

OTOJEN FİBRİN YAPIŞTIRICI (DeneySEL Çalışma)

Ahmet KARACALAR, Sibel TAŞ, Mesut ÖZCAN

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Bursa

ÖZET

Fibrinojen, doku yapıştırıcısı olarak bilinen Tisseel[®] 'in en pahalı komponentidir. Aynı zamanda, viral hastalıkları taşıma ve immun reaksiyon yapma riskide vardır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için çeşitli fibrinojen elde etme yöntemleri araştırıldı. En yüksek fibrinojen konsantrasyonu, baryum sülfat ve magnezyum sülfatta bekletilmiş plazmanın amonyum sülfatla presipitasyonu sonucu elde edildi. Kan, Tisseel[®] ,trombositli ve trombositiz otojen yapıştırıcıların gerilme dirençleri sıçan deri greftlerinde karşılaştırıldı. Trombositli otojen yapıştırıcının Tisseel[®] kadar güçlü olmasa da, 10 gm/cm² 'a varan gerilme direnci sağladığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fibrin yapıştırıcı, otojen yapıştırıcı, Tisseel[®]

SUMMARY

Autologous fibrin glue (Experimental Study)

Fibrinogen is the most expensive component of Tisseel[®] known as tissue adhesive. Also, it has the potential danger of trasferral of viral diseases and possible immune reactions. In order to overcome these disadvantages, various methods of precipitation of fibrinogen were investigated. The highest concentration of fibrinogen was obtained when the plasma incubated in barium sulfate and magnesium sulfate was precipitated using ammonium sulfate. The average tensile strength of blood, Tisseel[®], autologous fibrin tissue adhesive without platelet and autologous fibrin tissue adhesive with platelet were compared after glueing skin grafts in rats. Our results suggested that the autologous fibrin tissue adhesive with platelet provided a tensile strength up to 10 gr/cm² although it was not as strong as Tisseel[®].

Key Words: Fibrin glue, autologous glue, Tisseel[®]

GİRİŞ

Tisseel[®] olarak bilinen iki komponentli fibrin yapıştırıcı sistemi, uzun yıllardan beri cerrahinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Mikro kanamaların önlenmesinde, kaviteilerin doldurulmasında, damar ve sinir onarımlarında tercih edilmekte ve her geçen gün uygulama alanını genişletmektedir. Fibrin koagulumunun lizisi sonucu, uygulanan yerden rezorbe olması nedeniyle de "cyanoacrylate" gibi yapıştırıcılara belirgin üstünlük sağlamaktadır¹. Bu sistemde, şekil 1' de görüldüğü gibi iki komponentin birleşmesiyle fibrin yapıştırıcı oluşmaktadır. Birinci komponent fibrinojen ve faktör XIII içerirken ikinci komponent trombin, kalsiyum klorür ve fibrinoliz inhibitörü içerir. Bu sistemin en pahalı kısmı fibrinojendir. Pekçok donörden hazırlanan plazma havuzundan elde edildiğinden, viral hastalıkları aktarma ve immun reaksiyona neden olma gibi dezavantajları yaratan da fibrinojen komponentidir²⁻⁵. Bu dezavantajları ortadan kaldırmanın en iyi yolu fibrinojenin otojen olarak, bir başka deyişle hastanın kendi kanından elde edilmesidir. Kalsiyum klorür ve fibrinoliz inhibitörü (aprotinin gibi) son derece ucuz maddelerdir. Trombin ise nisbeten ucuz olup, otojen elde edilmesine gerek yoktur. Sığır trombinini olduğundan viral enfeksiyonları

taşıma riskine sahip değildir. Trombositler, faktör XIII için iyi bir kaynaktır⁶⁻⁹. Bu nedenle, hastanın trombositleri konsantre bir şekilde kullanılırsa, faktör XIII ortama eklenmiş olur.

Bu araştırmada, fibrin yapıştırıcının her hastanede elde edilebilmesini sağlayacak basit ve ucuz bir yöntemin geliştirilmesine çalışıldı. Elde edilen yapıştırıcı alternatiflerin yapıştırıcı etkileri mekanik olarak karşılaştırıldı.

