

HEPARİN'İN İN VİTRO ORTAMDA DAMAR DÜZ KAS HÜCRE MİTOZUNA İNHİBİTÖR ETKİSİ

Berrin OKKA¹, Tahsin Murad AKTAN², Kadir İDİN³, Selçuk DUMAN²

¹Mümtaz Kuru Verem Savaş Dispanseri, Meram

²Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji ABD, KONYA

³Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, İSTANBUL

ÖZET:

Amaç: Heparin bazı klinik durumlarda kullanılmaktadır. Heparin'in in vitro ortamda damar düz kas mitozuna etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Hücre kültür laboratuvarında tavşan femoral arterinden hazırlanan damar düz kaslarının cryobank'ından (4.pasaj) çözülen hücreler kültüre alındı. 5. pasajda heparin ve sham grubu olmak üzere 4 gün uygulandı ve süre sonunda toplam hücre sayıları belirlendi. İstatistiksel karşılaştırma yapıldı. **Bulgular:** Kontrol (G1) ve heparin uygulanan (G2) düz kas hücrelerinin 5. pasaj sonunda elde edilen hücre sayılarında heparinin hücre mitozu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) inhibitör etkiye neden olduğu görüldü. **Sonuç:** Heparin damar düz kas hücrelerinde mitozu inhibe etmektedir..

Anahtar kelimeler: Damar düz kası, heparin, mitoz

Selçuk Tıp Derg 2007; 23: 7-10

SUMMARY:

The inhibitory effect of heparine on mitosis of in vitro smooth muscle cell

Aim: Heparine is used during some clinical situations. We aimed to reveal heparin's effect on vessel smooth muscle mitosis under in vitro conditions. **Material and Method:** Smooth muscle cells were obtained from the 4th passage of cryostored cell suspension prepared from rabbit femoral artery in cell culture laboratory. The 5th passage was studied as control and study group for four days by adding heparine to the medium. Final cell number was calculated and statistical comparison was done. **Results:** In the 5th passage smooth muscle cells, of control (G1) and heparin applied (G2) groups, heparin caused a statistically significant ($p<0,05$) inhibitory effect on cell mitosis. **Conclusion:** Heparin inhibits mitosis of vascular smooth muscle cells.

Key Words: Vessel smooth muscle, heparin, mitosis

Düz kas dokusu, organizmada hemen hemen tüm dokularda yer almaktadır. Özellikle arter ve venlerin media tabakasında yer alan düz kas hücreleri dolaşım sisteminin ka-

pillerler hariç, tüm hat boyunca bulunurlar. Bu hücreler sempatik sinir sisteminin denetiminde tonus özelliğine sahiptirler ve bu sayede kan akımı homeostazisinde önemli işlevle-

Haberleşme Adresi : **Dr. Berrin OKKA**

S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji A.D., KONYA

e-posta: **bataberk@hotmail.com**

Geliş Tarihi: **01.09.2006**

Yayına Kabul Tarihi: **04.10.2006**

ri bulunmaktadır (1). Bu hücrelerde ayrıca dinamik bir salgı özelliği bulunmaktadır. Bu özelliği lokal parakrin sekresyonlar, bağ dokusu yapım ve yıkımı ile değişik büyüme faktörlerinin salınımıdır. Hasara uğramış damarlarda doku tamirinde, hızlı bir mitotik aktivite dışında bu sekresyonları ile düz kasların önemli işlevleri bulunmaktadır (2).

Heparin fizyolojik şartlarda insan organizmasında mast hücreleri ve bazofil lökositlerin salgı granüllerinde bulunan glukozaminoglikan yapıda bir maddedir. Bağ dokusu mezenkimal matriksinde ve çeşitli hücrelerin dış yüzünde heparan sülfat ve dermatan sülfat şeklinde doğal olarak bulunur. Bu formların her ne kadar antikoagülan etkinliği ortaya konulmamış olsa da böyle bir potansiyellerinin varlığı kabul edilir. Heparin ayrıca organizmadaki en asidik madde olma özelliğini taşımaktadır (3). Heparinin bu şekildeki pH özelliği hücre mitozuna olumsuz etki yapabilir (4).

