

TÜBİTAK 1507, 7201426 Numaralı Anti-Bakteriyel Özellikli Altın Nano Kompozit Hyaluronik

Acid Bazlı Adezyon Bariyerinin Prototipinin

Gerçekleştirilmesi ve Üretimi (Green Synthetis Technology) Projesi Hayvan Deneyleleri Sonuç Raporu

Fatih Ada¹, Özhan Karataş², Ferit Kasımozade³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi ABD

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Veterinerlik Patolojisi ABD

³Ankara Şehir Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği

Deney Hayvanları ve Deney Yöntemi:

Çalışmaya, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.04.2021 tarih ve 65202830-050.04.04-524 sayılı etik kurul kararından sonra başlandı. Çalışma toplam 7 grup üzerinde yapıldı. Her grupta 6 tane rat mevcuttu. Ratlar her grup için, erişkin 3 erkek ve erişkin 3 dişi olacak şekilde düzenlendi. Deney prosedürünün tamamı için 42 rat (wistar albino) kullanıldı. Ratlar çalışma guruplarına göre maksimum 4 hafta boyunca eşit büyüklükteki kafeslerde olacak şekilde 20 derece sabit sıcaklıkta, 12 saat gece 12 saat gün ışığı alabilen %40-55 nemli laboratuvar ortamında himaye edildi. Bütün gruplardaki ratlarda standart rat yemi kullanıldı (25 gr/gün). Bütün gruplardaki hayvanların yem miktarı günlük olarak eşit miktarda verildi (25 gr/gün). Bütün gruplarda bulunan ratların suları gün aşırı değiştirildi. Deney sonunda bütün hayvanlar yüksek doz anestezi madde verilerek sakrifiye edildi. Ratların bakımı, beslenmesi Sivas Cumhuriyet Üniversitesi deney hayvanı laboratuvarındaki imkânlar kullanılarak yapıldı.

Deney ve kontrol grupları		Grup başına hayvan adedi	Tekrar sayısı	Kullanılan toplam hayvan sayısı
1	Ana kontrol grubu	6	0	6
2	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanacak (1. Hafta)	6	0	6
3	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanacak (2. Hafta)	6	0	6

4	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanacak (4. Hafta)	6	0	6
5	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanmayacak (1. Hafta)	6	0	6
6	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanmayacak (2. Hafta)	6	0	6
7	Standart median sternotomi+ Laparotomi ve adezyon bariyeri uygulanmayacak (4. Hafta)	6	0	6

Tablo 1: Anti-Bakteriyel Özellikli Altın Nanokompozit Hyaluronik Acid Bazlı Adezyon Bariyeri deneyi çalışma grupları

Grup 1: Ana kontrol grubu olup hayvanlar üzerinde hiçbir tedavi gerçekleştirilmeyecektir.

Grup 2: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilecek (1 Hafta takip edilecek)

Grup 3: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilecek (2 Hafta takip edilecek)

Grup 4: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilecek (4 Hafta takip edilecek)

Grup 5: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilmeyecek (1 Hafta takip edilecek)

Grup 6: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilmeyecek (2 Hafta takip edilecek)

Grup 7: Standart median sternotomi ve laparotomi yapılacak adezyon bariyeri yerleştirilmeyecek (4 Hafta takip edilecek)

Tavşanların bakımı, beslenmesi Sivas Cumhuriyet Üniversitesi deney hayvanı laboratuvarındaki imkânlar kullanılarak yapıldı. Ana kontrol grubu hariç, her gruba genel anestezi altında standart median laparotomi işlemi uygulandı. Ratlara genel anestezi verildikten sonra abdomen bölgesi tıraşlandı. Tıraşlama işlemi sonrası steril boyama, örtünme ve standart monitörizasyon uygulandı. Cerrahi sterilizasyon sağlandıktan sonra cilt ve cilt altı dokular geçilerek batına ulaşıldı. Batına ulaşıldıktan sonra kontrol grubu hariç bütün gruplarda batın içi organlar elle ve cerrahi pensetlerle maniple edildi. Manipülasyon sonrası adezyon bariyeri grubundaki her rata 4 cc olacak şekilde adezyon bariyeri (Metrical Tıbbi Cihazlar Yazılım Savunma Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi) batın içine tatbik edildi. Standart cerrahi gruplara da aynı manipülasyonlar yapıldı ancak herhangi bir uygulama yapılmadı. Prosedürler tamamlandıktan sonra cilt altı dokularda 2.0 vicryl, cilt içinse 4.0 vicryl dikiş ile cilt altı kapatma işlemi yapıldı. İşlem sırasında cerrahi farklılık olmaması için

