



Düşük molekül ağırlıklı heparinin sıçan tendon iyileşmesi üzerine etkisi

The effect of low-molecular-weight heparin on rat tendon healing

Erdinç ESEN, Erdal CİLA, Candan ÖZOĞUL,¹ Arzu Gül TAŞCI,² Serkan SİPAHİOĞLU,
Halil Can GEMALMAZ, Akif Muhtar ÖZTÜRK, Yunus DOĞRAMACI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ¹Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı;
²Orta Doğu Teknik Üniversitesi İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı

Amaç: Düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) tendon iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmada, ağırlığı yaklaşık 300 gram olan 45 adet erişkin Wistar tipi sıçan eşit sayıda üç gruba ayrıldı. Tüm gruplarda Aşil tendonu kesildi ve primer tamir uygulandı. Grup I ve II'deki deneklere (grup I'e yüksek doz, 6 mgr/kg, 170 IU AXa; grup II'ye düşük doz, 3 mgr/kg, 85 IU AXa) dört hafta süreyle, günlük, subkutan, tek doz olarak DMAH (nadroparin kalsiyum) uygulandı. Grup III'deki deneklere DMAH uygulanmadı, kontrol grubu olarak değerlendirildi. Histolojik olarak, elektron ve ışık mikroskopunda, iyileşen tendonlardaki fibriler kollajen sentezi, mitokondri dejenerasyonu ve ekstraselüler matriksteki kollajenin fibriler veya homojen yapıda olup olmadığı değerlendirildi. Biyomekanik olarak da en büyük yüklenme kuvvetleri ve bu sıradaki uzama miktarları belirlendi.

Sonuçlar: Histolojik olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMAH verilen iki grupta, grup I'de daha fazla olmak üzere, fibroblast sayısında, ekstraselüler matrikste fibriler kollajen oluşumunda, fibroblastların sitoplazmik içeriklerindeki granüllü endoplazmik retikulum sayısında artış, dejenerasyon göstergesi olarak da mitokondri vakuolizasyonunda azalma görüldü. Biyomekanik çalışmada, grup I'de ölçülen en büyük yüklenme ve uzama değerleri (31 N ve 25 mm) grup II (24.6 N ve 19.6 mm) ve grup III'e (23.1 N ve 17.3 mm) göre anlamlı farklılık gösterdi (p<0.05). Grup II ile III arasında ise bu açıdan anlamlı fark görülmedi (p>0.05).

Çıkarımlar: Günlük olarak tek doz şeklinde DMAH uygulaması, fibroblast sayısı ile fibriler kollajen sentezini artırıp, mitokondri dejenerasyonunu azaltarak tendon iyileşmesini olumlu etkilemektedir.

Anahtar sözcükler: Aşil tendonu/yaralanma; heparin, düşük molekül ağırlıklı; sıçan; yara iyileşmesi.

Objectives: We investigated the effect of low-molecular-weight heparin (LMWH) on the healing of tendons.

Methods: Forty-five adult Wistar rats weighing 300 g were randomized into three groups equal in number. All the rats underwent full-thickness surgical incision of the Achilles tendon followed by primary repair. After the operation, two groups received daily subcutaneous LMWH injections (nadroparin calcium) for four weeks at high or low doses (group I, 6 mg/kg, 170 IU AXa; group II, 3 mg/kg, 85 IU AXa). Group III remained untreated as the control group. Histologically, the specimens were examined under light and electron microscopy with regard to the amount of fibrillar collagen synthesis, mitochondrial degeneration, and the composition of the extracellular matrix collagen. Biomechanically, maximum load to failure and correspondent elongation of the tendons were measured.

Results: Compared to the control group, histologically, both LMWH-treated groups exhibited increased number of fibroblasts, increased fibrillar collagen formation in the extracellular matrix, and higher counts of granular endoplasmic reticula in cytoplasmic contents of fibroblasts as well as decreased mitochondrial vacuolization and degeneration. Biomechanical assessments showed that tendons in group I had significantly higher maximum load to failure and elongation values than group II and III (31 N vs. 24.6 N and 23.1 N; 25 mm vs. 19.6 mm and 17.3 mm, respectively; p<0.05). Group II and III did not differ significantly in this respect (p>0.05).

Conclusion: Daily administration of single dose LMWH improves tendon healing through increasing the number of fibroblasts and fibrillar collagen synthesis and decreasing mitochondrial degeneration.

Key words: Achilles tendon/injuries; heparin, low-molecular-weight; rats; wound healing.

