

Yeni Bir Hemostatik Ajan Olan Mecsina Hemostopper® 'ın Farklı Testlerle Sitotoksitesinin Değerlendirilip, Gingival Fibroblast Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması

Analyses of Effect of New Hemostatic Agent Mecsina Hemostopper® on Gingival Fibroblast Proliferation and Evaluation of Cytotoxicity by Different Tests.

Mehmet Kemal Tümer¹, Mustafa Çiçek²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye.

²Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye.

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Sağlık alanında hali hazırda aktif olarak kullanılan anti-hemorajik ajanlar farklı etki mekanizmaları kullanarak kanamayı engelleyebilir. Bu çalışmada yeni nesil bir anti-hemorajik ajan olan "Mecsina Hemostopper®"ın etki mekanizmasının, XTT (2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) sitotoksitate analiz metodu ile fibroblast hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

YÖNTEM ve GEREÇLER: Çalışma için insan gingival fibroblast ölümsüz hücre hatları ticari olarak satın alındı. Her flaska her bir farklı doz grubu için 5000 hücre olacak şekilde 9 gruba (Mecsina Hemostopper 1/1, Mecsina Hemostopper 1/2, Mecsina Hemostopper 1/10, Mecsina Hemostopper 1/50, Mecsina Hemostopper 1/100, Mecsina Hemostopper 1/200, Mecsina Hemostopper 1/500, distile su uygulanan negative ve hiçbir sey uygulanmayan kontrol) hücreler dağıtıldı. 24 saat inkübasyondan sonra her bir grup için XTT analiz yöntemi ile sitotoksitate değerleri ölçülmüştür.

BULGULAR: Mecsina Hemostopper'ın fibroblast hücresine olan etkilerinin doz grupları arasında anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,03$). %100 ve %50' lik konsantrasyonlarda en fazla ölüm görülmüşken en fazla canlılık oranı %10' luk ilaç uygulamasında görülmüştür. % 10' luk konsantrasyonun; %2, %1, %0,5 ve %0,2' lik konsantrasyondaki gruplar arasında önemli ölçüde fark bulunmuştur ($p < 0,001$). %2, %1, %0,5 ve %0,2' lik konsantrasyonlarındaki ilaç uygulamalarında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ: Bu çalışmada, yeni nesil kanama durdurucu olan mecsina hemostopper gingival fibroblast hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda farklı derecede sitotoksik değerleri olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mecsina Hemostopper, fibroblast, XTT, hemostatik ajan, kanama durduru

ABSTRACT

INTRODUCTION: In this study, the effects of the mechanism of action of "Mecsina Hemostopper®", a new generation anti-hemorrhagic agent, on fibroblast cell proliferation was investigated by using XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium) cytotoxicity assay.

METHODS: The immortalized human gingival fibroblast cell lines were commercially purchased for the study. The cells, 5000 cells per flask for each different dose group, were distributed into the 9 groups (mecsina 1/1, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, distilled water-administered negative and control without any administration). After the incubation for 24 hours, the cytotoxicity values were measured by XTT analysis technique for each group.

RESULTS: There was a significant difference in the effects of Mecsina Hemostopper on fibroblast cells between the dose groups ($p < 0,03$). The highest rate of survival was seen with 10% drug administration while the highest rate of mortality was seen at 100% and 50% concentrations. There was significant difference between the 2%, 1%, 0,5% and 0,2% concentration groups and 10% concentration ($p < 0,001$). There was no statistically significant difference between the groups in drug administrations at the concentrations of 2%, 1%, 0,5% and 0,2% ($p > 0,05$).

DISCUSSION AND CONCLUSION: This study showed that Mecsina Hemostopper has different cytotoxic levels at different concentrations in the gingival fibroblast cell lines.

Keywords: Mecsina Hemostopper, fibroblast, XTT, hemostatic agent, bleeding stopper

GİRİŞ

Tıp ve diş hekimliğinin birçok dalında gerçekleştirilen tedaviler sonrası veya sırasında, yapılan işlemin büyüklüğünden bağımsız olarak kanama komplikasyonu gelişebilir. Kanama eğilimi olan hastalarda şok ve ölümlerle sonuçlanabilecek ciddi kanamalar olabilmektedir. Kanama yatkınlığı toplumda önemli yer edinmiş sistemik rahatsızlıklardandır.¹

Sağlık alanında hali hazırda aktif olarak kullanılan anti-hemorajik ajanlar farklı etki mekanizmaları kullanarak kanamayı engelleyebilir. “*Mecina Hemostopper®*” (MH), Glycyrrhizaglabra özü, Alpiniaofficinatum, Thymusserpyllum, syzygiumaromaticum, Hypericumperforatum, vitisvinifera, Urticaangustifolia, Menthaarvensis gibi bitkisel özlü ajanlardan yapılmaktadır.

