

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**



**Hidroksiapatit Kaplı Güçlendirilmiş Non-absorbable Polifilaman Sütür**  
**Materyalinin Kemik – Tendon İyileşmesindeki Etkisi**

**(Uzmanlık Tezi)**

**DR. MUSTAFA ÖZKAYA**

**Tez Danışmanı**

**PROF.DR. GÖKHAN POLAT**

**İSTANBUL – 2024**

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamada etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmemiş olan bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak bu tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

**Dr. Mustafa Özkaya**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ön çapraz bağ yaralanmaları, sporcu popülasyonunun yanında genel popülasyonda da daha sık görülmeye başlamıştır. Bu sebeple ön çapraz bağ rekonstrüksiyonunun altın standart tedavi olarak uygulanma sıklığı artmaktadır. Ameliyat başarısı için rekonstrüksiyonda kullanılan tendon greftinin osseointegrasyonu önemlidir. Biz bu çalışmada biyoyumluluğu ile bilinen osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahip olan hidroksiapatit ile güncel rekonstrüksiyon pratiğinde tendon grefti hazırlarken kullanılan sütür materyalinin kaplanması kemik tendon iyileşmesi üzerine etkilerini hayvan deneyinde değerlendirmeyi amaçladık.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden itibaren her zaman desteğini hissettiğim, her türlü sorunumda engin tecrübeleriyle ve keyifli sohbetleriyle bana yol gösteren, hoşgörüsü, sabrı ve kendisinden hayata dair çok şey öğrendiğim anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hayati Durmaz hocama teşekkür eder ve ayrıca onun nezdinde kliniğimiz sekreter, hemşire ve personellerine de teşekkür ederim.

Spor cerrahisi alanında bizden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, ayrıca aileye, örf ve adetlere değer vermeyi öğreten, sorunlarımız ile ayrı ayrı ilgilenen, beraber çalıştığımız süre boyunca mesleki eğitimime olan eşsiz katkılarının yanında kendisinin hayata dair engin deneyimlerinden çokça faydalandığım Prof. Dr. Mehmet Aşık hocama teşekkür ederim.

Deformite ve artroplasti alanlarındaki tecrübelerini bizden esirgemeyen, birlikte çalışma fırsatı bulduğum dönemlerde teorik ve pratik olarak asistanlık eğitimimde çok şey öğrendiğim Prof.Dr. Cengiz Şen'e teşekkür ederim.

Eğitimim süresince iş ahlakını, hastaya verilmesi gereken önemi öğreten, teorik ve pratik anlamda eğitimimin her döneminde bana yol gösteren, tezimin oluşmasında ve devamında benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gökhan Polat'a teşekkür ederim.

Hidroksiapatit kaplanmış sütür materyalinin geliştirmesini yapan Bengisu Kubaşık ve Doç.Dr. Özgül Gök hocama, uzmanlık tezim vasıtasıyla çalışma şansı yakaladığım kendisiyle vakit geçirmek ve çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Bilge Bilgiç hocama, tezimde yardımlarını esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Ergün Poyraz'a teşekkür ederim.

Deformite alanında bilgi ve tecrübelerini bizimle her daim paylaşan, asistan eğitimine son derece duyarlı ve titizliğiyle bildiğim Prof. Dr. Halil İbrahim Balcı ağabeyime, çocuk ortopedisini bizlere sevdiren, hastalık yoktur hasta vardır ilkesini sürekli hatırlatan Prof.Dr. Fuat Bilgili ağabeyime, omuz dirsek cerrahisi üzerine bilgi ve birikimini istekle anlatan, bizlere olan hoşgörüsü ve arkadaşça yaklaşımını sürekli hissettiren sayın Prof.Dr. Ali Erşen ağabeyime, omurga cerrahisinde bizlere sürekli yol gösteren, hoşgörüsü ve anlayışıyla bizlere örnek olan Prof.Dr. Turgut Akgül ağabeyime teşekkür ederim.

Kas ve iskelet tümörlerinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız Doç. Dr. Ahmet Salduz ağabeyime, artroplasti tecrübesiyle asistanlık eğitimime eşsiz katkıları olan Doç.Dr. Ömer Naci Ergin ağabeyime, çocuk ortopedisi alanındaki bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, ikili ilişkileriyle örnek olan Doç.Dr. Yavuz Sağlam ağabeyime teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca sık bir şekilde çalışma fırsatım bulduğum, cerrahi bilgi ve tecrübelerinin yanısıra hayata dair bilgi ve tecrübelerini sürekli paylaşan, hekimlik hayatımda önemli bir yeri olan, kapısını her daim çalabildiğim ve zor zamanlarımda gerçekten ağabeylik yapan Op.Dr. Taha Kızılkurt ağabeyime teşekkür ederim. Asistanlık eğitimim süresince desteğini sürekli hissettiğim ve omurga cerrahisi alanında tecrübelerinden faydalandığım Op. Dr. Murat Korkmaz ağabeyime teşekkür ederim. El cerrahisine dair saat farketmeksizin hasta danışabildiğim ve bu alanda birçok şey öğrendiğim Op.Dr. Ömer Ayık ağabeyime, asistanlık eğitimim süresince ayak – ayak bileği alanındaki katkılarından dolayı Op.Dr. Mehmet Demirel ve kas – iskelet tümörleri alanındaki katkılarından Op.Dr. Serkan Bayram ağabeylerime teşekkür ederim. Asistanlığında da birlikte çalışma imkanım olan problemlere karşı pratik yaklaşımı ve sakin duruşunu örnek aldığım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Op.Dr. Alper Şükrü Kendirci ağabeyime teşekkür ederim.

Ayrıca asistanlığım boyunca dostluklarını her daim hissettiğim başta Dr. Oğuzhan Albayrak ve Dr. Yekta Furkan Altın olmak üzere diğer asistan arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca yanımda olan, sonsuz sevgi ve saygı duyduğum annem ve babam Fikriye ve Şemsi Özkaya'ya, çok sevdiğim kardeşlerim Hatice, Alattin ve Zeynep Özkaya'ya teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

<b>BEYAN .....</b>	<b>II</b>
<b>ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....</b>	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>IX</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ.....</b>	<b>X</b>
<b>I.ÖZET.....</b>	<b>1</b>
<b>II.GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>5</b>
<b>III.GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>7</b>
III.A.Ön Çapraz Bağ Rekonstrüksiyonu (ÖÇBR) .....	7
III.A.1.ÖÇB Anatomisi, ÖÇB Yaralanması .....	7
III.A.2.Greft Seçimi:.....	8
III.A.3.Tünel Yerleşimi: .....	10
III.A.4.Greft Gerginliği: .....	11
III.A.5.Greft Tespit Materyalleri: .....	11
III.B.Kemik – Tendon İyileşmesi (KTİ).....	12
III.B.1.Kemik Tendon Bileşkeleri (KTB).....	13
III.B.2.KTİ Hayvan Modelleri.....	17
III.B.3.KTİ Temel Prensipleri .....	19
III.C.Hidroksiapatit (HAp) .....	22
III.C.1.HAp ve Osteoindüktif Etki .....	24
III.D.Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT) .....	25
III.E.Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ve Mineral Karakterizasyonu .....	27
III.E.1.TEM Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (TEM - EDS) .....	28
<b>IV.MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>29</b>
IV.A.Sütürlerin Kaplanması .....	29

IV.A.1.Malzemeler .....	29
IV.A.2.Sütürlerin HAp ile Kaplanma Prosedürü.....	29
IV.A.3.Kaplama Prosedürü Değerlendirmesi.....	30
IV.A.4.HAp Kaplanmış Sütürlerin İn vitro Sitotoksisite Deneyi.....	33
IV.B-Hayvan Deneyi Tasarımı.....	33
IV.C.Mikroskopik Değerlendirme.....	37
IV.C.1.Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü .....	38
IV.C.2.Masson Trikrom Boyama Prosedürü .....	38
IV.C.3.Histolojik Görüntü Analizi .....	39
IV.D.Radyolojik Değerlendirme .....	39
IV.D.1.Mikro-BT Görüntü Analizi.....	41
IV.E.Biyomekanik Değerlendirme .....	42
IV.F.İstatistiksel Analiz.....	44
<b>V.BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
V.A.HAp Kaplama Prosedürü Bulguları .....	46
V.A.1.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin Morfolojik Analizi.....	46
V.A.2.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin Karakterizasyonu.....	51
V.A.3.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin İn vitro Sitotoksisite Deneyi.....	56
V.B.Mikroskopik Bulgular .....	56
V.B.1.KTA'nın Histomorfometrik Değerlendirmesi.....	56
V.B.2.KTİ Karakterizasyonu .....	57
V.C.Radyolojik Bulgular .....	63
V.D.Biyomekanik Bulgular .....	68
<b>VI.TARTIŞMA.....</b>	<b>69</b>
<b>VII.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>79</b>
<b>VIII. KAYNAKÇA .....</b>	<b>81</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hepsi içerde ve normal ÖÇBR’de sütür materyalinin KTA’da yer alması.....	6
Şekil 2: Femoral (A) ve tibial (B) ÖÇB yapışma bölgeleri .....	7
Şekil 3: Tek demet ve çift demet ÖÇBR artroskopik görüntüleri.....	8
Şekil 4: Hepsi içerde (A) ve normal (B) ÖÇBR sonrası radyografi ve tendon greftleri .....	9
Şekil 5: ÖÇBR’de kullanılan çeşitli otogreft tipleri.....	10
Şekil 6: ÖÇBR’de femoral tünel yerleşimlerinin tarihsel gelişimi .....	11
Şekil 7: İndirekt bir KTB tipi.....	14
Şekil 8: Yumuşak dokudan kemiğin derinliklerine uzanan Sharpey lifleri .....	15
Şekil 9: (Bir koyunda ÖÇB'nin femoral yapışma yeri, tipik bir direkt KTB .....	16
Şekil 10: İç içe geçmiş dört bölgeyi bir direkt KTB şematik gösterimi. ....	16
Şekil 11: Farklı greft tespit yöntemleri kullanılan koyunda intraartiküler KTİ modeli. ....	19
Şekil 12: Koyunlarda ÖÇBR’den 6 hafta sonra tibial tünelden uzunlamasına kesit .....	20
Şekil 13: Koyunlarda ÖÇBR’den 6 hafta sonra proksimal tibiadaki sagittal kesit .....	21
Şekil 14: HAp içeren bazı tasarlanmış skafoldlar .....	23
Şekil 15: Boyutlarına göre sıralanmış kalsiyum fosfat partikülleri.....	24
Şekil 16: Mikro-BT'nin temellerini gösteren şematik çizim .....	26
Şekil 17: İncelenen numune yüzeyi boyunca elektronların penetrasyon seviyeleri.....	27
Şekil 18: EDS'nin şematik görünümü. ....	28
Şekil 19: Jelatin ve HAp çözeltilerinin ısıtmalı manyetik karıştırıcı da hazırlanması .....	30
Şekil 20: Kaplama solüsyonlarına yerleştirilen sütürler .....	31
Şekil 21: Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) (Thermo Quattro S).....	31
Şekil 22: TEM - EDS analizi için sütür numunesi hazırlanışı .....	32
Şekil 23: Ekstraartiküler KTİ modeli ve sütür materyali ile tendonun hazırlanması .....	35
Şekil 24: Ekstraartiküler KTİ modeli, tavşanda uygulanan cerrahi prosedür .....	36
Şekil 25: Mikroskopik değerlendirme için hazırlanan numune görselleri .....	37
Şekil 26 Yüksek çözünürlüklü Mikro-BT sistemi .....	40
Şekil 27: INSTRON (MTS –Bionix II); biyomekanik çekme testi yapılan cihaz .....	43

## VIII

Şekil 28: : Biyomekanik değerlendirme için hazırlanan numune görselleri .....	44
Şekil 29: Kemik-tendon-kas kompleksi ile hazırlanan biyomekanik test düzeneği .....	45
Şekil 30: ‘N’ sütür numunesinin TEM görüntüleri .....	46
Şekil 31: ‘HA’ sütür numunesinin TEM görüntüleri .....	47
Şekil 32: ‘K1’ sütür numunelerinin TEM görüntüleri .....	48
Şekil 33: ‘K2’ sütür numunelerinin TEM görüntüleri .....	49
Şekil 34: : ‘K3’ sütür numunelerinin TEM görüntüleri .....	50
Şekil 35: N sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları. ....	51
Şekil 36: HA sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.....	52
Şekil 37: : K1 sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları. ....	53
Şekil 38: K2 sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları. ....	54
Şekil 39: K3 sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları. ....	55
Şekil 40: Grup I (Deney Grubu) 6’ncı hafta histolojik görüntüleri.....	59
Şekil 41: Grup II (Kontrol Grubu) 6’ncı hafta histolojik görüntüleri. ....	60
Şekil 42: Grup I (Deney Grubu) 12’nci hafta histolojik görüntüleri.....	61
Şekil 43: Grup II (Kontrol Grubu) 12’nci hafta histolojik görüntüleri. ....	62
Şekil 44: Grup I (Deney Grubu) 12’nci hafta mikro – BT görüntüleri.....	64
Şekil 45: Grup II (Kontrol Grubu) 12’nci hafta mikro – BT görüntüleri.....	65
Şekil 46: Grup I (Deney Grubu) 12’nci hafta mikro – BT 3 boyutlu görüntüleri.....	66
Şekil 47: Grup II (Kontrol Grubu) 12’nci hafta mikro – BT 3 boyutlu görüntüleri .....	67

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 1. Hayvan deneyi çalışma planı .....	34
Tablo 2. Histomorfometrik değerlendirmelerde 6'ncı ve 12'nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar .....	58
Tablo 3. Radyolojik değerlendirmelerde 12'nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar .....	63
Tablo 4: KTİ yapısal özelliklerinin 12'nci hafta gruplar arası biyomekanik karşılaştırmaları ...	68



**KISALTMALAR LİSTESİ**

**BMP:** Bone morphogenetic protein - Kemik morfojenetik protein

**CaP:** Kalsiyum fosfat

**EDL:** Ekstansör dijitorum longus

**EDS:** Enerji dağıtıcı spektrum

**FİZ:** Fibröz interzon

**HAp:** Hidroksiapatit

**K – PT – K:** Kemik patellar tendon kemik otogrefti

**KİA:** Kemik iliği aspiratı

**KMY:** Kemik mineral yoğunluğu

**KTA:** Kemik – tendon arayüzü

**KTB:** Kemik – tendon bileşkesi

**KTİ:** Kemik – tendon iyileşmesi

**Mikro – BT:** Mikro bilgisayarlı tomografi

**MKH:** Mezenkimal kök hücre

**OPG:** Osteoprotegerin

**ÖÇB:** Ön çapraz bağ

**ÖÇBR:** Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu

**PKL:** Polikaprolakton

**PLLA:** Poli L – laktik asit

**PY:** Periosteal yama

**TEM:** Taramalı elektron mikroskobu

## I.ÖZET

### Hidroksiapatit Kaplı Güçlendirilmiş Non-absorbable Polifilaman Sütür

#### Materyalinin Kemik – Tendon İyileşmesindeki Etkisi

**Giriş:** Ön çapraz bağ (ÖÇB) yaralanmaları sporcu popülasyonun yanısıra normal popülasyonda da sıklığı her geçen gün artmakta ve tedavi sürecinde ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu (ÖÇBR) ameliyatı ön plana çıkmaktadır. ÖÇBR sonrasında kullanılan tendon grefti ile kemik tünel arayüzündeki iyileşmeyi arttırıcı tıbbi uygulamalar günümüzde araştırılmaktadır. Hidroksiapatit(HAp) kemik defektlerinde, artroplasti ve diş hekimliği implantlarında kullanılan fakat kemik – tendon iyileşmesini (KTİ) arttırmaya yönelik uygulamaları kısıtlı olan bir materyal. Biz bu çalışmamızda ÖÇBR’de tendon grefti hazırlığında kullanılan güçlendirilmiş non-absorbable sütür materyalinin HAp ile kaplanması KTİ üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

**Materyal ve Metot:** Sütür materyalinin kaplanması prosedüründe HAp’ın sütür materyaline stabil ve yaygın bir katman oluşturarak kaplanması için jelatin ile hazırlanan çözelti ve HAp kristallerinin çözünmesini sağlayan HAp ile hazırlanan çözelti kullanıldı. Kaplama işlemi sonrasında kaplı sütür materyallerinin taramalı elektron mikroskobu (TEM) ve enerji dağıtıcı spektrum (EDS) analizleri yapıldı. Hayvan deneyi için 16 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanılması planlandı ve her iki (sağ – deney grubu, sol – kontrol grubu) dizde de ekstraartiküler KTİ hayvan modeline yönelik cerrahi prosedür uygulandı. Tavşanların 4 tanesi 6’ncı haftada erken dönem histolojik değerlendirme, geri kalanları ise 12’nci haftada (n=4) histolojik, radyolojik ve biyomekanik değerlendirme için kurban edildi. HAp kaplı sütür materyalinin KTİ üzerine etkisini değerlendirmek için histomorfometrik analizler, histolojik kesitlerde KTİ karakterizasyonu, mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro – BT) ile yeni oluşan kemik miktarı, kemik mineral yoğunluğu (KMY), kemik tünelin daralması ve çekme testi ile de kopma kuvveti, sertlik, deplasman vb. parametreler değerlendirildi.

**Bulgular:** Histolojik değerlendirmelerde 6 ve 12’nci haftada histomorfometrik analizler sonucu deney grubunda kemik/fibröz interzon oranı (alan oranı 6’ncı hafta  $1.24 \pm 0.14$ , 12’nci hafta  $2.07 \pm 0.47$ ; derinlik oranı 6’ncı hafta  $1.12 \pm 0.18$ , 12’nci hafta  $1.87 \pm 0.42$ ) Kontrol Grubuna kıyasla (alan oranı 6’ncı hafta  $0.45 \pm 0.18$ , 12’nci hafta  $0.74 \pm 0.11$ ; derinlik oranı 6’ncı hafta  $0.46 \pm 0.26$ , 12’nci hafta  $0.71 \pm 0.21$ ) anlamlı olarak daha yüksek (alan oranı 6’ncı hafta  $p=0.011$ , 12’nci hafta  $p=0.013$ ; derinlik oranı 6’ncı hafta  $p=0.022$ , 12’nci hafta  $p=0.017$ ), yeni oluşan

çevresel kemik miktarı (%) ise sadece 6'ncı haftada deney grubunda ( $89.17 \pm 5.97$ ) kontrol grubuna kıyasla ( $29.66 \pm 10.05$ ) anlamlı olarak daha yüksek ( $p=0.012$ ) görüldü. Ayrıca histolojik kesitlerde KTİ karakterizasyonu sonucu 6 ve 12'nci haftada da fibrokartilaj tabaka, Sharpey lifleri, tendondan kemiğe doku olarak geçişin belirsizliği, interdijitasyon, tidemark vb. kriterlere göre deney grubunda kontrol grubundan daha iyi sonuçlar (6'ncı haftada daha belirgin olmak üzere) görüldü. Radyolojik değerlendirmelerde ise mikro – BT analizleri sonrasında Deney Grubunda KMY'nin ( $2.09 \pm 0.41$ ) Kontrol Grubuna kıyasla ( $1.35 \pm 0.36$ ) anlamlı olarak daha fazla ( $p=0.037$ ) olduğu, kemik tünel çevresinin de (sırasıyla  $1551 \pm 49.6$ ,  $1707.6 \pm 42.38$ ) anlamlı olarak daha az olduğu ( $p=0.004$ ) yani daha fazla daraldığı görüldü. Biyomekanik değerlendirmeler sonrasında ise Deney Grubunda Kontrol Grubuna kıyasla kopma kuvveti (sırasıyla  $23.91 \pm 15.03$ ,  $29.63 \pm 15.25$ ) ve deplasman miktarının (sırasıyla  $10.83 \pm 4.86$ ,  $12.6 \pm 4.58$ ) daha az olduğu görüldü fakat anlamlı değildi (sırasıyla  $p=0.069$ ,  $p=0.148$ ). Sertlik değerlendirmesinde ise Deney Grubu ( $4.22 \pm 1.33$ ) Kontrol Grubundan ( $3.18 \pm 0.76$ ) anlamlı olarak daha yüksekti ( $p=0.044$ ). Numunelerin kopma yerlerine baktığımızda ise Deney grubunun tamamı kemik tendon bileşkesinden koparken, kontrol grubunda ise bir numune hariç tendonlar tünelden sıyrıldı.

**Sonuç:** Hidroksiapatit kaplı güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütür materyalinin normal sütür materyaline kıyasla KTİ'deki etkisinin erken dönemde belirgin olmak üzere olumlu yönde olduğu histolojik, radyolojik ve biyomekanik değerlendirmeler sonrasında gösterildi. Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda klinik uygulamalara geçilebilmesi adına daha ileri klinik çalışmaların yapılması önerilir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidroksiapatit, Kemik – tendon iyileşmesi, Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu, Non-absorbable sütür

## ABSTRACT

### **The Effect of Hydroxyapatite Coated Reinforced Non-absorbable Polyfilament Suture Material on Tendon - Bone Healing**

**Introduction:** The incidence of anterior cruciate ligament (ACL) injuries is increasing day by day in the normal population as well as in the athletic population and anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) surgery comes to the forefront in the treatment process. The inability to start rehabilitation early after surgery and the increase in revision surgery rates cause patients to have problems in returning to normal life and increase costs. Hydroxyapatite (HAp) is a material that is used in bone defects, arthroplasty and dental implants and also has applications to increase tendon-bone healing (TBH). In this study, we aimed to investigate the positive effects on BTH after HAp coating of reinforced non-absorbable suture material, which we prefer because of its use in tendon graft preparation in SCBR, although it is frequently used in bone-tendon injuries.

**Material and Method:** In the suture material coating procedure, a solution prepared with gelatin was used to coat HAp by forming a stable and widespread layer on the suture material and a solution prepared with Hapil to dissolve HAp crystals. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectrum (EDS) analyses of the coated suture materials were performed after the coating process. For the animal experiment, 16 New Zealand rabbits were planned to be used and both knees (right - experimental group, left - control group) underwent surgical procedure for extra-articular BTH animal model. Four of the rabbits were sacrificed at the 6th week for early histological evaluation and the rest were sacrificed at the 12th week (n=4) for histological, radiological and biomechanical evaluation. To evaluate the effect of HAp-coated suture material on TBH, histomorphometric analyses and characterisation of TBH in histological sections were performed. In addition, the amount of newly formed bone, bone mineral density (BMD), narrowing of the bone tunnel were evaluated by micro-computed tomography (Micro-CT) and parameters such as failure load, stiffness, displacement etc. were evaluated by tensile test.

**Results:** In histological evaluations, as a result of histomorphometric analyses at 6 and 12 weeks, bone/fibrous interzone ratio in the experimental group (area ratio  $1.24 \pm 0.14$  at 6 weeks,  $2.07 \pm 0.47$  at 12 weeks; depth ratio  $1.12 \pm 0.18$  at 6 weeks,  $1.87 \pm 0.42$  at 12 weeks) The amount of newly formed circumferential bone (%) was significantly higher in the experimental

group (area ratio  $0.45\pm 0.18$  at week 6,  $0.74\pm 0.11$  at week 12; depth ratio  $0.46\pm 0.26$  at week 6,  $0.71\pm 0.21$  at week 12) compared to the control group (area ratio  $p=0.011$  at week 6,  $p=0.013$ ; depth ratio 6th week  $p=0.022$ , 12th week  $p=0.017$ ), and the amount of newly formed circumferential bone (%) was significantly higher in the experimental group ( $89.17\pm 5.97$ ) compared to the control group ( $29.66\pm 10.05$ ) only in the 6th week ( $p=0.012$ ). In addition, as a result of CTT characterisation in histological sections, better results were observed in the experimental group than in the control group (more prominent in the 6th week) according to criteria such as fibrocartilage layer, Sharpey fibres, uncertainty of the transition from tendon to bone as tissue, interdigitation, tidemark, etc. at 6 and 12 weeks. In radiological evaluations, after micro-CT analyses, BMD in the experimental group ( $2.09\pm 0.41$ ) was significantly higher ( $p=0.037$ ) compared to the control group ( $1.35\pm 0.36$ ) and bone tunnel circumference ( $1551\pm 49.6$ ,  $1707.6\pm 42.38$ , respectively) was significantly less ( $p=0.004$ ), i.e. more narrowed. After the biomechanical evaluations, it was observed that the rupture force ( $23.91\pm 15.03$ ,  $29.63\pm 15.25$ , respectively) and displacement ( $10.83\pm 4.86$ ,  $12.6\pm 4.58$ , respectively) were less in the Experimental Group compared to the Control Group, but not significantly ( $p=0.069$ ,  $p=0.148$ , respectively). In the hardness evaluation, the Experimental Group ( $4.22\pm 1.33$ ) was significantly higher than the Control Group ( $3.18\pm 0.76$ ) ( $p=0.044$ ). When we look at the rupture sites of the specimens, all of the specimens in the experimental group ruptured from the bone tendon junction, while in the control group, except for one specimen, the tendons were stripped from the tunnel.

**Conclusion:** After histological, radiological and biomechanical evaluations, it was shown that hydroxyapatite coated reinforced non-absorbable polyfilament suture material had a positive effect on TBH compared to normal suture material, more prominent in the early period. In line with the results of our study, further clinical studies are recommended for clinical applications.

**Keywords:** Hydroxyapatite, Tendon – bone healing, Anterior cruciate ligament reconstruction, Non-absorbable suture

## II.GİRİŞ VE AMAÇ

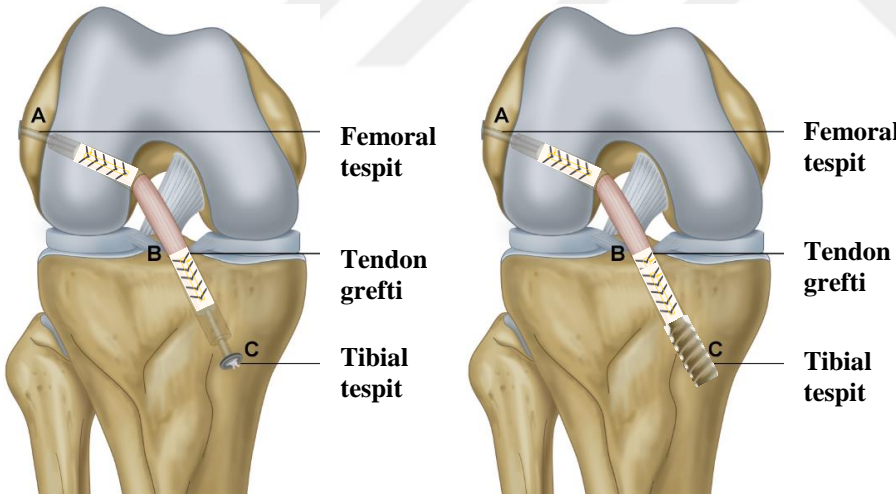
Ön çapraz bağ (ÖÇB) yaralanmaları, sporcu popülasyonun yanında genel popülasyonun da yüksek yoğunluklu pivotale aktivite içeren fiziksel aktivitelere artan katılımı nedeniyle daha sık görülmeye başlamıştır. Genç-erişkin popülasyonun ÖÇB yaralanma yıllık insidansı 100.000’de 68,6 olmakla birlikte ABD’de yılda 200.000 ila 400.000 ÖÇB yaralanması meydana gelmekte ve yaklaşık 175.000 hastaya ise ÖÇB rekonstrüksiyonu (ÖÇBR) ameliyatı yapılmaktadır (1-3). Spor cerrahisi alanında en sık görülen yaralanma ve en sık yapılan ameliyat olması nedeniyle ÖÇBR için bir çok teknik tanımlanmıştır; artrotomi yapılan açık rekonstrüksiyondan minimal invaziv, tamamen içeride rekonstrüksiyona kadar (4). Bu teknikler arasında tendon grefti kullanımı mutabık olunan tek unsurdur. Son yıllarda greft seçimi, greft alma yöntemi, greft tespiti ve tibial - femoral tünellerin konumlandırılması literatürde tartışmaya açık konular olmuştur. Bu konuları özellikle araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır; genel sonuçları tatmin edici olan bu farklı cerrahi teknikler arasında önemli bir fark ortaya konulamamıştır (5, 6).

ÖÇBR ameliyatı bir tendon greftinin femoral ve tibial tünellerden geçirilerek tibia ve femur kemiklerine tespit edilmesini gerektirir. Kemik tünel ile tendon arasındaki yüzeyin uygun bir entegrasyon için biyolojik olarak elverişli olmaması ve kemik – tendon iyileşmesinin (KTİ) nispeten uzun sürmesi ameliyat sonrası önemli bir klinik sorundur. ÖÇBR’de KTİ, kemiğin greft içine büyümesi ile birlikte kemiğe doğru dolaylı olarak uzanan ve bağlanan (Sharpey lifleri) fibröz doku oluşumu aracılığıyla meydana gelmektedir (7). KTİ yaklaşık 6’ncı haftada oluşmaya başlar, fakat kullanılan tendon greftinin eklem içindeki kısmının en zayıf nokta olmasına kadar yani KTİ oluşana kadar yaklaşık 12 hafta geçmesi gerekir (8). Bu nedenle rekonstrüksiyon sonrası dönemde erken aktiviteden kaçınmanın kemik – tendon arayüzünde (KTA) sağlıklı ve sürekli bir biyolojik iyileşme süreci için yararlı olduğu da savunulmaktadır. Diğer yandan rekonstrüksiyon sonrası uzun süreli immobilizasyon tendonu zayıflatır, eklem sertliğine neden olur ve fonksiyonel sonuçları olumsuz etkileyebilir (9).

KTİ’yi hızlandırmak ve güçlendirmek için farklı yöntemler ortaya konmuştur (10-12). Bunlar arasında, KTA’ya osteoindüktif materyallerin yerleştirilmesi maliyet etkin görünmesinin yanında ÖÇBR’ye kolayca entegre edilebilmesi nedeniyle çok umut verici bir strateji olarak görünmektedir. Bu stratejiye binaen literatürde kolajen, şitosan, polikaprolakton vb. polimer osteoindüktif materyallerin yama şeklinde tendon etrafına sarıldığı, kolajen, hidroksiapatit (HAp), fibrin vb. osteoindüktif materyallerin yapıştırıcı formunda tünele enjekte edildiği, HAp,

polikarbonat vb. osteoindüktif materyallerden yapılan tespit amaçlı kullanılan arayüz vidalarının KTA'ya yerleştirildiği görülmektedir. Bunların yanında başta kemik morfojenetik protein (bone morphogenetic protein, BMP) olmak üzere granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF), transforme edici faktör beta (transforming growth factor beta 1, TGF-B1) vb. osteoindüktif faktörlerin kullanıldığı ilaç salınım sistemlerinin tendonu yamayla sarma yöntemi vb. tekniklerle KTA'ya yerleştirildiği de görülmektedir (13).

Günümüzde tendon grefti ÖÇBR için hazırlanırken greft uçları farklı sütür teknikleri ile hazırlanmakta ve greft uçları ile birlikte kullanılan sütür materyali de kemik tünel içinde KTA'da yer almakta (14) (Şekil 1). Bu sütür teknikleri her ne kadar farklılık gösterse de greft hazırlığı için piyasada kullanılan sütür materyallerinin çoğu polietilen içerikte non-absorbable olup polifilaman yapıdadır. HAp genellikle biyouyumluluğu ile bilinir ve hayvan çalışmalarında KTİ'yi arttırdığı gösterilmiştir (15). İmplantların HAp ile yüzey modifikasyonu için kullanılan yöntemler arasında biyomineralizasyon, lazer puls biriktirme, plazma püskürtme, elektrokimyasal biriktirme, elektroforetik biriktirme ve daldırma-kaplama yer almaktadır (16)



**Şekil 1:** Hepsisi içerde (sağ), normal (sol) ÖÇBR' de sütür materyalinin kemik tüneli içinde KTA'da yer alması. 'Yang YT, et al. All-Inside Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Review of Advance and Trends. Front Biosci (Landmark Ed). 2022 Mar 8;27(3):91.'

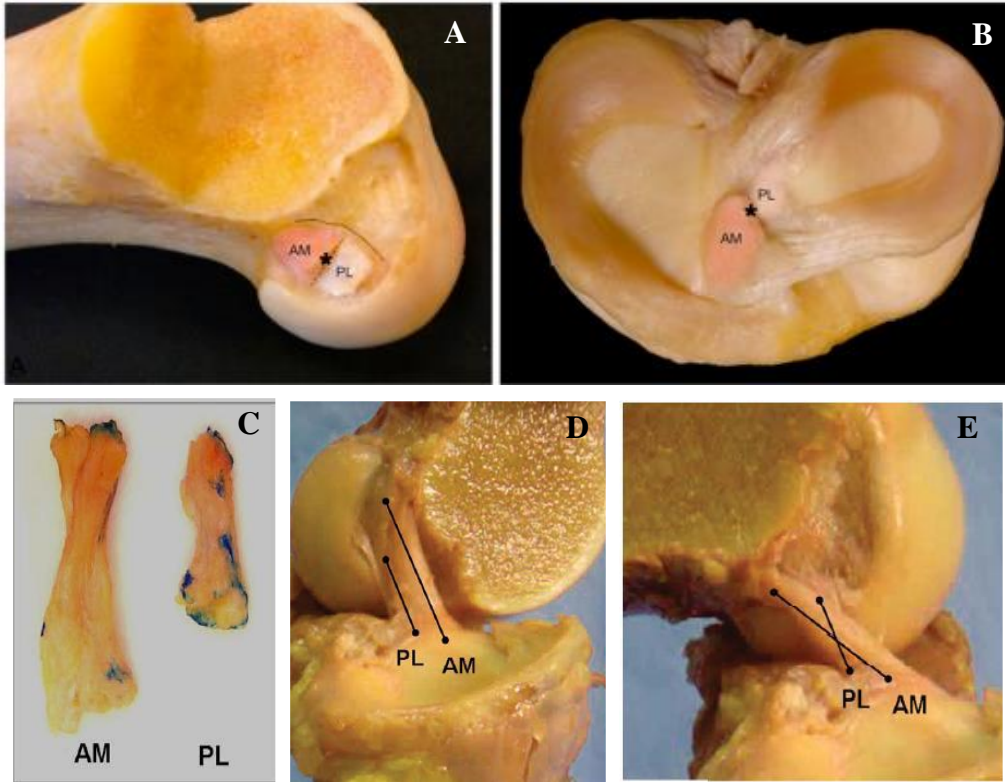
Biz bu çalışmada osteokondüktif özelliğinin yanında osteoindüktif etki de gösteren materyallerden olan HAp kristalleri (17-19) ile kaplı güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütürün KTA üzerine olan etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Tendon grefti hazırlamada kullanılacak olan sütür materyali aracılığıyla HAp'in kemik ile tendon arasında biyoaktif ve osteoindüktif etkisi ile KTİ'yi güçlendirmeye yönelik bir köprü görevi göreceğini varsaydık (18). Bu amaçla KTA'nın fonksiyonel iyileşmesini ve gücünü değerlendirmek için radyolojik görüntülemeler, histolojik ve biyomekanik değerlendirmeler yapıldı.

### III.GENEL BİLGİLER

#### III.A.Ön Çapraz Bağ Rekonstrüksiyonu (ÖÇBR)

##### III.A.1.ÖÇB Anatomisi, ÖÇB Yaralanması

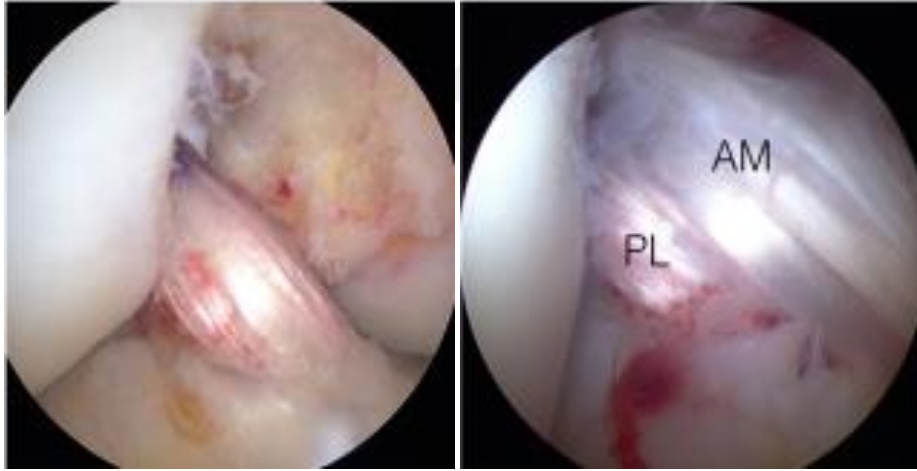
Diz eklemi, statik bağlar ve dinamik kas kuvvetleri ile eklem yüzeylerinin birleşik etkisiyle sağlam kalır. Femur ve tibia arasındaki eşgüdümlü kayma ve yuvarlanma hareketleri sayesinde geniş bir hareket arki elde edilir (20). Dizin dengeli hareketinde önemli rol oynayan dört bağdan biri olan ön çapraz bağ (ÖÇB), rotasyonel ve translasyonel destek sağlar (21). ÖÇB'nin anteromedial (AM) ve posterolateral (PL) olmak üzere iki fonksiyonel demeti, dizin ön-arka ve kompleks rotasyonel hareketlerinde farklı rollere sahiptir (22) (Şekil 2).



