



Deneysel Arteriyovenöz Fistüller için Melatonin İçeren Matriks Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Araştırılması

A Novel Approach for Arteriovenous Fistula Maturation; Effects of Melatonin Loaded PLGA Nanofibers in Rats

İD Damla AYKORA¹, İD Serpil ŞAHİN², İD Cemre AYDEĞER¹, İD Özden YÜLEK³, İD Sevil ALKAN⁴, İD Ayhan ORAL⁵, İD Muhammad Umar JAJERE¹

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

³Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

⁵Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Fakültesi, Fizikokimya Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

Öz

Amaç: Arteriyovenöz fistül (AVF), periferik bir ven ve bir arterden erişilen bir kanülasyon yöntemidir. AVF, kronik böbrek hastalığı hastalarının hemodiyaliz alabilmeleri için vasküler erişim sağlar. AVF cerrahi müdahale ile oluşturulabilir ve hızlı iyileşme için arteriyel-venöz dolaşımı kolaylaştırır. Ancak AVF'nin olgunlaşması, sirkülasyonun ve hemodiyalizin devamı için optimum akış hızına izin veren venöz proliferasyona ve lümen çapına bağlıdır. Birçok beklenmedik durum nedeniyle, AVF'lerin olgunlaşmaması hemodiyalizin etkinliğini sınırlar, bu nedenle hastaların AVF kanülasyonu için başka bir ameliyat olması gerekir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri olduğu bilinen melatoninin (MT) etkilerinden yararlanarak yeni bir teknikle AVF'lerin daha uzun süre ve daha etkin kullanımını sağlamayı amaçladık. Bu amaçla ilk olarak elektrospinning yöntemi ile polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanofiber membranlar geliştirilmiştir. Daha sonra PLGA içine MT yüklenmiş ve karakterize edilmiştir. Biyobozunum ve ilaç salınım profilleri analiz edilmiştir. Wistar Albino erkek sıçanlarda (n=18) bir *in vivo* çalışma gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar rastgele üç deney grubuna ayrılmıştır; sırasıyla Sham, PLGA ve MT/PLGA (n=6). Tüm gruplarda genel anestezi altında karotis arter ve jugular ven arasında AVF modeli oluşturulmuştur. Sham grubuna herhangi bir tedavi veya biyomateriyal uygulaması yapılmadı. Geliştirilen membranlar PLGA ve MT/PLGA gruplarındaki AVF'lerin üzerine yerleştirildi. Tüm sıçanlar deneyin 28. gününde sakrifiye edildi. Tüm hayvanların anastomoz bölgeleri histopatolojik analiz için toplandı.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre, MT/PLGA grubunda histopatolojik olarak vasküler proliferasyon ve fibroblastik hücre çoğalması açısından değerlendirildiğinde matürasyon düzeyinin Sham grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0,05).

Sonuç: Elde ettiğimiz veriler MT/PLGA nanofiblerinin erken AVF olgunlaşması için umut verici bir materyal olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Arteriyovenöz fistül, melatonin, PLGA, biyoyumlu materyaller, matürasyon, venöz proliferasyon

ABSTRACT

Aim: Arteriovenous fistula (AVF) is a cannulation method that is accessed by a peripheral vein and an artery. AVF provides vascular access for chronic kidney disease patients so they can receive hemodialysis. AVF could be created by surgical intervention and facilitates arterial to venous circulation for rapid recovery. However, AVF maturation depends on venous proliferation and luminal diameter which allows the optimum flow rate for continuing circulation and hemodialysis. Due to multiple unexpected conditions, non-maturation of AVFs limits the efficacy of the hemodialysis so patients must receive another surgery for AVF cannulation.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Serpil ŞAHİN, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

E-posta: serpilsahin@comu.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-6094-4754

Geliş Tarihi/Received: 08.02.2025 **Kabul Tarihi/Accepted:** 20.03.2025 **Yayınlanma Tarihi/Publication Date:** 0000-0001-8158-4594

Atıf/Cite this article as: Aykora D, Şahin S, Aydeğer C, Yülek Ö, Alkan S, Oral A, et al. A novel approach for arteriovenous fistula maturation; effects of melatonin loaded PLGA nanofibers in rats. Nam Kem Med J. 2025;13(2):141-148



©Telif Hakkı 2025 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2025 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

Materials and Methods: In this study, we aimed to utilize the effects of melatonin (MT), which is known to have antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects, to provide longer and more effective use of AVFs via a novel technique. For this purpose, firstly by electrospinning method, polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanofiber membranes were developed. After MT is loaded into the PLGA and characterized. Biodegradation and drug release profiles were analyzed. An *in vivo* study was performed in Wistar Albino male rats (n=18). Rats were randomly divided into three experimental groups; Sham, PLGA, and MT/PLGA respectively (n=6). AVF model was established in all groups between arteria carotica and vena jugularis under general anesthesia. The Sham group did not receive any treatment or biomaterial application. The developed membranes were placed onto the AVFs in PLGA and MT/PLGA groups. All rats were sacrificed on the 28th of the experiment. The anastomosis sites of all animals were harvested for histopathological analysis.

Results: Our results showed MT/PLGA group indicated increased maturation levels compared to Sham group (p<0.05).

Conclusion: The results showed that PLGA/MEL may be a promising material for early AVF maturation.

