

Eksperimental Yara İyileşmesinde Eksojen Kaynaklı Kollogenin İn Vivo Etkisinin Çift Kör Kontrollü Araştırılması

An Experimental Study on the Effects of Exogen Collagen upon Wound Healing

Dr.Levent AVTAN^{*}, Dr.Hovsep HAZAR^{***}, Dr.Cumhur ARICI^{*},
Dr.Sıtkı TUZLALI^{**}, Dr.Cavit AVCİ^{*}

ÖZET: Ana maddesi avian kollagen olan Celltrex[®] (Nu Skin Co.)'in yara iyileşmesi üzerine in vivo etkisini araştırmak amacıyla 16 adet Wistar Albino cinsi beyaz erkek sıçan çift kör kontrollü çalışma yapıldı. Sıçanlar test ve kontrol grubu olarak iki gruba ayrıldı. Her grup 7. ve 14. günlerde incelenen şekilde dörder sıçandan oluşan iki subgruba ayrıldı. Sıçanların sırt derisinde bir kesi oluşturulmasını takiben kesi primer suture edildi. Ortasında insizyon bulunacak şekilde eksize edilmiş olan materyalde yaranın kopma kuvveti tensiyometre ile ölçüldü. Ayrıca histolojik inceleme içinde kesit alınarak yara iyileşme kriterleri olan kollagen içeriği, neovaskülarizasyon, inflamatuvar granülasyon dokusu varlığı bakımından incelendi.

Kollogen tatbik edilen grupta kontrol grubuna göre hem 7. ($p < 0.01$) hem de 14. günde ($p < 0.005$) kopma kuvveti istatistiksel anlamlı bulundu. Kesitlerin histolojik incelenmesinde test grubunda yara iyileşmesinin kontrol grubuna göre daha iyi olduğu saptandı. Eksojen kaynaklı kollagen tatbikinin bu etkisi, literatürdeki diğer bilinen etkilerinin ışığı altında tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Yara iyileşmesi, Avian kollagen, Gerilme Kuvveti

SUMMARY: In this double blind controlled study, in vivo influence of exogen collagen on wound healing was investigated on sixteen albino guinea rats. Animals were randomised to test and control groups and subdivided into two subgroups with regard to postoperative days on which they were sacrificed in order to remove a skin strip for measurement of tensile strength and to examine histologic sections in terms of the healing criteria such as the collagen content, neovascularisation and cellular compactness of inflammatory granulation tissue.

The results of tensiometric measurements was found to be better in test animals compared with controls on

YAZIŞMA ADRESİ: Dr.Levent AVTAN
İstanbul Üniversitesi Odiyo Vizüel Uygulama ve Araştırma
Merkezi, Cerrahi Monoblok 34390 Çapa, İSTANBUL

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi,
* Genel Cerrahi Anabilim Dalı,
** Patoloji Anabilim Dalı,
***Amiral Bristol Hastanesi, Genel Cerrahi Bölümü,
İSTANBUL

