



T.C.

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ORTOPEDİ VE
TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**EPİDERMAL GROWTH FAKTÖR (EGF) VE
EGF YÜKLENMİŞ POLİKAPROLAKTON SKAFOLDUN
TENDON DEFEKT İYİLEŞMESİNE ETKİLERİ**

Dr. İSMAİL AYKUT KOÇYİĞİT

**UZMANLIK TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR.**

ANKARA

2017



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ORTOPEDİ VE
TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

EPİDERMAL GROWTH FAKTÖR (EGF) VE
EGF YÜKLENMİŞ POLİKAPROLAKTON SKAFOLDUN
TENDON DEFEKT İYİLEŞMESİNE ETKİLERİ

Dr. İSMAİL AYKUT KOÇYİĞİT

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. GAZİ HURİ

ANKARA

2017

TEŞEKKÜRLER

Yazar, bu çalışmanın gerçekleştirilmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür eder.

Prof. Dr. Mahmut Nedim Doral, Anabilim Dalı Başkanı olarak asistanlık eğitimimiz boyunca engin bilgi ve tecrübesini bizimle paylaşmış, yol gösterici olmuş ve hiçbir zaman desteğini eksik etmemiştir. Asistanlık eğitimimde olduğu gibi bu çalışmanın oluşması ve ilerlemesinde de her zaman yardımcı olmuş, yoğun ilgi ve desteğini esirgememiştir.

Doç. Dr. Gazi Huri, tez danışmanı olarak projenin oluşmasında, şekillenmesinde ve çalışmanın ilerlemesinde yönlendirici olmuş, bilgi ve birikimiyle olduğu kadar manevi desteğiyle de her zaman büyük katkıda bulunmuştur.

Doç. Dr. Sinan Yürüker, Dr. Can Iğın ve Vet. Ramin Hashemihesar çalışmanın şekillenmesinde ve histolojik incelemenin yapılmasında yardımını hiçbir zaman esirgememiştir.

Doç. Dr. Pınar Huri çalışmada kullandığımız polikaprolakton skafoldun tasarımı, üretimi konusunda yardımını esirgememiştir.

Yrd. Doç. Dr. Kenan Dağlıoğlu laboratuvarlarını bize tüm imkanlarıyla açmış ve çalışmanın birçok basamağında yardımını esirgememiştir.

Doç. Dr. Yurdanur Şanlı Uçar çalışmanın biyomekanik analizlerin yapılması ve değerlendirilmesinde yardımını esirgememiştir.

Sevgili eşim Keziban her zaman bana destek olmuş, hiçbir zaman sevgi ve ilgisini eksik etmemiştir.

Son olarak Ortopedi ve Travmatoloji eğitimimde bana emeği geçmiş, her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen tüm değerli hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İsmail Aykut Koçyiğit, Epidermal Growth Faktör (EGF) ve EGF Yüklenmiş Polikaprolakton Skafoldun Tendon Defekt İyileşmesine Etkileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji, Uzmanlık Tezi, Ankara 2012.

Genel Bilgi: En uygun histolojik ve anatomik tendon iyileşmesini sağlamak için, Platelet'ten zengin plazma (PRP), mezenkimal kök hücre uygulamaları, kemik morfojenik protein, kemik iliği aspiratı, büyüme faktörleri (bFGF, HGF, rhPDGF-BB, TGF-b, VEGF) geleneksel tedavi protokolüne eklenmektedir. Epidermal Growth Faktör (EGF), hücre gelişmesini, farklılaşmasını EGFR reseptörüne bağlanarak sağlayan bir büyüme faktörüdür. Günümüzde EGF' in cilt rejenerasyonunda epidermisler arasında köprüleşmeyi içeren, özellikle diyabetik ayak gibi kronik yara problemleri olan hastalarda klinik uygulamaları vardır. Bu çalışmada, daha önce araştırılmamış olan defektif tendon tamiri ve iyileşmesinde EGF 'in potansiyel rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Hayvan deneyi çalışmasında 30 tane Yeni Zellanda beyaz tavşanının aşıl tendonunda 1 cm büyüklüğünde defekt oluşturuldu. Herbirinde 10 tendon bulunan 3 denek grubu oluşturuldu; (1) "*Sham grubu*: 1 cm lik tendon defekti gap bırakılarak emilmeyen dikiş ile "splint"leme uygulandı. (2) *EGF(+)* grup: 1 cm lik tendon defektine "gap" bırakılarak emilmeyen dikiş ile "splint"leme uygulandı ve defekt oluşturulan bölgeye 25 µg/kg EGF enjekte edildi. (3) *Skafold+EGF(+)* grup: 1 cm lik tendon defektine 25 µg/kg EGF yüklenmiş dönüştürülebilir, poroz polikaprolakton (PCL) "skafold" yerleştirilerek emilmeyen dikiş ile tespit edildi. 2. ve 3. Gruplara aynı dozlarda EGF enjeksiyonuna postoperatif gün aşırı 10 gün devam edildi. 8. haftada hayvanlar sakrifiye edildikten sonra aşıl tendon tamiri ve rejenerasyonu histolojik ve biyomekanik olarak incelendi. Histolojik incelemede ışık mikroskopi yöntemi kullanıldı. Işık mikroskopi yöntemi için dokular %10 formalinde fikse edildi. Bütün parçalar parafine gömüldü, 10 mm kesitlere ayrıldı, Hematoksilen - Eosin (H&E) ve Masson's trichrome ile boyandı. Biyomekanik çalışma, hayvanlar sakrifiye edildikten hemen sonra tendonlar tazeliğini korurken uygulandı. Çekme testi uygulanan aşıl tendonlarında kopma kuvveti, kopma anındaki uzama miktarı ve young modulus değerleri ölçüldü. Tüm prosedürler Hayvan Araştırma Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır.

Bulgular: Bütün denek gruplarında, defektin iyileştiği ve köprüleşmenin olduğu makroskopik olarak gözlemlendi. Histolojik olarak “*Sham*” grup: Damar formasyonu ve Tip 3 kollojenin yeni yapılmaya başlanmış olduğu gözlemlendi. Nadir adipozit izlendi. *EGF (+) grup:* Tendon içinde damar formasyonu, periferel sinir tomurcuklanması, daha fazla adipoz dokular gözlemlendi. Tamamen tendon rejenerasyonu için sonuçta Tip 1 kollajene dönüşen ve fibroblastlar tarafından üretilen yüksek düzeyde Tip 3 kollajen görüldü. *Skafold + EGF(+)* grup: damar formasyonu, periferel sinir tomurcuklanması yine gözlemlendi fakat adipoz doku miktarı, ve üretilen Tip 3 kollajen miktarı EGF(+) grup ile karşılaştırıldığında daha az olduğu gözlemlendi. Tip I / Tip III kollajen oranının en fazla Skafold + EGF grubunda olduğu, en az ise Sham grubunda olduğu saptandı. Biyomekanik olarak, kopma kuvvetleri açısından 3 deney grubu ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı($p>0,05$). Kopma anındaki uzama miktarı açısından da gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı($p>0,05$). Young modulus açısından 3 deney grubu arasında anlamlı fark saptanmadı($p>0,05$) ama kontrol grubuyla EGF ve Skafold + EGF gruplarının ikili karşılaştırılması sonucunda anlamlı fark olduğu saptanmıştır($P<0,05$).

Sonuçlar: Geleneksel tedavi ile beraber EGF uygulanması daha uygun ve histolojik olarak ileri düzeyde tendon iyileşmesi ile sonuçlandı. Bizim hipotezimiz; EGF uygulanması, damarlanmanın artması, damarda endotel hücreye komşu “ perisit” hücrelerin (kök hücrelerin) defekt boyunca toplanması, iyileşmede gerekli enerjinin sağlanabilmesi için tendon defekt bölgesinde yağ hücrelerinin gelişiminin görülmesi yüksek doku onarımının olabileceği histolojik olarak göstermiştir. Kopma kuvvetleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. EGF eklenmesi tendon iyileşmesini biyomekanik açıdan negatif etkilememiştir. Biyomekanik açıdan olumsuz etkileri bulunmayan EGF’in, Tip I / Tip III kollajen oranını artırarak histolojik olarak daha uygun ve daha ileri seviyede tendon iyileşmesini sağladığı gözlemlendi. Tedaviye EGF eklenmesiyle histolojik olarak etkin tendon iyileşmesi elde edildi. Tedaviye EGF + skafold birlikte eklenmesiyle en etkin tendon iyileşmesi elde edildi. Skafoldun boşluk doldurarak ve büyüme faktörünün etkinliğini artırarak daha az Tip 3 kollajen formasyonu ve böylece daha hızlı tendon tamiri olabileceği savı da ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: aşıl tendon rüptürü, büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü, polikaprolakton, tavşan

ABSTRACT

İsmail Aykut Koçyiğit, Effects of Epidermal Growth Factor (EGF) and EGF-loaded Polycaprolactone Scaffolds on Tendon Defect Healing. Hacettepe University, Departments of Orthopaedics and Traumatology, Thesis, Ankara, 2012

Introduction: In order to obtain the most accurate anatomical and histological tendon regeneration, therapies including the administration of platelet rich plasma (PRP), bone marrow aspiration, bone morphogenic protein, mesenchymal stem cells and growth factors (bFGF, HGF, rhPDGF-BB, TGF- β , VEGF) are being applied along with the conventional treatment. Epidermal growth factor (EGF) is a growth factor that stimulates cell growth, proliferation and differentiation through binding EGFR cell surface receptor. Its current clinical application includes the bridging in between epidermis fragments in skin regeneration. In this study, the aim was to investigate the potential role of EGF in tendon repair and regeneration which has not been investigated previously.

Material and Methods: In this preclinical study, 1 cm size defects were created on one of the Achilles tendon of 30 New Zealand white rabbits. 3 experimental groups of 10 tendons were made including:(1) "*Sham*" group: 1 cm tendon defect was splinted leaving the gap with non absorbable suture; (2) *EGF(+)* group: 1 cm tendon defect was splinted leaving the gap with non absorbable suture and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EGF injection was made in the defect; (3) *Scaffold+ EGF(+)* group: 1 cm tendon defect was grafted with biodegradable, porous polycaprolactone (PCL) scaffolds loaded with 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EGF and stabilized using non absorbable suture. In groups 2 and 3, same dose EGF injections were made every other day for 10 days. Animals were sacrificed at 8 weeks postop, and Achilles tendon repair and regeneration was investigated by histopathological and biomechanics analysis. The tissues were rapidly fixed in 10% formalin and processed for routine light microscopy. All specimens were embedded in paraffin, 10 mm sections were cut and stained by hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome. The biomechanical study was performed immediately after the animal was sacrificed and the tendons were maintained fresh. Pullout force test was performed for Achilles tendons and then was measured breaking force, amount of elongation at break and young modulus. All procedures were approved by Animal Research Ethical Committee.

Results: It was observed macroscopically that defects healed and bridged in all of the experimental groups. Histologically, "*Sham*" group: Damar formation and Type 3 collagen have been observed to be newly constructed. Rare adiposity was observed *EGF(+)* group: vessel formation, peripheral nerve buds and more adipocytes were observed inside the tendon. A high level of type III collagen was detected which was laid by fibroblasts to be replaced by type I collagen eventually for complete tendon regeneration. *Scaffold +EGF(+)*group: vessel formation and peripheral nerve buds were again observed, but the amount of adipocytes and laid type III collagen were less compared to EGF(+) group. Type I / Type III collagen ratio was highest in Skafold + EGF group and at least in sham group. Biomechanically, there was no statistically significant difference between the 3 experimental groups and the control groups in terms of the breaking forces ($p > 0,05$). There was no significant difference between the groups in terms of the amount of elongation at break ($p > 0,05$). Young modulus was not significantly different between the three experimental groups ($p > 0,05$) but it was found that there was a significant difference between control group , EGF and Skafold + EGF groups ($P < 0,05$).

Conclusion: EGF application together with the conventional therapy led to more appropriate, advanced tendon regeneration histologically. Our hypothesis is; The histological demonstration that EGF application, increased vascularity, accumulation of "pericyte" cells (stem cells) adjacent to the endothelial cell in the vasculature, and appearance of the development of fat cells in the tendon defect region in order to provide the necessary energy for healing can provide high tissue repair. There was no significant difference between the groups in terms of breaking forces. EGF application did not negatively affect tendon healing in biomechanical aspects. It was observed that EGF without biomechanical adverse effects improves histologically more appropriate and advanced tendon healing by increasing the proportion of Type I / Type III collagen. Histologically effective tendon healing was achieved by the addition of EGF. Treatment with EGF + scaffold was obtained the most effective tendon healing. Scaffold implantation into the defect as the void filler and by increasing the effectiveness of the growth factor, resulted in less type III collagen formation and thus faster tendon repair response.

Key words: Achilles tendon rupture, growth factors, epidermal growth factor, polycaprolactone, rabbit

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
KISALTMALAR.....	1
ŞEKİLLER.....	2
TABLolar.....	4
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. AŞİL TENDON TARİHÇESİ.....	7
2.2. AŞİL TENDON ANATOMİSİ	8
2.3. TENDONUN YAPISI VE HİSTOLOJİSİ.....	10
2.4. TENDON KANLANMASI	12
2.5. TENDON BİYOMEKANİĞİ.....	13
2.8. ETİYOLOJİ	19
2.9. MUAYENE BULGULARI.....	21
2.10. GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ.....	23
2.11. TEDAVİ	24
2.11.1 KONSERVATİF TEDAVİ	24
2.11.1 CERRAHİ TEDAVİ.....	25
2.11.1.1 AÇIK CERRAHİ TAMİR	25
2.11.1.2 PERKÜTAN CERRAHİ TAMİR.....	26

2.11.1.3	GELENEKSEL TEDAVİYE EKLENEN BİYOLOJİK AJANLAR....	27
3.	MATERYAL- METOD.....	29
3.1.	DENEY ÇALIŞMASI.....	29
3.2.	CERRAHİ TEKNİK.....	30
3.3.	HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	37
3.4.	BİYOMEKANİK DEĞERLENDİRME	37
3.5.	İSTATİKSEL ANALİZ.....	39
4.	BULGULAR.....	39
4.1.	MAKROSKOPİK BULGULAR.....	39
4.2.	HİSTOLOJİK BULGULAR.....	40
4.11.	BİYOMEKANİK BULGULAR.....	46
5.	TARTIŞMA.....	51
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
7.	KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR

cm	: santimetre
mm	: milimetre
Ort	: Ortalama
N	: Newton
Min	: Minimum
Mak	: Maksimum
MR	: Manyetik Rezonans
GF	: Growth (Büyüme) Faktör
EGF	: Epidermal Growth Faktör
PDGF	: Platelet derived growth faktör
TGF-Beta	: Trombosit growth faktör
VEGF	: Vasküler endotelial growth faktör
FGF	: Fibroblast growth faktör
IGF-1	: İnsülin growth faktör
PF-4	: Platelet faktör
HGF	: Hepatosit growth faktör
Std.	: Standart

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1.1 : Gastroknemius kası	8
Şekil 2.1.2 : Soleus kası.....	8
Şekil 2.3.1: Tendon yapısı.....	11
Şekil 2.4.1: Aşil tendonunun kanlanması.....	12
Şekil 2.5.1: Yürüme fazları.....	13
Şekil 2.5.2: Yürümenin Basma Fazı.....	13
Şekil 2.5.3: Yürümeni Salınım Fazı.....	14
Şekil 2.5.4: Tendondaki stres-gerginlik ilişkisini gösteren eğri.....	16
Şekil: 2.9.1: Thompson Baldır Sıkıştırma Testi.....	21
Şekil 2.9.2: O' Brien testini yapılışı.....	22
Şekil:2.9.3 : Matles testinin yapılışı.....	22
Şekil 2.10.1 : Aşil Tendon Ruptürünün MR görüntüsü.....	24
Şekil 3.2.1: Modifiye Kessler Dikiş Yöntemi.....	31
Şekil 3.2.2 : Tavşanlarda 1 cm lik Tendon defekt modelinin oluşturulmasının fotoğrafları.....	32
Şekil 3.2.3: “Sham” grubundaki defektif cerrahi onarım aşamalarının fotoğrafları.....	33
Şekil 3.2.4: EGF(+) grubunda defektif aşil rüptürlerinde cerrahi onarım ve EGF enjeksiyonu fotoğrafları	34
Şekil 3.2.5: Skafold + EGF(+) olan grupta defektif aşil rüptürünün skafold ile defektin doldurulması ve skafolda EGF emdirilmesini gösteren cerrahi onarım fotoğrafları.....	35
Şekil 3.2.6: EGF(+) ve Skafold + EGF(+) gruplarına 10 gün boyunca gün aşırı EGF enjeksiyonunu gösteren fotoğraflar.....	36

Şekil 3.4.1: Testometric marka çekme cihazı.....	38
Şekil 3.4.2 : Klemplerin ucuna yerleştirilen tendon.....	38
Şekil 4.1.1: “Sham” grubunda daha atrofik ve hacimsel daha ince iyileşme.....	39
Şekil 4.1.2 : EGF(+) grup.....	40
Şekil 4.1.3: Skafold + EGF(+) grubu.....	40
Şekil:4.2.1: Sham grubu ışık mikroskopunda (dijital olarak birleştirilmiş görüntü) .	40
Şekil 4.2.2 : Sham grubu ışık mikroskopisi (x10).....	41
Şekil 4.2.3: Sham grubu ışık mikroskopisi (x20).....	41
Şekil 4.2.4: EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (dijital olarak birleştirilmiş görüntü) ..	42
Şekil 4.2.5: EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10).....	43
Şekil 4.2.6 : EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10).....	43
Şekil 4.2.7 : EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10).....	44
Şekil 4.2.8 : Skafold+EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (dijital olarak birleştirilmiş görüntü).....	45
Şekil 4.2.9 : Skafold+EGF(+) grubu ışık mikroskopisi.....	45
Şekil : 4.3.1: Kopma kuvvetinin gruplar arasında karşılaştırılmasını gösteren göre kutu-çizgi ve ortalama(sol) -standart sapma (sağ) grafikleri	49
Şekil 4.3.2 : Gruplar arasındaki Young modulus değerlerini karşılaştıran kutu – çizgi(sol) ve ortalama-standart sapma (sağ) grafikleri.....	51

TABLULAR

	sayfa
Tablo 4.3.1 : Biyomekanik ölçüm sonuçları.....	47
Tablo 4.3.2: Grupların kopma kuvvetleri, kopmadaki uzama miktarları ve young moduluslerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	48
Tablo 4.3.3 : Grupların kendi aralarında young modülüslerinin karşılaştırılmasını gösteren tablo.....	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aşil tendon, ayak bileği eklemi posteriorunun en güçlü ligamenti ve insan yürüyüşünün en önemli biyomekanik yapılarından birisidir. Vücut ağırlığının yaklaşık 12,5 katı kadar kuvvete dayanabilmektedir (1).

Önemli ayak bileği tendonlarından olan aşil tendon, ayak bileği travmalarından sıklıkla etkilenir. Bu yüzden akut yada kronik yaralanmalara açıktır. Tüm tendon yaralanmaları arasında 3. sırada yer almaktadır. Aşil tendon rüptürü hastalarının %75' ini 30-49 yaş aralığında erkek hastalar oluşturur ve çoğunlukla sportif aktiviteler ile oluşmaktadır. Bu yaralanmalar sonucu hastaların aktivite düzeyleri azalmakta, sosyal ve ekonomik yönden ciddi kayıplar ortaya çıkmaktadır. Hastaların tedavi edilmemesi durumunda ciddi instabilite, buna bağlı ayak bileği plantar fleksion kaybı ve yürüyüş aktivitesinde kayıplar oluşmaktadır.

Aşil tendon kopmalarının nedenleri konusunda birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen kopmanın doğası tam olarak anlaşılammış, bunun bir tendon hastalığının sonucu mu yoksa mekanik nedenlere bağlı bir sonuç mu olduğu tartışılmıştır(2).

Cerrahi tamir sırasında alınan biyopsi örneklerinde saptanan dejeneratif değişiklikler, akut aşil tendon rüptürünün aslında kronik tendon dejenerasyonu zemininde oluşan akut yırtıklar olabileceğini düşündürmektedir(1). Tedavi yaklaşımı halen tartışmalı olsa da günümüzde daha çok kabul gören ve tercih edilen tedavi yöntemi cerrahi onarımdır(3).

Aşil tendon yaralanmalarının tedavisinde, primer tamirden çeşitli rekonstrüksiyon tekniklerine kadar çeşitli cerrahi seçenekler vardır. Ancak ülkemizde ve dünyadaki en popüler yaklaşım, akut vakalarda primer açık cerrahi teknikle onarımdır. Onarımlar sonrası erken mobilizasyon ve erken rehabilitasyon önemlidir. Tüm onarımlar sonrası hastaların immobilizasyonu ve geç rehabilitasyonu, ciddi fonksiyonel kayıpları da beraberinde getirmektedir. Daha kısa iyileşme süresi ve operasyon sonrası rehabilitasyona daha erken başlanabilmesi, morbiditeyi önemli ölçüde azaltmıştır. Refleks sempatik distrofi, eklem kontraktürleri ve kaslar atrofiler gibi olası komplikasyonları azalttığı gibi günlük hayata dönüş süresi ve ekonomik kayıpları da azaltmaktadır. Tendon tamirleri sonrasında büyüme faktörlerini içeren biyolojik ajanların kullanımı ile doku iyileşmesinin hızlandığı gösterilmiştir.

Büyüme faktörleri yaralanmadan sonraki ilk 10 günde yani tendon iyileşmesinin inflamasyon fazında etkin olduğu bilinmektedir. İlk 10 günde uygulanan büyüme faktörlerinin iyileşmeyi hızlandırdığı ve yapışıklığı azalttığı gösterilmiştir. Tendon iyileşmesinde kullanılan bazı büyüme faktörlerinin etki alanları da belirlenmiştir. TGF- β , defekt bölgesinin etrafı özellikle defekt proksimalinde etkili olduğu, IGF, bFGF ve EGF in ise defekt bölgesinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir. PDGF ve VEGF ise defekt tamiri sonrası tamir bölgesinin tamamında etkinliği ortaya konulmuştur(4).

Günümüzde daha iyi ve daha hızlı bir tendon iyileşmesi sağlamak için cerrahi tedavi ile kombine kullanılan biyolojik ajanlar vardır. Plateletten zengin plazma (PRP), kemik iliği aspiratı, kemik morfojenik protein, mezenkimal kök hücreler , skafold, ve çeşitli büyüme faktörleri (bFGF, HGF, rhPDGF-BB, TGF-b, IL-6) geleneksel tedavi protokolüne eklenmektedir.(5) Epidermal büyüme faktörünün (EGF) tendon iyileşmesinde ve kas iskelet sisteminde mevcut kullanımı yoktur.

Epidermal büyüme faktörü günümüzde epidermal köprüleşmeyi sağladığından dolayı cilt defekti olanlarda ve özellikle diyabetik yara problemlerinde topikal infiltrasyon veya intralezyonel, perilezyonel enjeksiyonlar ile kullanılmaktadır. Nedbe dokusunun oluşumunda yer alan fibroblastların, keratinositlerin ve vasküler endotel hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını uyarır. Tüm dünyada ve ülkemizde, cilt yara iyileşmesinde epidermal büyüme faktörünün klinik olarak uygulanması mevcuttur(6).

