



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

**NORMOBARİK ARALIKLI HİPOKSİNİN KEMİK
TENDON BİLEŞKESİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ:
RAT MODELİ**

Dr. Anıl Tarık SAYGILI

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa TEKİN**

ADANA-2024



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**NORMOBARİK ARALIKLI HİPOKSİNİN KEMİK
TENDON BİLEŞKESİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ:
RAT MODELİ**

Dr. Anıl Tarık SAYGILI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa TEKİN

ADANA-2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar LİSTESİ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik-tendon bileşkesinin morfolojisi ve histolojisi	3
2.1.1. Dolaylı Bağlanmalar – Fibröz Entezler	6
2.1.2. Doğrudan Bağlanmalar – Fibrokartilajinöz Entezler	6
2.2. Kemik-Tendon Bileşkesinin Damar ve Sinir Yapılanması	9
2.3. Tendon-Kemik Birleşim Yerinin Embriyonal Gelişimi	9
2.3.1. Entez oluşumu ve yeniden şekillendirilmesini düzenleyen sinyal yolakları	13
2.3.1.1. TGF- β ve BMP Sinyal Yolağı	13
2.3.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Sinyal Yolağı	15
2.3.1.2. Hedgehog Sinyal Yolağı	16
2.4. Tendon-Kemik Birleşim Yeri İyileşmesinin Biyolojisi	17
2.5. Hipoksi	19
2.5.1. Aralıklı Hipoksi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Uygulanan Cerrahi İşlemler ve Teknik	25
3.2. Cerrahi Sonrası Takip	32
3.3. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Materyallerin Hazırlanması	32
3.4. Biyomekanik Değerlendirme	34
3.5. Histolojik Değerlendirme	36
3.6. Çalışmanın İstatistiksel Metodu	41
4. BULGULAR	42

4.1. Çalışmanın Biyomekanik Sonuçları.....	42
4.2. Çalışmanın Histolojik Sonuçları	46
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69



TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Entezlerin karakteristik özellikleri.....	6
Tablo 2. Fibrokartilajinöz Entezlerin Bölgeleri	8
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Hayvan Gruplarının Özet Tablosu	23
Tablo 4. Işık mikroskopik doku takip işlemi aşamaları	37
Tablo 5. Bonar skorlama sistemi	38
Tablo 6. Movin skorlama sistemi	39
Tablo 7. Nourissat skorlama sistemi.....	40
Tablo 8. Biyomekanik parametrelerin istatistik sonuçları.	45
Tablo 9. Bonar skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları	47
Tablo 10. Movin skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları.....	50
Tablo 11. Nourissat skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Fibröz kıkırdığın gelişim diyagramı	4
Şekil 2. İnsanda triceps brachi kasının olekranın entezi, Masson's trikrom boyası	5
Şekil 3. Tavşanda dolaylı ve doğrudan bağlanmaların fotomikrograf görüntüsü	8
Şekil 4. Fare supraspinatus kasının entezinin dört histolojik bölgesinin gösterimi. Tendon, fibrokartilaj ve kalsifiye fibrokartilajdaki proteoglikanlar mor renkte görülmektedir. Toluidin mavisi ile boyanmıştır	9
Şekil 5. E11.5 ile E12.5 arasındaki farelerin sagittal humerus kesitlerinde çift floresanlı in situ hibridizasyon kullanılarak yapılan entez yapısının gösterimi	11
Şekil 6. Entez yapısının in situ şematik modeli	12
Şekil 7. Entezin “iki-kaderli” progenitör hücrelerden oluşan yapısı	15
Şekil 8. Gli-1 (+) hücrelerin sayısının artışı ve mineralizasyon bölgesinde birikimi	17
Şekil 9. Normobarik aralıklı hipoksinin uygulandığı el yapımı kafes (önden görünüm)	24
Şekil 10. Normobarik aralıklı hipoksinin uygulandığı el yapımı kafes (arkadan görünüm) , bölmeler arası gaz geçişini sağlayan plastik borular görülmekte	25
Şekil 11. Ratın cerrahi sahada tespiti	26
Şekil 12. Cilt kesisi sonrasında aşıl tendonunun explore edilmesi.....	27
Şekil 13. Kemik tendon bileşkesinin eksplorasyonu sonrasında bileşkenin kesilerek yaralanma modelinin gerçekleştirilmesi	28
Şekil 14. Delici motor yardımıyla kalkaneusa tünel açılması	29
Şekil 15. Aşıl tendonundan geçilen süturun kalkaneustaki açılan tünelden geçirilmesi.....	30
Şekil 16. Süturun, açılan tünelden geçirilerek distal tarafta bağlanması	31
Şekil 17. Cildin sütürasyonu sonrası işlemin tamamlanması	32
Şekil 18. Sakrifikasyon sonrasında biyomekanik ve histolojik değerlendirme için materyallerin hazırlanması	33
Şekil 19. Biyomekanik değerlendirme için materyallerin cihaz içerisinde en az kaymayı sağlayacak şekilde hazırlanması	34
Şekil 20. Testometric(M500-50CT, İngiltere) cihazı ile materyal üzerinde biyomekanik çalışmanın yapılması	35
Şekil 21. Kontrol grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre zamansal karşılaştırılması	42
Şekil 22. Deney grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre zamansal karşılaştırılması	43
Şekil 23. Kontrol ve deney grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre gruplar arası karşılaştırılması.....	44
Şekil 24. Bonar Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması	48

Şekil 25. Bonar Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması	48
Şekil 26. Movin Skoru ve Parametrelerinin Kontrol Grubunda Zamansal Karşılaştırılması.....	51
Şekil 27. Movin Skoru ve Parametrelerinin Deney Grubunda Zamansal Karşılaştırılması.....	51
Şekil 28. Movin Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması	52
Şekil 29. Movin Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması	52
Şekil 30. Nourissat Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	55
Şekil 31. Nourissat Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması	55
Şekil 32. Kontrol grubu 4. hafta tendon-kemik birleşkesinin histolojik görünümü.....	56
Şekil 33. Kontrol grubu 8. hafta tendon-kemik birleşkesinin histolojik görünümü.....	57
Şekil 34. Deney grubu 4. hafta tendon-kemik birleşkesinin (siyah ok başı) histolojik görünümü.	58
Şekil 35. Deney grubu 8. hafta tendon-kemik birleşkesinin (siyah ok başı) histolojik görünümü	59
Şekil 36. Kontrol grubu 4. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü.....	60
Şekil 37. Kontrol grubu 8. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü.....	61
Şekil 38. Deney grubu 4. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü.....	62
Şekil 39. Deney grubu 8. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü.....	63

KISALTMALAR

MCL	: Medial Kollateral Ligament
Sox9 SRY	: (Sex-determining Region Y)-box 9
Scx	: Skleraksis
bHLH	: Basic Helix-Loop-Helix
TGF-β	: Transforming Growth Factor-Beta
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
TGFβR	: Transforming Growth Factor-Beta Reseptörü
Smad	: Sma and Mad Related Protein
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
IKKβ	: İnhibitor Kappa B Kinase Beta
Tgfbβ-II	: Transforming Growth Factor-Beta Reseptörü-2
Gli3	: GLI-Krüppel Like Zinc Finger Family Member 3
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor
Hh	: Hedgehog
SHH	: Sonich Hedge Hog
PTHrP	: Parathyroid Hormone-related Protein
PTCH-1	: Patched-1
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor 1
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
HIF-1α	: Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HIF	: Hypoxia-Inducible Factor
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

ÖZET

Normobarik aralıklı hipoksinin kemik tendon bileşkesi iyileşmesi üzerine etkisi: Rat modeli

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kemik-tendon bileşkesinin iyileşme sürecinde normobarik aralıklı hipoksi uygulamasının biyomekanik ve histolojik etkilerini incelemektir. Kemik-tendon bileşkesinin doğal iyileşme süreçlerinde karşılaşılan zorluklar göz önüne alındığında, normobarik aralıklı hipoksinin bu süreci nasıl etkileyebileceği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 64 adet Wistar-Albino cinsi erişkin dişi rat kullanılmıştır. Denekler, kontrol ve deney grupları olmak üzere iki ana gruba ayrılmış ve her grup kendi içinde biyomekanik ve histolojik analizler için iki alt gruba bölünmüştür. Aralıklı hipoksi uygulaması, haftada 5 gün, günde 5 saat, ortalama %10.5 oksijen seviyesine maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Denekler 8 haftalık bir takip sürecine tabi tutulmuş ve bu süre zarfında cerrahi olarak oluşturulan aşil tendonu yaralanmalarının iyileşme süreçleri değerlendirilmiştir. 4. ve 8. haftalarda alınan örneklerle iki ayrı gözlem noktası belirlenmiştir. Biyomekanik analizler Testometric(M500-50CT, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş, histolojik değerlendirmeler ise Safranin-o ve Picro-Sirius boyaları ile ve mikroskopik incelemeler yardımıyla Bonar, Movin, Nourissat skorlama sistemlerine göre yapılmıştır.

Bulgular: Aralıklı hipoksi uygulaması yapılan deney grubunda, iyileşen kemik-tendon bileşkesinin biyomekanik dayanıklılığında ve histolojik yapısında anlamlı iyileşmeler gözlemlenmiştir. 8. hafta sonunda kontrol grubuna kıyasla, deney grubunda kopma anındaki uzama, maksimum uzama, kopma anındaki gerilim ve maksimum gerilim değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. (p değerleri sırasıyla; 0.016 , 0.031, 0.016, 0.033) Bonar, Movin ve Nourissat skorlama sistemlerine göre yapılan değerlendirmelerde, deney grubunun Bonar ve Movin skorlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, anlamlı olarak daha iyi iyileştiği saptanmıştır. (p değerleri sırasıyla; 0.009, 0.004) Ayrıca skorlamaların parametreleri de incelendiğinde Bonar skorlama sistemi parametrelerinden kollojen artışı, Movin skorlama sisteminden hyalinizasyon azalışı, Nourissat skorlama sistemi parametrelerinden kollojenin organizasyonunun artışı 8. haftada kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. (p değerleri sırasıyla; 0.009, 0.041, 0.015)

Sonuç: Bu çalışma, aralıklı hipoksi uygulamasının kemik-tendon bileşkesinin iyileşme sürecinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Biyomekanik ve histolojik bulgular, aralıklı hipoksinin skar dokusu oluşumunu azaltarak entez yapısının yeniden oluşumunu desteklediğini ve tendonun elastikiyetini, kuvvet taşıma kapasitesini, uzama kapasitesini ve taşıdığı gerilimi arttırdığını ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, aralıklı hipoksinin ortopedik yaralanmaların tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: normobarik aralıklı hipoksi, kemik-tendon bileşkesi, iyileşme süreci

ABSTRACT

Effect of normobaric intermittent hypoxia on bone tendon junction healing: A rat model

Objective: The aim of this study is to investigate the biomechanical and histological effects of normobaric intermittent hypoxia on the healing process of the bone-tendon junction. Considering the challenges encountered in the natural healing processes of the bone-tendon junction, the potential impact of normobaric intermittent hypoxia on this process was explored.

Materials and Methods: In this study, 64 adult female Wistar-Albino rats were used. The subjects were divided into two main groups: control and experimental, with each main group further divided into two subgroups for biomechanical and histological analyses. The intermittent hypoxia application involved exposing the subjects to an average of 10.5% oxygen level for 5 hours a day, 5 days a week. The rats were subjected to an 8-week follow-up period during which the healing processes of surgically induced Achilles tendon injuries were evaluated. Two observation points were determined with samples taken at the 4th and 8th weeks. Biomechanical analyses were conducted using a Testometric (M500-50CT, UK) device, while histological evaluations were performed using Safranin-O and Picro-Sirius stains, assessed microscopically according to Bonar, Movin, and Nourissat scoring systems.

Results: Significant improvements were observed in the biomechanical strength and histological structure of the healing bone-tendon junction in the experimental group subjected to intermittent hypoxia. At the end of the 8th week, the experimental group showed statistically significant higher values in extension at break, maximum extension, stress at break, and maximum stress compared to the control group (p-values: 0.016, 0.031, 0.016, 0.033, respectively). Evaluations according to Bonar, Movin, and Nourissat scoring systems indicated that the experimental group had significantly lower Bonar and Movin scores than the control group, demonstrating better healing (p-values: 0.009, 0.004, respectively). Additionally, the parameter analyses of these scoring systems revealed significant findings at the 8th week: increased collagen content in the Bonar scoring system, decreased hyalinization in the Movin scoring system, and improved collagen organization in the Nourissat scoring system compared to the control group (p-values: 0.009, 0.041, 0.015, respectively).

Conclusion: This study demonstrates that intermittent hypoxia application has beneficial effects on the healing process of the bone-tendon junction. Biomechanical and histological findings indicate that intermittent hypoxia supports the reformation of the enthesis structure by reducing scar tissue formation and enhancing the tendon's elasticity, load-bearing capacity, extension capacity, and stress tolerance. These results suggest that intermittent hypoxia could be a potential therapeutic approach in the treatment of orthopedic injuries.

Key words: normobaric intermittent hypoxia, bone-tendon junction, healing process

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik-tendon bileşkesi, biyomekanik işlevleri ve histolojik karmaşıklığı ile dikkat çeken, vücudun kritik yapılarından biridir.¹ Bu bileşke, tendonların kemiklere bağlandığı noktada hem esnekliği hem de dayanıklılığı sağlaması gereken, biyolojik olarak özgün bir bölgedir.² Kemik-tendon bileşkesinin anatomisi ve histolojisi, mekanik streslerin etkisi altında farklılaşarak, kendi kendini yeniden düzenleyen bir sistem olarak işlev görür.³ Bu özellikler, kemik-tendon bileşkesinin hasar gördüğünde yeniden yapılanma sürecini karmaşık ve zorlu hale getirir.⁴

Literatürde, kemik-tendon bileşkesinin iyileşme süreçleri üzerine yapılan çalışmalar, genellikle fibrovasküler skar dokusu oluşumuna odaklanmıştır.⁵ Ancak bu skar dokusu, doğal entez yapısının biyomekanik ve histolojik özelliklerini tam anlamıyla yeniden oluşturamaz.⁶ Bu nedenle, kemik-tendon bileşkesinin en iyi şekilde iyileşmesini sağlayacak yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi önem taşımaktadır.⁷

Aralıklı hipoksi uygulaması, belirli aralıklarla düşük oksijen seviyelerine maruz bırakılarak hücrel adaptasyonun ve iyileşmenin teşvik edildiği bir yöntemdir.⁸ Aralıklı hipoksinin, kalp, beyin ve iskelet kası gibi çeşitli dokularda iyileşme süreçlerini hızlandırdığı ve hücrel dayanıklılığı artırdığına dair pek çok kanıt bulunmaktadır.⁹ Ancak, kemik-tendon bileşkesinin iyileşmesi üzerindeki etkileri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır.¹⁰ Bu çalışmada, aralıklı hipoksinin kemik-tendon bileşkesinin biyomekanik ve histolojik iyileşmesi üzerindeki potansiyel etkileri araştırılacaktır.

Araştırma hipotezimiz, normobarik aralıklı hipoksi uygulamasının kemik-tendon bileşkesinin iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyerek, skar dokusu oluşumunu azaltacağı ve doğal entez yapısının yeniden oluşumunu destekleyeceği yönündedir. Bu bağlamda, çalışmanın amacı, kemik-tendon bileşkesinin iyileşme sürecinde normobarik aralıklı hipoksinin biyomekanik ve histolojik etkilerini incelemektir.

Bu tez, üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde, kemik-tendon bileşkesinin morfolojik ve histolojik yapısı ile ilgili literatür taraması sunulacaktır. İkinci bölümde, araştırmanın metodolojisi, deneysel tasarımı ve analiz yöntemleri detaylı bir şekilde açıklanacaktır. Son bölümde ise, elde edilen bulguların analizleri yapılarak, bu bulguların literatürdeki mevcut bilgilerle karşılaştırılması ve yorumlanması gerçekleştirilecektir.

Bu alışma, kemik-tendon bileşkesinin iyileşme süreçleri ve aralıklı hipoksinin terapötik potansiyeli hakkında değerli bilgiler sunmayı hedeflemektedir.

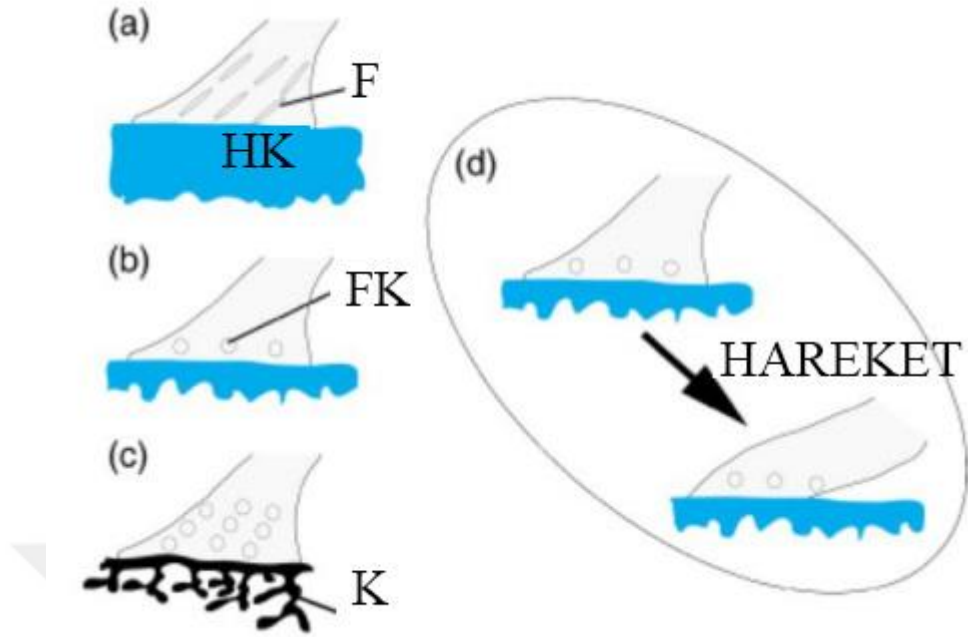


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik-tendon bileşkesinin morfolojisi ve histolojisi

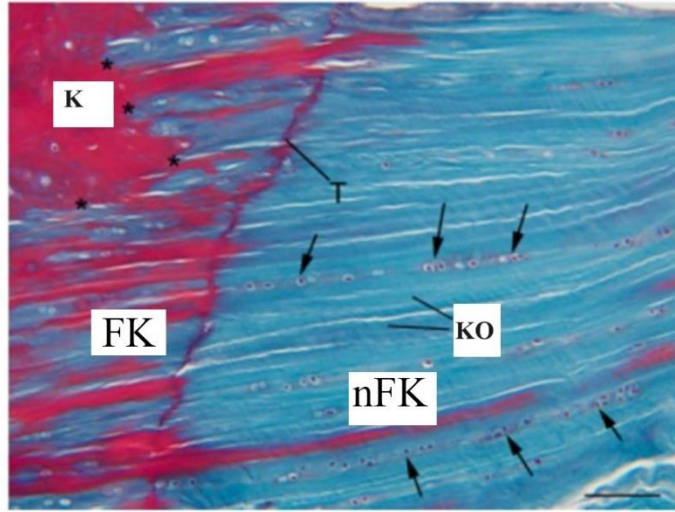
Tendonların kemiklere olan bağlanmaları biyolojik dokular içerisinde en karmaşıklarından biridir.¹¹ Bu bağlanma bölgesi entez olarak adlandırılır. Bu bölgenin morfolojik olarak farklılaşması mekanik yükün etkileri ile belirlenir ve böylece kendi kendini tasarlayan bir sistem oluşur.¹² Entez bölgesinin kendine özgü bu farklılaşması Thomopoulus ve arkadaşları tarafından da farelerin supraspinatus entez bölgeleri üzerinde gösterilmiştir. Yeni doğmuş farelerin omuzları intramüsküler botulinum toksini yapılarak felç edildiğinde kontrol grubuna göre gelişiminin çarpıcı bir şekilde geciktiği gösterilmiştir.¹³

Yumuşak dokunun sert dokuya dönüşümü, sırası ile kollajen liflerinin önce mineralize olmayan fibrokartilaja, sonra mineralize olmuş fibrokartilaja ve en sonunda kemiğe dönüşmesini gerektirmektedir.¹¹ Bu dönüşüm Gao ve arkadaşları tarafından immünohistokimyasal bir çalışma ile desteklenmiş ve gösterilmiştir.¹⁴ Gao ve ark. fetüs ve yenidoğan sıçanların diz eklemine MCL yapışma yerine yönelik incelemeler yapmış, tendon veya bağın fibroblastlarla kemik oluşumundan önce gelen hyalin kıkırdağa bağlandığı daha sonra kemikleşme başladıkça hyalin kıkırdağın aşındığı, fibroblastlarınsa metaplaziye uğrayarak fibrokartilaj yapı meydana getirdiği, en son olarak da kemikleşmenin tamamlanması ile birlikte metaplazinin de artması ile fibrokartilaj yapının daha fazla arttığı gösterilmiştir.¹⁴ Bahsi geçen metaplazi sinyalininse muhtemelen mekanik yüklenme ve özellikle yüksek düzeyde kompresyon ve/veya kayma güçleri ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.¹⁵



Şekil 1. Fibröz kıkırdakın gelişim diyagramı¹²

Gao ve arkadaşlarının çalışmasına¹⁴ dayalı olarak, sıçan diz eklemi iç yan bağının femoral bağlanma noktasında fibröz kıkırdakın gelişiminin diyagramsal bir temsili verilmiştir. (a) Başlangıçta, tendon veya bağ (F ile karakterize edilen farklılaşmış fibroblastlar) kemik rudimentini takip eden hyalin kıkırdak (HK) ile birleşir. (b) Kemikleşme devam ettikçe, hyalin kıkırdak erozyona uğrar, ancak fibroblastların metaplazisi nedeniyle tendon veya bağda fibröz kıkırdak (FK) ortaya çıkar. (c) Metaplazi muhtemelen tendonun veya bağın bağlantı noktasındaki kemikle (K) olan hareketle ilişkili mekanik uyarılar tarafından sürdürülür. (d) Sonunda, tüm rudimenter kıkırdak çözünür, ancak devam eden metaplazi ile tendon veya bağda daha fazla fibröz kıkırdak oluşur.



Şekil 2. İnsanda triceps brachii kasının olekranın entezi, Masson's trikrom boyası¹²

Tendon, kemiğe (K) yaklaştıkça fibrokartilajinöz hale gelir. Kalsifiye olmayan fibrokartilajın daha geniş bir bölgesi, bir tidemark (T) ile kalsifiye olan daha ince bir bölgeden ayrılır. Bu, kalsifikasyonun dış sınırını temsil eder ve bu nedenle bağlanma noktasının mekanik sınırını oluşturur. Kalsifiye olmayan fibrokartilaj (nFK) bölgesindeki hücrelerin (oklar) paralel kollajen lifler (KO) arasında uzunlamasına sıralandığına ve bu patolojik olmayan örnekte fibrokartilaj bölgelerinde kan damarı bulunmadığı da görülmektedir.