**Şekil 2:** Femoral (A) ve tibial (B) ÖÇB yapışma bölgeleri, eksiz edilen AM ve PL demetler (C), diz ekstansiyonda iken demetler paralel (D), diz fleksiyonda iken demetler birbirini çaprazlar (E). 'Irrarrazaval S, Kurosaka M, Cohen M, et al. JISAKOS 2016;1: 38-52, p:45' ve 'Prodromos, et al. (2007) The Anterior Cruciate Ligament: Reconstruction and Basic Science 1st Edition, Elsevier, USA, p:5, 7'

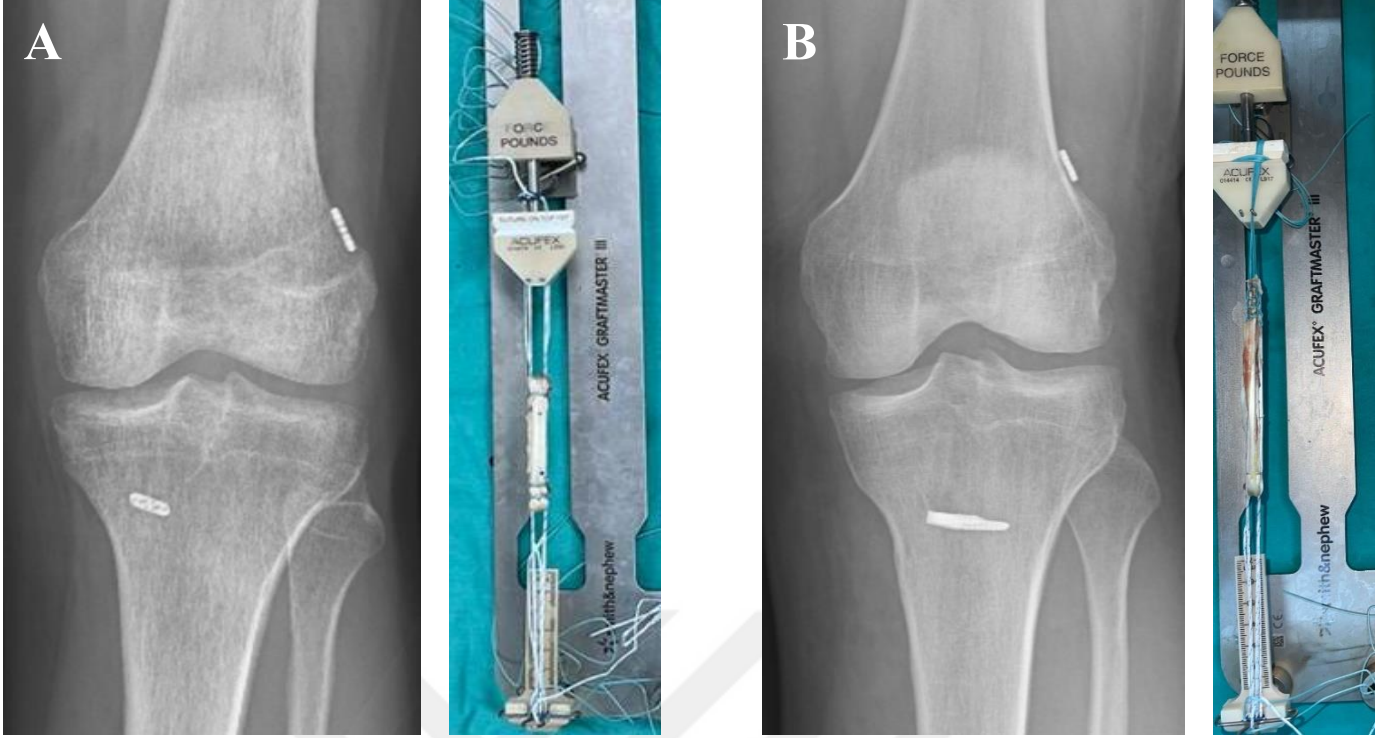
ÖÇB yaralanmalarının tedavi yöntemleri, görülme sıklığının artması nedeniyle önemli bir odak konusu olmuştur. Bu tedavilerin temel amacı, hastaların yaralanma öncesi işlev düzeylerine geri döndürülmesidir. Çeşitli tedavi yöntemleri ve rehabilitasyon yaklaşımları geliştirilmiştir ancak ÖÇB tamamen koptuğunda bağın iyileşme kapasitesinin kısıtlı olması nedeniyle ÖÇB rekonstrüksiyonu tercih edilmektedir (23). Artroskopik cerrahi prosedürlerdeki gelişmeler, doğal ÖÇB'nin fonksiyonuna yakın rekonstrüksiyonların yapılmasını mümkün kılmıştır (24). Klinik ve fonksiyonel değerlendirmeler, anatomik rekonstrüksiyonların daha olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir ve bu sonuçlarla modern artroskopik ÖÇBR yaklaşımları eski tekniklerin yerini almıştır (25) (Şekil 3,4).

ÖÇBR, eklemi stabilize ederek tibiofemoral kinematiği yeniden sağlar ve uzun vadede dejeneratif süreçlerden korur (26). Özellikle genç, aktif ve elit sporcular için cerrahi tedavi genellikle daha uygun görülür (27). Ancak cerrahi müdahale kararını etkileyen başka faktörler de vardır. ÖÇB yaralanmaları ile birlikte menisküs yırtıkları, akut osteokondral lezyonlar veya çoklu bağ yaralanmaları gibi ek patolojiler, cerrahi tedavi seçiminde belirleyici olabilir.



**Şekil 3:** Tek demet - TD (solda) ve çift demet – ÇD (sağda) ÖÇBR artroskopik görüntüleri. *Trarrázaval S, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction JISAKOS 2016;1: 38-52, p:48'*

**III.A.2.Greft Seçimi:** Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu (ÖÇBR) cerrahisinde greftler önemli bir rol oynar ve genellikle allogreftler ve otogreftler olarak iki kategoriye ayrılır. Greft seçimi, hastanın durumu, aktivite seviyesi, yaşı ve cerrahin tercihinine göre yapılır.



**Şekil 4:** Hepsi içinde (A) ve normal (B) ÖÇBR sonrası radyografi ve kullanılan tendon greftleri..  
*'İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Prof.Dr. G. Polat arşivi'*

#### a. Allogreftler:

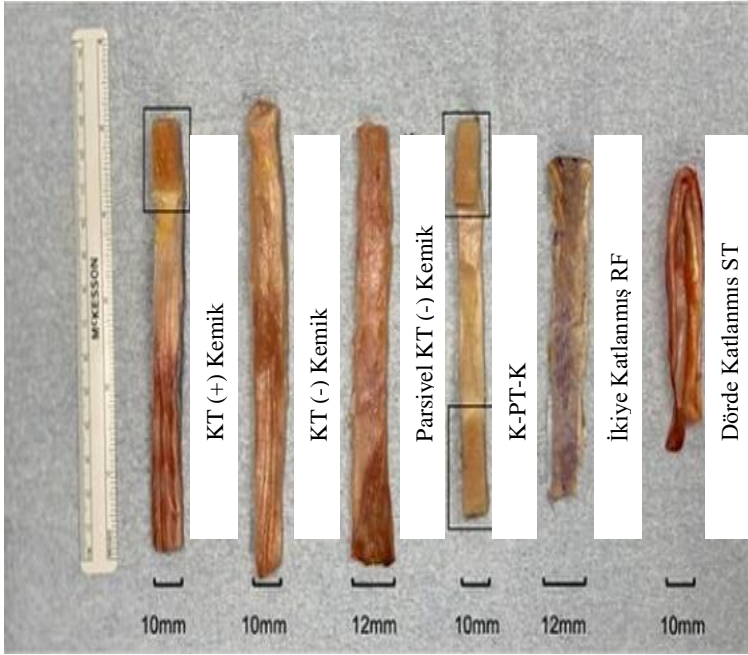
Kadavralardan temin edilen greftlerdir ve greft alınan donör bölgesinde morbidite olmaması gibi avantajlara sahiptir. Bu, cerrahinin daha az invazif olmasını ve daha hızlı iyileşmeyi sağlar. Allogreftler cerrahi ve rehabilitasyon sürelerini kısaltarak hastaların normal aktivitelere daha hızlı dönmesine olanak tanır. Ayrıca postoperatif ağrı azalır ve kozmetik sonuçlar daha iyidir (26). Ancak biyolojik uyumlarının az olması, temin edilmesinin zor ve maliyetli olması gibi dezavantajları vardır. ÖÇB rekonstrüksiyonunda aşil tendonu, tibialis anterior tendonu, hamstring tendonu ve tensor fasya lata gibi çeşitli allogreftler kullanılabilir (27).

#### b. Otogreftler: (Şekil 5)

**(1). Kemik-patellar tendon-kemik otogrefti (K-PT-K):** Yüksek tensil güce sahip olması ve kolay alınabilir olması gibi avantajlarla tercih edilen bir greft yöntemidir. Kemik-kemik iyileşme imkanı sunması eklem içinde sağlam bir tespit imkanı sağlar. Ancak donör sahada morbiditeye hatta komplikasyonlara neden olabilirler. Ayrıca diz eklemi ekstansör mekanizmasını olumsuz etkileyebilir (28).

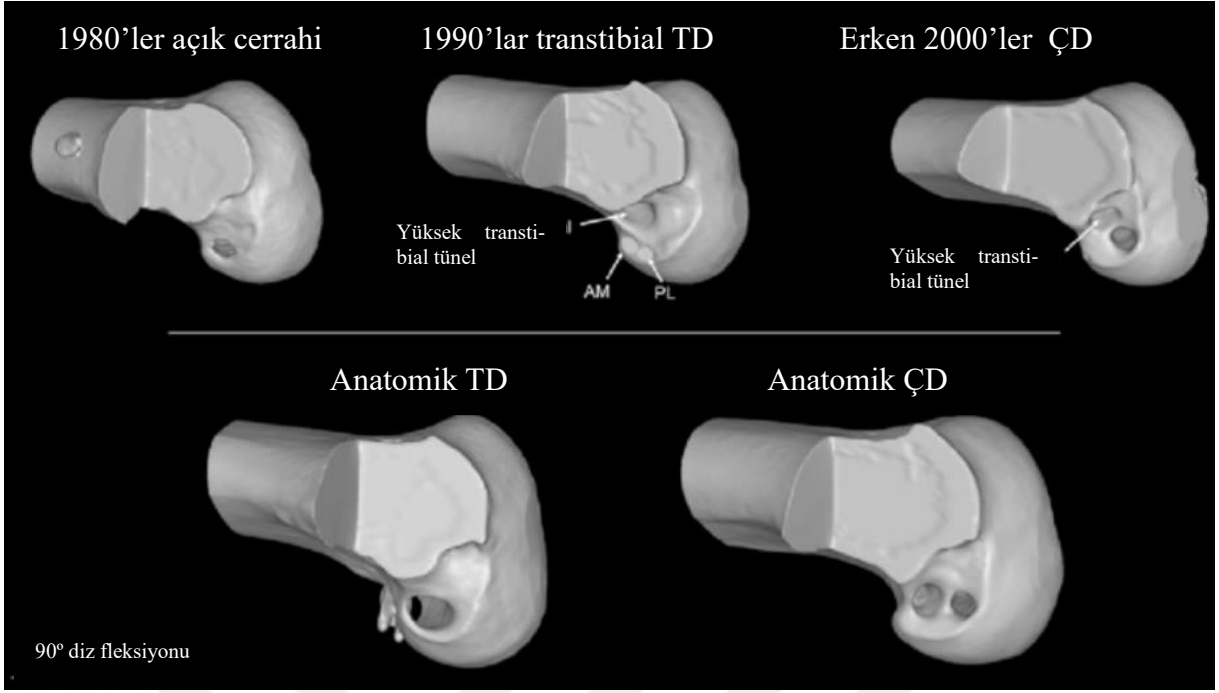
**(2).Hamstring Otogrefti:** ÖÇBR’de kullanılan greftin doğal ÖÇB’ye daha yakın olması eklem mekaniğini ve stabilitesini daha iyi yeniden oluşturabilir. K-PT-K tendonunun etkilerinin olmaması da greft seçiminde önemli bir faktördür. Ancak yavaş greft-tünel iyileşmesi, greftin eklem içinde uzun sabitleme süreci ve potansiyel tünel genişlemesi ve gevşeklik gibi dezavantajları vardır, ki bu da cerrahi sonrası komplikasyon riskini artırabilir (25).

**(3).Kuadriseps Otogrefti (KT):** Diğer greft tiplerine kıyasla daha üstün tensil özelliklerine sahiptir. Geniş yüzey alanı ve kalın yapısı, daha güçlü bir dayanma ve gerilme yeteneği sağlar. Bu tendonun geniş yüzey alanı, tünel içinde hareketin daha az olmasını sağlayarak greftin eklemde daha stabil bir şekilde yerleştirilmesine ve daha sağlam bir iyileşme sürecine olanak tanır. Bu özellikler, kuadriseps tendonunu hamstring ve patellar tendon greft seçeneklerine tercih edilebilir kılar (29).



**Şekil 5:** ÖÇBR’de kullanılan çeşitli otogreft tipleri, RF (Rektus Femoris). ‘Strauss MJ et al (2022). Full thickness quadriceps tendon grafts with bone had similar material properties to bone-patellar tendon-bone and a four-strand semitendinosus grafts: a biomechanical study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 30(5), 1786-1794.’

**III.A.3.Tünel Yerleşimi:** Femoral ve tibial tünellerin doğru konumlandırılması, greftin uzunluğu ve pozisyonu ile ilişkilidir ve eklem mekaniğinin restore edilmesi ve stabilizasyonun sağlanması için kritiktir. Yanlış açılan tüneller, greftin istenilen stabiliteyi sağlayamamasına ve eklem hareketinde anormalliklere neden olabilir. Hassas cerrahi teknikler ve uygun cerrahi planlama ile doğru tünel yerleşimi sağlanarak istenilen klinik sonuçlar elde edilebilir (30). Doğal ÖÇB anatomisine en uygun tünel yerleşimi, greftin doğal ÖÇB’nin yerini ve hareketini taklit etmesini sağlar ve genelde kabul edilen bir altın standart olarak kabul edilir (30) (Şekil 6).



**Şekil 6:** ÖÇBR'de femoral tünel yerleşimlerinin tarihsel gelişimi, TD (Tek Demet), ÇD (Çift Demet). *Kopf, S. et al (2012). Transtibial ACL reconstruction technique fails to position drill tunnels anatomically in vivo 3D CT study. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 20, 2200-2207.*

**III.A.4.Greft Gerginliği:** Greftin başarılı bir şekilde iyileşebilmesi için uygun biyolojik ortam ve doğru gerginlik seviyesinin sağlanması gereklidir. Uygun gerginlik, diz kinematiğinde anormallikleri önler ve iyileşmeyi olumlu etkiler (31). Otojen greftler, erken dönemde fibroblast nekrozu ve revaskülarizasyon süreciyle yapısal ve mekanik özelliklerini kazanır (32). Literatürde greft gerginliği ile ilgili farklı görüşler vardır; bazı çalışmalar yüksek gerginliğin greft yapısına zarar verdiğini, bazıları ise daha iyi eklem stabilizasyonu sağladığını belirtir (33, 34). Bu nedenle, başarılı bir rekonstrüksiyon için greftin uygun gerginlik seviyesinin sağlanması ve doğru cerrahi tekniklerin kullanılması önemlidir.

**III.A.5.Greft Tespit Materyalleri:** Sağlam bir greft tespiti KTA iyileşmesi sağlanana kadar erken dönemde yük verilmesine ve rehabilitasyona imkan sağlar (35). K-PT-K greftleri tünelde stabil sert bir tespiti sağlar ve kemik-kemik iyileşmesine sahiptir. Ancak hamstring otogreftlerinin KTİ farklılık göstermektedir. Greftin kemiğe tespitinin ideal bir şekilde yapılması için materyaller ve teknikler farklılık göstermektedir. Sabit looplu/ayarlanabilir looplu kortikal askı sistemleri, interferans vidaları, U çivileri (staple), suture post vidaları, dişli pullu vidalar (spiked washer)...vb. olmak üzere çeşitli tespit materyalleri kullanılmaktadır.(36).

ÖÇBR fonksiyonel ve klinik sonuçları belirleyen faktörler; donör greft tipi, tünellerin anatomik pozisyonu, greftin tespit materyalleri ve gerginliği, rekonstrüksiyon esnasında dizin pozisyonu... vb. olarak sıralanabilir (37-41).

ÖÇB revizyon ameliyatları sıklığının artmasının birçok sebebi var ve bu artışın ekonomik, duygusal ve fiziksel etkileri de oldukça önemlidir. Ameliyat sonrası sürecin daha etkili takip protokolleriyle desteklenmesi, hastaların talep ve beklentilerinin artması, aktivite seviyelerinin yükselmesi ve cerrahi müdahalelerin genç yaşlarda daha sık yapılması gibi faktörler revizyon riskini arttırabilir. Bu durumun ekonomik boyutu da göz ardı edilmemeli. Bununla birlikte, ÖÇB yaralanmaları sadece fiziksel sağlığı değil, aynı zamanda duygusal sağlığı da etkileyebilir. Ek cerrahi müdahalelerin neden olduğu psikolojik travma, uzun ve zorlu rehabilitasyon süreçlerinden kaynaklanan hayal kırıklığı ve motivasyon kaybı gibi durumlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, hastaların duygusal ve fiziksel ihtiyaçlarına uygun destek sağlamak ve ameliyat sonrası süreci dikkatli bir şekilde yönetmek son derece önemlidir. Gelişmiş ameliyat tekniklerinin uygulanması ve ameliyat sonrası sürecin iyi bir şekilde yönetilmesi, hastaların daha iyi sonuçlar elde etmesine yardımcı olabilir. Bu, cerrahi müdahalelerin etkinliğini arttıracak ve revizyon ameliyatlarının gereksinimini azaltmakla birlikte fonksiyonel sonuçları daha iyi hale getirecek ve hastaların yaşam kalitesini arttıracaktır. (42).

### **III.B.Kemik – Tendon İyileşmesi (KTİ)**

Tendon yaralanmalarının çoğu tendonun orta kısmından veya yaralanma sırasında kemikten ayrılma şeklinde oluşmaktadır. KTA'da doğrudan yaralanma oldukça nadir görülse de tendon yapılarının yaralanma veya cerrahi müdahale sonrasında KTA'da uygun şekilde iyileşmesi önemlidir. Bu iyileşme, ilgili fonksiyonel hareket biriminin tam olarak yeniden sağlanması için temel bir gerekliliktir. Özellikle rotator manşet yırtıkları gibi durumlarda, tendon dokusunun yaralanmadan önce dejeneratif değişiklikler gösterdiği durumlarda bile, genellikle KTB'ye yakın bir yerde hasar meydana gelir. Genellikle bu KTA'da iyileşme genellikle gerçekleşmez. Bunun yerine, çoğu anatomik yapıda, iyileşme süreci tendon greftleri, yumuşak doku greftleriyle ön/arka çapraz bağların rekonstrüksiyonu veya tendon grefti kullanılan el, ayak ve ayak bileği cerrahisi gibi işlemler sonrasında ortaya çıkar.

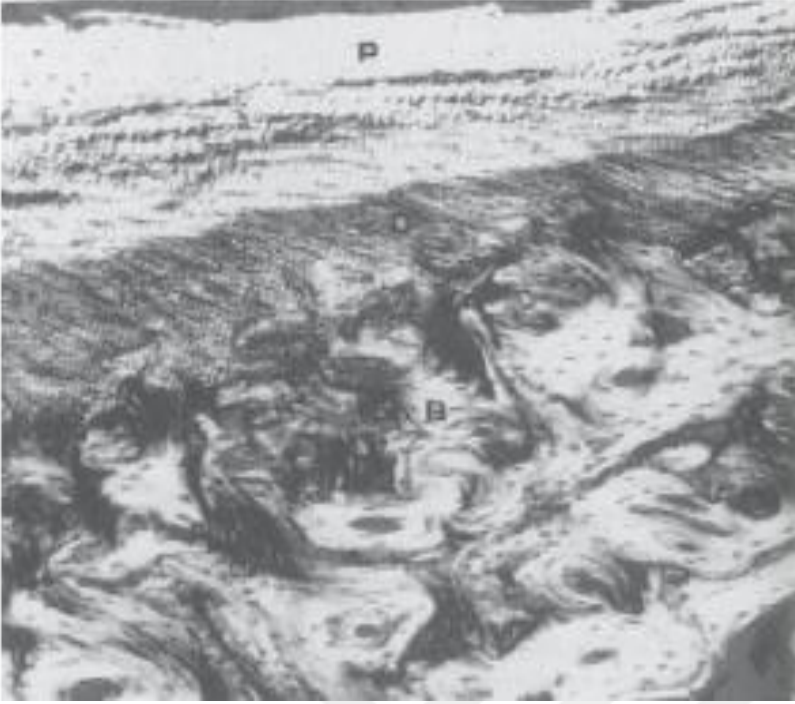
ÖÇBR sonrası KTİ'de yaşanan sıkıntılar diz ekleminde dengesizlik, hareketlerde rahatsızlık, menisküs ve kıkırdak hasarı ile bunlara bağlı gelişen osteoartrit gibi çeşitli ikincil bulgulara neden olabilir (43, 44). Başarılı bir KTİ, bu yaralanmalarda fonksiyonel işlevi geri kazanmanın anahtarıdır, ancak klinik bir zorluk olmaya devam etmektedir (45).

ÖÇBR gibi cerrahi müdahalelerde kullanılanlar başta olmak üzere tendon greftlerinin uzun süreli hayatta kalması için sağlam bir KTİ esastır. Geçmişte genellikle K-PT-K grefti tercih edilirdi, ancak son zamanlarda özellikle hamstring tendonları ve distal kuadriseps tendonunun proksimal kısmı gibi yumuşak doku greftleri daha popüler hale gelmiştir. K-PT-K greftinde, greft kemik tünelineki KTİ ile kemikten kemiğe iyileşme yoluyla entegre olur. Bu süreç, geçmişte incelenmiş ve genellikle 4 ila 6 haftada greftin belirli bir stabiliteye ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu süreç, greftin yerleştirildiği kemik tünelineki iyileşme sürecini içerir ve greftin kemik dokusuyla entegrasyonunu sağlar. Bu stabilite, hastanın rehabilitasyon sürecini yönlendirmek ve sportif aktivitelere geri dönüş zamanlamasını belirlemek için önemlidir. (46-48). Başka bir seçenek olarak, ÖÇBR için bir yumuşak doku grefti kullanıldığında, kemik tünelineki osseöz entegrasyonu tendondan kemiğe iyileşme ile ilerlemektedir. Bu süreç daha önce çeşitli hayvan modellerinde araştırılmış ve sağlam bir KTİ'nin farklı zaman dilimlerinde oluştuğu bildirilmiştir (7, 8, 49-57). Biyolojik ve mekanik koşullar KTİ üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabileceğinden, bunun sonucunda ortaya çıkan klinik önemi de dahil olmak üzere, erken ve geç KTİ sırasında etkili bulunabilecek mekanizmalar konusunda tartışmalar devam etmektedir (58, 59).

### **III.B.1.Kemik Tendon Bileşkeleri (KTB)**

1691 yılında KTB'lerin tanımlanmasına dair Havers, farklı histolojik yapıları olan doğrudan ve dolaylı bileşkeleri ilk kez tanımladı. 1957 ve 1958'de Alman anatomistler Biermann ve Knese, bileşkelerdeki kemik büyümesi hakkında bilgi verdi ve periosteal-diyafizer (indirekt) bileşkeler (60) ile kondral-apofizer (direkt) bileşkeler (61) arasındaki farkı vurguladılar.

İndirekt bileşke (periosteal bileşke), tendondan periosta ve kemiğe doğru devam eden çok sayıda kolajen lif ile tanımlanmakta (Şekil 7) olup 1856 yılında William Sharpey tarafından ilk kez literatüre kazanılmasından ötürü "Sharpey lifleri" olarak isimlendirilir. Sharpey, kemik

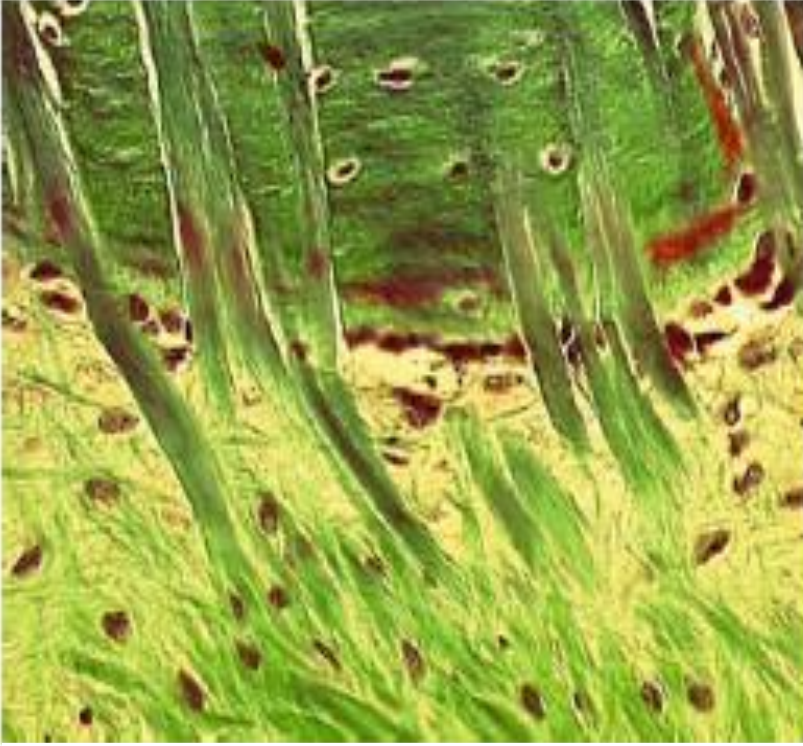


**Şekil 7:** İndirekt bir KTB tipi. Yüksek yoğunlukta Sharpey lifleri ile periostu (P) alttaki kemiğe (bone - B) bağlayan geniş bir fibröz doku bölgesi (O) vardır. *Woo SL-Y, Akeson W. Ligament, tendon, and joint capsule insertion to bone. In Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft-Tissues. Woo SL-Y, Buckwalter JA, eds. The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL, 1988, pp 133-166, p 138'*

lamelleri boyunca yayılan gözenekli kolajen liflerini sanki tahtaya dikey veya eğik olarak çakılmış çiviler gibi veya onları birbirine cıvatalamış gibi tanımlamıştır. Ayrıca periost, tendonların ve bağların kemiklere daha sağlam bir şekilde bağlanmasına katkıda bulunur; aslında bu lifli yapılar, bağlandıkları noktada kemikle sürekli hale gelerek birleşir ve sıkı bir bağ oluşturur (62) (Şekil 8). Bir indirekt bileşke örneği, dizdeki medial kollateral ligamentin tibial bağlanma noktasıdır. Bu tür bileşkeler genellikle kemikle büyük bir temas alanına sahip kısa ligamentler veya tendonlarda bulunur. İndirekt bileşkelerin belirgin özelliği, bileşke bölgesinin distal ve proksimalinde periostun devamlılığıdır; bu nedenle, periosteal bileşke olarak da adlandırılırlar.

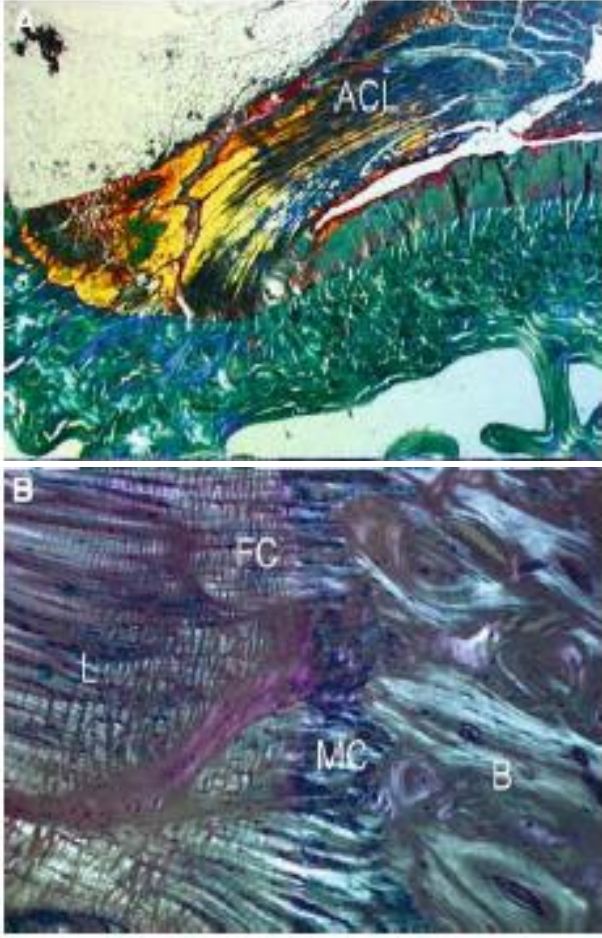
Direkt bileşke tipinde, sürekli olan bir periost söz konusu değildir ve tendon veya bağ dokusu doğrudan alttaki kemikle temas halindedir (63). Bu tür bileşkelerin tipik histolojik görünümü, ilk olarak 1929'da Dolgo-Saburoff tarafından tanımlanmış ve tendon, fibrokartilaj, mineralize fibrokartilaj ve kemik olmak üzere dört bölgeden oluşmaktadır (64) (Şekil 9). Daha sonraki çalışmalar, bu histolojik yapıyı ışık ve elektron mikroskobu kullanarak doğrulamış ve ön/arka çapraz bağlar, supraspinatus tendonu, patellar tendon, aşil tendonu, deltoid kas yapışma yeri ve vücuttaki diğer birçok bağ ve tendon yapışma yerinde mevcut olduğunu belirlemiştir (60-63, 65-70) Dolgo-Saburoff ayrıca fibrokartilaj ile kemik arasında mineralize kıkırdak tide-mark veya çimento hattı olan "mavi çizgi" varlığını tanımlamıştır (64). Mineralize kıkırdak tide-mark derin interdijitasyonlar oluşturur (Şekil 10), böylece mekanik olarak farklı olan iki

bölge arasındaki temas alanını ve Schneider (63) tarafından 1956'da tanımlandığı üzere bu bileşkenin makaslayıcı ve çekme kuvvetlerine direnme gücünü artırır. Bu tidemark, hiyalin eklem kıkırdağı ile subkondral kemik arasındaki mineralize kıkırdak tidemark ile benzerlik gösterir; bu da eklem kıkırdağı ile alttaki kemik arasındaki sertlik gradyanını azaltarak bir şok emici görevi görür ve böylece kondral makaslama yaralanmaları olasılığını azaltır.

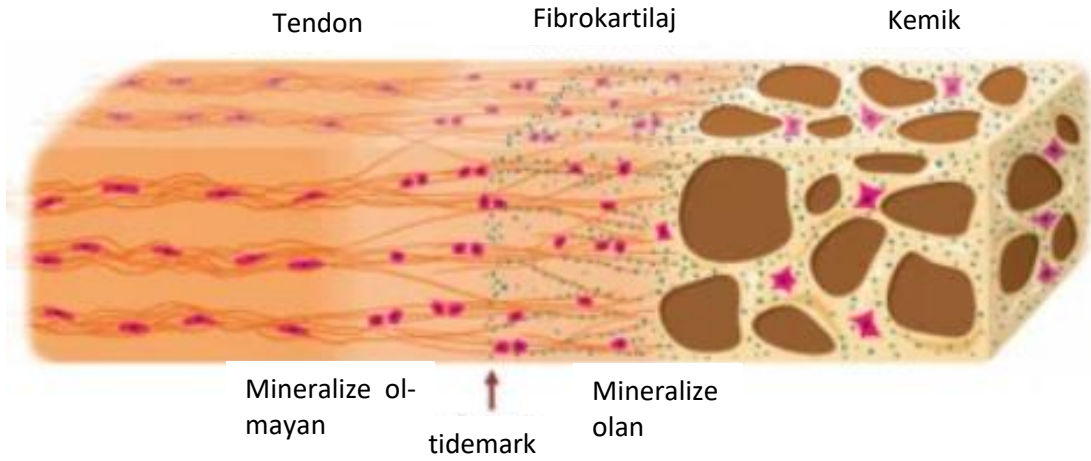


**Şekil 8:** Yumuşak dokudan kemiğin derinliklerine uzanan Sharpey lifleri (Masson Goldner'in trikrom boyası, ×400 orijinal büyütme). *Weiler, A., Scheffler, S., Apreleva, M. (2006). Healing of Ligament and Tendon to Bone. In: Walsh, W.R. (eds) Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule. Orthopedic Biology and Medicine. Humana Press. p: 203'*

Özetlemek gerekirse, bileşke bölgelerinin morfolojisi, buldukları anatomik yapının mekanik koşullarını yansıtır. Ancak mekanik ortamın direkt (kondral-apofizer) veya indirekt (periosteal) bileşke gelişimini nasıl etkilediği hala belirsizdir.



**Şekil 9:** (A) Bir koyunda ÖÇB'nin femoral yapışma yeri, tipik bir direkt KTB göstermektedir (Masson Goldner'in trikrom boyası, polarize ışık,  $\times 16$  orijinal büyütme). (B) Direkt bir KTB'nin daha yüksek büyütmesi. Dört farklı bölge vardır: Lamellar kemik (B), mineralize kırkırdak (MC), fibrokartilaj (FC) ve ligament dokusu (L). 'Weiler, A., Scheffler, S., Apreleva, M. (2006). *Healing of Ligament and Tendon to Bone*. In: Walsh, W.R. (eds) *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule*. Orthopedic Biology and Medicine. Humana Press. p: 203'



**Şekil 10:** İç içe geçmiş dört bölgeyi bir direkt KTB şematik gösterimi. 'Friese, N., et al. (2020). *Regeneration of damaged tendon-bone junctions (entheses)—TAK1 as a potential node factor*. International journal of molecular sciences, 21(15), 5177.'

### III.B.2.KTİ Hayvan Modelleri

Tendon greftinin bir kemik tüneline yerleştirilmesinin temel nedeni, ÖÇBR başta olmak üzere çeşitli tendon rekonstrüksiyonları, tendon transferleri ve tenodez cerrahileridir. Özellikle, yumuşak doku greftlerinde (hamstring tendonları veya kuadriseps tendon greftinin proksimal kısmı) ve özel allogreft dokularında iki ana sorunla karşılaşılır. Birincisi, greftin şekillenmesinden sonra normal doku morfolojisine ve mekanik özelliklere sahip bir neoligament elde edilmesidir. İkincisi, kemiğe normal bir giriş sağlamak ve böylece normal ligament fonksiyonu için gerekli olan yumuşak doku ile kemik arasındaki bu özel geçiş bölgelerinin yeniden oluşturulmasıdır (71).

KTİ'yi araştırmak için uygun bir hayvan modeli seçilmelidir. Farklı hayvan modellerinin sonuçları farklılık ve klinik uygulanabilirlikleri değişkenlik gösterebileceğinden ötürü literatürdeki çalışmaların sonuçlarını yorumlarken de kullanılan hayvan modelinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir. Kemik tüneline KTİ'yi araştıran çalışmaların çoğunda ekstraartiküler tendon transfer prosedürleri kullanılmıştır. (8, 50, 53, 55, 56, 72-78). Ekstraartiküler modellerin bir dizi avantajı vardır. Özellikle, transfer edilen tendon dokusu genellikle önemli olan yeniden şekillenmeye tabi tutulmaz, bu da mekanik arayüz gücü ile ilişkili konuların daha kolay incelenmesini sağlar (8). Aksine, intraartiküler modellerde, özellikle ÖÇBR'lerde olduğu gibi, eklenen tendon dokusu yoğun bir yeniden şekillenmeye maruz kalır. Bu durum, erken dönemde tendon dokusunun mekanik özelliklerinin azalmasına ve greftin orta kısmından başarısız olmasına yol açabilir. Sonuç olarak, bu modellerde KTA gücü hakkında net bir sonuca varmak zordur (59). Ekstraartiküler modellerin, özellikle sıçanlar ve tavşanlar gibi küçük hayvanlarda kullanılması araştırmacılara pek çok avantaj sağlar. Ancak bu tür küçük hayvanlarda ÖÇBR modellerinin uygulanmasında bazı zorluklarla karşılaşılabilir. Bu hayvanların eklemlerinin boyutları insanlardakilerden oldukça farklılık göstermektedir, bu da yapılan rekonstrüksiyonların insan eklemlerine ne derece uygun olduğunu sorgulamamıza sebep olur. Koyun, keçi, köpek vb. daha büyük hayvanlar, insanlara daha yakın eklemlere sahiplerdir ancak hala bazı zorluklarla karşılaşılmaktadır (Şekil 11). Özellikle, bu hayvanların diz eklemlerinin boyutları bile insan eşdeğerine tam olarak uymayabilir. Bu nedenle, daha büyük hayvanlarda yapılan çalışmaların klinik geçerliliği bazı açılardan sınırlı olabilir. Bu tür hayvan modellerinde yapılan çalışmaların sonuçlarının insanlara nasıl genelleştirilebileceği ve klinik olarak ne kadar geçerli olduğu konuları, araştırmacılar arasında devam eden bir tartışma konusudur. Bu tür hayvan modelleri, insanlarda ortaya çıkan patolojileri ve tedavi yöntemlerini anlamak için önemli bir araç

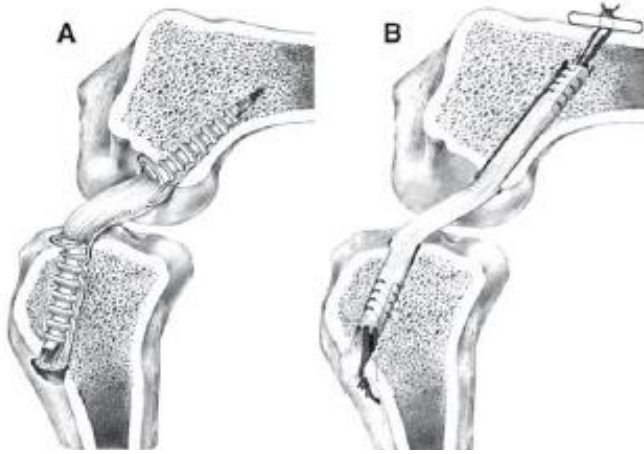
olabilir, ancak bulguların insanlar üzerindeki etkilerini doğru bir şekilde yorumlamak önemlidir (79).

Biyolojik müdahale prosedürleri veya mekanik koşullarını incelediğimizde, ekstraartiküler modeller avantajlıdır çünkü daha az değişken sunarlar. Örneğin, bağın yeniden şekillenmesi veya sinovyal temas gibi faktörler daha az etkileyici olabilir. Bu durum, araştırmacıların belirli değişkenlere odaklanmasını ve sonuçları daha net bir şekilde çıkarmasını sağlar. Bu nedenle, ekstraartiküler modeller, belirli biyolojik veya mekanik süreçleri anlamak ve müdahalelerin etkilerini değerlendirmek için daha kontrollü bir ortam sağlayabilir (8, 73).

KTİ'yi incelerken, özellikle ÖÇBR prosedürlerini ele aldığımızda, klinik duruma daha yakın bir perspektif elde etmek için intraartiküler bir modelin dikkate alınması da önemli olabilir. Son zamanlarda, yumuşak doku greftlerinin KTİ intraartiküler ortamlarda incelendiği daha fazla literatür bulunmaktadır. Bu, araştırmacılara gerçek hayatta görülen koşullara daha yakın bir ortamda çalışma fırsatı sağlar. İntraartiküler modeller, greftin tendon ile kemik arasındaki bağlantı sürecini daha iyi anlamak ve bu süreci iyileştirmeye yönelik müdahaleleri değerlendirmek için değerli bir araç sunar. Bu nedenle, ÖÇBR gibi klinik uygulamalara odaklanan çalışmalarda intraartiküler modellerin kullanılması, araştırmalardan elde edilen bulguların klinik uygulanabilirliğini artırabilir (7, 11, 49, 51, 52, 54, 57, 59, 80-83). Bu modellerin belirgin avantajlarından biri, greft-tünel hareketinin ve olası sinovyal girişin değerlendirilebilmesi gibi faktörlerin incelenebilmesidir, bunlar da tünel genişlemesindeki ana etkenlerdir. Ancak daha büyük hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalar sınırlıdır; bazı çalışmalarda köpek, koyun veya keçi gibi bu tür hayvanlar kullanılmıştır. Bu, büyük hayvan modellerinin bu tür araştırmalarda daha fazla kullanılmasının gerekliliğini vurgular. Daha büyük hayvanlar, insanlara daha yakın anatomik özelliklere ve boyutlara sahip oldukları için elde edilen bulguların insan klinik uygulanabilirliğini daha iyi yansıtabilir (50, 51, 54, 57, 59). Bu nedenle, ÖÇBR' ye dair KTİ hakkındaki bilgiler hala yeterli düzeyde değildir.

