Fasudil umblikal ven endotelinde hücre proliferasyonunu artırıyor

Kenan Ahmet Türkdoğan*, Fatma Mutlu Kukul Güven**, Figen Tunalı Türkdoğan***, Mustafa Karabacak****, Hikmet Orhan*****, Zübeyde Akın Polat******, Oğuz Karahan*******.

*Isparta Devlet Hastanesi Acil Departmanı, Isparta/Türkiye
**Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp AD, Sivas/Türkiye
***Isparta Devlet Hastanesi, Radyoloji Bölümü/Isparta.
****Isparta Devlet Hastanesi Kardiyoloji Kliniği/Isparta.
*****Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi AD, Isparta/Türkiye
******Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD, Sivas/Türkiye
*******Dicle Üniversitesi, Kalp Damar Cerrahisi AD, Diyarbakır/Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışma ile rho kinaz inhibitörünün vasküler endotel hücreleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Materyal metod: İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinin (HUVEC) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan elde edildi. Hücreler kuyu başına toplam hacmi 100 µl olan jelatin kaplı mikrotitre plaklar içinde mililitrede 104 hücre olacak şekilde 96 kuyuya ekildi. Bazal grup ile 5mMol ve 6mMol konsantrasyonlarda rho kinaz inhibitörü uygulanan iki grup olmak üzere üç grup oluşturuldu. İlaç uygulanmış kültürler ve ilaç uygulanmayan bazal kültürler 72 saat takip edildi. Bulgular: Kontrol hücreleri ile rho kinaz inhibitörü (fasudil) verilen hücreler arasında doğrusal artan, kuvvetli bir ilişki saptanmıştır. Fasudil konsantrasyonu 5 mMol olanların ortalaması 1.063 iken, 6 mMol olanların ortalaması 1.147 olmuştur. Bu ortalamalar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur (p:0,044). Zamana göre hücre sayılarında 24 saat ile 48 saat süreleri arasında önemli ölçüde fark oluşurken, 48 saat ile 72 saat arasında istatistiksel olarak fark oluşmamıştır. Sonuç: Fasudil endotel hücre üzerine sitotoksisite göstermeyip aksine proliferasyonu arttırıyor. Bu da endotel hücre proliferasyonunun artarak neointimal hiperplazi ile vasküler stenoza neden olan stent stenozu gibi hastalıklar için kötü bir durum oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: fasudil,hücre proliferasyonu,hücre kültürü.

Abstract

Fasudil induced cell proliferatıon in human umbilical ven endothelial cell

Objective: This study investigated the effects of a Rho kinase inhibitor on vascular endothelial cells. Material and Methods: Human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were seeded in 96-well gelatin coated microtiter plates at a concentration of 1×10^4 cells/ml in a final volume of 100 µl per well. Three groups were established: a control group and groups with rho kinase inhibitor (fasudil) added at concentrations of 5 or 6 mM. These baseline cultures were then observed for 72 hours. Results: A strong linear cell proliferation was seen in the control and the rho kinase inhibitor groups. The average concentration was 1.063 for the 5 mMol fasudil group and 1.147 for the 6 mM group, and this difference was statistically significant (p=0.044). The number of cells analyzed at 24 to 48 hours showed a significant difference, but the cell numbers between 48 and 72 hours did not differ statistically. Conclusion: Fasudil did not show any cytotoxicity to endothelial cells; on the contrary, it promoted cell proliferation. The increase in endothelial cell proliferation and vascular stenosis was caused by neointimal hyperplasia, which would be detrimental in diseases such as stent stenosis.

Key Words: fasudil,cell proliferation,cell culture

Yazışma Adresi: Kenan Ahmet Türkdoğan
Isparta Devlet Hastanesi Acil Departmanı, Isparta, Turkiye
Tel: 05546807050 Fax: 02462237831
E-mail: kenan-ahmet@hotmail.com

Müracaat tarihi: 28.11.2012
Kabul tarihi: 16.04.2013

Giriş

Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların fokal adezyonundan ve düz kas kasılmasında Ca+2 duyarlılığının düzenlenmesinden sorumludurlar (1). Ayrıca aktin iskeletinin yapılanmasını sağlayarak hücrenin şekli, motilitesi, adezyonu, göçü, kasılması ve sitokinezis gibi birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynarlar (2).