Araştırmacılar entezleri genel olarak doğrudan ve dolaylı bağlanmalar olmak üzere ikiye ayırmıştır.¹¹ Dolaylı ve doğrudan entezler literatürde sırasıyla "periostal-diyafiziyel" ve "kondroapofizyal" ya da "fibröz" ve "fibrokartilajinöz" olarak da adlandırılmıştır.¹⁶ Entezlerin karakteristik özellikleri Tablo-1' de özetlenmiştir. Ancak bu terimler kafa karıştırıcı olabilir. Fibröz entezler "dolaylı" olarak tanımlandığında, bazı yerleşim noktalarında tendonun doğrudan kemikle birleşemediği ve bunun yerine periosteum aracılığıyla dolaylı olarak bağlandığı vurgulanmaktadır. Bu tür "dolaylı" bağlantılar genellikle metafiz yerleşimlerinde bulunur. Ancak bu tanım, fibrokartilajinöz entezlerin de bağlantılarının fibrokartilaj bölgeleri aracılığıyla dolaylı bağlantı olduğu ve dolayısıyla fibröz dokudan "direkt" bağlantılar olmadığı şeklinde anlaşılabileceğinden karışıklığa neden olabilir.¹⁶

Tablo 1. Entezlerin karakteristik özellikleri¹⁶

	Fibröz Entezler	Fibrokartilajinöz Entezler
Yapışma yeri	Uzun kemiklerin metafiz ve diyafiz bölgeleri	Epifiz ve apofiz
İçerik	Perforan mineralize kollojen lifler	4 esas bölge
Yapışma açısı	Açı hareket boyunca hafifçe değişir.	Bağlanma açısı değişiklikleri daha büyük olduğundan aşırı kullanım yaralanmalarına daha yatkındır.
Örnekler	Deltoid kasın humerusa, adduktor magnus kasın femura, pronator teres kasın radiusa yapışma bölgeleri	Aşıl tendonun kalkaneusa, rotator kafın humerusa yapışma bölgeleri

2.1.1. Dolaylı Bağlanmalar – Fibröz Entezler

Fibröz entezler uzun kemiklerin diyafizine bağlanan tendonlarda daha yaygındır ve bağlanma bölgesinde yoğun fibröz bağ doku bulunması ile karakterizedir. Genellikle büyük yüzey alanlarında bulunurlar ve mineralize olmuş kollojen liflerini delen bir yapıya sahiptir.¹⁶ Doğrudan bağlanmalardan farklı olarak, dolaylı bağlanmaların yüzeyel bileşenleri periosteum ile kaynaşır, derin bileşenleri ise kemiğe fibrokartilajın geçiş zone olmadan veya çok az olarak bağlanır. Burada kollajen lifleri kemikle dar bir açı yapar.^{11,16} Fibröz entezler, fibrokartilajinöz entezlere göre muhtelemen aşırı kullanma ilişkili yaralanmalara daha az maruz kalması nedeni ile daha az ilgi çekmiştir.¹⁶

2.1.2. Doğrudan Bağlanmalar – Fibrokartilajinöz Entezler

Fibrokartilajinöz entezler kemik-tendon bileşkesinde fibrokartilaj olması ile karakterizedir ve bu epifizler ve apofizler için tipiktir. Bu entez tipi vücutta fibröz entezlerden daha sık olarak bulunur ve aşırı kullanma ilişkili yaralanmalar daha sık görülür.¹⁶ Bağların ve tendonların lifleri, dört farklı bölgeyle kemiklere tutunurlar.^{11,16} Bu bölgeler Tablo-2’ de özetlenmiştir.

Bölge 1; saf yoğun fibröz bağ doku olarak adlandırılır.¹⁶ Fibroblastlar ve esas olarak tip I kollajenden oluşur.¹¹ Ana yapının lineer sıralanmış tip 1 kollojen olmasının

yanı sıra tip 3 kollojen, elastin ve hücreleri çevreleyen proteoglikan yapı da bulunur.¹⁶ Kollajen liflerine paralel uzanan arterioller ve venüller vardır ancak bu bölgede sinir uçları yoktur.¹¹

Bölge 2; kalsifiye olmamış fibrokartilaj bölgesi olarak adlandırılır.¹⁶ Hücreler bu bölgede büyür, yuvarlaklaşır ve kondrositlere benzerler. Bu bölgedeki hücreler, paralel kollajen lifleri arasına sıralanmıştır. Golgi organeli belirginleşir ve hücre süreçlerinin kısa olduğu izlenir. Çoğu hücrenin, hücrenin etrafında 1-2 mm uzanan bir lakunar bölgede kaldığı görülür. Mikroskobik olarak, bu bölge fibrokartilaj dokuya benzeyen bir görünüme sahiptir.¹¹ Bu bölgede tip 1 kollojenin yanı sıra tip 2 ve tip 3 kollojen de proteoglikanlarla birlikte bulunur. Fibrokartilajınöz entezlerin epifiz ve apofizde bulunması buna karşı fibröz entezlerin metafiz ve diyafizde bulunması mekanik fonksiyon üzerinde insersiyon açısının değişmesi nedeni ile önemli bir etkiye sahiptir. Bu fark humerusa deltoidin yapışması ve supraspinatusun yapışması örneği düşünülerek anlaşılabilir. Omuz abdüksiyonu ile supraspinatus insersiyosunun açısal değişimi deltoid insersiyosundan daha fazla olması nedeni ile aşınma ve yıpranmaya daha açıktır. Bu açısal değişimi kalsifiye olmamış 2. bölge tendonun içindeki kollojen liflerinin bükülmesinden kaynaklanan stresi dağıtır ve amortisör olarak çalışır. İnsersiyon açısının daha değişken olduğu bölgelerde 2. bölgenin miktarının arttığı gösterilmiştir.^{16,17}

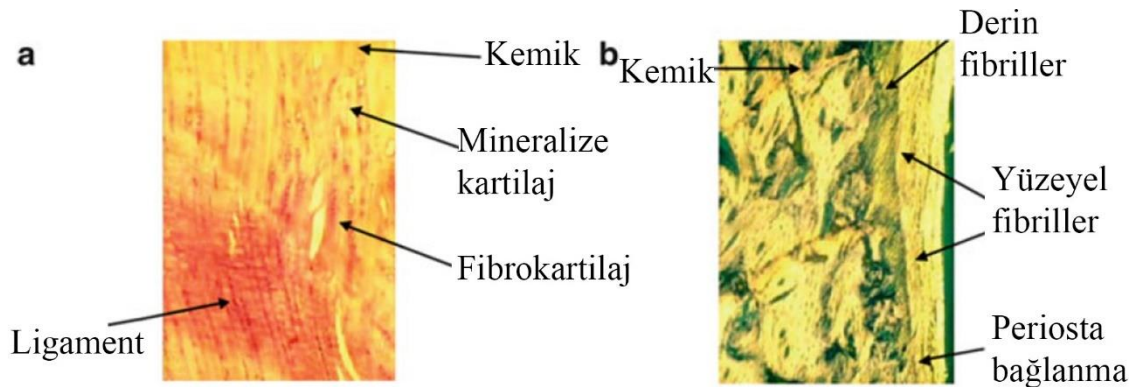
Tidemark bazofilik çizgi halinde kalsifiye ve kalsifiye olmayan fibrokartilaj bölgesini ayırır ve mineralizasyon sürecinde düz bir bölge oluşmasını sağlar ve aynı zamanda eklemin hareketi sırasında yumuşak dokunun hasarlanma riskini düşürür.¹⁶

Bölge 3; kalsifiye fibrokartilaj bölgesi olarak adlandırılır.¹⁶ Tidemark bölgesinden yaklaşık 12 mm uzakta, mineral kristalleri kütleler halinde toplanır ve sayısı artar, böylece tek tek kristaller daha az görünür hale gelir. 3. Bölgenin derin kısımları, kollajen lifleri arasında yoğun mineral birikintileriyle karakterizedir.¹¹

Bölge 4; içeri giren doku kemik matriks kollajen fibrilleri ile birleşerek kemik haline gelir. Bu bölgede osteoklastlar, osteoblastlar ve osteositlerle birlikte tip 1 kollojen bulunur.¹⁶ MCL'nin femura bağlanması, doğrudan bağlanmaya iyi bir örnektir. MCL, iyi tanımlanmış bir fibrokartilaj bölgesi boyunca kortekse akut bir şekilde geçerek ve üstteki periosteuma minimum katkı sağlayarak femoral epifiz alanına eklenir. (Şekil 3)¹¹

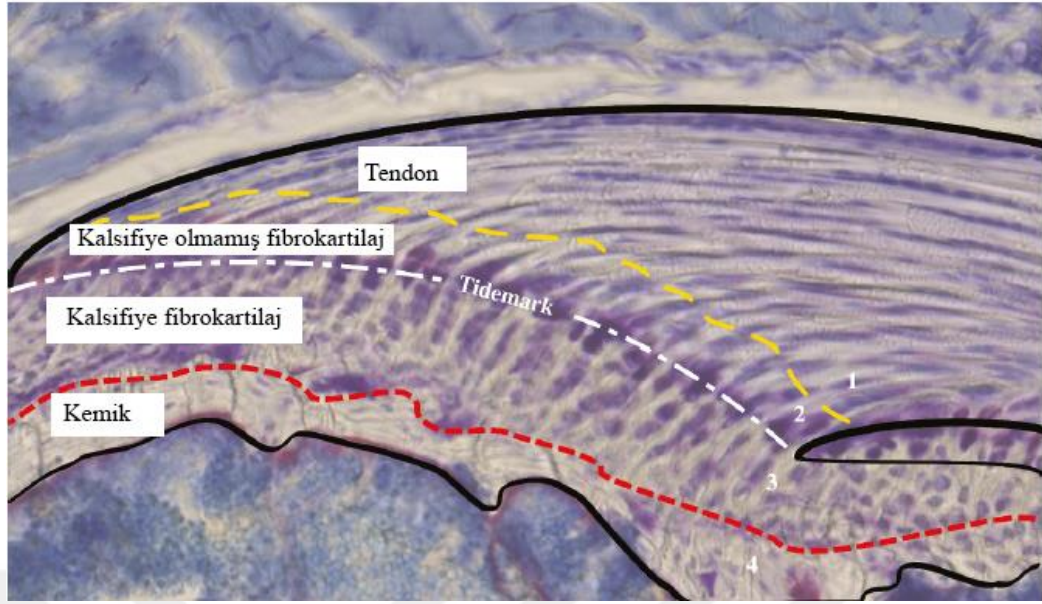
Tablo 2. Fibrokartilajinöz Entezlerin Bölgeleri¹⁶

	İçerik	Önemi
1. Bölge Saf, yoğun fibröz bağ doku	Fibroblastlar Tip 1-3 kollojen	Lineer olarak düzenlenmiş kollojen doku, mekanik özellikleri tendonun orta kısmına benzerdir.
2. Bölge Kalsife olmamış fibrokartilaj bölge	Fibro kondrositler Tip 1-3 kollojenle birlikte proteoglikanlar	Tendon içindeki kollajen liflerinin bükülme kuvvetini dağıtır.
Tidemark		Kalsifiye olmayan ve kalsifiye fibrokartilaj arasındaki bazofilik ayrım, yumuşak ve sert dokular arasındaki sınırı temsil eder.
3. Bölge Kalsifiye fibrokartilaj bölge	Fibro kondrositler Tip 1-2(baskın)-10 kollojen	Kemiklere bağlanmaların düzensizliği, Entezin mekanik bütünlüğünü sağlar.
4. Bölge Kemik	Osteoblastlar Osteoklastlar Osteositler Tip 1 kollojen	Tendon için bağlanma bölgeleri sağlar.



Tavşanda medial yan bağının femoral yapışma yeri olan doğrudan-fibrokartilajinöz bir bağlanmanın (a) ve medial yan bağın tibial yapışma yeri olan dolaylı-fibröz bir bağlanmanın (b) fotomikrograf görüntüsü

Şekil 3. Tavşanda dolaylı ve doğrudan bağlanmaların fotomikrograf görüntüsü



Şekil 4. Fare supraspinatus kasının entezinin dört histolojik bölgesinin gösterimi. Tendon, fibrokartilaj ve kalsifiye fibrokartilajdaki proteoglikanlar mor renkte görülmektedir. Toluidin mavisi ile boyanmıştır.¹⁶

2.2. Kemik-Tendon Bileşkesinin Damar ve Sinir Yapılanması

Tendon ve ligamentlerin bağlanma bölgeleri avaskülerdir, bu bölgelerin beslenmesi eklem kapsülünden gelen kan akımı ile sağlanır. Genellikle, ligamentlerin veya tendonun bağlanma bölgelerinin uç kısmındaki damarlar periosta bağlanır. Bu nedenle kemik yüzeyinde gerçekleşen avülsiyon yaralanmalarında tendon-kemik bileşkesi dış yüzeyindeki kan damarları bozulan başlıca damarlardır.¹¹

Sinir yapılanması, kan akışına benzerdir, çünkü fibrokartilaj bölgesinin her iki tarafını da innerve etmek için fibrokartilaj bölgesini geçen sinirler yoktur. Bunun aksine kemikler, tendonlar ve bağlar, eklem hareketi, pozisyonu ve ivmesini analiz eden önemli uyarıları iletebilecek yoğun sinir yapılarına sahiptir. Sinir uçları, Pacini ve Ruffini reseptörlerinin bağ dokusunda olduğu gösterilmiştir.¹¹ Bu reseptörlerin, fizyolojik olarak “limit tespiti fonksiyonu” işlevine sahip gibi çalıştığı veya ivme algılaması yaparak küçük hareketlerin kontrolü görevini yaptığı gösterilmiştir.¹⁸

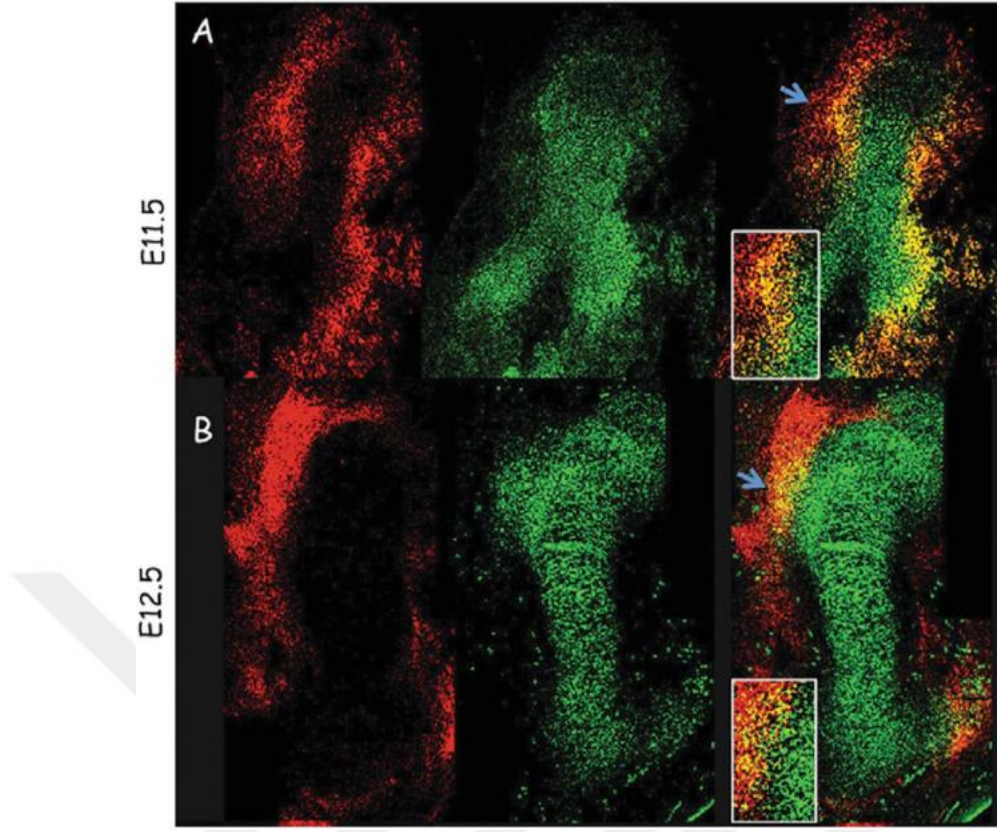
2.3. Tendon-Kemik Birleşim Yerinin Embriyonel Gelişimi

Hareket için kas kasılmasının kemiklere moment kazandırması gerekir ve bu süreç kasların kemiklere tutunduğu bileşke bölgesi sayesinde olur. Bu bileşke bölgesi yapısal

olarak karmaşıktır çünkü birbirinden farklı iki dokunun bütünleştiği bir bölgedir. Kemik sert ve kırılğan bir materyal olmasına rağmen tendon esnek ve dayanıklı bir materyaldir. Bu iki dokunun birleştirilmesi doku ara yüzlerinde stres odakları yaratır ve birleştirme sonrasında başarısızlıklara yol açar. Bu zorluk gelişimsel olarak kademeli farklı doku özelliklerine sahip olunması ve stresi azaltan yapısal ve kompozisyonel geçişlere sahip bir doku özelliğinin gelişmesi ile aşılmıştır.¹⁹

Tendon-kemik bağlantı biriminin gelişimi ve modülerliği konusunda yapılan araştırmalar, tendonların yerleştirildiği kemik çıkıntılarının oluşum mekanizmalarına odaklanmıştır. İskeletin gelişimi, kondrojenitörlerin köken aldığı lateral plak mezoderminin belirlenmesiyle başlar. Farelerde, kondrojenitör farklılaşması 12.5 embriyonel günde tamamlanır ve gelecekteki kemiklerin kıkırdak şablonları oluşur. Bununla birlikte, kemik çıkıntılarının, bu şablon oluşumundan sadece 2 gün sonra ortaya çıktığı belirlenmiştir. Genetik soy deneyleri, kemik çıkıntısının hücresel kökenini sorgulamıştır. Son araştırmalar, kemik çıkıntısı hücrelerinin, ana kıkırdak şablonunu oluşturan kondrositlerin soyundan gelmediğini, ancak önceden var olan şablona eklenen dış bir modül olduğunu göstermiştir. Farelerdeki embriyonel ilk kıkırdak şablonunun yanında, öngörülen kemik çıkıntısı yerlerinde farklılaşmamış hücre alanlarının olduğu göstermiştir.

Kemik çıkıntısının ayrı bir modül olarak gelişimi, moleküler düzeyde de kendini göstermektedir. Gen ifadesi analizleri, kemik bağlantı noktalarında çıkıntı bölgesi progenitörlerinin iskeletle birlikte Sox9 ve skleraksis (Scx) ifade ettiğini göstermiştir. Kemik çıkıntısı kök hücreleri, Sox9 ve Scx genlerini birlikte ifade eder. Bu ifadenin gösterimi Sox9 için antisens komplementer RNA probu (yeşil) ve Scx için antisens komplementer RNA probu (kırmızı) kullanılarak Şekil-5' te yapılmıştır. Mavi oklar, deltoid ve büyük tüberkülün geliştiği bir alana işaret eder; kutu, hem Sox9 hem de Scx'i ifade eden kemik çıkıntısı kök hücrelerinin büyütülmüş görüntüsünü gösterir.²⁰ (Şekil-5) Bu analizler, tendon yerleşim bölgelerindeki hücrelerin Sox9(+) bir soydan geldiğini ve çıkıntı kondrositlerinin Scx(+) bir soydan geldiğini göstermiştir. Sox9, mezodermin hücrelerinin kondrositlere farklılaşmasında temel bir moleküldür. Bu gen, kondrojenesis sırasında tüm kondrojenitörlerde ve kondrositlerde sürekli olarak ifade edilir. Scx, tüm tendon dokularının progenitörleri ve hücreleri tarafından ifade edilen bir bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) transkripsiyon faktörüdür ve bunların farklılaşmasını düzenler.¹⁹

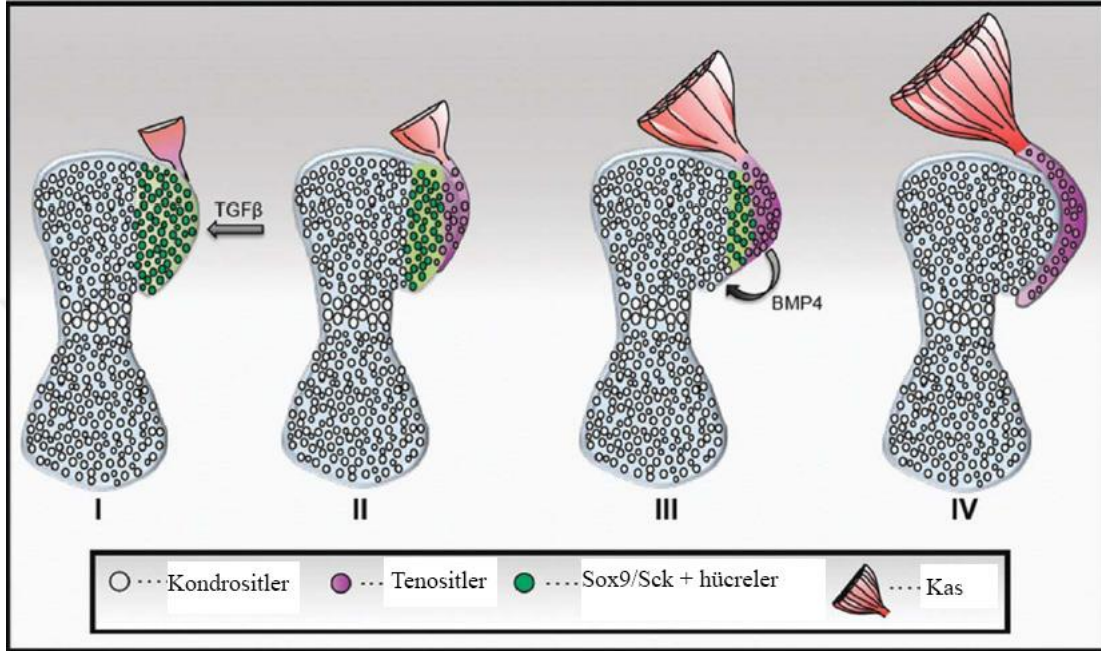


Şekil 5. E11.5 ile E12.5 arasındaki farelerin sagittal humerus kesitlerinde çift floresanlı in situ hibridizasyon kullanılarak yapılan entez yapısının gösterimi²⁰

Tendon bağlantı biriminin ayrı bir modül olarak gelişmesi, birkaç avantaj sunar. Mekanik açıdan, modülerlik, kas-iskelet sisteminin oluşumunu kontrol etmek için bir kontrol noktası sağlar. Bu kontrol noktası, modüler bir bileşen olarak kemik ve bağlanan tendon arasında koordinasyon sağlayabilir ve tüm kemik yapısının oluşumuna müdahale etmeden işlemi sağlamlaştırabilir. Kemik morfogenezinin modüler stratejisi, tüm yapının yeniden şekillendirilmesi yerine modüllerin kolayca eklenip çıkarılmasının evrimsel bir avantajını da içerir.¹⁹

Modülerlik, kemiklerin ve tendonların nasıl bir araya geldiği sorusuna farklı bir bakış açısı sunar. Gelişim sürecinde, kıkırdak ve tendonun bağlantısı önce farklılaşır ve daha sonra birleşerek oluşturulabilir. Bu süreç, tendonun belirli bir noktaya yerleştirilmesi için karmaşık sinyal iletim mekanizmalarını gerektirir. Bir diğer olasılık da her iki dokunun da aynı kök hücre havuzundan geldiği ve sonra tendon veya kıkırdak olarak farklılaşarak ayrıldığıdır. Başlangıçta (I), kemik taslağı farklılaşmış kondrositlerden (gri) oluşur ve birleşme birimi bölgesi Sox9/Scx pozitif progenitörleri içerir (yeşil). Sonrasında

(II ve III), progenitör hücreleri bir taraftan (mor) tenositlere, diğer taraftan (gri) ise kondrositlere yavaşça farklılaşır ve entezi oluşturur (IV). Entez yapısı oluşumu TGF- β sinyalleşmesi tarafından düzenlenmesine rağmen (I), kondrositlere dönüşüm tendon progenitör hücrelerinden BMP4 sinyalleşmesi tarafından düzenlenir.²⁰ (Şekil-6)



Şekil 6. Entez yapısının in situ şematik modeli²⁰

Bu ayırım modeli, fonksiyon kaybı çalışmaları ile de desteklenmiştir. Koşullu knock-out deneyleri tendon-kemik bağlantı ünitesinin kurulabilmesi için Scx(+) hücreler tarafından Sox-9 ifadesi olması gerektiğini göstermiştir. Başka bir öngörü de Scx(+) ve Sox-9(+) öncül hücrelerinin ortak bir havuz oluşturduğu ve hücrelerin tenosit yani tendon öncü hücreleri veya kondrosit yani kıkırdak öncü hücreleri yönünde farklılaşarak havuzun azaldığı öngörüsüdür. Bu öngörü embriyonel 11,5. günde Scx(+) ve Sox-9(+) olan havuzda 13,5. günde tenosit ve kondrositlere farklılaşma sonrasında çift pozitif olan hücrelerin tespit edilememesi ile gösterilmiştir.¹⁹

Bu yeni keşfedilen modülerlik teorisi ile ilişkili entez biriminin gelişimi hakkında hala birçok açık soru bulunmaktadır. Bu kemik çıkıntı bölgelerinin hücre soyu için ek genetik işaretleyicilerin tanımlanması, tendon-kemik arayüzünün hücresel kökeni ve gelişimini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.¹⁹

2.3.1. Entez oluşumu ve yeniden şekillendirilmesini düzenleyen sinyal yolları

Entez progenitörlerinin incelenmesinde, sınırlı sayıda hücrenin yoğun bir dokuda bulunmasından kaynaklı izolasyon zorluklarıyla karşılaşılır. Özel bir işaretleyici bulunmaması, farelerdeki entez progenitörlerinin belirlenmesini ve hedeflenmesini zorlaştırır. Yeni yöntemler, floresanla aktive edilen hücre sıralaması ve mikrodiseksiyon gibi tek hücreli analizlerde ilerleme sağlamaktadır. Bu alandaki ilerlemeler, sadece entezi hedefleyen spesifik işaretleyicilerin geliştirilmesini ve rekombinasyon stratejilerinin güçlendirilmesini sağlayabilir. Bu stratejiler, hedeflenen hücreleri tanımlamayı ve diğer dokuları dışlayarak daha kesin sonuçlar elde etmeyi amaçlamaktadır.

