

DEFİBROTİDİN BALB/C FARELERİNİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

THE EFFECT OF DEFİBROTIDE ON PLASMA PROTEINS OF BALB/C MICE

Ervin BAYRAKDAR* - Musa Ş. UĞUR* - Adile ÇEVİKBAŞ* - Turay YARDIMCI* -
Orhan N. ULUTIN**

SUMMARY

In this work, 12 mg/kg defibrotide was injected (i.v.) to BALB/C type mice everyday for 31 days. Blood samples were taken before, on 15th and on 21st days after injection. The samples taken before defibrotide administration were used as controls.

The total plasma protein level determined by the Lowry method was found to be 88.22 ± 4.80 mg/ml for the controls and they were 57.44 ± 7.82 mg/ml on the 15th day and 71.94 ± 20.00 mg/ml on the 21st day after defibrotide administration, respectively. The increase in the plasma protein level between the control group and the 21st day group was found to be statistically significant.

The plasma protein distributions were obtained by DAVIS-PAGE and the protein concentrations in fractions were determined by gel densitometer. Albumin concentration was found to be 16.00 ± 4.80 mg/ml for the controls. The 15th day defibrotide administration mean value was 15.90 ± 1.60 mg/ml and 21st day it was 22.50 ± 6.60 mg/ml. The increase in the 21st day was found to be statistically significant from both the control and 15th day values. The mean value of α_1 and α_2 globulins when evaluated together was found to be 8.00 ± 1.60 mg/ml for the control group and it was 5.10 ± 2.10 mg/ml for 15th day and 8.80 ± 2.20 mg/ml for the 21st day group. The differences were insignificant. The β -globulin levels were 9.50 ± 2.30 mg/ml, 9.10 ± 1.90 mg/ml, 14.00 ± 4.80 mg/ml, for control, 15th and 21st day groups, respectively. The differences between the 21st day compared to control and the 15th day groups were statistically significant. γ -globulin fractions had protein values as 18.35 ± 6.56 mg/ml, 27.40 ± 5.03 mg/ml and 29.90 ± 7.08 mg/ml, for control, 15th day, and 21st day groups, respectively. The differences between the control group and the 15th day, and 21st day groups were significant whereas the difference between the 15th and 21st day groups were found to be statistically insignificant.

When the protein fractions were determined by SDS-PAGE according to their molecular weights, the proteins with 68000 and 78000 Daltons were found to be significantly decreased after 15 and 21 days of defibrotide administrations. The other protein fractions obtained by SDS-PAGE showed increases in their protein content after defibrotide administrations.

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
Niğantaşı/İSTANBUL.

** İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı,
Cerrahpaşa/İSTANBUL.

ÖZET

Bu çalışmada BALB/C türünden farelere 21 gün süre ile her gün 12 mg/kg defibrotid intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kan örnekleri 15. ve 21. günlerde alındı. Defibrotid uygulamasından önce alınan kan örnekleri kontrol grubu olarak kullanıldı.

Plazmadaki toplam protein konsantrasyonu değerleri Lowry yöntemi ile bulundu. Kontrol değerlerinin $53,22 \pm 4,80$ mg/ml iken, 15. gün değerlerinin $57,44 \pm 7,82$ mg/ml, 21. gün değerlerinin $71,94 \pm 20,00$ mg/ml olduğu görüldü. Kontrol 21.gün değerlerindeki artış anlamlı bulundu.

Plazma protein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları DAVIS-PAGE yöntemi ve jel dansitometresi kullanılarak bulundu. Albumin kontrol değerlerinin $16,00 \pm 4,80$ mg/ml iken, 15. gün değerlerinin $15,90 \pm 1,60$ mg/ml, 21. gün değerlerinin $22,50 \pm 6,60$ mg/ml olduğu görüldü. 15. gün-21. gün değerlerindeki artış anlamlı bulundu. $\alpha_1 + \alpha_2$ - globulin kontrol değerlerinin $5,00 \pm 1,60$ mg/ml iken, 15. gün değerlerinin $5,10 \pm 2,10$ mg/ml, 21. gün değerlerinin $5,80 \pm 2,20$ mg/ml olduğu görüldü. β - globulin kontrol değerlerinin $9,50 \pm 2,30$ mg/ml iken, 15. gün değerlerinin $9,10 \pm 1,90$ mg/ml, 21. gün değerlerinin $14,00 \pm 4,80$ mg/ml olduğu görüldü. Kontrol -21. gün ve 15.gün - 21. gün değerlerindeki artış anlamlı bulundu.

Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayrımı ve her bantın protein konsantrasyonu SDS-PAGE yöntemi ve jel dansitometresi kullanılarak hesaplandı. Defibrotid uygulamasından sonra 68000 ve 78000 Dalton molekül ağırlıklı bantların protein konsantrasyonlarında azalış, diğer bantların protein konsantrasyonlarında ise artış görüldü.

GİRİŞ

Profibrinolitik ve antitrombotik etkili bir ilaç olan defibrotid (Proclide (R) Crinos) 16000 molekül ağırlığında doğal bir polideoksiribonükleik asittir. İn vitro deneylerde lökositlerde prostanoit sentezini inhibe ettiği (1,2), köpeklerde oluşturulan trombus modelinde endoteli koruyucu etkisinin olduğu (3,4), maymunlarda TX_2 yapımını inhibe edip PGI_2 formasyonunu arttırdığı (5), insanda trombosit fonksiyonlarını inhibe ettiği (6), t-PA seviyesini artırırken, t-PA-inhibitörünü (PAI) azalttığı (8) gösterildi.

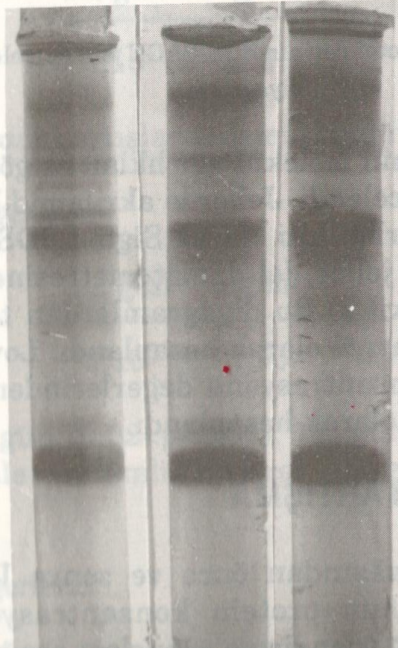
Defibrotidin çok yönlü etkisinden dolayı plazma proteinlerinde meydana getirebileceği değişimleri de araştırmak istedik. Plazma ve serum proteinlerindeki değişimleri araştırmada poliakrilamid gel elektforezi yöntemlerinin üstünlüğünü daha önceki çalışmamızda (9) tesbit ettiğimizden bu çalışmamızda defibrotidin etkisiyle oluşan plazma proteinlerinin dağılımı ve konsantrasyonlarındaki değişimler DAVIS-PAGE ve SDS-PAGE yöntemleri ile incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

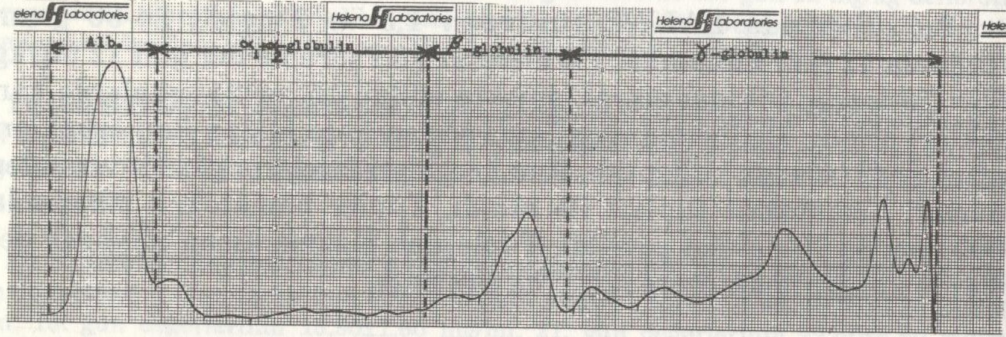
Bu çalışmada BALB/C türünden 1,5 ve 2 aylık, 24-30 gram ağırlığında 12 fare kullanıldı. Farelere 21 gün süre ile her gün 12 mg/kg defibrotid intraperitoneal olarak enjekte edildi. 15. ve 21. günlerde kan örnekleri alındı. Defibrotid uygulamasından önce alınan kan örnekleri kontrol grubu olarak kullanıldı. Kan örnekleri farelerin gözaltı veninden heparinli hematokrit tüpleri ile alındı. Tüpler hematokrit cihazında 19000 rpm'de 10 dakika çevrildi. Tüplerden plazma kısmı alınarak deneylerde kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

Plazmadaki toplam protein konsantrasyonu Lowry yöntemi (10) ile mg/ml olarak ölçüldü.