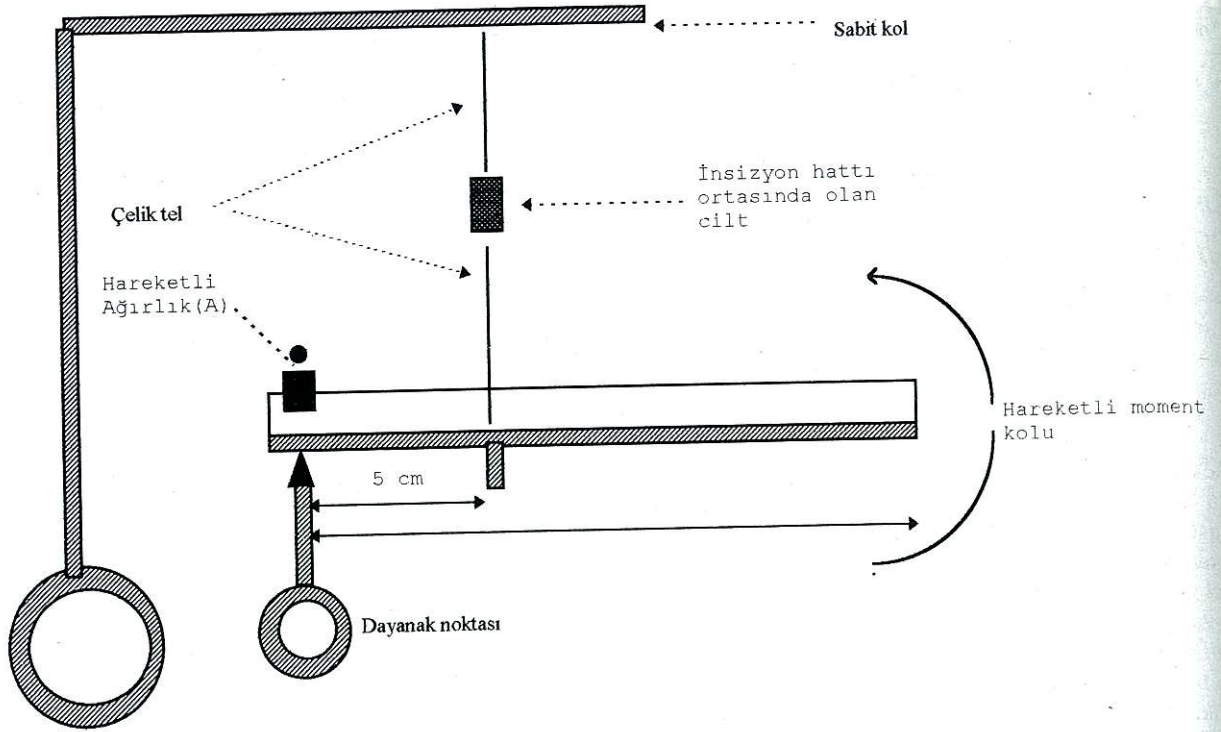
seventh postoperative day ($p < 0.01$) and results on fourteenth postoperative day were statistically significant ($p < 0.005$).

It was also noticed that histologically wound healing had been affected positively by Celltrex[®] in comparison with controls. Those effects of exogen collagen on healing process were discussed herein, taking other properties of exogen collagen.

Key Words: Wound healing, Avian collagen, Tensile strength

Yara iyileşmesi bir dizi inflamatuvar, immunolojik ve biokimyasal reaksiyonlar ile seyreden fizyolojik bir olaydır. Yanık yaraları, diabetik ülserler, dekübitus ve venöz ülserler gibi yara iyileşmesinin uzadığı durumlar ile yaraların remodelasyon safhasında beliren hipertrofik skarlar klinik pratikte bu alanda gözlenen sorunlardan birkaçıdır.^{1,2,3,4}

Kollogen, yara iyileşmesi prosedürü içinde rol alan temel proteindir.^{5,6} Yara iyileşmesinin birinci safhası olan inflamasyon döneminden sonra başlayan ikinci dönemde fibroblastlar tarafından ekstrasellüler kollagen sentezi başlar. Triple helix yapısında olan kollagen molekülleri sentezlendikten sonra fibroblastlardan ATP'ye bağlı mekanizma ile hücre dışına çıkartılır.⁷ Hücre dışına çıkan suda eriyebilir nitelikte olan kollagen süratle diğer kollagen molekülleri ile çapraz



ŞEKİL 1: Doku parçalarının kopma gerginliğini ölçen düzenek

bağlar kurarak daha güçlü ve olgun ancak suda daha az çözünür kollagen haline gelir. Yara dokusundaki kollagen miktarının artması yaranın mekanik gücünde artışa yol açar.^{8,9,10} Yara iyileşmesinin üçüncü safhası belkide yaşam boyu sürer. Bu dönemde kollagen moleküllerinin remodelizasyonu söz konusudur.¹¹

Yara ve skatris dokusuna eksojen kaynaklı kollagen tatbiki son yıllarda çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda önem kazanmaktadır.^{12,13,14,15} Eksojen kollagenin yara dokusu içine penetrasyonu sonrası bu bölgede silikon implantlar gibi inaktif kalmak yerine normal yara iyileşmesi prosedürüne aktif olarak katıldığı bilinmektedir.¹³ Bizim çalışmamızda ana maddesi kuş kaynaklı kollagen olan (avian kollagen) Celltrex® adlı bir solüsyon iyileşmekte olan temiz yara dokusuna haricen uygulanmış ve Celltrex® solüsyonunun yara iyileşmesine etkisi objektif metodlar ile araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi DETAM (Deneysel Tıp Araştırma

