



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Ortopedi Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

## Orthopedic Models and Imaging Techniques in Preclinical Researchs

Deniz Bedel, Fatma Suna Kırac

Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

### Öz

Tendinopatiler ve kırık hasarı sonrası gelişen osteoartritler hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik sağlık sorunlarıdır. Osteoporoz kırıklara yol açan diğer önemli bir sağlık problemidir. Osteoporotik kırıkların tedavisinde tatmin edici sonuçlar elde edilememektedir. Son yıllarda kırık iyileşmesinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına, kırık ve tendon yenilenmesinin sağlanmasına yönelik araştırmalar artış göstermiştir. Kırık iyileşmesindeki karmaşık süreçlerin ve ilgili mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak için hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. Kırık ve tendon patolojilerinde, yeni cerrahi yöntemlerin araştırılması, cerrahi implant ve materyallerin geliştirilmesi ve denenmesi amacıyla hayvan modellerinin kullanılması kaçınılmazdır. Doku mühendisliği modelleri yenilenmeyi sağlayacak yeni hücreler üretmeyi hedeflerken, ortopedik cerrahi modeller implantlar ve biyomekanik araştırmalar üzerine yoğunlaşmaktadır. Klinik öncesi ortopedik çalışmaların tasarlanmasında, elde edilen sonuçların doğru değerlendirilebilmesi için uygun yöntemler seçilmelidir. Dokuların mikroyapısal özelliklerinin değerlendirilmesinde histolojik yöntemler önemlidir. Ayrıca, görüntüleme yöntemlerini kullanarak yapılan nicel değerlendirmeler, sonuçların kliniğe uyarlanmasını sağlayacak değerli bilgiler sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Ortopedik araştırma, kırık iyileşmesi, tendinopati, kırık onarımı, osteoporotik kırık

### Abstract

Tendinopathies and osteoarthritis developed after cartilage damage are chronic health problems that decrease the patient's quality of life. Osteoporosis is another important health problem leading to fractures. In the treatment of osteoporotic fractures, satisfactory results cannot be achieved. In recent years, studies intended to understand the mechanisms underlying the fracture healing, and also, to provide the regeneration of cartilage and tendon have increased. Animal models are used to improve understanding of complex processes and related mechanisms in fracture healing. In cartilage and tendon pathologies, it is inevitable to use animal models in order to investigate new surgical methods and to develop and test surgical implants and materials. While tissue engineering models aim to produce new cells that will provide regeneration, orthopedic surgery models focus on implant and biomechanical research. In planning pre-clinical orthopedic studies, appropriate methods should be chosen in order to evaluate the results correctly. Histological methods are important in evaluating the microstructural properties of tissues. In addition, quantitative assessments obtained by imaging modalities provide valuable information for adaptation of the results to the clinic.

**Keywords:** Orthopedic research, fracture healing, tendinopathy, cartilage repair, osteoporotic fracture

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Deniz Bedel, Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

**E-posta:** denizbedel@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-9416-6973

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

## Giriş

Hayvan modelleri biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup özellikle ortopedik patolojiler ve travmaların tıbbi ve cerrahi tedavilerinin geliştirilmesi için farklı hayvan modellerinden (küçük veya büyük hayvan modelleri) yararlanılmaktadır. Preklinik hayvan modelleri, *in vitro* çalışma sonuçlarının insan klinik çalışmalarına uyarlanması için çok önemli bir köprü görevi görmektedir. Ancak, hayvan modellerinin *in vitro* yöntemler gibi tam standardize edilememiş olması en önemli kısıtlayıcı faktördür. Kullanılacak hayvan modeli insana benzer olmalı ve uluslararası kılavuzlarda tanımlandığı gibi çalışmada çok sayıda hayvan kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Çalışma iyi planlanmış ve yürütülmüş olsa da eğer incelenecek ortopedik patoloji için uygun hayvan modeli seçilmezse elde edilen sonuçlar yanıltıcı olacaktır. İnsanlara benzer model seçilmediğinde uygulamaya girecek sonuçlar elde edilemediği gibi hem zaman hem ekonomik kayba neden olacaktır. Bu nedenle, klinik öncesi çalışmalarda amaca uygun hayvan modelinin seçilmesi önemlidir.

Günümüzde ortopedide kullanılan tedavilerin bir kısmı, zaman içinde biriken klinik bulguların uygulanmasına ve cerrahi tecrübeye dayanmaktadır. Ancak, özellikle travmatolojide bazı klinik tabloların ideal tedavisi henüz yoktur. Örneğin; eklem kırıkdağı yaralanmaları ve patolojileri önemli bir sakatlık nedeni olup, kesin tedavisi yoktur. Travma nedeniyle gelişen osteoartritlerde hastaların yaşı gençtir; bu kırıkdağı patolojisi hastaların yaşam kalitesini azaltmakta ve sağlık sistemine klinik ve finansal yük getirmektedir (1). Tendon patolojileri ve yırtıkları, genellikle sporla ilişkili sorunlar olup kronik ağrı ve hareket kısıtlanmasına yol açmaktadır. Ne yazık ki, mevcut tedaviler ve rehabilitasyon sonrası başarısızlık ve yeniden yırtılmalar sıklıkla görülmektedir (2). Kırıkdağı ve tendon patolojilerinde yeni cerrahi yöntemlerin araştırılması, cerrahi implant ve materyallerin geliştirilmesi ve denenmesi amacıyla hayvan modellerinin kullanılması kaçınılmazdır. Son yıllarda doku iyileşmesinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına, kırıkdağı ve tendon rejenerasyonunun sağlanmasına yönelik araştırmalar belirgin olarak artmıştır.