Yazışma adresi / Correspondence: Dr. Erdinç Esen, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, 06510 Beşevler, Ankara. Tel: 0312 - 202 55 28 e-posta: erdinc@gazi.edu.tr

Başvuru tarihi / Submitted: 18.11.2008 **Kabul tarihi / Accepted:** 03.01.2009

© 2009 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği / © 2009 Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology

Tendonlar tekrarlayan hareketler, dejenerasyon ve travma nedeniyle, akut veya kronik olarak kolayca yaralanabilir.^[1,2] Yaralanmadan sonra tendon iyileşmesi fibrotik skar dokusu oluşumu ile gerçekleşir. Bu dokunun yapısal ve mekanik özellikleri, normal tendona göre zayıftır.^[3-5] Tendonun iyileşme sonrası daha sağlam olması için değişik çalışmalarda bazı biyomateriyaller denenmiş, fibroblast içeren hücrelerden iskelet yapıları oluşturulmuş, büyüme faktörleri ve sitokinler de eksojen olarak uygulanmıştır. Bunlardan başka, gen ve hücre tedavisi yoluyla doku mühendisliği de bu amaçla kullanılmıştır.^[6-13]

Tendon iyileşmesinin daha sağlıklı olması için yapılan çalışmalardan biri de antitrombotik ajanlardan heparinin iyileşme üzerine olan etkilerini araştırmak olmuştur. Heparin ile anjiyogenezisin artırılacağı, böylece tendon iyileşmesinin daha iyi olacağı düşüncesiyle araştırmalar yapılmıştır.^[14-17] Tendinozis ve peritendinitin tedavisinde kısa süreli immobilizasyon, germe egzersizleri, steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar ve lokal olarak heparin uygulanması önerilen tedavi seçenekleri arasındadır.^[14,15,18,19] Tatar ve ark.^[15] yaptıkları deneysel çalışmada, lokal olarak uygulanan heparinin tendon dejenerasyonunu artırdığını göstermişler ve heparinin Aşil tendon dejenerasyonunda kullanılmaması gerektiğini belirtmişlerdir.

Trombin, serin proteazdır ve proteolitik etki gösterir. Pek çok proteinin inaktif halden aktif hale geçmesini sağlar. Doku yaralanmasından sonra pıhtı oluşumunda temel faktördür. Nötrofil, monosit ve birçok büyüme faktörü için kemotaktik etki gösterir ve fibroblast çoğalmasını uyarır. En önemli etkisi, trombositleri aktive etmesi ve çözünebilir fibrinojenin çözümez fibrin hale dönüşmesini sağlamaktır. Tromboflebit oluşumunu engelleyen birçok tedavinin amacı trombin aktivitesini azaltmaya yöneliktir.

Koagülasyon mekanizmasında, faktör Xa etkisi ile protrombin aktive edilip trombin haline dönüştürülür. Düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH) faktör Xa aktivitesini azaltarak trombin oluşumunu etkiler.^[20,21] Ayrıca, antikoagülan etkileri yanında, DMAH'lerin yara iyileşmesini olumlu yönde etkiledikleri, yeni damar oluşumunu artırıcı, fibrozisi azaltıcı, enflamasyonu baskılayıcı, karınıçi yapışıklıkları azaltıcı ve makrofajları uyarıcı etkileri olduğunu belirten çalışmalar vardır.^[12,16,17,19,21-24] Yılmaz ve ark.^[25] ezilme yaralanması oluşturdukları tendonlarda, lokal

olarak DMAH verdikleri grupta, daha az yapışıklık oluşumu, normale daha yakın bir histolojik görünüm ve daha az skar dokusu izlediklerini belirtmişlerdir.

Düşük molekül ağırlıklı heparinin devamlı veya günde tek doz kullanımı sırasında trombin oluşum mekanizmasını ne derece baskıladığı tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma, sistemik olarak günde tek doz şeklindeki DMAH uygulamasının, trombin oluşumunun engellenip engellenmemesine bağlı olarak, tendon iyileşmesi üzerinde etkili olup olmadığını araştırmak amacıyla tasarlandı.

Gereç ve yöntem

Çalışmada, ağırlığı 300±20 gram olan 45 adet erişkin Wistar tipi sıçan kullanıldı. Sıçanlar Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Yetiştirme Çiftliği'nden temin edildi. Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Ünitesi, Cerrahi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Her kafese, hareket kısıtlanmasına yol açmayacak şekilde 3-4 adet sıçan yerleştirildi ve günlük olarak yemleri ve suları verildi. Tüm cerrahi işlemler anestezi altında uygulandı. Deney sonunda (4 hafta sonunda) tüm sıçanların yaşamları yüksek doz thiopental (İ.E. Ulugay, İstanbul) verilerek sonlandırıldı. Deneklerde DMAH olarak nadroparin kalsiyum (Fraxiparine, Sanofi-Aventis) kullanıldı. Çalışma sırasında ölüm ve otomutilasyon nedeniyle herhangi bir denek kaybı olmadı. Deneysel çalışma Gazi Üniversitesi Etik Komitesinin izniyle gerçekleştirildi (G.Ü. ET-03.007).

Sıçanlar uygulanan DMAH dozuna göre eşit sayıda (n= 15) üç gruba ayrıldı. Grup I'e yüksek doz (6 mgr/kg, 170 IU AXa), grup II'ye grup I'e göre yarım doz (3 mgr/kg, 85 IU AXa) DMAH verilirken, kontrol grubu olarak atanan grup III'e DMAH verilmedi.

