



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

**TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BETA-3 (TGF- β 3)
YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN SIÇANLARDA AŞIL TENDON
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. RIZA MERT ÇETİK

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2021



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

**TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BETA-3 (TGF- β 3)
YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN SIÇANLARDA AŞIL TENDON
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. RIZA MERT ÇETİK

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. MEHMET AYVAZ

ANKARA

2021

TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. A. Mazhar Tokgözoğlu olmak üzere, uzmanlık eğitimim süresince bana mesleğimi bütün incelikleriyle öğreten, üzerimde sonsuz emekleri olan Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine,

Tez danışmanım olarak bu çalışmanın planlanmasından sonlandırılmasına kadar geçen sürecin her basamağında bana destek olan, çok iyi bir yol gösterici olmanın yanında örnek bir cerrah olan Prof. Dr. Mehmet Ayvaz'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde çok önemli katkıları olan ve bana değerli zamanlarını ayıran Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Betül Arıca Yegin, Prof. Dr. Samiye Yabanoğlu Çiftçi ve Dr. Öğr. Üyesi İpek Baysal'a,

Çalışmama emek veren TOBB Üniversitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Teyfik Demir ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma Kübra Erbay'a, ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Saadet Özen Akarca Dizakar'a,

5 yıl boyunca beraber çalışma şansına sahip olduğum, her biri hem çok iyi birer meslektaş hem de eşsiz dost olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Sevgili annem M. Oya Çetik ve sevgili babam M. Fikret Çetik'e, örnek karakteri ve çalışkanlığıyla ağabeyi olmaktan hep gurur duyduğum, gelecekte bütün ailemizin göğsünü kabartacak başarılarla imza atacağına emin olduğum sevgili kardeşim Ece Melisa Çetik'e,

En güzel anılarımı beraber biriktirdiğim, kötü günlerimde beni anlayıp bana sonsuz destek olan, hayat arkadaşım ve sevgili eşim Uzm. Dr. Sıla Çetik'e, hayatımıza anlam katan güzel kızım Lara'ya,

Ve hepsinden önemlisi, bu toprak parçasının bize bir vatan olmasını sağlayan, ilkeleri ile Türk gençliğine örnek olan Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'e

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ÇETİK RM. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-3 (TGF- β 3) Yüklü Nanopartiküllerin Sıçanlarda Aşil Tendon İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanlık Tezi, Ankara 2021. İnsan vücudundaki en dayanıklı tendon olan aşil tendonu, aynı zamanda en sık yaralanan tendonlardan da birisidir. Kısa süreli *in vivo* etkinliğe sahip TGF- β 3 molekülünün embriyonik kök hücrelerde tendinojenezini uyardığı bilinmektedir. Bu tez kapsamında, TGF- β 3 molekülünün aşil tendon yaralanması sonrası iyileşme sürecine katkısının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, sıçan aşil tendonlarında tek taraflı oluşturulan tendon yaralanması modelinde; uzun etki süresine sahip TGF- β 3 yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit)-b-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) nanopartiküllerinin *in vivo* etkinliği değerlendirildi. 80 adet erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan; kontrol (C) grubu, boş kitosan film (Ch), serbest TGF- β 3 içeren kitosan film (ChT), TGF- β 3 yüklü nanopartikül içeren kitosan film (ChN) uygulanan grup olmak üzere 4 farklı gruba ayrıldı. 3. ve 6. haftada hayvanların sakrifiye edilmesiyle her grupta 10 adet sıçan bulunan 8 grupta tendonlar biyomekanik, histolojik (Movin ve Bonar skorları ile), immünohistokimyasal (tip I ve tip III kollajene yönelik) olarak incelendi ve gen ekspresyon düzeyleri (COL1A1, COL3A1, scleraxis, tenomodulin) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle tayin edildi. Histolojide; ChT ve ChN'nin doku iyileşmesini 3. ve 6. haftalarda olumlu etkilediği görüldü. 3. haftada ChT'nin maksimum yük, 6. haftada ise ChN'nin maksimum gerilim ölçümlerinde belirgin fark olduğu tespit edildi. İmmünohistokimyasal analizde; ChN'nin 3. haftada tip III kollajen, 6. haftada ise tip I kollajen ekspresyonunun belirgin şekilde artmış olduğu saptandı. 3. haftada COL1A1'nin ChT ve ChN'de artmış eksprese edildiği, COL3A1'nin ise sadece ChN'de artmış eksprese edildiği belirlendi. Sonuçlar, TGF- β 3 yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerini içeren kitosan filmin sıçanlarda aşil tendon yaralanmasını takiben iyileşme sürecine olumlu katkı sağladığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Aşil tendonu, tendon yaralanması, TGF- β 3, nanopartikül, PLGA-b-PEG, kitosan film

Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü Proje No: THD-2020-18657

ABSTRACT

ÇETİK RM. Evaluation of the Effect of Transforming Growth Factor Beta-3 (TGF-β3) Loaded Nanoparticles on Healing in a Rat Achilles Tendon Injury Model. Hacettepe University Faculty of Medicine, Orthopedics and Traumatology Thesis, Ankara 2021. Achilles tendon is the strongest tendon in the human body, and is one of the most frequently injured tendons . TGF-β3 was shown to induce tendinogenesis in embryonic stem cells; but it's in vivo effects are not long-lasting. The aim of this thesis project is to evaluate the effect of TGF-β3 on healing after achilles tendon injury. For this purpose, on a unilateral achilles tendon injury model in rats, the in vivo efficacy of TGF-β3 loaded polylactic-co-glycolic acid-b- polyethylene glycol (PLGA-b-PEG) nanoparticles has been evaluated. 80 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups: control (C), empty chitosan film (Ch), chitosan film containing free TGF-β3 (ChT) and chitosan film containing TGF-β3 loaded nanoparticles (ChN). 40 rats were sacrificed in the 3rd week, and the remaining 40 in the 6th week; therefore 8 experimental groups were formed with 10 rat in each. Tendons were evaluated biomechanically, histologically (Bonar and Movin scores), immunohistochemically (type I and type III collagen); and gene expression analysis was done for COL1A1, COL3A1, scleraxis and tenomodulin by using real time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Histologic analysis showed better scores for both ChT and ChN groups. Biomechanically, ChT group had a higher maximum load on 3rd week, and ChN group had higher maximum stress on 6th week. Immunohistochemically, ChN group was shown to express higher amounts of type III collagen on 3rd week and type I collagen on 6th week. Gene expression for COL1A1 was higher for ChT and ChN on 3rd week, COL3A1 was only higher in ChN group. Our results indicate that TGF-β3 loaded PLGA-b-PEG nanoparticles, which have a longer duration of action, show positive effects on achilles tendon healing in a rat model.

Keywords: Achilles tendon, tendon injury, tendon rupture, TGF-β3, nanoparticle, PLGA-b-PEG

Hacettepe University Scientific Research Project Commission Project No: THD-2020-18657

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE ve KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aşıl Tendonu ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.1.1. Aşıl Tendonunun Histolojisi.....	3
2.1.2. Aşıl Tendonunun Anatomisi.....	5
2.1.3. Aşıl Tendonunun Biyomekanik Özellikleri.....	7
2.2. TGF- β 3 ile İlgili Genel Bilgiler	8
2.2.1. TGF- β 3'ün Moleküler Yapısı	8
2.2.2. TGF- β 3'ün Etki Mekanizması	10
2.2.3. TGF- β 3'ün Vücuttaki Etkileri.....	11
2.3. Kitosan Filmler ve Nanopartiküller ile İlgili Genel Bilgiler	12
2.3.1. Kitosan Filmler	12
2.3.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküller.....	13
2.4. Aşıl Tendon Yaralanmaları	14
2.4.1. Aşıl Tendon Yaralanmaları Hakkında Genel Bilgiler.....	14
2.4.2. Aşıl Tendon Yaralanmalarında Tedavi Yöntemleri.....	16
2.4.3. Aşıl Tendon Yaralanmalarında Biyolojik Yöntemler	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma Planı	20
3.2. Nanopartiküllerin ve Kitosan Filmlerin Hazırlanması.....	21
3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile PLGA-b-PEG Boş Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	21
3.2.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile TGF- β 3 Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	22

3.2.3. Nanopartiküler Karakterizasyonu.....	23
3.2.4. Nanopartiküllerine TGF- β 3 Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi.....	23
3.2.5. Etkin Madde Salım Çalışmaları.....	24
3.2.6. Kitosan Filmlerin Hazırlanması	24
3.2.7. TGF- β 3 Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Sitotoksosite Çalışmaları.....	26
3.3. Cerrahi Prosedür	26
3.4. Sonuçların Eldesi	29
3.4.1. Biyomekanik Değerlendirme	29
3.4.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme	33
3.4.3. RT-PCR İle Gen Ekspresyonu Değerlendirmesi.....	37
3.4.4. İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	39
4.1.1. Boş PLGA Nanopartikülleri.....	39
4.1.2. TGF- β 3 Yüklü PLGA Nanopartiküller.....	40
4.2. TGF- β 3 Yüklü PLGA Naopartikülleri Etkin Madde Salım Çalışmaları.....	42
4.3. Genel Bulgular	43
4.4. Biyomekanik Bulgular	46
4.5. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	52
4.6. RT-PCR İle Gen Ekspresyonu Analizi Bulguları	66
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	80

SİMGE VE KISALTMALAR

ACT: Aktivinler

AOD: *Average optical density*

BLK: Büyük latent kompleks

BMP: Kemik morfogenetik protein, *Bone morphogenetic protein*

DAB: Diaminobenzedin

ESM: Ekstraselüler matriks

FGF: *Fibroblast growth factor*

GAG: Glukozaminoglikan

GDF: Büyüme ve farklılaşma faktörü, *Growth and differentiation factor*

GNDF: Glial hücre türevli nörotrofik faktör, *Glial derived neurotrophic factor*

GP: Glikoprotein

Gpa: Gigapascal

HE: Hematoksilen-eozin

HGF: *Hepatocyte growth factor*

INH: İnhibinler

IP: İntraperitoneal

IV: İntravenöz

kDa: Kilodalton

KLK: Küçük latent kompleks

kN: Kilonewton

KS: Kitosan

LAP: Latens ilişkili peptid

MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2

MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9

Mpa: Megapaskal

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür

PA: Peroneal arter

PBS: *Phosphate buffered saline*

PDGF: *Platelet derived growth factor*

PG: Proteoglikan

PLGA-b-PEG: Poli (laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli (etilen glikol)

PRP: Trombositten zengin plazma

PTA: Posterior tibial arter

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

SP: Sinyal peptidi

SS: Standart sapma

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü- β , *Transforming growth factor- β*

μ m: Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa No.
Şekil 2.1. Aşil tendonunun hiyerarşik yapısı.....	3
Şekil 2.2. Aşil tendonunun kanlanması.....	6
Şekil 2.3. Örnek bir gerilim-gerinim eğrisi.....	8
Şekil 2.4. TGF- β sentezindeki moleküler basamaklar.....	9
Şekil 2.5. TGF- β sinyal yolları ve ara mesajcılar.....	11
Şekil 3.1. Kitosan film hazırlanışının şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.2. 1*1 cm ebatlarında kitosan film.....	25
Şekil 3.3. Baldır posteriorunda yapılan longitudinal insizyon ve aşil tendonu.....	26
Şekil 3.4. Kitosan filmin aşil tendon kesilmeden önceki pozisyonu.....	27
Şekil 3.5. Kitosan filmin aşil tendonu kesildikten sonra etrafına sarılmış haldeki görüntüsü.....	28
Şekil 3.6. Operasyon tamamlandıktan sonra cildin dikişlerle kapatılması.....	28
Şekil 3.7. Biyomekanik test için hazırlanan aşil tendonunun etrafına zımpara kağıdı uygulanması.....	30
Şekil 3.8. Test için hazırlanan tendonun cihaza polietilen klempler üzerinden tutturulması.	31
Şekil 3.9. Universal test cihazı (Instron® 5944, Norwood, ABD).....	31
Şekil 3.10. Onarım bölgesinden kopan bir tendon örneği.....	32
Şekil 3.11. Ölçümlerde kullanılan gerilim-gerinim eğrisine bir örnek.....	32
Şekil 4.1. Hazırlanan boş nanopartiküllerin boyut dağılım grafikleri.....	39
Şekil 4.2. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin boyut dağılım grafikleri.....	41
Şekil 4.3. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	42
Şekil 4.4. TGF- β 3 yüklü PLGA nanopartiküllerinin TGF- β 3 salım profili.....	42
Şekil 4.5. 3. hafta ortalama tendon uzunluğu grafiği.....	44
Şekil 4.6. 6. hafta ortalama tendon uzunluğu grafiği.	44
Şekil 4.7. 3. hafta ortalama tendon kesit alanı grafiği.	45
Şekil 4.8. 6. hafta ortalama tendon kesit alanı grafiği.	46
Şekil 4.9. 3. hafta ortalama maksimum yük grafiği.	47
Şekil 4.10. 3. hafta ortalama rijitlik grafiği.	48

Şekil 4.11. 3. hafta ortalama maksimum gerilim grafiği.	48
Şekil 4.12. 3. hafta ortalama elastik modülüs grafiği.	49
Şekil 4.13. 6. hafta ortalama maksimum yük grafiği.	50
Şekil 4.14. 6. hafta ortalama rijitlik grafiği.	50
Şekil 4.15. 6. hafta ortalama maksimum gerilim grafiği.	51
Şekil 4.16. 6. hafta ortalama elastik modülüs grafiği.	52
Şekil 4.17. Hematoksilen-eozin boyama sonrası alınan histolojik kesitler.....	53
Şekil 4.18. Masson's trichrome ile boyama sonrası alınan histolojik kesitler.....	54
Şekil 4.19. Alcian blue ile boyama sonrası alınan histolojik kesitler.....	55
Şekil 4.20. 3. hafta ortalama total Bonar skoru grafiği.	56
Şekil 4.21. 6. hafta ortalama total Bonar skoru grafiği.....	57
Şekil 4.22. 3. hafta ortalama total Movin skoru grafiği.....	59
Şekil 4.23. 6. hafta ortalama total Movin skoru grafiği.....	60
Şekil 4.24. Tip I kollajene yönelik olarak yapılan ilmmünohistokimyasal boyama sonrası alınan histolojik kesitler.	61
Şekil 4.25. Tip III kollajene yönelik olarak yapılan ilmmünohistokimyasal boyama sonrası alınan histolojik kesitler.	62
Şekil 4.26. 3. hafta, tip I kollajen immünohistokimya sonuçları.....	63
Şekil 4.27. 3. hafta, tip III kollajen immünohistokimya sonuçları.	64
Şekil 4.28. 6. hafta, tip I kollajen immünohistokimya sonuçları.	65
Şekil 4.29. 6. hafta, tip III kollajen immünohistokimya sonuçları.....	65
Şekil 4.30. COL1A1 rölatif gen ekspresyonu.	67
Şekil 4.31. COL3A1 rölatif gen ekspresyonu.	68
Şekil 4.32. SCX rölatif gen ekspresyonu.	68
Şekil 4.33. TNMD rölatif gen ekspresyonu.	69

TABLOLAR

Tablo	Sayfa No.
Tablo 3.1. Deney gruplarının dağılımı.	20
Tablo 3.2. Boş PLGA nanopartikül formülasyonları.	22
Tablo 3.3. Bonar histopatolojik skorlama sistemi.	36
Tablo 3.4. Movin histopatolojik skorlama sistemi.	37
Tablo 3.5. RT-PCR gen ekspresyonu analizinde kullanılan primerler.	38
Tablo 4.1. Hazırlanan boş nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel verileri	39
Tablo 4.2. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve yükleme oranı verileri	41
Tablo 4.3. Grupların ortalama tendon uzunlukları ve kesit alanları.	43
Tablo 4.4. Biyomekanik analiz sonuçları.	46
Tablo 4.5. Ortalama total Bonar skorları ve alt skorları.	52
Tablo 4.6. Ortalama total Movin skorları ve alt skorları.	58
Tablo 4.7. Tip I ve tip III kollajen optik yoğunlukları.	60
Tablo 4.8. Rölatif gen ekspresyonları.	66
Tablo 4.9. Grupların rölatif gen ekspresyonlarının intakt kontroller ile karşılaştırmasından elde edilen p değerleri.	66

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kas-iskelet sistemi hastalıkları, 50 yaş üzeri popülasyonun kronik rahatsızlıklarının yarısından fazlasını [1] ve gençlerin spor ilişkili yaralanmalarının %30-50'sini oluşturan [2] önemli sağlık sorunlarıdır. Tendon yaralanmaları da bu hastalıklar içerisinde çok önemli bir paya sahiptir.

İnsan vücudundaki en dayanıklı tendon olan aşil tendonu, aynı zamanda en sık yaralanan tendonlardan da birisidir. Yıllık insidansı 7-40/100.000 arasında bildirilen bu yaralanmalarla en sık 30-40 yaş aralığındaki erkeklerde karşılaşılr [3].

Tendon dokusunun düşük yenilenme hızı, zayıf vaskülarite ve inervasyon gibi sebeplerden dolayı; hasar gören tendon dokusunun iyileşmesi genellikle uzun sürer ve sonuç olarak daha zayıf ve tekrar yaralanmaya yatkın bir doku oluşur [4, 5]. Başarılı tedavi sağlamanın çok zor olduğu bu yaralanmalarda, yeni tedavi seçeneği olarak potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla birçok biyolojik ajan deneme aşamasındadır. Bunların içerisinde güncel olarak en umut verici olanlardan birisi de “Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-3” (TGF- β 3) molekülüdür.

TGF- β 3 molekülü, antifibrotik etkisi ve skarsız iyileşme sağlması [6] sebebiyle uzun süredir birçok çalışmada yer almıştır ve embriyonik kök hücrelerde tendinojenezi uyardığının da gösterilmesiyle beraber [7, 8], kas-iskelet araştırmacılarının da ilgi alanına girmiştir. Rotator manşet yaralanmalarında TGF- β 3'ün olumlu etkileri çalışmalarla gösterilmişken [9-11], henüz aşil tendon yaralanmaları üzerine olan etkisi çalışılmamıştır. Bununla birlikte TGF- β 3'ün *in vivo* koşullarda uygulanabilir olması açısından en büyük sorun kısa etki süresine sahip olmasıdır.

Bu tez kapsamında, TGF- β 3 molekülünün aşil tendon yaralanması sonrası iyileşme sürecine katkısının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, sıçan aşil tendonlarında tek taraflı oluşturulan tendon yaralanması modelinde; uzun etki süresine sahip TGF- β 3 yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit)-b-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) nanopartiküllerinin *in vivo* etkinliği değerlendirildi. Tendon yaralanması modelinde nanopartiküllerin lokal uygulanabilirliğini sağlamak, uzun süreli etki elde edebilmek ve doku yıkımını yavaşlatmak için TGF- β 3 yüklü nanopartiküller içeren kitosan film kullanıldı.

Hipotezimiz; TGF- β 3 uygulamasının histolojik olarak iyileşmeyi hızlandıracağı, biyomekanik olarak dayanıklı bir doku oluşumunu sağlayacağı, immünohistokimyasal açıdan doğal aşıl tendon dokusu ile uyumlu olacağı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle yapılan çalışmada gen ekspresyonu açısından tendinojenez sürecini daha iyi yansıtacağı yönündedir.

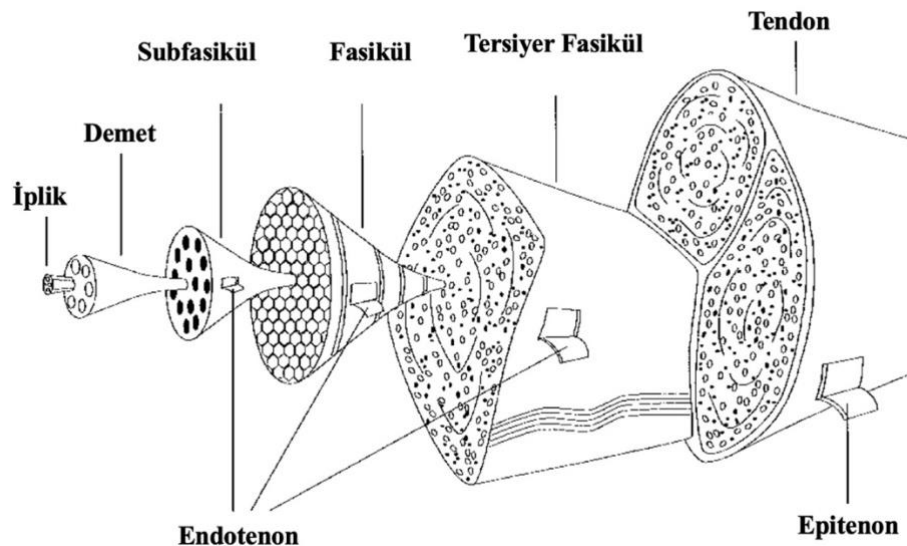
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Aşil Tendonu ile İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. Aşil Tendonunun Histolojisi

Aşil tendonu, vücudun diğer tendonlarına benzer bir histolojik yapıya sahiptir. Bu yapıyı; ana hücresel eleman olan tenositler ve bunların etrafında büyük oranda tip I kollajen içeren bir ekstraselüler matriks (ESM) oluşturur [12]. Bu klasik bağ doku yapısı hücre içeriği açısından fakirdir, temel hücresel elemanlar olan tenoblast ve tenositler ise fibroblast kökenli hücrelerdir [13].

Ekstraselüler matriks içeriğinin yaklaşık olarak %30'u kollajen, %2'si elastin ve %68'i sudan oluşmaktadır [14]. Bu kollajen protein içeriğinin %90'dan fazlası tip I kollajendir [12]. Tendon içerisinde bu proteinler, hiyerarşik bir yapı oluşturacak şekilde dizilmişlerdir. Bu yapı küçükten büyüğe doğru; iplikçik (mikrofibril), iplik (fibril), demet (fiber) ve fasiküllerden oluşur (Şekil 2.1.). Kollajenler; iplik oluşturan tipler (I, II, III, V, XI), iplik ilişkili tipler (IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI), altıgen ağ oluşturan tipler (VIII, X), iplikçik oluşturan tip (VI) ve bazal membran tipi (IV) olmak üzere kategorize edilebilir [15, 16].



Şekil 2.1. Aşil tendonunun hiyerarşik yapısı [17].

Birbirine paralel dizilmiş ve sıkıca paketlenmiş tip I kollajen molekülleri, iplikleri oluşturur. İplikler ise yine paralel bir dizilimde bir araya gelir ve demetleri oluşturur. Tipik bir aşıl tendon ipliğinin çapı 60 µm'dir. İplikçiklerin çapı ise 30-130 nm arasında değişir [14]. Demetler; sinir uçları, damarlar, lenfatik venlerin de katılımıyla fasikülleri oluşturur. Biyomekanik olarak test edilebilen en küçük tendon birimi fasiküllerdir [14]. Endotenon ile çevrili olan fasiküller bir araya gelerek makroskopik tendonu oluştururlar. Tendonu çevreleyen epitenon ve paratenon katmanları arasında, hareket sırasında sürtünmeyi azaltmayı amaçlayan sıvı içeriğinden yoğun gevşek bir bağ doku tabakası bulunur (Şekil 2.1.) [13].

Tendona biyomekanik özelliklerini kazandıran, kollajenden sonra en önemli molekül olan elastin, toplam ağırlığın %1'inden azını oluşturmaktadır [15]. Elastin, ESM'de tropoelastin molekülleri tarafından oluşturulur ve mikrofibriler bir çatıya bağlanır. Elastinin biyomekanik özellikleri kollajene göre oldukça farklıdır ve yük altında %200'e kadar uzayabilir, sonrasında ise eski şeklini tekrar kazanabilir [13].

ESM içerisinde, proteoglikanlar (PG) ve kollajen dışı glikoproteinler (GP) de bulunmaktadır. Bunların, hücrel çoğalmanın kontrolü, farklılaşma, hücre migrasyonu ve tenosit sağkalımı gibi çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir [17]. Aşıl tendonunda, küçük yapıları PG'ler arasından en çok bulunanı dekorin, büyük yapıları içerisinde ise versikan ve agrekandır [15]. Kollajen dışı GP'ler arasında ise aşıl tendon yapısında en çok görülenler; fibronektin, laminin, trombospondin ve tenaskin-C'dir [17].

Tendonun hücrel elemanlarının %95'ini, tenosit ve tenoblastlar oluşturur. Bunların dışında az miktarda sinovyal hücreler, kondrositler ve vasküler hücrelere de rastlanır [13, 16, 17]. Tenoblastlar, yeni gelişmekte olan aşıl tendonunda çok bol miktarda bulunur. Uzun, paralel zincirler halinde dizilen bu farklı şekil ve büyüklükteki hücreler, ESM proteinlerinin sentezinden sorumludur. Pinositotik veziküller, aktin ve myozin içeriği ve yoğun lizozom içeriği bu hücrelerin karakteristik özelliğidir. Gelişimin tamamlanması sırasında bu hücreler işsi bir şekil alarak tenositlere farklılaşırlar [15].

Tendon histolojisi ve yapısı incelenirken, tendon yaralanması esnasında ve sonrasında bu yapının değişikliğe uğradığı unutulmamalıdır.

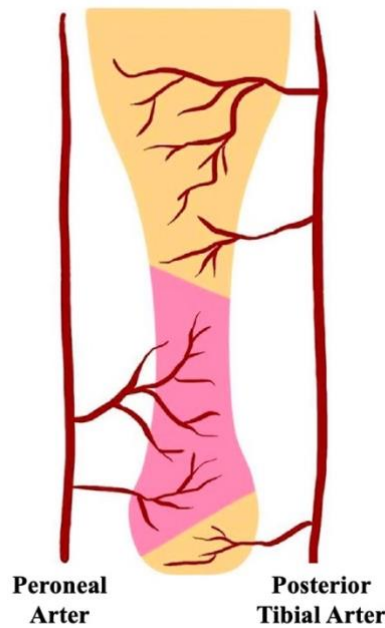
2.1.2. Aşil Tendonunun Anatomisi

Gastroknemius ve soleus kaslarının tendonlarının birleşimiyle oluşan aşil tendonu, vücuttaki en dayanıklı ve en geniş tendondur [14]. Bu tendon, baldırın yaklaşık olarak orta hizasında, posterior kompartmandaki en yüzeysel kas olan gastroknemiusun liflerinden oluşur [13]. Gastroknemiusun hemen inferiorunda plantaris kası bulunur. Bu kas, aşil tendonundan bağımsız olarak kabul edilmesine rağmen, bazı kaynaklarda aşil tendonu içerisine katılabildiği gösterilmiştir [18]. Bu iki kasın hemen anteriorunda ise soleus kası yer alır. Gastroknemius'un medial başı tendonun posterior liflerini, lateral başı ise anterior liflerini oluştururken, santral lifler ise soleustan köken almaktadır [19]. Bunun sebebi de aşil tendonunda ipliklerin düz bir şekilde insersiyoya kadar ilerlememesi, bunun yerine bir spiral gibi 90°'ye kadar dönerek ilerlemesidir [13].

Aşil tendonunun uzunluğu popülasyonda 11-26 cm arasında değişken olarak saptanmıştır ve ortalaması 15 cm'dir [13]. Tendonun kalınlığı ise, orijininde ortalama 6.8 cm (değer aralığı 4.5-8.6), orta kısmında en ince yerinde ortalama 1.8 cm (değer aralığı 1.2-2.6) ve kalkaneusa yapışma yerinde ortalama 3.4 cm (değer aralığı 2-4.8) olarak tespit edilmiştir [13].

Tendonun kalkaneus üzerindeki insersiyosu, posterior kalkaneal prominens üzerinde, medial ve laterale doğru genişleyen hilal şeklinde bir bölge oluşturmaktadır ve yarı çapı 13.8 mm ile 43.6 mm arasında değişmektedir [20]. Tendon, insersiyonun 4 cm proksimaline kadar dairesel bir kesit alanına sahipken, bu noktadan distale ilerleyişi sırasında insersiyoya yaklaştıkça genişler.

Aşil tendonunun distal ucunda farklı yerleşimli, derin ve yüzeysel bursalar bulunabilmektedir. Bunların en sık görüleni, aşil tendonu ile kalkaneusun posterioru arasında yer alan retrokalkaneal bursadır [21]. Anterior duvarı fibrokartilaj yapıda olan bu bursanın posterior duvarı incedir ve aşil paratenonu ile birleşiktir [13]. Daha düşük sıklıkta görülen bursalar ise, aşil tendonu ile cilt arasında bulunan yüzeysel bursa ve kalkaneus ile plantar fasyanın başlangıcı arasında genişçe yayılan retrokalkaneal bursalardır.



Şekil 2.2. Aşil tendonunun kanlanması [15].

Kalkaneusun posterior-superior yüzeyi, tibia'nın posterior yüzeyi ve aşil tendonu arasında kalan bölgeye Kager üçgeni denir [22]. Bu bölge, aşil tendonu ile derin fleksörleri birbirinden ayırmaktadır. Fleksör hallucis longus, fasyal septum ile tibia arasında yer almaktadır. Kager üçgeni içerisindeki yağlı gevşek bağ dokusu, içerdiği damarlarla aşil tendonunun kanlanmasına katkıda bulunmaktadır [14].

Baldır posteriorunda medialde posterior tibial arter (PTA), lateralde ise peroneal arter (PA) seyretmektedir. Tendonun proksimal ve distali PTA tarafından beslenmekteyken, orta kesimi ise PA tarafından beslenir (Şekil 2.2.) [23]. Yapılan bir çalışmada, tendon kanlanmasının kantitatif analizi sonucunda tendonun proksimal ve distalinde sırasıyla 73.4 damar/cm² ve 56.6 damar/cm² olan vasküler dansite, tendonun orta kesiminde 28.2 damar/cm²'ye düşmüştür [24]. Tendonun bu damarlanma özellikleri, yaralanmaya yatkınlık ve iyileşme kapasitesinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Tendon kanlanmasının yaşla beraber azaldığı da unutulmamalıdır [13].