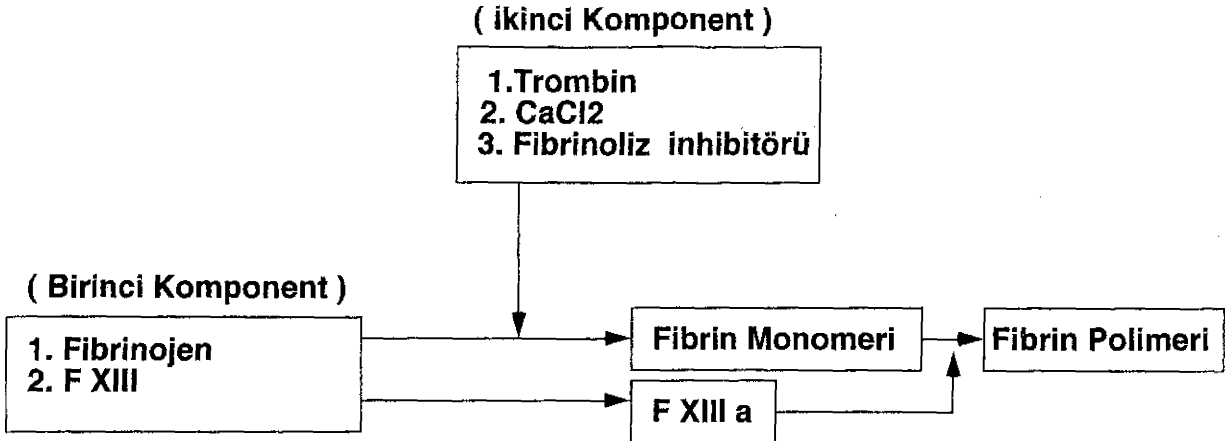
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma iki bölümden oluşmaktadır.

I) Çalışmanın bu bölümünde dört fibrinojen elde etme tekniği toplam 40 insan plazması örneği kullanılarak birbirleriyle ve kontrol fibrinojen ile karşılaştırıldı. Bu yöntemler:

1. Yöntem (amonyum sülfatla presipitasyon): 9 ml plazma+1 ml % 3.8 sodyum sitrat, 1.3 ml soğuk, pürifiye amonyum sülfatla karıştırıldı. 4000 devirde 10 dak. santrifüje edildi. Süpernatant döküldü. Dipteki materyalden fibrinojen analizi yapıldı.

2. Yöntem (amonyum sülfatla presipitasyon ve -20 derecede kriopresipitasyon): 9 ml plazma+1 ml % 3.8 sodyum sitrat, 1.3 ml soğuk, pürifiye amonyum sülfatla



Şekil 1: Fibrin yapıştırıcı sisteminin temel reaksiyon basamakları

karıştırıldı. 4000 devirde 10 dak. santrifüje edildi. 24 saat - 20 derecede bekletildi. Süpernatant döküldü. Dipteki materyalden fibrinojen analizi yapıldı.

3. Yöntem (amonyum sülfatla presipitasyon ve şok dondurma ile kriopresipitasyon): 9 ml plazma + 1 ml % 3.8 sodyum sitrat, sıvı azotta 30 sn. bekletilerek şok donduruldu. 72 saat sonra çözüldü. 1.3 ml soğuk, pürifiye amonyum sülfatla karıştırıldı. 4000 devirde 10 dak. santrifüje edildi. Süpernatant döküldü. Dipteki materyalden fibrinojen analizi yapıldı.

4. Yöntem (baryum sülfat ve magnezyum sülfat içerisinde bekletme ve amonyum sülfatla presipitasyon): 9 ml plazma + 1 ml %3.8 sodyum sitrat, 0.36 gr baryum sülfat ve 0.019 gr magnezyum sülfat içerisinde 1 saat bekletildi. 2000 devirde 20 dak. santrifüje edildi. Plazma 1.3 ml soğuk, pürifiye amonyum sülfatla karıştırıldı. 4000 devirde 10 dak. santrifüje edildi. Süpernatant döküldü. Dipteki materyalden fibrinojen analizi yapıldı.

