



Tendon iyileşmesinde ekstrakorporeal şok dalgası tedavisi: Sıçanlarda deneysel çalışma

Extra-corporeal shock wave therapy in tendon healing

Zafer ORHAN,¹ Murat ALPER,² Özlem YAVUZ,³
Yavuz AKMAN,⁴ Altan YALÇINER⁵

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi, ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ²Patoloji Anabilim Dalı,
³Biyokimya Anabilim Dalı, ⁴Üroloji Anabilim Dalı; ⁵Düzen Laboratuvarı, İstanbul

Amaç: Düşük enerjili ekstrakorporeal şok dalgası tedavisinin (ESWT) kırıklara eşlik edebilen tendon dokularındaki zedelenmelerin iyileşmesine etkileri sıçanlar üzerinde araştırıldı.

Çalışma planı: Histopatolojik tetkik için 28 sıçan kullanıldı. Sıçanların sağ aşil tendonları kesilerek modifiye Kessler yöntemi ile sütüre edildi. Aşil tendonlarına skopi kontrolünde 14 kV gücünde 500 şok dalgası uygulandı. Cerrahi onarım yapılan ve ESWT uygulanmayan 14 sıçan kontrol grubuna alındı. Biyokimya çalışması için de 20 sıçan beşerli dört gruba ayrıldı. Sıçanların aşil tendonları kesilip sütüre edilerek birinci ve ikinci gruba 14 kV gücünde 500 şok dalgası uygulandı. Birinci grup üçüncü günde ikinci grup dokuzuncu günde öldürülerek hidrokspirolin düzeyleri ölçüldü. Üçüncü ve dördüncü grup kontrol grubunu oluşturdu.

Sonuçlar: Histolojik incelemede, ESWT uygulanan grupta ikinci haftada granülasyon dokusu belirgin olarak daha selüler, daha vaskülarize ve yoğun iltihabi infiltrasyon içermekteydi ve çok sayıda multinükleer dev hücre vardı. Üçüncü haftada ESWT grubunda iyileşmenin kontrol grubuna göre daha iyi ve düzenli olduğu, fibrillerde düzensizliğin, yoğun lenfosit ve histiosit infiltrasyonunun azaldığı ve çok daha az sayıda multinükleer dev hücre içerdiği görüldü. Deney grubunda hidrokspirolin düzeylerinin yükseldiği görüldü.

Çıkarımlar: Deney grubundaki histopatolojik bulgular ve artmış hidrokspirolin düzeyleri ESWT uygulamasının tendon iyileşmesini hızlandırdığını gösterdi.

Anahtar sözcükler: Aşil tendonu/yaralanma; kollajen/biyosentez; lithotripsi; sıçan; tendon yaralanmaları/terapi.

Objectives: A rat model was designed to investigate the effect of low-energy extra-corporeal shock wave therapy (ESWT) (500 shock waves at 14 kV) on the healing potential of tendon injuries that may accompany fractures.

Methods: The study included 48 rats for histopathologic (n=28) and biochemical (n=20) studies. The right Achilles tendons of all rats were cut and then sutured using the modified Kessler method. For histopathologic examination, ESWT was administered to the injured tendons under the guidance of fluoroscopy in 14 rats, while the remaining 14 rats remained as controls following sham operation. On the other hand, for biochemical studies 20 rats were divided into four equal groups where two groups received ESWT. On the postoperative third and ninth days, rats (one study with one control group, respectively) were sacrificed to measure the hydroxyproline levels.

Results: Histopathologic examination in the second week showed highly cellular granulation tissue with more vascularization and massive inflammatory infiltration in ESWT-administered rats. There were many multinuclear giant cells. On the third week, the healing in the ESWT group was considerably better than that of the controls. In addition, the irregularity of the fibrils, intensity of lymphocyte and histiocyte infiltration were less and there was a reduction in the number of giant cells. Hydroxyproline levels were found to be high in the study groups.

Conclusion: Histopathological findings and increased hydroxyproline levels suggest that ESWT may facilitate tendon healing.

Key words: Achilles tendon/injuries; collagen/biosynthesis; lithotripsy; rats; tendon injuries/therapy.