Epidermal büyüme faktörünün cilt ve yara problemlerinde klinik uygulaması mevcutken, kas – iskelet sisteminde kullanımı ve özellikle tendon iyileşmesine etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Kas iskelet sistemi ve özellikle tendon iyileşmesi üzerine etkileri bilinmeyen izole epidermal büyüme faktörünün biyoemilebilir taşıyıcı sistemler ile tendon / ligament iyileşmesindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen çıkarımlar ile EGF'in başka kullanım alanlarının in-vivo olarak tespiti, EGF emdirilmiş taşıyıcı (skafold) sistemlerin geliştirilmesi ve patentlenmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, defektif aşil tendon rüptürü cerrahisi gibi tendonun erken iyileşmesinin çok önemli olduğu ameliyatlarda cerrahi tedaviye ek olarak EGF uygulanmasının tendon üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AŞİL TENDON TARİHÇESİ

Vücudumuzun en güçlü ve en büyük yüzeysel tendonu kalkaneal tendondur.(7). Bu tendon tarihteki en güçlü ve en büyük savaşçı olarak kabul edilen Yunan mitoloji karakterlerinden Aşil' in ismi ile de anılır. Tendon ile Aşil isminin ilişkisini anlatan hikaye ise Homer'in M.Ö. 720'lerde yazmış olduğu "İlyada" adlı mitolojik eserinde geçmektedir. Eserde yarı tanrı (Peleus adında ölümlü bir baba ile su tanrıçası Thetis' in oğlu) olarak geçen Aşil' e (Achilles) yenilmezlik kazandırmak için, ölümler ülkesindeki "Styx" nehrinde annesi yıkamıştır. Thetis' in bir tanrıça olarak elini nehre değdirmesi yasak olduğundan Aşil'i kalkaneal tendonundan tutarak nehirde yıkadığından dolayısıyla oğlunun yara alabileceği ve yenilebileceği hatta ölebileceği tek yerin bu tendon olduğuna anlatılmaktadır. Efsaneye göre öleceğini bildiği halde Helen'i geri almak için yapılan ve en büyük savaş kabul edilen Truva Savaşı'na adının sonsuza kadar anılması için katılmış ve Truvalı prens Paris tarafından sol topuğundan okla vurularak ölmüştür. Bu yüzden bu tendona "aşil tendonu" adı verilir.

Tendondan "Aşil tendonu" olarak bahseden, bilinen en eski yazılı belge 1693 yılında anatomist Philip Verheyen tarafından yazılmıştır. Ama tendon patolojileri hakkında ilk bilgi: "Bu tendon eğer ezilir veya yırtılırsa; akut ateş yapar, zihni bulandırır ve zamanla ölümü getirir" diyen Hipokrat tarafından verilmiştir (8). Aşil tendon tamirine yönelik ilk cerrahi tedavi 1575 yılında Fransız cerrah Ambroise Pare tarafından yapılmıştır. Ambroise Pare, yırtılmış aşil tendonlarının şaraba ve baharata bulanmış bandajlarla sarılmasını tavsiye etmiş, fakat sonuçların hayal kırıklığı yarattığını vurgulamıştır.

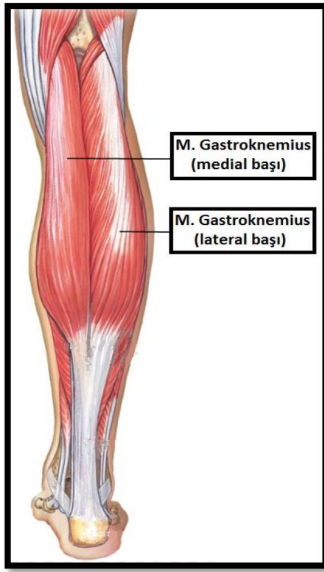
20. yüzyılın başlarına kadar aşil tendon yırtıklarında konservatif tedavi yöntemleri tercih edilmiş olsa da, Abrahamsen (1923), Quenu ve Stoianovitch (1929), Arner ve Lindholm (1959) cerrahi onarımı savunmuşlardır(1). 20. yüzyılın son çeyreğinde ise Ma ve Griffith perkütan yapılan cerrahi onarım tekniğini tariflemişlerdir(9). Eş zamanlı olarak Nistor ise cerrahi onarımın gereksiz olduğunu ve konservatif tedavi yöntemlerinin yeterli olduğunu bildirmiştir(10).

Literatüre göre aşil tendon yırtıklarının etyolojisi net olmamakla beraber tedavisi hakkında da tartışmalar halen devam etmektedir. En iyi ve başarılı sonuçların sadece cerrahi tedavi ile mümkün olacağını belirten yazarlara rağmen konservatif tedavide ısrar eden ve

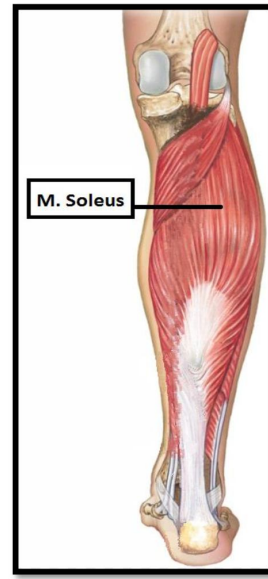
savunan yazarlar da bulunmaktadır. Tedavi seçiminde yol gösterici ana belirteçler ise hastanın yaşı, aktivite durumu ve yaralanmanın ciddiyetidir.

2.2. AŞİL TENDON ANATOMİSİ

Aşil tendonu vücudun en güçlü ve en büyük tendonudur. Bacağın arka yüzeyel kompartmanı içinde bulunur. Aşil tendonu "Gastrocnemius" ve "soleus" kaslarının tendinöz kısımlarının birleşmesiyle oluşur (11). Bu iki kas ve aşil tendonu ayak bileğinin en güçlü plantar fleksörünü oluşturur.



Şekil 2.1.1 : Gastrocnemius kası



Şekil 2.1.2: Soleus kası

Aşil tendonunu oluşturan kaslardan, yüzeyle olan gastrocnemiusun caput laterale ve caput mediale olmak üzere iki başı vardır (Şekil 2.1.1). Caput laterale epicondylus lateralis femoris' den ve caput mediale ise epicondylus medialis femoris' den başlar. Bir kısım lifleri de femur kondillerinin hemen üzerinde, diz eklemleri kapsülünden başlar. Her iki baştan gelen kas lifleri orta hatta birleşerek distale doğru uzanır ve bacağın ortalarında geniş bir aponeurozda sonlanırlar. Bu aponeuroz, distalde daralarak tendo muscui gastrocnemii adını alır ve derininde bulunan musculus soleus'un tendinöz kısmıyla birleşerek Aşil tendonunu oluşturur. Aşil tendonu, kalkaneusta tuber calcanei denilen bölgeye yapışır. Derinde olan soleus kası ise tendinöz bir yapı ile fibula başının posterior yüzünden, fibula gövdesinin proksimal 1/3' ünden, tibia posterior yüzündeki linea muscui solei'den ve fibula ile tibia

arasında gerilen arcus tendineus musculi solei'den başlar, distalde aponeuroza dönüştükten sonra gastrocnemius' un tendinöz kısmıyla birleşerek aşil tendonunu oluşturur

Tendo calcaneus (Aşil tendonu) yaklaşık 10 cm - 15 cm uzunluğundadır. Gastrocnemius tendonu, kas origolarının distal sınırında geniş bir aponevroz şeklinde başlarken, soleus tendonu, proksimalde, soleus kasının posterior yüzeyinden bir band şeklinde başlar. Gastrocnemius komponentinin uzunluğu ortalama 11 cm ile 26 cm arasında değişmekte iken, soleus kasının uzunluğu 3 cm ile 11 cm arasındadır(12). Aşil tendonu distale ilerledikçe aksiyel planda yuvarlaklaşır ve kalkaneusa yapışma bölgesinin yaklaşık 4 cm proksimalinde düz bir hal alır(13). Aşil tendon lifleri distale ilerleyişleri sırasında 90°'lik bir spiral oluşturular. Tendonun proksimalde posteriorda seyreden soleus bileşenine ait lifler mediale tutunurken, proksimalde anteriorda seyreden gastrocnemius bileşenine ait lifler laterale tutunurlar. Tendon liflerinin dönme derecesini, her iki kasın birleştiği seviye belirler. Birleşme ne kadar distalde ise liflerin dönme derecesi o kadar artar. Bu sayede tendonda uzama ve kısalma mümkün hale gelir ve depolanan enerji hareketin uygun döneminde serbest kalır(14). Aşil tendon liflerindeki dönme, sonlanma yerinin 2 cm - 5 cm proksimalinde maksimuma ulaşır. Bu yüzden bu bölgede stres düzeyinin aşırı yükselmesine yol açar. Bu yapıda olan aşil tendonunda yırtıkların en sık görüldüğü bu bölgedeki zayıf beslenmeyi, dejenerasyona ve yaralanmaya yatkınlığı açıklayabilir.

Aşil tendonunun kalkaneusa yapışma yeri, tendonun distal ucu, hyalin kartilaj tabakası ve periost ile kaplı olmayan kemik parçasından oluşur. Tendon ve çevre dokular arasında sürtünmeyi azaltan subkutan bursa bulunur. Retrokalkaneal bursa ise tendon ile kalkaneus arasındaki bölgede yer almaktadır. Retrokalkaneal bursa, dorsifleksiyon ve plantarfleksiyon hareketleri esnasında şeklinin değişmesine izin vererek, aşil tendonu ve kalkaneus arasında hareketin serbest olmasını destekleyen, sinovyal çıkıntılara sahiptir. Retrocalcaneal bursanın posterior duvarı, tendonun basınçlı yüklere karşı direnmesine olanak sağlayan, sesamoid fibröz kıkırdaktan oluşmuştur. Ön duvarı ise periosteal fibröz kıkırdaktan oluşmuştur(15). Aşil tendonu ile tibia'nın posterior sınırı arasındaki boşluk Kager üçgeni olarak bilinir. Bu boşlukta Kager yağ yastığı bulunur. Tendon ile kemik arasındaki sürtünmeyi azaltmak, yük altında iken tendona destek olup bükülmesini engellemek, boşluğu doldurduğu için hareket esnasında oluşacak olası negatif basıncın etkilerinden korumak, tendonu besleyen kan damarlarını korumak ve içerdiği birçok duysal sinir ucu nedeniyle propriyosepsiyonda görev almak gibi çok önemli

fonsiyonlara sahiptir (16). Aşil tendonunun kalkaneusun posterior yüzeyinin orta noktalarında sonlandığı yerdeki kalınlığı ise ortalama 3.4 cm (2.0-4.8 cm) olarak belirtilmiştir(17, 18)

Aşil tendonunun sural sinir ile yakın bir komşuluğu mevcuttur. Yapılan bir kadavra çalışmasında sural sinirin distalde aşil tendonunun kalkaneusa yapışma bölgesinin ortalama 18 mm lateralinde yer aldığı bulunmuştur. Proksimalde ise sural sinir, tendonu kalkaneusa yapışma bölgesinden ortalama 9.8 cm uzaklıkta çaprazlar ve tendonun lateralinde seyrederek (19). Bu nedenle aşil tendonunun cerrahi onarımında ve özellikle de perkütan/kapalı cerrahi sırasında yerleştirilen proksimal ve lateraldeki dikişler sural sinir zedelenmesine neden olabilir.

2.3. TENDONUN YAPISI VE HİSTOLOJİSİ

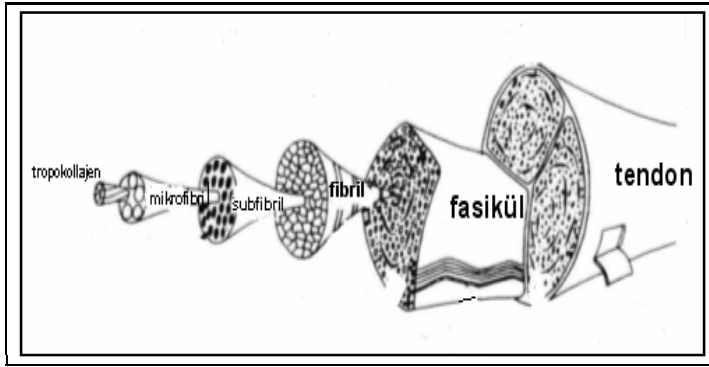
Çok organize bir hücreli düzenlemeye sahip olan aşil tendonunun histolojik incelemelerinde transvers kesitlerde satellit hücreler olarak gözlenen tenositler, longitudinal kesitlerde diziler şeklinde düzenlenirler. Bu düzenli yapı, kollajenin tenosit kolonları çevresinde oluşturduğu sentrifugal sekresyonuna bağlıdır.

Tendon dokusundaki baskın hücre tipi tenoblastlar ve tenositlerdir. Bunlar fibroblast ve fibrositlerin uzun yapıda olanlarıdır. Tenositler, ekstraselüler matriksin hem fibriler, hem de nonfibriler komponentlerini üretir ve aynı zamanda kollajen liflerini absorbe eder. Hücrelerin %95'ini tenoblast ve tenositler oluştururken, geriye kalan %5-10' luk kısmı kemiğe yapışma bölgesinde ortaya çıkan kondrositler, tendon kılıfındaki sinovyal hücreler ve besleyici damarların endotel hücreleri oluşturur. Hücreler enerji üretimini aerobik ve anaerobik yollardan sağlayabilirler. Yaş ilerledikçe tendon hücrelerinin enerji üretimi daha çok anaerobik yoldan sağlanır. Tendon ve ligamentlerde oksijen tüketimi kas dokularına kıyasla 7,5 kat daha düşüktür. Metabolizma hızındaki bu düşüklük neticesinde yaralanma sonrası iyileşme de uzun sürmektedir(20)

Tendonlar ekstraselüler matriks içine yerleşmiş paralel dizilimli kollajen fibrillerden oluşur. Ekstraselüler matriks ise; proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikoproteinler ve birçok küçük molekülden oluşmaktadır. Proteoglikanların yüksek hidrofilik özelliği sayesinde difüzyon ve hücre migrasyonu hızlıdır. "Fibronektin" ve "trombospondin" gibi yapışkan glikoproteinler, tendonun rüptür sonrası tamir ve rejenerasyon evrelerinde görev alırlar. Tendon ekstraselüler matriksinin diğer önemli birleşeni "tenasin-C" tendon yapısında bol miktarda bulunur. Tenasin-C kollajen lif düzeni ve oryantasyonunda görev alır. Tendinopati

durumunda sentezi artar, elastik bir proteindir(21).

Tendonun kuru ağırlığının %70'ini kollajen oluşturur (7). Kollajenin %95'i tip I kollajendir(22). % 200'lere varan gerilme kuvvetine karşı koyan ve kuvvet ortadan kalkınca orijinal haline geri dönebilen elastin ise tendonun kuru ağırlığının % 2'sini teşkil etmektedir(7, 23). Tendon dejenere oldukça tip III kollajen daha baskın hale gelir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte tip I kollajen azalır ve tendonun çapı ile yoğunluğu da azalır. Bu durum, elastikiyetinin azalması ve rüptüre daha yatkın olması anlamına gelmektedir. Hasar sonrası tendon iyileşmesinde ilk sentezlenen kollajen, tip III'tür ve tip I kadar esnek değildir (12)

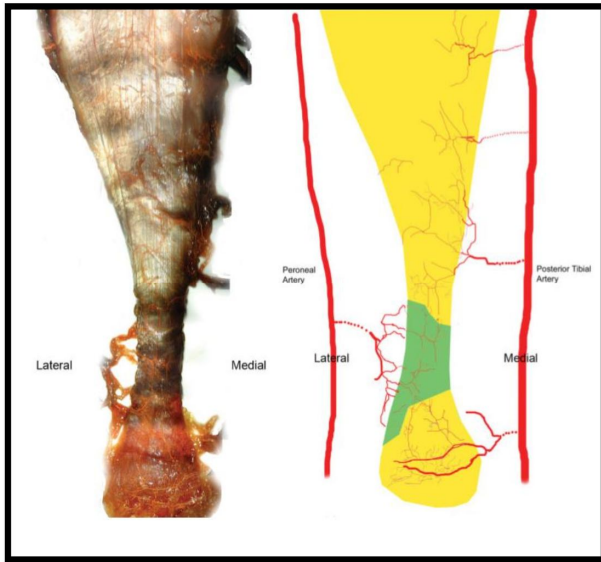


Şekil 2.3.1 Tendon yapısı

Tendonun yapısı kendi içinde hiyerarşik bir düzen içerir: Fasiküller fibrillerden, fibriller mikrofibrillerden ve mikrofibriller tropokollajenlerden oluşmaktadır (şekil 2.3.1). Aşil tendonunun yapısında yer alan kollajen fibrillerinin çapı 30 -150 nm arasında değişmektedir. Her bir kollajen fibrillerinin etrafı endotenon ile çevrelenerek fasikülleri oluşturur. Endotenon, hem fiber demetlerinin kaymasını hem de birbirlerine bağlanmasını sağlar. Ayrıca kan damarlarının, sinirlerin ve lenfatiklerin erişimine olanak sağlayan kanallara sahiptir. Fasiküller biraraya gelerek epitenon ile kaplanarak tendonu oluşturur. Tendonun etrafını da epitenondan ince bir sıvı tabakasıyla ayrılan paratenon çevreler(1). Aşil tendonunda paratenon iki tabakadan oluşmaktadır ve her iki tabakanın yapısında sinovyal hücreler bulunur. İç tabaka tendon ile devamlılık gösterirken dış tabaka etraf yumuşak dokular ile devamlılık gösterir. Paratenon tendonun kayması, kanlanması ve iyileşmesinde görev alır (20).

2.4. TENDON KANLANMASI

Aşil tendonunun kanlanması ; kas-tendon birleşim bölgesi, paratenon gibi çevre yumuşak dokular ve kemik-tendon birleşim bölgesi olmak üzere 3 farklı bölgeden sağlanmaktadır. (13, 24). Sürtünmeyi azaltmak için kılıflarla kaplı olan tendonlarda ana damarlardan çıkan dallar sinoviyal kılıfın viseral tabakasına ulaşabilmek için "vincula"lardan (mezotenon) geçer. Burada pleksus oluşturarak tendonun yüzeyel kısmını beslerler. Damar yapılarından bazıları endotenon içinde seyrederek peritendinöz ve intratendinöz damar ağını birbirine bağlarlar. Sinoviyal kılıfın olmadığı aşil tendonu gibi tendonlarda paratenon kanlanmaya yardımcı olur. Paratenondan ayrılan arteriyel damarlar epitenona girerek endotenon içinde intratendinöz vasküler ağ oluştururlar(20). Bu nedenle paratenon tendon iyileşmesinde kilit bir rol oynamaktadır.

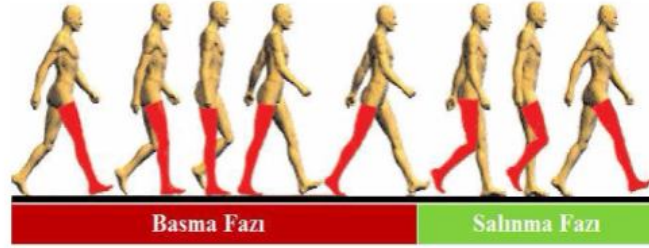


Şekil 2.4.1: Aşil tendonunun kanlanması

Aşil tendonunu asıl besleyen damar, posterior tibial arterin (a. tibialis posterior) rekürren bir dalıdır. Bu dal, daha çok peritendinöz yapıları besler. Fibular arterin (a.fibularis) distal dalları da, posterior tibial arter ile anastomoz yaparak aşil tendonunun beslenmesinde az da olsa katkıda bulunur(18, 25, 26). Proksimal ve distal 1/3'ü, esas olarak posterior tibial arterin dallarından beslenirken, orta 1/3'ü fibular arter tarafından beslenir. Tendonun damarsal yapısı sürtünmenin, torsiyon ve kompresyon kuvvetlerinin arttığı bölgelerde yetersizdir. Aşil tendonunun kanlanmasını ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda, tendon yapışma bölgesinin 2-7

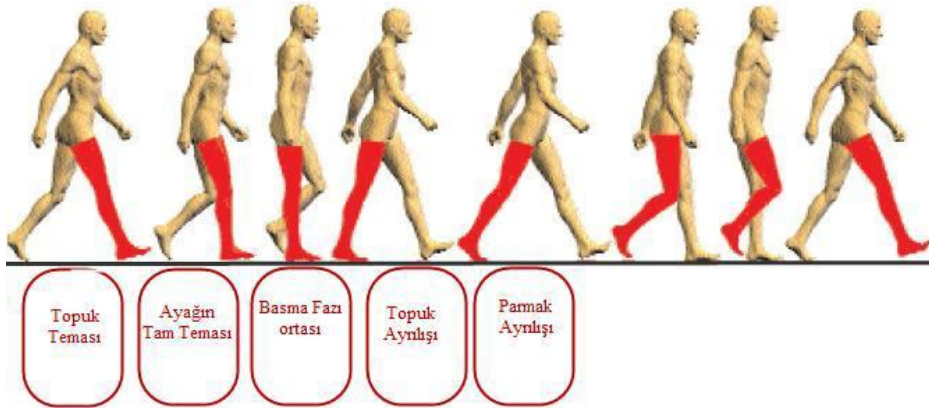
cm proksimalinde hipovasküler bir alan tespit edilmiştir ve bu hipovasküler alan, tendon yaralanmalarının sıklıkla karşılaşıldığı bölgeyi oluşturmaktadır(27)

2.5. TENDON BİYOMEKANİĞİ



Şekil 2.5.1: Yürüme fazları

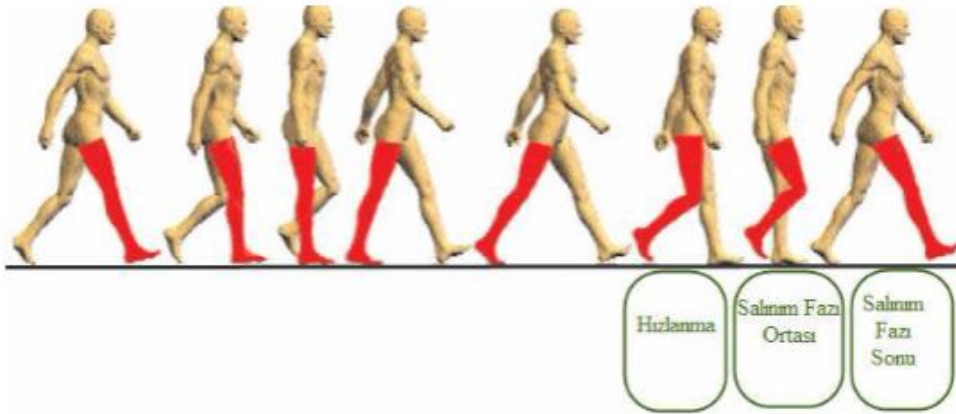
Aşil tendonunun, biyomekanik özelliklerini anlayabilmek için yürümenin biyomekaniklerini de bilmek gerekir. Yürüme, koşma ve spor faaliyetleri sırasında aşil tendonu tekrarlayan yüklenmelere maruz kalmakta, bu da tendinopatiye neden olmaktadır ve rüptüre zemin hazırlamaktadır(28, 29). Yürüme siklusu % 60 basma ve % 40 salınım olarak iki safhadan oluşur. Basma ve salınım fazları da kendi içinde bölümlere ayrılır.



Şekil 2.5.2: Yürümenin Basma Fazı

- Topuk Teması (İlk temas) yürüme siklusunun % 0-2 arasını teşkil eder. Basma fazının başlangıcı olup ayağın yere değmesi ile başlar. Amaç ayağı önce topuk yere değecek şekilde yere indirmektir. Ayak bileği dorsifleksörlerin yardımı ile nötral pozisyonda tutulur(30).

