

Ginkgo biloba ekstresinin dondurulmuş-çözölmüş sıçan kornea epitel hücrelerinin viabilitesine etkisi

Mehmet Okka¹, Murad Aktan²

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi ¹Göz Hastalıkları ve ²Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalları, Konya

Amaç: Doku organizasyonundan hücre süspansiyonu haline getirilen kornea epitel hücrelerinin dondurulup-saklama sonrası viabilite oranına ginkgo biloba ekstresi (EGb 761)'nin etkisinin araştırılması. **Yöntem:** Wistar albino tipinde 7 adet erkek sıçanın korneaları 360° limbal insizyon ile eksize edildi. Korneaların epitel tabakaları hücre süspansiyonu haline getirildi. Epitel hücreleri homojenize edilerek iki adet tüpe dağıtıldı. Tüplerden bir tanesine EGb 761 ilave edilerek hızlı bir dondurma işlemi uygulandı. Dondurma işlemi öncesi ve dondurulup saklandıktan sonra ısıtılmayı takiben Eosin-Y ile viabilite ölçümü yapıldı. **Bulgular:** Dondurma işlemi öncesi Eosin- Y ile yapılan viabilite ölçümlerinde kontrol grubu viabilite ortalaması % 45.5, EGb 761 grubu viabilitesi ortalaması % 37.5 bulunmuştur. Bu iki grup arasında viabilite açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (P= 0.061). Isıtıp çözme işlemi takiben viabilite ölçümü ortalamaları ise kontrol grubunda % 15.8, EGb 761 grubunda ise % 31.08 olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görölmüştür (P= 0.0002). **Sonuç:** EGb 761 ilavesi sıçan kornea epitel süspansiyonunun dondurulup-saklanmasında koruyucu bir etki göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kornea epiteli, EGb 761, hücre viabilitesi, hücre süspansiyonu

The effect of ginkgo biloba extract on the viability of freeze-thawed rat corneal epithelial cells

Objective: To dissociate rat cornea epithelium tissue to single cell suspension and to explore if adding Ginkgo Biloba extract (EGb 761) has an effect on viability after freeze-thawing procedure. **Methods:** Corneas of seven Wistar Albino rats were obtained by 360° limbal incision. After dissociation was achieved the cell suspension was divided into two tubes, and to one of them EGb 761 was added. Viability was evaluated in groups before and after freeze-thaw procedure. **Results:** The viability of cells before freezing was 45.5% and 37.5%, respectively for control and EGb 761 treated group, there was no statistical difference (P=0.061). After thawing procedure the viability was 15.8% and 31.8% respectively which has a statistical difference (P= 0.0002). **Conclusion:** It can be concluded that EGb 761 has a protective effect for cryopreservation procedure for rat corneal epithelial cell suspension.

Key words: Cornea epithelial cell, EGb 761, cell viability, cell suspension

Genel Tıp Derg 2002;12(2):57-60

Kornea epiteli yüzey ektoderminden gelişir. Kornea epiteli ile endotelyumu arasında mezodermal fibroblastlar göç eder; kornea stroması bu fibroblastlar ve bunların salgısı ile oluşan proteoglikan ve kollajen liflerden oluşur. Kollajenlerin ortogonal tabakalar halinde düzenlenmiş olması sayesinde saydamlık gerçekleşir

Yazışma adresi: Dr. Mehmet Okka, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı 42080, Meram, Konya.

(1). Günümüzde hücre kültürü çalışmaları toksikolojik araştırmalar yanında doku mühendisliği biliminin yoğun ilgisi altındadır. Deride epitel dermisten ayrıştırılıp saf epitel hücre süspansiyonu meydana getirilmekte ve ileri derecedeki deri hasarlarında kültüre edilip başarı ile uygulanmaktadır (2,3). Ksenograftik hücre uygulamaları ve ileri gen tedavi teknikleri epitelde uygulanmış (4), klinik kullanımda epitel hücre bankalarının oluşturulması da gündeme gelmiştir (5).