Keywords: Arteriovenous fistula, melatonin, PLGA, biocompatible materials, maturation, venous proliferati

GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH) tedavisi erken dönemde öncelikle mevcut böbrek fonksiyonunu korumaya yönelik olup diyet, yeterli sıvı alımı, anjiyotensin inhibitörlerinin kullanımı gibi medikal tedaviler, yaşam tarzının değiştirilmesi, fiziksel aktivitenin artışı gibi yöntemleri içermektedir. İleri dönem böbrek yetmezliğinde ise başlıca hemodiyaliz, periton diyalizi tedavileri uygulanırken, böbrek transplantasyonu son dönem böbrek yetmezliği hastalarının son çaresi durumundadır¹. Küresel Tanı Yüğü 2017 verilerine göre, KBH dünya genelinde yaklaşık 700 milyon kişiyi etkilemektedir. Hasta sayısındaki aşırı artış ve organ bağışçısı eksikliği nedeniyle, KBH hastaları ancak hemodiyaliz ile hayatta kalabilmektedir². Hemodiyaliz, KBH hastaları için dolaşımdaki kandaki mineralleri dengelemek ve kan basıncını kontrol etmek için vazgeçilmezdir³. Uzun süreli hemodiyaliz için hastaların arteriyovenöz fistül (AVF) adı verilen bir venöz hatta arterler arasında kurulan kalıcı vasküler erişime ihtiyacı vardır. AVF, uzun süreli hemodiyaliz hastaları için en yaygın kanülasyon yöntemidir⁴. Primer maturasyon yetmezliği, iç remodeling ve lümen darlığı nedeniyle AVF kullanımının ana sınırlayıcı faktörüdür. Önceki çalışmalar, 2 mm'nin altındaki ven lümenal çapının bozulmaya yatkın olduğunu iddia etmiştir. Buna ek olarak, ven çapının anastomoz arter çapından daha yüksek olması gerektiği yaygın olarak kabul edilmektedir⁵. Bu nedenle, AVF'nin uzun süreli kullanımı için erken olgunlaşma acildir. Aksi takdirde, hastalar hemodiyaliz tedavisi için bir AVF kanülasyonu daha yaptırmak üzere birkaç ameliyat geçirmek zorunda kalmaktadır.

AVF'lerin olgunlaşmaması çoğunlukla oksidatif stres, enflamasyon veya hipoksiden oluşan altta yatan patolojik mekanizmalar nedeniyle damar intimasının kalınlaşmasına bağlıdır ve bu da düz kas hücrelerinin bol miktarda göçüne ve çoğalmasına ve hücre dışı matris birikimine neden olur⁶. Yapılan araştırmalar AVF başarısızlığının çoğunlukla ameliyat sonrası erken haftalarda ortaya çıktığını bildirmiştir⁷. Yaklaşık 4 ila 6 hafta civarında, kan akışı 500 mL/dakikadan düşükse ve damar çapı 4 mm'nin altındaysa, yeni bir AVF erişiminin yeniden kurulması için acilen yeniden ameliyat gerekir⁸. Bu

nedenle, başarılı bir AVF kanülasyonunun oluşturulması kadar AVF olgunluğunun sağlanması da uzun süreli hemodiyaliz için gereklidir. Gelişen cerrahi teknikler ve yeni farmakoterapi ajanları kullanılmasına rağmen, AVF başarısızlığını önlemek için altın standart yöntem mevcut değildir. Bu nedenle, bu çalışmada AVF'nin erken olgunlaşmasını ve arter ile ven arasındaki yetersiz kan akışının önlenmesi için stenozdan kaçınmayı amaçladık.

Bu noktada, doku mühendisliği biyoyumluluk özellikleri ile çeşitli patolojilerin tedavisi için umut verici sonuçlar sunmaktadır⁹. Sentetik polimerler, doku mühendisliği çalışmaları alanında en yaygın kullanılan taşıyıcılardır. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) çeşitli ajanları, hücreleri veya molekülleri taşımak için tercih edilen sentetik polimerlerden biridir. Hücre göçünü, çoğalmasını ve yapışmasını aktive edebilen laktik asit ve glikolik asitten oluşur¹⁰. Biyoyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle PLGA, doku iyileşmesi veya rejenerasyonu için faydalı etkiler sağlar¹¹. Çalışmamızda melatonin (MT) yüklenen PLGA nanofiblerinin AVF matürasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. MT yüklenen PLGA biyomateryalleri doku mühendisliği alanında sıklıkla tercih edilmektedir. MT ve PLGA Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı moleküller olduğundan klinik translayona oldukça uygun olduğu belirtilmektedir¹²⁻¹⁴. Bunun yanında MT'nin anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikleri birçok patogenezin tedavisinde, tedaviyi güçlendiren nitelik kazandırmaktadır¹⁵. Öte yandan PLGA'nın da hücrelerin ekstraselüler matriksini taklit eden özelliği bu sinerjiyi güçlendirmekte ve deneysel çalışmalarda çeşitli olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır¹⁶.

MT, tüm hücre kompartmanlarının etkilerini göstermesine izin veren hidrofilik bir yapıya sahip, epifizden salgılanan bir hormondur. MT antioksidan ve anti-enflamatuvar etkileri iyi bilinmektedir^{17,18}. Ayrıca, MT'nin iNOS ve eNOS sentezini azaltarak ve anjiyogenezi artırarak kardiyovasküler sistem üzerinde iyileştirici etkileri vardır¹⁹. MT'nin kontrollü salım çalışmaları son yıllarda önem kazanmıştır¹⁵. Bunların nedenleri arasında MT'nin oral veya paranteral kullanımının karaciğerden

ilk geçişte etkisini sınırlaması ve yeterli biyoyararlanım elde edilememesi gösterilebilir²⁰.

MT yüklü PLGA nanoliflerinin uygulandığı deneysel abdominal adezyon modelinde, MT yüklü nanoliflerin erken dönemde adezyonu önlediğini, enflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve fibrozisi azalttığı belirtilmiştir²¹. Radyasyonla indüklenen akciğer hasarı üzerine MT yüklü PLGA nanopartiküllerinin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise ratlarda akciğer enflamasyonunu ve apoptozisi azalttığı belirtilmiştir²². Karbon tetraklorid ile indüklenen karaciğer hasarı üzerine MT yüklü PLGA biyomateryallerinin uygulandığı deneysel *in vivo* bir çalışmada, MT'nin karaciğer üzerine koruyucu etkiler gösterdiği, toksisitenin oluşturduğu olumsuz etkileri azalttığı görülmüştür²³.

