

Bukadherenser – ett stort kliniskt problem

I samband med kirurgveckan i Göteborg mottog Bobby Tingstedt det prestigefyllda Ihre-stipendiet för sitt forskningsarbete gällande uppkomst, prevention och sjukvårdsekonomiska aspekter av bukadherenser. Stipendiaten presenterar här forskningsgruppens viktiga grundforskning med spännande klinisk applikation.



BOBBY TINGSTEDT
Lund
bobby.tingstedt@med.lu.se

Adherensens uppkomst

Postoperativa adherenser i buken är en del i en normal reaktion efter skador på bukhinnan och utvecklas efter ett inflammatoriskt svar och det efterföljande läkningsförloppet. Adherenser som bildas efter skada/inflammation/infektion är en viktig del i försvaret mot infektion då det avgränsar infektionen, minskar bakteremi och generell peritonit. Adherenserna bildas under de första 24–48 timmarna för att sedan konsolideras till fibros. Det initiala förloppet karaktäriseras av en kärlischemi i peritoneums microcirkulation vid skada (kirurgi eller annat). Detta medför att fibrinrester blir kvar på den skadade peritoneala ytan och utgör substrat för adherensbildning.

Postoperativt mycket vanligt

Upp till 95 procent av alla patienter utvecklar adherenser efter kirurgi. Hos de flesta patienter tillbakabildas de i ett läkningsförlopp men adherenserna kvarstannar hos en del patienter och fem procent kommer att utveckla kliniska problem så som ileus, infertilitet och smärta. Vidare kan dessa samman-

växningar ge problem vid kommande operationer med ökad risk för tarm-skada samt förlängd operationstid.

Adherenser – ett medicinskt problem

Vi undersökte i en retrospektiv studie hos appendektomerade patienter frekvensen postoperativa adherensproblem och kunde konstatera att drygt en procent av dessa kommer att drabbas av tunntarmsileus inom tio år efter sin appendektomi varav hälften krävde operation. Vidare noterades att ytterligare två–tre procent hade problem med subileus attacker och smärta som kunde härledas till appendektomin.

I en annan studie fokuserade vi på kostnaden för adherensproblem i en kohort med konstaterade adherenser. Där kunde vi påvisa att den enskilda sjukhuskostnaden, 67 200 kronor/patient (2007) nästan motsvarar sjukhuskostnaden, 73 450 kronor (2007), av vård för ventrikelcancer i Sverige. En samhällsekonomisk kalkyl extrapolerat till hela Sverige på detta material innefattande sjukskrivningar och produktionsbortfall visade på en

kostnad av 400–600 miljoner kronor årligen. I denna siffra finns inte infertilitetsproblematiken medräknad. I många internationella studier räknar man med att 30 procent av kvinnlig infertilitet orsakas av postoperativa adherenser.

Profylaktiska preparat

Postoperativa adherenser är således inte bara ett problem för individen och kirurgen utan orsakar också betydande kostnader nationellt. Det finns idag inga verksamma medel för att förebygga detta. På marknaden finns idag framförallt Adept® och Seprafilm®. Båda förebygger adherenser experimentellt och kliniskt men studier med kliniskt relevanta variabler som outcome kan inte påvisa någon tydlig effekt. Behovet av ett profylaktiskt preparat som kan förebygga adherenser och minska kliniskt viktiga symtom som tunntarmsobstruktion och infertilitet är alltså stort.

Kravspecifikation på profylax

I vår hypotes har vi utgått från att alla opererade patienter skall behandlas med ett antiadhesivt preparat. Det



Figur 1. Polyptid matrix i mus ackumuleras till skada vävnad. Tidigare publicerad i *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.

måste, då det ändå rör sig om en benign åkomma, vara atoxiskt, stanna kvar i bukhålan under åtminstone fem dygn, vara biologiskt nedbrytbart, inte påverka immunologiska funktioner i peritoneum negativt och kunna appliceras/fungera i kliniskt relevanta situationer såsom vid anläggning av anastomos, blödning eller infektion.

Teoretiskt resonemang som grund

Vi började arbeta med olikkladdade polypeptider, långa aminokedjor som är elektrostatiskt laddade. Teorin baserades på att vi skulle binda in dessa till skadad peritoneal vävnad eller submesotelial vävnad som oftast är negativt laddad. En första positivt laddad polypeptid administreras då och binder in till skadad vävnad. Kort därefter ges en negativt laddad polypeptid som med den första positivt laddade polypeptiden skapar ett matrix vilket skulle fungera som en barriär mot adherensbildning.