Genel Tıp Derg 2002;12(2)

Ginkgo bilobanın kornea viabilitesine etkisi-Okka ve Aktan

Ginkgo biloba ağacının yapraklarından elde edilen ekstre 5000 yıldan beri geleneksel Çin tıbbında kullanılmaktadır. Günümüzde tıbbi kullanım için standardize edilerek EGb 761 (Tebokan, Tanakan, Seremaks) adıyla piyasaya sunulan bu maddenin başlıca etkileri platelet aktive edici faktör inhibisyonu, serbest oksijen radikallerinin giderilmesidir ve diyabetik retinopati, retina damar tıkanıklıkları ve senil makula dejenerasyonu gibi göz hastalıklarında etkili olabileceği bildirilmiştir (6-8).

Kornea epitelini araştırmaları için tavşan dışında model olarak kabul gören bir diğer hayvan sıçandır (9-11). Çalışmamızda ginkgo biloba ekstresinin yukarıda saydığımız özelliklerinden yararlanarak sıçan korneasının epitel hücrelerinin süspansiyon haline getirilmesi ve çok geniş etki spektrumu ile dikkati çeken ginkgo biloba ekstresi EGb 761 ile muamele edilip viabilite değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem

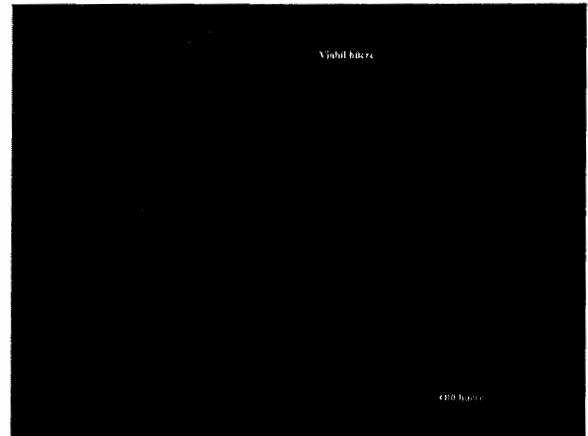
Wistar Albino tipinde 7 adet erkek sıçan (15-19 aylık, 240-270 gr) yüksek doz ketamin hidroklorid (100-150 mg/kg) i.m. anestezisi uygulandıktan sonra kantatomize edilerek 360 derece limbal insizyon ile kornea dokuları eksize edildi. Bu şekilde toplam 14 kornea parçası DMEM (Sigma, D-5796) solüsyonu içerisinde toplandı ve laboratuara ulaştırıldı. Burada laminar akım kabini içerisinde her kornea % 70 alkol içerisinde daldırılıp çıkarıldı ve iki defa DMEM solüsyonu ile yıkandıktan sonra 5-7 ml % 10 tripsin-EDTA (Sigma, T-4174) (DMEM'li) enzimi ihtiva eden plastik petri kutular içerisinde konuldu, her kutu 5 kornea dokusu olacak şekilde yerleştirme yapıldı ve % 5 CO₂, % 96 nem ortamına ve 37° ısıya sahip inkübatöre konuldu. Enzim etkisi ile kornea epitelini özellikle uç kısımlardan ayırışmaya girmektedir. Çalışma grubunda 30. dakikadan sonra steriomikroskop altında kontroller yapıldı ve 45. ile 80. dakika arasında uçlardan ayırışma tespit edilen epitel tabakaları ince penslerle steriomikroskop yardımı ile sıyrılarak ayrıldı. Sıyrılan epitel tabakaları % 15 fetal dana serumu (FCS) (Sigma, F 4135) (DMEM'de) ihtiva eden petri kutularında toplandı ve cerrahi bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıştırıldı. Bu işlemi takiben doku parçaları Tripsin-EDTA içeren 30 ml medium bulunan polisteren şişeye konuldu. Mekanik karıştırıcı ve teflon stirrer

(Sigma, Z11,534-7) ile düşük devirde 25 dakika karıştırma yapıldı. Takiben süpernatanttan eşit volüme % 15 FCS'li medium ilave edilerek santrifüj tüplerinde toplandı ve 10 dakika 1100 devirde santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1.0 ml % 7 FCS'li DMEM ilave edildi, böylece epitel tabakasının hücre süspansiyonuna dönüşmesi için işlem tamamlanmış oldu. Makler sayım kamarası ile epitel hücre sayısı hesaplandı.