Bu çalışmada MT'nin, AVF oluşturulan anastomoz bölgesine kontrollü salım uygulaması ile AVF'nin matürasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, MT yüklü PLGA'nın AVF bölgesine lokal olarak kontrollü salımına ilişkin ilk çalışmadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Biyomateryal Üretimi

PLGA Nanoliflerin Üretilmesi

Optimum biyolojik bozunmayı elde etmek için PLGA nanoliflerini optimize etmek üzere PEG6000 kullanılmıştır. Bu amaçla, nanolifler 0,8 mL/saat akış hızı, 20 cm mesafe ve 20 kV voltajda elektrospinning ile geliştirilmiştir²¹. Bu amaçla kullanılan elektrospinning yöntemi hazırlanan solüsyonun bir enjektör yardımı ile Taylor Konisi olarak bilinen toplayıcı bir yüzeye püskürtülmesi ve kalınlığı yaklaşık 1 mm'den az olan nanolif membranlar elde edilmesini sağlayan yöntemdir²⁴. Tüm hazırlama prosedürleri MT ağırlık kaybını önlemek için kırmızı ışık altında gerçekleştirilmiştir.

MT Yüklü PLGA Nanoliflerinin Üretilmesi

Nanoliflere yüklenen MT dozu PLGA nanoliflerinin ağırlıkça %50'si MT olacak şekilde başlanmış ve homojen lif dağılımı elde edilinceye kadar sürdürülmüştür. Nihai bileşim içerisindeki MT dozu sıçanlara uygulanacak olan 1x3 cm şeklindeki dikdörtgen materyalde 1 mg MT olacak şekilde optimize edildi.

MT Yüklü Nanoliflerin Biyobozunum Profilinin Belirlenmesi

MT yüklü PLGA nanoliflerin biyobozunumu erken dönemde AVF matürasyonu sağlamak üzere 28 günde en az %90 biyobozunuma uğrayacak şekilde optimize edildi. Bu amaçla hazırlanan MT yüklü PLGA nanolifleri öncelikle 10 mL fosfat tamponlu salin (PBS) (0,1M, pH 7,4) içinde inkübe edildi. Biyobozunum eğrisinin çizdirilmesi için materyal 30 güne kadar

takip edildi. Her 3 saatte bir PBS yeni solüsyon ile değiştirildi. Tüm numuneler 24 saatte bir tartılmış ve ağırlık kaybı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır²⁵.

İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi

İlaç salım değerlendirmesi için, MT yüklü PLGA nanofiberler 50 mL pH 7.4 PBS'ye maruz bırakılmıştır. MT salınımı 300-190 nm dalga boyunda UV spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile 3 saatlik periyotlarla takip edilmiştir²⁶.

In vivo Deneyler

Hayvan Materyali

Tüm deneysel çalışmalar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (karar no: 2022/01-03, tarih: 21.01.2022) onay alınmıştır. Bu çalışmada 18 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan (3-4 aylık; 250-300 g) kullanılmıştır. Sıçanlar 22±2 °C, 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde barındırıldı. Sıçanlar ad-libitum ile beslendi ve suya serbest erişimleri sağlandı. Tüm prosedürler "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımına İlişkin Kılavuz" a uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar aşağıdaki gibi rastgele üç gruba (n=6) ayrılmıştır;

Sham (n=6): Karotis arter ile jugular ven arasında AVF modeli oluşturuldu. Cerrahi bölge ve anastomoz hattı 100 IU/mL heparin ile yıkandı.

PLGA (n=6): Karotis arter ile jugular ven arasında AVF modeli oluşturulduktan sonra. Cerrahi alan ve anastomoz hattı 100 IU/mL heparin ile yıkandıktan sonra anastomoz bölgesi saf PLGA matriks ile kaplandı.

MT/PLGA: (n=6): Karotis arter ile jugular ven arasında AVF modeli oluşturulduktan sonra. Cerrahi bölge ve anastomoz hattı 100 IU/mL heparin ile yıkandıktan sonra anastomoz bölgesi saf MT/PLGA matriks ile kaplandı.

Cerrahi Prosedür

AVF daha önce tarif edildiği şekilde oluşturulmuştur²⁷. Kısaca, tüm sıçanlar intraperitoneal yoldan ketamin (70 mg/kg) ve ksilazin (7 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezide alındı. Boyun derisi tıraş edildikten sonra sağ boyunda bir insizyon yapıldı. Submandibular doku ve kaslar klemplendi ve juguler ven görüldü. Masif kanamayı önlemek için tüm damar dalları 6.0 prolisütür ile bağlandı. Daha sonra juguler ven 100 IU/mL heparin içeren serum fizyolojik ile yıkandı. Tüm ameliyat loop gözlük ile yapıldı. Daha sonra karotis arter diseke edildi ve klemplendi. Karotis arterin orta noktasından minimal bir insizyon yapıldı ve ardından jugular ven ucu ile birleştirildi ve 8.0 prolisütür ile dikildi. Kan akışı intravasküler kanül ile gözlemlendi. Biyomateryal grubunda anastomoz etrafına 1x3 cm'lik dikdörtgen şeklinde membranlar kaplandı (Şekil 1). AVF

modeli Sham grubunda da oluşturuldu ancak herhangi bir biyomateryal verilmedi. Tüm sıçanlar daha sonra derlenmeye alındı ve hipovolemik şoku önlemek için %0,9 NaCl uygulandı.

