

ULTHERAPY®-BEHANDLUNG: WIRKUNGSMECHANISMUS

EINLEITUNG

Das Ultherapy®-System wurde 2009 von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA als erste und einzige nicht-invasive Methode zum Augenbrauenlifting und anschließend als Liftingmethode für das gesamte Gesicht zugelassen. Ende 2012 erhielt Ultherapy® dann die FDA-Zertifizierung als wirksame Methode für das Lifting der submentalen Region und des Halses. 2014 folgte die Zulassung für die Behandlung von Falten und feinen Linien des Dekolletees. Die Ultherapy®-Behandlung wird derzeit erfolgreich in mehr als 50 Ländern weltweit angewendet.

In dieser Zusammenfassung wird die Wirkungsweise der Ultherapy®-Behandlung beschrieben, basierend auf den Kenntnissen der Prozesse der Kollagenenaturierung, der physiologischen Wundheilung mit dem Prozess der Kollagenneubildung („Kollagen-Remodellingprozess“). Die Wirkung von bestimmten Medikamenten, wie z. B. nicht-steroidalen entzündungshemmenden Medikamenten (NSAR), und ihr potenzieller Einfluss auf die Wundheilungsprozesse, der für die Wirkung einer Ultherapy®-Behandlung entscheidend ist, werden ebenfalls in dieser Zusammenfassung beschrieben.

WIRKUNGSMECHANISMUS

Das Ultherapy®-System arbeitet zum einen mit Ultraschall zur Visualisierung und zum anderen mit mikrofokussiertem Ultraschall, um Hautgewebe zu straffen und einen Lifting-Effekt zu erzielen. Der sofort sichtbare Lifting-Effekt, der direkt nach einer Ultherapy®-Behandlung erlebt wird, beruht auf der dermal und subdermal induzierten Kollagenenaturierung, welche durch die Erzeugung von präzisen, definierten großen Läsionen (TCPs: thermale Koagulationspunkte) hervorgerufen wird. Diese leiten einen entzündungsbedingten Wundheilungsprozess ein, welcher zu einer langfristigen Gewebeumstrukturierung und zu einem Gewebenaufbau mit einem weiteren Lifting-Effekt führt. Beide Stadien werden im Detail hier beschrieben.

Stadium 1: Kollagenenaturierung

Das Ultherapy®-System fokussiert Ultraschallwellen und erzeugt damit präzise Areale in dermalen oder subdermalen Gewebeschichten, in denen das Kollagengewebe denaturiert (TCP: thermaler Koagulationspunkt).¹⁻³ Aktuelle Behandlungsrichtlinien sehen für eine vollständige Gesichts- und Halsbehandlung ca. 16.000 thermische Koagulationspunkte in verschiedenen Hauttiefen vor (s. Abb. 1). In der Publikation von White & Kollegen¹ wird beschrieben, wie die Ultraschallwellen zu einer Vibration der Moleküle innerhalb des Gewebes führen und aus der daraus resultierenden Reibung



Abbildung 1: Nahezu 16.000 präzise gesetzte thermale Koagulationspunkte (TCPs) in definierten Tiefen erzeugen eine sofortige Hautstraffung (Lifting-Effekt) und induzieren die Kollagenneusynthese

Wärme entsteht. In diesen definierten, thermischen Koagulationspunkten werden dadurch Temperaturen von rund 60–70° Celsius erreicht. Dies ist die optimale Temperatur, bei der Kollagen, ein wichtiges Stützprotein der Dermis und der subdermalen Gewebeschichten (wie das SMAS: superfizielles muskuläres aponeurotisches System) seine organisierte Struktur verliert und zerfällt. Studien zeigen, dass Kollagenfasern, sobald sie über eine gewisse Zeitspanne auf eine bestimmte Temperatur erhitzt werden, zu schrumpfen beginnen, da sich die intramolekularen Wasserstoffbindungen in der Kollagenstruktur lösen (Abb. 2). Mittels mikrothermalen Analysemethoden zeigten Bozec und Odlyhan (2011)⁴, dass die inneren Quervernetzungen, die die einzelnen Kollagenfasern in einer Triplehelixstruktur zusammenhalten, bei 58° C aufbrechen und bei einer Temperatur von rund 65° C zerfallen (Abb.3).

Diese Vorgänge erklären die Kontraktion des Kollagens, welche zu dem beobachteten Lifting-Effekt direkt nach einer Ultherapy®-Behandlung führt.