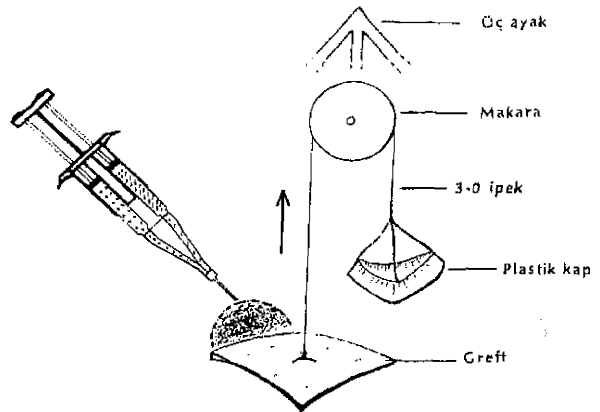
II) Dördüncü yöntemle elde edilen fibrinojen miktarının en yüksek olduğunun saptanması üzerine kan (kontrol), Tisseel^R, 4. yöntemle elde edilen yapıştırıcı ve trombosit ilaveli 4. yöntemle elde edilen yapıştırıcı karşılaştırdı. 10 adet 200-250 gr Wistar sıçan kullanıldı. Uludağ Üniversitesi, Deney Hayvanları Laboratuvarı hayvan koruma standartları ve protokolüne göre çalışma gerçekleştirildi (Proje no: 93/54). Anestezi 50 ml/kg intraperitoneal penthotal ile sağlandı. Sıçanın abdominal bölgesinden 1X1 cm boyutlarındaki 4 adet tam kalınlıkta deri grefti hazırlandı. Yapıştırma işlemi için gerekli kalsiyum klorür (40 mmol/L), trombin (500 IU/mlt), ısıtma ve karıştırma için gerekli malzeme (Fibrinotherm), parametreleri sabit tutmak için Tisseel^R in orjinal setinden kullanıldı. Fibrinoliz inhibitörü kullanılmadı. Trombositler kan merkezi tarafından konsantre olarak hazırlandı. 1/4 oranında 4. yönteme eklenerek kullanıldı. Greftlerin merkez noktalarından 3-0 ipek geçirildi. Greftler altına belirtilen maddeler

sürüldü. Bu sırada ortamın kuru olmasına, hazırlanan solusyonların köpüksüz, homojen olmasına özen gösterildi. Greftler üzerine sabit basınçlar uygulanarak 30 dak. bekletildi. Greftin ortasından geçirilen 3-0 ipek dikişe bağlı bir makara sistemiyle, ipe uygulanan kuvvet artırılarak greftlerin yerlerinden ayrıldığı andaki ölçümler yapıldı (Şekil 2). İşlemlerin bitirilmesinden sonra, yüksek doz penthotal ile sıçanlar sakrifiye edildi.

SONUÇLAR

Plazmalardaki kontrol fibrinojen miktarı 220 -370 mg/mlt, 1. yöntemle elde edilen fibrinojen miktarı 430-460 mg/mlt, 2. yöntemde 430-460 mg/mlt, 3. yöntemde 450-470 mg/mlt, 4. yöntemde 550-600 mg/mlt olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünün istatistiksel değerlendirilmesi "Kruskal-Wallis nonparametrik ANOVA test" ve "Dunn's multiple comparison test" i ile yapıldı. Grup 1 ve 2 ile Grup 1 ve 4 arasında anlamlı farklar bulundu. (p<0.0001)



Şekil 2: Greft altına sürülen yapıştırıcıların gücünü ölçen sistemin şematik görüntüsü. Plastik kaba yerleştirilen gramlarla greftlerin yerlerinden ayrıldığı andaki ölçümler yapıldı.

Şıçanda gerçekteştirilen ölçümlerde, kanla yapıştırılan greftte (kontrol) ortalama gerilim direnci 0.5 gr/cm^R bulunurken; Tisseel^R de 12.1 gr/cm², 4. yöntemle elde edilen yapıştırıcıda 2.5 gr/cm² ve trombosit ilaveli 4. yöntemle elde edilen yapıştırıcıda 3.4 gr/cm² olarak bulunmuştur. Sonuçlar tabloda özetlenmiştir.

