

Fetal Calf Serumunun Taze Aortik Heterogreftlerdeki Fibroblast Canlılığına Etkisi[#]

Serdar AKGÜN*, Ali CİVELEK*, Selim İŞBİR*, Koray AK*, Emel DEMİRALP**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul

* Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

** Hematoloji Bilim Dalı

Bu çalışmada fetal calf serumunun antibiyotik ile sterilize edilmiş taze aortik heterogreftlerdeki fibroblast canlılığına etkisi incelenmiştir.

Kırkiki ristar sıçanın aortik kapakları üç grupta (kontrol, Hank ve fetal calf solusyonu) incelenmiştir. Her grup inceleme zamanına göre (48, 96 ve 196 Saatler) kendi içinde üçe ayrılmıştır. Fibroblast canlılığı flow cytometric yöntem ile belirlenmiştir.

İstatistiksel analiz fetal calf soluyonu grubunda özellikle 48. ve 96. saatlerde daha iyi fibroblast canlılığı olduğunu göstermiştir. Fetal calf serumu fibroblast canlılığı üzerinde olumlu bir etki yapmıştır. Fetal calf serumu taze antibiyotikli aortik allograft saklanması için diğer solusyonlara alternatif olabilir.

Anahtar sözcükler: Fetal calf serumu, heterogreft, fibroblast

GKDC Dergisi 1999; 7: 170-174

Effect of Fetal Calf Serum on the Fibroblast Viability of Fresh Aortic Heterografts

The present study examines the effect of fetal calf serum on the fibroblast viability of fresh antibiotic sterilized aortic heterografts.

Aortic valves of forty-two ristar rats are examined in three (control, Hank's and fetal calf solutions) groups. Each group is divided into three groups according to the time scale (48, 96 and 196 hours). Fibroblast viability is measured by flow cytometric assay.

Statistical analysis revealed better fibroblast viability especially in 48 and 96 hours. Fetal calf serum has additive effects on the viability of fibroblasts. Fetal calf serum can be used as an alternative solution than the other ones for fresh antibiotic sterilized aortic allografts.

Fetal calf serum has additive effects on the viability of fibroblasts. Fetal calf serum can be used as an alternative solution than the other ones for fresh antibiotic sterilized aortic allografts.

Key words: Foetal calf serum, heterograft, fibroblast

Giriş

Aortik allograft kapak replasmanının ilk defa Ross (1) tarafından tanımlanmasından itibaren günümüze kadar geçen süre içerisinde kullanım alanı giderek genişleyen bir yöntem olarak, özellikle aort kapak replasmanlarında kullanılmaktadır.

Aortik allograftlar alternatif prostetik kapaklara nazaran daha iyi hemodinamik performans göstermesi, antikoagülasyon gerektirmemesi, minimal tromboembolik komplikasyon görülmesi

ve uzun dönem dayanıklılıkları (durability) nedeniyle tercih edilmektedir (2,3). Allograft kapakların durabilitesinin ise implantasyon anındaki fibroblast canlılığına bağlı olduğu kabul edilmektedir (4). Günümüzde bu canlılığı uzun dönemde en iyi sağlayan tekniğin krayoprezervasyon olduğu kabul edilmekle birlikte, bu yöntemin uygulanabilmesi için soğuk nitrojen tankına gereksinim olduğu için, açık kalp cerrahisiyle yoğun olarak uğraşan birçok merkezde dahi krayoprezervasyon uygulanamamakta donörlerden elde edilen aortik homogreftler

antibiyotikle sterilize edilmiş Hank's solüsyonunda saklanarak mümkün olan en kısa sürede alıcıya implante edilmektedir.

Bu deneysel hayvan çalışmamızda, aortik homogreftlerin taze olarak saklanması için kullanılan solüsyon değiştirildiğinde fibroblast canlılığında meydana gelen değişiklikleri incelemeyi ve aortik heterogreftleri taze olarak daha uzun sürelerde daha yüksek canlılıkta saklamayı amaçladık. Bu çalışma ile heterogreftlerin üzerinde elde edilen sonuçların homogreftler içinde geçerli olabileceği noktası klinik uygulamaya geçişte yararlı olabileceği düşüncesindeyiz.

Materyal ve Metod

Aortik homogreftlerin hazırlanması ve saklanması; Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Çalışma Etik Kurulunca incelenmiş ve onaylanmıştır. Hayvanların sakrifiyasını da Etik Komitemizin kabul ettiği yöntemlere göre yapmıştır.

