

Tendon iyileşmesi ve yapışıklık gelişimi üzerine hyaluronik asit, A ve E vitaminlerinin etkileri

Nail Derelioğlu⁽¹⁾, Semiha Noyan⁽²⁾, Bartu Sarısözen⁽³⁾, Öner Gedikoğlu⁽⁴⁾

Tendon iyileşmesi ve yapışıklık gelişimi üzerine hyaluronik asit, A ve E vitaminlerinin etkileri deneysel model oluşturularak incelendi. Bu amaçla sıçanların aşil tendonlarında kapalı travma ile hasar oluşturuldu. Deney gruplarında; hyaluronan tendon kılıfına, E vitamini kas içine enjekte edildi, A vitamini diyetle eklendi, kontrol grubuna tedavi uygulanmadı. Otuzuncu günde, denekler öldürülerek aşil tendonları çıkarıldı. Makroskopik olarak yapışıklık gelişimi, biyomekanik olarak kopma direnci ve histolojik olarak tendon iyileşmesi değerlendirildi. Yapışıklık gelişiminin önlenmesinde hyaluronanın başarılı olduğu, A ve E vitaminlerinin etkili olmadıkları saptandı. Tendonların biyomekanik kopma dirençleri, deney ve kontrol grupları arasında belirgin farklılık göstermedi. Tendon iyileşmesinin histolojik değerlendirmesinde, E vitamininin, inflammatuar yanıtın hafifletilmesi ve normal tendon yapısının daha hızlı elde edilmesinde belirgin rol oynadığı saptandı. Hyaluronan ve A vitamininin ise iyileşmeyi hızlandırıcı etkilerinin gözlenmesine karşın bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Tendon iyileşmesi, A vitamini, E vitamini, hyaluronan

The effects of hyaluronic acid, vitamin A and E on tendon healing and adhesion formation

The effects of Hyaluronic acid, Vitamin A and E on tendon healing and adhesion formation were studied in an experimental model. For this purpose achilles tendons of rats were injured by blunt trauma. In the treatment groups vitamin E was injected by I.M. way, Vitamin A was added to diet and hyaluronan was injected into the tendon sheat. Control group had no treatment. On the 30th day, objects were killed, achilles tendons were removed as a whole and used as achilles tendon functional unit. Adhesion formation were evaluated macroscopically. Biomechanical strength of the tendon was assessed by linear tensiometer and tendon healing was evaluated histologically. Hyaluronan was effective on preventing adhesion formation while vitamin A and E had no effect. There was no difference between the biomechanical strength of tendons in treatment groups and control group. Vitamin E had a significant role on subsiding the inflammatory response during healing and normal tendon structure was obtained more rapidly comparing to the other groups.

Keywords : Tendon healing, Vitamin A, vitamin E, hyaluronic acid

Tendon iyileşmesinin temel mekanizmaları ortaya çıkarılmış olmasına karşın, iyileşme üzerine etkili biyokimyasal, biyomekanik etkenler ve farmakolojik ajanların etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Kollajen metabolizmasına etkili ve antiinflammatuar özellik gösteren kortikosteroidler, steroid olmayan antiinflammatuar ilaçlar, hyaluronan, A ve E vitaminlerinin tendon iyileşmesinin çeşitli evrelerinde kullanılması ile hızlı ve yapışıklıkların az geliştiği bir iyileşme sağlandığı ileri sürülmüştür (2).

Çalışmamızda; ek travma, enfeksiyon gibi cerrahi girişime bağlı gelişebilen etkilerden kaçınmak amacıyla seçtiğimiz deneysel modelde, kapalı trav-

ma ile sıçanların aşil tendonlarında hasar oluşturuldu. Oluşturulan deney gruplarına; hyaluronik asit, A ve E vitaminleri verilerek, bunların iyileşme ve yapışıklık gelişimi üzerindeki etkileri kontrol grubu ile karşılaştırılarak araştırıldı.

Gereç ve yöntem

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada, ortalama ağırlığı 350 gr ± 50 gr olan 48 adet dişi sıçan (Sprague-Dawley) kullanıldı. Denekler oda sıcaklığında (23°C-25°C) tutuldu, standart

(1) S.B. Bursa Yüksek İhtisas Hastanesi, Uzman Dr.

