



Özgün Araştırma / Original Article

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

Mustafa Çiçek¹, Mehmet Kemal Tumer^{2,3}

1 Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye ORCID: 0000-0001-8925-0230

2 Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye ORCID: 0000-0002-6250-0954

3 Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

Geliş: 31.01.2018, Revizyon: 29.06.2018, Kabul Tarihi: 23.07.2018

Öz

Amaç: Tıp ve diş hekimliğinin birçok dalında kanama komplikasyonu, gerçekleştirilen tedaviler sonrası veya sırasında, yapılan işlemin büyüklüğünden bağımsız olarak gelişebilir. İyi ve etkin bir cerrahi operasyon için, operasyon sırasında ve sonrasında hemostazın sağlanması en önemli cerrahi gereksinimlerin başında gelmektedir Sağlık alanında 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) sitotoksitesite analiz metodu ile fibroblast hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yöntemler: Çalışma için insan 3T3-E1 osteoblast (non transformed human preosteoblastic cellline) ölümsüz hücre hatları ticari olarak satın alındı. Her flaska her bir farklı doz grubu için 5000 hücre olacak şekilde 9 gruba (mecsina 1/1, mecsina 1/2, mecsina 1/10, mecsina 1/50, mecsina 1/100, mecsina 1/200, mecsina 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 sitotoksitesite değerleri ölçülmüştür.

Bulgular: Mecsina Hemostopper kanama durdurucu ajanın osteoblast hücrelerinde farklı dozlarda ki ilaç uygulama grupları arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). En fazla ölüm oranı %100 ve %50 'lik ilaç uygulamalarında görülmüşken en fazla canlılık oranı %1' lik grupta görülmüştür. %10' luk konsantrasyonun ; %2, %1, %0,5, %0,2' lik konsantrasyondaki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmuştur ($p < 0,001$).

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, osteoblast, XTT, hemostatik ajan, kanama durducu.

DOI: 10.5798/dicletip.457247

Yazışma Adresi / Correspondence: Mehmet Kemal Tumer, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye e-mail: dr_kemaltumer@yahoo.com

Investigation of the Effect of a New Hemostatic Agent Field Messina Hemostopper® on Proliferation of Calvarial Osteoblasts and Evaluation of Cytotoxicity by Different Tests

Abstract

Objective: Hemorrhagic complications may develop in many branches of medicine and dentistry after or during the treatment independently of the extent of the procedure performed. The maintenance of homeostasis per- and post-operatively is one of the most important surgical requirements for a good and effective surgical operation. Anti-hemorrhagic agents actively used in the field of health may prevent hemorrhage by using different mechanisms of action. 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-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) cytotoxicity assay.

Methods: The immortalized human 3T3-E1 osteoblast (non-transformed human preosteoblastic cell line) 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, mecsina 1/2, mecsina 1/10, mecsina 1/50, mecsina 1/100, mecsina 1/200, mecsina 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 antihemorrhagic agent on fibroblast cells between different dose groups ($p < 0.001$). The highest rate of survival was seen in the 1% group while the highest rate of mortality was seen with 100% and 50% drug administrations. There was a significant difference between the 2%, 1%, 0.5% and 0.2% concentration groups of 10% concentration ($p < 0.001$).

Result: It has been found in this study that the mecsina hemostopper, a new generation antihemorrhagic agent, produced different cytotoxic levels at different concentrations in the gingival fibroblast cell lines

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

GİRİŞ

Oral bölge hastalıkları ve cerrahisi diş çekimi, sert ve yumuşak dokulardaki lezyonların eksizyonu, ağız ve yüz bölgesinde oluşan travmatik olgular sonucu meydana gelen kırıkların tedavisi ya da preprotetik ve ortognatik cerrahi işlemler gibi birçok alanı kapsamaktadır. Tüm cerrahi uygulamalar opere edilmiş bölgede değişik derecelerde kanamalara sebep olmaktadır. Cerrahi uygulamanın iyi olması için operasyon sırasında ve sonrasında etkili bir hemostazın sağlanması ihtiyacı hayati derecede önem arz etmektedir. Bu nedenle birçok kanama durdurucu ajan operasyonlar sırasında ve sonrasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır¹.