Aşil tendonunun inervasyonu, temel olarak sural sinirin dalları tarafından sağlanmaktadır. Bu sinir, tibial sinirin bir dalı olan medial sural kütanöz sinir ile peroneal sinirin komünikan dalının baldır orta 1/3'ünde birleşmesi ile oluşur, farklı varyasyonlar da bildirilmiştir [25]. İnversiyonun yaklaşık 8-10 cm proksimalinde,

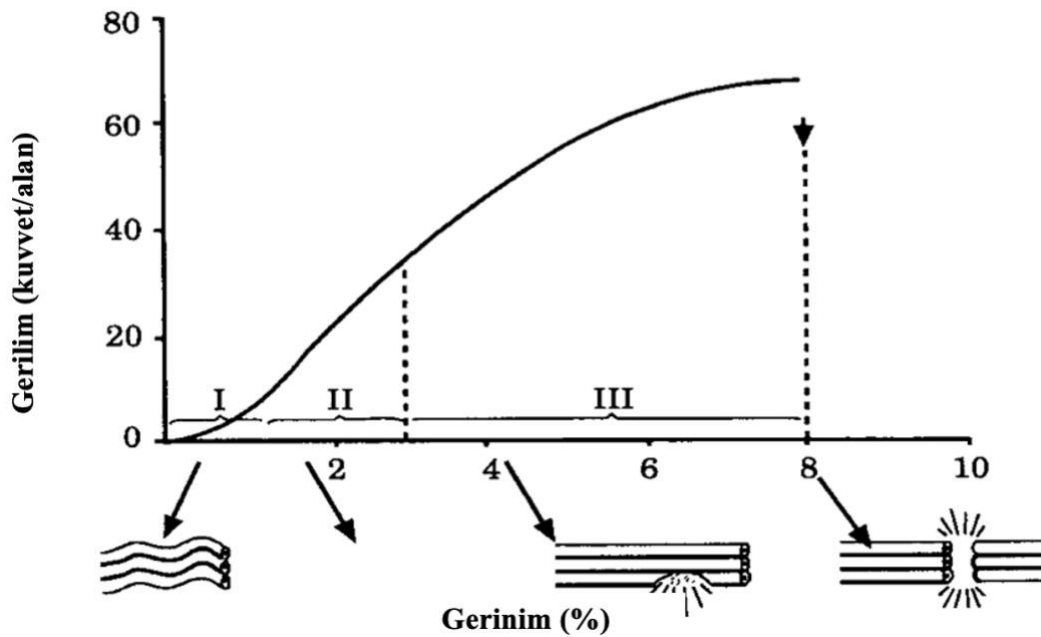
sural sinir aşıl tendonunun lateral sınırının komşuluğunda seyreder ve bu ilişki özellikle aşıl tendon cerrahisi sırasında önemlidir [15]. Aşıl tendonunun tibial sinirden de dallar alabildiği bilinmektedir [13]. Afferent sinir uçlarının büyük çoğunluğu, kemik-tendon bileşkesi ve çevresinde sonlanmaktadır ve dört çeşit reseptör gözlenmektedir: tip 1 Ruffini korpuskülü, tip 2 Vater-Paccini korpuskülü, tip 3 golgi tendon aparatı ve tip 4 serbest sinir uçları.

2.1.3. Aşıl Tendonunun Biyomekanik Özellikleri

Aşıl tendonu, ayak bileğinin en kuvvetli plantar fleksörlerinin oluşturduğu kuvveti iletir; diz, ayak bileği ve subtalar eklemler üzerine etki gösterir [15, 26]. Hasar oluşmadan önce tendonun %4'e kadar gerinime dayanabildiği bilinmektedir [14]. Tendonun maruz kaldığı yük; yürüme sırasında 2.6 kN, sıçrama sırasında 3.8 kN ve koşma sırasında vücut ağırlığının 12 katından fazla olan 9 kN'nin üzerinde ölçülmüştür [15, 26, 27].

Aşıl tendonunun mekanik özelliklerinin *in vitro* koşullarda ölçümünde iki farklı eğriden faydalanılabilir. Bunlardan ilki, yük-yer değiştirme eğrileri; ikincisi ise daha sık kullanılan, materyalin boyutlarının ölçümde oluşturabileceği farklılıkları ortadan kaldırma avantajına sahip olan gerilim-gerinim eğrileridir (Şekil 2.3.) [15]. Yapılan *in vitro* ölçümlerde aşıl tendonunun Young modülüsü 1-2 GPa, en üst dayanma gerilimi 100 MPa, en üst dayanma gerinimi %4-10 olarak bulunmuştur [15, 27].

Biyomekanik özelliklerin *in vivo* koşullarda ölçümü de farklı metodlarla yapılabilmektedir: ultrasonografi [28-30], manyetik rezonans görüntüleme (MRG) [31, 32] ve dinamometri [33] bunlardan bazılarıdır. *In vivo* ölçüm metodlarının biyomekanik sonuçları, kullanılan tekniklerin standardize edilmesinin güç olması sebebiyle oldukça farklı bulunmaktadır [15]. Bu metodlar, yaşlanma gibi fizyolojik ve tendinopati gibi patolojik süreçlerin tendon üzerine etkilerinin incelenmesi açısından oldukça önemlidir [34, 35].



Şekil 2.3. Örnek bir gerilim-gerinim eğrisi [13].

2.2.TGF- β 3 ile İlgili Genel Bilgiler

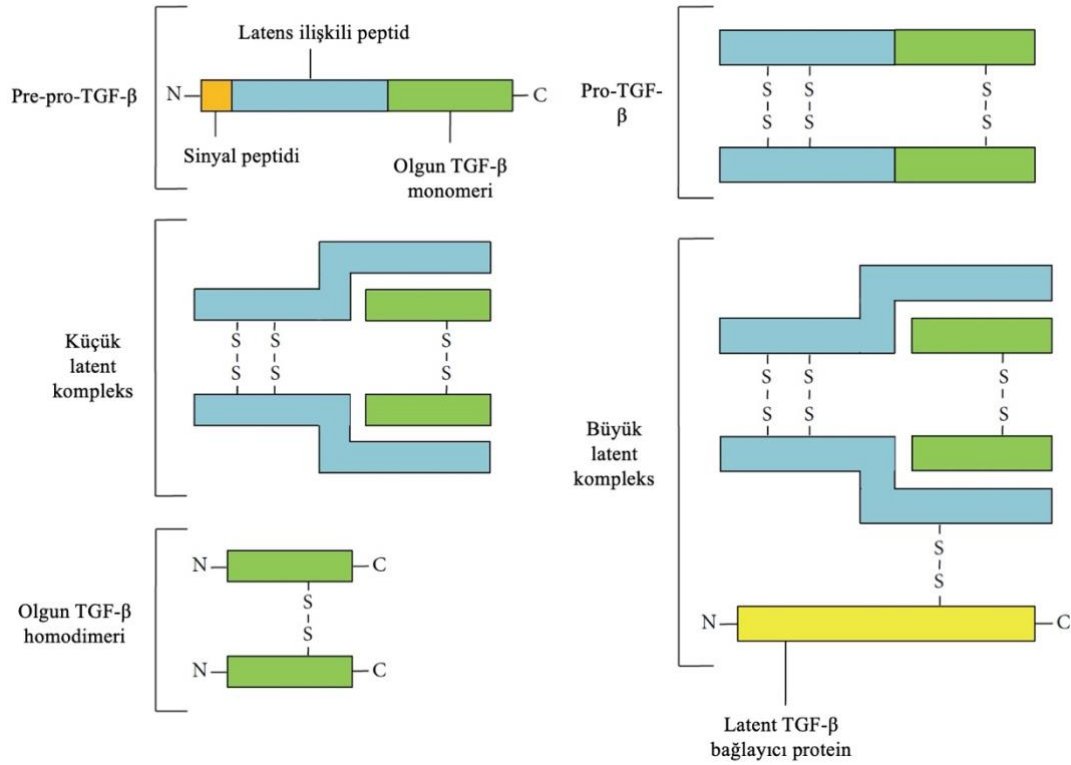
2.2.1. TGF- β 3'ün Moleküler Yapısı

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süperailisi, sürekli genişlemekte olan ve birçok düzenleyici polipeptidi içinde barındıran bir protein ailesidir. Bu protein süperailisi TGF- β ailesi dışında kemik morfogenetik protein (BMP), büyüme ve farklılaşma faktörü (GDF), aktivinler (ACT), inhibitörler (INH), glial hücre türevli nörotrofik faktör (GDNF) gibi farklı moleküler aileleri de içermektedir [36].

TGF- β ailesinde yer alan proteinler etkilerini otokrin, parakrin veya endokrin sinyal iletim yolları ile gösterebilirler [36, 37]. Bu aile, insan vücudu için elzem olan birçok fizyolojik süreçte rol almaktadır: embriyonik gelişim esnasında mezenter-epitel etkileşimleri, doku farklılaşması, immün fonksiyonların düzenlenmesi ve yaralanmaya karşı doku yanıtı bunların başlıcalarıdır [36, 38].

Memelilerde üç farklı TGF- β izoformu bulunur: TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3. Bu izoformların hepsi farklı kromozomların üzerindeki farklı genler tarafından kodlanmaktadır. TGF- β 1'in geni 19q13.1 lokasyonunda, TGF- β 2'nin geni 1q41 lokasyonunda ve TGF- β 3'ün geni ise 14q24 lokasyonundadır [36, 39, 40].

Sentezlenen izoformlar ise, %70'in üzerinde amino asit homolojisine sahiptir [36]. TGF- β sentezi; makrofajlar, fibroblastlar, trombositler ve tümör hücreleri gibi birçok farklı hücre tipi tarafından gerçekleştirilebilmektedir [38].



Şekil 2.4. TGF- β sentezindeki moleküler basamaklar [36].

TGF- β izoformlarının sentezi ve post-translasyonel modifikasyonları, kompleks ve çok basamaklı bir süreçtir ve birçok farklı enzim tarafından kontrol edilir (Şekil 2.4.) [36]. İzofomların hepsi ilk olarak, 390 amino asitten oluşan 55 kDa ağırlığında bir monomer olan pre-pro-TGF- β formunda sentezlenir. Bu monomerin yapısında; N-terminalinde 29 amino asitlik bir sinyal peptidi (SP), 249 amino asitlik bir latens ilişkili peptid (LAP) ve 112 amino asitlik bir C-terminal peptidi bulunur. Aktif TGF- β izomerleri, C-terminal peptidinin farklı modifikasyonları sonucu oluşur [41, 42]. Sürecin devamında, enzimatik proteoliz, SP'nin çıkarılması ve üç adet disülfid bağı ile iki monomerin bir dimer oluşturmak üzere birbirine bağlanması gerçekleşir [43]. Bu sürecin sonunda küçük latent kompleks (KLK) oluşur. TGF- β hücre dışına inaktif formda salınır. KLK, latent TGF- β bağlayıcı protein ile birleşerek, büyük latent kompleks (BLK) oluşturur. BLK, biyolojik olarak inaktiftir ve hücre dışına salınır.

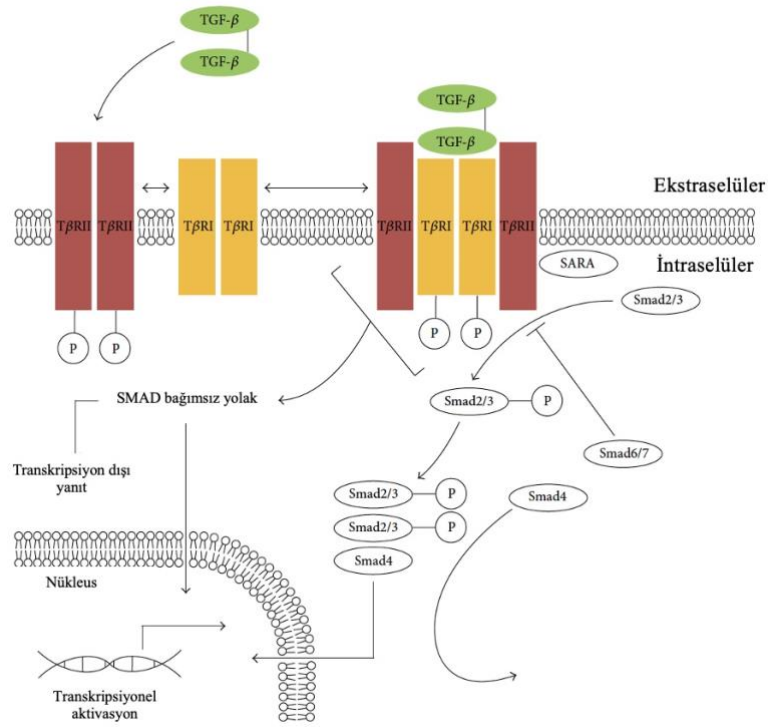
ESM içerisinde plazmin, matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), BMP-1, trombospondin-1, retinoik asit gibi farklı enzim ve moleküllerle kurulan etkileşim sonrasında aktif TGF- β oluşur [44-47].

2.2.2. TGF- β 3'ün Etki Mekanizması

TGF- β ailesi, bulunduktan sonra çok sayıda çalışmaya konu olmuş ve yoğun olarak araştırılmıştır. İlk dikkat çeken özellikleri ise farklı epitel ve hematopoietik hücre serilerinde büyüme inhibisyonu yapması, aynı zamanda mezenkimal kökenli hücrelerin ekstraselüler matriks sentezini regüle etmesi olmuştur [48]. Bu aile, temel olarak hedef hücrelerde gen ekspresyonlarının değişimine sebep olur [48].

Salınım ve aktivasyonlarının ardından TGF- β ailesi, plazma membranındaki spesifik bir serin/treonin kinaz reseptörüne bağlanarak etkisini hücre içine iletir [49]. TGF- β reseptör ailesinin, her biri sisteinden zengin ekstraselüler bir kısım ve kinaz etkili intraselüler kısımdan oluşan T β RI ve T β RII olmak üzere iki farklı üyesi vardır [38]. TGF- β molekülleri, T β RII üzerinden etki gösterirler.

TGF- β yolağındaki ikincil mesajcılar, Smad molekülleridir. Sitoplazmik bir ara molekül olan Smad'lar 3 grup halinde incelenmektedirler: reseptör ilişkili olan R-Smadlar (Smad 1, 2, 3, 5 ve 8), ortak mediatör Co-Smadlar (Smad 4) ve inhibitör özellikte olan I-Smadlar (Smad 6 ve 7) [50]. TGF- β hücre içi sinyal iletim yolağı ve Smad moleküllerinin rolü Şekil 2.5.'te gösterilmektedir. Burada bahsedilen yollar, TGF- β 3 için de ortaktır.



Şekil 2.5. TGF-β sinyal yolları ve ara mesajcılar [36].

2.2.3. TGF-β3'ün Vücuttaki Etkileri

TGF-β ailesinin insan vücudundaki görevleri ve etkileri araştırılırken en çok bilgi TGF-β1 ve sonra da TGF-β2'yi konu alan çalışmalardan elde edilmiştir; fakat dikkat etmek gerekir ki bu ailenin üyeleri içerisinde yapısal homoloji yüksek oranda olmasına rağmen vücutta etkileri çok geniş yelpazede seyretmektedir [38, 51, 52].

TGF-β3 molekülünün embriyogenezde çok önemli bir rolü olduğu, TGF-β3 knock-out fare deneyleri sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Bu molekülün yokluğu sonucunda oluşan dudak-damak yarığı [53] ve anormal akciğer gelişimi [54] etkileri uzun süredir bilinmekteyken; kardiyovasküler gelişimde de rol oynadığı ve yokluğunun aritmojenik sağ ventrikül displazisi, kardiyomyopati ve çeşitli aritmilere de sebep olabileceği [55] yakın dönemde gösterilmiştir.

TGF-β3'ün immün sistem üzerine etkileri de oldukça belirgindir [52]. T hücrelerinde CD4+ hücrelere olan farklılaşmayı engeller, ve TGF-β3 etkisini nötralize eden antikörlerin T-reg hücre aracılı immünsüpresyonu engellediği gösterilmiştir [52]. TGF-β3'ün bağlandığı reseptör olan TβRII'nin spesifik delesyonunda B hücrelerinin uyarılara aşırı yanıtlar vermeye başladığı da

bilinmektedir [56]. Bu antiinflamatuvar etkilerin yanında, TGF- β 3'ün indirekt proinflamatuvar etkileri de vardır: IL-6 ile birlikte etki ettiğinde, patojenik Th17 hücre serisini uyardığı gösterilmiştir [57] ve LPS ile uyarılmış olan B hücrelerinde antikor sentezini artırmaktadır [58].

TGF- β 3, yara iyileşmesi sürecinde skarsız iyileşmeyi sağlaması yönüyle diğer TGF- β izoformların zıttı bir etki göstermektedir [59]. Erişkinlerin yaralarında TGF- β 1 ve TGF- β 2 ekspresyonu artmaktayken, skarsız iyileşen fetal yaralarda bu moleküllerin yerine TGF- β 3 artışı gözlenir [60]. Skarsız iyileşme etkisi, trakeal stenoz modeli üzerinde de çalışılmıştır [61].

Kas-iskelet sistemi üzerinde de TGF- β 3'ün çeşitli etkileri gösterilmiştir. Embriyonik kök hücrelerde [7] ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerde [8] tenojenik farklılaşmayı uyarmaktadır. Sıçanlarda rotator manşet yaralanmaları sonrasında iyileşmeye olan olumlu etkisi de farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır [10, 11]. Mezenkimal kök hücrelerin kırıkta gelişimi yönünde uyarılması [62, 63] ve kırıkta benzeri ekstraselüler matris sentezi uyarılması [64, 65] da bu molekülün çalışılmış etkileri arasındadır.

2.3. Kitosan Filmler ve PLGA-b-PEG Nanopartiküller ile İlgili Genel Bilgiler

2.3.1. Kitosan Filmler

Kitosan (KS), doğada selülozdan sonra en sık bulunan ikinci polisakkarit olan kitinin bir türevidir [66]. KS'nin kitinden üretilme süreci, 60-80°C arasında, alkaliler kullanılarak kısmi N-deasetilasyon işlemlerini içerir [67]. Bu polimer, pozitif yüklü amin grupları içerir ve β 1-4 bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin'den oluşur [67]. Toksik olmaması, biyo-bozunur ve biyo-uyumlu olması gibi birtakım özellikleri nedeniyle KS, ilaç Ar-Ge çalışmalarında farklı amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır [68].

Kitosan polimerleri, üretilme şekillerine ve koşullarına bağlı olarak değişik özellikler taşır ve molekül ağırlıkları 300-1000 kD arasında değişkenlik gösterir [69]. Viskozite ve molekül ağırlığı, deasetilasyon ile ters orantılıdır. Deasetilasyon derecesi, kitosanın canlı dokuda bozunma süresini de etkiler; deasetilasyon düzeyi ile bozunma süresi arasında pozitif korelasyon vardır [67].

Modifiye edilebilen özellikleri sayesinde KS, farklı moleküller ve ilaçlar için taşıyıcı olarak sık kullanılan bir seçenek olmuştur: Lee ve ark. tarafından KS filmlere yüklenen PDGF-BB'nin osteoblast hücre kültürü üzerine olan çalışması buna bir örnektir [70]. Taşıyıcı polimer olma özelliğinin dışında, ortopedi alanında KS'nin farklı şekillerde de kullanımını görmek mümkündür. Kemik defektine moleküler çatı olarak uygulanması [71], biyo-kompozit kemik çimentosu modeli [72], kırık doku biyomühendisliğinde hidrojel formunun ESM olarak kullanılması [73] bu çeşitliliğin bazı örnekleridir.

2.3.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküller

İlaçların hedef dokulara taşınmasında kullanılabilecek güncel stratejilerden birisi, nano boyutta taşıma sistemleri geliştirmektir. İdeal bir nano-taşıyıcı sistem, ilaç molekülünü sistemde prematür hidrolizden korumalı, aynı zamanda biyo-yararlanımını ve hücre içerisine geçişini de artırmalıdır [74-76].

Poli(etilen glikol) (PEG)'un, poli(laktik asit) (PLA) veya poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi poli(α -hidroksi asit) molekülleriyle birleşerek oluşturduğu blok kopolimerler, ilaç taşınımını konu alan birçok çalışmanın odak noktasıdır [77]. Bu birleşimin avantajları ilk olarak 1994 yılında Gref ve ark. tarafından ortaya konmuştur: PLGA misellerinin üzeri PEG ile kaplandığında yarı-ömürde belirgin bir artış saptanmıştır ve 2 saat sonunda karaciğer tarafından elimine edilen nanopartikül miktarı azalmıştır [78]. Bu blok kopolimerlerin avantajları arasında biyo-uyumlu, kontrollü biyo-bozunur olmaları, görece kolay olan polimer sentezi ve birçok farklı boyutta nanopartikül hazırlamaya olanak vermeleri yer almaktadır [77, 79, 80]. Bu kopolimerler, misel ve nanopartikül yapılar oluşturarak enkapsüle edilen ilaç moleküllerinin taşınımını sağlarlar.

PLA ve PLGA'nın doku mühendisliği ve ilaç taşınımı alanlarında kullanımı sırasında karşılaşılan zorlukların en önemli sebebi, bu moleküllerin hidrofobik özellikte olmalarıdır [74]. Bu poli(α -hidroksi asit)'lerin yapısına PEG gibi hidrofilik özellikte ve biyo-uyumlu bir polimerin katılması, oluşan yeni blok kopolimere hidrofilik özellik katmaktadır ve bu da ilaç taşınımı uygulamalarında kolaylık sağlamaktadır. PLGA yapısına eklenen PEG sayesinde kandaki sirkülasyon süresinin

arttığı, hücre içine alımının hızlandığı ve enzimler tarafından degrade edilme hızının yavaşladığı da gösterilmiştir [81].

Literatürde birçok farklı ilacın taşınımı için PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur: bir non-steroidal anti-enflamatuar olan ibuprofen [76], dosetaksel ve irinotekan gibi kemoterapötikler [82, 83] ile donepezil gibi kolinesteraz inhibitörleri [84] bunlara örnek verilebilir. TGF- β 3 molekülünün de PLGA-b-PEG nanopartikülleri ile enkapsüle edildiği *in vitro* çalışmanın sonuçları bildirilmiştir [75].

2.4. Aşil Tendon Yaralanmaları

2.4.1. Aşil Tendon Yaralanmaları Hakkında Genel Bilgiler

Aşil tendon yaralanmaları; genç bireylerde sıklıkla spor yaralanmaları şeklinde, yaşlılarda ise kronik tendinopati sürecinin sonunda ortaya çıkan önemli bir ortopedik sorundur. Daha nadir olarak, sistemik hastalıkların bir bulgusu da olabilmektedir [85].

Vücuttaki en kalın ve en dayanıklı tendon olmasına rağmen, aşil tendonu aynı zamanda en sık rüptüre olan tendon olmasıyla da dikkati çeker. Büyük tendon yaralanmalarının %20'sini aşil tendon yaralanmaları oluşturur [86].

Epidemiyolojik olarak incelendiğinde, aşil tendon rüptürlerinin yıllık insidansının 7-40/100.000 aralığında bildirildiği görülmektedir [3]. Lantto ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 1979'dan 2011'e kadar olan süreçte aşil tendon rüptürü insidansının anlamlı bir artış gösterdiği ve bu artış miktarının yıllık ortalama %2.4 olduğu bildirilmiştir [87]. Aynı çalışmada, insidanstaki artışın her yaş grubu için geçerli olduğu, spor ile ilişkili olan ve olmayan yaralanmaların birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu artışın sebebi olarak; spor faaliyetlerine yönelik ilginin artması, yaşlanan toplumlar, spora katılım yaşının artması ve artan obezite prevalansı öne sürülen faktörlerdir [88, 89].

Aşil tendon yaralanmaları her yaş grubunda görülebilmektedir. Lemme ve ark. tarafından yapılan güncel bir epidemiyolojik çalışmada hastaların 7-85 yaş aralığında olduğu bildirilmiştir [3]. 854 hasta üzerinde yapılan bu çalışmada,

erkeklerin yaralanma sırasında ortalama yaşının 38 (± 13.9), kadınların ise 36.2 (± 16.9) olduğu görülmüştür.

Erkekler, aşil tendon rüptürüne kadınlara göre daha yatkındırlar. Kadınlara oranla erkeklerin aşil tendon yaralanmasına 2-12 kat fazla maruz kaldığı bildirilmiştir [88].

Aşil tendon yaralanmalarının en sık spor faaliyetleri sırasında olduğu görülmektedir: Lemme ve ark.'ın çalışmasında bu oran %81.9 olarak bildirilirken [3], Raikin ve ark. da %68 oranını bildirmişlerdir [89]. Yaralanmalar içerisinde en yüksek orana sahip olan spor, her iki epidemiyolojik çalışmada da basketbol olarak görülmektedir [3, 89]; fakat bu durumun çalışmanın yapıldığı ülkeye göre değişebileceği de literatürde dikkat çekilen önemli bir noktadır [85].

Aşil tendon rüptürü saptanan hastaların çoğu, yaralanma öncesinde belirgin semptomlar göstermemektedir, bu sebeple rüptüre yatkınlık oluşturan faktörleri belirlemek zordur. Çalışmalar, rüptüre olan tendonların histopatolojik incelemesinde dejeneratif değişiklikler, vaskülaritede bozulma, kollajen diziliminde anormallikler gibi altta yatan bir tendinopatik sürece işaret eden bulguları ortaya çıkarmıştır [90, 91]. Sistemik veya lokal uygulanan anabolik steroidler ve florokinolon grubu antibiyotikler, aşil tendon rüptürü riskini artıran ilaçlardır [85, 92]. Raikin ve ark. tarafından yapılan çalışmada sigara kullanımının, aşil tendon rüptürü ile ilişkili olduğu bulunmuştur [89]. Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, ankilozan spondilit gibi inflamatuvar artropatilerde aşil tendon rüptürü riski artarken, alkaptonüri hastalığında da benzer bir risk artışı olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur [92-94].

Aşil tendon rüptürü tanısı klinik muayene ile çoğu zaman konabilir. Hastaların çoğunun öyküsü tipiktir; bir aktivite veya spor esnasında, ayak dorsifleksiyon pozisyonundan hızlıca plantar fleksiyon pozisyonuna getirilirken baldırda ve topukta oluşan ani ağrı hissedilir ve bir "pop" sesi de buna sıklıkla eşlik eder. Şiddetli ağrı çoğunlukla birkaç saat içerisinde geçer, hasta hekimin karşısına geldiğinde yürümede güçlük ve topukta hafif ağrı şikayeti olur, aktif plantar fleksiyon hareketi tamamen kaybolmamıştır. Tanı koyarken en çok uygulanan test, tam kat rüptürlerde yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olan Thompson testidir [95]. Plantar fleksiyonda zayıflık, tendonda rüptür bölgesinde palpe edilebilen bir boşluk olması ve hastanın

tek ayağı üzerinde parmak ucu pozisyonuna kalkamaması da diğer muayene bulgularıdır [88].

Görüntüleme yöntemleri, tanıda mutlaka gerekli olmasa da destekleyici bulgular verebilir. Direkt grafiler, çoğunlukla farklı patolojilerin varlığını dışlamak için kullanılsa da; Kager üçgeninde yumuşak doku dansitesinde artış, Haglund deformitesi, intratendinöz kalsifikasyonlar gibi aşıl tendon rüptürüne indirekt olarak işaret eden bulgular da görülebilir. MRG, tendon rüptürü tanısının şüpheli olduğu durumlarda, özellikle tam kat-kısmi yırtık ayırıcı tanısı için kullanılabilir [96]. Ultrasonografi ise, aynı şekilde tam kat-kısmi yırtık ayırımını yapabilmenin yanı sıra, dinamik bir görüntüleme olmasının da avantajıyla ayağın farklı pozisyonlarında yırtık aşıl tendonunun uçlarının ilişkisinin incelenerek tedavi kararında belirleyici olabileceği bildirilen bir görüntüleme yöntemi olarak son yıllarda öne çıkmaktadır [97].

2.4.2. Aşıl Tendon Yaralanmalarında Tedavi Yöntemleri

Amerikan Ortopedik Cerrahi Cemiyeti (*American Academy of Orthopaedic Surgeons – AAOS*)’nin yayınladığı kılavuza göre akut aşıl tendon rüptürlerinin tedavisinde hem konservatif hem de cerrahi metodların yeri vardır [98]. Deng ve ark. tarafından yayınlanan bir meta-analiz çalışmasında, dahil edilen 762 hastanın %50.3’ünün cerrahi metodlarla, %49.7’sinin ise konservatif metodlarla tedavi edildiği bildirilmiştir [99]. Hastaya göre hangi tedavi metodunun seçileceği konusunda endikasyonlar net olmamakla beraber genel kabul gören yaklaşım; sedenter bir yaşam süren ve medikal komorbiditeleri fazla olan hastaların konservatif tedavi edilmesi ve genç, aktif hastalar ile sporcularda cerrahi yöntemlerin tercih edilmesi yönündedir [88, 92]. Buna ek olarak; arteriyel yetmezlik, aşıl üzerindeki cilt bölgesinde kötü yumuşak doku kalitesi, kontrolsüz diyabet gibi faktörler de cilt komplikasyonlarında belirgin artışa sebep oldukları için cerrahi tedavinin rölatif kontrendikasyonları olarak görülebilmektedir [100]. Ayağın farklı pozisyonlarında ultrasonografi ile yırtık uçları arasındaki boşluğun uzunluğu gibi bazı farklı parametreler de tedaviyi yönlendirebilecek faktörler olarak önerilmiştir; fakat kullanımları tartışmalıdır [97, 101].

Konservatif tedavi prensipleri günümüzde fonksiyonel ortezlerin kullanımı ve erken fizyoterapi başlanmasını içermektedir. Tedavinin ilk haftalarında hasta, ayak bileğini plantar fleksiyon pozisyonunda sabit tutan bir ortez ile ekstremiteye kısmi yük vererek mobilize olur. 2-4. haftalar arasında hareket açıklığı yavaşça artırılarak hastanın aktif plantar fleksiyon yapmasına, ve yine aktif olarak nötrali geçmemek koşuluyla dorsifleksiyon yapmasına izin verilir. 4. haftadan sonrasında hasta ekstremiteye tam yük verebilir ve aşamalı bir şekilde nötrali geçen dorsifleksiyon egzersizleri başlanır. 10. haftada hastanın normal ayakkabılar giyerek günlük yaşamına devam etmesi amaçlanır [92, 100]. Konservatif tedavi yönteminin rerüptür oranları %6-39 arasında değişkenlik göstermektedir [92].

Cerrahi tedavi seçenekleri; açık, minimal-invaziv ve perkütan yöntemler olarak ayrılabilir [88, 102]. Kullanılan teknikten bağımsız olarak cerrahinin amacı tendon uçlarını bir araya getirmek ve dorsifleksiyonu kısıtlayacak bir kısalmaya sebep olmamak amacıyla uygun tendon boyunu oluşturabilmektir. Perkütan ve minimal-invaziv yöntemlerin temel avantajı, açık cerrahinin getirdiği kötü kozmetik sonuç ve yara komplikasyonlarını önlemesidir; fakat bu üç yöntem arasında total komplikasyon oranları açısından fark bulunmamıştır [102].

Aşil tendonu rüptürü sonrasında aktif genç hastaların ve amatör sporcuların işlerine ve eski aktivite düzeylerine yüksek oranda dönebildikleri gösterilmiştir [99, 103]. Profesyonel sporculara bakıldığında ise görece olumsuz bir tablo göze çarpmaktadır. Trofa ve ark. tarafından Amerikan ulusal liglerinde yapılan bir çalışmada, aşil tendon rüptürü sonrasında cerrahi olarak tedavi edilen sporcuların oynanan maç sayısı, oyunda kalma süresi ve genel performanslarında anlamlı düşüş olduğu gösterilmiştir [104].

Konservatif ve cerrahi tedavi yöntemlerinin karşılaştırılmasında en çok üzerinde durulan konu, rerüptür oranlarıdır. Deng ve ark. tarafından yayınlanan meta-analizde, konservatif tedavi edilen hastalarda %9.8 olan rerüptür oranı cerrahi tedavide %3.7 olarak bulunmuştur ($p=0.001$) [99]. Benzer şekilde Soroceanu ve ark. tarafından yayınlanan bir meta-analizde cerrahi tedavinin rerüptür riskini %5.5 azalttığı gösterilmiştir [103]. Yara enfeksiyonu, sural sinir yaralanması, insizyonel sorunlar gibi komplikasyonlar sadece cerrahi tedavide görülür. Cerrahi ve konservatif tedavi metotları arasında ayak bileği hareket açıklığı, baldır kuvveti ve

fonksiyonel skorlar açısından anlamlı fark bulunmazken, cerrahi tedavi uygulanan hastaların işe geri dönüşünün ortalama 19 gün erken olduğu gösterilmiştir ($p=0.001$) [99, 103].

