

Demineralize kemik matriksinin tendon-kemik iyileşmesi üzerine etkileri: Tavşanlarda *in vivo* deneysel çalışma

Önder İsmet KILIÇOĞLU¹, Göksel DİKMEN¹, Özgür KOYUNCU², Bilge BİLGİÇ³, Aziz Kaya ALTURFAN¹

¹*İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, İstanbul;*

²*Amerikan Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü, İstanbul;*

³*İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

Amaç: Bu çalışmanın amacı demineralize kemik matriksinin (DKM) tendon-kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmak idi.

Çalışma planı: On iki Yeni Zelanda tavşanının her iki bacağına uzun dijital ekstansör tendon tibia proksimalinde açılan tünelin içine askı dikiş yöntemi ile tespit edildi. Sağ tibialarda tendon tünele yerleştirilmeden önce tünel içine tavşan kaynaklı DKM enjekte edildi. Sol tibialar ise kontrol grubu olarak alındı ve sadece uzun dijital ekstansör tendonları tünel içerisinde tespit edildi. Üçüncü, 6. ve 9. haftalarda 4'er adet tavşan rastgele şekilde intravenöz yüksek doz (200 mg/kg) pentotal ile sakrifiye edildi ve tavşanların her iki bacağı histolojik inceleme için alındı. Örnekler histopatolojik açıdan fibrokartilaj oluşumu, yeni kemik oluşumu, tendonun kemik tünel içerisindeki tutunması ve Sharpey lifleri oluşumu açısından bir skorlama sistemi ile kör ve bağımsız bir şekilde değerlendirildi.

Bulgular: Üçüncü haftada DKM grubunda Sharpey lifleri, fibrokartilaj ve yeni kemik oluşumu skorlarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Altıncı ve 9. haftalarda ise histolojik değerlendirme parametreleri açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Çıkarımlar: Demineralize kemik matriksinin kemik tünel hayvan modelinde tendon-kemik iyileşmesi sürecinin ilk 3 haftasında yeni kemik oluşumunu ve Sharpey liflerinin sayısını artırdığı görüldü.

Anahtar sözcükler: Demineralize kemik matriksi; tendon-kemik iyileşmesi; kemik tünel.

Kemik tünel içerisindeki tendon greftin iyileşmesi birçok rekonstrüksiyon tekniğinde başarılı sonuçlar elde edilmesi için gerekli temel biyolojik süreçtir. Tünel içi tendon-kemik iyileşmesindeki kalite ve iyileşme hızı cerrahi sonrası erken rehabilitasyon programı ve spora dönüşte önemli kriterlerdir.^[1]

Rekonstrüksiyon sonrası dönemde uzamış immobilizasyon süreci tendonun zayıflamasına, eklem sertliği-

ne ve başarısız sonuçlara neden olmaktadır.^[2] Öte yandan, biyolojik iyileşme sürecinin sağlıklı ve sorunsuz devamı için rekonstrüksiyon sonrası dönemde tendon-kemik ara yüzünde erken hareketten kaçınılmasının faydalı olacağı da savunulmuştur. Bununla birlikte, yapılan çoğu çalışmada ilk tespitin gücünün farklı tespit teknikleri ile artırılması ve sonrasında kontrollü erken harekete başlanması üzerinde durulmuştur.^[3-5]

Yazışma adresi: Dr. Göksel Dikmen, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Çapa, Fatih, 34093, İstanbul.
Tel: 0212 - 414 20 00 - Dahili: 31511 e-posta: gdkmen@yahoo.com

Başvuru tarihi: 18.09.2011 **Kabul tarihi:** 13.07.2012

©2012 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi:10.3944/AOTT.2012.2748
Karekod (Quick Response Code):