(2) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

(3) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(4) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.

Denek No:	Kontrol	A Vit	E Vit	Hyaluronan
1	53.87	69.74	64.22	72.78
2	46.39	64.15	53.61	81.24
3	71.50	53.63	73.39	59.29
4	70.40	70.67	62.77	49.33
5	81.14	47.97	60.35	77.67
6	82.44	58.78	66.58	58.85
Ortalama	67.52	61.23	63.51	66.32

Tablo 1 : Mekanik germe testi değerlerinin gruplara göre dağılımı

Denek No:	Kontrol	A Vit	E Vit	Hyaluronan
1	1	2	2	2
2	3	2	3	1
3	3	1	2	1
4	2	2	1	1
5	2	3	2	1
6	3	2	3	2
Ortalama	2.3	2.0	2.2	1.3

Tablo 2: Makroskopik yapışıklık bulgularının gruplara göre dağılımı. Kontrol / Hyaluronan : p=0.0406

yiyeceklerle beslendi. Tendon hasarı oluşturulması amacıyla, eter anestezisi altında sıçanların sağ bacak aşıll tendonlarına kapalı travma uygulandı. Bu amaca yönelik hazırlanan düzencek yardımıyla (11) 1.500 kg ağırlık, 15 cm yükseklikten, kalkaneal bileşkenin yaklaşık 0.5 cm proksimalinde tendon üzerine düşürüldü. Herbiri 12 denekten oluşan 3 deney, 1 kontrol grubu oluşturuldu. Deney gruplarında şu tedaviler uygulandı: A vitamini, 26.000 iu/kg (26 mg b-karotene eş değer) dozda nazogastrik tüp ile oral yoldan; E vitamini, 20 iu dozda, sağ uyluğa kas içi enjeksiyonu; Hyaluronik asit, 0.075 ml/kg dozda, travmatize tendon kılıfına enjeksiyon. Kontrol grubuna tedavi uygulanmadı.

Denekler, 30. günde yüksek doz eter verilerek öldürüldü. Sağ alt ekstremiteleri tibiofemoral eklemden ayrıldı ve tibiaları yumuşak dokulardan sıyrılarak bütün olarak çıkarıldı. Aşill tendonunun, kalkaneusa yapışma bölgesi sağlam bırakıldı. Tibiofemoral eklemin altında kalan bu ekstremitte bölümü, aşill tendonu fonksiyonel birimi olarak kullanıldı. Her bir grup ikiye bölünerek, 6 deneye biyomekanik testler uygulandı, kalan 6 denekte tendon iyileşmesi, yapışıklık gelişimi makroskopik ve histolojik olarak değerlendirildi. Biyomekanik testlerde, aşill tendonunun kopma direnci, lineer tansiyometre (Shirley Development Ltd., İngiltere) ile ölçüldü. Bu amaçla,

	Kontrol n=6	A Vit n=6	E Vit n=6	Hyaluronan n=6	
Vaskülarite Artışı					
Ortalama	0.833	1.000	0.833	1.166	P>0.05*
Aralık	0-2	0-3	0-3	0-3	
SD	0.752	1.095	1.329	1.169	
Fibroblast Artışı					
Ortalama	1.500	1.500	1.000	1.500	p>0.05*
Aralık	0-3	0-3	0-3	0-3	
SD	1.378	1.224	1.549	1.378	
Kollajen Artışı					
Ortalama	1.500	1.666	1.000	1.666	p>0.05*
Aralık	0-3	0-3	0-3	0-3	
SD	1.224	1.366	1.549	1.211	
Onarım Evresi					
Ortalama	2.500	2.000	0.500	2.000	P=0.0270 (Kontrol/E Vit)
Aralık	0-3	0-3	0-3	0-3	
SD	1.224	1.549	1.224	1.549	
Remodelling Evresi					
Ortalama	2.500	2.000	0.500	2.000	P=0.0270 (Kontrol/E Vit)
Aralık	0-3	0-3	0-3	0-3	
SD	1.224	1.549	1.224	1.549	