2.4.3. Aşil Tendon Yaralanmalarında Biyolojik Yöntemler

Son yıllarda, aşil tendon patolojilerinde biyolojik yöntemlerin hem tek başına hem de cerrahi tedaviye adjuvan olarak kullanımı giderek daha popüler hale gelmiştir [105-107].

Trombositten zengin plazma (*platelet rich plasma-PRP*) uygulaması, aşil tendon rüptürlerinde en çok çalışılmış olan biyolojik adjuvan yöntemlerden birisidir. Zou ve ark. tarafından yapılan prospektif randomize kontrollü klinik çalışmada, cerrahi tedaviye adjuvan olarak uygulanan PRP'nin 6 ve 12. aylarda SF-36 ve Leppilahti skorlarıyla ölçülen fonksiyonel iyileşmede ve 24. ayda ayak bileği hareket açıklığında, sadece cerrahi uygulanan kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir [108]. Schepull ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada ise yine cerrahi tedaviye adjuvan olarak uygulanan PRP'nin tendon elastik modülüsü ve parmak ucuna kalkma indeksi ile ölçülen sonuçlarda olumlu etkisi olmadığı gösterilmiştir [109].

PRP'nin konservatif yöntemlerle tedavi edilen hastalara da uygulanması araştırılmıştır. Keene ve ark. tarafından yapılan randomize kontrollü çalışmada alçı, atel veya ortez ile tedavi edilen hastalarda PRP enjeksiyonunun kas-tendon fonksiyonu, ekstremité simetrisi ve parmak ucuna kalkma dayanıklılık testleri sonuçlarında anlamlı fark oluşturmadığı gösterilmiştir [110].

Stein ve ark. yaptıkları çalışmada, konsantre kemik iliği aspiratının cerrahi yöntemle tedavi edilen akut aşil tendon rüptürüne olan etkisini araştırmışlardır. Bir kontrol grubunun olmadığı bu çalışmada rerüptür görülmediği, hastaların ortalama 1.8 ayda bot ile yürümeye, 3.4 ayda hafif düzeyde aktivitelere başlayabildiği bildirilmiştir [111]. Aynı yöntemin sıçan aşil tendon yaralanması modelinde uygulanmasının sonucunda ise, işlemi takiben 28. günde konsantre kemik iliği aspiratı uygulanan grupta dayanma kuvvetinin sağlıklı tendon seviyesine ulaştığı bildirilmiştir [112].

Henüz birçoğu klinik insan çalışmalarına uygulanamamış olsa da, hayvan aşıl tendon yaralanması modelleri üzerinde denenmiş olan biyolojik ajanların sayısı oldukça fazladır. Çeşitli hayvan ve hücre kültürü modellerinde BMP-2, 7, 12 ve 14 ile umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir [113-116]. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), rekombinant insan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri de hayvan modellerinde olumlu sonuçlar vermişlerdir [107].

TGF- β ailesinin bir diğer üyesi olan TGF- β 1 de aşıl tendon yaralanması hayvan modellerinde birçok kez denenmiştir [107]. Hou ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TGF- β 1 geni ile transfekte edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, tavşan aşıl tendon yaralanması modeli üzerine uygulandığında, tip I kollajen miktarını ve dizilimini artırdığı, daha erken matriks yeniden düzenlenimi sağladığı gösterilmiştir [117]. Kashiwagi ve ark. tarafından yapılan çalışmada, sıçan aşıl tendon yaralanması modeli üzerine lokal TGF- β 1 uygulandığında, prokollajen tip I ve III mRNA sentezinde doz bağımlı bir artış olduğu, tendonun maksimum dayanma kuvvetinde de 2. ve 4. haftalarda artış görüldüğü bildirilmiştir [118]. Yapılan çalışmalar, TGF- β 1'in etkisini genellikle kollajen tip I sentezi üzerinden gösterdiğine işaret etmektedir.

TGF- β 3'ün embriyonik tendon gelişimi ve hasarlanan tendonun iyileşmesi süreçlerindeki rolleri araştırılmıştır [119, 120]. Bu molekülün rotator manşet yaralanması hayvan modeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır [9, 11]; fakat aşıl tendon gövde yaralanması üzerine olan etkileri henüz araştırılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, KOBAY Deneysel Hayvanları Laboratuvarı AŞ. Yerel Etik Kurulu'nun 14.01.2020 tarihinde 452 numaralı onayı üzerine gerçekleştirilmiştir.

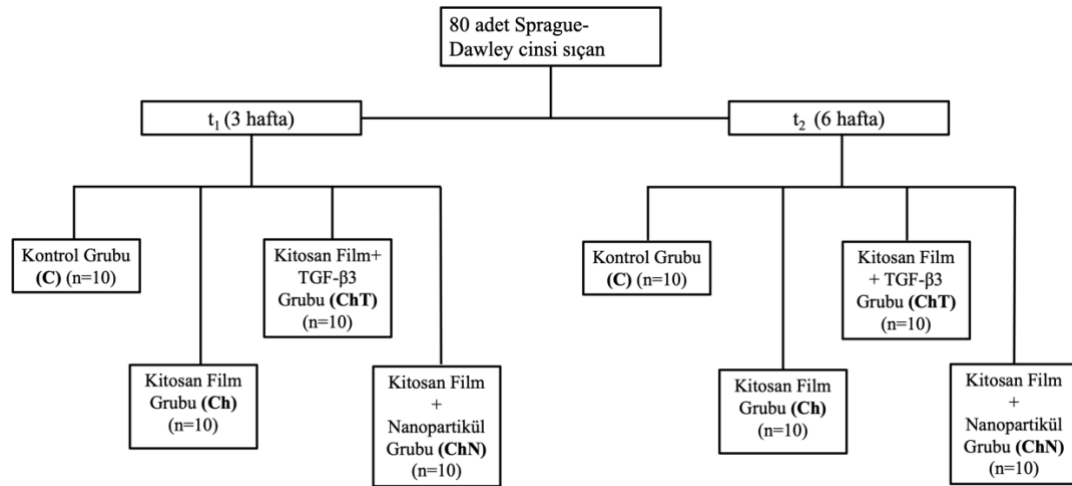
Çalışmanın mali desteği, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hızlı Destek Programı tarafından THD-2020-18657 proje kodu ile sağlanmıştır.

3.1. Çalışma Planı

Çalışmamız, prospektif randomize kontrollü *in vivo* hayvan deneyi olarak tasarlanmıştır. Deneyde toplam 80 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, KOBAY DHL AŞ.'den temin edilmiştir. Ortalama 16 haftalık, 300-350 gr ağırlıkta, erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tendon yaralanması modeli oluştururken her hayvanın sadece sağ arka ekstremitesi kullanılmıştır.

Kontrol ve deney grupları, t_1 ve t_2 olmak üzere iki farklı zamanda sakrifiye edilerek sonuçlar açısından incelenmiştir ($t_1=3$ hafta, $t_2=6$ hafta). Toplam 2 kontrol grubu, 6 deney grubu planlanmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Deney gruplarının dağılımı



-**Kontrol grubu (C) t_1** : Boş tendon defekti, 3. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kontrol grubu (C) t_2** : Boş tendon defekti, 6. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kitosan film grubu (Ch) t_1** : Defekte sadece boş kitosan film uygulanmış, 3. haftada sakrifiye edilmiştir.

- **Kitosan film grubu (Ch) t₂**: Defekte sadece boş kitosan film uygulanmış, 6. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kitosan+TGF- β 3 (ChT) grubu t₁**: Defekte serbest TGF- β 3 yüklü kitosan film uygulanmış, 3. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kitosan+TGF- β 3 (ChT) grubu t₂**: Defekte serbest TGF- β 3 yüklü kitosan film uygulanmış, 6. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kitosan+Nanopartikül (ChN) grubu t₁**: Defekte TGF- β 3 yüklü nanopartikülleri içeren kitosan film uygulanmış, 3. haftada sakrifiye edilmiştir.

-**Kitosan+Nanopartikül (ChN) grubu t₂**: Defekte TGF- β 3 yüklü nanopartikülleri içeren kitosan film uygulanmış, 6. haftada sakrifiye edilmiştir.

Literatür incelendiğinde, sıçanlar üzerinde yapılan aşil tendon defekti modellerinde her deney grubunda biyomekanik test için 7 hayvan, histolojik inceleme için 3 hayvan bulunması, sonuçlar açısından yeterli görünmektedir [121, 122]. Ek olarak yapılan güç analizinde, tendonun dayanma kuvveti üzerine beklenen etki büyüklüğü literatüre bakılarak 0,6 olarak belirlenmiş ve her grupta biyomekanik çalışma için 7 hayvan olması durumunda çalışmanın gücü $P = .85$ olarak bulunmuştur.

Ratların deney ortamına uyum sağlaması için, deneyin yapılacağı laboratuvara geldikten 2 hafta sonra deneye başlanmıştır. Gruplar birbirinden ayrı olarak barındırılmış, 3 ve 6 hafta takip edilmiştir. Uygun yara yeri bakımı verilmiş ve hayvanın genel durumu, yara yerinin kızarıklık, şişlik, enfeksiyon gibi parametreleri değerlendirilmiştir. Ayrıca hayvanlar ağrı, beslenmeme, hareketsizlik, dehidratasyon, güçsüzlük açısından da takip edilmiştir. Yiyecek ve içecek '*ad libitum*' olarak sağlandı. Günlük sıvı ve gıda tüketimleri takip edildi ve tüm parametreler postoperatif ilk üç günde günlük olarak, ardından her hayvan için haftada en az iki kere olmak üzere kayıt altına alındı.

3.2. Nanopartiküllerin ve Kitosan Filmlerin Hazırlanması

3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile PLGA-b-PEG Boş Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan nanoçöktürme yöntemi çözücü yer değişimi olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemin temel prensibi;

lipofilik çözeltilerdeki suyla karışabilen, yarıpolar çözücünün yer değişimi sonucu polimerin ara yüzeyde çökmesidir. PLGA-Resomer RG 505 (Mw 30000-60 000) 50:50 polimeri aseton içerisinde çözülerek organik faz hazırlanmıştır ve bu organik faz Pluronic F68 içeren sulu çözeltiliye bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı altında damla damla ilave edilmiştir. Organik fazın uçurulması için yaklaşık 24 saat manyetik karıştırıcı altında karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan nanopartikül süspansiyonu ultrasantrifüj ile 40,000xg'de 30 dakika santrifüjlenerek hazırlanmış olan nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 2 kez yıkanarak yüzey aktif maddenin fazlasının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kullanılan farklı formülasyonların miktarları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Boş PLGA nanopartikül formülasyonları

Formülasyon	Polimer	Çözücü	Yüzey Aktif Madde
NP1	10 mg	Aseton (2.5 mL)	% 0.1 Pluronic F68 (5 mL)
NP2	10 mg	Aseton (2.5 mL)	% 0.5 Pluronic F68 (5 mL)
NP3	10 mg	Aseton (2.5 mL)	% 1 Pluronic F68 (5 mL)

3.2.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile TGF- β 3 Yüklü Nanopartiküllerin

Hazırlanması

TGF- β 3 yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması için; PLGA-Resomer RG 505 polimeri (10 mg) aseton (2.5 mL) içerisinde çözülerek organik faz hazırlanmıştır ve bu organik faz Pluronic F68 (%1, 5 mL) ve TGF- β 3 (10 μ g) içeren sulu çözeltiliye bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı altında damla damla ilave edilmiştir. Organik fazın uçurulması için yaklaşık 24 saat manyetik karıştırıcı altında karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan nanopartikül süspansiyonu ultrasantrifüj ile 40000xg'de 30 dakika santrifüjlenerek hazırlanmış olan nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 2 kez yıkanarak yüklenmemiş TGF- β 3 ve yüzey aktif maddenin fazlasının uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.3. Nanopartiküler Karakterizasyonu

Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Malvern Zetasizer Nano-ZS partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Partikül büyüklüğü dağılımı tayinindeki temel prensip, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketi yapmasına bağlı gelişen hareketlerinin ölçümüdür. Büyük boyutlu partiküllerin küçük olanlardan daha fazla ışık saçması sonucu boyut açısından hassas bir ölçüm yapılabilen ve özellikle agregasyon durumlarında stabil olmayan sistemler kolaylıkla ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir. Dinamik ışık saçılımı tekniği, Foton Korelasyon Spektroskopisi ya da Kuazi-Elastik Işık Saçılımı olarak da bilinmektedir.

Zeta potansiyeli, sulu ortamlarda partiküllerin yüzeyindeki iyonizasyon ya da yüzeylerine adsorbe olan iyonik maddelerin meydana getirdiği yüzey yükü olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzey yüküne bağlı olarak partikülü çevreleyen iyonların dağılımı değişiklik göstermektedir. Partikül hareket ederken, bu iyon tabakası da onunla birlikte hareket etmekte, tıpkı bir parçası gibi davranmaktadır. Bu değer negatif ve pozitif her iki yönde de artması sonucu partiküller birbirini itmekte ve sistem kararlılığı korunmaktadır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ölçümü için kullanılan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak gelişen hareket hızlarını ölçerek hesaplama yapmaktadır.

Morfolojik Analiz

Nanopartiküllerin şekil, geometri, büyüklük ve dağılım gibi morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizinde nanopartiküller ince bir platin tabakası ile kaplanmış ve Nova NanoSem cihazı ile örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.4. Nanopartiküllerine TGF- β 3 Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

TGF- β 3 yükleme etkinliğinin belirlenmesi için nanopartikül hazırlama işlemi sırasında dış sulu fazda serbest halde bulunan TGF- β 3 miktarı tayin edilmiştir. Bu

amaçla, nanopartiküller hazırlandıktan sonra nanopartikül süspansiyonu 40,000xg'de 30 dakika santrifüj edilerek üst fazdan örnekler alınmış ve protein miktarı hesaplanmıştır. TGF-β3 yükleme etkinliği ise TGF-β3 ELISA tayin kiti yönergesi takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki formülasyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Etkin madde yükleme etkinliği (\%)} = \frac{K_1 - K_2}{K_1} \times 100$$

K1: Nanopartikül formülasyonu hazırlanmasında kullanılan TGF-β3 derişimi

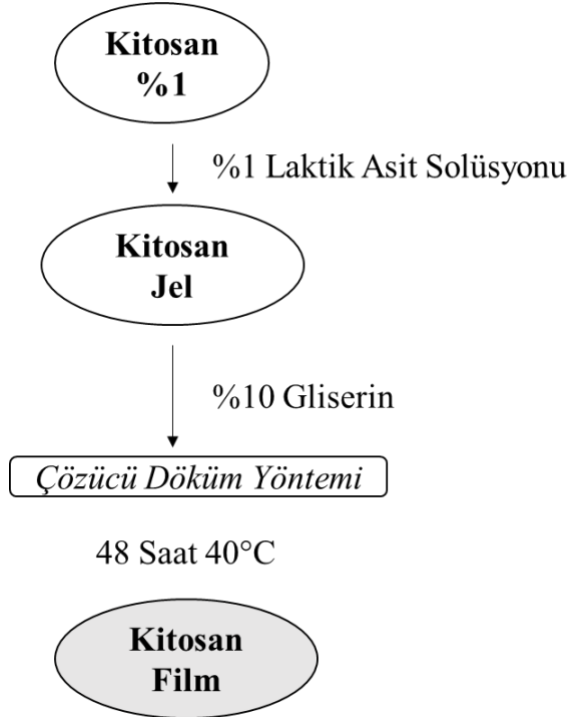
K2: Su fazında nanopartiküllere yüklenmeden kalan TGF-β3 derişimi

3.2.5. Etkin Madde Salım Çalışmaları

TGF-β3 yüklü PLGA nanopartiküllerden etkin madde salımının incelenmesinde “sink” koşulları sağlayacak şekilde 10 mg nanopartikül 2 mL DMEM içerisinde dağıtılmıştır. Örnekler 37°C'de su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu örneklerin önceden belirlenmiş zaman noktalarında üst fazları toplanarak TGF-β3 için ELISA kiti kullanılarak etkin madde miktarları her zaman noktası için toplanarak salım profilleri elde edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

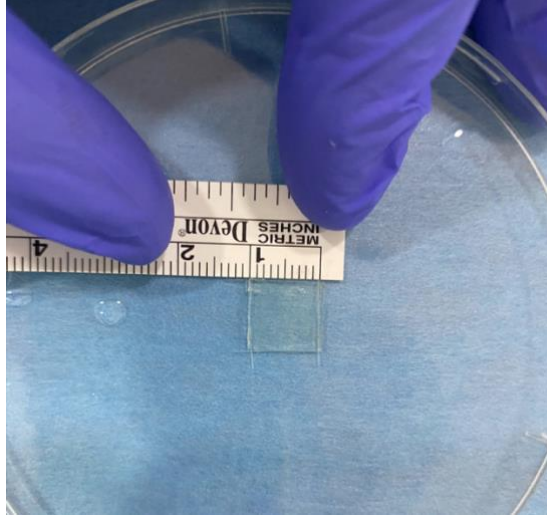
3.2.6. Kitosan Filmlerin Hazırlanması

Film formülasyonları biyoparçalanır bir polimer olan kitosan ile hazırlandı. Bu amaçla kitosan %1 konsantrasyonda kullanıldı. Gliserin plastizer olarak formülasyona eklendi. Boş film hazırlama basamakları Şekil 3.1.'de özetlenmiştir. Serbest TGF-β3 veya TGF-β3 yüklü nanopartikül içeren filmler hazırlanırken aynı basamaklar takip edilmiş; çözücü dökümü yöntemi sırasında TGF-β3 veya TGF-β3 yüklü nanopartiküller film içinde disperse edilmiştir.



Şekil 3.1. Kitosan film hazırlanışının şematik gösterimi

Uygulama için filmler 1x1cm boyutlarında, 500 ng TGF- β 3 içerecek şekilde hazırlanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. 1*1 cm ebatlarında kitosan film.

3.2.7. TGF- β Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Sitotoksiste Çalışmaları

TGF- β yüklü nanopartiküllerin hücre hatları proliferasyonu üzerindeki etkilerinin saptanabilmesi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) deneyi yapıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna yaklaşık 4×10^4 - 6×10^4 hücre %10 FBS içeren DMEM ortamı içinde ekildi. Hücreler plaka dizaynına uygun olarak muamele edildikten sonra kuyucuk başına 5 mg/mL MTT çözeltisinden 10 μ L eklendi. 4,12, 24 saat sürelerle 37°C'de inkübe edilen hücrelerin hücre kültürü ortamları inkübasyon süresi sonrasında uzaklaştırıldı. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri kuyucuk başına 100 μ l DMSO'da çözüldü. Plaka 630 nm'de plaka okuyucuda okundu. Sonuçlar kontrol grup değerleri kullanılarak standardize edildi. MTT deneyi en az n=3 olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.3. Cerrahi Prosedür

Hayvanlarda yapılacak olan işlemler öncesinde 75 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine intraperitoneal (IP) yolla uygulanarak cerrahi anestezi sağlandı. Cerrahi süresince idame gerekmesi halinde fentanil 2 ug/kg/h , midazolam 1 mg/kg/h, intravenöz (IV) yol ile uygulandı. Ardından hayvanların sağ arka ekstremitelerinde aşil tendon üzeri traş edilmiş, cerrahi dezenfeksiyon sağlanmasını takiben aşil tendon üzerine posteriordan 2 cm uzunluğunda longitudinal insizyon yapıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Baldır posteriorunda yapılan longitudinal insizyon ve aşil tendonu.

Tendona ulaşıldıktan sonra, kalkaneal insersiyonun 5 mm proksimalinden, tendona tam kat bir kesi yapıp, internal atelleme etkisinin olmaması için arkasındaki plantaris tendonu da tam kat kesildi. Ardından, kontrol grubunda herhangi bir onarım yapılmadan paratenon-ciltaltı-cilt dokuları tek bir kat halinde dikildi. Deney gruplarında ise, öncesinde 1*1 cm boyutlarında kesilerek uygun şekilde hazırlanan kitosan filmler kesilen tendonun etrafına sarıldı (Şekil 3.4. ve 3.5.). Takiben paratenon-ciltaltı-cilt dokuları tek bir kat halinde dikildi (Şekil 3.6.). Hayvanların ekstremitelerine herhangi bir immobilizasyon uygulanmadı.

Cerrahi amacıyla hayvanların tek bir aşıl tendonunun kullanılma sebebi, çift taraflı cerrahi sonrası yaşanabilecek ciddi mobilizasyon kısıtlılığını ve buna bağlı deney sonuçlarını etkileyebilecek morbiditeleri engellemektir. Postoperatif süreçte hayvanlara analjezik olarak tramadol hidroklorid (2-4 mg/kg) ve ketoprofen (1 mg/kg) uygulandı. 5 günün ardından analjezik tedavisi kesildi. Hayvanlar, yukarıda da belirtildiği üzere 40 tanesi 3. hafta sonunda diğer 40 tanesi de 6. hafta sonunda olmak üzere sakrifiye edildi.



Şekil 3.4. Kitosan filmin aşıl tendon kesilmeden önceki pozisyonu.



Şekil 3.5. Kitosan filmin aşil tendonu kesildikten sonra etrafına sarılmış haldeki görüntüsü.

Sakrifikasyon sırasında hayvanların daha önce kesilmiş olan tendonları, proksimalde kas-tendon bileşkesini tamamen içerecek şekilde bir miktar kas dokusu ile birlikte, distalde ise kalkaneus kemiğinin tamamı ile birlikte insersiyoya müdahale edilmeden çıkarılmıştır.



Şekil 3.6. Operasyon tamamlandıktan sonra cildin dikişlerle kapatılması.

3.4. Sonuçların Eldesi

Deney ve kontrol gruplarının (Tablo 3.1.) her birinde, sakrifikasyonu takiben, 10 sıçanın 7'si biyomekanik analiz ve RT-PCR, 3'ü ise histoloji ve immünohistokimya çalışmaları için ayrılmıştır. Hayvanların gruplara ayrımı randomize şekilde yapılmıştır.

Biyomekanik analiz ve RT-PCR için ayrılan hayvanların tendonlarına ilk olarak biyomekanik analiz uygulanmış, ve ardından RT-PCR uygulanmak üzere -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Ayrıca toplam 10 sıçanın sağlıklı tendonları da; 7'si biyomekanik ve RT-PCR, 3'ü de histoloji ve immünohistokimya için olmak üzere, intakt kontrol değerlerinin belirlenmesi amacıyla elde edilmiştir. Bu 10 sıçan, gruplar arasında randomize olarak seçilmiştir.

3.4.1. Biyomekanik Değerlendirme

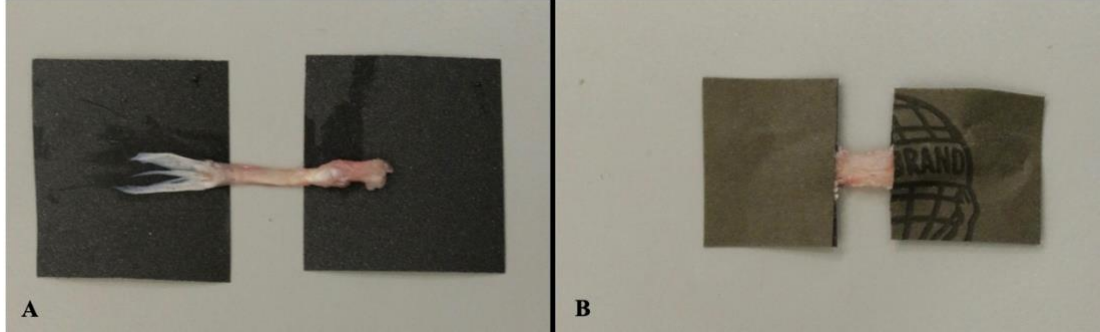
Biyomekanik değerlendirmeler, TOBB ETÜ bünyesinde Labiotech biyoteknoloji laboratuvarında yapılmıştır.

Hayvanların sakrifikasyonunun ardından biyomekanik test için ayrılan tendonlar, dehidratasyonu engellemek için izotonik salin (%0.9 NaCl) içerisinde muhafaza edilmiştir. Biyomekanik testler, sakrifikasyon ve tendon eldesini takip eden 6 saat içerisinde tamamlanmıştır.

Deneye tabi tutulan tendonlar, bir uçta kas-tendon bileşkesinin tamamını, diğer uçta da kalkaneus kemiğinin tamamını içerecek şekilde çıkarıldı. Tendonun boyu, kalkaneal insersiyoyu ile kas-tendon bileşkesi arasından ölçüldü, ölçümler yapılırken 0,01 mm hassasiyetli dijital kumpas (Accud[®], Viyana/Avusturya) kullanıldı .

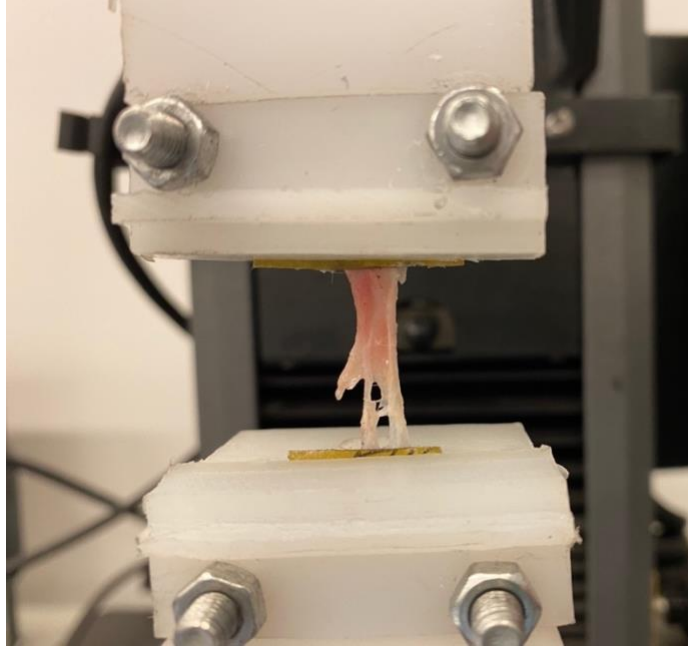
Tendonların proksimal ucundaki kas dokusu, literatürde tanımlandığı üzere [123], bir bisturinin keskin olmayan yüzü kullanılarak, tendona zarar vermeyecek şekilde sıyrılarak çıkarıldı. Ardından, tendonun her iki ucu, siyanoakrilat yapıştırıcı (Scotch-Weld[®], 3M, MN/ABD) kullanılarak, kare şeklinde kesilmiş 2 adet 150 kum zımpara kağıdı (Atlas Zımpara[®], İstanbul/Türkiye) arasına yapıştırıldı (Şekil 3.7.). Bu yöntem sayesinde, ölçüm cihazının kıskaçları arasına sıkıştırılan tendonun çekme testi sırasında kayması engellenmiş ve kopmaların bekleneceği şekilde kesinin

yapıldığı bölgeden oluşması sağlanmıştır. Bu yöntem benzer şekillerde birçok farklı çalışmada kullanılmıştır [123-126].



Şekil 3.7. Biyomekanik test için hazırlanan aşil tendonunun etrafına zımpara kağıdı uygulanması. (A) tendon, kaslar sıyrıldıktan sonra zımpara kağıdı üzerine yayılır, (B) ardından üzerine ayrı bir parça zımpara kağıdı kapatılır ve araya sürüne siyanoakrilat yapıştırıcı ile yapışmaları sağlanır.

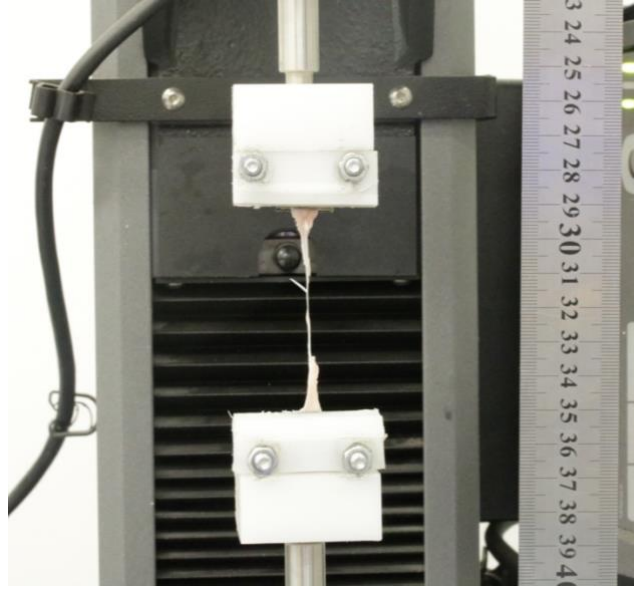
Ölçüm için hazırlanan tendonlar, proksimal ve distal uçlarından birer polietilen klempe tutturuldu (Şekil 3.8.). Ölçümler, universal test cihazı (Instron® 5944, Norwood, ABD) kullanılarak yapıldı (Şekil 3.9.). Tendonlara 1 N ön-yük verilerek, dijital kumpas ile tendonun en ince yerinde genişliği ve kalınlığı, ardından klempler arasındaki uzaklık ölçüldü. Hesaplamalar yapılırken, tendonun kesit alanı oval olarak kabul edildi. Ardından cihaz 10 mm/dakika hıza ayarlanarak çekme testi uygulandı ve tendon kopana kadar teste devam edildi. Tendonun, onarım yapıldığı bölgeden kopmuş olmasına dikkat edildi (Şekil 3.10.), test cihazı ile bağlantı noktalardan kopan tendonlar ölçüme dahil edilmedi. Yük–yer değiştirme eğrileri ve gerilim–gerinim eğrileri Bluehill 3 programı tarafından deney esnasında kaydedildi. Maksimum yük, yük – yer değiştirme eğrisinde kopma gerçekleşmeden önce görülen en yüksek yük değeridir. Rijitlik (*stiffness*) değeri, yük–yer değiştirme eğrisinde elastik bölgenin eğimidir. Gerilim değeri, birim alana düşen yük değeridir. Maksimum yükün kesit alanına bölünmesi ile maksimum gerilim değeri elde edilir. Elastik modulus ise gerilim–gerinim eğrisinin elastik (lineer) bölgesinin eğimi hesaplanarak elde edilir.



Şekil 3.8. Test için hazırlanan tendonun cihaza polietilen klemler üzerinden tutturulması.