Fraxiparinin sıçanlarda günlük subkutan uygulamada 10 mgr/kg dozunda lokal hemorajiye yol açtığı, etkisiz dozun ise 2.5 mgr/kg olduğu görülmüştür (1 mgr Fraksiparine= 90 IU AXa).^[21]

Grup I ve II'deki deneklere DMAH uygulamasına cerrahi girişimden 12 saat önce başlandı ve sıçanların sırt bölgesine subkutan olarak uygulandı. Ameliyat sonrasındaki DMAH uygulaması dört hafta süreyle, günlük olarak subkutan enjeksiyon şeklinde grup I'deki deneklere 170 IU AXa/gün, grup II'deki deneklere 85 IU AXa/gün olarak gerçekleştirildi. Deney sonunda her gruptan sekiz denek biyomekanik, yedi denek de histolojik değerlendirmeye alındı.

Cerrahi teknik

Cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından, ketamin-HCL (50 mgr/ml) ve benzotonyum-Cl karışımının (Ketalar-IM) parenteral (IM) yolla uygulandığı anestezi eşliğinde gerçekleştirildi. Aşil tendonu seyrine uyan bölgede, orta hatta kalacak şekilde, uzunlamasına 3 cm'lik kesi ile cilt ve ciltaltı geçildi. Aşil tendonu ve plantaris tendonları çevre fasyadan sıyrıldı. Tüm gruplarda Aşil tendonu yapışma yerinin 0.5 cm proksimalinden tam kat transvers kesi oluşturuldu. Plantaris tendonu kesilerek "internal splint" oluşturması engellendi. Kesi oluşturulan tendonlara, 6-0 Ethilon monoflaman naylon (Ethicon, ABD) dikişle modifiye Kessler yöntemiyle primer tamir uygulandı. Ciltaltı ve cilt 3-0 Ethilon monoflaman naylon dikiş materyaliyle devamlı dikiş tekniğiyle kapatıldı.

Ameliyat sonrasında herhangi bir örtü ve alçı kullanılmadı ve iyileşme süresi boyunca hayvanlara herhangi bir kısıtlama uygulanmadı. Bu dönemde tüm denekler aynı standart laboratuvar yemi ve su ile beslendi, aynı özellikteki ortamda serbest olarak hareket ettirildi.

Histolojik değerlendirme

Alınan tendon örnekleri gluteraldehid-paraformaldehid solüsyonunda bekletildi. Alışılmış takip işlemlerinden sonra, araldit+DDSA (dodese-nil süksinik anhidrit)+BDMA (benzil dimetil amin) ile bloklanmış dokulardan önce 1 mikron kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Kesitler toluidin mavisi ile boyandı ve ışık mikroskopik inceleme ile hangi alanlarda elektron mikroskopik inceleme yapılacağı belirlendi. İncelenecek alanlardan ultramikrotomda 300-700 A° kalınlığında ince kesitler alınarak uranil asetat+kurşun sitrat ikili boyası ile boyandı. Boyama işleminden sonra Carl-Zeiss EM-900 marka elektron mikroskopunda inceleme yapılarak fotoğrafları çekildi. Toluidin mavisi ile boyanan yarı ince kesitler de ışık mikroskopunda (Olympus-BH2) değerlendirildi.

Biyomekanik değerlendirme

Deney gruplarındaki tendonların kopma kuvvetleri arasında biyomekanik açıdan fark olup olmadığı, ODTÜ İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomekanik Laboratuvarında aynı mühendis tarafından araştırıldı. Her gruptan alınan sekiz adet kalkaneus-Aşil kompleksi, Llyod instruments LR5KPlus (Ametek, ABD) model cihaza, özel olarak yaptırılan tutucular yardımıyla yerleştirildi. Normal tendonların siklik yüklenme ve deformasyon testi, cerrahi işlem uygulanmayan taraftaki

Aşil tendon kompleksleri ile yapıldı. Gerilme kuvveti 5 N/sn olacak şekilde uygulandı. Uygulamaya başlamadan önce, tüm Aşil tendon kompleksleri için yüklenme ve uzama miktarları için kalibrasyon uygulandı. Tendonlardaki uzama miktarı cihaza bağlı olan bilgisayar desteği ile ölçüldü. Tüm yüklenme ve deformasyon testleri Lloyd Instruments Data Analysis Package sistemi ile yapıldı ve kaydedildi. Tendonlara öngerilme uygulanmadı. İşaretleme (marker) ve kamera yardımıyla uzama miktarı izlemi yapılamadı.

İstatistiksel değerlendirme

Veriler SPSS 10.0 for Windows istatistik programında değerlendirildi. En büyük yüklenme (maximum load) ve uzama (extention) yönünden karşılaştırmalar, küçük grupların karşılaştırılmasında kullanılan non-parametrik test olan Mann-Whitney U-testi ve Wilcoxon işaretli sıra sayıları testi ile yapıldı.