Sağlık alanında hali hazırda aktif olarak kullanılan anti-hemorajik ajanlar farklı etki mekanizmaları kullanarak kanamayı engelleyebilir. "Mecsina Hemostopper®",

Glycyrrhizaglabra özü, Alpiniaofficinarum, Thymusserpyllum, syzygiumaromaticum, Hypericumperforatum, vitisvinifera, Urticaangustifolia, Menthaarvensis gibi bitkisel özlü ajanlardan yapılmaktadır. "Mecsina Hemostopper®" ortamında bir protein ağı oluşturarak vital eritrosit agregasyonunu sağlar. Uygulandığı bölgede özellikle fibrinojene bağlanarak protein ağı oluşturduğu ve bu ağa eritrositler ruloformasyonu şeklinde sıralandığı, yapılan elektron mikroskop deneylerinde kanıtlanmıştır. Bu sayede hemostaza etkisi gözlemlenebilmiştir².

Osteoblastlar, kemik yapımından başlıca sorumlu genç kemik hücre tipi olarak tanımlanırlar. Organik ekstraselüler matriksin komponentlerini sentezlerler ve matriksin mineralizasyonunu kontrol ederler. Bu hücreler, fonksiyonel olarak kemik oluşum ve remodelingi için gerekli olan proteinleri (başta tip I kollajen ve diğer non-kollajenöz) ve

proteoglikanları salgılayan hücrelerdir³. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar⁴. Bu minvalde düşünüldüğü zaman, kullandığımız bütün hemostatik ajanlar operasyon sırasında açığa çıkan kemik yüzeylerine ve çevre dokulara temas etmekte ve canlı dokuya uygulanan bu tür maddelerin doku üzerine olan etkilerinin bilimsel olarak araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü tarafından eksternal kanamaların kontrolünde kullanılmak üzere ara ürün olarak ruhsatlandırılmış "Mecsin Hemostopper®"ın sitotoksitate testinin ve daha önce araştırılmamış olan osteoblast proliferasyonuna etkisinin hücre kültürü ortamında XTT sitotoksitate analiz yöntemi ile araştırılmasıdır.

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Bu çalışmada; Fare Kalvarial Osteoblastik hücre hattı (Mouse calvarial osteoblastic cell line 3T3-E1-ECCAR; (MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™)) ATCC (American Type Culture Collection)'den ticari olarak satın alındı. %10 fetal dana serumu (Capricon) içeren DMEM (Dulbecco's modified eagle's Medium) ve HAM'S F12 (Capricon) besiyerinde %95 nem ve %5 karbondioksitli ortamda 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı. 25 cm²'lik flasklarda çoğaltılan hücreler, hücre kültür kaplarını kapladıkları zaman %0.05 tripsin/EDTA (Capricon) 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 DMSO (Dimetilsülfoksit) ile dondurma protokolü uygulanarak stok olacak şekilde saklandı. Sigma markalı Tripkan Blue (Product Number: T6146, CAS Number: 72-57-1) (%0.05) boyası ile boyandıktan sonra Celeromics (Micro

Counter 1100, Grenoble/France) marka hücre sayım cihazı 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 negative, hiçbir şey uygulanmayan kontrol) hücreler dağıtıldı.

Hücre Proliferasyon Deneyi

Bu test için 96'lık plağa 10.000 hücre ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra 1:1, 1:2, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:500 dozlarında ilaç uygulanarak hücrelerde uygun doz bulunmuştur.