Son yirmi yılda, yara iyileşmesinde çeşitli fiziki etkenlerin rolü birçok çalışmada incelenmiş ve tanımlanmıştır.^[1-4] Üriner sistem taşlarının tedavisinde şok dalgalarının kullanımıyla, yeni bir mekanik yöntem tedavi alanına girmiştir.^[1,5]

Dört Yorkshire pigletde (domuzda), kantitatif morfometrik yöntem ile yapılan çalışmada parsiyel kalınlıkta yara epitelizeasyonunda şok dalgalarının etkileri incelenmiştir.^[1]

Düşük etkili şok dalgalarının uyarıcı etkileri üst dermisen önemli miktarda artmış kanlanması ve yarıyı kaplayan epitel tabakasının daha kalınlaşması şeklinde ortaya çıkmıştır.^[1]

Tendon iyileşmesinde ultrason, direkt akım elektrik uyarı ve lazer foto uyarı kullanılmış ve tendon iyileşmesine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir.^[2-4]

Bu çalışmada, son zamanlarda kırık iyileşmesinde, tendinitlerde, psödoartrozlarda ve yara iyileşmesinde deneysel ve klinik amaçlarla sıklıkla kullanılan düşük enerjili ekstrakorporeal şok dalgası tedavisinin (extra-corporeal shock wave therapy-ESWT) kırıklara eşlik edebilen tendon dokularındaki zedelenmelerin iyileşmesine olumlu ya da olumsuz etkilerini saptamak için sıçanlarda deneysel bir model oluşturuldu ve bu yöntemin sonuçları histolojik ve biyokimyasal açıdan araştırıldı.^[6-10]

Gereç ve yöntem

Çalışmada histolojik tetkik için 28 sıçan kullanıldı. Sıçanların ortalama ağırlığı 220 gr (220±20) olup yaş ortalaması 4 ay (dağılım 3-6 ay) idi. Çalışma için Fakültemiz Etik Komitesi'nden onay alındı.

Ameliyat tekniği

Sıçanların ameliyattan bir gün önce sağ arka bacaklarına lapiden jenerik isimli tüy dökücü krem sürüldü. Ameliyat günü 25 mg/kg dozunda ketamin HCl enjeksiyonu yapılarak anestezi sağlandıktan sonra kılilar temizlendi; bacağı povidon iyodür sürüldü ve steril delikli kompresle örtüldü. Steril sahadaki bacak tekrar povidon iyodürle temizlendi. Sağ bacak arka yüzünden 1.5 cm'lik kesi yapılarak aşil tendonuna tam kesi uygulandı. Kesilen aşil tendonlarının, 4/0 prolendikiş malzemesi ve modifiye Kessler yöntemi ile cerrahi onarımı yapıldı. Tendon kılıfı onarılmadı. On dört sıçana cerrahi onarımı takiben mobil-2001 ESWT cihazıyla (Multimed-Türkiye) 14 kV gücünde 500 şok dalgası (80 şok dalgası/dakika) skopi kontro-

lunda aşil tendonuna odaklanarak uygulandı. Cerrahi onarım yapılan 14 sıçan da kontrol grubu olarak ayrıldı. Tendon onarımından sonra sıçanların serbest hareketlerine izin verildi. Deney laboratuvarında normal sıçan yemiyle beslendikten sonra deney ve kontrol sıçanlarının yedişer tanesi ikinci haftada, yedişer tanesi üç hafta sonunda eter anestezisi altında öldürülerek aşil tendonlarından biyopsi örnekleri alındı. Örnekler %10'luk nötral tamponlu formalinde bir hafta beklendikten sonra rutin doku takip işlemleri sonucu elde edilen parafin bloklar 5 mikron kalınlığında kesildi, hematoksilin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopu altında incelendi.

Biyokimya çalışması için 20 sıçan kullanıldı. Sıçanlar beşerli dört gruba ayrıldı. Yukarıda belirtildiği gibi aşil tendonları suture edilerek birinci ve ikinci gruba 14 kV gücünde 500 şok dalgası uygulandı. Birinci grup üçüncü günde, ikinci grup dokuzuncu günde öldürülerek tendonlar diseke edildi. Üçüncü ve dördüncü grup kontrol grubunu oluşturdu. Tendonlar kesilip suture edildikten sonra herhangi bir tedavi uygulanmadı. Üçüncü grup, üçüncü günde, dördüncü gruptaki sıçanlar dokuzuncu günde öldürüldü. Diseke edilen tendonlar isotonik sıvıda iki saat içinde laboratuvara ulaştırıldı, analize kadar -72°C'de beklendi. Hidroksiprolin, Switzer'in^[9] tarif ettiği yöntemle göre, gram kuru dokuda ağırlığına düşen mg hidroksiprolin olarak ölçümlendi. Sonuçlar Reddy ve Enwemeka'nın^[11] yöntemine göre HPLC'de de (high performance liquid chromatography) doğrulandı. İstatistik yöntemi olarak Mann -Whitney U-testi uygulandı.