Första laboratorietesten

I de första pilotstudierna, där olikkladdade polypeptider och glykoprotei-

ner användes, noterades att den bästa effekten erhöles då man kombinerade polylysin och polyglutamat. Polypeptid matrix ackumulerade till skadad vävnad (Figur1). De anti-adhesiva resultat som erhöles var kraftigt signifikant bättre än både kontroller med natriumklorid och hyaluronsyra. Hyaluronsyra ingår som del i vissa existerande preparat på marknaden. Denna kombination med polylysin och polyglutamat undersöktes sedan experimentellt under omständigheter som skulle likna en klinisk vardag i syfte att visa att inga negativa effekter erhöles.

Dubbel positiv effekt av polypeptiden

Kombinationen polylysin och polyglutamat testades vid tarm anastomoser (administrerat på serosan), blödning och peritonit på råttor och mus. Inga negativa effekter kunde ses utan tvärtom sågs additiva positiva effekter då kombinationen noterades stärka anastomoserna, mätt som "burst pressure", tidigt i läkningsförloppet (första

tre dagarna). Vi kunde också se att i blödningsmodellen minskade blödningen signifikant efter behandling med polylysin-polyglutamat (Figur 2a och 2b). I den peritonit modell vi använde kunde vi notera att mindre hål på tarm täcktes med polypeptid matrix och den generella peritoniten var mindre utbredd. Histologisk utvärdering noterade en minskad mängd inflammatoriska celler men också kollagen inlagring hos behandlade djur. Detta kan vara ett indirekt tecken på minskat inflammatoriskt exsudat till följd av att den skadade ytan täcktes av matrix. Långtidsuppföljning, åtta samt 20 veckor, visade histologiskt inga tecken till defekt läkning i dessa försök (Figur 3). Således noterades det i denna rad av djurförsök effekter som kan tolkas som att polypeptid matrixet assisterar vid läkning samt, i alla försöken, också signifikant minskad adherensbildning.

Biologiska försök

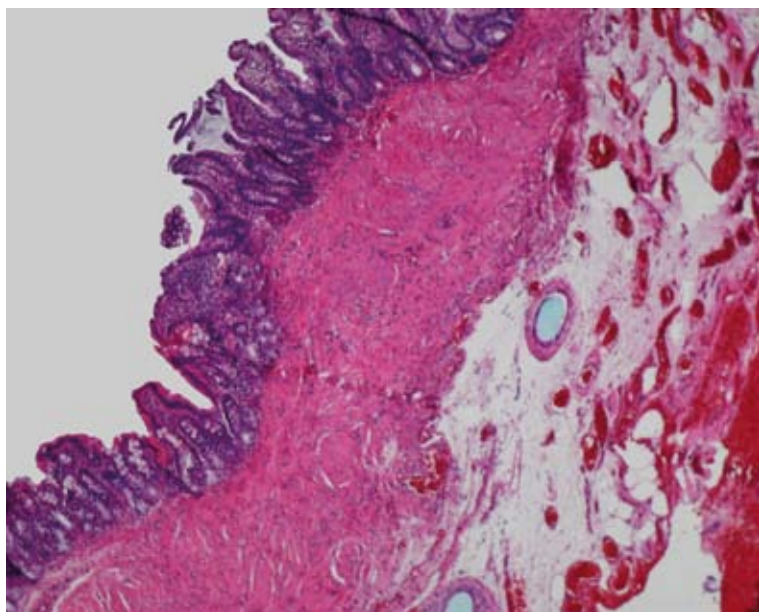
Nästa steg i utvecklingen av olikkladdade polypeptider som antiadherensprofylax var att utvärdera den toxiska effekten av behandlingen. Först testades huruvida den immunologiska funktionen var påverkad. Peritoneala makrofager visade ingen påverkan på överlevnad eller funktion vid flödescytometri och Picks test för peroxidproduktion. Makrofagerna var däremot fyllda med rester av polypeptid matrix vilket noterades i mikroskop. Flourescentmikroskopi och elektronmikroskopi utfördes också vilken bevisade att polypeptidmatrixet verkligen ackumulerades vid skadad



Figur 2a. Minskad blödning och synligt polypeptidmatrix vid blödningmodell på mus med skada på lever och mälte.



Figur 2b. Stort koagel vid mjälte på obehandlad mus. Tidigare publicerad i *European Journal of Surgical Research*.



Figur 3. Lågt ileocecal anastomos på råttor efter åtta veckor. Inget synligt polypeptidmatrix. Tidigare publicerad i *International Journal of Colorectal Disease*.

yta för att efter sex dagar integreras och börja nedbrytas (Figur 4 och 5). Mesothelceller växte också snabbt över polypeptid matrixet inom någon dag vilket togs som intäkt för biokompatibilitet (figur 5). Initialt fanns de första dagarna också ett mycket tunt lager generellt i buken hos försöksdjuren men detta degraderades snabbt. Polypeptid kombinationen kunde också noteras vara helt degraderad och borta efter fyra veckor. Dessa steg visade att det inte fanns några tydliga negativa effekter på immunförsvaret och att ämnet var biologiskt nedbrytbart.

