

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
ANKAFERD KAN STOPERİ ADLI İLACIN İNSAN UMBİLİKAL
VEN ENDOTEL KÜLTÜRÜ (HUVEC) ÜZERİNE ETKİSİ

Proje No:TSA-08-623

Proje Türü: Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Harun ÜLGER, ERÜ Tıp Fak. Anatomi AD.

Araştırmacılar:
Prof. Dr. Mehmet Akif ÖZDEMİR ERÜ Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. AD.
Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ (Hacıhalioğulları), ERÜ Tıp Fak. Anatomi AD.
Doç. Dr. Esmâ KAYA, ERÜ Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Yasemin ALTUNER TORUN, Kayseri Eğt. ve Araş. Hast.

Mayıs 2014

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	3
ABSTRACT	4
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	5
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
4. BULGULAR	14
5-TARTIŞMA VE SONUÇ	16
6-KAYNAKLAR	19

ÖZET

AMAÇ: Ankaferd kan stoper (ABS) folklorik tıbbi bitki ekstraksiyonudur. Ülkemizde yıllardır geleneksel hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. ABS *Thymus vulgaris*, *Glicirhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinin standardize edilmiş bir karışımıdır. Bu bitkilerin hepsinin bireysel olarak endotel, kan hücreleri, anjiogenez, hücre proliferasyonu, vasküler dinamikler ve mediatörler üzerine etkisinin olabileceği rapor edilmiştir. Çalışmamızda Ankaferd'in insan endoteli üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla İnsan Umbilical Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) kullanılarak farklı doz ve zamanda oluşturduğu değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Erciyes Üniversitesi hastanesinde sezeryanla yapılan doğumlardan alınan göbek bağı toplardamarı PBS ile yıkandıktan sonra içine yaklaşık 10 mg/ml kollajenaz verildi ve 10 dakika 37°C de inkübatörde bekletildi. Damar içerisindeki hücre ve kollajenaz karışımı tüp içine alındıktan ve 30 ml besi yeri ilave edildikten sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki supernatant atıldı ve tüpün dip kısmında biriken hücreler üzerine 2 ml besi yeri ilave edilerek karıştırıldı ve 25 cm'lik flasklara ekildi. Ekilen hücreler konfluense ulaşıncaya pasajlama yapıldı. Yeterince hücre elde edildikten sonra Thoma lamında sayılan hücreler gruplara ayrıldı. Her bir gruba (n=16) ait kültür ortamına sırasıyla 5%, %25 ve %50 oranında ABS 24 saat süre ile uygulanmıştır. 48 saat sonra gruplardaki hücreler Thoma lamı ile sayılarak ABS'nin etkileri tespit edildi.

BULGULAR: HUVEC'lere ABS muamelesi boyunca, mikroskopik olarak hücrelerin yüzeyden kalktığı ve birbirlerine yapıştığı ve 24 saat sonra ise normal büyümelerine ve fonksiyonlarına döndükleri gözlemlenmiştir. Doza bağlı olarak deney grubu hücrelerinde bir artışın olduğu görüldü. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen ortalama hücre sayısı sırasıyla $5,68 \times 10^4 (\pm 1,7)$, $6,56 \times 10^4 (\pm 1,09)$, $7,12 \times 10^4 (\pm 1,14)$, $7,43 \times 10^4 (\pm 0,89)$ idi. Deney gruplarındaki hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deney gruplarındaki hücre azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

SONUÇ: Ankaferd'in HUVEC'lerde çeşitli doz ve konsantrasyona bağımlı etkisinin varlığı saptanmış olup hemostatik etkileri yanı sıra hücresel birçok mekanizmayı da etkileyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelime: ABS, HUVEC, göbek bağı

ABSTRACT

OBJECTIVE: Ankaferd BloodStopper (ABS) is an herbal extract which has been used historically as a haemostatic agent in traditional Turkish medicine. ABS comprises of standardized mixture of herbs *T. vulgaris*, *G. glabra*, *V. vinifera*, *A. officinarum* and *U. dioica*. Basic effect mechanism of ABS is the formation of an encapsulated protein web which represents the focus points for the vital erythrocyte masses. The haemostatic effects have been demonstrated by in vitro and in vivo studies.

METHODS Human umbilical cord obtained at Caesarean sections from Erciyes University hospital. After washing PBS, the cord vein lumen was filled with PBS containing 10 mg/ml collagenase and incubated 10 minute at 37°C. The contents of the vein were gently flushed out with an equal volume of 30 ml medium collected in a conical centrifuge tube then centrifugated at 1000 rpm for 10 minute yielded a small white pellet which was resuspended in culture medium. The cells were plated in 2 ml of medium at T-25 plastic flasks. The endothelial cells were passaged when confluent density was approached. After obtaining enough cells, the cells were counted by **Thoma slide**. Then cells were divided into control and five experimental groups. 5%, %25 ve %50 ABS were added to medium of each experimental group (n=16). After 48 hours culture period, the effects of ABS were determined by cell counting.

RESULTS: It was microscopically observed that cells arised from the surface and adhered to each other after the ABS application to the HUVECs. Also, after 24 hours cells returned the normal growth and physiology. After 48 hours culture period, the effects of ABS were determined by cell counting. While the mean cell number of control group and experiment groups were $5,68 \times 10^4 (\pm 1,7)$, $6,56 \times 10^4 (\pm 1,09)$, $7,12 \times 10^4 (\pm 1,14)$, $7,43 \times 10^4 (\pm 0,89)$ respectively. There was a reduction on cell number in experimental groups when compared to the control. This reduction was statistically significant ($p < 0.05$).

CONCLUSION: In this study, we observed that Ankaferd has dual diverse dynamic reversible actions depend on dose and concentration in the model of HUVEC. ABS might have a role on numerous cellular mechanisms as well as its hemostatic actions.

Key words: ABS, HUVEC, umbilical cord

1.GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Ankaferd kan stoper (ABS) folklorik tıbbi bitki ekstraksiyonudur. Ülkemizde yıllardır geleneksel hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. ABS *Timus vulgaris*, *Glicirhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinin standardize edilmiş bir karışımıdır. Bu bitkilerin hepsinin bireysel olarak endotel, kan hücreleri, anjiogenez, hücre proliferasyonu, vasküler dinamikler ve mediatörler üzerine etkisinin olabileceği rapor edilmiştir(1).

ABS etkili bir hemostatik ajan olup tıpta hemoraji yönetimi için terapötik potansiyele sahiptir. Klinik çalışmalar, bu yeni ilaç gelişiminin, patolojik hemostazda da kısmen etkili olacağını göstermektedir. ABS'nin temel mekanizması enkapsüle protein ağının oluşması ile eritrosit agregasyonunun başlatılmasıdır. Belirli bir alanın ABS'ye maruz kalması doku oksijenizasyonunu destekler ve aynı zamanda pıhtılaşma faktörlerine zarar vermeden fizyolojik hemostazı başlatır. Bu eşsiz mekanizma, diğer hemostatik aktif bitki ekstraktlarına göre ABS'ye avantaj sağlamaktadır.

Son zamanlarda vasküler zedelenmenin belirleyicisi olarak endotelial mikropartiküller (EMP) tanımlanmıştır. Bu hücrelerin vasküler zedelenmeyi takiben miktarı artmakla birlikte son çalışmalarda anjiogenezde de rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır(2-4). EMP herhangi bir zedelenme veya aktivasyon sonrası endotelial hücre membranından vezikül şeklinde ortaya çıkar. Salındığı hücredeki aktivasyon ve apoptozis gibi reaksiyonları endotel hücre üzerindeki belirleyicileri ile gösterebilir(5). Dolaşımdaki mikropartiküller başlıca trombositlerden ayrıca eritrosit, lökosit ve endotelial hücrelerden kaynaklanırlar. Mikropartiküller salındığı hücrelere göre; trombosit kaynaklı ise CD42b, CD31 ve CD62P; eritrosit kaynaklı ise glikoforin A, granülosit kaynaklı ise CD66, monosit kaynaklı ise CD14, lenfosit kaynaklı ise CD4 ve CD8, endotel hücre kaynaklı ise CD31, CD34, CD51 (vitronektin), CD62E ve CD146 (Munc 18, S-Endo-1) ile karakterizedirler(2,3).