Andere Studien haben gezeigt, dass die Schrumpfung von Kollagenfasern bei 57° C erfolgt, gefolgt von einer weiteren Denaturierung und kompletten Auflösung der Kollagenfibrille bei 60° C.⁵ Eine Gewebestraffung, als Folge einer Kollagen-denaturierung, von 11 % bei 65° C bis zu einem Maximum von 59 % bei 80° C findet in weniger als 2 Minuten nach der Hitzeeinwirkung statt. Demzufolge ist es wichtig, diesen Temperaturbereich während einer Ultherapy®-Behandlung zu erzeugen, um den Effekt der Kollagen-denaturierung, der anschließend zur Kollagenneubildung („Kollagen-Remodelling“) führt, optimal zu gestalten. Die sofortigen kosmetischen Verbesserungen nach einer Ultherapy®-Behandlung werden auch zum Teil durch die Bildung leichter Ödeme verursacht. Ödeme (Schwellungen) entstehen durch die Ansammlung von Gewebeflüssigkeit, was eine körpereigene Reaktion auf eine akute „Verletzung“ (im Falle einer Ultherapy®-Behandlung: TCPs: thermische Koagulationspunkte) darstellt. Diese milden Schwellungen tragen dazu bei, dass sich die Haut sofort nach der Behandlung wie „aufgepolstert“ anfühlt.

Anschließend an die Phase der Kollagen-denaturierung erfolgt die Wundheilung und Neubildung von Kollagen („Kollagen-Remodelling“).

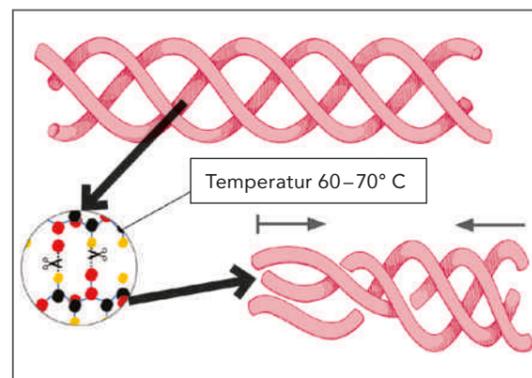


Abbildung 2: Eine Erhitzung des Gewebes auf eine Temperatur von 60–70° C löst die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Kollagenfasern stabilisieren und bedingt das Zusammenbrechen der Kollagenstruktur.

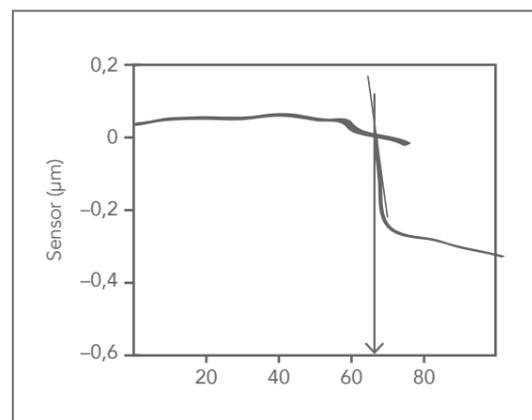


Abbildung 3: Thermomechanische Analyse einer Kollagenfaser: Beim Erreichen der Temperatur von ca. 58° C (onset) setzt die partielle Schrumpfung der Kollagenfibrille ein. Die hauptsächlichste Veränderung geschieht bei ca. 65° C, hier brechen die internen Brücken und die Denaturierung setzt ein.

Stadium 2: Wundheilung und Kollagen-Remodellierung

Die thermischen Koagulationspunkte, die bei der Behandlung durch den mikrofokussierten Ultraschall erzeugt werden, werden vom Körper als „Verletzung“ wahrgenommen und leiten den Wundheilungsprozess ein. Dieser Prozess beinhaltet Geweberegeneration und Kollagenneusynthese sowie die Neuordnung und Quervernetzung des frischen Kollagens. Dies führt dazu, dass das neu gebildete Gewebe wieder an „Stützfunktion“ gewinnt und dem mechanischen Stress besser standhalten kann.⁶ Nach und nach führt dies zu dem gewünschten Lifting-Effekt. Die Wundheilung kann in drei fließend ineinander übergehende Phasen eingeteilt werden (Abb. 4):

a) Entzündungsphase

Die Entzündungsphase ist charakterisiert durch Blutgerinnung, Vasokonstriktion und Fibrinverklebung. In dieser Phase induzieren freigesetzte Signalmoleküle (Hitze-Schock-Proteine) eine inflammatorische Antwort, durch die Makrophagen, Granulozyten und Neutrophile in die Wunde migrieren, um nekrotisches Gewebe zu beseitigen. Schon in dieser Phase werden Wachstumsfaktoren freigesetzt, die weitere Prozesse der Wundheilung in den TCPs stimulieren.^{13, 14} Diese Moleküle aktivieren Fibroblasten und stimulieren so die Bildung von neuem Kollagen und extrazellulären Matrixmolekülen. Hantash et al.⁸ zeigten, dass auf 60–70° C erhitztes Gewebe mit einer messbaren Entzündungsreaktion nach 2 Tagen bis hin zu 10 Wochen nach der Erhitzung reagierte.