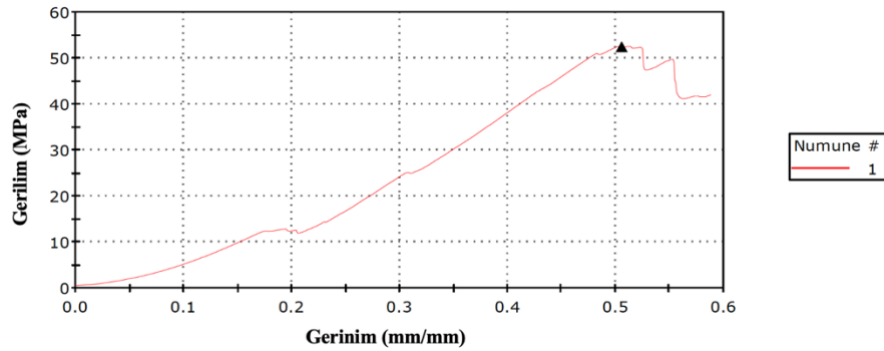


Şekil 3.9. Universal test cihazı (Instron® 5944, Norwood, ABD)



Şekil 3.10. Onarım bölgesinden kopan bir tendon örneği.

Ölçüm sırasında, tendonun yük (N)-yer değiştirme (mm) eğrisi ve gerilim (mPa)-gerinim (%) eğrisi (Şekil 3.11.) çizildi ve maksimum yük (N) kaydedildi. Elastik modülüs (mPa) ve rijitlik (N/mm) değerleri de kaydedilen verilerden yola çıkarak hesaplandı.



Şekil 3.11. Ölçümlerde kullanılan gerilim-gerinim eğrisine bir örnek.

Çekme testinin tamamlanmasını takiben, kopan tendonların proksimal ve distal uçları kesilerek çıkarıldı, ve ardından RT-PCR yapılmak üzere -80°C 'de dondurularak saklandı.

3.4.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için her bir gruptan (Tablo 3.1) 3'er adet sıçanın tendonu kullanıldı.

Işık Mikroskopisi Yöntemi

Deney gruplarına ait tendon dokuları ışık mikroskopisi altında inceleme için %10' luk formalin solüsyonu ile tespit edildi. Rutin histolojik takip işlemlerinin ardından elde edilen parafin bloklardan mikrotom ile (Leica SM 2000, Manheim, Germany) histokimyasal ve immunohistokimyasal analizler için 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama Protokolü

Deney gruplarına ait tendon kesitleri, deparafinizasyon işlemi sonrasında, azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 ve %50) 10'ar dakika tutuldu. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, 10 dakika akan musluk suyu ile yıkayıp alkolün uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Yıkama sonrasında 10 dakika Harris Hematoksilen solüsyonunda bekletilen kesitler akan musluk suyu altında 10 dakika daha yıkandı. Glasiyel asetik asit ile alkol solüsyona batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkama gerçekleştirildi. Eosin boya solüsyonunda 10 dk bekletilen kesitler, tekrar 10 dakika akan musluk suyu ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından dehidratasyon işlemi için sırasıyla % 50, %70, %80, %90 ve %100'lük artan etil alkol serilerinden hızlıca geçirilerek ksilolde bekletilip kesitlerin kapama işlemi gerçekleştirildi. Boyanan kesitlerden DM 4000B (Leica, Manheim, Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, LAS V 4.9 (Leica, Manheim, Almanya) programında değerlendirildi.

Masson's Trichrome Boyama Protokolü

Deney gruplarına ait tendon kesitleri deparafinizasyon işlemi sonrasında boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere Masson Trichrome boyama kiti (Kod: RRSK20-100, Atom Scientific, İngiltere) uygulandı. Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonu ile 20 dk çekirdek boyaması yapıldı. Suda hızlıca yıkanarak, % 1'lik asit alkol solüsyonunda farklılaştırılarak, tekrar yıkamaya alındı.

Ponceau Fuchsin solüsyonunda 5 dk boyama yapıldı ve ardından distile suda ile yıkandı. Fosfotungustik asit solüsyonu ile 15 dk mordantlaştırılan kesitler ardından % 2,5' lik asetik asit - % 2' lik Metil Blue Solüsyonu ile 5 dk boyandı. Suda yıkama işleminin ardından kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve kapama mediumu ile kapatıldı. DM 4000B (Leica, Manheim, Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi.

Alcian Blue Boyama Protokolü

Deparafinize edilen kesitler alkollerden geçirilerek akar suda yıkandı. Boyama için Alcian Blue Kiti (pH 2.5) kullanıldı (Kod:RRSK400-100, Atom Scientific, İngiltere) % 1 alcian blue solüsyonunda 30 dk boyandıktan sonra % 3' lük asetik asitte 10-20 saniye yıkandı. Akar su altında 5 dk yıkamanın ardından 3 dk neutral red ile zemin boyası yapıldı. Yıkama ve dehidratasyon sonrasında ksilole alınarak kapama mediumu ile kesitler kapatıldı. DM 4000B (Leica, Manheim, Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda elde edilen görüntüler, LAS V4.9 (Leica, Manheim, Almanya) programında değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal analizler için tendon dokularına ait parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, deparafinizasyon işleminin ardından azalan alkol serilerinden (%100, %96,%90, %80 ve % 70) geçirildi. Dehidrate edilen dokular alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilerek, sitrat tamponu (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) (pH 6.0) ile yüksek ısıda retrieval işlemi uygulandı. Dokular oda ısısında 20 dk soğutulduktan sonra, 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Ardından dokuların çevresi Pap pen ile sınırlandırıldı. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline), (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) (pH:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) etkin bırakıldı. İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkandı ve immunohistokimyasal yöntemle Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (TP-125-HP, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts,

ABD) kiti kullanılarak devam edildi. Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan direkt primer antikor aşamasına geçildi. Kesitler uygun dilüsyonda Collagen I (1:200, bs-0708R, Bioss Antibodies, Massachusetts, ABD) ve Collagen III (1:200, bs-10423R, Bioss Antibodies, Massachusetts, ABD) primer antikorları ile gece boyunca + 4 °C’ de inkübe edildi. Bu uygulamadan sonra lamlar 3 kez 3’er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulanarak, tekrar PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı ve işlem sonrasında 3 kez 3’er dakika PBS ile yıkandı. Diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB (TA-125-HD, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer’in Hematoksilen’i (TA-125-MH, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanıldı. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi. 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılan kesitlerin immunohistokimyasal analizler için görüntülenmesi, DM 4000B (Leica, Manheim, Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve LAS V4.9 (Leica, Manheim, Almanya) programında gerçekleştirildi.

Deney gruplarına ait tendon kesitlerinde Tip I ve Tip III kollajen immünoaktivite yoğunluğu (*average optical density*,AOD) ImageJ programı kullanılarak (National Institute of Health, ImageJ Software[127]) değerlendirildi.

Semikantitatif Bonar Histopatolojik Analizi

Bonar histopatolojik skorlamasında deney gruplarına ait tendon kesitleri tenositler, zemin maddesi, kollajen ve vaskülarite açısından değerlendirildi [128].

Bonar skorlama sisteminin detayları Tablo 3.3.’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Bonar histopatolojik skorlama sistemi [128].

Özellik	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Tenosit	Işık mikroskopunda belirgin sitoplazma olmadan uzun iğsi çekirdek	Belirgin sitoplazma olmadan çekirdeğin yuvarlaklaşması	Bir miktar görülebilir sitoplazma ile birlikte çekirdeğin yuvarlaklığının ve boyutunun artması	Yuvarlak ve büyük çekirdek ile birlikte bol miktarda stoplazma ve Laküna oluşumu
Zemin maddesi	Boyanma yok	Lifler arasında boyanabilir müsin mevcut ancak demetler hala ayrık	Lifler arasında boyanabilir müsin mevcut ancak demetlerin sınırları kaybolmuş	Göze çarpmayan kollajen boyama ile birlikte bol miktarda müsin
Kollajen	Normal yapıda kollajen, homojen polarizasyon	Demetler korunmuş, lifler ayrılmış, azalmış polarizasyon	Demetlerin sınırlarının kaybı, ayrılmış lifler, polarizasyon kaybı	Yapısal kayıp ile birlikte kollajen liflerinin tamamen ayrılması
Vaskülarite	Demetler arasında belirgin olmayan kan damarları	Ara sıra kılcal kümeler, 10'luk büyütmede sahada 1'den az kapiller	10'luk büyütmede sahada 1-2 arası kapiller	10'luk büyütmede sahada 2' den fazla kapiller

Semikantitatif Movin Histopatolojik Skoru

Movin semikantitatif skorlamasında HE, Masson's Trichrome ve Alcian Blue boyamaları yapılarak fibril yapısı, fibril düzeni, nukleus yuvarlaklığı, hücresel değişiklik, vaskülarite artışı, kollajen boyanmasında azalma, hyalinizasyon ve glikozaminoglikan (GAG) içeriği değerlendirildi. Her bir parametre 0 ile 3 arasında; 0: Normal, 1: Hafif anormal, 2: Anormal, 3: Belirgin anormal şeklinde değerlendirilerek skorlandı [128, 129].

Movin skorlama sisteminin detayları Tablo 3.4.'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Movin histopatolojik skora sistemi [128, 129].

Özellik	0	1	2	3
Fibril yapısı	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Fibril düzeni	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Nukleus Yuvarlaklığı	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Hücre sel değışiklik	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Vaskülarite artışı	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Kollajen boyanmasında azalma	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
Hyalinizasyon	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal
GAG	Normal	Hafif Anormal	Orta Anormal	Belirgin Anormal

3.4.3. RT-PCR İle Gen Ekspresyonu Değerlendirmesi:

Kesilen tendonlar, 1mL TRIzol reaktifi içeren 1.5 ml'lik tüplere yerleştirilmiş ve daha sonrasında, bıçaklı homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. RNA ekstraksiyonu, kit üretici firmanın yönergesi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tek zincirli cDNA, RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit yönergesi takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizi 96 kuyucuklu plaklar ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak Via 7 (Applied Biosystems, Kaliforniya, ABD) sekans deteksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (20 µl) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 1:5 oranında seyreltilmiş; 5 µl örnek varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Deneyde ekspresyonu araştırılan genler; kollajen tip 1 alfa zinciri 1 (COL1A1), kollajen tip 3 alfa zinciri 1 (COL3A1), scleraxis (SCX) ve tenomodulin (TNMD)'dir. Her deneyde araştırılan genin değeri, iç kontrol genin (housekeeping gene; GAPDH) değerine oranlanarak normalize edilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin tamamı Tablo 3.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. RT-PCR gen ekspresyon analizinde kullanılan primerler.

Primerler	Sekanslar
GAPDH	F: 5'-AGTGCCCAGCCTCGTCTCATA -3' R: 5'-GGTAACCAGGCGTCCGATAC -3'
COL1A1	F: 5'-ATGAGCCGAAGCTAACCCC -3' R: 5'-TCAGGTTTCCACGTCTCACC -3'
COL3A1	F: 5'-CAGGGAACAACCTGATGGTGCTA -3' R: 5'-GAGAAGAAACCAGGTCCACAT -3'
SCX	F: 5'-AGAAAGTTGAGCAAAGACCGTG -3' R: 5'-GGGCTCTCCATGACTCTTCA -3'
TNMD	F: 5'-TAAATTCAGTTCTCCTCTGGCA -3' R: 5'-GGATTCTTTGCCATGGTCTCC -3'

3.4.4. İstatistiksel Analizler:

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, SPSS programı (IBM Corp., yayınlanma tarihi 2015. IBM SPSS, Mac OS için, v23.0. Armonk, NY, ABD) kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma (SS) olarak belirtildi.

Deney grupları arasında ortalamalar karşılaştırılırken, parametrik veri grupları için Student's t-test veya tek yönlü ANOVA testleri, non-parametrik veri grupları içinse Mann-Whitney-U testi ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Post-hoc karşılaştırmalarda ANOVA testi için Tukey testi, Kruskal-Wallis testi için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Verilerin normal dağılımını test etmek amacıyla Shapiro-Wilk testi, histogramlar, basıklık/çarpıklık ölçümleri ve eğimden arındırılmış Q-Q plot verileri kullanıldı. Varyansların homojenliği değerlendirilirken Levene testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık açısından sınır $p=0.05$ olarak kabul edildi, Bonferroni düzeltmesi yapılan karşılaştırmalarda uygun şekilde değiştirildi.

4. BULGULAR

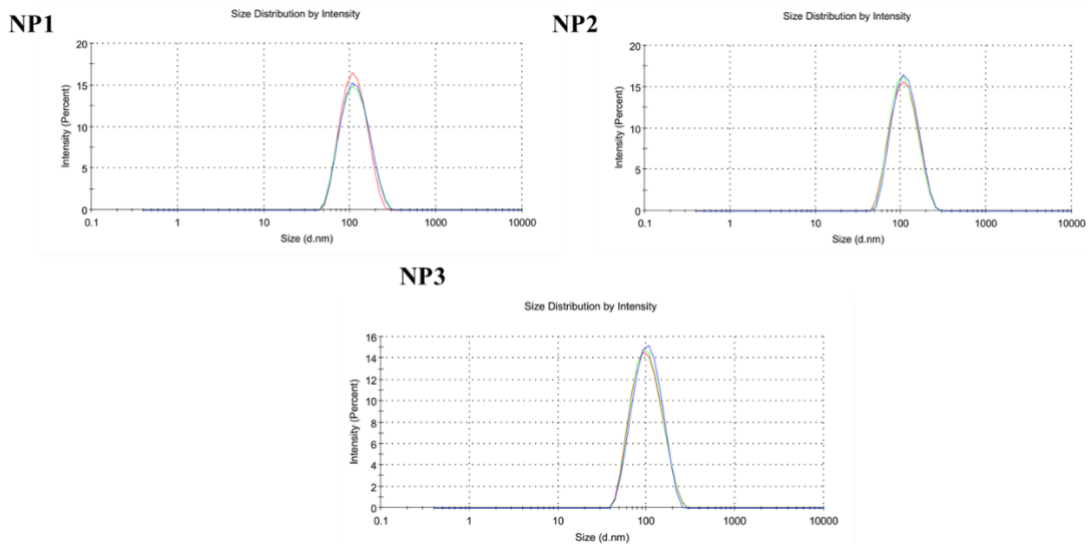
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Boş PLGA Nanopartikülleri

Boş nanopartiküllere 3 farklı formülasyon (NP1, NP2, NP3) hazırlanmıştır (Tablo 4.1.). Her formülasyon için 6 örnekle çalışılmış; ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel değerleri standart sapmaları hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.1.'de belirtilmiştir (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Hazırlanan boş nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel verileri

Formülasyon	Boyut (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
NP1	111.433±0.832666	0.089±0.037807	-19.400±0.953939
NP2	108.667±0.680686	0.088±0.018583	-19.433±0.404145
NP3	107.633±0.568624	0.087±0.009644	-15.900±0.458258



Şekil 4.1. Hazırlanan boş nanopartiküllerin boyut dağılım grafikleri.

Hazırlanan boş nanopartiküllerin boyutları formülasyonu haricinde 100-110 nm arasında bulunmuştur. Formülasyonlar boyut açısından uygun görülmüştür.

Nanopartiküllerin kullanımda süspansiyon halde hazırlanacağı için zeta potansiyelleri diğer bir deyişle yüzey yükü özelliği önemlidir. Zeta potansiyel, partiküllerin elektriksel potansiyellerini yansıtmaktadır ve partiküllerin ve içinde buldukları ortamın kompozisyonundan etkilenmektedir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyel), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ayrıca nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri elde edilebilir. Zeta potansiyel değeri $\pm 20-30$ mV arasında ise partiküller kararlıdır. Sentezlenen nanopartiküller bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve topaklaşarak çökelme eğilimindedirler. Hazırlanan nanopartiküllerde amaç hedeflendirme olmadığı için zeta potansiyelinin sonuçlara etkisi olmayacaktır. Nanopartikül boyutlarının homojen dağılımı gösterip göstermediklerini izleyebilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı incelenmiştir. Polidispersite indeksi (PDI) değeri 0.1-0.25 arasındaki nanopartiküllerin dar bir dağılım gösterdikleri, bunun üzerindeki PDI değerlerinin ise geniş dağılım gösterdikleri kabul edilir. Hazırlanan nanopartiküllerin PDI değerleri dar bir dağılım göstermektedir.

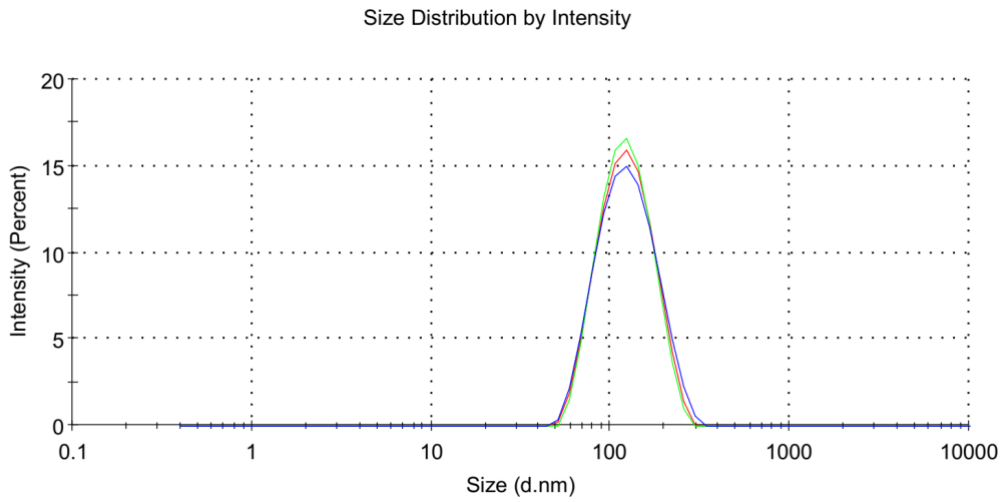
Sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmada kullanılmak üzere NP3 formülasyonu seçilmiştir.

4.1.2. TGF- β 3 Yüklü PLGA Nanopartiküller

TGF- β 3 yüklü nanopartiküller NP3 formülasyonu ile hazırlanmıştır. Her formülasyon için 3 örnekle çalışılmış; ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve TGF- β 3 yükleme oranı değerleri standart sapmaları hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.2.'de ve Şekil 4.2.'de sunulmuştur.

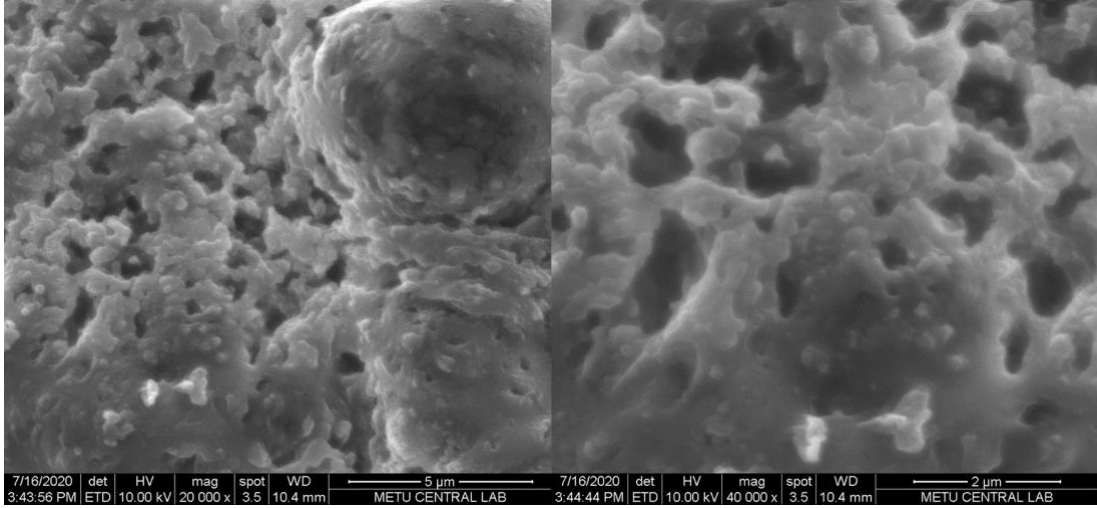
Tablo 4.2. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve yükleme oranı verileri

Formülasyon	Boyut (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)	TGF- β 3
NP3	114.267 \pm 0.35	0.096 \pm 0.01	-17.03 \pm 0.55	%56.5 \pm 5.12



Şekil 4.2. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin boyut dağılım grafikleri.

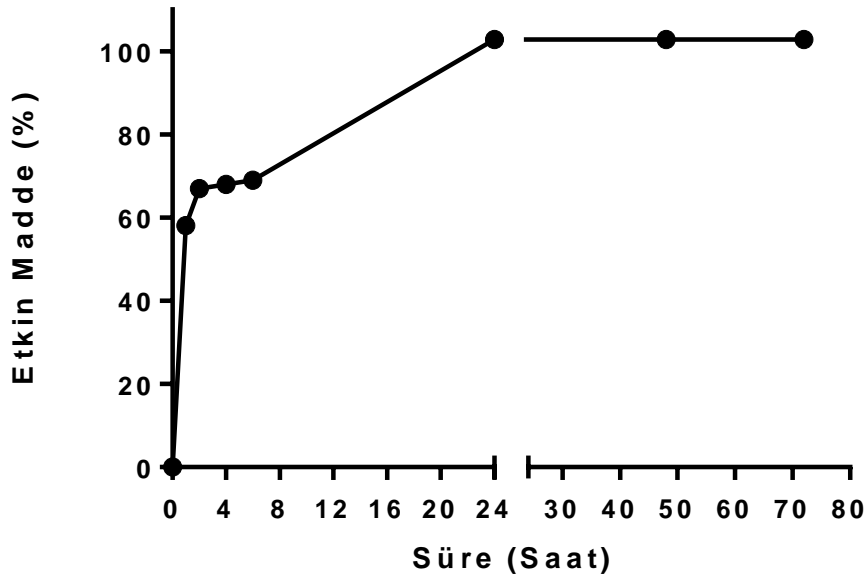
Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.3.'te sunulmuştur. Morfolojik görüntüleri analiz edildiğinde nanopartiküllerin küresel formda oldukları görülmektedir. Ancak morfolojileri incelendiğinde nanopartiküllerin kolay agrege olabileceği tespit edilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin film formülasyonu ile beraber kullanılması planlandığı için agregasyon göz önüne alınmamıştır.



Şekil 4.3. Hazırlanan TGF- β 3 yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüsü

4.2.TGF- β 3 Yüklü PLGA Naopartikülleri Etkin Madde Salım Çalışmaları

TGF- β 3 içeren PLGA nanopartiküllerinin (NP3) in vitro etkin madde salım çalışmaları, farklı zaman dilimlerinde (1, 2, 4, 6, 24, 48 ve 72. saat) hazırlanan nanopartiküllerin % salınan etkin madde miktarının ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Etkin madde salım grafiği Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. TGF- β 3 yüklü PLGA nanopartiküllerinin TGF- β 3 salım profili

4.3. Genel Bulgular

Deney süreci boyunca hiçbir grupta hayvan ölümü görülmedi. 3. haftada sakrifiye edilen grupta 4, 6. haftada sakrifiye edilen grupta ise 1 hayvanda kısmi yara dehisansı gözlemlendi, ek müdahaleye gerek kalmadan ve enfeksiyon bulgusu olmadan sekonder iyileşme olduğu görüldü.

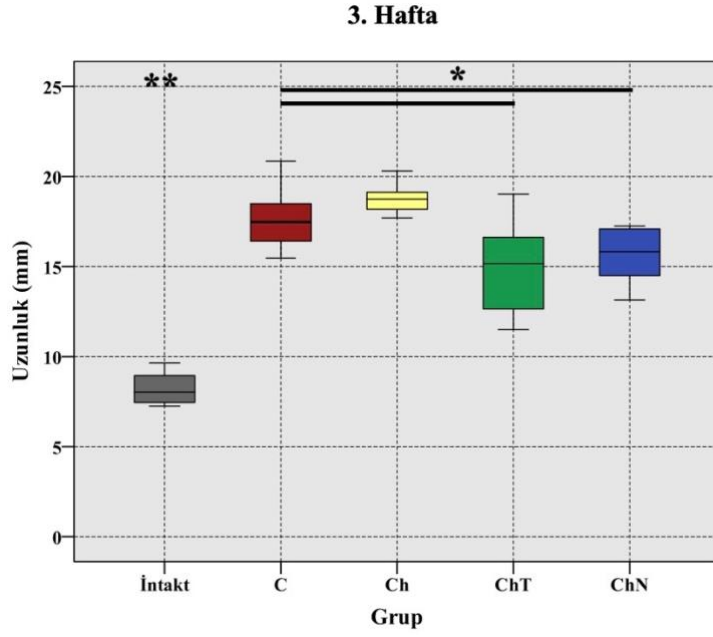
3. ve 6. hafta deney gruplarının tendon uzunlukları ve kesit alanları, intakt tendonların ölçümleriyle birlikte Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların ortalama tendon uzunlukları ve kesit alanları.

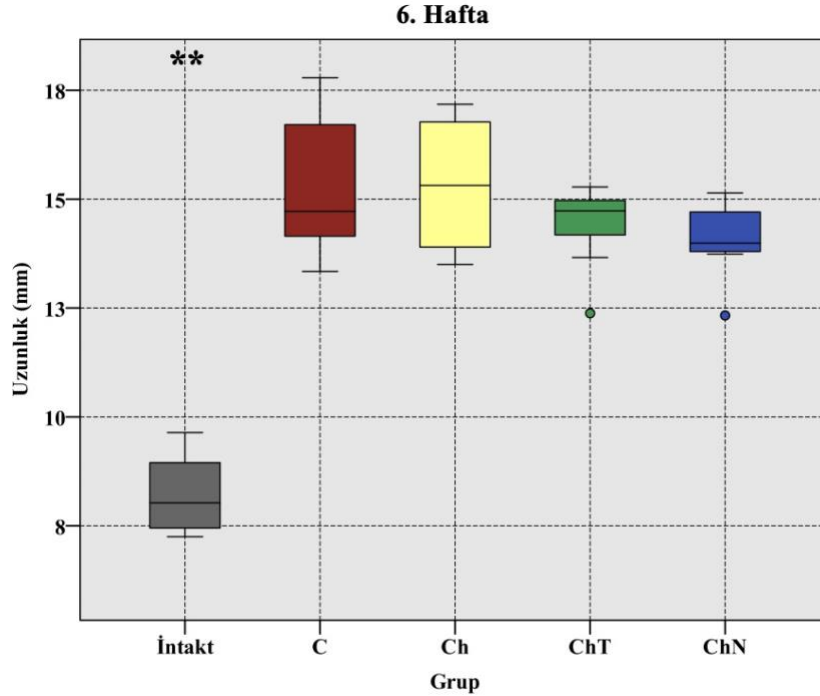
	Gruplar	Tendon Uzunluğu (mm)	Tendon Kesit Alanı (mm²)
	İntakt	8.2 (±0.9)	6.4 (±1.1)
3 Hafta	C	17.6 (±1.8)	19.6 (±4.1)
	Ch	18.7 (±0.9)	18.9 (±4.1)
	ChT	15 (±2.7)	20.8 (±1.1)
	ChN	15.6 (±1.6)	16.5 (±2.8)
6 Hafta	C	15.4 (±1.7)	18.5 (±3.1)
	Ch	15.3 (±1.6)	14.7 (±4)
	ChT	14.4 (±1)	14.2 (±4.9)
	ChN	14.1 (±0.9)	10.4 (±1.9)

3. hafta tendon uzunluklarının karşılaştırılması Şekil 4.5.'teki grafikte verilmiştir. Bu haftada bütün deney gruplarının tendonları, intakt tendonlardan belirgin şekilde uzundur (her biri için $p < 0.001$). Deney grupları kendi içerisinde ikişerli karşılaştırıldığında ise, C grubunun ChT ve ChN gruplarından anlamlı şekilde uzun olduğu görüldü (sırasıyla $p = 0.019$ ve $p = 0.004$).

6. hafta tendon uzunluklarının karşılaştırılması Şekil 4.6.'daki grafikte gösterilmiştir. Bu haftada, bütün deney gruplarının tendonları, intakt tendonlardan belirgin şekilde uzundur (her bir karşılaştırma için $p < 0.001$). Deney grupları kendi aralarında ikili olarak karşılaştırıldığında benzer bulunmuştur.



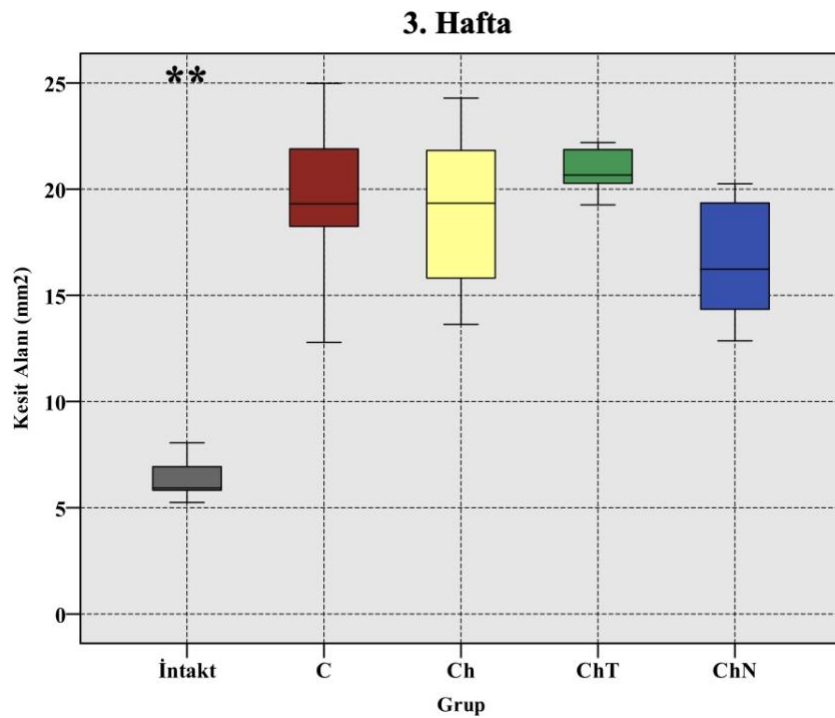
Şekil 4.5. 3. hafta ortalama tendon uzunluğu grafiği. *C ile ChT ve ChN grupları arasındaki fark ($p= 0.019$ ve $p=0.004$), ** intakt tendonlar ile bütün gruplar arasındaki fark (herbiri için $p<0.001$).



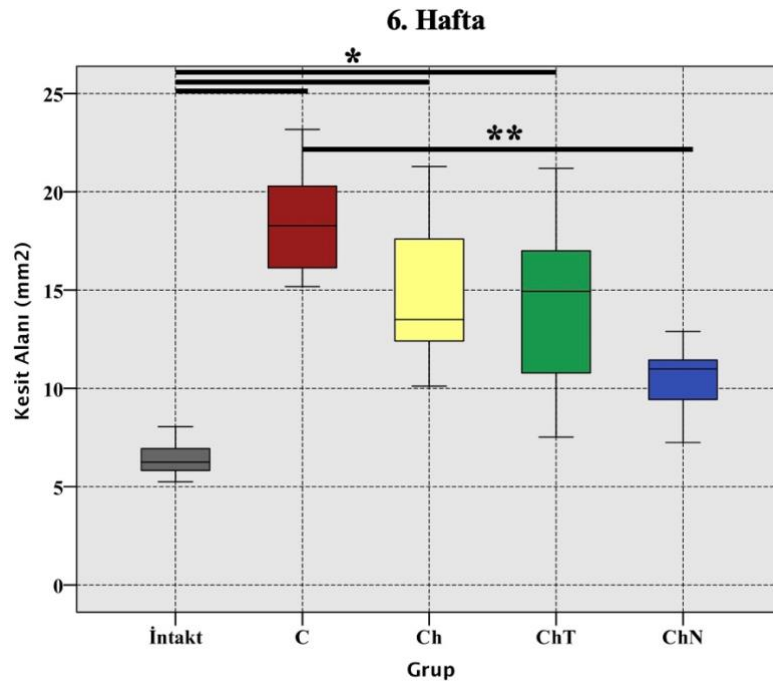
Şekil 4.6. 6. hafta ortalama tendon uzunluğu grafiği (** İntakt tendonlar, bütün gruplardan anlamlı şekilde daha kısadır, $p=0.001$).

