

# Wpływ antykoagulantów na tkankę łączną w procesie gojenia się rany chirurgicznej

*The influence of low molecular weight heparin on wound healing in rats*

Ewa Kuś

*Proces gojenia rany dzieli się tradycyjnie na 3 fazy: zapalenia, proliferacji oraz przebudowy (remodeling) i zależy od rewaskularyzacji tkanki. Jednym z kluczowych procesów w gojeniu się rany jest tworzenie się na nowo syntetyzowanych włókien kolagenowych. W pracy opisano własne doświadczenia dotyczące oceny procesu gojenia się ran poprzez syntezę kolagenu. Szeroko stosowane w ginekologii, szczególnie u kobiet starszych, leczenie antykoagulantami może mieć wpływ na przebieg tych procesów.*

**Słowa kluczowe:** gojenie się ran, siatka prolenowa, heparyna niskocząsteczkowa

(Przegląd Menopauzalny 2005; 5: 48–53)

## Wstęp

W ciągu ostatnich 10 lat zwiększyła się znacznie nasza wiedza na temat mechanizmów gojenia się ran [1–4]. Proces ten dzieli się tradycyjnie na 3 fazy: zapalenia, proliferacji oraz przebudowy (*remodeling*) i zależy od rewaskularyzacji tkanki. Wiadomo już obecnie, że podczas procesu gojenia się rany zachodzi interakcja pomiędzy składnikami morfotycznymi krwi i elementami naczyń krwionośnych (płytki krwi, makrofagi, neutrofile, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich), elementami naskórka (keratynocyty, melanocyty, komórki Langerhansa), strukturami przydatków (komórki zewnętrznej osłonki włosa, komórki części brodawki włosa), a także skórą właściwą (fibroblasty i miofibroblasty), tkanką nerwową (neurony) oraz tkanką podskórną (adipocyty). Jednym z klu-

czowych procesów w gojeniu się rany jest tworzenie się na nowo syntetyzowanych włókien kolagenowych [5, 6]. Oceniając efektywność syntezy kolagenu pośrednio można więc wnioskować o sprawności procesu gojenia się ran. Szeroko stosowane w ginekologii, szczególnie u kobiet starszych, leczenie antykoagulantami, ze względu na mechanizmy działania może mieć wpływ na przebieg tych procesów.

## Cel pracy

Celem pracy było oszacowanie wpływu długoterminowego leczenia przeciwzakrzepowego na proces gojenia się rany – w warunkach uszkodzonych tkanek i siatki prolenowej, umieszczonej w ranie – poprzez określenie zawartości kolagenu i jego frakcji rozpuszczalnej.

Klinika Patologii Ciąży I Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi;  
kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Urszula Kowalska-Koprek,  
kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Jacek Suzin



## Materiał badawczy

Badania przeprowadzono w Zakładzie Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2000–2001. Materiał badawczy stanowiło 39 szczurów. Do badań użyto młode, 3-miesięczne szczury rasy Wistar, płci żeńskiej, którym podawano karmę firmy Bactil i wodę *ad libitum*. Na wykonanie badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej przy UM w Łodzi.

Wszystkim szczurom golono skórę w części grzebietowo-bocznej i w ogólnej narkozie (Thiopental, Biochemie GmBH, Wiena, Austria), podawanej dootrzewnowo w dawce 50 mg/kg masy ciała – wykonywano podłużną ranę na skórze o długości 4 cm, przez całą grubość skóry. W środku rany umieszczano siatkę z prolenu PMM1, firmy Ethicon, Johnson&Johnson, o powierzchni 0,25 cm<sup>2</sup>. Ranę zszywano nitką niewchłaniającą Ethibond 2,0. Zakładano 4 szwy pojedyncze samoadaptacyjne.

Populację 39 badanych szczurów podzielono na 3 grupy.

- ▶ W grupie I – podawano podskórnie *antykoagulant enoxaparinum natrium* (Clexane, Bellon, Rhone-Paulene Roer) w dawce 1 mg/kg masy ciała raz/dobę przez 7 dni.
- ▶ W grupie II – Clexane był podawany podskórnie w tej samej dawce raz/dobę przez 14 dni.
- ▶ W grupie III – kontrolnej szczurom podawano 0,9% NaCl podskórnie raz/dobę przez 7 lub 14 dni.

