

İnsan büyüme hormonunun yara iyileşmesine histopatolojik etkisini inceleyen deneysel bir çalışma *

Emre ERAN, Sinan CELAYİR, Sergülen DERVİŞOĞLU, Nur DANİŞMEND

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dalları, İstanbul

Özet

Yara iyileşmesini arttırdığı son yıllarda sınırlı sayıda çalışmayla ileri sürülen insan büyüme hormonu (BH)'nun, sağlıklı yavru sıçanlarda, yara iyileşmesi üzerindeki temel histopatolojik etkisini incelemek amacıyla, deneysel bir çalışma gerçekleştirildi. Oldukça geniş, histolojik değişiklikleri daha kolaylıkla saptanabilecek bir granülasyon dokusu elde etmek amacıyla 20 yavru sıçanda batın duvarı defekti yaratıldı. Sıçanlar iki gruba ayrılarak, ilk gruba takip süreleri boyunca hergün cilt altına 2 mg/kg dozda BH enjeksiyonları yapıldı. Diğer grup kontrol grubu olarak takip edildi. Sekiz ve 14 günlük takip süreleri sonunda oluşan granülasyon dokusu; iltihabi reaksiyon, damarlanma, kollajen yapısı ve dağılımı ve fibroblastik aktivite yönünden değerlendirildi ve granülasyon dokusu kalınlıkları ölçüldü. Fibroblastik aktivitenin ve kollajen yapısının ve granülasyon dokusu kalınlıklarının BH grubunda belirgin şekilde artış gösterdiği görüldü. Bu sonuçlarla BH'nun sağlıklı, katabolizmada olmayan sıçanlarda sekiz ve 14 günlük takiplerde yara iyileşmesini hızlandırdığı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: İnsan büyüme hormonu, yara iyileşmesi

Summary

The histopathological effect of human growth hormone on wound healing

The present study was designed to evaluate the histopathological effects of human growth hormone (HGH) on wound healing in healthy, young rats. To investigate this process in a huge, widespread granulation tissue, we created an abdominal wall defect on 20 rats. The animals were randomized in a control group and a treatment group with daily injection of 2 mg/kg HGH. They were sacrificed on the 8 and 14th postoperative days and the rate of inflammation and capillary proliferation, maturation and extent of fibroblasts and collagen ingrowth and granulation tissue thickness were studied. Compared with the control group, the extent and maturation of fibroblasts and collagen ingrowth were found to be higher in the HGH group. Our findings suggest that, HGH accelerates wound healing at 8 and 14th days in healthy young rats.

Key words: Human growth hormone, wound healing

Giriş

Yara iyileşmesini olumlu ya da olumsuz yönde etkilediği bilinen birçok faktör söz konusudur (10,14). Bu faktörler arasında sistemik etkili büyüme hormonunun (BH) yara iyileşmesini artırıcı etkisinin bulunduğunu düşündüren deneysel çalışmalar son birkaç yıldır yayımlanmaktadır. Sınırlı sayıdaki bu çalışmalarda büyüme hormonunun kemik, yanık ve batın insizyonu gibi farklı dokulardaki yara iyileşmelerine etkisi incelenmeye çalışılmıştır (1,2,4,5,7,14,17).

* XIV. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde serbest bildiri olarak sunulmuştur (26-30 Eylül 1995, Pamukkale).

Adres: Dr. Emre Eran, Ataköy 2. Kısım H/3 14/15, 34710-İstanbul

BH yara iyileşmesini indirekt olarak nitrojen dengesi üzerinden de etkiler. Çeşitli nedenlerden dolayı katabolik fazda ve negatif nitrojen dengesinde bulunan hastalarda, özellikle parenteral yolla beslenen olgularda, negatif nitrojen balansını düzelttiği, parenteral beslenme elemanlarının; proteinlerin, lipidlerin ütilizasyonunu artırıp, katabolik durumun düzelmesini sağladığı yine son yıllardaki deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (3,6,8,10,11,15,16). İşte BH'nun hem katabolizmayı (nitrojen dengesini) düzeltici etkisi, hem de yara iyileşmesini artırıcı etkisi, bu hormonun dışarıdan verilerek kullanılması fikrini çekici hale getirmiştir.