Yoğun bakım ünitelerinde myokard enfarktüsü, pulmoner emboli tablosuna sahip hastalarda, ayrıca hemodiyalizasyon uygulanan hastalarda heparin sıklıkla kullanılmaktadır. Amacımız heparinin damar düz kas hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerine olan etkilerini hücre kültürü yolu ile belirlemektir (5).

GEREÇ VE YÖNTEM

Cerrahi İşlem: Yeni Zelanda tipi erkek (1.860 gr ağırlığında) tavşan, subkutan ketamin (80 mg/kg) ve xylocaine (0,6 mg/kg) ile anestezi edildi. Uyluk bölgesi tüyleri tıraşlandıktan sonra iyot solüsyonu ile deri temizliği yapıldı. Deri ve altındaki bağ dokusu katları cerrahi olarak geçildikten sonra femoral arter çıkışından itibaren 3,0 cm uzunluğunca disseke edildi. Arterin açıkta kalan iki ucu sütür ile kapatıldı ve deney hayvanına antibiyotik (Penisilin 1.000.000 iu/kg) ve analjezi (Dipiron 25mg/kg) verilerek tekrar kafesine geri konuldu. Adventisya tabakası ve diğer çevre doku ile ilişkili yağlı dokular bistüri ile uzaklaştırıldı. Fosfatlı tampon çözelti (PBS) içerisine konulan doku, kültür laboratuvarına ulaştırıldı.

Laboratuvar İşlemleri: Damar biyopsi parçası, bistüri yardımı ile 7–8 küçük parçaya ayrıldı. Penisilin, Streptomisin (10 000 unit/mL, 10 000 mcg/mL) ile Amphotericin B (250 ng/ml) içeren PBS solüsyonu içerisinde 30 dakika bekletildi. Doku parçaları iki defa PBS içeren tüplerden geçirildi ve bistüri ile iyice küçük parçalara ayrıldı. Kalsiyumsuz PBS içerisine doku yıkıcı enzimler (2,5 mg/ml collagenase tip 1A (Sigma, C-9891) ile 20.000 IU/ml hyaluronidase tip VIII (Sigma, H 3757) ilave edildi ve küçük doku parçaları bu medium içerisine konuldu, ertesi sabaha kadar bu şekilde 37.0°C'lik etüvde beklendi. İşleme ertesi sabah eşit hacimde %20 Föetal İnek Serum (FCS) içeren medium ilavesi ile enzimler nötralize edilerek devam edildi, 500g'de iki defa santrifüje edildikten sonra 5.0 ml PBS ilave edildi ve 5–6 dakika otomatik el pipeti ile mekanik ajitasyon yapıldı. Bu şekilde damar düz kas hücreleri tek hücre süspansiyonu haline geldi. Hücreler %20 FCS DMEM (Sigma D 6421) içeren 25cm²'lik kültür flaskları içerisine 150,000 adet olacak şekilde konuldu. %5.0 CO₂, 37.0°C ayarlanmış inkübatöre yerleştirildi. Haftada iki defa %10'luk FCS'li DMEM ile medium tazelenildi. 12. günde subkonfluent (şekil 1) hale gelen kültür Tripsin EDTA ile subkültüre edildi. Böylece 1. pasaj tamamlanarak, 3 flask olacak şekilde %7.0 FCS ile 7–8 gün kültüre devam edildi ve bu şekilde 4. pasaja kadar düz kas hücreleri çoğaltıldı.

4. pasajdaki hücreler 2x10⁶/cryovial (dondurma-saklama tüpü) olacak şekilde krioprotektan özelliği olan Test Yolk Buffer (Irvine Sci., ABD) [1:1] ile %10 Human Serum Albumin (Irvine Sci, ABD)'li DMEM F12 (Biological Ind., İsrail) içerisine sıvı azot buharında (yaklaşık -20°C) 30 dakika bekletildi ve direk -196°C'lik sıvı azot saklama tankına konuldu. Çözme işlemi için, tanktan çıkartılan cryovial'ın görülebilen en küçük buz kristali kayboluncaya kadar oda ısısında çözünmesi beklendi ve eşit hacimde DMEM yapıldı. Mekanik ajitasyon uygulanarak 500g'de santrifüje edilerek, son pellet üzerine %20 FCS konuldu flasklara dağıtıldı.