MH’in uygulandığı bölgede özellikle fibrinojene bağlanarak protein ağı oluşturduğu ve bu ağı eritrositlerin ruloformasyonu şeklinde sıralandığı, yapılan elektron mikroskop deneylerinde kanıtlanmıştır. Bu sayede hemostaza etkisi gözlemlenebilmiştir.²

Fibroblast ve osteoblastlar oral ve maksillofasiyal bölgede, diğer vücut bölgelerinde olduğu gibi yara iyileşmesinde büyük önem taşımaktadırlar.³ Fibroblastlar kollojen, elastin, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve çok yönlü yapıştırıcı glikoproteinleri sentezler. Fibroblastlar bağ dokularında en fazla bulunan hücrelerdir ve yara anjiogenezisi ile eş zamanlı olarak, yara matriksinde yerleşerek, çoğalıp hücre dışı matriks bileşenlerini sentezler ve kontrakte olabilen, fibroblast fenotipi miyofibroblastlara dönüşürler.⁴

Bu çalışmanın amacı, T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü tarafından eksternal kanamaların kontrolünde kullanılmak üzere ara ürün olarak ruhsatlandırılmış *farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MH’in oluşturduğu sitotoksiste düzeylerinin belirlenmesi* ve daha önce araştırılmamış olan fibroblast proliferasyonuna etkisinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Bu çalışmada; İnsan Gingival Fibroblast hücre hattı (Gingival Fibroblasts Cell line 2620-GFB, Sciencell) ATCC (American Type Culture Collection)’den ticari olarak satın alındı. %10 fetal dana serumu (12483012, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) içeren Dulbecco's modified eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12) besiyerinde %95 nem ve %5 karbondioksitli etüvde 37°C’de inkübe edilerek çoğaltıldı. 25 cm²lik flasklarda çoğaltılan hücreler, hücre kültür kaplarını kapladıkları

zaman %0,05 tripsin/EDTA (25200056, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) çözeltisi ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Pasajlama sırasında yeni pasajda 1:2 hücre olacak şekilde hücre aktarımı yapıldı. Kültür besiyeri pasajdan sonra her iki günde bir değiştirildi. Daha sonra Dimetilsülfoksit Dimethylsulfoxide (DMSO, sc-358801 Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ile dondurma protokolü uygulanarak stok olacak şekilde saklandı. (%0,05Tripan Blue (Sigma–Aldrich, Schnellstoff, Germany)) boyası ile boyandıktan sonra hücre sayım cihazı (Celeromics, Grenoble, France) ile canlı ölü hücre miktarı tespit edildi. Yeterli hücre sayısına ulaştıktan sonra, her flaska her bir ilaç için 5000 hücre olacak şekilde 3 gruba (ilaç, distile su uygulanan negatif, hiçbir sey uygulanmayan kontrol) hücreler dağıtıldı.

Hücre Proliferasyon Deneyi

Bu test için 96’lık plağa 10.000 hücre ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra; distile su uygulanan negatif grup, hiçbir sey uygulanmayan kontrol grubu, MH 1:1 konsantrasyon, MH 1:2 konsantrasyon, MH 1:10 konsantrasyon, MH 1:50 konsantrasyon, MH1:100 konsantrasyon, MH1:200 konsantrasyon ve MH 1:500 konsantrasyon gruplarına konsantrasyon oranlarına uygun olacak dozlarda ilaç uygulanarak hücrelerde uygun doz bulunmaya çalışılmıştır.