Deneyin 28. gününde, tüm sıçanlar genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Anastomoz hatları histopatolojik analiz için hemen toplandı ve analize kadar %10 tamponlu formaldehit içinde tutuldu.

İstatistiksel Analiz

Histopatolojik Analiz

Ötenazi sonrası genel anestezi altında elde edilen AVF bölgesi örnekleri paraformaldehit içinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra gece boyunca su altında yıkandı ve artan alkol serilerine maruz bırakıldı. Son olarak, örnekler şeffaflık için 3 kez tolüen ile yıkandı ve parafine gömüldü (Slee, MPS, Mainz, Almanya). Parafin bloklardan 4 µm'lik kesitler alındı ve kit protokolüne göre hematoksilin-eozin boyama ile boyandı. Boyanan slaytlar Olympus BX40 (Olympus, Japonya) mikroskobu ile vasküler proliferasyon, fibroblastik hücre çoğalması ve fibrozis parametreleri açısından (0=yok, 1=az, 2=orta, 3=çok) gruplara kör bir araştırmacı tarafından değerlendirildi²⁸. Vasküler proliferasyon ve fibroblastik hücre skorları birlikte matürasyon skoru olarak kabul edilerek istatistiksel değerlendirmeye alındı.

Elde edilen veriler SPSS 24.0 paket programı kapsamında analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis, iki grup karşılaştırmalar ise post-hoc Tukey HSD testleri ile belirlendi. İstatistiksel anlam $p<0,05$ olarak kabul edildi. Veriler (ortalama $\pm$ standart sapma) ile özetlendi.

BULGULAR

Çalışma bulgularımız materyal karakterizasyonunu ve *in vivo* sıçanlardan elde edilen AVF anastomoz hattında

gerçekleştirilen doku analizleri sonuçlarını kapsamaktadır. Tüm çalışma boyunca sıçan kaybı olmamıştır.

In vitro ve *in vivo* Biyobozunma Bulguları

In vitro biyolojik bozunma, analizin 28. gününde yaklaşık %85-90 oranında tamamlanmıştır. *In vivo* makroskopik gözlem ile, PLGA grubundan 2 hayvanda implante edilen biyomateryalin tamamen bozulmadığı görülmüştür.

In vitro İlaç Salım Profili Bulguları

In vitro ilaç salım analizine göre PLGA ve MT, 220 nm dalga boyunda neredeyse aynı zaman noktasında salınmıştır.

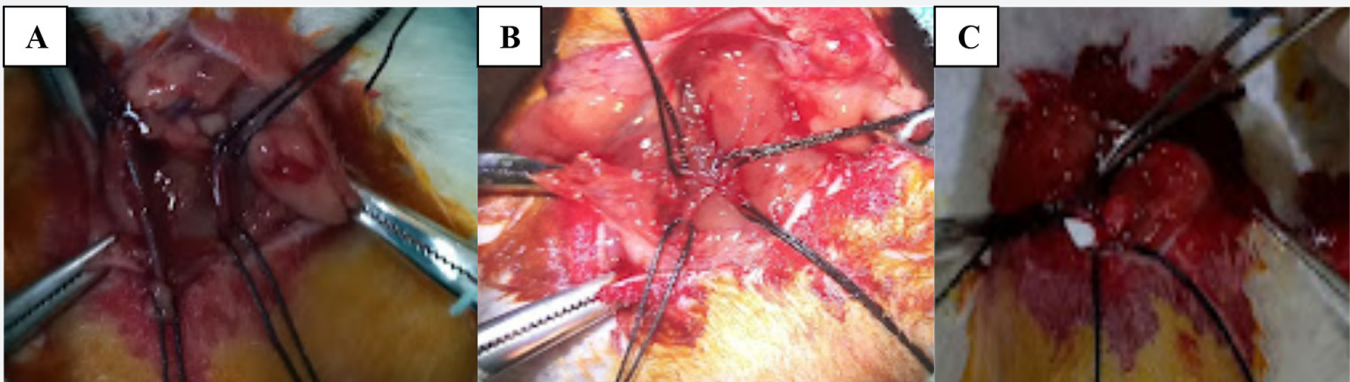
Hematoksilen-eozin Boyama Bulguları

Hematoksilen-eozin boyama sonuçları ile vasküler proliferasyon ve fibroblastik hücre çoğalması parametreleri matürasyon düzeyi olarak değerlendirildi. Yapılan histopatolojik skorlamaya göre MT/PLGA ($3,67\pm0,25$) grubunda Sham grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış belirlendi ($p<0,05$). Öte yandan MT/PLGA grubu ile PLGA ($3,16\pm0,65$) grubu arasında anlamlı bir farklılık mevcut değildi ($p>0,05$). Bununla beraber Sham ($2,4\pm0,4$) ve PLGA grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 2 ve 3). Bu incelemelere ait veriler Tablo 1'de verildiği şekildedir.

Histopatolojik olarak incelenen diğer bir parametre ise fibrozisti. Elde edilen sonuçlara göre MT/PLGA ($1,25\pm0,25$), PLGA ($0,83\pm0,40$) ve Sham ($0,2\pm0,2$) grupları arasında fibrozis açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

TARTIŞMA

İşlevsel bir vasküler erişim, terminal dönem KBH yaşam çizgisidir. Bu amaçla yaygın olarak bir arter ve ven bileşkesi oluşturularak AVF anastomozları kullanılmaktadır. Bununla birlikte AVF'lerin hemodiyaliz öncesi ve sonrası başarısız olma eğilimi kalıcı bir vasküler erişimin sağlanmasını olanaksız kılmaktadır²⁹. Vasküler