Das Einwandern der Makrophagen in das verletzte Gewebe ist ein wichtiger Schritt für diese Entzündungsreaktion. Das unverletzte Gewebe zwischen den TCPs spielt dabei eine wichtige Rolle.^{1, 9} Entscheidend ist der Abstand zwischen den TCPs, da aus dem umgebenden gesunden Gewebe Entzündungszellen in den Nekrosebereich einwandern können.^{8, 10–12}

Ca. 48–72 Stunden nach der Verletzung beginnt dann die nächste Phase der Wundheilung, die Proliferationsphase.

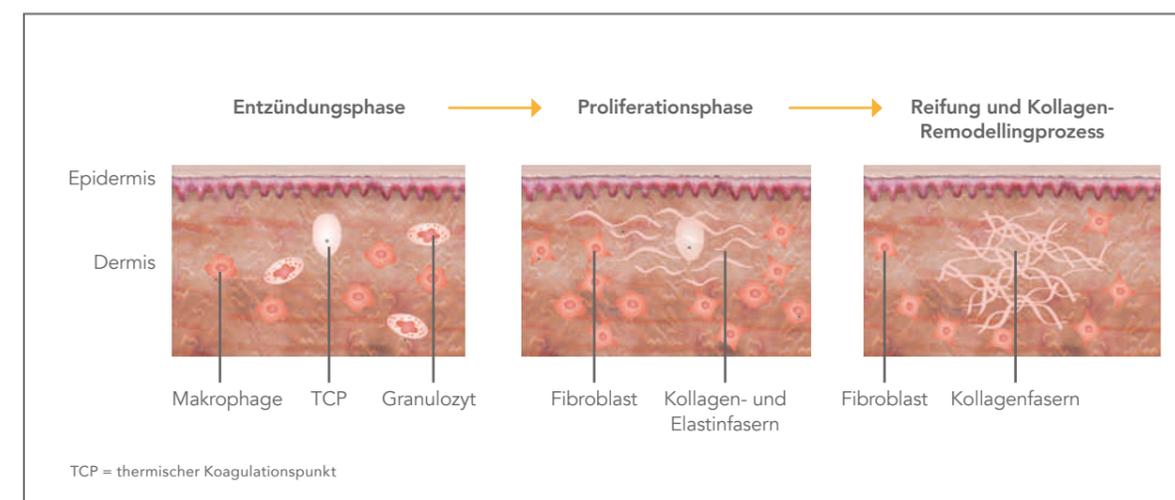


Abbildung 4: Die 3 Phasen der Wundheilung gehen fließend ineinander über: a. Entzündungsphase; b. Proliferationsphase; c. Reifung und Kollagen-Remodellingprozess

b) Proliferationsphase

Zunächst bilden Hyaluronsäure und hochmolekulares Fibrin ein provisorisches Gerüst für das Granulationsgewebe, das als Grundlage für die Gewebeneubildung fungiert. Eingewanderte Fibroblasten beginnen jetzt, neues Kollagen (Typ-III-Kollagen) und andere Strukturelemente, wie Elastinfasern, Glycosaminoglykane und Proteasen, zu bilden. Studien⁸ mit thermal erhitzter menschlicher Haut haben gezeigt, dass Fibroblasten am 28. Tag nach der Verletzung im geschädigten Gewebe nachweisbar waren. Dies ist ein Hinweis, dass der Kollagen-Remodellingprozess begonnen hat. Sue et al. (2011)¹⁵ zeigten in ihrer histologischen Analyse von menschlicher Gesichtshaut nach einer Ultherapy®-Behandlung, dass der Anteil von denaturiertem Kollagen in der retikulären Dermis um 24 % und die Dicke der Dermis ebenfalls zugenommen hatte (Tab. 1; Abb. 5). Außerdem waren die elastischen Fasern der oberen und unteren retikulären Dermis mehr parallel und dichter angeordnet als vor der Behandlung (Abb. 6).

| | Mittel(wert) ± Standardabweichung | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------|--------------|--------|
| | Vor Ultherapy® | Nach Ultherapy® | Änderung (%) | p-Wert |
| Mittlerer Flächenanteil von Kollagen (%) | | | | |
| Papilläre Dermis | 54,38 ± 10,89 | 55,58 ± 8,22 | 2,2 | 0,26 |
| Retikuläre Dermis | 52,70 ± 7,79 | 65,18 ± 7,89 | 23,7 | 0,001 |
| Dicke der Dermis (mm) | 1,37 ± 0,18 | 1,63 ± 0,31 | 65,9 | 0,001 |