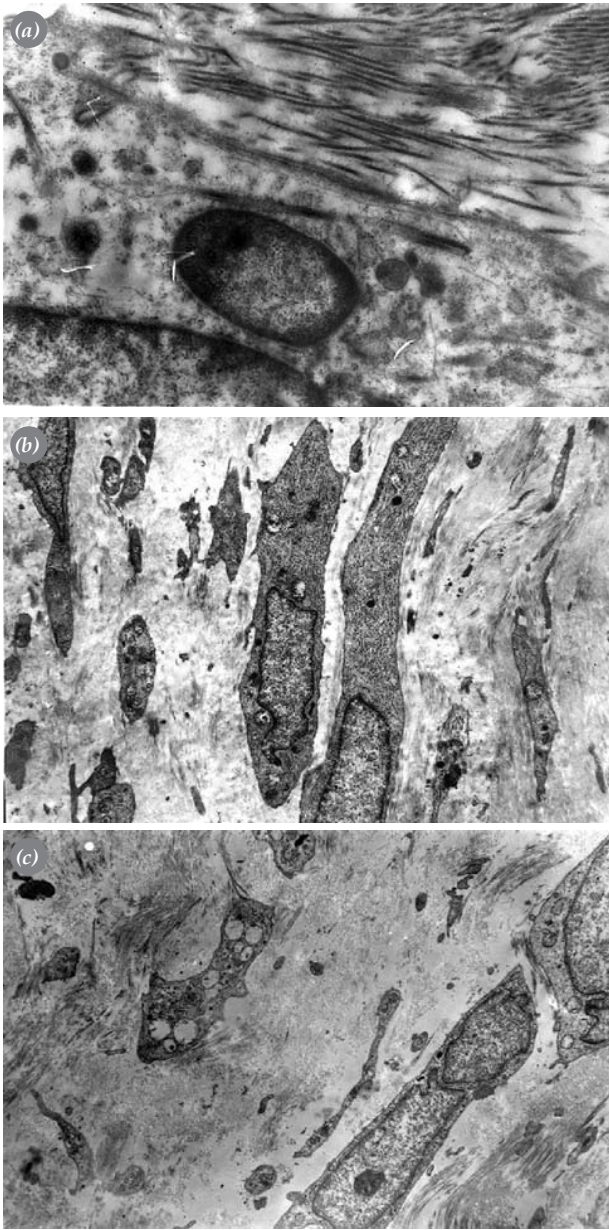
Sonuçlar

Histolojik sonuçlar

Elektron mikroskopik incelemede, grup I'e ait örneklerde, büyük büyültmelerde fibroblastlar içinde granüllü endoplazmik retikulum sayısında belirgin artış, sitoplazma içinde sentezlenmiş prokollajen görüldü. Mitokondrilerde krista erimesi (crystalysis) olmadığı ve normal görünümlü mitokondrilerin hakimiyeti gözlemlendi (Şekil 1a). Bu grupta fibroblastlar çekirdek ve sitoplazmik özellikler açısından sağlıklı görünümdeydi. Ekstraselüler matriks içinde, son derece düzenli ve yoğun bulunan artmış kollajen fibril oluşumu gözlemlendi (Şekil 1a).

Grup II'de, grup I'e oranla daha az, grup III'den ise daha fazla olacak şekilde, fibroblast sayısı ve sentezlenen kollajen miktarında artış gözlemlendi. Büyük büyültmelerde, ekstraselüler matrikste, yer yer enine çizgilenme görünümünü kaybedip, homojen görünen kollajen oluşumu vardı (Şekil 1b). Fibroblastlarda granüllü endoplazmik retikulumların grup I'e göre daha az olduğu, mitokondrilerde de krista erimesinin yok denecek kadar az olduğu ve vaskülarizasyonun belirgin olarak arttığı gözlemlendi.

Grup III'te, fibroblastlarda grup I ve II'ye göre sayı ve sitoplazmik içerik açısından azalma vardı; kollajen sentezinin, sentezlenen kollajende fibril oluşumunun ve enine bantlaşma görünümünün daha az olduğu homojen yapı görüldü. Büyük büyültmelerde, mitokondrilerde krista erimesi, fibril oluşumu yetersiz homojen kollajen yapısı (Şekil 1c), yetersiz kolla-