Çalışmada kırkiki adet ortalama 300 gr ağırlığında ristar sıçan aort kapağı inceleme için kullanılmıştır. Tüm aortik heterogreftler hayvanlar sakrifiye edildikten sonra sterilizasyon şartlarına azami ölçüde riayet edilerek medyan sternotomiye kalp ve çıkan aorta bütün olarak çıkarılarak saklama solüsyonlarına konulmuştur. İnceleme öncesinde aortik homogreftler 2.5 büyütme cerrahi gözlük kullanılarak çıkan aorta ve kalpten diseke edilerek hazırlanmışlardır.

Sıçanlar üç gruba bölünerek incelemeler yapılmıştır. Birinci grupta 6 adet sıçan aortik heterografti çıkarıldıktan iki saat sonra incelenerek bazal fibroblast canlılığı ölçülmüştür. Bu ölçümler istatistiksel karşılaştırmada kontrol grubu değerleri olarak kabul edilmiştir.

İkinci gruptaki 18 aortik heterogreft antibiyotikle sterilize edilmiş "Hank's solüsyonunda" +4 °C'de saklanarak 6'lı gruplar halinde 48., 96. ve 168. saatlerde fibroblast canlılığı ölçülmüştür.

Üçüncü gruptaki 18 aortik homograft ise yine +4 °C %19 fetal kalf serumuyla zenginleştirilmiş TC-199 kültür medyumuna %5 HEPES buffer ve Hank's solüsyonunda bulunan antibiyotikler hastanemiz eczanesinde aynı oranda (Cefoxitine 1000 mg/lt, Lincomycin 600 mg/lt, Vancomycin 500 mg/lt, Polymixine B 500 mg/lt, amphotericine B 100 mg/lt) ilave edilerek yapılarak elde edilen "Fetal Calf Koruyucu Solüsyonunda" saklanmıştır. Yine 48., 96. ve 168. saatlerde fibroblast canlılığı ölçülmüştür.

Fibroblast Canlılığının Ölçülmesi;

Aortik heterogreftler %0.5 tip II Kollejenaz (Sigma Corp, St. Louis MO) içeren Eagle's minimal essential medyuma (MEM) koyularak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Endoteliyal tabaka dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra aort kapağı fosfat buffer solüsyonuyla (PBS) yıkanarak mikromaks vasıtasıyla küçük parçalara bölünüp, parçacıklar tekrar %0.5'lik tip II kollejenaz içeren MEM'e konulup oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve manyetik karıştırıcı ile yaklaşık bir dakika karıştırıldı. Bu solüsyon filtreden (Falcon Cell Strainer-Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) geçirilerek elde edilen supernatant, içinde buzdolabından yeni çıkarılmış ve %10 oranında fetal kalf serumu içeren MEM bulunan test tüplerine transfer edilerek 1.800 devir/dakika ile 8 dakika santrifüje edildi. Elde edilen çöküntü fibroblast hücre örneği olarak kullanıldı. Çöküntü üzerine, boyama amacıyla içinde 1 mol/L fluorescein diacetate (FDA, (sigma Corp, St. Luis MO) içeren PBS ilave edilerek 10 dakika bekletildi. Hücreler tekrar PBS ile yıkanarak fibroblastlara bağlanmayan FDA uzaklaştırıldı. Çöküntü üzerine tekrar 1 mol/lt propidium iodide (PI, Sigma Cokp, St. Luis MO) ilave edilerek 3-5 dakika içinde flowcytometrik yöntemle (Flowcytometride, FACScan; Becton Dickinson) değerlendirildi. FDA pozitif ve PI negatif hücreler canlı fibroblast olarak değerlendirildi. Herbir inceleme için minimum 15.000 hücre sayıldı ve canlılık yüzdeleri 0., 48., 96. ve 168. saatlerde kaydedildi.

Bu sonuçlar Friedman Non-parametrik Tekrarlanmış Ölçüm, Dunn Çoklu Karşılaştırma ve

Mann Whitney testleri kullanılarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bioistatistik bölümüne istatistiki olarak incelendi.

Bulgular

Kırkiki denek hayvanından alınan aortik heterograftlerin flowsaytometri ile 0., 48., 96. ve 168. saatlerde ölçülen fibroblast canlılık yüzdeleri Tablo 1’de verilmiştir.

Hank’s Solüsyonu ve Koruyucu Solüsyon grupları kendi içinde 0., 48., 96. ve 168. Saatlerdeki sonuçları Friedman Tekrarlanmış karşılaştırılmış Ölçüm testine göre anlamlı olarak ($p < 0.0001$) bulunmuştur.

Hank solüsyonu grubunda saatlere göre elde edilen fibroblast canlılık yüzdeleri ise Dunn Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak istatistik olarak incelendiğinde Tablo 2’de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre 0. saat ile 96. saat, 0. saat ile 196. saat ve 48. saat ile 196. saat arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark 0. saat ile 168. saat arasında daha açık bir şekilde gözlenmiştir ($p < 0.001$).