Tabelle 1: Durchschnittliche Anteile von Kollagen und dermalen Dicke vor und nach einer Ultherapy®-Behandlung

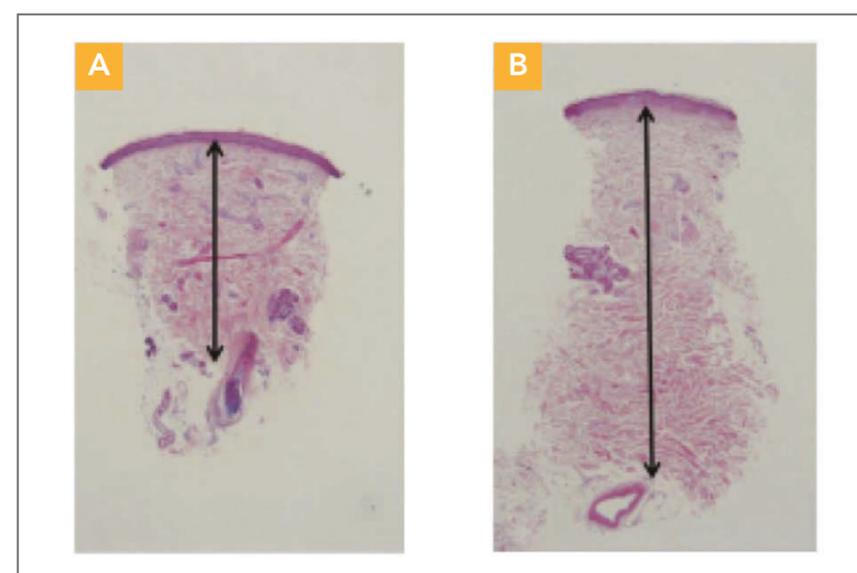


Abbildung 5: Histologien von menschlicher Haut (laterale Wange): Die dermale Gesamtdicke ist nach der Ultherapy®-Behandlung größer als vorher

c) Reifung und Kollagen-Remodellingprozess

Diese Phase startet im Allgemeinen in der 3. Woche nach der Behandlung und kann bis zu einem Jahr andauern. Während dieser Zeit wird das Kollagen vom Typ III nach und nach durch Kollagen vom Typ I ersetzt, welches eine dichtere Struktur und festere Bindung zu anderen Proteinen der Grundsubstanz bildet. Studien¹⁶ zeigten, dass während der Wundheilung nach einem thermischen Prozess ein deutlicher Anstieg von Kollagen Typ I erfolgte. Selbst 12 Monate nach der thermischen Behandlung waren in Hautbiopsien noch erhöhte Kollagenproduktionen nachweisbar.¹⁷ Die Umwandlung von Kollagen Typ III in Typ I („Kollagen-Remodelling“) ist ein wichtiger Schritt bei der Hautstraffung mit Ultherapy®: Wie Hantash et al.⁸ zeigen, startet die Kollagenneusynthese im denaturierten Gewebe gleichzeitig mit dem Remodellingprozess in den betroffenen Gebieten und Gebieten mit altem Kollagen. Der Remodellingprozess, vorangetrieben durch das Hitze-Schock-Protein HSP47, führt dazu, dass i. d. R. 10 Wochen nach der Behandlung die TCPs komplett durch neues, kollagenreiches Gewebe ersetzt sind. Die Dauer dieser Remodellingphase ist abhängig vom Alter des Patienten und vom Hauttyp. Je älter ein Patient ist, umso länger können die Wundheilung und der Remodellingprozess andauern. Bei älteren Patienten (>65 Jahre) kann es sein, dass kein befriedigendes Ergebnis der Hautstraffung mehr erreicht werden kann.

Der Kollagen-Remodellingprozess ist der wesentliche Schritt des Lifting-Effektes nach einer Ultherapy®-Behandlung. Um diese Wirkung nach einer Behandlung quantitativ zu erfassen, wurde eine Pilotstudie in Zusammenarbeit mit Kinemed, Inc. durchgeführt (Data on file): Dazu tranken 2 Patienten, bei welchen eine Rhytidectomy geplant war, 6 Wochen lang eine Lösung, die mit „schwerem Wasser“ angereichert war (schweres Wasser enthält Deuterium, ein nicht toxisches und nicht radioaktives Wasserstoffatom). Der „schwere“ Wasserstoff reichert sich in neu synthetisierten Proteinen des Körpers an (Abb. 7). Diese können dann als Biopsie entnommen und die Mengen quantitativ bestimmt werden. 2 Wochen nach Studienbeginn wurde einseitig im periaurikulären Areal eine Ultherapy®-Behandlung durchgeführt (je 30 Linien mit 4MHz–4,5mm Transducer und 7MHz–3,0mm Transducer). Auch in den nächsten 4 Wochen tranken die Patienten jeden Tag eine definierte Menge des „schweren Wassers“. In der 6. Woche wurden auf der behandelten