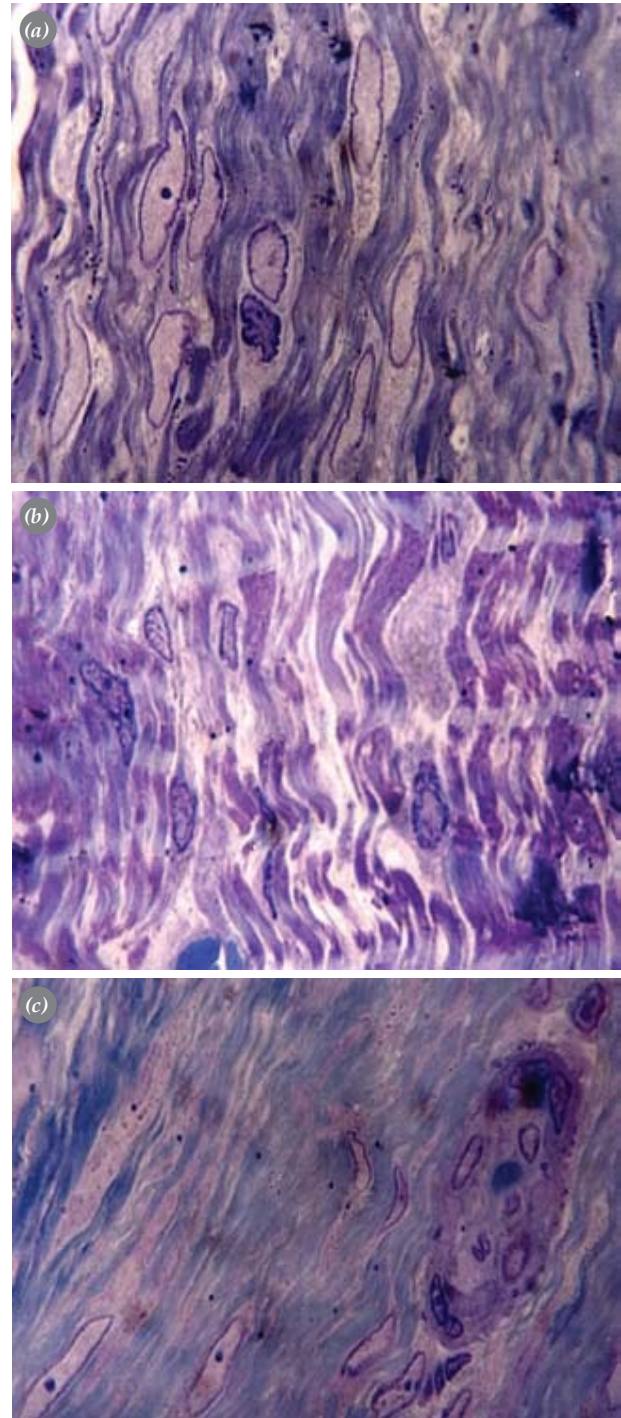


Şekil 1. Gruplarda uranil asetat ve kurşun sitrat boyamasından sonra elde edilen elektron mikroskopik görüntümler. **(a)** Grup 1 (x36000); **(b)** grup II (x9000); **(c)** grup III (x9000).

jen sentezi ile genişlemiş sisternalar içeren granüllü endoplazmik retikulum belirlendi.

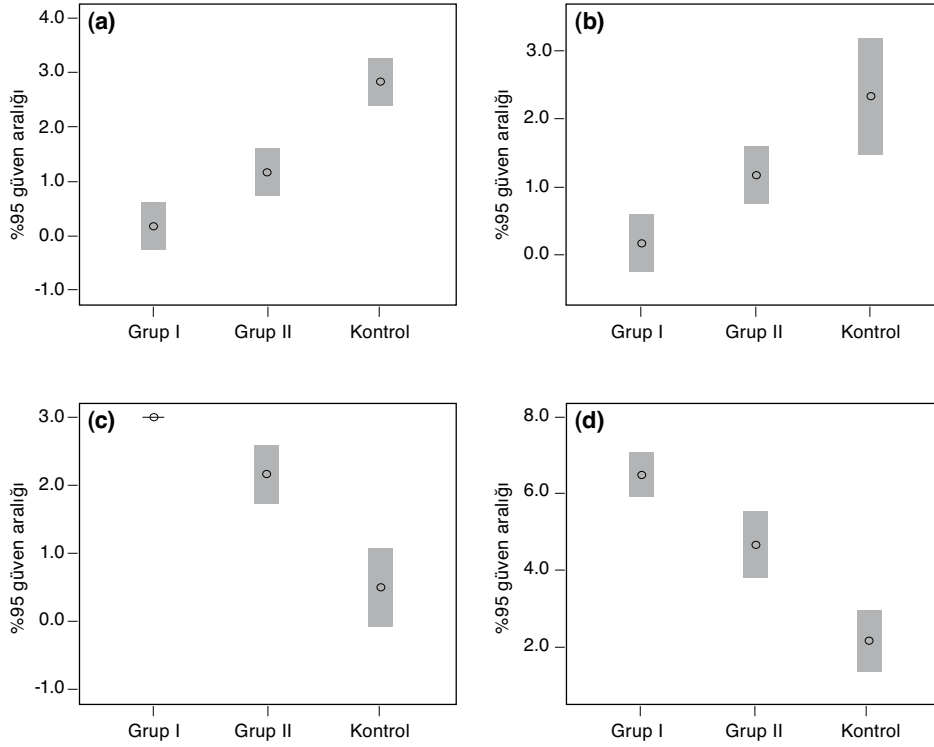
Işık mikroskobu ile incelemede de grup I ve II'de fibroblastların sitoplazma içeriklerinin artmış olduğu ve ekstraselüler matrikste bulunan kollajenin fibriler yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 2a, b).

Grup III'te ise, fibroblastların sitoplazmik içerikleri daha az, ekstraselüler matrikste bulunan kollajen fibriler yapıdan çok homojen yapıda idi (Şekil 2c).



Şekil 2. Toluidin mavisi ile boyama sonrasında elde edilen ışık mikroskobu görüntümleri (x1000). **(a)** Grup 1; **(b)** grup II; **(c)** grup III.

Gruplar arasında, endoplazmik retikulum sayısı, mitokondriyal lizis olup olmaması, ekstraselüler homojen kollajen yoğunluğu ve ekstraselüler fibriler kollajen yoğunluğunu belirlemek için her preparattan yapılan sayımlar ve değerlendirmeler sonucunda



Şekil 3. Gruplar arası histolojik farklılıklar. (a) Homojen kollajen yoğunluğu; (b) Mitokondriyal krista lizis; (c) Fibriler kollajen yoğunluğu; (d) Granüllü endoplazmik retikulum sayısı.

grup I ve II ile grup III arasında belirgin fark olduğu gözlemlendi (Şekil 3).