Diğer önemli bir ortopedik sorun, kemiklerde posttravmatik veya spontane kırık gelişimidir. Kırık iyileşmesi karmaşık bir süreç olup, çeşitli hücre tiplerinin, sitokinlerin ve morfogenetik proteinlerin koordinasyonunu ve düzenlenmesini içermektedir. Bu süreç sonunda kırıkların çoğu tamamen iyileşse de

bazı kırıklarda kaynama görülmez. Kırık iyileşmesinde farklılığa yol açan karmaşık süreçlerin ve bu süreçlerden sorumlu mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak ve süreçleri geliştirmek için hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. Osteoporoz, dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından biri olup spontane kırıkların başlıca nedenlerinden biridir. Osteoporoz ile ilişkili kırıkların tedavisi bugün hala tam olarak yapılamamaktadır. Mevcut tedavi seçeneklerini artırmak ve osteoporotik kırıkların cerrahi tedavisinde yeni stratejiler geliştirmek için dünya çapında büyük araştırmalar yapılmaktadır. Günümüzde küçük hayvan modelleri özellikle kırık iyileşmesinin moleküler yönlerini analiz etmek için kullanılmakta; doku mühendisliği modelleri yeni kemik üretmeyi hedeflerken, ortopedik cerrahi modeller ise implantlar ve biyomekanik araştırmalar üzerine yoğunlaşmaktadır. Kırık iyileşmesindeki gecikmelerin önemli bir nedeni implantla ilişkili enfeksiyonlardır. Ancak, bu konu enfeksiyon modelleri içinde incelendiğinden burada tartışılmamıştır.

Bu derlemenin amacı, kırık iyileşmesi, osteoporotik kırıklar, kırıkdağı ve tendon yaralanmaları ile ilgili araştırmalarda kullanılan hayvan modellerini tartışmaktır. Ayrıca mümkün olduğunca, amaca uygun model seçimi ve çalışmalarda kullanılan görüntülemeler ve diğer değerlendirme yöntemleri hakkında bilgi aktarımı yapılacaktır.

## Kırık Modelleri

Oluşturulacak *in vivo* kırık modelleri araştırmacılara kemik onarımındaki fizyolojik süreçler ve çeşitli faktörlerin kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırma olanağı sunar. Literatürde birçok farklı kırık modeli vardır. Bu modeller kullanılan deney hayvanına, kırığın yerine, açık veya kapalı kırık oluşturulmasına göre farklılık gösterir. En yaygın standart kırık modeli, sıçanlarda femur diyafiz orta kesimde oluşturulan kapalı kırık modelidir. Femur intramedüller Steinmann pini veya Kirschner (K) teli ile stabilize edildikten sonra, Einhorn ağırlık düşürme aparatı ile femur diyafizinde kırık oluşturulur (3). Bu modelin en büyük avantajı, çok iyi bir şekilde tekrarlı transvers kırıklar oluşturulabilmesi, minimal yumuşak doku hasarına yol açması ve farklı araştırmacılar tarafından modellerde yaygın olarak kullanılmış olmasıdır. Pin, iyileşmiş kırık alanında herhangi bir bozulmaya neden olmadan kolaylıkla uzaklaştırılır. Bu modelde kırık iyileşmesi çabuk ve tam olarak gerçekleşir. Bu nedenle, gecikmiş kaynakmalarda iyileşmeyi artırıcı faktörlerin araştırılması olası değildir.

Sıçanlarda femoral osteotomi ile açık kırık modeli oluşturulabilir (4). Bu teknikte salınımlı bir testereyle femur diyafiz orta kısmında osteotomi açılır; sonra kırık hatları çevresindeki periosteum sıyrılıp çıkarılarak yumuşak doku hasarı oluşturulur. Periosteum, kemik onarımı için önemli bir osteoprogenitör hücre kaynağı olduğundan bu işlem kemik iyileşmesinde önemli bir bozulmaya sebep olur. Bu nedenle periosteumu hasarlayan veya ortadan kaldıran teknikler, bozulmuş kemik iyileşmesi modelleri oluşturmak için kullanılabilir (5).

Farelerde femur veya tibiada kırık modelleri oluşturulabilir. Fareler için bir ağırlık düşürme cihazı tasarlanmıştır (6). Tibia diyafiz orta kesim kırıkları distal tibia kırıklarından daha hızlı iyileşme eğilimindedirler. Distal tibia kırıklarında bazen 3 haftada gecikmiş kaynama gözlenir (7). Bu tür kırıklar genellikle bir intramedüller pin ile sabitlenir, ancak halka ve eksternal plaka fiksatörler ile sabitleme de literatürde tanımlanmıştır (8). Fare kırık modelleri, gen nakavt fareler, transgenik veya mutant fareler kullanılarak genetik değişkenlerin test edilmesini sağlayabildiklerinden büyük bir avantaj oluşturmaktadır.

### Kemik Defekti Modelleri

Klinik öncesi deneysel model tasarlanırken kemik defekti (KD) tipinin göz önüne alınması önemlidir. Literatürde birkaç farklı model vardır, ancak bunların tamamı tüm hayvanlarda kullanılamaz. Bazı modellerde fiksasyon uygulamak gerekmediğinden pilot çalışmaların maliyetini azaltmak için iyi seçim olabilirler. Fare ve sıçanların büyüme plakları yaşamları süresince açık olduğundan, oluşturulan KD kemiğin büyüme plaklarına yakın olmamalıdır. Literatürde bildirilen farklı modeller vardır (9):

- Segmental defektler (uzun kemik segmental defektleri ve yassı kemik segmental defektleri),
- Kısmi kortikal kemik defektleri (kortikal pencereler, kama defektleri veya transkortikal matkap delikleri),
- Süngerimsi kemik defektleri (matkap delikleri).