Toxicitet

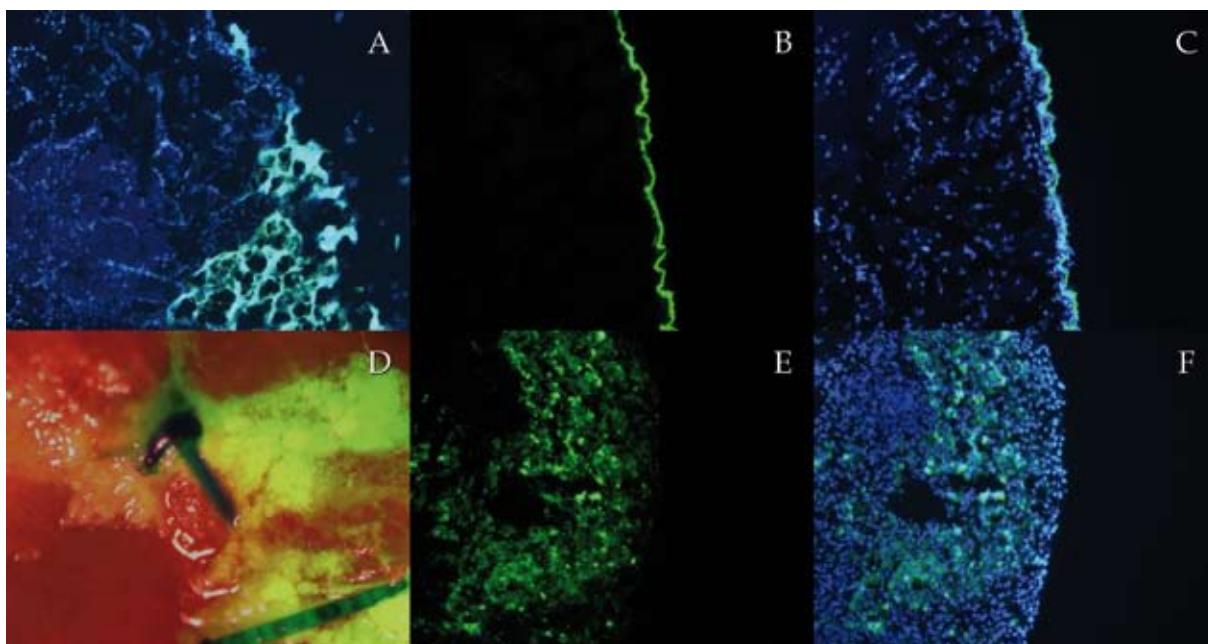
Därefter vidtogs tester för att visa på toxicitet i de ingående preparaten var för sig. Här visade polyglutamat inga tecken till toxicitet men polylysin däremot gav på mus svåra toxiska symtom med i vissa fall letal utgång. Ett stort avbräck, men en utmaning att försöka överkomma. Dos respons studier pekade på, som väntat, att effekten och toxiciteten sjönk med minskad mängd polylysin. Gapet mellan lägsta effektiva dos och lägsta toxicitetsdos blev cirka 30-falt, vilket är för litet för att accepteras. I de flesta livsmedelstoxiska studier accepteras

en 100-faldig skillnad mellan effekt och toxicitet vilket har blivit vårt riktmärke. I de studier vi utfört på mus och råttor har vi använt ganska stora doser polypeptider via installation i bukhålan. Möjligheten att applicera lokalt har varit begränsad på grund av av försöksdjurens litenhet.