Histolojik olarak, grup I ve II'de fibroblastların çekirdek ve sitoplazmik özellikler açısından sağlıklı görünümde olmaları, mitokondriyal krista erimesinin olmaması ve artmış granüllü endoplazmik retikulum sayısı iyileşme açısından olumlu sonuçlardı. Ayrıca, ekstraselüler matrikste oluşan kollajenin fibriler yapıda olması tendon iyileşmesinin iyi olduğunu göstermekteydi. Grup III'te ise, azalmış fibroblast sayısı, içerdikleri granüllü endoplazmik retikulum sayısının az olması; ayrıca, oluşan kollajenin daha çok homojen yapıda olması, tendon iyileşmesinin grup I ve II'ye göre daha yavaş ve yetersiz olduğunu göstergeleriydi.

Biyomekanik sonuçlar

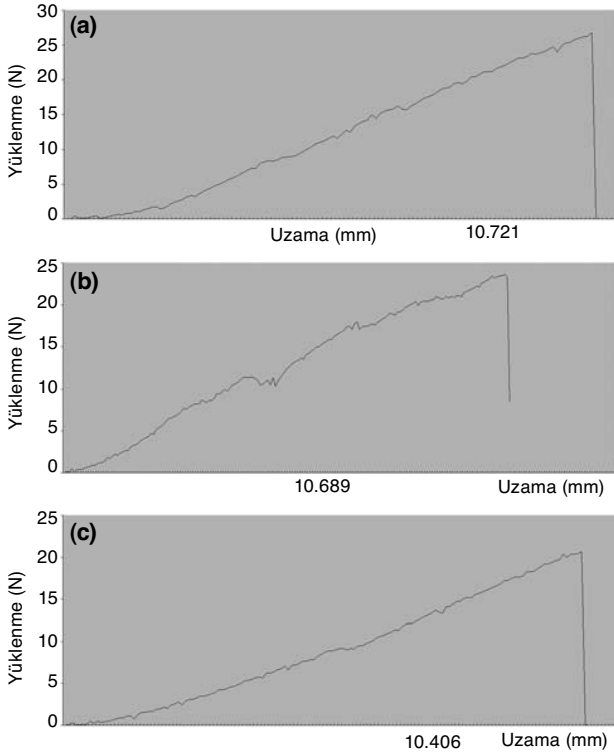
Biyomekanik inceleme sırasında kalkaneus-Aşil kompleksinin en büyük yüklenme kuvvetleri (Newton) ve bu yüklenme sırasındaki en büyük uzama miktarları (milimetre olarak) belirlendi. Tüm gruplarda yüklenme ve uzama eğrileri çıkarıldı (Şekil 4). Deney sırasında grup I ve II'de, tendon kopmalarının yaralanma yerinin distalinde, kemik ile birleşim bölgesinin yakınında olduğu gözlemlendi. Grup III'te ise

kopmaların çoğunluğu yaralanma bölgesine yakın veya yaralanma bölgesinde meydana geldi. Grup I, II ve III'te en büyük yüklenme kuvvetleri ortalaması sırasıyla 31 N, 24.6 N ve 23.1 N bulundu. En büyük uzama miktarları ortalaması ise sırasıyla 25 mm, 19.6 mm ve 17.3 mm idi.

Grup I ile III arasında en büyük yüklenme ve uzama değerleri açısından anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$). Grup I'deki deneklerde tendon iyileşmesi, anlamlı derecede ve histolojik bulgularla da uyumlu olarak daha iyi idi. Grup I ile II arasında da anlamlı fark vardı ($p<0.05$). Histolojik olarak da iki grup arasında kollajen sentezi yönünden fark bulunması, grup II'deki tendon iyileşmesinin grup III'den daha iyi, ancak grup I'den daha az olduğunu gösterdi. Grup II ile III arasında ise anlamlı fark elde edilmedi ($p>0.05$). Ancak, histolojik olarak grup III'de mitokondri dejenerasyonu daha fazla, fibriler kollajen sentezi ise daha az idi.

Tartışma

Tendon yaralanmaları ve yumuşak doku zedelenmeleri ortopedik cerrahların günlük iş yüklerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Özellikle Aşil



Şekil 4. (a) Normal tendonun (karşı taraf), (b) grup I'deki tendonun ve (c) grup III'teki tendonun yüklenme deformasyon eğrileri.

tendon yırtıkları, genellikle vasküler yapının iyi olmadığı, dejeneratif değişikliklerin ortaya çıktığı orta yaşlı kişilerde daha fazla görülmektedir. Tüm yara iyileşmelerinde, tendonlar da dahil olmak üzere ortak bir iyileşme mekanizması vardır. Yaralanma bölgesinde öncelikle fibrin pıhtı oluşumu meydana gelmekte, bu pıhtı içinde kan hücreleri, fibronektin ve trombositler hapsedilip yıkıma uğramaktadırlar. Yıkılan hücrelerden salınan kemotaktik faktörler ve ortama gelen lokal büyüme faktörlerinin etkisi ile iyileşme süreci başlamaktadır.^[12,16,19] Pıhtılaşmada etkili olan trombin oluşumunu heparin ve türevleri DMAH'ler inhibe etmektedir. Etki mekanizması açısından iyileşmenin erken safhasının DMAH'ler ile baskılandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan, heparin ve türevlerinin doku ve hücrelerde yıkımı azaltıp, neoangiyozenisi artırıp revaskülarizasyon, granülasyon ve epitelizasyonu destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir.^[21,22] Ayrıca, heparin ve türevleri, iskemik dokuda hücresel yığılımı ve çoğalmayı, yeni damarlanma oluşumunu artırarak hücresel yıkımı azaltmak suretiyle yara iyileşmesini olumlu etkilemektedir.^[16,17,19-21] Heparinin, damarlanmayı artırarak ve hücresel yenilenmeyi

düzenleyerek tendon iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir.^[15,19,21]