her operasyon aynı cerrah tarafından yapıldı. Yaralar tamamen iyileşene kadar günlük pansuman yapıldı. Grup 2 ve 5 işleminden 1 hafta sonra, grup 3 ve 6 işleminden 2 hafta sonra ve grup 4 ve 7 işleminden 4 hafta sonra adezyon derecesini değerlendirmek için bütün hayvanlar yüksek doz anestezik madde ile sakrifiye edildi (Tablo 1).

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra periton dokusu örnekleri alındı. Çıkarılan örnekler histolojik ve histopatolojik değerlendirmeye alındı ve her grup için karşılaştırma yapıldı.

Histopatolojik Yöntem

Ratların nekropsileri yapılarak alınan periton örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin alkol-ksilol takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Poly-lysinli lamlara alınan 5 µ' lik kesitler hematoksilin-eosin (H-E) ve Masson's Trichrome (MST) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirme Papparella ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer şekilde ödem, vaskülarizasyon ve yangısal hücre infiltrasyonu yönünden değerlendirildi (1). Masson's Trichrome ile yapılan boyamada ise oluşan fibröz doku kalınlığı ölçülerek sınıflandırıldı (Table 2).

Tablo 2.	
Histopatolojik Skorlar	
Değişiklik yok	Yok (-)
<10% değişiklik	Hafif (+)
10-40 % değişiklik	Orta (++)
>40% değişiklik	Şiddetli (+++)
Fibröz Doku Skorları	
<20 µm kalınlık	Yok (-)
20-80 µm kalınlık	Hafif (+)
80-160 µm kalınlık	Orta (++)
>160 µm kalınlık	Şiddetli (+++)

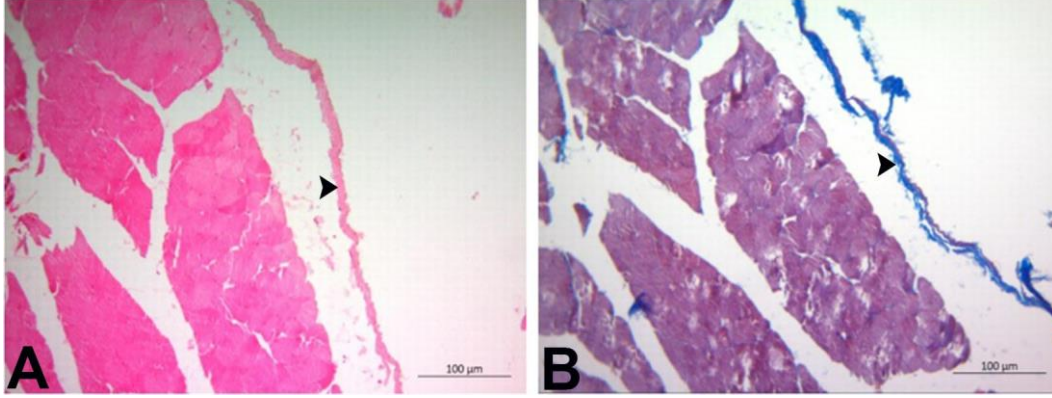
Tablo 2: Histolojik skorlama sistemi (Papparella ve arkadaşları referans alınmıştır).

İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık nonparametrik testlerden olan Student T testi belirlendi. (p <0.05).

Bulgular

Herhangi bir uygulama yapılmamış ratların periton örnekleri normal histolojik görünümdeydi (Resim 1). Uygulama grupları arasında ise histopatolojik olarak istatistiksel farklar tespit edildi ($p < 0.05$).