- Ayağın Tam Teması (Taban Vuruşu) yürüme siklusunun % 2-10 arasını teşkil eder. Aynı zamanda birinci çift destek fazıdır. Diğer ayak yerden kaldırılana dek gövde ağırlığı bu ayağa aktarılır. Ayak bileği 10 derece plantar fleksiyondadır ve ayak bileğinde dorsifleksörler kasılır. Amaç; şok absorpsiyonu, ayağın tümünün yere indirilmesi ve vücut ağırlığının üstlenilmesidir(30).
- Basma Fazı Ortası yürüme siklusunun % 10-30 arasını teşkil eder. Tek basma fazının başlangıcıdır. Kalça ve diz ekstansiyonda, ayakbileği dorsifleksiyondadır. Salınım fazındaki bacak basan bacağı yanından geçer. Amaç yerde sabit olan ayak üzerinde gövdeyi öne doğru ilerletmektir(30).
- Topuk Ayrılışı (Basma Sonu) yürüme siklusu % 30-50 arasını teşkil eder. Tek basma fazı bitmektedir. Ayak bileği plantar fleksiyondadır. Amaç bacağı yerden kesilmesidir(30).
- Parmak Ayrılışı (Salınım Öncesi) yürüme siklusunun % 50-60 arasını teşkil eder. Basma fazının bitip salınım fazının başladığı dönemdir, ayrıca ikinci çift destek dönemini oluşturur. Karşı ekstremitenin yere değdiğinde başlar ve parmakların yerden kesilmesiyle sonlanır. Bu dönemde gövde ağırlığı ekstremitenin üzerinden kalkar. Amaç bacağı salınımına hazırlamaktır.



Şekil 2.5.3: Yürümeni Salınım Fazı

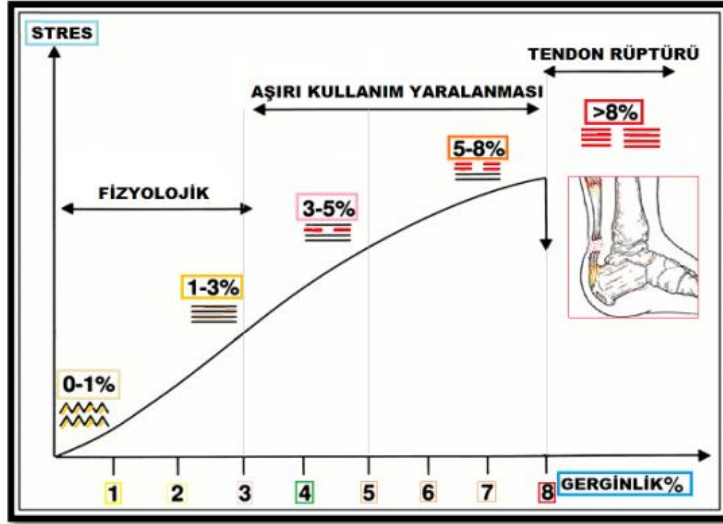
- Erken Salınım (Hızlanma- akselerasyon) yürüme siklusunun % 60-73 arasını teşkil eder. Ayağın yerden kaldırılması ile başlar, ayak diğer ekstremitenin hizasına geldiğinde biter. Amaç havadaki bacağı hızla öne ilerletmektir.
- Salınım Fazı Ortası yürüme siklusunun % 73-87 arasını teşkil eder. Salınan bacak basma fazındaki bacağı yanına gelir ve önüne geçer. Amaç ayağın yere değmeden

aktarılmasıdır.

- Salınım Fazı Sonu (Deselerasyon) yürüme siklusunun % 87-100 arasını teşkil eder. Salınan bacak basan bacağın önüne geçtiğinde başlar, ayağın yere değdiği ana kadar sürer. Amaç ayağın yere basmaya hazırlanmasıdır. Dizin tam ekstansiyonu ile adım uzunluğu artar(30).

Gastroknemius ve soleus kasları basma fazı sonunda vücudun hızlanmasını sağlarlar(30). Yürüme siklusunda, aşıl tendonunun kalkaneusa aktardığı kuvvet parmakların yerden ayrılması fazında oldukça hızlı bir şekilde yükselirken, topuğun yere teması fazında aniden düşer. Aşıl tendonu kaslardan gelen kuvveti kemiğe iletmesinden başka, şok emici etkisi ile gastroknemius-soleus kas kompleksinin hasarlanmasını önler. Vücut ağırlığının 8 katına kadar olan yüklenmelere dayanabilir(30). Koşu sırasında aşıl tendonu üzerine binen yükün 9000 N'a kadar çıktığı belirlenmiştir (31). Bu kuvvetler bir tendonun karşılayabileceği kuvvetten yüksek olduğu için yükün uygulanma hızının da tendonun taşıyabileceği maksimum yük miktarı üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir(30). Tendona uygulanan gerim ne kadar hızlı ve oblik planda ise tendonun kopma riski o kadar yüksektir (32).

İstirahat halinde tendonlardaki kollajen fibrilleri kıvrımlı halde iken tensil kuvvetlere tendonun ilk cevabı bu fibrillerin düzleşmesidir. Eğriliğin ilk kısmında görülen konkav bölge tendonun boyunun %2 si kadar gerildiği döneme aittir ve kıvrımlı kollajen yapısı bu dönemde düzleşir (Şekil 2.5.4). Bu noktanın ötesinde tendonlar kollajen üçlü helikslerinin molekülleri arasındaki bağların kırılmasına bağlı olarak çizgisel bir şekilde deforme olurlar ve kollajen fibrilleri paralel hale gelir. Gerilme %4'ün altında kalır ise tendon elastik özellik gösterir ve üzerindeki yük kaldırıldığında başlangıç uzunluğuna döner. Gerilme %4'ün üstünde olursa kollajen yapısında mikroskopik düzeyde bozulma başlar. %8-10'un üzerinde ise gözle görülen bir deformasyon mevcuttur(20).



Şekil 2.5.4: Tendondaki stres-gerginlik ilişkisini gösteren eğri

Bir kollajen fibrilinin mekanik gücü, üçlü heliks yapısında oluşturduğu molekül içi bağlarla birlikte çapıyla ilişkidir. Öyle ki fibril çapı arttıkça biyomekanik dayanıklılık da artmaktadır(33). Dejenerasyona uğramış tendonlarda ve tendon iyileşmesi sürecinde yoğunluğu artan tip III kollajen fibril çapının tip I 'e göre daha küçük olduğu bilinmektedir(34).

Gerilmiş olan aşil tendonuna direk travma ile tendonda yırtık oluşabileceği gibi rüptür en sık indirekt travma ile olmaktadır(35, 36). Arner ve Lindholm aşil tendon rüptürüne neden olabilecek 3 farklı indirekt travma mekanizması tariflemişlerdir. Bu yaralanma mekanizmaları; 1) ön ayağa yük binmiş durumda ve diz ekstansiyonda iken, ani olarak ayağa itme gücü uygulanması; 2) merdiven çıkarken ayağın kayması veya ayağın çukura düşmesi gibi durumlarda, beklenmedik bir şekilde ayak bileğinin dorsifleksiyona gelmesi; 3) plantar fleksiyon durumundaki ayağa güçlü dorsifleksiyon yaptırılmasıdır(36, 37).

McMaster, sağlıklı tendonun şiddetli gerilme kuvvetlerine maruz kalsa bile yırtık olmayacağını öne sürmüştür(38). Barfred ise yaptığı çalışmalar sonucunda, aşırı yüklenmeler uygulandığında sağlıklı tendonda yırtık olabileceğini belirtmiştir(39, 40). Postacchini ve Puddu, sağlıklı tendonun da aşırı yüklenmeler ile yırtılabileceğini belirterek Barfred'i desteklemişlerdir(41). Inglis ve Sculco, aşırı yüklenmeler ile oluşan muskületendinöz bileşkedeki gerilmeyi önleyen refleks inhibitör mekanizmanın yetersizliğinin, aşil tendon yırtıklarına neden olduğunu bildirmişlerdir(42).

2.6. TENDON İYİLEŞMESİ

Tendon yapısındaki meydana gelen herhangi bir bozulma, iyileşme ve skar oluşturma sürecini başlatır. Tendon iyileşmesi iki teori üzerinden açıklanmaya çalışılır. İntrensek iyileşme modelinde epitenon ve endotenondaki fibroblastların çoğalması ve bu kılıfların sağladığı kanlanma görev alır. Ekstrensek iyileşme modeli ise tendon iyileşmesi için çevre dokulardan gelen inflamatuvar hücrelerin, tenositlerin ve ekstratendinöz kanlanmanın gerekli olduğunu savunur(20). Her ikisinde de iyileşme süreci birbiriyle bağlantılı 3 evre içerir ve süreleri tendon hasarının yerine göre farklılıklar gösterir.

İnflamasyon Evresi: Tendon iyileşmesinin ilk evresidir. Tendon hasarından hemen sonra başlar ve yaklaşık 7 gün sürer. Tendon gücünün en az olduğu dönemdir. Bu dönemde belirgin özellik, hücre göçü ve fagosit aktivasyonudur. Hasar sonrası ilk olarak kanama, pıhtı oluşumu, eksüdasyon ve fibrin birikimi oluşur. İlk 24 - 48 saat arasında, öncelikle vazodilatasyon ve kan akımında lokal artış olur. Takiben küçük damarlarda geçirgenlik, ödem meydana gelir ve staz oluşur. Bütün bunları lökositlerin diapedezi, kemotaksisi ve fagositozu izler. 4 - 6 saat arasında nötrofiller yara bölgesine gelir ve 24 - 48 saat arasında da elimine olur. Makrofajlar ise ilk 3 gün içinde yara bölgesine gelir ve uzun süre kalır. Nekrotik materyalin fagositozundan sorumludurlar. Makrofajlar yeni tenositlerin toplanmasını ve angiogenesisi başlatır. İnfiltrate olan yangısal hücreler fibroblastlara farklılaşır. İki gün sonra fibroblastlar ortaya çıkmaya başlar. İyileşme ilk olarak, epitenon hücrelerinde başlar ve ilk iki gün içinde proliferer olur. Yaralanmayı takiben başlayan inflamasyon 1-3 günde giderek artarak maksimum seviyeye ulaşır. Bu süreçte hipoksinin ve inflamasyonun etkisiyle yaralanan dokularda nekroz gelişimi başlar. Nekroz oluşumu 3-7 günlerde daha da belirgin gözlenir ve bazen haftalarca süren rezolusyon başlar. Nekrozun temizlenmesi 5-10. günlerde yoğunudur ve oluşan yeni damarlar granülasyon dokusunda belirginleşmeye başlar. Bu dönem içinde DNA, su, glikozaminoglikan, fibronektin ve kollajen tip III miktarında artış tespit edilir(43)

Büyüme faktörleri tendon iyileşmesinin inflamasyon fazında etkin olduğu bilinmektedir. Yaralanmadan sonraki ilk 10 günde büyüme faktörlerinin tendon hasarının olduğu defekt bölgesinin farklı lokalizasyonlarında artış gösterdiği ve farklı defekt bölgelerinde etkin rol oynadığı saptanmıştır. TGF- β , defekt bölgesinin etrafı özellikle defekt proksimalinde etkin rol oynadığı saptanmıştır. IGF, bFGF ve EGF tenositlerde görülmediği, tamir bölgesini kuşatan inflamatuvar hücrelerde mevcut olduğu ve bu büyüme faktörlerinin defekt bölgesinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir. PDGF ve VEGF ise defekt tamiri sonrası

tamir bölgesinin tamamında etkinliği ortaya konulmuştur(4). İnflamasyon fazında defekt bölgesinin farklı bölgelerinde etkin rol oynayan büyüme faktörlerinin defekt bölgesine ilk 10 gün içinde uygulanmasının iyileşmeyi hızlandırdığı ve yapışıklığı azalttığı gösterilmiştir(4).

Proliferatif Evre: Yaralanmadan sonraki 2 - 28 gün arasında meydana gelir. Baskın hücre popülasyonu tenositlerdir. Yara bölgesine fibroblastlar 8 -10 saat arasında gelir. Eş zamanlı kollajen sentezi de başlar. Tip III kollajen sentezi bu safhada çok yükselir. Glikozaminoglikan ve su içeriği de giderek artış gösterir(15). Yara bölgesinde 3. gün anjiogenez de belirginleşir ve 5. gün maksimum seviyelere ulaşır. Granülasyon dokusu 3 - 5 gün arasında maksimum seviyelere ulaşır. Granülasyon dokusu büyük ölçüde iğsi şekilli fibroblastlardan, yoğun kollajenden ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır. Haftalar içinde (7. gün granülasyon dokusu organize olmaya başlar) olgunlaşan granülasyon dokusunda damarlar yavaş yavaş kaybolur ve soluk renkli ve büyük ölçüde damarsız doku olan nedbe dokusuna dönüşür. Yara bölgesi, 14. gün fibroblast ve kollajen fibrilleri ile dolar. Ancak yaranın gerilme gücü hala sınırlıdır. Fibroblastik aktivite ise 3 - 6 hafta kadar sürer ve giderek azalır. Sağlıklı aşil tendonu, yırtılmış tendonun aksine çok organize olmuş bir hücrenel düzenlemeye sahiptir (44). Ekstrasellüler matriks proteinlerini üreten tenositlerin iğ biçimli hücre gövdeleri, kollajen fiber demetleri arasında sıralar halinde düzenlenirler. Bu düzenleme, kollajenin tenosit kolonları çevresinde muntazam sentrifugal sekresyonuna bağlıdır. Yani, yeni oluşan kollajen fibrillerinin dizilimleri sağlıklı tendondakinden farklılık gösterir, rastgeledir ve dağıktır. Tamir edilen tendonun gerilme gücü sentez edilen kollajen fibrillerinin yoğunluğuna ve dizilimine bağlıdır.

Remodelizasyon Evresi: Tendon iyileşmesinin son dönemidir. Skar dokusunun olgunlaşması ve yeniden yapılanması 3. haftanın ardından başlar. Tenositlerin büyüklükleri azalır, hücre dışı matriks sentezi yavaşlar ve kollajen fibrilleri tendonun uzun eksenine paralel olacak şekilde yeniden şekillenir. Kollajen fibrillerinin yapısında yer alan kovalent çapraz bağların sayısı artar. Tip III kollajen yerini tip I kollajene bırakmaya başlar. Kollajen döngüsü ve tendonun su içeriği normal düzeye döner (31). Bu süreçte, gerilme gücü de giderek artar. 6 -12 ay kadar sürer.

Normal aşil tendonu, hemen hemen tamamıyla tip I kollajen içermekteyken, yırtılmış olan tendon önemli oranda daha immature olan tip III kollajen içerir. Remodelizasyon ile immature tip III kollajen yerini daha matür ve sağlam olan tip I kollajene bırakır. Kollajen sentezi sadece yaralanma bölgesinde değil, tendonun tamamında meydana gelir. 14.ve 28. günler arasında kollajen sentezi en üst seviyededir. Kopuk aşil tendonları üzerinde yapılan

incelemelerde tendon yapısında tip I kollajen yanında belirgin bir tip III kollajen varlığı da gösterilmiştir (20, 45). Kopuk aşil tendonlarından alınan tenositlerin hücre kültürlerinde tip I ve tip III kollajen üretiminin yapıldığı tespit edilmiştir. Tip III kollajen çapının tip I'e göre daha ince olduğu ve gerilme kuvvetlerine karşı daha dayanıksız olduğu bilinmektedir(45) ve bu nedenle Tip III kollajenin hakim olduğu tendonlar kendiliğinden kopmalara karşı daha duyarlı hale gelir.

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

1994'te Finlandiya'da yapılan bir çalışmada aşil tendon rüptürü insidansı 18/100000 olarak bulunmuştur(46). Erkeklerde kadınlara oranla daha sık karşılaşılmaktadır. Genellikle 30-40 yaşlarında erkeklerde daha fazla görülmektedir. Kadınlarda ise 60-80 yaşları arasında artış göstermektedir. Amatör sporcularda ve antrenman sayılarının, sürelerinin ve yoğunluklarının arttığı profesyonel sporcularda, tekrarlayan streslerin ve mikrotravmaların neden olduğu aşırı kullanıma bağlı aşil tendon yırtığı meydana gelebilir(47).

2.8. ETİYOLOJİ

İnflamatuar ve otoimmün hastalıklar, kollajen doku hastalıkları, nörolojik hastalıklar spontan aşil rüptürlerine neden olduğu gösterilmiştir(48-50). Kronik dejenerasyon, aşırı yüklenmeler olmaksızın tendonun yırtılmasına yol açar ve 30 - 40 yaşları arasında görülme sıklığı artar(51, 52). Erkeklerde kadınlara oranla 5 - 10 kat daha fazla görülür. Genellikle sedanter bir yaşam tarzı olan, nadiren spor yapanlarda meydana gelirken, profesyonel olarak spor yapanlarda da meydana gelebildiği görülmüştür(53). Ani ve basit yaralanmalar sonrası ortaya çıkan tendon kopmalarında kollajen yapının dejeneratif değişiklikleri dikkat çekmektedir. Histolojik çalışmada, ani kopma sonrası uygulanan cerrahi tedavi sırasında elde edilen biyopsi materyallerinin hiçbirinde normal histoloji görülmemiş ve kesitlerde hipoksik dejeneratif tendinopati, mukoid dejenerasyon, tendolipomatososis, kalsifiye tendinit dikkati çekmiştir(51). Bu değişikliklerin kronik bir süreç içerisinde kopma öncesi var olduğu düşünülmektedir.

Aşil tendonunun en dar yeri, sonlanma yerinin yaklaşık 4 cm kadar proksimalindedir. Aşil tendon liflerindeki dönme, bu bölgede maksimuma ulaşır ve stres düzeyinin aşırı yükselmesine yol açar. Böyle bir durum, aşil tendon yırtıklarının en sık

görüldüğü bu bölgedeki zayıf beslenmeyi, dejenerasyona ve yaralanmaya yatkınlığı açıklayabilir. Ayrıca sonlanma yerinin 2 cm - 6 cm proksimalinde yer alan bu bölüm tendonun kanlanması en zayıf ve aynı zamanda yırtıklarının da en sık görüldüğü bölgedir. Kanlanmasının zayıf olmasının, doğrudan tendonun gerilme gücünü azalttığına ve dolaylı olarak dejenerasyona sebep olup tendon güçsüz bıraktığına inanılır(51). Birbirinden önemli bu nedenlerin hepsi, sonlanma yerinin 2 cm - 6 cm proksimaline dikkatlerimizi çeker. Yapılan çalışmalarda genellikle aşıl tendon yırtıkları sonlanma yerinin 2 cm - 6 cm proksimalinde görülür(53).

Tendinopatinin gelişmesinde rol alan faktörler kesinlik kazanmamıştır. Tendon maksimum gerim kuvveti altında iken iskemi meydana gelir ve gevşemeyle beraber reperfüzyon ortaya çıkar ve oksijen radikalleri oluşur. Bu süreç tendon hasarına ve tendinopatiye neden olabilir(20). Tendinopatisi mevcut olan hastaların tendonlarında tenositleri oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bilinen peroksiredoksin 5 enziminin arttığı tespit edilmiş ve bu bulgu oksijen radikalleri teorisini desteklemiştir (54).

Tendon hareketleri sırasında meydana gelen ısı tendinopati etiyolojisinde suçlanmıştır. Tekrarlayan hiperterminin hücre yaşamını olumsuz etkilediği ve tendon dejenerasyonuna neden olduğu gösterilmiştir(55).

Tendinopati etiyolojisindeki diğer bir faktör programlanmış hücre ölümüdür. Programlanmış hücre ölümü rotator manşet tendinopatisinde gösterilmiştir. Rotator manşet sorunları nedeniyle opere edilen hastaların kopmuş supraspinatus tendonlarından alınan örneklerde normal tendonlara göre daha fazla apoptotik fibroblast benzeri hücreye rastlanmıştır(56).

Tendinopatinin histolojik incelemesinde inflamatuvar hücrelerin bulunmadığı, düzensiz bir iyileşme dokusu, kollajen dejenerasyonu, kollajen fibrillerinde düzensizlik ve incelme, dağınık bir damarsal büyüme dikkati çeker(57).

Steroid tedavisinin tendon üzerindeki etkisinin ne olduğu tam olarak bilinmese de literatürde steroidin oral kullanımının ve tendinopati tedavisi amacıyla enjeksiyonunun aşıl tendon rüptürüne neden olduğu yönünde yazılar mevcuttur(51, 58). Yapılan bir hayvan çalışmasında intratendinöz steroid enjeksiyonunun tendonun biyomekanik özelliklerini saline enjeksiyonuna göre belirgin ölçüde bozduğu gösterilmiştir(59).

Florokinolanların tendinit, tendon rüptürü gibi sorunlara neden olduğu bilinmektedir(60). Yapılan hayvan çalışmalarında insan dozuna yakın dozlar verildiğinde

hayvanlarda kıkırdak dokunun hücre dışı matriks yapısında bozulma, kıkırdakta çatlaklar ve kondrosit nekrozu, kollajen miktarında azalma meydana geldiği gösterilmiştir(61). Tavşan aşil tendonlarından elde edilen tenosit kültürlerinde florokinolonların sitotoksik olduğu, mitokondriyal aktivitede azalmaya neden olduğu gösterilmiştir(62).

Yukarıda bahsedilen faktörlerin üzerine gelen bazen ağır bazen de hafif yaralanmalar sonucu aşil tendon yaralanmaları görülebilir.

2.9. MUAYENE BULGULARI

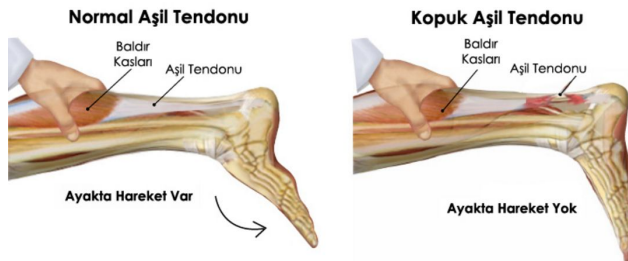
Aşil tendon rüptürünün tanısı esas olarak fizik muayene ve hikaye ile konulur. Fizik muayene bulgularının belirsiz olması ve ayırıcı tanı yapmak dışında MRG ve USG kullanım endikasyonu yoktur(63). Vücut – kitle indeksinin $> 30 \text{ kg/m}^2$, 55 yaşından daha büyük, yaralanmanın spor aktivite ile olmadığı hastalarda tanı da gecikme olabilir. Bu yüzden bu özelliklerdeki hastalarda özellikle şüphelenilmelidir(64).

Akut aşil tendon rüptürlerinde hastaların hikayeleri tipiktir. Hastalar yaralanan taraflarında baldırlarına sopa ile vurulduğunu veya baldırlarına top, taş veya sert bir cismin çarptığını iddia ederler. Aynı zamanda hastalar patlama tarzında bir ses duyduklarını da ifade ederler. En önemli şikayetleri baldırlarına aniden giren keskin ve yoğun ağrıdır.

Fizik muayenede lokal hassasiyet, şişlik, kızarıklık ve aşil tendon bölgesinde bir basamaklanma ve boşluk vardır. Tendon üzerinde basamaklanmanın palpe edilmesi ve hastanın ayak parmak ucunda yükselememesi önemli fizik muayene bulgularındandır.

Thompson Baldır Sıkıştırma Testi

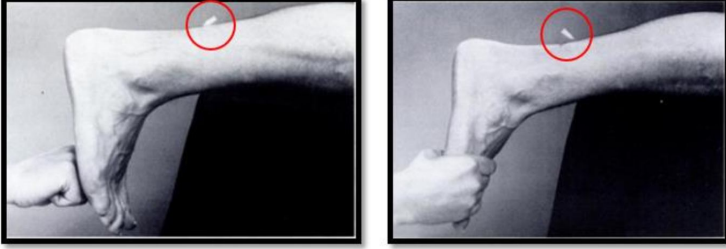
Hasta prone pozisyonda yatarken baldırın en kaslı bölgesi sıkıldığında ayak plantar fleksiyona gelir. Aşil tendon rüptüründe ayakta plantar fleksiyon olmaz(12, 65). Yapılan bir çalışmada bu testin yüksek duyarlılıkta (0.96) , gap palpasyonun ise en düşük (0.73) duyarlılıkta olduğunu göstermiştir(64).