3. hafta tendon kesit alanlarının karşılaştırılması Şekil 4.7.'deki grafikte gösterilmiştir. Bu haftada, bütün deney gruplarının tendonları, intakt tendonlardan belirgin şekilde büyük kesit alanlarına sahiptir (her bir karşılaştırma için $p<0.001$). Deney grupları kendi aralarında ikili olarak karşılaştırıldığında benzer bulunmuştur.

6. hafta tendon kesit alanlarının karşılaştırılması Şekil 4.8.'deki grafikte gösterilmiştir. C, Ch ve ChT gruplarının kesit alanları intakt tendona göre belirgin şekilde büyüktür (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.003$ ve $p=0.003$); fakat ChN grubu ile benzerdir ($p=0.290$). Deney grupları kendi içerisinde ikişerli karşılaştırıldığında, C grubunun ChN grubundan anlamlı şekilde büyük kesit alanına sahip olduğu görülmüştür ($p=0.002$).



Şekil 4.7. 3. hafta ortalama tendon kesit alanı grafiği. ** İntakt tendon grubu, bütün gruplardan belirgin şekilde küçük kesit alanına sahiptir (herbiri için $p<0.001$).



Şekil 4.8. 6. hafta ortalama tendon kesit alanı grafiği. * İntakt tendon grubu; C, Ch ve ChT gruplarından anlamlı şekilde farklı kesit alanına sahiptir (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.003$, $p=0.003$). ** C grubu ile ChN arasında da anlamlı fark saptanmıştır. ($p=0.002$).

4.4. Biyomekanik Bulgular

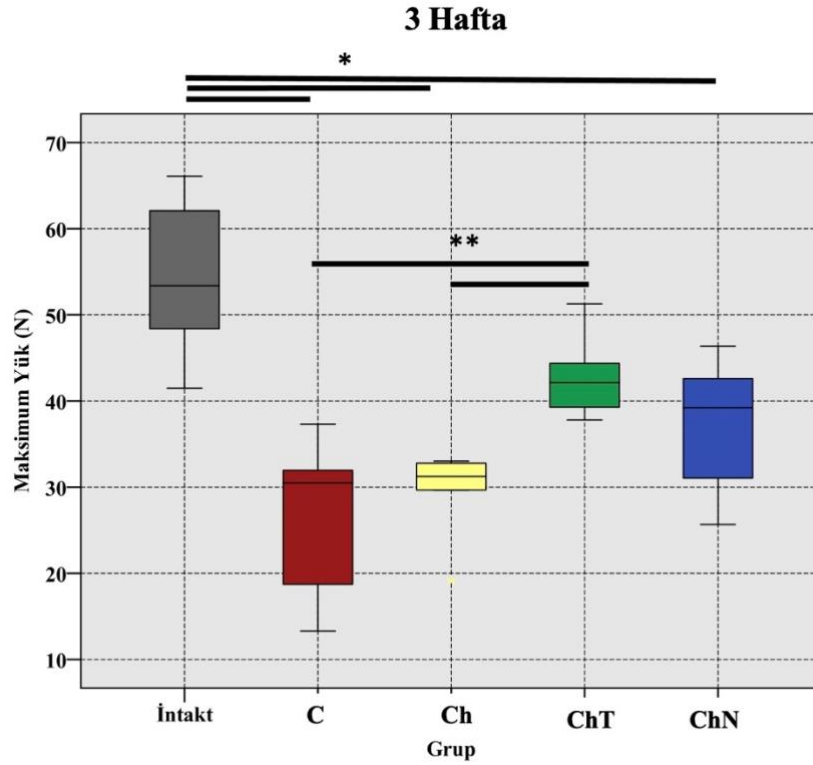
Grupların 3. ve 6. haftalarda hesaplanan maksimum yük (N), rijitlik (N/mm), maksimum gerilim (Mpa) ve elastik modulları (Mpa) Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Biyomekanik analiz sonuçları.

	İntakt	3. Hafta				6. Hafta			
		C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
Maksimum yük (N)	54.6 (±9.4)	27 (±9.1)	29.2 (±5.7)	42.8 (±4.9)	35.1 (±10.1)	73.2 (±7.6)	63.4 (±5.4)	51.6 (±9.3)	60.4 (±7.6)
Rijitlik (N/mm)	26.9 (±10.7)	8.4 (±3.1)	9.3 (±2.5)	13 (±3.6)	11.4 (±6.4)	23 (±6.3)	23.1 (±8.8)	17.5 (±4.6)	23 (±2.7)
Maksimum gerilim (Mpa)	34.1 (±7.8)	4.9 (±1.4)	7.2 (±2.2)	6.5 (±0.8)	10.6 (±3.9)	16.6 (±2.7)	21.4 (±4)	16 (±5.8)	26.9 (±3.9)
Elastik Modulus (Mpa)	77.4 (±22.2)	23.2 (±7.5)	30.6 (±14.2)	14.5 (±4.7)	20.1 (±6.9)	39.7 (±11.8)	46.5 (±9.4)	37.5 (±12.4)	43 (±11.8)

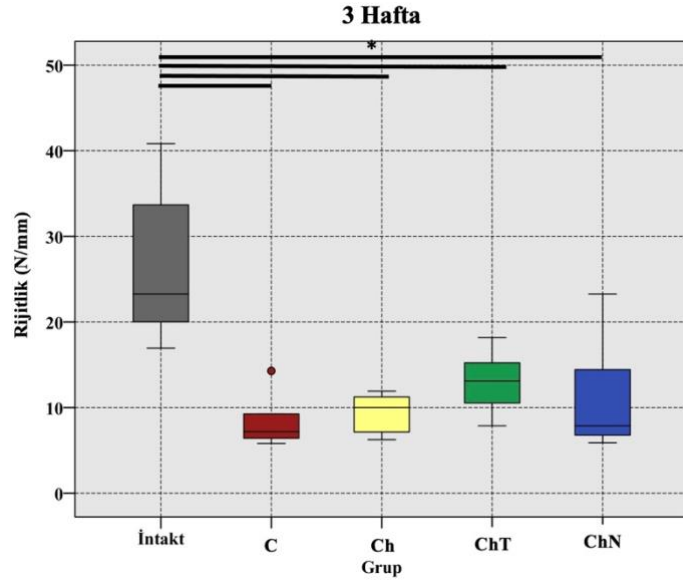
3. haftada maksimum yüklerin karşılaştırılmasında (Şekil 4.9.); C, Ch ve ChN gruplarının intakt tendona göre istatistiksel anlamlı farkları olduğu görülmüştür

(sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$ ve $p=0.005$). Deney grupları karşılaştırıldığında ise ChT grubunun, C ve Ch gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bir maksimum yüke sahip olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.005$).



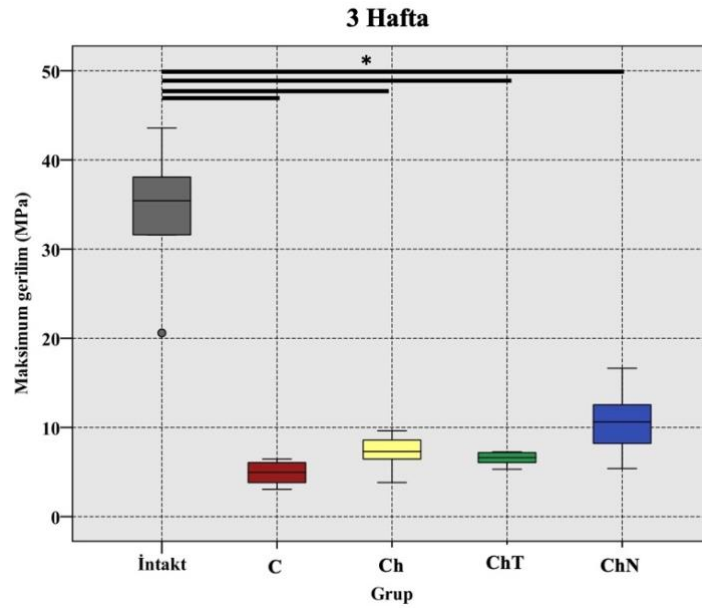
Şekil 4.9. 3. hafta ortalama maksimum yük grafiği. * İntakt tendonlar; C, Ch ve ChN gruplarından daha yüksek maksimum yüke sahiptir (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$ ve $p=0.005$). ** ChT grubu C ve Ch gruplarından yüksektir (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.005$).

3. haftada rijitlikler karşılaştırıldığında (Şekil 4.10.); deney gruplarının birbirine benzer olduğu ve intakt tendonların rijitliğinin bütün deney gruplarından anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla C için $p=0.003$, Ch için $p=0.004$, ChT için $p=0.004$ ve ChN için $p=0.005$).



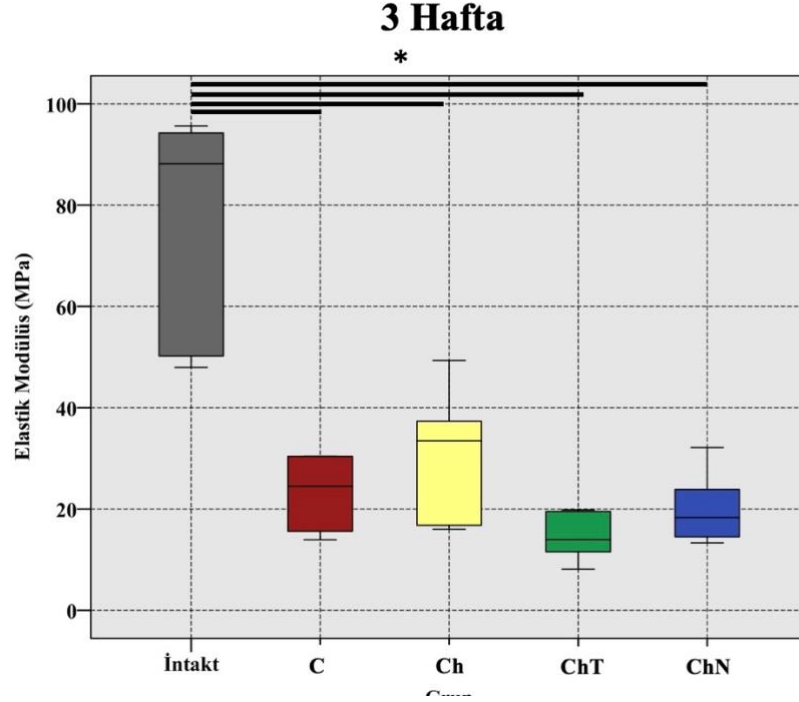
Şekil 4.10. 3. hafta ortalama rijitlik grafiği. * İntakt tendonların rijitliği bütün gruplardan yüksektir (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$, $p=0.005$ ve $p=0.005$).

3. haftada grupların dayandığı maksimum gerilim karşılaştırıldığında (Şekil 4.11.), intakt tendonların ortalama maksimum gerilim değerinin diğer gruplardan belirgin şekilde yüksek olduğu (herbiri için $p<0.001$), deney grupları arasında fark olmadığı görüldü.



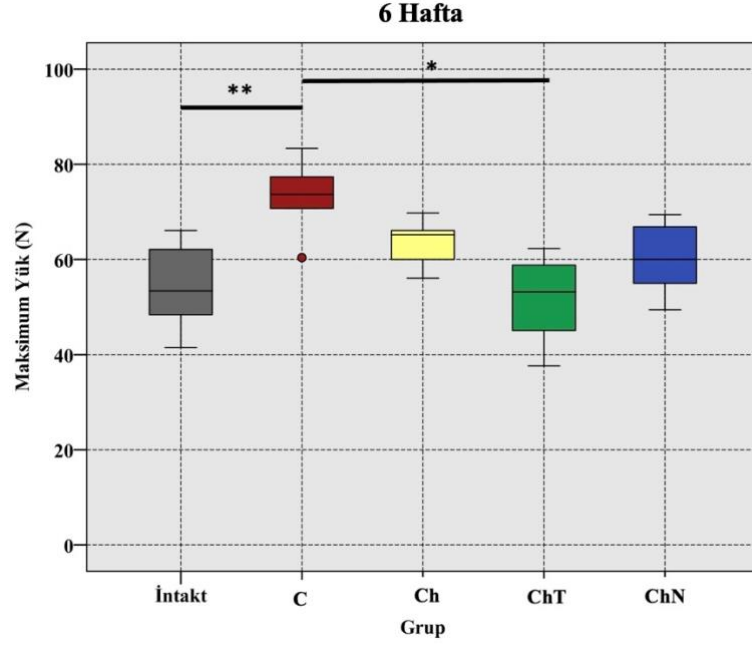
Şekil 4.11. 3. hafta ortalama maksimum gerilim grafiği. *İntakt tendonlar, bütün deney gruplardan yüksek maksimum gerilim değerine sahiptir ($p<0.001$).

3. haftada gruplar elastik modülüs açısından karşılaştırıldığında (Şekil 4.12.), anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0.001$). İntakt tendonların elastik modülüs değerinin bütün gruplardan yüksek olduğu (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.005$, $p=0.004$, $p=0.003$) görüldü. Deney gruplarının kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmadı (C ve ChT grupları için $p=0.055$, Ch ve ChT grupları için $p=0.045$; Bonferroni düzeltmesinden dolayı anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edilmiştir.).



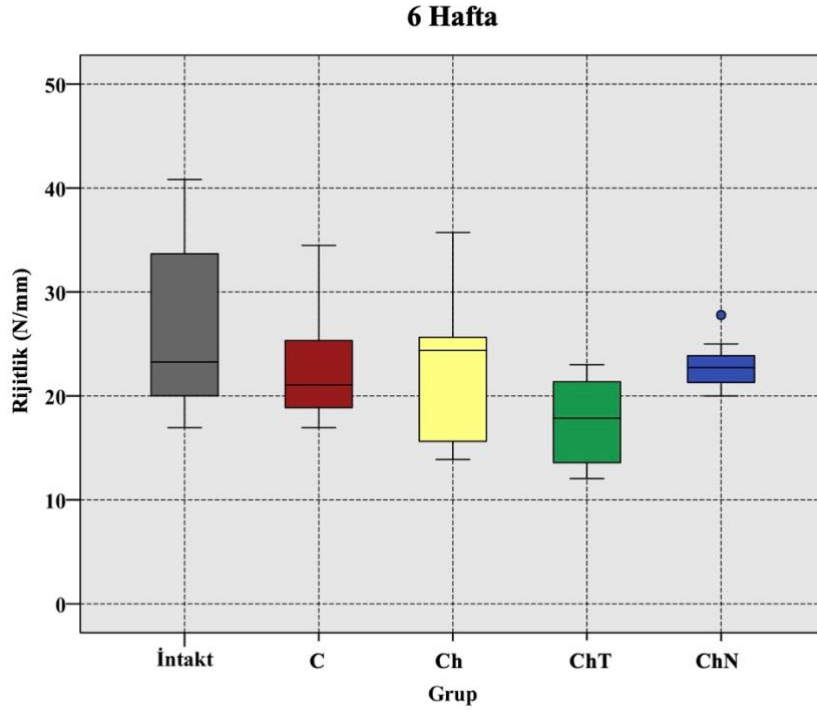
Şekil 4.12. 3. hafta ortalama elastik modülüs grafiği. *İntakt tendonların deney gruplarının tamamından anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.005$, $p=0.004$ ve $p=0.003$).

6. haftada grupların dayandığı maksimum yüklerin karşılaştırılmasında (Şekil 4.13.); C grubu intakt tendonlardan ($p=0.003$) ve ChT grubundan ($p=0.001$) yüksek bulunmuştur. İntakt tendonlar, C, Ch ve ChN grupları kendi içlerinde benzer bulunmuştur.



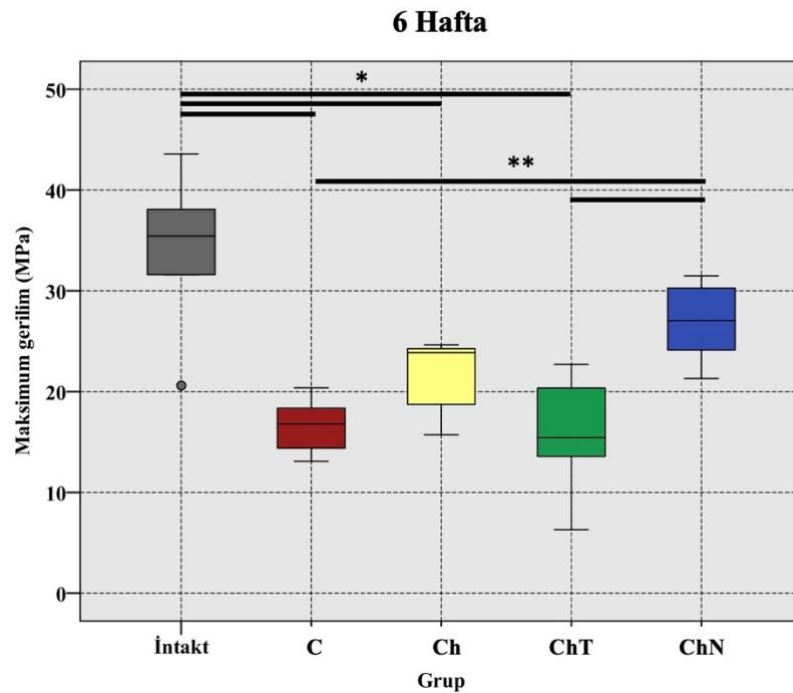
Şekil 4.13. 6. hafta ortalama maksimum yük grafiği. * C grubu Ch ve intakt tendon gruplarından yüksektir (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.001$).

6. haftada grupların rijitlik değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.14.); gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.164$).



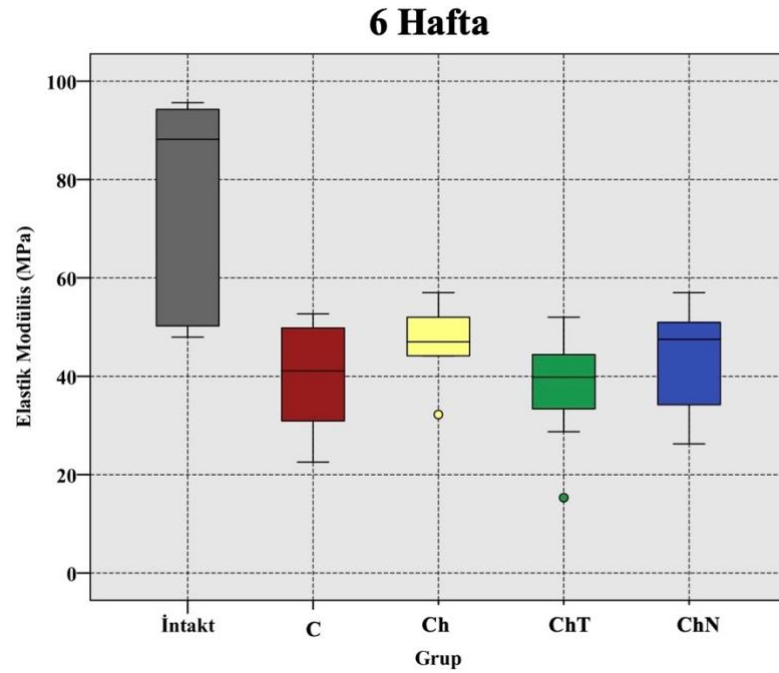
Şekil 4.14. 6. hafta ortalama rijitlik grafiği.

Grupların 6. haftada ortalama maksimum gerilim değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.15.), gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.001$). İntakt tendon grubunun maksimum gerilim değeri C, Ch ve ChT gruplarından farklı iken (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.003$, $p<0.001$), ChN grubu ile benzerdir ($p=0.121$). ChN grubu, C grubundan ve ChT grubundan yüksek maksimum gerilime sahiptir (sırasıyla $p=0.01$ ve $p=0.004$).



Şekil 4.15. 6. hafta ortalama maksimum gerilim grafiği. * İntakt tendon grubu; C, Ch ve ChT gruplarından anlamlılığa ulaşan düzeyde yüksek değere sahiptir (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.003$ ve $p<0.001$). ** ChN grubu C ve ChT gruplarından yüksek değere sahiptir (sırasıyla $p=0.01$ ve $p=0.004$).

Grupların 6. haftada ortalama elastik modülüs değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.16.), gruplar arasında fark saptandı ($p=0.035$). İkili karşılaştırmalarda aradaki farkın sonuçlara anlamlı olarak yansımadağı görüldü. Ortalaması diğer gruplardan yüksek olan intakt tendon grubu, diğer gruplarla istatistiksel olarak karşılaştırıldığında fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.036$, $p=0.045$, $p=0.010$ ve $p=0.022$, Bonferroni düzeltmesi ile anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edildi).



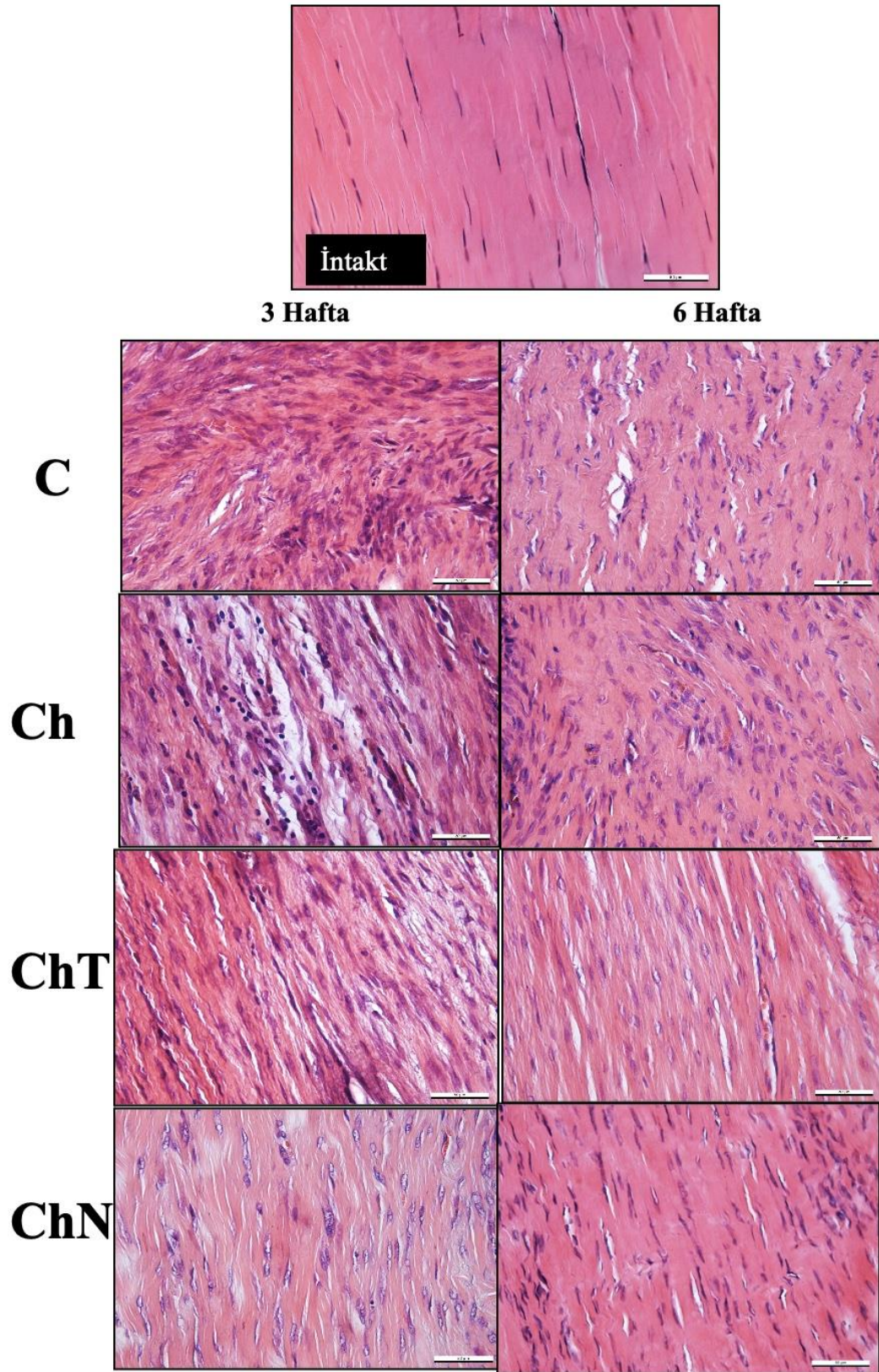
Şekil 4.16. 6. hafta ortalama elastik modülüs grafiği. Gruplar arasında ikişerli karşılaştırmada anlamlı fark saptanmamıştır.

4.5. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

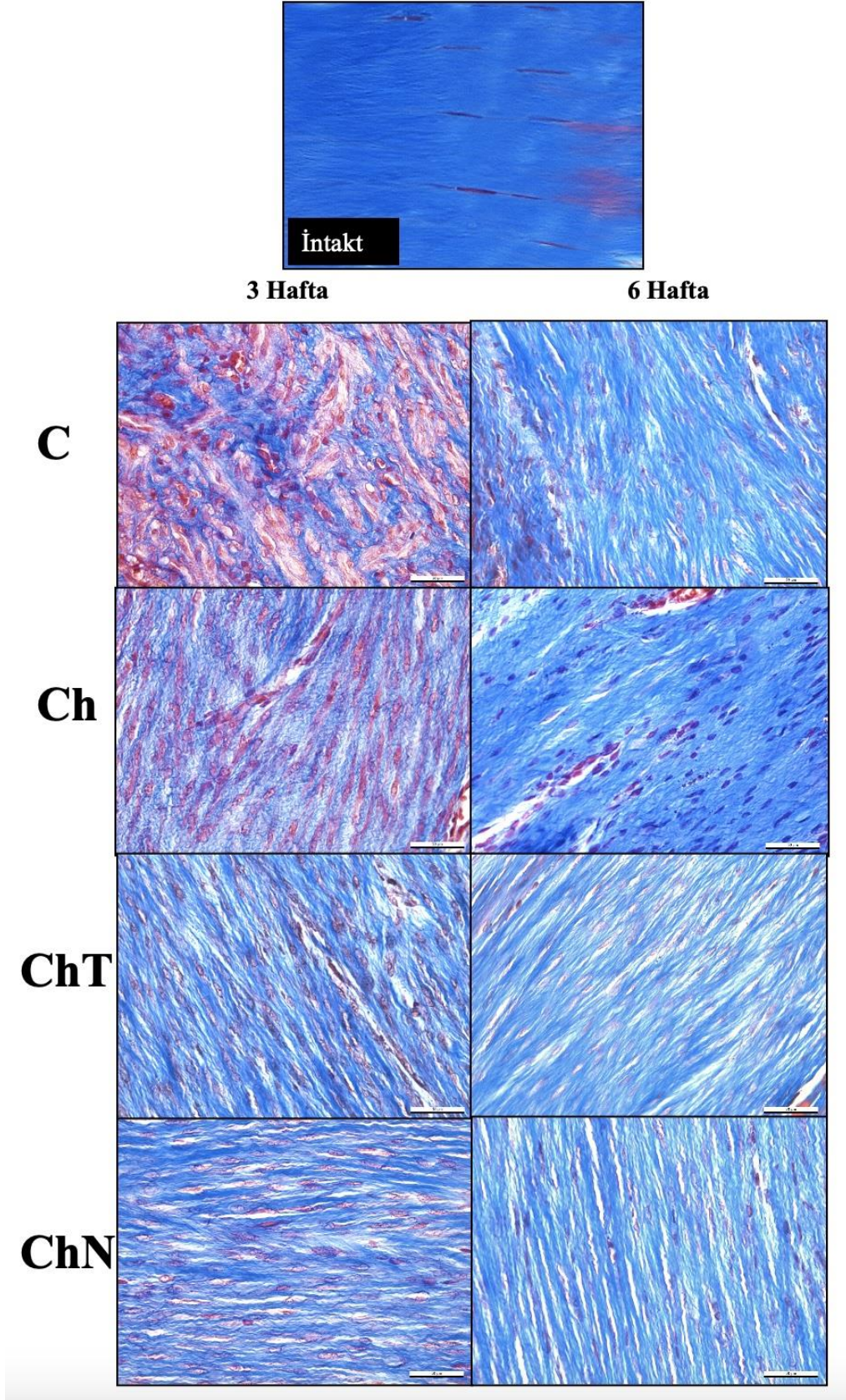
Grupların 3 hafta ve 6 hafta Bonar skorları, alt gruplar ve total skor olarak Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. HE boyama sonrası alınan kesitler Şekil 4.17.'de, Masson's trichrome boyama sonrası alınan kesitler Şekil 4.18.'de ve Alcian blue ile boyama sonrası alınan kesitler Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Ortalama total Bonar skorları ve alt skorları.