4. pasajda dondurulup çözülerek kültüre devam edilen kültürdeki hücreler 5–9 günlük sürede subkonfluent hale geldi ve çalışma 5. pasaj hücreleri üzerinde yapıldı.

Çalışmada iki grup oluşturuldu;

Grup 1 (G1): Toplam 6 flask kontrol grubu olarak düzenlendi. Hücre süspansiyonu medium olarak sadece %7,0 FCS'li DMEM ile muamele edildi.

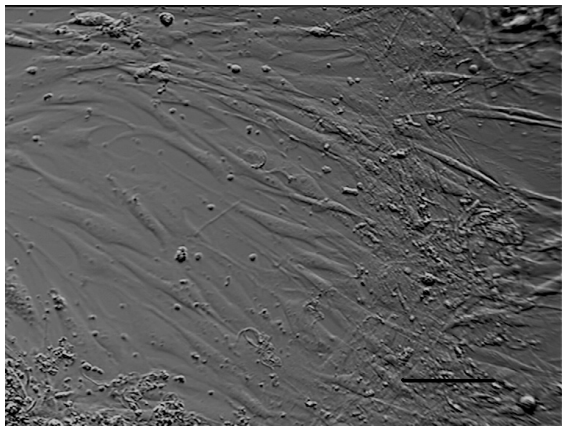
Grup 2 (G2): Toplam 8 flask deney grubu olarak düzenlendi. Hücrelere medium olarak %7,0 FCS'li DMEM'e ilaveten heparin (15 mg/ml) olacak şekilde ilave edildi.

Her iki grupta 2 günde bir ilgili medium değişimi yapılarak taze medium verildi. 5. günde tripsinizasyon tüm flasklara yapıldı ve santrifüj sonrası pellete DMEM ilave edildi, hücre sayım kamerası ile elde edilen hücrelerin sayısı belirlendi.

Her iki grubun karşılaştırılması değerlerin normal dağılıma uygun olması nedeniyle bilgisayar ortamında SPSS programı yardımı ile Independent Sample's t-test ile değerlendirildi. Anlamlı farklılık $p < 0.05$ olması durumunda kabul edildi.

BULGULAR

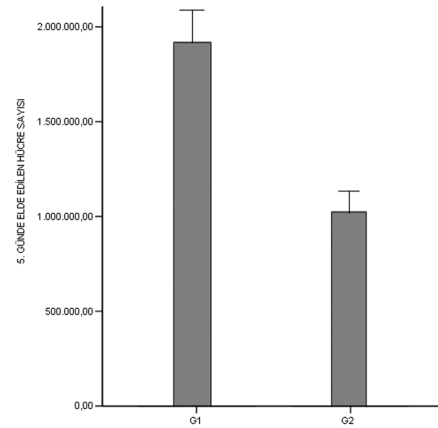
Tripsinizasyon işlemi sonrası viabilite testi (Trypan blue due exclusion) her iki grupta da yüksek (G1 ve G2 için sırası ile % 98 ve %97)



Şekil 1. Subkonfluent aşamaya gelmiş düz kas hücre kültürü. Bar 100 µm uzunluğu göstermekte.

Flask No	G1 grubu (n=sayılan hücre sayısı)	G2 grubu (n=sayılan hücre sayısı)
1	2255000	855000
2	1590000	1150000
3	1800000	905000
4	1760000	1200000
5	2105000	1100000
6	2000000	930000
7	-	780000
8	-	1110000
Ortalama	1.918.333 ± 245,655	1.003.750 ± 154,844

Tablo 1. Kontrol (G1) ve Heparin uygulanan(G2) düz kas hücrelerinin 5. gün sonunda elde edilen hücre sayıları.