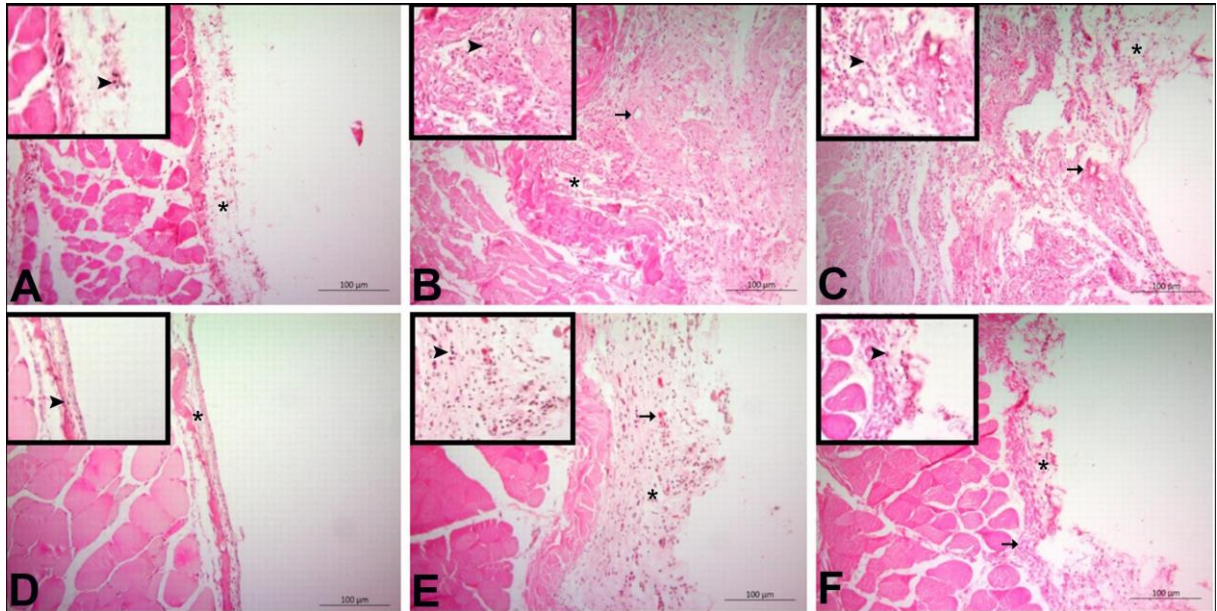
Resim. 1. Kontrol grubu. A- Hematoksilen- Eosin, **B-**Masson's Trichrome Boyama. Normal histolojik görünüm. Mezotelyal tabaka (okbaşı).

1.hafta adezyon bariyeri uygulanan ve uygulanmayan gruplarda hafif düzeyde ödem ve yangısal hücre infiltrasyonları görüldü. Bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. 2. hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grupta şiddetli düzeyde ödem, yangısal hücre infiltrasyonu ve orta düzeye vaskülarizasyon belirlenirken, aynı haftanın adezyon bariyeri uygulanan grubunda ödem ve yangısal hücre infiltrasyonunun orta düzeyde vaskülarizasyonun ise hafif düzeyde olduğu tespit edildi. Histopatolojik olarak en önemli fark 4. Haftada belirlendi. Bu haftada adezyon bariyeri uygulanmayan grupta ödem, yangısal hücre infiltrasyonu ve vaskülarizasyon şiddetli olarak belirlenirken, adezyon bariyeri uygulanan grupta bu histopatolojik bulgular hafif düzeyde idi (Tablo 3, Resim 2).