Endotel hücrelerinin kendisi 30 yıl öncesinden dolaşımda gösterilmesine rağmen vasküler bütünlüğün değerlendirilmesinde son yıllarda ilave belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır(6). Ancak endotel hücrelerinin hastalık öncesi veya hastalık sırasında ki durumunun monitorize edilmesi pratikte zor bir işlemdir. Çeşitli hasta gruplarında yapılan çalışmalar endotel kaynaklı EMP ölçülmesinin endotel hasarını değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermiştir (7-9).

Türkiye’de geleneksel olarak eskiden beri kullanılmakta olan ABS, çok etkin bir hemostatik ajandır ve tıbbi pratikte hemoraji yönetiminde terapötik potansiyeli vardır. Günümüzde lokal olarak kullanılması için ruhsat almış olup parenteral kullanılması uygun değildir. Büyük damar kesilerinde lokal kullanılması sırasında damar endoteli üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı; Ankaferd’in insan endoteli üzerine olan etkisini ortaya çıkarmak ve uygulama alanlarının belirlenmesine yardımcı olmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

EMP TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler veya enfeksiyon ajanlarının aktivasyonu ile ya da apoptozis süresince endotel hücrelerden salınan küçük($\leq 1\mu\text{m}$) vesiküllerdir. Salındığı hücredeki aktivasyon ve apoptozis gibi reaksiyonları endotel hücre üzerindeki belirleyicileri ile gösterebilir. EMP hakkındaki ilk çalışmalar kompleman aracılığıyla lizis sonrası insan umbilikal ven endotel kültürü (HUVEC) üzerinde yapılmıştır. Combes ve ark. (10) TNF-alfa ile HUVEC aktivasyonundan sonra EMP oluşturmuşlar ve antifosfolipid sendrom tanısı alan hastaların serumu ile endotel hücrelerini inkübe etmişlerdir. Bu gibi hastalıklarda EMP’nin arttığına dair birçok çalışmalar yapılmıştır. Endotelden EMP salınımını indükleyen ana hücresel mekanizmalar selüler aktivasyon, zedelenme ve apoptozisdir. EMP oluşumu in vitro olarak IL1 ve TNF-alfa gibi sitokinlerin endotel hücrelerin aktivasyonu ile gösterilmiştir. Kakishita ve ark. (11) TTP’li hasta plazması ile maruz kaldıktan sonra endotel hücrelerinde apoptotik değişiklikler ve EMP’nin arttığını rapor etmişlerdir. EMP’nin gösterilmesinde kullanılan en yaygın teknik flow sitometredir (7-10).

EMP’nin ayrıca platelet faktör 3 aktivitesi ve TF üzerinden prokoagülan aktivitesi de vardır. Mikropartiküller lökosit adezyonunu artırarak, sitokin oluşumunu tetikleyerek ve doku faktörü veya P-Selektin maruz kalmasıyla vasküler endotel hücreleri direkt olarak etkileyebilirler. Ek olarak mikropartiküller endotel NO yoluyla veya proinflamatuvar cevap artışıyla endotel fonksiyon bozukluğu yaparlar. Mikropartikül oluşumu inflamasyon, koagülasyon veya vasküler fonksiyonlara eşlik eden birçok patofizyolojik olayları içeren apoptozis ve hücre aktivasyonu ile tetiklenir. Karmaşık fizyopatolojik stresler endotelin regülatör fonksiyonlarının değiştirebilir. Endotele lökosit adezyonu hücre zedelenmesinde en önemli olaylardan birisidir. Aktive lökositler ile endotel hücrelerinin etkileşimi endotel bağımlı vasodilatasyon ile ilişkili olup vasküler geçirgenlikte artma ve pıhtılaşma kaskatında aktivasyona neden olur. Reaktif oksijen radikalleri, süperoksit ve inflamatuvar sitokinler gibi bir çok lökosit ürünleri endotel fonksiyonlarına zarar verir ve inflamasyon-koagülasyon arasındaki pozitif feedback için potansiyel meydana getirir. Yapılan araştırmalarda

ateroskleroz, transplantasyon reddi, septik şok, geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları ve reperfüzyon hasarı gibi patolojik durumlarda bu moleküllerin rolü gösterilmiştir (5-9).

ABS kullanılması ile oluşan protein network ve eritrosit egregasyonu da endotel hücresi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (1). Günümüze kadar ABS hakkında yapılmış sadece bir çalışma mevcut olup bu çalışmanın bilgilerinden yararlanılmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

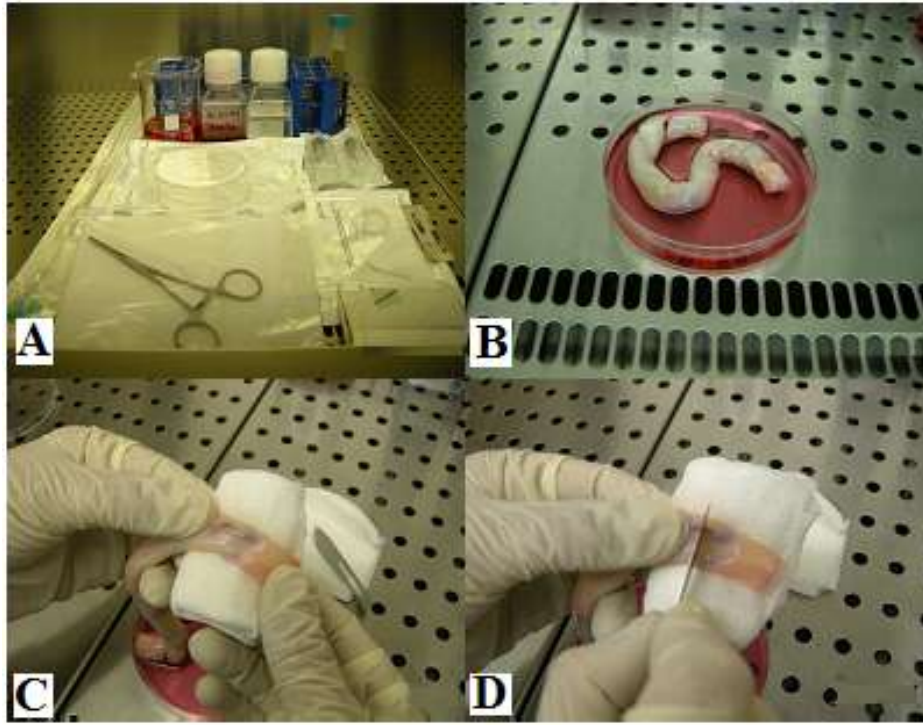
3.1.GÖBEK BAĞININ TEMİN EDİLMESİ

Yeni doğan göbek bağı Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Kadın Doğum Kliniğinde sezeryanla doğum yapan hastalardan temin edildi. Göbek bağından endotel hücre izolasyonu ve kültürü Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Yapılan bütün işlemler sırasında steril malzemeler kullanıldı. Çalışmada Jaffe ve arkadaşları tarafından rapor edilen yöntem temel alındı (Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J Clin Invest. 1973; 52:2745-2756).