Süspansiyon homojenize edilip 0.4 ml volüm iki eşit tüpe dağıtıldı. Tüplerden birine sıvı formdaki 100 mikrolitre EGb 761 (Tebokan®) ilavesi yapıldı ve sonuç olarak 320 miligram ekstre ilave edilmiş oldu. Kontrol tüpüne ise 100 mikrolitre medium ilavesi yapılarak 30 dakika inkübe edildi.

Bu şekilde her iki tüpten 6'şar örnek alındı ve eosin-Y ile viabilite tayini, 200 adet hücre sayılarak boya alan koyu kırmızı renkli hücreler ölü, boyayı içine almayan şeffaf-açık renkli hücreler canlı sayılarak yapıldı (Şekil 1). Tüpler santrifüje edildi, süpernatant atıldı, pellet üzerine 0.5 cc DMEM ilave edildi, pellet süspansiyon edildi.

Takiben Test Yolk Buffer (Irvine Scientific, 9971) uygulaması ile strawlara çekilen epitel hücreleri sıvı azot yardımı ile önce -30° (20 dakika) ve sonra direkt -196° içerisine daldırıldı ve bu şekilde iki hafta saklandı. Çalışma ve kontrol grubunun 4'er straw'ı vardı.



Şekil. Eosin-Y viabilite testi invert mikroskop ile görüntüsü (x 40 objektif). Boyayı alan hücre (koyu kırmızı) ölü, boyayı almayan şeffaf görünümlü hücre viabilidir

Strawların ısıtıp çözme işlemi yapıldıktan sonra iki grup ayrı tüplerde toplandı ve Eosin-Y ile viabilite tayini yapıldı.

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde; grupların önceki ve sonraki değerlerinin ortalamalarının kendi içlerinde karşılaştırılmasında "bağımlı gruplarda Student'ın t testi", kontrol ve diğer araştırma gruplarının değerlerinin karşılaştırılmasında ise "bağımsız gruplarda Student t testi" kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Doku disosiasyonu tekniği ile 14 adet kornea epitel tabakasından toplam 11,600,000 epitel hücresi elde edildiği Makler sayım kamarası ile tayin edildi.

Kontrol ve EGb 761 ile muamele edilen epitel hücrelerinin Eosin-Y ile yapılan 6 viabilite ölçümü sonuçları Tablo 1'de gösterilmektedir. Kontrol grubu viabilite ortalaması % 45.5, EGb 761 grubu viabilitesi ortalaması % 37.5 bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($P = 0.035$). Isıtıp çözme işlemi takiben viabilite ölçüm sonuçları ise Tablo 2'de sunulmuştur. Kontrol grubu viabilitesi ortalama % 15.83, EGb 761 grubu viabilitesi % 31.08 olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($P = 0.0002$).

Tartışma ve sonuç

Ginkgo biloba ekstresinin kornea epitel süspansiyonu dondurup-çözme işlemine etkisinin sebebini açıklayamadık, ancak EGb 761'in antioksidan veya

Tablo 1. Dondurma işlemi öncesi grupların viabilitesi

Sayım No	Kontrol grubu viabilitesi (%)	EGb 761 grubu viabilitesi (%)
1	46.0	42.0
2	44.5	36.0
3	41.5	40.5
4	53.0	35.5
5	36.5	28.0
6	52.0	43.0
Ortalama	45.58	37.5

Tablo 2. Dondurma işlemi sonrası ısıtılıp çözülen epitel hücrelerinin gruplara göre dağılımı.

Sayım No	Kontrol Grubu Viabilitesi (%)	EGb 761 Grubu Viabilitesi (%)
1	12.0	28.0
2	21.5	32.5
3	17.0	37.5
4	10.5	27.0
5	11.5	28.0
6	22.5	33.5
Ortalama	15.83	31.08

serbest radikal temizleyici (scavenger) etkisinin (12) dondurma işleminin hücre membranı üzerine hasarına karşı koruduğunu düşündük. EGb 761 bitkisel kaynaklı olup çok değişik kimyasal bileşikler içermektedir. Dolayısıyla bileşenlerinin etkilerinin ayrı ayrı üzerinde durmanın yanlış olacağı, ilacın toplam etkisinin göz önünde tutulmasının gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Bulgularımıza göre EGb 761'in, sıçan kornea epitel süspansiyonu dondurup-çözme işlemine olumlu etkisi olduğu kanaatine varıldı.