Ayrıca küçük hayvan modelleri, özellikle sıçanlar ve tavşanlar, intraartiküler modellerde kullanılmak için genellikle elverişli değildir ve daha çok ekstraartiküler KTİ çalışmalarında tercih edilirler. Ekstraartiküler prosedürler genellikle tendonların veya bağların transferi veya implantasyonu yoluyla ekstraartiküler tedavi yöntemlerini temsil eder. Tavşanlarda kalkaneus çevresine tendon transferi prosedürleri (50, 55, 56) veya köpek, koyun ve tavşanlarda dijital ekstansör tendonunun proksimal metafizyel tibiaya implantasyonu (8, 73-77) gibi eklem dışı modeller, çeşitli çalışmalarda etkili bulunmuştur. Fakat yumuşak doku greftlerinin tendondan

kemiğe iyileşmesini araştırmak için en uygun greft kaynağı hakkında yapılan çalışmalar çeşitlilik göstermektedir. Ancak birçok çalışma koyun, keçi, maymun veya köpeklerde K-PT-K (patellar tendon grefti) grefti kullanıldığını belirtmektedir. Bu greft, kolayca alınabilir ve sadece tek bir insizyon gerektiren bir artrotomi ile elde edilebilir. Ancak yumuşak doku greftlerinde, insan hamstring tendonuna uygun eşdeğerin ne olduğu konusunda tartışmalar bulunmaktadır.



**Şekil 11:** Farklı greft tespit yöntemleri kullanılan koyunda intraartiküler KTİ modeli. 'Weiler A. et al, Tendon healing in a bone tunnel—Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 2002;18:113–123.'

### III.B.3.KTİ Temel Prensipleri

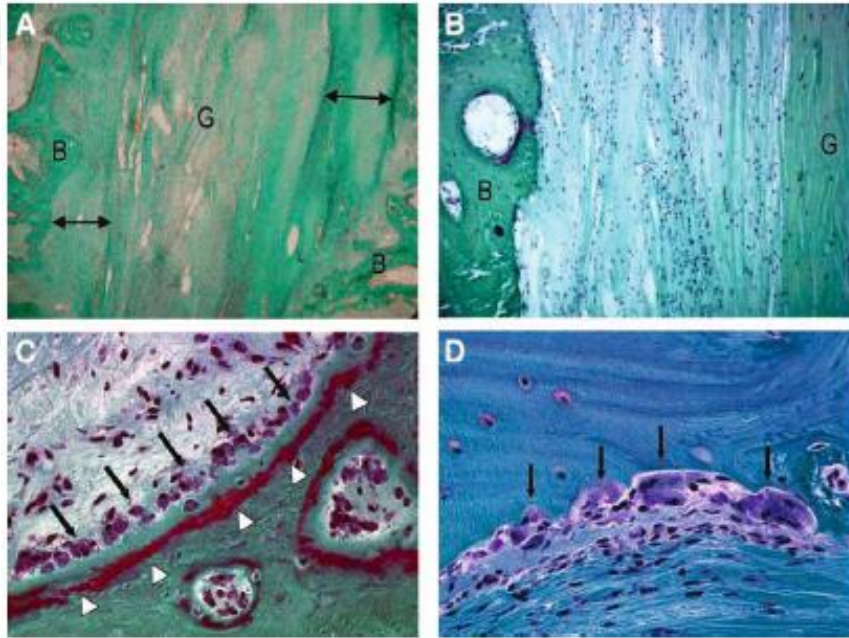
Forward ve Cowan, KTİ'de tendondan kemiğe iyileşmenin temel prensiplerinden Rodeo ve arkadaşlarının da (8) belirttiği şekilde bahsettiler ve kemik dokusuna yakın olan kondroid hücre dönüşümünü araştırdılar. (56). Ancak kondroblastik reaksiyonu iyileşen kallusun bir parçası olarak ele aldılar. Diğer bir çalışmada, Jones ve arkadaşları, kemik tünellerine yapılan tendon transferi ve tendon greftlemenin etkilerini inceledi. Ancak her iki yöntemin de histolojik olarak dört bölgeli bir tendon birleşimi oluşturmadığını gözlemlediler (53). Bu sonuçlar, iyileşme sürecindeki anatomik ve histolojik değişikliklerin karmaşıklığını vurgulamaktadır.

Rodeo ve arkadaşları, köpeklerdeki ekstraartiküler bir modelde yaptıkları bir araştırma sonrası, implant edilen tendon ile çevresindeki kemik arasında bir ara bölgenin (Fibröz İnterzone – FİZ) gelişimini tanımlamışlar (8). FİZ, eğer bir tünel genişlerse genişleyebileceği için (59) düzensiz, yüksek oranda hücreli ve yüksek oranda vasküler bağ granülasyon dokusundan oluşur (Şekil 10). Bu, kemik ve tendon arasındaki ilişkinin detaylarını anlamak için önemli bir bulgu olabilir.

Erken iyileşme sürecinde, kemiğin dokuda apozisyonel büyümesi ve aynı zamanda rezorpsiyonu gerçekleşir. Bu süreçte kemik dokusu yoğun bir şekilde yeniden şekillenir (Şekil 12). FİZ kalınlığı belirgin olarak değişkenlik gösterebilir ve implantasyon sırasında tendon ile kemik tüneli arasındaki uyuma, daha sonra tünel genişlemesinin meydana gelmesine veya erken iyileşme sırasında kemiğin ne kadar apozisyonel büyüdüğüne bağlı olabilir. (54, 74) (Şekil 13).

İyileşmenin ilerlemesiyle FİZ - tendon ve FİZ - kemik arayüzlerinde şu değişiklikler meydana gelir:

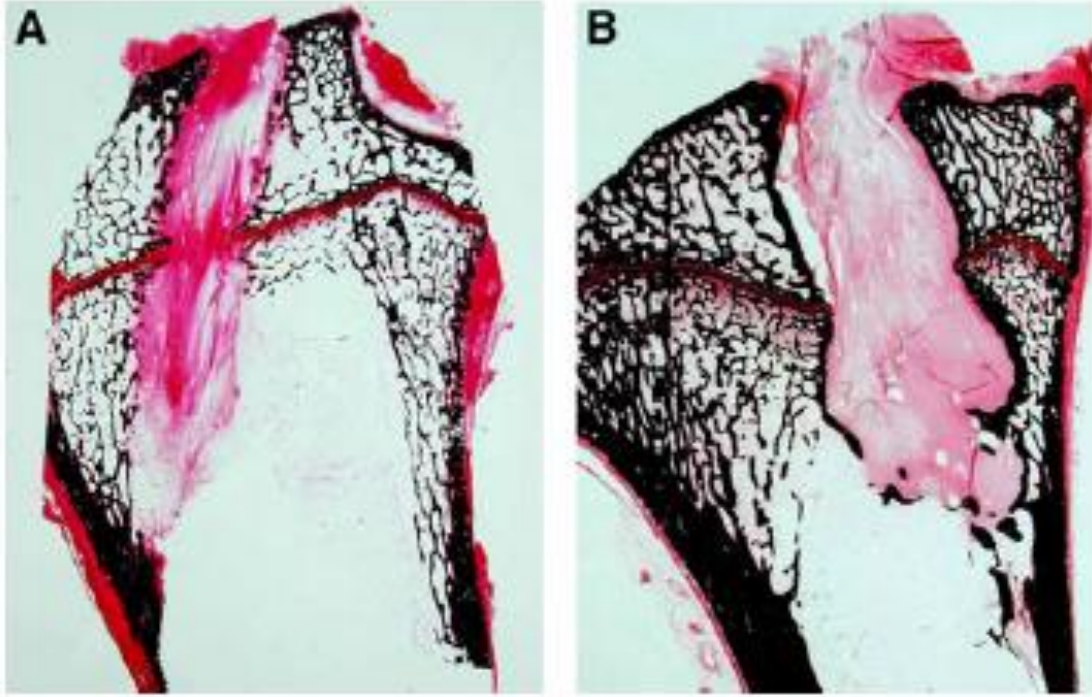
- FİZ histolojik olarak daha az vasküler ve hücreli hale gelir. FİZ - tendon arayüzü belirsizleşir ve ekstraselüler matriks, lifleri uzunlamasına dizilir.



**Şekil 12:** A) Koyunlarda ÖÇBR'den 6 hafta sonra tibial tünelden uzunlamasına kesit. Greft dokusu (G) ve çevresindeki kemik (B) arasında geniş bir FİZ (oklar arasında) vardır. (Masson Goldner'in trikrom boyası,  $\times 15$  büyütme). (B) ÖÇBR'den 9 hafta sonra FİZ'in daha yüksek büyütmesi. Doku hipersellüler ve hipervaskülerdir. (Masson Goldner's Trikrom boyası,  $\times 100$  orijinal). (C) Kemik - FİZ arayüzü ameliyat sonrası 9. hafta. Yüksek miktarda osteoblast (oklar) ve sürekli kalsifiye olmamış osteoid (ok başları) içeren yoğun bir apozisyonel kemik büyümesi var (Masson Goldner'in trikrom boyası,  $\times 400$  büyütme). (D) Kemik - FİZ arayüzü ameliyattan 6 hafta sonra. Kemik tünelinin yeniden şekillendiğini gösteren yüksek miktarda osteoklast (oklar) (Masson Goldner'in trikrom boyası,  $\times 400$  büyütme).  
'Weiler, A., Scheffler, S., Apreleva, M. (2006). *Healing of Ligament and Tendon to Bone*. In: Walsh, W.R. (eds) *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule*. Orthopedic Biology and Medicine. Humana Press. p: 203'

- FİZ - kemik arayüzünü bileştiren, hatta tendonla kemiği doğrudan köprüleyen Sharpey benzeri kolajen liflerinin erken gelişimi vardır ve bu lifler zaman geçtikçe daha da yoğunlaşır.

- FİZ - kemik arayüzünde de kemiğin tüm tünel boyunca kesintisiz stabil bir iyileşme sağlaması için tüm açık intertrabeküler boşlukları doldurana kadar kemik doku büyür. İlerleyen süreçte, daha fazla tünel genişlemesi olmadan bir kemik daralması meydana gelir ve FİZ - kemik arayüzündeki kemik sklerotik hale gelir.



**Şekil 13:** (A) Koyunlarda yumuşak doku grefti ile ÖÇBR'den 6 hafta sonra proksimal tibia üzerinden sagittal kesit. Başlangıçta 4,5 mm delinen tünel 5 mm çapa yükselmiştir; FİZ her iki tarafta 0,25 mm büyümüş olmalıdır (Safranin O-van Kossa boyası). (B) Koyunlarda ÖÇBR'den 24 hafta sonra tibia üzerinden sagittal kesit, yoğun bir tünel genişlemesi gösteriyor. Tünel çapı 4,5 mm'den maksimum 11 mm'ye çıkmıştır. Bu nedenle, FİZ her iki tarafta 3,25 mm artmış olmalıdır (Safranin O-van Kossa boyası). 'Weiler A, et al. Aktuelle aspekte in der verankerung von hamstringsehnens-transplantaten in der kreuzbandchirurgie. [Current aspects of anchoring hamstring tendon transplants in cruciate ligament surgery.] Chirurg 2000;71:1034–1044'

Çalışmaların çoğunda greftlenen tendonun tünel içindeki kısmı histolojik açıdan incelenmiştir fakat sadece birkaçı kondroid bir geçiş bölgesinin geliştiğini görmüştür (51, 56, 73), bu da direkt bir KTB tipinin geliştiğini gösterebilir. Greftlenen tendonun tünel içindeki kısmında ve tünelin giriş bölgesinde tendondan kemiğe iyileşme süreci incelendiğinde de farklı iyileşme

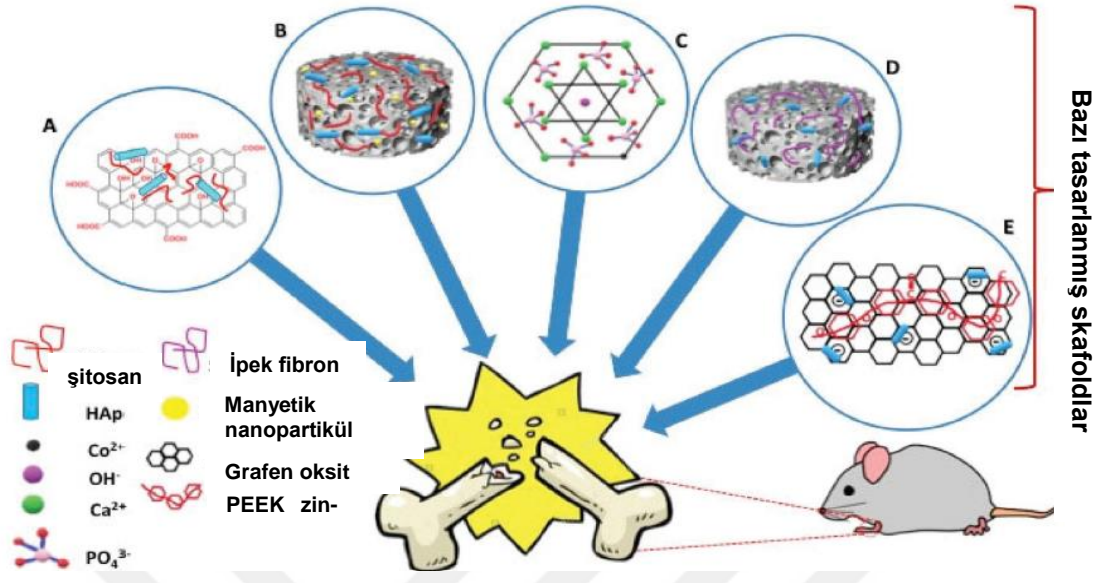
mekanizmaları olduğu görülmüştür. Erken tünel içi iyileşme, indirekt bir KTB gelişimi ile bağlantılı olabilir ve daha sonraki yüzey iyileşmesinde, belirli mekanik koşullar ile direkt KTB oluşabilir (59, 73). Bu nedenle, indirekt ve direk KTB gelişimine ilişkin tartışmaların çoğu, incelenen KTİ dokusunun farklı bölgelerindeki metodolojik farklılıklardan ötürüdür.

KTİ sürecinin ilerlemesini ve kalitesini değerlendirmek için temel bir parametre olduğundan, histolojik görünüm ve yeni gelişen KTB gücü hakkında bilgi sahibi olmak, rehabilitasyon protokollerini daha iyi uyarlamak için önemlidir. Rodeo ve arkadaşları, ekstraartiküler modellerinde, yaptıkları çekme testlerinde 2 ila 8. haftalarda greft dokusunun sıyrılarak başarısız olduğunu, 12 ila 26. haftalarda ise greft dokusunun ortasından veya tünel girişinde koştugu tanımlamıştır (8). Bu durum, 8 ila 12. haftalar arasında başarısızlık bölgelerinde bir değişiklik olduğunu ve KTA'nın erken iyileşme döneminde zayıf olduğunu göstermektedir. Erken iyileşme döneminde greftin başarısızlığa uğrama riski yüksek olduğundan rehabilitasyon planlamasının bu göz önünde bulundurularak yapılması gerekmektedir.

### **III.C.Hidroksiapatit (HAp)**

Nanoteknolojinin gelişimiyle birlikte nanomalzemelerin üretimi ve kullanımı birçok alanda büyük potansiyel sunmuştur. Nanomalzemeler, birimlerinin kuantum boyutlarının ayarlanabilirliği ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları sayesinde çeşitli teknolojilerde kullanılabilir. Hidroksiapatit (HAp), bu nanomalzemelerden biridir ve memelilerin sert dokularının ana bileşeni olarak doğal bir biyolojik malzemedir. HAp, mine yapısındaki yüksek en-boy oranlı çubuklar veya dentin ve kemik yapılarındaki trombositler gibi çeşitli formlarda bulunabilir. HAp, diğer seramik nanomalzemelerle bazı ortak özellikler paylaşırken, kendine özgü özellikleri sayesinde bir dizi uygulama için ideal bir adaydır (84).

Hidroksiapatit (HAp), kalsiyum fosfat (CaP) biyomalzeme ailesinin en kararlı üyesi olup, kemik ve dişlerde bulunan apatitik CaP fazıyla en yüksek bileşimsel ve yapısal benzerliği gösterir (85). Bu özellikleri, HAp'ı birçok tıbbi uygulama için ideal hale getirir. HAp nanopartikülleri, olağanüstü biyoyumluluğu ve biyoaktivitesi sayesinde diş hekimleri, ortopedik cerrahlar ve kemik dokusu mühendislerinin dikkatini çekmiştir. Günümüzde ise HAp'ın potansiyel uygulamaları bu alanların ötesine geçmiştir. Her bir HAp formu, belirli özelliklere sahip olup, benzersiz bir biyolojik yanıt ortaya çıkarır. Bu çeşitlilik, HAp'ın farklı tıbbi uygulamalarda kullanılmasını sağlar ve dokuların teşhisi, tedavisi ve güçlendirilmesi gibi çeşitli ihtiyaçları karşılayabilir (Şekil 14).

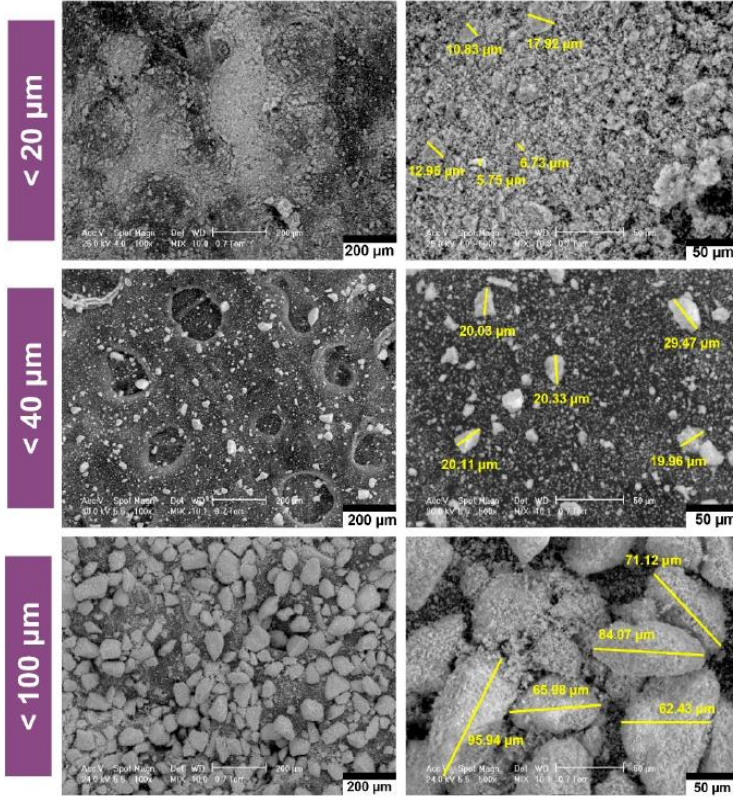


**Şekil 14:** HAP içeren bazı tasarlanmış skafoldlar, A) HAP/grafen oksit/şitosan kompozit hidrojel; B) HA/şitosan matrisinde manyetik nanopartiküller; C) kobalt katkılı HAP; D) ipek fibroin/HAP kompozit; E) polietereeterketon ve HAP arasında bir arayüz fazı olarak grafen oksit. 'Ghiyasi B, et al. Hydroxyapatite as a biomaterial - a gift that keeps on giving. Drug Dev Ind Pharm. 2020 Jul;46(7):1035-1062.'

Çok sayıda çalışmaya göre, HAP uygulamalarının ana odak noktası doku mühendisliği, özellikle de kemik defektlerinin yenilenmesi ve onarımıdır. Ancak HAP'ın sert doku mühendisliğinde karşılaşılan temel mekanik sorunlar arasında yetersiz kırılma dayanımı, yorulma kaynaklı başarısızlık ve kırılma bulunmamaktadır. İdeal bir kemik ikamesinin, yeni kemik büyüme hızıyla uyumlu olarak aşamalı olarak rezorbe olması beklenirken, kompakt HAP bloklarının rezorpsiyon hızı hiç de pratik olmayarak yıllar hatta on yıllar sürebilir (86). Bu engellerin üstesinden gelmek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım, HAP'ın tamamlayıcı özelliklere sahip ve sinerjik etkiler sağlayan bileşenlerle birleştirilmesini içerir (87).

HAP implantlarda kullanılmasını uygun hale getiren faktörlerden biri, mükemmel osteokondüktiviteye ve immünolojik reddin olmamasına sahip olmasıdır. HAP'ın yapısal özelliklerini kontrol etmek, implantların istenilen özelliklere sahip olmasını sağlar; bunlar arasında gözeneklilik, faz bileşimi, partikül boyutu ve kristalinlik yer alır (88). HAP biyolojik uyumluluğu konusundaki tartışmalar, kesin bir şekilde sonlanmış değildir. Her bir özel bağlam için karakteristik özellikleri açısından HAP partiküllerinin yeniden test edilmesi önerilir (89-91). Mevcut

anlayış, partikül boyutu (Şekil 15), yükü ve canlı sistemle etkileşim şekline göre farklı hücre kültürleri, HAp'a farklı tepkiler verebilir ve farklı testler genellikle HAp'ın biyolojik uyumluluğu konusunda farklı sonuçlar ortaya koyabilir (92, 93).



**Şekil 15:** Boyutlarına göre sıralanmış kalsiyum fosfat partiküllerinin morfolojik ve boyutsal karakterizasyonu, TEM görüntülemesiyle. 'Miculescu F, et al. Considerations and Influencing Parameters in EDS Microanalysis of Biogenic Hydroxyapatite. J Funct Biomater. 2020 Nov 15;11(4):82.'

### III.C.1.HAp ve Osteoindüktif Etki

HAp, osteoindüktif özelliklere sahip olması, yeni kemik oluşumunu teşvik etme potansiyeline sahip olduğunu gösteren birçok çalışma tarafından desteklenmektedir. Bu özellikler, kemik rejenerasyonu ve implant başarısını artırmak için önemli bir faktördür (94-97). HAp türevlerinden yapılan implantların biyoaktivitesini daha da geliştirmek ve yeni osteoindüktif malzemeler geliştirmek için osteoindüktif mekanizmanın moleküler düzeyde detaylı bir şekilde karakterize edilmesi gereklidir. Bu, HAp'ın hücrelerle ve çevresiyle etkileşimlerini anlamak ve kemik farklılaşması üzerindeki etkilerini daha iyi değerlendirmek için önemlidir.

HAp osteojenik hücreler üzerindeki etkisi, laboratuvar ortamında osteoblastlarla yapılan etkileşimlerin incelenmesiyle araştırılmıştır (98-102). Osteoblastların çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkileri, yaygın olarak kullanılan belirteçler olan alkalik fosfat (ALP), tip I

kolajen (KOL1) ve osteokalsin (OKN) gibi çeşitli osteo-spesifik genlerin ekspresyonunun izlenmesi yoluyla değerlendirilmiştir. Ancak HAp ve osteoblast etkileşiminden elde edilen sonuçlar bazen çelişkilidir. Örneğin, Shu ve arkadaşlarının çalışması, HAp'ın fare osteoblast benzeri MC3T3-E1 hücrelerinde ALP ve OKN ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığını gösterirken (19); Wang ve arkadaşlarının verileri, osteoblast benzeri Saos-2 hücrelerinde HAp ve plastik substratlar arasında ALP, KOLI ve OKN ekspresyonunda %10'dan az bir fark olduğunu ortaya koymuştur (101).

Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HAp substratları üzerinde mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yetiştirilmesi incelenmiştir. Bu çalışmada, MKH'lerin HAp üzerinde yetiştirilmesi, bir osteoindüktif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle, HAp ve kemik morfogenetik proteinlerin olmadığı bir ortamda bile, MKH'lerin yetiştirildiği HAp substratları, ALP enziminin aktivitesini artırmış ve osteojenik farklılaşmayı teşvik etmiştir. Bu sonuçlar, HAp'ın hücrelerle etkileşime girerek çevresine osteoindüktif sinyaller salgılayabileceğini ve bu şekilde osteojenik farklılaşmayı teşvik edebileceğini göstermektedir. Bu tür sinyaller, hücreleri kemik benzeri dokular oluşturmak üzere harekete geçirebilir ve doku rejenerasyonunu destekleyebilir. (18).

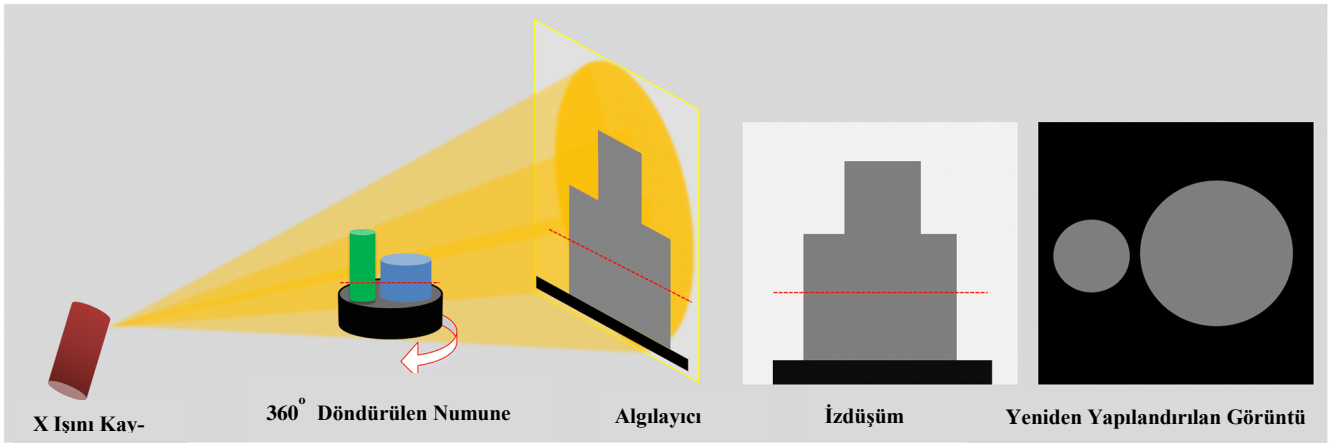
Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kemik doku mühendisliğinde etkileyici moleküllerin potansiyel etkilerini değerlendirmek için in vitro olarak tasarlanmış bir iki aşamalı hücre-soy modeli kullanılmıştır. Bu çalışma, hidroksiapatit (HAp) nanopartikülleri üzerinde yapılmıştır ve endotelyal hücreler ile mezenkimal kök hücreler arasındaki iş birliğine dayalı etkileşimlerin, kemik rejenerasyonunu teşvik etmede olası bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, HAp nanopartiküllerin, farklı hücre tipleri arasında etkileşime girerek kemik rejenerasyonunu destekleyebileceğini ve bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamalarında potansiyel bir osteoindüktif kullanım alanına sahip olduğunu öne sürmektedir (17).

### **III.D.Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT)**

Yakın geçmişte, kemik yapısını değerlendirmek için kullanılan yaygın bir yöntem, trabeküller ve kortikal kemik mimarisini belirlemek için kantitatif histolojik tekniklerdi. Ancak, bu yöntemlerin bazı sınırlamaları vardı. Özellikle, kemik mikromimarisini değerlendirme konusunda bazı zorluklarla karşılaşılıyordu. Çünkü bu histolojik analizler genellikle birkaç 2 boyutlu

kesitin stereolojik analizine dayanıyordu ve bu da bazen yapısal parametrelerin doğru bir şekilde belirlenmesini zorlaştırıyordu. Ayrıca bu analizler genellikle altta yatan yapıyı bir plato gibi varsayarak yapılmaktaydı (103). Buna karşılık, mikro-BT gibi yüksek çözünürlüklü 3 boyutlu görüntüleme teknikleri, stereolojik modellere dayanmadan doğrudan kemik mikromimarisini ölçme imkanı sunuyor.

Feldkamp ve diğer araştırmacılar tarafından 1980'lerin sonlarında tanıtılan (104) mikro-BT, küçük hayvan modellerinde kemiklerin yapısını incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, X-ışını zayıflama verilerini kullanarak örneğin üç boyutlu bir temsili oluşturur (Şekil 16).



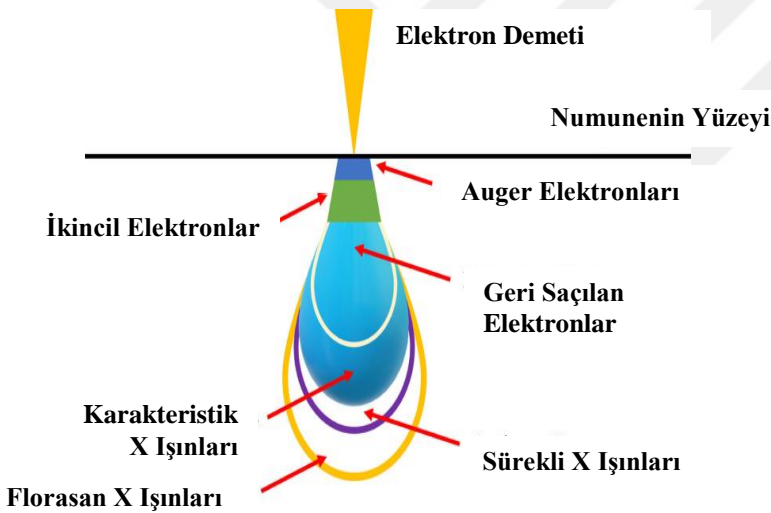
**Şekil 16:** Mikro-BT'nin temellerini gösteren şematik çizim. Kırmızı kesikli çizgi, yeniden yapılandırılan görüntünün dikey konumunu, yani kesit görüntüsünü gösterir. 'Cengiz, I.F., Oliveira, J.M. & Reis, R.L. *Micro-CT – a digital 3D microstructural voyage into scaffolds: a systematic review of the reported methods and results. Biomater Res* 22, 26 (2018).'

Mikro-BT kemik morfolojisine yönelik yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliği ve tutarlılığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu ölçümlerin doğruluğu, hayvan örneklerinde değerlendirilmiştir. (105-109). Ayrıca insan örneklerinde de geleneksel 2 boyutlu histomorfometriye dayalı ölçümlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve 2 boyutlu ve 3 boyutlu morfolojik ölçümlerin yüksek oranda uyumlu olduğunu gösterilmiştir (110-114). Ancak bazı çalışmalarda mikro-BT ölçümlerinin, histomorfometrik ölçümlerden daha trabeküler kalınlık için yüksek sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Kemiği yumuşak dokudan ayırmak için kullanılan eşik ve elde edilen görüntünün çözünürlüğü bu karşılaştırmaları etkiler (113). Ancak tüm bu farklılıklara

rağmen, mikro-BT ve histomorfometri arasındaki yüksek korelasyon, mikro-BT'nin kemik morfolojisini değerlendirmek için güvenilir bir araç olduğunu göstermektedir.

### III.E.Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ve Mineral Karakterizasyonu

Elektron ışınları, numunenin yüzeyinin altına doğru hareket eder. Bu elektron ışını, numunenin iç kısmıyla etkileşime girerken X-ışınları üretir. Bu olay, fizikte iyi bilinen bir ilkeye dayanır; elektronlar, numunenin elektrik alanına girdiklerinde yavaşlarlar. Bu yavaşlama, elektronun enerjisini kaybetmesine ve fotonların yayılmasına neden olur. TEM analizinde, incelenen numunenin karakteristik özellikleriyle uyumlu X-ışınları yayılır (115). Bu süreç, Şekil 17'de gösterildiği gibi gerçekleşir. TEM, numunenin yüzeyinden elektronların yansıtılması veya emilmesi yoluyla detaylı görüntüler elde etmeye olanak tanır. Ayrıca X - ışını teknikleri, özellikle enerji dağılımı spektroskopisi (EDS), numunenin kimyasal bileşenlerini belirlemek için TEM ile entegre edilebilir.



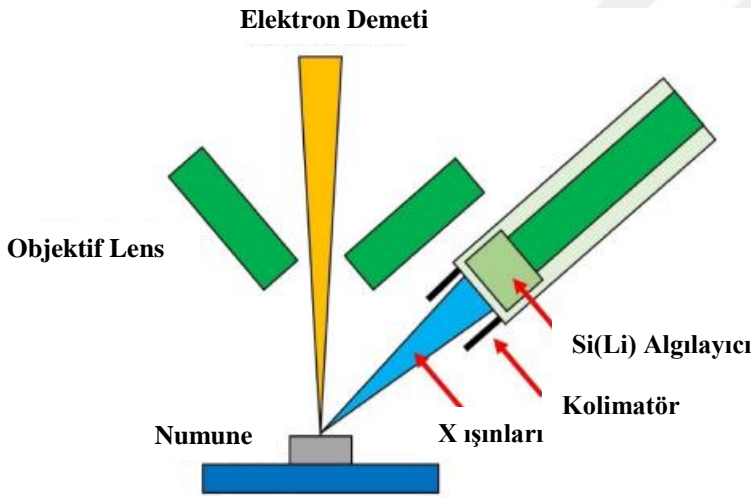
**Şekil 17:** İncelenen numune yüzeyi boyunca elektronların çeşitli penetrasyon seviyeleri. 'Ali A, et al. *Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions*. Applied Sciences.2023;13 (23):12600.'

Niceliksel değerlendirme yöntemlerinin niteliksel analiz ile beraber kullanılması, mineralojik çalışmalarda büyük bir adımdır. TEM enerji dağılım spektroskopisi (TEM - EDS) (116-120), otomatik SEM mineral serbestleştirme analizi (TEM-MSA) (121-123) ve taramalı elektron mikroskobu ile kuantitatif değerlendirme (KEMSCAN) (124-126) gibi teknikler, mineral bileşimlerini belirlemede ve mikroskobik ölçekte nicel veriler elde etmede önemli rol oynamak-

tadır. Bu yöntemlerin kullanılması, nadir toprak mineralleri gibi karmaşık bileşenlerin tanımlanmasını ve kantitatif analizini sağlar. TEM - EDS, yüzeylerin ince detaylarını görselleştirmek ve kimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılır.

### III.E.1. TEM Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (TEM - EDS)

Şekil 18’de gösterilen TEM-EDS’de X-ışını algılama sistemi numunede bulunan çeşitli elementlerin karakteristik X-ışınlarını ayırıştırır (Şekil 18). Sonrasında, EDS sistemi yazılımı, enerji spektrumunu analiz eder ve belirli elementlerin genliklerini belirlemek için ilgili foton enerjilerinden elektrik sinyalleri üretir. Bu süreç, numunede bulunan elementlerin kimyasal bileşim haritasının kalitatif ve yarı kantitatif olarak belirlenmesiyle sonuçlanır (127). TEM - EDS, çeşitli alanlarda mineral karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır (128-134).



**Şekil 18:** EDS'nin şematik görünümü. 'Ali A, et al. Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions. Applied Sciences. 2023;13 (23):12600.'

## IV.MATERYAL VE METOT

"Hidroksiapatit Kaplı Güçlendirilmiş Non-Absorbable Polifilman Sütür Materyalinin Kemik-Tendon İyileşmesindeki Etkisi " başlıklı projemiz T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararıyla 24.08.2023-E.120061 ve 31.10.2023-E.127861 tarih ve sayı numaralarıyla bilimsel ve etik açıdan uygun görülüp onaylanmıştır. Araştırma bütçemiz 07.02.2024 tarihinde, 2024/3 toplantısında alınan karar ile İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) bünyesinden karşılanmıştır.

### IV.A.Sütürlerin Kaplanması

#### IV.A.1.Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan Hidroksiapatit (289296 – reagent grade, powder, synthetic) ve Jelatin (sığır derisinden elde edilmiştir) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan çift distile su Millipore Direct Q® 8 UV Su Saflaştırma Sistemi ile sağlanmıştır. Sitotoksikite deneyinde kullanılan fibroblast hücre suşu Mus musculus ATCC CRL-2648'dir. Tüm hücre kültürü ticari ürünleri steril koşullarda TPP'den temin edilmiştir. FBS ve DMEM Gibco'dan temin edilmiştir. Güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman 2.0 no iğnesiz sütür materyalleri Artrotek'ten temin edilmiştir. Sütürlerin kaplama işlemi Acıbadem Üniversitesi Nanobiyoteknoloji Merkezinde 'Bengisu Kubaşık, Development of Hydroxyapatite Coated and Bioactive Orthopedic Sutures - Hidroksiapatit Kaplı Ve Biyoaktif Ortopedik Sütürlerin Geliştirilmesi (Yüksek Lisans Tezi, Acıbadem Üniversitesi, 2022)' çalışmasından elde edilen sonuçlar ile gerçekleştirilmiştir.

#### IV.A.2.Sütürlerin HAp ile Kaplama Prosedürü

Sütürlerin yerleştirilmesi için aynı anda eklenerek kaplama solüsyonunu elde etmek üzere 2 ayrı çözelti hazırlandı. 'Bengisu Kubaşık, Development of Hydroxyapatite Coated and Bioactive Orthopedic Sutures - Hidroksiapatit Kaplı Ve Biyoaktif Ortopedik Sütürlerin Geliştirilmesi (Yüksek Lisans Tezi, Acıbadem Üniversitesi, 2022)' çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda nihai olarak %1 jelatin ve %10 HAp sütürlerin kaplama solüsyonunu elde etmek için %2 jelatin ve %20 HAp çözeltilerinin aynı miktarda eklenerek kaplama solüsyonu hazırlanması planlandı.

Jelatinin (sığır derisinden elde edilen) ağırlıkça %2 çözeltisi, pH 7.4 10mM fosfat tampon salin (PTS; BioShop) ile ısıtmalı manyetik karıştırıcıda (Velp®Scientifica) karıştırılarak hazırlandı. HAp ağırlıkça %20 çözeltisi, pH 5,5 0,1 M asetat tampon çözeltisi ile ısıtmalı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandı (Şekil 19).



**Şekil 19:** Jelatin ve HAp çözeltilerinin ısıtmalı manyetik karıştırıcı da hazırlanması

Sütürlerin üzerine, uygun rpm de karıştırılarak hazırlanan iki çözelti eşit miktarlarda eklenerek elde edilen nihai kaplama solüsyonuna sütürler yerleştirilmiş oldu ve sütür kaplama işlemine başlandı. Sütür yerleştirilen kaplama solüsyonları uygun sıcaklık ve hızda ayarlanan orbital çalkalayıcıya yerleştirildi (Şekil 20), iki 24-saatlik inkübasyondan sonra solüsyondan çıkarılan sütürler iki kez çift distile su ile yıkandı. Daha sonra Freeze Dryer'da (Labconco) liyofilizasyon yoluyla kurutuldu ve sterilizasyon işlemi için paketlenip etilen oksit ile sterilize edildikten sonra HAp ile kaplanmış olan sütürler +4 °C'de muhafaza edildi.

#### **IV.A.3.Kaplama Prosedürü Değerlendirmesi**

Kaplama prosedüründen sonra elde edilen sütürler dayanıklılıkları ve morfolojik özellikleri açısından karakterize edildi. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) (Thermo Quattro S) ile görüntüledi ve sütür yüzeyindeki HAp kristallerinin varlığı değerlendirildi (Şekil 21).