3.2.İNSAN GÖBEK BAĞINDAN ENDOTEL HÜCRELERİN İZOLASYONU

Göbek bağı steril şartlarda doğum salonunda plasentadan alınır alınmaz içerisinde steril HBSS solüsyonu bulunan steril kap içerisine kondu ve Doku Kültürü laboratuvarına taşınarak alındıktan sonra en geç bir saat içinde izolasyona başlandı. Laminar-air kabin altında göbek bağı incelenerek klemp izleri olan bölgeler steril bir bisturi yardımıyla kesildi (Şekil 3.1). Göbek bağında 2 atardamar ve 1 toplardamar bulunmaktadır. Toplardamar atardamlara göre biraz daha büyüktür. Göbek bağı toplardamar lümenine ucu pürüzsüz ve künt bir steril çubuk yardımı ile yaklaşık 2 cm boyunca girildi ve steril 6 French'lik (Fr) besleme sondası toplardamar lümenine yerleştirilerek sabitlendi (Şekil 3.2). Toplardamar lümeni enjektör yardımıyla 50 ml PBS ile yıkanarak toplardamarın içindeki kan hücrelerinden temizlendi. Toplardamarın diğer ucuna, ucu pürüzsüz ve künt bir çubuk yardımı ile yine yaklaşık 2 cm boyunca girildi ve steril 6 Fr'lik besleme sondası da buraya yerleştirilerek sabitlendi. Göbek bağının boyutuna bağlı olarak toplardamarın içerisine ortalama 10 mg/ml kollajenaz enjekte edildi. Göbek bağının her iki ucu kapalı olacak şekilde HBSS içeren steril şişe içerisine konularak 30-40 dakika 37°C deki roller inkübatörde bekletildi (Şekil 3.2, Şekil 3.3). 50 ml'lik falcon tüp içerisine bağın bir ucu yerleştirilerek diğer uçtan göbek bağı toplardamarı içine enjektör yardımıyla girildi ve toplardamar içerisindeki hücre-kollajenaz karışımı tüpe aktarıldı. 30 ml kültür besi yeri (%20 Fetal Bovine Serum, %80 Dulbeccos Middle Eagle

Medium ve 1ml penicilin/streptomycin: 10,000 unit/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin) göbek bağı toplardamarına verilerek kalan hücrelerin tüp içine alınması sağlandı. Daha sonra tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüj edildi ve üstteki supernatant kısım steril pasteur pipetle yavaşça çekilerek atıldı. Tabanda kalan hücreler üzerine tekrar 10 ml kültür besi yeri ilave edilerek önce vortekste karıştırıldı ve daha sonra 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant kısım steril pasteur pipet yardımıyla çekildi (Şekil 3.4). Daha sonra tüpün dip kısmında biriken hücreler üzerine 2-2,5 ml kültür besiyeri ilave edilerek karıştırıldı ve 25 cm² lik flaslara (kültür kabı) ekilerek inverted mikroskop altında hücre olup olmadığına bakıldı. Hücre bulunduğuna kanaat getirildikten sonra kültür kapları 37°C'lik % 5 CO₂ ihtiva eden inkübatöre kondu (Şekil 3.5, Şekil 3.6).

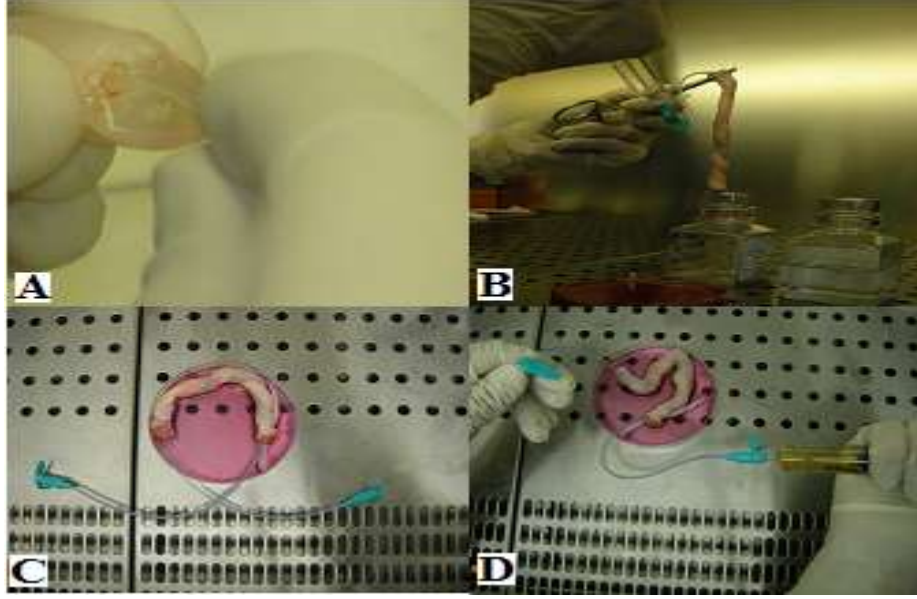


Resim 3.1: Göbek bağıının steril şartlarda (Lamin-air flow'da) endotel izolasyonu için hazırlanması. **A**-Endotel hücre kültüründe kullanılan malzemelerin görünümü **B**-Göbek bağıının görünümü **C**-Klemp izinin görünümü **D**-Klemp izinin kesilmesi

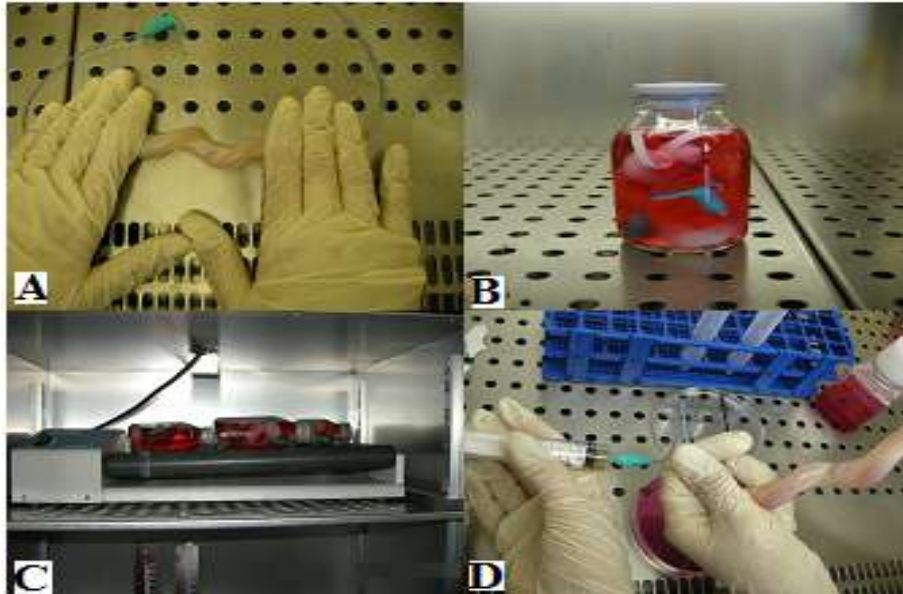
3.2.1. İzole Edilen Endotel Hücrelerin Takibi

Göbek bağından izole edilen endotel hücrelerin bir gece inkübasyonundan sonra yani ertesi gün kültür kaplarındaki hücreler inverted mikroskop altında incelendi. Kültür kabındaki hücreler PBS (3ml PBS ile üç kez) ile yıkandı ve 2-2,5 ml besi yeri ilave edildi. Kültür kabı tekrar inkübatöre kondu. Daha sonra kültür kabındaki hücreler her gün kontrol edildi ve