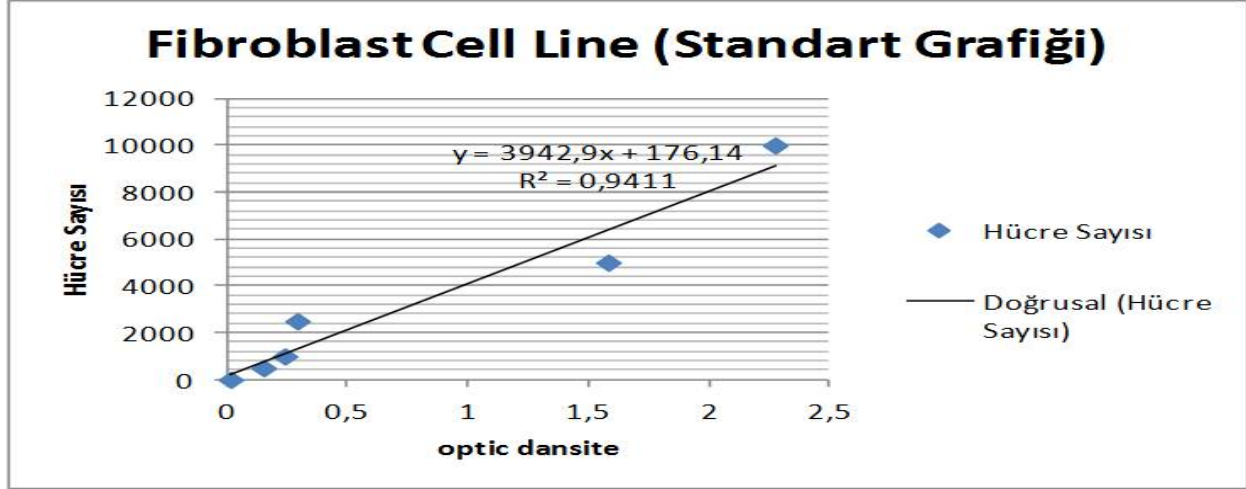
İn Vitro Sitotoksiste Deneyleri

MH uygulaması yapılan hücreler ve ortam plakalara kültürlendi. Deneyler sırasında oluşturduğumuz grupları içeren 6 kuyulu kültür kaplarında 5-10 milyon hücre üremesi takip edildi. Hedef rakama ulaşıldığında (24-48 saat) çalışma başlatıldı. Hücreler 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 5000/kuyu olacak şekilde aktarıldı. 48 saat inkübatörde hücrelerin yapışması beklendi. XTT solüsyonu ile aktivasyon solüsyonu karıştırıldı. 25 µl aktivasyon solüsyonu ile 5 mililitre XTT ajanını karıştırıp XTT’nin aktifleşmesi sağlandı. Aktif olan XTT ‘den 50 µl alınıp 100 µl kültür medium içeren hücre ile kaplı kuyulara eklendi. Hücreler 24 saat inkübatörde bekletildi. 24. Saatin sonunda 450 nanometre (nm) dalga boyunda analiz edildi ve gruplar arasında doz farklılığına bağlı olarak oluşacak sitotoksik etki araştırıldı.

İstatistiksel analizler

Muamele edilmiş hücrelerin ve muamele edilmemiş hücrelerin optik yoğunluğunun (OD) değerlerini karşılaştırmak için GraphPad Prism Sürüm 6.01’i (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) kullanarak verileri analiz etmek için tek kuyuklu T-testi kullanıldı.

İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak bildirildi. Bütün değerler bunlar Microsoft Excel Ver. 3.2013 kullanılarak ortalama \pm standart sapma (SD) olarak rapor edildi ve hesaplandı.