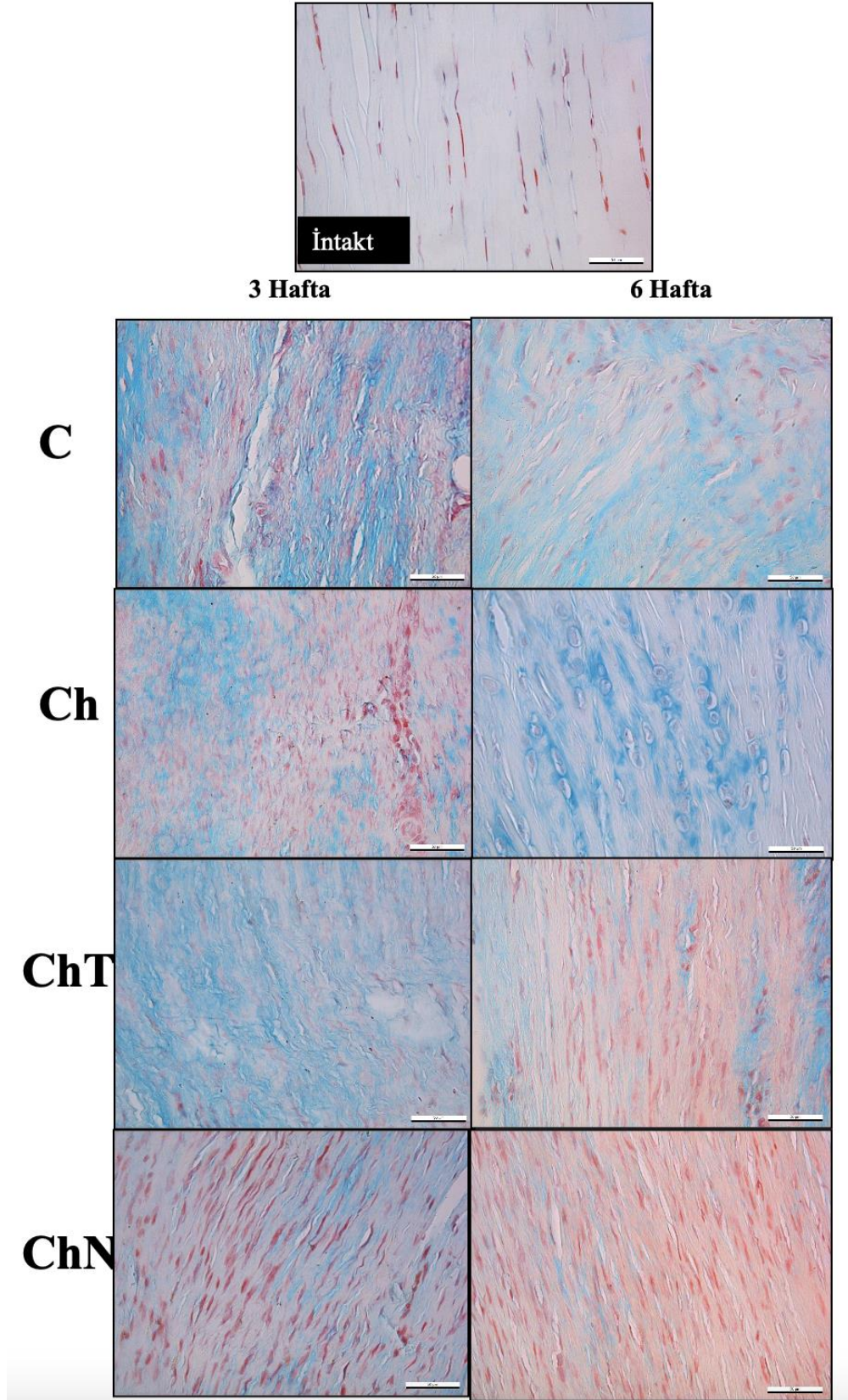
	3 Hafta				6 Hafta			
	C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
Toplam Skor	9.6 (±1.3)	9.5 (±1)	5.6 (±1.4)	4.7 (±1)	7.4 (±1)	7.1 (±1.2)	3 (±1.1)	2.7 (±1.1)
Tenosit	2.5 (±0.5)	2.3 (±0.6)	1.6 (±0.5)	1.5 (±0.5)	2.3 (±0.5)	1.7 (±0.6)	0.8 (±0.6)	0.6 (±0.5)
Zemin Maddesi	2.5 (±0.5)	2.6 (±0.5)	1.5 (±0.5)	0.9 (±0.5)	1.6 (±0.5)	1.7 (±0.6)	0.6 (±0.5)	0.7 (±0.5)
Kollajen	2.2 (±0.6)	2.2 (±0.4)	1.1 (±0.7)	1.2 (±0.6)	1.5 (±0.5)	1.5 (±0.6)	0.7 (±0.5)	0.9 (±0.5)
Vaskülarite	2.4 (±0.5)	2.3 (±0.5)	1.4 (±0.7)	1.1 (±0.6)	1.9 (±0.6)	2.1 (±0.6)	0.9 (±0.6)	0.6 (±0.5)



Şekil 4.17. Hematoksilen-eozin boyama sonrası alınan histolojik kesitler (x400, skala bar=50 µm).

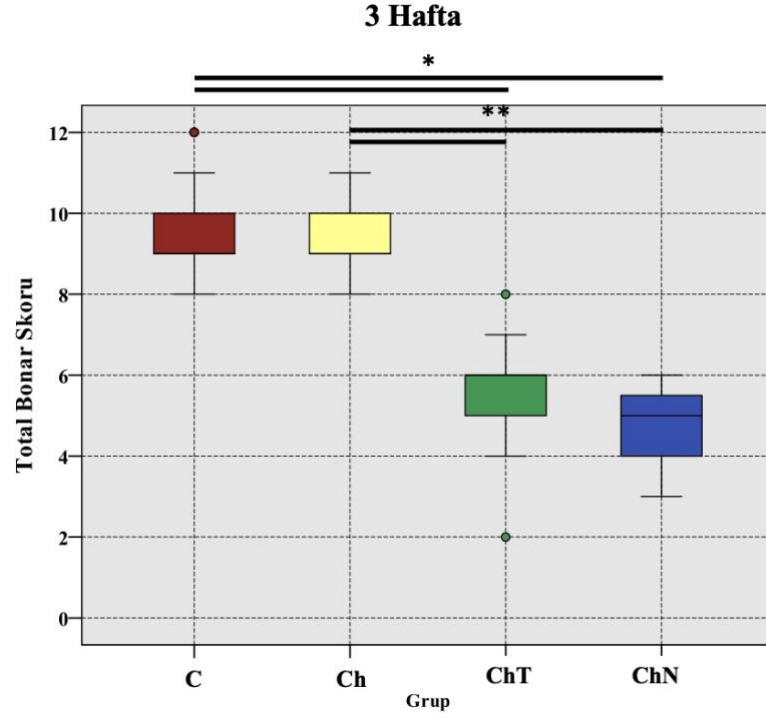


Şekil 4.18. Masson's trichrome ile boyama sonrası alınan histolojik kesitler (x400, skala bar=50 μ m).



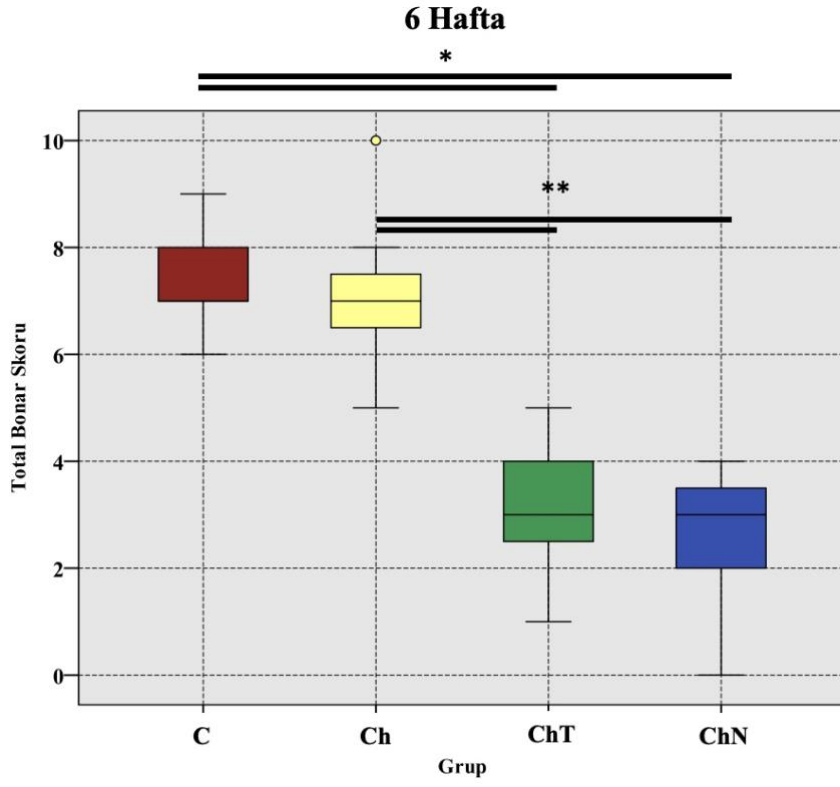
Şekil 4.19. Alcian blue ile boyama sonrası alınan histolojik kesitler (x400, skala bar=50 μ m).

3. hafta total Bonar skorları bütün gruplarda karşılaştırıldığında (Şekil 4.20.) anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda; C grubu ile ChT ve ChN grupları arasında (her ikisi için de $p<0.001$), Ch grubu ile ChT ve ChN grupları arasında (her ikisi için de $p<0.001$) anlamlı fark bulunmuştur. ChT ve ChN grupları arasındaki fark anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0.037$, Bonferroni düzeltmesinden dolayı anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edilmiştir).



Şekil 4.20. 3. hafta ortalama total Bonar skorları grafiği. *C grubu ile ChT ve ChN arasında ($p<0.001$); **Ch grubu ile ChT ve ChN arasında (her ikisi için $p<0.001$) anlamlı fark vardır.

6. hafta total Bonar skorları bütün gruplarda karşılaştırıldığında (Şekil 4.21.) anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda; C grubunun ChT ve ChN gruplarından yüksek olduğu görülmüştür (her ikisi için de $p<0.001$). Ch grubu, ChT ve ChN gruplarından büyük bulunmuştur (her ikisi için de $p<0.001$). ChT ve ChN grupları arasında fark yoktur ($p=0.531$).



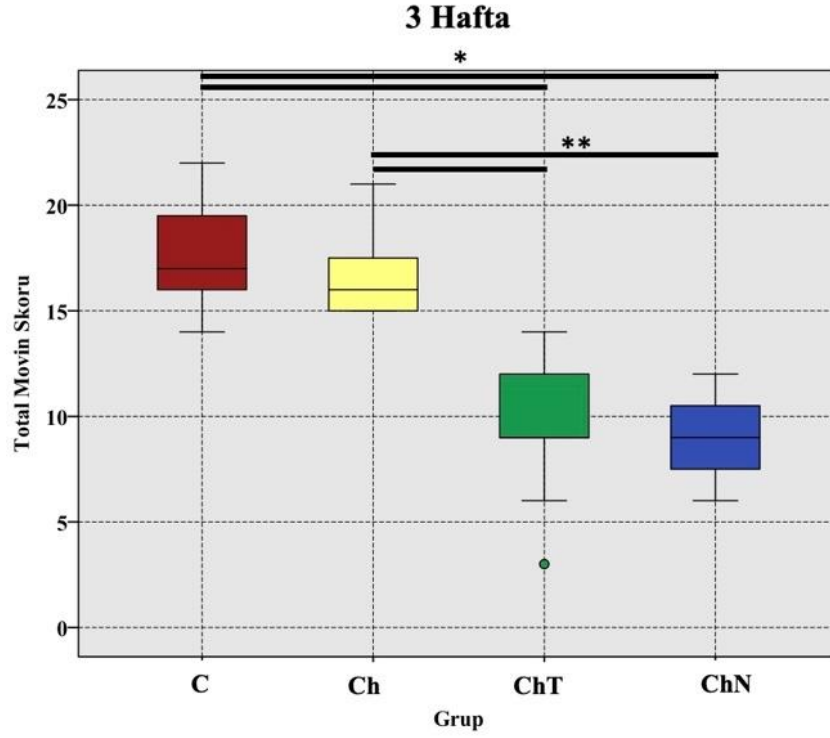
Şekil 4.21. 6. hafta ortalama total Bonar skoru grafiği. * C grubu ChT ve ChN gruplarından (her ikisi için de $p < 0.001$); ** Ch grubu da ChT ve ChN gruplarından (her ikisi için de $p < 0.001$) yüksektir.

Grupların 3 hafta ve 6 hafta Movin skorları, alt gruplar ve total skor olarak Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Ortalama total Movin skorları ve alt skorları.

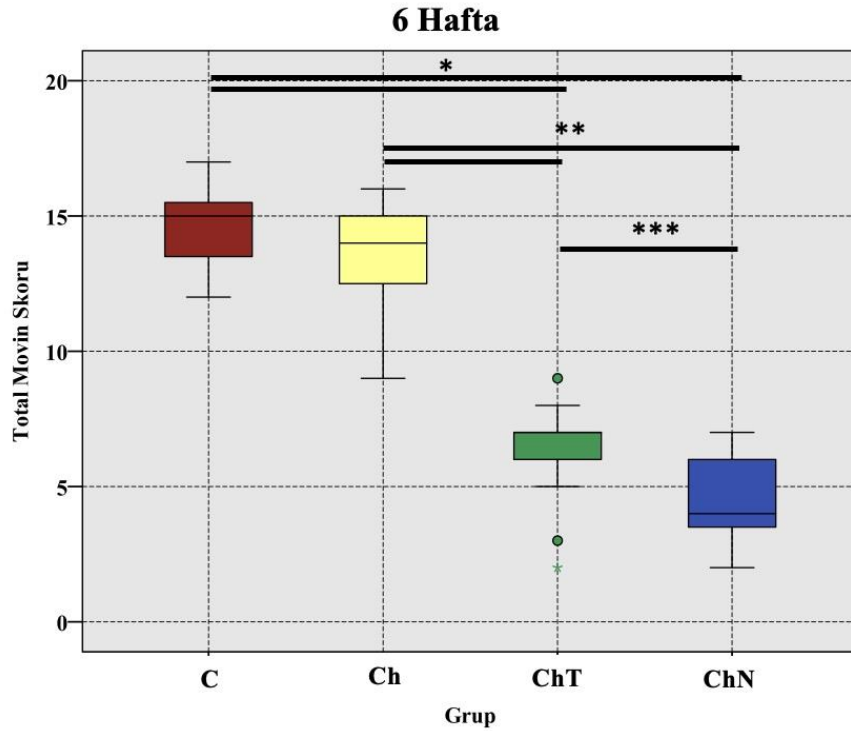
	3 Hafta				6 Hafta			
	C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
Total Skor	17.7 (±2.6)	16.8 (±1.9)	9.9 (±2.9)	9.1 (±2)	14.5 (±1.5)	13.3 (±2)	6.3 (±1.8)	4.5 (±1.5)
Fibril Yapısı	2.2 (±0.6)	2.1 (±0.4)	1.1 (±0.6)	1.2 (±0.6)	1.9 (±0.6)	1.8 (±0.4)	0.8 (±0.6)	0.5 (±0.5)
Fibril Düzeni	2.3 (±0.5)	2.2 (±0.4)	1.1 (±0.7)	1.2 (±0.6)	1.9 (±0.4)	1.8 (±0.6)	1.1 (±0.5)	0.5 (±0.5)
Nükleus Yuvarlaklığı	2.5 (±0.5)	2.3 (±0.6)	1.6 (±0.5)	1.5 (±0.5)	2.3 (±0.5)	1.7 (±0.6)	0.8 (±0.6)	0.6 (±0.5)
Hüresel Değişiklik	2.3 (±0.6)	1.9 (±0.6)	1.4 (±0.6)	1.5 (±0.5)	2.3 (±0.5)	1.7 (±0.7)	0.9 (±0.5)	0.7 (±0.5)
Vaskülarite Artışı	2.4 (±0.5)	2.3 (±0.5)	1.4 (±0.7)	1.1 (±0.6)	1.9 (±0.6)	2 (±0.7)	0.9 (±0.6)	0.6 (±0.5)
Kollajen Boyanmasında Azalma	2.2 (±0.6)	2.2 (±0.4)	1.1 (±0.7)	1.2 (±0.6)	1.5 (±0.5)	1.5 (±0.5)	0.7 (±0.5)	0.8 (±0.6)
Hyalinizasyon	1.3 (±0.5)	1.1 (±0.6)	0.7 (±0.5)	0.5 (±0.5)	1.1 (±0.6)	1.3 (±0.7)	0.4 (±0.5)	0.2 (±0.4)
GAG	2.5 (±0.5)	2.6 (±0.5)	1.5 (±0.5)	0.9 (±0.5)	1.6 (±0.5)	1.6 (±0.5)	0.6 (±0.5)	0.7 (±0.5)

3. hafta total Movin skorları bütün gruplarda karşılaştırıldığında (Şekil 4.22.) anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda; C grubunun ChT ve ChN gruplarından yüksek olduğu (her ikisi için de $p<0.001$) ve Ch grubunun, ChT ve ChN gruplarından yüksek olduğu (her ikisi için de $p<0.001$) görülmüştür. ChT ve ChN grupları arasında fark saptanmamıştır ($p=0.302$).



Şekil 4.22. 3. hafta ortalama total Movin skoru grafiği. *C grubu ChT ve ChN gruplarından (her ikisi için de $p<0.001$); ** Ch grubu da ChT ve ChN gruplarından yüksektir (her ikisi için de $p<0.001$).

6. hafta total Movin skorları bütün gruplarda karşılaştırıldığında (Şekil 4.23.) anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda; C grubunun ChT ve ChN gruplarından yüksek olduğu (her ikisi için de $p<0.001$), Ch grubunun ChT ve ChN gruplarından yüksek olduğu (her ikisi için $p<0.001$) ve ChT grubunun ChN grubundan yüksek olduğu ($p=0.006$) görülmüştür.

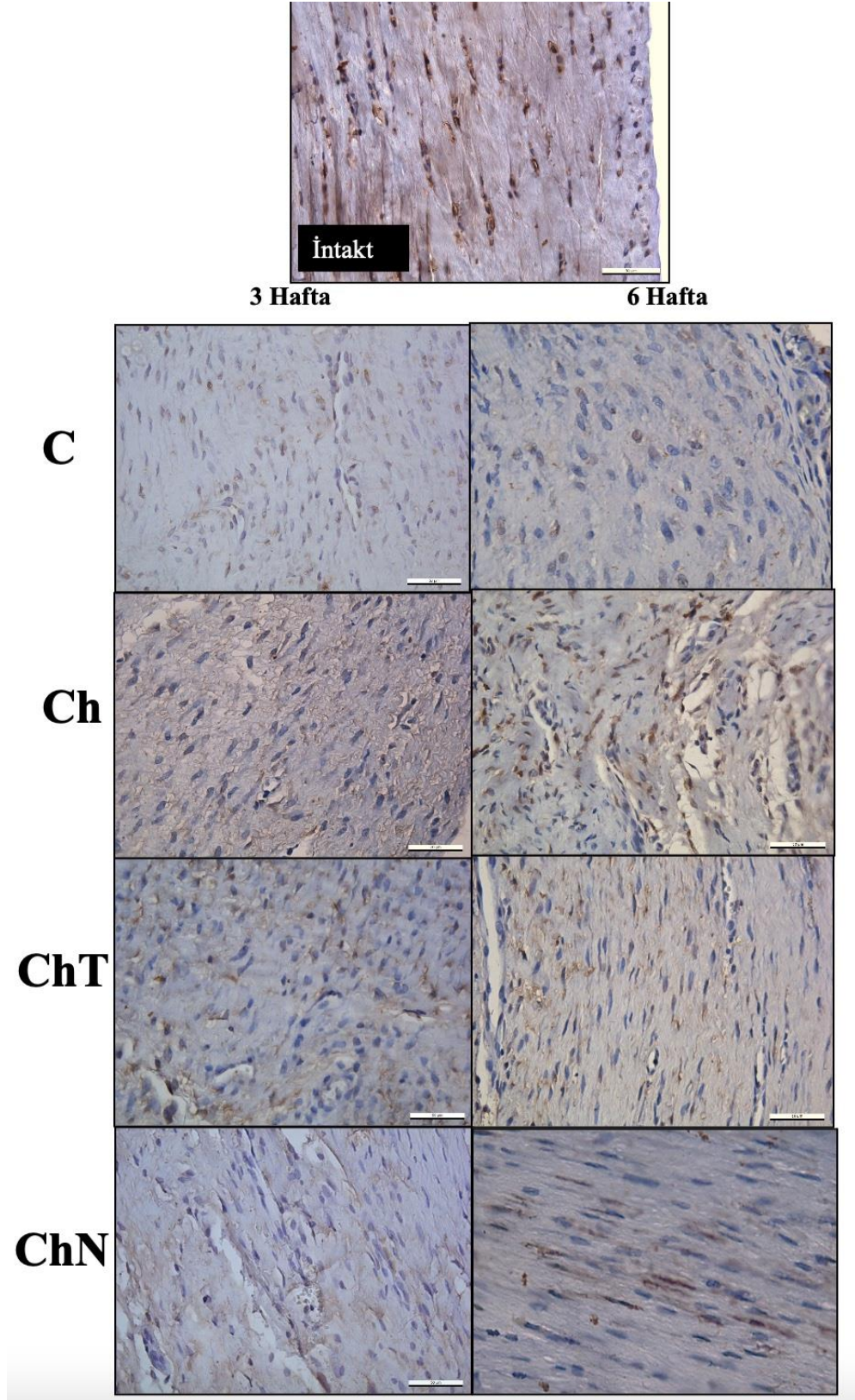


Şekil 4.23. 6. hafta ortalama total Movin skoru grafiği. * C grubu, ChT ve ChN gruplarından (her ikisi için de $p < 0.001$), ** Ch grubu ChT ve ChN gruplarından (her ikisi için de $p < 0.001$) ve *** ChT grubu da ChN grubundan ($p = 0.006$) yüksek bulunmuştur.

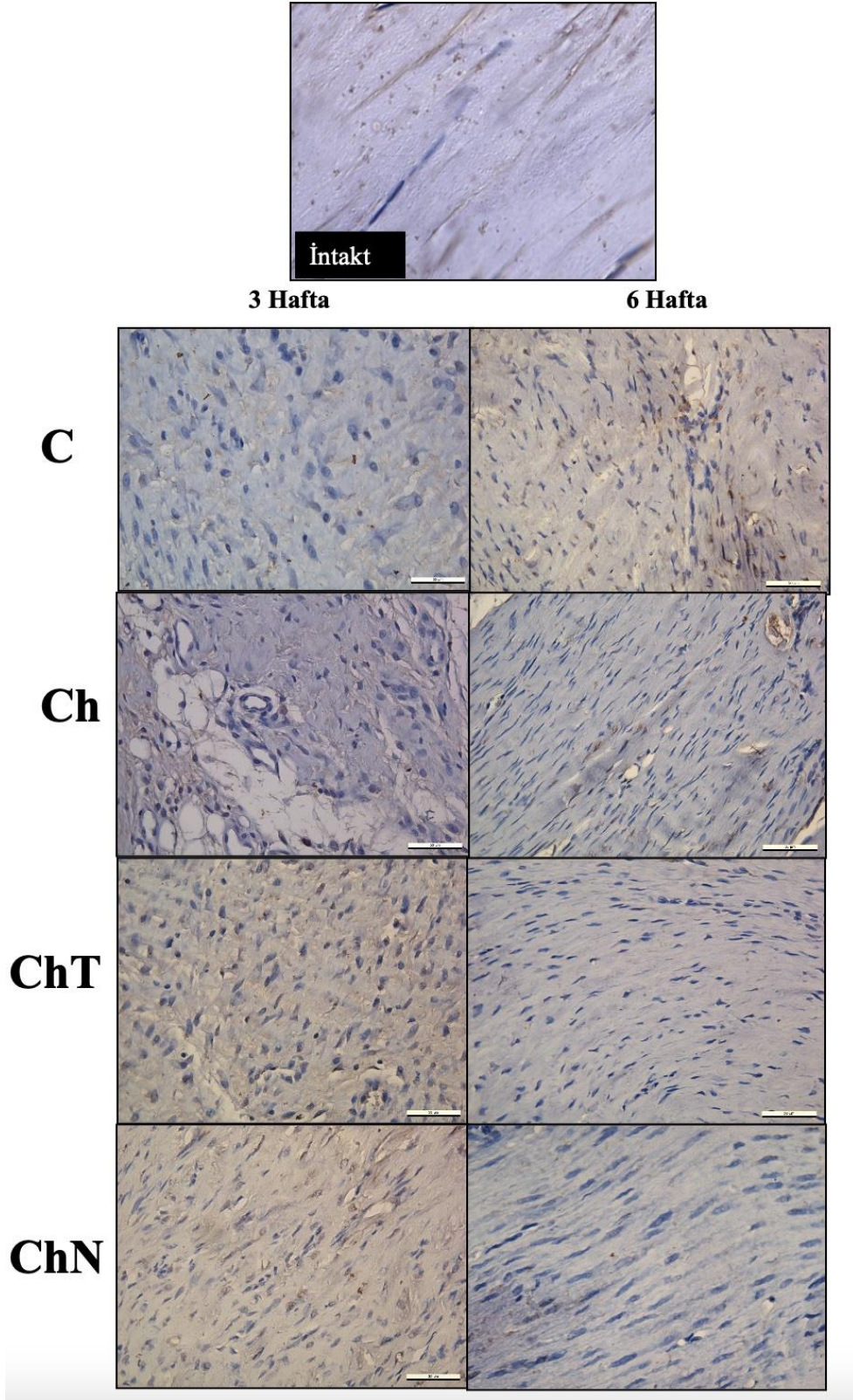
3. ve 6. haftalarda immünohistokimyasal boyama ile bakılan Tip I ve Tip III kollajen optik yoğunlukları Tablo 4.7.'de gösterilmiştir. Tip I kollajene yönelik boyama sonrası alınan kesitler Şekil 4.24.'te, tip III kollajene yönelik yapılan boyama sonrasında alınan kesitler ise Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Tip I ve tip III kollajen optik yoğunlukları.

	3. Hafta				6. Hafta			
	C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
Tip I Kollajen	0.811 (±0.466)	0.843 (±0.575)	0.998 (±0.443)	0.850 (±0.541)	0.749 (±0.456)	0.698 (±0.441)	1.203 (±0.723)	1.129 (±0.368)
Tip III Kollajen	0.769 (±0.514)	0.965 (±0.505)	1.038 (±0.5)	1.469 (±0.514)	0.648 (±0.454)	0.636 (±0.505)	0.281 (±0.280)	0.275 (±0.218)



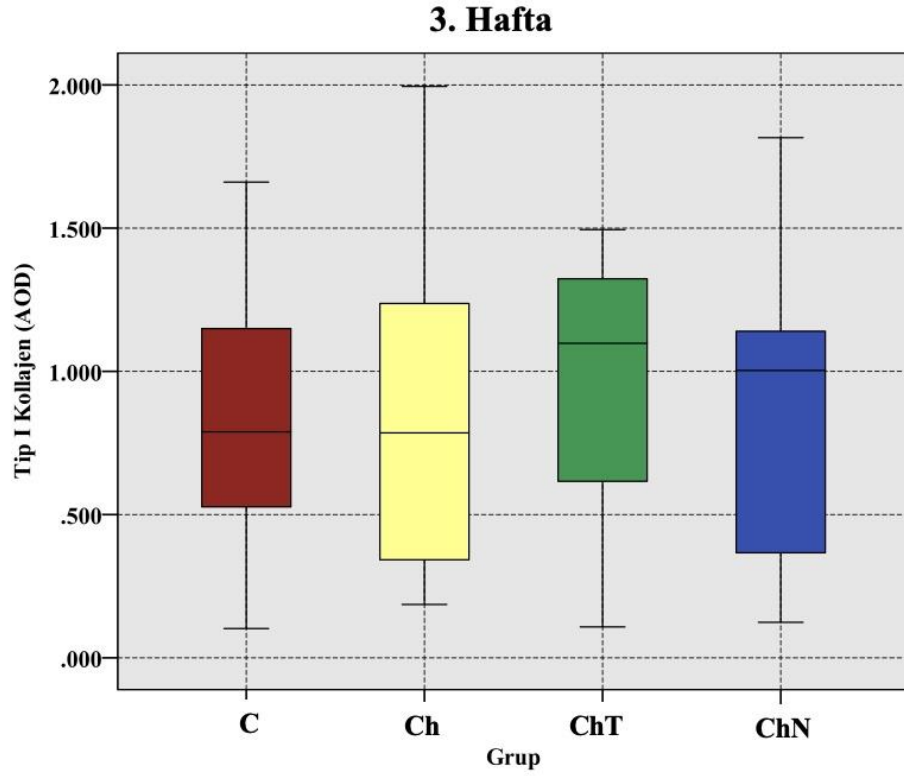
Şekil 4.24. Tip I kollajene yönelik olarak yapılan ilmmünohistokimyasal boyama sonrası alınan histolojik kesitler (Hematoksilen-DAB, x400, skala bar=50µm).



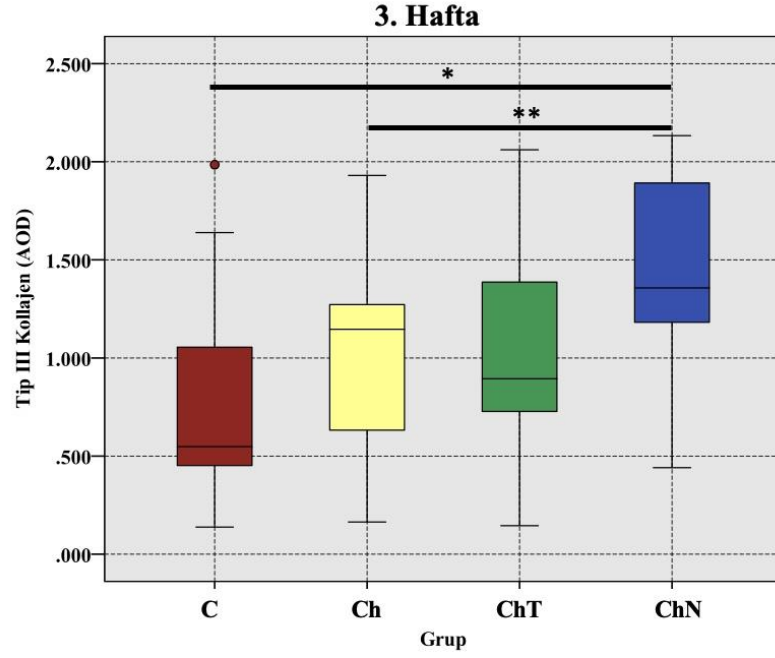
Şekil 4.25. Tip III kollajene yönelik olarak yapılan ilmmünohistokimyasal boyama sonrası alınan histolojik kesitler (Hematoksilen-DAB, x400, skala bar=50µm).

3. haftada immünohistokimyasal yöntemle bakılan Tip I kollajen optik yoğunluğu gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.26., $p=0.681$).

3. haftada immünohistokimyasal yöntemle bakılan Tip III kollajen optik yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Şekil 4.27., $p=0.004$). İkili karşılaştırmalarda, ChN grubunun C grubundan ve Ch grubundan yüksek Tip III kollajen yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.008$). ChT ve ChN grupları arasındaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0.019$, Bonferroni düzeltmesinden dolayı $p=0.008$ anlamlı sınır kabul edilmiştir).



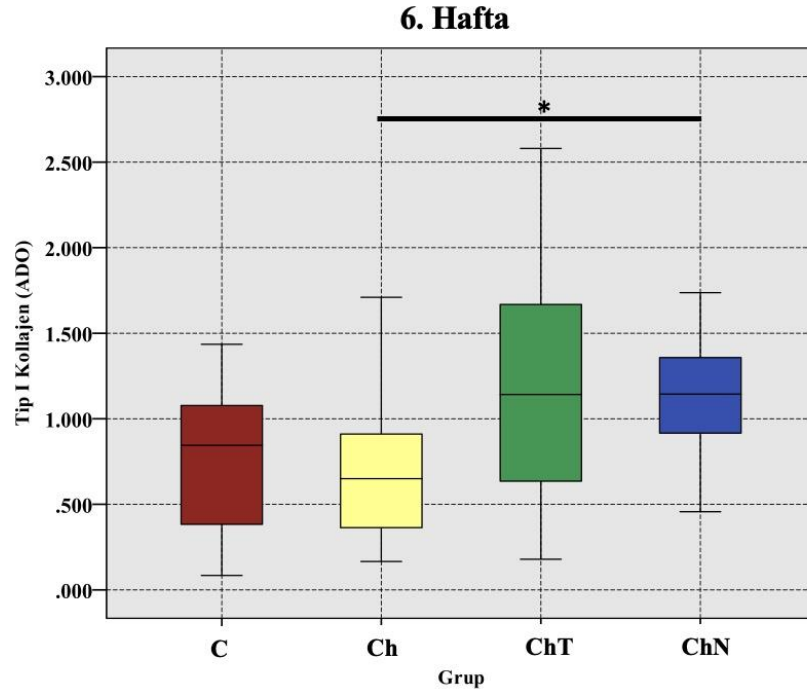
Şekil 4.26. 3. hafta, tip I kollajen immünohistokimya sonuçları.