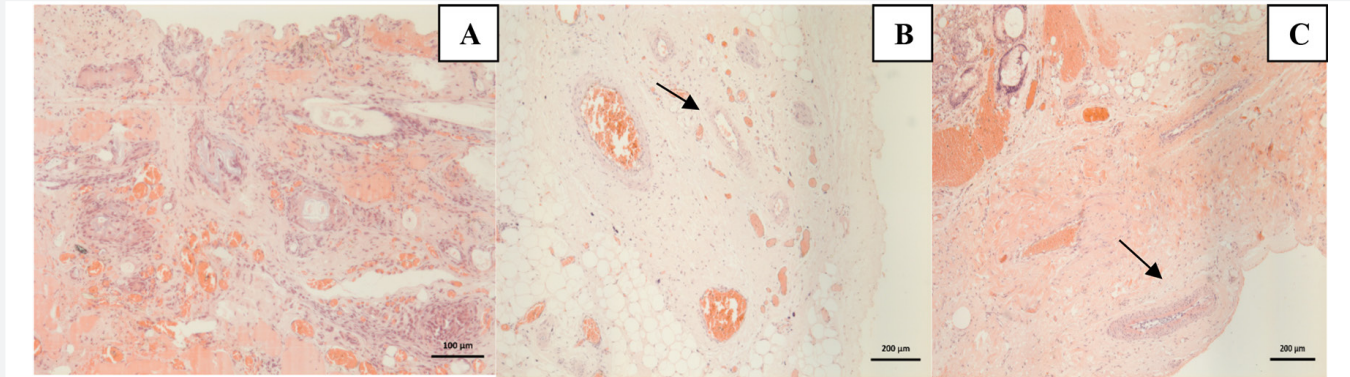
Şekil 1. Cerrahi prosedürün gerçekleştirilmesi. (A) Juguler ven ve Carotid arterin ekartasyonu (B) AVF'nin gerçekleştirilmesi, (C) biyomateryalin uygulanması

AVF: Arteriyovenöz fistül

matürasyonun gerçekleşmemesi terminal dönem böbrek hastalarının morbidite riskini önemli ölçüde artırmaktadır³⁰. Bu nedenle uzun süreli kullanılabilen ve işlevsel bir vasküler erişim sağlamak üzere yeni cerrahi yöntemlere ek olarak matürasyonun hızlı sağlanması ve kalıcılığı için destekleyici uygulamalara olan acil ihtiyacın önemi artmıştır. Bu amaçla çalışmamızda MT yüklenen PLGA nanoliflerinin AVF matürasyonu üzerine

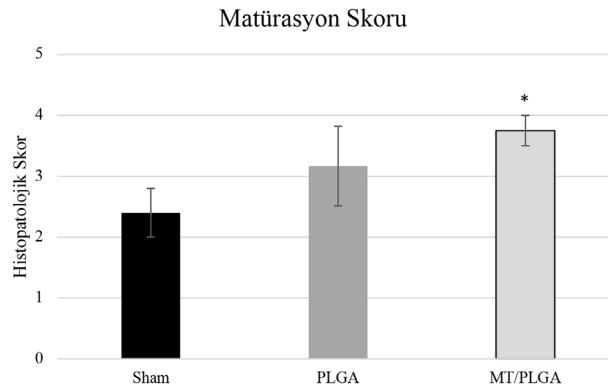
etkinliği incelenerek, başarılı ve kalıcı bir vasküler erişim için yeni bir metot geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Kontrollü salım çalışmalarında üretilen biyomateryalin patolojik mekanizmanın iyileşme sürecine uygun olarak optimize edilmesi mümkündür. Bu amaçla çeşitli sentetik veya doğal kaynaklı polimerik malzemeler kullanılmaktadır^{31,32}.



Şekil 2. Hematoksilen-eozin boyama sonuçları. Siyah oklar damarların yeniden şekillendiğini ve vasküler proliferasyonu göstermektedir (A) Sham, (B) PLGA, (C) MT/PLGA

MT/PLGA: Melatoninin/Polilaktik-ko-glikolik asit



Şekil 3. Histopatolojik değerlendirmede vasküler proliferasyonu ve fibroblastik hücre çoğalması değerlendirmelerine bağlı yapılan matürasyon skorunun istatistiksel grafik gösterimi (*p<0,05)

MT/PLGA: Melatoninin/Polilaktik-ko-glikolik asit

Tablo 1. Gruplara göre matürasyonu skoru ve fibrozis değerlendirmesi

Sham			PLGA			MT/PLGA		
Sıçan no	Matürasyon skoru	Fibrozis	Sıçan no	Matürasyon skoru	Fibrozis	Sıçan no	Matürasyon skoru	Fibrozis
1	1	0	1	3	0	1	4	1
2	2	0	2	3	0	2	3	1
3	2	1	3	1	2	3	4	1
4	0	1	4	2	0	4	4	1
5	2	1	5	1	0	5	3	2
6	1	0	6	3	2	6	4	1

MT/PLGA: Melatoninin/Polilaktik-ko-glikolik asit

Son yıllarda doku mühendisliği alanında geliştirilen biyomateryaller ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere deneysel süreçleri başarı ile tamamlayan biyomateryaller bulunmaktadır. Bunlar arasında sentetik biyomateryaller immünojenite göstermemelerinden dolayı daha çok tercih edilir olmuştur. Bunlar arasında PLGA, biyouyumlu, biyobozunur ve ekstraselüler matriksi taklit edebilme yeteneği, diğer doğal ve sentetik polimerlere oranla daha yüksek olması dolayısı ile daha çok tercih edilmektedir³³. PLGA, FDA onaylı polimerik bir malzemedir ve biyouyumluluk, biyobozunurluk ve ekstraselüler matriks taklit etme özelliklerine bağlı olarak doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılan sentetik bir polimer türüdür³⁴. PLGA antiadeziv etkiler sağlar ve birkaç farklı molekül ve ajanın yüklenmesi için iyi bir seçimdir³⁵. PLGA nanoliflerinin biyolojik bozunması, spesifik doku iyileşmesinin gereksinimlerine göre optimize edilebilir³⁶⁻³⁸. Çalışmamızda PLGA nanoliflerin örtücü membran şeklinde bir yapıya sahip olacak şekilde geliştirilmesini amaçladık. Bu amaçla AVF matürasyonu ve vasküler proliferasyonun sağlanması için MT içeren ve MT'nin kontrollü salgılanmasını sağlayan biyobozunur bir bariyer üretilerek, *in vitro* salınım ve bozunma profili ile *in vivo* etkinliği belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle PLGA nanolifler üretilerek, 1x3 cm² başına 1 mg MT içeren bir matris geliştirildi. Bu matriks üzerinde yapılan *in vitro* deneyler ile MT salınımı ve kütlesinin biyobozunumu araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalar sonucunda nanoliflerin 28. günde kütlelerinin %85-90'ını kaybettikleri ortaya konmuştur.