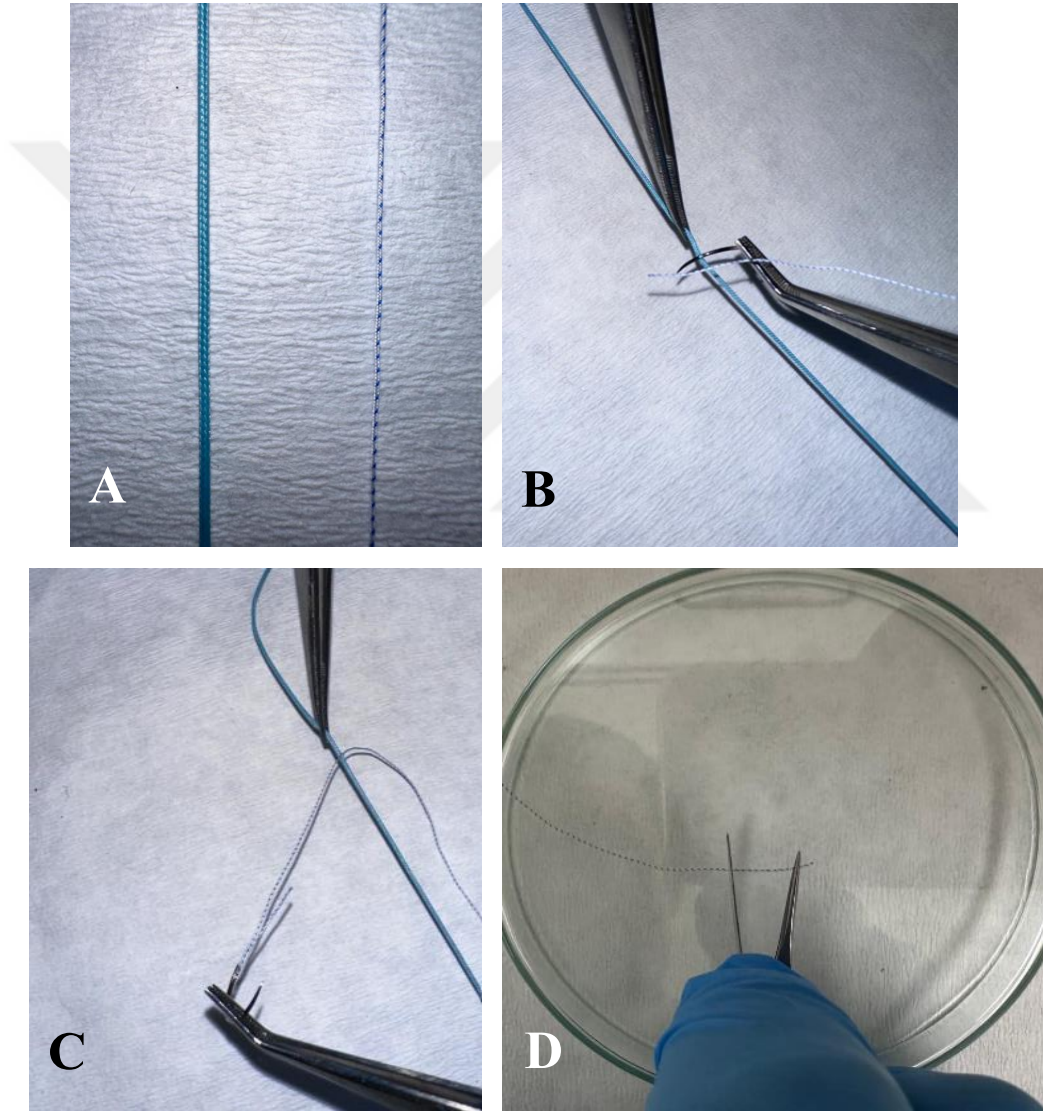


**Şekil 20:** Kaplama solüsyonlarına yerleştirilen sütürlerin orbital çalkalayıcı da kaplanması.



**Şekil 21:** Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) (Thermo Quattro S).

HAp kaplamasının mekanik sürtünmeye dayanıklılığının değerlendirilmesine yönelik kaplanmış sutureler 5 nu ethibond suture materyalinden sırasıyla 1, 2 ve 3 defa geçirilmesiyle K1, K2 ve K3 (K-Kullanılmış) suture numuneleri elde edildi (Şekil 22). Morfolojik analizlerde kaplanmış suture numuneleri (HA-Hidroksiapatit), kaplanmamış suture numuneleri (N-Normal) ve K1, K2, K3 suture numuneleri, yüzeylerindeki kaplama tabakaları ve yüzey düzgünlüğü ile birlikte porozite açısından TEM kullanılarak analiz edildi. Ayrıca TEM'e bağlı Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi dedektörü (EDS) ile her morfolojik analizden sonra suture yüzeyindeki kaplamaların adım adım elementel analizleri yapıldı ve kaplama verimi değerlendirildi.



**Şekil 22:** TEM - EDS analizi için suture numunesi hazırlanışı (A) HAp kaplanmış 2.0 nu suture materyali ve 5 nu ethibond suture, (B, C) Kaplanmış suture materyalinin ethibond suture içinden geçirilmesi, (D) TEM - EDS analizi için incelenecek her suture grubundan 1'er cm'lik numunelerin hazırlanması.

#### IV.A.4.HAp Kaplanmış Sütürlerin İn vitro Sitotoksosite Deneyi

HAp kaplanmış sütür materyallerinin sitotoksitesitesi, ‘Bengisu Kubaşık, Development of Hydroxyapatite Coated and Bioactive Orthopedic Sutures - Hidroksiapatit Kaplı Ve Biyoaktif Ortopedik Sütürlerin Geliştirilmesi (Yüksek Lisans Tezi, Acıbadem Üniversitesi, 2022)’ ipin geliştirilme sürecinde CCK-8 canlılık testi aracılığıyla Mus musculus fibroblast hücre hatları (ATCC CRL-2648) üzerinde değerlendirildi. Her kuyuya 10000 hücre olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu plakaya dördü olarak 100 µL uygun kültür ortamına ekildi ve 37 °C’de hücrelerin tamamen yapışması için 24 saat inkübe edildi. Bu süre, hücrelerin yüzeye tam olarak yapışması için yeterliydi. Normal ve HAp kaplanmış sütürler, 30 dakika kadar biyogüvenlik kabini içinde UV ışığı ile sterilize edildi. Hazırlanan sütür parçaları ile 37 °C’de 24 saat hücreler muamele edildi ve sütürler çıkarılıp kuyuların dibinde kalan yapışmış hücreler 100 µL FBS ile iki kez yıkandı. Canlı hücre sayısı belirlenmek üzere, 100 µL taze ortam içeren kuyulara 10 µL CCK-8 reaktifi eklendi. 1 saatlik inkübasyonun ardından, mikropilaka okuyucusu ile 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Tedavi edilmemiş hücrelerin bulunduğu kontrol kuyusundaki değere göre, göreceli sitotoksosite değerleri bir Excel belgesinde hesaplandı.

#### IV.B-Hayvan Deneyi Tasarımı

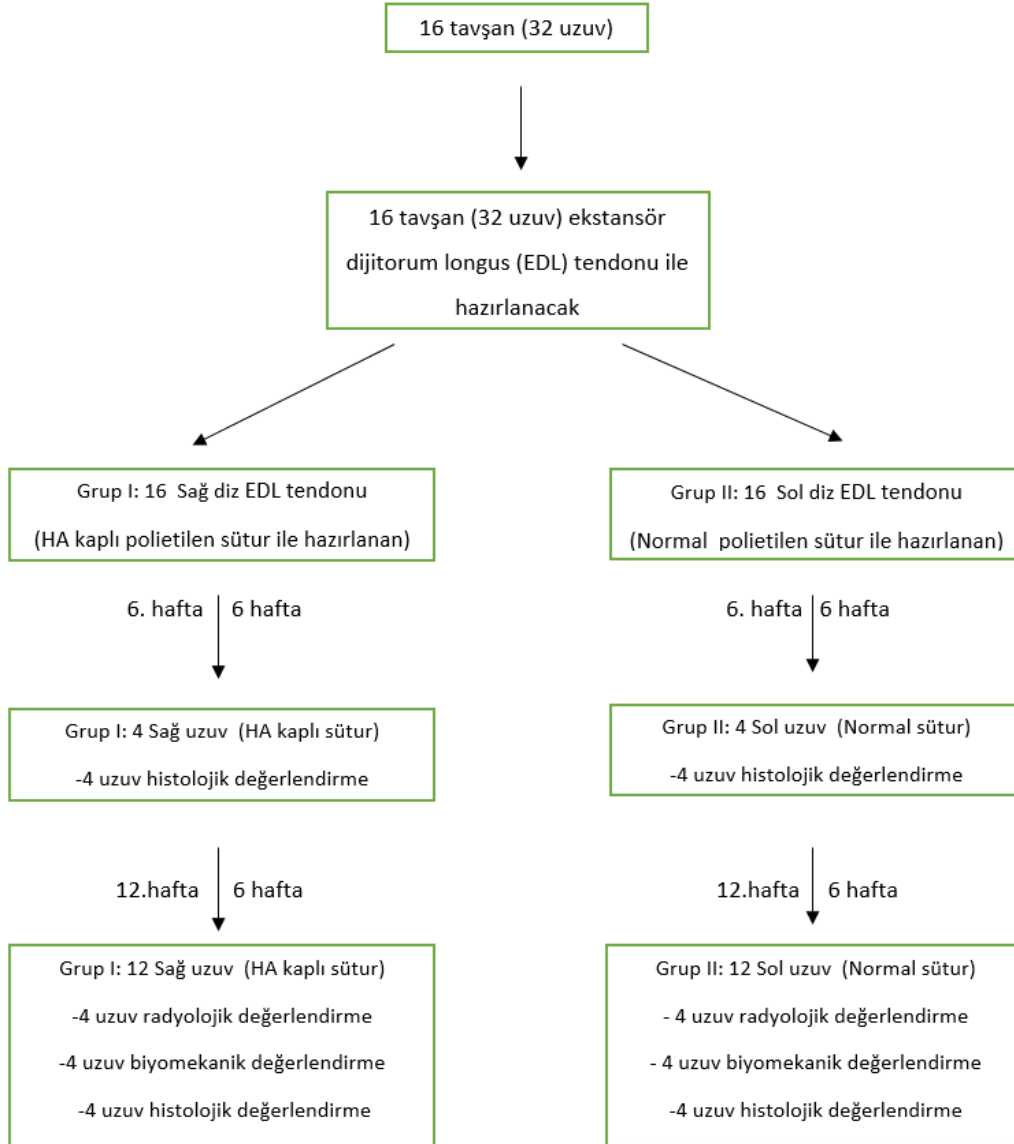
Deney Hayvanları ve Gruplandırma Çalışmamızda Bezmialem Üniversitesi hayvan deneyleri laboratuvarından temin edilen 16 adet Yeni Zelanda deney tavşanı kullanıldı. Denekler; yaşları 1,5 ile 2 yaş arasında, ağırlıkları 2,5 kg ile 3,2 kg arasında ve erkek cinsiyet seçildi. Deney süresince tüm denekler 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde aydınlatma altında, %50-60 nem ve 20-24 °C derece oda sıcaklığında tekli kafeslerde tutuldu. Standart laboratuvar diyeti ve su ile ad libitum beslenme şekliyle beslendi.

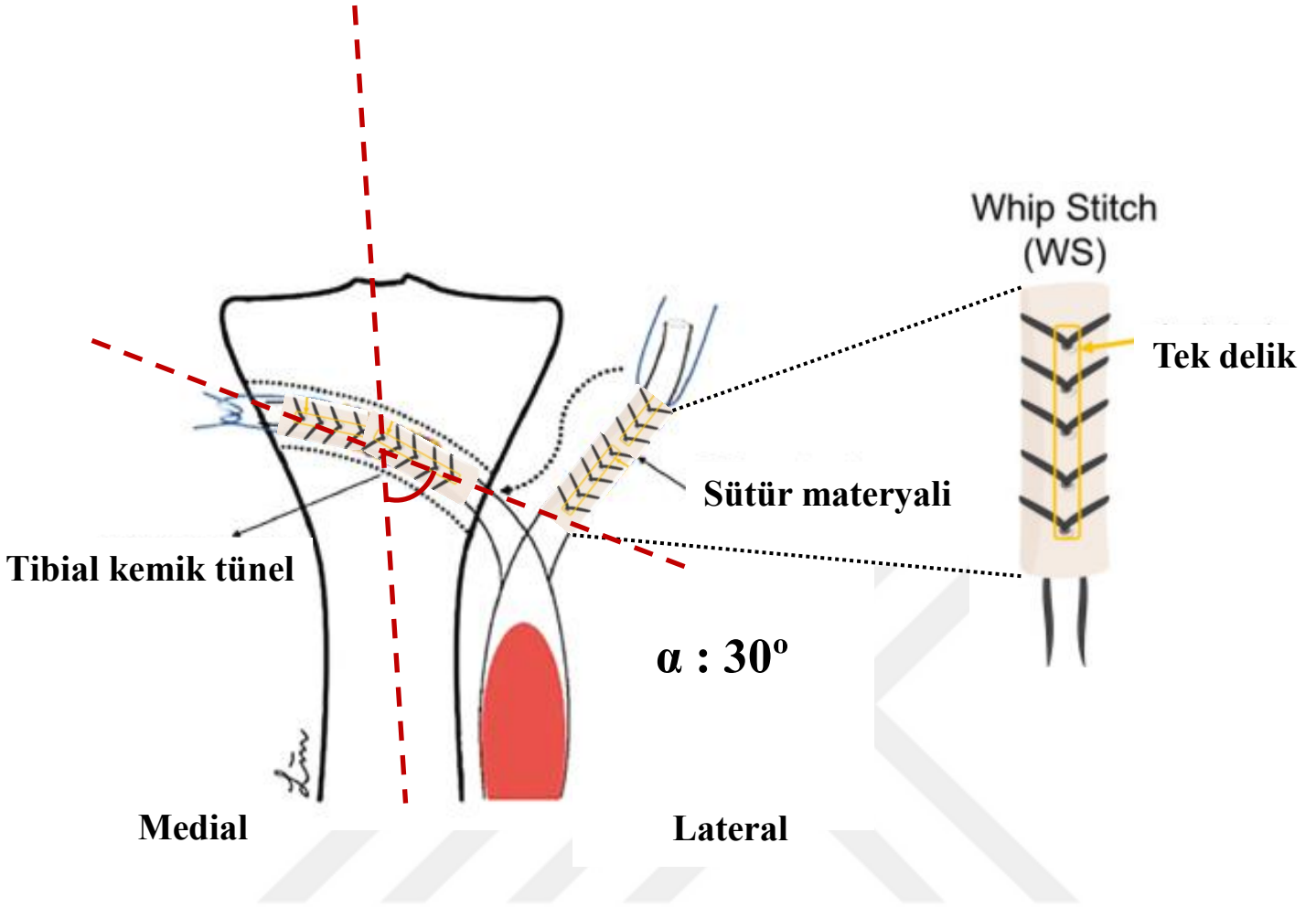
Deneysel çalışmada Yeni Zelanda cinsi 16 adet tavşanın toplamda 32 uzvu kullanıldı (Tablo 1). Deneklerin anestezisi ksilazin HCL (Rhompun, Bayer, İstanbul) 10mg/kg doz, keta-min HCL 35 mg/kg (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul) ve analjezi meloksikam 5mg/kg doz ile sağlandı. Cerrahi işlem için her tavşanın diz eklemindeki tüyler anestezisi altında tıraş edildi. Her operasyon öncesi profilaktik sefazolin 50mg/kg antibiyoterapi uygulandı.

Tavşanların bilateral uzuvları ekstraartiküler KTİ modeli oluşturmak için kullanıldı ve sağ ekstansör dijitorum longus tendonları deney grubu, sol EDL tendonları kontrol grubu olmak üzere gruplar belirlendi. Cerrahi işlemde cilt, ciltaltı geçildikten sonra EDL tendonları saptandı

ve femur orijininin ayrıldı. Serbest tendon ucu serbest iğne takılan loop yapılan sütün materyaliyle standart whipstitch tekniği kullanılarak dikildi ve hazırlandı. Tibia proksimalinde tibianın uzun eksenine 30 derece açđ ile lateral korteksten medial kortekse doğru 2 mm genişliğinde kemik tüneli oluşturuldu. Tendon greftini kemik tünelinden çekmek için bir serbest düz iğne kılavuz olarak kullanıldı ve greft, proksimal tibianın medialine geçtikten sonra korteks üzerine sütün düğümü ile sabitlendi (Şekil 23,24). Ameliyat sonrası tüm deney hayvanlarına yara enfeksiyonunu önlemek ve ağrı kontrolünü sağlamak için penisilin ve meloksikam uygulandı. Deneklerin günübirlik yara bakımı, beslenme kontrolleri veteriner hekim kontrolünde sağlandı.

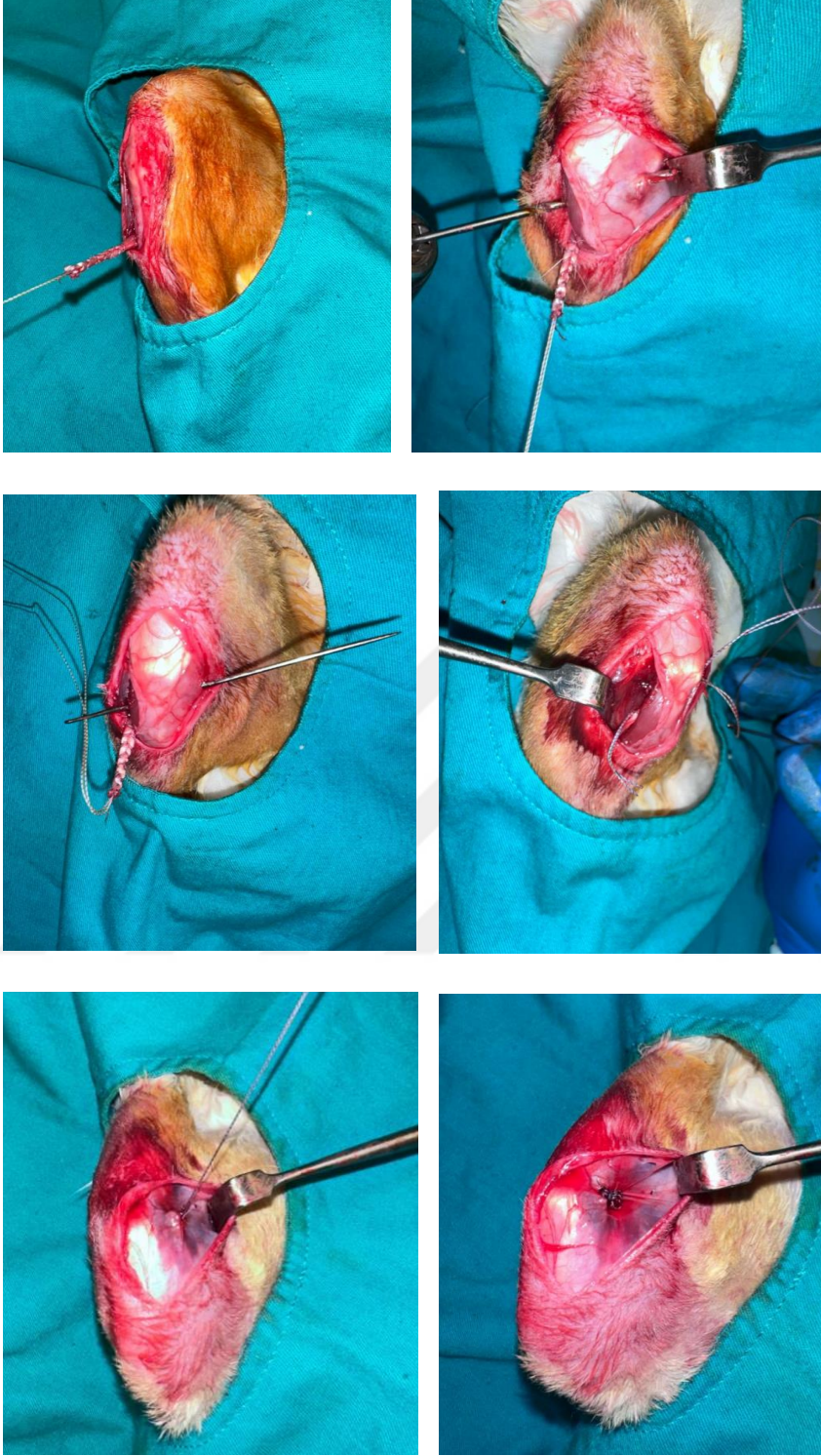
Tablo 1. Hayvan deneyi çalışma planı





**Şekil 23:** Ekstraartiküler KTİ modeli ve sütür materyali ile tendonun hazırlanması. 'Diaz MA, et al. Whip-Lock Stitch Is Biomechanically Superior to Whipstitch for Semitendinosus Tendons. *Arthrosc Sports Med Rehabil.* 2024 Jan 20;6(1):100853.' ve 'Wong CC, et al. Augmentation of Tendon Graft-Bone Tunnel Interface Healing by Use of Bioactive Platelet-Rich Fibrin Scaffolds. *Am J Sports Med.* 2020 May;48(6):1379-1388.'

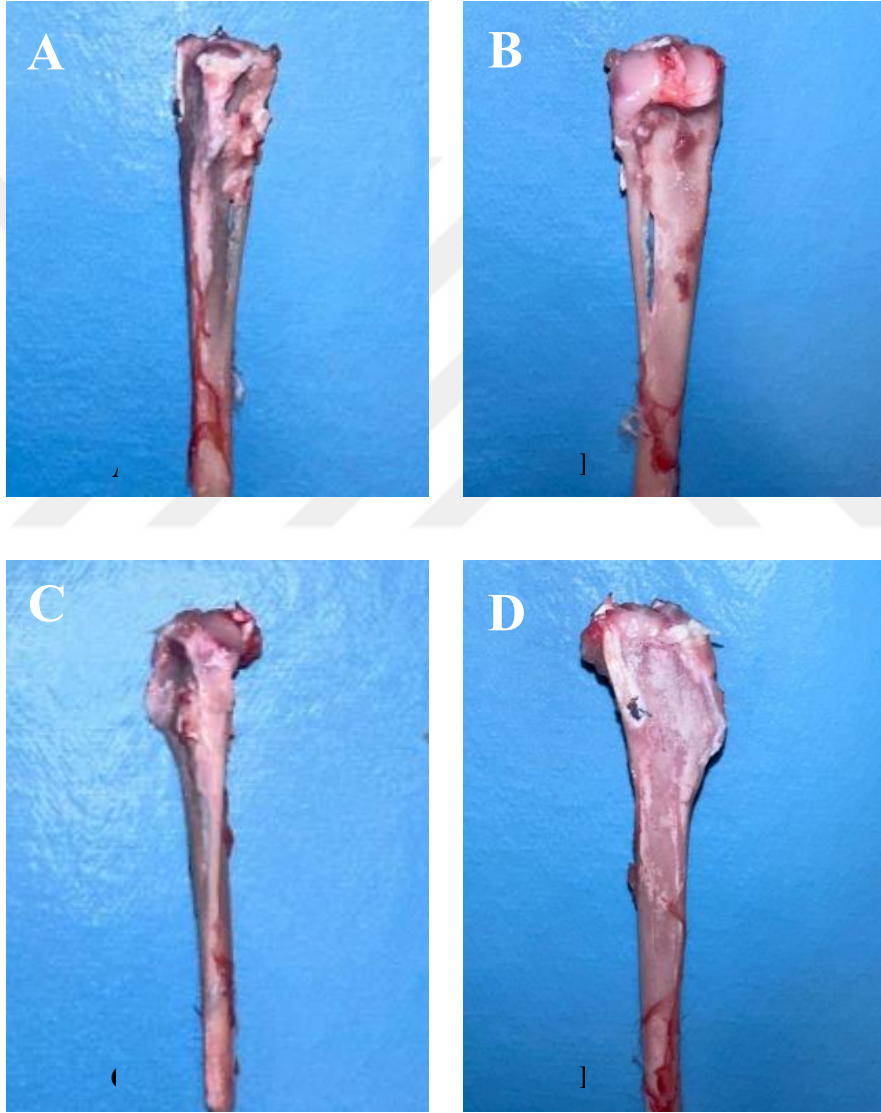
İşlem sonrası 6. haftada 4 tavşan – 8 uzuv , 12.haftada 12 tavşan – 24 uzuv (sağ dizleri: Grup I, sol dizleri: Grup II) her grupta 4'ü biyomekanik olarak, 4'ü radyolojik ve her gruptan 8'i (6 ve 12. haftalarda 4'er tane olmak üzere) histolojik açıdan değerlendirilmek üzere sakrifiye edildi (Tablo 1). Sakrifikasyon uygulaması yüksek doz Thiopental Sodium (Pental, İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş.) ile sağlandı.



**Şekil 24:** Ekstraartiküler KTİ modeli, tavşanda uygulanan cerrahi prosedür basamakları.

#### IV.C.Mikroskopik Değerlendirme

6 ve 12'nci haftada sakrifiye edilen tavşanlardan mikroskopik değerlendirme için toplam 16 adet numune elde edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası ilgili ekstremitelerin diz eklemlerinden distaline kadar uzanacak şekilde cilt ciltaltı geçildi ve diz eklemi seviyesinden dezartikülasyon ve ayak bileği superiorundan aşil tendonu seviyesinden de gigli teli yardımıyla tibia osteotomisi yapıldı ve tibidaki kemik tünel ve tendon grefti tünel girişi seviyesinden korunarak numunelerden yumuşak dokular ayrıştırıldı (Şekil 25).



**Şekil 25:** Mikroskopik değerlendirme için hazırlanan numune görselleri; (A) Anterior, (B) Posterior, (C) Lateral, (D) Medial (Radyolojik değerlendirme için de numune hazırlığı aynı şekilde yapılmıştır.).

Dokuların fiksasyonu ve histolojik incelemeler için dokular %10'luk formolde 24–48 saat bekletildi. Daha sonra kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular, %10'luk nitrik asit içinde kontrollü şekilde bekletildi. Nitrik asitin uzaklaştırılması amacıyla 20 dakika akan musluk suyu altında yıkandı. Sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutularak dehidratasyon sağlandı. Ardından 30'ar dakika 2 farklı ksilene tabi tutuldu. Birer saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlanan dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile aksiyel ve sagittal olmak üzere 5µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin mikroskopik incelemesi için Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom ile boyama işlemi gerçekleştirildi.

#### **IV.C.1.Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü**

Kesitler parafinden uzaklaştırmak için 1 gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra 20-10-10' ar dakikalık etüv içerisinde üç farklı ksilene tabi tutuldu. Dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su altında 40 dakika tutulduktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Sonrasında, fazla boyaların dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akan su altında tutulan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Kesitler sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirildi ve şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç ksilende tutulmanın ardından entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

#### **IV.C.2.Masson Trikrom Boyama Prosedürü**

Dokular ksilol, alkol ve su ile parafinden uzaklaştırıldı. Önceden 45°C'ye kadar ısıtılmış %5'lik (ferric ammonium sulphate)  $FeNH_4(SO_4) \cdot 2.12H_2O$  içinde 5 dakika mordantlandı (renk sabitleştirici). Çeşme suyunda yıkandıktan sonra Regaud'un hematoksilen solüsyonu içinde 5 dakika boyandı ve %95'lik alkolde yıkandı. Pikrik alkolde diferansiye edildikten sonra da çeşme suyunda yıkandı. Ponceau-asit fuksin solüsyonunda 5 dakika boyandı ve distile suda yıkama işlemi yapıldı. Preparat 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte diferansiye edildi. Prepaarata Asetik anilin mavisi solüsyonu döküldü, 5 dakika beklendi ve tekrar distile suda yıkandı. Preparat sırasıyla 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte tekrar bırakıldı, %1'lik sulu asetik asitte 5 dakika bırakıldı ve absolü alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edilerek yıkandıktan sonra ksilol ile şeffaflaştırıldı, balsam ile kapatıldı.

### **IV.C.3.Histolojik Görüntü Analizi**

Histolojik değerlendirmeler uzman bir patolog ve bir ortopedist tarafından randomize kör olarak yapıldı. Elde edilen kesitlerin x40 ve x200 büyütmeleeri değerlendirildi. Bu büyütmeleerdeki görüntüler dijital ortama aktarıldı.

#### **a.Histomorfometrik Değerlendirme**

Histomorfometrik değerlendirmeler, her numune için uygun kesitlerde x40 büyütmede elde edilen dijital görüntüler üzerinden ImageJ (Bharti Airtel Ltd 1.8.0, Windows) açık kaynak programı kullanılarak tendon çevresindeki kemik ve FİZ alanlarının ve derinliklerinin oranları ile tendon çevresindeki kemikleşme yüzdeleri değer olarak belirlendi.

#### **b.KTİ Karakterizasyonu**

Histolojik olarak uygun kesitlerdeki x200 büyütmedeki dijital görüntüler FİZ ekstraselüler matriks, kolajen lifleri ile Sharpey liflerinin varlığı ve yoğunluğu, intertrabeküler boşlukları dolduran kemik doku büyümesi ve FİZ - kemik arayüzündeki sklerotik doku oluşumu değerlendirildi.

KTB'nin direkt veya indirekt tip olup olmadığını değerlendirmek için histolojik görüntülerde KTİ karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bu sebeple Jang ve ark. KTİ karakterizasyonuna yönelik geliştirdikleri puanlama sistemindeki kriterler kullanılarak grupların 6'ncı hafta ve 12'nci hafta histolojik görüntülerinde KTA'daki hücrelerin olgun kıkırdak hücre içeriğine göre morfolojisi, Sharpey benzeri liflerin yoğunluğuna göre hücre dışı matriksin yapısı, tendonu çevreleyen fibrokartilaj dokunun genişliği ve KTA dokusunun geçiş belirsizliğine göre değerlendirildi (135). Puanlama sistemindeki tendon çevresi matriksin imünohistokimyasal olarak tip II kolajen boyanma miktarı çalışmamızda imünohistokimyasal boyama kullanmadığımız için değerlendirilmemiştir.

### **IV.D.Radyolojik Değerlendirme**

12. haftada sakrifiye edilen tavşanlardan radyolojik değerlendirme için toplam 8 adet numune elde edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası ilgili ekstremitelerin diz eklemlerinden distaline kadar uzanacak şekilde cilt ciltaltı geçildi ve diz eklemi seviyesinden dezartikülasyon ve ayak bileği superiorundan aşil tendonu seviyesinden de gıgli teli yardımıyla tibia osteotomisi yapıldı.

Tibidaki kemik tünel ve tendon grefti tünel girişi seviyesinden korunarak numunelerden yumuşak dokular ayrıştırıldı.

Katı numunelerin farklı yoğunluktaki bileŐenlerinin yüksek znrlkte, tahribatsız bir Şekilde 3 boyutta incelenmesine imkan veren bir görüntüleme tekniği olması ve doku diseksiyonuna gerek kalmadan morfolojik yapılardan yüksek znrlkte ve mikroskobik inceleme detayında görüntüler elde edilebilmesine olanak sağlamasından ötürü radyolojik değerlendirmede kullandığımız görüntüleme cihazı mikro-BT oldu. Çalışmamızda, gruplar arası radyolojik olarak KTİ modelinin değerlendirilmesi Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikro-BT Laboratuvarında yapıldı.

Numuneler 80kVp, 125mA, Al filtre, 22 µm piksel boyutu ve 0,2 adımda rotasyon ayarlarında yüksek znrlkl mikro-BT sistemi (Bruker Skyscan 1275, Kontich, Belçika) kullanılarak taranmıŐtır (Şekil 26). Tarama süresi yaklaşık 1 saattir. Halka artefaktlarını en aza indirmek için her taramadan önce dedektörün hava kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Her numune 5 dakikalık bir entegrasyon süresi içinde 360° döndürülmüŐtür. Her numune, aynı tarama parametreleriyle çalıŐmanın standardizasyonunu sağlamak için iki kez taranmıŐtır.



**Şekil 26:** Yüksek znrlkl Mikro-BT sistemi (Bruker Skyscan 1275, Kontich, Belçika).

#### IV.D.1.Mikro-BT Görüntü Analizi

Numunelerin görüntülenmesi ve kantitatif ölçümleri aksiyal, iki boyutlu (2B),  $1000 \times 1000$  piksel görüntüler sağlayan NRecon (ver. 1.6.10.4, SkyScan, Bruker, Billerica, MA; ABD) ve BT-analiz yazılımı (CTAn, ver. 1.17.7.2, SkyScan, Bruker, Billerica, MA, ABD) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeniden yapılandırma parametreleri için halka artefaktı düzeltmesi ve yumuşatma sıfıra sabitlenmiştir. Işın artefakt düzeltmesi %38 olarak ayarlanmıştır. Kontrast limitleri SkyScan'in talimatlarına göre uygulanmıştır. NRecon yazılımı kullanılarak, tarayıcı tarafından elde edilen görüntüler 2 boyutlu dilimleri gösterecek şekilde yeniden yapılandırılmıştır. Toplamda, tüm numunelerin toplam hacimlerinden yaklaşık 450 ila 700 kesitsel görüntü yeniden yapılandırılmıştır.

3 boyutlu volümetrik görselleştirme ve hacim ölçümü için CTAn yazılımı (SkyScan, Bruker, Billerica, MA, ABD) kullanılmıştır. Rekonstrüksiyondan sonra ilgili bölgeler (VOI) CTAn yazılımı kullanılarak çizilmiştir. VOI'ler tüm tüneller boyunca uzanmakta olup CTAn 2D/3D (Bruker Micro-CT, Bruker, Billerica, MA SA) ile hesaplanan parametreler tünel girişinde, ortasında ve çıkışında çevresel lineer değerlerin ( $\mu\text{m}$ ) ortalamasını, tünel içindeki tendon çevresinde oluşan kemik dokusunun hacmini ( $U^3$ ) ve tendon çevresinde oluşan kemik dokusunun arayüzey alanını ( $U^2$ ) içermiştir.

Ayrıca CTAn yazılımı veri setlerinin Hounsfield birimleri (HB) ve mineral yoğunluğu (MY) ölçeklerine entegre bir şekilde kalibre edilmesini sağlamıştır. Bu amaçla, kalibrasyon ölçümleri için 0,25 ve 0,75 g/cm<sup>3</sup> kalsiyum hidroksiapatit (CaHAp) mineral konsantrasyonlarına sahip iki farklı konik MD (fantom) çubuğu kullanılmıştır.

Numuneler ve MD fantom çubukları kalibrasyon taraması için aynı tüplere yerleştirilmiştir. Bu da yoğunluk değerinin her bir tarama için bağımsız olarak kalibre edilmesini sağlamıştır. Taramadan sonra gri tonlama değerleri, iki fantom çubuktan elde edilen gri tonlama değerlerine dayanan doğrusal bir kalibrasyon eğrisi ile mineral yoğunluğu değerlerine dönüştürülmüştür. Tünel içindeki tendon çevresinde oluşan kemik dokusunu diğer dokulardan ayırmak için uygun bir eşik gereklidir. Bu nedenle, CTAn yazılımı kullanılarak global bir eşikleme uygulanmıştır; tüm prosedür aynı yazılım kullanılarak yarı otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Tendon çevresinde oluşan kemik dokunun mineral yoğunluğunu 3B hacimlerde analiz etmek için orijinal gri tonlamalı görüntüler gürültü azaltma amacıyla Gauss alçak geçiren filtre ile işlenmiş ve otomatik segmentasyon eşiği kullanılmıştır. Sadece siyah/beyaz piksellerden oluşan bir görüntü

elde etmek için gri seviye aralığının işlendiği bir eşikleme (binarizasyon) işlemi uygulanmıştır. Her bir kesit için mineral yoğunluğunu analiz etmek üzere bütünüyle tek bir nesneyi içeren bir ROI seçilmiştir. Her numune için nihai kemik mineral yoğunluğu ( $\text{g/cm}^3$ ) hesaplanmıştır.

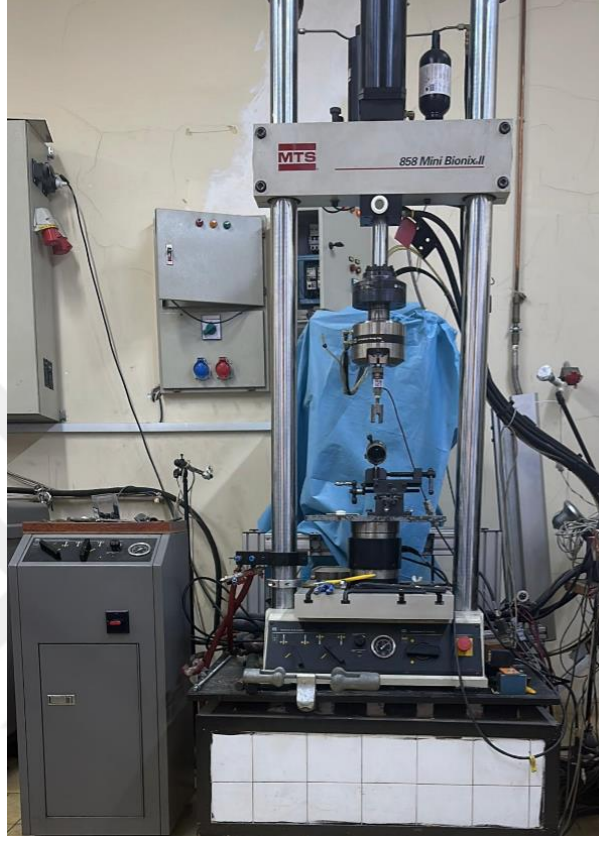
Yeniden yapılandırılan görüntüler ayrıca görselleştirme için SkyScan CTVox'ta (ver. 3.3.0, SkyScan, Bruker, Billerica, MA, ABD) işlenmiştir. Tüm rekonstrüksiyonlar, 75 Hz'de  $2048 \times 2560$  çözünürlüğe ve 0,17 mm nokta aralığına sahip, 11,9 bit ile çalışan 0,3 inç düz panel renkli aktif matris TFT medikal ekran (NEC MultiSync MD215MG, Münih, Almanya) ile yapılmıştır.

#### **IV.E.Biyomekanik Değerlendirme**

Bağ ve tendonların öncelikli fonksiyonu gerilme kuvvetlerini iletmek olduğundan, bu dokuların biyomekanik deneysel çalışmaları tek eksenli gerilimde çoğunlukla gerçekleştirilir. İzole olarak bağ ve tendon dokusunun değerlendirilmesi, birçok sebepten ötürü doğal olarak zordur (örneğin, numunenin klempe sağlam tespit edilememesi, stres yoğunlaşma noktaları, dokuların boy olarak kısalığı). Bağ veya tendon dokularının kemik girişleri sağlam bırakılarak (örneğin, kemik-bağ-kemik kompleksi) çekme testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testten, kemik bağ-kemik kompleksi veya kas-tendon-kemik kompleksi için doğrusal olmayan (yukarı doğru içbükey) bir yük - uzama eğrisi elde edilebilir. Doku kompleksinin yapısal özelliklerini gösteren bu eğri sertlik, kopma kuvveti, kopma deplasmanı gibi parametreleri anlamamızı sağlar.