Segmental defektler, kritik ve subkritik boyutta KD'leri oluşturulabildiğinden kaynamama çalışmaları için önemli modellerdir. Tedavi yöntemlerinin test edildiği çalışmalarda kritik boyutlu (KB) KD modellerinin seçimi önemlidir. Kritik boyutlu KD, belli bir hayvan türünde ve belli bir kemikte oluşturulan, hayvanın ömrü süresince kendiliğinden iyileşemeyen en küçük boyuttaki defektlerdir. Farklı çalışmalarda KBKD, hayvanın ömrü boyunca %10'dan daha az miktarda iyileşmenin görüldüğü defekt olarak tanımlanmıştır. Oluşturulduktan 1 yıl sonra

defektin %10'unda iyileşme görülmediyse hayvanın ömrü boyunca iyileşmenin görülmesi beklenmez. Pratikte, defektin çalışma süresince iyileşmeyeceği kabul edilir (10,11). Tedavi edilmeden bırakıldığında iyileşme kemik yerine fibröz bağ dokusu oluşumuyla olur. Kemik iyileşme araştırmalarında kullanılan her bir hayvan türü için KBKD oluşumunda hayvan soyu ve yaşı, kemiğin yeri, cerrahi fiksasyonun varlığı veya yokluğu ve defekt büyüklüğü gibi birçok faktör göz önüne alınmalıdır. İdeal olarak her bir model, negatif kontrol ve pozitif kontrol (otojen kemik grefti) grupları kullanılarak standart hale getirilmelidir.

Kemik metabolizmaları çok yüksek olduğu için fare, sıçan ve tavşan modelleri defekt iyileşmesinin izlendiği çalışmalarda iyi seçimdir. Defektler hızlı iyileşir ve çalışmanın süresi kısa olabilir. Bu nedenle nispeten düşük maliyetlidirler. Ancak, insanlarda kullanılacak ürünleri test etmek için iyi seçim değildirler. Koyun, keçi, köpek, insan dışı primatlar ve domuzlar büyüklük ve kemik özellikleri açısından insanlarla daha yakından ilişkili büyük hayvan modelleridir. Özellikle ortopedik ve prostetik cihazlar, büyük implantlar veya biyomekanik çalışmalar için daha iyi modellerdir (12,13). Son dönemde köpek, insan dışı primatlar ve tavşan kullanımında azalma varken koyun, keçi ve domuz modellerinde artış tanımlanmıştır (12).

Klinik öncesi ortopedik çalışmalar tasarlanırken sonuçların değerlendirilmesinde uygun yöntemlerin seçilmesi önemlidir. Kemik kalitesi ile ilişkili olan mikroyapısal özelliklerin değerlendirildiği histolojik sonuçlar değerlidir. Bununla birlikte, klinik uygulamaya yansımaları için, kemik iyileşmesinin fonksiyonel ölçümleri ve kaynamanın kuvvetini gösteren mekanik testlerin sonuçlarının tartışılması daha önemlidir. Kemik iyileşme çalışmalarının çoğunda en önemli sonuç kaynamanın olması veya olmamasıdır. Son zamanlarda bazı çalışmalarda buna ek olarak kısmi kaynama durumu da tanımlanmaktadır (14). Klinikte tibia için kullanılan radyografik kaynama skalası temel alınarak, fare ve sıçanlar için bir skorlama sistemi önerilmiştir. Bu yöntemde sıçanlarda anterior-posterior ve lateral radyografilerde kortikal köprüleşme değerlendirilerek skorlama yapılmış ve gözlemciler arası uyumun iyi olduğu gösterilmiştir (15).

Kemik oluşumunu ölçmek için, mikro bilgisayarlı tomografi (mikroBT) kemiğin üç boyutlu değerlendirmesinde altın standart kabul edilmektedir. Bu yöntem özellikle fare ve sıçanlardaki kırık çalışmalarında kullanılmıştır. Örnekler üzerinde bir tahribat yapmadığı için mikroBT görüntüleme ilk inceleme olarak tercih edilir; daha sonra örnekler mekanik veya histolojik

analizlerden geçirilebilir. MikroBT görüntüleme verileri, kallus özelliklerinin belirlenmesi ve daha sonra elde edilen biyomekanik verilerle kallus arasındaki iliŐkilerin incelenmesi amacıyla da kullanılabilir (16). Boussein ve ark., mikroBT yöntemi ile kemik oluşumunu değerlendiren çalışmaların raporlarının standardizasyonu için kılavuz yayınlamıŐtır (17). Böylece, farklı mikroBT sistemleri ile yapılan çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesi ve karŐılaŐtırılması mümkün olacaktır. Bu kılavuza göre, mikroBT görüntüleri değerlendirilirken kemik hacim fraksiyonu, trabekül sayısı, kalınlığı ve ayrımı gibi trabeküler kemik morfolojik özellikleri raporda tanımlanmalıdır. Kortikal kemik morfometrisini tanımlamak için total kesit alanı, kortikal kemik alanı, kortikal kemik alan fraksiyonu ve kortikal kalınlık belirtilmelidir. Diğer deęiŐkenler görüntüleme özellikleri (görüntüleme alanı, X-ray akımı, voksel boyutu, vb.) ve görüntü iŐleme özellikleri (filtre seçimi, segmentasyon vb.) ile araştırma hipotezine göre seçilecek deęiŐkenler olabilir.

### **Osteoporotik Kırık Tedavisine Yönelik  alıŐmalarda Kullanılan Hayvan Modelleri**

Osteoporoz, kemik kütlesinin kaybına ve kemik dokusunun mikro mimarisinin bozulmasına yol açan, bunun sonucunda kemik kırılmalılığının ve kırık gelişimine yatkınlılığın artmasıyla karakterize sistemik bir hastalıktır. Yaşam beklentisinin ve nüfustaki yaŐlı insan popülasyonunun artması nedeniyle, osteoporoz dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiŐtir. Osteoporoz ile ilişkili kırıkların tedavisi bugün hala tatmin edici değildir. Osteoporotik kemiğe kırık fiksasyonu için geleneksel implantların uygulanması sınırlıdır ve zayıf kemik yapısının sonucu olarak fiksasyonlar baŐarısızlıkla sonuçlanır (18). Mevcut tedavi seçeneklerini artırmak ve osteoporotik kırıkların cerrahi tedavisinde yeni stratejiler geliştirmek için dünya çapında büyük araştırmalar yapılmaktadır. Osteosentez veya artroplastisi için implantlar geliŐtirilmesinin yanı sıra, biyomateryaller, hücreler ve sitokinler gibi biyolojik yaklaŐımları içeren çalışmalar yürütülmektedir (19).