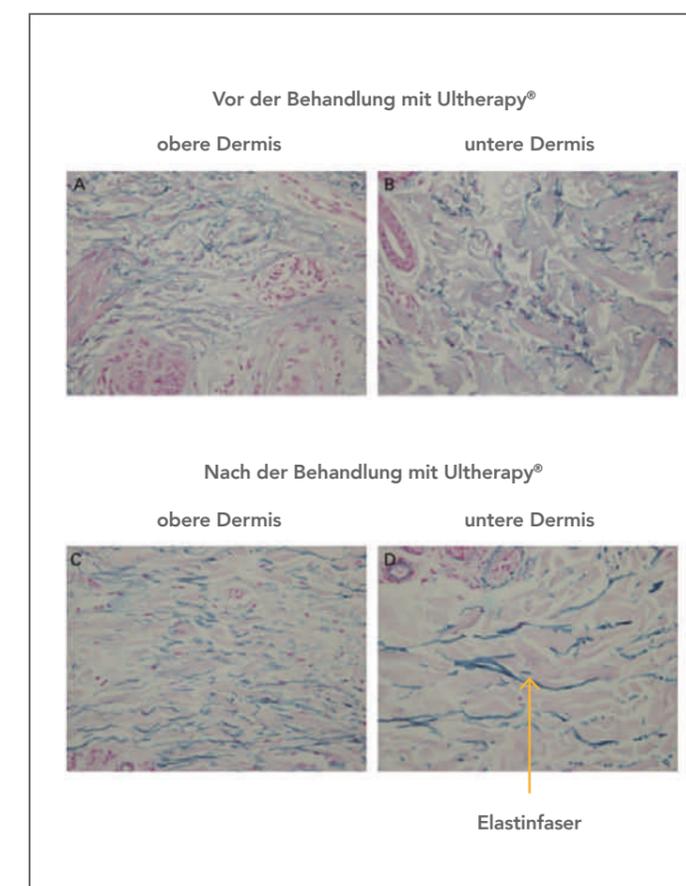


Abbildung 6: Hautbiopsien, die von der lateralen Wange vor und 2 Monate nach der Behandlung entnommen wurden, zeigen, dass die elastischen Fasern der oberen und unteren retikulären Dermis parallel und dichter angeordnet sind als vor der Behandlung

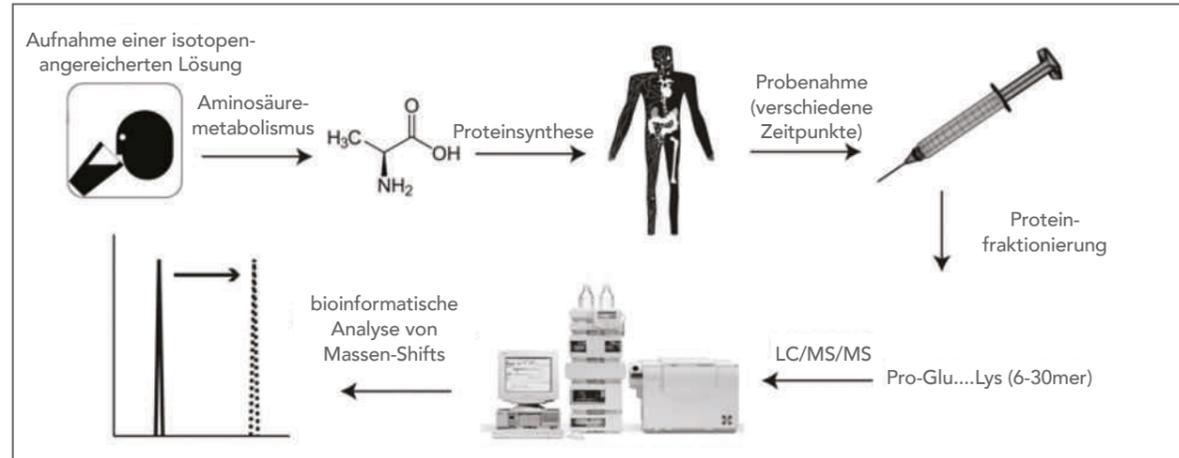


Abbildung 7: Quantifizierung der fraktionalen Proteinsynthese unter Anwendung von Kinemed's Dynamic Proteomics Platform, stabiler Isotopenmarkierung und LC/MS.5

und der unbehandelten Seite jeweils 2–5 Biopsien entnommen und unter dem Gesichtspunkt der neu synthetisierten Proteine (Kollagen Typ I und III) analysiert. Bei beiden Patienten konnte gezeigt werden, dass der Kollagengehalt nach einer Ultherapy®-Behandlung deutlich angestiegen war (Abb. 8):