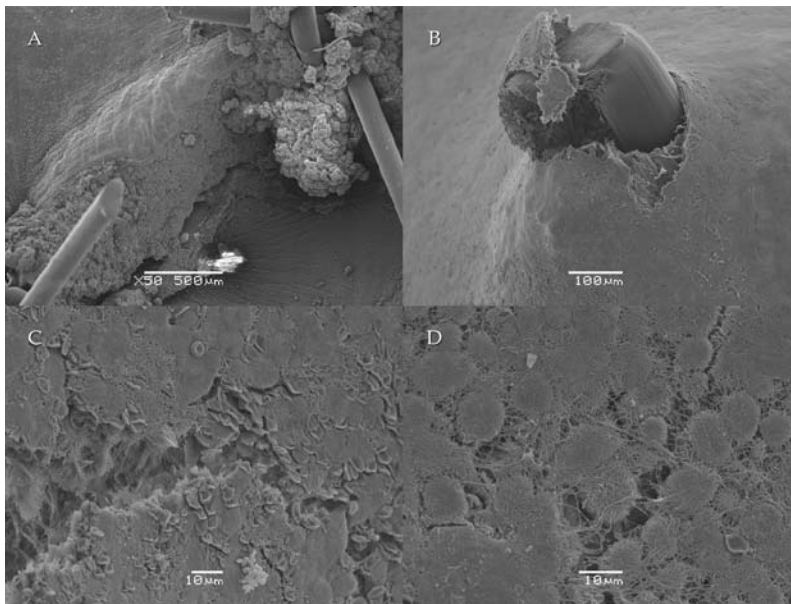
In vitro försök av polypeptiderna

Vi har i gruppen därefter parallellt arbetat med flera spår för att undkomma toxiciteten. In vitro försök på cell cytotoxicitet har genomförts för att lättare kunna se vilka polypeptider som kan vara aktuella för djurförsök. Detta har ökat vår förståelse för polypeptidernas toxicitet. Denna kan nu sägas bero på en inducerad skada på cellmembran med efterföljande lysis och anses bero på polypeptidernas storlek, konfiguration och laddningsmängd. Vi har provat fler olika positivt laddade polypeptider och glykoproteiner, ex lactoferrin, lysozym och epsilon-poly-lysin samt olika storlekar av vanligt polylysin. Resultaten talade för att epsilon polylysin är en intressant kandidat att arbeta med då den har samma effekt som vanligt polylysin men en mindre toxicitet. Detta anses bero på att epsilon har kortare sidokedjor vilken minskar den elektrostatiska interaktionen med cellmembranen.

Gruppen har samtidigt arbetat med en större djurmodell, kanin, för



Figur 4. En dag efter intraperitoneal injektion på råttor täcker FITC märkt polylysin-polyglutamat peritoneal kaviteten (A) och ses som ett tunt lager (B och C). Vanligt foto visar ansamling av fluorescerande material vid skadad yta (D). Efter sex dagar noteras överväxt av mesotel celler och begynnande integration nedbrytning. Tidigare publicerad i *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.



Figur 5. Elektron mikroskopisk bild efter intraperitoneal injektion på råttor dag 1 (A) och dag 6 (B-D). Matrixet kan ses vid artefakt (B och C) under ett kontinuerligt mesotelcells lager (D). Tidigare publicerad i *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.

att med sprayaerosol kunna applicera mindre totalmängd polypeptid. Resultaten är initialt mycket positiva och visar att mängden polypeptid som behöver appliceras via aerosol kraftigt har kunnat reducerats, och vi har nu en 100-faldig skillnad mellan toxicitet och effekt.

Kan minska lokal inflammation

Försök har också utförts för att närmare beskriva påverkan på peritoneal läkning. I sekventiella försök har inflammatoriska markörer som TGF beta och IL6 samt markörer för fibrinolys, tPa och PAI-1, analyserats i peritoneal vätska och skadad peritoneal vävnad utförts. Dessa analyser visar en tendens till minskad inflammation men ingen signifikant skillnad och påverkan på fibrinolys. Histologiskt ser man en signifikant skillnad i antalet inflammatoriska celler och kollageninlagring lokalt vilket kan stödja teorin om att det inflammatoriska svaret är dämpat lokalt.

Konklusion

Sammanfattningsvis visar raden av våra studier på att det finns ett behov av ett kliniskt verksamt antiadhesivt preparat och att omfattningen av adherens relaterade bukproblem möjligen är undervärderat samt att den samhällsekonomiska belastningen är stor. Olikladdade polypeptider skulle kunna vara ett möjligt preparat för att profylaktiskt minska postope-

rativa adherenser. Djurstudier visar på mycket positiva resultat avseende adherens profylax på mus, råttor och kanin. Några negativa kliniska effekter kan inte ses utan tvärtom en positiv additiv effekt såsom minskad blödning och förbättrad läkning vid anastomoser och tarmperforation.

Olika laddade polypeptider anses fungera via elektrostatisk bindning till skadad peritoneal vävnad och kan i viss mån liknas vid en riktad behandling mot rätt område. Toxiciteten av en av de ingående polypeptiderna, det positivt laddade polylysinet, har kunnat minska via lokal applikation med sprayaerosol. Toxiciteten hos polylysin beror på det stora antalet laddningar hos molekylerna vilka interagerar med cellmembran.

Humanförsök

Vi hoppas inom kort kunna börja formella toxikologistudier hos ackrediterad undersökare för att därefter i en pilotstudie applicera olikladdade polypeptider som adherens profylax på människa. ■

I forskningsgruppen ingår förutom författaren; professor Roland Andersson, Lund, specialistläkare Karolin Isaksson, Lund, ST-läkare Daniel Åkerberg, Helsingborg samt Katarzyna Said och Monica Bauden-Posaric, biomedicinska analytiker vid BMC, Lund.