Moleküler mekanizmaların incelenmesi tendonun bağlanacağı kemik çıkıntının bozulduğu zaman ifade edilen mutant genlerin tespiti ile mümkün olmuştur.²¹

2.3.1.1. TGF- β ve BMP Sinyal Yolağı

TGF- β süper ailesi, TGF- β ve BMP gibi proteinleri içerir ve eklem ile tendon gelişimi üzerinde kritik bir etkiye sahiptir. (Şekil-6) Bu sinyallerin Smadlar aracılığıyla iletimi, özellikle TGF β R'lerin tendon rejenerasyonunu etkileyebileceğini göstermektedir. Smad-4 kaybının tendon incelmesine ve eklem sertliğine yol açabileceği belirtilmiştir, bu da BMP sinyalinin tendon büyümesinde önemli olduğunu düşündürmektedir.²² TGF β ve BMP alt aileleri Smadlar aracılığıyla sinyal gönderirken, Smad olmayan yollar da bu süreçte rol oynar.²¹

TGF- β süper ailesinin, Smad olmayan yollar aracılığıyla sinyal iletimine örnek olarak NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B) yolları verilebilir. IKK β (İnhibitor Kappa B Kinase Beta) hedeflenerek yapılan çalışmalar entez olgunlaşması ve yaralanma sonrası iyileşmeyi etkileyebilir. Bu bulgular, immünomodülasyon ile entez gelişimi arasındaki ilişkinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini göstermektedir.^{23,24}

Tgf β R-II' nin devre dışı bırakıldığı çalışmalar, TGF- β yolağının entezde birleşim yeri embriyonel kemik çıkıntı oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir. Hücre kültürü modellerinde TGF- β kondrojenezini tetiklerken in vivo uyluk mezodermi çalışmalarında kondrosit farklılaşması ve parmaklardaki eklemlerin oluşmasında hafif bir etki göstermiştir. Bu etki sadece kemik çıkıntı oluşumunda etkisi olduğu düşünülen bu

molekül dışında bağlantı yerinin modülerliğini kanıtlayan başka hücre havuzları olduğu fikrini de güçlendirmiştir.

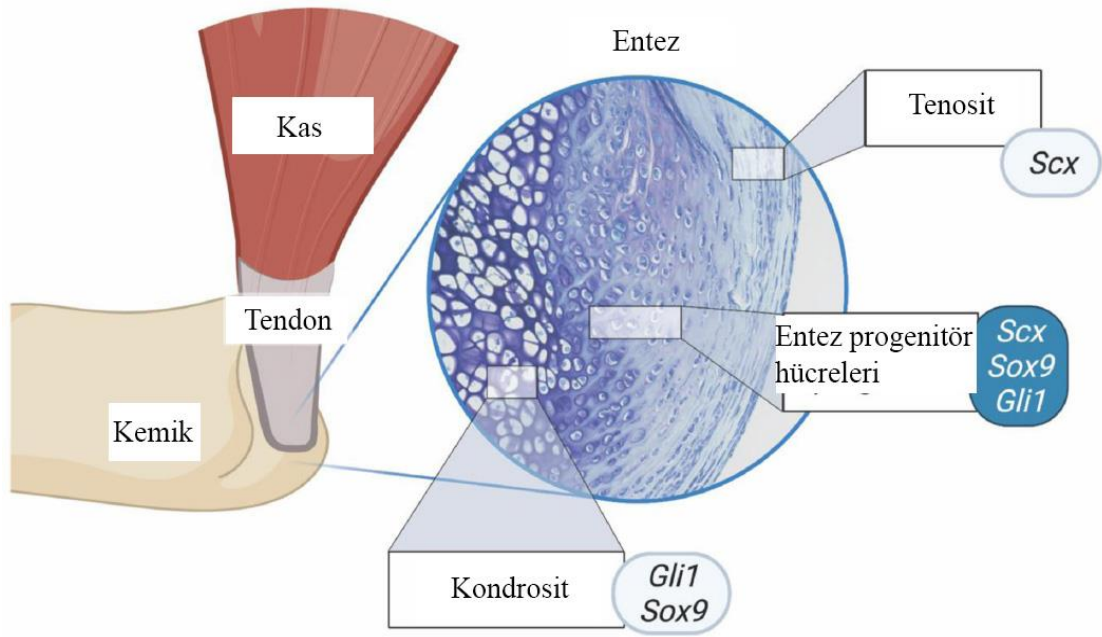
Fare embriyolarında ekstremite mezoderminden Tgf β RII reseptörünün genetik olarak eksikliği veya Tgf β 1 ve Tgf β 2'nin eksikliği, tüm tendon dokusunun kaybına neden olmuştur.²⁵ Bu sebeple, TGF β sinyalinin, hem tendon hem de kemik çıkıntı öncül hücrelerini düzenleyerek, tendon-kemik bağlantı biriminin oluşumundaki önemli bir düzenleyici olduğu düşünülebilir.

Kemik yükseltisi oluşumunda etkili olan diğer bir moleküler mekanizma, BMP-4 sinyal yoludur. Ekstremitte mezodermde BMP-4' ün koşullu olarak devre dışı bırakılması, kemik yükseltisi öncül hücrelerinin kıkırdaklaşmasını engellemiştir.²⁶ Aynı bir araştırma, BMP-4 ifadesinin Scx tarafından düzenlenen tendon-kıkırdak birleşiminde, kemik yükseltisi oluşumunu tetiklediğini göstermiştir.²⁶ Her iki çalışma da SCX/BMP4 yolunun, kemik yükseltisi ile tendon-kemik bağlantı birimi gelişimi arasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Tendon bağlantı birimi oluşumunda rol oynayan moleküler mekanizmalarla ilgili birçok ucu açık soru bulunmaktadır. BMP-4 eksikliği olan ekstremite bölgelerinde tüm kemik yükseltilerinin kaybolmaması, diğer BMP türlerinin farklı aşamalarda bağlantı birimi oluşumunu düzenleyebileceği ihtimalini düşündürmektedir. Bu kapsamda etkili olabilecek adaylar arasında BMP-2 ve BMP-7 bulunmaktadır. Ekstremitte mezoderminden bu reseptörlerin, örneğin deltoid tüberosit gibi yükseltilerden yoksun humerus oluşumuna yol açtığı gözlemlenmiştir.²⁷

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, izometrik ölçeklendirmenin kemikler boyunca kümülatif üst yapı ilerlemesini en aza indiren genel bir mekanizmayı tanımladı.²⁸ Bu ölçeklendirme bir nesnenin boyutlarının değiştirilmesiyle birlikte orantılarının korunduğu bir ölçekleme türüdür. Üst yapılar, Scx ve Sox-9 ifade eden farklı bir hücre havuzundan modüler şekilde oluşur ve bu üst yapılar omurgalıların uzuvlarında embriyonik ve postnatal büyüme sırasında entez ve kas gelişimini güvenilir fenotipik göstergeler olarak sunar.^{20,26} Üst yapıların genel düzenlenmesi, Gli3 (GLI-Krüppel ailesinin üyesi 3), TGF- β , BMP-4 ve pre-B hücre lösemi transkripsiyon faktörü gibi birçok faktör tarafından düzenlenir.^{26,29} Üst yapı öncül hücreleri, ya kondrositlere ya da fibroblastlara farklılaşırlar^{20,29,30} ve bu iki hücre karışımı Krüppel benzeri (KLF) transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir³¹. Sox9+/Scx+ hücreleri, entezde bulunan ve hem kondrositler hem de

tenositler arasında sıkışmış olarak tanımlanmıştır. Bu hücreler, 'iki kaderli' olarak adlandırılmıştır çünkü kondrojenik ve tenojenik genlerin karışık bir transkriptomunu ifade ederler.³¹ Bu ortak transkriptomin varlığı, entez öncülerinin hem kondrositlerle hem de tenositlerle ortak düzenleyici unsurlara sahip olabileceğini gösterir. (Şekil-7) Bu ortak düzenleyici unsurlar, örneğin KLF gibi belirli proteinler, entez hücrelerinde ifadeyi tetikleyen artırıcı unsurlar olarak hareket edebilir.²¹



Şekil 7. Entezin “iki-kaderli” progenitör hücrelerden oluşması²¹

2.3.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Sinyal Yolu

FGF ligandları, yüksek afiniteye sahip protein tirozin kinaz reseptörlerini (FGFR'ler) aktive eden ve onlarla etkileşen salgı sinyal proteinleridir. Kemik büyümesi endokondral ossifikasyon süreciyle gerçekleşir ve bu süreçte FGF ligandları ile FGFR'lerin aktivasyonu büyük önem taşır. FGFR aktivasyonu, uzun kemiklerin büyüme plağında farklı hücre grupları arasında değişen seviyelerde ifade edilir. Özellikle FGFR-3 sinyali, kemik büyümesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar.³² Bununla birlikte, entez birimi gelişiminde etkili olabilecek diğer moleküller arasında bulunan hem FGF-1 hem de FGF-2'nin inaktivasyonu ile yapılan çalışmalar iskelet anormalliklerine yol açmıştır.³³ Kemik gelişiminde FGF ligandları ve reseptörlerinin deseni belirgindir ancak entezdeki sinyal desenleri daha yeni anlaşılmaktadır.²¹ Fareler üzerinde yapılan

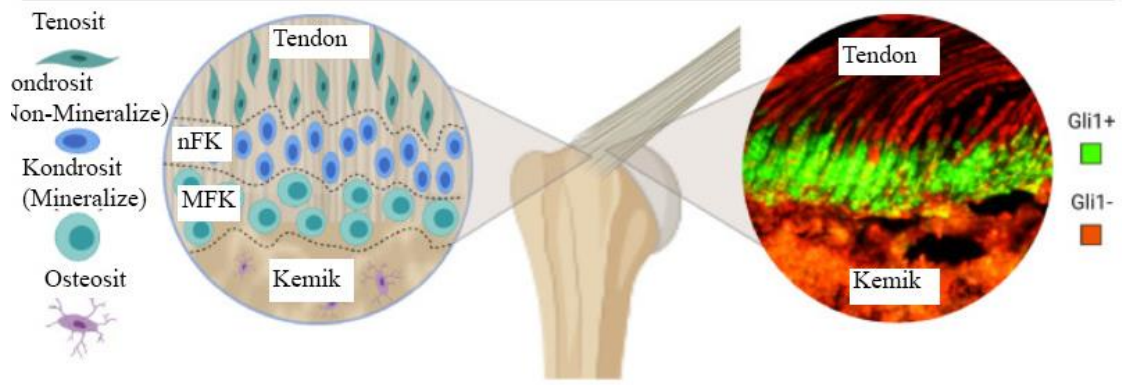
alışmalar, olgun entez fibrokartilajında belirli reseptör ifadelerinin varlığını ortaya koymakta ve bu durumun entezopatiye yatkınlığı temsil edebileceğini göstermektedir.³²

Entez, postnatal döneme kadar değişmeyen bir progenitor havuzuna sahiptir ve dinamik bir yapı gösterir. Burada fibroblastlar, kondrositler ve fibrokondrositler matris sentezi üzerinde etkilidir. Bu hücreler, büyüme plağından farklılık gösterir ve belirgin bir şekilde ayrılır. Gelişmekte olan entezde, FGF sinyalinin kemik oluşumunun farklılıklarında önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Kraniofasial ve eklem kemiklerinin oluşumu, farklı hücre kaynaklarından gelir ve bu süreçte FGF sinyalinin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular, entez gelişiminde özellikle FGF sinyalinin belirleyici bir faktör olabileceğini vurgular.²¹

2.3.1.2. Hedgehog Sinyal Yolu

Endokondral kemik oluşumu sırasında mineralizasyon süreçleri, hedgehog (Hh) sinyali tarafından düzenlenir ve büyüme plağındaki kondrosit olgunlaşmasını Paratiroid Hormonla İlişkili Protein (PTHrP) ile negatif bir geri bildirim döngüsü aracılığıyla kontrol eder. Benzer süreçler postnatal entezde de tekrarlanır.²¹

Sonic Hedgehog (SHH) sinyal yolunda Hh ligandı, reseptörlerinden biri olan PTCH-1 reseptörüne bağlanır ve bir takım hücre içi proteinlerle sinyal yolu devam eder. Hücre içinde Gli-1, Gli-2, Gli-3 proteinlerinin sentezi ile birlikte yolağın aktivasyon ve deaktivasyonu düzenlenir. Hem Sox-9 (+) hem Scx (+) olan progenitor hücrelerin anatomik lokalizasyona bağlı olarak, yani kırıkta kalan progenitorların sadece Sox-9 (+) progenitorlara dönüşmesi sonrasında SHH sinyal yolu aktive edilerek Sox-9 (+) hücreler Gli-1 proteini ile işaretlenir ve Gli-1 (+) hücrelere dönüşürler.²¹ Gli-1(+) hücreler entez gelişimi sürecinde sayıları artar ve mineralize olmuş fibrokartilaj bölgelerinden mineralize olmamış fibrokartilaj bölgelerine doğru göç ederler.³⁴ Bu hücreler postnatal gelişim sırasında korunur ancak iskelet oluşumu tamamlandıktan sonra kaybolurlar. Gli-1 (+) hücrelerin deaktiv edilerek entez gelişimi yapılan çalışmalarda mineralize fibrokartilaj bölgesinin kaybolduğu gösterilmiştir.³⁵ SHH sinyal yolağının durdurulması da aynı şekilde, mineralize fibrokartilaj bölgesinin neredeyse tamamen kaybına yol açar.²¹



Şekil 8. Gli-1 (+) hücrelerin sayısının artışı ve mineralizasyon bölgesinde birikimi³⁴

2.4. Tendon-Kemik Birleşim Yeri İyileşmesinin Biyolojisi

Tendon-kemik iyileşmesi, kıkırdaklı entezin düzenli gelişiminden farklı olarak fibrovasküler skar dokusu oluşumu ile gerçekleşir. Araştırmalar, entezin gelişiminin anlaşılmasının, iyileşme sürecini anlamak için önemli olduğunu ve biyolojik ve mekanik faktörlerin entezin uygun gelişimi için kritik olduğunu vurgular.¹⁶ Entez bölgesinde iyileşmede önemli bir rolü olan kollojen liflerinin varlığı tespit edilmiş ancak bunun normal entez dokusundan ne kadar farklı olduğu henüz aydınlatılamamıştır.³⁶ Doğal yerleşim yerinin yeniden oluşturulmasının zorluğu, mekanik yük, mineral birikimi ve kolajen liflerinin oluşumu gibi faktörlerin etkisiyle tendon-kemik entezin doğal gelişiminin iyileşme sürecinde eksik kaldığını göstermektedir.¹⁶ Fibrovasküler skar dokusu, doğal tendon-kemik entezden daha zayıf ve başarısız olma eğilimindedir. Şu anda, tendon-kemik entezin doğal iyileşme süreci hakkında yeterli bilgiye sahip olunmamış olması, etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Thomopoulos'un yaptığı bir çalışma, iyileşme sitelerinde fazla skar oluşumu ve fibrokartilaj eksikliği rapor etmiştir.¹⁶

Fibrovasküler skar dokusunun oluşumu, belirli aşamalardan geçer: inflamasyon (0-7 gün), tamir (5-14 gün) ve yeniden şekillenme (>14 gün). İlk aşama, trombositlerin fibrin ve fibronektini biriktirmesiyle başlar; bunun sonucunda ise insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) gibi unsurların etkisiyle makrofajlar bir araya gelir.

TGF- β 'nin üç farklı formu bulunur; TGF- β 1 ve TGF- β 3 ise tendon-kemik eklem yerlerindeki iyileşme sürecinde kritik rol oynar. TGF- β 1, yetişkin yara iyileşmesinin her

evresinde bulunur ve hücre göçüyle anjiyogenez ile ilişkilendirilir. Diğer yandan, TGF- β 3 yetişkin eklem kıkırdağında ve skarsız fetal yara iyileşmesinde ortaya çıkar.

Tamir aşamasına geçiş, makrofajların TGF- β 1 salgılamasıyla başlar. Bu durum fibroblastik çoğalma ve skar dokusunun oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan skar dokusu genellikle tip III kollajenle şekillenir ve ekstraselüler matriksin dönüşümü, matriks metalloproteinazları aracılığıyla gerçekleşir.¹⁶

Fibroblast çoğalması, yedinci günden itibaren artmaya başlar ve onuncu gün zirve yapar, aynı dönemde kapiller proliferasyon üçüncü günden itibaren başlar ve yedinci günde doruğa ulaşır. Bu süreçte, yedinci ile onuncu gün arasında osteoblast ve osteoklast üretimi artış gösterir. Tip 1 ve Tip 3 kollajen üretimi onuncu gün zirve yapar ve dördüncü haftada istikrarlı bir seviyeye ulaşır. Onuncu gün, tendon-kemik iyileşmesinde kritik bir dönem olarak kabul edilir. Olgun tendon ve entez bölgesinde yoğunluklu olarak Tip 1 kollajen bulunur. Tip 3 kollajen genellikle ciltle ilişkilendirilir ve ligaman iyileşmesinde, hasarlı veya dejeneratif tendonlarda bulunabilir. Erken iyileşme sürecinde Tip 3 kollajenin varlığı, sonraki iyileşme ve olgun kollajen birikimi için önemli bir belirteç olarak kabul edilir.^{37,38}

Tendon ile kemik birleşkesinde, ilk iki hafta içinde hipertrofik kondroid hücreler belirgin hale gelir, erken fibroblastik büyüme görülür ve iyileşme dokusu oluşur. Bu dokular, tendon ile lamellar kemik arasında erken zamanda görülen bir köprü oluşturur. Zamanla, içerdikleri kollajen liflerinin sayısı ve düzeni artar. Kemikteki osteoblast sayısı artar ve iyileşme dokusu yakınlarında kemiğin yeniden oluştuğu görülür. İkinci hafta, iyileşme dokusundan kemik dokusuna doğru uzanan kollajen lifleri gözlemlenebilir. Dördüncü haftada, kondrositlerin toplandığı ve yoğunlaştığı görülür ve mineralizasyon süreciyle bir "tidemark" çizgisi belirir. Altıncı haftada, iyileşme dokusu ile kemik arasında köprü benzeri görevi olan lifler tam manasıyla gelişir ve entez bölgesinde yoğun bir şekilde bulunur. Kondrosit hücrelerinin düzenli hizalanması 24. haftada son bulur, fakat bu aşamada proteoglikan içeriği hala normal entez dokusundan daha düşüktür ve kollajen düzenlemesinin yaklaşık %70'i tamamlanır. Yumuşak doku ile kemik arasındaki yeniden yapılanmanın olması amacıyla yeni bir kemik dokusunun oluşumu anahtar bir rol oynar, çünkü bu yeni oluşan doku tendon kökenli kollajen liflerini birbirine tutturur. Bu amaçla, entezin iyileşmesi endokondral iyileşme ile iç içedir. Ön çapraz bağ ile ilgili yapılan çalışmalarda, greftin iyileşmesinin entez iyileşme arayüzündeki oluşacak yeni

kemik bölgeye bağlı olduğu ve bu sürecin endokondral ossifikasyonla benzerlik gösterdiği bulunmuştur.³⁹

Çeşitli araştırmalar, tendon-kemik birleşim yerinin karmaşık yapısını göstermiştir. İyileşme sürecinde, kemikle ilişkili sharpey benzeri liflerle birlikte fibrovasküler yara dokusu oluşur. Ancak, bu dokunun yapı ve biyomekanik özellikleri doğal entez yerindeki kadar güçlü değildir.³⁶

2.5. Hipoksi

Entez fizyolojik olarak hipoksik bir ortamla çevrelenmiştir. Ayak bileği tendonunun kan akışı üzerine yapılan çalışmalar, bu belirli bölgede çok az arteriol olduğunu ve dolayısıyla entezin doğal olarak hipoksik bir ortamla çevrili olduğunu göstermektedir.⁴⁰ Posterior tibial tendon ve tibialis anterior tendon üzerinde yapılan araştırmalar da benzer sonuçlar ortaya koymuştur.^{41,42} Bu nedenle, entez kompleksi, kanlanması az olan ve fizyolojik olarak hipoksik koşullara adapte olmuş bir bölgedir.⁴³

Entezin fibrokartilaj bölgesindeki temel hücre tipi kondrositlerdir. Bu nedenle, bu özel anatomik yapının tekrar oluşturulması için kondrojenez önemli bir süreçtir. Kondrositler normalde avasküler ve düşük oksijenli bir ortamda bulunurlar ve çevrelerindeki ekstraselüler matriksteki oksijen ve glukoz seviyelerini algılayarak hücrel metabolizmayı düzenleyebilirler. Bu durum, kondrositlerin sınırlı besin ve düşük oksijen seviyelerinde bile yaşayabilmesini sağlar. Kondrojenez üzerine yapılan çalışmalar, öncül hücrelerin kıkırdak tamir dokusunun daha derin, düşük oksijenli bölgelerinde kolajen tip II mRNA'sının arttığını ve büyüme faktörleri tarafından hipoksi uyarıcı faktör-1 α (HIF-1 α) aktivitesinin artırılması için uyarıldığını göstermiştir.⁴³ Ayrıca hipoksik uygulamadan sonra artmış kolajen tip II mRNA'sı gösterilmiştir ve omurilik disklerindeki fibrokartilaj dokusunda hipoksik koşulların fibrokartilaj oluşumunda temel bir rolü olduğu gösterilmiştir.^{44,45}

Hem kondrojenez hem de anjiyogenez, hücredeki hipoksinin etkilerini düzenleyen temel faktör olan HIF'in aktivasyonundan etkilenir.⁴⁶ HIF, hücre içindeki süreçleri kontrol ederek, özellikle de oksijen seviyeleri düştüğünde etkinleşir. Bu durumda, bazı genlerin faaliyeti artar ve bunlar arasında özellikle kan damarlarının oluşumunu teşvik eden genler de bulunur. HIF'in etkinleşmesi, bir dizi proteinin etkileşimi ve

düzenlenmesiyle gerçekleşir. Yukarıdaki durum sadece oksijenli koşullarda meydana gelirken, hipoksik koşullarda oksijen, HIF etkisini inhibe eder.⁴⁷

Hipoksi aynı zamanda mitokondride elektron taşıma zincirinin inhibisyonu nedeniyle süksinat birikimine neden olur. Süksinat birikimi, HIF işlevini daha da inhibe eder. Hipoksik koşullar kararlı hale geldiğinde, HIF-1, düşük oksijen koşullarında hayatta kalımı teşvik etmek için birkaç geni aktive eder; bunlar arasında anjiyogenezin teşvik edilmesine katkıda bulunabilecek olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) geni de bulunur. Özetle, vücut, düşük oksijen seviyelerinde belirli genlerin aktivitesini artırarak hücrelerin hayatta kalmasını destekleyici düzenlemeler yapar.⁴³

Hematomlar, içerdikleri eritrositlerin kaybıyla oksijen transferini engelleyerek hipoksik bir ortam oluşturması nedeniyle çok uygun bir model olarak görülmüştür.⁴⁸ Bu ortamda, hematoma içinde bulunan bazı faktörler (TGF- β ve PDGF gibi), kemik mezenkimal kök hücrelerinin hareketliliğini ve kondrojenezini destekleyen sitokinlerdir.^{49,50} Araştırmalar, bu faktörlerin hipoksik ortamda bu hücrelerin yaşamasına ve özelleşmesine yardımcı olduğunu gösteriyor. Özellikle, mezenkimal kök hücreleri hipoksik bir ortamda yaşayabilir ve özelleşebilirler. Bu durum, hematoma sadece hipoksik bir ortam oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda bu hücrelerin çok yönlü özelleşme yeteneklerini korumasına da yardımcı olduğunu gösteriyor.^{51,52}

Yetişkin tendonunda, hipervaskülerite muhtemelen patoloji ilerlemesine ve matris bozunumuna yol açan bir "durum geçişi" oluşturur. Ancak entezin ve genel olarak tendonun gelişimi sırasında nasıl ve ne şekilde vaskülarize olduğunu ve tendonun ve entezin vasküler yapısının, yaralanmayı takiben iyileşme yeteneğini nasıl etkilediğini tam olarak anlayamamıştır. Laboratuvar çalışmaları, düşük oksijenin tendon hücrelerinin farklılaşmasını teşvik edebileceğini ve aynı zamanda tendon kasılmasını sınırlandırabileceğini göstermiştir. Bu durum, normal oksijen seviyelerinin, aslında patolojik bir durumu taklit edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, düşük oksijenin, tendon hücrelerinde farklı fenotiplere yol açabileceği ve bu durumun hücresel mekanizmalarla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, tendon-kemik bağlantısının gelişiminde oksijenlenme ve kan damarlarının rolü henüz tam olarak anlayamamıştır.²¹