İn vitro sitotoksitate deneyleri

Mecsin Blood Stopper hücrelerin tedavisinde kullanıldı. Hücreler ve ortam plakalara kültürlendi. Deneyler sırasında oluşturduğumuz grupları içeren 6 kuyulu kültür kaplarında 5-10 milyon hücre üremesini takip ettik. 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 mikrolitre (µl) aktivasyon solüsyonu ile 5 mililitre (ml) 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 MRC UT-6100, Auto Microplate Reader cihazında ELISA yöntemi ile 450 nanometre (nm) dalga boyunda Atlas Biyoteknoloji Laboratuarında analiz edildi ve gruplar arasında doz farklılığına bağlı olarak oluşacak sitotoksik etki araştırıldı.

İstatistiksel Analizler

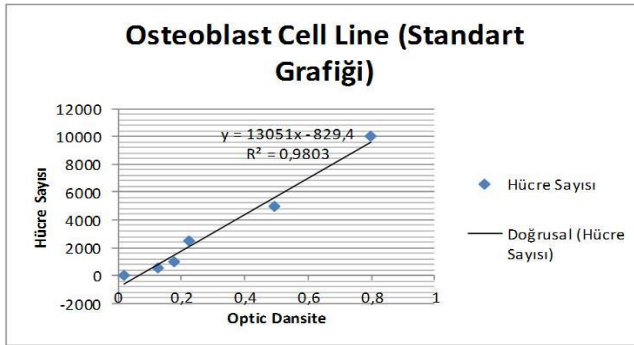
GraphPad Prism Sürüm 6.01'i (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA, ABD, www.graphpad.com) kullanarak verileri analiz etmek için tek kuyruklu T-testi kullanıldı. T-testi, muamele edilmiş hücrelerin ve muamele edilmemiş hücrelerin optik yoğunluğunu (OD)

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

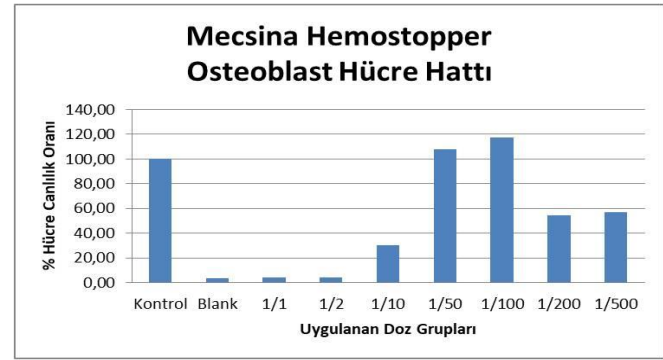
BULGULAR

Mecsinanın osteoblast hücre proliferasyonuna doza bağımlı etkisi analiz edildi (Grafik 1). Mecsinanın %100, %50, %10, %2, %1, %0,05, %0,02' lik konsantrasyonlardaki hücre canlılık oranları 24 saat sonunda tespit edildi. Mecsinanın bu konsantrasyonlardaki inhibisyonu kontrol grubuyla kıyaslandı (Grafik 2).

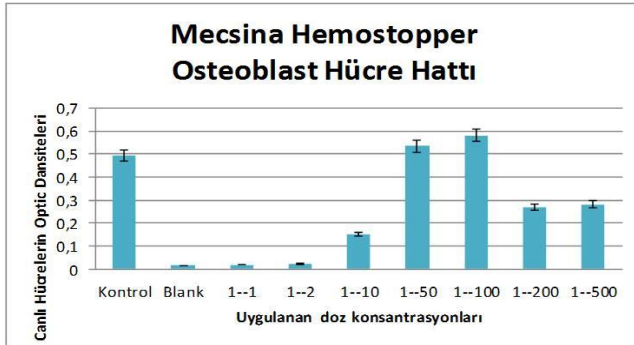
ölüm görülmüştür. %10' luk konsantrasyonun ; %2, %1, %0,5, %0,2' lik konsantrasyondaki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmuştur ($p < 0,001$). Hem %2' lik grubumuz ile %1' lik grubumuz arasında hem de %0,5 ve %0,2' lik grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). En yüksek canlılık düzeyi %2 ve %1' lik gruplarımızda gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki canlılık oranlarına bakıldığı zaman %2 ve %1' lik grupların ayrı ayrı %0,5, %0,2' lik doz konsantrasyonundaki gruplarımıza göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$) (Grafik 3).