- Anstieg des neu synthetisierten Typ-I-Kollagens (im Vergleich zum unbehandelten Areal):
Patient 1: 1,4-fach
Patient 2: 1,6-fach
- Anstieg des neu synthetisierten Typ-III-Kollagens (im Vergleich zum unbehandelten Areal):
Patient 1: 1,3-fach
Patient 2: 1,4-fach

Trotz der geringen Anzahl von Patienten unterstützen diese Ergebnisse die Aussagen aus früheren histologischen Untersuchungen, indem sie aufzeigen, dass die Ultherapy®-Behandlung einen Kollagen-Remodellingprozess anstößt, in dessen Folge es zu einer vermehrten Kollagen-Typ-I- und -III-Neusynthese kommt.

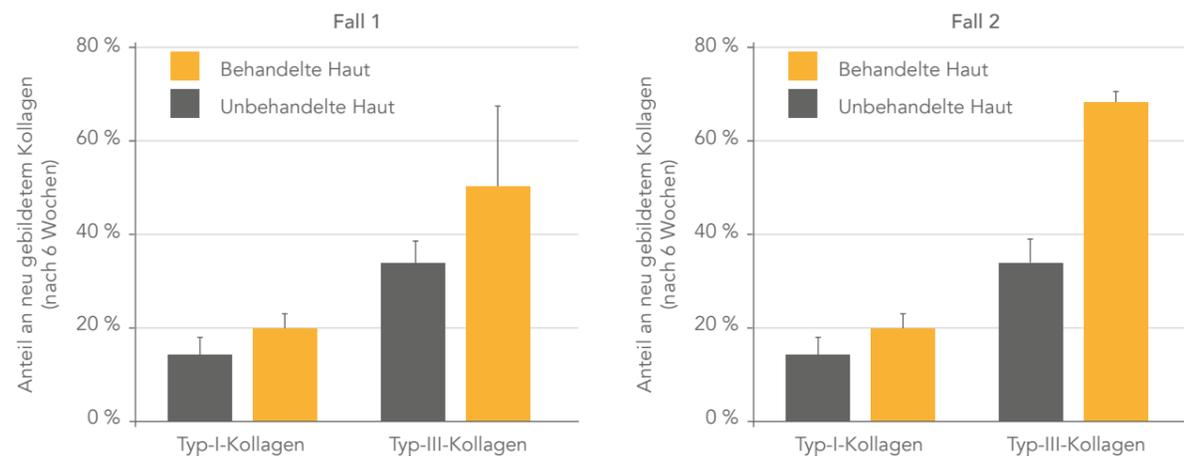


Abbildung 8: Stimulation der Kollagenneusynthese nach einer Ultherapy®-Behandlung (Guanidin-extrahierbarer Kollagenpool; Mean±SD von 2–5 Biopsien jedes Patienten pro Seite)

Wirkung von Medikamenten auf den Entzündungsprozess und die Wundheilung

Es gibt verschiedene Methoden der Schmerztherapie während einer Ultherapy®-Behandlung. Da einige Medikamente den Wundheilungsprozess beeinflussen können, ist es für den Behandler wichtig zu wissen, welchen Einfluss die verschiedenen Medikamente auf den Wundheilungsprozess haben können, um den Erfolg der Therapie nicht zu gefährden. Entzündungshemmende Medikamente, wie nicht steroidale Antirheumatika (NSAR, z. B. Ibuprofen oder Celecoxib) sind nicht selektive Cyclooxygenasehemmer (COX-1- und COX-2-Hemmer) und reduzieren die Produktion von Prostaglandinen. Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, indem sie die Produktion von Hyaluronsäure anstossen. Prostaglandine agieren ebenfalls als Entzündungsmediatoren und modulieren die Fibroblastenaktivität, welche maßgeblich die Kollagenneusynthese und den Kollagen-Remodellingprozess steuert. In Tiermodellen zeigte sich, dass die chronische Einnahme von Ibuprofen eine Hemmung der Fibroblastenproliferation und eine reduzierte Wundheilung herbeiführte.^{21, 22, 23}

Daher wird für die Schmerzreduktion bei der Ultherapy®-Behandlung eine einmalige Dosis von 800 mg Ibuprofen ca. 1 Stunde vor Behandlungsbeginn empfohlen. Diese Maßnahme hat eine vergleichbare schmerzreduzierende Wirkung wie ein Narkotikum, welches in einer Doppelblindstudie eingesetzt wurde. Die Halbwertszeit von Ibuprofen mit ca. 4 Stunden macht es unwahrscheinlich, dass diese Einzeldosis den Wundheilungsprozess und den wochenlang andauernden Prozess der Kollagen-Remodellierung negativ beeinflusst. Dennoch sollte man beachten, dass eine regelmäßige Einnahme von Ibuprofen das Ultherapy®-Behandlungsergebnis negativ beeinflussen kann, da der gewünschte Entzündungsprozess, welcher zur Neubildung von Kollagen notwendig ist, gehemmt wird.