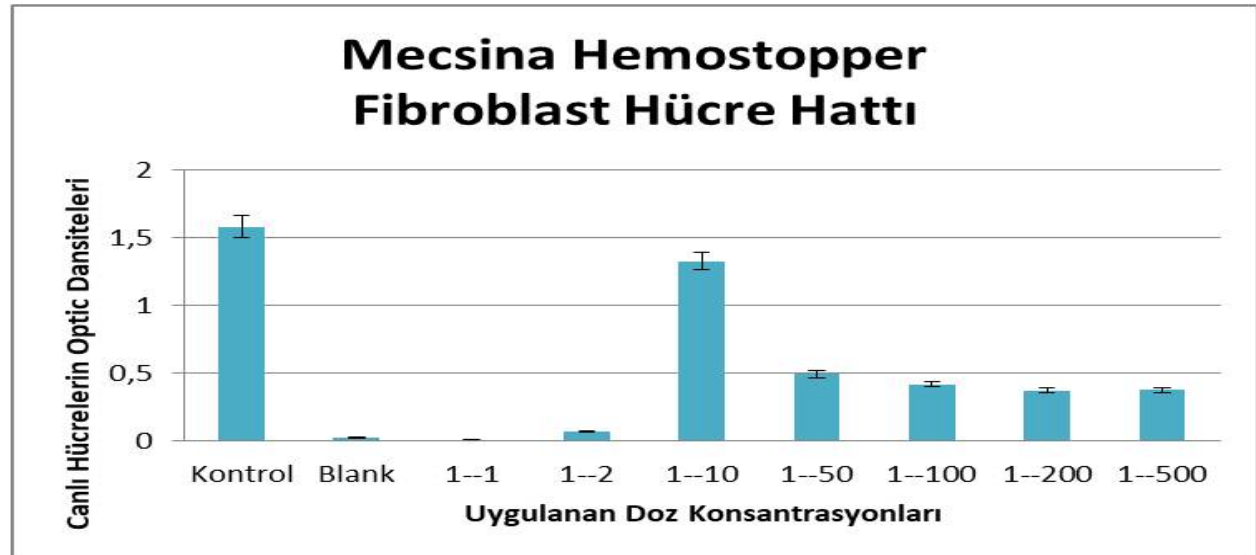


Grafik 1: Fibroblast hücre hattı standart grafiği

BULGULAR

MHH fibroblast hücre proliferasyonuna doza bağımlı etkisi analiz edildi. (Grafik 1) MH%100, %50, %10, %2, %1, %0,05, %0,02' lik konsantrasyonlardaki hücre canlılık oranları 24 saat sonunda tespit edildi. MH bu konsantrasyonlardaki inhibisyonu optik dansite değerlerine göre kontrol grubuyla kıyaslandı.(Grafik 2) MH uygulanmış olan fibroblast hücrelerinde farklı doz gruplarında gruplar arasında anlamlı farklar görülmüştür ($p < 0,03$). MH farklı konsantrasyonlarda fibroblast hücrelerine etkileri görülmüştür. %100 ve %50' lik

konsantrasyonlarda istatistiksel olarak en fazla ölüm görülmüştür. %10' luk konsantrasyonun ; %2, %1, %0,5 ve %0,2' lik konsantrasyondaki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmuştur ($p < 0,001$). En düşük canlılık düzeyi %100' lük grupta gözlemlenmiştir. %2, %1, %0,5 ve %0,2' lik konsantrasyonlarındaki gruplarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). En yüksek canlılık düzeyi %10' luk grupta gözlemlenmiştir.(Grafik 3)

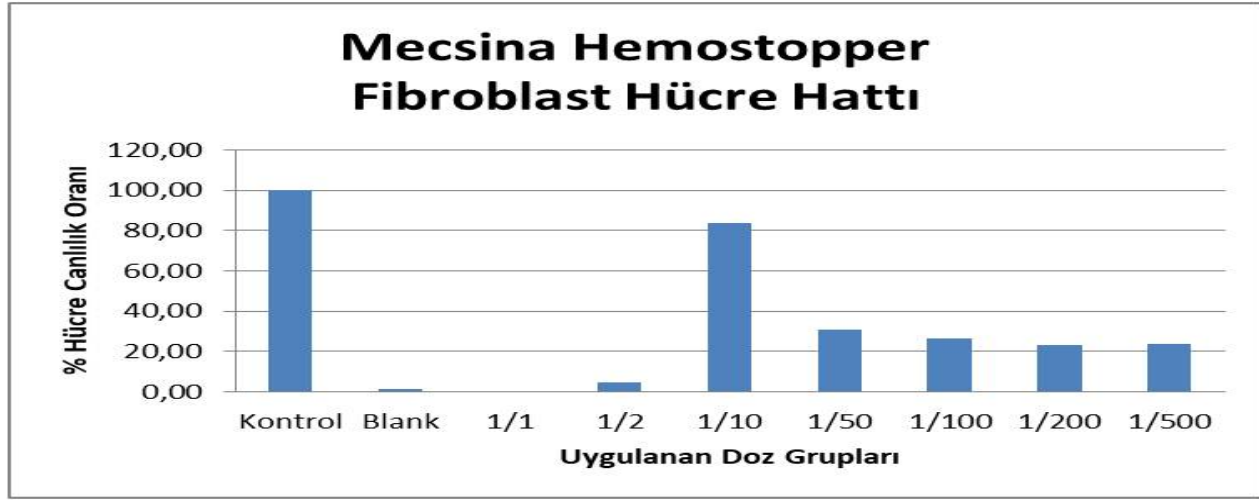


Grafik 2: Kontrol fibroblast hücrelerinin ve farklı dozlarda mec sina hemostopper uygulaması yapılmış fibroblast hücrelerinin optik dansite değerlerinin gösterimi