Tablo: Sonuçların Özeti

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|
| Örnek sayısı | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Ortalama (gr) | 0.5 | 12.1 | 2.5 | 3.4 |
| SD | 0.97 | 10.6 | 2.6 | 2.6 |
| SEM | 0.3 | 3.3 | 0.8 | 0.8 |
| Minimum (gr) | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Maksimum (gr) | 3 | 30 | 10 | 10 |

SD = Standart Deviasyon

SEM = Ortalamanın Standart Hatası

TARTIŞMA

Amonyum sülfat'ın fibrinojeni presipite ettiği Harker ve Slichter¹⁰ tarafından bildirilmiştir. Siedentop ve ark.^{2,3} amonyum sülfat ile konsantre fibrinojen elde edilebileceğini ileri sürdüler. Weisman ve ark.³ polietilen glikölü, fibrinojen presipitasyon amacıyla kullandılar Plastik cerrahi literatüründe bulunan, otojen fibrinojen elde edilmesi ile ilgili tek çalışma Saltz ve ark.¹ tarafından yapılmış bir araştırmadır. Bu araştırmacılar fibrinojeni bir dizi kriopresipitasyon işleminden sonra konsantre olarak elde etmişler ve otojen yapıştırıcı olarak kullanmışlardır. Bununla birlikte, yapıştırmanın basamaklarında önemli bir rolü olan faktör XIII ü ilave etmemişlerdir. Halbuki faktör XIII fibrin monomerinin, fibrin polimerine dönüşme basamağında rol alan, önemli bir komponenttir. Bu dönüşüm ile fibrin pıhtısının stabilizasyonu sağlanır¹¹. Son zamanlarda etanol ve santrifüj kullanılarak presipitasyonun yanısıra, yalnızca kriopresipitasyon yöntemiyle yüksek konsantrasyonda fibrinojen elde edilebileceğini bildiren çalışmalar da olmuştur¹²⁻¹³.

Bizim çalışmamızda, fibrinojenin presipitasyonunda en bilinen yöntem olan amonyum sülfat ile, yeterince yüksek fibrinojen konsantrasyonları elde edilemedi. Kriopresipitasyon ile bu yöntem kombine edildiğinde ise daha yüksek fibrinojen konsantrasyonlarına varıldı. Plazmanın baryum sülfat ve magnezyum sülfat ile karıştırılıp bekletilmesinden sonra amonyum sülfatla presipitasyon gerçekleştirildiğinde ise en yüksek fibrinojen konsantrasyonlarının elde edildiği saptandı (550-600 mg/mlt). Bu farkın nedeni baryum sülfat ve magnezyum sülfat'ın plazmadaki trombinin absorbe etmesi ve fibrinojen kullanımını önlemesi olabilir².

Fibrinojen yoğunluğunu ölçmede kullanılan yöntemler farklı olduğundan sonuçlarımız diğer araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırılmadı

Bu yöntemle elde edilen fibrinojen konsantrasyonunun diğer yöntemlerden daha yüksek olması nedeniyle çalışmanın ikinci bölümünde trombositli ve trombositiz olarak Tisseel^R ile karşılaştırma yapıldı. Trombositlerin iyi bir faktör XIII kaynağı olduğu bilinmektedir⁶⁻⁹. Fakat, trombositlerin eklenmesiyle, ortama faktör XIII ile birlikte birtakım hücre elemanları da dahil edilmektedir¹⁶⁻¹⁸. Bu durum fibrinojen konsantrasyonunu azaltacağı için, yapışma gücünü düşürmektedir. Trombositli yapıştırıcı ile trombositiz yapıştırıcı arasında gerilim direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen kantitatif olarak trombosit eklenen grupta gerilim direnci daha fazlaydı (3.4 gr/cm² ye karşı 2.5 gr/cm²). Çalışmamızda faktör XIII kaynağı olarak kullanılan trombositlerin lizise uğratılmadan karışıma eklenmiş olması, bu iki grup arasında fazla bir farklılık olmamasını açıklayabilir. Saltz ve ark.¹ yapışma kuvvetini ölçmek için mekanik bir test cihazı kullanmışlardır.