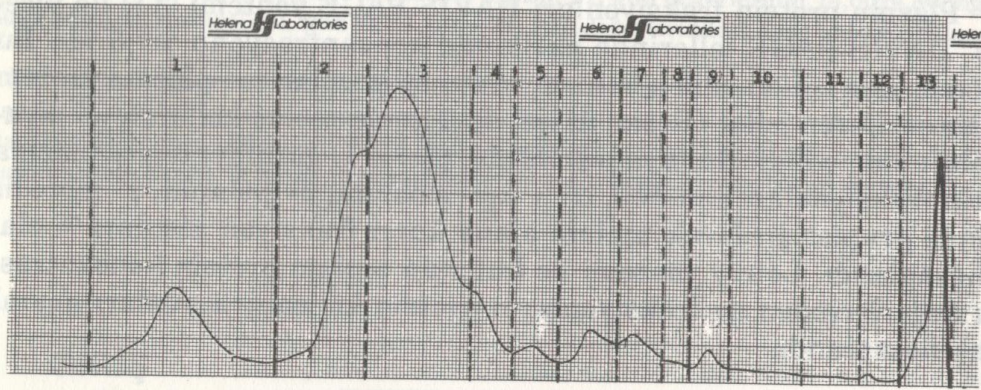
Plazma protein fraksiyonları DAVIS-PAGE yöntemi (11) ile incelendi. DAVIS-PAGE jellerinde akrilamid konsantrasyonu %7,5 idi. Bu yöntemle elde edilen kontrol ve deney gruplarının plazma protein bantlarını içeren jeller (Resim 1), jel dansitometresine konarak jel diyagramları elde edildi. Bu diyagramlarda, (Şekil 1) görüldüğü gibi plazma protein fraksiyonları albumin, $\alpha_1 + \alpha_2$ - globulin, β - globulin, γ - globulin şeklinde gruplandırılarak toplam alana karşı fraksiyon alanları % olarak hesaplandı. Lowry yöntemi ile bulunan toplam protein konsantrasyonu değerlerinden de fraksiyonların protein konsantrasyonları mg/ml olarak hesaplandı.



Önce 15. gün 21. gün



Şekil-1: Bir farenin plazma proteinlerinin DAVIS-PAGE jelinden elde edilen dansitometrik diyagramı.



Şekil-2: Bir farenin plazma proteinlerinin SDS-PAGE jelinden elde edilen dansitometrik diyagramı.

Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre dağılımları SDS-PAGE yöntemi (12) ile incelendi. Jellerde akrilamid konsantrasyonu %5 idi. Standart molekül ağırlığı kiti olarak Sigma SDS-6H kiti kullanıldı. Bu yöntemle elde edilen jeller, jel dansitometresine konarak jel diyagramları elde edildi. (Şekil 2) Bu diyagramlardan toplam alana karşı, protein bantlarının alanları % olarak hesaplandı. Lowry yöntemi ile bulunan toplam protein konsantrasyonu değerlerinden bantların protein konsantrasyonları mg/ml olarak hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Defibrotid uygulamasından önce ve sonra Lowry yöntemi ile ölçülen plazmadaki toplam protein konsantrasyonunun ortalama değerleri ve istatistiki değerlendirme sonuçları aşağıda gösterilmiştir. (Ort.± SD; n= 12)

<u>Kontrol</u> mg/ml	<u>15. gün</u> mg/ml	<u>21. gün</u> mg/ml
68,22 ± 4,80	57,44 ± 7,82	71,94 ± 20,00

Kontrol -15. gün, 15. gün -21. gün değerlerindeki artış anlamsız, kontrol -21. gün değerlerindeki artış anlamlı ($0,02 < p < 0,05$) bulundu.