Memelilerin embriyonik ortamı genellikle kardiyovasküler sistem oluşmadan önce hipoksik bir yapıdadır.⁵³ Hücreler, hipoksik stres altında HIF1 α adlı faktörün stabilitesine bağlı olarak hayatta kalabilirler.¹⁴¹ HIF1 α aktive olduğunda, oksijen

tüketimi ve hücre çoğalması azalırken, kollajen üretimi artar.⁵³⁻⁵⁵ Araştırmalar, fetal büyüme plağının oksijen seviyelerinde bir tür derecelendirme oluşturduğunu ve bu plağın gelişiminin HIF-1 α faktörüne bağlı olduğunu gösterdi.⁵⁴⁻⁵⁷ Bu hipoksik büyüme plakasında, yükselen HIF1 α seviyeleri, hücrelerin hayatta kalımını destekleyerek mitokondriyal solunumu ve oksijen tüketimini azaltır.⁵⁸ Benzer şekilde, entezde de kan damarları bulunmaz.⁵⁹ Bu nedenle, entezin gelişimi sırasında oksijen seviyelerinde bir derecelendirme olması, kollajen üretimi ile metabolik ihtiyaçlar arasında önemli bir ilişki olabilir.²¹

Özetle, hipoksiye karşı yeni tedavi yaklaşımları, gelecekteki entez iyileşmesi çalışmalarına yol gösterebilir. Operasyonel yenilikler ve HIF'e odaklı ilaçlar, hipoksik bir ortamı devam ettirerek tedavinin faydalarını kanıtlayabilir. Bu değerlendirmeye dayanarak, hipoksiye bağlı kemik ve damar oluşumu, entezin daha iyi bir şekilde yeniden yapılanmasına katkıda bulunabilir.⁴³

2.5.1. Aralıklı Hipoksi

Biyolojik çevre, kemik hücrelerinin kaderini progenitör hücrelerin farklılaşarak çoğalmasıyla ve olgun kemik hücrelerini aktive ederek etkiler. Aralıklı hipoksinin birçok farklı doku üzerine etkileri gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak; kalp, beyin ve iskelet kasında anti oksidasyonu arttırıp ısı şok proteinlerini indükleyip iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruması örnek verilebilir.⁶⁰⁻⁶⁵ Diyabetik farelerin böbreklerini ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan farelerin karaciğerlerini koruduğu, kemik defektinin iyileşmesini teşvik ettiği, sıçanlarda kemik mineral yoğunluğu üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir.⁶⁶⁻⁶⁹ Aralıklı hipoksinin etkinliği, düşük oksijen seviyelerinin hücresel faydalara yol açacak kadar düşük, ancak istenmeyen etkileri önleyecek kadar yeterli olmasıyla ilişkilidir. Son veriler, kısa süreli orta düzeyde hipoksinin en olumlu sonuçları sağladığını göstermektedir.⁷⁰

Literatürde farklı şekillerde aralıklı hipoksi uygulaması yapıldığını görebiliyoruz. Haftanın 6 günü, günde 60 döngü olacak şekilde 20 saniye %5, 40 saniye %21 oksijen seviyesi uygulamasının farelerde kemik mineral dansitesini değiştirmediği gösterilmiştir.⁷¹ Azot gazı kullanılarak oksijen seviyesinin %5'e düşürüldüğü ardından oksijen gazı kullanılarak tekrar %21 oksijen seviyesinin yakalandığı böylece bu döngünün saatte 5.6 kez günde 10.5 saat toplamda 32 gün boyunca uygulandığı başka bir

çalışmada obstrüktif uyku apne sendromu modellemesi yapılarak aralıklı hipoksinin kemik iliği mikroçevresinde vasküler yeniden oluşumu indüklediğini ve bunun hematopoezi, eritropoezi artırarak dolaşımdaki monositleri artırdığını gösterilmiştir.⁷² Oksijen seviyesinin %8'e yine azot gazı ile düşürülüp ardından tekrar normal seviye olan %21'e çekildiği ve bu siklusun saatte 30 kere, günde 8 saat, toplamda 4 ve 6 hafta olacak şekilde uygulandığı başka bir çalışmada kemikte oluşan aralıklı hipoksiye bağlı metabolik bozuklukların tedavisi üzerine yoğunlaştırılmıştır.⁷³ Aralıksız 6 saat boyunca %10-%11 seviyesinde düşük oksijen seviyesi uygulanarak kalan gün sürelerinde normal oda havasında takip edilen ratlarda kırık iyileşmesi modeli uygulandığında aralıklı hipoksinin kırık iyileşmesini hızlandırdığı da başka bir çalışmada gösterilmiştir.⁶⁰ Yine başka çalışmalarda ise aralıklı hipoksi uygulamasının bir hipoksi odasında iç gazların oda havası ile hipoksik bir gaz karışımı (1% O₂, 5% CO₂ ve 94% N₂) arasında her 10 dakikada bir 10 kez değiştirilerek uygulandığı⁷⁴, dakikada 20 döngü halinde olacak şekilde aralıklı hipoksiye en düşük seviye %4 oksijen, en yüksek seviye %21 oksijen ve toplamda 3 hafta boyunca maruz bırakılarak uygulandığı belirtiliyor.⁷⁵ Ülkemizden yapılan başka bir çalışmada ise aralıklı hipoksi uygulaması düşük basınç ortamı yaratılarak haftada 5 gün, günde 5 kez, toplamda 5 hafta boyunca yapılmıştır.⁶⁶ Günde 2 kez, birer saat %10 oksijen seviyesi uygulanarak yapılan başka bir aralıklı hipoksi modelinde ise osteopenik fareler üzerinde bu etki araştırılmıştır.⁷⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; “Bilimsel Araştırma Projeleri” kapsamında Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınması sonrasında, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM)’nde gerçekleştirildi.

Denek sayıları, çalışmaya öncesinde istatistiksel analiz sonrasında hesaplanan örneklem hesabına göre belirlendi.

Çalışmanın denekleri ortalama 300-500 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi 64 erişkin dişi rat olarak seçildi. Deney hayvanları, kontrol ve deney grubu olarak 2 ana gruba ayrıldı. Kontrol ve deney grupları biyomekanik ve histolojik analiz için iki alt gruba ayrıldı.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Hayvan Gruplarının Özet Tablosu

Gruplar	Denek Sayısı	Açıklama
1.Grup	12	Kontrol grubu (oda havasında takip edilen) histolojik değerlendirme grubu
2.Grup	12	Kontrol grubu (oda havasında takip edilen) biyomekanik değerlendirme grubu
3.Grup	12	Deney grubu (aralıklı hipoksiye maruz bırakılan) histolojik değerlendirme grubu
4.Grup	12	Deney grubu (aralıklı hipoksiye maruz bırakılan) biyomekanik değerlendirme grubu

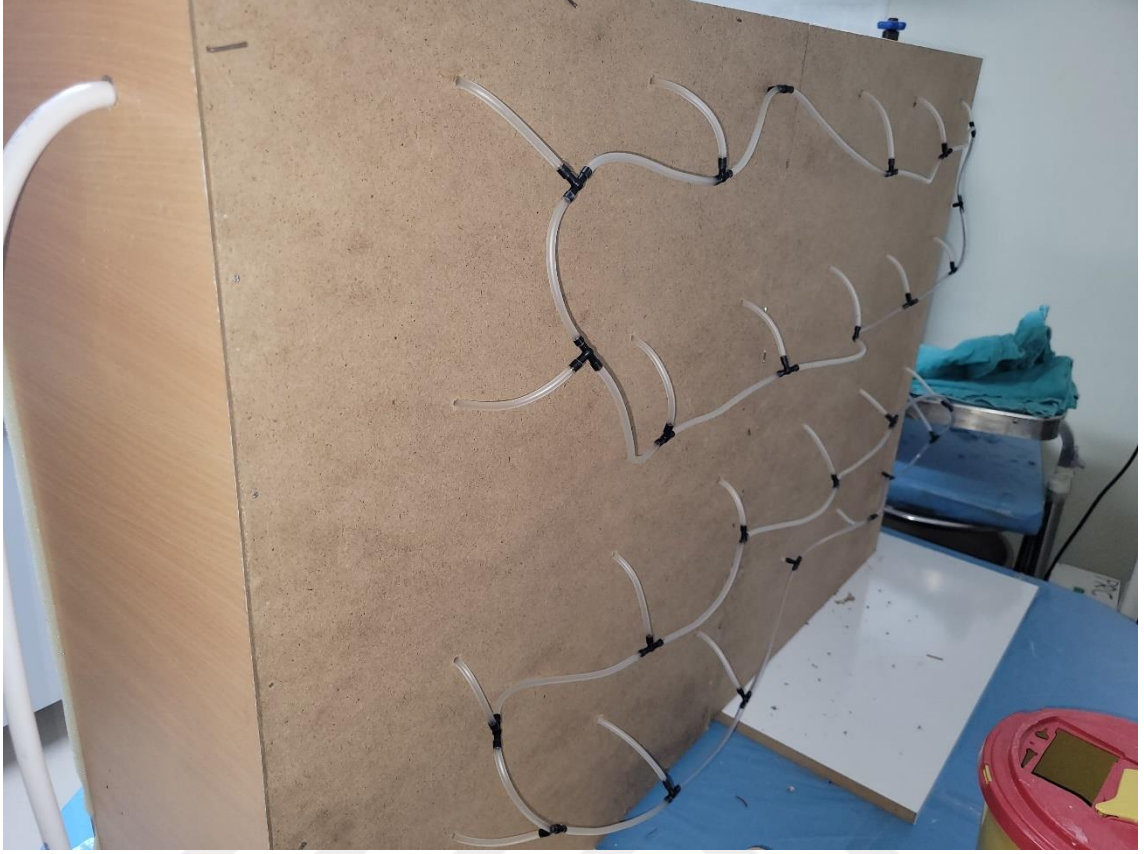
Tüm ratlar her kafeste dörder rat olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Tüm ratlar aynı odada rutin oda sıcaklığı ve rutin beslenme programı (palet yem ve musluk suyu) ile takip edili. Ancak deney grubundaki hayvanlar sadece hipoksiye maruziyetleri sırasında su ve yem kısıtlanmasına maruz kaldı. Ratların kafes bakımları ve gözlemleri günlük olarak ilgili personel tarafından gerçekleştirildi.

Normobarik aralıklı hipoksi uygulaması el yapımı 24 ayrı bölmesi olan, her bölmenin kafesin arka tarafından birbirine plastik hava boruları ile bağlandığı el yapımı,

hava sızdırmaz bir kafes aracılığı ile uygulandı. Oksijen ölçümleri, Maxtec (MaxO2 ME, Amerika) cihazı yardımıyla gerçekleştirildi. Ölçüm probu deney öncesi her bölmede hipoksinin eşit olarak sağlandığını test etmek amacıyla kafesin içine cihaz dışarıda bırakılarak yerleştirildi, ölçümler okundu. Hipoksi uygulaması N₂ gazı manuel verilerek sağlandı. 15 dakikalık aralıklarla kafes içindeki oksijen seviyesi ölçüldü ve kayıt altına alındı. Çalışmada sağlanan oksijen yüzde seviyeleri ortalama %10.5 olarak ölçüldü. Kafes boyutu çok büyük olmadığından bu oksijen seviyesine ulaşmak yaklaşık 3-4 dakika sürdü. Bu uygulama deney grubunda haftanın 5 günü, günde 5 saat olmak üzere uygulandı.



Şekil 9. Normobarik aralıklı hipoksinin uygulandığı el yapımı kafes (önden görünüm)



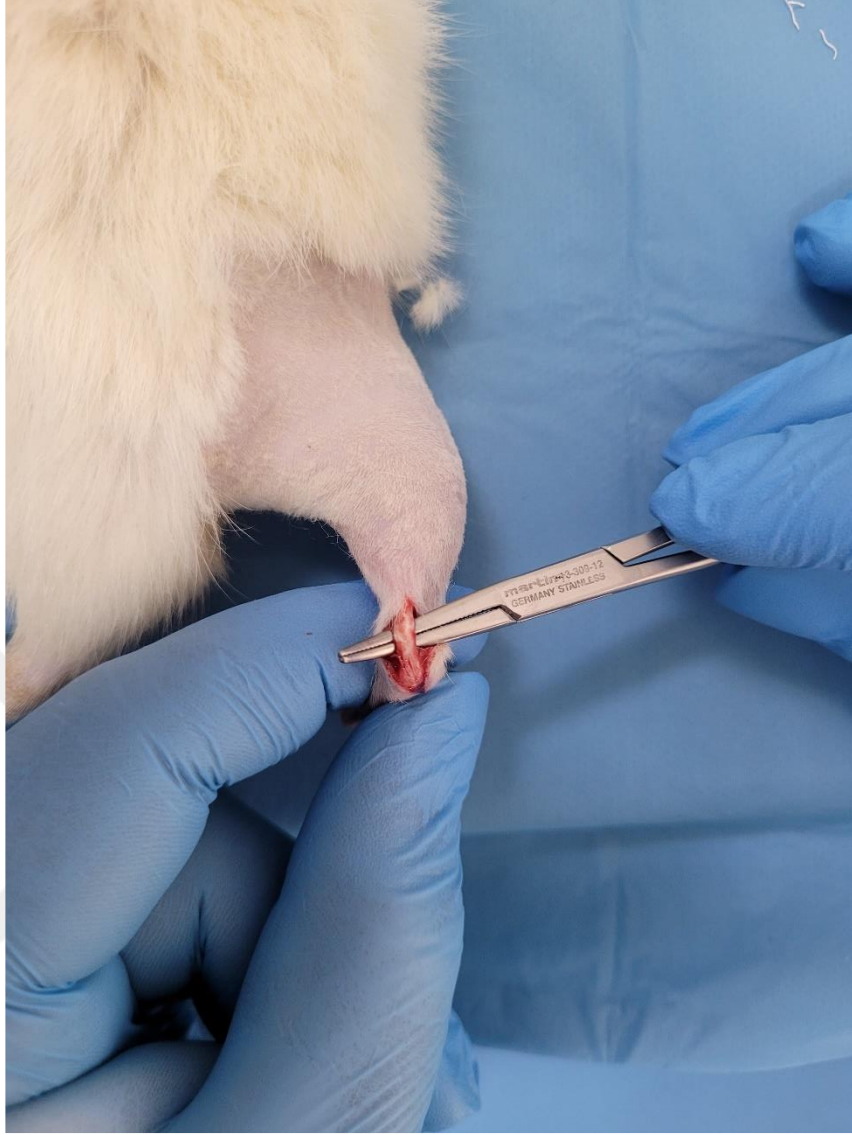
Şekil 10. Normobarik aralıklı hipoksinin uygulandığı el yapımı kafes (arkadan görünüm) , bölmeler arası gaz geçişini sağlayan plastik borular görülmekte

3.1. Uygulanan Cerrahi İşlemler ve Teknik

Tüm ratlar cerrahi öncesinde tartılarak her biri için ayrı ayrı anestezi ilaç dozu hesaplandı. Ketamin hidroklorür (50 mg/kg, intraperitoneal, Ketazol® %10, Richter Pharma AG, Wels-Avusturya) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg, intraperitoneal, Basilazin® %2, Bavet İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. İstanbul) aynı enjektör içinde hazırlanarak ratların sol kasık bölgesinden intraperitoneal olarak verildi. Cerrahi örtüm yapıldıktan sonra aşil tendonu palpe edildi ve tendon boyunca longitudinal insizyon yapıldı. Aşil tendonu kalkaneusa yapışma yerine kadar diseke edildi. Plantaris tendonu görüldü ve korundu. Aşil tendonu, kalkaneusa yapışma yerinden 11 numara bistüri ile kesildi. Ardından kalkaneusa motor yardımıyla tünel açıldı. Aşil tendonuna 3-0 polipropilen (Prolene®, Ethicon, Johnson&Johnson) ile modifiye kessler yöntemi kullanılarak iğne atıldıktan sonra iğneler tünelden geçirildi ve kalkaneus plantar bölgesine pullout yöntemi kullanılarak tespit edildi. Cilt 3-0 polipropilen (Prolene®, Ethicon, Johnson&Johnson) ile iğne edildi.



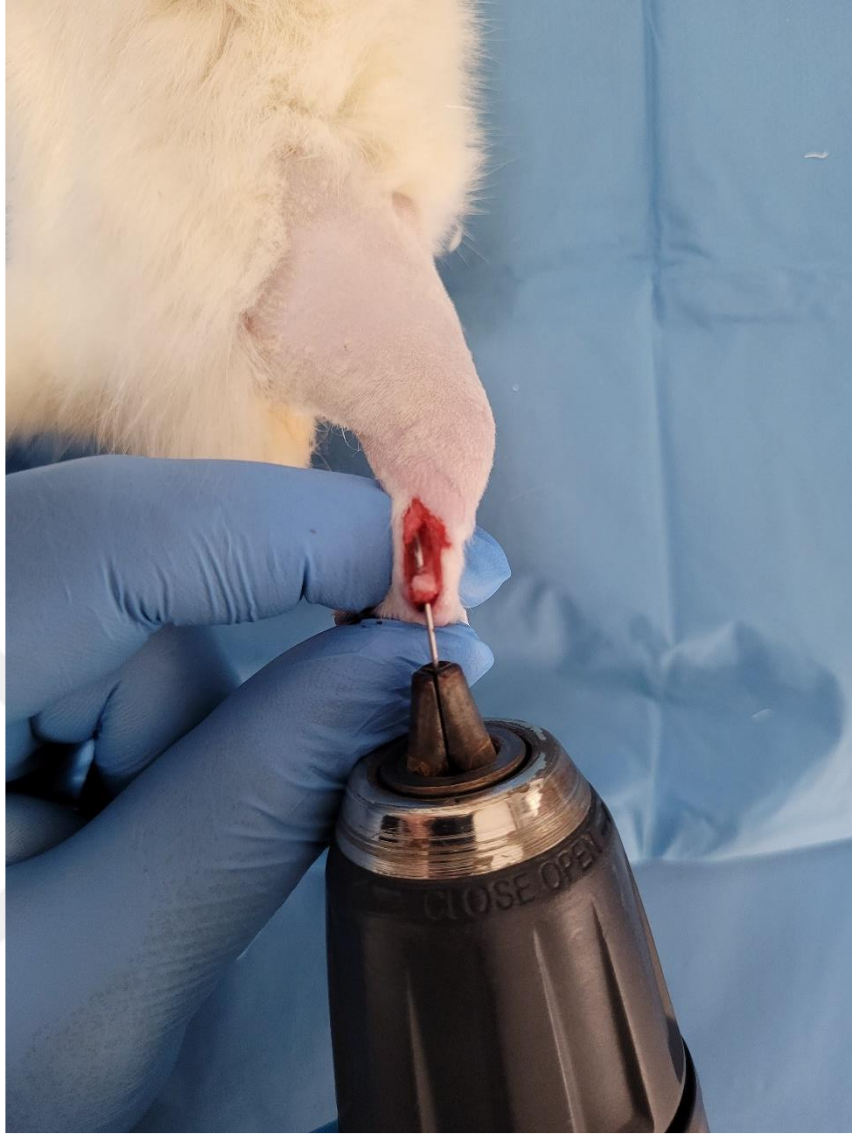
Şekil 11. Ratın cerrahi sahada tespiti



Şekil 12. Cilt kesisi sonrasında aşil tendonunun eksplere edilmesi



Şekil 13. Kemik tendon bileşkesinin eksplorasyonu sonrasında bileşkenin kesilerek yaralanma modelinin gerçekleştirilmesi



Şekil 14. Delici motor yardımıyla kalkaneusa tünel açılması



Şekil 15. Aşıl tendonundan geçilen sütünun kalkaneustaki açılan tünelden geçirilmesi



Şekil 16. Süturun, açılan tünelden geçirilerek distal tarafta bağlanması



Şekil 17. Cildin sütürasyonu sonrası işlemin tamamlanması

3.2. Cerrahi Sonrası Takip

Cerrahi sonrası deneklerin erken hareketlerine engel olunmadı. 8 hafta boyunca herhangi bir komplikasyon yaşanmadı. Tüm deneklere aynı oda içerisinde, rutin oda havası, rutin palet yem, musluk suyu imkanları sağlandı. Kafeslerin bakımları günlük olarak ilgili personel tarafından gerçekleştirildi.

3.3. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Materyallerin Hazırlanması

Denekler, gözlem gruplarına göre cerrahi girişimden 4 hafta ve 8 hafta takip s  resinin ardından anestezi altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Eski yara üzerinden giriş yapıldı. Tamir hattının iyileşmesi görüldü ve rüptür izlenmedi.

Tamir bölgesi korunacak şekilde proksimalde diz eklemi distalinden kemik kesildi. Distalde, parçaya kesi uygulanmadı. Biyomekanik ve histolojik gruplar eşit sayıda hayvan olacak şekilde oluşturuldu.



Şekil 18. Sakrifikasyon sonrasında biyomekanik ve histolojik değerlendirme için materyallerin hazırlanması



Şekil 19. Biyomekanik değerlendirme için materyallerin cihaz içerisinde en az kaymayı sağlayacak şekilde hazırlanması

3.4. Biyomekanik Değerlendirme

Sakrifikasyon sonrasında örnekler biyomekanik test yapmak için, cihazdan ayrılmasını engellemek amacıyla çevrelerine kaymalarını engelleyecek şekilde gazlı beze sarılarak ve bu bez kas kompleksine sütüre edilerek hazırlandı. Hazırlanan örnekler % 10 formol solüsyonlu içerisinde Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'na götürüldü.

Testler, Testometric(M500-50CT, İngiltere) cihaz kullanılarak 10 mm/dk hızında her iki ucundan çekilerek gerçekleştirildi. Cihazın alt tarafına kemik, üst tarafına kas kompleksi cihazın çekme doğrultusuna uygun olacak şekilde yerleştirildi. Entez yerinden kopana kadar işleme sürdürüldü.



Şekil 20. Testometric(M500-50CT, İngiltere) cihazı ile materyal üzerinde biyomekanik çalışmanın yapılması

Dokuz parametre kayıt altına alındı;

Maksimum Kuvvet (Force Peak): Bu parametre, tendon bileşkesinin belirli bir yüke maruz kaldığında dayanabileceği en yüksek kuvveti ölçer. Yüksek değerler, bileşkenin daha güçlü olduğunu ve daha iyi iyileştiğini gösterir.

Kopma Anındaki Uzama (Elong Break): Bu parametre, bileşke kırıldığında veya zarar görene kadar gerçekleşen uzama miktarını gösterir. Daha yüksek değerler, tendonun daha esnek olduğunu ve iyileşme sürecinde daha fazla dayanıklılık kazandığını gösterir.

Maksimum Uzama (Elong Peak): Bu parametre, malzemenin en fazla uzayabileceği noktayı ifade eder. Yüksek değerler, tendonun yüksek yükler altında bile esnekliğini koruduğunu ve daha iyi iyileştiğini gösterir.

Maksimum Gerilim Noktası (Strain L.O.P): Bu parametre, malzemenin üzerine uygulanan yük arttıkça, gerinimin en yüksek noktasını belirtir. Daha yüksek değerler, tendonun daha esnek olduğunu ve gerilim altında daha dayanıklı hale geldiğini gösterebilir.

Kopma Anındaki Gerilim (Strain Break): Bu parametre, malzeme kırıldığında veya zarar gördüğünde gerinim miktarını ifade eder. Yüksek değerler, tendonun kırılmadan önce ne kadar gerildiğini ve iyileşme sürecinde ne kadar esnek olduğunu gösterir.

Maksimum Gerilim (Strain Peak): Bu parametre, malzemenin en fazla gerinebileceği noktayı ifade eder. Yüksek değerler, tendonun yüksek gerilim altında bile esnekliğini koruduğunu gösterir.

Kopma Anındaki Kuvvet (Force Break): Bu parametre, malzeme kırıldığında veya bileşke zarar gördüğünde uygulanan kuvvet miktarını belirtir. Yüksek değerler, tendonun daha dayanıklı olduğunu ve iyileşme sürecinde daha güçlü hale geldiğini gösterir.

Maksimum Uzama Noktası (Elong L.O.P): Bu parametre, malzemenin üzerine uygulanan yük arttıkça, uzamanın en yüksek noktasıdır. Daha yüksek değerler, tendonun daha esnek olduğunu ve iyileşme sürecinde daha fazla dayanıklılık kazandığını gösterir.

Maksimum Kuvvet Noktası (Force L.O.P): Bu parametre, malzemenin üzerine uygulanan yük arttıkça, kuvvetin en yüksek noktasıdır. Yüksek değerler, tendonun yüksek yükler altında bile dayanıklılığını koruduğunu ve daha iyi iyileştiğini gösterir.