Gruplar	Ödem	Yangısal hücre infiltrasyonu	Vaskülarizasyon
1.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	1,00± 0,00 ^{aA}	0,83± 0,40 ^{aA}	0,12± 0,40 ^{aA}
1.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	0,83± 0,40 ^{aA}	0,83± 0,40 ^{aA}	0,33± 0,51 ^{aB}
2.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	2,83± 0,40 ^{bA}	2,66± 0,51 ^{bA}	1,83± 0,40 ^{bB}

2. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	1,66± 0,51 ^{CA}	1,83± 0,40 ^{CA}	1,00± 0,00 ^{CB}
4. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	2,66± 0,40 ^{bA}	2,83± 0,40 ^{bA}	2,66± 0,51 ^{dA}
4. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	1,12± 0,40 ^{aA}	1,12± 0,40 ^{aA}	1,00± 0,00 ^{CA}

Tablo 3: Histopatolojik değerlendirme sonuçları ^{a,b,c,d}, Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir (p <0.05). ^{A,B,C}, Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir (p <0.05).



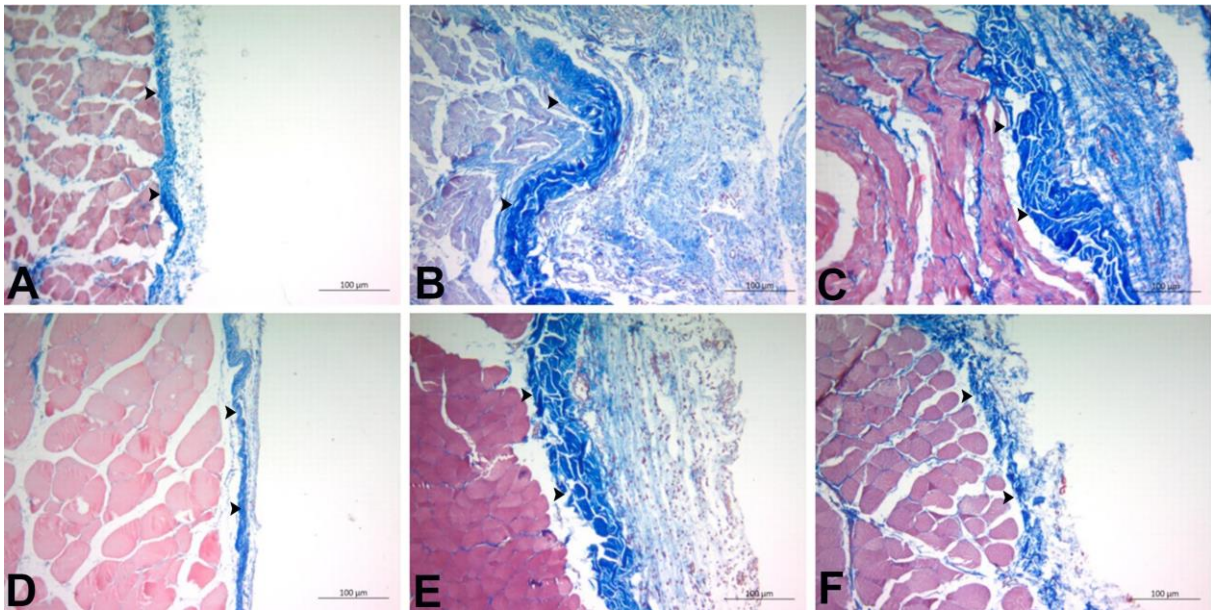
Resim 2. A- 1.hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Hafif düzeyde ödem (*) ve yangısal hücre infiltrasyonu, B- 2. hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Şiddetli düzeyde ödem (*), yangısal hücre infiltrasyonu (okbaşı) ve orta düzeyde vaskülarizasyon (ok), C- 4. hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Şiddetli düzeyde ödem (*), yangısal hücre infiltrasyonu (okbaşı) ve vaskülarizasyon (ok), D- 1.hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Hafif düzeyde ödem (*) ve yangısal hücre infiltrasyonu, E-2. hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Orta düzeyde ödem (*), yangısal hücre infiltrasyonu (okbaşı) ve hafif düzeyde vaskülarizasyon (ok), F- 4. hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Hafif düzeyde ödem (*), yangısal hücre infiltrasyonu (okbaşı) ve vaskülarizasyon (ok), H-E.