Sonuçlar

Histopatolojik incelemede ikinci hafta kontrol grubunda insizyon bölgesinde mononükleer iltihabi hücre artışı, fibroblast artışı ve liflerin diziliminde bozukluk vardı. ESWT uygulaması 500 şok grubunda ikinci haftada insizyon bölgesinde çok sayıda multinükleer dev hücre, damarlanma artışı, yoğun histiosit, lenfosit ve plazma hücresi infiltrasyonu, artmış fibroblastik aktivite ve liflerde düzensiz dizilim görüldü (Şekil 1).

Üçüncü hafta kontrol grubunda fibrillerde düzensiz dizilim, yoğun mononükleer iltihabi infiltrasyon vardı. Üçüncü hafta 500 şok grubunda hafif derecede mononükleer iltihabi hücre artışı ve fibrillerde hafif düzensizlik izlendi (Şekil 2).

Biyokimyasal çalışmada, kollajen sentezini gösteren hidroksiprolin oranları ESWT uygulaması gru-

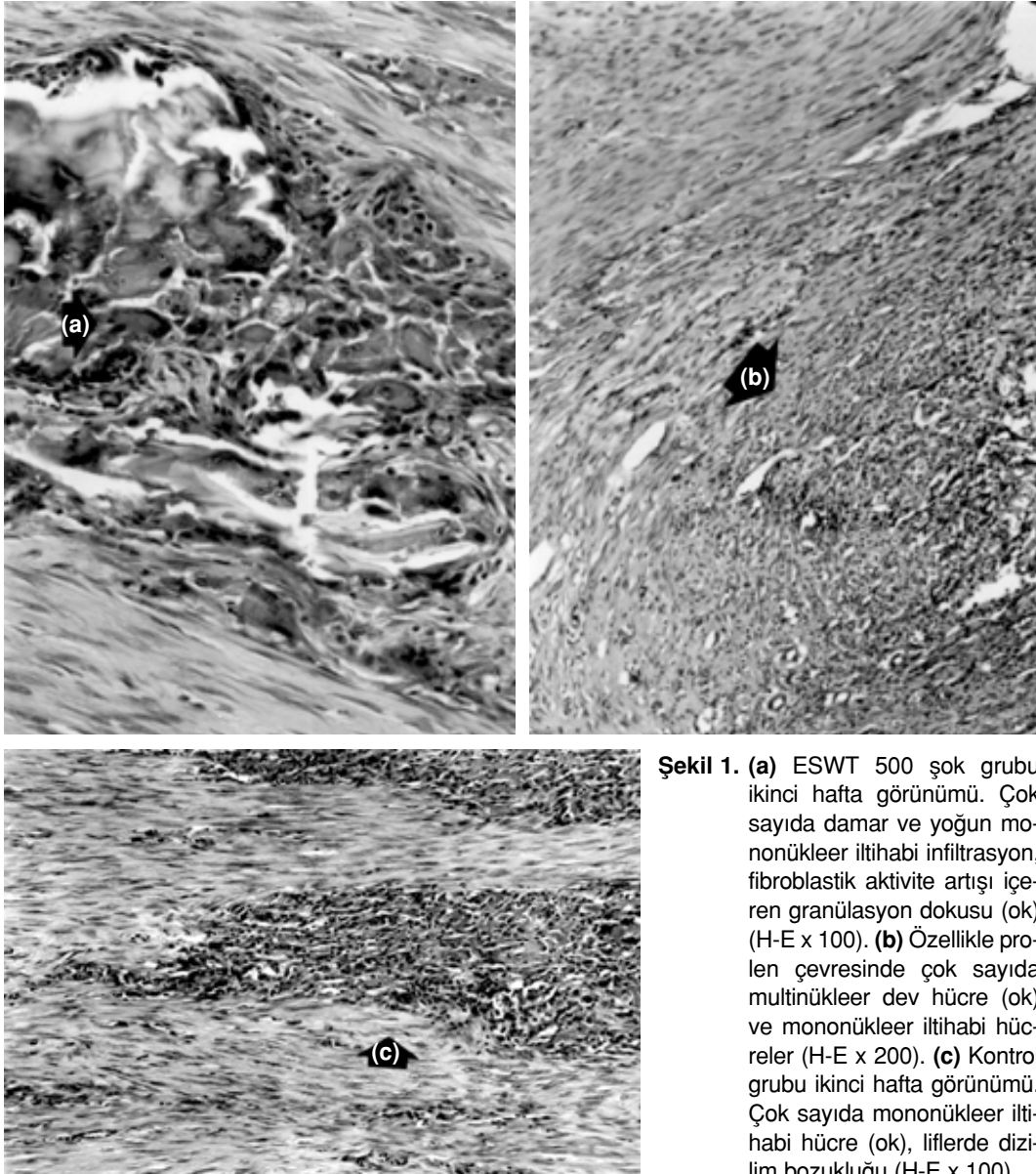
bunda kontrole göre üçüncü günde iki kat (kontrol 15.4 ± 1.42 , deney 32.4 ± 4.82), dokuzuncu günde üç kat (kontrol 29.1 ± 7.189 , deney 85.2 ± 5.86) artmıştı (Şekil 3). Mann-Whitney U-testine göre aradaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Tartışma