Gallie ve Le Mesurier'in^[6] 1922'de tendonun kemik dokusu içerisindeki davranışını inceleyen çalışmasını takiben araştırmacılar iyileşme sürecinde tendonların kemik üzerinde veya içerisinde kemikleşmiş halde tutunmasını gösteren birçok hayvan çalışması yapmışlardır. İyileşme sürecinde tendon ve kemik arasında yeni oluşan liflere Sharpey'in lifleri denilmektedir. Bu lifler tendonun uzun aksına dik olarak uzanmakta ve kemiği delerek tendonun kemiğe sıkıca, indirekt tutunmasını sağlayan primer yapılardır.^[7,8] Sharpey'in tanımlamasından bugüne daha erken ve daha güçlü tespit sağlamak için birçok biyolojik ve biyolojik olmayan çalışma (farklı tespit tekniklerinin kullanıldığı) yapılmıştır. Kemik tünel içerisine büyüme faktörlerinin eklenmesi (kemik morfolojik proteinleri, transforme edici büyüme faktörü-, gibi), mezenkimal kök hücre uygulamaları, kollajen yıkımını sağlayan matriks metalloproteinazlarını inhibe eden ajanların uygulanması gibi biyolojik süreci hızlandıran birçok yöntem çalışmalarda denenmiştir. Bu çalışmalarda biyolojik adjuvanların tendon kemik iyileşmesini olumlu yönde etkiledikleri belirtilmiştir.^[9-12] Diğer bir çalışmada, tavşanlarda hiperbarik oksijen tedavisinin tendon-kemik iyileşmesi üzerine biyolojik ve mekanik olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.^[13] Tendonun tünele yerleştirilmeden önce cerrahi sırasında kalsiyum fosfat ile hibridasyonunun ve tendonun tünele yerleştirilmeden önce periost ile sarmalanmasının tendon-kemik iyileşmesini arttırdığı bildirilmektedir.^[14,15] Yapılan bu çalışmalarda deneysel olarak iyileşme süreci için olumlu sonuçlar bildirilmişse de klinik olarak halen rutin kullanılan biyolojik bir ajan mevcut değildir.

Demineralize kemik matriksi (DKM) kemiğin asit ekstrasyonu sonrası mineralize komponentinin uzaklaştırılması ile elde edilmektedir.^[16] DKM, kollajen ve kollajen olmayan proteinleri, kemik morfolojik proteinlerini (KMP), transforme edici büyüme faktörlerini (TGF- β 1, 2 ve 3) ve büyüme farklılaştırma faktörlerini içerir.^[17] DKM osteoindüktiftir ve bunu encondral kemikleşme sağlayarak yapar.^[18,19] Günümüzde, DKM kaynama yokluğunun tedavisinde, omurga füzyonlarında ve kemik defektlerinin doldurulmasında kullanılmaktadır.^[20-22] Tendon-kemik tutunması tendonun kemik tünel yüzeyine ilerleyici mineralizasyonu ve mekanik yüklere maruz kalan dokunun yeniden şekillenmesi ile oluşmaktadır.^[23] Tendon-kemik tutunmasında DKM'nin olası etkisi ise, birçok büyüme faktörünü içermesiyle, encondral kemikleşme sağlaması ve tendon-kemik ara yüzünde iyileşme için görev alacak birçok hücre için iskelet alt yapı oluşturması olabilir.

Bu çalışmadaki amacımız, DKM'nin kemik tünel içinde tendon iyileşmesine etkisi olup olmadığının belirlenmesi ve kemik tünel çevresinde anormal kemik