Masson's Trichrome ile yapılan boyamalarda fibröz doku oluşumu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi 1. hafta adezyon bariyeri uygulanan ve uygulanmayan gruplarda hafif düzeyde fibröz doku oluşumu tespit edilirken, 2. haftada orta hafif düzeyde fibröz doku oluşumu tespit edildi. 4. haftada adezyon bariyeri uygulanan ve

uygulanmayan gruplar arasında önemli derecede fark bulunmaktaydı. Adezyon bariyeri uygulanmayan grupta şiddetli düzeyde fibröz doku oluşumu görülürken, adezyon bariyeri uygulanan grupta hafif düzeyde fibröz doku oluşumu gözlemlendi (Tablo 4, Resim 3).

Gruplar	Fibröz doku oluşumu
1.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	0,83± 0,40 ^a
1.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	0,83± 0,40 ^a
2.hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	1,66± 0,51 ^b
2. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	1,83± 0,40 ^b
4. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanmayan	2,83± 0,40 ^c
4. hafta Adezyon Bariyeri Uygulanan	1,00± 0,00 ^a

Tablo 4: Masson's Trichrome Boyama Bulguları. ^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir (p <0.05).



Resim 3. A- 1.hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Hafif düzeyde, B- 2. hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Orta düzeyde, C- 4. hafta adezyon bariyeri uygulanmayan grup. Şiddetli düzeyde, D- 1.hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Hafif düzeyde, E-2. hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Orta düzeyde, F- 4. hafta adezyon bariyeri uygulanan grup. Hafif düzeyde fibröz doku oluşumu (okbaşı). MST.

Tartışma:

Postoperatif perikardiyal ve batın yapışıklıkları, Redo (tekrar) kalp cerrahisi ve batın cerrahisi için bir risk faktörü olarak kabul edilir (2). Açık kalp sonrası için perikardın tam olarak tekrar bir araya getirilmesi neredeyse imkansızdır. Kalbin ve büyük damarların (Aort ve pulmoner arter) üzerinin perikard ile kapatılmadığı cerrahilerden sonra, yeni bir cerrahi ihtiyacında daha önceki cerrahiden kalan yapışıklıklar (adezyonlar) hem cerrahi işlemin kompleksliğini artırmakta hem de artmış mortalite/morbidite ile ilişkilendirilmektedir. Aynı sıkıntılar batın cerrahisi tekrar cerrahi ihtiyacında da meydana gelmektedir. Özellikle pediatrik yaş grubu açık kalp cerrahileri stage-by-stage şeklinde ilerlemektedir. Bazı doğumsal kalp ameliyatlarının 4-6 basamaklı şekli mevcuttur. Düzeltme ameliyatları olarak adlandırılan bu cerrahilerde her seferinde yapışıklıklar yoğun bir hal almakta ve cerrahinin seyrini etkilemektedir (3). Açık cerrahi sonrası adezyonlar (yapışıklıklar) her cerrahi sonrası görülmektedir. Adezyon oluşumundaki ana mekanizma cerrahi uygulanan bölgeye akut ve kronik fazda inflamatuvar hücrelerin göçüdür. Esasen bu göç iyileşmeyi hızlandırmak için gerçekleşse de tekrar bir cerrahi söz konusu olduğunda hastanın cerrahi sürecini zora sokmaktadır. Aynı durum batın boşluklarının açıldığı cerrahilerde de söz konusudur. Nitekim çalışma batın yapışıklıkları baz alınarak dizayn edilmiştir.

Adezyon bariyerleri günümüzde hemen hemen her vakada adezyon riskini yok etmek için kullanılmaktadır. Bu bariyerler inflamatuvar kaskadı ya da fibrin oluşumunu engeller ve adezyon oluşumuna neden olan etkilenmiş dokular arasında yaklaşma ve teması engelleyip mekanik bariyer oluşturur. Abdominal adezyonlarda ise kronik pelvik ağrı, dispareni, subfertilite ve barsak tıkanıklığı gibi önemli komorbidite ile ilişkilidir. Adezyonlar, onkolojik veya pediatrik cerrahi gibi diğer uzmanlık dallarında da sorunlu olabilir. Hastaneye yeniden yatış maliyetleri ile ilişkili büyük mali ve halk sağlığı yansımaları vardır ve gerçek bir halk sağlığı sorununu temsil ederler.