Şekil: 2.9.1: Thompson Baldır Sıkıştırma Testi

O'Brien İğne Testi

Aşil tendonunun yapışma yerinin 10 cm proksimaline, 90° açı ile tendon içine iğne perkütan olarak yerleştirilir. Daha sonra ayak bileğine fleksiyon - ekstensiyon yaptırılırsa normalde iğne aşağı yukarı hareket eder. Eğer rüptür varsa iğnede hareket gözlenmez(12, 66).



Şekil 2.9.2: O' Brien testini yapılışı

Diz Fleksiyon Testi

Matles tarafından tanımlanmıştır(67). Hasta prone pozisyonda iken dizini aktif olarak 90° flexiona getirmesi istenir ve bunu yaparken ayak nötral ya da dorsifleksiyona gitme eğilimi gösterirse tendon rüptürü vardır anlamına gelir(67).



Şekil:2.9.3 : Matles testinin yapılışı

Aşil tendon yırtıklarının varlığı klinik olarak genellikle belirgin olmasına rağmen, tendonun yırtık uçları arasındaki boşluğu sadece fizik muayene ile tespit etmek zor olabilir. Cerrahi onarım için tercih edilecek tekniği belirlemeden önce, bu boşluğu iyi analiz etmek gerekir. USG ve MRG incelemeleri, aşil tendon yırtıklarını değerlendirirken preoperatif planlamada, cerraha yardımcı olur.

2.10. GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

Direkt grafide avulsiyon, ossifikasyon, haglund gibi kemik patolojileri ile birlikte Kager üçgeninde ve Toygar açısındaki değişiklikler de saptanabilir.

Karger Üçgeni: Ayak bileği lateral direkt grafisinde, tibia posterioru, kalkaneus süperioru ve aşil tendonunun anteriorunda kalan bölge, yağ dokusuyla kaplı üçgen bir yapı oluşturur. Aşil tendon rüptüründe bu görüntü kaybolur(68).

Toygar İşareti: Direkt lateral grafide, aşil tendon ile kalkaneus üzerindeki cilt dokusunun yumuşak açılanması Toygar açısıdır ve Aşil rüptürlerinde bu açı 150 derecenin üzerindedir(69)

USG, yüzeysel bir tendon olan aşil tendon patolojilerini değerlendirirken, semptomların lokalizasyonunu belirlemede, eşlik eden patolojileri ortaya koymada, tedaviye yanıtı izlemede, preoperatif planlamada ve intraoperatif değerlendirmede yardımcı olur. USG ile, tendon devamlılığının bozulması, basamaklanma ve boşluk içine kanama görüntülenebilir. Aynı bölge önce pasif sonra aktif dorsifleksiyon ve plantarfleksiyon hareketleriyle yapılarak da incelenir. Tendondaki boşluğun genişleyip daraldığı görülür. Kronik yırtıklarda ise tendondaki incelme ve defektin içine fitiklaşmış hiperekojenik yağ dokusu görülür.

MRG, aşil tendon patolojilerini değerlendirirken preoperatif planlamada, cerraha yardımcı olur. Tendonun yırtık uçları arasındaki boşluğu sadece fizik muayene ile tespit etmek zor olabileceği gibi, cerrahi onarım için tercih edilecek tekniği belirlemede önemlidir. MRG' de, normal aşil tendonunda düşük sinyal yoğunluğu alınırken, dejenerasyon varlığında aşil tendonunda yüksek sinyal yoğunluğu alınır. T2 ağırlıklı sekanslarda aşil tendonunda alınan yüksek sinyal yoğunluğu, sıvılar kadar parlak değilse dejenerasyonu, sıvılardan daha parlaksa kısmi yırtığı düşündürür. Tam kat yırtıkta, tendonun fibriler yapısında devamlılık kaybolur ve yüksek sinyal yoğunluğu alınır. Preoperatif planlamada, tendonun hem yırtık uçlarının kalitesi değerlendirilir hem de geri çekilme mesafesi ölçülür.



Şekil 2.10.1 : Aşil Tendon Ruptürünün MR görüntüsü

2.11. TEDAVİ

Tedavinin amacı, tendonun uzunluğunun ve gerginliğinin tekrar oluşturulması ile fonksiyonel geri dönüşün sağlanmasıdır. Aşil tendon yırtıklarına yaklaşım genelde konservatif veya cerrahi tedavi başlıkları altında toplanabilir. Cerrahi de açık ve kapalı/perkütan yaklaşım olarak ikiye ayrılabilir. Genç aktif hastalarda, genellikle cerrahi tedaviler tercih edilirken, ileri yaşta, ek komorbiteleri olan ve sedanter yaşayan hastalarda konservatif tedavi daha ön planda düşünülebilir(12).

2.11.1 KONSERVATİF TEDAVİ

Hastalara 6-8 hafta süreyle alçı ile immobilizasyon uygulanır. Bu uygulamadaki temel fikir, travma sonrası tendon rüptürü olduğunda paratenonun sağlam kalması, alçı ile uygun pozisyona getirilen tendon uçlarının paratenondan beslenmesi ve doku iyileşmesinin optimum olacağı yönündedir(70). 8 hafta alçılı immobilizasyon sonrası %13 oranında rerüptür olduğu gösterilmiştir

Literatürde konservatif olarak tedavi edilmiş hastaları bekleyen en temel sorunun tendonun yeniden kopması, gastrosoleus kas grubundaki atrofi ve immobilizasyon olduğu belirtilmiştir. Alçı tedavisi nedeniyle tendon uçlarının bir araya getirilememesi, iyileşme kalitesinin iyi olmaması ve immobilizasyon süresinin uzun olması konservatif tedavinin olumsuz sonuçlarından sorumlu tutulmaktadır(52, 71).

İnglis ve arkadaşlarının cerrahi uyguladıkları hastalarda rerüptür görülmemişken konservatif tedavide % 39 rerüptür gözlenmiştir. Cerrahi tedavi grubunda plantar fleksiyon kuvvet ölçümlerinin de daha üstün olduğunu saptanmıştır(72). Yapılan randomize prospektif

bir çalışmada cerrahi grubun günlük yaşama daha erken döndüğü, bacak atrofisinin daha az olduğu ve ayak bileği hareketlerinin daha iyi olduğu saptanmıştır(52).

2.11.1 CERRAHİ TEDAVİ

Genç, sportif aktiviteyle uğraşan ya da günlük yaşamında aktif olan hastalarda primer cerrahi tedaviyi önerilmektedir. Cerrahi tedavi açık ya da kapalı/perkütan yöntemle yapılabilir.

2.11.1.1 AÇIK CERRAHİ TAMİR

Aşil tendon rüptürünün cerrahi tedavisinde, Bunnel ya da Kessler tipi dikişlerle basit uç uca onarımdan gastrosoleus kasının fasyasının, plantaris tendonunun ya da tendon greftlerinin onarımı güçlendirmek için kullanıldığı komplike yöntemlere kadar cerrahi teknik tariflenmiştir(12). Tendonun uçları arasındaki mesafe 3 cm'nin altında ise uç uca tamirlerin mümkün olabileceği, 3-6 cm arası gap olduğunda da ise ek güçlendirici yöntemlere ihtiyaç duyulabileceği belirtilmiştir(73). Tamir hattını güçlendirmek için fasya lata greftleri kullanılabilir (Lynn yöntemi). Aşil tendon rüptür alanına gastroknemius kasının aponörozunu, santral olarak tek parça ya da mediolateral 2 parça halinde indirilerek güçlendirici sütürlerle sabitlenir (Lindholm yöntemi). Bu tamir yöntemine ek olarak, plantaris veya peroneus brevis tendonu, güçlendirmek amacıyla kullanılabilir (Turco ve Spinella modifikasyonları). Bunlara rağmen, akut aşil tendon rüptürlerinde fasya lata ile güçlendirmenin primer tamirlere üstünlüğü gösterilememiştir(12).

Açık cerrahi tedavi yapılan hastalarda, lokal yara yeri komplikasyonları görülebilir. Bu hastalarda düz longitudinal inzisyon yerine S şeklinde inzisyon tercih edilmesi, lokal yara yeri nekrozu ve cilt problemleri riskini azaltır(74). Bhandari ve arkadaşları tarafından yapılan bir meta-analizde rerüptür riskinin cerrahi tedavi olanlarda daha düşük olduğu, buna rağmen enfeksiyon riskinin konservatif tedavi tercih edilen hasta grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir(75).

Cerrahi tedavi konservatif tedaviyle yapılan bir derlemede karşılaştırılmış ve rerüptür açısından değerlendirildiğinde açık cerrahi tedavi üstün bulunmuş (cerrahi tedavi % 2.8 - konservatif tedavi %11.7) fakat komplikasyonlar açısından bakıldığında açık cerrahide 20 kez daha çok komplikasyon yaşandığı tespit edilmiştir(76).

Operasyon sonrası alt ekstremitenin 4-6 hafta süreyle uzun bacak alçısı ile tespit edilmesi genel kabul gören görüştür. Buna rağmen bazı cerrahlar, alçı ile tespit süresini kısa tutup fonksiyonel aşıl tendon breyslerini tercih etmektedir(74, 77). Bu breyslerin avantajı, dorsifleksiyonu kısıtlayıp plantar fleksiyona izin vererek triseps suraede atrofiyi önlemeleridir. Yapılan hayvan çalışmalarında, kontrollü erken hareket verilen grubun, original tendon gücüne, 6 haftalık immobilizasyon verilen gruba göre daha erken sürede ulaştığı gösterilmiştir (78).

2.11.1.2 PERKÜTAN CERRAHİ TAMİR

Konservatif tedavide görülen rerüptür, gastrosoleus kas atrofisi, uzun immobilizasyon süresi, günlük hayata geç dönüş ve açık cerrahi tedavi yönteminde görülen gecikmiş yara iyileşmesi, cilt nekrozu, enfeksiyon ve yapışıklıklar 1977 yılında her iki yöntemin olumsuz yönlerini kaldırmayı amaçlayan perkütan/kapalı cerrahi kavramını ortaya çıkarmıştır (9). Bu teknikte aşıl tendonunun medial ve lateralinden üçer adet küçük cilt insizyonları yapılmakta ve dikişler tendondan bu cilt insizyonları kullanılarak geçirilmektedir. Perkütan uygulamalarda tendon çevresi yumusak dokularda, paratenonda hasar oluşturulmadığı için tendon kanlanması ve beslenmesi korunmaktadır. Cilt insizyonları çok küçük olduğu için cilt komplikasyonları nadiren görülmektedir. Ma ve Griffith 18 hastalık serilerinde 2 önemsiz cilt komplikasyonundan söz etmişler ve yeniden kopmayla karşılaşmadıklarını bildirmişlerdir(9). Kadavra çalışmalarında ise, primer açık tamir uygulanan deneklere göre perkütan aşıl tendon tamiri uygulanan deneklerde %50 oranında güç kaybı ve %50' den fazla sural sinir yaralanması görülmüştür. Cilt, yara yeri nekrozu, erken mobilizasyon enfeksiyon komplikasyonlarının azlığı açık cerrahiye üstünlükleridir(9, 77, 79).

Perkütan/kapalı cerrahide en önemli iki eleştiri sural sinirin yaralanma riski ve kopuk tendon uçlarının bir araya getirilip getirilmediğidir. Perkütan/kapalı yöntem, endoskopi tekniğini ekleyen araştırmacılar lateral ve medial bölgeden açılan iki portalden kopma bölgesini göstermişler ve dikişlerin düğümlenmesi sırasında tendon uçlarının bir araya geldiğini tespit ettikten sonra düğümlerini kilitlemişlerdir. Yaptıkları kadavra çalışmasında tendon uçlarının biraraya gelmiş olduğunu, tendonda herhangi bir dizilim bozukluğu olmadığını ve sural sinirin yaralanmadığını göstermişlerdir (80, 81).

Açık ve perkütan/kapalı cerrahi yöntemi karşılaştıran çalışmalarda perkütan yöntemde major ve minör komplikasyonlar anlamlı miktarda az olarak saptanmakla birlikte sural sinir

yaralanması, ayak bileği puanları ve rerüptür riski açısından iki yöntem arasında fark bulunamamıştır(82-84).

2.11.1.3 GELENEKSEL TEDAVİYE EKLENEN BİYOLOJİK AJANLAR

Yukarıda tariflenen açık veya perkutan cerrahi tedaviler, aşil tendon rüptüründe kullanılan geleneksel tedavi protkolleridir. Normal anatomi ve histolojiye uygun, doğal tendona en yakın, daha matür bir tendon iyileşmesi elde etmek için, trombositten zengin plazma, kemik iliği aspiratı, kemik morfojenik protein, mezenkimal kök hücreler, büyüme faktörleri (bFGF, HGF, rhPDGF-BB, TGF- β ve VEGF) gibi biyolojik ajanlar geleneksel tedavi protokolüne eklenmektedir(5).

Trombositten zengin plazma; hastadan alınan tam kanın birtakım işlemlere tabi tutulmasıyla elde edilir. Trombositlerde bulunan alfa granüllerin içindeki büyüme faktörlerinin (GF) yara iyileşmesini olumlu şekilde etkilemesinden yola çıkılmıştır. Alfa granüllerin içinde birçok GF bulunmaktadır. Bunlardan yara iyileşmesinde ön plana çıkanlar; PDGF (platelet derived growth faktör), TGF-Beta (trombosit growth faktör), VEGF (vasküler endotelial growth faktör), IGF-1 (insülin growth faktör), PF-4 (platelet faktör) dür. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, platelet konsantrasyonunu artırınca büyüme faktörlerinde lineer bir artış olduğu bildirilmiştir(85). Trombositten zengin plazma revaskülarizasyonu uyarak mikroskobik düzeyde iyileşmeyi arttırdığı da gösterilmiş(86)

“Transforming” büyüme faktörü (TGF- β): “Transforming” büyüme faktörü- β 1 ve β 2 bağ dokusu iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda görev alan, TGF’nin en sık görülen alt gruplarıdır. TGF- β , hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu düzenler ve Tip I ve Tip III kollajen üretiminin artmasını sağlar(87). Hücre büyümesi, farklılaşması, ekstrasellüler matriks üretimi gibi çeşitli biyolojik olaylarda da rol alırlar(88, 89). Fibroblastları prokollajen üretimi için aktive ederek yarada kollajen depolanmasına neden olurlar (89). TGF- β ’lar parakrin olarak etkilerini fibroblast, kemik iliği kök hücresi ve preosteoblast gibi hücreler üzerinde gösterebilirler ve bu hedef hücreler de yine TGF- β salgılayabilirler. Böylece TGF- β yalnızca yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu başlatmakla kalmayıp yeniden şekillenme aşamaları ve kemik grefti olgunlaşmasında da etkili olurlar(90, 91).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF): Fibroblast büyüme faktörleri mitojenik özellik gösterir. İçlerinde en çok incelenmiş altgrup olan bFGF; fibroblastlar, endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler ve keratinositler üzerinde mitozu artırıcı etki gösterir, anjiogenezis

ve endotelial hücre göçünde rol oynar ve TGF- β 'nın dağılımını artırıcı etki gösterir. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiogenik etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde, özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Anjiogenezin başlaması için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar(92). Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur. Kemik iyileşmesi için düşünüldüğünde, kırık bölgesinde anjiogenezini artırarak, osteoblast diferansiyasyonu ve proliferasyonunu doz bağımlı uyararak, mekanik dayanıklılığı artırarak yardımcı olur(93).

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I): İnsülin benzeri büyüme faktörü-I, fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını artırarak büyümeyi uyarır. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferik glikoz alımını, glikojen sentezini, sinir sağkalımını, miyelin sentezini, kemik oluşumunu uyaran anabolik etkileri artırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir(94, 95). Aşil tendonunda travma oluşturarak yapılan çalışmada, düzeyinin arttığı görülüp tendon iyileşmesinde muhtemelen mitozu artırarak etki gösterdiği düşünülmüştür. Egzojen olarak verilen IGF-1'in DNA, kollajen ve proteoglikanı artırdığı gösterilmiştir.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): Vasküler endotelial büyüme faktörünün, en kuvvetli anjiogenezis uyarıcısıdır(96, 97). Anjiogenezin ilk basamaklarında, vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenezini başlatır. Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyararak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder. Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, enflamatuar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır(98-100). Deneysel modellerde ekstremitelerde iskemisinde egzojen verilen VEGF'in anjiogenezini başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. Petersen ve arkadaşları da, 2002'de tendon anjiogenezinin ana belirleyicisinin VEGF olduğunu bulmuşlardır(97).

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır. Kollajen üretimini artırmadan fibroblastların çoğalmasını sağladığı düşünülmüş olmasına rağmen Brown ve arkadaşları, sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF

uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler ve 7-14 gün sonra yara gerim kuvvetinin %200 arttığını bildirmişlerdir. İn vivo olarak anjiogenezi uyardığı bilinen EGF ile yapılan klinik çalışmalarda, gümüş sülfadiazin içine koyularak kronik yaralara uygulandığında epitelizasyonu artırdığı saptanmıştır(96, 101).

Mezenkimal kök hücreler: Aşil tendon tamirinde anti-apoptotik etkiyi artırarak tamiri artırdığı yönünde hipotezler mevcuttur(102). Tenositlerin farklılaşmasında etkili olabilirler. Mezenkimal kök hücrelerin en büyük etkin olduğu dönem inflamasyon fazıdır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücrenin ilk 3 haftada kollajen organizasyonunu arttırdığı ama iyileşmenin daha sonraki dönemlerinde anlamlı fark olmadığı saptanmıştır(103).

Kemik iliği aspiratı: Kemik iliği aspiratının asıl görevi yaralanma bölgesine mezenkimal kök salınmasını (MSCs) sağlamaktır.

3. MATERYAL- METOD

3.1. DENEY ÇALIŞMASI

Literatür incelendiğinde, Aşil tendonu üzerinde yapılan biyomekanik çalışmalar için deney hayvanı olarak daha ziyade rat ve tavşanların kullanılmış olduğu görülür. Tavşanlar arasında hayvan deneylerinde en çok kullanılan ırk, beyaz Yeni Zelanda tavşanlarıdır. Beyaz Yeni Zelanda tavşanlarının taksonomik sınıflandırılması; Animalia (Alem), Vertebrata (Şube), Mammalia (Sınıf), Lagomorpha (Takım), Leporidae (Familya), Pentalagus (Cins), Oryctolagus cuniculu (Tür) olacak şekilde yapılır.

Öncelikle, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi' nde yapılan "Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanımına ait Eğitim Sertifikası Programı" tamamlanarak sertifika alınmıştır.

Etik kurul onayı: Karar No:2 olarak 27.04.2016 tarihinde "Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" ndan çalışmamız için hayvan etik kurul onayı alınmıştır.

Ağırlıkları 3000-3500 gr arasında değişen Yeni Zelanda beyaz tavşanlar çalışmada denek olarak kullanıldı. Tavşanlar Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ÇÜTF-DETAUM) temin edilmiştir.

Bütün tavşanların vücut ağırlıkları ölçülmüş ve tutulan kayıt defterine not edilmiştir. Yaşları 9 ay -12 ay arasında, vücut ağırlıkları 3000 gr - 3500 gr arasında değişen, ortalama vücut ağırlığı 3350 g olan 30 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanı çalışmaya dahil edilmiştir. Randomize ve kontrollü olan bu deneysel çalışmada, deney hayvanları kapalı zarf usulü kullanılarak randomize edilmiş ve gruplandırılmıştır. Randomize olarak seçilen her birinde 10 adet tavşan bulunan 3 grup oluşturulmuştur. Tavşanların sağ aşil tendonları 0. gün kesilip 1 cm lik defekt çıkarıldıktan sonra 0. Gün tamir edilmiştir. Tavşanların sol aşil tendonlarına invaziv işlem uygulanmamıştır ve doğal tendon yapısında olan sol aşil tendonları kontrol grubunu oluşturmuştur.

3.2. CERRAHİ TEKNİK

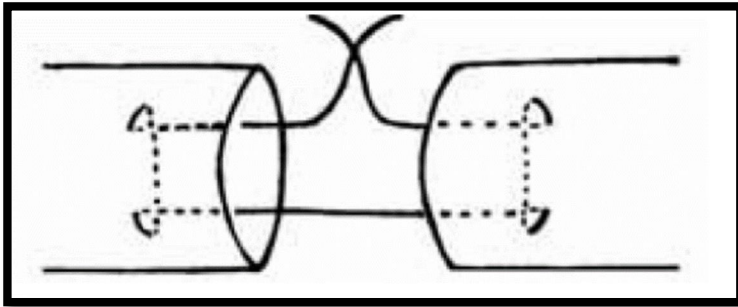
Cerrahi işlemler Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (ÇÜTF-DETAUM) tek cerrah tarafından yapılmış olup, tüm hayvanlarda, tendon onarımı için aynı dikiş materyali (3.0 Prolene, Ethilon, ABD) kullanılmıştır

Deney hayvanları her bir grupta 10'ar tavşan olacak şekilde üç eşit gruba bölünmüştür. Genel görünümünde, davranışlarında, kafes içi hareketlerinde, klinik bulgularında, besin ve su alımlarında ameliyata engel herhangi bir anormal durum saptanmayan tavşanlar, cerrahi işlemlerin yapılacağı sabah kafeslerinin bulunduğu ve takiplerinin yapıldığı odadan sırasıyla anestezi işlemlerinin yürütüldüğü odaya alınmışlardır. Tüm hayvanlara 20 mg/ kg Sefazolin Sodyum I.M. antibiyotik profilaksisinin ardından 35mg/kg Ketamin HCL ve 5 mg/ kg Ksilazin ile anestezisi uygulanmıştır. Kornea refleksinin kaybolması ile yeterli düzeyde anestezi derinliğine ulaşıldığı anlaşılmıştır. Takiben tavşanların dizleri ile kalkaneusları arası (sağ alt ekstremitesinin posterior kısımları) dikkatli bir şekilde traş edilmiştir. Ardından tavşanların sağ alt ekstremitesicivı sabun solüsyonu olan % 7,5 Polivinilprolidon-İyot kompleksi (Batticon®) ve % 0,9 İzotonik NaCl solüsyonu ile yıkanmıştır. Daha sonra tavşanlar cerrahi işlemin uygulanacağı odaya alınmıştır.