AVF anastomozlarının matürasyonu, vasküler onarım, neointimal hiperplazi ve enflamasyon gibi süreçlerin dahil olduğu kompleks basamakları içermektedir. Bu süreçlerde AVF'nin başarısı vasküler proliferasyon ve hızlı fibroblastik hücre çoğalmasına bağlıdır. Vasküler proliferasyon ve fibroblastik hücre çoğalması süreçleri baskılandığı durumlarda anormal vasküler remodeling görülür. Bu da primer vasküler erişim başarısızlığına yol açar³⁹. Bu nedenle vasküler proliferasyonun ve fibroblastik hücre çoğalmasının AVF anastomoz hattında sağlanması kritiktir. Çalışmamızın *in vivo* kısmında, sıçanlardan alınan doku örneklerinde hematoksilen-eozin boyama ile histopatolojik incelemeler yapıldı. Hematoksilen-eozin boyama sonuçları ile vasküler proliferasyon ve fibroblastik hücre çoğalması parametreleri matürasyon düzeyi açısından değerlendirildi. Yapılan histopatolojik skorlamaya göre MT/PLGA grubunda Sham grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış belirlendi ($p<0,05$). MT yüklü PLGA nanoliflerinden 28 gün süre ile kontrollü salımı gerçekleşen MT'nin vasküler proliferasyonu sağladığı ve fibroblastik hücre çoğalmasını artırarak, AVF matürasyonunu desteklediğini söylemek mümkündür. Yapılan çalışmalar MT'nin vasküler proliferasyonu düz kas hücrelerinin anormal çoğalmasını baskılayarak düzenlediği belirtilmiştir^{40,41}. Çalışmamızın histopatolojik bulguları MT'nin vasküler proliferasyonu AVF matürasyonu sağlamak üzere artırdığını ve

intimal hiperplaziyi de engellediğini gösterdiği düşündürmüştür. MT'nin bu etkiyi damar düz kası üzerinde nitrik oksit salımının artışı sağlayarak ve oksidatif stresi azaltarak gerçekleştirmiş olduğu muhtemeldir⁴². Fakat çalışmamızda bu yönde bir sinyal yolağı veya moleküler mekanizma incelenmemiştir.

Doku mühendisliği çalışmaları arasında güncel literatüre bakıldığında AVF anastomozlarının matürasyonunun sağlanması üzere yapılan biyomateryal çalışmalarında da kontrollü salım yapılan ajanlar intimal hiperplaziyi baskılamak ve vasküler proliferasyonu artırmak üzere kullanılmıştır. Bu çalışmalardan birinde damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) yüklü PLGA nanoliflerinin vasküler olgunluk etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, VEGF ve PDGF yüklü PLGA nanoliflerinin deneyin ilk 21 gününde vasküler olgunluğu artırdığını göstermiştir⁴³. Başka bir çalışmada farelerde subkutan damar oluşumunu incelemek üzere, anjiyojenik faktör yüklü PLGA nanolifleri farelere subkutan olarak implante edilmiştir. AVF oluşturulan sıçanlara nitrik oksit salan nano matris jel uygulaması, dışa doğru yeniden şekillenme için daha iyi sonuçlar sağlamış ve 28 günde intimal hiperplaziyi inhibe etmişti⁴⁴. Rapamisin yüklü nanofibröz membranlar, AVF anastomozu yapılan bir hayvan modelinde materyalin olgunlaşma etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Dört hafta sonra anastomoz bölgeleri hasat edilmiş ve ileri analiz için değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda rapamisin yüklü nanofibröz membranların intimal hiperplaziyi azalttığı ve AVF olgunlaşmasını kolaylaştırdığı belirtilmiştir⁴⁵. Çalışmamızdan elde edilen bulgular MT yüklü PLGA nanoliflerinin 28. günde vasküler proliferasyonu artırarak AVF matürasyonunu sağladığını söylemek mümkündür. MT'nin AVF hattında 28 gün boyunca biyouyumlu bir biyomateryal ile sürekli salınımının sağlanması anti-enflamatuvar ve antioksidan etkilerinin yanında vasküler proliferasyona katkıda bulunduğu işaret etmektedir.

Çalışmamızda MT yüklü PLGA nanoliflerinin AVF matürasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi üzere araştırılan bir başka parametre de fibrozisdi. Fibrosiz damar intimasında ekstraselüler kolajen matriksin birikimidir⁴⁶. AVF fistül matürasyonu için medial fibrozisin varlığı anastomozun başarısını ne ölçüde gösterdiği literatürde hala bir tartışma konusudur. Arteriyel fibrozisin ve venöz fibrozisin artışının AVF matürasyonunun başarısını sağladığını gösteren çalışmalar ve fibrozis artışının AVF immatürasyonuna neden olduğunu gösteren çalışma sonuçları bulunmaktadır^{47,48}. Çalışmamızda damar kesitlerinden yapılan fibrozis değerlendirmeleri açısından deney grupları arasında anlamlı bir sonuç bulunmamıştır.