Sıçanlarda yara iyileşmesi sırasında kullanılan subkutan heparinin etkisi çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Deneysel olarak yanık oluşturulan sıçanlarda verilen heparinin yara iyileşme süresini kısalttığı gösterilmiştir.^[24] Kweon ve ark.^[23] sıçan sırtlarındaki tam kat yaralara topikal olarak uygulanan heparin/kitosan kompleksinin 15 günlük tedavi sonunda tama yakın iyileşme sağladığını göstermişlerdir. Kutlay ve ark.^[22] abdominal cerrahi sonrası subkutan olarak uygulanan DMAH'nin karıncı yapışıklıkları azalttığını, iyileşmeyi hızlandırdığını bildirmişlerdir. Yılmaz ve ark.^[25] sıçan Aşil tendonlarında ezilme yaralanması sonrasında lokal olarak DMAH uygulamışlar, histolojik olarak daha az yapışıklık, skar oluşumu ve normale daha yakın tendon yapısı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Tendon iyileşmesi sırasında hiyalin kollajen oluşumundan daha çok fibriler kollajen oluşumu ve iyileşen dokuda yeni damar oluşumunun gözlenmesi sağlıklı iyileşmenin bir göstergesidir.^[1,5,16,17,23] Çalışmamızda DMAH verilen gruplarda histolojik olarak, sağlıklı mitokondriler, granüle endoplazmik retikulum sayısında artış (artmış hücresel sentezi gösterir), hücresel apoptozda azalma ve belirgin fibriler kollajen oluşumu görüldü. Bu bulguların, literatürde bildirilen bulgularla uyumlu olduğunu gözlemledik.

Virchenko ve ark.^[26] DMAH'lerin devamlı ve aralıklı (günde iki kez) olarak verilmesinin tendon iyileşmesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Devamlı infüzyon şeklinde DMAH verilen grupta biyomekanik olarak tendon iyileşmesinin azaldığını; ameliyat öncesinde tek doz veya günde iki kez aralıklı olarak DMAH verilen gruplarda tendon iyileşmesi açısından anlamlı fark bulunmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda günde tek doz şeklinde verilen DMAH'nin etkisi incelenmiştir. Klinik uygulamada da, venöz tromboembolizm ve pulmoner tromboemboli tanısı veya şüphesi yoksa, DMAH tedavisi günde tek doz olarak uygulanmaktadır. Hem yüksek doz (grup I) hem de grup I'e göre düşük dozda, günde tek sefer olarak verilen DMAH'nin iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği histolojik olarak gösterilmiş, biyomekanik olarak da desteklenmiştir. Virchenko ve ark.^[26] çalışmasında sıçanların yaşamı deneyin yedinci gününde sonlandırılmasına ve erken dönem biyomekanik sonuçlar incelenme-

sine karşın, çalışmamızda deney dördüncü haftada sonlandırılmış ve histolojik ve biyomekanik değerlendirmeler yapılmıştır.

Bulgularımız, tendon iyileşmesinin evreleri de göz önüne alındığında, günde tek doz şeklinde uygulanan DMAH'nin uzun dönemde iyileşmeyi hızlandırıcı ve arttırıcı etkisi olduğunu gösterdi. Uygulama aralıklı olarak yapıldığında (klinik uygulamada da DMAH genellikle günde tek doz şeklinde aralıklı verilir), devamlı olarak trombin oluşumu engellenmeksizin, tendon iyileşmesinin arttığı gözlenmiştir. İyileşmekte olan tendon bölgesinde trombin ve fibrin pıhtı oluşumunun yavaşlamış olması, erken dönemde bu bölgenin kanlanmasında artışa, ortama büyüme faktörlerinin daha fazla gelmesine yol açarken, DMAH'nin neovaskülarizasyonu artırıcı etkileri de iyileşmenin hızlanmasına katkıda bulunmaktadır.

Çalışmamızda yaygın bir şekilde kullanılan DMAH'lerin günde tek doz olarak sistemik yolla verildiklerinde, fibroblastlarda kollajen sentezini, ekstraselüler matrikste fibriler kollajen oluşumunu ve yeni damar oluşumunu artırarak tendon iyileşmesini olumlu etkilediği gözlemlendi. Bunun yanı sıra, DMAH uygulaması sırasında, hem uygulama bölgesinde hem de yaralanma bölgelerinde makroskobik olarak herhangi bir kanama veya hematoma oluşumuna rastlanmadı. Aslında, DMAH'lerin pıhtı oluşumunu azaltarak, tendon iyileşmesinin erken safhasını ve uzun dönemde ideal iyileşmeyi bozacağı düşünülse de, bu çalışmada tendon iyileşmesini iyi yönde etkilediği ve arttırdığı gözlemlendi.