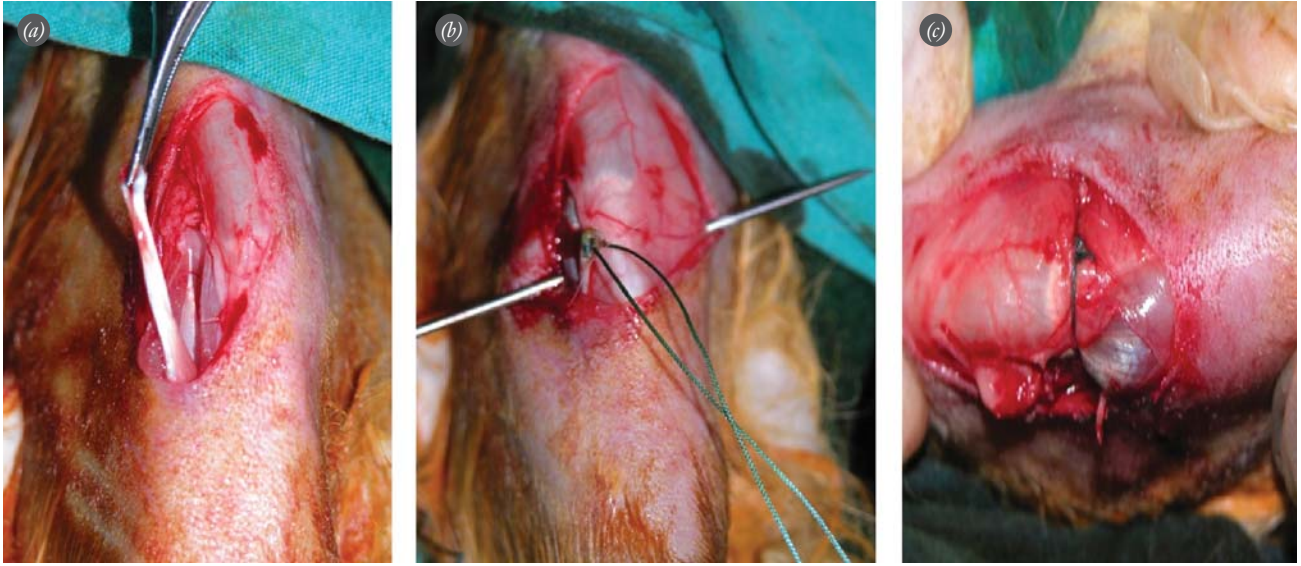
yapımına neden olup olmayacağının histolojik olarak değerlendirilmesi idi.

Gereç ve yöntemler

Çalışmada İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilen 12 erişkin erkek Yeni Zelanda albino türü tavşan (yaş: 8 ila 12 ay; ağırlık: 2.7 ila 4.0 kg) kullanıldı. Çalışmanın etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden alındı. Tavşanların her iki dizinde lateral femur kondilinden uzun dijital ekstansör (extensor digitorum longus, EDL) tendon kesilerek tibia proksimalinde eklem dışına açılan kemik tünele tespit edildi.^[24] Çalışma grubunda; sağ tibiada açılan tünele, tavşan uzun kemiklerinden elde edilen 1.5 ml DKM (Musculoskeletal Transplant Foundation; Edison, NJ, ABD) uygulandı.^[25] Kontrol grubunda, EDL tendonu aynı hayvanın sol tibiasında, tünel içinde tespit edildi.

Tavşanlara 100 mg/kg ketamin (Ketalar; Sigma, St Louis, MO, ABD) ve 8 mg/kg ksilazin (Rompun; Sigma, St Louis, MO, ABD) ile intramüsküler anestezi uygulandı. Ameliyat öncesi 50 mg/kg sefazolin sodyum ile enfeksiyon profilaksisi sağlandı. Tavşanların gün içindeki diurnal değişikliklerini standardize etmek için ameliyatlara sabah 9 ila 12 arasında gerçekleştirildi. Her iki dizde traşlama, povidon-iyot solüsyonu ile cerrahi saha temizliği ve steril örtme işlemi yapıldı. Her iki diz eklemi lateral parapatellar kesi ile ortaya koyulduktan sonra cilt kesisi tibia distali gözükecek şekilde uzatıldı.^[24] Uzun ekstansör tendon lateral femur kondili başlangıç yerinden ayrıldı (Şekil 1a). Tibia proksimal metafizinde, tibia uzun kemik aksına 30° olacak şekilde, 2.5 mm genişliğinde kemik tünel açıldı (Şekil 1b). Açılan tünelin boyu ölçüldü ve serbestleştirilen tendonun açılan tünel boyunca kemikle temasta olmasına dikkat edildi. Tendon 3/0 emilmeyen dikiş materyali (Ethibond) kullanılarak askı dikiş yöntemi ile tünel içerisinde tespit edildi. Tendon, tünel içerisinden tespit edilmeden önce, her bir tavşanın sağ tibiasında tünel içerisine tavşan kaynaklı DKM enjekte edildi (Şekil 1c). Eklem kapsülü, cilt altı dokuları ve cilt 3/0 ipek kullanılarak kapatıldı. Ameliyattan sonra her bir tavşan ayrı kafese alındı ve herhangi bir immobilizasyon uygulanmadı. Üçüncü, 6. ve 9. haftalarda 4'er adet tavşan rastgele şekilde intravenöz yüksek doz (200 mg/kg) pentotal ile sakrifiye edildi. Her bir tavşanın sağ ve sol tibiası tibiofemoral eklem yüzünden ayrıldı ve histolojik inceleme için hazırlandı.