Merkezi) da gerçekleştirdik. Çalışma grubumuzu onaltı adet Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçan oluşturdu. Sıçanlar standart laboratuvar yemi ve serbest miktarda su ile beslendi. Sıçanları kontrol ve Celltrex® uygulananlar olmak üzere sekizli iki ana gruba ayırdık. Diyetletere uygulanan inhalasyon anestezisi altındaki sıçanların sırt derisi traş edildi ve povidon iodyun suda ki solüsyonu bu sahaya uygulandı. Temiz ancak steril olmayan koşullarda sıçanların sırt derisinde bistüri ile cilt ve cilt altını içeren 4 cm'lik düzgün bir keşi oluşturuldu ve bu keşi 3-0 keskin iğneli atravmatik ipek ile beş adet matriks sütür ile kapatıldı. Yara bölgesine sıyan serum ve debris tampone edildikten sonra sekiz sıçanın insizyon hattına bir damla Celltrex® solüsyonu (Nu Skin Co.) topikal olarak uygulandı ve bir plastik baget ile solüsyonun tüm insizyon boyunca yayılması sağlandı. Aynı işlem serum fizyolojik ile kontrol grubuna uygulandı. Deney süresince Celltrex® ve serum fizyolojik uygulananına her gün aynı saatte devam edildi. Tüm hayvanlarda yedinci gün dikişler alındı. Kontrol grubundan dört, Celltrex® grubundan dört sıçan yedinci gün geriye kalan sekiz sıçan öndördüncü gün sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen sıçanlardan insizyon hattı (1 cm) tam ortada olan 4 x 1 cm'lik iki

adet cilt şeridi eksize edildi ve bunlardan biri patolojik incelemeye gönderilmek üzere formol solüsyonuna kondu, diğer şerit ise dehidrate olduktan hemen kopma kuvveti ölçümüne alındı.

Kopma Kuvveti Ölçümü:

Burada sıçanlarda ağrı eşliğini hesaplamada kullanılan algometre (Ugo Basieri Co., Italy) bir eklenti yapılarak kullanılmıştır (Şekil 1). Kopma kuvveti ölçülecek doku parçası çelik teller ile nötral pozisyondaki aletin sabit ve hareketli kollara bağlanmıştır. Hareketli kol üzerine seçilen ağırlık konmuş ve ağırlığın bir elektrik motoru ile yavaş yavaş sağa doğru gitmesi sağlanmıştır. Dokuda insizyon hattında ilk ayrışma gözleendiği zaman deney sonuçlandırılmıştır. Kopma kuvveti zit yöndeki dengedeki moment kuvvetleri eşitliği prensibine dayanılarak $5.T = X.A$ denkleminde hesaplanmıştır.^{16,17}

5: Dokunun hareketli kola bağlı olduğu yerin dayanak noktasına uzaklığı (cm)

T: Dokudaki gerginlik (gr cinsinden kopma kuvveti)

X: Ağırlığın dokudaki ayrışma anında dayanak noktasına uzaklığı (cm)

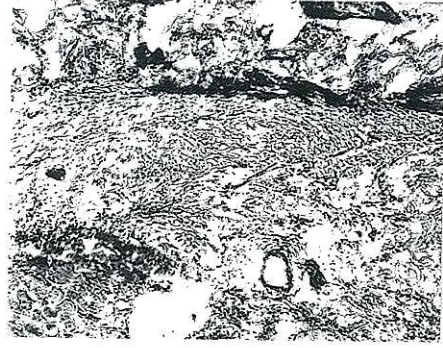
A: Dayanak noktasındaki hareketli ağırlık (gr)

Histopatolojik İnceleme:

Formalin solüsyonunda fikse edilen deriye ait doku örneklerinin parafin kesitleri Hematoksi-len-Eozin ve Masson-Trikrom boyaları ile boyandı. Yara bölgesindeki kollagenizasyon, neovaskülarizasyon, ödem ve iltihabi infiltrasyon ile fibroblastların ve polimorf nüveli lökositlerin varlığı, çalışma konusunda bilgisi olmayan patoloğ tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda (+) az, (++) orta, (+++) fazla şeklinde derecelendirilerek değerlendirildi.

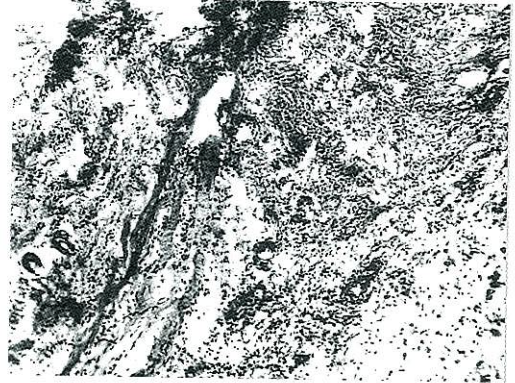
SONUÇLAR

Histopatolojik incelemede 7. gün alınan doku örneklerinde kontrol grubu ile Celltrex® grubu arasında kollagenizasyon açısından belirgin bir fark görülmezken, Celltrex® verilen grupta neovaskülarizasyonun daha belirgin olduğu görüldü (Resim 1, 2).