Çalışmamız şu soruları cevaplayabilmeyi amaçlamaktadır: I. Sağlıklı yavru sıçanlarda insan büyüme

hormonunun yara iyileşmesi üzerine etkisi var mı?
2. Bu farklılık, gözlemlenebilen histopatolojik bir değişikliğe dayanıyor mu?

Gereç ve Yöntem

BH'nun histolojik etkilerinin daha iyi gözlemlenebilmesi amacı ile yara modeli olarak batın duvarı defekti ile oluşturulan geniş granülasyon dokusu seçildi.

Bu amaçla ağırlıkları 50-100 gr arasında değişen 20 adet yavru Wistar Albino türü sıçan; BH tedavisi yapılacak 10 sıçan ve kontrol grubunu oluşturulacak 10 sıçandan oluşan iki grubu ayrıldı. Her iki gruptaki sıçanlarda cerrahi işlem esnasında medyan insizyonla batın duvarı ortaya çıkarılıp 3x4.5 cm boyutunda tam kat batın duvarı eksize edildikten sonra cilt defekt üzerinden sürekli dikiş tekniği ile 5/0 propilen kullanılarak kapatıldı.

BH grubunda, rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen Human Growth Hormone (Genotropin 16 IU, Kabi Pharmacia AB) cerrahi girişimden bir gün önce başlayarak sıçanların sakrifiye edilecekleri güne kadar, 2 mg/kg/gün olarak özel enjeksiyon kalemiiyle saat 9.00-10.00'da enseden cilt altına enjekte edildi. Sıçanlar standart yem ve şehir suyu ile beslendiler. Sekiz ve 14 günlük iki ayrı takip süresi sonunda derin eter anestezisi ile sakrifiye edilen sıçanların batın duvarları her iki yandan kesilerek bir kapak tarzında kaldırılıp çıkarıldı. Bu esnada kalp boşluklarından 0.5 cc kan örneği alınarak RİA yöntemiyle (Kit: Diagnostic Product Corporation KGHD1) insan büyüme hormonu düzeyleri ölçüldü. Elde edilen dokular % 10 tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilip, rutin doku takip işlemlerinden sonra hazırlanan parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler alındı. Bu kesitler Hematoxilen Eosin, Masson trikrom ve Gomori'nin gümüşleme bo-yalarıyla boyanıp incelendi.

Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde şu parametreler esas olarak alındı:

1. Büyüme hormonu ve kontrol grubu arasındaki takip süreleri sonunda ağırlık farklılıkları
2. Alman kan örneklerinde büyüme hormonu düzeyleri ölçümleriyle bu hormonun kan düzeylerinin kontrolü

3. Histolojik değerlendirme batın duvarından yapılan histolojik değerlendirmede 1. İltihabi reaksiyon, 2. Granülasyon dokusunun damarlanması, 3. Fibroblastik aktivite, 4. Kollajen yapısı ve dağılımı kalitatif olarak 4 derecede skorlanıp değerlendirildi. Ayrıca oluşan granülasyon dokusunun kalınlıkları özel bir mikroskop ile kantitatif olarak ölçüldü.

İstatistiksel değerlendirme Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalı tarafından yapıldı. Ağırlık farklılıklarının değerlendirilmesi için Student t testi, diğer parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla Mann Whitney U testi kullanıldı.

Bulgular

1. Ağırlık artışının takibi: Ameliyat sonrası 8 ve 14 gün takip edilen yavru sıçanların tümünde kilo artışı ve büyüme saptandı (Tablo 1-2). Sekiz gün takip edilen iki grupta günlük ortalama kilo artışları 1.73 g/gün ve 3.134 g/gün, 14 gün takip edilen iki grupta aynı değerler 2.072 g/gün ve 2.404 g/gün olarak saptandı. Beklenildiği üzere BH grubu ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı ağırlık artışı mevcuttu (8. gün kontrol t=3.77 p=0.02, BH t=5.93 p=0.03; 14. gün kontrol: t=6.68 p=0.03, BH t=10.46