Sakrifikasyon sonrası toplanan tibialar, yumuşak dokuları temizlendikten hemen sonra, tamponlu %10 formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Ardından, örnekler 7 gün boyunca nitrik asit ile dekalsifikasyon



Şekil 1. (a) Dijital ekstansör tendonun yerinin belirlenmesinden sonra uzun ekstansör tendonun lateral femur kondilinden ayrılması. (b) Proximal tibia metafizinde ve tibia uzun kemik aksına 30° açı ile 2.5 mm genişliğinde kemik tünel açılması. (c) Tendonun emilmeyen suture materyali kullanılarak askı dikiş yöntemi ile tüneli içerisine tespiti. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

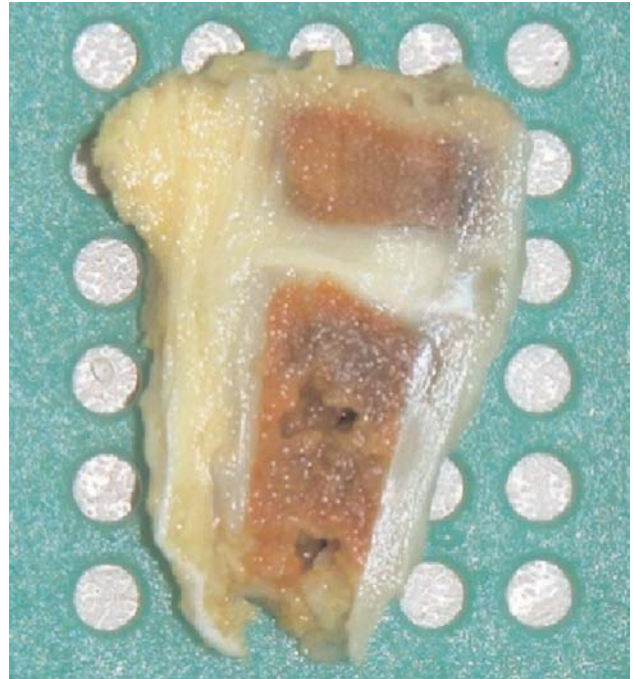
işlemine tabi tutuldu. Koronal planda kesiler ile ayrılan parçalar parafin blok içerisine gömüldü. Her bir parafin bloktan 3 ayrı kesit alındı (Şekil 2). Deparafinizasyon işleminden sonra, alınan kesitler hematoksil-eozin (H&E) ve Masson trikrom ile boyandı. Boyalı her bir kesit tendon-kemik ara yüzündeki yeni kemik oluşumu, fibrokartilaj oluşumu ve tendon greftin kemik tüneli içerisindeki tutunmasını kriter alan bir skorlama sistemi ile değerlendirildi (Tablo 1).^[13] Buna ek olarak, hedef sahadaki Sharpey lifleri sayısı ölçekli oküler mikrometrede kaplanan birim sayısı ile belirlendi. Tüm histolojik değerlendirme ve skorlamalar deney hayvanlarının hangi çalışma grubuna ait olduğunu bilmeyen iki patoloji uzmanı tarafından birbirlerinden bağımsız olarak yapıldı.

İstatistiksel analizde histolojik skorlar ve Sharpey lifleri sayısı için Mann-Whitney U testinden yararlanıldı. $P < 0.05$ eşik değeri anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

Bulgular

Deney sırasında hiçbir hayvanda cerrahi saha enfeksiyonu veya DKM'ye bağlı cilt reaksiyon gözlenmedi. Toplam ortalama skor 3. haftada DKM grubu için 6.5 ± 0.6 ve kontrol grubu için 5.25 ± 0.5 ; 6. haftada DKM grubu için 5.75 ± 0.25 ve kontrol grubu için 6 ± 0 olarak hesaplandı. Her iki grupta 9. haftada toplam ortalama skor 5.75 ± 0.25 idi. (Tablo 2). Bununla birlikte, DKM grubunda ilk 3 haftada tendon greftine uzanan daha fazla sayıda Sharpey lifleri (hedef sahadaki kareli

oküler mikrometrede gözlenen birim sayısı) görüldü (ortalama $n=19$). Altıncı ve 9. haftada ise hedef sahada ortalama 14 ve 13 Sharpey lifi saptandı.