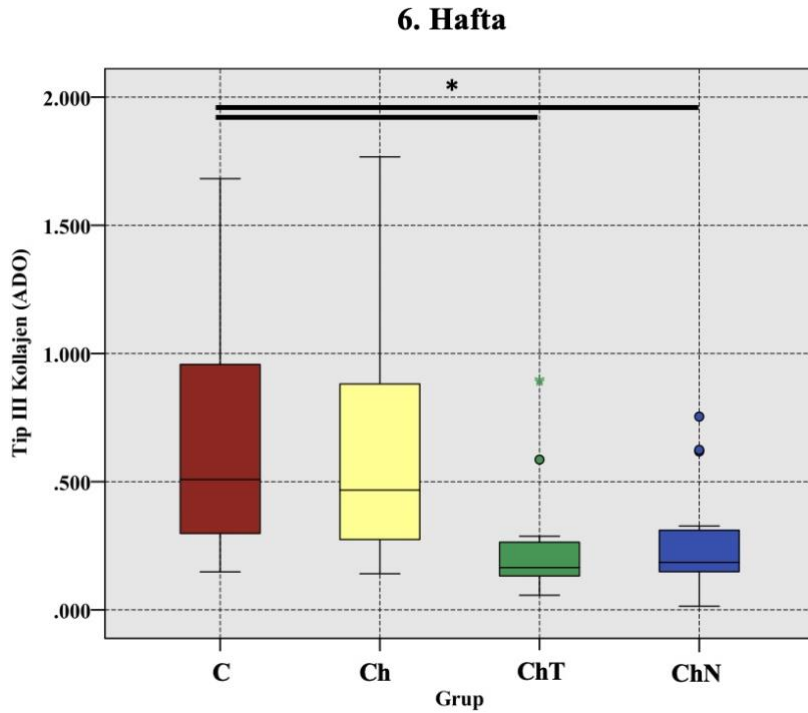
Şekil 4.27. 3. hafta tip III kollajen immünohistokimya sonuçları. * ChN grubu C grubundan ($p=0.003$) ve ** Ch grubundan ($p=0.008$) yüksek bulunmuştur.

6. haftada immünohistokimyasal yöntemle bakılan Tip I kollajen yönünden gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır (Şekil 4.28., $p=0.021$). İkili karşılaştırmalarda, ChN grubunun Ch grubundan belirgin şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.007$). C ve ChT ($p=0.059$), C ve ChN ($p=0.033$), Ch ve ChT ($p=0.049$) karşılaştırmaları istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Bonferroni düzeltmesinden dolayı anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edilmiştir).

6. haftada immünohistokimyasal yöntemle bakılan Tip III kollajen yönünden gruplar arasında belirgin fark saptanmıştır (Şekil 4.29., $p=0.003$). C grubunun ChT ve ChN gruplarından anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.006$). Ch ve ChT ($p=0.018$) arasındaki fark ile Ch ve ChN ($p=0.024$) arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Bonferroni düzeltmesinden dolayı anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edilmiştir).



Şekil 4.28. 6. hafta, tip I kollajen immünohistokimya sonuçları. * ChN grubunun, Ch grubundan yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.007$).



Şekil 4.29. 6. hafta, tip III kollajen immünohistokimya sonuçları. *C grubu ChT grubundan ve ChN gruplarından yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.006$).

4.6. RT-PCR İle Gen Ekspresyonu Analizi Bulguları

COL1A1, COL3A1, SCX ve TNMD genlerinin ekspresyonları, bütün deney gruplarında incelenmiş ve intakt tendonlardaki ekspresyon düzeyinin katları olarak (rölatif gen ekspresyonu) sonuçları verilmiştir. Tablo 4.8.'de bütün genlerin 3. ve 6. haftadaki rölatif ekspresyon değerleri, Tablo 4.9'da da bu değerlerin intakt kontroller ile ikili karşılaştırılması sonucunda elde edilen p değerleri gösterilmektedir.

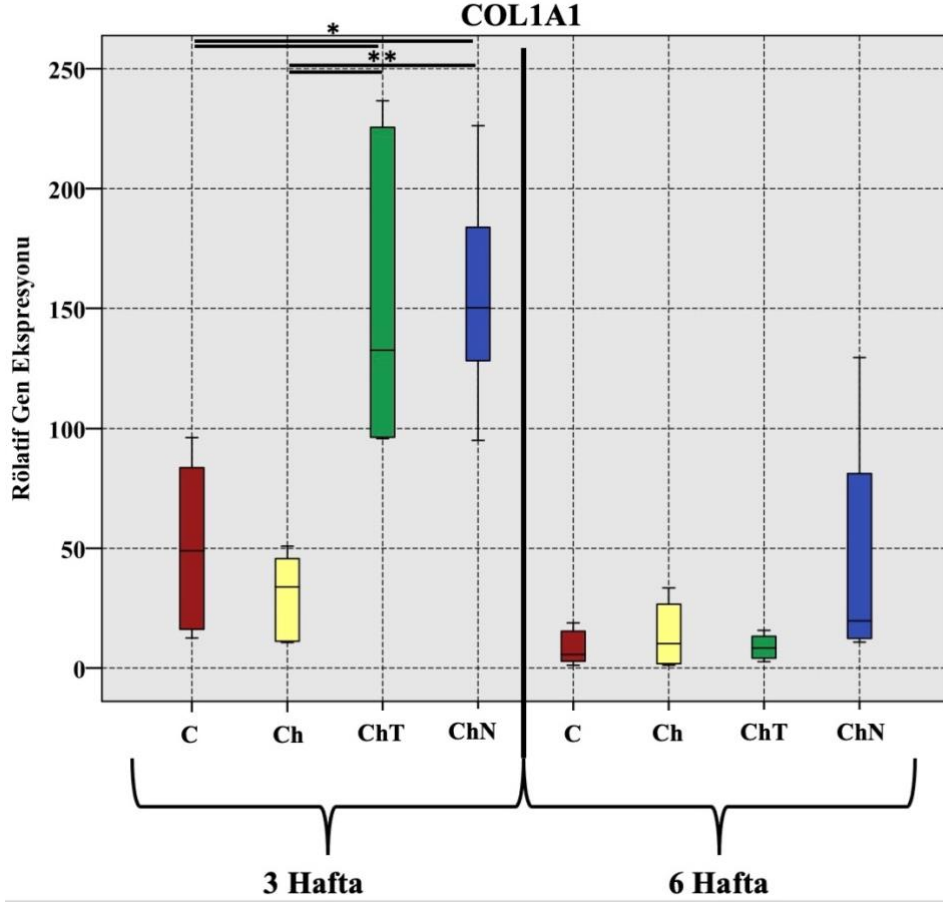
Tablo 4.8. Rölatif gen ekspresyonları.

	3 Hafta				6 Hafta			
	C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
COL1A1	51 (±34.1)	31 (±17.4)	153.2 (±62.8)	155.6 (±46.9)	8.3 (±7.2)	13.9 (±13.3)	8.7 (±5.4)	45.5 (±41.2)
COL3A1	47.2 (±32.9)	22.1 (±17.1)	84.4 (±42)	124.5 (±65.6)	5.1 (±2.8)	10.9 (±11.9)	6.8 (±5.9)	35.3 (±29.2)
SCX	2 (±1.2)	2.5 (±0.9)	1.1 (±0.4)	1.3 (±1.3)	0.47 (±.32)	0.52 (±0.1)	0.65 (±0.26)	0.89 (±0.51)
TNMD	9.6 (±7.2)	6 (±4.7)	9 (±5.6)	6.1 (±5.5)	3.8 (±1.7)	4.6 (±3.4)	10.2 (±12.4)	4.1 (±2.9)

Tablo 4.9. Grupların rölatif gen ekspresyonlarının intakt kontroller ile karşılaştırmasından elde edilen p değerleri. (Anlamli olan değerler koyu ile yazılmıştır).

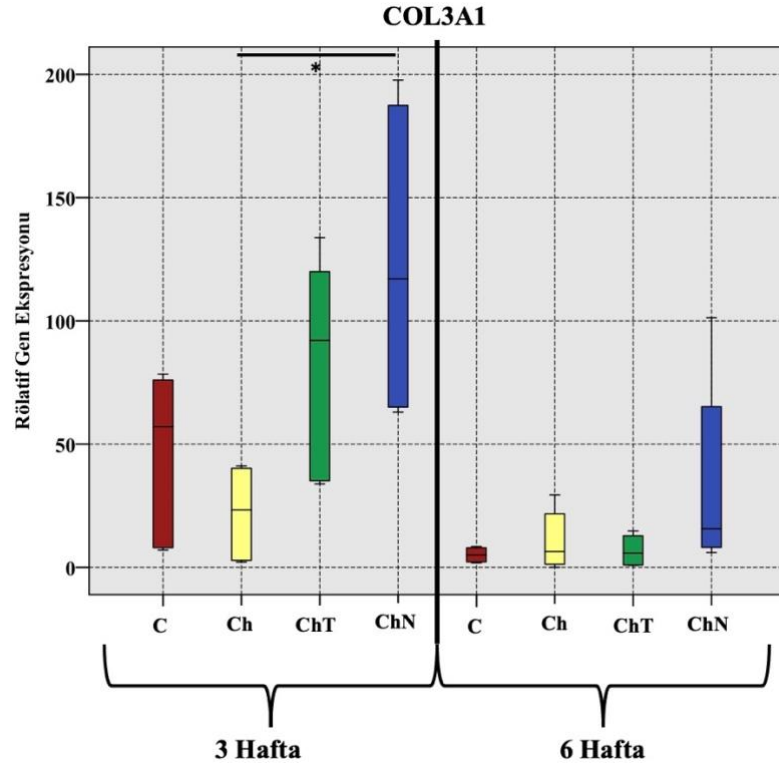
	3 Hafta				6 Hafta			
	C	Ch	ChT	ChN	C	Ch	ChT	ChN
COL1A1	0.0016	0.0081	0.0063	0.0036	0.0452	0.0493	0.0375	0.0483
COL3A1	0.0201	0.0329	0.0036	<0.001	0.0236	0.0491	0.0282	0.0189
SCX	0.0742	<0.001	0.0734	0.0155	0.0149	<0.001	0.001	0.7221
TNMD	0.0456	0.0231	0.0249	0.0431	0.0204	0.0287	0.0438	0.0144

COL1A1 gen ekspresyonu incelendiğinde (Şekil 4.30.), 3. haftada gruplar arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). C grubunun ChT ve ChN grupları ile arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi (sırasıyla $p = 0.05$ ve $p = 0.01$). Ch grubunun da yine ChT ve ChN grupları ile arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi (sırasıyla $p = 0.024$ ve $p = 0.004$). 6. hafta sonuçları değerlendirildiğinde, ChN grubunun ortalaması diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p = 0.125$).



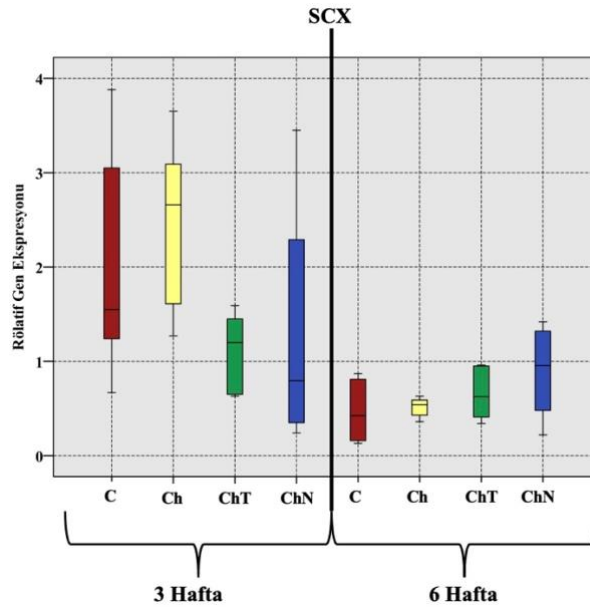
Şekil 4.30. COL1A1 rölatif gen ekspresyonu. 3. haftada * C grubunun ChT ve ChN gruplarından (sırasıyla $p=0.05$ ve $p=0.01$) düşük olduğu, ** Ch grubunun da ChT ve ChN gruplarından (sırasıyla $p=0.024$ ve $p=0.004$) düşük olduğu saptandı.

COL3A1 gen ekspresyonu incelendiğinde (Şekil 4.31.), 3. haftada gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0.013$). İkili karşılaştırmalar sonucunda, ChN grubunun Ch grubundan belirgin şekilde yüksek olduğu saptandı ($p=0.004$). Ch grubu ile ChT ($p=0.025$) karşılaştırması istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (Bonferroni düzeltmesinden dolayı anlamlı sınır $p=0.008$ olarak kabul edilmiştir). 6. haftada, ChN grubunun ortalamasının diğerlerinden yüksek olduğu görüldü; fakat istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.128$).



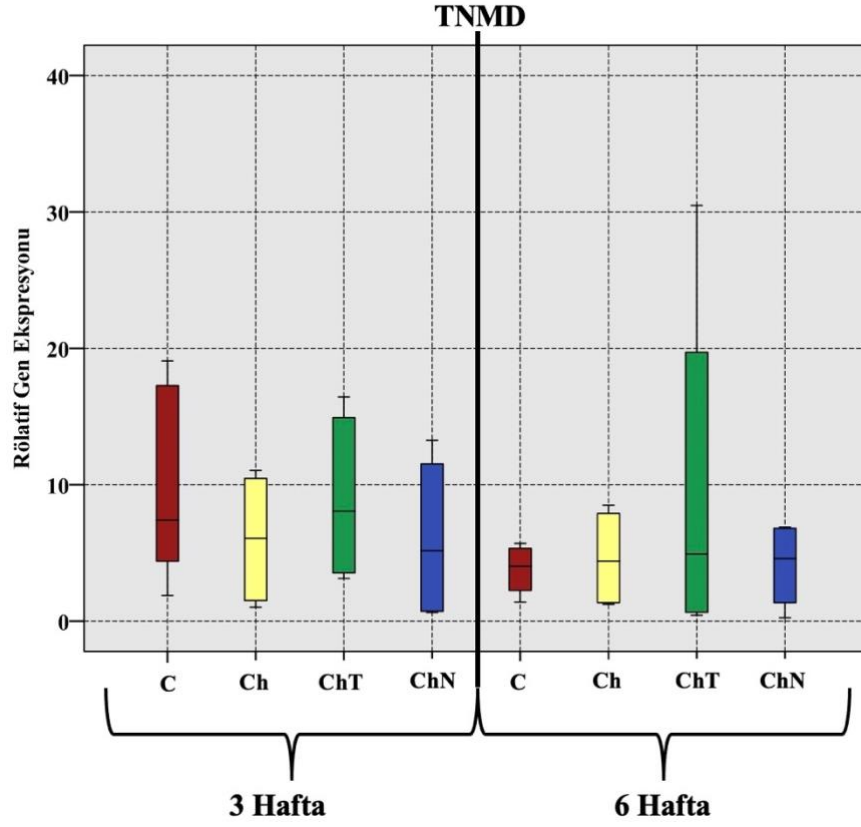
Şekil 4.31. COL3A1 rölatif gen ekspresyonu. * 3. haftada ChN grubunun Ch grubundan belirgin şekilde yüksek olduğu saptandı ($p=0.004$).

SCX gen ekspresyonu incelendiğinde (Şekil 4.32.), 3. haftada ve 6. haftada gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.108$ ve $p=0.159$).



Şekil 4.32. SCX rölatif gen ekspresyonu.

TNMD gen ekspresyonu incelendiğinde (Şekil 4.33), 3. haftada ve 6. haftada gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.515$ ve $p=0.967$).



Şekil 4.33. TNMD rölatif gen ekspresyonları.

5. TARTIŞMA

Sıçan aşıl tendon gövde yaralanması modelinde TGF- β 3'ün tendon iyileşmesine olan etkisinin incelendiği bu çalışmada; iyileşme sürecinin farklı basamaklarında transkripsiyon, translasyon ve fonksiyonel düzeyde olumlu sonuçlar elde ederek çalışma hipotezi doğrulandı. Çalışma, güncel olarak ilgi uyandırmakta olan bir konuda daha önce çalışılmamış bir modelin sonuçlarının bildirilmesi açısından özgündür.

Aşıl tendon yaralanmalarında doğru tedaviyi seçmek ve en iyi klinik sonuca ulaşabilmek zorlu bir süreçtir. Kullanılan çeşitli tedavi yöntemlerinin uzun dönem sonuçları tatmin edici olmakla beraber, hasta beklentilerinin de artmakta olduğu günümüzde kısa sürede elde edilecek daha iyi sonuçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ortopedik cerrahinin farklı branşlarında, cerrahi teknik ve tedavi seçenekleri hızla gelişim gösterirken, aşıl tendon yaralanmalarının tedavisi konusunda aynı hızda gelişme sağlanamamaktadır. Çeşitli farklı cerrahi teknik ve konservatif yöntemin uzun süredir uygulanmakta olduğu bu yaralanmalarda, biyolojik destekleyici ajanların (ortobiyolojikler) ise laboratuvar çalışmalarında umut vadeden sonuçları olmasına rağmen çok az bir kısmı PRP gibi rutin klinik kullanıma girebilmiştir [105, 106, 108, 110].

Tendonlar, kas-iskelet sisteminin statik elemanları olan kemikler ile dinamik elemanları olan kaslar arasındaki bağlantıyı oluşturarak çok özgün bir görevi yerine getirmektedir. Tendon yaralanması sonrasında iyileşme süreci, birbirini takip eden üç faz halinde gerçekleşir: inflamasyon, proliferasyon ve yeniden düzenlenme [130]. Bu temel fazların yanında, rüptüre olan tendon uçlarından sağlanan kollajenin defekti kapatmak için kullanıldığını öne süren kollajen geri dönüşümü adı verilen süreç de yeni tanımlanmıştır ve araştırılmaktadır [131]. Bu süreçlerin ürünü olarak oluşan iyileşme dokusu tip III kollajenden oluşmaktadır ve uzun süren yeniden düzenlenme fazı sırasında yerini yavaş bir şekilde tip I kollajene bırakır. Yoğun olarak tip III kollajen içeren doku, sağlıklı tendona göre daha büyük bir kesit alanına sahiptir ve uzama eğilimindedir. Bu özellikleri sebebiyle de biyomekanik olarak kas-tendon ünitesinin işlevini doğru bir şekilde yerine getiremez [130, 132]. Bu yeniden düzenlenme öncesi süreçte tendonlar rerüptüre olma eğilimindedir. Bu fazlardan

geçerek iyileşen tendon dokusu da sağlıklı yapıdan uzak olabilmektedir ve gerilme direnci sağlıklı tendonun %30'unda kalabilmektedir [130, 132].

Embriyolojik gelişim sürecinde olduğu gibi yaralanan tendonların iyileşme sürecinde de büyüme faktörlerinin çok önemli payı vardır. Würzler-Hauri ve ark. tarafından sıçanlarda supraspinatus tendonu yaralanma modelinde, birçok farklı büyüme faktörünün yaralanmayı takiben hızlı bir artış gösterdiği, 1 haftada belirgin artış olduğu ve 16. haftada normal seviyeye döndükleri gösterilmiştir [133]. Bu veriler, tendon iyileşmesinin bütün fazlarında büyüme faktörlerinin rolü olduğuna işaret etmektedir [134].

TGF- β ailesi, tendon iyileşmesi sırasında; hücre migrasyonu, farklılaşması ve en önemlisi de ESM sentezini uyarmak dahil geniş yelpazede seyreden birçok önemli görevi yerine getirmektedir. Bu ailenin farklı izoformlarının ayrıntılı işlevleri, ilk olarak yara iyileşme sürecinde incelenmiştir. TGF- β 1 ve 2 izoformları erişkin yara iyileşmesinde rol alıp fibrotik ve skarlı iyileşmeye sebep olurken, TGF- β 3 izoformu ise fetal yaralarda yüksek miktarda eksprese edilip skarsız iyileşme sağlamaktadır [135, 136]. Bu bilgiler ışığında TGF- β 3'ün ESM oluşumunu azalttığı düşünülmese rağmen, takip eden süreçte birçok çalışmada farklı bulgular rapor edilmiştir: Klein ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışmada, fleksör tendonlarda bütün izoformların tip I ve III kollajen sentezini artırdığı gösterilmiştir [137, 138]. Chan ve ark. tarafından yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmasında, Tip I kollajen gen ekspresyonunu en fazla artıran izoformun TGF- β 3 olduğu dikkat çekmektedir [120]. TGF- β 3 sinyal yollarının detaylı araştırılmasıyla da Smad3 ekspresyonunu azalttığı ve Smad7 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir ve bu da intrinsik tendon iyileşmesini güçlendirip adhezyonsuz iyileşme sağlayabileceği yönünde umut vermiştir [139].

TGF- β 3'ün sadece ESM sentezini engelleyen bir molekül olmadığı ve kompleks bir düzenleyici rolü olduğunun anlaşılmasıyla; kas-iskelet sistemi yaralanmaları modellerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Manning ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan supraspinatus tendon-kemik bileşkesi yaralanması modeline heparin/fibrin bazlı bir yavaşlatılmış salım sistemiyle TGF- β 3 uygulanmıştır: iyileşmenin hızlandığı, 28. günde yapısal tendon özelliklerinde ve 56. günde de biyomekanik özelliklerinde daha başarılı sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir [10]. Kovacevic ve ark., benzer şekilde rotator manşet yaralanması

modeli üzerinde TGF- β 3'ün etkilerini incelemişlerdir ve 4 haftada artmış onarım gücü ve belirgin şekilde yüksek COLI/COLIII oranı elde etmişlerdir [9]. Han ve ark. da sıçan rotator manşet yaralanması modeli çalışmışlardır ve enjektabl jel çatı içerisinde uygulanan TGF- β 3'ün biyomekanik testlerde maksimum dayanma kuvvetini belirgin şekilde artırdığını göstermişlerdir [11]. Bu çalışmaların aksine, Kim ve ark., tavşan aşil tendon-kemik bileşkesi yaralanması modelinde TGF- β 3 ve BMP-2'nin etkilerini araştırmışlardır, ve TGF- β 3'ün olumlu katkısı olmadığı sonucuna ulaşmışlardır [140]. Görülebileceği üzere yapılan çalışmaların çoğu tendon-kemik bileşkesi yaralanmaları üzerine odaklanmıştır; bunun en önemli sebebi bazı çalışmalar sonucunda TGF- β 3'ün tendonda fibröz kıkırdak oluşumunu uyarabileceğinin gösterilmiş olması [141] ve fibröz kıkırdak dokunun tendon-kemik bileşkesi iyileşmesi sürecinde önemli rolü olmasıdır [142]. Fakat Barsby ve ark.'ın rapor ettiği gibi, TGF- β 3 molekülü at embriyonik kök hücrelerinde tenosit yönünde farklılaşmayı uyarabilmektedir ve *in vitro* ortamda TGF- β 3 uygulanan kök hücrelerin tendon ilişkili belirteçler olan SCX, TNMD, tenascin-C ve COL1A1 ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir [7]. Benzer sonuçlar, Gonçalves ve ark. tarafından insan adipoz doku kaynaklı kök hücreler üzerinde de gösterilmiştir: çeşitli kök hücre alt-popülasyonlarında TGF- β 3 uygulanmasıyla SCX ekspresyonunda artış gösterilmiştir [8]. Bu bulgular etkilerin sadece tendon-kemik bileşkesiyle sınırlı olmadığını göstermektedir.

Tendonların uzunlukları ve kesit alanları, biyomekanik özelliklerini belirleyen en önemli faktörlerdir ve yaralanma sonrası tendon elongasyonu da kalıcı morbiditeye sebep olabilmektedir [143]. Çalışmamızda TGF- β 3'ün normal ve uzatılmış salımlı nanopartikül formlarının ikisi de 3. haftada, kontrol grubuna göre belirgin şekilde kısa tendon dokusu oluşumu sağlamışlardır (Tablo 4.3., Şekil 4.5.). Fakat Şekil 4.6.'de da görüleceği üzere bu etki 6. haftada devam etmemektedir. Kesit alanlarına baktığımızda ise (Tablo 4.3.), 3. haftada bütün deney grupları benzer ve intakt kontrole göre daha geniş kesit alanına sahipken (Şekil 4.7.), 6. haftada ChN grubunun kontrole göre belirgin şekilde küçük kesit alanına (18.5'e karşı 10.4, $p=0.002$) sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.8.). Bu durum, TGF- β 3'ün tendonun boyutları üzerine olan etkisinin hem erken hem de geç dönemlerde görülebileceğini, uzun salımlı şekilde uygulandığında geç dönemi de etkileyerek kesit alanını

daraltabileceğini göstermektedir. Kontrol (C) grubu ile sadece kitosan film uygulanan grubun (Ch) bütün karşılaştırmalarda benzer sonuçlara ulaşmış olması da amacımıza uygun olarak, bir çatı işlevi görmeden sadece bir taşıyıcı görevi yapmakta olduğunu teyit etmektedir.

Esas görevleri kaslar ile iskelet arasında yük aktarımı olan tendonların, yaralanma sonrasında yüklenme karşısında gösterdikleri biyomekanik özelliklerinin normal değerlere dönebilmesi, fonksiyon gösterebilmeleri açısından çok önemlidir. 3. haftada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, maksimum yük (Şekil 4.9.) dışında diğer parametrelerde deney grupları arasında bir fark görülmemektedir. 6. haftada ise, TGF- β 3'ün de etkilerini net bir biçimde ortaya koyan bulgular ortaya çıkmaktadır. Yaralanan tendonların iyileşme sürecinde dayanılan maksimum yük açısından intakt tendonlardan yüksek değerler elde edebildiği literatürde daha önce gösterilmiş olan bir bulgudur [112, 132]; çünkü maksimum tensil kuvvet (maksimum yük) tendon kesit alanından etkilenebilmektedir. Maksimum gerilime baktığımızda ise ChN grubunun, Şekil 4.8.'de gösterdiğimiz daralan kesit alanının da etkisiyle belirgin şekilde yüksek gerilime dayanabildiği görülmektedir (Şekil 4.15.). ChT grubunda görülmeyen bu etkinin, TGF- β 3'ün yavaş salımı sayesinde ortaya çıkmış olması düşünülebilir.

Histolojik incelemeler Bonar ve Movin skorlama sistemlerine göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar, TGF- β 3'ün iyileşme dokusu üzerine olumlu etkilerinin tüm zaman dilimlerinde görüldüğünü, ve yavaş salımlı uygulamanın da sonuçlar üzerine serbest uygulamaya göre daha büyük katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir. Bonar skorları açısından hem 3. hem de 6. haftalarda ChT ve ChN gruplarında, C ve Ch gruplarına kıyasla istatistiksel anlamlılığa ulaşan düzeyde farklı ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Movin skorlamasına baktığımızda, Bonar skoruna benzer şekilde her iki zaman diliminde de ChT ve ChN gruplarında daha iyi sonuçlar olduğu görülmekle beraber, aynı zamanda 6. haftada nanopatikül ile uygulama yapılan grupta serbest uygulamaya kıyasla anlamlı düzeyde iyi sonuç elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.23.). Bu durum TGF- β 3'ün tendon doku yapısı üzerindeki etkilerinin sadece erken dönemde değil, geç dönemde de devam edebileceğine işaret etmektedir. Literatürde Robbins ve ark. tarafından bildirilmiş olan TGF- β 3'ün tenositlerde fibröz kıkırdak oluşumunu uyarma etkisi göz önüne

alınarak [141] kesitler bu açıdan da incelenmiş ve her grupta yer yer kondrojenik farklılaşma bölgeleri görülmekle beraber gruplar arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır. TGF- β 3 uygulanmış olan iki grupta da (serbest veya nanopartikül içinde) kollajen liflerinin daha iyi organize oldukları saptanmıştır.

Tendon iyileşmesi dinamik bir süreçtir ve sürecin takibinde kollajen ekspresyonunun gen ve protein düzeyinde incelenmesi iyi bir yol göstericidir. Yaralanma sonrasında tip I ve tip III kollajen gen ekspresyonları birlikte artmakta; 1-2. hafta arasında pik yapmaktadır [144, 145]. Sağlam dokuda minimum miktarda bulunmasına rağmen Tip III kollajenin yaralanan tendonun iyileşmesi sırasında önemli rolü vardır: çok hızlı disülfid bağları kurabilmesi sebebiyle kopmuş tendona iyileşme esnasında ilk mekanik dayanıklılığını veren ESM elemanı olduğu düşünülmektedir [146]. Tendon iyileşmesinin üçüncü aşaması olan yeniden düzenlenim fazı 6-8. haftalar arasında başlamakta ve erken dönemde tip III kollajen tarafından oluşturulan onarım dokusunun yerini tip I kollajenden oluşan daha organize sıkı bir bağ dokusunun almasıyla devam etmektedir [147]. Bu çalışmada, transkripsiyon ve translasyon düzeylerinde yapılan analiz sonuçları literatürü desteklemekte ve aynı zamanda TGF- β 3'ün bu sürece yaptığı olumlu katkıları yansıtmaktadır. COL1A1 (Şekil 4.30.) ve COL3A1 (Şekil 4.31.) gen ekspresyonları erken dönemde bütün gruplarda, intakt kontrole göre belirgin şekilde artış gösterirken (Tablo 4.8. ve Tablo 4.9.), COL1A1 için hem ChT grubunda hem de ChN grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde fazla artış görülmüştür. COL3A1 için ise belirgin fark gösteren grup ChN grubu olmuştur. Başta tip I kollajen olmak üzere gen ekspresyonlarında görülen bu artış, biyomekanik sonuçlara erken dönemde artmış ortalama maksimum yük olarak yansımaktadır (Şekil 4.9., Tablo 4.4.). Altıncı haftadaki rölatif gen ekspresyonlarında ise gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır; ChN grubunun diğer gruplardan yüksek olan ortalama COL1A1 ve COL3A1 değerlerine rağmen farkın anlamlı olmaması, grup içerisindeki yüksek standart sapma ile açıklanabilir. İntakt kontrollere kıyasla ekspresyonların daha fazla olması tendon onarım sürecinin devam etmekte olduğuna işaret etmektedir; fakat Juneja ve ark. tarafından yapılan çalışmada da bildirildiği üzere 6. haftada bu genlerin ekspresyonunda pik noktanın geride kalıp bazal düzeylere gerilemesi beklenen bir bulgudur [145].