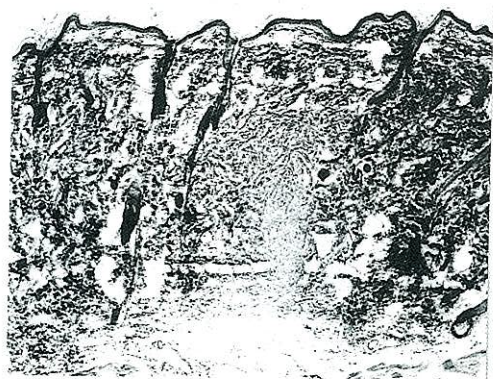
RESİM 1: Kontrol grubuna ait histolojik kesit (7. gün)

14. gün alınan örneklerde ise Celltrex® verilen gruptaki kollagenizasyonun kontrol grubuna göre anlamlı olarak belirli olduğu görüldü (Resim 3, 4), (Tablo 1).



RESİM 2: Celltrex® grubuna ait histolojik kesit (7. gün)

Kopma kuvveti ölçümleri "student's t" testi ile değerlendirildiğinde Celltrex® uygulanan grupta kontrol grubuna göre mekanik dayanıklılık yönünden hem 7. gün yapılan değerlendirmede ($p < 0.01$) hem de 14. gün yapılan değerlendirmede ($p < 0.005$) belirgin üstünlük sağlandı (Tablo 2), (Grafik 1).



RESİM 3: Kontrol grubuna ait histolojik kesit (14. gün)

TABLO 1: Histopatolojik bulgular

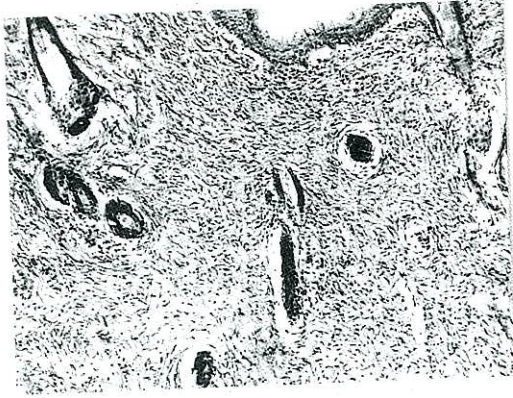
Grup	Kollagenizasyon	İltihabi hücre infiltrasyonu	Neovaskülarizasyon	Ödem	Fibroblastlar	Lökosit infiltrasyonu
1	+	+++	+	-	+	-
2	+	+	++	-	+	+
3	++	+	+	-	++	-
4	+++	+	+	-	+++	+

Grup 1 : 7. gün kontrol

Grup 2 : 7. gün Celltrex®

Grup 3 : 14. gün kontrol

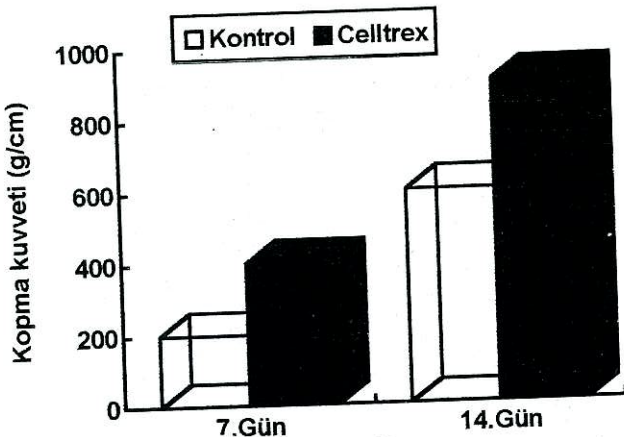
Grup 4 : 14. gün Celltrex®



RESİM 4: Celltrex® grubuna ait histolojik kesit (14. gün)

TARTIŞMA

Yara iyileşmesi travma ile başlayan, hücre yenilenmesi, proliferasyonu, protein sentezi ile devam eden ve doku devamlılığının sağlanması ile sonuçlanan hücresel ve biokimyasal olaylar zinciridir.