Figür 1: Osteoblast hücre hattı standart grafiği



Figür 3: Kontrol osteoblast hücrelerinin ve farklı dozlarda mecsina hemostopper uygulaması yapılmış osteoblast hücrelerinin hücre canlılık oranlarının % değişimleri



Figür 2: Kontrol osteoblast hücrelerinin ve farklı dozlarda mecsina hemostopper uygulaması yapılmış osteoblast hücrelerinin optik dansite değerlerinin gösterimi

Mecsinanın osteoblast hücresine olan etkilerinin doz grupları arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). %100 ve %50 'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak en fazla

TARTIŞMA

Operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın kontrolü cerrahinin temel prensiplerinden biri olmaktadır. Özellikle koagulopati hastalığı olan bireylerde bu durum daha da bir önem kazanmaktadır. Diş hekimliği cerrahisinde halen kullanılmakta olan farklı tipte kanama durdurucu birçok ajan bulunmaktadır. Diş hekimliği klinik uygulamalarında en çok kullanılan kanama durdurucu ajanlar selülöz kaynaklı olanlardır¹. Yapılan bir çalışmada warfarin kullanımı olan ve INR değeri 1-4 arasındaki hastaların diş çekim boşluklarına rejenere okside selülöz kullanılmış ve hiçbir hastasında kanamayı kontrol etmek için ikinci

bir kanama durdurucu kullanımına gerek duyulmamıştır⁵. Başka bir çalışmada ise warfarin kullanımı kesilmeden yapılan periodontal tedavi gerçekleştirilmiş hastalara kanama durdurucu olarak uygulanan okside selülozun kanama kontrolünde etkin olduğu gösterilmiştir⁶. Günümüzde kanamanın kontrolü için yeni bir çok hemostatik ajan üretilmekte ve kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız mecsina hemostopper da yakın zamanda literatüre girmiş doğal kaynakları bünyesinde bulunduran bir kanama durdurucu materyaldir. Yeni bir madde olması nedeniyle mecsina hemostopper üzerinde yapılmış nitelikli bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda çalışmamız literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

İnsan vücudunda bulunan kök hücreler farklı hücrelere dönüşebilmektedir⁷. Embriyo kaynaklı kök hücreler gelişimsel ya da doğum sonrası (organ veya doku spesifik ve erişkin kök hücreler) kök hücre olarak ikiye ayrılmaktadır⁸. Erişkin kök hücreler, kemik iliği, kas, deri, sinir dokusu, bağırsak, diş pulpası, karaciğer, periodontal ligament, alveolara kemik ve ekstrakte edilmiş kalıcı dişlerden elde edilmektedir⁹. Ayrıca organ veya dokuya spesifik kök hücre özellikleri kök hücrelerin davranışlarını etkilemektedir¹⁰. Oral ve maksillofasial bölgedeki pek çok tıbbi uygulamada, kök hücre araştırması hızla artmaktadır¹¹. Bu nedenle çalışmamızda kaliteli ve deney sonuçlarımızın güvenilir olması için ticari osteoblast hücre hattı kullanılması tercih edilmiştir.

Mecsina Hemostopper®", Glycyrrhizaglabra özü, Alpiniaofficinarum, Thymusserpyllum, syzygiumaromaticum, Hypericumperforatum, vitisvinifera, Urticaangustifolia, Menthaarvensis gibi bitkisel özlü ajanlardan yapılmaktadır. Bu bitkilerin tümü endotel, kan hücreleri, hücresel proliferasyon, anjiyogenez, mediatörler ve vasküler dinamikler üzerinde etki oluşturmaktadır¹². Mecsina Hemostopper'ın etki mekanizması,

kapsüllenmiş protein ağı oluşturma yoluyla eritrosit agregasyonu odak noktalarının oluşumunu sağlamaktır². Bu etkisini fibroblastlar üzerinde göstermekte iken osteoblast hücrelerinde nasıl bir etki mekanizması olduğu henüz bilinmemektedir. Çalışmamızda Mecsina Hemostopper'ın osteoblast hücre hattı üzerine nasıl bir toksik etki gösterdiği analiz edilmeye çalışılmıştır.