Şekil 2. Dekalsifikasyon sonrasında tibia proksimalinden alınan koronal kesitte EDL tendonu ve kemik tüneli ile olan ilişkisi makroskopik olarak görülmekte. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

Tablo 1. Histolojik değerlendirme için skorlama sistemi.

Karakteristik Özellikler	Puan
Fibrokartilaj oluşumu	
Çok	3
Orta	2
Az	1
Yok	0
Yeni kemik oluşumu	
Çok	3
Orta	2
Az	1
Yok	0
Tendon greftin tünel içi tutunumu	
Çok	3
Orta	2
Az	1
Yok	0
Mükemmel puan	9

İlk 3 haftada, çalışma grubunda yeni kemik oluşumu, fibrokartilaj oluşumu ve tendon greftinin tünel içerisinde tutunumu kontrol grubuna göre daha yüksekti; ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p>0.05$). Altıncı haftadan sonra, gruplar arasında histolojik olarak değerlendirme kriterleri arasında bir farklılık görülmedi. Sharpey lifleri sayısı ilk 3 haftada DKM uygulanan grupta daha yüksek olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 3). Üçüncü, 6. ve 9. haftalar arasında

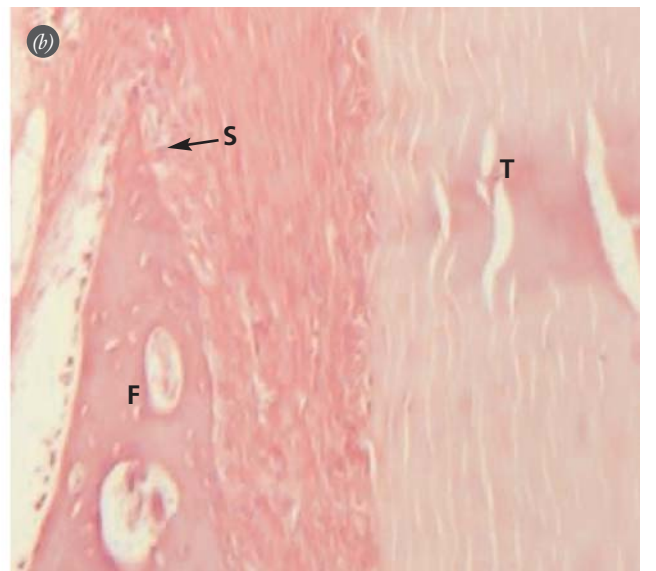
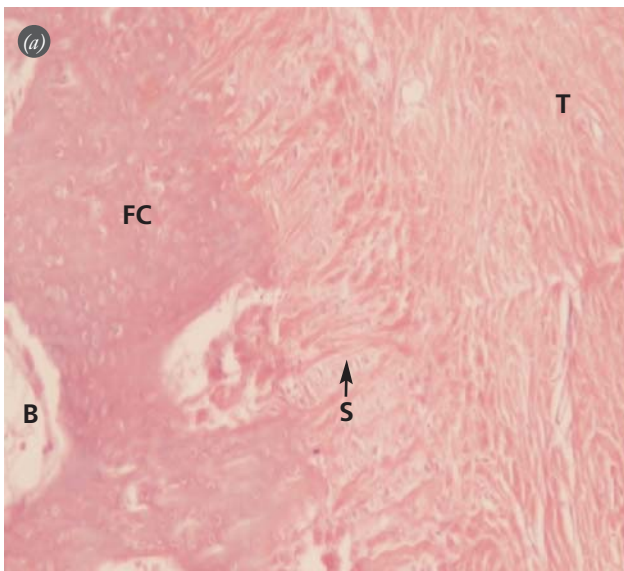
Tablo 2. Histolojik skorlama sonuçları.