Elde edilen otojen yapıştırıcının reaksiyon ürünü, makroskopik olarak Tisseel^R ile karşılaştırıldığında, daha az kıvamlı ve daha esnek olduğu gözlemlendi.

Tisseel^R de bulunan fibrinoliz inhibitörü olan aprotinin, fibrin koagulumunun lizisini geciktirmekte ve etki süresini uzatmaktadır. Çalışmamızda erken dönem gerilim direnci ölçüldüğü için, aprotinin yapıştırıcı komponentleri arasına dahil edilmedi.

Gerilim direncinin artırılmasında ortamdaki fibrinojen konsantrasyonunun asıl rolü oynadığı kabul edilmektedir. Diğer önemli faktörler ortamdaki faktör XIII ün varlığı ve trombin konsantrasyonudur. Ortamda trombinin 4 IU/mlt olması yapışma için yeterli olmaktadır. Trombin konsantrasyonu arttıkça yapışma kuvveti artmamakta yalnızca yapışma hızı artmaktadır⁵. Çalışmamızda, hızlı yapışma sağlayan 500 IU/mlt trombin kullanılmıştır.

Bir dizi çalışmanın ön çalışması olarak değerlendirilebileceğimiz bu çalışmadan, şu sonuçlara varılmıştır: Baryum sülfat ve magnezyum sülfatta bekletilen plazmanın, amonyum sülfat ile presipitasyonu sonucu fibrinojen elde edilmesi basit, etkili ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemle elde edilen yapıştırıcının gücü Tisseel^R den daha zayıf bulunmuştur. Bu nedenle bu yöntemle elde edilen yapıştırıcı henüz Tisseel^R in yerini alabilecek derecede güçlü olmasa da greftemeerde kullanılabileceğini ve yara iyileşmesine önemli katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Dr. Ahmet KARACALAR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dah

BURSA

KAYNAKLAR

1. Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz MB, Dimick A, Vasconez LO. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast Reconstruct Surg* 88:1005,1991
2. Siedentop KH, Harris DM, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. *Laryngoscope* 95: 1074,1985
3. Siedentop KH, Harris DM, Kam K, Sanchez B. Extended experimental and preliminary surgical findings with autologous fibrin tissue adhesive made from patient's own blood. *Laryngoscope* 96:1062,1986
4. Harris DM, Siedentop KH, Kam K, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive biodegradation and systemic effects. *Laryngoscope* 97: 1141, 1987
5. Weisman RA, Torsiglieri AJ, Schreiber AD, Epstein GH. Biochemical characterization of autologous fibrinogen adhesive. *Laryngoscope* 97: 1186, 1987
6. Broekman MS, Handin RI, Cohen P. Distribution of fibrinogen, and platelet factors 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets. *Br J Haematol* 35:51, 1975
7. Aberg M, Bergentz SE. The effect of dextran on the platelet distribution and lysability of ex vivo thrombi in dogs. *Eur Surg Res* 11: 282, 1979
8. Inhibition of platelet factor XIIIa-catalyzed reactions by calmodulin. *Biochim Biophys Acta.* 883: 265, 1986
9. Kasahara K, Takagi J, Sekiya F, Inada Y, Saito Y. "A" subunit of factor XIII is present on bovine platelet membrane and mediates collagen-induced platelet activation. *Thromb Res*, 253: 50,1988
10. Harker LA, Slichter SJ. Platelet and fibrinogen consumption in man. *N Eng J Med.* 287:999,1972
11. Lorond L, Urayma T, de Kiewiet J: Fibrin stabilizing factor. *J Clin Invest* 48:1054,1969
12. Gammon RR, Prum BE, Avery N, Mintz PD: Rapid preparation of small volume autologous fibrinogen concentrate and its same day use in bleb leaks after glaucoma filtration surgery. *Ophthalmic Surg Las* 29; 1010,1998
13. Park JJ, Cintron JR, Siedentop KH, Orsay CP, Pearl RK, Nelson RL, Abcarian H: Technical manual for manufacturing autologous fibrin tissue adhesive. *Dis Colon Rectum* 42: 1334,1999
14. Komatsu F, Yoshida S: Utility and quality of autologous fresh frozen plasma and autologous fibrin glue for surgical patients. *Transfus Sci* 21:105,1999
15. Yoshida H, Hirozane K, Kamiya A: Adhesive strength of autologous fibrin glue. *Biol Pharm Bull* 23: 313,2000
16. Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM: Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* 309:804,1984
17. Baucr EA, Cooper TW, Huang JS. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4132, 1985
18. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg* 17:421,1990