12. haftada sakrifiye edilen tavşanlardan biyomekanik değerlendirme için toplam 8 adet numune elde edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası ilgili ekstremitelerin diz eklemlerinden distaline kadar uzanacak şekilde cilt, ciltaltı geçildi ve diz eklemi seviyesinden dezartikülasyon ve ayak bileği superiorundan aşıl tendonu seviyesinden de gigli teli yardımıyla tibia osteotomisi yapıldı. Tibidaki kemik tünel ve tendon grefti tespitinden sonra greftin muskölöz parçası disseke edildi (Şekil 28). Diseksiyon sonrasında kalan yumuşak dokular numuneden ayrıştırıldı. Akabinde numunelerin diseksiyonunun yapıldığı aynı gün numuneler biyomekanik test için 2 no ethi-bond sütür yardımıyla greftin muskölöz parçası hazırlandı. Numunelerin kemik parçası cam macun yardımıyla daire şeklindeki plastik yuvalara proksimal metafizodiyafizer kısımları açıkta olacak şekilde gömüldü. Muskölöz parçadan geçirdiğimiz ipin serbest ucu loop yapıldı ve çekme testinin üst ucunu oluşturacak şekilde biyomekanik cihazının yük hücreğine entegre edilmiş olan makaradan geçirildi. Numunelerin kemik parçası ise çekme testinin alt ucunu oluşturacak şekilde plastik yuvaların biyomekanik cihazının metal yuvasına sıkıştırılması suretiyle

sabitlendi. Ardından tünele paralel olacak şekilde aksiyel çekme testinin yapılabilmesi için numunelerin pozisyonu ayarlandı (Şekil 29).

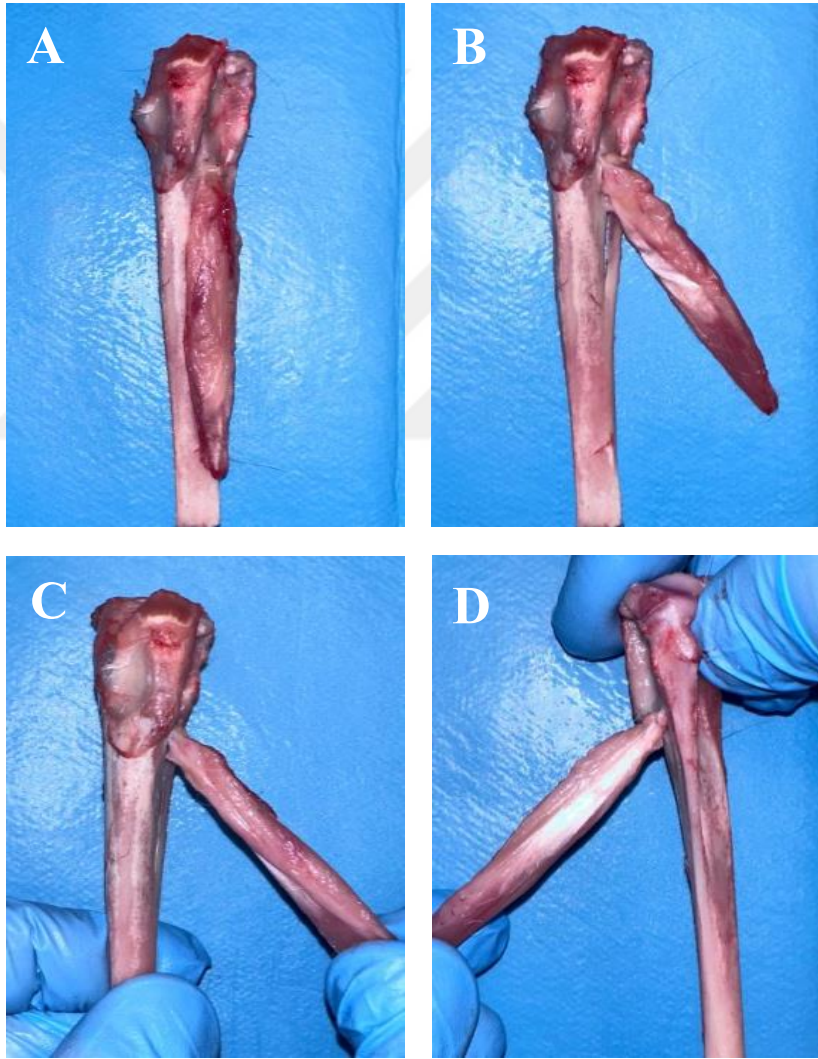


**Şekil 27:** INSTRON (MTS –Bionix II); biyomekanik çekme testi yapılan cihaz.

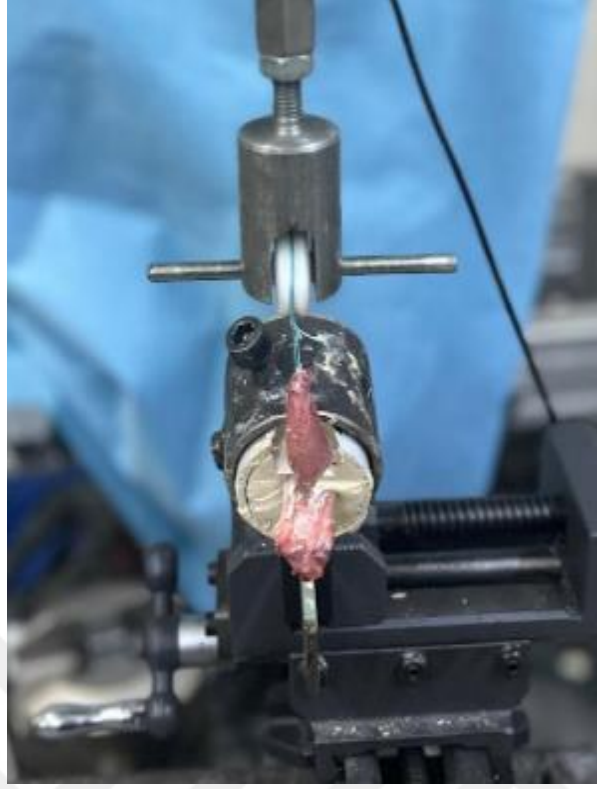
Çalışmamızda da gruplar arası biyomekanik olarak KTİ modelinin yapısal özellikleri karşılaştırılması için İstanbul Teknik Üniversitesi Makine Mühendisliği Fakültesi Mukavemet Laboratuvarında MTS 858 Mini Bionix II (Model No:359 XX Serial No: 10189576) cihazında çekme testi yapıldı (Şekil 27). Biyomekanik çekme testleri tendon üzerinden 0,1 mm/sn hızla lineer çekme kuvveti uygulanarak gerçekleştirildi ve ESİT SPA 20 yük hücresi (load cell) ile tek noktadan çekim kuvvet verisi ölçüldü. Deplasman verisi ise MTS LVDT Transducer (Serial No: 10188729) aracılığıyla kaydedildi. Kopma kuvveti (Newton - N), kopma deplasmanı (mm) ve sertlik(N/mm) değerleri kaydedildi. Ayrıca kas-tendon-kemik kompleksinin uygulanan çekme testi sonrasında hangi seviyesinde kopma olduğu kayıt altına alındı.

#### IV.F.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programının 29.0 versiyonu (IBM, Armonk, NY, USA) gerçekleştirildi. Ekstraartiküler KTİ modelinde HAp kaplı sütür (Grup I – Deney Grubu) ve normal sütür (Grup II – Kontrol Grubu) ile cerrahi prosedür uygulanan gruplar arası karılatırmalar bağımlı t-test kullanılarak yapıldı. Zaman ve grubun histomorfometrik değerlendirmeler üzerindeki anlamlı etkisini belirlemek için tekrarlı ölçümlerde 2 yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. P değerinin 0.05’in altında olması anlamlı kabul edildi.



**Şekil 28:** Biyomekanik değerlendirme için hazırlanan numune görselleri; (A) Anterior, (B) Kemik-tendon-kas kompleksi , (C) Tendon intakt (anterior) , (D)Tendon intakt (lateral).



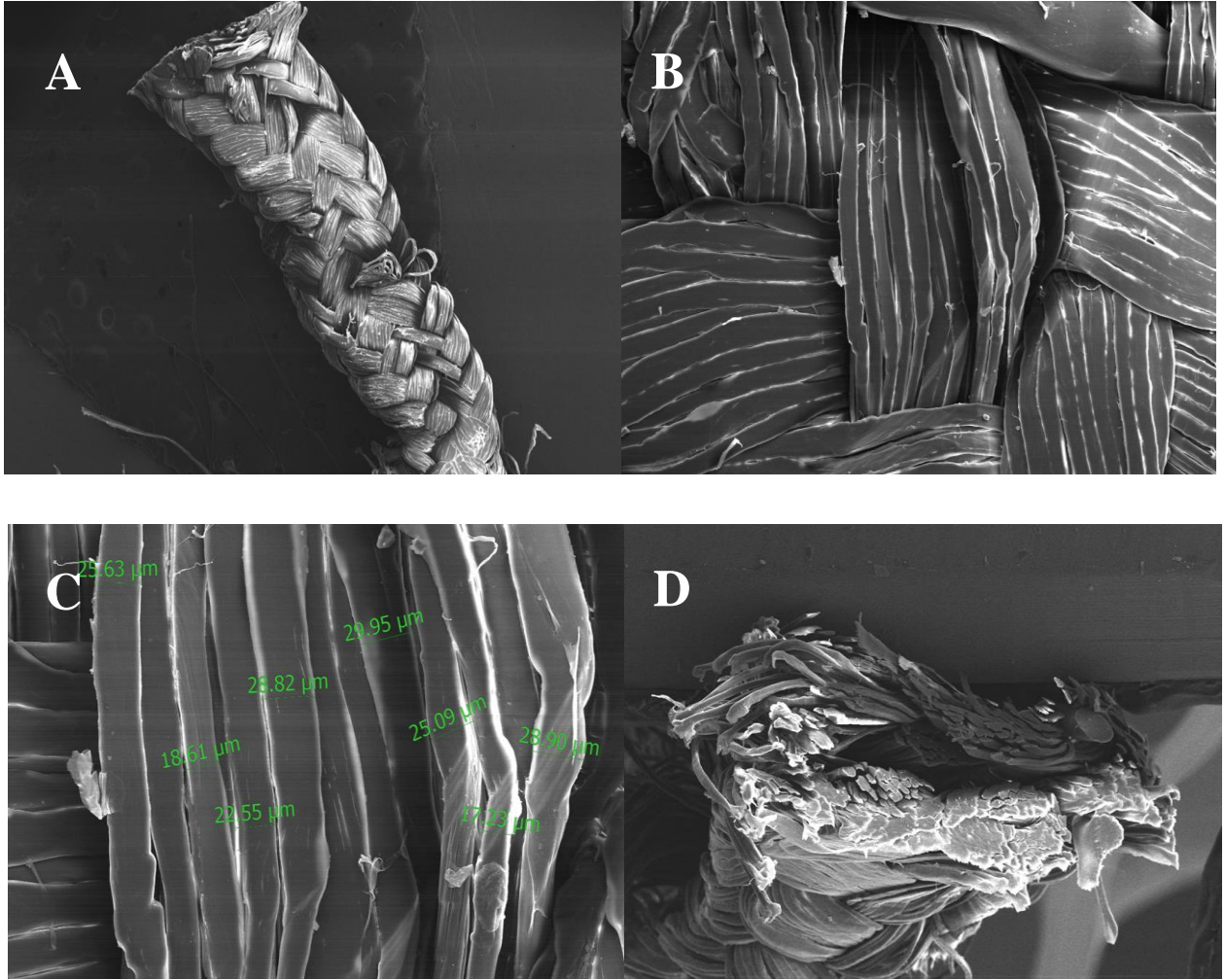
**Şekil 29:** Kemik-tendon-kas kompleksi ile hazırlanan biyomekanik test düzeneği görselleri.

## V.BULGULAR

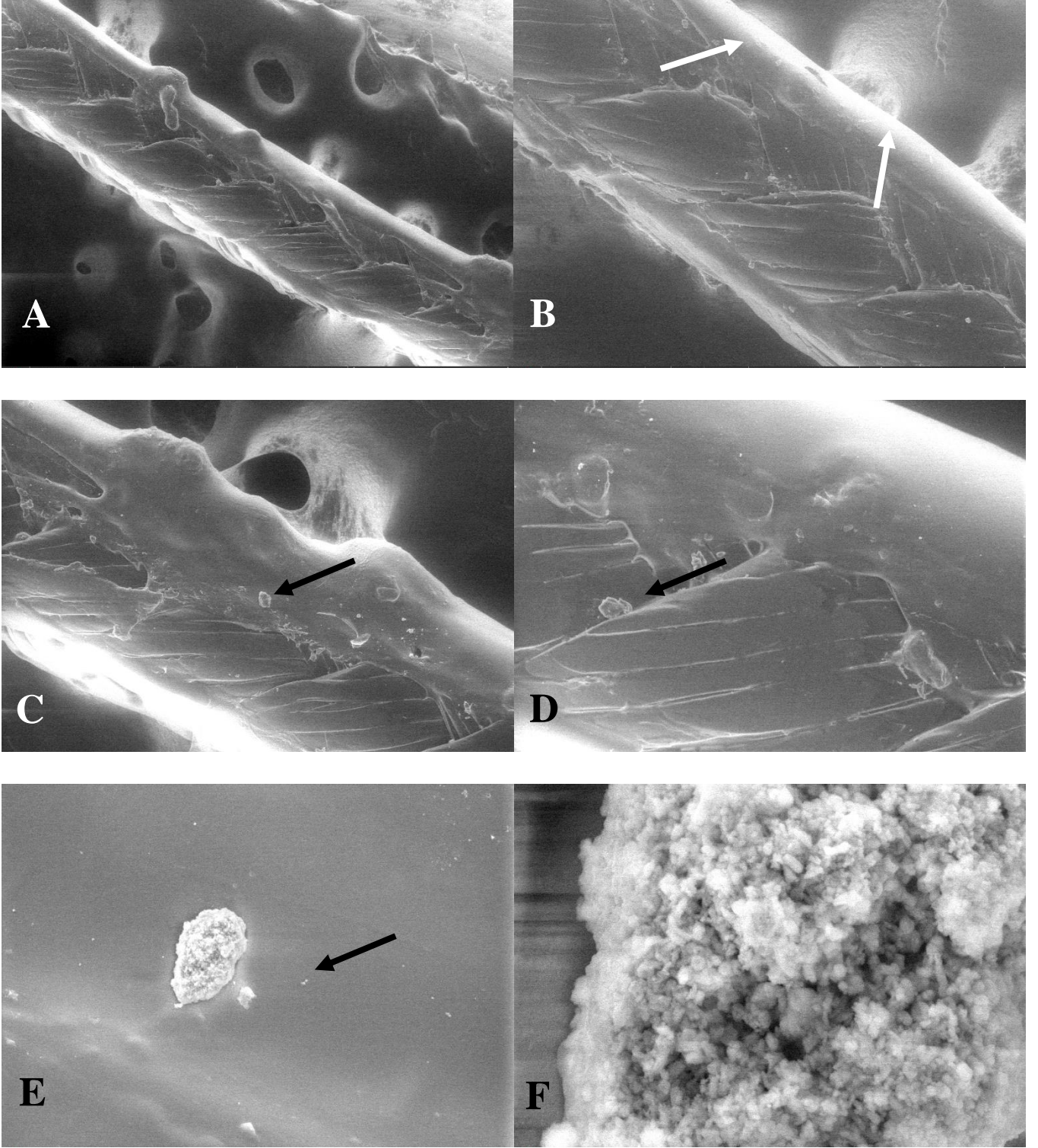
### V.A.HAp Kaplama Prosedürü Bulguları

#### V.A.1.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin Morfolojik Analizi

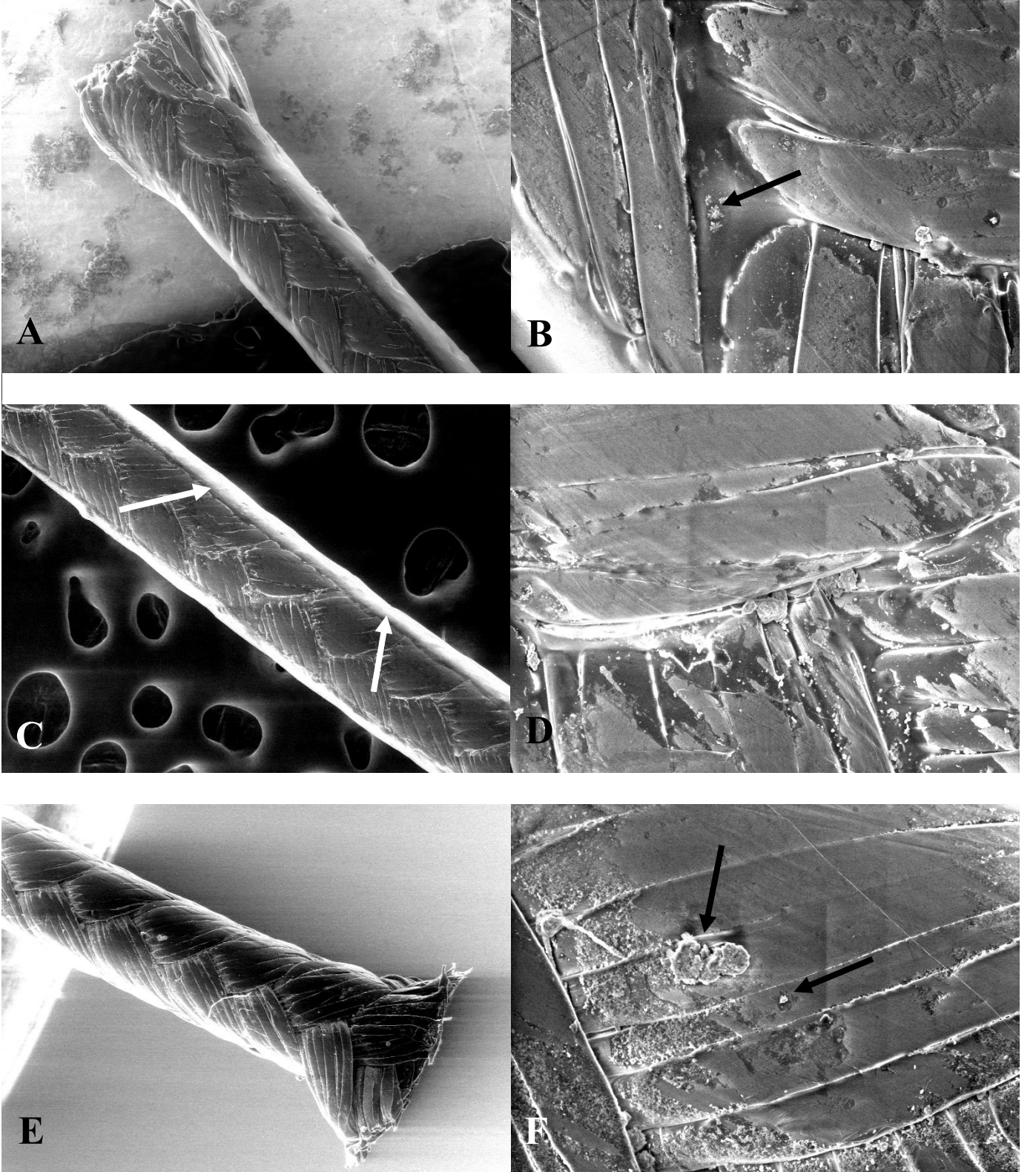
Normal ve HAp kaplanmış sütür materyalleri üzerindeki TEM gözlem sonuçları değerlendirildiğinde normal sütür materyali yüzeyinin pürüzsüz olduğu görülmüştür (Şekil 30). Kaplanmış sütür materyallerinde ise HAp partikülleri sütürün yüzeyinde düzgün bir şekilde birikmiş ve sütürün her tarafını saran bir katman oluşturmuştur (Şekil 31). Ayrıca mekanik sürtünmeye dayanıklılık değerlendirmesine yönelik elde ettiğimiz K1, K2, K3 sütür materyallerinin TEM gözlem sonuçlarında da HAp pariküllerinin sütürün yüzeyinde düzgün bir şekilde biriktiği ve sütürün her tarafını saran bir katman oluşturduğu görüldü (Şekil 32-34).



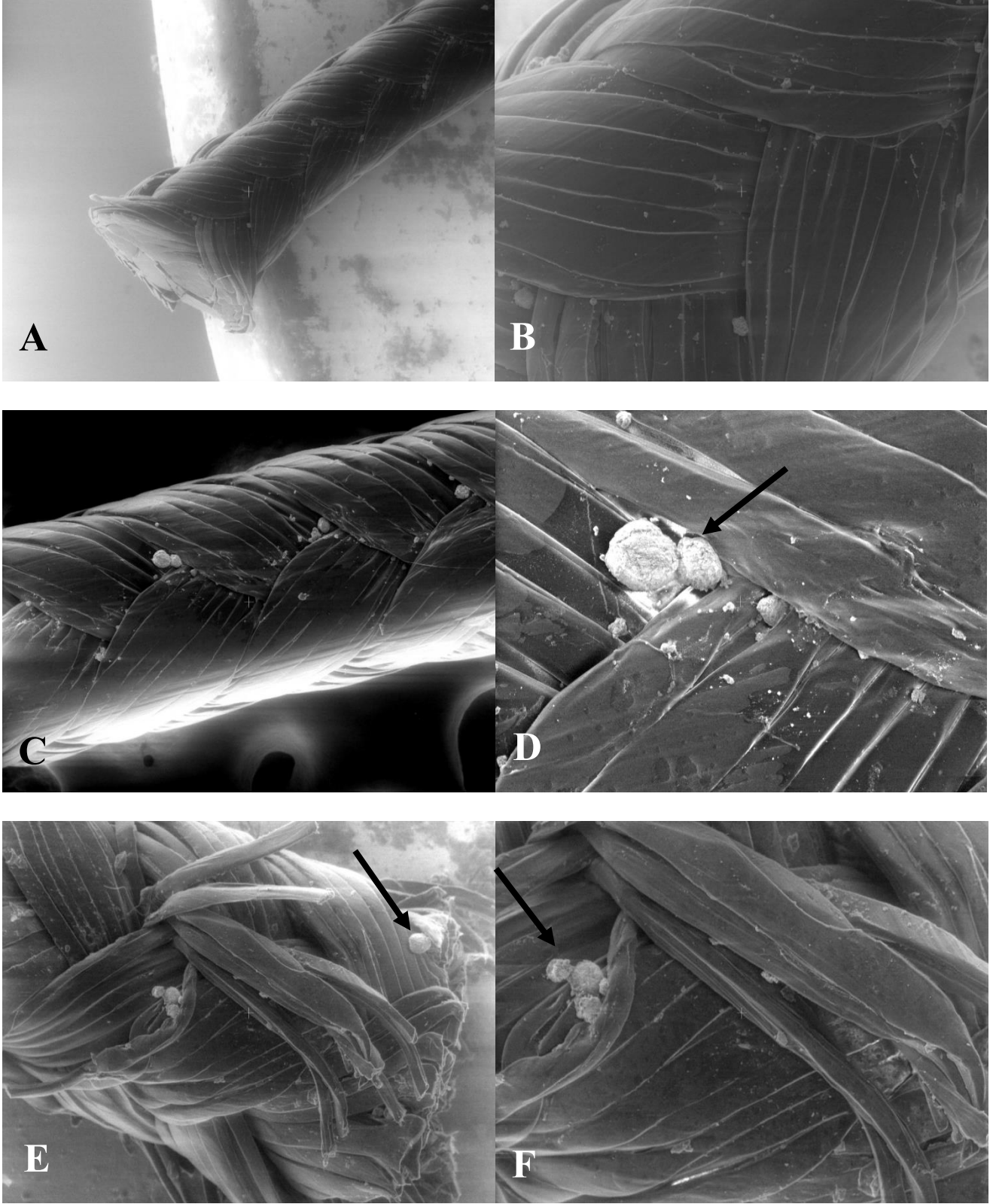
**Şekil 30:** 'N' sütür numunesinin TEM görüntüleri (A) 65x büyütme, frontal, (B) 500x büyütme, (C) 1200x büyütme, (D)250x büyütme, aksiyel.



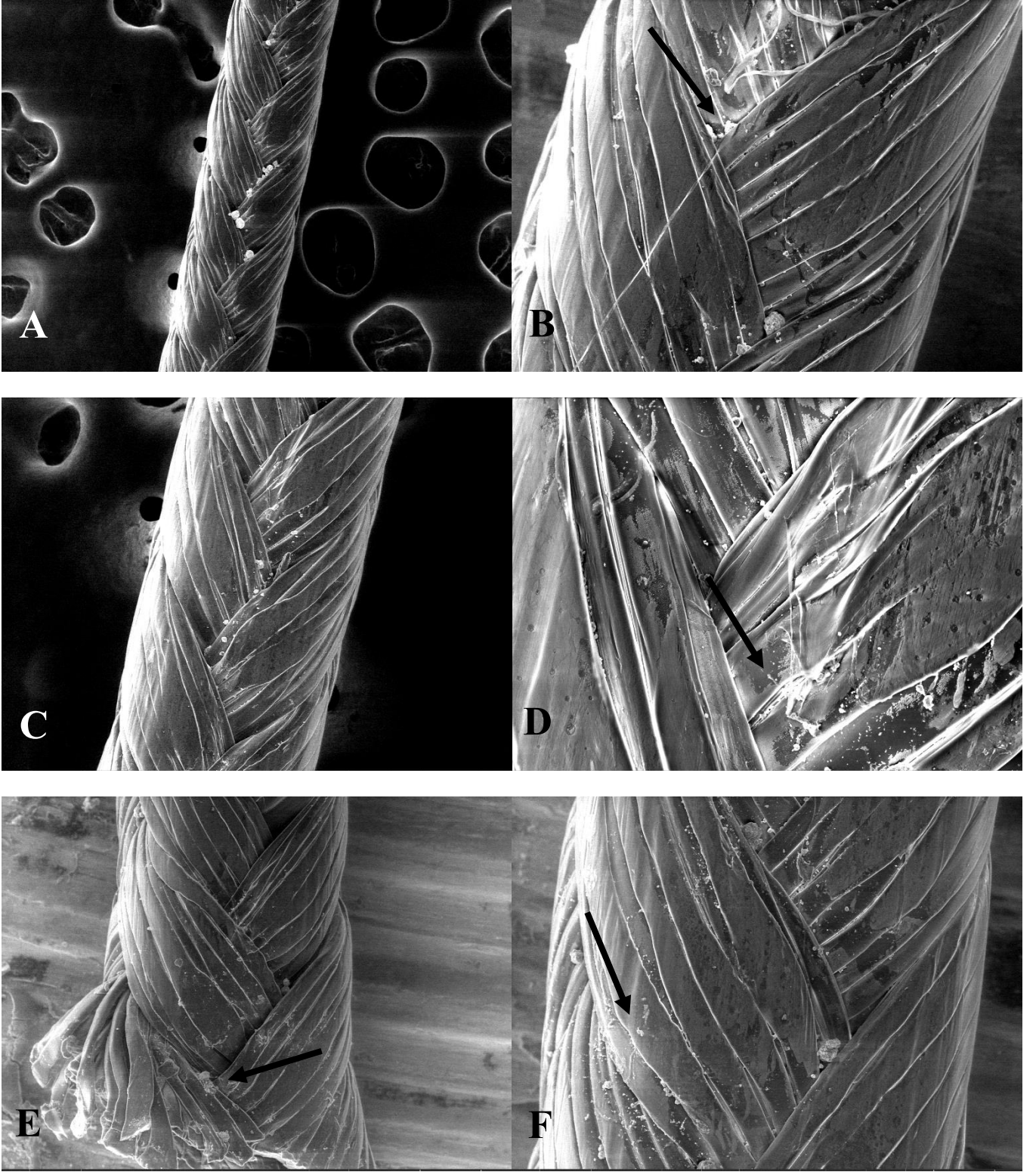
**Şekil 31:** 'HA' sütün numunesinin TEM görüntüleri (A) 250x büyütme, (B) 500x büyütme, (C) 500x büyütme, (D) 1000x büyütme, (E) 5000x büyütme, (F) 40000x büyütme. Jelatin sütün her tarafını saran bir katman oluşturmuş (beyaz oklar), HAp kristallerinin sütün yüzeyindeki birikimi (siyah oklar).



**Şekil 32:** 'K1' sütün numunelerinin TEM görüntüleri (A-B) 250x - 2000x büyütme, 1'inci uç, (C-D) ) 250x - 2000x büyütme, Orta, (E-F) ) 250x - 2000x büyütme, 2'nci uç. Jelatin sütünün her tarafını saran bir katman oluşturmuş (beyaz oklar), HAp kristallerinin sütün yüzeyindeki birikimi (siyah oklar).

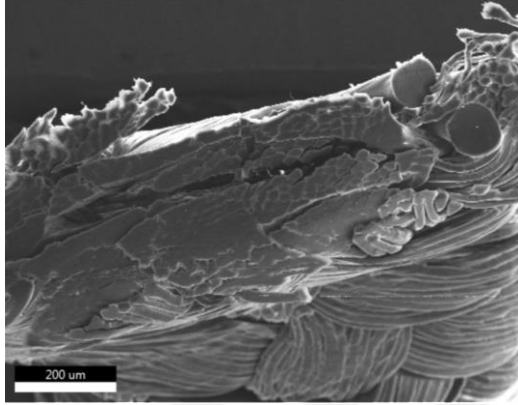


**Şekil 33:** 'K2' sütün numunelerinin TEM görüntüleri (A-B) 250x - 1000x büyütme, 1'inci uç, (C-D) ) 500x - 2000x büyütme, Orta, (E-F) ) 500x - 1000x büyütme, 2'nci uç. HAp kristallerinin sütün yüzeyindeki birikimi (siyah oklar).

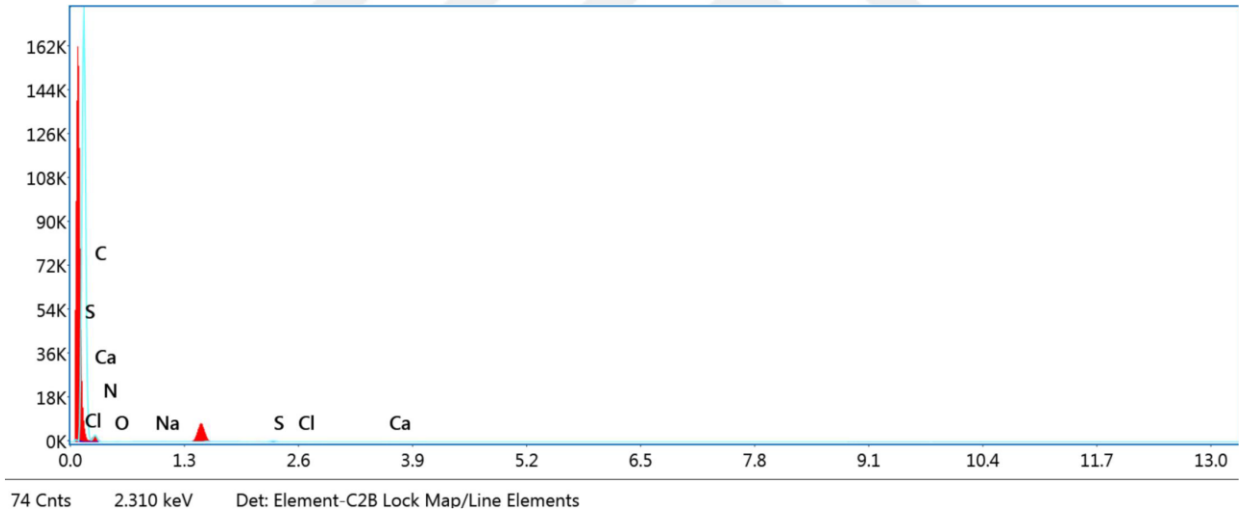


**Şekil 34:** 'K3' sütün numunelerinin TEM görüntüleri (A-B) 250x - 1000x büyütme, 1'inci uç, (C-D) ) 500x - 2000x büyütme, Orta, (E-F) ) 500x - 1000x büyütme, 2'nci uç. HAp kristallerinin sütün yüzeyindeki birikimi (siyah oklar).

### V.A.2.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin Karakterizasyonu



Element	Kütle %	Atomik %	Hata %
C K	77.26	84.89	9.52
N K	6.04	5.69	55.32
O K	5.97	4.93	17.77
NaK	1.34	0.77	15.32
S K	7.06	2.90	5.14
ClK	1.16	0.43	21.22
CaK	1.18	0.39	26.70

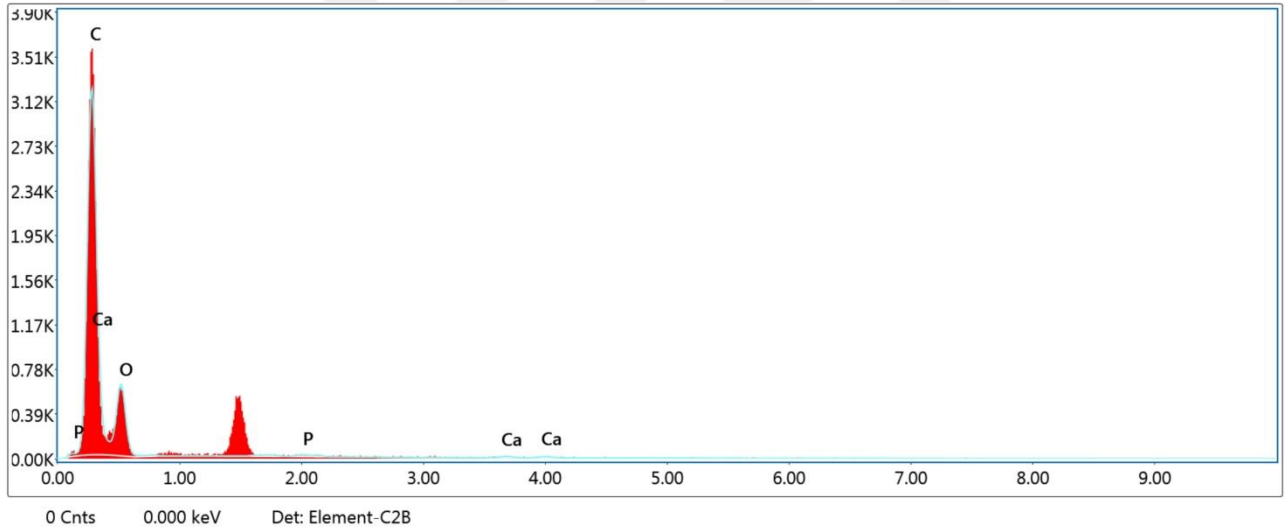


**Şekil 35:** N sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.

Sütür numunelerinin kaplamaya yönelik elementel bileşim analizi TEM - EDS ile değerlendirilmiştir. Şekil 35 normal sütür numunesinin EDS analizi olup Şekil 36-39'daki HAp kaplanmış sütür numunelerini saran inorganik katmanı temsil eden spektrumlardır.



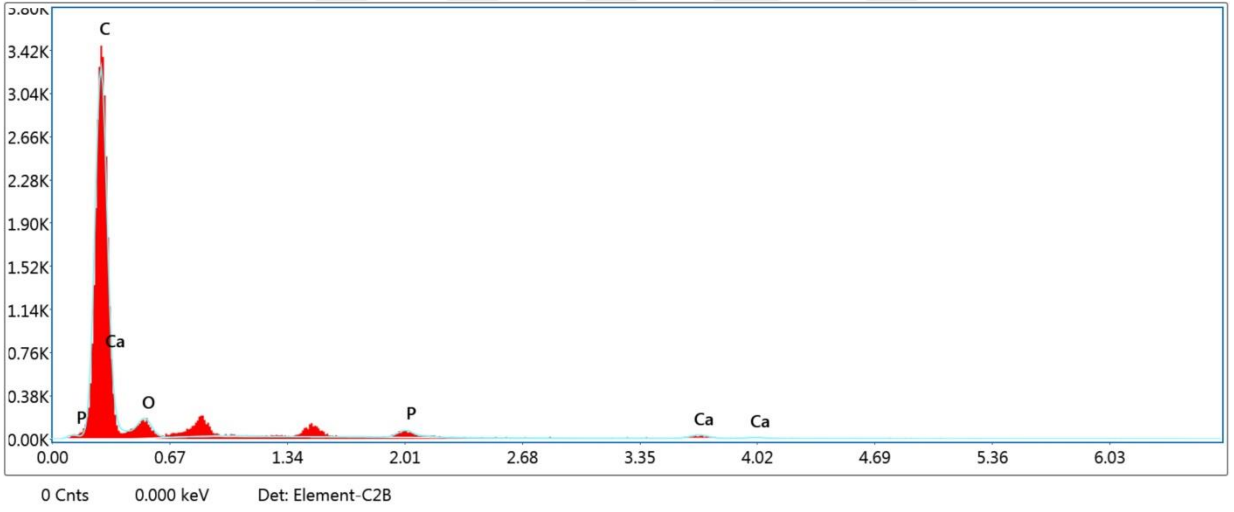
Element	Kütle %	Atomik %	Hata %
CK	73	78.5	4.2
OK	26.2	21.2	13.5
PK	0.3	0.1	62.4
CaK	0.5	0.2	39.3



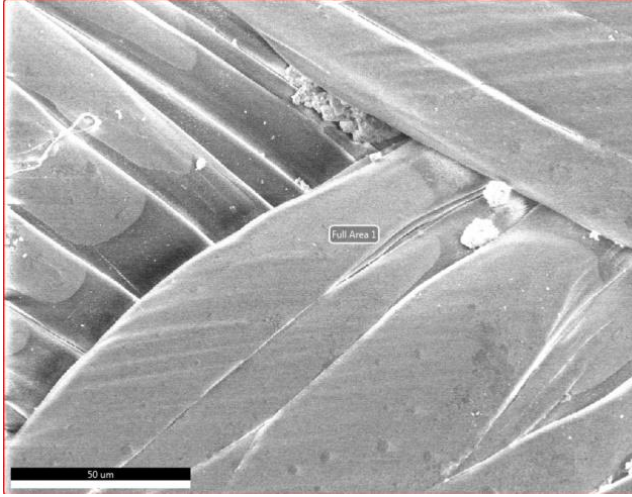
**Şekil 36:** HA sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.



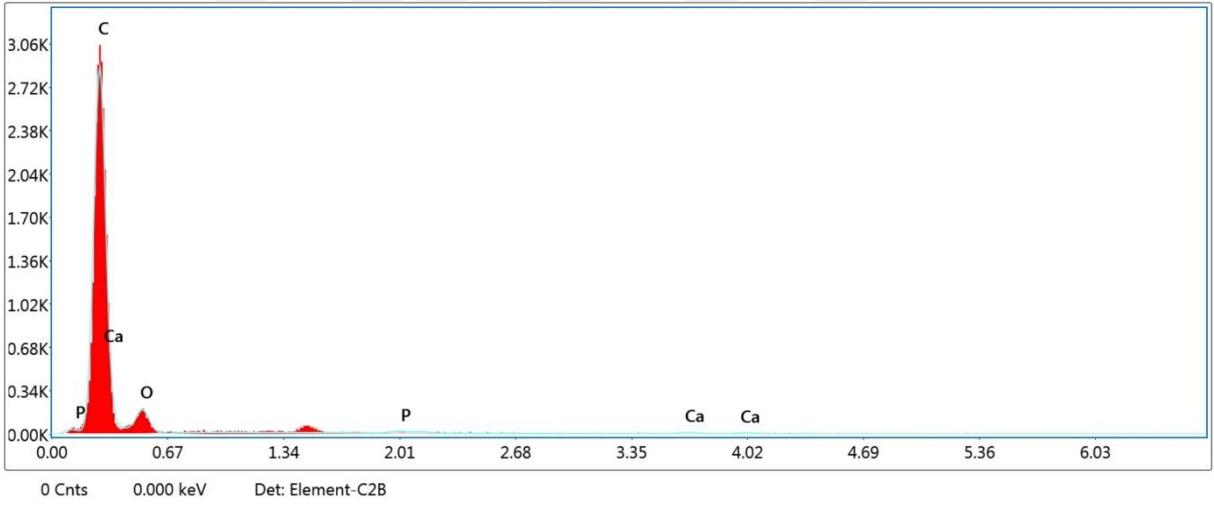
Element	Kütle %	Atomik %	Hata %
C K	85.2	91.4	4.6
O K	7.5	6	24.2
P K	3	1.2	10.4
CaK	4.3	1.4	16.2



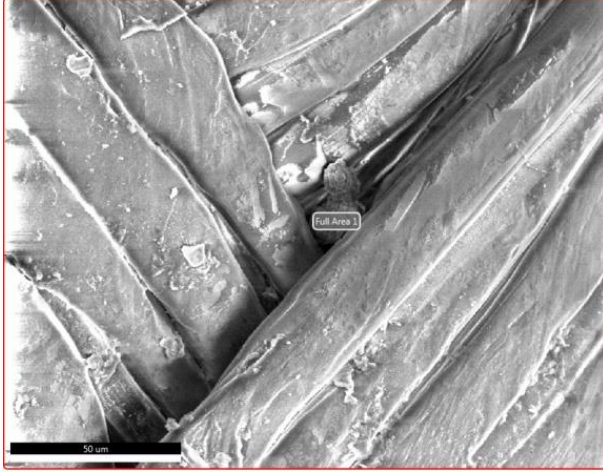
**Şekil 37:** K1 sütün numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.