Çalışmanın belirli günlerde (örneğin 2, 7, 14, 28. günler) alınan örneklerin incelenmesine dayanan bir tasarımla yapılmaması; histolojik açıdan kollajen boyamasının olmaması, kollajen tiplendirmesinin yapılamaması; biyomekanik değerlendirme açısından ise tendonlara öngerilme uygulanmaması, işaretler ve kamera sistemi kullanılarak uzama ve kopmanın izlenmemesi çalışmanın kısıtlılıkları olarak sayılabilir.

Sonuç olarak, kullanım kolaylığı, standart heparine göre daha az kanama, hematoma oluşumu ve takip için monitörizasyon ihtiyacı göstermemesi gibi avantajlarından dolayı, tüm (cerrahi veya travmatik) tendon yaralanmalarından sonra DMAH'lerin sistemik yolla aralıklı olarak kullanılmasının, fibroblast sayısı ve fibriler kollajen sentezini artırıp, mitokondri dejenerasyonunu azaltarak tendon iyileşmesini olumlu etkileyeceğini düşünüyoruz.

Kaynaklar

1. Hyman J, Rodeo SA. Injury and repair of tendons and ligaments. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000;11:267-88.
2. Walsh S, Frank C. Two methods of ligament injury: a morphological comparison in a rabbit model. *J Surg Res* 1988; 45:159-66.
3. Chan BP, Fu SC, Qin L, Rolf C, Chan KM. Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: an animal study. *J Orthop Res* 1998;16:597-603.
4. Frank C, Woo SL, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson W. Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med* 1983; 11:379-89.
5. Frank C, McDonald D, Bray D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D, et al. Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connect Tissue Res* 1992;27:251-63.
6. Gelberman RH, Vande Berg JS, Lundborg GN, Akeson WH. Flexor tendon healing and restoration of the gliding surface. An ultrastructural study in dogs. *J Bone Joint Surg [Am]* 1983;65:70-80.
7. Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med* 1989;8:371-84.
8. Kubota H, Manske PR, Aoki M, Pruitt DL, Larson BJ. Effect of motion and tension on injured flexor tendons in chickens. *J Hand Surg [Am]* 1996;21:456-63.
9. Murrell GA, Lilly EG 3rd, Goldner RD, Seaber AV, Best TM. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *J Orthop Res* 1994;12:582-91.
10. Noguchi M, Seiler JG 3rd, Gelberman RH, Sofranko RA, Woo SL. In vitro biomechanical analysis of suture methods for flexor tendon repair. *J Orthop Res* 1993;11:603-11.
11. Woo SL, Gelberman RH, Cobb NG, Amiel D, Lothringer K, Akeson WH. The importance of controlled passive mobilization on flexor tendon healing. A biomechanical study. *Acta Orthop Scand* 1981;52:615-22.
12. Thomopoulos S, Soslowsky LJ, Flanagan CL, Tun S, Keefer CC, Mastaw J, et al. The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J Shoulder Elbow Surg* 2002; 11:239-47.
13. Wright PE II. Flexor and extensor tendon injuries. In: Canale ST, editor. *Campbell's operative orthopaedics*. 9th ed. St. Louis: Mosby; 1998. p. 3318-76.
14. Sundqvist H, Forsskåhl B, Kvist M. A promising novel therapy for Achilles peritendinitis: double-blind comparison of glycosaminoglycan polysulfate and high-dose indomethacin. *Int J Sports Med* 1987;8:298-303.
15. Tatari H, Koşay C, Baran O, Özcan O, Özer E, Ulukuş C. Effect of heparin on tendon degeneration: an experimental study on rats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9:247-53.
16. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and

- its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 2002;4:252-60.
17. Xia W, de Bock C, Murrell GA, Wang Y. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is up-regulated during tendon healing. *J Orthop Res* 2003; 21:819-25.
 18. Almekinders LC, Gilbert JA. Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med* 1986;14:303-8.
 19. Williams IF, Nicholls JS, Goodship AE, Silver IA. Experimental treatment of tendon injury with heparin. *Br J Plast Surg* 1986;39:367-72.
 20. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996; 5:383-92.
 21. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001;119(1 Suppl):64S-94S.
 22. Kutlay J, Özer Y, Işık B, Kargıcı H. Comparative effectiveness of several agents for preventing postoperative adhesions. *World J Surg* 2004;28:662-5.
 23. Kweon DK, Song SB, Park YY. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials* 2003;24:1595-601.
 24. Saliba MJ Jr. Heparin in the treatment of burns: a review. *Burns* 2001;27:349-58.
 25. Yılmaz S, Saray A, Adanalı G, Aşkar İ, Apaydın İ, Gültan M. Tendon iyileşmesi ve adezyonlar üzerinde nadroparin' in etkisi. Deneysel çalışma. *Sağlık Bilimleri Araştırma Dergisi* 1996;7:209-17.
 26. Virchenko O, Aspenberg P, Lindahl TL. Low molecular weight heparin impairs tendon repair. *J Bone Joint Surg [Br]* 2008;90:388-92.