

YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE KOLLAGENAZ'IN ETKİSİ

THE EFFECT OF COLLAGENASE IN WOUND HEALING

Dr.İbrahim H. TAÇYILDIZ* Dr.Selçuk MIZRAKLI** Dr.Nedim ABAN*
Dr.Murat AKKUŞ*** Dr.Vatan KAVAK***

ÖZET : Bu çalışma; son yıllarda yara bakımında yaygın olarak kullanılmaya başlanan enzim preparatlarından biri olan kollagenaz'ın yara iyileşmesi sürecine olan etkisini değerlendirmek amacı ile, 15'erli iki gruba ayrılan 30 adet rat kullanılarak yapıldı. Kollagenazın çalışıldığı grupta *clostridium histolyticum* kültür filtratından elde edilen clostridiopeptidaz-A ve eşlik eden proteazlar içeren pomad (Novuxol[®]) kullanıldı. Kontrol grubunda ise sadece serum fizyolojik kullanıldı. 48. saatte ve 7. günde yaralardan mikrobiyolojik kültür ve ek olarak yara kenarlarından histopatolojik inceleme için kesit alındı. Histopatolojik kesitlerin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar, yara iyileşmesi açısından kollagenaz grubunun, kontrol grubuna göre belirgin olarak üstün olduğunu göstermektedir ($p<0.005$). Sadece neovaskülarizasyon ve hücre infiltrasyonu açısından kollagenaz grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ayrıca, enfeksiyonun kontrol grubunda kollagen yoğunluğu ve fibroblast aktivasyonunu anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$), kollagenaz grubunda ise kollagen regülasyonunu belirgin olarak bozduğu belirlendi ($p<0.001$). Sonuç olarak, açık yara tedavisinde kollagenaz kullanımının yara iyileşmesini hızlandırdığı, kontrol grubuna göre belirgin olarak daha temiz ve canlı bir granülasyon dokusu sağladığı, fibroblast ve myofibroblast aktivasyonunu artırdığı, kollagen liflerinde düzenli ve yoğun bir artışa neden olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Yara iyileşmesi, Kollagenaz.

SUMMARY : This study was planned for evaluating the effect of collagenase which is one of the popular enzyme used in wound healing recently. Two groups of rats which consist 15 animals each were used by this aim. On collagenase applied group Novuxol-as ointment- consist of the enzymes as protease and clostridiopepsidase-A that is obtained from the culture filtrates of *clostridium histolyticum*. In the control group serum physiologic was used. At second and seventh days samples were taken from the wound for microbiological and histopathological examinations. Histopathological examinations revealed that wound healing was better in the collagenase group than the control group ($p<0.005$). There were no significant difference about neovascularisation and cellular infiltration among the groups. It was seen that infection reduced the activation of fibroblasts and density of collagen's in control group ($p<0.001$) and impaired the regulation of collagen in collagenase treated group ($p<0.001$). As a result, we saw that treatment with collagenase accelerates healing in open wounds, supports a significantly clean and viable granulation tissue, increases activation of fibroblast and myofibroblast and results in a regular and dens increase in collagen fibrin's.

Key Words: Wound healing, Collagenase.

Açık yara fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla beraber, tedavide de yeni prensipler ve yöntemler gelişmektedir. Yaraların açık bırakılması sonucu, yara yüzeyinden olan sıvı, ısı, protein ve elektrolit kayıplarının iyileşmeyi olumsuz yönde etkilediği kabul edilmiştir. De-

hidratasyon sonucu oluşan doku kuruluğu ve ısı kaybının canlı dokularda nekroza yol açtığı, hücre gelişimi ve üremesini, dolayısı ile iyileşmeyi durdurduğu belirlenmiştir (1). Ayrıca açık yaralar lökositlerin yaşam ve fonksiyonları için kötü bir ortam oluşturur. Böylesi bir ortamda lökositler yara yüzeyinden derinlere göç eder. Bunun sonucu bakteri ve nekrotik doku eliminasyonundan uzak kalınır ve nekrotik gelişim dermal tabakaya ilerleyebilir (2). Yaranın istenen şekil ve sürede iyileşmesinin gerçekleşebilmesi için yarada bulunan nekrotik dokuların uzaklaştırılması gerekir. Non invaziv bir teknik olan enzimatik debridmanın yara iyileşmesinde olumlu katkıları