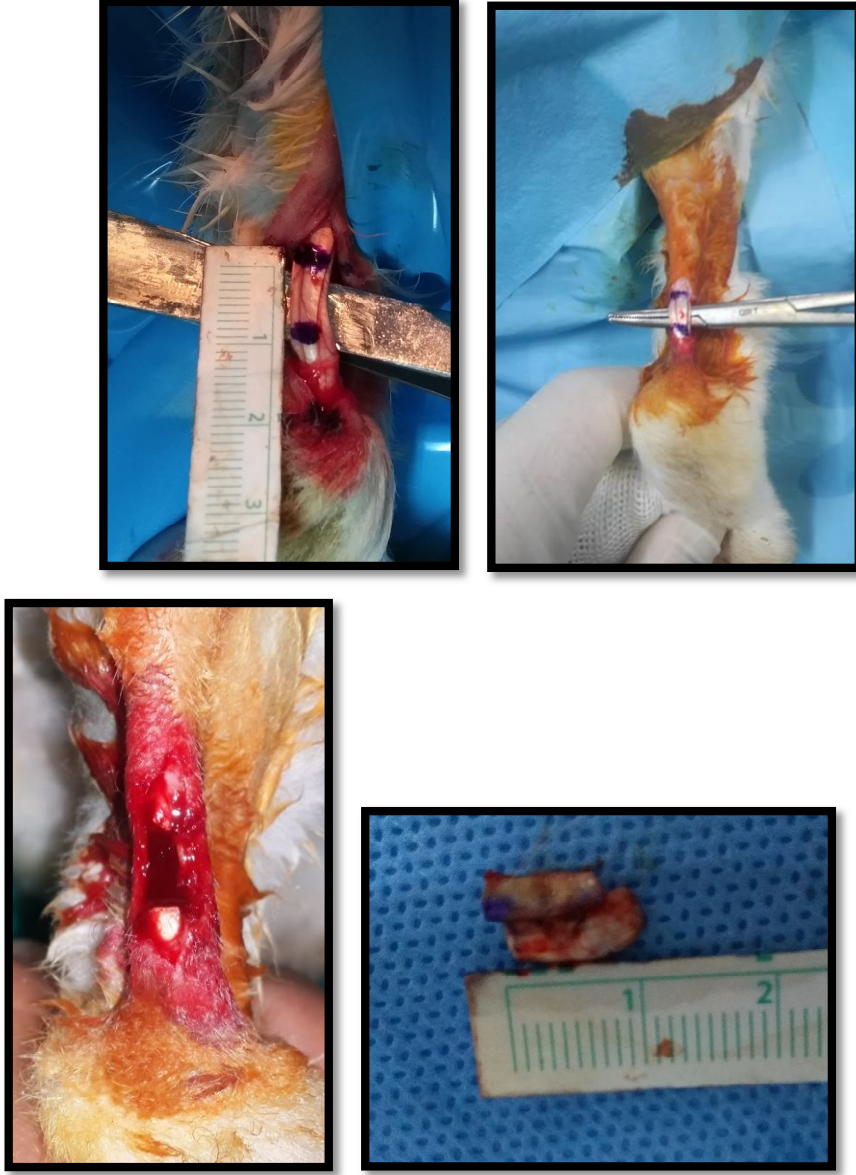
Tavşanların sağ alt ekstremitesinde cerrahi saha, antiseptik solüsyonu olan % 10 Polivinilprolidon - İyot kompleksi (Batticon®) ile boyanmıştır. Daha sonra ameliyat masasına

alınan tavşanlara, prone pozisyonu verilmiştir. Takiben steril cerrahi örtülerle örtüm sağlanmıştır.

Cerrahi saha sterilizasyonu sonrası aşil tendonu hissedilerek ayak bileğinin posteriorundan başlayan, aşil tendonunun medial kenarından proksimale doğru uzanan yaklaşık 4 cm uzunluğunda olan cilt insizyonu ile girilmiştir. Cilt altı dokular keskin diseksiyon ile geçilmiş ve aşil tendonuna ulaşılmıştır. Ayak tabanı yere paralel pozisyonda iken aşil tendonu kalkaneus' ta sonlandığı bölgenin 1.5 cm proksimali ve aşil tendonunun kalkaneusta sonlandığı bölgenin 2.5 cm proksimali cetvel yardımı ile ölçülerek cerrahi kalem ile işaretlendi. 1 cm lik defekt oluşturulacak tendon bölgesi cetvel yardımı ile ölçülerek işaretlendi (Şekil 3.2.2). Her grupta ve her tavşanın sağ aşil tendonlarında işaretlenen tendon bölgesi eksize edilerek 1 cm lik defekt bölgesi oluşturuldu. 1 cm lik defektif aşil tendon rüptür modeli oluşturuldu (Şekil 3.2.2). 0. Günde defektif tendon rüptür modeli oluşturulan tavşanlar, 0. Gün emilmeyen dikiş ile “gap” bırakılarak “splintleme” uygulanarak onarım yapıldı. Sol taraf aşil tendonları ise kontrol grubu olarak değerlendirildi. Her grupta tavşanların sağ aşil tendonlarında aynı emilmeyen dikiş (3/0 Prolene, Polypropylene) ile ve aynı dikiş tekniği (modifiye Kessler tekniği) uygulanarak onarım yapılmıştır.



Şekil 3.2.1: Modifiye Kessler Dikiş Yöntemi



Şekil 3.2.2 : Tavşanlarda 1 cm lik Tendon defekt modelinin oluşturulmasının fotoğrafları

Bu 3 gruba aşağıdaki gibi 3 farklı işlem uygulanmıştır.

“Sham” grubu: Standart olarak oluşturulan 1 cm lik tendon defekti, tendon uçları yaklaştırılmadan ve arada 1 cm lik “gap” bırakılarak, ayak tabanı yere paralel pozisyonda tutulurken emilmeyen Prolene® (3/0, Polypropylene) dikişle Kessler dikiş tekniği ile “splint”leme uygulandı. Daha sonra “gap” bölgesinin 1 cm olduğu cetvelle teyit edildi. Tendon stabilitesi kontrol edildikten sonra cilt, Prolene® (3/0, Polypropylene) kullanılarak kapatılmıştır.



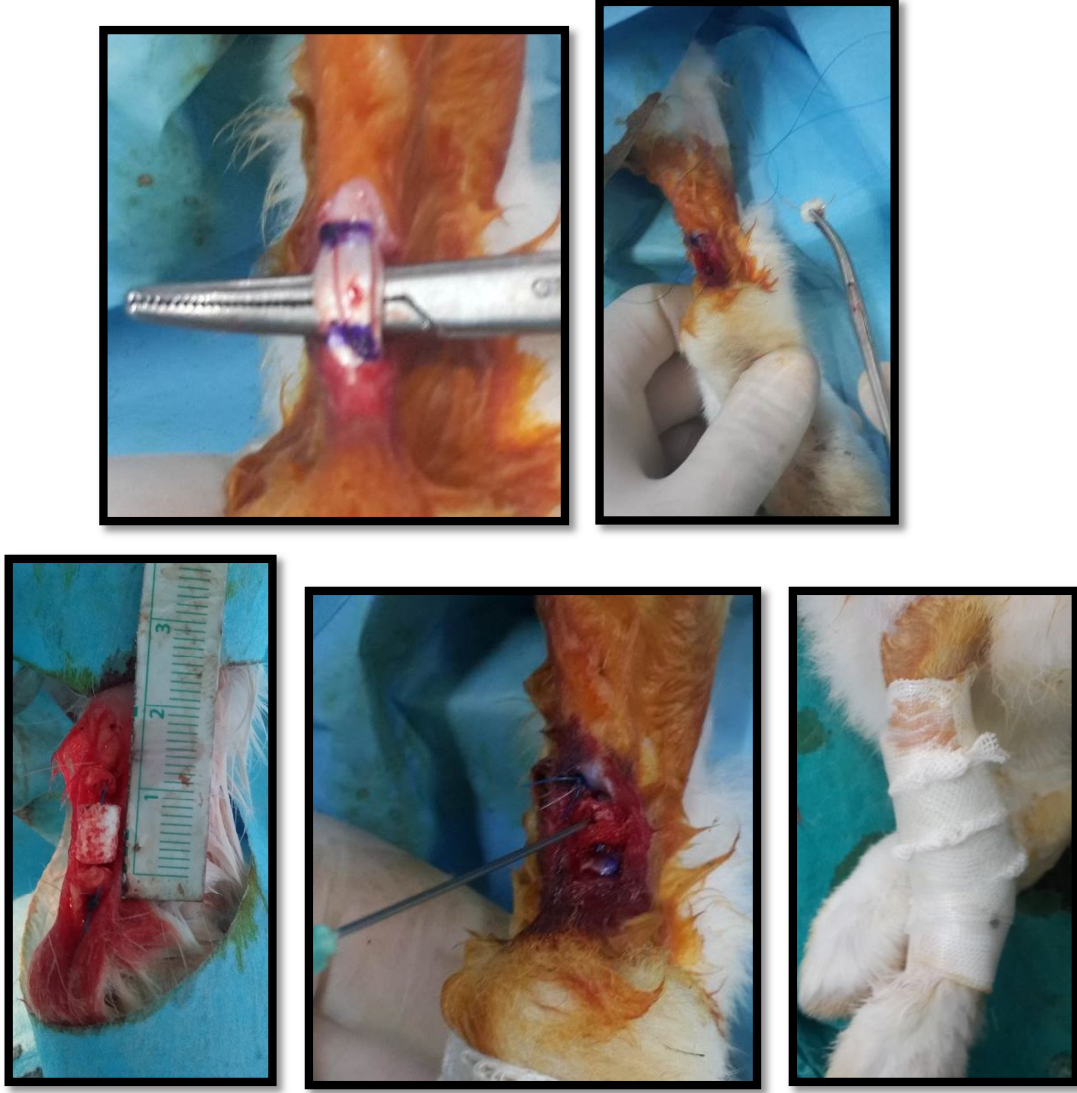
Şekil 3.2.3: “Sham” grubundaki defektif cerrahi onarım aşamalarının fotoğrafları

EGF(+) Grup: Standart olarak oluşturulan 1 cm lik tendon defekti, tendon uçları yaklaştırılmadan ve arada 1 cm lik “gap” bırakılarak, ayak tabanı yere paralel pozisyonda tutulurken emilmeyen Prolene® (3/0, Polypropylene) dikiş ile “splint”leme uygulandı. Daha sonra “ gap” bölgesinin 1 cm olduğu cetvelle teyit edildi. Defekt oluşturulan bölgeye 25µg/kg EGF enjekte edildi. Tendon stabilitesi kontrol edildikten sonra cilt, Prolene® (3/0, Polypropylene) kullanılarak kapatılmıştır.



Şekil 3.2.4: EGF(+) grubunda defektif aşil rüptürlerinde cerrahi onarım ve EGF enjeksiyonu fotoğrafları

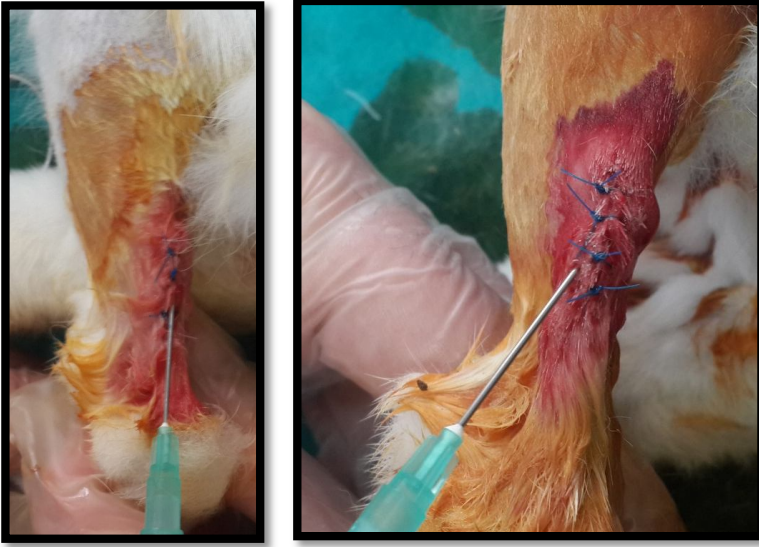
Skafold + EGF(+) Grup: Standart olarak oluşturulan 1 cm lik tendon defektini dolduran, 1 cm lik standardize edilen, 25 µg/kg EGF yüklenmiş dönüşebilen, poroz polikaprolakton (PCL) “skafold” yerleştirilerek emilmeyen Prolene® (3/0, Polypropylene) dikiş ile tendon uçları ve skafold tespit edildi. Tendon stabilitesi kontrol edildikten sonra cilt, Prolene® (3/0, Polypropylene) kullanılarak kapatılmıştır.



Şekil 3.2.5: Scaffold + EGF(+) olan grupta defektif aşıl rüptürünün scaffold ile defektin doldurulması ve scaffoldta EGF emdirilmesini gösteren cerrahi onarım fotoğrafları

Peroperatif komplikasyon izlenmemiştir. Postoperatif her iki alt ekstremitede, yapılan nörovasküler muayene doğal bulunmuştur. Postoperatif sağ alt ekstremiteye ayak bilekleri hafif ekin pozisyonunda olacak şekilde abeslang ve plaster ile postoperatif 1 gün kalacak şekilde atelleme uygulandı. Postoperatif 2. Günden itibaren ayak bilekleri serbest bırakıldı.

Büyüme hormonlarının etkisinin, yaralanma sonrası ilk 10 gün yani inflamasyon fazında etkili olduğu bilinmektedir(4). Bu dönemde büyüme hormonlarının daha hızlı iyileşmeyi sağladığı ve yapışıklığı azaltmasından yola çıkarak EGF (+) ve Scaffold & EGF(+) gruplarında defekt bölgesine 25 µg/kg EGF enjeksiyonuna postoperatif gün aşırı 10 gün devam edildi. “Sham” grubuna ise ise postoperative hiçbir işlem uygulanmadı.



Şekil 3.2.6: EGF(+) ve Skafold + EGF(+) gruplarına 10 gün boyunca gün aşırı EGF enjeksiyonunu gösteren fotoğrafları

Cerrahi işlemi takiben tavşanların marjinal kulak venleri kullanılarak 15 mg/ kg Parasetamol (Perfalgen®) I.V. olacak şekilde analjezi amacı ile uygulanmış olup antibiyotik ve analjezik uygulamaya postop. 2. güne kadar devam edilmiştir. Sonrasında ise tavşanlar, cerrahi işlemlerin yapıldığı odadan kafeslerinin bulunduğu odaya alınmışlardır. Tavşanların tamamının, postoperatif. uyandıktan sonra kafeslerinin içinde hareketli olduğu gözlenmiştir. Opere edilen tüm tavşanların postoperatif 2. Gün yaraları açılıp pansumanları yapılmıştır ve 2 gün aralıklarla 10 gün pansumanları yapılmıştır.

Postoperatif takiplerde 3 tavşan ölmüştür. Her gruptan birer tavşan öldüğünden dolayı gruplarda 9 adet tavşan kalmıştır. Grup sayıları eşit olduğundan dolayı çalışmaya bu şekilde devam edilmiştir.

8. haftada hayvanlar marjinal kulak venleri kullanılarak 100 mg/kg Tiyopental sodyum (Pental Sodyum®) I.V. olacak verilerek ötenazi uygulanmıştır. Sakrifiye edilen tavşanların tümünde pansuman temiz bulunmuş, hiçbirinde infeksiyon bulgusu (akıntı, kötü koku, dikişlerde açılma) saptanmamıştır. Aynı insizyondan tekrar cilt ve cilt altı geçilerek aşıl tendonlarına ulaşıldı, daha önceden tamir edilmiş olan tendonlarda dikiş materyallerinin emilmediği görüldü. Kontrol grubu ve cerrahi uygulanan gruplardaki bütün tavşanların aşıl tendonları proksimalde kas-tendon bileşkesinden, distalde aşıl tendonunun kalkaneusa

yapıştığı kemik- tendon bileşkesiyle birlikte en blok halinde eksize edildi. Sakrifiye edilen aşil tendonlarının tamiri ve rejenerasyonu makroskopik, histolojik ve biyomekanik olarak incelendi.

Her bir gruptaki 9 tendonun 5 tanesi biyomekanik değerlendirme için ve diğer 4 tanesi ise histolojik değerlendirme için ayrıldı.

3.3. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tendonların histolojik incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'nda yapılmıştır. Tendonlar çıkarıldıktan sonratendonların iyileşme bölgesini içeren 1 cm uzunluğundaki tendon parçaları ve sağlam tendonların aynı bölgeye uyan eşit uzunluktaki parçaları elde edildi ve daha sonra hızlıca %10 formalinde fikse edildi. Tüm doku örnekleri ışık mikroskopisiyle incelenmek amacıyla rutin işlemlerden geçirildiler. Tüm dokular parafin bloklara gömüldükten sonra sliding mikrotom ile 10 mikron kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin eozin ve Masson's trichrome ile boyandı. Kesitler dijital olarak mikroskop altında görüntülendi.

Leica DM4000 araştırma mikroskobu altında tüm doku, QImaging dijital kamera ile görüntülenip resimler birleştirilerek tam alanın dijital görüntüsü çekildi ve doku iyileşmeleri tüm guruplarda karşılaştırmalı olarak incelendi. İyileşme sürecinde kollajen fibril yapısı ve düzeni, damarlanmanın artıp artmaması, adiposit infiltrasyonu, inflamatuvar hücreler incelendi.

3.4. BİYOMEKANİK DEĞERLENDİRME

Biyomekanik değerlendirme Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Tavşanlar sakrifiye edilerek aşil tendonları distalde kalkaneusun bir kısmını ve proksimalde gastrosoleus kasının bir kısmını içerecek şekilde çıkartıldı. Tendonlar çıkarıldıktan hemen sonra taze olarak laboratuvara getirildi. Aşil tendonları sırası ile her iki ucundan test makinesinin (Testometric, Rochdale, England) klemplerine yerleştirildi. Tendonlara 10mm/dak hızında gerim uygulandı. Eş zamanlı olarak cihaza bağlı bilgisayarda da "stres - gerinim eğrileri" elde edildi. Elde edilen bu eğrilerde, gücün yükselip tepeye ulaştıktan sonra aniden düşmeye başladığı nokta, kopma kuvveti (Force Peak) Newton

cinsinden kaydedildi. Bunun yanında tendonların “Young Modulus” (N/mm^2) ve kopma anındaki uzama miktarı (mm) (Elongation at Break) kaydedildi.



Şekil 3.4.1: Testometric marka çekme cihazı



Şekil 3.4.2 : Klemplerin ucuna yerleştirilen tendon

Klemplerin ucuna yerleştirilen tendonlara 10mm/dk sabit hızda gerim uygulandı.

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatiksel analiz tendonların biyomekanik çalışma sonucunda elde edilen değerlerini karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

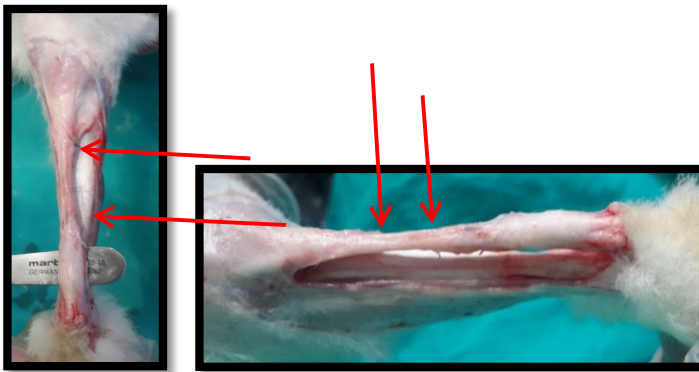
Kopma kuvveti, young modulus ve kopma anındaki uzama miktarı değişken değerlerinin kontrol grubu ve 3 deney grubu arasında istatistiksel olarak farklı olup olmadığının belirlenmesinde öncelikle Shapiro-Wilks testi ile normallik varsayımının sağlanıp sağlanmadığı incelenmiştir. Daha sonra her 3 değişken için de parametrik bir test olan Tek Yönlü Varyans Analizi uygulanmıştır. Bir diğer önemli varsayım olan varyans homojenliği varsayımı ise, Levene Testi ile incelenmiştir. Young modulus değişkeninde saptanan gruplar arası farklılık için hangi grubun farkı yarattığını saptamak amacıyla post-hoc analizi yapılmış, bu aşamada ikili karşılaştırmalar için Bonferroni testi uygulanmıştır.

Değişkenlerin görsel sunumu için kutu-çizgi grafikleri ile ortalama standart sapma grafikleri verilmiştir. Her 3 değişken için de tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama standart sapma çifti verilmiştir. Bütün analizler SPSS 22. Versiyon ile gerçekleştirilmiş; analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MAKROSKOPİK BULGULAR

Bütün denek gruplarında,defektin iyileştiği ve köprüleşmenin olduğu makroskopik olarak gözlemlendi. Ama “sham” grubunda diğer gruplara göre daha atrofik ve hacimsel olarak daha ince tendon iyileşmesi ile karşılaşıldı.



Şekil 4.1.1: “Sham” grubunda daha atrofik ve hacimsel daha ince iyileşme



Şekil 4.1.2 : EGF(+) grup



Şekil 4.1.3: Skafold + EGF(+) grubu

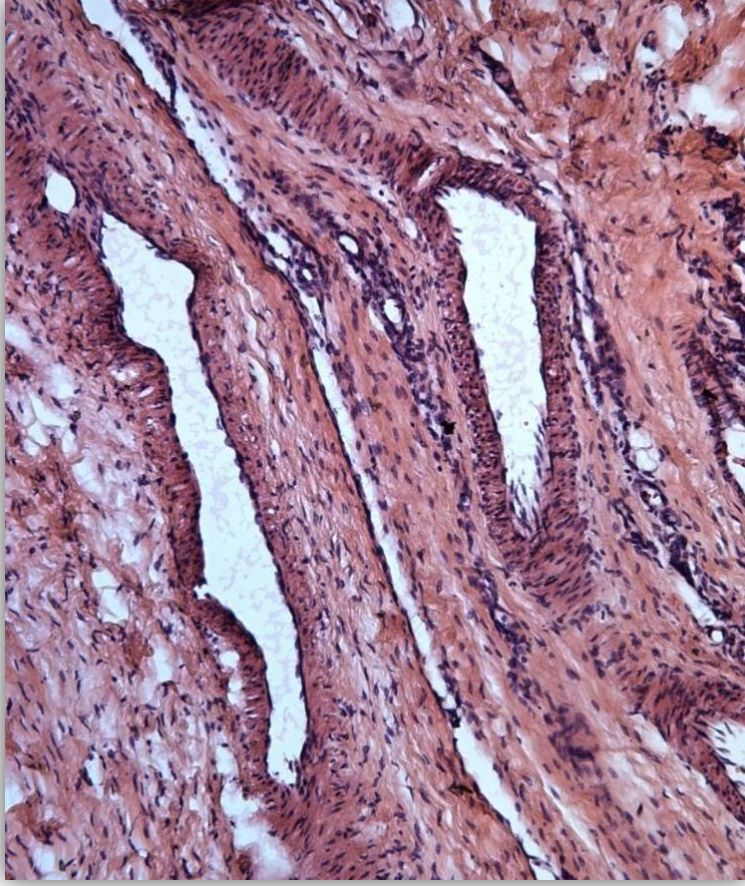
Bu iki grupta “Sham” grubuna göre daha iyi iyileşmenin olduğu makroskopik olarak saptandı.