Standart tedaviden farklı olan herhangi bir yeni yöntemin yararının gösterilmesi için hayvan modelinde çalıŐılması gerekir. Ayrıca, yeni tedavilerin veya cihazların verimlilik ve güvenliğinin kanıtlanması için klinik uygulama öncesinde test edilmeleri gerekir. Amerika BirleŐik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), osteoporoz tedavisindeki potansiyel ajanların çalıŐılması için iki farklı hayvan türünün kullanılmasını önermektedir. Bu hayvan

modellerinden birincisi ovaryektomize sıçanlardır; ikincisi ise fare veya sıçan olmayan ve insandakine benzer şekilde Haversian sistemine sahip bir büyük hayvan modelidir (20). FDA kılavuzlarındaki öneriler yalnız farmasötik ajanları içerir. Ancak, yeni cerrahi tedavi seçeneklerinin de klinik uygulama öncesinde değerlendirilmesi gerekir. Bu nedenle k c k ve büyük hayvan osteoporoz modellerine gereksinim vardır.

Azalmış kemik mineral yoğunluğu (BMD), azalmış kemik kütlesini yansıtır. İnsanlarda osteoporoz, sağlıklı genç yetişkinlerin ortalama kemik yoğunluğu değerinin (T-skoru), 2,5 standart sapma altında olan BMD olarak tanımlanmıştır. Hayvan modelleri için bu tanımın kullanılması tartıŐmalıdır;  nk  belirlenmiŐ bir T-skoru yoktur. Yumurtalıkların fonksiyonunun sona ermesinden sonra uzun süreli bir gözlemde BMD'nin önemli miktarda azalması kemik kaybını kanıtlayabilir. Fakat omurgadaki spontane kırıklar gibi klinik bulgular oluŐmaz (19). Ek olarak, hayvan çalışmalarında saptanan BMD azalmaları için elde edilen değerleri karŐılaŐtırmak zordur.  nk ,  ift enerjili X-ıŐını absorpsiyometrisi (DEXA) ve periferik kantitatif (pQ) BT gibi farklı yöntemlerle elde edilen değerlerden yararlanılmaktadır. DEXA yöntemi daha popüler olmasına ve yaygın olarak kullanılmasına rağmen, hayvan modellerini içeren çalışmalarda kortikal ve trabeküler kemik arasında ayırım yapılabilmesi için pQBT gibi  c boyutlu tekniklerin kullanılması önerilir (18).

Ovaryektomize sıçan modeli, osteoporozda en çok çalıŐılan hayvan modelidir. Bu modelde yumurtalıkların çıkarılmasını takiben bifazik kemik kaybı oluşur. İlk 100 güne kadar hızlı bir kemik kaybının ardından süngerimsi kemik hacminin osteopeni düzeyinde stabilize olduğu gözlenir. Model oluşturulduktan 270 gün sonra, süngerimsi kemik hacminin azaldığı yavaŐ bir kemik kaybı fazı görülür. Bununla birlikte, toplam BMD kaybı, insanlarda görülen kayıptan daha azdır (21). Bu model göreceli olarak kısa bir süre içinde incelendiğinde, postmenopozal kemik kaybını taklit etmektedir. On iki aylık ve daha uzun süreli gözlemlerde ise, ovaryektomize sıçanlarda kemik mineral içeriği, kemik alanı ve vücut ağırlığı değerleri insanlarda görülenden daha yüksek bulunmuŐtur (20). Ayrıca, kortikal kemikte Haversian sistemin bulunmaması ve klinikte östrojen eksikliğinin geç evrelerinde görülen bozulmuş osteoblast fonksiyonunun olmaması nedeni ile bu modelin kullanımı sınırlıdır (22).

YaŐlanma ve osteoporozun bir sonucu olarak kemiklerde kortikal gözenekli yapının artıŐı gözlenmektedir. İnrakortikal gözenekli yapı, kemik

oluşumu ile rezorpsiyon arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Hem kortikal kemiğin mekanik dayanıklılığını hem de kullanılan vidaların sabitleme gücünü etkiler. Brockstedt ve ark. 64 normal kişide (41 kadın ve 23 erkek; ortalama yaş 48 yıl) ilyak kortikal kemiği inceledikleri çalışmalarında kortikal gözenekli yapıdaki artışın duvar kalınlığındaki azalma ve Haversian kanal çapındaki artış ile ilişkili olduğunu saptamıştır (23). Kortikal gözeneklilik değerlerinde hayvan modelleri arasında büyük farklılıklar gözlenmekte ve modellerin hiçbirinde insandaki durumla karşılaştırılabilir intrakortikal gözenekli yapı bulunmamaktadır. Bu durum, spontane kırık riskinin hayvan osteoporoz modellerinde gözlenmemesine rağmen insanlarda neden yüksek olduğunu açıklamakta faydalı olabilir.

Birçok hayvan deneyinde belirtildiği gibi, osteoporotik kemikte kırıkların iyileşme kapasitesi azalmış görünmektedir. Ayrıca, osteoporoz varlığında gözlenen azalmış iyileşme kapasitesi, implant fiksasyonundaki başarısızlık oranını belirgin yükseltmektedir. Ovaryektomize sıçan modeli ve koyun modeli kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda, kırık iyileşmesinde bozulma olduğu bildirilmiştir (24,25). Osteoporotik kemikte kırık fiksasyonunun araştırılması için bir hayvan modelinin seçilmesi, insanlarla karşılaştırılabilir boyutta uzun kemik bulunmasına dayanmaktadır. Bu nedenle, koyunlar küçük hayvan modellerine tercih edilmiştir. Günümüzde implant üretimindeki teknik gelişmeler, kemirgen kemiğinin plakalar ve vidalar vasıtasıyla iç fiksasyonuna izin veren çok küçük fiksasyon cihazlarının geliştirilmesini sağlamıştır. Bu gelişmelerle, deneysel çalışmalarda hayvan büyüklüğü sorunu aşılabilecektir. Böylece, osteoporoz için yaygın olarak kullanılan modeller olan ovaryektomize sıçanlar veya genetiği düzenlenmiş fareler, fiksasyon cihazlarının araştırılması için kullanılabilir.