Hafta	Kontrol grubu	Çalışma grubu (DKM uygulanan grup)	P değeri
3. hafta	5,5,6,5	6,6,7,7	$p>0.05$
6. hafta	6,6,6,6	5,6,6,6	$p>0.05$
9. hafta	6,6,5,6	6,6,5,6	$p>0.05$

tendon-kemik iyileşmesi histolojik değerlendirme parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Skorların 6. ve 9. haftada 3. haftaya göre azalmasının nedeninin fibrokartilaj oluşumunun yerini 6. ve 9. haftada kalsifiye kıvrıkdak ve yeni kemik oluşumuna bırakmasının olduğu düşünülmektedir.

Tartışma

Kemik tünel içerisinde tendon iyileşmesini hızlandırmak veya kolaylaştırmak, veya kalitesini arttırmak için DKM kullanımı, üzerinde henüz yeterli araştırma yapılmamış bir konudur. Bu konuda yapılmış en kapsamlı hayvan çalışmasında Sundar ve ark.,^[26] koyun patellar tendonunun kemikten ayrılması ve sütür ankor ile tekrar tespitini içeren çalışmalarında, tendon-kemik ara yüzünün DKM ile takviyesinin biyomekanik olarak daha güçlü, morfolojik ve fonksiyonel olarak daha üstün olduğu sonuçlar bildirmiştir. Bu çalışmada, ameliyat sonrası 12. haftada mineralize fibrokartilaj dokunun kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmekle birlikte, 12. haftada yapılan biyomekanik test-

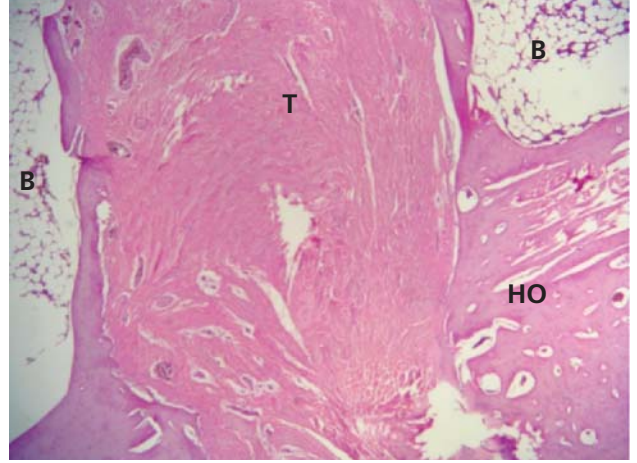


Şekil 3. (a) DKM uygulanan grupta 3. haftada alınan, H&E ile boyalı histolojik kesitlerde Sharpey lifleri ve yeni fibrokartilaj doku oluşumunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmekte (FK: Fibrokartilaj, K: Kemik, S: Sharpey lifleri [siyah ok], T: Tendon). (b) Kontrol grubunda 3. haftada alınan, H&E ile boyalı histolojik kesitlerde tendon-kemik ara yüzünde oluşan Sharpey lifleri ve fibrokartilaj doku. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

lerde ise iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bizim histolojik çalışmamızda gruplar arasında DKM kullanımından kaynaklanan belirgin bir üstünlük görmedik. Buna karşılık, 3. haftaya ait olan kesitlerde, DKM uygulanan grupta Sharpey lif oluşumu ve tüm histolojik değerlendirme parametre skorları daha yüksekti. Zamana bağlı oluşturduğumuz gruplarda DKM ve kontrol grupları arasında da anlamlı farklılık gözlenmedi. Çalışmamızın Sundar ve ark.'nın^[26] çalışmasından farkı, tünel içi tendon-kemik iyileşmesini irdelemesi ve tespit tekniklerinin farklı olmasıdır.