Weitere Faktoren, die die Wundheilung beeinflussen

Krankheiten wie Diabetes können ebenfalls einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Studien zeigen eine verzögerte Reaktion des Körpers auf die Verletzung sowie eine beeinträchtigte Funktion der Fibroblasten.^{24–26} Auch andere systemische Faktoren, wie Adipositas, Ernährungszustand sowie Stress haben auf eine oder mehrere Phasen dieses Prozesses Einfluss und können demzufolge eine verzögerte Wundheilung hervorrufen.²⁷

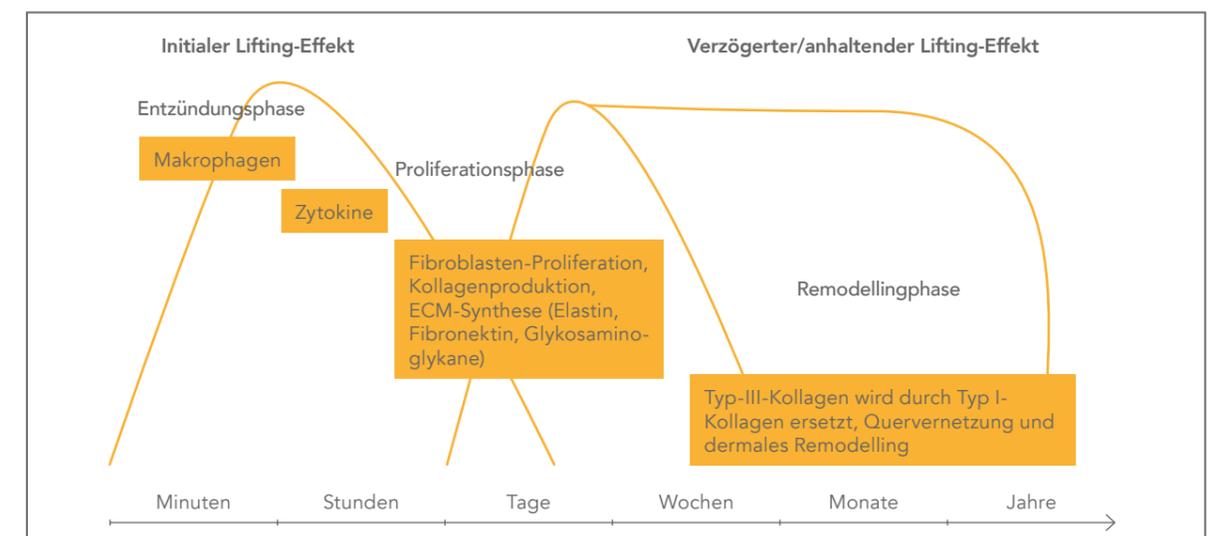


Abbildung 9: Die Entwicklung des Lifting-Effektes

ZUSAMMENFASSUNG

Ultherapy® ist derzeit die einzige Technologie, mit der das Gewebe punktgenau auf 60–70° C erwärmt werden kann – die optimale Temperatur zur Kollagen-denaturierung in definierten Gewebetiefen. Der Lifting-Effekt direkt im Anschluss an eine Behandlung entsteht durch die Kollagenkontraktion in den thermischen Koagulationspunkten (TCPs). Durch die im Folgenden ablaufenden körpereigenen Wundheilungsprozesse der nächsten Monate entsteht neues Kollagen mit optimierter Stützfunktion (Kollagen-Remodellingprozess).

Diese Zusammenfassung basiert auf den Erkenntnissen wissenschaftlicher Studien, in denen mikrofokussierter Ultraschall und andere Energiequellen angewendet wurden, um menschliches Gewebe auf eine Temperatur zu erhitzen, die die Denaturierung von Kollagenfasern einleitet. Weiter wurden medikamentenbedingte und andere Krankheitsprozesse aufgeführt, welche diese Prozesse beeinflussen können. Es wurde auch darauf hingewiesen, dass eine dauerhafte Einnahme von Schmerzmitteln (wie NSAR) sich auf das Behandlungsergebnis negativ auswirken kann.