Zwierzęta zabijano poprzez podawanie dootrzewnowe Thiopentalu w dawce letalnej w 14., 21., 28. i 42. dniu gojenia się rany. Skórę z uszkodzoną powierzchnią wraz z siatką usuwano z tkanki podskórnej i poddawano dalszej analizie biochemicznej. Oznaczano procentową zawartość wody w tkance oraz stężenie kolagenu całkowitego i jego frakcji rozpuszczalnej w ranie i siatce prolenu. Zawartość wody w tkance została określona jako różnica pomiędzy mokrą a suchą masą. Wszystkie próbki były zważone i wysuszone do stałej masy w temperaturze +90°C.

W celu oznaczenia kolagenu pobrany materiał do badania biochemicznego siatkę z prolenu usuwano z tkanki podskórnej, ważono, suszono do stałej masy

w 60°C. Wyszuszone siatki z kolagenem były następnie hydrolizowane w 6N HCl (3 mg/10 mg suchej masy). Roztwór suszono. Suchą substancję rozcieńczano wodą destylowaną, poprzez dodanie 5N NaOH, osiągnęto pH 7,0, wodę dodawano do 10 ml objętości, 0,1 ml roztworu dodawano do 2 ml wody. Hydroksypolina była oszacowywana wg metody Woessnera [7]. Hydroksypolina była utleniona do pyrolu przy pomocy chlorku aminobenzaldehydu. Optyczna gęstość była mierzona przy długości 560 nm, przy pomocy spektrofotometru Unicam SP 800B. Stężenie kolagenu było obliczane przy użyciu współczynnika 8,2 (12,2% kolagenu to hydroksypolina).

Stężenie kolagenu rozpuszczalnego w ranie oznaczano przygotowując homogenaty świeżej tkanki. Siatka z prolenu usuwana z tkanki podskórnej była mieszana 0,45 M NaCl (pH=7,0) i umieszczana w 4°C przez 48 godz. Penicylina krystaliczna (10 000 IU/próbkę) była podawana w celu zahamowania wzrostu bakteryjnego. Po 48 godz. roztwór był odwirowywany, a supernatant był suszony. Następne procedury były takie same jak opisane powyżej.

Otrzymane wyniki opracowano, wykorzystując odpowiednie metody analizy statystycznej przy użyciu programu CSS Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA), numer licencji SP7025487510D51. Do analizy statystycznej użyto testów nieparametrycznych Kruskalla-Wallisa. Poziom istotności statystycznej przyjęto jako  $p < 0,05$ .

## Wyniki badań

Proces gojenia się rany chirurgicznej w grupie kontrolnej szczurów, którym nie podawano antykoagulantu, łączył się ze wzrostem stężenia kolagenu całkowitego w gojącej się ranie. Podawanie Clexane w grupie I i II spowodowało jeszcze większy wzrost (istotny statystycznie) stężenia kolagenu całkowitego, zarówno w ranie skóry, jak i w siatce. Ponadto im dłużej podawano antykoagulant – tym otrzymano wyższe stężenie kolagenu całkowitego w gojącej się ranie. Po 6. tyg.

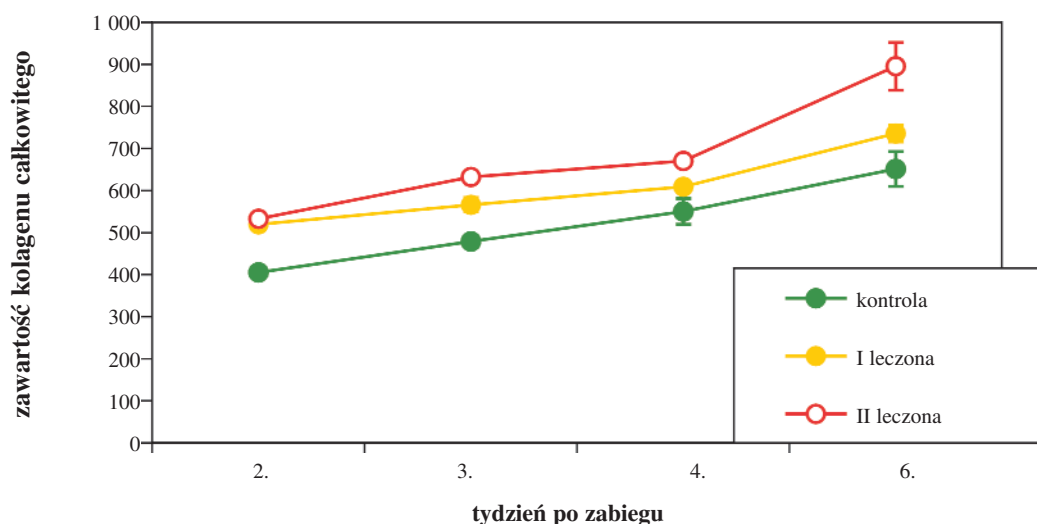
Tab. I. Średnie stężenie kolagenu całkowitego w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem

Tydzień	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	p	I vs C	II vs I
2.	405±26	519±20	532±30	0,002	<0,001	0,430
3.	479±38	566±37	632±21	0,003	0,001	0,014
4.	550±81	609±27	670±14	0,015	0,091	0,106
6.	651±109	736±43	895±113	0,025	0,152	0,026

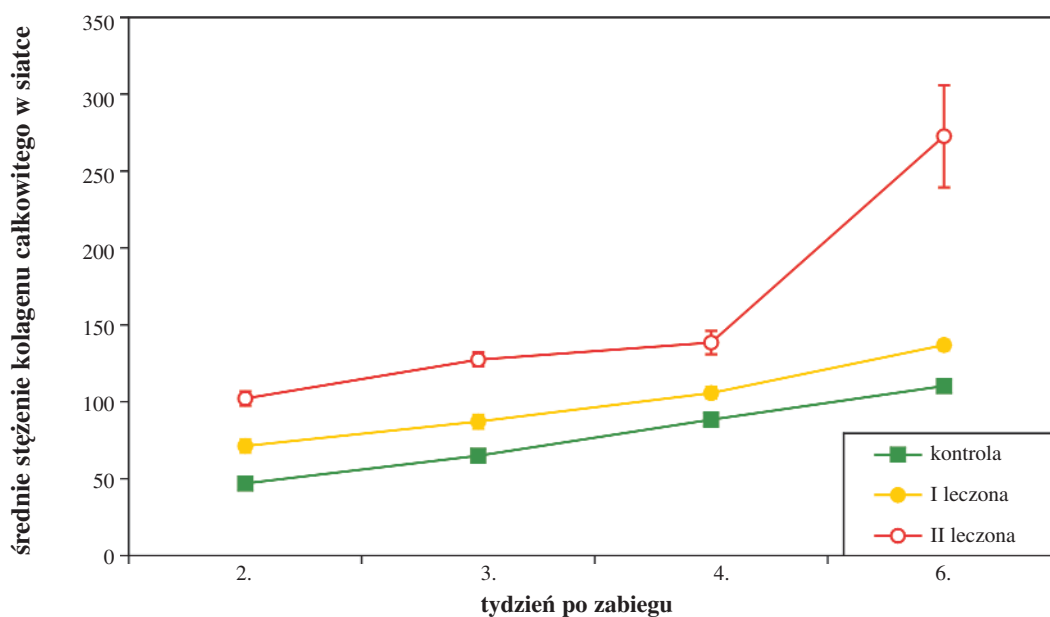


Tab. II. Średnie stężenie kolagenu całkowitego w siatce prolenowej umieszczonej w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem

Tydzień	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	II vs C p	I vs C	II vs I
2.	47,0±6,8	71,2±8,9	102,1±9,2	0,003	0,001	<0,001
3.	64,9±9,0	87,1±10,0	127,5±8,9	0,003	0,002	<0,001
4.	88,4±7,9	105,8±8,6	138,5±17,0	0,002	0,029	0,001
6.	110,3±7,6	136,8±7,1	272,7±66,5	0,001	0,188	<0,001



Ryc. 1. Średnie stężenie kolagenu całkowitego w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem

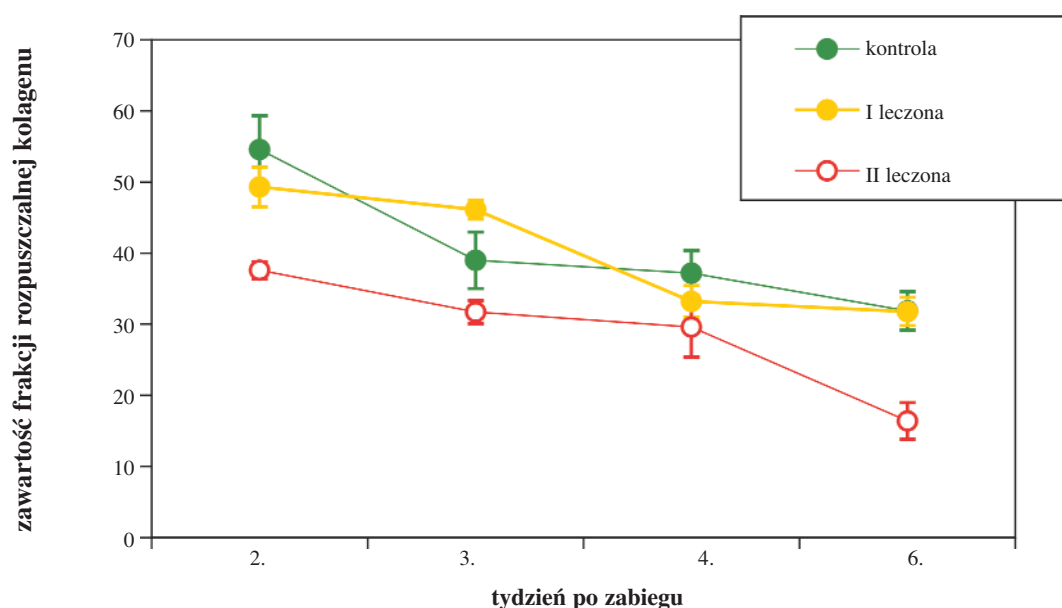


Ryc. 2. Średnie stężenie kolagenu całkowitego w siatce prolenowej umieszczonej w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem



Tab. III. Średnie stężenie frakcji rozpuszczalnej kolagenu w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem

Tydzień	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	II vs C P	I vs C	II vs I
2.	54,6±4,7	49,3±2,8	37,6±1,2	<0,02	ns	ns
3.	39,0±3,99	46,1±1,31	31,7±1,62	<0,05	ns	ns
4.	37,2±3,18	33,2±2,22	29,6±4,2	<0,01	ns	ns
6.	31,9±2,7	31,8±2,0	16,4±2,6	<0,001	ns	ns



Ryc. 3. Średnie stężenie frakcji rozpuszczalnej kolagenu w skórze rany chirurgicznej, w zależności od długości leczenia antykoagulantem

gojenia się rany – średnie stężenie kolagenu całkowitego uzyskane w grupie II było istotnie statystycznie wyższe od otrzymanego w grupie I. Podobnie, jak w skórze rany – również w siatce prolenowej – wyniki oznaczania kolagenu całkowitego (mimo niższych wartości średnich niż uzyskane w ranie) – wykazywały wzrost istotny statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej. Najwyższą różnicę zanotowano w grupie II po 6. tyg. gojenia się rany, zarówno w porównaniu do grupy I, a tym bardziej do grupy kontrolnej. Dokładne wyniki przedstawiono w tab. I, II i zobrazowano graficznie na ryc. 1., 2.

Podawanie Clexane powodowało obniżenie istotnie statystycznie stężenia frakcji rozpuszczalnej kolagenu w ranie skóry, ale wyłącznie w grupie II badanej, tj. szczurów, którym dłużej, bo przez 14 dni podawano Clexane – w porównaniu do grupy kontrol-

nej. W grupie I wartości średnie frakcji rozpuszczalnej kolagenu obniżały się dopiero od 3. tyg. gojenia się rany (tab. III, ryc. 3.).

Wyniki oznaczeń procentowej zawartości wody pokazują obniżanie się zawartości wody w gojącej się tkance. Jest to szczególnie dobrze widoczne w grupie II badanej, gdzie wartości średnie są istotnie statystycznie niższe niż otrzymane w grupie I i grupie kontrolnej (tab. IV, ryc. 4.).