3.5. Histolojik Değerlendirme

Işık mikroskopik inceleme için alınan prefrontal tendon-kemik birleşke doku örnekleri, % 10'luk formalin içerisine alındı ve bu solüsyonda 3 gün bekletilerek tespit edildi. Dokular ardından akar suda yıkandıktan sonra, Leica TP 1020 ototeknikon cihazı (Leica Biosystems, Germany) ile Tablo 1'de belirtilen şekilde doku takip işlemi yapıldı.

Tablo 4. Işık mikroskobik doku takip işlemi aşamaları

Sıcaklık	Uygulanan yöntem	Süre
Oda Sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda Sıcaklığında	% 70'lik etil alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	% 80'lik etil alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	% 90'lık etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda Sıcaklığında	Saf alkol + Ksilol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Doku takibinden sonra doku örnekleri, parafin içerisinde bloklandı ve mikrotom (Thermo Shandon Finesse 325, USA) ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler, Safranin-O ve Picro-Sirius boyama yöntemleri ile boyandı. Boyama sonucu elde edilen doku kesitleri Olympos mikroskopla incelenerek fotoğraflandı. Elde edilen fotoğraflar, Bonar (Tablo 5), Movin (Tablo 6) ve Nourissat (Tablo 7) tendon-kemik birleşke skorlama sistemlerine göre değerlendirildi. Değerlendirme tek bir histolog tarafından kör bir şekilde yapıldı. Doku kesitleri, Olympus BX53 ışık mikroskobunda (Japonya) incelenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 5. Bonar skorlama sistemi

	0	1	2	3
Tenosit	Uzun, ince çekirdekler, belirgin sitoplazma yok	Çekirdekler yuvarlaklaşmış, sitoplazma yok	Çekirdekler daha büyük ve yuvarlak, biraz sitoplazma	Büyük, yuvarlak çekirdekler, bol sitoplazma, laküna oluşumu
Zemin Maddesi (Alcian Mavisi ve Kolloidal Demir Boyası)	Boyanma yok	Lifler arasında müsin, demetler ayrılmış	Lifler arasında müsin, demet sınırları kaybolmuş	Bol müsin, kollajen boyama zayıf
Kollajen (Polarize Işıkla veya Işıksız)	Normal kollajen yapısı, homojen polarizasyon	Demetler korunmuş halde, lifler ayrık pozisyonunda, polarizasyon az	Demet sınırları kaybolmuş, lifler ayrılmış, polarizasyon kaybı	Kollajen lifleri tamamen ayrılmış, yapısal kayıp
Vaskülarite	Belirgin damar yok	Yer yer kılcıl damarlar, 10x büyütmede 1'den daha az kılcıl damarlar	10x büyütmede 1-2 kapiller	10x büyütmede 2'den daha fazla kılcıl damarlar

Tablo 6. Movin skorlama sistemi

	0	1	2	3
Fibril Yapısı	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Fibril Düzeni	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Çekirdek Yuvarlaklığı	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Hücreyel Değişiklik	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Vaskülerite Artışı	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Kollajen Boyanmasında Azalma	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
Hiyalinizasyon	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik
GAG İçeriği	Normal	Hafif Anormallik	Orta Anormallik	Belirgin Anormallik

Tablo 7. Nourissat skarlama sistemi

	1	2	3	4
Entezdeki hücre miktarı	yok	Kümeler halinde	Geniş alanlarda	Birleşkeyi sarmış durumda
Entezdeki Tip 2 kollajen miktarı	< % 25	% 25-50	% 50-75	>% 75
GAG içeriği	Yok	Dar alanda	Geniş alanda	Birleşkeyi sarmış durumda
Kollajenlerin organizasyonu	Yok	Yamalar şeklinde	Dar alanda	Birleşkeyi sarmış durumda
Kondrosit hücrelerin organizasyonu	Hücre yok	Az sayıda hücre	Kümeler halinde hücre	Sütunlar şeklinde

Fearon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Bonar Skalasını belirtmişlerdir. Bu skala, tendon dokusunun morfolojik değerlendirilmesi için kullanılan dört parametre içermektedir. Bu parametrelere göre normal doku yapısı 0 puan (çok iyi), anormal doku yapısı ise 12 puan (çok kötü) arasında değerlendirilmiştir.⁷⁶ (Tablo 5) .

Mafulli ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri Movin skoru skalası ise sekiz parametre içermektedir ve bu parametrelere göre normal doku yapısı 0 puan (çok iyi), anormal doku yapısı ise 24 puan (çok kötü) arasında değerlendirilmektedir.⁷⁷ (Tablo 6) .

Nourissat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda kullanılan entezin histolojik analizi, yeni bileşke dokusunun kalitesini Tip 2 kollajen, glikozaminoglikan (GAG) içeriği, kollajen ve kondrosit hücrelerin organizasyonu ile belirlemektedir. Bu skala, doğal entezis dokusunun kalitesini çift kör çalışmalarda 16 puan olarak değerlendirirken, anormal doku yapısı ise 4 puan (çok kötü) olarak değerlendirilmiştir⁷⁸ (Tablo 7) .

3.6. Çalışmanın İstatistiksel Metodu

Verilerin analizinde SPSS 25.0 programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümler ise ortalama ve standart sapma (gereken yerlerde ortanca ve 1.çeyreklik-3.çeyreklik) olarak gösterildi. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edilerek; parametrik dağılım ön şartı sağlanmadığında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arası parametrik dağılıma sahip sürekli verilerin karşılaştırılmasında ise bağımsız örneklem t testi kullanıldı. İstatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı.

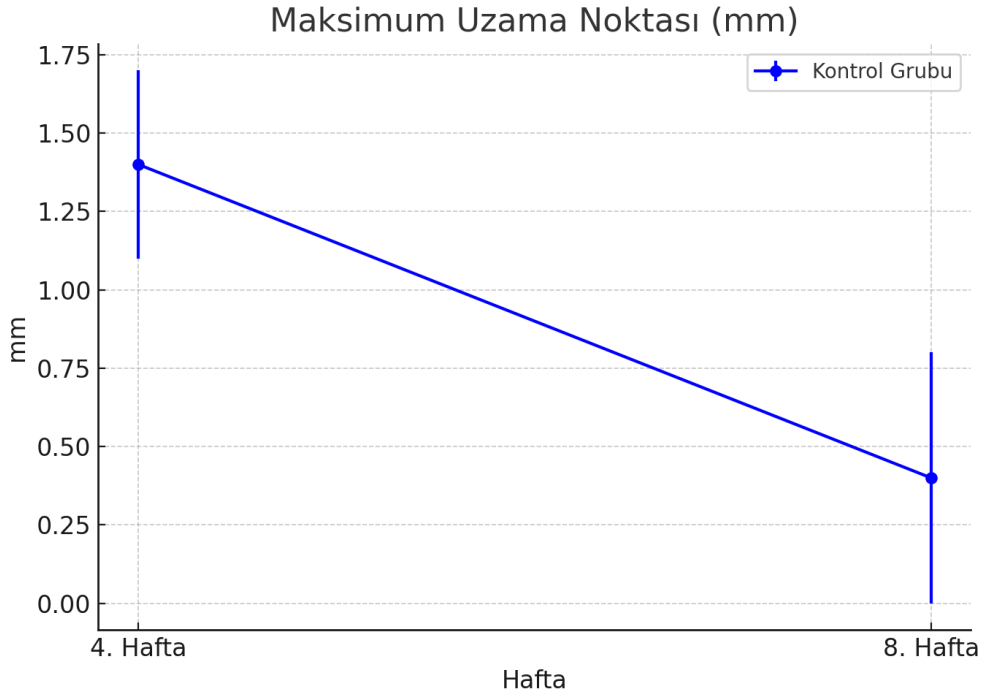


4. BULGULAR

4.1. Çalışmanın Biyomekanik Sonuçları

Kontrol grubu zamansal olarak incelendiğinde:

Maksimum uzama noktası (Elong L.O.P) değeri 4. haftada $1,4 \pm 0,3$ mm, 8.haftada $0,4 \pm 0,4$ mm olacak şekilde azalmış olup kontrol grubunun sadece bu parametresinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. (p: 0.001)



Şekil 21. Kontrol grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre zamansal karşılaştırılması

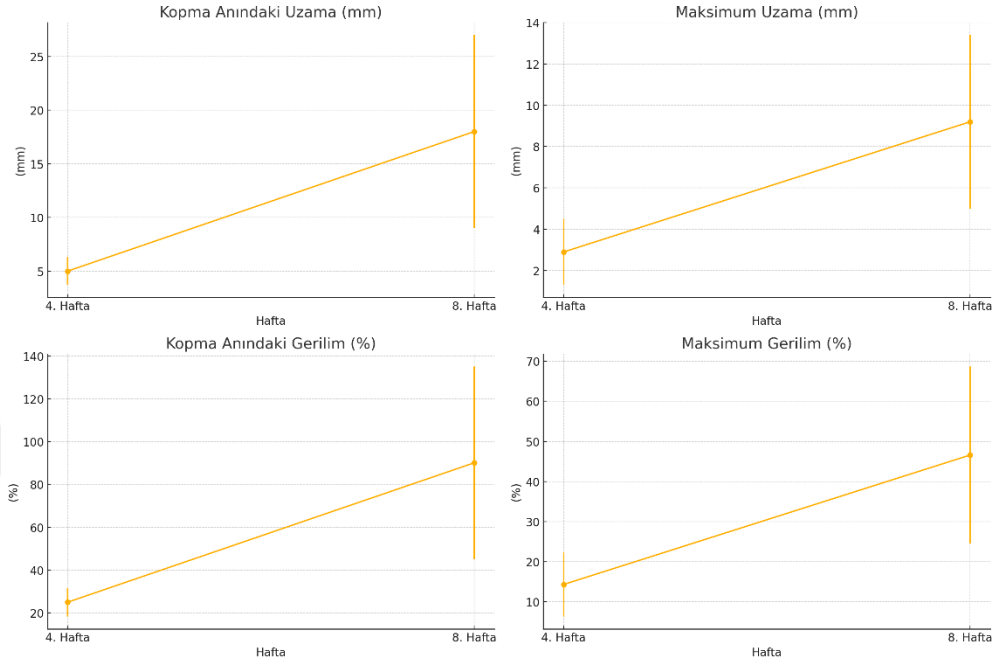
Deney grubu zamansal olarak incelendiğinde:

Kopma anındaki uzama (Elong Break) değeri 4. hafta: $5,0 \pm 1,3$ mm, 8.hafta: $18,0 \pm 9,0$ mm olacak şekilde artmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p: 0.008)

Maksimum uzama (Elong Peak) değeri 4. hafta: $2,9 \pm 1,6$ mm, 8.hafta: $9,2 \pm 4,2$ mm olacak şekilde artmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p: 0.006)

Kopma anındaki gerilim (Strain break) değeri 4. hafta: $25,0 \pm 6,7\%$, 8.hafta: $90,1 \pm 45,0\%$ olacak şekilde artmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p: 0.008)

Maksimum gerilim (Strain Peak) değeri 4. hafta: $14,3 \pm 8,0\%$, 8.hafta: $46,6 \pm 22,1\%$ olacak şekilde artmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p: 0.007)



Şekil 22. Deney grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre zamansal karşılaştırılması

Kontrol ve deney grubu, gruplar arası karşılaştırıldığında:

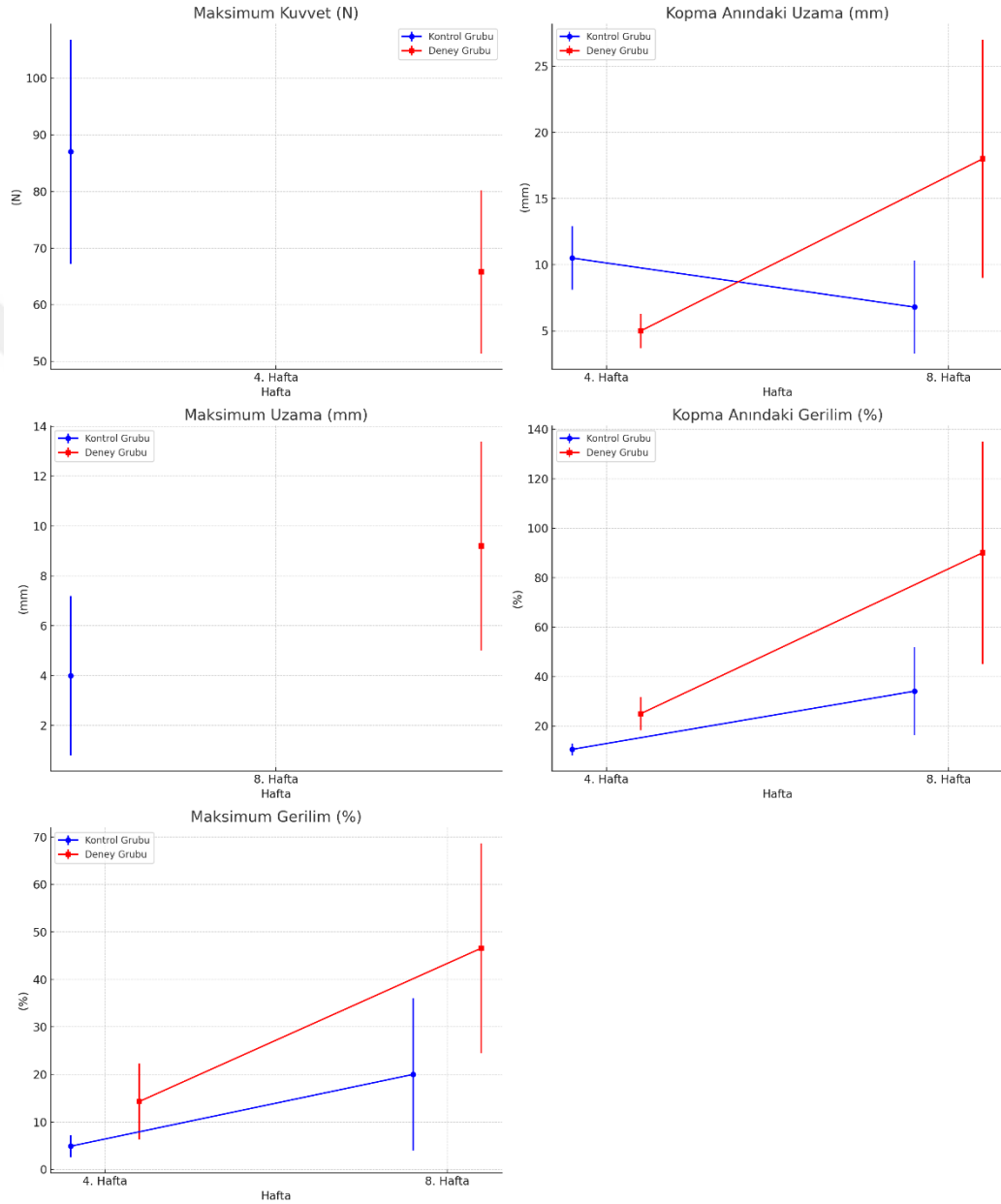
Maksimum kuvvet (Force Peak) değeri 4. haftada kontrol grubunda $87,0 \pm 19,8$ N iken, deney grubunda $65,8 \pm 14,4$ N olup gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.047).

Kopma anındaki uzama (Elong Break) değeri 4. haftada kontrol grubunda $10,5 \pm 2,4$ mm, deney grubunda $5,0 \pm 1,3$ mm olup, gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.001). 8. haftada kontrol grubunda $6,8 \pm 3,5$ mm, deney grubunda $18,0 \pm 9,0$ mm olup gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.016).

Maksimum Uzama (Elong Peak) değeri 8. haftada kontrol grubunda $4,0 \pm 3,2$ mm, deney grubunda $9,2 \pm 4,2$ mm olup gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.031).

Kopma anındaki gerilim (Strain Break) değeri 4. haftada kontrol grubunda $10,6 \pm 2,4\%$, deney grubunda $25,0 \pm 6,7\%$ olup, gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.001). 8. haftada kontrol grubunda $34,1 \pm 17,7\%$, deney grubunda $90,1 \pm 45,0\%$ olup gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.016)

Maksimum gerilim (Strain Peak) değeri 4. haftada kontrol grubunda $4,9 \pm 2,3\%$, deney grubunda $14,3 \pm 8,0\%$ olup, gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.020). 8. haftada kontrol grubunda $20,0 \pm 16,1\%$, deney grubunda $46,6 \pm 22,1\%$ olup gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. (p: 0.033).



Şekil 23. Kontrol ve deney grubunun istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının haftalara göre gruplar arası karşılaştırılması

Tablo 8. Biyomekanik parametrelerin istatistik sonuçları , Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan(1. çeyreklik-3. çeyreklik) olarak özetlenmiştir. p+ 4. Haftada gruplar arası karşılaştırma, p++ 8. Haftada gruplar arası karşılaştırma. * Mann Whitney U testi uygulanarak elde edilmiştir, diğerleri bağımsız örneklerde t testi uygulanarak elde edilmiştir.

	Grup										p ⁺	p ⁺⁺
	Kontrol					Deney						
	4. hafta		8. hafta		p	4. hafta		8. hafta		p		
	Ort±SS	Med(Ç1-Ç3)	Ort±SS	Med(Ç1-Ç3)		Ort±SS	Med(Ç1-Ç3)	Ort±SS	Med(Ç1-Ç3)			
Force Peak	87,0±19,8	88,3(65,7-104,4)	90,3±41,5	97,0(50,7-125,5)	0,865	65,8±14,4	73,2(49,3-78,8)	85,6±32,2	89,6(50,7-120,8)	0,164	0,047	0,821
Elong Break	10,5±2,4	9,4(8,8-12,8)	6,8±3,5	7,3(4,7-10,0)	0,132*	5,0±1,3	4,6(4,0-6,1)	18,0±9,0	16,1(11,4-22,0)	0,008	0,001*	0,016
Elong Peak	4,8±2,3	5,7(2,1-6,6)	4,0±3,2	3,5(1,3-5,9)	0,618	2,9±1,6	3,2(1,2-3,8)	9,2±4,2	7,9(6,1-13,8)	0,006	0,097	0,031
Strain L.O.P	1,4±0,3	1,3(1,1-1,6)	1,8±1,9	1,1(0,6-1,8)	0,562	6,4±6,5	2,8(1,0-10,3)	10,3±17,1	3,0(1,2-14,7)	0,902*	0,083	0,202*
Strain Break	10,6±2,4	9,4(8,8-12,8)	34,1±17,7	36,5(23,7-50,1)	0,065*	25,0±6,7	23,0(20,1-30,6)	90,1±45,0	80,5(57,3-110,1)	0,008	0,001*	0,016
Strain Peak	4,9±2,3	5,7(2,1-6,7)	20,0±16,1	17,6(6,6-29,4)	0,069	14,3±8,0	15,8(6,0-18,8)	46,6±22,1	39,5(30,7-69,0)	0,007	0,020	0,033
Force Break	49,5±16,7	48,0(41,1-50,6)	72,5±46,4	69,3(25,6-121,9)	0,294	44,7±15,9	46,2(30,5-59,7)	46,8±30,0	63,8(15,9-68,7)	0,872	0,609	0,253
Elong L.O.P	1,4±0,3	1,3(1,1-1,6)	0,4±0,4	0,2(0,1-0,4)	0,001	1,3±1,3	0,5(0,2-2,1)	2,1±3,4	0,6(0,2-2,9)	0,902*	0,867	0,202*
Force L.O.P	58,6±19,6	55,0(48,6-59,0)	44,3±12,6	43,4(36,0-47,3)	0,132*	42,5±21,6	33,6(25,1-69,5)	43,0±16,3	38,3(27,1-58,7)	0,962	0,181*	0,874

4.2. Çalışmanın Histolojik Sonuçları

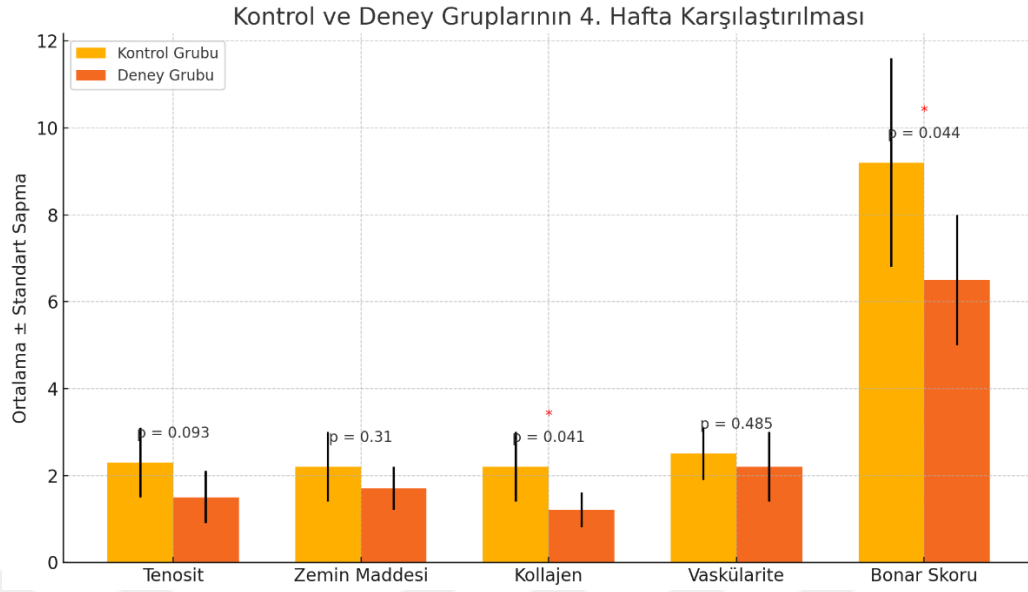
Bonar skorlamasına göre; kollajen parametresinde hem 4. hem 8. haftalarda kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur (4. hafta $p = 0.041$, 8. hafta $p = 0.009$).

Bonar skorlamasına göre; kontrol ve deney grubunun toplam skorlarının karşılaştırılmasında hem 4. hem 8. haftalarda kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. (4. hafta $p = 0.044$, 8. hafta $p = 0.009$)

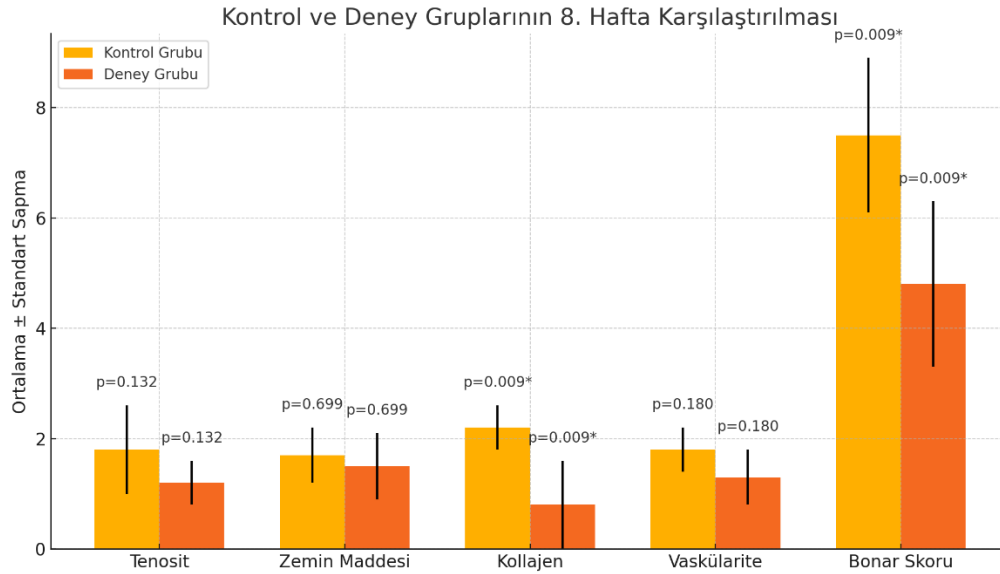


Tablo 9. Bonar skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları , Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan(1. çeyreklik-3. çeyreklik) olarak özetlenmiştir. p+ 4. Haftada gruplar arası karşılaştırma, p++ 8. Haftada gruplar arası karşılaştırma. * Bağımsız örneklerde t testi uygulanarak elde edilmiştir, diğerleri Mann Whitney U testi uygulanarak elde edilmiştir.