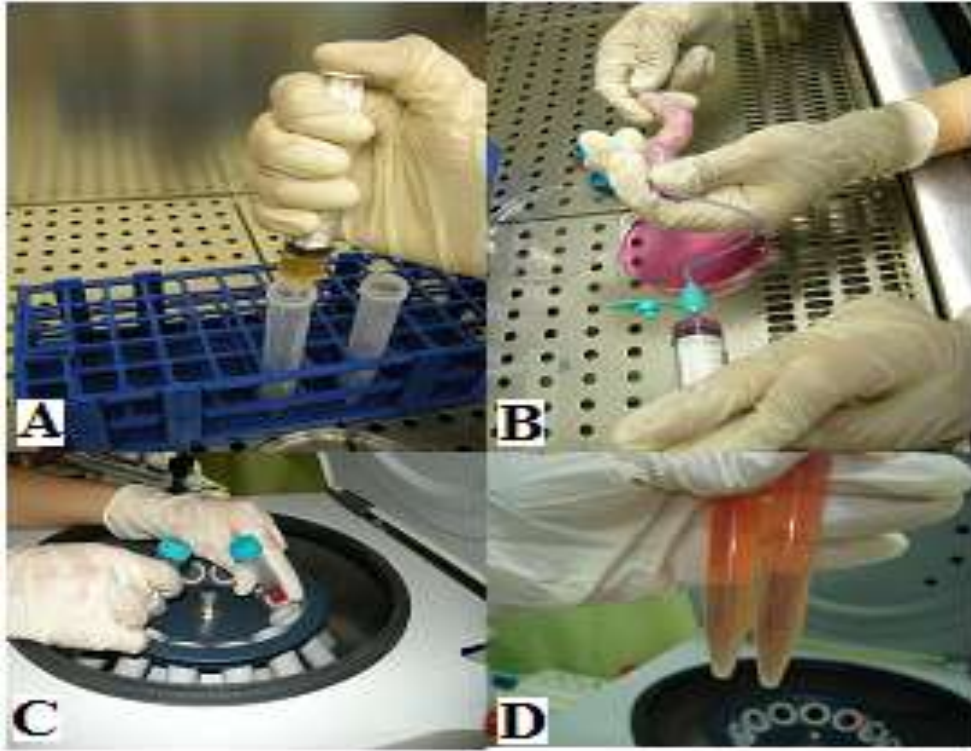
konfluense ulaşıncaya kadar (kültür kabının %70-80'lik alanını kaplayıncaya kadar) 48 saatte bir PBS (3ml PBS ile üç kez) ile yıkandı ve besi yeri değiştirildi. Hücreler konfluense ulaştıktan sonra pasajlama işleminde geçildi.



Resim 3.2: Göbek bağı toplardamarına beslenme sondasının yerleştirilmesi
A-Toplardamarla besleme sondasının girişi B-PBS ile toplardamar lümeninin yıkanması C-Göbek bağının her iki ucuna besleme sondasının takılması D-Besleme sondasından kollajenazın verilmesi

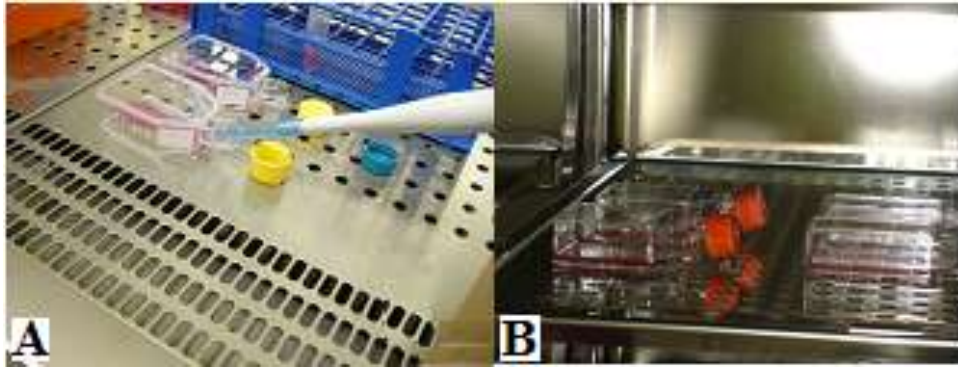


Resim 3.3: Göbek bağı toplardamarının kollajenaz ile muamelesi
A-Göbek bağına mekanik etkinin uygulanması B-HBSS bulunan şişe içerisinde göbek bağının konması C-Roller inkübatöre şişenin konması D-Göbek bağından hücre karışımının çekilmesi



Resim 3.4: Kollajenzdan endotel hücrelerinin ayrıştırılması

A-Hücre karışımının tüpe aktarılması **B-**Göbek bağına mediumun verilip tekrar çekilmesi **C-**Santrifüj aşaması **D-**Santrifüjden sonra dibe çöken hücrelerin görünümü