Yapılan araştırmalar, rho/rho kinaz yolağının kardiyovasküler sistem (KVS) fizyolojisi ve patofizyolojisinde yeri olduğunu göstermektedir. Rho kinaz, vasküler düz kas hücrelerinin adhezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunda önemli rol oynar. Aterosklerozun patogenezinde de yer aldığı gösterilmiştir. Son çalışmalar, rho kinazın kardiyovasküler yeniden yapılanma (remodeling) patogenezinde rolü olduğunu ortaya konmuştur (3). Rho/rho kinaz yolunun önemi pulmoner vazokonstriksiyonda, sıçanlardaki mineralokortikoid kaynaklı hipertansiyonda, artan vasküler reaktivitede ve serebral vazospazmda gösterilmiştir. Kronik NOS inhibisyonu nedeniyle hipertansif olan sıçanların arterlerinde alfa-2 agoniste verilen kontraktil yanıtın, rhoA aktivasyonu aracılığıyla arttığı bildirilmiştir (4). Rho/rho kinaz sinyali vasküler direncin kontrolünde rol oynayabilir ve rho kinaz inhibitörleri, hipertansiyon, vazospazm ve ateroskleroz gibi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkili olabilir (2). Son zamanlarda yapılan bir çalışma iskemi-reperfüzyonun kalpte rhoA yapımını artırdığını ve miyokardiyal rho kinaz aktivitesini yükselttiğini göstermiştir (5).

Biz bu çalışma ile selektif rho kinaz inhibitörü olan fasudilin, oluşturulan hücre kültürü ortamında kontrol grubuna göre endotel hücresine olan etkilerini araştırmak istedik.

Gereç ve Yöntem

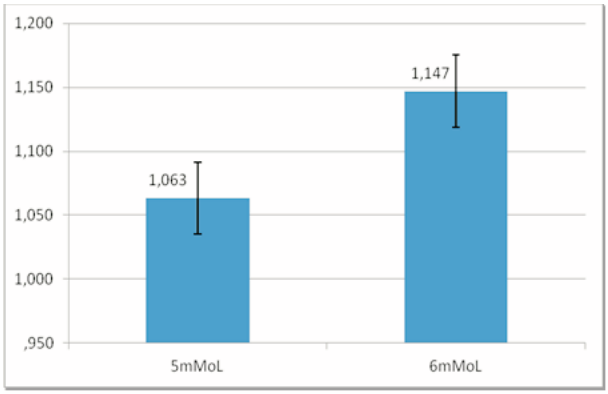
Çalışma şekli

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan elde edildi. Hücreler jeltin kaplı 75 cm^2 lik M199 şişelerinde muhafaza edildi (Sigma, St. Louis, MO,USA) %20 sığır embriyo serumu ile desteklendi (FBS, Sigma, St. Louis, MO,USA) 100 mg ml–1 streptomisin, ve 3 ng ml–1 temel fibroblast büyüme faktörü(bFGF) (Life Technologies). Hücreler kuyu başına toplam hacmi 100 µl olan jelatin kaplı mikrotitre plaklar içinde mililitrede 104 hücre olacak şekilde 96 kuyuya ekildi. Bazal grup ile 5mMol ve 6mMol konsantrasyonlarda rho kinaz inhibitörü uygulanan iki grup olmak üzere üç grup oluşturuldu. Uygulanan 5mMol ve 6mMol'lük konsantrasyonlar farmakoloji tarafından belirlenen ve rho kinazın dokuya ulaşan etkin dozlarıdır. İlaç uygulanmış kültürler ve ilaç uygulanmayan bazal kültürler 72 saat takip edildi. Her çalışma grubu için 6 farklı plaka dizayn edildi. 24 saatte bir kültürler değerlendirildi ve karşılaştırıldı.Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