Koruyucu solüsyon grubunun sonuçları da yukarıda anılan aynı istatistiki test ile zamanlara göre karşılaştırmalı sonuçları Tablo 3’de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre 0. saat ile 48., 96. ve 168. saatler arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Koruyucu solüsyon grubunun aynı saatlerdeki fibroblast canlılık yüzdelerinin Hank Solüsyonu sonuçları Mann Whitney Testi kullanılarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 2. Hank Solüsyonu grubunda elde edilen sonuçların kendi içinde saatlere göre Dunn Çoklu Karşılaştırma Testi ile incelenmesi.

Karşılaştırma	p değeri	Anlamlı
0. saat x 48. saat	$p > 0.05$	-
0. saat x 96. saat	$p < 0.05$	+
0. saat x 168. saat	$p < 0.05$	+
48. saat x 96. saat	$p > 0.05$	-
48. saat x 168. saat	$p < 0.05$	+
96. saat x 168. saat	$p > 0.05$	-

Tablo 3. Koruyucu Solüsyon grubunda elde edilen sonuçların kendi içinde saatlere göre Dunn Çoklu Karşılaştırma Testi ile incelenmesi.

Karşılaştırma	p değeri	Anlamlı
0. saat x 48. saat	$p < 0.05$	+
0. saat x 96. saat	$p < 0.05$	+
0. saat x 168. saat	$p < 0.05$	+
48. saat x 96. saat	$p > 0.05$	-
48. saat x 168. saat	$p > 0.05$	-
96. saat x 168. saat	$p > 0.05$	-

Tablo 4. Koruyucu Solüsyonun fibroblast canlılık yüzdelerinin saatlere Hank Solüsyonu grubu ile karşılaştırılması.

Koruyucu x Hank Solüsyon Saatleri	p değeri	Anlamlı
48. saat	$p < 0.05$	+
96. saat	$p < 0.05$	+
168. saat	$p < 0.05$	+

Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde koruyucu grubun Hank solüsyonuna göre canlılık açısından anlamlı bir farklılık gösterdiği ve bu farklılığın 48., 96. ve 168. saatlerin tümünde izlendiği ancak 48. ve 96. saatlerde istatistiki olarak anlamlılık açık bir şekilde görülmesine karşın bu farklılık 168. saatte anlamlılığını korumak ile birlikte fark azalmaktadır.

Tablo 1. 42 denekten alınan aortik heterograftlerin fibroblast canlılıklarının yüzde olarak sonuçları.

Denek	Hank’s Solüsyon Grubu				Koruyucu Solüsyon Grubu		
	0. saat	48. saat	96. saat	168. saat	48. saat	96. saat	168. saat
1	93.8	86.7	66.2	42.4	90.1	75.2	50.4
2	92.0	80.5	71.2	36.2	91.6	78.6	51.6
3	91.6	72.8	68.5	40.6	88.2	80.1	45.2
4	95.3	84.2	65.7	38.7	93.2	81.5	40.1
5	97.4	88.3	66.8	41.3	92.6	78.7	55.3
6	92.5	78.5	72.4	42.7	88.5	79.2	52.6
Mean±SD	93.7±2.1	81.8±2.3	68.4±2.7	40.3±2.8	90.7±2.1	78.8±2.1	49.2±2.2

SS: Standart Sapma

Tartışma

Hank ve Koruyucu solusyonlarda 0. saatte baz alınmak üzere 48., 96. ve 168. saatlerde fibroblast canlılığına bakıldığında (Tablo 1); Hank's solusyonunda belirlenen saatlere göre sırası ile fibroblast canlılık yüzdeleri 81.8 ± 2.3 , 68.1 ± 2.3 ve 40.3 ± 2.8 iken, koruyucu solusyon grubunda gene aynı sıra ile 90.7 ± 2.1 ve 49.2 ± 2.2 olarak saptanmıştır. Zaman içerisinde fibroblastlar canlılıklarını her iki grupta da yitirmektedirler. Fibroblast canlılığındaki azalma istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$).

Her solusyon kendi içinde incelendiğinde (tablo 2); Hank's solusyonu grubuna doğal olarak her zaman diliminde, bir öncekine göre fibroblast canlılığında anlamlı olarak bir azalma göstermektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde 0. ve 196. saatler arasında daha anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Koruyucu solusyon grubunda ise 0. saatteki bazal değerlere göre 48., 96. ve 168. saatlerde fibroblast canlılığında anlamlı bir azalma görülürken 48., 96. ve 196. saatler arasındaki karşılaştırmada fibroblast canlılığındaki azalma istatistiki anlamını yitirmektedir (Tablo 3).