Tablo3: Histolojik değerlendirme bulgularının gruplara göre dağılımı

* : Tüm gruplar arasında
SD : Standart sapma

aşill tendonlarına 200 mm/dakika gücünde germe uygulandı. Mekanik kopma gücü değerleri Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Histolojik değerlendirme için ayrılan 24 aşill tendonu, önce yapışıklık oluşumu açısından makroskopik olarak değerlendirilerek puanlandı (1=az, 2=orta, 3=çok). Daha sonra tendonlar %10'luk nötral formalinde fikse edildi. Parafine gömülen parçalarından 5 mikron kalınlığında boylamasına kesitler alındı. Kesitler, hematoksilin-eosin (H-E) ve masson trikrom yöntemleri ile boyandı. Işık mikroskopuyla yapılan değerlendirmede denekler yeni damar oluşumu, fibroblast proliferasyonu, yeni kollajen sentezi miktarına göre puanlandılar (0=yok, 1=az, 2=orta, 3=çok). Onarım ve remodelling evrelerinin tamamlanma durumu, 0 (tamamlanmış) veya 3 (tamamlanmamış) puan verilerek değerlendirildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanıldı.

Bulgular

Biyomekanik değerlendirme bulguları: Kontrol ve deney gruplarının mekanik germe testi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Ortalama kopma direnci, 67.52 Newton-milimetre (N-mm) ile kontrol grubunda en yüksekti. Bu değer; A vitamini grubunda 61.23 N-mm, E vitamini grubunda 63.51 N-mm, Hyaluronan grubunda ise 66.32 N-mm idi. Grupların ortalama kopma direnci değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 1). Makroskopik değerlendirme bulguları :

Tüm deneklerde, aşıl tendonu ve çevre dokular arasında yapışıklık vardı. Yapışıklık, hyaluronan uygulanan grupta, kontrol grubuna göre belirgin oranda azdı ($p=0.0406$) (Tablo 2).

Histolojik değerlendirme bulguları: Tendon iyileşmesinin ilk evresine ait inflamatuvar değişiklikler ve hemoraji hiç bir grupta saptanmadı. Kontrol grubuna ait incelemede; 6 denekten sadece birinde remodeling fazı tamamlanmıştı. Diğer beş deneğin henüz onarım fazında olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

A vitamini verilen grubun histolojik değerlendirmesinde 6 denekten ikisinin onarım fazını tamamlayıp remodeling fazına geçtiği belirlendi. Diğer 4 denekte onarım fazının özellikleri gözlemlendi. Remodeling fazında olan iki deneğin tendonlarında normal tendon yapısı görüldü. E vitamini verilen grupta; 6 denekten sadece ikisinin onarım fazında olduğu, 4'ünün remodeling evresini tamamlayıp normal yapıyı kazandığı gözlemlendi. Hyaluronan verilen grupta ise 6 denekten, 4'ünün onarım sürecini tamamladığı, 2'sinin remodeling fazını tamamlayıp iyileştiği görüldü.

Tendon iyileşmesinin histolojik bulgularının istatistiksel değerlendirilmesinde; vaskülarite, fibroblast ve kollajen artışı açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Onarım ve remodeling evrelerinin tamamlanması açısından ise E vitamini ve kontrol grubu arasında belirgin farklılık vardı (Tablo 3).

Tartışma

Günümüzde gelişmiş mikrocerrahi teknikleri ve denenen farmakolojik ajanlara karşın, ideal bir tendon iyileşmesi henüz elde edilememiştir. Gelberman (6), köpeklerde fleksor tendona açık kesi ve cerrahi onarım sonrasında harekete izin vererek yapışıklığın engellendiğini belirtmiştir. Ayrıca, hareketli olan tendonlarda, epitenon kökenli hücre artışı ve yayılımını, harekete izin verilmeyen tendonlarda ise yapışıklık gelişimi ile birlikte endotenon kökenli hücre artışının, iyileşmede etkili olduğunu bildirmiştir (6). Çalışmamızda, denekler tendon yaralanması oluşturulduktan sonra serbest bırakıldı. Tüm deneklerde yapışıklığın gözlenmiş olması ve biyomekanik dirençlerinde farklılık gelişmemesi, serbest bırakılan tendonlarda da ekstrinsek iyileşmenin rolü olduğunu göstermiştir. İyileşme döneminde tendonun serbest bırakılması, yapışıklığı tek başına önlemede yetersiz kalmaktadır.