GRAFİK 1: Kopma kuvveti ölçümlerinin ortalama değerlerinin grafik üzerinde dağılımı

Yara iyileşmesi ve yaradaki kollagen miktarı birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Eksojen kaynaklı L-askorbik asit, CO₂ lazer, radyasyon ile endojen olarak salınan PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF-beta (Transforming Growth Factor Beta), BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor-Alpha)'nın yara iyileşmesi üzerine etkileri daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir.^{4,18,19,20,21}

Yara iyileşmesi sırasında ekstrasellüler matriksde saptanan ana protein kollajendir. Eksojen kollagenin yara dokusu içine penetrasyonu sonrası bu bölgede silikon implantlar gibi inaktif kalmak yerine normal yara iyileşmesi prosedürüne aktif olarak katıldığı bilinmektedir.¹³ Biz çalışmamızda ana maddesi yan bağları ile birbirine bağlı olmayan, suda erir nitelikte bir saf kollajen olan (Avian kollajen) Celltrex®'i kullandığımız Celltrex® solüsyonunun topikal olarak yara dokusuna uygulanmasının yara iyileşmesine etkisini, hem kopma kuvveti ölçümü ile hem de histopatolojik olarak değerlendirdik.

Yara iyileşmesini etkileyen iki önemli faktör sentez edilen kollajen miktarı ve dokuda var olan kollajen ile yeni sentezlenen kollajenin anatomik konfigürasyonudur.⁵ İyileşmekte olan yaradaki kollajen 4.-5. günden itibaren artmaya başlar ve 14. günde maksimum düzeye ulaşır. Birinci haftadan itibaren kollajen miktarının artması ile kopma kuvveti ölçümleri paralellik gösterirken, 13. haftadan itibaren kopma kuvvetinin artmasına rağmen kollajen düzeyinin sabit kaldığı gösterilmiştir.^{22,23}

TABLO 2: Deney ve kontrol grublarında kopma kuvveti sonuçları

CELLTRET[®] SONUÇLARI

No	Cins	Ağırlık x Uzaklık (adet x cm)	Gram Sonuç (T)
1	Celltrex [®] 7.Gün	2 x 15 cm	420
2	Celltrex [®] 7.Gün	2 x 15.5 cm	434
3	Kontrol 7. Gün	1 x 20 cm	280
4	Kontrol 7. Gün	1 x 25 cm	350
5	Kontrol 14. Gün	2 x 25 cm	700
6	Kontrol 14. Gün	2 x 20 cm	560
7	Celltrex [®] 14.Gün	3 x 22 cm	924
8	Celltrex [®] 14.Gün	3 x 24 cm	1008
9	Kontrol 14. Gün	2 x 24 cm	672
10	Kontrol 14. Gün	2 x 23 cm	644
11	Celltrex [®] 14.Gün	3 x 22 cm	924
12	Celltrex [®] 14.Gün	3 x 18 cm	756
13	Kontrol 7. Gün	1 x 9 cm	126
14	Kontrol 7. Gün	1 x 16 cm	224
15	Celltrex [®] 7.Gün	2 x 12 cm	336
16	Celltrex [®] 7.Gün	2 x 14 cm	392

1 adet ağırlık = 70 gr

Çalışmamızda 7. gün yapılan değerlendirmede histopatolojik incelemede kollagenizasyon açısından her iki grup arasında belirgin bir fark görülmezken, Celltrex[®] uygulanan grupta neovaskülarizasyonun daha belirgin olması ve kopma kuvveti ölçümü ile değerlendirildiğinde Celltrex[®] uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı üstünlük saptanması Celltrex[®]'in yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir. Bunun nedeni yara iyileşmesi sırasında total kollagen miktarı artmadan çeşitli şekillerde kopma kuvvetinde artma meydana gelebilmesidir. Bu yara var olan kollagen liflerinin daha dayanıklı hale gelmesi ile, yada sentez edilen yeni kollagen ile var olan kollagenin farklı bir anatomik figür oluşturması ile olmaktadır.⁵

14. gün yapılan değerlendirmede ise Celltrex[®] kullanılan grupta kopma kuvveti ölçümlerinin anlamlı üstünlük göstermesinin yanısıra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dokudaki kollagen düzeyinin de belirgin olarak artmış olduğu saptandı.