İstatistiksel analiz

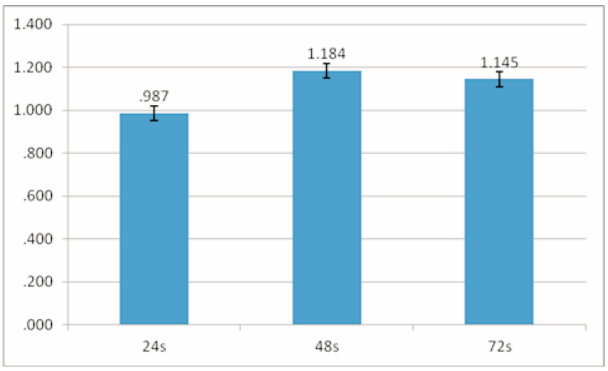
Rho kinazın konsantrasyon ve zamana göre ortalamalarının karşılaştırılmasında iki faktörlü varyans analiz testi (ANOVA) kullanıldı, anlamlı bulunan ortalamaların ikili karşılaştırmaları için Tukey testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart hata ve güven sınırları ile birlikte verilmiştir. Rho kinaz değerleri ile kontrol değerleri arasındaki doğrusal ilişkinin yönünü ve önemliliğini belirlemek için korealsyon analizi yapılmıştır. Rho kinaz değerlerinin kontrol değerlerinden tahmin edilebilirliğini araştırmak için lineer regresyon analizi yapılmıştır. Tüm karşılaştırmalar için 0.05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz SPSS 15.0 SPSS,Inc.,Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki mortalite ve %95 güven aralıkları Fisher'in kesin Ki-kare testi ile değerlendirildi ve çoklu regresyon analizi yapıldı.

Bulgular



Şekil 1. Rho kinaz inhibitörünün konsantrasyona göre tanımlayıcı istatistik (ortalama ve standart) grafiği.

Konsantrasyonlar arasında önemli derecede farklılık saptanmıştır. 5 mMol olanların ortalaması 1.063 iken 6 mMol olanların ortalaması 1.147 olmuştur. Bu ortalamalar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur (p:0,044). (Şekil 1)



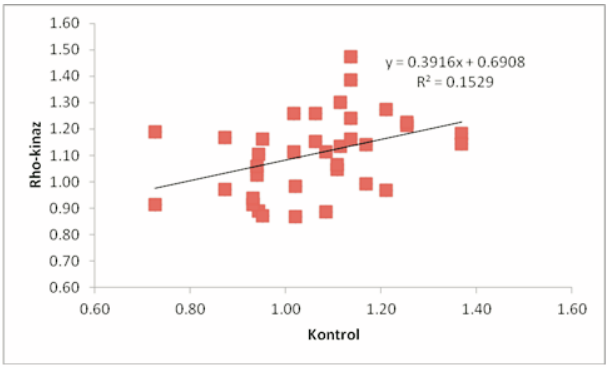
Şekil 2. Rho kinaz inhibitörünün zamana göre hücre sayısını gösteren tanımlayıcı istatistik grafiği.

Zaman içindeki dağılımları da önemli olmuştur. 24 saat ile 48 saat süreleri arasında önemli ölçüde fark oluşmuşken 48 saat ile 72 saat arasında istatistiksel olarak fark oluşmamıştır. (Şekil 2)

Tablo 1. a,b: Zamanla gözlenen değişiklikler için farklı harflerle sunulan değerler 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

		$\bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	%95 güven sınırları	
Konsantrasyon	P	0.044			
	5mMoL	1.063	0.035	1.006	0.121
	6mMoL	1.147	0.034	1.090	1.204
Zaman(saat)	P	0.001			
	24	0.987b	0.031	0.916	1.057
	48	1.184a	0.039	1.114	1.255
	72	1.145a	0.039	1.074	1.215

Kontrol hücreleri ile rho kinaz inhibitörü verilen hücreler arasında doğrusal artan kuvvetli bir ilişki saptanmıştır. Bu ilişkinin katsayısı 0,39 olup önem değeri 0,018 olarak saptanmıştır.



Şekil 3 . Rho kinaz inhbitörü verilen hücreler ile kontrol hücrelerinin çoğalması arasındaki ilişki.

R^2 si (belirleme katsayısı) düşük olmakla birlikte kontrol grubu arttıkça rho kinaz inhibitörü verilen hücrelerde de çoğalma gözlenmiştir. Bu büyümede doğrusal bir artış gözlenmiştir. Kontrol grubu hücrelerden rho kinaz inhibitörü kullanılan hücreleri tahmin etmek için oluşturulan regresyon analizi tahmin yöntemi denklemi grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 3).

Tartışma

Rho kinaz enziminin ROCK1 ve ROCK2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Rho kinaz yolağının; düz kas hücrelerinde Ca2+ duyarlılığı, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre adezyonu, hücresel kontraksiyon gibi fizyolojik olaylarda; anjina, hipertansiyon, glokom, kanser invazyonu, preeklampsi gibi patolojik olaylarda rol oynadığı insan ve hayvanlar üzerinde yapılan in-vivo ve in-vitro deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur(6). Farklı yolaklarla farklı etkileri olan rho kinazın inhibisyonu da değişik etkilere neden olabilmektedir. Bu da bizim çalışmamızdaki hipotezi desteklemektedir. Kas hücreleri dışında ROCK'lar birçok hücresel fonksiyonları rho ikincil "downstream" etkileri ile düzenler. En önemlisi, ROCK'lar aktin-hücre iskeleti topluluğunu ve hücre kontraktilitesini kontrol ederek birçok fizyolojik olaya katılmaktadır. Şimdiye kadar ROCK 1 ve ROCK 2'nin farklı fonksiyonları olduğuna dair çok fazla bilgi yoktur fakat bazı durumlarda farklı regüle edebilmektedirler. Örneğin, apopitozis süresince sadece ROCK 1 bölünmektedir(7).