Defibrotid uygulamasından önce ve sonra DAVIS-PAGE yöntemi, jel dansitometresi ve Lowry yöntemi ile ölçülen plazma protein fraksiyonlarına ait protein konsantrasyonlarının ortalama değerleri ve istatistiki değerlendirme sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

Albumin değerleri:

<u>Kontrol</u> mg/ml	<u>15. gün</u> mg/ml	<u>21. gün</u> mg/ml
16,00 ± 4,80	15,90 ± 1,60	22,50 ± 6,60

Kontrol -15. gün ve kontrol -21. değerlerindeki değişimler anlamsız, 15. gün-21. gün değerlerindeki artış anlamlı ($0,02 < p < 0,05$) bulundu.

$\alpha_1 + \alpha_2$ - globulin değerleri:

<u>Kontrol</u> mg/ml	<u>15. gün</u> mg/ml	<u>21. gün</u> mg/ml
6,00 ± 1,60	5,10 ± 2,10	5,80 ± 2,20

Bütün gruptaki artışlar anlamsız bulundu.

β - globulin değerleri:

<u>Kontrol</u> mg/ml	<u>15. gün</u> mg/ml	<u>21. gün</u> mg/ml
9,50 ± 2,30	9,10 ± 1,90	14,00 ± 4,80

Kontrol -21. gün ($0,02 < p < 0,05$), 15. gün -21. gün ($0,02 < p < 0,05$) değerlerindeki artışlar anlamlı, Kontrol -15. gün değerlerindeki azalış anlamsız bulundu.

γ - globulin değerleri:

<u>Kontrol</u> mg/ml	<u>15. gün</u> mg/ml	<u>21. gün</u> mg/ml
18,85 ± 6,56	27,40 ± 5,03	29,90 ± 7,08

Kontrol -15. gün ($0.001 < p < 0.01$), kontrol -21. gün ($0.001 < p < 0.01$) değerlerindeki artışlar anlamlı, 15. gün -21. gün değerlerindeki artış anlamsız bulundu.

Defibrotid uygulamasından önce ve sonra SDS-PAGE yöntemi, jel dansitometresi ve Lowry yöntemi ile ölçülen plazma protein bantlarının molekül ağırlıklarına göre protein konsantrasyonlarının ortalama değerleri ve istatistiki değerlendirme sonuçları Tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo-1: Defibrotid uygulamasından önce ve sonra plazma protein bantlarının molekül ağırlıklarına göre protein konsantrasyonu değerleri.

Bant no.	MW Dalton	Kontrol mg/ml	15. gün mg/ml	21. gün mg/ml
1	371000	1,17 ± 1,17	1,40 ± 1,20	3,00 ± 2,35
2	327000	0,38 ± 0,43	0,42 ± 0,49	0,79 ± 1,10
3	282000	0,45 ± 0,30	1,10 ± 0,42	1,06 ± 0,62
4	242000	0,93 ± 0,70	1,94 ± 0,60	2,10 ± 0,50
5	198000	1,10 ± 0,80	1,10 ± 0,50	1,47 ± 0,90
6	179000	0,85 ± 0,70	1,00 ± 0,70	1,00 ± 1,10
7	147000	1,00 ± 0,60	1,30 ± 0,80	1,20 ± 0,60
8	117000	6,30 ± 2,20	7,10 ± 1,60	9,60 ± 1,90
9	96000	23,26 ± 6,00	23,90 ± 2,70	33,10 ± 6,80
10	78000	8,25 ± 3,10	7,94 ± 2,24	7,90 ± 1,90
11	68000	1,45 ± 0,70	0,96 ± 0,34	1,30 ± 0,20
12	51000	1,48 ± 0,60	2,10 ± 0,90	2,30 ± 0,40
13	28000	6,90 ± 2,80	7,30 ± 1,70	7,70 ± 1,00

1,2,5,6,7 ve 13 No.lu bantlarda Kontrol -15. gün, kontrol -21. gün, 15. gün -21. gün değerlerindeki artışlar anlamsız olarak bulunmuştur.

3 ve 4 No.lu bantlarda Kontrol -15. gün, Kontrol -21. gün değerlerindeki artışlar anlamlı ($0.02 < p < 0.05$), 15. gün -21. gün değerlerindeki artış anlamsız bulundu.

8 ve 9 No.lu bantlarda kontrol -21. gün, 15. gün -21. gün değerlerindeki artışlar anlamlı ($0.02 < p < 0.05$), kontrol -15. gün değerlerindeki artış anlamsız olarak bulundu.