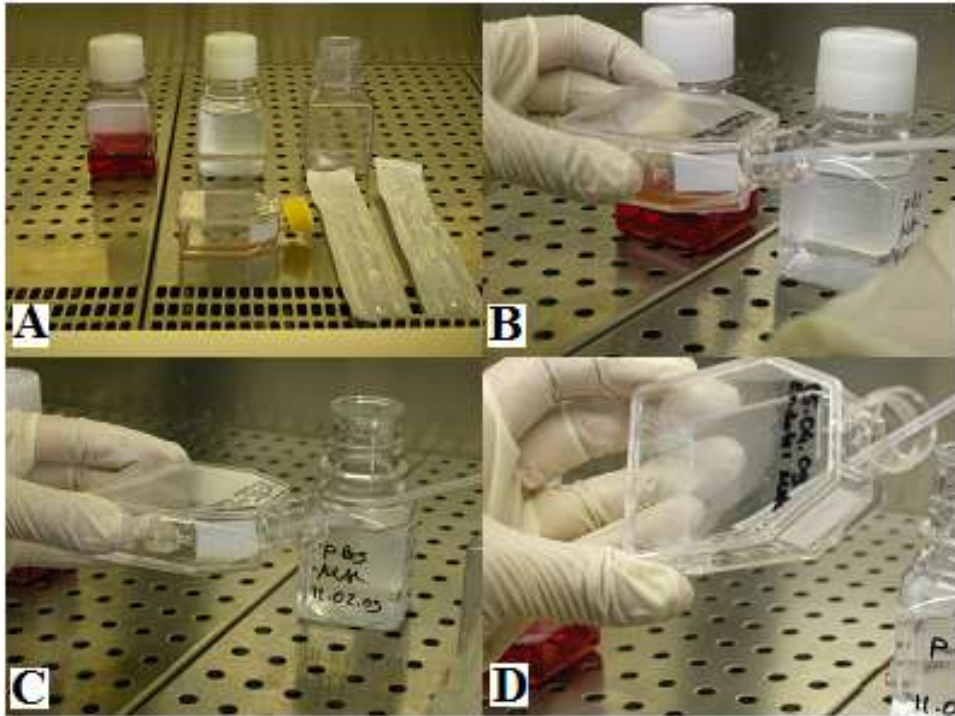


Resim 3.5: İzolasyondan sonra elde edilen endotel hücrelerin ekimi

A-Hücrelerin kültür kabına ekilmesi **B-**Ekilen hücrelerin inkübatöre konması

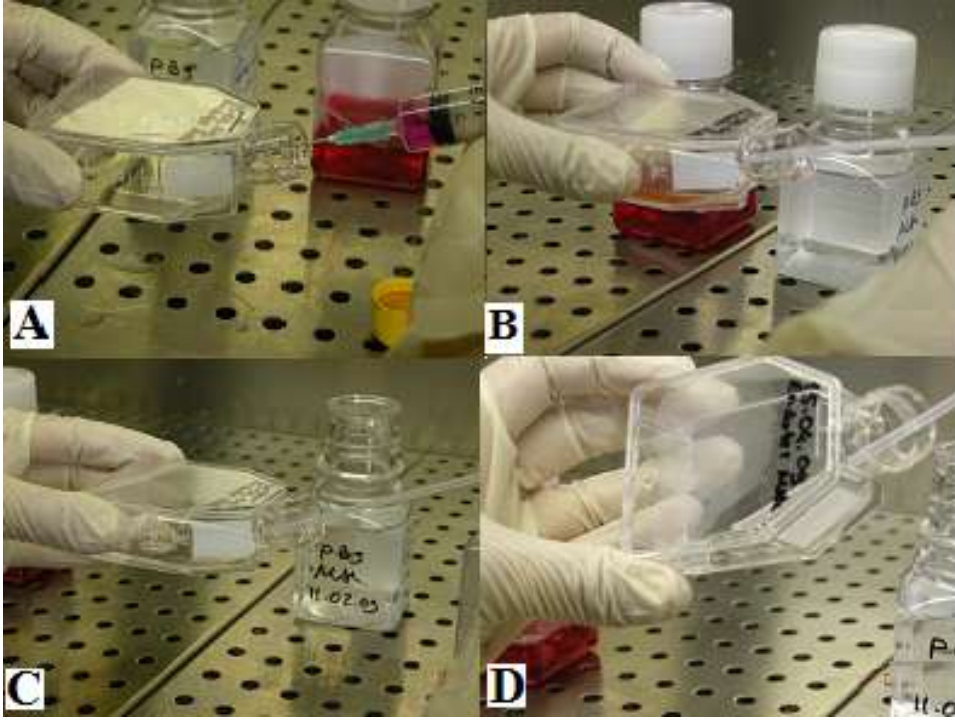
3.2.2. Endotel Hücrelerin Pasajlanması

Endotel hücrelerinin konfluense ulaştığı görüldükten sonra pasajlama aşamasına geçildi (Şekil 3.6). Kültür kabındaki medium steril pasteur pipeti ile aspire edildikten sonra 3 kez PBS ile yıkandı. Enjektör ile 2 ml tripsin/EDTA kültür kabı içerisine konularak 37°C'lik inkübatörde 1-2 dk bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin zeminden tamamen kalktığını gördükten sonra tripsin/EDTA'nın etkinliğini ortadan kaldırmak için 4 ml tam besi yeri ilave edildi (Şekil 3.8). Kültür kabı içerisindeki karışım çekilerek iki santrifüj tüpüne steril pasteur pipeti ile aktarıldı. Daha sonra 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant steril pasteur pipeti ile aspire edildikten sonra steril pasteur pipeti ile 4'er ml tam besi yeri eklendi. Pellet ile tam besi yerinin homojenize olması için vortekslendikten sonra tekrar 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant steril pasteur pipeti ile çekildikten sonra 2-3 ml tam besi yeri ilave edilip vortekste karıştırıldıktan sonra 25 cm²'lik iki kültür kabına ekim yapıldı 37°C'lik inkübatöre kondu (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Ertesi gün mikroskop altında hücreler incelendi ve besi yeri aspire edildikten sonra PBS ile iki kez yıkandı ve taze besi yeri ilave edilerek inkübatöre kaldırıldı. Bundan sonraki zamanlarda her gün hücreler kontrol edildi ve iki günde bir mediumları değiştirildi. Konfluense ulaştıktan sonra ikinci pasajlama işlemine geçildi.

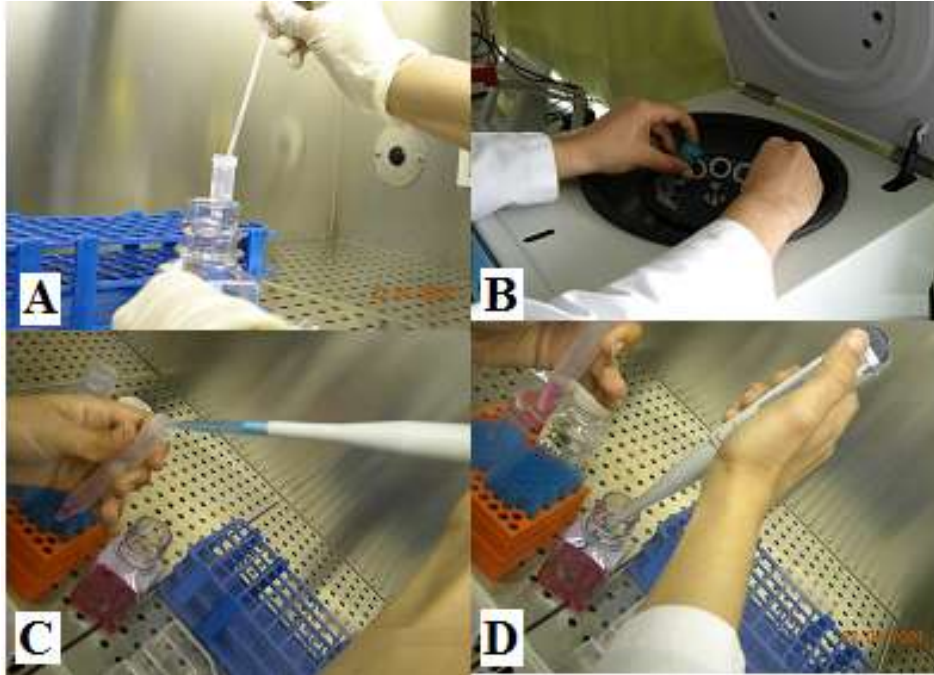


Resim 3.6: Konfluense ulaşan endotel hücrelerin pasajlanması

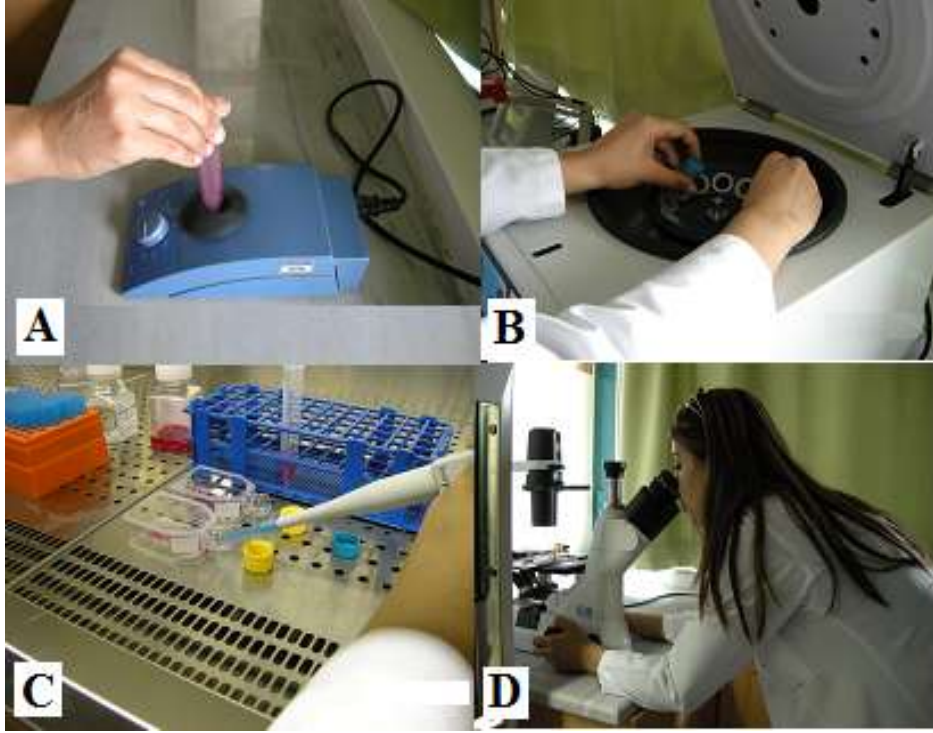
A-Pasajlama işlemi sırasında kullanılan malzemeler **B-**Mediumun aspire edilmesi **C-**Yıkama işlemi **D-**PBS'in aspire edilmesi



Resim 3.7: Endotel hücrelerin tripsin ile muamelesi
A-Tripsinin kültür kabına aktarılması B-Mediumun kültür kabına aktarılması
C-Mediumun çekilmesi D-Kültür kabına mekanik etki oluşturduktan sonra hücrenin tamamının çekilmesi