Ateroskleroz hipertansiyon ve vazospazmın nedenleri ortak olabilmektedir. Aterosklerozun patogenezi, neointimal formasyon ve patolojik vasküler remodelleme gibi histolojik değişimlere neden olan kronik proliferasyon, migrasyon ve makrofajların, düz kas hücrelerinin veya endotelial hücrelerin invasyonunu içermektedir (8).

Şu anki kanıtlar, rho kinaz yolağının aterosklerotik lezyonların oluşmasında rol aldığını göstermektedir. Spesifik inhibitörler ile rho kinazın inhibisyonu neointimal formasyonu inhibe etmektedir. Rho kinazın, makrofajların ve düz kas hücrelerinin arterlerin dış çeperinden orta veya içe doğru invazyonu ve migrasyonunu düzenleyerek neointimal formasyonla ilgili olduğu görünmeketir (8). Xiao Sun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TNF alfa aracılı rho kinaz sinyal yolağının aktivasyonu düz kas hücre proliferasyonunu belirgin şekilde artırdığını bulmuşlar (9). Bizim çalışmamızda ise

selektif bir rho kinaz inhibitörü olan fasudilin hücre proliferasyonunu artırdığı sonucuna varılmıştır. Bu farklılıklar yapılan çalışmaların farklı dozlarda yapılması ve farklı hücre tiplerinden çalışılması nedeniyle olabilir.

Sonuçlara göre rho kinaz inhibitörleri endotel hücre üzerine sitotoksisite göstermeyip aksine hücre proliferasyonu arttırıyor. Artan hücre proliferasyonu neointimal hiperplazi ile vasküler stenoza neden olabilir. Buna örnek olarak stent stenozu gibi hastalıklar gösterilebilir. Ancak kollateral dolaşımın önemli olduğu neoanjiogenezin indüklenmesi gereken durumlarda ise faydalıdır. Mesela Buerger hastalığında (tromboanjiitis oblterans) endotel reaksiyonu nedeni ile dejenere olan damar duvarı fibrotiktir ve distal dolaşım yeni endotel göçü ile neo anjiogeneze bağlıdır. Plak üzerinde de proliferasyonu arttıran rho kinaz inhibitörleri aynı zamanda bu etkiyi hücrelerin plak üzerinde ilerlemesini de sağlayarak yaptığı için proliferasyonu migrasyon yolu ile arttırır. Yani, akut tıkanmalarda risk oluştururken kronik olaylarda yeni damar oluşumunu indükleyebilir. Bu nedenle ileri deneylerle kollateral sirkülasyon üzerine ve mevcut intimal hiperplazi üzerine etkinliğinin araştırılması yeni terapotik yaklaşımlar kazandıracaktır.

Kaynaklar

1. Hırata K, Kıkuchı A, Sasakı T, Kuroda S. Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. J Biol Chem. 1992;267:8719-8722.
2. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.Trends Pharmacol Sci. 2001;22(1):32-9.
3. Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. Trends Pharmacol Sci. 2007;28:296-302.
4. Mukai Y, Shimokawa H, Mataba T Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disase:a novel therapeutic target in hypertension. FASEB J. 2001;15(6):1062-4.
5. Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, et al. Inhibition of Rhokinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res.2004;61(3):548-58.
6. Kubat H, Ark M. İnsanda Rho-kinazın rolü. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2005; 2 : 153-159
7. Riento K, Ridley AJ. Kinases in cell behaviour. Nature 2003; 4 : 446-456.
8. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. TRENDS in Pharmacological Sciences 2001; 22(1) : 32-39.
9. Xiao Sun, Hao Tong, Man Zhang, Xiao-Hang Wang. Rosuvastatin inhibits the smooth muscle cell proliferation by targeting TNFα mediated Rho kinase pathway. Journal of Geriatric Cardiology (2012) 9: 180-184