Söz konusu solüsyon USA'de FDA (Federal Drug Administration) tarafından kozmetik olarak satışına izin verildiği için Aloe Verae Gel, vitamin C ve E, hyalürik asit gibi cildi nemlendirici yan maddeler de içermektedir. Pek çok kozmetik maddede bulunan bu yan maddelerin yara iyileşmesine katkısı çalışmamızda ekarte edilememekle birlikte yan bağ içermeyen suda erir kollagenin esas olumlu etkiyi yapan etken olduğu düşünülebilir. Bu hipotezden hareketle saf kollagen solüsyonunun yara iyileşmesinde problem yaratan durumlardaki etkisinin araştırılmaya değer bir konu olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Hartmann M, Johnsson K, Zederfeldt B: Importance of dehydration in anastomotic and subcutaneous wound healing: An experimental study in rats. Eur J Surg 1992 Feb, 158(2):79-82.
2. Dans MJ, Isseroff R: Inhibition of collagen lattice contraction by pentoxifyline and interferon-alpha, -beta and -gamma. J Invest Dermatol 1994 Jan, 102(1):118-121.
3. Reith HB, Dittich H, Kozuscheck W: Morphology and healing of skin repair in abdominal wall defects. Langenbecks Arch

- Chir 1994, 379(1):13-19.
4. Rinaldi F, Alberetto M, Pontiroli A: The diabetic foot. General considerations and proposal of a new therapeutic and preventive approach. *Diabetes Res Clin Pract* 1993 July, 21(1):43-49.
 5. Madden JW, Peacock EE: Studies on the biology of collagen during wound healing. *Surgery* 1968, 64:288-294.
 6. Mian M, Beghe F, Mian E: Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *Int J Tissue React* 1992, 14:1-9.
 7. Genever PG, Wood EJ, Cunliffe WJ: The wounded dermal equivalent offers a simplified model for studying wound repair in vitro. *Exp Dermatol* 1993 Dec. 2 (6):266-273.
 8. Juhasz I, Murphy GF, Yan HC, Herlyn M, Albelda SM: Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo. *Am J Pathol* 1993 Nov, 143(5):1458-1469.
 9. Howes EL, Sooy WJ and Harvey SC: The healing of wounds as determined by tensile strength. *JAMA* 1929, 9:43.
 10. Bertone AL: Principles of wound healing. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1989, 5(3):449-463.
 11. Kirsner RS, Eaglstein WH: The wound healing process. *Dermatol Clin* 1993 Oct, 11(4):629-640.
 12. Seyer HM, Andreassen TT, Oxlund H, Jorgensen PH: The influence of aminoguanidine on borohydride reducible collagen cross-links and wound strength. *Connect Tissue Res* 1991, 26(3):181-186.
 13. Varnavides CK, Forster RA, Cunliffe WJ: The role of bovine collagen in the treatment of acne scars. *British Journal of Dermatology*, 1987, 116:199-206.
 14. Madison JB, Hamir AN, Ehrlich HP, Haberman J, Topkis V, Villasin JV: Effects of a proprietary topical medication on wound healing and collagen deposition in horses. *Am J Vet Res* 1991, 52(7):1128-1131.
 15. Mian E, Martini P, beconcini D, Mian M: Healing of open skin surface with collagen fails. *Int J Tissue Rect* 1992, 14:27-34.
 16. Milch RA: Tensile strength of surgical wounds. *Journals of Surgical Research* 1965, 377-388.
 17. White WL, Brody GS, Glaser AA, Morangoni RD, Beckwith TC, Must JS, Lehman JA: Tensiometric studies of unwounded and wounded skin: Results using standardized testing method. *Annals of Surgery* 1971, 173:19-25.
 18. Lorenz HP, Adzick NS: Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med* 1993 Sep, 159(3):350-355.
 19. Hasgood G: Wound healing. The role of platelet derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg* 1993 Nov-Dec, 22(6):490-495.
 20. Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N: The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* 1994, 64(1):56-59.
 21. Bettinger DA, Pellicane JV, Terry WC, Yager DR, Diegelman RF, Lee R, Cohen IK, DeMaria EJ: The role of inflammatory cytokines in wound healing: Accelerated healing in endotoxine resistant mice. *J Trauma* 1994 Jun, 36(6):810-813.
 22. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, et all: The healing of rat skin wounds. *Ann Surg* 1965, 161:293-294.
 23. Peacock EE Jr: Inter-intra molecular bonding in collagen of healing wounds by insertion of methylene and a mide cross-links into scar tissue. Tensile strength and thermal shrinkage in rats. *Ann Surg* 1966, 163:1-3.