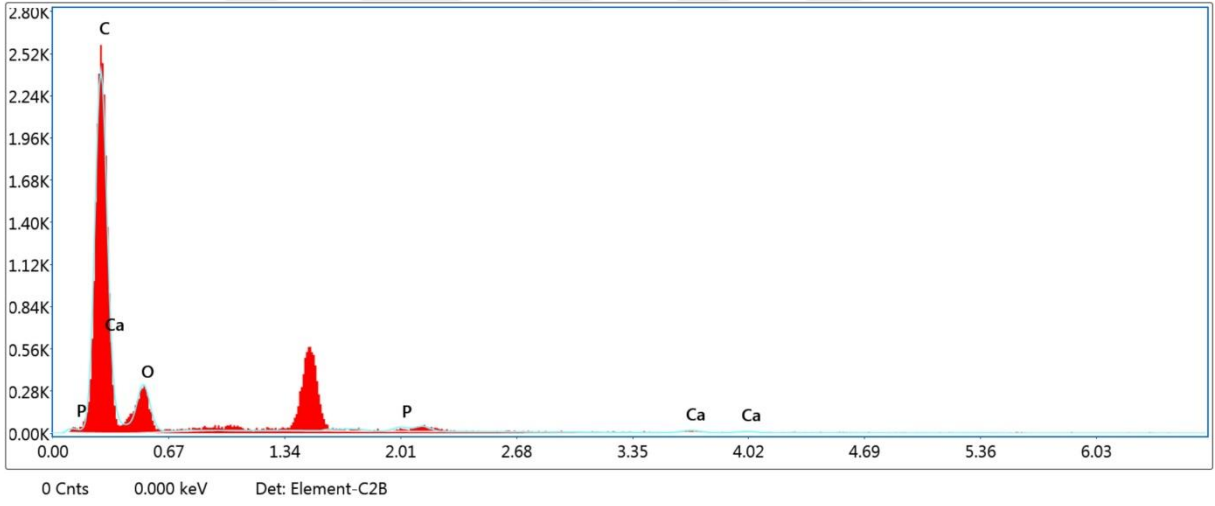
Element	Kütle %	Atomik %	Hata %
C K	85.7	89.7	3.4
O K	12.1	9.5	19
P K	0.6	0.2	13.6
CaK	1.5	0.5	25.7



**Şekil 38:** K2 sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.

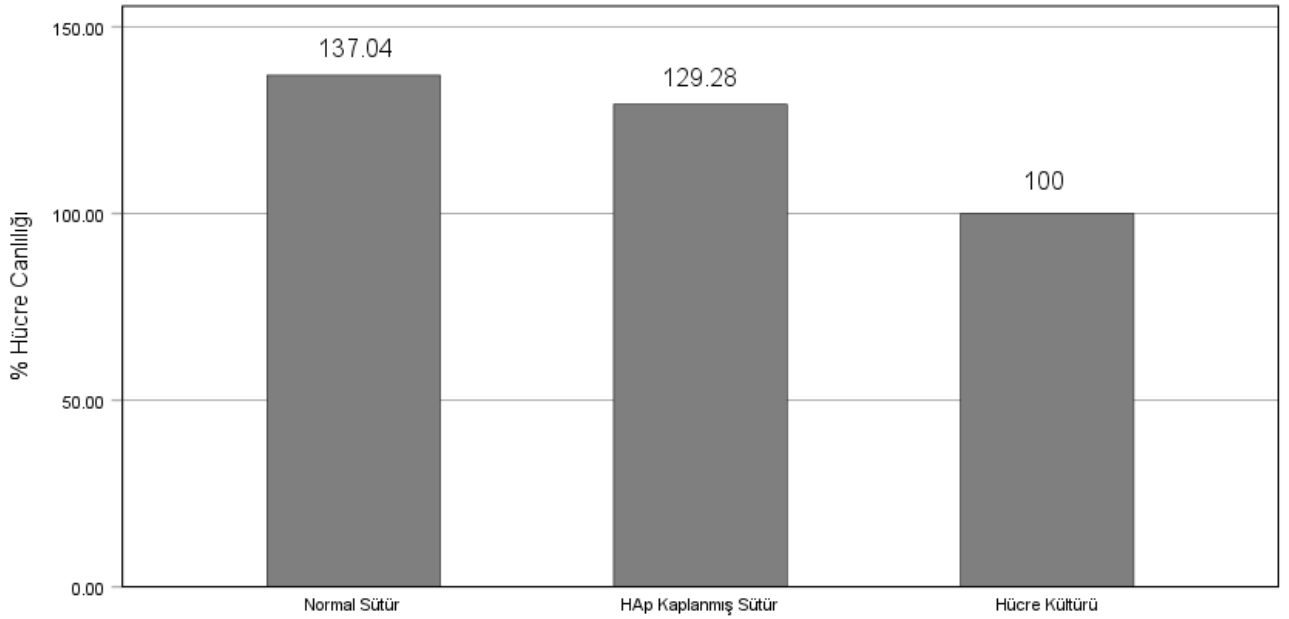


Element	Kütle %	Atomik %	Hata %
C K	82.9	88.1	3.9
O K	13.2	10.5	17.1
P K	1.1	0.5	17.5
CaK	2.8	0.9	18.8



**Şekil 39:** K3 sütür numunesinin TEM aracılığıyla elde edilen EDS analiz sonuçları.

### V.A.3.HAp Kaplanmış Sütür Materyallerinin İn vitro Sitotoksosite Deneyi



Grafik 1: L929 fare fibroblast hücre kültürüne karşı in vitro sitotoksosite deney sonuçları.

## V.B.Mikroskopik Bulgular

### V.B.1.KTA'nın Histomorfometrik Değerlendirmesi

Ekstraartiküler KTİ modelinde HAp kaplı sütür (Grup I – Deney Grubu) ve normal sütür (Grup II – Kontrol Grubu) ile cerrahi prosedür uygulanan gruplar histomorfometrik olarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Tendon çevresi kemikleşme miktarının yüzde değer olarak değerlendirilmesiyle elde edilen erken dönem (6'ncı Hafta) sonuçlarda Deney Grubunun yüzdesel kemikleşme miktarı ( $89.17 \pm 5.97$ ) Kontrol Grubu yüzdesel kemikleşme miktarından ( $29.66 \pm 10.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.012$ ) bulundu. Geç dönem (12'nci Hafta) sonuçlarda ise Deney Grubunun yüzdesel kemikleşme miktarı ( $83.81 \pm 5.61$ ) Kontrol Grubu yüzdesel kemikleşme miktarından ( $51.6 \pm 30.21$ ) daha yüksek bulundu fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.144$ ). Tendon çevresi KTA değerlendirilmesinde alan ölçümüyle yapılan kemik bölge ve FİZ oranlaması ile elde edilen erken dönem (6'ncı Hafta) sonuçlarda Deney Grubunun kemik/FİZ alan oranı ( $1.24 \pm 0.14$ ) Kontrol Grubu kemik/FİZ alan

oranından ( $0.45 \pm 0.18$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.011$ ) bulundu. Geç dönem (12'nci Hafta) sonuçlarda da Deney Grubunun kemik/FİZ alan oranı ( $2.07 \pm 0.47$ ) Kontrol Grubunun kemik/FİZ alan oranından ( $0.74 \pm 0.11$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.013$ ) bulundu. Tendon çevresi KTA değerlendirilmesinde derinlik ölçümüyle yapılan kemik bölge ve FİZ oranlaması ile elde edilen erken dönem (6'ncı Hafta) sonuçlarda Deney Grubunun kemik/FİZ derinlik oranı ( $1.12 \pm 0.18$ ) Kontrol Grubu kemik/FİZ derinlik oranından ( $0.46 \pm 0.26$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.022$ ) bulundu. Geç dönem (12'nci Hafta) sonuçlarda da Deney Grubunun kemik/FİZ derinlik oranı ( $1.87 \pm 0.42$ ) Kontrol Grubu kemik/FİZ derinlik oranından ( $0.71 \pm 0.21$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.017$ ) bulundu. Tekrarlı ölçümler için 2 yönlü varyans analizi testi sonucunda tendon çevresi yüzdesel kemikleşme miktarı değerlendirmesinde grup ( $p=0.149$ ), zaman ( $p=0.248$ ) ve grup x zaman ( $p=0.077$ ) etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tendon çevresi KTA değerlendirmesinde alan ölçümüyle yapılan kemik/FİZ alan oranlamasında ise grup ( $p=0.004$ ) etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu, zaman ( $p=0.104$ ) ve grup x zaman ( $p=0.311$ ) etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tendon çevresi KTA değerlendirmesinde derinlik ölçümüyle yapılan kemik/FİZ derinlik oranlamasında da grup ( $p=0.025$ ) etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu, zaman ( $p=0.136$ ) ve grup x zaman ( $p=0.285$ ) etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tablo 2'de histomorfometrik değerlendirmeler, 6'nci ve 12'nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar özetlenmiştir.

### **V.B.2.KTİ Karakterizasyonu**

Ekstraartiküler KTİ modelinde HAp sütür (Grup I – Deney Grubu) ve normal sütür (Grup II – Kontrol Grubu) ile cerrahi prosedür uygulanan grupların literatürde yer alan parametreler doğrultusunda KTİ'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmamızda yapılan 6'nci hafta histolojik değerlendirmesinde Kontrol Grubunda fibrokartilaj tabaka görülmedi, kondrosit hücreleri veya sharpey lifleri görülmedi, ancak Deney Grubunda ise yer yer fibrokartilaj tabakaya rastlandı, matür kondrosit hücreleri görülmedi fakat düzensiz sharpey lifleri fibrokartilaj tabaka görülen yerlerde mevcuttu. Ayrıca tendona doğru büyüyen kemik miktarı belirgin olarak Deney Grubunda daha fazlaydı ve interdijitasyonlar Kontrol Grubuna kıyasla daha yoğundu. Tidemark Deney grubunda histolojik kesitlerde az da olsa görülebildi, kontrol grubunda ise hiç rastlanmadı. 12'nci hafta histolojik değerlendirmesinde ise Deney Grubundaki düzensiz sharpey liflerinin daha düzenli hale geldiği ve sıklaştığı görüldü, fibrokartilaj tabaka görülen yerlerde kondrosit hücrelerine rastlanmaya başlandı fakat kalsifikasyon görülmedi. Ayrıca tendona doğru büyüyen kemik çevresel olarak 6'nci haftaya göre daha artmasa da alan olarak daha fazla olduğu

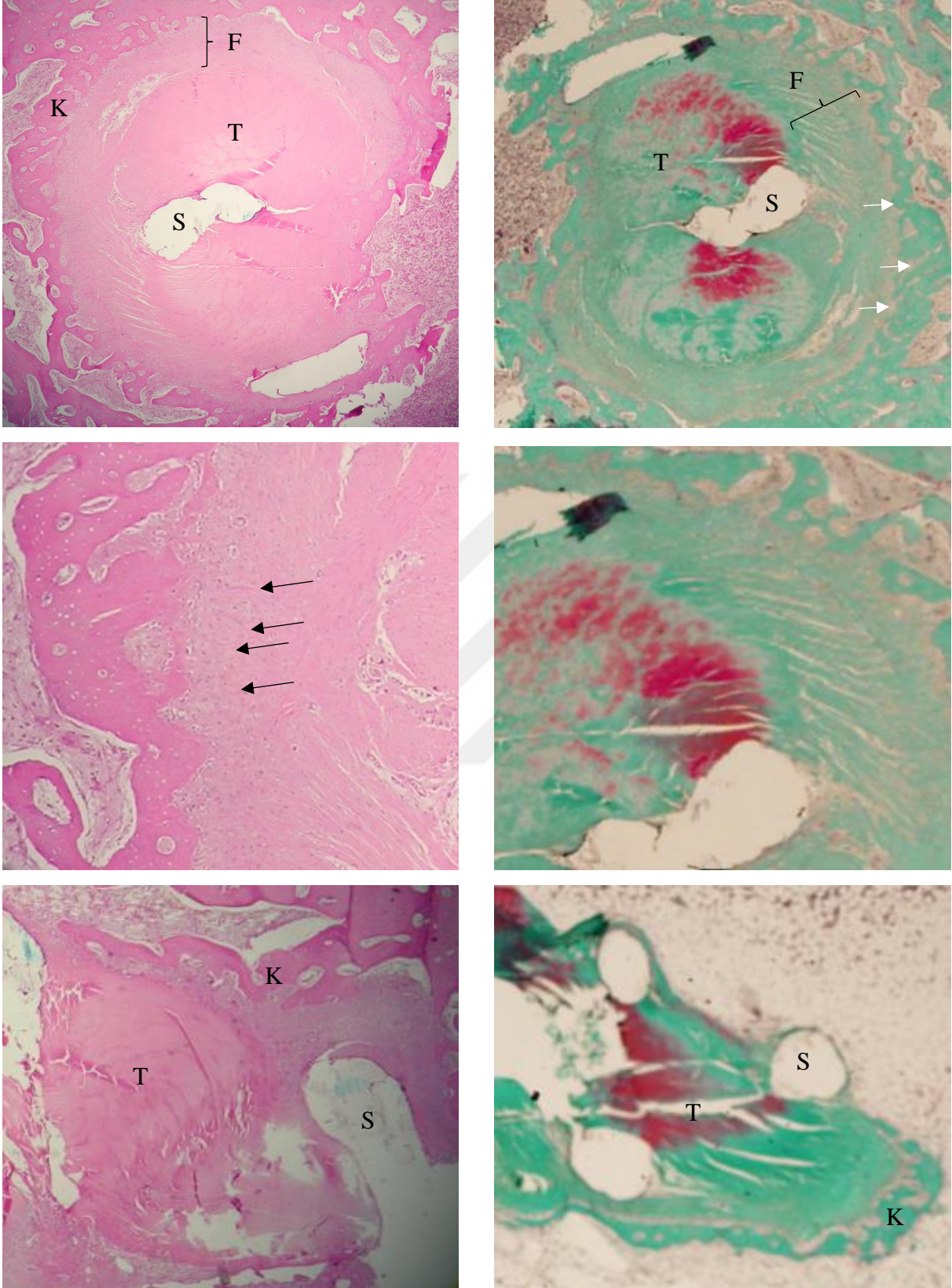
görüldü, interdijitasyonların artmadığı anlaşıldı ve hatta skleroze olan kemikle beraber interdijitasyonların daha az yoğun olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise fibrokartilaj tabakalar görülmeye başlansa da Sharpey lifleri düzensiz bir şekilde yer yer görüldü ve kondrosit hücreleri görülmedi. Tendona doğru büyüyen kemik miktarının arttığı, interdijitasyonlarda belirgin bir değişikliğin olmadığı görüldü. 6'ncı haftada tendondan kemiğe geçiş genel olarak bakıldığında Deney Grubunda Kontrol Grubuna kıyasla daha belirsizdi fakat 12'nci haftadaki değerlendirmelerde Deney Grubu tendondan kemiğe geçiş olarak en belirsiz görüntüye sahipti, Kontrol Grubunda ise 6'ncı haftaya kıyasla belirgin bir değişiklik olmadı (Şekil 40-43).

Tablo 2. Histomorfometrik değerlendirmelerde 6'ncı ve 12'nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar.

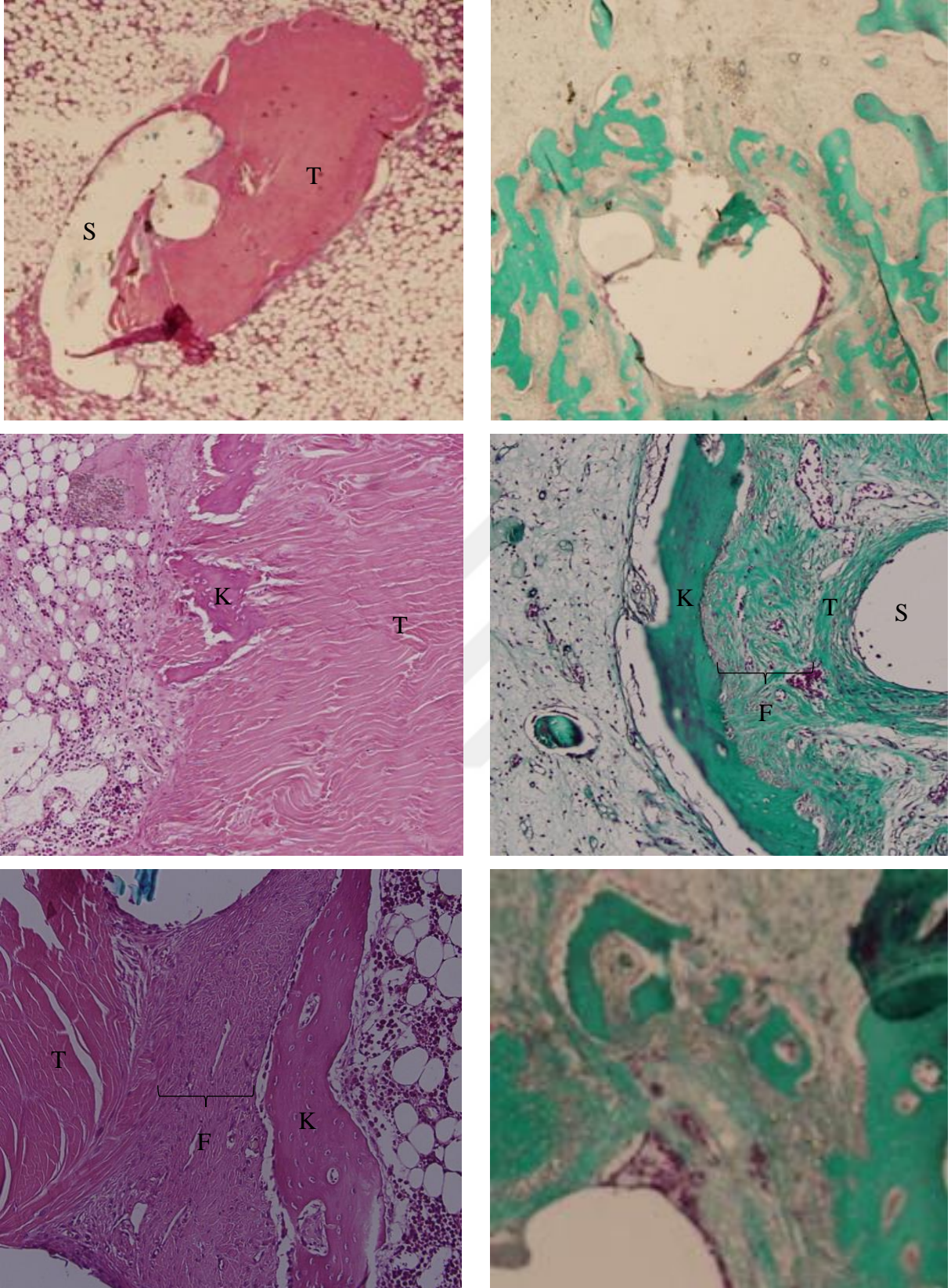
	Yüzde (Çevresel Kemik)		Alan (Kemik/FİZ)		Derinlik (Kemik /FİZ)	
	6'nci Hafta	12'nci Hafta	6'nci Hafta	12'nci Hafta	6'nci Hafta	12'nci Hafta
	Ortalama (SS)					
Grup I (Deney Grubu)	89.17 ±5.97	83.81 ±5.61	1.24 ±0.14	2.07 ±0.47	1.12 ±0.18	1.87 ±0.42
Grup II (Kontrol Grubu)	29.66 ±10.05	51.6 ±30.21	0.45 ±0.18	0.74 ±0.11	0.46 ±0.26	0.71 ±0.21
Deney ve Kontrol Grubu*; p değeri	p=0.012**	p=0.144	p=0.011**	p=0.013**	p=0.022**	p=0.017**
Varyans Analizi***; p değeri	Grup: 0.149 Zaman: 0.248 GrupxZaman: 0.077		Grup: 0.004** Zaman: 0.104 GrupxZaman: 0.311		Grup: 0.025** Zaman: 0.136 GrupxZaman: 0.285	

\*Bağımlı t test istatistiksel yöntemi uygulandı, \*\*p < 0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır,

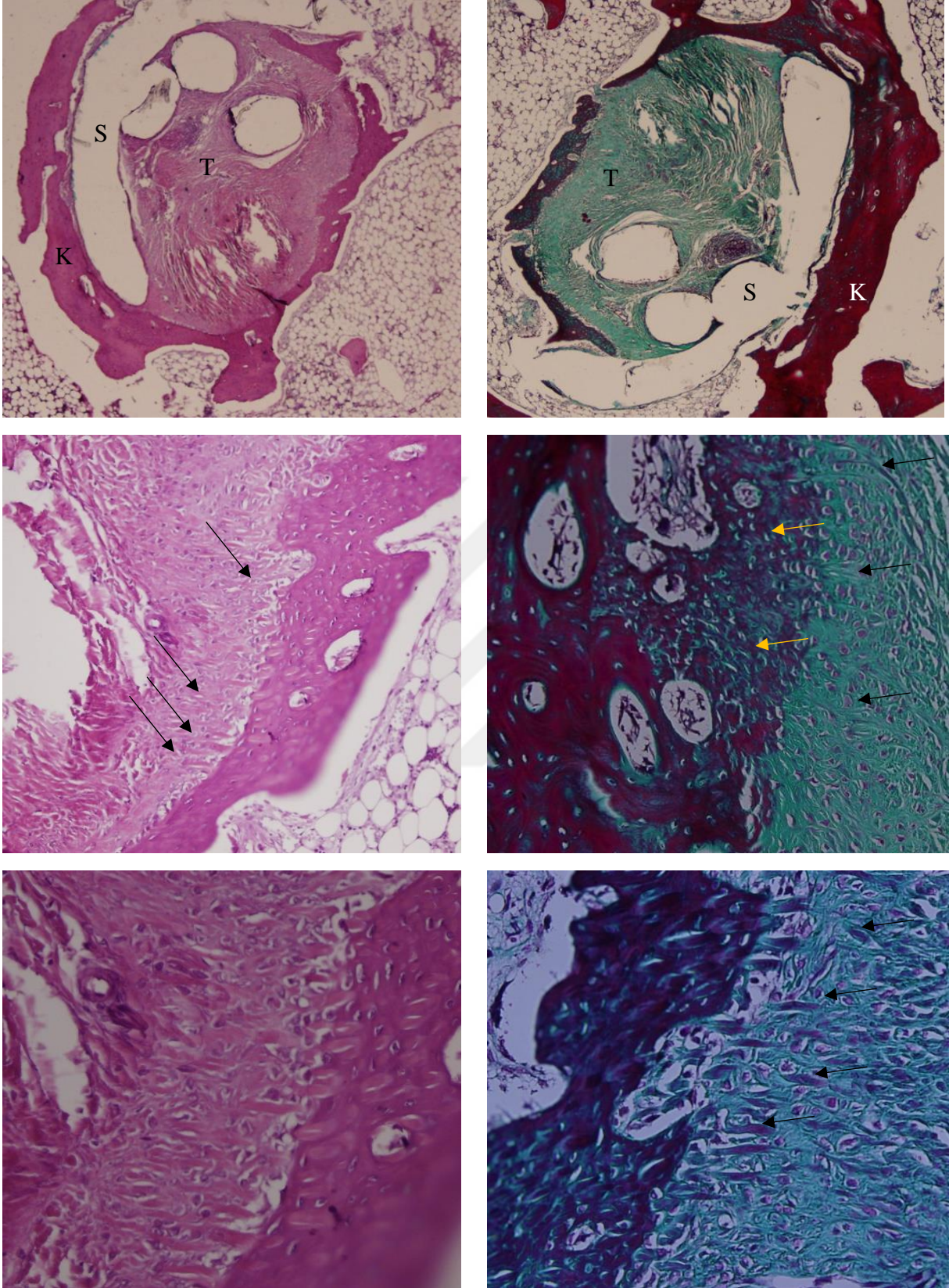
\*\*\*Tekrarlayan ölçümlerde 2 yönlü varyans analizi, FİZ: fibröz interzon, SS: standart sapma



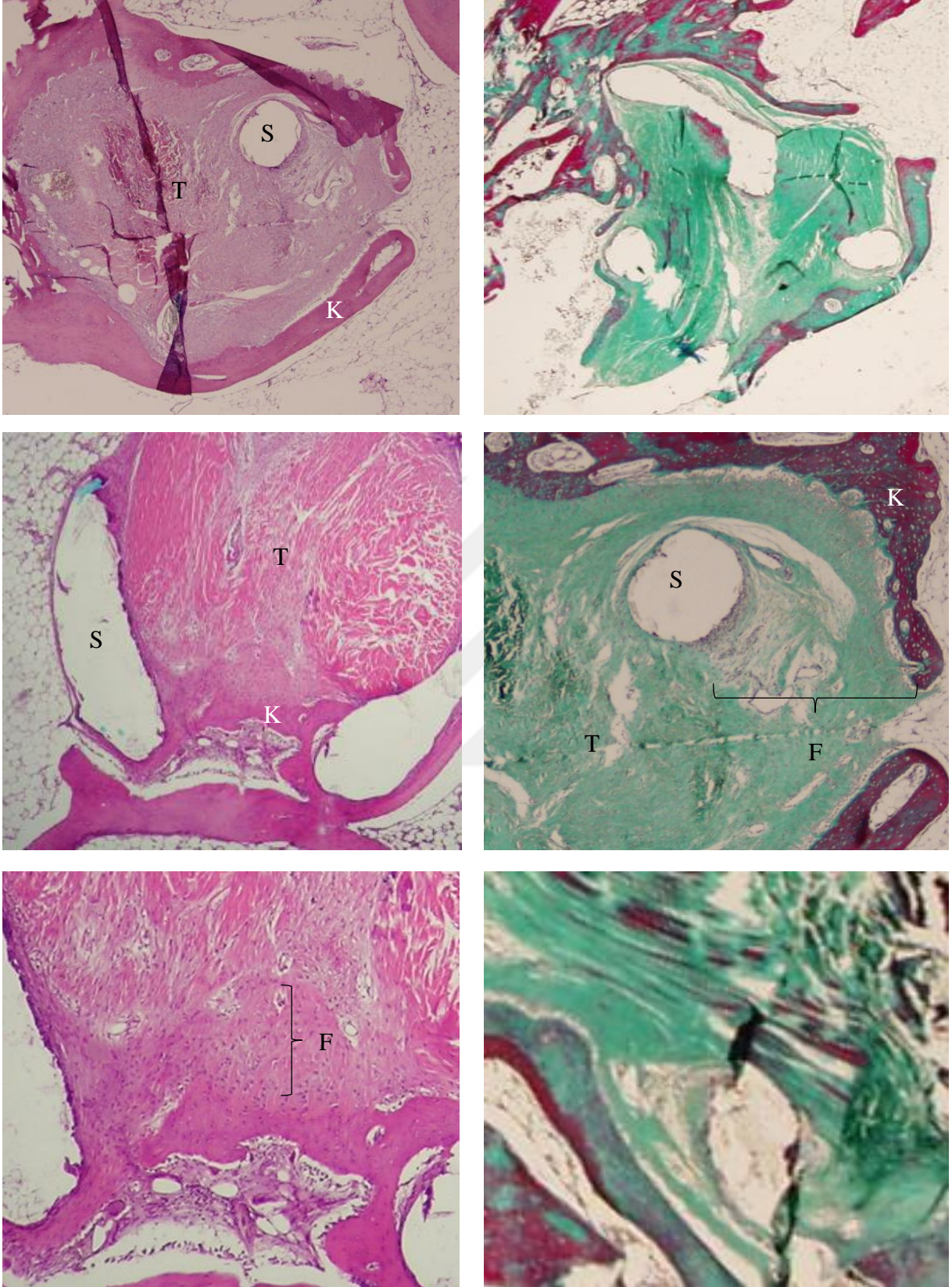
**Şekil 40:** Grup I (Deney Grubu) 6'ncı hafta histolojik görüntüleri. S: sütür, T: tendon, F: fibröz interzon, K: kemik, interdijitasyon alanları (beyaz oklar), dağınık fibröz dokuda yer yer gözüken Sharpey lifleri (Siyah oklar), F'de tendondan kemiğe geçişin belirsizleşmeye başladığı görülüyor, sol – Hematoksilen eozin (HE) boyama, sağ – Masson trikrom boyama.



**Şekil 41:** Grup II (Kontrol Grubu) 6'ncı hafta histolojik görüntüleri. S: sütür, T: tendon, F: fibröz interzon, K: kemik, F'de tendondan kemiğe geçiş belirgin görünmekte ve F dokusu çok dağınık ve boşluklu, interdijitasyonlar ve Sharpey lifleri yok, kemik dokumu oluşumu az, sol – Hematoksilen eozin (HE) boyama, sağ – Masson trikrom boyama.



**Şekil 42:** Grup I (Deney Grubu) 12'nci hafta histolojik görüntüleri. . S: sütür, T: tendon, F: fibröz interzon, K: kemik, F'de tendondan kemiğe geçiş oldukça belirsiz görünmekte ve F dokusu düzenli ve yoğun, Sharpey liflerinin sıklığı fazla ve düzenli (siyah oklar), yeni kalsifiye kemik dokusu oluşumu (sarı oklar), kemik doku skleroze yoğun, interdijitasyonlar azalmış, sol – Hematoksilen eozin (HE) boyama, sağ – Masson trikrom boyama.



**Şekil 43:** Grup II (Kontrol Grubu) 12'nci hafta histolojik görüntüleri. S: sütün, T: tendon, F: fibröz interzon, K: kemik, F'de tendondan kemiğe geçiş nispeten belirsiz görünmekte ve F dokusu dağınık ve boşluklar içeriyor, interdijitasyonlar az ve Sharpey lifleri çok az, kemik doku oluşumu belirgin, sol – Hematoksilen eozin (HE) boyama, sağ – Masson trikrom boyama.

### V.C.Radyolojik Bulgular

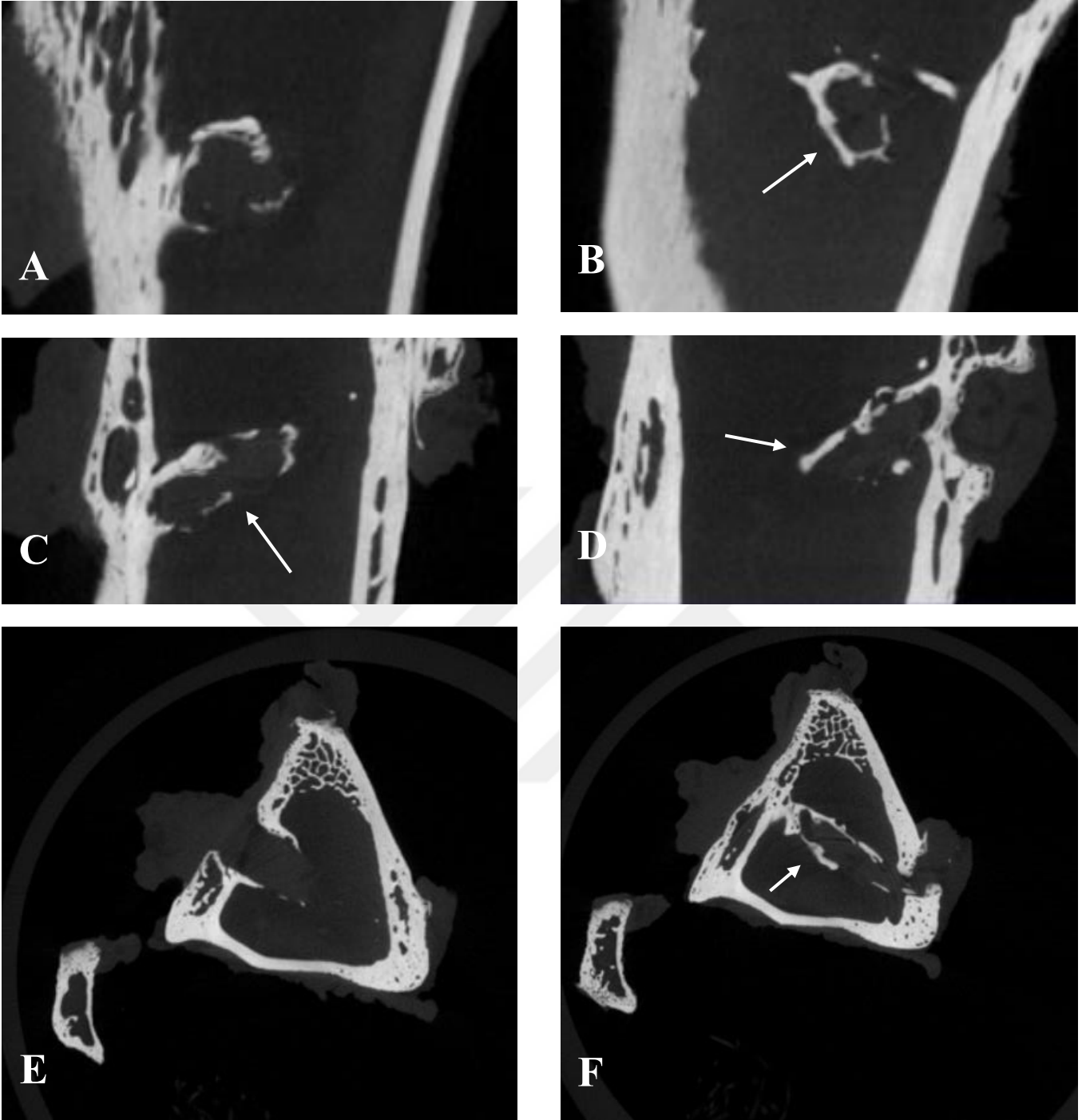
Ekstraartiküler KTI modelinde HAp sütür (Grup I – Deney Grubu) ve normal sütür (Grup II – Kontrol Grubu) ile cerrahi prosedür uygulanan gruplar mikro – BT kalibrasyon taramaları ve 3 boyutlu volümetrik görselleştirme, hacim ölçümleri ile değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 44-47). Kalibrasyon taramaları sonrasında BT – analiz yazılımı aracılığıyla elde edilen KMY ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) sonuçlarında Deney Grubunun KMY değeri ( $2.09 \pm 0.41$ ) Kontrol Grubu KMY değerinden ( $1.35 \pm 0.36$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek ( $p=0.037$ ) bulundu. 3 boyutlu volümetrik görselleştirme sonrasında tünel girişinde, ortasında ve çıkışında ölçülen tünel çevresel lineer değerlerinin ( $\mu\text{m}$ ) ortalaması sonuçlarında da deney grubunun ortalama tünel çevresi ( $1551 \pm 49.6$ ) Kontrol Grubu ortalama tünel çevresinden ( $1707.6 \pm 42.38$ ) istatistiksel olarak anlamlı daha düşük ( $p=0.004$ ) bulundu. Ayrıca 3 boyutlu volümetrik görselleştirme, hacim ölçümleri sonrasında tünel içinde oluşan yeni kemik dokusunun toplam VOİ kemik hacmine oranlamasıyla elde edilen yeni kemik hacim oranı (%) sonuçlarında ise Deney Grubunun yeni kemik oranı ( $26.51 \pm 11.24$ ) Kontrol Grubu yeni kemik oranından ( $21.11 \pm 5.48$ ) daha yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.182$ ); yüzey alan ölçümleri sonrasında tünel içinde oluşan yeni kemik dokusunun arayüzey alanının toplam VOİ kemik yüzey alanına oranlamasıyla elde edilen arayüzey oranı (%) Deney Grubunun arayüzey oranı ( $18.13 \pm 5.64$ ) Kontrol Grubu arayüzey oranından ( $14.47 \pm 1.54$ ) daha yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,168$ ). Tablo 3’te radyolojik değerlendirmeler, 12’nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar özetlenmiştir.