Ekstrakorporeal şok dalgaları, su altında enerjinin ani salınımı ile yaratılan basınç dalgalarıdır.^[5,12,17] Akustik özellikleri su ile benzer olduğu sürece yayılım gösterdikleri ortama enerji transfer etmezler ve hasar oluşturmazlar.^[5,12,18] Vücuttaki yumuşak dokular da bu ortamlardan biridir. Değişik akustik özelliklere sahip

ortamlara geçiş bölgesinde (yüzey) ise enerji salınımı sonucu oluşan ani basınç farkının yarattığı gerdirici kuvvet mekanik parçalanmayı yaratır.^[12,16-18]

Günümüzde kullanımda bulunan bütün ESWT cihazları aynı fizik kuralları ile çalışmaktadır. Su içinde küçük bir alanda, ani olarak enerjinin salınımı ile yüksek enerjili basınç (şok) dalgası üretilmektedir.^[5,12,17] Ortaya çıkan şok dalgası akustik kurallar sonucu içinde oluşturulduğu su tankını ve vücutta bulunan yumuşak dokuları (akustik özellikleri su ile aynı olduğundan) değişime uğramadan ve doku harabiyeti yaratmadan geçmektedir.^[5,12,17] Bu tedavi şekli, kırık ve yumuşak doku iyileşmesi, omzun kalsifi-



Şekil 1. (a) ESWT 500 şok grubu ikinci hafta görünümü. Çok sayıda damar ve yoğun mononükleer iltihabi infiltrasyon, fibroblastik aktivite artışı içeren granülasyon dokusu (ok) (H-E x 100). (b) Özellikle prolen çevresinde çok sayıda multinükleer dev hücre (ok) ve mononükleer iltihabi hücreler (H-E x 200). (c) Kontrol grubu ikinci hafta görünümü. Çok sayıda mononükleer iltihabi hücre (ok), liflerde dizi- lim bozukluğu (H-E x 100).

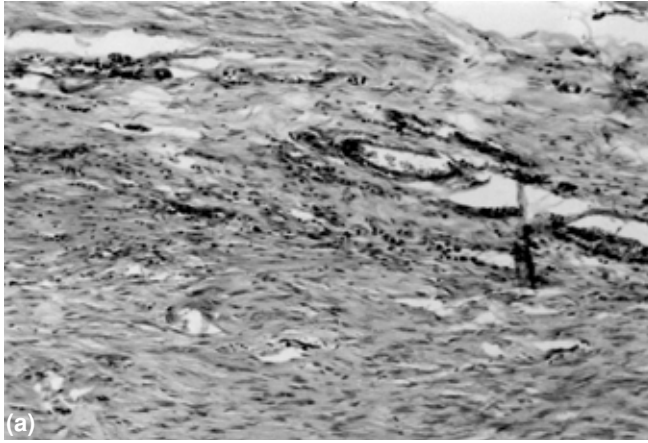
ye tendiniti, tenisçi dirseği ve plantar fasciitis tedavisinde kullanılmaktadır.^[6-9]

Tendon iyileşmesinde ultrason, direkt akım elektrik uyarı ve lazer foto uyarı gibi değişik yöntemler kullanılmış ve tendon iyileşmesine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir.^[2-4]