Çalışmamızda MT yüklü PLGA nanoliflerini AVF hattı etrafında bir örtü malzemesi olarak kullandık. Sonuçlarımız, MT'nin yeniden şekillenmenin erken aşamalarında vasküler olgunluğu artırdığını ortaya koydu. Ayrıca, MT'nin mükemmel

antioksidan ve anti-enflamatuvar özellikleri ile cerrahi bölgede ve anastomoz hattında oksidatif ve enflamatuvar hasarları önleyerek matürasyona katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. PLGA'nın vasküler doku mühendisliğinde farklı ajanların yüklenmesi için iyi bir seçenek olduğu görülmektedir.

Özetle, projemizde geliştirilen MT yüklü PLGA biyomateryalinin hem makroskopik hem de mikroskopik düzeyde vasküler proliferasyon sağlayarak 28. günde AVF olgunlaşmasını başlattığı gözlenmiştir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızda biyomateryal üretimi, optimizasyonu yapılarak, *in vivo* deneyler ile üretilen biyomateryalin AVF matürasyonu üzerine etkinliğini incelenmiştir. Çalışmamızda sadece anastomoz hattından elde edilen dokudan histopatolojik analiz yapılmıştır. Bununla birlikte MT'nin hangi moleküler sinyal mekanizması ile bu etkileri ortaya koyduğu belirlenmemiştir.

SONUÇ

Ayrıca MT yüklü PLGA nanofiblerinin bozunumu sonrasında biyolojik bozunum sadece makroskopik olarak belirlenmiştir. Daha ileri araştırmalar ve deney planlaması ile bu kısıtlılıkların ortadan kaldırılması hedeflenmektedir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik onay Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (karar no: 2022/01-03, tarih: 21.01.2022) alınmıştır.

Hasta Onayı: Tüm prosedürler Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımına İlişkin Kılavuz' a uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Dipnot

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: D.A., S.Ş., C.A., S.A., M.U.J., Konsept: A.O., S.S., Dizayn: A.O., D.A., Veri Toplama veya İşleme: S.S., D.A., C.A., Analiz veya Yorumlama: Ö.Y., C.A., Literatür Arama: D.A., Yazan: D.A.

Çıkar Çatışması: Yazarların beyan edecek herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneyel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından THD-2022-3967 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Turner JM, Bauer C, Abramowitz MK, Melamed ML, Hostetter TH. Treatment of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;81:351-62.

- Carminatti M, Tedesco-Silva H, Silva Fernandes NM, Sanders-Pinheiro H. Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: a focus on traditional risk factors. *Nephrology (Carlton).* 2019;24:141-7.
- Jadoul M, Aoun M, Masimango Imani M. The major global burden of chronic kidney disease. *Lancet Glob Health.* 2024;12:e342-e343.
- Manov JJ, Mohan PP, Vazquez-Padron R. Arteriovenous fistulas for hemodialysis: brief review and current problems. *J Vasc Access.* 2022;23:839-846.
- Fila B, Ibeas J, Tey RR, Lovčić V, Zibar L. Arteriovenous fistula for haemodialysis: the role of surgical experience and vascular access education. *Nefrologia.* 2016;3689-94.
- Farrington CA, Cutter G, Allon M. Arteriovenous fistula nonmaturation: what's the immune system got to do with it? *Kidney360.* 2021;2:1743.
- Sabiu G, Gallieni M. Pathophysiology of arteriovenous fistula maturation and nonmaturation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2022;18:8.
- Gameiro J, Ibeas J. Factors affecting arteriovenous fistula dysfunction: a narrative review. *J Vasc Access.* 2020;21:134-47.
- Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology.* 2003;12:271-6.
- Han J, Lazarovici P, Pomerantz C, Chen X, Wei Y, Lelkes PI. Co-electrospun blends of PLGA, gelatin, and elastin as potential nonthrombogenic scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomacromolecules.* 2011;12:399-408.
- Jeong SI, Kim SY, Cho SK, Chong MS, Kim KS, Kim H, et al. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials.* 2007;28:1115-22.
- Gökçe ON, Aykora D, Danışman M, Demircan N, Ermiş H, Gürbüz M. Development of melatonin-embedded PLGA-PEG6000 nanofiber biomaterial, and investigation of the effects on abdominal adhesion formation. 2023;39:63-75.
- Lv N, Hou M, Deng L, Hua X, Zhou X, Liu H, et al. A sponge-like nanofiber melatonin-loaded scaffold accelerates vascularized bone regeneration via improving mitochondrial energy metabolism. *Mater Today Bio.* 2024;26:101078.
- Wang S, Li J, He Y, Ran Y, Lu B, Gao J, et al. Protective effect of melatonin entrapped PLGA nanoparticles on radiation-induced lung injury through the miR-21/TGF-β1/Smad3 pathway. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;602:120584.
- Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mihanfar A, Yousefi B, Majidinia M. Nanotechnology-based advances in the efficient delivery of melatonin. *Cancer Cell Int.* 2022;22:1-11.
- Guzmán-Soria A, Moreno-Serna V, Canales DA, Garcia-Herrera C, Zapata PA, Orihuela PA. Effect of Electrospun PLGA/Collagen scaffolds on cell adhesion, viability, and collagen release: potential applications in tissue engineering. *Polymers.* 2023;15:1079.
- Lee S, Kim HJ, Cho HB, Kim HR, Lee S, Park JI, et al. Melatonin loaded PLGA nanoparticles effectively ameliorate the in vitro maturation of deteriorated oocytes and the cryoprotective abilities during vitrification process. *Biomater Sci.* 2023;11:2912-23.
- Jarrar H, Çetin Altındal D, Gümüşderelioğlu M. Effect of melatonin/BMP-2 co-delivery scaffolds on the osteoclast activity. *J Mater Sci Mater Med.* 2021;32.
- Mendes L, Queiroz M, Sena CM. Melatonin and vascular function. *Antioxidants.* 2024;13:747.
- Ait Abdellah S, Gal C, Guinobert I, Bardot V, Raverot V, Vitacca A, et al. Melatonin bioavailability after oral administration of a new delayed-release form in healthy male volunteers. *Drugs R D.* 2024;24:415-23.
- Gökçe ON, Aykora D, Danışman M, Demir U, Aydeğer C, Suner SC, et al. Development of melatonin-embedded PLGA-PEG6000 nanofiber biomaterial, and investigation of the effects on abdominal adhesion formation. *J Bioact Compat Polym.* 2023;39:63-75.
- Wang S, Li J, He Y, Ran Y, Lu B, Gao J, et al. Protective effect of melatonin entrapped PLGA nanoparticles on radiation-induced lung injury through the miR-21/TGF-β1/Smad3 pathway. *Int J Pharm.* 2021;602:120584.