Koruyucu solusyon grubunun aynı saatlerde Hank's solusyon grubuna göre fibroblast canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında (Tablo 4); 48., 96. ve 196. saatlerde anlamlı bir fark daha da anlamlı olarak izlenmektedir ($p < 0.005$). 196. saatte ise istatistiki olarak anlamlı devam etmek ile birlikte fark azalmaktadır ($p < 0.05$).

Aortik allograftlerin kullanıma girmesi ile birlikte klinik olarak dayanıklılığın kapakçıklardaki fibroblast canlılığına bağlı olduğu ifade edilmiştir (5,6).

Hangi koruma solusyonu ya da yöntemi seçilecek olursa olsun klinik uygulamada donör kalp atımı durması ile harvesting arasında geçen zaman kapakçık hasarına neden olmaktadır (7-9).

Bu konuda sıcak iskemi zamanı fibroblast canlılığını etkileyen önemli bir faktör olarak

görülmektedir (10-12). Fibroblast canlılığın özellikle kapak matriksinin bütünlüğü açısından önem taşımaktadır. Bunun yanında fibroblastlar doku canlılığı açısından da araştırılması gereken ideal hücreler olarak değerlendirilmektedirler (13). Fibroblastlar aminoasitler ile birlikte kollajen prokürsörlerinin sentezinde görev almaktadırlar. Bu nedenden dolayı selüler matriks oluşumunda yukarıda belirtildiği üzere stratejik öneme sahiptirler. Bu önem de direkt olarak aortik kapakların canlılığını ve dayanıklılığını etkilemektedir.

Fetal calf serumunun uzun süreli saklamalarda endotel canlılığına olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (14). Fibroblast canlılığı konusunda literatürde bir yayın bulunmamaktadır.

Bu bulgular ışığında Hank solusyonuna göre fetal calf serumu ile elde edilen koruyucu solusyonumuzun aortik heterofrestlerdeki fibroblast canlılığının daha uzun süre koruduğu görülmektedir. Fetal calf serumunun endotel canlılığının yanında fibroblast canlılığına da olumlu etkisi gösterilmiştir. Bu sonuca göre taze anti-biotik solusyonlarına karşın fetal calf serumu da saklanma açısından değerlendirilmesi gereken bir seçenek olarak gözlenmektedir.

Kaynaklar

1. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2: 487.
2. O'Brien MF, McGiffen DC, Stafford EG. Allograft aortic valve replacement. Long-term comparative clinical analysis of the viable cryopreserved and antibiotic 4 °C stored valve. *J Cardiovasc Surg* 1991; 6 (Suppl): 534-43.
3. Angel WW, Oury JH, Lamberiti JJ. Durability of the viable aortic allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 94: 48-56.
4. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH. A comparison of the aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 812-23.
5. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH. Comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 812-23.
6. Mc Nally RT, Brockbank KGM. Issues surrounding the preservation of viable allograft heart valves. *J Med Eng Technol* 1992; 16: 34-8.

7. Hu JU, Gilmer L, Hopkins R, Wolfinger L. Effects of antibiotics on cellular viability in porcine heart valve tissue. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 960-4.
8. Abd-Elfattah AS, Messier RH, Domkowski PW. Inhibition of adenosine deaminase and nucleoside transport. Utility in a model of homograft cardiac valve preimplantation processing. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 1095-105.
9. Kelvin GM, Brockbank M, Carpentier JF, Dawson PE. Effects of storage temperature on viable bioprosthetic heart valves. *Cryobiology* 1992; 29: 537-42.
10. Crescenzo DG, Hilbert SL, Barrick MK. Donor heart valves: electron microscopic and morphometric assesment of celular injury induced by warm ischemia. *J Thorac Caridovasc Surg* 1992; 103: 253-8.
11. Domkowski PW, Meser RH Jr, Crescenzo DG. Preimplantation alteration of adenine nucleotides in cryopreserved heart valves. *Ann Thorac Surg* 55: 413-9.
12. Niwaya K, Sakaguchi H, Kawachi K, Kiatanura S. Effect of warm ischemia and crypreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: S114-7.
13. Gall KL, Smith SE, Wilmette EN, O'Brien MF. Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 1032-8.
14. Feng XJ, Van Hove CE, Walter PJ, Herman AG. Effects of storage temperature and fetal calf serum on the endothelium of porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; Jan; 11 (1): 218-30.

Yazışma adresi: Yard. Doç Dr. Serdar AKGÜN
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
Tophanelioğlu Cad. 13-15
81090, Altunizade, İstanbul
Tel: 216 325 91 33
Faks: 216 325 24 26
E-mail: serdar@turk.net