* DÜTF Genel Cerrahi ABD,

** Diyarbakır Devlet Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği,

*** DÜTF Anatomi-Histoloji ABD.

Yazışma Adresi: Dr.İbrahim H.TAÇYILDIZ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD.
21280-Diyarbakır

Bu çalışma 8-10 Mayıs 1997 tarihinde Diyarbakır 'da 14. Bölgesel Cerrahi Kongresinde sunulmuştur.

olduğu bildirilmektedir (3). Çalışmamızda, son yıllarda kullanıma girmiş olan enzim preparatlarından kollagenazın yara iyileşmesi sürecine olan etkisini histopatolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirmeyi amaçladık.

MATERYEL- METOD

Çalışmamızda kollagenazın yara iyileşmesine olan etkisi Spraque-Dawley cinsi, ağırlıkları 275-325 gr. arasında değişen 30 adet rat kullanılarak araştırıldı. Denekler aralarında ortalama ağırlık beslenme ve çevresel şartlar açısından fark olmayacak şekilde 15'erli 2 gruba ayrıldı. Ketamin anestezisi altında (0.1 mg./kg.); sırt traşını ve antiseptisini takiben steril şartlar altında 1 cm. çapında tüm katları içeren cilt eksizyonu yapıldı.

Kollagenazın çalışıldığı grupta clostridium histolyticum kültür filtratından elde edilen clostridiopeptidaz-A ve eşlik eden proteazlar içeren pomad (Novuxol^R) kullanıldı. Kontrol grubunda ise sadece serum fizyolojik kullanıldı.

Hemostazı takiben ilk 15 ratın kesisi serum fizyolojikle ıslatıldı ve pansumanla kapatıldı. 2. grupta yara serum fizyolojikle silindikten sonra yaraya kollagenaz içeren pomad

tatbik edildi ve yara kontrol grubunda olduğu gibi gazlı bezle örtüldü. Pansumanlar 24 saat ara ile aynı şekilde planlı olarak değiştirildi. 48. saatte ve 7. günde yaralardan kültür ve ek olarak yara kenarlarından histopatolojik inceleme için kesit alındı. Kesitler %5'lik formalin ile tespit edildi.

Mikrobiyolojik değerlendirme Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik değerlendirmeler ise Histoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Mikrobiyolojik kültür kanlı agar ekilerek yapıldı. Histopatolojik değerlendirmede kollagen lifleri daha iyi gösteren Hematoksilin-Von Giesen boyama teknikleri kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirmelerde ise gruplar tek yönlü varyans analizi yöntemi ile karşılaştırıldı. Yara iyileşmesi sonuçları açısından farklılık çıkan grupların kendi aralarındaki karşılaştırmaları Neuman-Keuls yöntemi ile yapıldı. Yara kültürlerinde üreme olması ile yara iyileşmesi parametreleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon matrixi ile değerlendirildi ve student's "t" testi ile test edildi. Enfeksiyon varlığı kültürde patojen bakteri üremesine göre değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede tablo-I'deki parametreler kullanıldı. Sonuçlar bu parametreler açısından ayrı ayrı "zayıf", "orta" ve "iyi" şeklinde derecelendirildi.

Tablo-I: Değerlendirilen histopatolojik parametreler

1. Kollagen yoğunluğu
2. Fibroblast aktivasyonu
3. Myofibroblast aktivasyonu
4. Kollagen regülaritesi
5. Neovaskülarizasyon
6. Hücre infiltrasyonu

BULGULAR

İkinci günde ve yedinci günde, kontrol grubunda daha fazla denekte bakteriyolojik üreme olduğu görüldü. Kontrol grubunda 3 (%20) ratda ikinci gün ve 3 (%20) ratda da 7. gün yapılan yara kültüründe patojen bakteri üremesi saptandı. Kollagenaz grubunda yapılan yara kültüründe, 2. gün

Tablo-II: İkinci günde alınan yara kesitlerinde histopatolojik sonuçlar

Parametreler	Kontrol grubu n:15			Kollagenaz n:15		
	iyi	orta	zayıf	iyi	orta	zayıf
Kollagen yoğunluğu	2	8	5	8	7	-
Fibroblast aktivasyon	2	8	5	11	4	-
Myofibroblast aktivasyon	-	9	6	9	6	-
Kollagen regülaritesi	-	7	8	11	4	-
Neovaskülarizasyon	3	9	3	4	10	1
Hücre infiltrasyonu	9	6	-	4	11	-