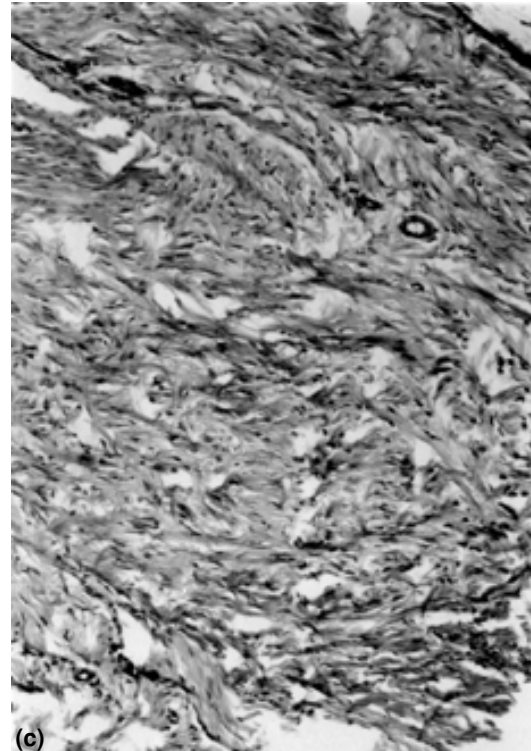
Sıçanlar, tendon kesiklerinin onarımında ESWT'nin etkilerini incelemek için iyi bir model oluşturur. Tendon hasarına yol açmak ve kontrollü koşullarda tedavi uygulamak kolaydır. Doku çeşitli histolojik, fizik ve biyomekanik teknikleri kullanarak muayene edilebilir. Bu çalışmada, genç hayvanlarda daha iyi

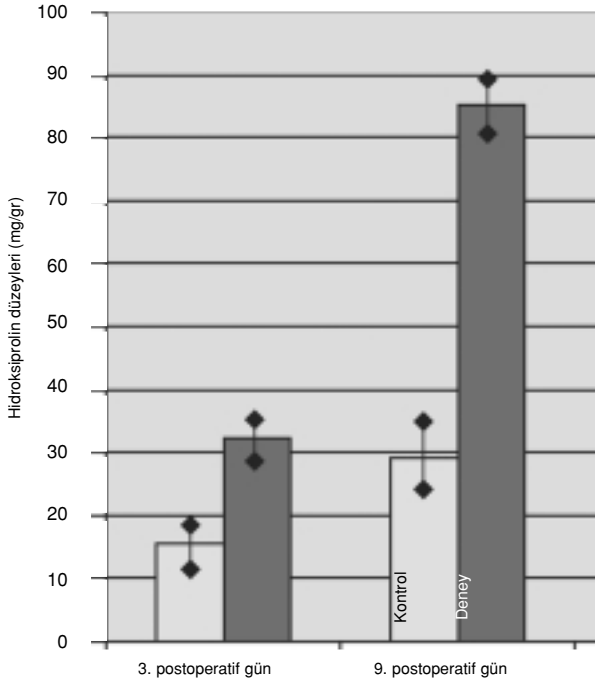
bir onarım oranı beklendiğinden genç sıçanlarla çalışılmıştır. Dişi sıçanlarda östrojen siklusunun tendon iyileşmesini etkileyebilmesi olasılığından dolayı sadece erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tendon iyileşmesi sıçanların aşıl tendonunda çalışılmıştır. Aşıl tendonu insan vücudundaki ekstrasinovyal en büyük tendondur; bu yapısıyla eldeki fleksör tendonlardan ayrılır.

Histolojik çalışmada, ikinci haftada ESWT 500 şok tedavisi grubunda oluşan granülasyon dokusu belirgin olarak daha selüler, daha vaskülarize idi; yoğun iltihabi infiltrasyon içermekteydi ve çok sayıda multinükleer dev hücre vardı.



Şekil 2. (a) ESWT 500 şok grubu üçüncü hafta görünümü. Konjesyone kan damarları ve hafif mononükleer hücre artışı (H-E x 100). (b) Kontrol grubu üçüncü hafta görünümü. Özellikle prolen çevresinde mononükleer iltihabi hücre ve fibroblastik aktivite artışı, arada birkaç multinükleer dev hücre (ok) görülmekte (H-E x 100). (c) Kontrol grubu üçüncü hafta görünümü. Liflerde belirgin dizilim bozukluğu (H-E x 200).