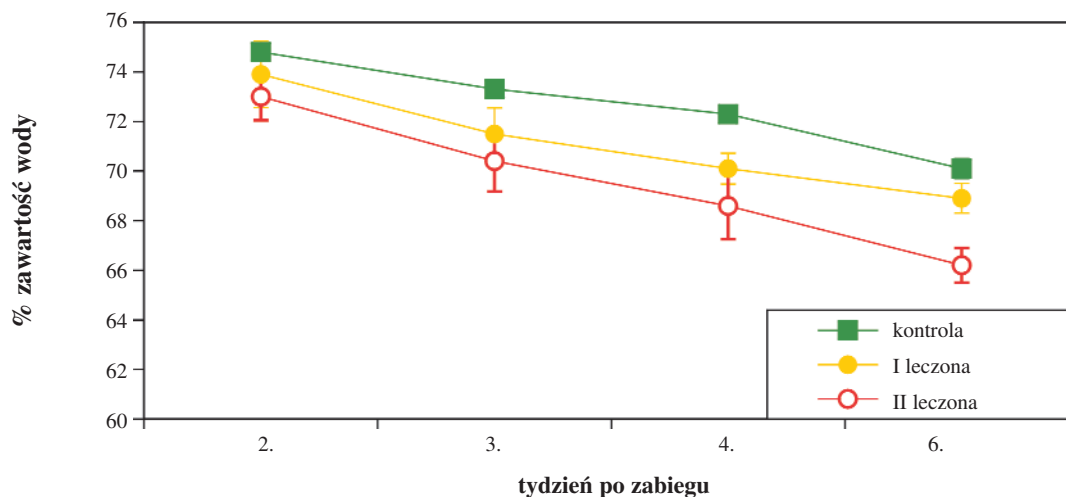
## Dyskusja

Na proces gojenia się rany składa się wiele mechanizmów biochemicznych, które prowadzą do całkowitej odnowy tkanki. Mechanizmy kierujące tymi procesami nie są do końca poznane. Wpływ różnych



Tab. IV. Zawartość wody w tkance w zależności od długości leczenia antykoagulantami

Tydzień	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	II vs	CI vs C	II vs I
2.	74,8±0,4	73,9±3,0	73,0±2,1	<0,02	ns	ns
3.	73,3±0,6	71,5±2,3	70,4±2,5	<0,001	ns	<0,05
4.	72,3±0,6	70,1±1,4	68,6±3,0	<0,001	ns	<0,05
6.	70,1±1,0	68,9±1,3	66,2±1,4	<0,005	ns	<0,05



Ryc. 4. Zawartość wody w tkance w zależności od długości leczenia antykoagulantami

czynników na gojenie się rany jest nadal w fazie badań. Jednym z szeroko rozpowszechnionych sposobów oceny procesu gojenia się rany jest określenie zawartości kolagenu w bliznie [3].

Większość doświadczeń badających wpływ niskocząsteczkowej heparyny na gojenie się rany operacyjnej dotyczy procesu odnowy kości, uszkodzeń czaszki, błony bębenkowej, jelit, owrzodzeń żołądka, zwyrodnienia ścięgien, oparzeń i innych [5, 8–14]. Zarówno w chirurgii ogólnej, jak i w ginekologii i położnictwie, heparyna niskocząsteczkowa jest szeroko stosowana w profilaktyce powikłań zakrzepowych u niektórych pacjentów. Powszechnie znany jest również korzystny efekt działania heparyny zmniejszający tworzenie się zrostu [15]. Wpływ heparyny niskocząsteczkowej na skłonność do krwawienia w porównaniu do heparyny standardowej badany przez Matzsha i wsp. wykazał wzrost występowania krwawienia u szczurów otrzymujących heparynę standardową [16]. Ostatnio wskazano również na udział PDGF w procesie gojenia się rany. Saba i wsp. [17] wykazały, że PDGF wzmacnia zamykanie się rany poprzez re-

epitelizację i zapobiega jej kurczeniu się. Podobny efekt działania heparyny na tworzenie się zwłóknień na oparzeniach przełyku obserwował Bingol-Kologlu [2]. W zapobieganiu wymienionych wyżej efektów ubocznych kluczowym jest znaczne zmniejszenie zawartości kolagenu. Korzystny wpływ podawania niskocząsteczkowej heparyny na gojenie się wrzodu żołądka, niewpływającego na aktywność koagulacyjną zostało opisane przez Li i wsp. [6]. Ponadto dodanie heparyny przyczynia się do wzrostu infiltracji fibroblastów do implantów kolagenowych w zależności od podanej dawki. W porównaniu z kontrolą, implanty te były bardziej unaczynione, co poprawiło przebieg gojenia się rany [8]. Ciekawe, że orbitalna ekspozycja opóźnia zdolność ran do gojenia się, poprzez zmniejszenie zawartości kolagenu i odpowiedzi na stymulujące czynniki zewnętrzne [3].