İmmünohistokimyasal olarak kollajen düzeylerinin semikantitatif analizi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, COL1A1 ekspresyonu artışının 3. haftada protein düzeyinde ESM'ye yansımadağı saptanmıştır (Şekil 4.21.). Kollajen gibi kompleks yapıdaki proteinlerin sentezinde çok fazla sayıda post-translasyonel modifikasyon olması ve yaralanan tendon dokusunda kollajen ile birlikte ESM yıkımından sorumlu olan metalloproteinazların sentezinin de indükleniyor olması [145] transkripsiyonel etkilerin tamamen protein düzeyine yansıtılmasını engelleyen faktör olabilir. Bunun dışında gen düzeyinde saptanan farklılıkların protein düzeyine yansımadağı için gerekli süre daha uzun olabilir; bunun destekler nitelikte Şekil 4.23.'te de görüldüğü üzere 6. haftadaki Tip I kollajen optik yoğunluğu açısından ChN grubu Ch grubundan belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. ChT grubunun belirgin artış göstermemiş olması, TGF- β 3 etkisinin kısa süreli olmasına bağlanabilir. 6. haftada Tip III kollajen optik yoğunluklarına baktığımızda ise ChT ve ChN gruplarında kontrole göre belirgin şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 4.24.). Bu bulgular, tip I/III kollajen oranının gittikçe artmasıyla karakterize olan yeniden düzenlenim sürecinin, TGF- β 3 uygulamasıyla artmış bir hızda gerçekleşmekte olabileceğine işaret etmektedir. Yavaş salımlı uygulama ise, özellikle tip I kollajen üzerine daha fazla etki göstererek, bu yeniden düzenlenim sürecine belirgin katkı yapmaktadır.

Tek başına uygulandığında sağlayabileceği olumlu etkiler çalışmamızda gösterilmiş olan TGF- β 3, çoklu büyüme faktörü uygulamaları için de bir aday olarak öne çıkmaktadır. Tendon iyileşmesinin birçok molekülün etkileşimiyle yönetilen kompleks bir süreç olmasından yola çıkılarak, birden çok büyüme faktörünün çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasının sonuçları olumlu etkileyebileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir [121]. PRP gibi olumlu etkileri bilinen uygulamaların da aslında birden çok biyolojik ajanın karışımından oluşan bir kokteyl olduğu düşünülürse, tek başına uygulandığında olumlu etkiler gösteren TGF- β 3'ün kombine uygulamalarda daha iyi sonuçlar verebileceği öngörülebilir.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Yapılmış olan güç analizine ve literatür incelemesine rağmen, özellikle TGF- β 3'ün nanopartikül dozaj formu ve serbest form ile film içinde disperse edilerek uygulanması arasında oluşacak olan etki büyüklüğünün de bilinemediği göz önüne alınarak, hayvan sayısının kısıtlılığından dolayı bazı etkilerin görülememiş olma ihtimali mevcuttur. TGF- β 3'ün nanopartikül

dozaj formu ile yavaş salım özelliği kazandırılan TGF- β 3'ün *in vivo* kinetik davranış profili bilinmemektedir ve *in vitro* olarak planlanan salım özellikleri sıçan dokusunda görülememiş olabilir. TGF- β 3'ün literatürde belirtilen fibröz kıkırdak oluşumunu uyarma etkisi, histolojik olarak incelenmiş olmasına rağmen; SOX9, COL2A1, ACAN, COMP gibi kıkırdak ilişkili genlerin ekspresyonu incelenerek net bir şekilde ortaya konması mümkündür. Aynı zamanda literatürde TGF- β 3'ün en sık vurgulanan etkilerinden biri olan adezyonun engellenmesi, çalışmamızda araştırılmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aşil tendon yaralanmaları, günümüzde ortopedi ve travmatoloji pratiğinde oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir ve tedavi sonuçları gelişimlere açıktır. Biyolojik tedavi yöntemleri, yapılan çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır ve bunlar arasında da büyüme faktörleri en çok umut vadeden ajanlardır.

Çalışmamızın sonuçları, sıçanlarda aşil tendon yaralanması sonrasında uygulanan TGF- β 3'ün; biyomekanik analizle ortaya konan fonksiyonel sonuçlara, histolojik inceleme ile gösterilen doku iyileşmesi sürecine ve transkripsiyonel / translasyonel süreçlere farklı basamaklarda olumlu etkiler sağladığı yönündedir. PLGA-b-PEG nanopartiküllere enkapsüle edilerek TGF- β 3'e yavaş ve uzun süreli salım özelliği kazandırıldığında ise, tip I/tip III kollajen oranını artırarak yeniden düzenlenim sürecini hızlandırmak gibi olumlu etkiler elde edilebilmektedir.

Biyomekanik incelemeler, kesit alanı ve uzunluk parametreleri açısından TGF- β 3 uygulamasının sonuçları olumlu yönde etkilediğini, özellikle de 6. hafta kesit alanı açısından yavaş salımlı uygulamanın diğer gruplara üstünlüğü olduğunu göstermiştir. 3. haftada incelenen diğer parametrelerden sadece maksimum yük açısından standart TGF- β 3 uygulaması daha iyi sonuçlar vermiştir. 6. haftada ise maksimum yük açısından gruplar benzer düzeylere gelmesine rağmen nanopartikül ile TGF- β 3 beraber uygulanan grupta daha yüksek maksimum gerilim değerlerine erişilmiştir. Bu durumda daralan kesit alanının etkisi olabilir; tendonların yavaş salımlı TGF- β 3 uygulaması sonrasında sağlıklı tendonlara biyomekanik olarak daha yakın bir hale geldiği öne sürülebilir.

Histolojik incelemelerin sonuçları, TGF- β 3 uygulamasının hem 3. hem de 6. haftalarda kontrollere göre daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bonar skoru TGF- β 3'ün nanopartikül içerisinde uygulandığı grup için bir fark göstermemiş olmasına rağmen Movin skorları 6. haftada bu grubun standart uygulamadan daha iyi sonuçları olduğuna işaret etmektedir.

İmmünohistokimyasal analizler, tendon iyileşmesi sürecinin literatür ile uyumlu olduğunu yansıtmakla beraber hem TGF- β 3 uygulamasının olumlu etkilerini hem de nanopartikül formunda uygulamanın standart uygulamaya göre ne gibi farklar oluşturduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır. 3. haftada, tip III kollajen yoğunluğu TGF- β 3'ün her iki uygulaması için de artmıştır, bu sonuçlar biyomekanik

olarak artmış maksimum yük bulguları ile uyuşmaktadır. 6. haftada ise, normal tendon iyileşme süreci ile uyumlu olarak remodelasyon sonucu tip III kollajen azalmaktadır, ve TGF- β 3'ün uygulandığı her iki grupta bu azalma daha belirgin olmuştur. Tip I kollajenin de aynı zaman diliminde bu gruplarda kontrollere göre daha yüksek yoğunluğa sahip olması (yavaş salımlı uygulamada bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır), tip I / tip III kollajen oranının gittikçe artmasıyla karakterize olan remodelasyon sürecinin TGF- β 3 uygulanan gruplarda daha hızlı şekilde yaşandığına, yavaş salımlı uygulamanın standart uygulamaya göre daha olumlu sonuçlar verdiğine işaret etmektedir.

3. haftada COL1A1 ekspresyonu hem standart hem de nanopartikül ile birlikte uygulamalar için anlamlı şekilde artmıştır, COL3A1 ekspresyonundaki artış ise sadece nanopartikül ile beraber yapılan uygulamada anlamlı düzeye erişmiştir. 3. hafta sonuçları tip I ve tip III kollajen açısından immünohistokimya, histoloji ve biyomekanik ile birlikte değerlendirildiğinde, olumlu yönde etkilerin görülmesi bakımından uyumlu olarak değerlendirilebilir. 6. haftadaki kollajen gen ekspresyonları gruplar arasında farklılık göstermemektedir, kollajen molekülü uzun ömürlü ve yavaş dönüşümlü bir molekül olması sebebiyle daha gen ekspresyonu azalmış olmasına rağmen protein düzeyinde fark olmaya devam etmesi anlaşılır bir bulgudur. SCX ve TNMD genleri ise, herhangi bir zaman diliminde gruplar arasında fark göstermemiştir. Bu genlerin tendinojenez sürecinde önemli rol aldıkları bilinmektedir; fakat şüphesiz ki rol alan yegane genler değildirler ve TGF- β 3'ün olumlu etkileri farklı genlerin düzenlenmesi ile kendini göstermiş olabilir.

In vitro ortamda hazırlanarak farmakolojik özellikleri belirlenen ve TGF- β 3 salım çalışmaları yapılan PLGA-b-PEG yapılı nanopartiküllerin, beklenen yavaş salımlı etkileri *in vivo* çalışmada da kendini göstermiştir. Deney çalışmamızdaki ChT ve ChN gruplarına uygulanan kitosan filmler aynı miktarda TGF- β 3 içermektedir, ve bu bilgiler ışığında gruplar arasındaki sonuçların farklı olması yavaş salım etkisine bağlanabilir. Bu uygulama yöntemi, kısa yarı ömürlü moleküllerin uygulanması için umut vadetmektedir.

Tendon iyileşmesi sürecindeki rolü henüz net olarak ortaya konmamış olsa da, TGF- β 3 ile aşılan tendon yaralanmalarının tedavisinde umut veren sonuçlar elde edilmiştir. Farklı uygulama metodları, çoklu büyüme faktörleri ile kombine şekilde

uygulama, farklı tendonlar üzerinde uygulamalar gibi çeşitli çalışmalar, bu molekülün tendon iyileşme sürecindeki yerini ve olası klinik faydalarını ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Weinstein, S.L., *The Burden of Musculoskeletal Conditions*. J Bone Joint Surg Am, 2016. **98**(16): p. 1331.
2. Kannus, P., *Tendons--a source of major concern in competitive and recreational athletes*. Scand J Med Sci Sports, 1997. **7**(2): p. 53-4.
3. Lemme, N.J., et al., *Epidemiology of Achilles Tendon Ruptures in the United States: Athletic and Nonathletic Injuries From 2012 to 2016*. Orthop J Sports Med, 2018. **6**(11): p. 2325967118808238.
4. Heinemeier, K.M., et al., *Lack of tissue renewal in human adult Achilles tendon is revealed by nuclear bomb (14)C*. FASEB J, 2013. **27**(5): p. 2074-9.
5. Tempfer, H. and A. Traweger, *Tendon Vasculature in Health and Disease*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 330.
6. Penn, J.W., A.O. Grobbelaar, and K.J. Rolfe, *The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review*. Int J Burns Trauma, 2012. **2**(1): p. 18-28.
7. Barsby, T. and D. Guest, *Transforming growth factor beta3 promotes tendon differentiation of equine embryo-derived stem cells*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(19-20): p. 2156-65.
8. Goncalves, A.I., et al., *Evaluation of tenogenic differentiation potential of selected subpopulations of human adipose-derived stem cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2019. **13**(12): p. 2204-2217.
9. Kovacevic, D., et al., *Calcium-phosphate matrix with or without TGF-beta3 improves tendon-bone healing after rotator cuff repair*. Am J Sports Med, 2011. **39**(4): p. 811-9.
10. Manning, C.N., et al., *Sustained delivery of transforming growth factor beta three enhances tendon-to-bone healing in a rat model*. J Orthop Res, 2011. **29**(7): p. 1099-105.
11. Han, B., et al., *Repair of Rotator Cuff Tendon Defects in Aged Rats Using a Growth Factor Injectable Gel Scaffold*. Arthroscopy, 2019.
12. Waggett, A.D., et al., *Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon*. Matrix Biol, 1998. **16**(8): p. 457-70.

13. Doral, M.N., et al., *Functional anatomy of the Achilles tendon*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(5): p. 638-43.
14. O'Brien, M., *The anatomy of the Achilles tendon*. Foot Ankle Clin, 2005. **10**(2): p. 225-38.
15. Winnicki, K., et al., *Functional anatomy, histology and biomechanics of the human Achilles tendon - A comprehensive review*. Ann Anat, 2020. **229**: p. 151461.
16. Tresoldi, I., et al., *Tendon's ultrastructure*. Muscles Ligaments Tendons J, 2013. **3**(1): p. 2-6.
17. Kannus, P., *Structure of the tendon connective tissue*. Scand J Med Sci Sports, 2000. **10**(6): p. 312-20.
18. Spang, C., et al., *The plantaris tendon in association with mid-portion Achilles tendinosis: tendinosis-like morphological features and presence of a non-neuronal cholinergic system*. Histol Histopathol, 2013. **28**(5): p. 623-32.
19. Szaro, P., et al., *Fascicles of the adult human Achilles tendon - an anatomical study*. Ann Anat, 2009. **191**(6): p. 586-93.
20. Lohrer, H., et al., *The Achilles tendon insertion is crescent-shaped: an in vitro anatomic investigation*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(9): p. 2230-7.
21. Pekala, P.A., et al., *The Achilles tendon and the retrocalcaneal bursa: An anatomical and radiological study*. Bone Joint Res, 2017. **6**(7): p. 446-451.
22. Theobald, P., et al., *The functional anatomy of Kager's fat pad in relation to retrocalcaneal problems and other hindfoot disorders*. J Anat, 2006. **208**(1): p. 91-7.
23. Chen, T.M., et al., *The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications*. Clin Anat, 2009. **22**(3): p. 377-85.
24. Zantop, T., B. Tillmann, and W. Petersen, *Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study*. Arch Orthop Trauma Surg, 2003. **123**(9): p. 501-4.
25. Riedl, O. and M. Frey, *Anatomy of the sural nerve: cadaver study and literature review*. Plast Reconstr Surg, 2013. **131**(4): p. 802-10.
26. Joseph, M.F., et al., *Measuring Achilles tendon mechanical properties: a reliable, noninvasive method*. J Strength Cond Res, 2012. **26**(8): p. 2017-20.

27. Maganaris, C.N., M.V. Narici, and N. Maffulli, *Biomechanics of the Achilles tendon*. *Disabil Rehabil*, 2008. **30**(20-22): p. 1542-7.
28. Ying, M., et al., *Sonographic evaluation of the size of Achilles tendon: the effect of exercise and dominance of the ankle*. *Ultrasound Med Biol*, 2003. **29**(5): p. 637-42.
29. Obst, S.J., R. Newsham-West, and R.S. Barrett, *In vivo measurement of human achilles tendon morphology using freehand 3-D ultrasound*. *Ultrasound Med Biol*, 2014. **40**(1): p. 62-70.
30. Kongsgaard, M., et al., *Mechanical properties of the human Achilles tendon, in vivo*. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2011. **26**(7): p. 772-7.
31. Shin, D., et al., *In vivo estimation and repeatability of force-length relationship and stiffness of the human achilles tendon using phase contrast MRI*. *J Magn Reson Imaging*, 2008. **28**(4): p. 1039-45.
32. Kinugasa, R., et al., *Reduction in tendon elasticity from unloading is unrelated to its hypertrophy*. *J Appl Physiol (1985)*, 2010. **109**(3): p. 870-7.
33. Kubo, K., et al., *In vivo dynamics of human medial gastrocnemius muscle-tendon complex during stretch-shortening cycle exercise*. *Acta Physiol Scand*, 2000. **170**(2): p. 127-35.
34. Arya, S. and K. Kulig, *Tendinopathy alters mechanical and material properties of the Achilles tendon*. *J Appl Physiol (1985)*, 2010. **108**(3): p. 670-5.
35. Narici, M.V., N. Maffulli, and C.N. Maganaris, *Ageing of human muscles and tendons*. *Disabil Rehabil*, 2008. **30**(20-22): p. 1548-54.
36. Poniatowski, L.A., et al., *Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 137823.
37. Fleisch, M.C., C.A. Maxwell, and M.H. Barcellos-Hoff, *The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(2): p. 379-400.
38. Javelaud, D. and A. Mauviel, *Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(7): p. 1161-5.

39. Fujii, D., et al., *Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7*. Somat Cell Mol Genet, 1986. **12**(3): p. 281-8.
40. Barton, D.E., et al., *Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta 2 and beta 3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family*. Oncogene Res, 1988. **3**(4): p. 323-31.
41. Derynck, R., et al., *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. Nature, 1985. **316**(6030): p. 701-5.
42. Gentry, L.E. and B.W. Nash, *The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor*. Biochemistry, 1990. **29**(29): p. 6851-7.
43. Gentry, L.E., et al., *Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4162-8.
44. Sato, Y. and D.B. Rifkin, *Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 309-15.
45. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
46. Ge, G. and D.S. Greenspan, *BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein*. J Cell Biol, 2006. **175**(1): p. 111-20.
47. Schultz-Cherry, S., et al., *Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26775-82.
48. Roberts, A.B., *Molecular and cell biology of TGF-beta*. Miner Electrolyte Metab, 1998. **24**(2-3): p. 111-9.
49. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.

50. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *The regulation of TGFbeta signal transduction*. Development, 2009. **136**(22): p. 3699-714.
51. Okamura, T., et al., *Role of TGF-beta3 in the regulation of immune responses*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(4 Suppl 92): p. S63-9.
52. Komai, T., et al., *Reevaluation of Pluripotent Cytokine TGF-beta3 in Immunity*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
53. Taya, Y., S. O'Kane, and M.W. Ferguson, *Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice*. Development, 1999. **126**(17): p. 3869-79.
54. Kaartinen, V., et al., *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 415-21.
55. Chakrabarti, M., et al., *Transforming Growth Factor Beta3 is Required for Cardiovascular Development*. J Cardiovasc Dev Dis, 2020. **7**(2).
56. Cazac, B.B. and J. Roes, *TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 443-51.
57. Lee, Y., et al., *Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 991-9.
58. Komai, T., et al., *Transforming Growth Factor-beta and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1364.
59. Larson, B.J., M.T. Longaker, and H.P. Lorenz, *Scarless fetal wound healing: a basic science review*. Plast Reconstr Surg, 2010. **126**(4): p. 1172-80.
60. Nath, R.K., et al., *The expression of transforming growth factor type beta in fetal and adult rabbit skin wounds*. J Pediatr Surg, 1994. **29**(3): p. 416-21.
61. Elicora, A., et al., *Effect of locally applied transforming growth factor Beta3 on wound healing and stenosis development in tracheal surgery*. Respir Care, 2014. **59**(8): p. 1281-6.
62. Zheng, D., et al., *Controlled chondrogenesis from adipose-derived stem cells by recombinant transforming growth factor-beta3 fusion protein in peptide scaffolds*. Acta Biomater, 2015. **11**: p. 191-203.

63. Ravindran, S., et al., *Changes of chondrocyte expression profiles in human MSC aggregates in the presence of PEG microspheres and TGF-beta3*. *Biomaterials*, 2011. **32**(33): p. 8436-45.
64. Gupta, M.S., E.S. Cooper, and S.B. Nicoll, *Transforming growth factor-beta 3 stimulates cartilage matrix elaboration by human marrow-derived stromal cells encapsulated in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels: potential for nucleus pulposus replacement*. *Tissue Eng Part A*, 2011. **17**(23-24): p. 2903-10.
65. Park, J.S., et al., *Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF-beta3*. *Biomaterials*, 2011. **32**(32): p. 8139-49.
66. Muxika, A., et al., *Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications*. *Int J Biol Macromol*, 2017. **105**(Pt 2): p. 1358-1368.
67. Rodriguez-Vazquez, M., et al., *Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 821279.
68. Ribeiro, J.C.V., et al., *Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration*. *ScientificWorldJournal*, 2017. **2017**: p. 8639898.
69. Kim, I.Y., et al., *Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications*. *Biotechnol Adv*, 2008. **26**(1): p. 1-21.
70. Lee, J.Y., et al., *Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials*. *J Control Release*, 2002. **78**(1-3): p. 187-97.
71. Lee, J.S., et al., *In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration*. *Int J Biol Macromol*, 2014. **67**: p. 360-6.
72. Fang, C.H., et al., *The chitosan/tri-calcium phosphate bio-composite bone cement promotes better osteo-integration: an in vitro and in vivo study*. *J Orthop Surg Res*, 2019. **14**(1): p. 162.

73. Choi, B., et al., *Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering*. ACS Appl Mater Interfaces, 2014. **6**(22): p. 20110-21.
74. Ocal, H., et al., *5-Fluorouracil-loaded PLA/PLGA PEG-PPG-PEG polymeric nanoparticles: formulation, in vitro characterization and cell culture studies*. Drug Dev Ind Pharm, 2014. **40**(4): p. 560-7.
75. Yabanoglu-Ciftci, S., et al., *Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: Efficacy in preventing cardiac fibrosis induced by TGF- β 1*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018. **48**: p. 223-234.
76. Eroglu, I., et al., *Gel network comprising UV crosslinked PLGA-b-PEG-MA nanoparticles for ibuprofen topical delivery*. Pharm Dev Technol, 2019. **24**(9): p. 1144-1154.
77. Cho, H., J. Gao, and G.S. Kwon, *PEG-b-PLA micelles and PLGA-b-PEG-b-PLGA sol-gels for drug delivery*. J Control Release, 2016. **240**: p. 191-201.
78. Gref, R., et al., *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1600-3.
79. Jeong, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(1): p. 37-51.
80. Discher, D.E. and F. Ahmed, *Polymersomes*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 323-41.
81. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 505-15.
82. Rafiei, P. and A. Haddadi, *Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile*. Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 935-947.
83. Emami, J., et al., *PLGA-PEG-RA-based polymeric micelles for tumor targeted delivery of irinotecan*. Pharm Dev Technol, 2018. **23**(1): p. 41-54.
84. Baysal, I., et al., *Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro*. J Neural Transm (Vienna), 2017. **124**(1): p. 33-45.

85. Jarvinen, T.A., et al., *Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology*. Foot Ankle Clin, 2005. **10**(2): p. 255-66.
86. Gillies, H. and J. Chalmers, *The management of fresh ruptures of the tendo achillis*. J Bone Joint Surg Am, 1970. **52**(2): p. 337-43.
87. Lantto, I., et al., *Epidemiology of Achilles tendon ruptures: increasing incidence over a 33-year period*. Scand J Med Sci Sports, 2015. **25**(1): p. e133-8.
88. Park, S.H., et al., *Treatment of Acute Achilles Tendon Rupture*. Clin Orthop Surg, 2020. **12**(1): p. 1-8.
89. Raikin, S.M., D.N. Garras, and P.V. Krapchev, *Achilles tendon injuries in a United States population*. Foot Ankle Int, 2013. **34**(4): p. 475-80.
90. Kvist, M., L. Jozsa, and M. Jarvinen, *Vascular changes in the ruptured Achilles tendon and paratenon*. Int Orthop, 1992. **16**(4): p. 377-82.
91. Jarvinen, T.A., et al., *Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle*. J Orthop Res, 2004. **22**(6): p. 1303-9.
92. Gross, C.E. and J.A. Nunley, 2nd, *Acute Achilles Tendon Ruptures*. Foot Ankle Int, 2016. **37**(2): p. 233-9.
93. Ando, W., et al., *Bilateral achilles tendon ruptures in a patient with ochronosis: a case report*. Clin Orthop Relat Res, 2004(424): p. 180-2.
94. Prasad, S., et al., *Spontaneous, bilateral patellar tendon rupture in a woman with previous Achilles tendon rupture and systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(7): p. 905-6.
95. Thompson, T.C., *A test for rupture of the tendo achillis*. Acta Orthop Scand, 1962. **32**: p. 461-5.
96. Daffner, R.H., et al., *Magnetic resonance imaging in acute tendon ruptures*. Skeletal Radiol, 1986. **15**(8): p. 619-21.
97. Amlang, M.H., et al., *Ultrasonographic classification of achilles tendon ruptures as a rationale for individual treatment selection*. ISRN Orthop, 2011. **2011**: p. 869703.
98. Chiodo, C.P., et al., *Diagnosis and treatment of acute Achilles tendon rupture*. J Am Acad Orthop Surg, 2010. **18**(8): p. 503-10.

99. Deng, S., et al., *Surgical Treatment Versus Conservative Management for Acute Achilles Tendon Rupture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. J Foot Ankle Surg, 2017. **56**(6): p. 1236-1243.
100. Canale, S.T., J.H. Beaty, and W.C. Campbell, *Campbell's operative orthopaedics*. 12th ed. 2012, St. Louis, Mo. ; London: Mosby. v. <1-4 (2050 p.).
101. Kotnis, R., et al., *Dynamic ultrasound as a selection tool for reducing achilles tendon reruptures*. Am J Sports Med, 2006. **34**(9): p. 1395-400.
102. Hsu, A.R., et al., *Clinical Outcomes and Complications of Percutaneous Achilles Repair System Versus Open Technique for Acute Achilles Tendon Ruptures*. Foot Ankle Int, 2015. **36**(11): p. 1279-86.
103. Soroceanu, A., et al., *Surgical versus nonsurgical treatment of acute Achilles tendon rupture: a meta-analysis of randomized trials*. J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(23): p. 2136-43.
104. Trofa, D.P., et al., *Professional Athletes' Return to Play and Performance After Operative Repair of an Achilles Tendon Rupture*. Am J Sports Med, 2017. **45**(12): p. 2864-2871.
105. Docheva, D., et al., *Biologics for tendon repair*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **84**: p. 222-39.
106. Indino, C., R. D'Ambrosi, and F.G. Uselli, *Biologics in the Treatment of Achilles Tendon Pathologies*. Foot Ankle Clin, 2019. **24**(3): p. 471-493.
107. Shapiro, E., D. Grande, and M. Drakos, *Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review*. Curr Rev Musculoskelet Med, 2015. **8**(1): p. 9-17.
108. Zou, J., et al., *A Prospective Study of Platelet-Rich Plasma as Biological Augmentation for Acute Achilles Tendon Rupture Repair*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9364170.
109. Schepull, T., et al., *Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study*. Am J Sports Med, 2011. **39**(1): p. 38-47.

110. Keene, D.J., et al., *Platelet rich plasma injection for acute Achilles tendon rupture: PATH-2 randomised, placebo controlled, superiority trial*. *BMJ*, 2019. **367**: p. l6132.
111. Stein, B.E., D.A. Stroh, and L.C. Schon, *Outcomes of acute Achilles tendon rupture repair with bone marrow aspirate concentrate augmentation*. *Int Orthop*, 2015. **39**(5): p. 901-5.
112. Okamoto, N., et al., *Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy*. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. **92**(17): p. 2776-84.
113. Pelled, G., et al., *Smad8/BMP2-engineered mesenchymal stem cells induce accelerated recovery of the biomechanical properties of the Achilles tendon*. *J Orthop Res*, 2012. **30**(12): p. 1932-9.
114. Yeh, L.C., A.D. Tsai, and J.C. Lee, *Bone morphogenetic protein-7 regulates differentially the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in rat achilles and patellar tendon cell cultures*. *J Cell Biochem*, 2008. **104**(6): p. 2107-22.
115. Jelinsky, S.A., et al., *Treatment with rhBMP12 or rhBMP13 increase the rate and the quality of rat Achilles tendon repair*. *J Orthop Res*, 2011. **29**(10): p. 1604-12.
116. Bolt, P., et al., *BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury*. *J Bone Joint Surg Am*, 2007. **89**(6): p. 1315-20.
117. Hou, Y., et al., *The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **383**(2): p. 235-9.
118. Kashiwagi, K., et al., *Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2004. **38**(4): p. 193-7.
119. Kuo, C.K., B.C. Petersen, and R.S. Tuan, *Spatiotemporal protein distribution of TGF-betas, their receptors, and extracellular matrix molecules during embryonic tendon development*. *Dev Dyn*, 2008. **237**(5): p. 1477-89.

120. Chan, K.M., et al., *Expression of transforming growth factor beta isoforms and their roles in tendon healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(3): p. 399-407.
121. Majewski, M., et al., *IMPROVED TENDON HEALING USING bFGF, BMP-12 AND TGF beta(1) IN A RAT MODEL*. European Cells & Materials, 2018. **35**: p. 318-334.
122. Muller, S.A., et al., *Response of the Injured Tendon to Growth Factors in the Presence or Absence of the Paratenon*. Am J Sports Med, 2019. **47**(2): p. 462-467.
123. Best, T.M., et al., *Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat*. J Orthop Res, 1993. **11**(6): p. 897-906.
124. Korntner, S., et al., *A high-glucose diet affects Achilles tendon healing in rats*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 780.
125. Dogan, A., et al., *Biomechanical comparison of Achilles tenotomy and achilloplasty techniques in young rats: an experimental study*. J Am Podiatr Med Assoc, 2009. **99**(3): p. 216-22.
126. Javidi, M., et al., *Tendons from kangaroo rats are exceptionally strong and tough*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 8196.
127. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
128. Maffulli, N., et al., *Movin and Bonar scores assess the same characteristics of tendon histology*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(7): p. 1605-11.
129. Movin, T., et al., *Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients*. Acta Orthop Scand, 1997. **68**(2): p. 170-5.
130. Sharma, P. and N. Maffulli, *Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006. **6**(2): p. 181-90.
131. Ingraham, J.M., R.A. Weber, and E.W. Childs, *Intrinsic tendon healing requires the recycling of tendon collagen fibril segments*. J Hand Surg Eur Vol, 2011. **36**(2): p. 154-5.
132. Muller, S.A., et al., *Effect of a Simple Collagen Type I Sponge for Achilles Tendon Repair in a Rat Model*. Am J Sports Med, 2016. **44**(8): p. 1998-2004.

133. Wurgler-Hauri, C.C., et al., *Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model*. J Shoulder Elbow Surg, 2007. **16**(5 Suppl): p. S198-203.
134. Oliva, F., A.G. Via, and N. Maffulli, *Role of growth factors in rotator cuff healing*. Sports Med Arthrosc Rev, 2011. **19**(3): p. 218-26.
135. Beredjikian, P.K., et al., *Regenerative versus reparative healing in tendon: a study of biomechanical and histological properties in fetal sheep*. Ann Biomed Eng, 2003. **31**(10): p. 1143-52.
136. Shah, M., D.M. Foreman, and M.W. Ferguson, *Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 3): p. 985-1002.
137. Muller, S.A., et al., *Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015. **23**(7): p. 2097-105.
138. Klein, M.B., et al., *Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production*. J Hand Surg Am, 2002. **27**(4): p. 615-20.
139. Jiang, K., et al., *Effect of transforming growth factor-beta3 on the expression of Smad3 and Smad7 in tenocytes*. Mol Med Rep, 2016. **13**(4): p. 3567-73.
140. Kim, H.J., 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, 2007. **48**(6): p. 309-15.
141. Robbins, J.R., S.P. Evanko, and K.G. Vogel, *Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon*. Arch Biochem Biophys, 1997. **342**(2): p. 203-11.
142. Cooper, R.R. and S. Misol, *Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study*. J Bone Joint Surg Am, 1970. **52**(1): p. 1-20.
143. Maquirriain, J., *Achilles tendon rupture: avoiding tendon lengthening during surgical repair and rehabilitation*. Yale J Biol Med, 2011. **84**(3): p. 289-300.
144. Dahlgren, L.A., H.O. Mohammed, and A.J. Nixon, *Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions*. J Orthop Res, 2005. **23**(1): p. 84-92.

145. Juneja, S.C., et al., *Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: a histological and gene expression analysis*. Connect Tissue Res, 2013. **54**(3): p. 218-26.
146. Liu, S.H., et al., *Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review*. Clin Orthop Relat Res, 1995(318): p. 265-78.
147. James, R., et al., *Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options*. J Hand Surg Am, 2008. **33**(1): p. 102-12.