Greenwald (7), tavşanda cerrahi kesi oluşturarak

in vivo ve in vitro tendon iyileşmesini incelemiş, A ve E vitamini uyguladığı gruplardaki tendonların biyomekanik özelliklerinin, iyileşme sürecinin dönemlerine göre farklılık gösterdiğini saptamıştır. Bu araştırmacıya göre, in vivo ilk 7 günde E vitamini verilen grubun biyomekanik kopma direnci azalırken, 30. günde kontrol grubuna eşitlenmiş, A vitamini grubunda ise tüm iyileşme süresi boyunca kopma direnci devamlı artış göstermiştir. Çalışmamızda, yaralanmadan sonra 30. günde E vitamini grubu biyomekanik dirençlerinin, kontrol grubuna göre farklılık göstermemesi Greenwald (7)'in bulgularıyla uyumludur (Tablo 1).

Kontrol ve A vitamini gruplarının tendon dirençleri arasında farklılık saptanmayışının ise, tendon hasarının kapalı travma ile oluşturulmasından, intrinsek ve ekstrinsek iyileşmenin birlikte etkimesinden ve 30. günde iyileşme sürecinin büyük oranda tamamlanmış olmasından kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Histolojik olarak; kontrol grubunda 1, A vitamini grubunda 2 deneğin remodeling evresinde olması ve normal tendon özellikleri göstermesi bu düşüncüyü desteklemektedir (Tablo 3).

Daha çok yapışıklık üzerinde etkili olduğu düşünülen hyaluronanın, tendon biyomekaniğine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir. Gaughan (5) ve Nader (12), deneysel çalışma modelinde, hyaluronanın fleksor tendonlarda iyileşme ve yapışıklık üzerindeki etkilerini inceleyerek, tendonun biyomekanik özelliklerinde değişiklik gelişmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, Gaughan (5) ve Nader'in (12) bulgularıyla uyumlu olarak, hyaluronanın tendon kopma direnci üzerinde etkisi olmadığı saptandı (Tablo 1). Abrahamsson (1), Gelberman (6), Lundborg (9) ve Manske (10), tendon iyileşmesi için yapışıklığın şart olmadığını, intrinsek tenositlerin bölünme ve kollajen üretme yeteneklerinin olduğunu bildirmişlerdir. Hangi mekanizmanın en önemli olduğu tam açığa kavuşmuş bir konu olmamakla beraber, yapışıklığın azaltılması, tendon cerrahisinde istenen ana amaçtır. Tendon yaralanmalarının tedavisinde kullanılan farklı tedavi yöntemleri, yapışıklık yerine, intrinsek tendon iyileşmesini ön plana çıkarmaya yöneliktir. Çalışmamızda, makroskopik değerlendirmede deneklerin tümünde farklı oranlarda yapışıklık geliştiği saptandı (Tablo 2). A ve E vitamini verilen gruplarda, yapışıklık gelişiminde herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. E vitamininin, yara iyileşmesinde skar oluşumunu azaltıcı etkisiyle ilgili çok sayıda çalışma (3,8) yapılmış olmasına karşın, tendon iyileşmesinde yapışıklık gelişimi üze-

rine etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Greenwald (7), çalışmasında yapışıklığı araştırmamakla beraber, kortikosteroidlere ve kollajen liflerinin moleküler bağlanmasını engelleyen çeşitli ajanlara göre, E vitamininin tendon iyileşmesinde kullanılabilecek uygun bir alternatif olduğunu belirtmiştir.

Çalışmamızda E vitamininin yapışıklığa karşı etki göstermeyişinin, cilt dokusunun aksine, tendonun kanlanması özelliğine, fibroblast sayısının daha az oluşuna ve travmaya karşı düşük düzeyde hücre sel yanıt vermesine bağlı olduğu kanısındayız. Thomas (13) ve Gaughan (5), yaptıkları deneysel çalışmalarda hyaluronanın yapışıklığı azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, hyaluronan uygulanan grupta yapışıklığın belirgin biçimde az olması bu sonuçlar ile uyumludur (Tablo 2).