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

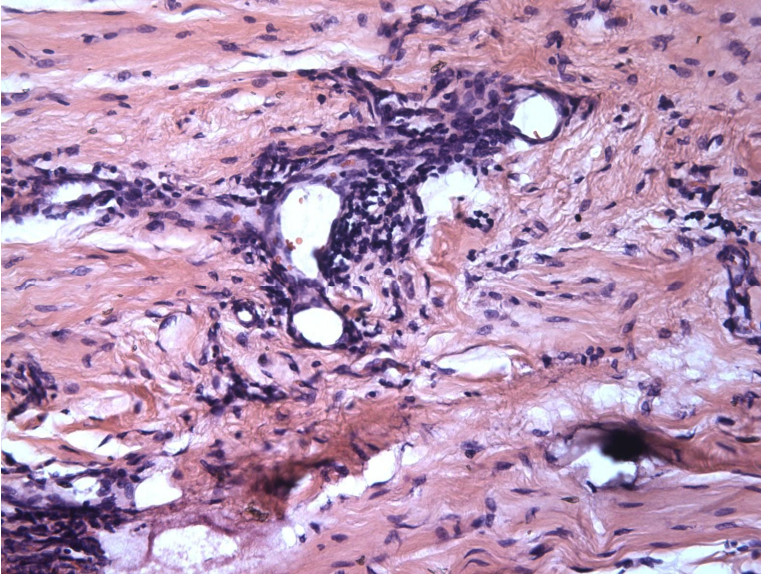
“Sham” Grubu



Şekil:4.2.1 : Sham grubu ışık mikroskopunda (dijital olarak birleştirilmiş görüntü)



Şekil 4.2.2 : Sham grubu ışık mikroskopisi (x10)



Şekil 4.2.3: Sham grubu ışık mikroskopisi (x20)

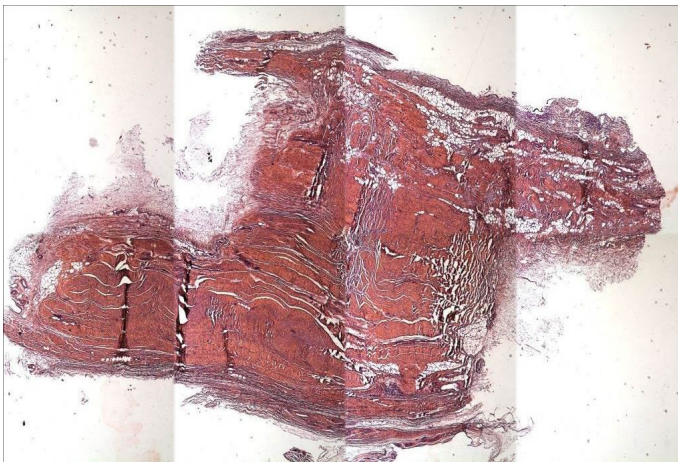
Bu gruptaki dokuların ışık mikroskopisi ile incelenmesinde, tendon içerisinde yeni damar formasyonunun olduğu yani anjiogenezisin olduğu, Tip 3 kollejenin yeni yapılmaya başlanmış olduğu görüldü. Nadir adipozit izlendi.

Defekt bölgesinde angiogenezisin olması ile, her damarda bulunan endotel hücreye komşu “Perisit” hücrelerinin (kök hücrelerin) defekt boyunca toplanması sağlanır. Bu sayede iyileşme için gerekli büyüme faktörlerinin ve hücrelerin defekt bölgesine gelmesi sağlanır. Adipositlerin bu yeni damar oluşumuyla birlikte aktive olan perisitler tarafından iyileşme bölgesine enerji kaynağı olarak defekt bölgesinde yapıldığını izledik.

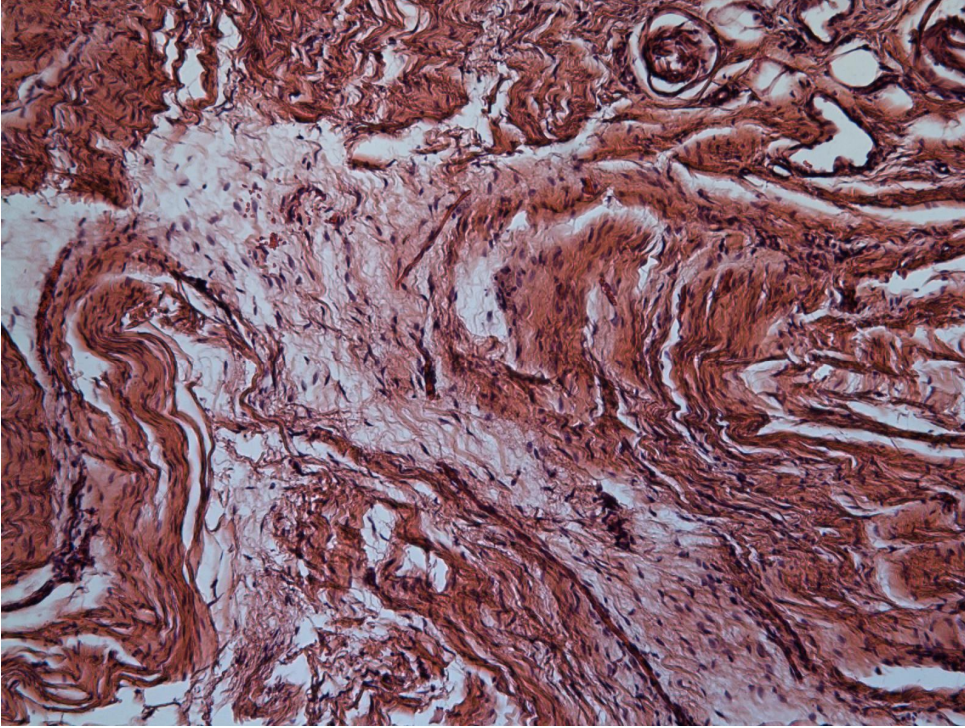
Normal, doğal tendon yapısında Tip I kollejenin baskın kollejen olduğu bilinmektedir. Tip III kollejenin tendon iyileşme evrelerinde ilk üretilen kollejen olduğu, tendon iyileşmesinin proliferasyon evresinde çok fazla arttığı, remodelizasyon evresinde yerini Tip I kollejene bıraktığı bilinmektedir. “Sham” grubunda Tip III kollejenin yeni üretilmeye başlanılmasının, tendon iyileşmenin erken safhasında olduğunu ve iyileşmenin çok yavaş ilerlediğini bize göstermiştir.

Tendon iyileşme bölgesinde görülen adipozitler enerji rezervi olarak görev yapmaktadır. Tendon iyileşmesinde hücrelerin büyüme, metabolik aktivite için fazla miktarda enerji gerekebilir. Adipozitler gerekli olan fazla enerji için kaynak sağlamaktadır. Bu grupta nadir adipozitlerin görülmesi yani enerji ihtiyacının çok fazla olmadığını göstermektedir. Enerji ihtiyacının az olması, metabolik aktivitenin zayıf, hücre proliferasyonunun yavaş, büyüme ve onarımın yavaş olduğu dolaylı olarak da tendon iyileşmesinin yavaş ilerlediğini göstermiştir.

EGF(+) Grup

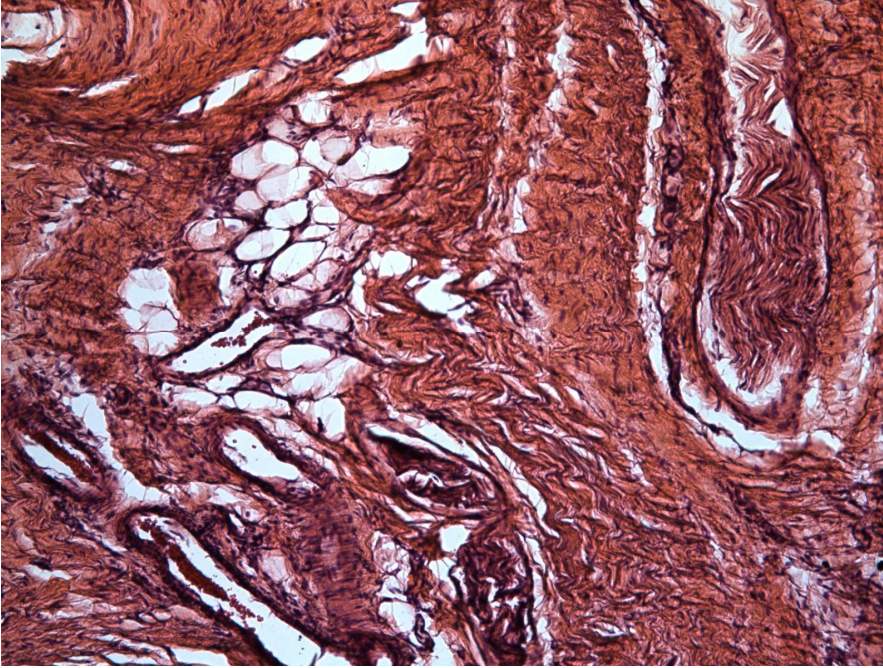


Şekil 4.2.4: EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (dijital olarak birleştirilmiş görüntü)

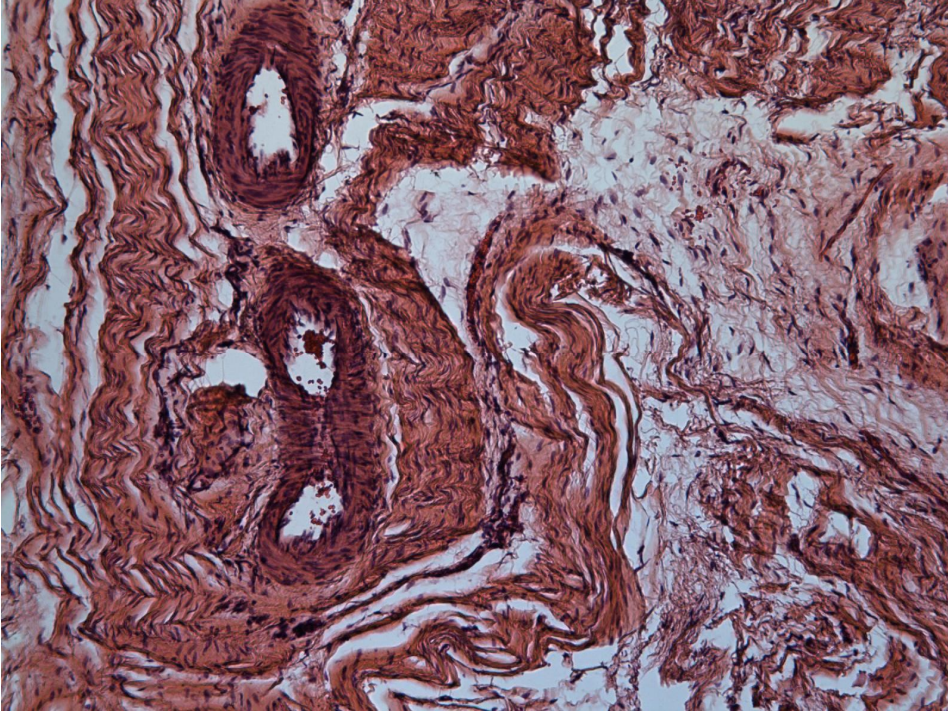


Şekil 4.2.5: EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10)

Tip III > Tip I kollajen hakimiyeti ve Periferel sinir tomurcuklanması görülmektedir



Şekil 4.2.6 : EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10)- Adipoz hücreler görülmektedir.



Şekil 4.2.7 : EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (x10)

Tip III kollajen hakimiyeti ve damar formasyonu görülmektedir.

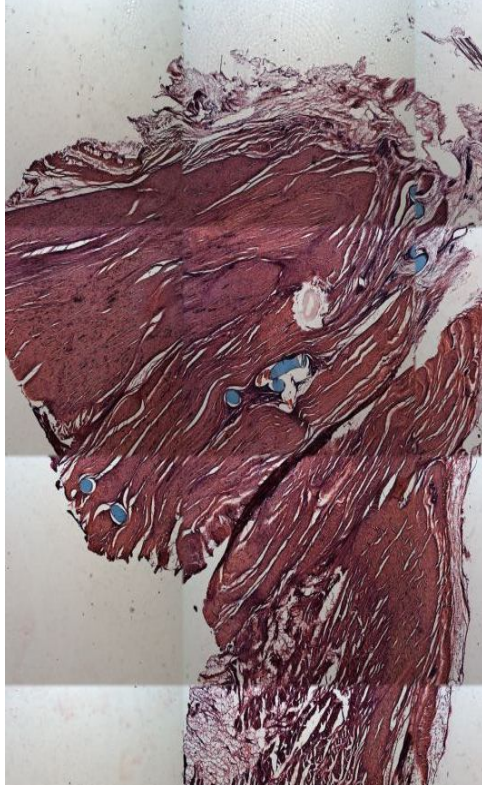
EGF(+) grubun ışık mikroskopi ile incelenmesinde, tendon içinde damar formasyonu yani anjiogenezis gözlemlendi. Perisit hücrelerin defekt boyunca toplandığı ve iyileşmenin devam ettiği görülmüştür.

“Sham” grubuna göre daha fazla adipozit dokunun olduğu görülmüştür. Adipozit dokunun çoğalması, bu grupta daha fazla enerji ihtiyacının olduğunu göstermektedir. Bu da dolaylı olarak hızlı metabolik aktivitenin olduğunu, daha aktif , hızlı proliferasyon ve onarımın olduğunu işaretini vermektedir.. EGF(+) grubunda, “Sham” grubuna göre daha aktif , daha hızlı onarımın olduğu ve tendon iyileşmesinin hızlı ilerlediğini göstermiştir.

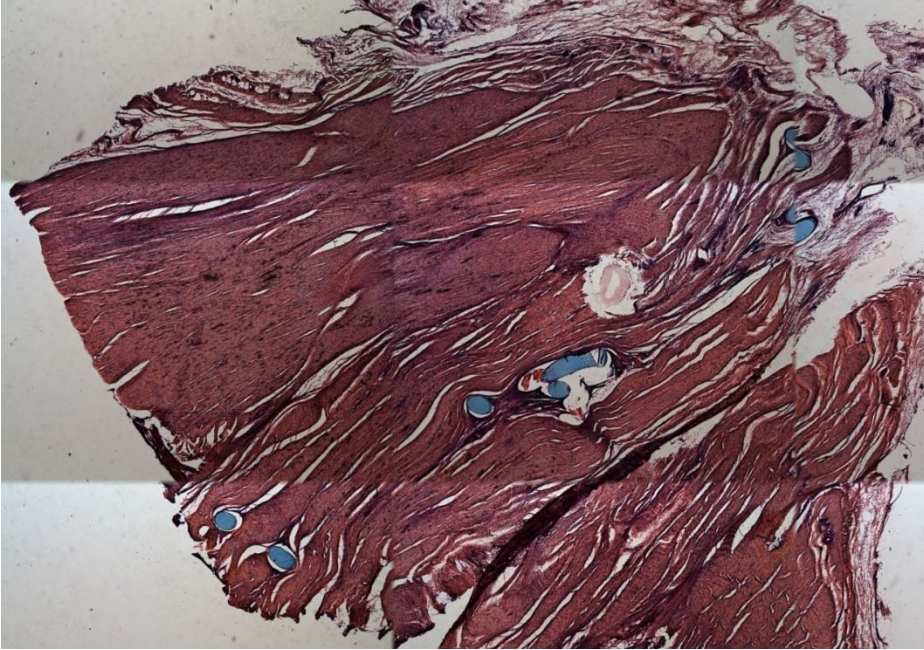
Tamamen tendon rejenerasyonu için, Tip I kollajene dönüşen ve fibroblastlar tarafından üretilen yüksek düzeyde Tip III kollajen görüldü. Bu grupta “ Sham” grubundan farklı olarak ayrıca az miktarda Tip I kollejenin olduğu görülmüştür. Bu grupta Tip I kollejenin az da olsa görülmesi, tendon iyileşmesinin “Sham” grubuna göre daha ileri safhada olduğu ve iyileşmenin daha fazla olduğunu göstermiştir.

Bu grupta ayrıca EGF in etkisi ile mezenkimal kök hücrelerden farklılaştığını düşündüğümüz periferel sinir tomurcukları da gözlemlendi.

Skafold + EGF(+) Grup



Şekil 4.2.8 : Skafold+EGF(+) grubu ışık mikroskopisi (dijital olarak birleştirilmiş görüntü)



Şekil 4.2.9 : Skafold+EGF(+) grubu ışık mikroskopisi

Skafold + EGF (+) grupta Tip I kollajen hakimiyeti görülmektedir.

Işık mikroskopisi ile inceleme sonrası, tendon içinde damar formasyonu yani anjiogenezis gözlemlendi.

Mezenkimal kök hücrelerden farklılaştığını düşündüğümüz periferel sinir tomurcukları bu grupta da gözlemlendi.

Diğer gruplara göre daha fazla Tip I kollojen gözlemlendi. Bu grubun neredeyse tamamı Tip I kollajenden oluştuğu görülmüştür. EGF (+) gruba göre daha az Tip III kollajen, daha fazla Tip I kollajen olduğu görüldü. Tip III kollajenlerin yerini Tip I kollajene bıraktığı görülmüştür. Tip I / Tip III kollajen oranının bu grupta arttığı ve normal tendon yapısına daha yakın tendon iyileşmesi elde edildiği görüldü. Aynı süre içinde bu grupta daha fazla Tip I kollajen sentezinin olduğu gözlemlenmiştir. Skafold ve EGF kombine uygulanmasıyla Tip I kollejenin daha kısa sürede elde edildiği, iyileşmenin bu grupta diğer gruplara göre daha hızlı olduğu görülmüştür

Adipoz doku miktarının, EGF(+) grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. Tip 1 kollejen hakimiyetinin olduğu bu grubun, rüptür sonrası 8. haftada aktif proliferasyon evresini geçtiğini ve iyileşmenin son evresinde olduğundan dolayı enerji ihtiyacının azaldığı saptanmıştır.

4.3. BİYOMEKANİK BULGULAR

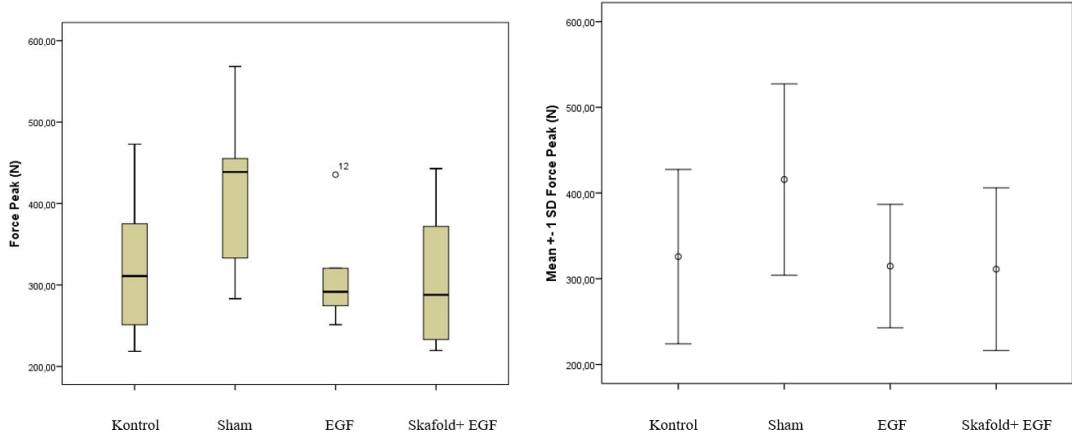
Kopma kuvveti (Force Peak), Young Modulus ve kopma anındaki uzama miktarı (Elongation at Break) değişkenlerinin değerlerinin 4 farklı grup arasında istatistiksel olarak farklı olup olmadığının belirlenmesinde öncelikle Shapiro-Wilks testi ile normallik varsayımının sağlanıp sağlanmadığı incelenmiş, söz konusu varsayımın her 3 değişken için de sağlandığı görülmüştür($p>0,05$). Bu nedenle her 3 değişken için de parametrik bir test olan Tek Yönlü Varyans Analizi uygulanmıştır. Bir diğer önemli varsayım olan varyans homojenliği varsayımı ise, Levene Testi ile incelenmiş ve her 3 değişken için de söz konusu varsayımın sağlandığı görülmüştür($p>0,05$). Söz konusu analiz sonuçlarına göre yalnızca “Young modulus” değişkeninde gruplar arası farklılık olduğu saptanmıştır($p<0,05$). Hangi grubun farkı yarattığını saptamak için Post-hoc analizi yapılmış, bu aşamada ikili karşılaştırmalar için Bonferroni testi uygulanmıştır. Post-hoc analizi sonucunda kontrol grubunun, EGF+ ve Skafold + EGF gruplarından farklı olduğu görülmüştür($p<0,05$).

Tablo 4.3.1 : Biyomekanik ölçüm sonuçları

	Denek	Kopma Kuvveti (N)	Kopmadaki Uzama Miktarı (mm)	Young Modulus (N/mm ²)
Sham Grubu	1	283,22	4,288	155,14
	2	438,75	14,237	156,22
	3	455,22	8,43	124,82
	4	333,13	10,576	72,35
	5	568,49	14,655	131,18
EGF (+) Grup	1	274,59	9,343	152,65
	2	435,51	17,576	92,29
	3	291,65	13,512	56,71
	4	320,48	15,085	80,12
	5	251,34	4,864	103,81
Skafold + EGF (+) Grubu	1	287,92	8,371	72,14
	2	233,1	6,687	68,05
	3	371,97	7,74	114,49
	4	219,57	16,132	41,87
	5	442,97	18,213	121,04

Tablo 4.3.2: Grupların kopma kuvvetleri, kopma anındaki uzama miktarları ve young moduluslerinin ortalama ve standart sapma değerleri

			Ortalama	Std. Sapma
Kopma Kuvveti (N)	Kontrol	5	325,8160	101,73547
	Sham	5	415,7620	111,58702
	Egf (+)	5	314,7140	72,08167
	Skafold+Egf	5	311,1060	94,99198
	Total	20	341,8495	98,70002
Kopma anındaki uzama miktarı (mm)	Kontrol	5	7,47820	2,018315
	Sham	5	10,43720	4,303751
	Egf (+)	5	12,07600	5,021165
	Skafold+Egf	5	11,42860	5,328872
	Total	20	10,35500	4,393808
Young modulus (N/mm ²)	Kontrol	5	190,6320	61,88776
	Sham	5	127,9420	34,09574
	Egf (+)	5	97,1160	35,61472
	Skafold+Egf	5	83,5180	33,43067
	Total	20	124,8020	57,85016



Şekil : 4.3.1: Kopma kuvvetinin gruplar arasında karşılaştırılmasını gösteren göre kutu-çizgi (sol) ve ortalama -standart sapma grafikleri (sağ)

Kopma kuvvetlerinin istatistiksel analizi için 3 deney grubu, kontrol grubuyla ve deney grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. “Sham”, EGF(+) ve Skafold + EGF(+) grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). “Sham”, EGF(+) ve Skafold+EGF(+) grupları kendi aralarında da karşılaştırıldığında da 3 grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Kopma anındaki uzama miktarları (mm), kontrol grubu ve 3 deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

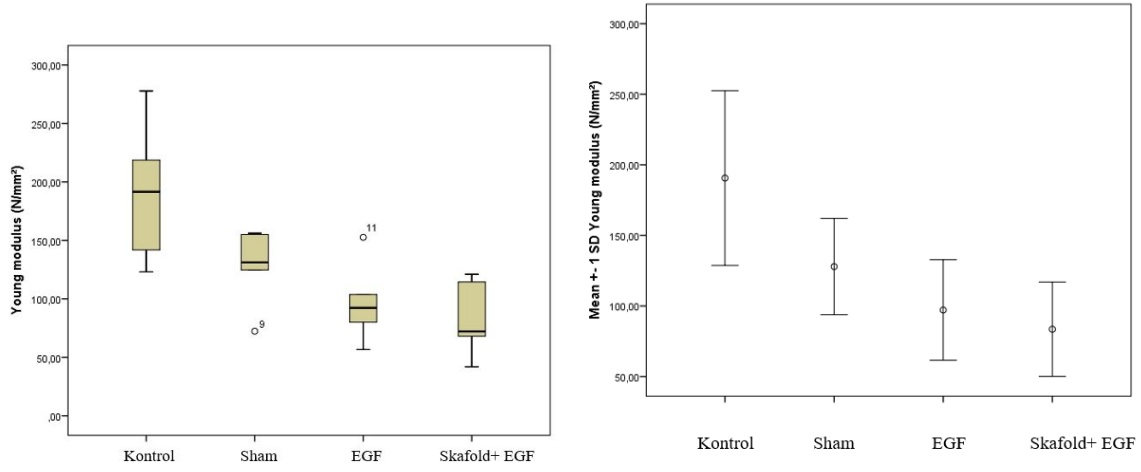
Kopma anında kaydedilen 3 farklı değerden sadece “Young modulus” değerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). Grupların ikili karşılaştırılması sonucunda farkı yaratan gruplar bulunmuştur. EGF(+) ve Skafold+EGF(+) gruplarının kontrol grubundan anlamlı olarak farklı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu iki deney grubunda kontrol grubuna göre “Young modulus” ortalamasının daha düşük olduğu saptanmıştır. Sham, EGF(+) ve Skafold+EGF(+) gruplarının kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda gruplar arasında “Young modulus” açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.3.3 : Grupların kendi aralarında young moduluslerinin karşılaştırılmasını gösteren tablo - Kontrol grubunun, EGF+ ve Skafold+ EGF grupları arasında ile anlamlı fark olduğu sarı ile vurgulanmıştır.