Literatur:

- ¹ White WM, Makin JR, Slayton MH; Glicklich RE. Selective creation of thermal injury zones in the superficial usculoaponeurotic system using intense ultrasound therapy: a new target for noninvasive facial rejuvenation. *Arch Facial Plast. Surg.* 2007; 9(1): 2-29
- ² White WM, Makin IR, Slayton MH, Barthe PG, Glicklich RE. Selective transcutaneous delivery of energy to porcine soft tissues using intense ultrasound (IUS), *Lasers in surgery and medicine.* 2008; 40(2): 67-75
- ³ Laubach HJ, Makin IR, Barthe PG, Slayton MH, Manstein D. Intense focused ultrasound: Evaluation of a new treatment modality for precise microcoagulation within the skin. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery (et al.)* 2008; 34(5): 727-734
- ⁴ Bozec L, Odlyha M: Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophys J.* 2011; 101(1): 228-236
- ⁵ Lin SJ; Hsiao CY, Sun Y, et al. Monitoring the dermally induced structural transitions of collagen by use of second harmonic generation microscopy. *Opt. Lett.* 2005; 30(6): 622-624
- ⁶ Christiansen DL; Huang EK, Silver FH. Assembly of type I collagen; fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties *Matrix Biology*, 2000; 19: 409-420
- ⁷ Agren MS, Taplin CJ, Woessner JF, Jr., Eaglstein WH, Mertz PM. Collagenase in wound healing: effect of wound age and type. *J Invest Dermatol.* 1992; 99(6): 709-714
- ⁸ Hantash BM, Ubeid AA, Chang H, Kafi R, Renton B. Bipolar fractional radiofrequency treatment induce neocollagenesis and neocollagenesis. *Lasers Surg. Med.* 2009; 41(1): 1-9
- ⁹ Glicklich RE, White WM, Slayton MH, Barthe PG, Makin IR. Clinical pilot study of intense ultrasound therapy to deep dermal facial skin and subcutaneous tissues. *Arch Facial Plast. Surg.* 2007; 9(2): 88-95
- ¹⁰ Hantash B, Bedi VP, Kapadia B, et al. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg. Med.* 2007; 39(2): 96-107
- ¹¹ Zelickson BD, Kist D, Bernstein E, et al. Histological and ultrastructural evaluation of the effects of a radiofrequency-based nonablative dermal remodeling device: a pilot study. *Arch Dermatol* 2004; 140(2): 204-209
- ¹² Dierickx CC. The role of deep heating for non-invasive skin rejuvenation. *Lasers Surg. Med.* 2006; 38(9): 799-807
- ¹³ Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958-969
- ¹⁴ Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGFalpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science.* 1988; 241 (4866): 708-712
- ¹⁵ Suh DH, Skin MK, Lee SJ, et al. Intense focused ultrasound tightening in Asian skin: clinical and pathologic results. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery (et al.)*. 2011; 27(11): 1595-1602
- ¹⁶ Zelickson BD, Kist D, Bernstein E et al. Histological and ultrastructural evaluation of the effects of a radiofrequency-based nonablative dermal remodeling device: a pilot study. *Arch Dermatol.* 2004; 140(2): 204-209
- ¹⁷ Meshkinpour A, Ghasri P, Pope K, et al. Treatment of hypertrophic scars and keloids with a radiofrequency device: a study of collagen effects. *Lasers Surg Med.* 2005; 37(5): 343-349
- ¹⁸ Murota S, Chang WC, Abe M, Otsuka K. The stimulatory effect of prostaglandins on production of hexosamine-containing substances by cultured fibroblasts. *Prostaglandins.* 1976; 12(2): 193-195
- ¹⁹ Murota S, Abe M, Otsuka K. Stimulatory effect of prostaglandins on the production of hexosamine-containing substances by cultured fibroblasts (3) induction of hyaluronic acid synthase by prostaglandin F2alpha *Prostaglandins.* 1977; 14(5): 983-991
- ²⁰ Sandulache VC, Parekh A, Li-Korotky H, Dohar JE, Hebda PA. Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta-1-induced collagen synthesis. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(1): 122-133
- ²¹ Dong YL, Fleming RY, Yan TZ, Herndon DN, Waymack JP. Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds. *J Trauma.* 1993; 35(3): 340-343
- ²² Dvivedi S, Tiwari SM, Sharma A. Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. *Indian J Exp Biol.* 1997; 35(11): 1243-1245
- ²³ Krischak GD, Augat P, Claes L, Kinzl L, Beck A. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *J Wound Care.* 2007; 16(2): 76-78
- ²⁴ Rosenberg CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurse Clin North Am.* 1990; 25(1): 247-261
- ²⁵ Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. *Clin. Plast Surg.* 2003; 30(1): 37-45
- ²⁶ Verhofstad MH, Bieseling TM, Haans EM, Hendriks T. Collagen synthesis in rat skin and ileum fibroblasts is affected differently by diabetes-related factors. *Int. J. Exp Pathol.* 1998; 79(5): 321-328
- ²⁷ Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 219-229