Tablo 1. 8 gün takip edilen sıçanlarda vücut ağırlığı takibi

Sıçan	Büyüme hormonu grubu (gram)		Kontrol grubu (gram)	
	1. gün	8. gün	1. gün	8. gün
1	80	107	92	102
2	60	87	100	107.5
3	65	83.5	88	96
4	67	88	91	108
5	74	106	76	103

Tablo 2. 14 gün takip edilen sıçanlarda vücut ağırlığı takibi

Sıçan	Büyüme hormonu grubu (gram)		Kontrol grubu (gram)	
	1. gün	14. gün	1. gün	14. gün
1	59	83	69	103
2	58	79	90	130
3	57	105	53	75.5
4	76	105	76	92
5	51	97.5	55	83

$p < 0.01$). Ancak her iki grup karşılaştırıldığında kovaryans çözümlemesi ile 8 ve 14. günlerde iki grubun düzenleri arasında anlamlı fark bulunmadı (8. gün $p = 0.517$; 14. gün $p = 0.48$).

2. Kan büyüme hormonu seviyelerinin değerlendirilmesi: Yeterli kan alınamaması ve laboratuvar ile ilgili nedenlerden dolayı ancak 11 sıçanda ölçüm yapılabilirdi. BH verilen gruptaki tüm hayvanlarda kan düzeyleri ölçülebilen en üst sınır olan 30 nanogram/ml'nin üstünde iken, kontrol grubunda sıfıra çok yakın değerlerde bulundu (Tablo 3). Böylece cilt altına enjekte edilen BH'nun kana yeterli düzeyde geçmiş olduğu görüldü.

Tablo 3. Sıçanlarda kan büyüme hormonu düzeyleri

Sıçan	Büyüme hormonu grubu (nanogram/ml)		Kontrol grubu (nanogram/ml)	
	8. gün	14. gün	8. gün	14. gün
1	>30	>30	0.03	0.5
2	>30	>30	-	0.07
3	-	>30	0.03	-
4	>30	-	-	-
5	-	-	-	0.06

Tablo 4. 8 günlük takip sonrası histolojik inceleme sonuçları

Sıçan no.	Büyüme hormonu grubu					Kontrol grubu				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
İltihap	++	+	+++	++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
Damarlanma	+	±	++	+	+	++	++	++	++	++
Kollajen	+++	++++	+++	++++	++	+	++	++	+	±
Fibroblast	+++	++++	++	+++	+++	+	+	++	+++	+
Kalınlık (mm)	0.58	0.71	0.58	0.90	0.90	0.19	0.51	0.19	0.25	0.71

Tablo 5. 14 günlük takip sonrası histolojik inceleme sonuçları

Sıçan no.	Büyüme hormonu grubu					Kontrol grubu				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
İltihap	+	+	+	++	++	+++	++++	++	++++	++
Damarlanma	±	+	-	-	+	+	++	+	+++	++
Kollajen	+++	++++	+++	+++	+++	+	++	+++	+	++
Fibroblast	++++	+++	++++	++	+++	+	++	+	+	++
Kalınlık (mm)	1.03	0.84	0.51	0.45	0.77	0.51	0.38	0.64	0.25	0.38

3. Histolojik bulguların değerlendirilmesi: Histolojik incelemeler sonucunda, iltihabi reaksiyonun beklendiği gibi 8 günlük grupta belirgin olduğu ve özellikle de kontrol grubunda görüldüğü saptandı. Her iki grupta da bazı sekonder nedenlerle artmış lokal iltihabi reaksiyona rastlandı. Damarlanma açısından gruplar arasında belirgin fark görülmedi, kontrol grubunda skor biraz daha yüksek bulundu (Tablo 4).

Özellikle dikkati çeken sonuç fibroblast yayılımının BH grubunda yüksek oluşu ve 14 günlük grupta fibrositlere de rastlanması oldu (Tablo 5). Kollajen artışı da BH grubunda her iki takip döneminde belirgin şekilde artmış olarak bulundu (Resim 1,2,3,4). Peritonealizasyonun 14. günde granülasyon dokusunu en kenarından oluşmaya başladığı görüldü, ancak çok sınırlı olduğu için değerlendirmeye alınmadı.