	Kontrol Grubu					Deney Grubu						
	4. hafta		8. hafta			4. hafta		8. hafta				
	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)		p değeri	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS			
Tenosit	2.3 ± 0.8	2.5 [2.0, 3.0]	1.8 ± 0.8	2.0 [1.0, 2.0]	0,310	1.5 ± 0.6	1.5 [1.0, 2.0]	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,394	0,093	0,132
Zemin Maddesi	2.2 ± 0.8	2.0 [2.0, 3.0]	1.7 ± 0.5	2.0 [1.0, 2.0]	0,310	1.7 ± 0.5	2.0 [1.0, 2.0]	1.5 ± 0.6	1.5 [1.0, 2.0]	0,699	0,310	0,699
Kollajen	2.2 ± 0.8	2.0 [2.0, 3.0]	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,937	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0.8 ± 0.8	1.0 [0.0, 1.0]	0,485	0,041	0,009
Vaskülerite	2.5 ± 0.6	2.5 [2.0, 3.0]	1.8 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,093	2.2 ± 0.8	2.0 [2.0, 3.0]	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	0,093	0,485	0,180
Bonar Skoru	9.2 ± 2.4	10.0 [8.0, 10.0]	7.5 ± 1.4	7.5 [6.0, 9.0]	0.171*	6.5 ± 1.5	6.5 [5.0, 7.0]	4.8 ± 1.5	4.5 [4.0, 6.0]	0,082*	0,044*	0,009*



Şekil 24. Bonar Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması



Şekil 25. Bonar Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması

Movin skorlamasına göre; kontrol grubu zamansal olarak incelendiğinde vaskülerite artışı parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.041$)

Movin skorlamasına göre; deney grubu zamansal olarak incelendiğinde toplam Movin skorunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.007$)

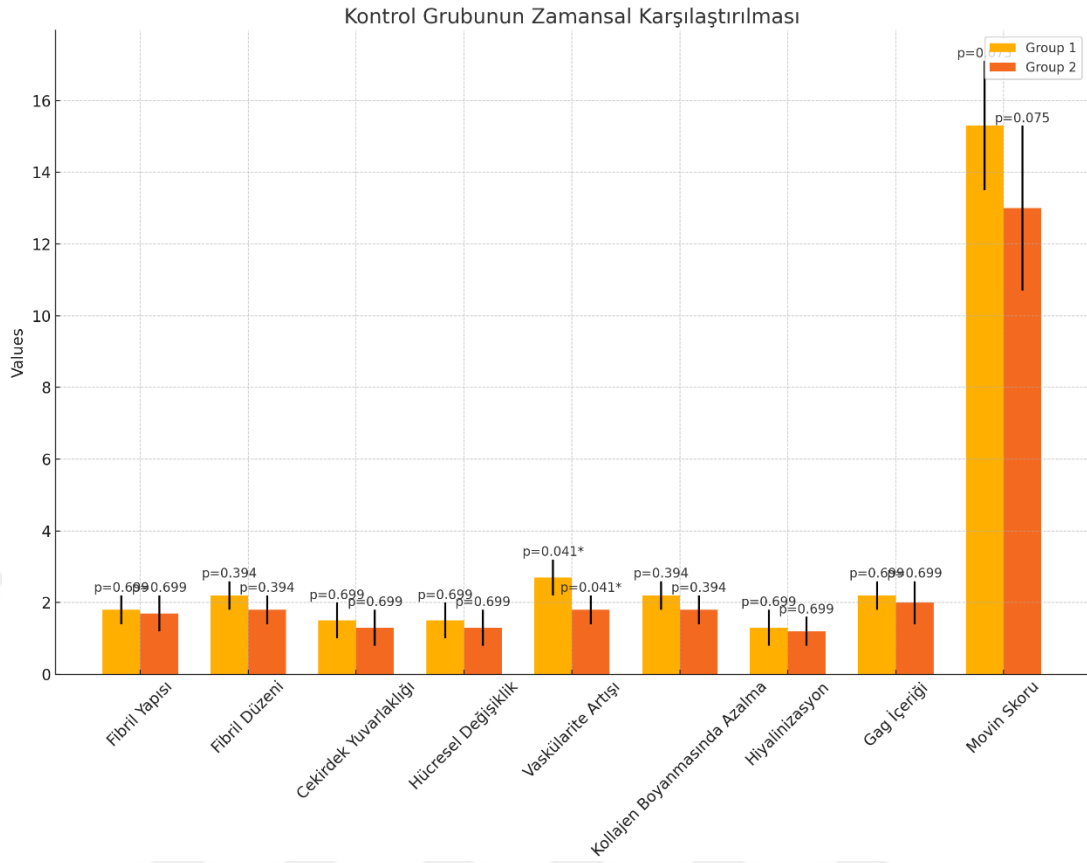
Movin skorlamasına göre; kontrol ve deney grubu 4. haftada gruplar arası farklılık yönünden incelendiğinde toplam Movin skorunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.001$)

Movin skorlamasına göre; kontrol ve deney grubu 8. haftada gruplar arası farklılık yönünden incelendiğinde toplam Movin skorunda ($p = 0.004$) ve hyalinizasyon ($p = 0.041$) parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

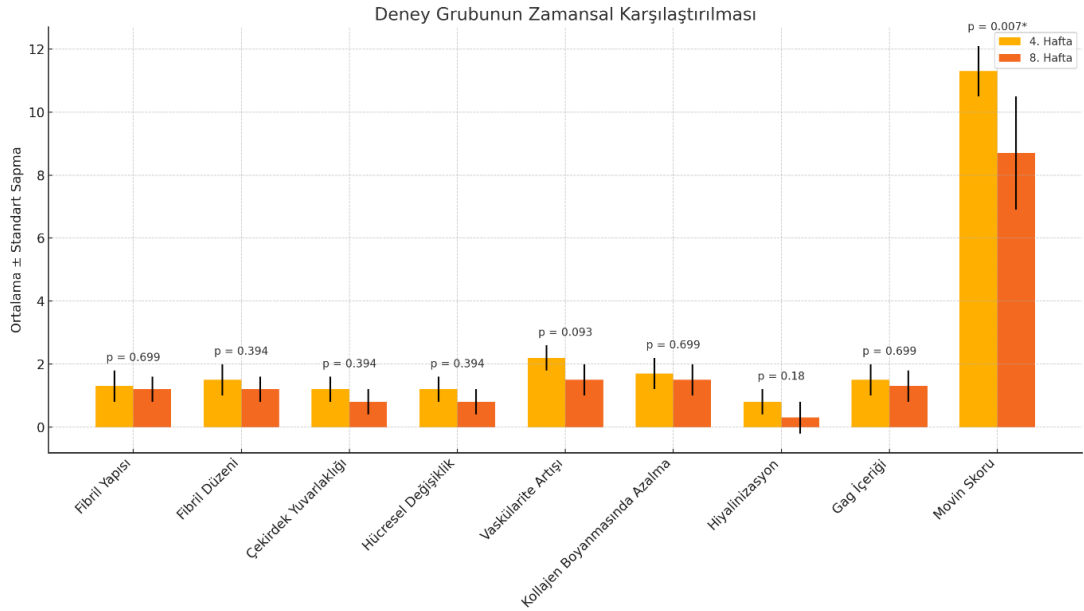


Tablo 10. Movin skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları , Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan(1. çeyreklik-3. çeyreklik) olarak özetlenmiştir. p+ 4. Haftada gruplar arası karşılaştırma, p++ 8. Haftada gruplar arası karşılaştırma. * Bağımsız örneklerde t testi uygulanarak elde edilmiştir, diğerleri Mann Whitney U testi uygulanarak elde edilmiştir

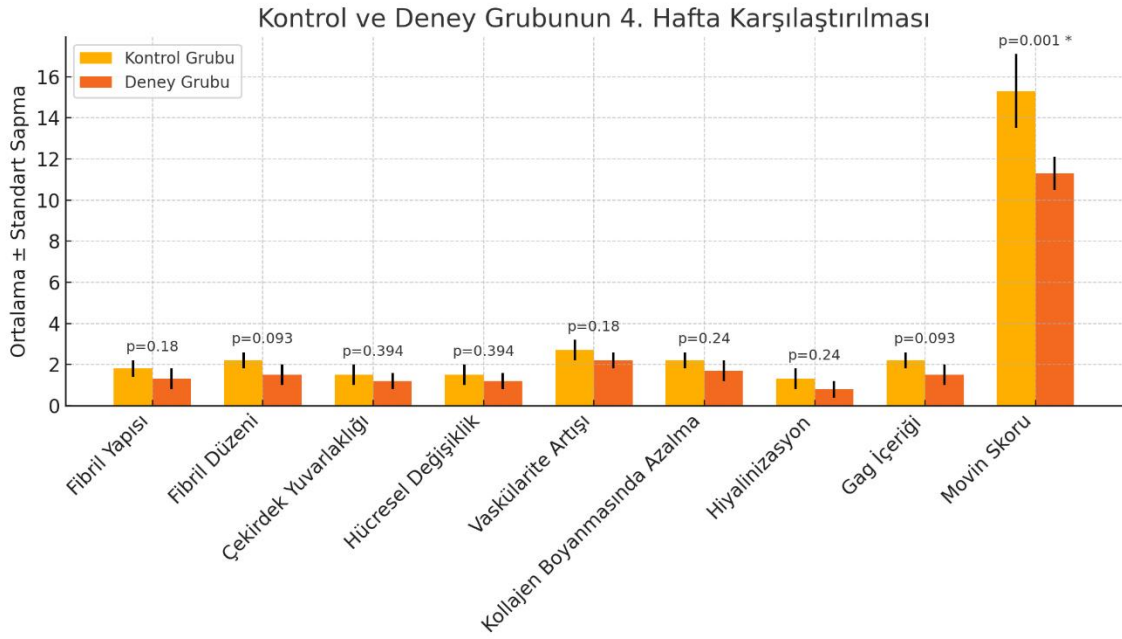
	Kontrol Grubu					Deney Grubu						
	4. hafta		8. hafta			4. hafta		8. hafta				
	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)		p değeri	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS			
Fibril Yapısı	1.8 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	1.7 ± 0.5	2.0 [1.0, 2.0]	0,699	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,699	0,180	0,180
Fibril Düzeni	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	1.8 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,394	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,394	0,093	0,065
Çekirdek Yuvarlaklığı	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	0,699	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0.8 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,394	0,394	0,240
Hücrel Değişiklik	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	0,699	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0.8 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,394	0,394	0,240
Vaskülarite Artışı	2.7 ± 0.5	3.0 [2.0, 3.0]	1.8 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,041	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	0,093	0,180	0,394
Kollajen Boyanmasında Azalma	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	1.8 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,394	1.7 ± 0.5	2.0 [1.0, 2.0]	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	0,699	0,240	0,394
Hiyalinizasyon	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	1.2 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0,699	0.8 ± 0.4	1.0 [1.0, 1.0]	0.3 ± 0.5	0.0 [0.0, 1.0]	0,180	0,240	0,041
Gag İçeriği	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	2.0 ± 0.6	2.0 [2.0, 2.0]	0,699	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	1.3 ± 0.5	1.0 [1.0, 2.0]	0,699	0,093	0,132
Movin Skoru	15.3 ± 1.8	15.5 [14.0, 16.0]	13.0 ± 2.3	13.5 [12.0, 15.0]	0,075*	11.3 ± 0.8	11.5 [11.0, 12.0]	8.7 ± 1.8	8.0 [8.0, 9.0]	0,007*	0,001*	0,004*



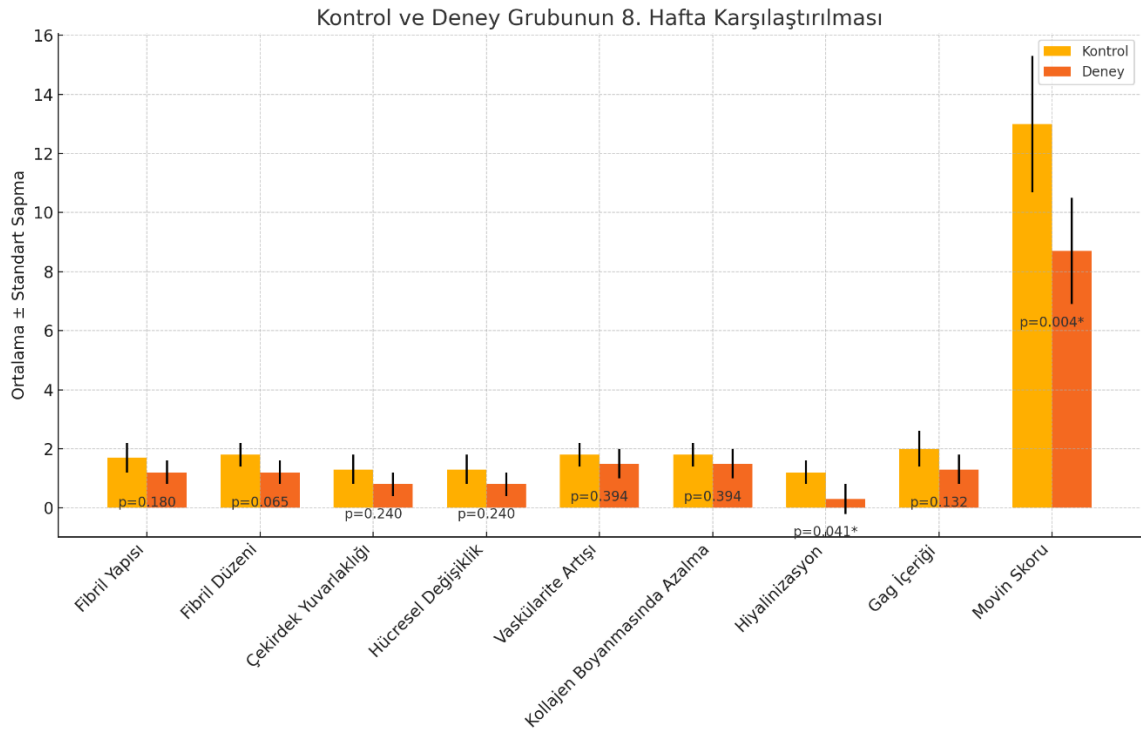
Şekil 26. Movin Skoru ve Parametrelerinin Kontrol Grubunda Zamansal Karşılaştırılması



Şekil 27. Movin Skoru ve Parametrelerinin Deney Grubunda Zamansal Karşılaştırılması



Şekil 28. Movin Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması



Şekil 29. Movin Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması

Nourissat skarlama sistemine göre; 4. haftada kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında bileşkedeki hücre parametresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p = 0.026$)

Nourissat skarlama sistemine göre; 8. haftada kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında kollojen organizasyonu parametresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p = 0.015$)

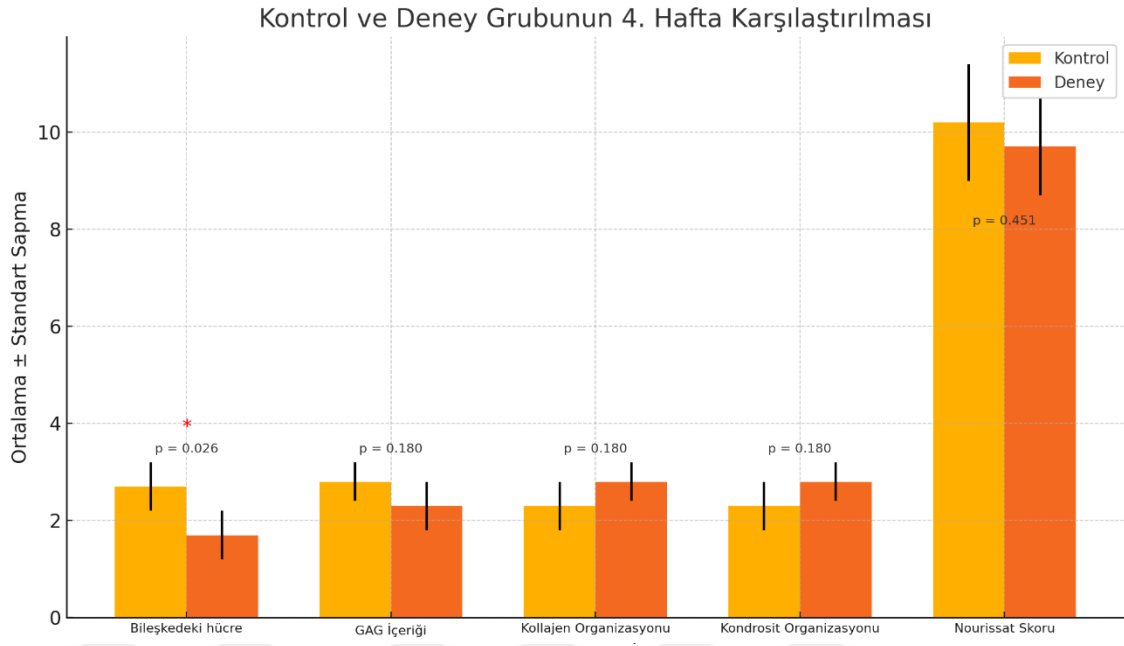


Tablo 11. Nourissat skoru ve parametrelerin istatistik sonuçları , Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan(1. çeyreklik-3. çeyreklik) olarak özetlenmiştir.

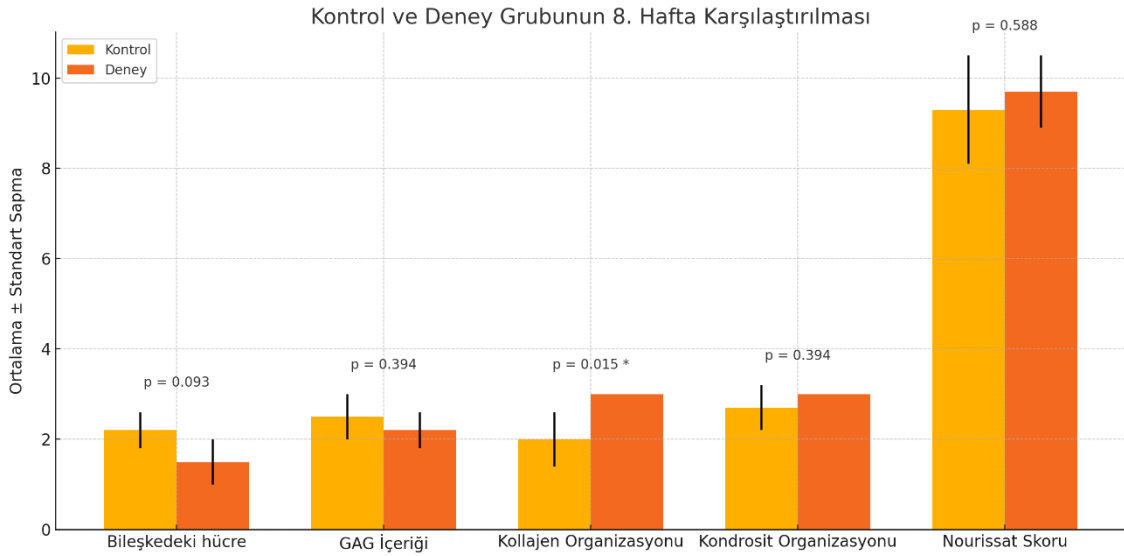
p+ 4. Haftada gruplar arası karşılaştırma, p++ 8. Haftada gruplar arası karşılaştırma. * Bağımsız örneklerde t testi uygulanarak elde edilmiştir, diğerleri

Mann Whitney U testi uygulanarak elde edilmiştir

	Kontrol Grubu					Deney Grubu						
	4. hafta		8. hafta			4. hafta		8. hafta				
	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)		p değeri	Ortalama ± SS	Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	Ortalama ± SS		Ortanca(1. Çeyreklik-3. Çeyreklik)	p değeri
Bileşkedeki hücre	2.7 ± 0.5	3.0 [2.0, 3.0]	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,180	1.7 ± 0.5	2.0 [1.0, 2.0]	1.5 ± 0.5	1.5 [1.0, 2.0]	0,699	0,026	0,093
GAG İçeriği	2.8 ± 0.4	3.0 [3.0, 3.0]	2.5 ± 0.5	2.5 [2.0, 3.0]	0,394	2.3 ± 0.5	2.0 [2.0, 3.0]	2.2 ± 0.4	2.0 [2.0, 2.0]	0,699	0,180	0,394
Kollajen Organizasyonu	2.3 ± 0.5	2.0 [2.0, 3.0]	2.0 ± 0.6	2.0 [2.0, 2.0]	0,485	2.8 ± 0.4	3.0 [3.0, 3.0]	3.0 ± 0.0	3.0 [3.0, 3.0]	0,699	0,180	0,015
Kondrosit Organizasyonu	2.3 ± 0.5	2.0 [2.0, 3.0]	2.7 ± 0.5	3.0 [2.0, 3.0]	0,394	2.8 ± 0.4	3.0 [3.0, 3.0]	3.0 ± 0.0	3.0 [3.0, 3.0]	0,699	0,180	0,394
Nourissat Skoru	10.2 ± 1.2	10.5 [10.0, 11.0]	9.3 ± 1.2	9.5 [8.0, 10.0]	0,253*	9.7 ± 1.0	10.0 [9.0, 10.0]	9.7 ± 0.8	9.5 [9.0, 10.0]	0,999*	0,451*	0,588*

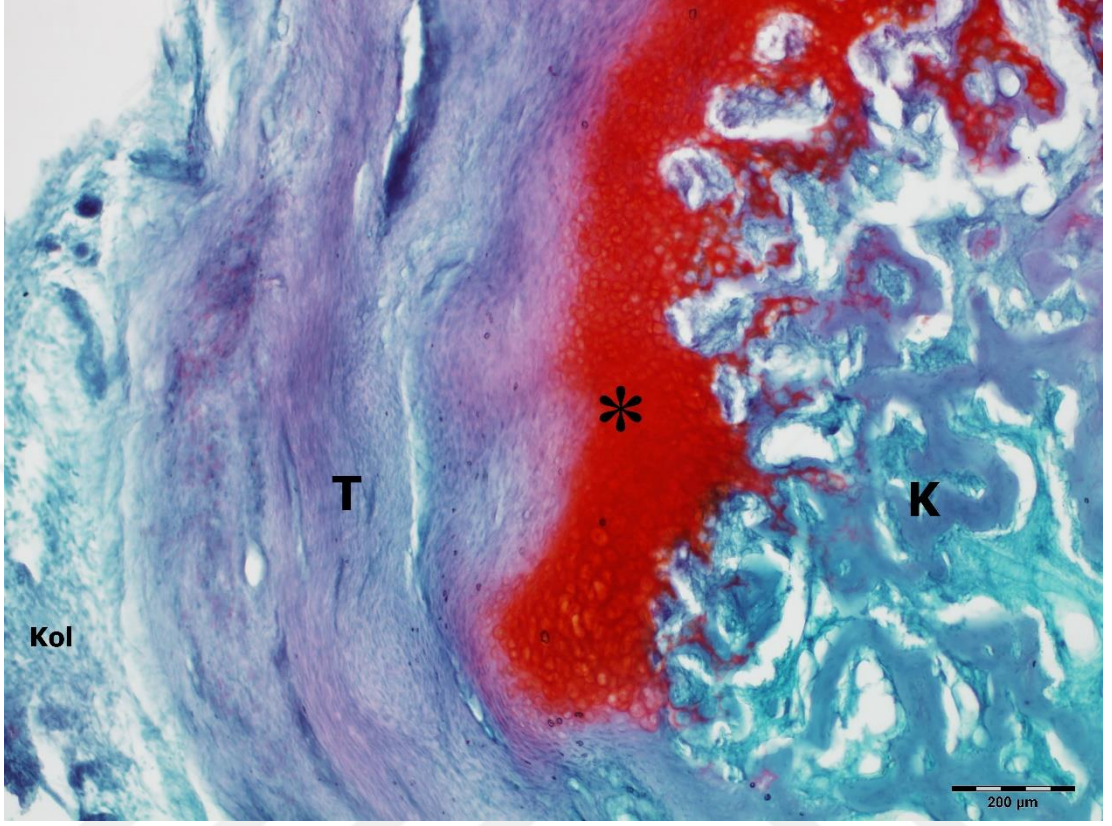


Şekil 30. Nourissat Skoru ve Parametrelerinin 4. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması

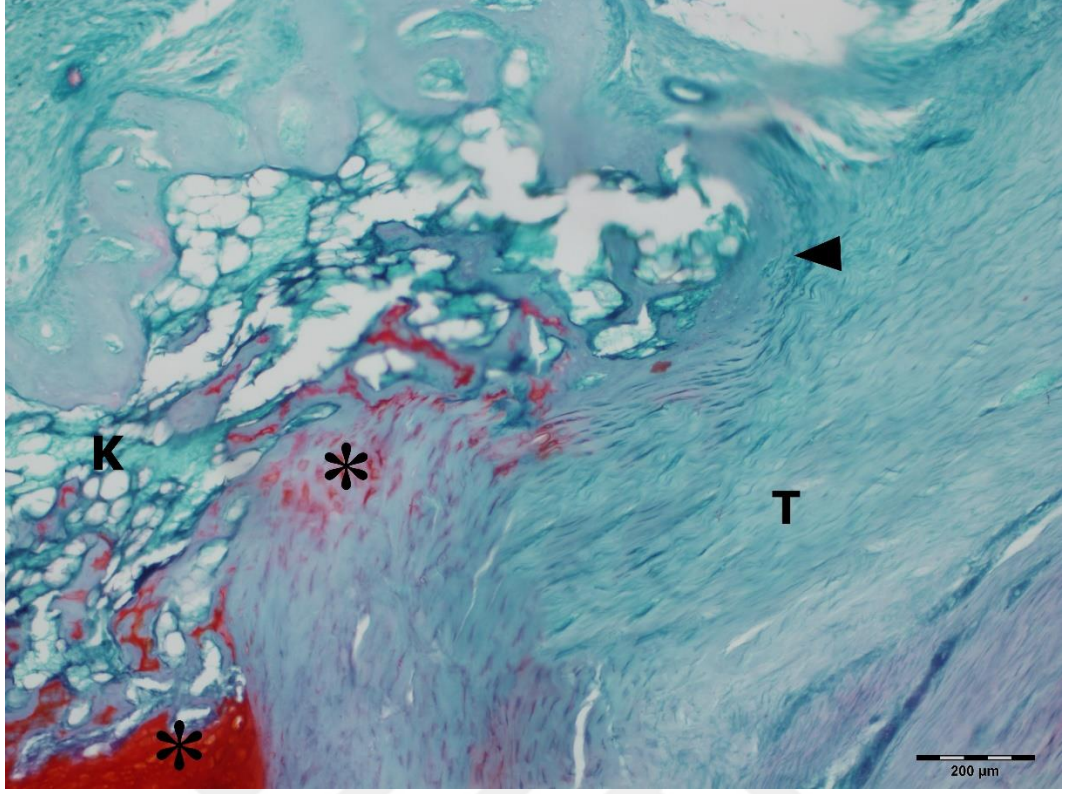


Şekil 31. Nourissat Skoru ve Parametrelerinin 8. Hafta Gruplar Arası Karşılaştırılması

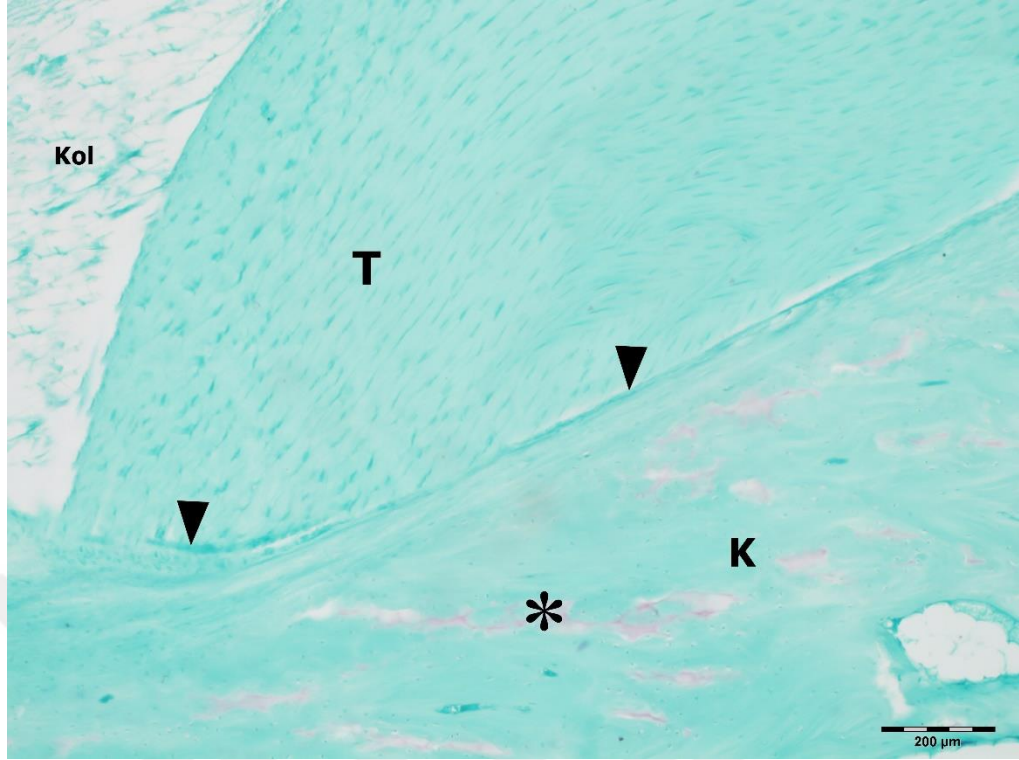
1. Safranin-O Boyama Bulguları



Şekil 32. Kontrol grubu 4. hafta tendon-kemik birleşkesinin histolojik görünümü. Nispeten dağınık şekilde kollajen liflere sahip tendon (T) bölgesi izlenmektedir. Bu bölgede tenositlerde hafif yuvarlaklaşma izlenmektedir. Sağ tarafta matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları izlenmekle birlikte, bu bölgede artmış proteoglikan birikimi (*) izlenmektedir. Safranin-O boyama
Bar: 200 µm.

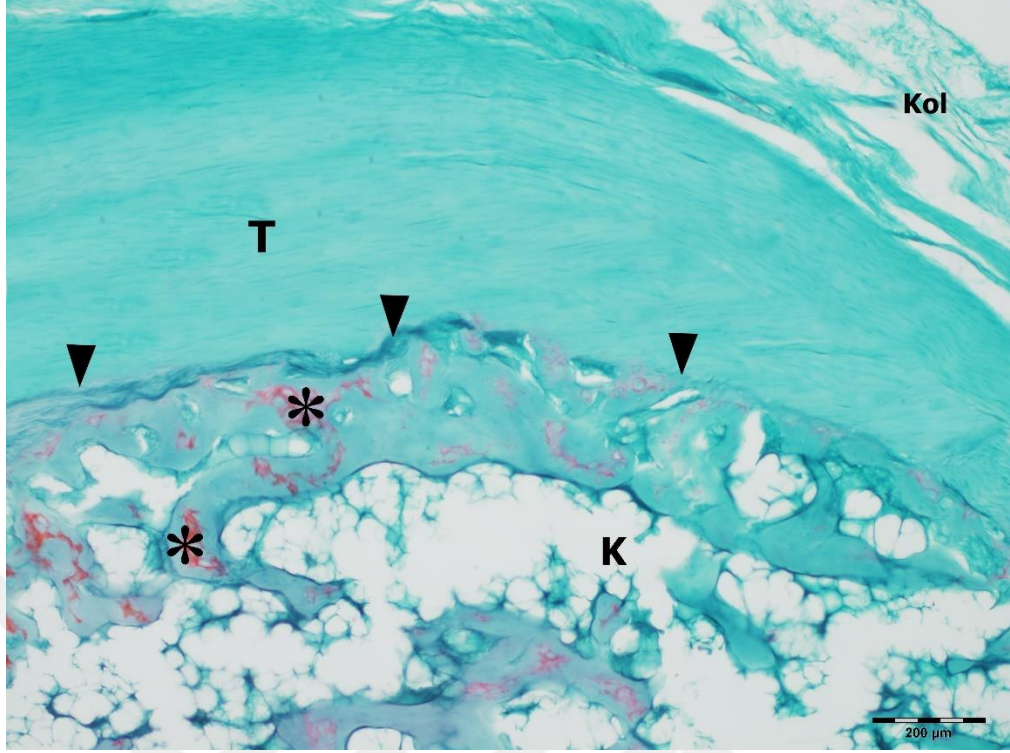


Şekil 33. Kontrol grubu 8. hafta tendon-kemik birleşkesinin histolojik görünümü. Düzenli dağılım gösteren kollajen liflerine sahip tendon (T) bölgesi izlenmektedir. Bu bölgede tenositlerde yuvarlaklaşma çok zayıf düzeyde izlenmektedir. Sol yukarı bölgede izlenen matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları izlenmekle birlikte, bu bölgede proteoglikan birikimi (*) izlenmektedir. Safranin-O boyama, Bar: 200 µm.



Şekil 34. Deney grubu 4. hafta tendon-kemik birleşkesinin (siyah ok başı) histolojik görünümü.

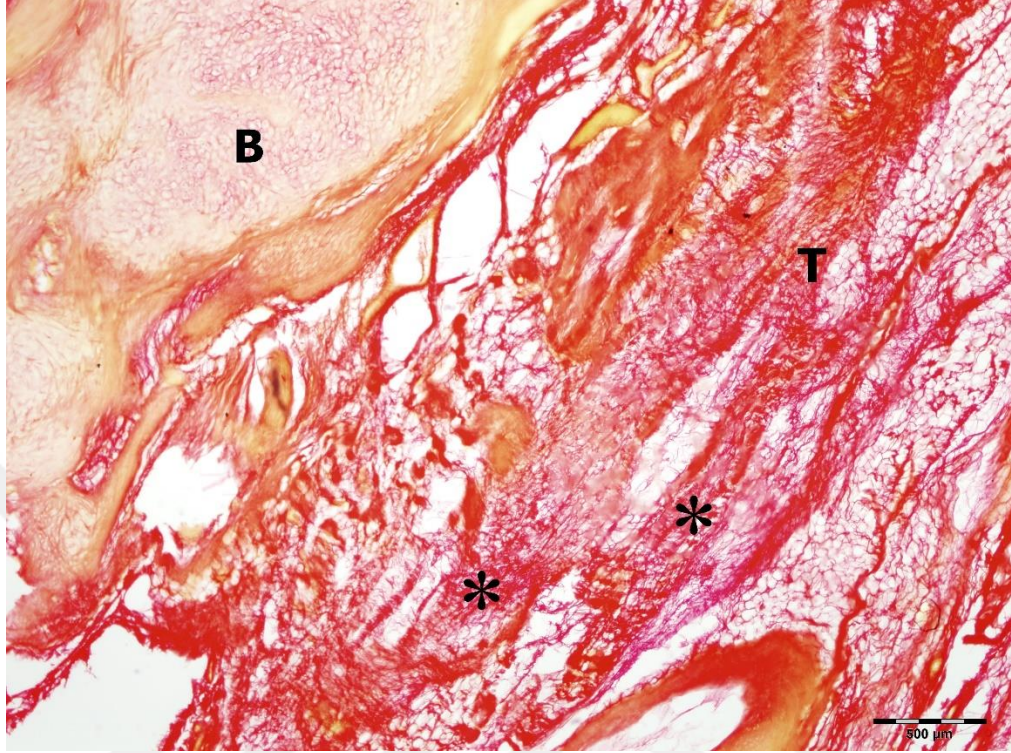
Düzenli dağılım gösteren kollajen liflerine sahip tendon (T) bölgesi ve daha periferik alanda görülen düzensiz sıkı bağ dokusuna ait kollajen (Kol) lifler izlenmektedir. Bu bölgede tenositlerde yuvarlaklaşma çok hafif düzeyde izlenmektedir. Sağ aşağı bölgede izlenen matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları izlenmekle birlikte, bu bölgede hafif düzeyde proteoglikan birikimi (*) izlenmektedir. Safranin-O boyama, Bar: 200 µm.



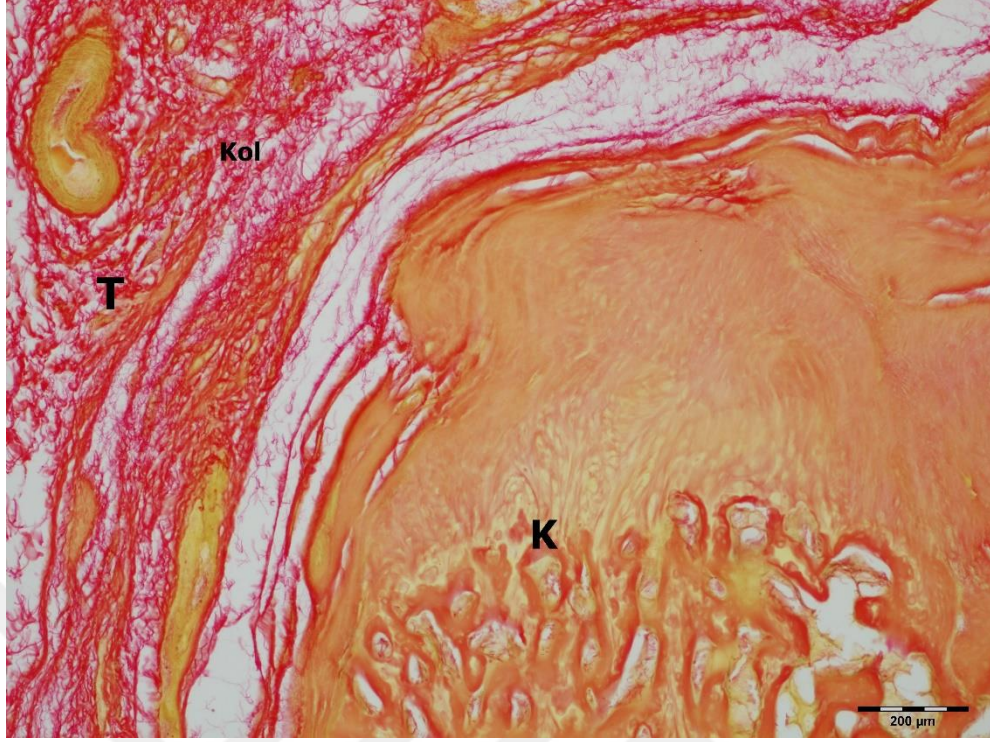
Şekil 35. Deney grubu 8. hafta tendon-kemik birleşkesinin (siyah ok başı) histolojik görünümü.

Oldukça düzenli dağılım gösteren kollajen liflerine sahip tendon (T) bölgesi ve daha periferel alanda görülen düzensiz sıkı bağ dokusuna ait kollajen (Kol) lifler izlenmektedir. Bu bölgede tenositlerde yuvarlaklaşma izlenmemektedir. Daha aşağı bölgede izlenen matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları izlenmekle birlikte, bu bölgede minimal düzeyde proteoglikan birikimi (*) izlenmektedir. Safranin-O boyama, Bar: 200 µm.

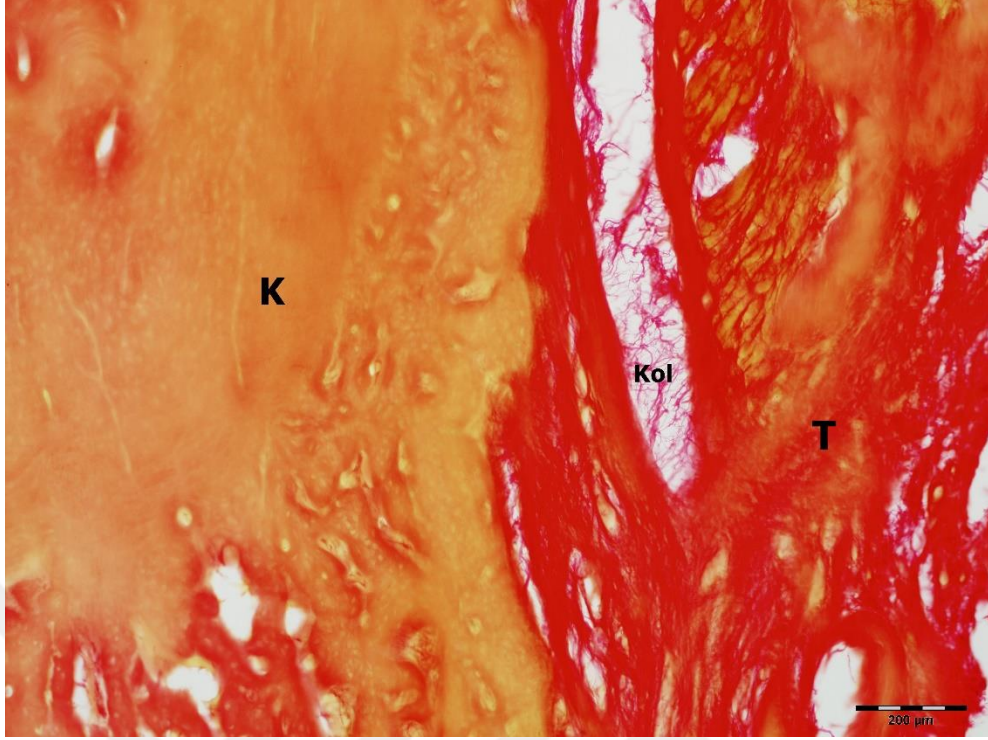
2. Picro-sirius Boyama Bulguları



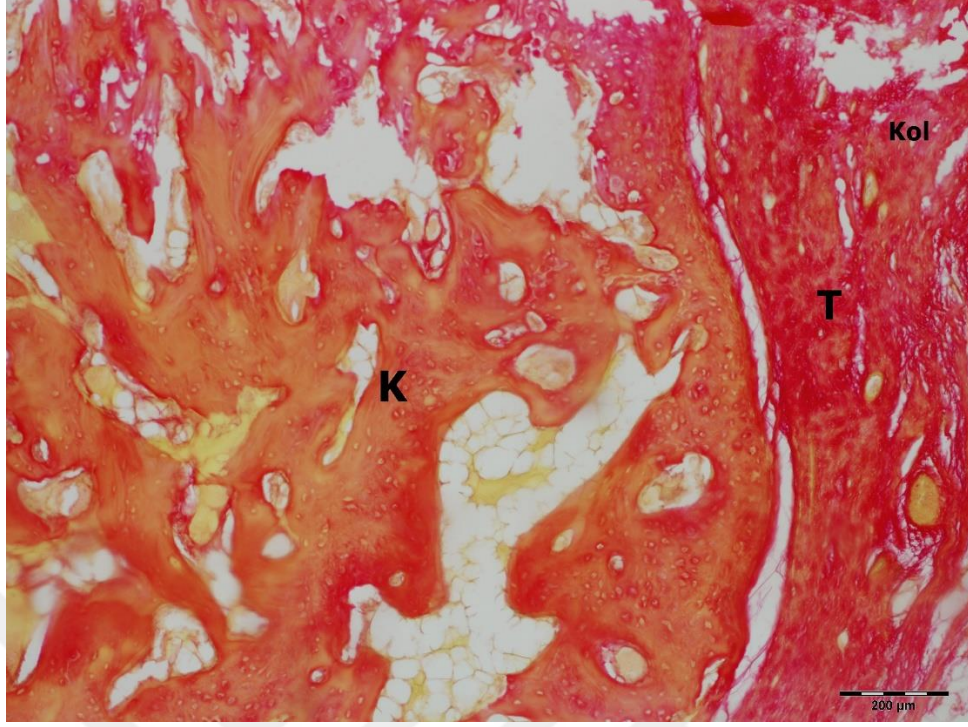
Şekil 36. Kontrol grubu 4. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü. Tendon yapısında (T) hasar bölgesinde oldukça dağınık yapıya sahip kollajen liflerin dağılımı (*) izlenmektedir. Matür kemik dokusu (K) nispeten normal yapıda görülmektedir. Picro-Sirius boyama Bar:200 µm.



Şekil 37. Kontrol grubu 8. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü. Tendon yapısında (T) hasar bölgesinde dağınık yapıya sahip kollajen liflerin dağılımı (*) izlenmektedir. Matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları normal yapıda görülmektedir. Picro-Sirius boyama Bar:200 μ m.



Şekil 38. Deney grubu 4. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü. Tendon yapısında (T) hasar bölgesinde hafif düzeyde dağınık yapıya sahip kollajen (Kol) liflerin dağılımı (*) izlenmektedir. Matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları normal yapıda görülmektedir. Picro-Sirius boyama Bar:200 µm.



Şekil 39. Deney grubu 8. haftada tendon kemik bileşke bölgesinin histolojik görünümü. Tendon yapısında (T) hasar bölgesinde çoğunlukla normal yapıya sahip kollajen (Kol) liflerin dağılımı izlenmektedir. Matür kemik dokusu (K) ve ossifikasyon alanları normal yapıda görülmektedir. Picro-Sirius boyama Bar:200 µm.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın biyomekanik verileri gruplar arasında karşılaştırıldığında şu yorumlara ulaşılmıştır:

Kopma anındaki uzama (Elong Break) değerlerinde 4. ve 8. haftalarda deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Bu farklar, deney grubunda dokunun daha elastik olduğunu ve daha fazla uzayabildiğini göstermektedir.

Maksimum uzama (Elong Peak) değeri 8. haftada kontrol grubunda daha düşük iken, bu, deney grubunda iyileşmenin daha iyi ve elastikiyetin artmış olduğunu gösterir.

Aşıl tendon rüptürlerinin cerrahi tedavisi sonrası ultrasonik elastografi metoduyla elastikiyetlerinin ölçüldüğü bir çalışmada aşıl tendon tamirleri sonrasında tendonun sertliğinin arttığı ancak elastikiyetinin de arttığı ve bunun klinik fonksiyonel skorlamalar üzerine anlamlı olumlu etki yaptığı saptanmıştır.⁸⁰ Bu çalışmayla benzer olarak çalışmamızda kopma anındaki uzama ve maksimum uzama değerleri hem deney grubunun 4. ve 8. haftasında anlamlı olarak artmış bulunmuştur hem de gruplar arası karşılaştırmada deney grubunun değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur, bu da tendonun rüptür sonrası iyileşmesi sırasında elastikiyetinin arttığını göstermektedir.

Maksimum kuvvet (Force Peak) değeri 4. haftada kontrol grubunda daha yüksek iken, bu durum deney grubunun daha erken dönemlerde daha zayıf olduğunu ancak zamanla kuvvet taşıma kapasitesinin arttığını göstermektedir.

Kopma anındaki gerilim (Strain Break) değeri 4. ve 8. haftalarda deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Bu farklar, deney grubunda dokunun kopma anında daha fazla gerilim taşıyabildiğini göstermektedir.

Maksimum gerilim (Strain Peak): 4. ve 8. haftalarda deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Bu farklar, deney grubunda dokunun daha yüksek gerilimleri tolere edebildiğini göstermektedir.

Bu veriler literatürde birebir olarak başka çalışmalarla karşılaştırılamamakla beraber, benzer tek örnek bir çalışmada hipoksi ile indüklenmiş mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı ve bunların tavşanlarda patellar tendon tamiri sonrasında etkilerinin araştırıldığı bir araştırmada kopma öncesi maksimum kuvvet yüklenmesi değerlerinin 4. haftada normoksi grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu, maksimum

gerilme değerlerinin hipoksi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğu, elastik modül değerlerinin hipoksi grubunda anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür.⁷⁹ Bu çalışmanın sonuçlarından olan maksimum kuvvet yüklenmesi değeri çalışmamızın maksimum kuvvet değeri parametresi ile örtüşmekte olup 4. haftada kontrol grubunun maksimum kuvvet değerleri deney grubundan anlamlı olarak düşüktür ve bahsedilen çalışma ile benzer sonuç bulunmuştur. Bahsedilen çalışmadaki maksimum gerilme değeri parametresi çalışmamızdaki maksimum gerilim değerine benzer olduğundan birlikte yorumlanabilir ancak çalışmamızda maksimum gerilim değerlerimiz 4. ve 8. haftalarda deney grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yine elastik modülüs parametresi çalışmamızdaki maksimum uzama ve kopma anındaki uzama parametrelerine benzemekte olup, karşılaştırıldığında deney grubunda elastikiyetin arttığı her iki çalışmada da anlamlı olarak bulunmuştur.

Çalışmamızın histolojik verileri gruplar arasında karşılaştırıldığında şu yorumlara ulaşılmıştır:

Bonar skorlamasına göre; kollajen parametresinde (4. hafta $p = 0.041$, 8. hafta $p = 0.009$) ve toplam Bonar skorunda (4. hafta $p = 0.044$, 8. hafta $p = 0.009$) hem 4. hem 8. haftalarda kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu sonuçlar, deney grubunun tendon dokusundaki kollajen ve genel histolojik yapının, kontrol grubuna kıyasla hem 4. hem de 8. haftalarda önemli ölçüde iyi yönde farklı olduğunu göstermektedir. Aralıklı hipoksik deneysel müdahalenin tendon dokusu üzerindeki etkisi zamanla artmış ve belirginleşmiştir, bu da 8. hafta verilerinde daha düşük p -değerleriyle kendini göstermiştir. Ratların supraspinatus tendonları üzerinde yapılan benzer bir çalışmada Larsen ve ark. toplamda 2 hafta olan daha kısa bir gözlem süresi, gece gündüz birer saat olmak üzere toplamda iki saat olacak şekilde daha az bir hipoksi maruziyeti ve %13.5 oksijen seviyesinde olmak üzere daha yüksek bir oksijen seviyesi ile genel histolojik iyileşmenin iyi olduğunu belirtmiş ancak yöntemlerine ulaşamamıştır.⁸¹

Movin skorlamasına göre; kontrol grubu zamansal olarak incelendiğinde vaskülarite artışı parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.041$) Bu sonuçlar, kontrol grubundaki tendon dokusunun vaskülarite artışının zamanla arttığını göstermiştir. Daha önce bahsedilen Larsen ve ark. yaptığı çalışmada sistemik

eritropoetin hormon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.⁸¹ Bizim çalışmamızda ortaya çıkan vaskülarite artışı da bu çalışmayla örtüşmüş ve hipotezimizi desteklemiştir.