Tablo 3. Radyolojik değerlendirmelerde 12’nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar

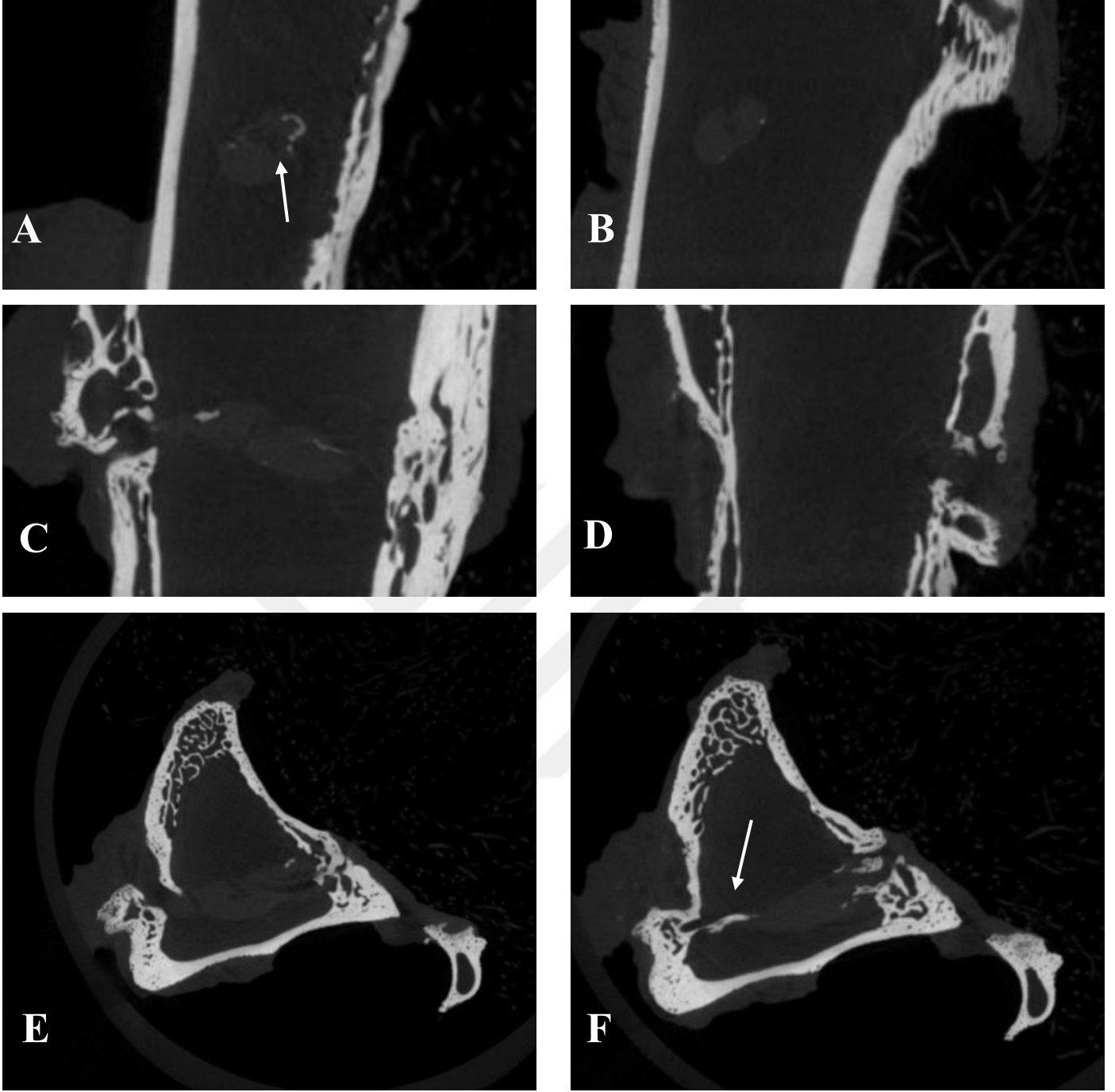
	KMY ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Tünel Çevresi ( $\mu\text{m}$ )	Yeni Kemik Hacim Oranı (%)	Yeni Kemik Arayüzey Alan Oranı (%)
Ortalama (SS)				
Grup I (Deney Grubu)	2.09 $\pm 0.41$	1551 $\pm 49.60$	26.51 $\pm 11.24$	18.13 $\pm 5.64$
Grup II (Kontrol Grubu)	1.35 $\pm 0.36$	1707.6 $\pm 42.38$	21.11 $\pm 5.48$	14.47 $\pm 1.54$
	$p=0.037^*$	$p=0.004^*$	$p=0.182$	$p=0.168$

Bağımlı t test istatistiksel yöntemi uygulandı, \* $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlıdır,

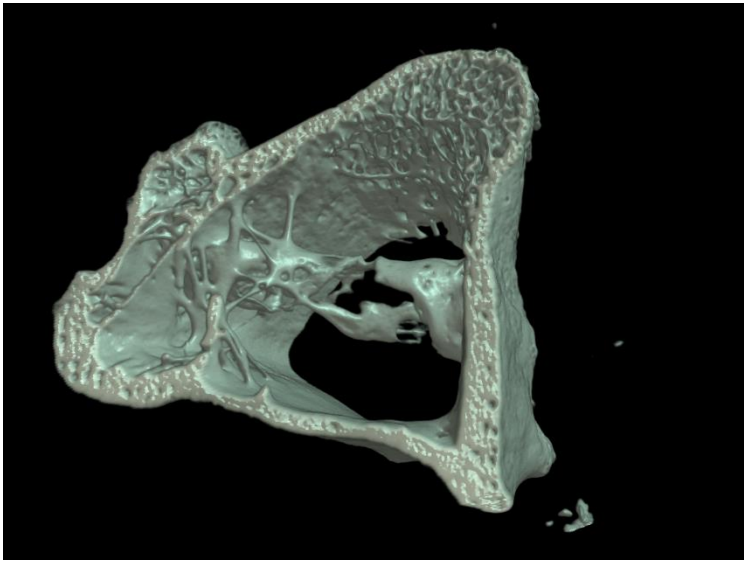
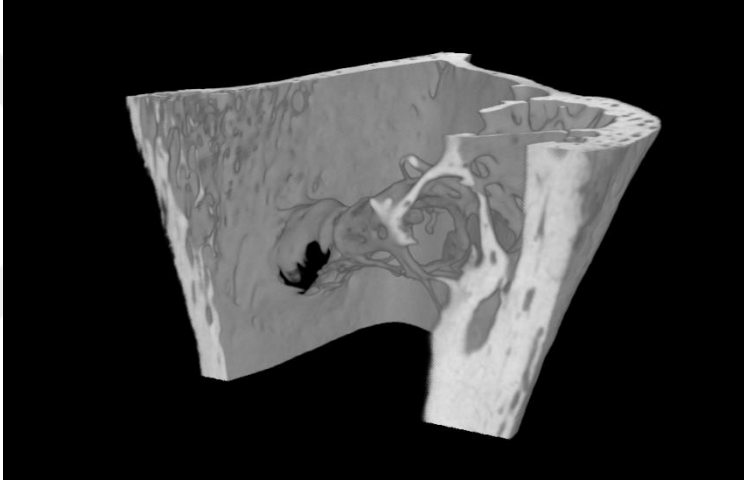
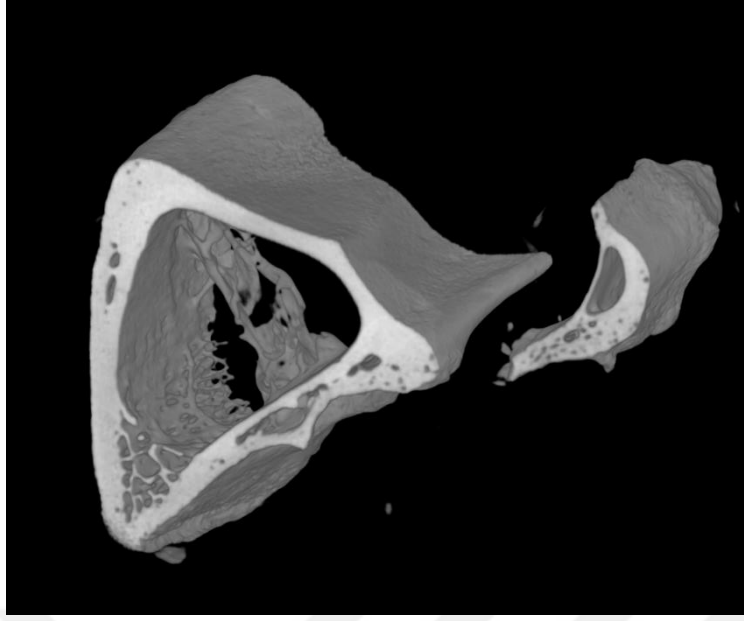
SS: standart sapma, KMY: kemik mineral yoğunluğu



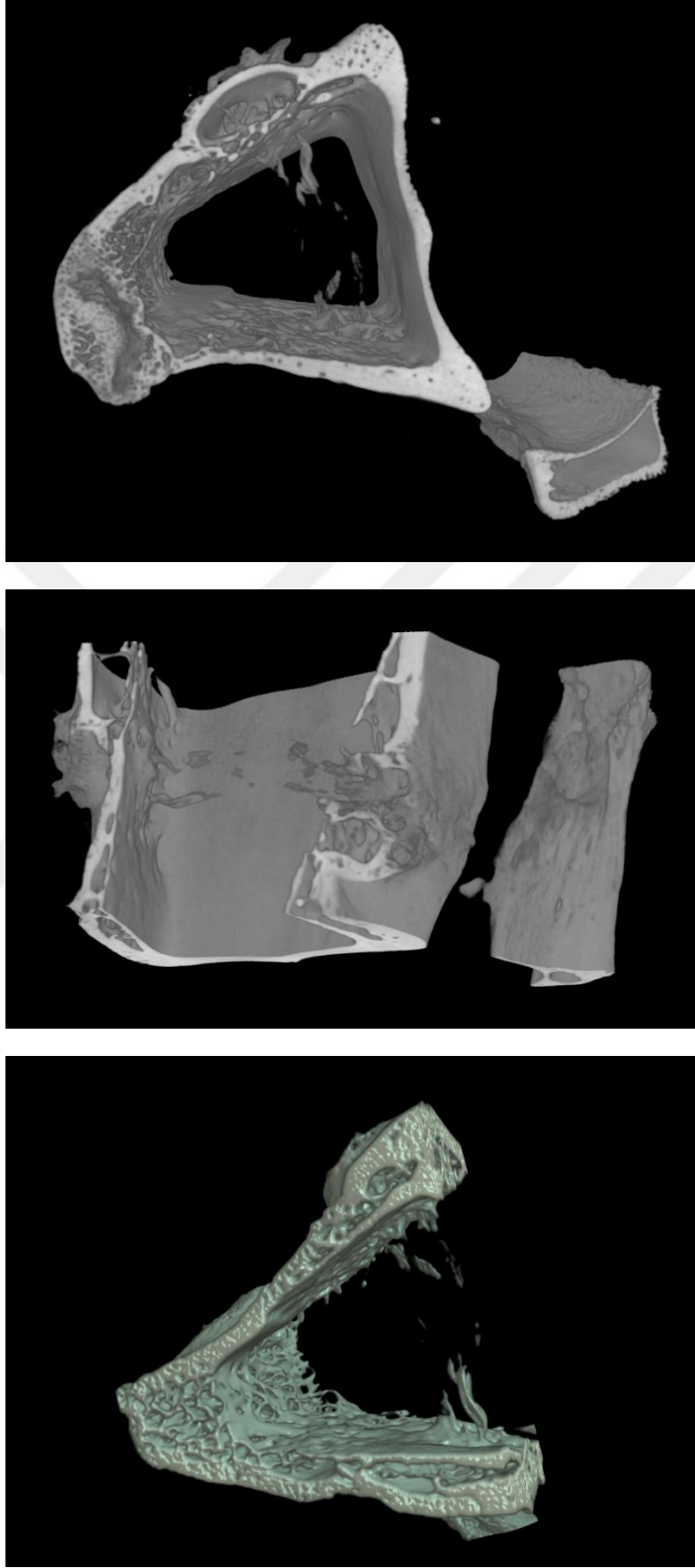
**Şekil 44:** Grup I (Deney Grubu) 12'nci hafta mikro – BT görüntüleri (A-B) sagital, (C-D) koronal, (E-F) aksiyel kesitler. Tünel çevresi kalsifikasyon alanları (beyaz oklar).



**Şekil 45:** Grup II (Kontrol Grubu) 12'nci hafta mikro – BT görüntüleri (A-B) sagital, (C-D) koronel, (E-F) aksiyel kesitler. Tünel çevresi kalsifikasyon alanları (beyaz oklar).



**Şekil 46:** Grup I (Deney Grubu) 12'nci hafta mikro – BT 3 boyutlu görüntüleri.



Şekil 47: Grup II (Kontrol Grubu) 12'nci hafta mikro – BT 3 boyutlu görüntüleri.

### V.D.Biyomekanik Bulgular

Ekstraartiküler KTİ modelinde HAp sütür (Grup I – Deney Grubu) ve normal sütür (Grup II – Kontrol Grubu) ile cerrahi prosedür uygulanan grupların KTİ yapısal özellikleri çekme testi ile biyomekanik olarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Çekme testi sonucunda Deney Grubu numunelerinin tamamı kemik – tendon bileşkesinden koparken, Kontrol Grubu numunelerinden 1’i kemik - tendon bileşkesinden koptu ve diğerleri tünelden sıyrıldı. Çekme testi ile elde edilen nihai kuvvet (N) sonuçlarında Deney Grubunun nihai kopma kuvveti (23.91±15.03) Kontrol Grubu nihai kopma kuvvetinden (29.63±15.25) daha düşük bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.069). Nihai kopma kuvveti kadar çekme yapıldığında meydana gelen deplasman (mm) miktarı sonuçlarında da Deney Grubunun deplasmanı (10.83±4.86) Kontrol Grubu deplasmanından (12.6±4.58) daha düşük bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.148). Lineer yüklenme anındaki ölçülen sertlik (N/mm) sonuçlarında ise Deney Grubunun sertliği (4.22±1.33) Kontrol Grubu sertliğinden (3.18±0.76) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek (p=0.044) bulundu. Tablo 4’te KTİ yapısal özelliklerinin biyomekanik sonuçları, 12’nci hafta gruplar arası karşılaştırmalar özetlenmiştir.

Tablo 4: KTİ yapısal özelliklerinin 12’nci hafta gruplar arası biyomekanik karşılaştırmaları.

	Kopma Kuvveti (N)	Deplasman (mm)	Sertlik (N/mm)
	Ortalama (SS)		
Grup I (Deney Grubu)	23.91 ±15.03	10.83 ±4.86	4.22 ±1.33
Grup II (Kontrol Grubu)	29.63 ±15.25	12.6 ±4.58	3.18 ±0.76
	p=0.069	p=0.148	p=0.044*

*Bağımlı t test istatistiksel yöntemi uygulandı, \*p <0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır,*

*SS: standart sapma*

## VI.TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmamızda kemik – tendon iyileşmesi ekstraartiküler tavşan modelinde tendon grefti serbest ucu kemik tünele yerleştirilmeden önce hazırlanma aşamasında kullanılan hidroksiapatit ile kaplanan güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütür materyalinin KTİ üzerinde olumlu etkisinin olup olmadığı histolojik, radyolojik görüntüleme ve biyomekanik olarak araştırıldı.

Kemik - tendon iyileşmesi, başlangıçta tendon ve kemik arasında oluşan fibrovasküler arayüz dokusu içine kemik büyümesiyle başlar. Bu sürecin ilerleyişini anlamak için bağ ve tendon bileşke türlerinin tanımlanması önemlidir (136). Direkt bileşkelerde, tendondan kemiğe geçişte 4 morfolojik aşama vardır: tendon, mineralize olmamış fibrokartilaj, mineralize fibrokartilaj ve kemik. Bu tür bileşkeler, sağlam ÖÇB’de gözlemlenmiştir. İndirekt bileşkelerde ise belirgin fibrokartilaj geçiş bölgeleri bulunmaz. ÖÇB’ye etki eden kuvvetler küçük bir alana odaklanır(137). Bu kuvvetler nedeniyle yumuşak bağı kemikten ayrılmasını engellemek için ani gerilme kuvvetlerini azaltan bir kemik - tendon arayüzü gerekmektedir. Bu bölgede fibrokartilaj ve mineralize kıkırdak, bağ ve kemik arasındaki sertlik geçişini azaltarak stres frenleri işlevi görür (137). Hayvan çalışmaları, KTİ’nin reaktif bir skar dokusu oluşumu ile gerçekleştiğini ve bunun mekanik olarak daha zayıf bir arayüz oluşturduğunu göstermiştir (138, 139).

ÖÇB yaralanması, osteoartrite yol açabilen ciddi diz yaralanmalarından biridir (140). Hamstring otogrefti, düşük postoperatif ağrı, düşük komorbidite ve daha az diz çökme problemi nedeniyle ÖÇBR’de sıkça tercih edilmektedir (141). Ancak, bu greftin kemikle tam entegrasyonu için 3 yıldan fazla süreye ihtiyaç duyması büyük bir dezavantajdır(142). Bu sorun, KTA’da osteoblastlar yerine fibroblastların daha hızlı çoğalmasıyla 4 morfolojik aşama yerine geniş FİZ geçiş bölgesi oluşumundan ve indirekt bileşke tipi iyileşmeden kaynaklanmaktadır. Bu klinik sorun, bu arayüzde osteorejenerasyonu teşvik edebilen HAp nanopartikülleri ile modifiye edilen materyaller aracılığıyla çözülebilir.

Tendon greftinin serbest ucunun hazırlanmasında kullanılan sütür materyalinin, ÖÇBR sonrasında kemik tünel ve tendon grefti arayüzünde osteoentegrasyonu arttırması beklenen daha biyomimetik bir yüzeye sahip olması için polimer bazlı bir kaplama yöntemi kullanılarak HAp ile kaplama işlemi yapıldı. KTB’de hücre dışı matriksin ana bileşeni olan farklı tiplerde polimer yapıya sahip olan kolajen liflerinin KTB mekanik özelliklerini sağladığı, dayanıklılı-

ğını ve sertliğini arttırdığı bilinmektedir. Biyouyumluluk açısından KTB'nin hücre dışı özellikleri de göz önünde bulundurularak sütür yüzeyini kaplama işlemi için yardımcı kaplama bileşeni olarak jelatini kullandık. Jelatin, bir polipeptit olup kolajen proteininin parçalanmasıyla oluşmaktadır ve suda çözünürlüğü, kullanılabilirliği yüksek olması nedeniyle, doku mühendisliği alanında kullanılan, öncelikle tercih edilen doğal biyopolimerlerdendir. Bu özelliklerinden dolayı da HAp kristallerinin sütür yüzeyinde stabil olarak homojen dağılması için kullanılmıştır. HAp, kalsiyum fosfat (CaP) biyomalzeme ailesinin en kararlı üyesidir ve kemik ve dişlerde bulunan apatitik CaP fazıyla en yüksek bileşimsel ve yapısal benzerliği gösterir. Bu kristal yapısıyla suda çözünürlüğü düşük olsa da HAp tozunu çözmek için hafif asidik bir ortam kullanıldı. Bu sayede jelatin ve HAp'ın birlikte homojen bir çözeltisi hazırlandı. Distile suda hazırlanan % 2 konsantrasyondaki jelatin solüsyonu ve %20 konsantrasyondaki HAp çözeltisinin eklenmesiyle uygun sıcaklıkta sütür parçalarıyla inkübe edilerek sütür parçalarının yüzeyi homojen bir şekilde kaplandı. Kaplanmış sütür numuneleri normal sütür numuneleriyle kıyaslanarak yapılan TEM görüntülemelerinin morfolojik değerlendirmelerinde HAp kristallerinin sütür yüzeyinde düzgün bir şekilde biriktiği ve sütürün her tarafını saran bir katman oluşturduğu görüldü. Ayrıca mekanik aşınmaya maruz kalan kaplanmış sütür numunelerinin yapılan TEM görüntülemelerinin morfolojik değerlendirmesinde de sütür yüzeyinde HAp kristallerinin düzgün bir şekilde dağılmaya devam ettiği ve sütürün her tarafını saran bir katman oluşturmaya devam ettiği görüldü. Ayrıca TEM - EDS ile her morfolojik analizden sonra sütür yüzeyindeki kaplamanın semikantitatif olarak yapılan elementel bileşim analizinde de EDS spektrumundaki Ca, P ve O pikleri ile Ca/P stokiyometrik oranları HAp kristallerinin stabil bir şekilde sütür üzerinde katman oluşturduğunu göstermektedir. TEM – EDS analizi sonrasında HAp kaplı sütürün kullanılması durumunda kaplamanın güvenilir olduğunu tespit ettik.

KTI'yi arttırmaya yönelik tendon greftine yönelik tendonun etrafını sarma, kemik tünele enjeksiyon ve tespit materyalleri vasıtasıyla çeşitli biyomateryal uygulamaları mevcut. Tendon etrafını sarma, yöntemi potansiyel bir osteoindüktif molekülün tendon greftine sarılabilen bir formda biyomateryallere yüklenmesi ve bu malzemenin bir rezervuar gibi davranmasını sağlaması prensibine dayanmaktadır. Kolajen veya jelatin en sık çalışılan biyomateryal olmuştur. Bir çalışmada BMP'nin skafolda yüklenmesinin erken kemik oluşumunu teşvik edebileceğini ve ÖÇBR'nin nihai kopma kuvvetini 2 ila 3 haftadan 8 haftaya çıkarabileceğini gösterilmiştir (81, 143, 144). Çalışılan diğer biyomateryaller biyomekanik açıdan tutarsız sonuçlar vermiş, ancak histolojik ve radyolojik analizlere dayanarak KTA'nın iyileşmesi sırasında kemik tünelinin genişlemesini sınırladığı görülmüştür (145, 146). Süngerlerin veya hidrojellerin aşırı hızlı

bozunması, rezorpsiyon hızı kontrol edilebilen sentetik polimerlerden yapılmış elektrospun nanofiber membranların yakın zamanda geliştirilmesine yol açmıştır. İki çalışmada BMP ve SDF35 veya HAp yüklü polikaprolakton (PKL) elektrospun membranların sonuçları bildirilmiştir(147). Bu yüklü membranlar, tek başına membranlara kıyasla 12'nci haftada nihai kopma kuvvetini arttırmış, ancak 12'nci hafta öncesinde arttırmamıştır. Bu çalışmamızda osteokonduktif etkisinin yanında osteoindüktif etkisinin de olduğu literatürde belirtilen HAp kristallerinin tendon grefti serbest ucu hazırlanmasında kullanılacak sütür materyalinin jelatin aracılığı kaplanması (yüklenmesi) işlemi gerçekleştirilmiş ve KTA'ya HAp kristalleri tendona sarma yöntemiyle yerleştirilmiştir. Yamakado et al. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak proksimal tibia metafizine dik olacak şekilde açılan kemik tünele EDL transferi sonrasında KTA'da tensil ve kompresif kuvvetlerin uygulandığı yerlere göre farklı KTİ paternleri oluştuğu göstermişlerdir (73). Ayrıca çalışmamızda tensil ve kompresif kuvvetlerin etkisini tünel boyunca standardize etmek için EDL tendonu transferi için hazırlanan kemik tünel yatay eksene 30° olacak şekilde hazırlanmıştır.

Rodeo ve ark. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak KTİ'nin temel prensiplerini açıkladıkları çalışmalarında biyomekanik olarak 12'nci haftaya lineer çekme testinde tünelden sıyrılma olduğu görülmüş, 12'nci hafta ve sonrasında KTA'nın sağlam kaldığı ve sıyrılmadığı görülmüş (8). Jang ve ark. intraartiküler hayvan modeli kullanarak insan umbilikal kord kanı kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması yaptıkları çalışmalarında KTİ histolojik değerlendirmesi için tanımladıkları puanlama kriterlerini 4, 8 ve 12'nci haftada değerlendirmişler (135). Wang ve ark. tarafından intraartiküler hayvan modeli kullanarak HAp kaplı poli L-laktik asit poroz vidanın KTİ üzerindeki etkisinin inceledikleri çalışmada histolojik değerlendirmeler 6 ve 12'nci haftada yapılırken mikro – BT değerlendirmesi ve biyomekanik değerlendirme 12'nci haftada yapılmış(148). Wong ve ark. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak biyoaktif plateletten zengin fibrin skafoldun tendon greftine sarılarak kemik tünele transferi sonrasında KTİ'ye etkisini inceledikleri çalışmada 12'nci haftada histolojik değerlendirme, mikro – BT değerlendirmesi ve biyomekanik değerlendirme yapmışlardır (149). Sonuç olarak, bizim çalışmamızda histolojik değerlendirme erken dönem 6'ncı haftada ve geç dönem 12'nci haftada yapıldı, mikro – BT değerlendirmesi ve biyomekanik değerlendirme geç dönem 12'nci haftada yapıldı.

Kemiklerin yaşam boyu yeniden şekillenme süreci, kemik rezorpsiyonu yapan osteoklast (OK) hücreleri ile kemik oluşumunu gerçekleştiren osteoblast (OB) hücreleri arasındaki den-

geye dayanır. Bu süreç kemiklerin yapısını, kütlelerini ve gücünü etkilemektedir. Osteoprotegerin (OPG), RANKL, RUNX2 ve ACP5 proteinlerinin kemik yeniden şekillenme sürecinde önemli rolleri mevcuttur. RUNX2 proteini mezenkimal kök hücrelerin osteoblast yönünde olgunlaşmasını ve farklılaşmasını sağlarken ACP5 ise monositlerden osteoklastların olgunlaşmasını engeller (150, 151). RANKL osteoklast matürasyonu için RANK reseptörüne bağlanır, OPG'de RANK reseptörüne bağlanarak yarışmalı inhibisyon yapar ve osteoklast farklılaşmasını engeller. Osteoblastlardan salınan bu iki proteinin oranı (OPG/RANKL) kemik remodelasyonunun devamlılığı için kritik bir öneme sahiptir (151, 152). Bose ve ark. katkılı HAp kaplamasının insan OB ve OK kök hücre kültür sistemlerinde osteojenik proteinlerin salınımına etkisini inceledikleri çalışmalarında normal HAp kaplamasında da OPG/RANKL oranının arttığı görülmüş (153). Ayrıca MacMillan ve ark. nanokristal HAp ve trikalsiyum fosfatın insan kemik mineraline benzer osteoklast aktiviteye (TRAP, rezorpsiyon çukurlarının oluşumu, rezorpsiyon çukurlarının boyutu ve RANK dahil) ve osteoblast aktiviteye (OPG ve RANKL) sahip olduklarını göstermiştir (154). Rodeo ve ark. intraartiküler hayvan modeli kullanarak osteoklast aktivitenin KTİ üzerine etkisini inceledikleri çalışmada osteoklast engellemesinin tendon greftini çevreleyen kemik hacminin önemli ölçüde arttığını ve KTB'nin sertliğinin arttığını göstermiştir (155). Han ve ark. intraartiküler hayvan modelinde ÖÇBR'de HAp yüklenmiş polikaprolakton (PKL) nanofiber membranın KTİ üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada histolojik değerlendirme sonrasında konak kemik ve tendon arasındaki fibröz skar dokusunun kalınlığının 4'ncü haftadan 8'nci haftaya kadar giderek daraldığı, skar dokusu kalınlığının PKL/nHAp/Kol grubunda ameliyattan 8 hafta sonra kontrol grubuna kıyasla açıkça daha az olduğunu göstermişler ve bu sayede greft ve konak kemik arasında iyi bir entegrasyon olduğunu göstermişler (147). Bizim çalışmamızda da histolojik değerlendirmede histomorfometrik analizler sonucunda 6'ncı hafta ve 12'nci haftada alan ve derinlik açısından kemik/FİZ oranlarının ortalaması olarak deney grubunun kontrol grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca 6'ncı haftadan 12'nci haftaya alan ve derinlik açısından kemik/FİZ oranlarının ortalamasının artışı tekrarlayan ölçümlerle ANOVA analizi yapıldığında bu artışın zaman ilerledikçe meydana gelmesi ve grup x zaman etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulundu ve bu artışta grup etkisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunması deney grubundaki tendon grefti çevresindeki kemik yeniden şekillenmesinin derinlik ve alan açısından kemik/FİZ oranlarının artmasını sağladığı anlaşıldı. HAp'ın kemik yeniden şekillenmesi üzerindeki olumlu etkileri sonucunda deney grubunda KTA'daki kemik bölgenin FİZ'e derinlik ve alan oranlamasının artmasını sağladığı ve osteoentegrasyon açısından daha sıkı bir KTİ oluşturduğunu değerlendirdik.

Wang ve ark. intraartiküler hayvan modeli kullanarak HAp kaplı poli L-laktik asit (PLLA) poroz vidanın KTİ üzerindeki etkisinin inceledikleri çalışmada 6'ncı hafta KTA histolojik değerlendirmesinde kolajen ve kolajen liflerin üretildiğini ve iki grup arasında osseointegrasyon açısından belirgin bir fark olmadığını ancak PLLA-HAp grubunda kondrosit tabakası gözlendiğini gösterdiler. 12'nci haftada ise, KTA'da daha fazla kolajen ve kolajen lifi üretildiğini ve PLLA grubunda KTA'da olgun kemik trabekülleri ve hücre büyümesi ile PLLA-HAp grubunda kemik trabeküler entegrasyonun olduğunu gösterdiler. Bi ve ark. intraartiküler hayvan modeli kullanarak HAp ile modifiye edilen ipek – kolajen skafoldun ÖÇBR'de KTİ üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada 16'ncı hafta, HAp grubunda, greftin daha derin kısmında daha olgun trabeküler kemik gözlediler ve daha fazla osteointegrasyon meydana geldiğini gösterdiler (148). Jiang ve ark. intraartiküler hayvan modelinde HAp – kolajen macununun kemik tünele enjekte edilmesinin KTİ üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada deney grubunda 12'nci haftada düzenli Sharpey liflerinin yeni şekillenen kemik dokusunun görüldüğü, 24'üncü haftada Sharpey liflerinin sayısının arttığı ve fibrokartilaj bölgenin oluştuğu ama kalsifikasyonun görülmediği, kemik fibröz tabaka geçişinin belirsiz olduğu, 48'nci haftada ise kalsifikasyonun da görüldüğü ve 4 tabakalı KTB'nin oluştuğu gösterilmiş (156). Huangfu ve ark. intraartiküler hayvan modelinde HAp ile trikalsiyum fosfatın karıştırılması ile kemik tünele enjekte edilmesi sonrasında deney grubunda 10'uncu haftada KTİ'de fibrokartilaj tabakanın görüldüğü, kalsifikasyonun ve tidemarkın oluşmadığı, 12'nci haftada ise kalsifiye fibrokartilaj tabakanın oluştuğu gösterilmiş (157). Sonuçlar bakımından ufak farklılıklar olsa da elde edilen sonuçlara bakıldığında KTİ'de HAp'ın osteokondüktif etkisinin yanında osteoindüktif etkisinden bahsedilebileceği bu deneysel hayvan çalışmalarının yanısıra literatürde Wang ve ark., Lin ve ark., Shu ve ark., Ogata ve ark. yaptığı in vitro çalışmalarda da mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında HAp'ın osteoindüktif etkisinden yararlanılabileceği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da 6 ve 12'nci hafta histolojik değerlendirmelerinde HAp kaplanmış sütür materyalinin uygulandığı Deney Grubunda Kontrol Grubunda kıyasla osteokondüktif etkinin sonucu olarak tendon çevresinde yeni oluşan kemik miktarı ve hatta FİZ'e oranla alanı daha fazlaydı. Osteoindüktif etkinin sonucu olarak ise erken dönem sonuçlarda Deney Grubunda fibrokartilaj tabakaların görüldüğü, Sharpey liflerinin oluşmaya başladığı, tendon kemiğe geçişin yoğun hücre dışı matriks ve kolajen üretimi nedeniyle daha belirsiz olduğu görüldü, geç dönem sonuçlarda ise Deney Grubunda Kontrol Grubuna kıyasla Sharpey liflerinin düzenli ve daha yoğun olmasının yanısıra yer yer kondrositlerin görüldüğü, tendondan kemiğe geçişin belirsizliğin arttığı görüldü.

Mihelic ve ark. intraartiküler hayvan modelinde BMP – 7 yüklenmiş yamaların tendon grefti etrafına sarılarak kemik tünele yerleştirilmesi sonrasında deney grubunda KTA’da oluşan yeni kemikte yoğun bir trabeküler ağ oluştuğu, fibrokartilaj veya kalsifikasyonun bulunmadığı ve bunun yeni kemiğin intramembranöz kemikleşme yoluyla oluştuğunu düşündürdüğü, yoğun fibröz doku tendondan kemik trabeküllerine doğru derinlemesine uzandığı gösterilmiştir (143). Wong ve ark. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak biyoaktif plateletten zengin fibrin skafoldun tendon greftine sarılarak kemik tünele transferi sonrasında 12’nci haftada deney grubunda KTA’da yeni kıkırdak benzeri dokuların oluşmasıyla iyileşme meydana geldiğini, yeni oluşan dokuların gevşek organize kolajen lifler şeklinde ve implante edilen tendon grefti ile interdijite olduğunu, yüksek büyütmede ise KTA’da kolajen lif devamlılığının yeniden kurulduğunu ve tendon greftinin lakünler içinde bulunan kondrosit benzeri hücre dizileriyle çevrili olduğunu ortaya koymuşlar(149). Karaoğlu ve ark. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak periosteal yama (PY) ve kemik iliği aspiratı (KİA) uygulanan grupların KTİ üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada kemik büyümesi ve yeniden şekillenmesinin Grup PY ve KİA’da daha belirgin olduğu, kıkırdak adalarının artışının hem Grup PY hem de KİA’da gözlemlendiği ancak 12’nci haftada KTA’da iyi tanımlanmış bir fibrokartilaj bölgesinin sadece Grup KİA’da görüldüğü gösterilmiştir(158). Literatürde hayvan modelleri kullanılarak tendon grefti etrafına osteoindüktif veya osteojenik materyalin sarılmasıyla yapılan çalışmalarda KTİ’deki değişikliklerin sonuçlarına yönelik temel farklılıklar fibrokartilaj dokunun oluşması veya kalsifikasyonun meydana gelmesi ile ilgili olup KTİ karakterizasyonunda bu iki olayın meydana gelmesi direkt KTB oluşumu için esas unsurlardır. Bizim çalışmamızda da Deney Grubunda 6’ncı haftada yer yer fibrokartilaj tabaka, 12’nci haftada ise düzenli ve sık Sharpey lifleriyle birlikte daha fazla fibrokartilaj tabaka görülse de kalsifikasyon görülmemiştir. Daha uzun zamanlı yapılacak çalışmalar ile HAp kaplanmış sütür materyali kullanılmasıyla kalsifikasyonun da görüleceği ve normal sütür materyaline kıyasla daha erken dönemde direkt KTB oluşumunun tamamlanacağını düşünüyoruz.

Wong ve ark. 12’nci hafta mikro – BT değerlendirmesi sonrasında biyoaktif plateletten zengin fibrin skafoldun tendon greftine sarıldığı grupta kemik mineral yoğunluğunun (KMY) daha yüksek ve kemik tünelin ortalama alanının anlamlı daha az olduğu gösterilmiş (149). Zhi ve ark. ekstraartiküler hayvan modeli kullanarak kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (MKH) ile yüklenmiş ipek – fibron yamanın tendon grefti etrafına sarıldığı grupta 12’nci hafta mikro – BT değerlendirmesinde kemik tünel alanının anlamlı daha az olduğu gösterilmiş (159). Jang ve ark. 4, 8 ve 12’nci hafta mikro – BT değerlendirmesi sonrasında insan umblikal kord

kanı kaynaklı MKH uyguladıkları grupta tibial tünel ve femoral tünelin ortalama alanının (tibial tünel olarak 12'nci hafta, femoral tünel olarak 8 ve 12'nci hafta anlamlı) daha az olduğu gösterilmiştir(135). Park ve ark. MKH ile üç boyutlu biyoyazıcıda hazırlanan skafold kılıfın tendon greftine uygulanana grupta tibial ve femoral tünel alanlarının 4, 8 ve 12'nci hafta mikro – BT değerlendirmesi sonrasında daha az olduğu (4 ve 8'nci hafta anlamlı değil, 12'nci hafta anlamlı) gösterildi (160). Kim ve ark. patellar tendon hayvan modelinde sütür ankorun kemikteki deliğine BMP-2 uygulamasının yapıldığı çalışmada gruplar arasında KMY bakımından anlamlı fark bulunamadı (161). Wang ve ark. 12'nci hafta mikro –BT değerlendirmesi sonrasında HAp kaplı poli L-laktik asit (PLLA) poroz vida uygulanan grupta kemik hacim fraksiyonunun, trabekül kalınlığının ve trabekül sayısının anlamlı daha yüksek olduğu gösterilmiştir (148). Jiang ve ark. HAp – kolajen macununu kemik tünele enjekte ettikleri grupta 12, 24 ve 48'nci hafta mikro – BT değerlendirmesi sonrasında kemik hacim fraksiyonunun, trabekül sayısının, toplam kemik hacminin anlamlı daha yüksek olduğu ve kemik tünel çevresinin de anlamlı daha az olduğu gösterilmiştir (156). Mikro – BT değerlendirmelerinde yeni kemik oluşumunu göstermeye yönelik VOİ hesaplamaları aracılığıyla elde edilen kemik hacim fraksiyonları, KTA'daki yeni kemik oluşumuna bağlı kemik tünelin çevre veya alan hesaplamalarıyla daralması, trabeküllerin morfolojisi, karakterizasyonu ve objektif değer sunması, yeni oluşan kemiğin mineralizasyon kalitesini ortaya koyması nedenleriyle ön plana çıkan KMY parametreleri bağlamında yapılmaktadır. Bizim çalışmamızda da VOİ hesaplamaları sonrasında yeni oluşan kemiğin hacim oranı ve arayüzey alan oranı deney grubundan daha yüksek bulundu ve anlamlı görülmedi bu yükseklik. Fakat VOİ hesaplamalarında elde yeni oluşan kemik parametrelerinin yüksekliği anlamlı olamasa da Deney grubunda tendon çevresi oluşan yeni kemiğin KMY'nin kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Tibial tünel çevresinin yeni oluşan kemikle beraber daralması değerlendirildiğinde de Deney Grubunda anlamlı olarak tünel çevresinin daha az olduğu ve daha fazla daraldığı görüldü. Kemik tünelin daha fazla daralması ve KMY'nin daha fazla olması ile çevresinde daha fazla yeni kemik oluşan tendon grefti kemik tünel içinde daha sıkı tutunmuş oldu, daha iyi bir KTİ oluştu. Daha fazla numune ile yapılacak bir çalışmada KMY'de anlamlı bir fark oluştuğu gibi HAp'ın osteokondüktif ve osteoindüktif etkisiyle tendon çevresi yeni kemik oluşumu hacim ve arayüzey alan oranı anlamlı olarak daha yüksek bulunacaktır.

Wong ve ark. 12'nci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında biyoaktif plateletten zengin fibrin skafold grubunun kontrol grubundan tendonun tünelden sıyrılma kuvvetinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (149). Zhi ve ark. kemik iliği kaynaklı MKH

ile yüklenmiş ipek – fibron yamanın uygulandığı grubun kopma kuvveti bakımından 6 ve 12'nci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında kontrol grubundan anlamlı daha yüksek olduğunu, sertlik bakımından ise 12'nci haftada anlamlı olarak daha yüksek olduğu göstermiştir ve her iki grubun tamamında 6 ve 12'nci haftada da tendonun tünelden sıyrıldığını göstermiştir (159). Karaoğlu ve ark. 6'ncı hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında periosteal yama (PY) grubunun kopma kuvveti ve sertlik bakımından KİA grubundan anlamlı daha yüksek olduğu, 12'nci haftada ise kemik iliği aspiratı (KİA) grubun yapısal özellikler bakımından daha yüksek olsa da her iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Kopma yeri bakımından değerlendirildiğinde 6'ncı haftada kontrol grubunun %10 u tendondan kopmuş, geri kalanında ise tendon tünelden sıyrılmıştır; PY grubunun, % 80'i tendondan kopmuştur, KİA grubunun ise %30'u tendonda kopmuştur; 12'nci haftada ise kontrol grubunun %80'i tendonda kopmuş, grup PY ve KİA'da ise hepsi tendondan kopmuştur (158). Mihelic ve ark. 3 ve 6'nci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında BMP – 7 yüklenmiş yamaların uygulandığı grubun kontrol grubundan kopma kuvvetinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişler ve BMP - 7 uygulanan grubun tamamı tendondan koparken, kontrol grubunun tamamında tendon tünelden sıyrılmıştır (143). Rodeo ve ark. kopma kuvveti bakımından 2 ve 8'inci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında osteoprotegerin (OPG) uygulanan grubun RANKL ve kontrol grubundan daha yüksek olduğu fakat anlamlı olmadığı görülmüş, 4'üncü haftada ise OPG uygulanan grubun diğer gruplardan daha az olduğu fakat anlamlı görülmediği gösterilmiştir. Kopma yeri bakımından değerlendirildiğinde OPG uygulanan 8'nci haftada grubun tamamı tendondan koptuğu, RANKL uygulanan grubun tamamı ise tendonun tünelden sıyrıldığı gösterilmiş. Sertlik bakımından 2, 4 ve 8'nci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında OPG uygulanan grubun diğer gruplardan yüksek olduğu fakat sadece 8'nci haftadaki farkın anlamlı olduğu gösterilmiştir (155). Lu ve ark. intraartiküler koyun modelinde HAp kaplı interferens vidasının KTİ üzerine etkisini inceledikleri çalışmada 6'nci hafta biyomekanik değerlendirmesi sonrasında kopma kuvveti, sertlik ve kopma yeri bakımından iki grup arasında da anlamlı fark olmadığı gösterilmiş (162). Osteoindüktif materyaller ile güçlendirme yapılan KTİ hayvan modellerinde biyomekanik testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi standardize edilememiştir. Bu biyomekanik testler için hazırlanan komplekslerin ve test düzeneklerinin standardize edilememesinden kaynaklanmaktadır. Bizim çalışmamızda da biyomekanik değerlendirme sonucunda kopma yerleri bakımından Deney Grubunda tendonlar kemik tendon bileşkesinden koparken Kontrol Grubunda ise bir numune hariç tendonlar tünelden sıyrılmıştır. Ayrıca Kontrol Grubu kopma kuvveti ve deplasmanı Deney Grubu kopma kuvveti ve deplasmanından daha yüksek fakat anlamlı olmadıkları görüldü. Sertlik bakımından değerlendirme yapıldığında ise

Deney Grubu Kontrol Grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Gerek tendon çevresinde mineral yoğunluğu daha fazla olan daha fazla miktarda kemik oluşarak tünel çevresinin daha fazla daralması, gerekse 6 ve 12'nci haftada yer yer kondrositlerin görüldüğü düzenli Sharpey liflerinin yer aldığı fibrovasküler tabakanın oluşması ve gerekse de tendon çevresinde oluşan skleroze ve yoğun yeni kemik miktarının daha sıkı olan FİZ'e oranının daha fazla olması nedenleriyle KTİ'nin daha iyi meydana gelerek tendon greftinin KTA'daki tespitinin Deney Grubunda daha sıkı ve sert olduğu sonucuna ulaşıldı.