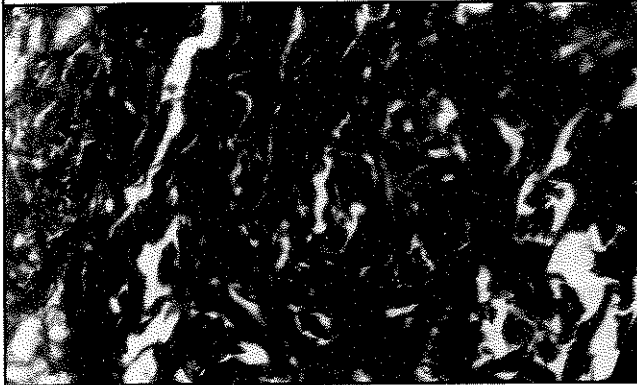
Tablo-III: Yedinci gün alınan yara kesitlerinde histopatolojik sonuçlar

Parametreler	Kontrol grubu n:15			Kollagenaz n:15		
	iyi	orta	zayıf	iyi	orta	zayıf
Kollagen yoğunluğu	1	8	6	13	2	-
Fibroblast aktivasyon	-	7	8	13	2	-
Myofibroblast aktivasyon	-	11	4	12	3	-
Kollagen regülaritesi	1	7	7	13	2	-
Neovaskülarizasyon	5	10	-	4	9	2
Hücre infiltrasyonu	7	8	-	9	6	-

Resim-I: 48 saat sonra kontrol grubunda yara kesiti, kollagen liflerinde hafif artış, fibroblastlarda orta derecede aktivasyon (H+Von Gieson, orijinal büyütme x82)



Resim-II: 48 saat süre ile kollajenin topikal olarak kullanıldığı grupta yara kesiti. Kollagen yoğunluğunda artma, fibroblastlarda orta derecede aktivasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu izlenmektedir. (H+Von Gieson, orijinal büyütme x82)



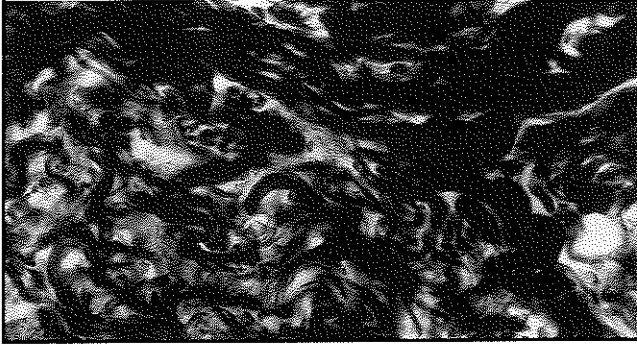
2 (%13.3); 7. günde de (%6.7) ratda patojen bakteri üremesi saptandı. Tüm yara enfeksiyonları göz önüne alındığında üreme olan 9 olgunun 6 (%66.7)'si serum fizyolojik grubunda idi.

Makroskopik yara görünümü itibari ile kollagenaz grubunda, kontrol grubuna oranla daha az eksudasyon ve daha canlı granülasyon dokusu gelişimi olduğu görüldü. Histopatolojik değerlendirmede kesitlerin uygun bir şekilde hazırlanmasından sonra toplam 80 kesit mikroskop altında değerlendirildi. Tespit ve boyama açısından en iyi olanları seçildi. 2. günün sonunda alınan doku örneklerinin Tablo-I'deki histopatolojik parametreler yönünden değerlendirilmesi sonucunda, kollagenaz grubunda daha iyi sonuçlar alındı (Resim-I,II). Özellikle kollagen yoğunluğu, regülaritesi, fibroblast aktivasyonu ve myofibroblast aktivasyonu açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p<0.05$) bulundu. Neovaskülarizasyon ve lökosit infiltrasyonu açısından ise her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (Tablo-II).