23. Farid A, Michael V, Safwat G. Melatonin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles reduce inflammation, inhibit apoptosis and protect rat's liver from the hazardous effects of CCL4. *Sci Rep.* 2023;13:16424.
24. Das SK, Chakraborty S, Naskar S, Rajabalaya R. Techniques and methods used for the fabrication of bionanocomposites. *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Published online. 2021:17-43.
25. Ramchandani M, Pankaskie M, Robinson D. The influence of manufacturing procedure on the degradation of poly(lactide-co-glycolide) 85:15 and 50:50 implants. *Journal of Controlled Release.* 1997;43:161-73.
26. Jusu SM, Obayemi JD, Salifu AA, Nwazojie CC, Uzonwanne V, Odusanya OS, et al. Drug-encapsulated blend of PLGA-PEG microspheres: in vitro and in vivo study of the effects of localized/targeted drug delivery on the treatment of triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2020;10:1-23.
27. Zheng C, Zhou Y, Huang C, Zhang Z, Liu Y, Xu Y. Establishment of a rat autogenous arteriovenous fistula model following 5/6 nephrectomy. *Exp Ther Med.* 2015;10:219-24.
28. Alpers CE, Imrey PB, Hudkins KL, Wietecha TA, Radeva M, Allon M, et al. Histopathology of veins obtained at hemodialysis arteriovenous fistula creation surgery. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:3076-88.
29. Applewhite B, Andreopoulos F, Vazquez-Padron RI. Periadventitial biomaterials to improve arteriovenous fistula and graft outcomes. *J Vasc Access.* 2024;25:713-27.
30. Vazquez-Padron RI, Duque JC, Tabbara M, Salman LH, Martinez L. Intimal hyperplasia and arteriovenous fistula failure: looking beyond size differences. *Kidney360.* 2021;2:1360.
31. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2013;42:323.
32. Hines DJ, Kaplan DL. Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2013;30:257-76.
33. Liu S, Yu JM, Gan YC, Qiu XZ, Gao ZC, Wang H, et al. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. *Military Med Res.* 2023;10:1-30.
34. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15:3640-59.
35. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:517-35.
36. Wang B, Lu G, Song K, Chen A, Xing H, Wu J, et al. PLGA-based electrospun nanofibers loaded with dual bioactive agent loaded scaffold as a potential wound dressing material. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2023;231:113570.
37. Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials.* 2009;30:4325.
38. Kim MJ, Kim JH, Yi G, Lim SH, Hong YS, Chung DJ. In vitro and in vivo application of PLGA nanofiber for artificial blood vessel. *Macromol Res.* 2008;16:345-52.
39. Siddiqui MA, Ashraff S, Santos D, Carline T. An overview of AVF maturation and endothelial dysfunction in an advanced renal failure. *Ren Replace Ther.* 2017;3:1-6.
40. Hyun BK, Kim MK, Park KG. Melatonin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis through upregulation of Sestrin2. *Endocrine Abstracts.* 2020;70.
41. Lv D, Cui PL, Yao SW, Xu YQ, Yang ZX. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. *Chin J Cancer Res.* 2012;24:310.
42. Mendes L, Queiroz M, Sena CM. Melatonin and vascular function. *Antioxidants.* 2024;13:747.
43. Del Vento F, Poels J, Vermeulen M, Ucakar B, Giudice MG, Kanbar M, et al. Accelerated and improved vascular maturity after transplantation of testicular tissue in hydrogels supplemented with VEGF- and PDGF-loaded nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2021;22:5779.
44. Somarathna M, Hwang PT, Millican RC, Alexander GC, Isayeva-Waldrop T, Sherwood JA, et al. Nitric oxide releasing nanomatrix gel treatment inhibits venous intimal hyperplasia and improves vascular remodeling in a rodent arteriovenous fistula. *Biomaterials.* 2022;280:121254.
45. Rong D, Wang T, Liu X, Pan X. The study of rapamycin nanofibrous membrane for preventing arteriovenous fistula stenosis. *Mater Des.* 2024;245:113297.
46. Shiu YT, Litovsky SH, Cheung AK, Pike DB, Tey JCS, Zhang Y, et al. Preoperative vascular medial fibrosis and arteriovenous fistula development. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11:1615-23.
47. Martinez L, Duque JC, Tabbara M, Paez A, Selman G, Hernandez DR, et al. Fibrotic venous remodeling and nonmaturation of arteriovenous fistulas. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29:1030-40.
48. Allon M, Litovsky S, Young CJ, Deierhoi MH, Goodman J, Hanaway M et al. Medial fibrosis, vascular calcification, intimal hyperplasia, and arteriovenous fistula maturation. *Am J Kidney Dis.* 2011;58:437-43.