Histolojik kesitlerin bazılarında, özellikle 6. ve 9. haftaya ait olan kesitlerde, uygulanan DKM'nin çevre dokulara bulaşmasından kaynaklandığını düşündüğümüz heterotopik kemikleşme benzeri alanlara rastladık (Şekil 4). DKM uygulama tekniği sırasında bulaşmanın ötesinde, DKM içinden kontrollü olarak salınan KMP'lerin uygulanan cerrahi sahada normalden yüksek dozlara ulaşmasının bu duruma yol açtığını düşünmekteyiz. Bu durum kemik oluşumu indüksiyonundan kaynaklanabilecek orta ve uzun vadedeki komplikasyonları akla getirmektedir. Olası senaryolar, ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu sonrası DKM'nin eklem içine sızmasının yaratabileceği artrofibroz, rotatör manşet cerrahisinde yine aynı uygulamadan kaynaklanabilecek olan akromiyoplasti yüzeyinin tekrar kemikleşmesidir. Bundan dolayıdır ki, DKM kullanımını tendon rekonstrüksiyonunda henüz klinikte kullanım alanı bulamamıştır. Tendonların elastikiyetini irdelemek amacıyla DKM'ye maruz kalan tendonların orta ve uzun dönemde biyomekanik özelliklerinin değerlendirilmesi için yeni çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

Benzer hayvan modelini kullanan diğer bir deneysel çalışmada, KMP-2 ve periost öncül hücreleri ile tendonun takviye edildiği histolojik kesitlerde KMP-2 kullanılan grupta kontrol grubuna göre 3. ve 6. haftalarda Sharpey lif oluşum sayısının ve fibrokartilaj ara yüz dokusunun daha fazla oluştuğu gösterilmiştir.^[24] EDL tendonun periost ile sarmalandığı ve kemik tünel içerisinde iyileşmesini inceleyen diğer bir çalışmada^[15] ise 3. ve 6. haftalarda periost ile sarmalanan grupta tendon-kemik ara yüzünde fibrokartilaj ve granülasyon dokusu ile Sharpey liflerinin kontrol grubuna göre daha fazla oluştuğu izlenmiştir. Biyomekanik çekme testinde de, 3. ve 6. haftalarda, periost ile sarmalanan grupta anlamlı farklılık saptanmıştır. Bizim çalışmamız da, histolojik değerlendirme parametreleri açısından, aynı hayvan modelini kullanan bu iki çalışma ile benzer sonuçlar vermiştir. Üçüncü haftada genel skorlar toplamının 6. ve 9. haftaya göre daha yüksek bulunmasını fibrokartilaj oluşumunun ilk 3 haftada daha yüksek olmasına bağlamaktayız. Fibrokartilaj ve fibrovasküler dokunun daha fazla olması, kollajen liflerden meydana gelen



Şekil 4. DKM uygulanan grupta, 9. haftada alınan ve H&E ile boyalı kesitte heterotopik kemikleşme benzeri alanlar gözleniyor (HO: kemik tünel dışında bulunan heterotopik kemikleşme odağı, K: Kemik, T: Tendon). [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

Sharpey liflerinin daha kolay oluşabilmesine olanak sağlayabilir.^[13,15] Rodeo ve ark.'nın^[27] yaptığı deneysel çalışmada, tendon-kemik tutunması sırasında tünel içerisinde her bölgede uniform iyileşme olmadığı görülmüştür. Tendon ile kemik arasında oluşan fibrovasküler granülasyon dokusunun heterojen karakterde olduğu ve bazı bölgelerin kötü bazı bölgelerin ise iyi organize (kollajen liflerinin paralel dizilimli) olabildiğini göstermişlerdir.^[1,27] Bu nedenle, tünelden alınan kesitlerde yapılan histolojik incelemede farklı Sharpey lif sayıları gözlemlenmiş olabilir. İlk 3 haftadaki DKM grubunda saptanan yüksek Sharpey lif sayısı, bu durum nedeniyle anlamlı kabul edilmemelidir.

Çalışmamızın kısıtlayıcı bir yönü kullanılan denek sayılarının daha doğru histolojik ve istatistiksel değerlendirme yapmak için yetersiz olmasıydı. Ayrıca, tendonun biyomekanik kuvvetinin iyileşme süreci boyunca haftalara göre değerlendirilmemesi, çalışmanın gücünü azaltan önemli bir faktördür. Çalışmamızda gruplar arasında farklılık olmamasını örneklem sayısının az olmasına bağlamaktayız.