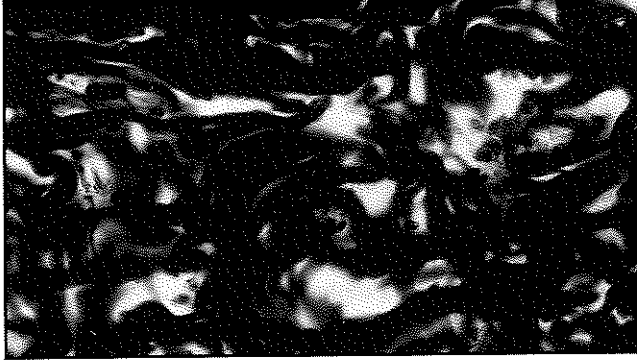
7. gün alınan histopatolojik kesitlerin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar, yara iyileşmesi açısından kollagenaz grubunun, kontrol grubuna göre belirgin olarak üstün olduğunu göstermektedir ($p<0.005$) (Resim-III,IV). Sadece neovaskülarizasyon ve hücre infiltrasyonu açısından kollagenaz grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo-III).

Kontrol grubunda, ikinci günün sonunda yapılan mikrobiyolojik kültürde, patojen bakteri üremesi saptanan de-

Resim-III: 7 gün süre ile sadece serum fizyolojik kullanılan kontrol grubunda yara kesiti. Yoğun mononükleer hücre artışı, fibroblastlarda orta rederece aktivasyon ve kollagen liflerinde artış izlenmektedir. (H+Von Giesen, orijinal büyütme x164)



Resim-IV: 7 gün süre ile kollagenazın topikal kullanıldığı grupta yara kesiti. Kollagen liflerin yoğun ve düzenli bir şekilde artışı, mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibroblastlarda aktivasyon izlenmektedir. (H+Von Giesen, orijinal büyütme x164)



neklerde, kollagen yoğunluğu ve fibroblast aktivasyonunun belirgin olarak azaldığı görüldü ($p < 0.005$). Kollagenaz grubunda ise yara kültüründe üreme olması ile fibroblast aktivasyonu ve kollagen regülaritesi açısından anlamlı ilişki saptandı ($p < 0.001$). Kültürde üreme olmasının fibroblast aktivasyonu ve kollagen regülasyonunu olumsuz etkilediği görüldü.

Yedinci gündeki yara iyileşmesi sonuçlarının değerlendirilmesinde, enfeksiyonun kontrol grubunda kollagen yoğunluğu ve fibroblast aktivasyonunu anlamlı olarak azalttığı ($P < 0.001$), kollagenaz grubunda ise kollagen regülasyonunu belirgin olarak bozduğu belirlendi ($p > 0.001$).

TARTIŞMA

Bugün yara bakımında pansuman amaçlı birçok solüsyon, jel, adheziv tape, kollajen örtüler ve enzim pre-

paratları geliştirilmiştir. Bütün bu ajanların olumlu ve olumsuz etkileri vardır (4). Yara iyileşmesinde son yıllarda sık kullanılan topikal ajanların arasına enzimatik ajanlar da girmiştir. Enzimler, yaradaki debridman ve degradasyonu hızlandırarak yara temizliğinde önemli rol oynarlar. Ayrıca, yara iyileşmesinde anabolik süreçlerin erken başlamasını da sağlarlar (3,5).

Polimorfonükleer granülositlerin konnektif dokuya yüksek oranda infiltrat olma yeteneği vardır. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazı süresince ekstrasellüler matriksin yıkımı infiltrat olan lökositlerden salgılanan kollagenaza bağlıdır. Kollagenazın parçalanması sonucu ortaya çıkan kollagen parçacıklarının fibroblastlar ve makrofajların kemotaksisini arttırdığı bilinmektedir (6). Çalışmamızda da kollagenaz grubunda histolojik parametreler kollagen sentezinin daha düzenli olduğunu göstermektedir. Özellikle 7. gün sonuçları kollagen liflerinde düzenli ve yoğun bir artış sağlandığını göstermektedir. Ayrıca histolojik parametreler ışığında, granülasyon dokusunun ve yara iyileşmesinin daha sağlıklı geliştiği söylenebilir.