Resim 3.8: Endotel hücrelerin tripsinden ayrıştırılması
A-Medium ve hücre karışımının tüpe aktarılması
B-Santrifüj işlemi C-Supernatantın aspire edilmesi D-Mediumun eklenmesi



Resim 3.9: Pasajlama işleminden sonra endotel hücrelerin ekimi
A-Hücre ve mediumun vortekslenmesi B-Santrifüj işlemi
C-Hücrelerin kültür kabına ekilmesi D-Mikroskop altında hücrelere bakılması

3.2.3.Kültüre Edilen Endotel Hücrelerin Sayımı

Çok küçük hacimdeki hücre süspansiyonunun içerdiği hücre sayısının mikroskop yardımı ile sayılması işlemine hücre sayımı denir. Hücre sayımı, hazırlanan bir hücre süspansiyonunun yoğunluğunu yani milimetredeki hücre sayısını ve hücrelerin canlılık oranını saptamak amacıyla yapılmaktadır. Canlı hücreler Trypan Blue Solusyon gibi bazı boya geçirmez. Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde kullanılan boya hücre içerisine girerek sitoplazmayı boyamaktadır. Mikroskop altında canlı hücreler parlak sarı renkte ölü hücreler ise mavi renkte görünmektedir (94). Hücre sayımı yapılırken; kültür kabı içerisindeki hücreler PBS ile üç kez yıkandıktan sonra 2 ml tripsin/EDTA eklenerek 1-2 dk 37°C’de bekletildi. Sonra 4 ml medium ilave edilerek 10 dk 1000 rpm’de santrifüj (bu işlem iki kez yapıldı) edildi. Falcon tüpün dibinde kalan pellete 1 ml kadar medium ilave edilerek pipetör ile hücreler iyice süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 50 µl alınarak eppendorf tüpüne kondu. Üzerine 50 µl Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine kondu ve lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesinin üzerine lamel kapatıldı. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucunu dayayarak tam orta noktadan yavaşça hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi (hazırladığımız

süspansüyondan 20 µl alarak). Daha sonra Thoma lamı mikroskopun tablasına yerleştirildi. 15-20 saniye kadar beklerken mikroskop objektifi X40'e ayarlanarak sayma alanı bulundu. Hücreler tek tek sayılarak not edildi. Toplam hücre sayısı HsxDoxSs formülüne göre hesaplandı. Hücreler daha sonra 96 kuyucuklu plate'lere kontrol ve deneysel gruplar şeklinde eşit oranda ekildi.

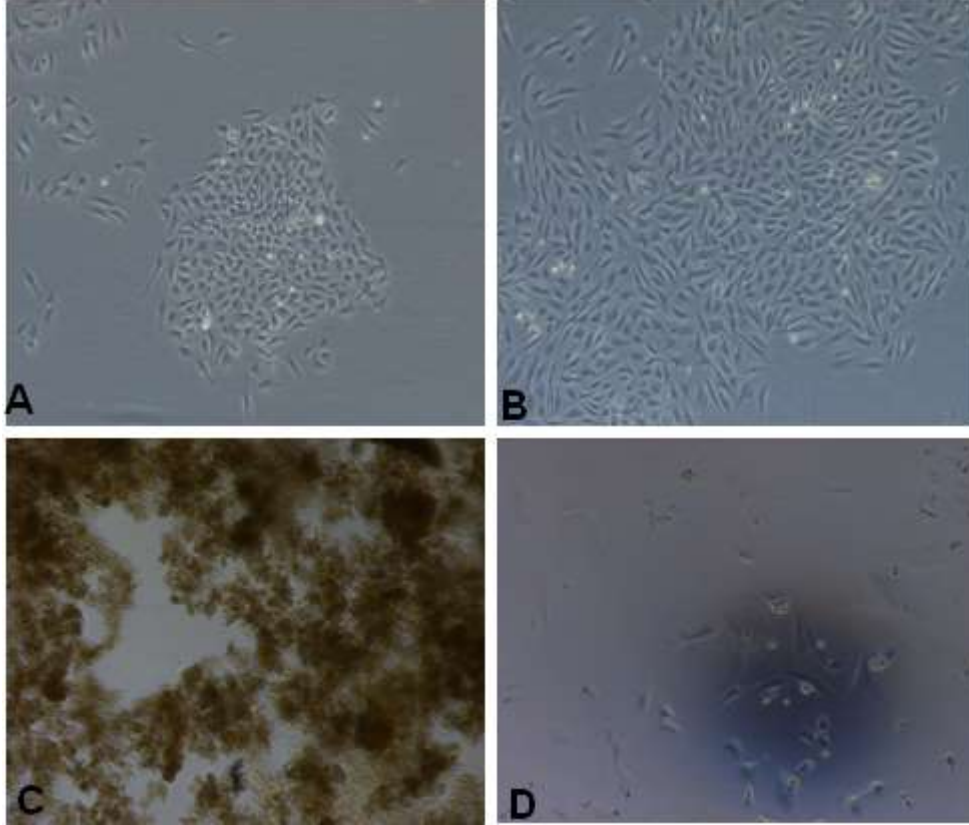
3.2.4.Deneysel Grupların Oluşturulması

Göbek bağından endotel hücreleri izole ettikten sonra pasajlama işlemini tamamlayıp yeterince hücre elde ettikten sonra Thoma lamında hücreler sayıldı. Çalışmamızda göbek bağından elde edilen ve ikinci pasajı yapılan endotel hücreleri kullanıldı. İkinci pasaj sonunda sayılan hücreler 1 kontrol ve 3 deneysel olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Grupları oluşturan her bir kuyucuğa 5×10^4 sayıda hücre ekildi. 96 kuyucuktan oluşan kültür kaplarına ekilen hücreler bir gece inkübatörde tutulduktan sonra sabah kuyucuklar PBS ile iki kez yıkandı ve besi yerleri değiştirildi. Kontrol grubuna sadece besi yeri verilirken deney gruplarını oluşturan kuyucuklara 5%, %25 ve %50 oranında ABS içeren 30 µl besi yeri ilave edilerek 24 saat beklendi. Daha sonra endotel hücrelerini saymak için kültür kabı içerisindeki hücreler PBS ile üç kez yıkandıktan sonra 20 µl tripsin/EDTA eklenerek 1-2 dk 37°C'de bekletildi. Sonra 40µl medium ilave edilerek 10 dk 1000 rpm'de santrifüj (bu işlem iki kez yapıldı) edildi. Eppendorf dibinde kalan pellete 20µl kadar medium ilave edilerek pipetör ile hücreler iyice süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 10µl alınarak başka bir eppendorf tüpüne kondu. Üzerine 10µl Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Hazırladığımız süspansüyondan 10 µl alarak Thoma lamına aktarıldı ve mikroskop objektifi X40'e ayarlanarak sayma alanı bulundu. Hücreler tek tek sayılarak not edildi. Toplam hücre sayısı HsxDoxSs formülüne göre hesaplandı. Hücreler daha sonra 96 kuyucuklu kültür kabına kontrol ve deneysel gruplar şeklinde eşit oranda ekildi.