### Kıkırdak Defekti Modelleri

Eklem kıkırdağı patolojileri ve yaralanmaları önde gelen bir sakatlık nedenidir. Kondral yüzeyin avasküler yapısı ve düşük hücre yoğunluğuna sahip ekstrasellüler matriks nedeniyle, kıkırdak dokusu nadiren kendiliğinden yenilenebilir. Kıkırdak yüzeyinde kusurlara neden olan fokal travma, genellikle orijinal kıkırdaktan daha dayanıksız bir doku ile onarılır. Bu dayanıksız onarım dokusu daha sonra osteoartrit gelişimine yol açabilir (26). Eklem yüzeyini etkileyen fokal travmatik olaylar için çeşitli eklem yenileme tedavileri vardır. Bunlar arasında debridman teknikleri, osteokondral transplantlar veya yeni replasman cihazları bulunur. Araştırmalarda hayvan

modelleri rejeneratif eklem yenileme için yeni kavramları değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Preklinik hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalarla insan klinik çalışmaları arasında çok önemli bir köprü görevi görmektedir.

Kıkırdak onarımına yönelik biyomateryal uygulamalarının (doku mühendisliği teknikleri, hücre ve doku transplantasyonu uygulamaları, büyüme faktörü temelli uygulamalar) etkinliğinin değerlendirilmesi için uygun bir hayvan modeli seçerken birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Öncelikle küçük veya büyük hayvan modeli mi seçileceğine karar verilmesi gerekir. Her birinin avantajları ve dezavantajları vardır. Yeni malzemelerin klinikte kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde, insan anatomisini ve fizyolojisini en yakın temsil eden model seçilmelidir. Dikkate alınması gereken faktörler arasında eklem büyüklüğü, kıkırdak kalınlığı, defektin derinliği ve kritik boyutu, iskelet yaşı ve matürasyonu bulunur (27). Ek olarak kıkırdak defektinin konumu da önemlidir. Klinik olarak en çok defekt femurun yük taşıyan medial kondilinde gelişir. Ancak, birçok hayvan çalışmasında, kullanılan materyallerin tutulmasını artırmak için troklea gibi kısmi yük taşıyan eklem yüzeyleri seçilmektedir (28). Küçük hayvan modelleri, bir implantın kalış süresi hakkında bilgi vermek ve ayrıca oluşan onarım dokusunun tipini belirlemek için çok faydalı olabilir. Farelerin ve sıçanların atimik, transgenik ve nakavt suşlarının olması nedeniyle, bu modeller çok sayıda faktörü değerlendirmek için kullanılabilirler (29). Ancak fare ve sıçanların eklemdeki küçük ve kıkırdakları çok ince olup, yalnız birkaç hücre katmanından oluşur. Kıkırdak tabakasının inceliği nedeniyle, fare ve sıçan modelleri kondral defekt onarımının değerlendirilmesinde genellikle kullanılmaz. Fare ve sıçanlar, biyomateryallerin ve implantların bozulma oranının ve güvenlik profilinin değerlendirilmesi için faydalı, genellikle 6-8 hafta süren deri altı ve kas içi modeller sağlayabilir (30).

Tavşanlar daha büyük eklemlere sahip olduklarından ve kolay cerrahi işlemlere uygun boyutta olduklarından kıkırdak onarımının değerlendirilmesi için daha uygun küçük hayvan modelidir. Defektler femurda medial ve lateral kondilde (31) veya trokleada (32) oluşturulabilir. Femoral kondil ağırlık taşıyan modeller için en sık kullanılan defekt bölgesidir. Tavşanlar dizlerinin yüksek dereceli fleksiyon yapması ve düşük vücut ağırlıkları (2-4,5 kg) nedeni ile kısmi ağırlık taşıma yüzeyi olarak troklea çentiği kullanır. Bu nedenle, insanlar ve büyük hayvanlardan çok farklı yüklenme durumu oluşur. Tavşan modeli spontane iyileşme potansiyelinin yüksek olması,

eklem yüklenme durumunun insandan farklı olması ve ince kırıkta dokusu nedeni ile son yıllarda önemini yitirmiştir.

Biyouyumluluk, erken hücrel cevap ve implantın defekt içindeki kalıcılığı ve durumu hakkında bilgi sağlamak için kısa süreli (8-12 hafta) çalışmalar yapılabilir. Ancak, eklem kırıktağının onarımı ve başarıyla yenilenmesi ile ilgili güvenli sonuçlara ulaşmak için daha uzun süreli (6-12 ay) çalışmalara gereksinim vardır. Kırıktağın onarımının değerlendirilmesine uygun bir dizi büyük hayvan modeli araştırılmıştır.

Alternatif büyük hayvan modellerinin bulunması ve etik nedenlerle, köpek modelleri ile yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Köpek modellerinde defektler femurda medial ve lateral kondilde veya trokleada oluşturulabilir. Bu modellerde artroskopik inceleme yapmak ve biyopsi almak mümkündür. Ayrıca köpekler kolayca eğitilebilir hayvanlar olduğundan koşu bandı kullanılarak egzersiz çalışmaları yapılabilir (33). Ancak oluşturulan defekt hacimlerinin diğer büyük hayvan modellerine göre küçük olması ve etik nedenlerle, köpekler çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir hayvan türü değildir (26).