Adezyon bariyeri konusunda üretilmiş prelinik/klinik deneyleri yapılmış ürünler mevcuttur (4, 5). İdeal bir adezyon bariyeri, hasarlı doku yüzeylerin birbirinden ayrılarak serbestçe iyileşmelerine olanak sağlayarak adezyon oluşumuna engel olur. Ayrıca, bariyerin in-vivo etkili olabilmeli, nonreaktif, antibakteriyel, biyouyumlu, biyobozunur olmalıdır. Bu proje de altın nanopartikül/hyaluronik asit nanokompozitin toksik kimyasal kullanmadan Green Sentez ile saflaştırma basamağı içermeyecek şekilde in-situ olarak sentezlenmiştir. Ürünün HA ve AuNP'nin antibakteriyel özelliklerinin sinerjik etkileri olduğu için inflamatuvar hücrelerin azlığı adezyon bariyeri uygulanan grupta anlamlı düzeyde bulunmuştur.

Çalışmada adezyon bariyerinin etkinliğini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu etkinliği akut-subakut ve kronik süreçleri içerecek şekilde değerlendirme ana hedef olmuştur. Akut dönem etkiler incelendiğinde adezyon bariyeri uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında hem inflamatuvar hücrelerin yoğunluğu hem de fibröz doku oluşumu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Süreç uzadıkça subakut ve kronik dönemlere gelindiğinde adezyon bariyeri uygulanan grup lehine hem inflamatuvar hücre hem de fibröz doku yoğunluğu açısından anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür. Öte yandan ödem ve

vaskülarizasyon açısından da yine adezyon bariyeri uygulanan grubun anlamlı düzeyde lehine bir azalma söz konusu idi.

Çalışma bütünü ile alındığında adezyon bariyeri uygulamasının ratlarda yapışıklığa neden olacak hücresel aktivitelerin önüne geçtiği gösterilmiştir. Bu ise tekrar cerrahi gereksinimi olacak hastalar açısından umut vaat edicidir.

Sonuç ve Öneriler:

Elde edilen bulgular neticesinde adezyon bariyeri uygulamasının subakut ve kronik dönemde adezyona neden olacak; inflamatuvar hücreleri, ödemi, vaskülariteyi ve fibröz doku oluşumunu minimuma düşürdüğü izlenmiştir. Bu değerler açısından erken dönemde her iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu bulgular Anti-bakteriyel özellikli altın nano kompozit hyaluronic acid bazlı adezyon bariyerinin subakut ve kronik adezyonu önlemede başarı ile uygulanabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan uzun dönem takipleri de içeren klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu da aşikardır.

Kaynaklar

1. Papparella A, Nino F, Coppola S, Noviello C, Paciello O. (2013) Peritoneal Morphological Changes due to Pneumoperitoneum: The Effect of Intra-abdominal Pressure, *European Journal of Pediatric Surgery*, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1349057>.
2. Kojima, A., Sakaue, T., Okazaki, M., Shikata, F., Kurata, M., Imai, Y., ... & Izutani, H. (2019). A simple mouse model of pericardial adhesions. *Journal of cardiothoracic surgery*, 14(1), 1-9.
3. Yang, B., Gong, C., Qian, Z., Zhao, X., Li, Z., Qi, X., ... & Wei, Y. (2010). Prevention of post-surgical abdominal adhesions by a novel biodegradable thermosensitive PECE hydrogel. *BMC biotechnology*, 10(1), 1-8.
4. Napoleone, C. P., Valori, A., Crupi, G., Ocello, S., Santoro, F., Vouhé, P., ... & Gargiulo, G. (2009). An observational study of CoSeal® for the prevention of adhesions in pediatric cardiac surgery. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 9(6), 978-982.
5. Stapleton, L. M., Steele, A. N., Wang, H., Hernandez, H. L., Anthony, C. Y., Paulsen, M. J., ... & Woo, Y. J. (2019). Use of a supramolecular polymeric hydrogel as an effective post-operative pericardial adhesion barrier. *Nature biomedical engineering*, 3(8), 611-620.