Yara iyileşmesinde, enfeksiyondan koruyacağı düşüncesiyle çok yaygın olarak kullanılmakta olan topikal antiseptik ajanların yararları da tartışmalıdır (7,8). Çoğunlukla antisepsi şartlarına uyarak ve dokuyu travmatize etmemeye özen göstererek enfeksiyondan korunmak mümkün iken, bunun yerine enfeksiyon endişesi ile topikal antiseptik kullanmak ağır basmaktadır (9). Yarada enfeksiyon gelişmesinin morbiditeyi önemli ölçüde arttıracığı bir gerçektir. Ancak antiseptik ajanların sitotoksik etkileri de bir başka gerçektir (10). Bununla beraber, çalışmamızda, mikrobiyolojik kültürde üreme ile yara iyileşmesi arasında negatif bir korelasyon varlığı, bu olgularda bakteri üremesi durumunda antiseptiklerle topikal müdahale yapılması gerektiği sonucuna götürmektedir. Çünkü en zayıf yara iyileşmesi enfekte olan yaralarda saptanmıştır. Bütün olgularda, enfekte olan yaraların hemen hepsinde kollagen birikiminin ve regülaritesinin yanında fibroblast ve myofibroblast aktivasyonunun da olumsuz etkilendiği görülmektedir. Topikal antiseptik kullanılmaksızın sadece enzim tedavisi uygulanan olgularda enfeksiyon gerçekten de ciddi bir problemdir. Hansbrough ve arkadaşları kollagenaz pomat kullanılan olgularda, polymixin-B sülfate veya bacitracin tozlarının tedaviye eklenmesi ile yara enfeksiyonunun azaltılabileceğini bildirmişlerdir (11).

Çalışmamızda, yara tedavisinde kollagenaz kullanılan olgularda, mikroskopik olarak kollagenin daha yoğun ve fibroblast aktivasyonunun daha yüksek olduğunu, makroskopik olarak da granülasyon dokusunun daha düzgün ve canlı olduğu belirlendi. Takahashi ve arkadaşları da clostridium perfringens kaynaklı enzimatik ajan kullanmışlar ve Hemotoxilin-Eosin ile boyanmış preparatlarda dermal kollagen liflerin oluşumunun ve kapiller tomurcuklanmanın arttığını, ek olarak kollagen liflerin diziliminin de oldukça düzenli olduğunu göstermişlerdir (12). Kollagenaz ve diğer proteazları içeren preparatlar henüz çok yaygın olmamakla beraber, özellikle sekonder yaralarda nekrotik dokuların uzaklaştırılması ve canlı granülasyon dokusuna olanak sağlaması nedeni ile yara bakımında gittikçe daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Bununla beraber cerrahi debridmanın göz ardı edilmemesi ve enfekte yaralarda topikal antiseptiklerin tedaviye eklenmesi önerilmektedir (8,9,10).

Sonuç olarak, açık yara tedavisinde kollagenaz kullanımının yara iyileşmesini hızlandırdığı, kontrol grubuna göre belirgin olarak daha temiz ve canlı bir granülasyon dokusu sağladığı, fibroblast ve myofibroblast aktivasyonunu arttırdığı, kollagen liflerinde düzenli ve yoğun bir artışa neden olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sinclair RD, Ryan TJ: Proteolytic enzymes in wound healing: The role of enzymatic debridement. *Aust. J. Dermatol.* 1994; 35:35-41.
2. Mertz PM, Ovington LG: Wound healing. *Dermatol. Clin. J.* 1993; 11: 739-747.
3. Krieg T: Collagen in the healing wound. *Wounds*, 1995; 7:5-9.
4. Ryan TJ: Overview of the healing wound. *Wounds*, 1995; 7:90-92.
5. Field CK, Kerstein MD: Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg* 1994; 167:2s-5s.
6. Mauch C, Hatamochi A, Scharggette K, Krieg T: Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 1988; 178: 493-503.
7. Jeffrey JJ. Collagen degradation. In: Cohen IK, Diegelman RF (eds). *Wound Healing: Biochemical and clinical aspects*. New York: WB Saunders Co, 1992; 177-194.
8. Forest I: Current concepts in wound healing. *British J Surg* 1983; 70:133.
9. Kjolseth D. Comparison of the affects of commonly used wound agents. *J Am Coll Surg* 1994; 179: 305-312.
10. Boucek R: Factors effecting wound healing. *Surg Clin North Am* 1984; 14: 243-247.
11. Hansbrough JF: Wound healing in partial thickness burn wounds treated with collagenase versus silver sulfadiazine cream. *J Burn Care Reh* 1995; 16: 241-247.
12. Takahoshi M, Morimoto Y, Kon M, Saga KA: Histological study of cutaneous thermal wounds a clostridium perfringens-derived wound healing substance with wound healings stimulation activity. *J Dermatol* 1995; 22: 98-106.