Çalışmamızda, hyaluronan ve A vitamininin, tendon iyileşmesinde inflamatuvar cevabın baskılanması ve onarım evresinin tamamlanma hızı üzerinde belirgin bir etkilerinin olmadığı, buna karşın E vitamininin yeni damar oluşumu ve fibroblast sayısında azalmaya yol açmadığı; onarım evresinin hızlanmadığı, histolojik olarak olgun kollajen yapısının ve normal tendon görüntüsünün daha çabuk kazanıldığı saptandı. Greenwald (7), A ve E vitaminlerinin; fibroblast diferansiyasyonu, göçü ve proliferasyonu üzerine etki ederek tendon iyileşmesinde rol oynadıklarını belirtmiştir. Foland (4), atlarda deneysel tendinit oluşturarak, histolojik değerlendirme sonucunda hyaluronanın peritendinöz fibrozis, fibroplazi ve antiinflamatuvar cevabın azaltılmasında rol oynadığını bildirmiştir.

Çalışmamızda, hyaluronan yapışıklık gelişimini önlemede başarılı olurken intrinsek tendon iyileşmesi üzerinde etkili olmadığı, tersine E vitamininin, intrinsek iyileşme üzerinde olumlu etkide bulunduğu, yapışıklık gelişiminde belirgin etki göstermediği saptandı. Gaughan da (5), çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyumlu olarak, hyaluronanın, atlarda inflamatuvar hücre sayısını, yeni damar oluşumunu azalttığını, ancak normal tendon yapısının gelişmesi üzerine belirgin etkisi olmadığını saptamıştır.

Kaynaklar

1. Abrahamson , Lundborg G, Rank Henhau B: Intrinsic tendon healing. A new experimental model. *Scand J Plast Reconst Surg* 19: 113-117, 1985.
2. Daniel P, Greenwald D, Sharzer L, Seifer E: Zone II flexor tendon repair; Effects of Vit A, E, b-carotene. *J Surg Res* 49: 98-102, 1990.
3. Erlich HP, Torver H, Hunt: Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair. *Ann Surg* 175 (2): 235-240, 1972.
4. Foland JW, Trotter GW, Powers BE, et al: Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am J Vet Res* 53 (12): 2371-2376, 1992.
5. Gaughan EM, Nixon AJ, Krade LP: Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *Am J Vet Res* 52 (5): 764-773, 1991.
6. Gelberman RH, Woo SL-Y, Amiel D et al.: Influences of flexor sheath continuity and early motion on tendon healing in dogs. *J Hand Surg (Am)* 15 (1): 69-77, 1990.
7. Greenwald DP, Mass D, Golthieb L, Liel RT: Intrinsic tendon healing in vitro; biomechanical analysis and effects of vitamin A and E. *Current Surgery* Nov-Dec: 440-443, 1990.
8. Hund TK, Erlich P, Ganki JA: Effect of vitamin A on reversing the inhibitory effect of cortisone on healing of open wounds in animals and man. *Annals of Surgery* 170 (4): 633-641, 1969.
9. Lundborg G: Experimental flexor tendon healing without adhesion formation- A new concept of tendon nutrition and intrinsic tendon healing mechanism. A preliminary report. *The Hand* 8 (3): 235-238, 1976.
10. Manske PR: Flexor tendon healing. *J Hand Surg (Br)* 13 (3): 237-245, 1988.
11. Mc Carthy F, Heckman RA: Influence of local steroid injection on traumatized tendon properties. *Am Orthop Soc Sports Med* 19 (5): 435-439.
12. Nader JS, Tuch RJ, Mass DP: Effect of Hyaluronic acid on rabbit profundus flexor tendon healing. In vitro. *J Surg Res* 411-415, 1993.
13. Thomas SC, Jones LC, Hungerford DS: Hyaluronic acid and its effect on postoperative adhesion in the rabbit flexor tendon. *Clin Orthop* 206: 281-289, 1986.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Bartu Sarısözen

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Görükle, Bursa, Türkiye