Bu bulgularla BH grubunda kontrol grubuna göre daha süratli bir yara iyileşmesi olduğu ancak, iki ayı takip süresi arasında ise belirgin bir fark olmadığı saptandı. Kontrol grubuyla BH grubu arasındaki bu fark, granülasyon dokusu kalınlık ölçümlerinde

Bu çalışmalarda böyle bir yarada BH'nun maksimal etkisinin 4-6. günlerde olduğu, daha sonra ise giderek azaldığı belirtilmiştir. Takona ve ark. yine benzer bir çalışmada kortikosteroid verilen sıçanlarda aynı sonucu elde etmişler ve kan aminoasit düzeylerine bakarak bu etkinin protein metabolizması üzerinden olduğunu iddia etmişlerdir (14). Sağlam sıçanlar da ise Christensen yaptığı çalışmalarda sol kolon anastomozlarının sağlamlığının arttığını göstermiştir (5,6).

BH'nun yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin katabolizmayı ve nitrojen dengesini düzeltici etkisinden mi, yoksa hücresele seviyede bilinmeyen başka bir mekanizmadan mı kaynaklandığı tam olarak ortaya konamamıştır (7). Çocuk cerrahisi ve özellikle yenidoğan cerrahisi açısından her iki etkisi de önem taşımaktadır. Her an katabolizmaya girebilecek opere bir yenidoğanda iki etkisinden de yararlanılması beklenebilir.

Bu nedenle çalışmamızın amacı sağlıklı ve yavru sıçanlarda BH'nun etkisini incelemek olarak belirlendi. Birçok ayrıntılı çalışmanın gerektiği bu konuda amaç, ilk olarak bu etkinin sonucu olabilecek patlama, kopma basınçları vb sonuçları incelemek değil, literatürde yer almayan, rutin histopatolojik incelemelerde saptanan bir farklılık olup olmadığını ortaya koymak oldu. Bu nedenle deney hayvanlarında batın duvarı defekti sonrası oluşan geniş granülasyon dokusunda oluşabilecek farklılıklar incelendi. Batın duvarı defekti yaratılmasındaki amaç bir gastroşizi modeli yaratmak değil, değişiklikleri daha evvelki çalışmalardan farklı olarak daha geniş bir iyileşme dokusunda incelemektir.

Sonuçlar irdelendiğinde kilo artışı açısından iki grup arasında saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeni hayvanların sağlıklı, normal beslenmesi olabilir. Bir diğer olasılık ise istatistiksel farklılık için takip süresinin kısa olmasıdır. Ancak önemli olan yara iyileşmesindeki farklılığın oluştuğu sürede, kilo artışı açısından farklılığın olmamasıdır.

Histolojik incelemede ise iltihabi hücre artışının (yara iyileşmesinin ilk fazının) kontrol grubunda ve 8. günde daha belirgin olduğu saptandı. BH grubunda 5 nolu sıçanda belirgin olan iltihabi artışın daha çok lokal bir abseleşmeye bağlı olduğu dü-

şünüldü. Benzer bir etki 14 günlük takipte kontrol grubundaki 1 nolu sıçanda, 8 günlük takipte 2 nolu sıçanda da görüldü. Damarlanma artışı kontrol grubunda biraz daha fazla görülmekle beraber iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Ön planda dikkat çekici olan ise BH grubunda fibroblastik aktivitenin artışı ve kollajen yapısının daha düzenli ve yaygın olması idi. Bu bulgu kontrol grubunda iltihabi fazın belirgin olmasıyla beraber değerlendirildiğinde, BH grubunda yara iyileşmesinin kontrol grubuna göre daha hızlı seyrettiğini düşündürür. Bu bulgular literatürdeki sonuçlarla uyum göstermektedir (1,4,5,14,17).