Celem tej pracy było wykazanie korzystnego wpływu podawania heparyny niskocząsteczkowej na gojenie się ran. Jakość blizny skórnej, jak wspomniano wcześniej, może być związana z zawartością kolagenu. W naszym eksperymencie zaobserwowano po-



zytywny efekt Clexane na gojenie się ran. Clexane prawdopodobnie działa poprzez antykoagulacyjny, antytrombolityczny oraz ochronny efekt na endotelium.

## Wnioski

1. Podawanie Clexane spowodowało istotny statystycznie wzrost stężenia kolagenu całkowitego

oraz obniżenie stężenia frakcji rozpuszczalnej kolagenu – zarówno w ranie, jak i w siatce prolonewej w grupach badanych, w porównaniu do grupy kontrolnej.

2. Gojeniu się rany towarzyszył spadek zawartości wody, istotnie statystycznie wyższy w grupach badanych (przy stosowaniu Clexane) w porównaniu do grupy kontrolnej.

### Summary

*The influence of low molecular weight heparine (Clexane) on healing of abdominal wounds in rats was studied. Subcutaneous injections of standard dose of clexane or physiologic saline were given to animals with skin wounds and with prolene mesh inserted into wounds. The collagen concentration was determined in wound and prolene mesh in control group 14, 21, 28 and 42 days after skin incision and in two groups of rats: treated with clexane for 7 (I group) and 14 (II group) days after skin incision and prolene insertion in 14, 21, 28 and 42 day of wound healing. Clexane administration resulted in significant increase of collagen content both in wound and in prolene mesh in total dose –dependent manner.*

**Key words:** wound healing, prolene mesh, low molecular heparin

## Piśmiennictwo

1. Al-Chalabi HA, Otubo JA. Value of a single intraperitoneal dose of heparin in prevention of adhesion formation: an experiment evaluation in rats. *Int J Fertil* 1987; 32: 332-5.
2. Benoit J, Meddahi A, Ayoub N, et al. New healing agent for colonic anastomosis. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13: 78-81.
3. Bingol-Kologlu M, Tanyel FC, Muftuoglu S, et al. The preventive effect of heparin on stricture formation after caustic esophageal burns. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 291-4.
4. Blanquert F, Saffar JL, Colombier ML, et al. Heparin-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 1995; 17: 499-506.
5. Cen Y, Luo P, Yan X. The effect of heparin on deep second-degree burn in scaled rats. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2001; 17: 174-6.
6. Davidson JM, Aquino AM, Woodward SC, et al. Sustained microgravity reduces intrinsic wound healing and growth factor responses in rats. *FASEB J* 1999; 12: 325-9.
7. Dąbrowski R. Histamina w procesie rozwoju tkanki łącznej. *Acta Physiol Pol* 1981; 32 (2, supp. 22): 141-63.
8. Hellstrom S, Spadow O. Exogenous heparin, topically administered, aids the remodelling of connective tissue in the healing of experimental tympanic membrane perforations. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1994; 56: 45-50.
9. Lafont J, Barouk B, Berdal A, et al. RTGA 11, a new healing agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats. *Growth Factors* 1998; 16: 23-38.
10. Laurent C, Hellstrom S. Extracellular matrix components reflect the dynamics of a healing tympanic membrane perforation – a histochemical study. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 221-9.
11. Li Y, Shin VY, Cheuk CY, et al. 3.0-kDa low molecular weight heparin promotes gastric ulcer healing in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 2009-17.
12. Matzsch T, Bergquist P, Jiborn H. Influence of standard heparin or low molecular weight heparin on healing of abdominal wounds and colonic anastomoses in rats. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 593-8.
13. McPherson JM, Ledger PW, Ksander G, et al. The influence of heparin on the wound healing response to collagen implants in vivo. *Coll Relat Res* 1998; 8: 83-100.

14. Meddahi A, Alexis C, Papy D, et al. Heparin-like polymer improved healing of gastric and colic ulceration. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 497-501.
15. Saba AA, Freedman BM, Gaffield JW, et al. Topical platelet-derived growth factor enhances wound closure in the absence of wound contraction: an experimental and clinical study. *Ann Plast Surg* 2002; 49: 62-6.
16. Tatari H, Kosay C, Baran O, et al. Effect of heparin on tendon degeneration: an experimental study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9: 247-53.
17. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportion of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1967; 93: 440-5.

## Adres do korespondencji

dr n. med. **Ewa Kuś**  
Klinika Patologii Cięży  
I Katedry Ginekologii i Położnictwa  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Wileńska 37  
94-029 Łódź  
e-mail: ewakadr@interia.pl