Koyun, kolayca bulunan ve nispeten ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modelidir. Ayrıca koyunların diz anatomisi insanlara benzer. Artroskopi uygulanabilir ve faydalı bilgiler sağlar. Bununla birlikte, büyük bir yağ yastığının varlığı ve femur kondillerini görebilmek için gereken bükülme derecesi nedeniyle zorluklar içeren bu işlem tecrübe gerektirmektedir. Koyunların değişken kalınlıkta eklem kırıktağı vardır. Bu durum, kırıktağ ve subkondral kemiği içeren defekt hacminin, denekler arasında farklı olmasına sebep olabilir. Yayınlanmış çalışmalar arasındaki standart sapma büyük olup koyun çalışmaları arasında karşılaştırma yapmak güçtür (26,34,35). Diğer bir dezavantaj ise, subkondral kemiğin çok yoğun ve sert olmasıdır; defektler ancak subkondral sondaj yöntemiyle oluşturulur. Subkondral delme işlemi, kemiğin mikromimarisini bozar ve subkondral kemik uzun süre kırılabilirliğini korur (36).

Keçi modelleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Keçilerin kalın kırıktağ yapısı ve insanlara benzer eklem anatomisi vardır ve femorotibial eklem artroskopik muayenesi mümkündür (37). Kalın kırıktağ yapısı kısmi veya tam kalınlık defektlerinin oluşturulmasına izin verir. Bu seçenek daha küçük hayvan modellerinde mümkün değildir. Yayınlanan çalışmalarda daha çok osteokondral defektler oluşturulmuştur. Oysa insan kırıktağ defektlerinin büyük kısmı subkondral kemiği içermez, bu nedenle hayvan modellerinde kısmi kalınlık

defektleri yaratılabilmesi daha önemlidir (38). Keçilerde subkondral kemik koyunlara kıyasla daha yumuşaktır ve osteokondral defektler oluşturmak için kullanılan, delik açmayı gerektirmeyen cerrahi teknikler kolayca ve başarıyla uygulanabilir.

Domuzlar büyük boyutları, bakım ve barındırma konusundaki güçlükler nedeniyle kırıktağ defekt araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir model değildir. Bu güçlükler minyatür domuzların kullanımıyla kısmen giderilebilir. Domuz medial femoral kondilinin 1,5 mm ve 2,0 mm kalınlıkta olduğunu bildiren çalışmalar vardır (39,40). Kırıktağ kalınlıkları kısmi veya tam kalınlıkta defektlerin oluşturulmasına izin verir. Bu özellik, Vasara ve ark.'nın çalışmasında kısmi kalınlıkta kırıktağ defektlerinin tedavilerini incelemek için kullanılmıştır (41).

Atlar mevcut olan en büyük hayvan modelidir. At modeliyle çalışırken konaklama ve ameliyat için büyük tesisler gerekir. Ayrıca uygun ekipmanların ve model oluşturulması için gerekli olan teknik beceriye sahip kişilerin bulunması kolay değildir. Atlar biyomedikal araştırmalarda kullanılmak için yetiştirilen hayvanlar değildir. Çalışmalarda genellikle çeşitli atletik kariyerlerinden emekli olan atlar kullanılır. Bu nedenle önceden var olan kas-iskelet sistemi hastalığının taranması gerekir. Öte yandan at, uzun ömürlü ve atletik bir hayvan olduğu için, kronik kusurlardaki yenileme teknolojilerini değerlendirmek için çekici bir modeldir. Ayrıca atlara operasyon sonrası egzersiz yaptırılabilirdiğinden zorlu yüklenme koşulları altında onarımın değerlendirilmesi mümkündür. Sporcu atlarda klinik olarak osteoartrit uyumlu bir eklem dejenerasyonu görüldüğünden, eklem sağlığına yönelik çok sayıda araştırmada kullanılmışlardır (42,43,44).

### **Tendon Araştırmalarında Kullanılan Hayvan Modelleri**

Tendon patolojileri veya diğer ismiyle tendinopatiler, kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarının önemli bir bölümünü oluşturur. Bunların ciddiyeti geçici ağrı ve iltihaptan, tendonun kısmi veya tam yırtıklarını içeren kronik durumlara kadar değişmektedir. Tendon patolojisi ve onarımda ortaya çıkan süreçleri incelemek amacıyla hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (45). Rotator cuff tendon yırtıkları, sıklıkla cerrahi onarım gerektiren ve yaygın görülen omuz yaralanmalarıdır. İleri tekniklerle yapılan rotator cuff onarımı ve cerrahi sonrası rehabilitasyona rağmen, cerrahi başarısızlıklar ve yeniden yırtılmaların oranı yüksektir. Sıçan omzu insan omzuna

benzeye anatomik yapıya sahiptir. Bu nedenle sıçan, rotator cuff araştırmalarında en çok kullanılan hayvan modelidir (46). Bununla birlikte, fare (47,48), tavşan (49), koyun (50) gibi çeşitli başka hayvan modelleri de rotator cuff yaralanması ve onarımının araştırılmasında kullanılmaktadır. Rotator cuff onarımında yüksek başarısızlık oranları nedeniyle, bu yırtıkların cerrahi onarımında kullanılan yöntemler ve malzemeler aktif bir araştırma alanı olmayı sürdürmektedir (50,51).

Büyüme faktörleri, trombositten zengin plazma (PRP), hormonlar, kemik morfogenetik proteini, otolog hücre tohumlaması ve kök hücre gibi potansiyel rejeneratif ajanların kullanımını araştırmak için hayvan modellerinden rutin olarak faydalanılmaktadır (52). Mezenkimal ve adipöz kök hücrelerin iyileştirme potansiyeli yakın zamanda tavşan ve sıçan modelleri (53,54,55) ile test edilmiş ve bu deneylerin sonuçları PRP tabanlı çalışmalardan daha istikrarlı sonuçlar vermiştir.