Young modulus (N/mm²)

Bonferroni

(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	p	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	Sham	62,69000	27,16364	,208	-19,0273	144,4073
	Egf	93,51600*	27,16364	,020	11,7987	175,2333
	Skafold+Egf	107,11400*	27,16364	,007	25,3967	188,8313
Sham	Kontrol	-62,69000	27,16364	,208	-144,4073	19,0273
	Egf	30,82600	27,16364	1,000	-50,8913	112,5433
	Skafol+Egf	44,42400	27,16364	,729	-37,2933	126,1413
Egf	Kontrol	-93,51600*	27,16364	,020	-175,2333	-11,7987
	Sham	-30,82600	27,16364	1,000	-112,5433	50,8913
	Skafol+Egf	13,59800	27,16364	1,000	-68,1193	95,3153
Skafol+Egf	Kontrol	-107,11400*	27,16364	,007	-188,8313	-25,3967
	Sham	-44,42400	27,16364	,729	-126,1413	37,2933
	Egf	-13,59800	27,16364	1,000	-95,3153	68,1193



Şekil 4.3.2 : Gruplar arasındaki Young modulus değerlerini karşılaştıran kutu – çizgi (sol)ve ortalama-standart sapma (sağ) grafikleri

5. TARTIŞMA

Aşil tendon kopmalarının tedavisi konusundaki tartışma halen devam etmektedir. Kopmanın oluş şekli, ne tür bir aktiviteyle meydana geldiği, hekime başvurma süresi ve tedaviye başlama zamanı gibi soruların cevabı halen netlik kazanmamıştır. Özellikle açık cerrahi yöntem ile yüksek oranda cilt komplikasyonuna, enfeksiyona ve derin ven trombozuna neden olduğundan dolayı konservatif tedavi bir dönem önerilmiş ama konservatif tedavi ile rerüptür oranının yüksek olması, gastrosoleus kas grubunda güçsüzlük ve atrofi, immobilizasyon süresinin uzun olması ve günlük aktiviteye geç dönüş gibi sorunlar konservatif yöntemlerden uzaklaşılmasına neden olmuştur.

Konservatif veya cerrahi teknik ile tedavi edilen aşil tendon yaralanmaları, iyileşmenin geç dönemlerinde rerüptürler ile tekrar karşımıza çıkabilmektedir. Tendon tamirleri üzerine yapılan çalışmalarda, özellikle de aşil tendonu ile olanlarda tekrardan kopmalar, insanlarda en çok 4 – 12. haftalar arasında görülmektedir(12). Birçok tendon çalışması, tendon onarımından sonra kontrollü erken hareketin tendon yapışıklıklarını azalttığını, gerilme gücünün oluşumunu hızlandırdığını, fakat tekrardan kopma insidansını da artırdığını göstermektedir(18). Bu yüzden aşil tendon rüptürlerine güncel yaklaşım, cerrahi onarım ve erken hareket şeklindedir(12, 52, 104). Cerrahi onarımda amaç, tendon fizyolojisini bozmayacak şekilde mümkün olduğunca güçlü bir onarım yapılarak, rerüptür riskini ve

immobilizasyon süresini en aza indirmektir(104-106). Yani tendon iyileşirken normal anatomi ve histolojiye ne kadar yakın olarak iyileşirse, o kadar rerüptür oranı azalacak ve o kadar erken mobilizasyona imkan sağlayacaktır. Tendon tamiri sonrasında tam iyileşme oluncaya kadar geçen süre de önemlidir. Bu süre özellikle sporcularda daha da önem kazanmaktadır.

Aşıl tendon yaralanmasından sonra iyileşme sıklıkla beklenildiği gibi iyi olmamaktadır. Genelde doğal tendondan mekanik olarak daha güçsüz şekilde fibrovasküler skar ile iyileşme olmaktadır. Bu skar formasyonu Tip I / Tip III kollajen oranındaki değişim sonucunda meydana gelmektedir. Tendon iyileşmesinde stratejeler, bu oranın doğal tendona en yakın olacak düzeye getirmeye yöneliktir. Bunu sağlayabilmek için bir arayış ve tartışma devam etmektedir.

Tüm yara iyileşmelerinde tendon da dahil olmak üzere ortak bir iyileşme mekanizması vardır. Yaralanma bölgesinde öncelikle fibrin pıhtı oluşumu meydana gelmekte, bu pıhtı içerisinde kan hücreleri, fibronektin ve trombositler hapsedilip yıkıma uğramaktadırlar. Yıkılan hücrelerden salınan kemotaktik faktörler ve ortama gelen lokal büyüme faktörlerinin etkisi ile iyileşme süreci başlamaktadır(107). İyileşme sürecinin başlamasıyla ortama gelen büyüme faktörleri ve diğer biyolojik ajanların ortamdaki konsantrasyonu artırılarak iyileşmenin yönlendirilebileceği ve daha hızlı bir iyileşme elde edilebileceği gösterilmiştir(4). Büyüme faktörlerinin özellikle inflamasyon fazında etkin rol oynadığı gösterilmiştir. Tendon rüptürü sonrası ilk 10 günde büyüme faktörlerinin tendon iyileşmesini hızlandırdığı ve yapışıklığı azalttığı gözlemlenmiştir(4). Bu bilgiye dayanarak çalışmamızda EGF enjeksiyonlarını rüptür tamiri sonrası ilk 10 günde gün aşırı olacak şekilde uyguladık.

Her büyüme faktörünün tendon defekt bölgesinin aynı bölgesine etkili olmadığı ve herbirinin farklı defekt bölgelerinde farklı etkilerinin olduğu bilinmektedir. TGF β 'nın tendon çevresinde özellikle defekt proksimalinde yoğunlaştığı saptanmıştır. bFGF, EGF ve IGF'in tendonun defekt olan bölgede defekt köprüleşmesine katkı sağladığı gösterilmiş, PDGF ve VEGF ise tendon defekt tamiri sonrası tamir bölgesinin tamamında ve özellikle tamir bölgesinin etrafında etkinlik göstermektedir(4).

Cerrahi tedavilere ek olarak farklı biyolojik ajanlar ve büyüme faktörleri günümüzde uygulanmaktadır. Bunlar; trombositten zengin plazma, kemik iliği aspiratı, kemik morfojenik protein, mezenkimal kök hücreler ve çeşitli büyüme faktörleridir(bFGF , HGF, rhPDGF-BB, TGF-b , VEGF vs.)(5). Sonuçta hedeflenen, daha iyi ve hızlı tendon iyileşmesini sağlamak, rerüptür oranını azaltmak ve en iyi fonksiyonel sonuçları elde etmektir. Aşıl tendon tamiri için biyolojik ajan ve büyüme faktörlerinin kullanımı ile ilgili fikir birliği ve klavuz yoktur.

Trombositten zengin plazma, trombositlerde bulunan granüllerden çeşitli büyüme faktörleri(TGF- β , PDGF, IGF ve VEGF vs.) salınarak etki gösterir. Trombositten zengin plazma revaskülarizasyonu uyararak mikroskobik düzeyde iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir(86). Ama yapılan bir tavşan çalışmasında, trombositten zengin plazma enjeksiyonlarının iyileşmenin ilerleme göstergesi olan kollajenlerin çapında azalmaya neden olduğu saptanmıştır(108). Aşıl tendon rüptür sonrası iyileşmeye yardımcı olabilmesine rağmen kronik aşıl tendonopatilerinde yetersiz kaldığı görülmüştür. Bu yüzden kronik aşıl tendinopatilerinde kullanımı ile ilgili yeterli kanıt bulunmamaktadır(109-111). Ayrıca insanlarda yapılan trombositten zengin plazma ile ilgili çalışmalarda, plasebodan üstün olmadığı da saptanmıştır(112-114).

Kemik iliği aspiratı kullanılabilen diğer biyolojik ajandır. Kemik iliği aspiratının asıl görevi yaralanma bölgesine mezenkimal kök hücre salınmasını (MSCs) sağlamaktır. Preklinik aşıl rüptürü yapılan çalışmada, kemik iliği aspirasyonu uygulanan tendonlardaki sonuçların mezenkimal kök hücre uygulanan ve kontrol grubundakinden daha kötü olduğu saptanmıştır(115).

Mezenkimal kök hücrelerinin, aşıl tendon tamirinde anti-apoptotik etkiyi artırarak tamiri arttırdığı yönünde hipotezler mevcuttur(102). Tenositlerin farklılaşmasında etkili olabilirler. Mezenkimal kök hücrelerin en büyük etkisinin olduğu dönem inflamasyon fazıdır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücrenin ilk 3 haftada kollajen organizasyonunu arttırdığı ama iyileşmenin daha sonraki dönemlerinde anlamlı fark olmadığı saptanmıştır(103). Mezenkimal kök hücrenin dikiş mataryeline entegre edilmesi ile de çalışmalar yapılmıştır. Mezenkimal kök hücre ile yapılan preklinik çalışmada, dikişe emdirilmiş mezenkimal kök hücrenin, injeksiyondan daha üstün olduğu saptanırken bu iki grupta kontrol grubuna göre biyomekanik olarak daha başarısız olduğu bulunmuştur(116). Mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesinde alternatif yöntem adipoz doku kaynaklı kök hücrelerdir. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler Tip I kollajen, FGF ve VEGF'i artırarak aşıl tendonundaki tensil gücü artırır. Bununla birlikte TGF- β düzeyi adipoz kaynaklı kök hücre tedavisi ile azalır ve büyüme faktörleri ile adipoz kaynaklı kök hücrelerinin arasındaki kompleks ilişkinin ve bunların tendon iyileşmesi üzerine olan etkilerinin daha da araştırılması gereken konudur(117). Kök hücrelerin tendon tamirini arttırmasına yönelik olarak major bulgular olmasına rağmen Kraus ve ark. (118) tarafından olumsuz yönleri ortaya konulmuştur. Rat aşıllarının yaralanmadan 28 gün sonra mezenkimal kök hücre uygulanan gruptaki biyomekanik testlerin kontrol grubuna göre daha kötü olduğu gösterilmiştir(118).

Çeşitli büyüme faktörleri de tendon rüptür tedavilerinde kullanılmaktadır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), erken iyileşme fazında artarak anjiogenik ve mitojenik etki gösterir. Tip I ve Tip III kollajen üretimini artırarak tendon iyileşmesine katkı sağladığı bilinmektedir. Rat rotator cuff rüptürlerinde yapılan çalışmada pozitif etkisinin olduğu gösterilmiştir(119). Hepatosit büyüme faktörü (HGF) trombositten zengin plazmada bulunur ve trombositten zengin plazmada bulunur ve anti-inflamatuar etkisi bulunmaktadır. Rat aşillerinde yapılan çalışmada, aşırı ekstrasellüler matriks üretimini ve myofibroblast farklılaşmasını azaltarak tendon tamirin sırasında skar formasyonunu azalttığı gösterilmiştir(120). Rekombinant insan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (rhPDGF) tendon iyileşmesini çeşitli mekanizmalar ile hızlandırmaktadır. Hayvan çalışmasında matriks remodelizasyonu, kollajen sentezi, kanlanmayı ve hücre proliferasyonunu artırarak tendonun mekanik kuvvetini ve hareket aralığını iyileştirdiği gösterilmiştir(121, 122), ama uygulanma zamanı ve doz ayarı ile ilgili ek çalışmalara ihtiyaç vardır. TGF- β , hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu düzenler ve Tip I ve Tip III kollajen üretiminin artmasını sağlar(87). Hou ve ark. TGF- β ile tedavi edilen tendonlarda, mekanik kuvvetlere karşı direncin arttığını göstermiştir.(123). İnsulin benzeri büyüme faktörünün (IGF), tenosit migrasyonunu, kollajen sentezini indüklediği ile ilgili bilgiler hayvan çalışmaları ile hala araştırılmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjigenezisi ve kapiller geçirgenliği artırmaktadır. VEGF ile aşıl tendon tamiri sonrası 2. haftada anlamlı tensil kuvvette artış gözlenmesine rağmen 4. hafta sonunda tensil kuvvetler arasında anlamlı fark bulunamamıştır(124). Yukarıda bahsettiğimiz biyolojik ajanlar aşıl tendon tamiri için umut vadetmektedir. Tendon iyileşmesi ile ilgili birçok yeni bilgiler mevcut olmasına rağmen bunların günümüzde sadece çok az kısmı klinik uygulama aşamasına gelebilmiştir. Çünkü bu çalışmaların büyük çoğunluğu prelinik araştırmalardan oluşmaktadır ve bunların insanlardaki etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılacak klinik denemeler için hala yeterli kanıt düzeyine ulaşılmamıştır. Sonuç olarak, aşıl tendonu için uygun tedavi protokolü ve görüş birliği olan biyolojik ajan mevcut değildir ve bu yüzden normal tendona daha yakın iyileşme elde etmek için hala arayış devam etmektedir.

Litaratürde biyolojik ajan ve büyüme faktörlerinin daha iyi tendon iyileşmesini sağlamak için birçok prelinik çalışma yapılmış ama bunlardan çok azının ise günümüzde klinik kullanımı mevcuttur. Buna rağmen EGF'in tendon iyileşmesi ile ilgili, prelinik çalışmaya ve güncel klinik kullanım alanına litaratürde rastlanılmamıştır. EGF'in kas-iskelet sisteminde rutin kullanım alanı olmadığı için tendon üzerine etkileri de bilinmemektedir.

Bilinmiyeni ortaya koymak ve litaratüre katkı sağlamak amacıyla bir büyüme faktörü olan EGF'in tendon iyileşmesine olan etkileri araştırılmıştır.

Bizim çalışmamızda kullandığımız EGF' in günümüzde özellikle kronik yara problemlerinde, cilt defektleri gibi kas- iskelet sistemi dışında aktif klinik kullanımı mevcuttur. Cilt defektlerinde lokal olarak uygulanan EGF'in kronik yara kapanmasında, epidermis köprüleşmesinde etkili olduğu bilinmektedir(6). Brown ve arkadaşları, sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler ve 7-14 gün sonra yara gerim kuvvetinin %200 arttığını bildirmişlerdir(101). İn vivo olarak anjiogenezi uyardığı bilinen EGF ile yapılan klinik çalışmalarda, gümüş sülfadiazin içine koyularak kronik yaralara uygulandığında epitelizasyonu artırdığı saptanmıştır(96). Özellikle intralezyonel veya perilezyonel EGF enjeksiyon uygulamalarının, topikal uygulamalardan daha etkin olduğu gösterilmiş.

Çalışmamızda 1 cm lik tendon bölümü eksize edilerek çıkarılıyor ve sonuçta 1 cm lik defektif tendon rüptür modali oluşturularak bunun iyileşmesi inceleniyor. Aşil tendonları ile yapılan çalışmaların birçoğunda defekt oluşturmadan, tendon parçası eksize etmeden sadece transvers kesi ile tendon rüptür modelleri incelenmiştir. Bu yüzden bizim çalışmamız diğer çalışmalara göre biraz farklılık arz etmektedir.

Aşil tendonunda normal de hakim olan kollajen Tip I kollajen olmasına rağmen yaşın ilerlemesi ile birlikte Tip I kollajende azalma, Tip III kollajende artma meydana gelir. Tip III kollajen, Tip I kollajen kadar esnek değildir. Tendon da meydana gelen bu dejenerasyon ile tendonun elastikiyetinin azalmasına ve rerüptüre yatkınlığının artmasına neden olmaktadır(125).

Normal tendonda Tip I kollojen hakimiyeti mevcutken, rüptür sonrası tamir bölgesinde ilk önce önemli ölçüde Tip III kollojen sentezi olur. Artan Tip III kollajen iyileşmenin ileri evrelerinde yerini daha dayanıklı olan Tip I kollajene bırakır. Tip III kollojen tensil (germe) kuvvetlere karşı çok az dirençlidir, bu nedenle tendonu spontan rüptürlere karşı daha duyarlı hale getirir(12). Tendon rüptür tedavilerinde hedeflenen, iyileşme sonunda Tip I kollajen hakimiyetinin elde edilmesidir. Tip I / Tip III oranı ne kadar yüksek ise rerüptür oranı o kadar düşük olacak ve komplikasyon oranı o kadar az olacaktır. Sonuç itibariyle normal tendona en yakın ve en hızlı tendon iyileşmesi elde edilebilmek için yüksek miktarda Tip I kollajen sentezinin olması kritik öneme sahiptir(126). Bunu sağlamak amacıyla Tip III kollajenden Tip I kollajene dönüşüm, iyileşmenin erken döneminde indüklenebilir. Bu

indüksiyonu sağlamak için cerrahi tedaviye çeşitli biyolojik ajanlar eklenmektedir. Ama hangi biyolojik ajanın ne zaman uygulanacağı ile ilgili yukarıda bahsedildiği gibi hala tartışma devam etmektedir. Bu konuda mevcut literatüre katkı sağlayabilmek amacıyla çalışmamızda defektif rüptür sonrası ilk 10 gün EGF enjeksiyonu uyguladık ve bunun iyileşme üzerine olana etkilerini gözlemledik.

Tendon rüptürlerinde hedeflenen, iyileşme sonunda Tip I / Tip III kollajen oranının yüksek olmasıdır. Bu amaçla planladığımız çalışmamızın histolojik incelemesinde, aynı süre içinde herhangi bir müdahale yapılmayan “Sham” grubunda yeni Tip III kollajen oluşmaya başlamış olduğu görülürken, EGF(+) grupta ileri düzeyde Tip III kollajen ve az miktarda Tip I kollajen olduğu gözlemlenmiştir. EGF eklenmesi ile kollajen sentezinin hızlandığı, bir miktar Tip I kollajene dönüşümün elde edilmesi ile de kollajen sentez aşamasında daha ileri düzeye ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Sonuç itibarıyla aynı süre içinde EGF’in etkisiyle kollajen sentezinin arttığı, iyileşme sürecinin hızlandığı ve “sham” grubuna göre iyileşme evrelerinde biraz daha ileri evrede olduğu görülmüştür.

EGF’in pozitif etkisini açıklayabilecek diğer elde edilen bulgu ise en fazla EGF(+) grupta artan adipozit doku miktarıdır. Adipozit doku miktarındaki artışın sebebi, EGF’in etkisiyle hızlanan sentez ve proliferasyon için gerekli olan enerji ihtiyacını karşılayabilmektir. EGF(+) grupta daha fazla adipoz dokunun görülmesi; daha hızlı bir şekilde sentez ve proliferasyonun olduğunun, sonuçta iyileşmenin “sham” grubuna göre daha hızlı ilerlediğinin bir göstergesidir. Bu elde edilen bulgular ışığında rüptürden sonraki ilk 10 günde gün aşırı epidermal büyüme faktörü enjeksiyonunun tendon iyileşmesi üzerinde etkin ve efektif rol oynadığı çıkarımını elde edebiliriz.

Skafoldun, tendon remodilizasyonu için hücrelerin içine büyüyebileceği mekanik destek sağladığına inanılır(127). Aşıl tendon tamiri için optimal bir skafold, 8 hafta içinde kullanılan materyalin tamamen kollajenden zengin doku ile birleşmesi sonucunda tendon defektinde doğal ve hızlı köprüleşmeyi sağlayabilmektedir(128). Büyüme faktörlerinin ve biyolojik ajanların yarılanma süreleri kısa olabilir. Bu yüzden enjeksiyon sonrası rüptür bölgesinden hızlıca elemine olarak etkinliği azalabilmektedir. Skafold ve büyüme faktörleri kombine kullanılırsa, büyüme faktörlerinin ortamda uzun süre kalması sağlanarak büyüme faktörlerinin etkinliğini artırdığı düşünülmektedir. Skafold aynı zamanda, hücre migrasyonu ve iyileşme dokuları için klavuz çatı görevi de görür. Bu yüzden skafold ve büyüme faktörlerinin kombine kullanılması ile teorik olarak en iyi iyileşmenin elde edileceği düşünülmektedir. Bizde bu amaçla polikaprolaktondan oluşan biyodönüşebilen skafold

kullandık. Çalışmamızda kullanılan polikaprolakton (PCL) skafold, yapılan hayvan çalışmasında defektif kemik tamirinde etkin rol oynadığı da gösterilmiştir(129).

EGF'in yanında biyodönüşebilen polikaprolakton skafoldun da defektif bölgeye yerleştirilmesi sonucunda aynı süre içinde histolojik incelemede, tamamen Tip I kollajenin hakim olduğu tendon elde edilmiştir. Diğer gruplara göre daha fazla Tip I kollajen bulunması, bu grupta aynı süre içinde daha ileri bir tendon iyileşmesinin elde edildiğini göstermiştir. EGF(+) grup ile karşılaştırıldığında, skafold + EGF(+) grubunda daha az adipoz doku ve Tip III kollajenin olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular ışığında, Skafold+EGF(+) grubunda aynı süre içinde aktif proliferasyon evresinin geçildiği ve aktif sentezin azalması ile orantılı olarak adipoz doku gereksiniminin de azaldığı çıkarımına ulaşabiliriz. Skafold+EGF(+) grupta Tip III kollajenin az olduğu ve yerini Tip I kollajene bıraktığı görülmüştür. Tendon iyileşmesinde hedeflemiş olduğumuz, erken dönemde Tip III kollajenden Tip I kollajene dönüşümün skafold+EGF ile çok iyi indüklenmiş olduğunu gördük. Tendon defekt bölgesini dolduracak boyutta polikaprolakton skafoldun eklenmesi ile, tendon iyileşmesindeki basamakların daha hızlı bir şekilde geçilmesine sebep olduğu görülmüştür. Polikaprolakton skafoldun defekte yerleştirilmesi ile, tendon iyileşmesi sırasında defektin doldurulması için vakit kaybedilmeden var olan iskelet üzerinden tamirin ilerlemesi sonucunda aynı süre içinde daha ileri tendon iyileşmesi elde edilmiştir. Bir başka ifadeyle; Tip III kollajenin, defekt bölgesini doldurarak oluşturacağı daha sonra Tip I kollajene dönüşecek olan iskeletin işlevini polikaprolakton skafoldun yapması ile Tip I kollajen sentezindeki basamakların daha hızlı ilerlemiş olduğu ve daha kısa sürede hedeflenen Tip I kollajen hakimiyetinin elde edildiği şeklinde yorumlanabilir. Polikaprolakton skafoldun bu pozitif etkisi literatürde yapılan başarılı skafold çalışmalarıyla uyumlu olduğu da görülmüştür(128). Sonuçta; Polikaprolakton skafold, büyüme hormonlarının etkinliğini artırmasıyla defektif tendon tamirlerinde efektif rol oynayabileceğini göstermiştir.