Gluteus maximus adipomuscular turnover or sliding flap in the surgical treatment of extensive sacral chordomas

Furukawa H, Yamamoto Y, Igawa HH, Sugihara T
(*Plast Reconstr Surg* 2000 Mar;105(3):1013-6Related Articles, Books, LinkOut)

Two cases with extensive posterior peritoneal defects after high sacral amputation for sacral chordoma are presented. An adipomuscular flap as a modification of the conventional gluteus maximus muscle flap was designed to obliterate an extensive residual posterior peritoneal dead space. The deep adipose tissue beneath the superficial fascia left on the gluteus maximus muscle was effectively used to provide more volume to the flap. The adipomuscular flap was turned over into the posterior peritoneal defect in the first case, and the flap was slid into the cavity in the other case. The adipomuscular flap eventually enabled the successful reconstruction of the posterior peritoneal defect, and the volume of the flap was well maintained behind the rectum, according to the postoperative magnetic resonance imaging findings in both cases.

Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis

Taub PJ, Silver L, Weinberg H
(*Plast Reconstr Surg* 2000 Mar;105(3):1034-42Related Articles, Books, LinkOut)

The practice of plastic surgery has always remained at the frontier of medical science. Over the past few decades, this frontier has been marked by significant developments in the field of gene therapy. Gene therapy serves to replace, supplement, or manipulate a patient's genetic makeup to restore function that has been lost or to correct function that is aberrant. Recent technology may allow surgeons to augment the processes of wound healing and angiogenesis by transfecting genes encoding desirable proteins, such as vascular endothelial factor (VEGF), into ischemic tissues. VEGF is a vital growth factor in the development of blood vessels. Although its mechanisms of action are numerous, its sole function seems to be the augmentation of angiogenesis. VEGF is active in growth and development, in wound healing, and in various pathologic conditions, such as psoriasis and rheumatoid arthritis. The role of VEGF in the field

of plastic surgery is just beginning to be explored; it may someday prove to be very rewarding.

"Apron" flap and re-creation of the inframammary fold following TRAM flap breast reconstruction

Amir A, Silfen R, Hauben DJ
(*Plast Reconstr Surg* 2000 Mar;105(3):1024-30Related Articles, Books, LinkOut)

To the best of our knowledge, the recreation of an inframammary fold after TRAM flap breast reconstruction has not yet been described. This article offers a technique for the creation of an inframammary fold as a secondary procedure. The technique has been performed thus far in two patients with good aesthetic outcomes and no postoperative complications. It may also be suitable for adding bulk to the TRAM flap, especially in bilateral breast reconstruction, and for other minor chest deformities.

Lip service for the stiff upper lip

Zide BM, Bradley JP, Longaker MT
(*Plast Reconstr Surg* 2000 Mar;105(3):1154-8; discussion 1159-61Related Articles, Books)

Lip augmentation procedures can restore volume and shape to the aging, thin upper lip, but some patients may develop problematic lip tightness. This stiff upper lip is manifested by a restricted smile and an adynamic central upper lip. We have had success in treating postreconstruction and postaugmentation stiff upper lip with a therapeutic device and treatment regimen. This therapy alleviated tightness and inability to smile. Also, the change in lip commissure-to-commissure distance in repose and when smiling improved after treatment.

Experience with a strong bleaching treatment for skin hyperpigmentation in Orientals

Yoshimura K, Harii K, Aoyama T, Iga T
(*Plast Reconstr Surg* 2000 Mar;105(3):1097-108; discussion 1109-10Related Articles, Books, LinkOut)

Although a variety of topical treatments have been used for skin hyperpigmentation, the effectiveness of each varies after prolonged treatment. In this study, 136 Oriental patients who were followed up for more than