Şiddetli rotator cuff yırtıklarında belirgin kas atrofisi ve yağ infiltrasyonu geliştiği gösterilmiştir (56). Klinik olarak, progresif dejenerasyon ve yağ infiltrasyonu cerrahi onarımdan sonra düşük başarı oranları ile koreledir. Ultrasonografi (US), BT ve manyetik rezonans (MR) spektroskopisi dahil olmak üzere, kas dejenerasyonu ve yağ infiltrasyonunu görselleştirmek için çeşitli görüntüleme teknikleri kullanılmıştır. Rotator cuff kaslarındaki atrofiyi değerlendirmede kas hacmini belirlemek için MR görüntüleme protokolleri de belirlenmiştir (57). Rotator cuff kaslarındaki yağ infiltrasyonunu ölçmek için MR ve BT görüntülemeleri kullanılmıştır. BT görüntülerinden yararlanılarak büyük hayvan modellerinde kas içi yağ birikimi incelenmiştir (58,59,60). Goutallier ve ark. tarafından BT görüntüleme ile yağ infiltrasyon derecesi için standart derecelendirme yapılmıştır (61). Bu yöntem zamanla omuz MR görüntülemesinde kullanılmak üzere değiştirilmiştir. Samagh ve ark., farelerdeki rotator cuff yırtıklarında gelişen kas atrofisi ve yağ infiltrasyonunu yüksek rezolüsyonlu MR (7T) kullanarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada invazif yöntemlere alternatif olarak, küçük hayvanlarda rotator cuff yırtıklarında oluşan kas atrofisi ve yağ infiltrasyonunun izlenmesinde MR görüntülemenin kullanılabileceği gösterilmiştir (62).

Aşıl tendonu insan vücudundaki en büyük ve en güçlü tendon olup rutin olarak bireyin ağırlığının 12,5 katına kadar olan yükleri taşır. Bu yüklenme, diğer faktörlerle birlikte aşıl tendonu patolojilerinin gelişimine olasılıkla önemli katkıda bulunur. Hem cerrahi hem de konservatif yöntemler için aşıl tendon araştırmalarına gereksinim vardır. Sıçanlar aşıl tendon kopması ve

tendinopatiji modellemek için sıklıkla kullanılmıştır. Sıçan modellerinde mekanik veya kimyasal yöntemler kullanılarak yaralanma oluşturulur. Kollajenazın indüklediği aşıl tendinopati modeli en yaygın kullanılan yaklaşımdır. Ancak, son zamanlarda trasforme edici büyüme faktör-1'in veya substance P'nin tendon içi enjeksiyonu ile oluşturulan yeni yöntemler önerilmiştir (63,64). Rotator cuff yaralanmalarına benzer şekilde, malzeme ve tekniklerdeki gelişmelerle aşıl tendonu tamir yöntemlerini iyileştirmek için de hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmıştır.

Görüntüleme yöntemlerinin kullanımı patolojiye bağlı olarak değişmektedir, ancak aşıl tendonu yüzeysel konumu nedeniyle US ile değerlendirme için özellikle uygundur. Ultrason, aşıl tendon patolojisinin derecesini ve yerini belirlemede kullanılabilecek düşük maliyetli, invazif olmayan bir yöntemdir. Sonoelastografi yöntemi, tendon elastikiyetini izleyebilme yeteneği kanıtlanan ultrason temelli bir tekniktir. Kronik lokal hipervaskülarite, tendinopatiye bağlı ağrıyla ilişkilendirilmiş olup indüklenmiş tendinopatiden sonra gelişen vaskülariteyi derecelendirmede kontrastı artırılmış sonografinin etkili olduğu kanıtlanmıştır (65,66).

## Sonuç

Ortopedi ve travmatolojide klinik öncesi hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalarla insan klinik çalışmaları arasında geçişi sağlayan çok önemli bir köprü görevi görür. Ancak, klinik koşulları tamamen yansıtan bir hayvan modeli henüz yoktur. Bununla birlikte, her modelin kendine özgü avantajları vardır. Araştırmanın amacına en uygun model seçimi yapılmalıdır. Denenmiş ve test edilmiş modeller, tamamen yeni bir modelin tasarımını yapmak yerine yeni klinik sorulara uyacak şekilde adapte edilebilir. Doku iyileşmesi süreçlerinin ve fonksiyonel gereksinimlerin daha iyi anlaşılması, doku mühendisliğinin ilerletilmesi için kritik önemdedir. Bu süreçlerin aydınlatılması insanlarda kullanılabilecek yeni biyomateryallerin, implantların ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlayacaktır.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

1. Harvey EJ, Giannoudis PV, Martineau PA, et al. Preclinical animal models in trauma research. J Orthop Trauma 2011;25:488-493.

2. Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res* 2014;3:193-202.
3. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984;2:97-101.
4. Tägil M, McDonald MM, Morse A, et al. Intermittent PTH(1-34) does not increase union rates in open rat femoral fractures and exhibits attenuated anabolic effects compared to closed fractures. *Bone* 2010;46:852-859.
5. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003;21:503-510.
6. Marturano JE, Cleveland BC, Byrne MA, O'Connell SL, Wixted JJ, Billiar KL. An improved murine femur fracture device for bone healing studies. *J Biomech* 2008;41:1222-1228.
7. Schindeler A, Morse A, Harry L, et al. Models of tibial fracture healing in normal and Nf1-deficient mice. *J Orthop Res* 2008;26:1053-1060.
8. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, et al. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 2010;28:1456-1462.
9. Harvey EJ, Giannoudis PV, Martineau PA, et al. Preclinical animal models in trauma research. *J Orthop Trauma* 2011;25:488-493.
10. Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, Davies B, Pearce S, Williams R, Zreiqat H. Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. *Acta Biomater* 2012;8:4162-4172.
11. Gosain AK, Song L, Yu P, et al. Osteogenesis in cranial defects: Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:360-371.
12. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001;51:292-299.
13. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.
14. Schindeler A, Mills RC, Bobyn JD, Little DG. Preclinical models for orthopedic research and bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2018;36:832-840.
15. Tawonsawatruk T, Hamilton DF, Simpson AH. Validation of the use of radiographic fracture-healing scores in a small animal model. *J Orthop Res* 2014;32:1117-1119.
16. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. Microcomputed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 2009;44:335-344.
17. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1468-1486.
18. Strømsøe K. Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury* 2004;35:107-113.
19. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16:S129-138.
20. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995;17:125S-133S.
21. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989;45:360-366.
22. Miller SC, Wronski TJ. Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. *Anat Rec* 1993;236:433-441.
23. Brockstedt H, Kassem M, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993;14:681-691.
24. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001;28:80-86.
25. Lill CA, Hesseln J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 2003;21:836-842.
26. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:705-713.
27. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:564-572.
28. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, et al. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage* 2011;2:153-172.
29. Nordling C, Karlsson-Parra A, Jansson L, Holmdahl R, Klareskog L. Characterization of spontaneously occurring arthritis in male DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 1992;35:717-722.
30. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:105-115.
31. Ramallal M, Maneiro E, López E, et al. Xenotransplantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model. *Wound Repair Regen* 2004;12:337-345.
32. Hoemann CD, Sun J, Légaré A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:318-329.
33. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, et al. Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the international cartilage repair society. *Cartilage* 2011;2:137-152.



34. Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton GS, Thabit G. The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. *Arthroscopy* 2000;16:527-536.
35. Kandel RA, Grynepas M, Pilliar R, Lee J. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a Sheep model. *Biomaterials* 2006;27:4120-4231.
36. Orth P, Goebel L, Wolfram U, et al. Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med* 2012;40:828-836.
37. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1214-1226.
38. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials* 1997;18:235-242.
39. Chiang H, Kuo TF, Tsai CC, et al. Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 2005;23:584-593.
40. Hembry RM, Dyce J, Driesang I, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:826-838.
41. Vasara AI, Hyttinen MM, Pulliainen O, et al. Immature porcine knee cartilage lesions show good healing with or without autologous chondrocyte transplantation. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1066-1074.
42. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Can J Vet Res* 1988;52:137-146.
43. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 1999;28:242-255.
44. Barnewitz D, Endres M, Krüger I, et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* 2006;27:2882-2889.
45. Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res* 2014;3:193-202.
46. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996;5:383-392.
47. Liu X, Laron D, Natsuhara K, Manzano G, Kim HT, Feeley BT. A mouse model of massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94:e41.
48. Kim HM, Galatz LM, Lim C, Havlioglu N, Thomopoulos S. The effect of tear size and nerve injury on rotator cuff muscle fatty degeneration in a rodent animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:847-858.
49. Quigley RJ, Gupta A, Oh JH, et al. Biomechanical comparison of single-row, double-row, and transosseous-equivalent repair techniques after healing in an animal rotator cuff tear model. *J Orthop Res* 2013;31:1254-1260.
50. Maguire M, Goldberg J, Bokor D, et al. Biomechanical evaluation of four different transosseous-equivalent/suture bridge rotator cuff repairs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011;19:1582-1587.
51. Onay U, Akpınar S, Akgün RC, Balçık C, Tuncay IC. Comparison of repair techniques in small and medium-sized rotator cuff tears in cadaveric sheep shoulders. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2013;47:179-183.
52. Hapa O, Cakıcı H, Kükner A, Aygün H, Sarkalkan N, Baysal G. Effect of platelet-rich plasma on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in rats: an in vivo experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2012;46:301-307.
53. Kida Y, Morihara T, Matsuda K, et al. Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:197-205.
54. Kim YS, Lee HJ, Ok JH, Park JS, Kim DW. Survivorship of implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute rotator cuff tear. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:1037-1045.
55. Levy DM, Saifi C, Perri JL, Zhang R, Gardner TR, Ahmad CS. Rotator cuff repair augmentation with local autogenous bone marrow via humeral cannulation in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:1256-64.
56. Gladstone JN, Bishop JY, Lo IK, Flatow EL. Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome. *Am J Sports Med* 2007;35:719-728.
57. Doro LC, Ladd B, Hughes RE, Chenevert TL. Validation of an adapted MRI pulse sequence for quantification of fatty infiltration in muscle. *Magn Reson Imaging* 2009;27:823-827.
58. Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, et al. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:2391-2402.
59. Frey E, Regenfelder F, Sussmann P, et al. Adipogenic and myogenic gene expression in rotator cuff muscle of the sheep after tendon tear. *J Orthop Res* 2009;27:504-509.
60. Gerber C, Meyer DC, Frey E, et al. Neer Award 2007: Reversion of structural muscle changes caused by chronic rotator cuff tears using continuous musculotendinous traction. An experimental study in sheep. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;18:163-171.
61. Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res* 1994;304:78-83.

62. Samagh SP, Kramer EJ, Melkus G, et al. MRI quantification of fatty infiltration and muscle atrophy in a mouse model of rotator cuff tears. *J Orthop Res* 2013;31:421-426.
63. Bell R, Li J, Gorski DJ, et al. Controlled treadmill exercise eliminates chondroid deposits and restores tensile properties in a new murine tendinopathy model. *J Biomech* 2013;46:498-505.
64. Andersson G, Backman LJ, Scott A, Lorentzon R, Forsgren S, Danielson P. Substance P accelerates hypercellularity and angiogenesis in tendon tissue and enhances paratendinitis in response to Achilles tendon overuse in a tendinopathy model. *Br J Sports Med* 2011;45:1017-1022.
65. Gehmert S, Jung EM, K gler T, et al. Sonoelastography can be used to monitor the restoration of Achilles tendon elasticity after injury. *Ultraschall Med* 2012;33:581-586.
66. Chang KV, Wu CH, Ding YH, et al. Application of contrast-enhanced sonography with time-intensity curve analysis to explore hypervascularity in Achilles tendinopathy by using a rabbit model. *J Ultrasound Med* 2012;31:737-746.