Şekil 3. Deney ve kontrol grubu 3. ve 9. gün hidrokspirolin değerleri.

Üçüncü haftada ESWT şok grubunda iyileşmenin kontrol grubuna göre daha iyi ve düzenli olduğu, fibrillerde düzensizliğin, yoğun lenfosit ve histiosit infiltrasyonunun azaldığı ve çok daha az sayıda multinükleer dev hücre içerdiği görüldü. Bulgular ESWT'nin tendon iyileşmesini kontrol grubuna göre hızlandırdığını göstermektedir.

Biyokimyasal çalışmada, kollajen sentezini gösteren hidrokspirolin oranları dokuzuncu günde ESWT uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin olarak artmıştı. Switzer'in^[9] tarif ettiği yöntemle göre, gram kuru doku ağırlığına düşen mg hidrokspirolin olarak ölçümlenen değerler, dokuzuncu günde deney grubunda 85 mg/g, kontrol grubunda 29.1 mg/g saptandı. Tenotomize tendonlarda kollajen üretiminin uyarılması, muhtemelen gen regülasyonu ya da kollajen metabolizmasındaki enzimlerin modülasyonuna bağlanabilir.

Yaptığımız bu çalışmada sütüre edilmiş aşıl tendonlarında kollajen sentezinin artışı ve histolojik bulgular ESWT uygulamasının, uygulanmayan gruba göre tendon iyileşme oranını artırdığını göstermektedir. Uzun süren tendon iyileşmesi sürecini

sağlıklı şekilde kısaltmayı hedefleyen çalışmalar arasında ESWT uygulamasının etki mekanizmasını göstermek ve değişik şok sayılarında ve enerji gruplarındaki etkilerini saptamak için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Kaynaklar

- Haupt G, Chvapil M. Effect of shock waves on the healing of partial-thickness wounds in piglets. *J Surg Res* 1990;49: 45-8.
- Jackson BA, Schwane JA, Starcher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1991;23:171-6.
- Nessler JP, Mass DP. Direct-current electrical stimulation of tendon healing in vitro. *Clin Orthop* 1987;(217):303-12.
- Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998;22:281-7.
- Chaussy CG, Fuchs GJ. Current state and future developments of noninvasive treatment of human urinary stones with extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol* 1989; 141(3 Pt 2):782-9.
- Dahmen GP, Meiss L, Nam V, Cruadis B. Extrakorporale Stosswellentherapie im knochennahen Weichteilbereich an der Schulter. *Extr Orthop* 1992;15:25-7.
- Loew M, Jurgowski W, Mau HC, Thomsen M. Treatment of calcifying tendinitis of rotator cuff by extracorporeal shock waves: a preliminary report. *J Shoulder Elbow Surg* 1995; 4:101-6.
- Schleberger R, Senge T. Non-invasive treatment of long-bone pseudoarthrosis by shock waves (ESWL). *Arch Orthop Trauma Surg* 1992;111:224-7.
- Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991;2:229-31.
- Spindler A, Berman A, Lucero E, Braier M. Extracorporeal shock wave treatment for chronic calcific tendinitis of the shoulder. *J Rheumatol* 1998;25:1161-3.
- Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;29:225-9.
- Chaussy C, Schmiedt E. Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for kidney stones. An alternative to surgery? *Urol Radiol* 1984;6:80-7.
- Hill DE, McDougal WS, Stephens H, Fogo A, Koch MO. Physiologic and pathologic alterations associated with ultrasonically generated shock waves. *J Urol* 1990;144:1531-4.
- Holmes SA, Whitfield HN. The current status of lithotripsy. *Br J Urol* 1991;68:337-44.
- Pfister RC, Papanicolaou N, Yoder IC. Urinary extracorporeal shock wave lithotripsy: equipment, techniques, and overview. *Urol Radiol* 1988;10:39-45.
- Plaisier PW, van der Hul RL, Terpstra OT, Bruining HA. Current role of extracorporeal shockwave therapy in surgery. *Br J Surg* 1994;81:174-81.
- Wilson WT, Preminger GM. Extracorporeal shock wave lithotripsy. An update. *Urol Clin North Am* 1990;17:231-42.
- Kaulesar Sukul DM, Johannes EJ, Pierik EG, van Eijck GJ, Kristelijn MJ. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study. *J Surg Res* 1993;54:46-51.