DKM osteokondüktif özelliği, enkondral kemikleşme sağlaması ve içerdiği büyüme faktörleri ile mineralize olmamış fibrokartilaj dokunun mineralizasyon sürecine katkıda bulunması ve Sharpey liflerinin oluşumunu arttırması ile tendon-kemik iyileşmesinde etkili olabilir. Bununla birlikte, DKM'nin kemik tünel içi tendon iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sadece histolojik açıdan irdelemek yeterli değildir ve biyomekanik olarak da bu iyileşme üzerine olası etkileri kanıtlanmalıdır.

Sonuç olarak, DKM'nin kemik tünel hayvan modelinde tendon-kemik iyileşmesi sürecinin ilk 3 haftasında yeni kemik oluşumunu ve Sharpey liflerinin sayısını arttırdığı görülmüştür.

Teşekkür

Yazarlar Sayın Emre Tomin'e çalışmada kullanılan tavşan demineralize kemik matriksinin teminindeki yardımları için teşekkür ederler.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Rodeo SA, Kawamura S, Ma CB, Deng XH, Sussman PS, Hays P, et al. The effect of osteoclastic activity on tendon-to-bone healing: an experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:2250-9.
- Amiel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand* 1982;53:325-32.
- Schneeberger AG, von Roll A, Kalberer F, Jacob HA, Gerber C. Mechanical strength of arthroscopic rotator cuff repair techniques: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:2152-60.
- Koh JL, Szomor Z, Murrell GA, Warren RF. Supplementation of rotator cuff repair with a bioresorbable scaffold. *Am J Sports Med* 2002;30:410-3.
- Gerber C, Schneeberger AG, Beck M, Schlegel U. Mechanical strength of repairs of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br* 1994;76:371-80.
- Gallie WE, Le Mesurier AB. A clinical and experimental study of the free transplantation of fascia and tendon. *J Bone Joint Surg* 1922;4:600-12.
- Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* 1994;22:344-51.
- Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:1795-803.
- Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 1999;27:476-88.
- Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004;20:899-910.
- Bedi A, Fox AJ, Kovacevic D, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2010;38:308-17.
- Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, Gulotta LV, Ehteshami JR, Warren RF, et al. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg* 2010;19:384-91.
- Yeh WL, Lin SS, Yuan LJ, Lee KF, Lee MY, Ueng SW. Effects of hyperbaric oxygen treatment on tendon graft and tendon-bone integration in bone tunnel: biochemical and histological analysis in rabbits. *J Orthop Res* 2007;25:636-45.
- Mutsuzaki H, Sakane M, Nakajima H, Ito A, Hattori S, Miyanaga Y, et al. Calcium-phosphate-hybridized tendon directly promotes regeneration of tendon-bone insertion. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:319-27.
- Kyung HS, Kim SY, Oh CW, Kim SJ. Tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model: the effect of periosteum augmentation at the tendon-to-bone interface. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003;11:9-15.
- Van de Putte KA, Urist MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1965;(43):257-70.
- Veillette CJ, McKee MD. Growth factors – BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them? *Injury* 2007;38 Suppl 1:S38-48.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
- Peel SA, Hu ZM, Clokie CM. In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: in vitro studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg* 2003;14:284-91.
- Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, et al. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone* 1999;25:321-32.
- Block JE, Russell JL. Spine fusion with demineralized bone. *J Neurosurg* 1998;88:354-6.
- Killian JT, Wilkinson L, White S, Brassard M. Treatment of unicameral bone cyst with demineralized bone matrix. *J Pediatr Orthop* 1998;18:621-4.
- Liu SH, Panossian V, al-Shaikh R, Tomin E, Shepherd E, Finerman GA, et al. Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 1997;(339):253-60.
- Chen CH, Liu HW, Tsai CL, Yu CM, Lin IH, Hsiue GH. Photoencapsulation of bone morphogenetic protein-2 and periosteal progenitor cells improve tendon graft healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 2008;36:461-73.
- Poynton AR, Zheng F, Tomin E, Lane JM, Cornwall GB. Resorbable posterolateral graft containment in a rabbit spinal fusion model. *J Neurosurg* 2002;97(4 Suppl):460-3.
- Sundar S, Pendegrass CJ, Blunn GW. Tendon bone healing can be enhanced by demineralized bone matrix: a functional and histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88:115-22.
- Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, Turner AS, Kim HJ, Atkinson BL. Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:2485-97.