TARTIŞMA

Diş hekimliği uygulama prosedürlerinde birçok biyomalzeme kullanılmıştır. Tüm biyomalzemelerin biyoyumluluk oranlarının sitotoksitesinin değerlendirilmesi klinik uygulamalar için gerekli bir adımdır. İn vitro sitotoksikite testleri insan dokusunun homoloğu olan hücreler ile gerçekleştirilmelidir.⁵ Ayrıca bu testlerin basit, tekrar edilebilir, düşük maliyetli ve uygulamanın yapılacağı dokunun temel biyolojik özelliklerini değerlendirmede uygun olması gerekmektedir. Diş pulpası (damar sinir paketi bulunan kısım) temelde fibroblast ve odontoblasttan oluşan bir bağ

dokusu olup, çevresel şartlar uygun olduğunda reperatif dentin üretmektedir.⁶ Kanamanın etkili bir şekilde kontrolü tedavinin prognozunu iyileştirmek için hayati derecede önem arz etmektedir.⁷ Bu amaçla cerrahi uygulama esnasında ve sonrasında kanamayı kontrol etmek için bazı anti hemorajik ajanların kullanılması gerekmektedir.⁸ Çalışmamızda bu amaç doğrultusunda MHkanama durducu ajanın sitotoksikite açısından cerrahi uygulamalar sırasında veya sonrasında kullanıma uygunluğunu farklı dozlarda ve bu dozları da kendileri arasında değerlendirmeye çalıştık.



Grafik 3: Kontrol fibroblast hücrelerinin ve farklı dozlarda mec sina hemostopper uygulaması yapılmış fibroblast hücrelerinin hücre canlılık oranlarının % değişimleri

Cerrahi uygulamalarda kanamayı kontrol altına almak için uygulanan en bilindik yöntem steril bir pamuklu pelet yardımı ile yara yüzeyine mekanik basınç uygulamaktır. Alternatif olarak ise hidrojen peroksit, epinefrin, klorheksidin, ferrik sülfat veya sodyum hipoklorit ihtiva eden pamuklu pelet ile yara bölgesine mekanik basınç oluşturmaktır. Bunların içinden sodyum hipoklorit uygulamasının cerrahi olarak başarılı olduğu ve hemostatik bir ajan olarak kullanılması sırasında biyoyumluluk gösterdiği rapor edilmiştir.⁹ Ancak bazı hücre kültürü çalışmalarında sodyum hipokloritin düşük dozlarda bile ciddi sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.¹⁰ Benzer bir şekilde yapılan çalışmalarda ferrik sülfat solüsyonunun da sitotoksik olduğu ve dokuda nekroza neden olduğu gösterilmiştir.¹¹ Bunlara ilaveten klorheksidin diglukonatin biyoyumluluk oranı halen tam olarak belirlenememiştir.¹² Tüm bu sentetik materyallerin etkileri düşünüldüğünde, ideal bir hemostatik ajanın sitotoksikiteden arındırılmış olması, hemostaz sağlandıktan sonra kullanımına ihtiyaç kalmayan bu ajanın ortamdan kaldırılması ve

postoperatif uygulamalar sonrasında da doku için herhangi bir tehlike oluşturmaması için daha doğal bir hemostatik ajan kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamız için MH'nin muhteiyatı bizim için yeterli derecede önemli bir kriter olmakta ve biyoyumluluğunun tespiti ve sitotoksik etkisinin belirlenmesi klinik uygulamalar için hayati bir önem oluşturmaktadır.

Diş hekimliğinde en sık kullanılan hemostatik ajanlardan biri demirli sülfattır. Kan proteinlerinin aglütinasyonu, kanın ferrik ve sülfatyonlarıyla reaksiyonundan kaynaklanmaktadır.⁹ Bu ferrik iyon-protein kompleksi, kesilen damarı sızdırmaz hale getirmekte ve hemostaz üretmektedir. Bu sayede yara bölgesinde iltihaplanma ve iç rezorpsiyon olasılığını en aza indirmektedir.¹¹ Yapılan çalışmalarda Urtica Dioica bitkisinde bulunan ve kırmızı kemik hücrelerine bağlanarak onları bir araya getiren fitohemaglutininlerden olan lektin proteini, hücre yüzeyine bağlanmakta ve aglütinasyona neden olmaktadır.¹³ MH'nin içeriğinde de Urtica Dioica

bitkisinin kullanılması bize benzer mekanizmanın MH için de geçerli olduğunu düşündürmektedir.