Tablo 2. İki grup arasında 5.gün sonunda elde edilen hücre sayısının karşılaştırması. Heparin uygulanan grupta (G2) mitoz belirgin olarak inhibe olmuştur.

canlılık tespit etti. Uygulanan heparin dozunda 5 gün süre sonunda 150,000 olan başlangıç hücre sayısı G1 ve G2 için sırası ile 1.918.333 ± 245,655; 1.003.750 ± 154,844 olarak belirlendi (Tablo 1).

Flask başına 5 gün sonunda elde edilen hücre sayısı Tablo 1'de verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 2'de 5. gün sonu elde edilen hücre sayısının farkı grafiksel olarak gösterilmiştir (Tablo 2).

Independent Sample's t-test ile yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre G1 ve G2 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak her iki grup

arasında anlamlı derece fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Damar düz kası organların bağ dokusu bileşenlerinde önemli yer tutar. Travma, şok gibi organizma homeostazisinin bozulduğu tablolarda hem mitotik hem de salgı özellikleri ile organizmanın toparlanmasına katkıda bulunurlar. Ancak uygulanacak kimyasal ajanların bu tür spesifik hücreler üzerine olabilecek yan etkileri uygulamalarda dikkate alınmalıdır. Mitotik aktivitenin azaldığı durumlarda iyileşme sürecinin gecikmesi beklenen bir durumdur.

Ancak heparinin kullanımının kaçınılmaz olduğu myokard enfarktüsü (6), pulmoner emboli (7) gibi durumlarda ve özellikle ağır sep-

sis (8) olgularında uygulanan hemofiltrasyon sırasında verilen heparinin damar düz kaslarının mitotik aktivitesini baskıladığı bilinmelidir. Vazoaktif ajanların da sıklıkla kullanıldığı bu olgularda klinik cevap heparin kullanımı ile azalabilecektir.

Heparinin bir diğer kullanım alanı olan gebelikteki pıhtılaşma bozukluklarındaki kullanımıdır (9). Fetüsün gelişim halinde olduğu, düz kaslarının organogenezis aşamasında olduğu bilinerek mümkün olan en düşük doz tercih edilmelidir.

Çalışma sonucunda, heparin kullanımının gereklilik sınırlarının iyi belirlenmesi ve gereksiz kullanımdan kaçınılarak organizmanın iyileşme sürecine olumsuz etki yapılmamasına dikkat edilmesini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Noyan A.Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji 8.Baskı. İstanbul: METEKSAN Yayınevi 1993,813-817.
2. Aguilera CM, George SJ, Johnson JL, Newby AC. Relationship between type IV collagen degradation, metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration and proliferation in cultured human saphenous vein. Cardiovascular Research 2003;58, 679-688.
3. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji 1.Cilt. Antitrombotik İlaçlar. Ankara: Hacettepe TAŞ, 12. Baskı. S.585. 2002.
4. Morrill GA, Robbins E. Changes in intracellular cations during the cell cycle in HeLa cells. Physiol Chem Phys Med NMR. 1984;16(3):209-19.
5. Irwin RS, Cerra FB, Rippe JM. Intensive Care Medicine Volume 1.Fourth Edition. New York: Lippincott Williams and Wilkins.1999,1026-1039.
6. Hendel RC, Acute myocardial ischemia and infarction: making the right decisions in antithrombotic and reperfusion therapies. Semin Respir Crit Care Med. 2001;22(1):75-88.
7. Kucher N, Goldhaber SZ. Management of massive pulmonary embolism. Circulation. 2005 Jul 12;112(2):e28-32.
8. Trzeciak S, Dellinger RP Other supportive therapies in sepsis: an evidence-based review. Crit Care Med. 2004 Nov;32(11 Suppl):S571-7.
9. James AH, Brancazio LR, Ortel TL. Thrombosis, thrombophilia, and thromboprophylaxis in pregnancy. Clin Adv Hematol Oncol. 2005 Mar;3(3):187-97.