Klinik olarak epitel bazal membran hasarının oluştuğu kornea alkali yanıkları gibi korneanın ileri derecede etkilendiği durumlarda kornea matriksinde yıkıma yol açan kollajenaz ve degradatif enzimlerin, epitel hücreleri, fibroblastlar ve polimorf nüveli lökositlerden salındığı ileri sürülmektedir. Bu hücrelerden polimorf nüveli lökositlerin serbest radikal üretiminde vücuttaki en önemli kaynaklardan biri olduğu anlaşılmıştır. Serbest radikaller ise antimikrobiyal savunma sistemi, iskemi-reperfüzyon hasarı, immün ve enflamatuar olaylar, tümör gelişimi, yaşlılık ve ilaç metabolizması gibi durumlarda önemli rol oynayan toksik ürünlerdir (12,13). Zengin ve ark (14) yaptıkları bir çalışmada kornea alkali yanıklarında ginkgo biloba ekstresinin büyük oranda serbest radikal giderici özelliğinin olduğunu ve yara iyileşmesinde olumlu katkısının olabileceğini vurgulamışlardır.

Kornea epitel hücre manipülasyonunda başarılı olacak bir tekniğin geliştirilmesi, toksikoloji, ksenotransplantasyon immünolojisi ve epitel hücre

biyolojisi çalışmaları gibi birçok olarak sağlamaktadır.

Sonuç olarak ginkgo biloba ekstresi ilavesi ile dondurulan kornea epitel hücreleri süspansiyon haline getirilerek değişik etmenlere bağlı olarak gelişen kornea erozyonlarında, kornea yara iyileşmesinde kullanılabilirler. Kornea epitel süspansiyonuna değişik maddelerin katılması ile ilgili deneysel çalışmalarımız halen devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Kurt EJ. In: Human Development Anatomy. Wiley; Pennsylvania, 1988; p: 345.
2. Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer GG. Skin generated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wound from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. Lab Invest 1989;60:600-12
3. Rheinwald JG, Gren H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes the formation of keratinizing colonies from single cell. Cell 1975;6:331-44.
4. Lindberg K, Rheinwald JG. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. Differentiation 1990;45:230-41.
5. Okka M, Aktan M. Kornea epitel hücre bankası oluşturulmasında uygulama araştırmasının ön sonuçları. T Oft Gaz 2000;30:634-38.
6. Ginkgo biloba extract (Egb 761) in perspective AIDS. Pres Ltd, Auckland 1990;1-6.
7. Lebutsson DA, Leroy Y, Rigal G. Treatment of senil macular degeneration with ginkgo biloba extract: A preliminary double-blind study versus placebo. Presse Medicale 1986;15:1556-8.
8. Szabo ME, Droy LE, Doly M, Carre C. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina, demonstration of a free radical- mediated mechanism. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:1471-8.
9. Sakemi F, Nakayasu K, Okisaka S. Mitotic activity of rabbit corneal epithelium in vitro, Nippon Ganka Gakkai Zasshi 1991;95:721-7.
10. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: Structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas, Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:1063-9.
11. Jozwiak J, Skopinski P, Komar A, Wojcik A, Malejczyk J. Characterisation of epithelial cell line from rat cornea, Eye 2001;15:82-8.
12. Kenyon KR, Berman M, Rose J, Gage J. Prevention of stromal ulceration in the alkali burned rabbit cornea by flueddon contact lens evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degraation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1979;18:570-6.
13. Kenyon KR. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. Trans Am Ophthalmol Soc 1985;83:610-63.
14. Zengin N, Vural Ö, Kurt E, Gündüz K, Acaroğlu Ş, Okudan S. Tavşan kornea alkali yanık modelinde ginkgo biloba ekstresinin yara iyileşmesine etkisi. MN Oftalmoloji 1993;2:57-9.