4.BULGULAR

Bölüm 3.3'de detaylı olarak belirtildiği gibi her bir göbek bağından izole edilen endotel hücreleri 25 cm²'lik kültür kabına ekildi. Sonra 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün kültür kabına mikroskop altında X 10 büyütmede incelendiğinde bazı hücrelerin kültür besi yeri içinde yüzerken bir kısım hücrenin kültür kabının zeminine tutunduğu gözlemlendi. Bu hücrelerin çoğu küçük koloniler oluşturmuştu ve koloniler arasında birçok hücre vardı (Resim 4.1). Mikroskopun X20 büyütmesinde bakıldığında ise çekirdek ve sitoplazması ayırt edilebilmekteydi. Endotel hücrelerinin poligonal bir şekle sahip olduğu ve sitoplazmik

uzantıları açık bir şekilde görünmekteydi (Resim 4.1). Üçüncü ve dördüncü günlerde de kültür kabındaki hücreler tekrar incelendi ve dördüncü günde bazı kültür kabındaki hücrelerin kabin tabanını %90 oranında kapladığı (konfluense ulaştığı) görüldü. Göbek bağından izole edilen ve in vitro olarak çoğaltılmış hücreler pasaj 2’de konfluense ulaşınca Thoma lamında sayıldı. Yaklaşık olarak %70-80 oranında konfluense ulaşan 75 cm²’lik kültür kabındaki hücreler sayıldığında 2 000 000 (1X10⁶) civarında hücre olduğu tespit edildi.

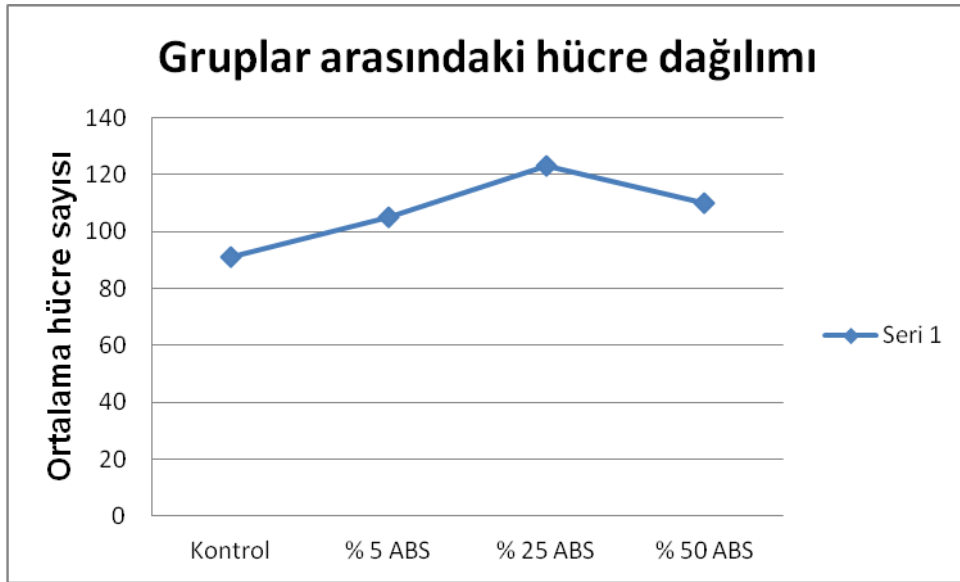


Resim 4.1: A-Bir gece inkübasyondan sonraki hücrelerin görünümü, B-Konfluense ulaşan endotel hücrelerin görünümü, C- ABS uygulanan HUVEC'in ilk 30 dakikadaki görüntüsü, D-ABS uygulanan HUVEC'in 24 saat sonundaki görüntüsü

ABS'nin değişik dozlardaki (5%, %25 ve %50 oranında ABS) etkisini ölçmek için sayımı yapılan hücrelerden her bir kuyucuğa 50 000 (5X10⁴) hücre düşecek şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. HUVEC'lere ABS muamelesi boyunca, mikroskopik olarak hücrelerin yüzeyden kalktığı ve birbirlerine yapıştığı ve 24 saat sonra ise normal büyümelerine ve fonksiyonlarına döndükleri gözlemlenmiştir. 24 saat sonra hücreler kuyucuklardan kaldırılarak sayıldığında kontrole göre %25 ve %50 ABS uygulamasında artışın olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05). Doza bağlı olarak deney grubu hücrelerinde bir artışın olduğu görüldü. (Grafik 4.1). Kontrol ve deney gruplarından elde

edilen ortalama hücre sayısı sırasıyla $5,68 \times 10^4 (\pm 1,7)$, $6,56 \times 10^4 (\pm 1,09)$, $7,12 \times 10^4 (\pm 1,14)$, $7,43 \times 10^4 (\pm 0,89)$ * idi. Deney gruplarındaki hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deney gruplarındaki hücre azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

5%, %25 ve %50 ABS eklenen gruplar kendi aralarında değerlendirildiği zaman hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ($p > 0,05$).



Grafik 4.1: Doza bağlı olarak gruplar arasındaki hücre dağılımı

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

ABS, geleneksel olarak Türk tıbbında kullanılan beş bitkisel içeriğin çeşitli oranlarda kullanılması suretiyle hazırlanan hemostatik bir ajandır. Aynı zamanda, damar endoteli, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri olan bitkisel bir karışımdır. Bitkilerden alınan ekstraktların standardize karışımından oluşan stabil ve steril bir üründür: 100 ml'lik ekstrakta 7 g Glycrrhiza glabra (Meyan), 8 g Vitis vinifera (Asma), 7 g Alpinia officinarum (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, 5 g Thymus vulgaris (Kekik) kurutulmuş ot ekstresi ve 6 g Urtica dioica (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi içerir (14,15). Buradaki her bir bitkinin etkisi farklıdır. ABS, fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ve eritrositlerin plazma ve serumda "protein ağı" meydana getirmesi suretiyle etkisini göstermektedir. Etkisi

çok hızlı başlamaktadır ve ABS'nin seruma eklemesi ile tıkaç etkisi sağlayan enkapüle protein ağı formasyonu bir saniyeden daha kısa sürede meydana gelmektedir. ABS'nin etkilerine bağlı olarak oluşan ağın koagülasyon ve hemostaz adına muhtemel reaksiyonları durdurma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir. ABS pıhtılaşma faktörleri dışında tüm fizyolojik süreci etkilemektedir. Bu yüzden ABS hem normal hemostaz parametlerine sahip bireylerde hem de primer hemostazı bozuk hastalarda ve/veya yaygın damar içi koagülasyonu olan hastalarda (faktör eksiklikleri, DIC vb.) etkili olmaktadır. Pıhtılaşma faktörleri ABS'den etkilenmese de, protein agregasyonu sayesinde anti-hemorajik süreç başlamaktadır (16,17).

Eritrosit agregasyonu, yüksek molekül ağırlıklı plazma proteinlerinin (örneğin; fibrinojen ve immunglobulinler) tespitiyle saptanmaktadır (17). ABS'nin hemostatik etkisini oluşturan temel mekanizma yapılan bir laboratuvar çalışmasıyla ortaya konmuştur. Bu çalışmada, ABS, plazma ve serum içinde çok hızlı (1 saniyeden kısa; saliseler düzeyinde) protein ağı oluşumuna sebep olmuştur. Plazma ve serumdaki ağ oluşumları, ABS'nin fibrinojen ve diğer proteinleri ağ oluşturmak için çöktürdüğüne işaret etmektedir. Plazmaya ABS eklenmesini takiben plazma fibrinojen aktivitesi ve fibrinojen antijeninde belirgin bir düşüş olmakta ve buna bağlı trombin zamanı (TT) da uzamaktadır. Fibrinojen azaldıkça eritrosit agregasyonu artar. Böylece ABS, fibrinojen–eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır. Tıkaç etkisi gösteren bu protein ağı oluşumu sırasında ayrıca plazmada; total protein, albumin ve globulin seviyelerinin de anlamlı oranda düştüğü görülmüştür (16). Ancak, yapılan biyokimyasal ölçümlerde, pıhtılaşma faktörleri üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXIII, ağ oluşumdan etkilenmediği için muhtemel kanamayı durdurma sürecinin ABS'nin fibrinojen ve diğer protein moleküllerinin aglütinasyonunu sağlayarak bir ağ oluşturması yoluyla olduğu düşünülmektedir. Eritrositler ve plateletler bir araya gelerek ağ oluşumuna katılmışlardır. Yani ABS'nin temel etki mekanizması, eritrosit yığınları için odak noktası olan protein ağı oluşumuna neden olmasıdır. Bu gözlemlere dayanarak ABS ağının herhangi bir pıhtılaştırıcı faktörü eşit olmadan etkileyerek tüm fizyolojik hemostaz sürecini kapsadığı hipotezi geliştirilebilir. ABS'nin varlığında kırmızı kan hücreleri eritrosit blokları oluşturmak için bir araya gelmişlerdir. Bu andan sonra normal hemostatik elemanlar ağ oluşumu süresince ayrılmışlar, muhtemel kanama durma süreci özellikle protein aglütinasyonuna bağlı olarak yürütülmüştür. Belli bölgede ABS'ye maruz kalınması doku oksijenasyonu ile birlikte herhangi bir pıhtılaştırıcı faktörünü devreye sokmadan fizyolojik