Aynı sürede 3 farklı grupta da farklı düzeylerde histolojik iyileşme elde edilmiştir. Aynı sürede en fazla iyileşme Skafold + EGF(+) grubunda gözlemlenirken, en az iyileşme "Sham" grubunda olmuştur. Yani EGF eklenmesiyle iyileşme hızlanırken, skafold ve EGF kombine eklenince en hızlı histolojik iyileşme olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu çalışmayı yaparken beklemediğimiz sonuç ise, EGF enjeksiyonu ile tendon içerisinde periferik sinir tomurcularının görülmesidir. Bunun da büyüme faktörü olan EGF in indüksiyonu sonucu olabileceği düşünülmüştür.

8. hafta sonunda sakrifiye edilen tavşanların aşil tendonlarında histolojik inceleme yanında biyomekanik inceleme de yapılmıştır. Biyomekanik inceleme için yapılan çekme testi sonucunda elde edilen kopma kuvvetleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 3 deney grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Her grubun teker teker kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da kopma kuvvetlerinin kontrol grubuyla anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Kopma anındaki uzama değerleri açısından da gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. EGF ve Skafold+EGF grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük young modüluse sahip olduğu saptanmıştır. Ama deney grupları arasında young modulus açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Biyomekanik çalışma sonucunda elde edilen kopma kuvvetlerinin ortalamalarına bakıldığında ise EGF ve Skafold+EGF gruplarının kontrol grubuna yakın değerler olduğu görülmüştür. EGF'in tedaviye eklendiği gruplarda, sham ve kontrol grubuna göre kopma kuvvetinde anlamlı farkın olmaması EGF'in tendon iyileşmesine olumsuz etkisinin de olmadığı görülmüştür. Ama EGF'in tendon üzerine biyomekanik olarak etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla denekten oluşan ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızın kısıtlılıkları ise, tendonlar histolojik ve biyomekanik olarak sadece 8. haftada incelenmişlerdir. Uzun dönem ve ara takip sonuçlarımız mevcut değildir. 8 haftadan daha kısa süredeki veya 8 haftadan daha uzun dönemdeki süreçte 3 grup arasında histolojik ve biyomekanik olarak anlamlı fark olup olmadığı anlamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma yapılırken oluşturulan tendon defektlerinin 1 cm olmasına dikkat edilmiş ve standardize edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası bunu anlayabilmek için de defekt kenarındaki tendon uçlarına ilk cerrahi sırasında emilmeyen prolen suture ile tespit dikişi atılmıştır. Tendon tamiri sonrasında tespit dikişlerinden saptadığımız iyileşmiş defekt bölgesinin bazı tavşanlarda 1 cm değil de 2-3 cm boyutundaki olduğu görülmüştür. Bunun da büyük ihtimalle tavşanların ekstansiyonda olan ayak bileği postüründen dolayı olabileceği ve bunu engellemek için de uzun süre atel ile immobilizasyon uygulanmadığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bunun özellikle EGF ve Skafold+EGF grubundaki biyomekanik çalışma için ayırdığımız 3 tavşanda olduğu, bütün tavşanlarda olmadığı gözlemlenmiştir. Buna rağmen 2-3 cm kadar olan defekt bölgesinde bile köprüleşmenin olduğu tendon bütünlüğünün sağlandığı gözlemlenmiştir. Ama bu şekilde 2-3 cm defekt tamiri ile iyileşen daha fazla tamir bölgesi bulunan tendonların özellikle çekme testinde EGF(+) ve Skafold+ EGF gruplarında az da olsa kopma kuvveti ortalamalarını etkilemiş olabileceği, bu tendonların beklenenden daha düşük kuvvetlerde kopmuş olabileceği

düşünülmüştür. 2-3 cm defekt olmasına rağmen köprüleşmenin iyi olduğu ve histolojik olarak iyi bir tamir bölgesinin olduğu gözlemlenmiştir. Belki bu tendonlarda EGF'in pozitif etkileri sonucunda iyi bir defekt tamirinin olduğu çıkarımı yapılabilir.

Sonuç olarak tedaviye EGF ve skafold eklenmesi, tendon iyileşmesi sürecinde Tip I / Tip III kollajen oranını arttırmış ve histolojik olarak daha iyi bir tendon iyileşmesi elde edilmesini sağlamıştır. Bunun yanında biyomekanik olarak kontrol grubundan ve sham grubundan anlamlı bir fark olmamasıyla, EGF'in tendon iyileşmesinde negatif etkisinin olmadığı da saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bizim hipotezimiz olan; EGF uygulanması ile damarlanmanın artması, damarda endotel hücreye komşu “ Perisit” hücrelerin (kök hücrelerin) defekt boyunca toplanması ve iyileşmede gerekli enerjinin sağlanabilmesi için tendon defekt bölgesinde yağ hücrelerinin gelişmesinin görülmesi, yüksek doku onarımının olabileceğini histolojik olarak göstermiştir.

Biyomekanik olarak tendonların kopma kuvvetleri karşılaştırıldığında, 3 deney grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. EGF'in biyomekanik olarak sham ve kontrol grubuna göre üstünlüğü olmadığı gibi tendon biyomekaniğine negatif etkisi de saptanmamıştır.

Aşıl tendon rüptürlerinin tedavisinde, cerrahi tedaviye ek olarak EGF uygulanması ile sham grubuna kıyasla normal histolojiye daha yakın ve daha uygun iyileşme elde edilmiştir. Polikaprolakton skafoldun EGF ile kombine uygulanmasıyla ise histolojik olarak en etkin, normal tendona en yakın tendon iyileşmesi elde edilmiştir. Skafoldun boşluk doldurarak ve büyüme faktörünün etkinliğini artırarak daha az Tip III kollajen formasyonu ve böylece daha hızlı tendon tamiri olabileceği savı ortaya çıkmıştır.

Bu çalışma bize, daha önce tendon üzerine etkilerinin bilinmediği EGF'in tendon rüptür tamirinde olumsuz etkilere yol açmadığını göstermiştir. Tendon rüptür tedavisindeki klinik uygulamalarda EGF'in de yer alabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Nunley JA. *The Achilles Tendon: Treatment and Rehabilitation*: Springer New York; 2008.
2. Williams J. Achilles tendon lesions in sport. *Sports medicine*. 1993;16(3):216-20.
3. Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports*. 1997;7(2):107-12.
4. Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, Zhao C, An KN. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg*. 2004;53(4):393-7.
5. Shapiro E, Grande D, Drakos M. Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015;8(1):9-17.
6. *Bionanomaterials for Skin Regeneration* | Mihaela D. Leonida | Springer2016.
7. O'Brien M. Functional anatomy and physiology of tendons. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(3):505-20.
8. Verheyen P. the cord of Achilles. *Corporis Humani Anatomia*1693. p. 328
9. Ma GW, Griffith TG. Percutaneous repair of acute closed ruptured achilles tendon: a new technique. *Clinical orthopaedics and related research*. 1977;128:247-55.
10. Nistor L. Surgical and non-surgical treatment of Achilles Tendon rupture. A prospective randomized study. *J Bone Joint Surg Am*. 1981;63(3):394-9.
11. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot and ankle clinics*. 2005;10(2):225-38.
12. MAFFULLI N. Current Concepts Review - Rupture of the Achilles Tendon*. 1999.
13. Kvist M, Hurme T, Kannus P, Järvinen T, Maunu V-M, Jozsa L, et al. Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *The American journal of sports medicine*. 1995;23(3):359-64.
14. Alexander RM, Bennet-Clark H. Storage of elastic strain energy in muscle and other tissues. *Nature*. 1977;265(5590):114-7.
15. Rufai A, Ralphs J, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *Journal of orthopaedic research*. 1995;13(4):585-93.
16. Theobald P, Bydder G, Dent C, Nokes L, Pugh N, Benjamin M. The functional anatomy of Kager's fat pad in relation to retrocalcaneal problems and other hindfoot disorders. *Journal of anatomy*. 2006;208(1):91-7.
17. Rockwood C, Green D, Bucholz R. *Healing of musculoskeletal tissues*. Rockwood and Green's *Fractures in Adults* 3rd ed Philadelphia, Pa: JB Lippincott. 1991.
18. Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. *Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management*. 2002.
19. Webb J, Moorjani N, Radford M. *Anatomy of the sural nerve and its relation to the Achilles Tendon*. 2000.

20. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2005;87(1):187-202.
21. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(2):181-90.
22. Coombs R, Klenerman L, Narcisi P, Nichols A, Pope F, editors. COLLAGEN TYPING IN ACHILLES-TENDON RUPTURE. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-BRITISH VOLUME; 1980: BRITISH EDITORIAL SOC BONE JOINT SURGERY 22 BUCKINGHAM STREET, LONDON, ENGLAND WC2N 6ET*.
23. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2000;10(6):312-20.
24. Lesic A, Bumbasirevic M. Disorders of the Achilles tendon. *Current Orthopaedics*. 2004;18(1):63-75.
25. Lagergren C, Lindholm Å. Vascular distribution in the Achilles tendon; an angiographic and microangiographic study. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1959;116(5-6):491.
26. Coughlin MJ, Mann RA. *Surgery of the foot and ankle*: Mosby Inc; 1999.
27. Carr A, Norris S. The blood supply of the calcaneal tendon. *Bone & Joint Journal*. 1989;71(1):100-1.
28. Järvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot and ankle clinics*. 2005;10(2):255-66.
29. Holmes GB, Lin J. Etiologic factors associated with symptomatic achilles tendinopathy. *Foot & Ankle International*. 2006;27(11):952-9.
30. Komi P, Fukashiro S, Järvinen M. Biomechanical loading of Achilles tendon during normal locomotion. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(3):521-31.
31. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clinical orthopaedics and related research*. 1999;367:S312-S23.
32. Fyfe I, Stanish W. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(3):601-24.
33. Järvinen TA, Järvinen TL, Kannus P, Józsa L, Järvinen M. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004;22(6):1303-9.
34. Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med*. 2000;28(4):499-505.
35. DiStefano V, Nixon J. Achilles tendon rupture: pathogenesis, diagnosis, and treatment by a modified pullout wire technique. *The Journal of trauma*. 1972;12(8):671.
36. Arner O, Lindholm A. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon; a study of 92 cases. *Acta chirurgica Scandinavica Supplementum*. 1958;116(Supp 239):1-51.
37. Yıldırım Y, Esemeli T. Initial pull-out strength of tendon sutures: an in vitro study in sheep Achilles tendon. *Foot & ankle international*. 2002;23(12):1126-30.
38. McMaster PE. Tendon and muscle ruptures. *J Bone Joint Surg Am*. 1933;15(3):705-22.

39. Barfred T. Kinesiological comments on subcutaneous ruptures of the Achilles tendon. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1971;42(5):397-405.
40. Barfred T. Experimental rupture of the Achilles tendon: Comparison of experimental ruptures in rats of different ages and living under different conditions. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1971;42(5):406-28.
41. Waterston SW, Maffulli N, Ewen S. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon: basic science and some aspects of clinical practice. *British journal of sports medicine*. 1997;31(4):285-98.
42. INGLIS AE, SCULCO TP. Surgical repair of ruptures of the tendo Achillis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1981;156:160-9.
43. Ross M, Pawlina W. *Connective tissue, histology: a text and atlas*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
44. Strocchi R, De Pasquale V, Guizzardi S, Govoni P, Facchini A, Raspanti M, et al. Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. *Foot & Ankle International*. 1991;12(2):100-4.
45. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Dönmez G, et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2010;18(5):638-43.
46. Leppilahti J, Puranen J, Orava S. Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1996;67(3):277-9.
47. Maffulli N, Waterston SW, Squair J, Reaper J, Douglas S. Changing incidence of Achilles tendon rupture in Scotland: a 15-year study. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 1999;9(3):157-60.
48. Dodds W, Burry H. The relationship between Achilles tendon rupture and serum uric acid level. *Injury*. 1984;16(2):94-5.
49. Dent C, Graham G. Osteogenesis imperfecta and Achilles tendon rupture. *Injury*. 1991;22(3):239-40.
50. Maffulli N, Irwin AS, Kenward MG, Smith F, Porter RW. Achilles tendon rupture and sciatica: a possible correlation. *British journal of sports medicine*. 1998;32(2):174.
51. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(10):1507-25.
52. Cetti R, Christensen S-E, Ejsted R, Jensen NM, Jorgensen U. Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture a prospective randomized study and review of the literature. *The American Journal of Sports Medicine*. 1993;21(6):791-9.
53. Thermann H. [Treatment of Achilles tendon rupture]. *Der Unfallchirurg*. 1998;101(4):299-314.
54. Wang M-X, Wei A, Yuan J, Clippe A, Bernard A, Knoops B, et al. Antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 is upregulated in degenerative human tendon. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;284(3):667-73.
55. Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *Journal of experimental biology*. 1997;200(11):1703-8.
56. Yuan J, Murrell GA, Wei AQ, Wang MX. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *Journal of orthopaedic research*. 2002;20(6):1372-9.

57. Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. Tendon pathology in long-standing achillodynia: biopsy findings in 40 patients. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1997;68(2):170-5.
58. Chiou Y, Lan J, Hsieh T, Chen Y, Chen D. Spontaneous Achilles tendon rupture in a patient with systemic lupus erythematosus due to ischemic necrosis after methyl prednisolone pulse therapy. *Lupus*. 2005;14(4):321-5.
59. Hugate R, Pennypacker J, Saunders M, Juliano P. The effects of intratendinous and retrocalcaneal intrabursal injections of corticosteroid on the biomechanical properties of rabbit Achilles tendons. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86(4):794-801.
60. L uthje P, Nurmi I, Nyyss onen T. Missed Achilles tendon rupture due to oral levofloxacin: surgical treatment and result. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2005;125(2):124-6.
61. Chaslerie A, Bannwarth B, Landreau J, Yver L, Begaud B. More on fluoroquinolone antibiotics and tendon rupture. *N Engl J Med*. 1995;1995(332):193.
62. Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Hayem G, Rat P, Adolphe M. In vitro study of cytotoxicity of quinolones on rabbit tenocytes. *Cell biology and toxicology*. 1998;14(4):283-92.
63. Heckman DS, Gluck GS, Parekh SG. Tendon Disorders of the Foot and Ankle, Part 2 Achilles Tendon Disorders. *The American journal of sports medicine*. 2009;37(6):1223-34.
64. Maffulli N. The clinical diagnosis of subcutaneous tear of the Achilles tendon a prospective study in 174 patients. *The American journal of sports medicine*. 1998;26(2):266-70.
65. THOMPSON TC, DOHERTY JH. Spontaneous rupture of tendon of Achilles: a new clinical diagnostic test. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1962;2(2):126-9.
66. O'Brien T. The needle test for complete rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66(7):1099-101.
67. Matles A. Rupture of the tendo achilles: another diagnostic sign. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*. 1975;36(1):48-51.
68. Kager H. Zur klinik und diagnostik des achillessehnenrisses. *Chirurg*. 1939;11(691-695):86.
69. Toygar O. Subkutane ruptur der Achillessehne. Diagnostik und Behandlungsergebnisse) *Helvetica Chir Acta*. 1947;14(209-231):182.
70. Khan RJ, Fick D, Keogh A, Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute Achilles tendon ruptures. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(10):2202-10.
71. H aggmark T, Liedberg H, Eriksson E, Wredmark T. Calf muscle atrophy and muscle function after non-operative vs operative treatment of Achilles tendon ruptures. *Orthopedics*. 1986;9(2):160-4.
72. Inglis AE, Scott WN, Sculco TP, Patterson AH. Ruptures of the tendo achillis. An objective assessment of surgical and non-surgical treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 1976;58(7):990-3.
73. Kuwada GT. An update on repair of Achilles tendon rupture. Acute and delayed. *J Am Podiatr Med Assoc*. 1999;89(6):302-6.
74. Canale ST, Beaty JH. *Campbell's operative orthopaedics*: Elsevier Health Sciences; 2012.
75. Bhandari M, Guyatt GH, Siddiqui F, Morrow F, Busse J, Leighton RK, et al. Treatment of acute Achilles tendon ruptures: a systematic overview and metaanalysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2002(400):190-200.

76. Lo IK, Kirkley A, Nonweiler B, Kumbhare DA. Operative versus nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a quantitative review. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 1997;7(3):207-11.
77. Doral MN. What is the effect of the early weight-bearing mobilisation without using any support after endoscopy-assisted Achilles tendon repair? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(6):1378-84.
78. Saleh M, Marshall P, Senior R, MacFarlane A. The Sheffield splint for controlled early mobilisation after rupture of the calcaneal tendon. A prospective, randomised comparison with plaster treatment. *Bone & Joint Journal*. 1992;74(2):206-9.
79. Doral MN, Bozkurt M, Turhan E, Dönmez G, Demirel M, Kaya D, et al. Achilles tendon rupture: physiotherapy and endoscopy-assisted surgical treatment of a common sports injury. *Open access journal of sports medicine*. 2010;1:233.
80. Halasi T, Tallay A, Berkes I. Percutaneous Achilles tendon repair with and without endoscopic control. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2003;11(6):409-14.
81. Turgut A, Gunal I, Maralcan G, Kose N, Gokturk E. Endoscopy, assisted percutaneous repair of the Achilles tendon ruptures: a cadaveric and clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2002;10(2):130-3.
82. Bradley JP, Tibone JE. Percutaneous and open surgical repairs of Achilles tendon ruptures A comparative study. *The American journal of sports medicine*. 1990;18(2):188-95.
83. Doral MN, Bozkurt M, Turhan E, Ayvaz M, Atay ÖA, Üzümcügil A, et al. Percutaneous suturing of the ruptured Achilles tendon with endoscopic control. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2009;129(8):1093-101.
84. Yılmaz G, Doral MN, Turhan E, Dönmez G, Atay AÖ, Kaya D, et al. Surgical treatment of Achilles tendon ruptures: The comparison of open and percutaneous methods in a rabbit model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2014;20(5):311-8.
85. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;114(6):1502-8.
86. Soomekh DJ. Current concepts for the use of platelet-rich plasma in the foot and ankle. *Clinics in podiatric medicine and surgery*. 2011;28(1):155-70.
87. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chan J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF- β on tendon cell collagen production. *The Journal of hand surgery*. 2002;27(4):615-20.
88. Altmeppen J, Hansen E, Bonnländer G, Horch R, Jeschke M. Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *Journal of Surgical Research*. 2004;117(2):202-7.
89. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM. The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1990;22(5):781-91.
90. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84(2):640.
91. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, et al. Transforming growth factor β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 1996;122(2):171-7.

92. Nakamura K, Koshino T, Saito T. Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product–fibrin glue mixture. *Biomaterials*. 1998;19(20):1901-7.
93. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthopedic clinics of north america*. 2000;31(3):375-87.
94. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, et al. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology*. 1992;131(3):1075-80.
95. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF β and BMP. *Bone*. 1996;19(1):S1-S12.
96. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108:1713-26.
97. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2003;123(9):485-8.
98. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T. Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointestinal endoscopy*. 2005;61(4):560-7.
99. Huang L-H, Neiva RE, Soehren SE, Giannobile WV, Wang H-L. The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *Journal of periodontology*. 2005;76(10):1768-77.
100. Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W. Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *British journal of plastic surgery*. 2002;55(1):59-63.
101. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plastic and reconstructive surgery*. 1991;88(2):189-94.
102. Selek O, Buluc L, Muezzinoğlu B, Ergün R, Ayhan S, Karaöz E. Mesenchymal stem cell application improves tendon healing via anti-apoptotic effect (Animal study). *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2013;48(2):187-95.
103. Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(1):74-81.
104. Maffulli N, Tallon C, Wong J, Lim KP, Bleakney R. Early weightbearing and ankle mobilization after open repair of acute midsubstance tears of the achilles tendon. *Am J Sports Med*. 2003;31(5):692-700.
105. Speck M, Klaue K. Early full weightbearing and functional treatment after surgical repair of acute achilles tendon rupture. *Am J Sports Med*. 1998;26(6):789-93.
106. Suchak AA, Spooner C, Reid DC, Jomha NM. Postoperative rehabilitation protocols for Achilles tendon ruptures: a meta-analysis. *Clinical orthopaedics and related research*. 2006;445:216-21.
107. Magnusson S, Qvortrup K, Larsen JO, Rosager S, Hanson P, Aagaard P, et al. Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix biology*. 2002;21(4):369-77.

108. Dallaudière B, Lempicki M, Pesquer L, Louedec L, Preux PM, Meyer P, et al. Efficacy of intra-tendinous injection of platelet-rich plasma in treating tendinosis: comprehensive assessment of a rat model. *European radiology*. 2013;23(10):2830-7.
109. Vannini F, Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M, Giannini S. Platelet-rich plasma for foot and ankle pathologies: a systematic review. *Foot and Ankle Surgery*. 2014;20(1):2-9.
110. Sarrafian TL, Wang H, Hackett ES, Yao JQ, Shih MS, Ramsay HL, et al. Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a cross-linked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg*. 2010;49(2):128-34.
111. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *The Cochrane Library*. 2014.
112. de Jonge S, de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, et al. One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic achilles tendinopathy a double-blind randomized placebo-controlled trial. *The American journal of sports medicine*. 2011;39(8):1623-9.
113. Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler HK, Dines JS, et al. Comparison of the effect of intra-tendon applications of recombinant human platelet-derived growth factor-BB, platelet-rich plasma, steroids in a rat achilles tendon collagenase model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014;32(1):145-50.
114. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human Achilles tendon ruptures a randomized single-blind study. *The American journal of sports medicine*. 2011;39(1):38-47.
115. Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(17):2776-84.
116. Adams SB, Jr., Thorpe MA, Parks BG, Aghazarian G, Allen E, Schon LC. Stem cell-bearing suture improves Achilles tendon healing in a rat model. *Foot Ankle Int*. 2014;35(3):293-9.
117. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2012;65(12):1712-9.
118. Kraus T, Imhoff F, Wexel G, Wolf A, Hirsch D, Lenz L, et al. Stem Cells and Basic Fibroblast Growth Factor Failed to Improve Tendon Healing. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2014;96(9):761-9.
119. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K-i, Sakamoto H, Mizuta H. The effects of fibroblast growth factor-2 on rotator cuff reconstruction with acellular dermal matrix grafts. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2009;25(6):608-16.
120. Cui Q, Wang Z, Jiang D, Qu L, Guo J, Li Z. HGF inhibits TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. *European journal of applied physiology*. 2011;111(7):1457-63.
121. Shah V, Bendele A, Dines JS, Kestler HK, Hollinger JO, Chahine NO, et al. Dose-response effect of an intra-tendon application of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in a rat Achilles tendinopathy model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013;31(3):413-20.

122. Cummings SH, Grande DA, Hee CK, Kestler HK, Roden CM, Shah NV, et al. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB-coated sutures on Achilles tendon healing in a rat model: A histological and biomechanical study. *Journal of tissue engineering*. 2012;3(1):2041731412453577.
123. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, et al. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(2):235-9.
124. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei M-P, Pang Y, Oswald TM, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;112(6):1613-9.
125. Whittaker P, Canham PB. Demonstration of quantitative fabric analysis of tendon collagen using two-dimensional polarized light microscopy. *Matrix*. 1991;11(1):56-62.
126. Müller SA, Todorov A, Heisterbach PE, Martin I, Majewski M. Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2015;23(7):2097-105.
127. Webb WR, Dale TP, Lomas AJ, Zeng G, Wimpenny I, El Haj AJ, et al. The application of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model. *Biomaterials*. 2013;34(28):6683-94.
128. Suckow M, Hodde J, Wolter W, Hiles M. Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule material in a rat model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(6):1105-10.
129. Huri PY, Huri G, Yasar U, Ucar Y, Dikmen N, Hasirci N, et al. A biomimetic growth factor delivery strategy for enhanced regeneration of iliac crest defects. *Biomed Mater*. 2013;8(4):045009.