Kanama kontrolünü sağlamak ve postoperatif dönemde kanama insidansını en aza indirmek için eskiden beri çeşitli yöntemler denenmiştir¹³. Kanama durdurucu ajan olarak kullanılan maddeler kemik yüzeyleri ile temas etmektedirler. Bu durumun neden olduğu doku reaksiyonları, kullanılan malzemelerin güvenilirliği açısından önemlidir. Uygulama sonunda dokularda herhangi bir nekroz alanı ve yabancı cisim reaksiyonlarının olmaması maddenin güvenilirliğini göstermektedir¹⁴. Bu açıdan bakıldığı zaman çalışmamızda mecsina hemostopper isimli kanama durdurucu ajanın sitotoksik etkisini göstermek için XTT analizi yapılmıştır. Araştırma bulgularımıza göre düşük doz konsantrasyonlarda yapılan uygulamada hücre canlılık oranları en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek doz ilaç uygulamalarında ise hücre canlılık oranlarında ciddi bir azalma görülmüştür.

Sonuç olarak, mecsina hemostopper bir bitki özütü olup hemostatik bir ajan olarak kullanılmıştır. Kesin etki mekanizması bilinmemekteyken ilaç içeriğini oluşturan bitkilerin çeşitli şekillede hemostatik sistem üzerinde bir etkisinin olduğunu bilmekteyiz. Çalışmamızın sonuçları bize mecsinanın sitotoksik ve proliferatif etkilerinin ilacın post ya da pre-operatif olarak uygulanmasında klinik olarak bir rahatsızlık doğurmadığını göstermiştir. Ancak çalışmamız literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle ilacın etki mekanizması hakkında daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

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

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Gaziosmanpaşa University. Project number: 2013/103.

KAYNAKLAR

1. Simsek HO, Tüzüm MS, Baykul T, Gürer IE, Başsorgun CI. Experimental investigation of the effects of a blood stopper agent (ankaferd blood stopper) on bone surfaces. Turkish Journal of Hematology. 2013; 30: 177-83.
2. Ozyurt A. Düşük enerji seviyeli lazer terapisi ve mecsina adlı hemostatik ajan kullanılarak sert doku iyileşmesinin histolojik ve morfolojik değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2014.
3. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology, 3rd edn. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001: 577.
4. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical Periodontology and Implant dentistry, 4th edn. Copenhagen: Blackwell Munksgaard, 2003: 1072.
5. Pekkan G, Tuna SH, Oghan F. Extraoral prostheses using extraoral implants. Int J Oral Max Surg. 2006; 40: 378-83
6. Morimoto Y, Niwa H, Minematsu K. Hemostatic management for periodontal treatments in patients on oral antithrombotic therapy: a retrospective study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 108: 889-96.
7. Otto WR, Rao J. Tomorrows skeleton staff: Mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. Cell Prolif. 2004; 37: 97-110.
8. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow - derived stem cells. Stem Cells. 2004; 22: 487-500.
9. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 5807-12.
10. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. Bone. 2006; 38: 758-68.
11. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res. 2005; 8: 191-9.
12. 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: 163-70.
13. Yıldırım M, Günyel E, Topçu İ. The Hemostatic Effect of Bizmut Subgallat in Tonsillectomy. Dicle Med J. 2007; 34: 1-6
14. Bilgili H, Captug O, Kosar A, et al. Oral systemic administration of Ankaferd Blood Stopper has no short-term toxicity in an in vivo rabbit experimental model. Clin Appl Thromb Hemost. 2010; 16: 533-6.