Ancak literatürden farklı olarak; BH'nun etkisinin 6. günde belirgin olduktan sonra azalmadığı ve 14. günde de devam ettiği saptandı. BH'nun etkili olduğu sürede saptanan bu farkın daha önceki çalışmalardaki karşı karşıya getirilen yara dokusu örneği ile bizim çalışmamızda kullanılan geniş granülasyon dokusu örneği arasındaki yara iyileşme fazlarının süreleri yönündeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir. BH grubunda bir diğer gözlem, oluşan granülasyon dokusunun kalınlığı oldu. Ancak bu sonucun yara iyileşmesinin derecesi ile ilgisi belirsizdir. Bu farklılığı bir sonuç olarak değil sadece BH'nun etkisini destekleyen bir gözlem olarak değerlendirilmesi gerekir düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda ortaya çıkan sonuç BH'nun sağlıklı yavru sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisinin bulunduğu ve bu etkinin daha erken dönemde fibroblastik aktivitenin ortaya çıkmasından daha yaygın ve olgun kollajen yapısının meydana gelmesinden kaynaklandığıdır. Bu farklılıklar rutin histopatolojik incelemede saptanmıştır. BH'nun etkin ve gerçekçi klinik kullanımı için bu çalışmaya eklenecek; elektron mikroskopisi, hücre içi metabolitlerin değerlendirilmesi, kollojen liflerinin yapısının ayrıntılı olarak incelenmesi vd çalışmalarla beraber, yan etkilerini de değerlendiren çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Atkinson JB, Kosi M, Srikanth MS, et al: Growth hormone reverses impaired wound healing in protein-malnourished rats treated with corticosteroids. J Pediatr Surg 27:1026, 1992
2. Bak B, Andreassen TT: The effect of growth hormone

on fracture healing in old rats. Bone 12:151, 1991

3. Baue AE: Nutrition and metabolism in sepsis and multisystem organ failure. Surg Clin North Am 71:549, 1991

4. Christensen H, Oxlund H: Growth hormone increases the collagen deposition rate and breaking strength of left colonic anastomosis. Surgery 116:550, 1994

5. Christensen H, Flyvbjerg A: Dose-dependent stimulatory effect of human growth hormone on the strength and collagen deposition of colonic anastomoses in the rat. Acta Endocrinologica 126:438, 1992

6. Douglas RG, Humberstone DA, Haystead A, et al: Metabolic effects of recombinant human growth hormone: Isotopic studies in the postabsorptive state and during total parenteral nutrition. Br J Surg 77:785, 1990

7. Gilpin DA, Barrow RE, Rutan RL, et al: Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. Ann Surg 220:19, 1994

8. Hammarqvist F, Strömberg C, Decken A, et al: Biosynthetic human growth hormone preserves both muscle protein synthesis and decrease in muscle-free glutamine and improves whole-body nitrogen economy after operation. Ann Surg 216:184, 1992

9. Hemdon DN, Nguyen TT, Gilpin DA: Growth factors. Local and systemic. Arch Surg 128:1227, 1993

10. Koea JB, Douglas RG, Shaw JHF, et al: Growth hormone therapy initiated before starvation ameliorates the catabolic state and enhances the protein-sparing effect of total parenteral nutrition. Br J Surg 80:740, 1993

11. Manson MJ, Smith RJ, Douglas W: Growth hormone stimulates protein synthesis during hypocaloric parenteral nutrition. Ann Surg 208:137, 1988

12. Sabiston: Textbook of Surgery. 14th edition. WB Saunders, p.164

13. Siegenthaler W: Klinische Pathophysiologie. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, 1982, p.302

14. Takona K, Mouri N, Sakura H, et al: Effect of growth hormone on wound healing in protein-malnourished rats treated with corticosteroids. J Pediatr Surg 29:790, 1994

15. Voerman HJ, Groeneveld J, Boer H, et al: Time course and variability of the endocrine and metabolic response to severe sepsis. Surgery 114:951, 1993

16. Ward HC, Halliday D, Sim AJW: Protein and energy metabolism with biosynthetic human growth hormone after gastrointestinal surgery. Ann Surg 206:56, 1987

17. Zaizen Y, Ford EG, Coatin G, et al: The effect of perioperative exogenous growth hormone on wound bursting strength in normal and malnourished rats. J Pediatr Surg 25:70, 1990

1st WORLD CONFERENCE on the PREVENTION and TREATMENT of CAUSTIC ESOPHAGEAL BURNS in CHILDREN

3-5 Nisan 1996, Çeşme

Düzenleyen

Türkiye Çocuk Cerrahisi Derneği

ve

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

Başvuru: Prof. Dr. Oktay Mutaf, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı,

35100, Bornova-İzmir Fax: (0232) 375 12 88