süreci sağlamaktadır. Bu benzersiz mekanizma ABS“ye diğer hemostatik etkili aktif bitki özlerine göre avantaj sağlamaktadır. Bu süreçte doku onarımına izin verecek düzeyde kan durdurulması işlemi temel olarak protein eritrosit etkileşimi ile bağlantılıdır. Kan hücreleri de bu ağa eşlik ederler. ABS ağında fizyolojik hemostatik işlem doku faktörü-bağlantılı kan pıhtılaşımı yapısından bağımsız olarak, bu sistemi bozmadan gelişir (16,18,19).

ABS klinikte ilk olarak, hemofili A tanısıyla takip edilen ve sünnet sonrası sızıntı tarzında kanaması olup, yüksek dozda faktör VIII tedavisine yanıt vermeyen ve ilave olarak alınan önlemlere rağmen kanaması devam eden bir hastada denenmiştir. ABS“nin kanayan yere yüzeysel olarak sürülmesini takiben birkaç dakika içinde kanamanın tamamen durduğu görülmüştür (20).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, gruplardan birine serebral doku üstüne 1 ml serum fizyolojik ve diğerine 1 ml ABS uygulanmış ve gruplar değerlendirildiğinde her iki grupta da belirgin ödem, nöronal dejenerasyon, inflamatuvar hücre olmadığı ve nöron sayılarında normale göre belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu, AB“nin beyin cerrahisi ameliyatlarında hemostaz için kullanılabileceği düşünülmektedir (21).

Domuzda arter, ven, karaciğer, yüzeysel ve derin cilt kesisi kanamalarında etkin hemostaz sağlamaktadır. Ayrıca, farklı preparat ve uygulama şekillerinin de etkisi araştırılmıştır. Sprey, ampul ve tampon şeklinde kullanımının cilt yaralanmalarında güçlü hemostatik etki gösterdiği, ancak damar yaralanmalarında tampon formunun daha etkili olduğu saptanmıştır (22).

Topikal ABS kullanımı, aspirin, warfarin ve enoksaparin kullanılarak antikoagülan tedavi uygulanan ratlarda, kanama süresini ve miktarını anlamlı derecede azaltmıştır. Böylelikle ABS“nin in vivo ortamda da etkili olduğu ortaya konmuştur (15).

Böbrek dokusu üzerindeki hemostatik etkinliği de araştırılmıştır. Bu çalışmada, ABS uygulaması sonucunda histopatolojik olarak eritrosit agregasyonu görülmüştür. Bu da ABS“nin hemostatik mekanizmasının böbrekte de oluştuğunu desteklemektedir. ABS“nin, renal travma sonrası gelişen kanama üzerindeki etkinliği de araştırılmıştır. ABS uygulanmasıyla, böbrek dokusunda, histopatolojik olarak dev hücre reaksiyonu, akut inflamasyon, fibrozis, adezyon, tiroidizasyon, fibroblast aktivasyonu, kalsifikasyon ve glomerüler nekroz saptanmıştır. Bu bulgular ABS“nin renal doku üzerindeki pozitif etkileri

arasındadır. Ayrıca, eritrosit agregasyonu, mikrovasküler proliferasyon gibi böbrek histopatolojisinde olumlu değişiklikler de gözlenmiştir (23).

Sonuç olarak, HUVEC'lere ABS muamelesi boyunca, mikroskobik olarak hücrelerin yüzeyden kalktığı ve birbirlerine yapıştığı ve 24 saat sonra ise normal büyümelerine ve fonksiyonlarına döndükleri gözlemlenmiştir. Bu da ABS'nin adeziv hücre sel fonksiyonlarının geri dönüşümlü olduğu ve muamelenin ardından zaman geçtikçe başlangıç durumuna döndüğünü düşündürmektedir. Bu bulgulara dayanarak ABS'nin ani kanama durdurucu etkisine ışık tutulmuştur.

6.KAYNAKALAR

1. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, Firat HC. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stoper. *J Int Med Res* 2008;36:163-70.
2. Jy W, Horstman L, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2:1842-1851
3. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?. *European Journal of Clinical Investigation* 2004;34: 392–401.
4. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg* 2006;61:213-9.
5. Jimenez JJ, Jy W, Mauro M, et al. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *British J Haematol* 2001;112:81-90
6. Robert S, Meideli MD. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Am J Med. Sci.*1994;307:378-89
7. Jimenez JJ, Jy W, Mauro M, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research* 2003; 109:175–180
8. Mizrahi LB, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145:962–970
9. Minager A, Jy W, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2001;56:1319-1324
10. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Clin Invest* 1999;104:93-102.
11. Kakishita E, Nakajima T, Suehiro A, Koyama T, Ueda M, Tsujioka H, Yoshimoto H. Studies of the pathogenesis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pol J Pharmacol* 1996;48:179-84.

12. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745–2756.
13. Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi 2009;128.
14. Haznedaroglu, I. C. Time to take a healthier view of history. *Nature*, 1998; 396 (6707);108.
15. Kosar, A., Cibil, H. S., Kaya, A., Uz, B., Haznedaroglu, I. C., Goker, H., Ozdemir, O., Ercetin, S., Kirazli, S. Firat, H. C. The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009;20 (3); 185-90.
16. Göker H, K. E., Uçar Çetinkaya D, Büyükasık Y, Aksu S, Turgut M, Haznedaroglu İC. Ankaferd®'in in vitro ortamda insan kolon kanseri hücreleri üzerine olan antikanser aktivitesi. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı 2008,P044 no "İubildirir, Antalya.
17. Reinhart, W. H. Nagy, C. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest*, 1995; 25 (7); 523-8.
18. Akar, N., Demiralp, D. O. Haznedaroglu, I. Functional Proteomics of Ankaferd Blood Stopper. *Blood*, 2008;112; 4103.
19. Aydın, S. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*, 2009;37 (1); 279.
20. Oner, A. F., Dogan, M., Kaya, A., Sal, E., Bektas, M. S., Yesilmen, O., Ayhan, H. Acikgoz, M. New coagulant agent (ankaferd blood stopper) for open hemorrhages in hemophilia with inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost*, 16 (6); 705-7.
21. Ulaş, D. A. K. Kanama Durdurucu Ajan Ankaferd Blood Stopper®'in Serebral Doku Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi ve Santral Sinir Sisteminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2009.
22. Karabıyık, A. K. Ankaferd ve defibrotid'in endotel hücre modelinde endotelial protein C reseptörü (EPCR), plazminojen aktivatör inhibitör-1(PAI-1) ve trombin reseptörü (PAR-1) gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, 2011.
23. Huri, E., Akgul, T., Ayyıldız, A., Ustun, H. Germiyanoglu, C. 2009. Hemostatic role of a folkloric medicinal plant extract in a rat partial nephrectomy model: controlled experimental trial. *J Urol*, 181 (5); 2349-54.