Movin skorlamasına göre; deney grubu zamansal olarak incelendiğinde toplam Movin skorunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.007$) Deney grubundaki bu anlamlı azalış yönündeki fark, bize aralıklı hipoksi uygulamasının olumlu etkisininin zamanla devam ettiğini göstermiştir.

Movin skorlamasına göre; kontrol ve deney grubu 4. haftada gruplar arası farklılık yönünden incelendiğinde toplam Movin skorunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p = 0.001$) Deney grubundaki bu anlamlı azalış yönündeki fark, bize aralıklı hipoksi uygulamasının olumlu etkisininin henüz 4. haftada başladığını toplam skor üzerinden göstermiştir.

Movin skorlamasına göre; kontrol ve deney grubu 8. haftada gruplar arası farklılık yönünden incelendiğinde toplam Movin skorunda ($p = 0.004$) ve hyalinizasyon ($p = 0.041$) parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu, aralıklı hipoksinin uzun vadede tendon sağlığını, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde iyileştirdiğini göstermektedir. Ayrıca hyalinizasyonun anlamlı azalması da deney grubunda tendon patolojisinin kontrol grubuna göre daha az olduğunu veya daha iyi bir iyileşme süreci yaşandığını göstermektedir.

Nourissat skarlama sistemine göre; 4. haftada kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında bileşkedeki hücre parametresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p = 0.026$) Bileşkedeki tenosit hücrelerinin deney grubunda daha fazla olması, yani bileşkedeki hücre parametresinin skorunun azalma yönündeki bu anlamlı fark aralıklı hipoksinin bileşkede tenosit sayısını artırarak etki yarattığını göstermektedir. Zhang ve ark. insan kök hücre kültürleri ile yaptığı bir çalışmada %5 oksijen seviyesinde hücrelerin kök hücre özelliklerini daha kontrol grubuna göre daha iyi korunduğu gösterilmiş ve kök hücre belirtilerinin daha fazla arttığı ayrıca tendon benzeri yapıların daha fazla oluştuğu gösterilmiştir.⁸² Bu, bize bileşkedeki tenosit sayısının artışının benzer şekilde kök hücrelerin aktivasyonuna bağlı gerçekleşmiş olabileceği düşündürmektedir.

Nourissat skarlama sistemine göre; 8. haftada kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında kollojen organizasyonu parametresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p = 0.015$) Kollojen organizasyonu parametresinin skorundaki azalma yönündeki bu anlamlı fark, aralıklı hipoksinin bileşkede kollojen liflerinin daha düzenli ve paralel

olmasını sağladığını gösterir. Campillo ve ark. hücre kültürlerinde değişken oksijen seviyelerinde yaptığı bir çalışmada endotelial yara iyileşmesine bakılmış ve aralıklı hipoksinin bu iyileşmede etkin olduğu gösterilmiştir.⁸³ Yara iyileşmesinde kollojen oluşumu anahtar bir rol oynadığından, bizim çalışmamızda da kollojen organizasyonunun deney grubunda artmış olması aralıklı hipoksinin olumlu bir etkisi olarak yorumlanmıştır.

Literatürde aralıklı hipoksinin kemik-tendon bileşkesi üzerine etkileri histolojik düzeyde iyi incelenmemiş olup bu skorlamaları karşılaştırabileceğimiz bir makale veya veri bulunmamaktadır. Çalışma bu yönden mevcut literatüre teorik bir katkı sunmaktadır. Henüz insan çalışmaları için bu tarz lokal uygulanabilecek aralıklı hipoksi uygulaması metodu olmadığından, çalışmamız pratik yönden bir katkı sunmamaktadır. Ancak aralıklı hipoksi uygulamasına en yakın klinik durumların bulunup küçük hasta grupları ile bu çalışmaların yapılması durumunda, hayvan çalışmamızla karşılıklı olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızın zayıf yönlerinden biri normobarik aralıklı hipoksi uygulaması manuel olarak uygulanmıştır, bu uygulamanın otomatize sistemlerle daha uygun ve oksijen seviyelerinin minimum dalgalanması sağlanarak daha doğru sonuçlara ulaşması mümkündür. Ayrıca biyomekanik testler Testometric(M500-50CT, İngiltere) cihazı ile yapılmış olup bu cihaza numunelerin konulması ve bileşkenin koparılmaya çalışılması sırasında aksaklıklar yaşanmıştır. Kemik-tendon bileşkesinin her numunede tam olarak kopmasını sağlayabilecek ve daha doğru veri setlerine ulaşmayı sağlayacak başka bir cihaz kullanma imkanımız olmaması nedeniyle bu durum çalışmada zayıflık oluşturmuştur. İmmünohistokimyasal belirteçlerin kullanılmaması da bu çalışmanın başka zayıf bir yönüdür.

Bu çalışmada deney hayvanları laboratuvarımızın erkek hayvan üretiminde oluşan aşırı talep nedeniyle dişi hayvanlar kullanılmıştır. Literatürde hayvan deneylerinde erkek hayvanlar tercih edilmekte ve bu durum standart bir uygulama olarak kabul görmektedir. Bu çalışmada dişi hayvanların kullanılması, çalışmanın sonuçlarının cinsiyetler arası biyolojik farklılıklar nedeniyle literatürdeki diğer çalışmalarla doğrudan karşılaştırılabilirliğini sınırlamaktadır. Dişi hayvanların hormonal döngüleri ve doku iyileşme süreçleri farklı olabileceğinden, bu çalışmanın bulguları yalnızca dişi hayvan popülasyonunu yansıtmaktadır. Bu durum, sonuçların genellenebilirliği açısından bir zayıflık teşkil edebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda biyomekanik olarak normobarik aralıklı hipoksinin, kemik-tendon bileşkesi iyileşmesi sırasında; tendonun elastikiyetini arttırdığı, kuvvet taşıma kapasitesini arttırdığı ve daha fazla gerilim taşımasını sağladığı saptanmıştır.

Çalışmamızda histolojik olarak Bonar ve Movin skorlama sistemi toplam skoruna göre normobarik aralıklı hipoksinin kemik-tendon bileşkesi iyileşmesini arttırdığı saptanmıştır.

Çalışmamızda, hayvan deneyi modelinde normobarik aralıklı hipoksinin kemik-tendon bileşkesi iyileşmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiş olsa da bu etkilerin klinik insan deneyleriyle ve farklı hipoksi süreleri veya oksijen seviyeleri ile deneysel çalışmalarda araştırılması faydalı olacaktır.

Çalışmamız, gelecekte lokal hipoksi uygulaması gerçekleştirebilecek cihazların tasarlanmasında uygun bir bilimsel dayanak olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S.** Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* **2006**;208(4):471-490. doi:10.1111/J.1469-7580.2006.00540.X
2. **Panni AS, Denti M, Franzese S, Monteleone M.** The bone-ligament junction: A comparison between biological and artificial ACL reconstruction. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy.* **1993**;1(1):9-12. doi:10.1007/BF01552151/METRICS
3. **Kim HJ, Kang SW, Lim H chul, et al.** The role of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein with fibrin glue in healing of bone-tendon junction injury. *Connect Tissue Res.* Published online **2007**.
4. **Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS.** Structural and Ultrastructural Characteristics of Bone-Tendon Junction of the Calcaneal Tendon of Adult and Elderly Wistar Rats. *PLoS One.* **2016**;11(4). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0153568
5. **Weiler A, Hoffmann RFG, 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.* **2002**;18 2(2):124-135. doi:10.1053/JARS.2002.30657
6. **Zhang X, Song W, Han K, et al.** Three-Dimensional Bioprinting of a Structure-, Composition-, and Mechanics-Graded Biomimetic Scaffold Coated with Specific Decellularized Extracellular Matrix to Improve the Tendon-to-Bone Healing. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2023**;15(24):28964-28980. doi:10.1021/ACSAMI.3C03793
7. **Nakase J, Kitaoka K, Matsumoto K, Tomita K.** Facilitated tendon-bone healing by local delivery of recombinant hepatocyte growth factor in rabbits. *Arthroscopy.* **2010**;26 1(1):84-90. doi:10.1016/J.ARTHRO.2009.06.029
8. **Serebrovskaya T V., Nosar VI, Bratus L V., Gavenauskas BL, Mankovska IM.** Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol.* **2013**;14 3(3):280-288. doi:10.1089/HAM.2013.1012
9. **Wang H, Zhu HF, Xia R, Zhou ZN, Zhu PH.** Effect of intermittent and continuous hypoxia on ryanodine receptors of rat heart. *Life Sci.* **2003**;73 17(17):2151-2160. doi:10.1016/S0024-3205(03)00599-X
10. **Panisello P, Torrella JR, Pagés T, Viscor G.** Capillary supply and fiber morphometry in rat myocardium after intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *High Alt Med Biol.* **2007**;8 4(4):322-330. doi:10.1089/HAM.2007.1030
11. **Tei MM, Farraro KF, Woo SLY.** Ligament and tendon entheses: Anatomy and mechanics. In: *Structural Interfaces and Attachments in Biology.* Vol 9781461433170. Springer New York; **2013**:69-89. doi:10.1007/978-1-4614-3317-0_4
12. **Benjamin M, McGonagle D.** Enteses: Tendon and ligament attachment sites. *Scand J Med Sci Sports.* **2009**;19(4):520-527. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00906.x
13. **Thomopoulos S, Kim HM, Rothermich SY, Biederstadt C, Das R, Galatz LM.** Decreased muscle loading delays maturation of the tendon enthesis during postnatal development. *J Orthop Res.* **2007**;25(9):1154-1163. doi:10.1002/JOR.20418

14. **Gao J, Messner K, Ralphs JR, Benjamin M.** An immunohistochemical study of enthesis development in the medial collateral ligament of the rat knee joint. *Anat Embryol.* **1996**;194:399-406.
15. **Benjamin M, Ralphs Jr.** Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat.* **1998**;193 (Pt 4)(Pt 4):481-494. doi:10.1046/J.1469-7580.1998.19340481.X
16. **Apostolakos J, Durant TJ, Dwyer CR, et al.** *The Enthesis: A Review of the Tendon-to-Bone Insertion.* Vol 4.; **2014**.
17. **Benjamin M, Ralphs Jr.** Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat.* **1998**;193 (Pt 4)(Pt 4):481-494. doi:10.1046/J.1469-7580.1998.19340481.X
18. **Haus J, Halata Z.** *Innervation of the Anterior Cruciate Ligament.* Vol 14.; **1990**.
19. **Zelzer E, Blitz E, Killian ML, Thomopoulos S.** Tendon-to-bone attachment: From development to maturity. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **2014**;102(1):101-112. doi:10.1002/bdrc.21056
20. **Blitz E, Sharir A, Akiyama H, Zelzer E.** Tendon-bone attachment unit is formed modularly by a distinct pool of Scx- and Sox9-positive progenitors. *Development.* **2013**;140(13):2680-2690. doi:10.1242/DEV.093906
21. **Killian ML.** Growth and mechanobiology of the tendon-bone enthesis. *Semin Cell Dev Biol.* **2022**;123:64-73. doi:10.1016/j.semcdb.2021.07.015
22. **Schlesinger SY, Seo S, Pryce BA, et al.** Loss of Smad4 in the scleraxis cell lineage results in postnatal joint contracture. *Dev Biol.* **2021**;470:108-120. doi:10.1016/J.YDBIO.2020.11.006
23. **Mu Y, Gudey SK, Landström M.** Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* **2012**;347(1):11-20. doi:10.1007/S00441-011-1201-Y
24. **Abraham AC, Shah SA, Golman M, et al.** Targeting the NF- κ B signaling pathway in chronic tendon disease. *Sci Transl Med.* **2019**;11(481). doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAV4319
25. **Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R.** Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. *Development.* **2009**;136(8):1351-1361. doi:10.1242/DEV.027342
26. **Blitz E, Viukov S, Sharir A, et al.** Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction. *Dev Cell.* **2009**;17(6):861-873. doi:10.1016/J.DEVCEL.2009.10.010
27. **Ovchinnikov DA, Selever J, Wang Y, et al.** BMP receptor type IA in limb bud mesenchyme regulates distal outgrowth and patterning. *Dev Biol.* **2006**;295(1):103-115. doi:10.1016/J.YDBIO.2006.03.013
28. **Stern T, Aviram R, Rot C, et al.** Isometric Scaling in Developing Long Bones Is Achieved by an Optimal Epiphyseal Growth Balance. *PLoS Biol.* **2015**;13(8):1002212. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1002212
29. **Eyal S, Kult S, Rubin S, et al.** Bone morphology is regulated modularly by global and regional genetic programs. *Development.* **2019**;146(14). doi:10.1242/DEV.167882
30. **Schwartz AG, Long F, Thomopoulos S.** Enthesis fibrocartilage cells originate from a population of Hedgehog-responsive cells modulated by the loading environment. *Development.* **2015**;142(1):196-206. doi:10.1242/DEV.112714
31. **Kult S, Olender T, Osterwalder M, et al.** Bi-fated tendon-to-bone attachment cells are regulated by shared enhancers and KLF transcription factors. *Elife.* **2021**;10:1-29. doi:10.7554/ELIFE.55361

32. **Liang G, Katz LD, Insogna KL, Carpenter TO, MacIca CM.** Survey of the enthesopathy of X-linked hypophosphatemia and its characterization in Hyp mice. *Calcif Tissue Int.* **2009**;85(3):235-246. doi:10.1007/S00223-009-9270-6
33. **Yu K, Ornitz DM.** FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development.* **2008**;135(3):483-491. doi:10.1242/DEV.013268
34. **Schwartz AG, Long F, Thomopoulos S.** Enthesis fibrocartilage cells originate from a population of Hedgehog-responsive cells modulated by the loading environment. *Development.* **2015**;142(1):196-206. doi:10.1242/DEV.112714
35. **Fang F, Sup M, Luzzi A, Ferrer X, Thomopoulos S.** Hedgehog signaling underlying tendon and entheses development and pathology. *Matrix Biol.* 2022;105:87. doi:10.1016/J.MATBIO.2021.12.001
36. **Atesok K, Fu FH, Wolf MR, et al.** Augmentation of tendon-to-bone healing. *J Bone Joint Surg Am.* **2014**;96(6):513-521. doi:10.2106/JBJS.M.00009
37. **Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, et al.** Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res.* **2006**;24(3):541-550. doi:10.1002/JOR.20067
38. **Fujioka H, Thakur R, Wang GJ, Mizuno K, Balian G, Hurwitz SR.** Comparison of surgically attached and non-attached repair of the rat Achilles tendon-bone interface. Cellular organization and type X collagen expression. *Connect Tissue Res.* **1998**;37(3-4):205-218. doi:10.3109/03008209809002440
39. **Wen CY, Qin L, Lee KM, Wong MWN, Chan KM.** Grafted tendon healing in tibial tunnel is inferior to healing in femoral tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction: a histomorphometric study in rabbits. *Arthroscopy.* **2010**;26(1):58-66. doi:10.1016/J.ARTHRO.2009.06.025
40. **Ahmed IM, Lagopoulos M, McConnell P, Soames RW, Sefton GK.** Blood supply of the Achilles tendon. *J Orthop Res.* **1998**;16(5):591-596. doi:10.1002/JOR.1100160511
41. **Petersen W, Hohmann G, Stein V, Tillmann B.** The blood supply of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Br.* **2002**;84-B(1):141-144. doi:10.1302/0301-620X.84B1.0840141/PDF
42. **Petersen W, Stein V, Tillmann B.** Blood supply of the tibialis anterior tendon. *Arch Orthop Trauma Surg.* **1999**;119(7-8):371-375. doi:10.1007/S004020050431
43. **Zhao J, Zhang P, Qin L, Pan XH.** Hypoxia is essential for bone-tendon junction healing: The molecular biological evidence. *Int Orthop.* **2011**;35(6):925-928. doi:10.1007/S00264-010-1157-7/METRICS
44. **Boskey AL.** Signaling in response to hypoxia and normoxia in the intervertebral disc. *Arthritis Rheum.* **2008**;58(12):3637-3639. doi:10.1002/ART.24071
45. **Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT.** In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Eng.* **2007**;13(12):2981-2993. doi:10.1089/TEN.2007.0050
46. **Brihimi-Horn MC, Pouyssegur J.** HIF at a glance. *J Cell Sci.* **2009**;122(Pt 8):1055-1057. doi:10.1242/JCS.035022
47. **Semenza GL.** Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* **2004**;19(4):176-182. doi:10.1152/PHYSIOL.00001.2004

48. **Pfeiffenberger M, Hoff P, Thöne-Reineke C, Buttgerit F, Lang A, Gaber T.** The In Vitro Human Fracture Hematoma Model - A Tool for Preclinical Drug Testing. *ALTEX*. **2020**;37(4):561-578. doi:10.14573/ALTEX.1910211
49. **Shiu HT, Leung PC, Ko CH.** The roles of cellular and molecular components of a hematoma at early stage of bone healing. *J Tissue Eng Regen Med*. **2018**;12(4):e1911-e1925. doi:10.1002/TERM.2622
50. **Chen Z, Jin M, He H, et al.** Mesenchymal stem cells and macrophages and their interactions in tendon-bone healing. *J Orthop Translat*. **2023**;39:63-73. doi:10.1016/J.JOT.2022.12.005
51. **Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S, Blanco FJ.** Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential. *Stem Cells Int*. Published online **2013**. doi:10.1155/2013/232896
52. **Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, et al.** The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull*. **2015**;5(2):141. doi:10.15171/APB.2015.021
53. **Dunwoodie SL.** The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Dev Cell*. **2009**;17(6):755-773. doi:10.1016/J.DEVCEL.2009.11.008
54. **Schipani E, Mangiavini L, Merceron C.** HIF-1 α and growth plate development: what we really know. *Bonekey Rep*. **2015**;4:730. doi:10.1038/BONEKEY.2015.99
55. **Amarilio R, Viukov S V., Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E.** HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*. **2007**;134(21):3917-3928. doi:10.1242/DEV.008441
56. **Simon MC, Keith B.** The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008** 9:4. **2008**;9(4):285-296. doi:10.1038/nrm2354
57. **Stegen S, Laperre K, Eelen G, et al.** HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature* **2019** 565:7740. **2019**;565(7740):511-515. doi:10.1038/s41586-019-0874-3
58. **Yao Q, Khan MP, Merceron C, et al.** Suppressing Mitochondrial Respiration Is Critical for Hypoxia Tolerance in the Fetal Growth Plate. *Dev Cell*. **2019**;49(5):748-763.e7. doi:10.1016/J.DEVCEL.2019.04.029
59. **Lorenz MR, Brazill JM, Beeve AT, Shen I, Scheller EL.** A Neuroskeletal Atlas: Spatial Mapping and Contextualization of Axon Subtypes Innervating the Long Bones of C3H and B6 Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. **2021**;36(5):1012-1025. doi:10.1002/JBMR.4273
60. **Zhang L, Jin L, Guo J, et al.** Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Enhances Bone Fracture Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2021**;11. doi:10.3389/FENDO.2020.582670/PDF
61. **Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Ding HL, Zhou ZN.** ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. **2003**;73(10):1275-1287. doi:10.1016/S0024-3205(03)00429-6
62. **Zhu WZ, Xie Y, Chen L, Yang HT, Zhou ZN.** Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. **2006**;40(1):96-106. doi:10.1016/J.YJMCC.2005.09.016
63. **Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Wang JC, Fang QZ, Zhou ZN.** Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacol Sin*. **2002**;23(4):305-310. Accessed December 21, 2023. <https://europepmc.org/article/med/11931703>

64. **Zhang Y, Zhong N, Zhou ZN.** Estradiol potentiates antiarrhythmic and antioxidative effects of intermittent hypoxic rat heart. *Acta Pharmacol Sin.* Published online **2000**.
65. **Cheng WJ, Liu X, Zhang L, et al.** Chronic intermittent hypobaric hypoxia attenuates skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in mice. *Life Sci.* **2019**;231:116533. doi:10.1016/J.LFS.2019.06.008
66. **Guner I, Uzun DD, Yaman MO, et al.** The effect of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on bone mineral density in rats: role of nitric oxide. *Biol Trace Elem Res.* **2013**;154(2):262-267. doi:10.1007/S12011-013-9722-8
67. **Durand M, Collombet JM, Frasca S, et al.** In vivo hypobaric hypoxia performed during the remodeling process accelerates bone healing in mice. *Stem Cells Transl Med.* **2014**;3(8):958-968. doi:10.5966/SCTM.2013-0209
68. **Yuan F, Teng X, Guo Z, Zhou JJ, Zhang Y, Wang S.** Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates endoplasmic reticulum stress mediated liver damage induced by fructose in rats. *Life Sci.* **2015**;121:40-45. doi:10.1016/J.LFS.2014.11.019
69. **Tian YM, Guan Y, Li N, et al.** Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates diabetic nephropathy through enhancing HIF1 signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* **2016**;118:90-97. doi:10.1016/J.DIABRES.2016.06.021
70. **Bromer FD, Brent MB, Pedersen M, Thomsen JS, Brüel A, Foldager CB.** The Effect of Normobaric Intermittent Hypoxia Therapy on Bone in Normal and Disuse Osteopenic Mice. *High Alt Med Biol.* **2021**;22(2):225-234. doi:10.1089/ham.2020.0164
71. **Torres M, Montserrat JM, Pavía J, et al.** Chronic intermittent hypoxia preserves bone density in a mouse model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* **2013**;189(3):646-648. doi:10.1016/j.resp.2013.08.016
72. **Alvarez-Martins I, Remédio L, Matias I, Diogo LN, Monteiro EC, Dias S.** The impact of chronic intermittent hypoxia on hematopoiesis and the bone marrow microenvironment. *Pflugers Arch.* **2016**;468(5):919-932. doi:10.1007/s00424-016-1797-6
73. **Dou ZJ, Gao XL, Jia YL, et al.** CB1 receptor antagonist rimonabant protects against chronic intermittent hypoxia-induced bone metabolism disorder and destruction in rats. Published online **2009**. doi:10.1007/s11325-019-02009-9/Published
74. **Kim G, Elnabawi O, Shin D, Pae EK.** Transient intermittent hypoxia exposure disrupts neonatal bone strength. *Front Pediatr.* **2016**;4(MAR). doi:10.3389/fped.2016.00015
75. **Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, et al.** Intermittent hypoxia influences alveolar bone proper microstructure via hypoxia-inducible factor and VEGF expression in periodontal ligaments of growing rats. *Front Physiol.* **2016**;7(SEP). doi:10.3389/fphys.2016.00416
76. **Fearon A, Dahlstrom JE, Twin J, Cook J, Scott A.** The Bonar score revisited: region of evaluation significantly influences the standardized assessment of tendon degeneration. *J Sci Med Sport.* **2014**;17(4):346-350. doi:10.1016/J.JSAMS.2013.07.008
77. **Maffulli N, Longo UG, Franceschi F, Rabitti C, Denaro V.** Movin and Bonar scores assess the same characteristics of tendon histology. *Clin Orthop Relat Res.* **2008**;466(7):1605-1611. doi:10.1007/S11999-008-0261-0
78. **Nourissat G, Diop A, Maurel N, et al.** Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PLoS One.* **2010**;5(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0012248

79. **Chen G, Zhang W, Zhang K, et al.** Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cells Exhibit Stronger Tenogenic Differentiation Capacities and Promote Patellar Tendon Repair in Rabbits. *Stem Cells Int.* **2020**;2020. doi:10.1155/2020/8822609
80. **Zhang LN, Wan WB, Wang YX, et al.** Evaluation of Elastic Stiffness in Healing Achilles Tendon After Surgical Repair of a Tendon Rupture Using In Vivo Ultrasound Shear Wave Elastography. *Medical Science Monitor.* **2016**;22:1186-1191. doi:10.12659/MSM.895674
81. **Larsen MC, Elmengaard B, Pedersen M, Foldager CB.** Intermittent systemic hypoxia – A possible way to improved regeneration. *The FASEB Journal.* **2019**;33(S1). doi:10.1096/FASEBJ.2019.33.1_SUPPLEMENT.611.1
82. **Zhang J, Wang JHC.** Human Tendon Stem Cells Better Maintain Their Stemness in Hypoxic Culture Conditions. *PLoS One.* **2013**;8(4). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0061424
83. **Campillo N, Falcones B, Montserrat JM, et al.** Frequency and magnitude of intermittent hypoxia modulate endothelial wound healing in a cell culture model of sleep apnea. *J Appl Physiol.* **2017**;123 5(5):1047-1054. doi:10.1152/JAPPLPHYSIOL.00077.2017