Menezes ve ark.¹⁴ bazı hemostatik ajanların sitotoksitesini karşılaştırdıkları bir çalışmada, demir sülfatın, mineral trioksit agregat ve kalsiyum hidroksitten sırasıyla 332 ve 32 kat daha toksik olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda MH'ın insan fibroblastlarında ki sitotoksitesi XTT analizi ile değerlendirilmiştir. MH fibroblast hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda (%50' lik konsantrasyon) ciddi toksik etki göstermişken düşük doz (%10 ve % 1'lik konsantrasyonlar) uygulamalarında sitotoksik etkisine rastlanılmamıştır. MH uygulamalarından hücre canlılık oranı en yüksek seviyede olan düşük doz konsantrasyonlarda yapılmış uygulamalar olduğu tespit edilmiştir (özellikle % 10' luk MH uygulaması yapılmış konsantrasyon).

SONUÇ

XTT analizi yapılan MH yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermişken düşük dozlarda sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte MH'ın prelinik ve postoperatif evredeki uygulamalarında yanlış sonuçlardan kaçınmak için, kullanılan konsantrasyon ve maruz kalma süreci sonucunda oluşabilecek etkiyi hesaplayabilmek ve doz kontrolünün sağlanması ve takibi gerekmektedir. MH'ın klinik uygulamadaki kullanımında uygun doz miktarının belirlenebilmesi için daha fazla deneysel çalışmanın yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: 2013/103

KAYNAKLAR

- 1- Yenicesu I. Kanama Diyatezi Olan Hastaya Yaklaşım. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 2002; 11: 6-7.
- 2- Ozyurt A. Düşük enerji seviyeli lazer terapisi ve mecsina adlı hemostatik ajan kullanılarak sert doku iyileşmesinin histolojik ve morfolojik değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014, Doktora Tezi,
- 3- Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83: 1689-1707.
- 4- McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 666-671.
- 5- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, et al. Genotoxicity and Cytotoxicity of Dental Materials in Human Lymphocytes as Assessed by the Single Cell Microgel Electrophoresis (Comet) Assay. *J Dent* 2004; 32: 229-234.
- 6- Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity Testing with Three-Dimensional Cultures of Transfected Pulp-Derived Cells. *J Endod* 2001; 27: 259-265.
- 7- Schonauer C, Tessitore E, Barbagallo G, Albanese V, Moraci A. The use of local agents: bone wax, collagen, oxidized cellulose. *Eur Spine J* 2004; 13: 89-96.
- 8- Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract, Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res* 2008; 36: 163-170.
- 9- Ulus AT, Turan NN, Ozyalcın S, et al. Surgical and histopathological effects of topical Ankaferd1 hemostat on major arterial vessel injury related to elevated intra-arterial blood pressure. *Turk J Hematol* 2011; 28: 206-212.
- 10- Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, et al. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dental Materials Journal* 2011; 30: 799-805.
- 11- Doganay L, Tuncer I, Ozturk O. Instant control of fundal variceal bleeding with a folkloric medicinal plant extract: Ankaferd Blood Stopper. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 873- 875.
- 12- Karabiyik A, Yılmaz E, Gulec S, Haznedaroglu IC, Akar N. Dual diverse dynamic reversible actions of Ankaferd on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells with and without LPS. *Turk J Hematol* 2012; 29: 361-366.
- 13- Göker B, Özmen R. Sıçanlarda ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) yaprağı ile beslenmenin akut karbon tetraklorür uygulamasına bağlı gelişen karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkisi. *F. Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg* 2009; 23: 77-80.
- 14- De Menezes FS, Leite HP, Fernandez J, Benzecry SG, de Carvalho WB. Hypophosphatemia in children hospitalized within an intensive care unit. *J Intensive Care Med* 2006; 21: 235-239.

Yazışma Adresi:

Yard. Doç. Dr. Mehmet Kemal TÜMER
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ali Şevki Erek Yerleşkesi Diş Hekimliği
Fakültesi, Merkez/ Tokat
Tokat - Türkiye
Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları Cerrahisi AD
0 (356) 212 42 22
dr_kemaltumer@yahoo.com