Bi ve ark. her iki grubun tamamının da tünel içinden tendonun kısmen kopması ile sonuçlanan 16'ncı hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında HAp ile modifiye edilen ipek – kolajen skafold uygulanan grubun kopma kuvveti ve sertlik bakımından daha yüksek olduğunu göstermiştir (163). Han ve ark. her iki grubun tamamının da tünel içinden sıyrılması ile sonuçlanan 4 ve 8'inci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında HAp yüklenmiş polikaprolakton nanofiber membran uygulanan grubun kontrol grubundan daha yüksek olduğu fakat sadece 8'inci hafta sonuçlarının anlamlı olduğunu göstermiştir (147). Wang ve ark. her iki grubun tamamının tendondan kopması veya tendonun tünelden sıyrılması şeklinde sonuçlanan 12'nci hafta biyomekanik değerlendirme sonrasında poli L-laktik asit (PLLA) poroz vida uygulanan grubun kontrol grubundan kopma kuvveti ve sertlik bakımından anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir (148). Jiang ve ark. her iki grubun çoğunluğu tendondan kopma olmak üzere tendon kopması ve tibial bağlanma noktasından ayrışması ile sonuçlanan biyomekanik değerlendirme sonrasında kontrol grubunun 12'nci haftada kopma kuvveti bakımından anlamlı olmasa da minimal yüksek olduğunu, HAp – kolajen macununun kemik tünele enjekte edilen grubunun ise kopma kuvveti bakımından 24 ve 48'inci haftada anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca kontrol grubunun tensil kuvvet bakımından 12, 24 ve 48'inci haftada daha yüksek olduğunu (24 ve 48'inci hafta anlamlı) göstermişlerdir (156). Özellikle literatürde biyomekanik testte çekme yapıldıktan sonra kompleksin kopma yerleri bakımından belirgin farklılıklar olsa da HAp ile modifiye edilen materyaller ile HAp haricinde osteoindüktif ve osteojenik uygulamaların yapıldığı modellerde tendonun tünelden sıyrılması KTA'daki tespitinin zayıf olduğu, KTİ'nin yeterli olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda da Kontrol Grubunda bir numune hariç geri kalan tendonlar tünelden sıyrıldı, Deney Grubunda ise tendonların tamamı kemik tendon bileşkesinden koptu. Kopma yeri bakımından da değerlendirildiğinde Deney Grubunda tendon greftinin KTA'daki tespitinin ve KTİ'nin daha iyi olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızın kısıtlılıklarından bahsedecek olursak bu ön çalışmada HAp kaplanmış sütür materyalinin histolojik değerlendirmeler hariç cerrahi prosedür sonrası 12. haftada KTİ'yi artırma kapasitesini radyolojik görüntüleme ve biyomekanik olarak değerlendirmiştir. Ancak çok zamanlı radyolojik görüntüleme yapmak, biyomekanik farklılıkları değerlendirmek, hatta histolojik değerlendirmenin çift zamanlı değerlendirmesini de arttırmak daha kapsamlı sonuçlar sunabilir. Ayrıca çalışmamız proksimal tibia metafizindeki kemik tünele yük almayan EDL tendonunun transferi ile yapılan bir ekstraartiküler küçük hayvan modelidir. Bu modelde sinoviyal sıvı girişi ve fizyolojik yüklenmeye bağlı greft tünel hareketi gibi tünel genişlemesi etkenleri göz ardı edilmiş oldu. Sinoviyal sıvı teması sonrası tendon yeniden şekillenmesinin etkisi de ekstraartiküler bir model kullanmamız sebebiyle değerlendirilemedi. Bu sebeplerden dolayı model itibariyle KTA değerlendirmesi açısından avantajlı olsa da çalışmamızda ÖÇBR'deki tendon yeniden şekillenme ve tünel genişlemesi olumsuz etkilerine yönelik değerlendirme yapılmasa da literatürde yer alan HAp'ın OPG/RANKL oranını arttırmasından dolayı Bedi ve ark. intraartiküler sıçan modelinde gösterdikleri ÖÇBR sonrası kemik tünelin eklem içine bakan tarafında osteoklast aktivitesinin fazla olması durumu (164) HAp kaplı sütür materyali kullanıldığında KTİ'yi daha az etkileyeceği düşünülebilir.

## VII.SONUÇ VE ÖNERİLER

KTİ'yi arttırmaya yönelik osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik muhtelif ajanlar ve materyaller geliştirilmektedir. Literatürde hayvan modelleri üzerinde farklı materyaller kullanılarak yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunda KTA'ya uygulanan iyileşmeyi uyarıcı materyallerin bir kısmı ÖÇBR ameliyatı esnasında güncel pratiğin dışında ek prosedürleri gerektirmektedir; tendon greftinin etrafına yama, skafold sarma, kemik tünel içine enjekte edilebilir formdaki materyallerin enjekte edilmesi vb. Diğer bir kısmı ise interferans vidaları vb. implantlar aracılığıyla kemik tünel içine uygulanmaya çalışılmakta ama bu implantların KTA'nın her yerine ulaşabilmesi mümkün olmamakta ve hem femoral hem de tibial tünele uygulanabilirliğine dair kısıtlılıkları mevcut.

İşte bu noktada HAp kaplı güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütür materyali ÖÇBR ameliyatı güncel pratiğinde hali hazırda tendon grefti hazırlamak için kullanılan sütür materyallerinin modifikasyonu ile elde edildi. Ayrıca tendon greftinin hazırlanmasında greftin her iki ucunda da kullanılıyor olması hem femoral hem de tibial tünelde KTİ'yi uyarmak için kullanma imkanı sunuyorken KTA'nın her yerine de tendon greftinin uygun bir sütünasyonu ile ulaşabilme imkanı sunmaktadır.

HAp ile kaplama için uygulanan prosedürün etkinliğinin kaplama yapılan güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütür materyallerinin morfolojik analizi ve karakterizasyonunun değerlendirilmesi sonucunda uygun olduğu, sütür yüzeyinde HAp partiküllerinin düzgün bir şekilde biriktiği ve sütürün her tarafını saran bir katman oluşturduğu görüldü. İn vitro sitotoksisite deneyinde de kontrol kuyusundaki tedavi edilmemiş hücre kültürüne göre hesaplanan sitotoksisite değerine göre hücre proliferasyonu üzerine olumlu bir etkisi olabileceği görülmüştür. Ancak bu sonucu daha geniş bir bağlamda yorumlayabilmek için ek deneyler ve analizler gerektiği için ekstraartiküler bir KTİ hayvan modeli tasarladık.

Çalışmamızda 6. ve 12. haftada yaptığımız histolojik değerlendirmeler sonucunda erken dönemde belirgin olmak üzere HAp kaplı sütür materyalinin histomorfometrik analizler ve KTİ karakterizasyonu bakımından KTİ'ni olumlu yönde etkilediği görüldü. Mikro – BT değerlendirmeleri sonucunda ise yeni oluşan kemik miktarı hacimi ve arayüzey alanı oranları bakımında anlamlı olmayan bir şekilde yüksek olsa da KMY ve kemik tünel çevresindeki yeni kemik oluşumuna bağlı daralma HAp kaplı sütür materyalinin histolojik bulguları destekler nitelikte olup

KTİ'ni olumlu yönde etkilemesi ile tendon greftin tünele daha sıkı sabitlendiğini göstermektedir. Ayrıca biyomekanik değerlendirmeler sonucunda ise deplasman miktarının anlamlı olmayan bir şekilde düşük olsa da sertlik değerlerinin anlamlı bir şekilde yüksek olması histolojik olarak ortaya konulan yeni oluşan kemik miktarının fazla olması ve FİZ'deki düzenli hücre dışı matriks, Sharpey lifleri ve yer yer görülen fibrokartilaj tabaka ile tidemarkın, radyolojik görüntüleme olarak da ortaya konulan kemik tüneldeki daralma ve KMY yüksekliğinin sonucu olarak değerlendirildi.

HAp kaplı güçlendirilmiş non-absorbable polifilaman sütür materyali, erken dönemde belirgin olmak üzere histolojik sonuçların KTİ'yi olumlu yönde etkilediği, radyolojik ve biyomekanik sonuçların da KTİ'nin daha iyi olmasını sağladığı göz önünde bulundurularak öncelikle ÖÇB'nin tekrar yaralanma riskinin fazla olduğu genç sporcularda olmak üzere erken rehabilitasyonun önemli olduğu hasta gruplarında ÖÇBR sonrası iyileşme sürecini hızlandırabileceğinden ötürü gelecek vadeden bir üründür.

Çalışmamızda bahsedilen kısıtlılıklar da göz önünde bulundurularak sütür materyalinin histolojik ve radyolojik değerlendirmeler bakımından daha büyük hayvan örneklerinde intraartiküler modellerde ve literatürde yer alan çalışmalarda da olduğu gibi biyomekanik çalışmaların standardizasyonunun zorluğu ve sonuçlarının tutarsızlığı nedeniyle de klinik olarak çalışılması gerekmektedir.

## VIII. KAYNAKÇA

1. Sanders TL, Maradit Kremers H, Bryan AJ, Larson DR, Dahm DL, Levy BA, et al. Incidence of anterior cruciate ligament tears and reconstruction: a 21-year population-based study. *The American journal of sports medicine*. 2016;44(6):1502-7.
2. Griffin LY, Albohm MJ, Arendt EA, Bahr R, Beynon BD, DeMaio M, et al. Understanding and preventing noncontact anterior cruciate ligament injuries: a review of the Hunt Valley II meeting, January 2005. *The American journal of sports medicine*. 2006;34(9):1512-32.
3. Bollen S. Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *British journal of sports medicine*. 2000;34(3):227-8.
4. Kon E, Di Matteo B, Altomare D, Iacono F, Kurpyakov A, Lychagin A, et al. Biologic agents to optimize outcomes following ACL repair and reconstruction: A systematic review of clinical evidence. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2022;40(1):10-28.
5. Filbay SR, Grindem H. Evidence-based recommendations for the management of anterior cruciate ligament (ACL) rupture. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2019;33(1):33-47.
6. Di Matteo B, Loibl M, Andriolo L, Filardo G, Zellner J, Koch M, Angele P. Biologic agents for anterior cruciate ligament healing: a systematic review. *World journal of orthopedics*. 2016;7(9):592.
7. Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *The American journal of sports medicine*. 1994;22(3):344-51.
8. Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *JBJS*. 1993;75(12):1795-803.
9. KİLİCOĞLU O, DİKMEN G, KOYUNCU O, Bilgiç B, ALTURFAN A. Effects of demineralized bone matrix on tendon-bone healing: an in vivo, experimental study on rabbits. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2012;46(6):443-8.
10. Guo R, Gao L, Xu B. Current evidence of adult stem cells to enhance anterior cruciate ligament treatment: a systematic review of animal trials. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2018;34(1):331-40. e2.
11. Martinek V, Latterman C, Usas A, Abramowitch S, Woo SL, Fu FH, Huard J. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *JBJS*. 2002;84(7):1123-31.
12. Hexter AT, Pendegrass C, Haddad F, Blunn G. Demineralized bone matrix to augment tendon-bone healing: a systematic review. *Orthopaedic journal of sports medicine*. 2017;5(10):2325967117734517.
13. Saab M, Hildebrand F, Martel B, Blanchemain N. Materials Enhancing ACL Tendon Graft to Bone Healing Show Favorable Results, In Animal Models, In Vivo: A Systematic Review. *Arthroscopy: the Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2022:S0749-8063 (22) 00338.

14. Barber FA, Howard MS, Piccirillo J, Spenciner DB. A biomechanical comparison of six suture configurations for soft tissue-based graft traction and fixation. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2019;35(4):1163-9.
15. Tien Y-C, Chih T-T, Lin J-H, Ju C-P, Lin S-D. Augmentation of tendon-bone healing by the use of calcium-phosphate cement. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*. 2004;86(7):1072-6.
16. Asri R, Harun W, Hassan M, Ghani S, Buyong Z. A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2016;57:95-108.
17. Wang Z, Han T, Zhu H, Tang J, Guo Y, Jin Y, et al. Potential osteoinductive effects of hydroxyapatite nanoparticles on mesenchymal stem cells by endothelial cell interaction. *Nanoscale Research Letters*. 2021;16(1):67.
18. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2009;89(2):326-35.
19. Shu R, McMullen R, Baumann M, McCabe L. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2003;67(4):1196-204.
20. Hurel C, Celebi G. Ön çapraz bağın anatomik ve biyomekanik özellikleri ve diz kinematiğindeki rolü. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 1999;33(5):369-73.
21. Zlotnicki JP, Naendrup J-H, Ferrer GA, Debski RE. Basic biomechanic principles of knee instability. *Current reviews in musculoskeletal medicine*. 2016;9:114-22.
22. Zantop T, Herbort M, Raschke MJ, Fu FH, Petersen W. The role of the anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament in anterior tibial translation and internal rotation. *The American journal of sports medicine*. 2007;35(2):223-7.
23. Yoshida M, Fujii K. Differences in cellular properties and responses to growth factors between human ACL and MCL cells. *Journal of orthopaedic science*. 1999;4(4):293-8.
24. Gianotti SM, Marshall SW, Hume PA, Bunt L. Incidence of anterior cruciate ligament injury and other knee ligament injuries: a national population-based study. *Journal of science and medicine in sport*. 2009;12(6):622-7.
25. Ageberg E, Roos HP, Silbernagel KG, Thomeé R, Roos EM. Knee extension and flexion muscle power after anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon graft or hamstring tendons graft: a cross-sectional comparison 3 years post surgery. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2009;17:162-9.
26. Clark J, Rueff DE, Indelicato PA, Moser M. Primary ACL reconstruction using allograft tissue. *Clinics in sports medicine*. 2009;28(2):223-44.
27. Cohen SB, Sekiya JK. Allograft safety in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clinics in sports medicine*. 2007;26(4):597-605.

28. Hospodar MSJ, Miller MD. Controversies in ACL reconstruction: bone-patellar tendon-bone anterior cruciate ligament reconstruction remains the gold standard. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. 2009;17(4):242-6.
29. Han HS, Seong SC, Lee S, Lee MC. Anterior cruciate ligament reconstruction: quadriceps versus patellar autograft. *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466:198-204.
30. Fu FH, Karlsson J. *A long journey to be anatomic*. Springer; 2010. p. 1151-3.
31. Nicholas SJ, D'Amato MJ, Mullaney MJ, Tyler TF, Kolstad K, McHugh MP. A prospectively randomized double-blind study on the effect of initial graft tension on knee stability after anterior cruciate ligament reconstruction. *The American journal of sports medicine*. 2004;32(8):1881-6.
32. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *Journal of orthopaedic research*. 1986;4(2):162-72.
33. Yoshiya S, Andrish JT, Manley MT, Bauer TW. Graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction: an in vivo study in dogs. *The American journal of sports medicine*. 1987;15(5):464-70.
34. Yasuda K, Tsujino J, Tanabe Y, Kaneda K. Effects of initial graft tension on clinical outcome after anterior cruciate ligament reconstruction: autogenous doubled hamstring tendons connected in series with polyester tapes. *The American journal of sports medicine*. 1997;25(1):99-106.
35. Hapa O, Barber FA. ACL fixation devices. *Sports medicine and arthroscopy review*. 2009;17(4):217-23.
36. Björnsson H, Samuelsson K, Sundemo D, Desai N, Sernert N, Rostgård-Christensen L, et al. A randomized controlled trial with mean 16-year follow-up comparing hamstring and patellar tendon autografts in anterior cruciate ligament reconstruction. *The American Journal of Sports Medicine*. 2016;44(9):2304-13.
37. Burks RT, Leland R. Determination of graft tension before fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1988;4(4):260-6.
38. DI B-A. Anterior cruciate ligament replacements: A mechanical study of femoral attachment location, flexion angle at tensioning, and Initial tention. *J Orthop Res*. 1990;8:522-31.
39. Jorn LP, Fridén T, Ryd L, Lindstrand A. Persistent stability 3 years after reconstruction of the anterior cruciate ligament: a radiostereometric analysis (RSA) of 20 patients. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1997;68(5):427-9.
40. Nabors ED, Richmond JC, Vannah WM, McConville OR. Anterior cruciate ligament graft tensioning in full extension. *The American journal of sports medicine*. 1995;23(4):488-92.
41. Chalmers PN, Mall NA, Yanke AB, Bach Jr BR. Contemporary anterior cruciate ligament outcomes: does technique really matter? *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2013;21(1):55-63.
42. Azar FM, Canale ST, Beaty JH. *Campbell's Operative Orthopaedics, E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2020.

43. Levine JW, Kiapour AM, Quatman CE, Wordeman SC, Goel VK, Hewett TE, Demetropoulos CK. Clinically relevant injury patterns after an anterior cruciate ligament injury provide insight into injury mechanisms. *The American journal of sports medicine*. 2013;41(2):385-95.
44. Musahl V, Karlsson J. Anterior cruciate ligament tear. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(24):2341-8.
45. Lebaschi AH, Deng X-H, Camp CL, Zong J, Cong G-T, Carballo CB, et al. Biomechanical, histologic, and molecular evaluation of tendon healing in a new murine model of rotator cuff repair. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2018;34(4):1173-83.
46. KASPERCZYK WJ, BOSCH U, OESTERN H-J, TSCHERNE H. Staging of patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament reconstruction: a biomechanical and histological study in a sheep model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*<sup>®</sup>. 1993;286:271-82.
47. Jackson DW, Corsetti J, Simon TM. Biologic incorporation of allograft anterior cruciate ligament replacements. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*. 1996;324:126-33.
48. NAGANO M. Healing Process of Bone-Patellar Tendon-Bone Graft in A Bone Tunnel: A Histological Study in Dogs. *Japanese Journal of Rheumatism and Joint Surgery*. 1999;17(4):315-22.
49. Blickenstaff KR, Grana WA, Egle D. Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *The American journal of sports medicine*. 1997;25(4):554-9.
50. Liu SH, Panossian V, Al-Shaikh R, Tomin E, Shepherd E, Finerman GA, Lane JM. Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*<sup>®</sup>. 1997;339:253-60.
51. Shino K, Kawasaki T, Hirose H, Gotoh I, Inoue M, Ono K. Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*. 1984;66(5):672-81.
52. Tomita F, Yasuda K, Mikami S, Sakai T, Yamazaki S, Tohyama H. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone–patellar tendon–bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2001;17(5):461-76.
53. Jones J, Smibert J, McCullough C, Price A, Mutton W. Tendon implantation into bone: an experimental study. *The Journal of Hand Surgery: British & European Volume*. 1987;12(3):306-12.
54. Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Minami A, Tohyama H. The effect of graft-tunnel diameter disparity on intraosseous healing of the flexor tendon graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *The American Journal of Sports Medicine*. 2002;30(4):498-505.
55. Whiston T, Walmsley R. Some observations on the reaction of bone and tendon after tunnelling of bone and insertion of tendon. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*. 1960;42(2):377-86.
56. FORWARD AD, COWAN RJ. Tendon suture to bone: an experimental investigation in rabbits. *JBJS*. 1963;45(4):807-23.

57. Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, Rohrer MD, Prasad HS. Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *The American journal of knee surgery*. 2000;13(3):143-51.
58. Brand J, Weiler A, Caborn DN, Brown CH, Johnson DL. Graft fixation in cruciate ligament reconstruction. *The American journal of sports medicine*. 2000;28(5):761-74.
59. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, Rehm O, Südkamp NP. Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery*. 2002;18(2):124-35.
60. Biermann H. Die knochenbildung im bereich periostaler-diaphysärer sehnen-und bandansätze. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1957;46:635-71.
61. Knese K-H, Biermann H. Die knochenbildung an Sehnen-und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Zeitschrift fuer Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1958;49:142-87.
62. COOPER RR, Misol S, Stimmel P. Tendon and ligament insertion: a light and electron microscopic study. *JBJS*. 1970;52(1):1-170.
63. Schneider H. Zur struktur der sehnenansatzzonen. *Zeitschrift für anatomie und entwicklungsgeschichte*. 1956;119:431-56.
64. Dolgo-Saburoff B. Über Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln. *Anat Anz*. 1929;68:80-7.
65. Küswetter W, Refior H. Vergleichende licht-und rasterelektronenmikroskopische untersuchungen zum morphologischen aufbau der knöchernen bandinsertionen. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. 1985;123(05):876-9.
66. Vis J. Histological investigations into the attachment of tendons and ligaments to the mammalian skeleton. *Proc kon Ned Akad v Went*. 1957;60:147-57.
67. Benjamin M, Evans EJ, Copp L. The histology of tendon attachments to bone in man. *Journal of anatomy*. 1986;149:89.
68. Messner K. Postnatal development of the cruciate ligament insertions in the rat knee: morphological evaluation and immunohistochemical study of collagens types I and II. *Cells Tissues Organs*. 1997;160(4):261-8.
69. Hurov JR. Soft-tissue bone interface: how do attachments of muscles, tendons, and ligaments change during growth? A light microscopic study. *Journal of Morphology*. 1986;189(3):313-25.
70. Gao J, Messner K. Quantitative comparison of soft tissue-bone interface at chondral ligament insertions in the rabbit knee joint. *Journal of anatomy*. 1996;188(Pt 2):367.
71. Walsh WR. *Repair and regeneration of ligaments, tendons, and joint capsule*: Springer Science & Business Media; 2006.
72. Kernwein G. A study of tendon implantation into bone. *Gynec Obstet*. 1942;75:794-6.

73. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, Hashiba K, Nakamura R, Tomita K. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2002;18(1):82-90.
74. Greis PE, Burks RT, Bachus K, Luker MG. The influence of tendon length and fit on the strength of a tendon-bone tunnel complex: a biomechanical and histologic study in the dog. *The American journal of sports medicine*. 2001;29(4):493-7.
75. Singhatat W, Lawhorn KW, Howell SM, Hull ML. How four weeks of implantation affect the strength and stiffness of a tendon graft in a bone tunnel: a study of two fixation devices in an extraarticular model in ovine. *The American Journal of Sports Medicine*. 2002;30(4):506-13.
76. Rodeo SA, Suzuki K, Deng X-h, Wozney J, Warren RF. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *The American journal of sports medicine*. 1999;27(4):476-88.
77. Shoemaker SC, Rechl H, Campbell P, Kram HB, Sanchez M. Effects of fibrin sealant on incorporation of autograft and xenograft tendons within bone tunnels: a preliminary study. *The American Journal of Sports Medicine*. 1989;17(3):318-24.
78. Grassman S, McDonald DB, Thornton GM, Shrive N, Frank C. Early healing processes of free tendon grafts within bone tunnels is bone-specific: a morphological study in a rabbit model. *The Knee*. 2002;9(1):21-6.
79. Weiler A, Peters G, Mäurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP. Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a two-year study in sheep. *The American journal of sports medicine*. 2001;29(6):751-61.
80. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, Abel C, Südkamp NP, Hoffmann RF. Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2002;18(2):113-23.
81. Anderson K, Seneviratne AM, Izawa K, Atkinson BL, Potter HG, Rodeo SA. Augmentation of tendon healing in an intraarticular bone tunnel with use of a bone growth factor. *The American journal of sports medicine*. 2001;29(6):689-98.
82. Papachristou G, Tilentzoglou A, Efstathopoulos N, Khaldi L. Reconstruction of anterior cruciate ligament using the doubled tendon graft technique: an experimental study in rabbits. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 1998;6(4):246-52.
83. Park M, Lee M, Seong S. A comparative study of the healing of tendon autograft and tendon-bone autograft using patellar tendon in rabbits. *International orthopaedics*. 2001;25:35-9.
84. Uskoković V. The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite. *RSC advances*. 2015;5(46):36614-33.
85. Uskoković V, Uskoković DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials*. 2011;96(1):152-91.

86. Goto T, Kojima T, Iijima T, Yokokura S, Kawano H, Yamamoto A, Matsuda K. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *Journal of orthopaedic science*. 2001;6(5):444-7.
87. Ghiasi B, Sefidbakht Y, Rezaei M. Hydroxyapatite for biomedicine and drug delivery. *Nanomaterials for advanced biological applications*. 2019:85-120.
88. Ohta K, Tada M, Ninomiya Y, Kato H, Ishida F, Abekura H, et al. Application of interconnected porous hydroxyapatite ceramic block for onlay block bone grafting in implant treatment: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(6):5564-8.
89. Zhao X, Ng S, Heng BC, Guo J, Ma L, Tan TTY, et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Archives of toxicology*. 2013;87:1037-52.
90. Liu X, Zhao M, Lu J, Ma J, Wei J, Wei S. Cell responses to two kinds of nanohydroxyapatite with different sizes and crystallinities. *International journal of nanomedicine*. 2012:1239-50.
91. Yuan Y, Liu C, Qian J, Wang J, Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 2010;31(4):730-40.
92. Ignjatović N, Ajduković Z, Savić V, Najman S, Mihailović D, Vasiljević P, et al. Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24:343-54.
93. Ignjatović N, Uskoković V, Ajduković Z, Uskoković D. Multifunctional hydroxyapatite and poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(2):943-50.
94. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials—physicochemical and structural influences. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2006;77(4):747-62.
95. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*. 2005;8:131-6.
96. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*. 1999;24(6):579-89.
97. Oonishi H. Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials*. 1991;12(2):171-8.
98. Hofmann A, Konrad L, Gotzen L, Printz H, Ramaswamy A, Hofmann C. Bioengineered human bone tissue using autogenous osteoblasts cultured on different biomatrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2003;67(1):191-9.
99. Ogata K, Imazato S, Ehara A, Ebisu S, Kinomoto Y, Nakano T, Umakoshi Y. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2005;72(2):127-35.

100. Richard D, Dumelié N, Benhayoune H, Bouthors S, Guillaume C, Lalun N, et al. Behavior of human osteoblast-like cells in contact with electrodeposited calcium phosphate coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2006;79(1):108-15.
101. Wang C, Duan Y, Markovic B, Barbara J, Howlett CR, Zhang X, Zreiqat H. Proliferation and bone-related gene expression of osteoblasts grown on hydroxyapatite ceramics sintered at different temperature. *Biomaterials.* 2004;25(15):2949-56.
102. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2004;71(1):108-17.
103. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595-610.
104. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11.
105. Kapadia RD, Stroup GB, Badger AM, Koller B, Levin JM, Coatney RW, et al. Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technology and health care.* 1998;6(5-6):361-72.
106. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou C. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different X-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Medical physics.* 2009;36(4):1286-97.
107. Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo  $\mu$ CT imaging. *Journal of bone and mineral research.* 2004;19(10):1640-50.
108. Alexander JM, Bab I, Fish S, Müller R, Uchiyama T, Gronowicz G, et al. Human parathyroid hormone 1–34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2001;16(9):1665-73.
109. Barbier A, Martel C, De Vernejoul M, Tirode F, Nys M, Mocaer G, et al. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *Journal of bone and mineral metabolism.* 1999;17:37-44.
110. Kuhn J, Goldstein S, Feldkamp L, Goulet R, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *Journal of orthopaedic research.* 1990;8(6):833-42.
111. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone.* 1998;23(1):59-66.
112. Fanuscu MI, Chang TL. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. *Clinical oral implants research.* 2004;15(2):213-8.

113. Chappard D, Retaillieu-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and  $\mu$ CT. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(7):1177-84.
114. Akhter MP, Lappe JM, Davies K, Recker RR. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone*. 2007;41(1):111-6.
115. Santos RM, Ling D, Sarvaramini A, Guo M, Elsen J, Larachi F, et al. Stabilization of basic oxygen furnace slag by hot-stage carbonation treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2012;203:239-50.
116. Trindade MJ, Dias M, Coroado J, Rocha F. Mineralogical transformations of calcareous rich clays with firing: A comparative study between calcite and dolomite rich clays from Algarve, Portugal. *Applied Clay Science*. 2009;42(3-4):345-55.
117. Dri M, Sanna A, Maroto-Valer MM. Mineral carbonation from metal wastes: Effect of solid to liquid ratio on the efficiency and characterization of carbonated products. *Applied energy*. 2014;113:515-23.
118. Reynolds B, Reddy K, Argyle MD. Field application of accelerated mineral carbonation. *Minerals*. 2014;4(2):191-207.
119. Newbury\* DE, Ritchie NW. Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative? *Scanning*. 2013;35(3):141-68.
120. Mandal S, Dileep Kumar C, Kumar D, Syed K, Van Ende MA, Jung IH, et al. Designing environment-friendly chromium-free Spinel-Periclase-Zirconia refractories for Ruhrstahl Heraeus degasser. *Journal of the American Ceramic Society*. 2020;103(12):7095-114.
121. Warlo M, Wanhainen C, Bark G, Butcher AR, McElroy I, Brising D, Rollinson GK. Automated quantitative mineralogy optimized for simultaneous detection of (precious/critical) rare metals and base metals in a production-focused environment. *Minerals*. 2019;9(7):440.
122. Schulz B, Sandmann D, Gilbricht S. SEM-based automated mineralogy and its application in geo-and material sciences. *Minerals*. 2020;10(11):1004.
123. Schulz B, Merker G, Gutzmer J. Automated SEM mineral liberation analysis (MLA) with generically labelled EDX spectra in the mineral processing of rare earth element ores. *Minerals*. 2019;9(9):527.
124. Smythe DM, Lombard A, Coetzee LL. Rare Earth Element deportment studies utilising QEMSCAN technology. *Minerals Engineering*. 2013;52:52-61.
125. Rollinson GK, Andersen JC, Stickland RJ, Boni M, Fairhurst R. Characterisation of non-sulphide zinc deposits using QEMSCAN®. *Minerals Engineering*. 2011;24(8):778-87.
126. Knappett C, Pirrie D, Power M, Nikolakopoulou I, Hilditch J, Rollinson G. Mineralogical analysis and provenancing of ancient ceramics using automated SEM-EDS analysis (QEMSCAN®): a pilot study on LB I pottery from Akrotiri, Thera. *Journal of Archaeological Science*. 2011;38(2):219-32.
127. Saghiri MA, Asgar K, Lotfi M, Karamifar K, Saghiri AM, Neelakantan P, et al. Back-scattered and secondary electron images of scanning electron microscopy in dentistry: a new method for surface analysis. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2012;70(6):603-9.

128. Han S, Löhr SC, Abbott AN, Baldermann A, Farkaš J, McMahon W, et al. Earth system science applications of next-generation SEM-EDS automated mineral mapping. *Frontiers in Earth Science*. 2022;10:956912.
129. Haque F, Santos RM, Chiang YW. Optimizing inorganic carbon sequestration and crop yield with wollastonite soil amendment in a microplot study. *Frontiers in plant science*. 2020;11:544852.
130. Butera A, Pascadopoli M, Gallo S, Lelli M, Tarterini F, Giglia F, Scribante A. SEM/EDS evaluation of the mineral deposition on a polymeric composite resin of a toothpaste containing biomimetic Zn-Carbonate hydroxyapatite (microRepair®) in oral environment: a randomized clinical trial. *Polymers* 2021; 13 (16): 2740. s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published ...; 2021.
131. Santos RM, Van Bouwel J, Vandeveld E, Mertens G, Elsen J, Van Gerven T. Accelerated mineral carbonation of stainless steel slags for CO<sub>2</sub> storage and waste valorization: Effect of process parameters on geochemical properties. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 2013;17:32-45.
132. Sukmara S, Adi WA, Manaf A. Mineral analysis and its extraction process of ilmenite rocks in titanium-rich cumulates from Pandeglang Banten Indonesia. *Journal of Materials Research and Technology*. 2022;17:3384-93.
133. Weerakoon AT, Cooper C, Meyers IA, Condon N, Sexton C, Thomson D, et al. Does dentine mineral change with anatomical location, microscopic site and patient age? *Journal of Structural Biology*: X. 2022;6:100060.
134. Jiang Y, Li Y, Liao S, Yin Z, Hsu W. Mineral chemistry and 3D tomography of a Chang'E 5 high-Ti basalt: implication for the lunar thermal evolution history. *Science Bulletin*. 2022;67(7):755-61.
135. Jang K-M, Lim HC, Jung WY, Moon SW, Wang JH. Efficacy and safety of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in anterior cruciate ligament reconstruction of a rabbit model: new strategy to enhance tendon graft healing. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2015;31(8):1530-9.
136. RR C. Tendon and ligament insertion: a light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*. 1970;52:1-20.
137. Soon MY, Hassan A, Hui JH, Goh JC, Lee E. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: a short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration. *The American journal of sports medicine*. 2007;35(6):962-71.
138. Lim J-K, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee E-H. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2004;20(9):899-910.
139. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *The American journal of sports medicine*. 2004;32(2):321-7.
140. Kiapour A, Murray M. Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair. *Bone & joint research*. 2014;3(2):20-31.

141. Murawski CD, van Eck CF, Irrgang JJ, Tashman S, Fu FH. Operative treatment of primary anterior cruciate ligament rupture in adults. *JBSJ*. 2014;96(8):685-94.
142. Ekdhahl M, Wang JH-C, Ronga M, Fu FH. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2008;16:935-47.
143. Mihelic R, Pecina M, Jelic M, Zoricic S, Kusec V, Simic P, et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) promotes tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *The American journal of sports medicine*. 2004;32(7):1619-25.
144. Wei B, Wang C, Yan C, Tang B, Yu X, Zhang H, et al. Osteoprotegerin/bone morphogenetic protein 2 combining with collagen sponges on tendon-bone healing in rabbits. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2020;38(4):432-41.
145. Sasaki K, Kuroda R, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, Mifune Y, et al. Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor. *The American Journal of Sports Medicine*. 2008;36(8):1519-27.
146. Oka S, Matsumoto T, Kubo S, Matsushita T, Sasaki H, Nishizawa Y, et al. Local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Engineering Part A*. 2013;19(9-10):1233-43.
147. Han F, Zhang P, Sun Y, Lin C, Zhao P, Chen J. Hydroxyapatite-doped polycaprolactone nanofiber membrane improves tendon-bone interface healing for anterior cruciate ligament reconstruction. *International journal of nanomedicine*. 2015:7333-43.
148. Wang Y, Ren C, Bi F, Li P, Tian K. The hydroxyapatite modified 3D printed poly L-lactic acid porous screw in reconstruction of anterior cruciate ligament of rabbit knee joint: A histological and biomechanical study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2023;24(1):151.
149. Wong C-C, Yeh Y-Y, Yang T-L, Tsuang Y-H, Chen C-H. Augmentation of Tendon Graft-Bone Tunnel Interface Healing by Use of Bioactive Platelet-Rich Fibrin Scaffolds. *The American Journal of Sports Medicine*. 2020;48(6):1379-88.
150. Burgess TL, Qian Y-x, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *The Journal of cell biology*. 1999;145(3):527-38.
151. Lacey D, Timms E, Tan H-L, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*. 1998;93(2):165-76.
152. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
153. Bose S, Vahabzadeh S, Banerjee D, Ke D. Enhanced osteogenic protein expression on human osteoblast-osteoclast co-culture system using doped hydroxyapatite plasma coatings for orthopedic and dental applications. *Materials Today Communications*. 2019;21:100534.
154. MacMillan AK, Lamberti FV, Moulton JN, Geilich BM, Webster TJ. Similar healthy osteoclast and osteoblast activity on nanocrystalline hydroxyapatite and nanoparticles of tri-calcium phosphate compared to natural bone. *International journal of nanomedicine*. 2014:5627-37.

155. Rodeo SA, Kawamura S, Ma CB, Deng X-h, Sussman PS, Hays P, Ying L. The effect of osteoclastic activity on tendon-to-bone healing: an experimental study in rabbits. *JBJS*. 2007;89(10):2250-9.
156. Jiang Q, Wang L, Liu Z, Su J, Tang Y, Tan P, et al. Canine ACL reconstruction with an injectable hydroxyapatite/collagen paste for accelerated healing of tendon-bone interface. *Bioactive Materials*. 2023;20:1-15.
157. Huangfu X, Zhao J. Tendon-bone healing enhancement using injectable tricalcium phosphate in a dog anterior cruciate ligament reconstruction model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2007;23(5):455-62.
158. Karaoglu S, Celik C, Korkusuz P. The effects of bone marrow or periosteum on tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2009;17:170-8.
159. Zhi Y, Liu W, Zhang P, Jiang J, Chen S. Electrospun silk fibroin mat enhances tendon-bone healing in a rabbit extra-articular model. *Biotechnology letters*. 2016;38:1827-35.
160. Park SH, Choi Y-J, Moon SW, Lee BH, Shim J-H, Cho D-W, Wang JH. Three-dimensional bio-printed scaffold sleeves with mesenchymal stem cells for enhancement of tendon-to-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction using soft-tissue tendon graft. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2018;34(1):166-79.
161. Kim JG, Kim HJ, Kim SE, Bae JH, Ko YJ, Park JH. Enhancement of tendon-bone healing with the use of bone morphogenetic protein-2 inserted into the suture anchor hole in a rabbit patellar tendon model. *Cytotherapy*. 2014;16(6):857-67.
162. Lu Y, Markel MD, Nemke B, Lee JS, Graf BK, Murphy WL. Influence of hydroxyapatite-coated and growth factor-releasing interference screws on tendon-bone healing in an ovine model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2009;25(12):1427-34. e1.
163. Bi F, Chen Y, Liu J, Wang Y, Xu D, Tian K. Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using a silk-collagen scaffold modified by hydroxyapatite at both ends: a histological and biomechanical study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2021;16:1-12.
164. Bedi A, Kawamura S, Ying L, Rodeo SA. Differences in tendon graft healing between the intra-articular and extra-articular ends of a bone tunnel. *HSS Journal*<sup>®</sup>. 2009;5(1):51-7.