10 No.lu bantta bütün gruptaki azalışlar anlamsız olarak bulundu.

11 No.lu bantta Kontrol -15. gün, Kontrol -21. gün değerlerindeki azalışlar anlamsız, 15. gün -21. gün değerlerindeki azalış anlamlı ($0.02 < p < 0.05$) bulundu.

12 No.lu bantta Kontrol -15. gün, 15. gün -21. gün değerlerindeki artışlar anlamsız, Kontrol -21. gün değerlerindeki artış anlamlı ($0.02 < p < 0.05$) bulundu.

Bu bulgular defibrotid uygulamasının, farelerinin kan plazma proteinlerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olduğunu göstermektedir. Bu da bu konuda daha önce yaptığımız, 1 haftalık defibrotid uygulaması (13) sonuçlarını doğrulamaktadır.

Defibrotid uygulanan farelerin doza bağlı olarak karaciğer hücrelerini ultrastrüktüel incelenmesi sonucunda granüler endoplazmik retikulumun artış gösterdiği, parmak izi yapılarının yoğunlaştığı ve protein sentezinin artış gösterdiği saptanmıştır (14).

Yine bulgularımızı doğrulayan bir başka çalışmada ise (15) endotel hücre kültüründe defibrotid uygulamasının endotel hücre çoğalmasına neden olduğu ve endotel hücresindeki protein sentezini artırdığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, defibrotid uygulamasından sonra plazma proteinlerinin konsantrasyonlarında görülen artışlar, büyük bir olasılıkla, defibrotidin karaciğerde ve/veya diğer hücrelerde protein sentezini arttırması ile birlikte plazmaya salgılanmasını da arttırdığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Çizmeel, G., Ulutin, O.N.: *Thrombosis and Haemostas.* 54, 210 (1985).
2. Çizmeel, G., Ulutin, O.N. : *Thrombosis and Hemorrhagic Disaeses*, Eds. O.N.Ulutin, H. Vinazzer, Gözlem Matbaası Koll, Şti. İstanbul 1986. pp. 194-201.
3. Ulutin, O.N., Tunalı, H., Uğur, M.Ş., Girişken, G., Aytış, Ş., Balkuv-Ulutin, Ş: *Haemostas.* 12, 130 (1982).
4. Ulutin, O.N., Tunalı, H., Uğur, M.Ş., Aytış, Ş., Erbenği, T., Balkuv-Ulutin, Ş: *Haemostas.* 10, Suppl. 7,9-12 (1986).
5. Ulutin, O.N. Fareed, J., Kumar, A., Walenga, J.M., Hoppensteadt, D.A: *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*, Eds. O.N., Ulutin, H. Vinazzer, Gözlem Matbaacılık Koll. İstanbul 1986. pp. 101-110.

6. Ulutin, O.N., Balkuv-Ulutin, Ş., Erbenği, T., Yardımcı, T., Çizmeçi, G., Uğur, M.Ş., Özsoy, Y., Demirkol, F., Ulutin, T., Uzman, F., Ferhanoglu, B.: *XX.Ulusal Hematoloji Kongresi, Özet Kitabı*, s.54, Ankara, 1988.
7. Balkuv-Ulutin, Ş., Ulutin, T., Kaya, G., Yardımcı, T. Ulutin, O.N.: *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases* Eds. O.N.Ulutin, H. Vinazzer, Gözlem Matbaası Koll. Şti. İstanbul 1986. pp. 409-410.
8. Balkuv-Ulutin, Ş., Ulutin, T., Özsoy, Y., Göker, B., Ferhanoglu, B., Ulutin, O.N.: *XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s.59, 1988 Ankara.
9. Bayrakdar, E.: *UV-C Işınlarının BALB/C Farelerini Serum Proteinleri Üzerine Etkilerini Poliakrilamid Jel Elektroforezi Yöntemleriyle İncelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, SS. 1986 İstanbul
10. Lowry, O.H. *J.Biol.Chem.* **193**, 265 (1951).
11. Davis, B.: *J Ann N.Y. Acad Sci.* **121**, 404 (1964).
12. Weber, K. and Osborn, M.: *J.Biol. Chem*, **244**, 4406 (1969).
13. Bayrakdar, E., Uğur, M.Ş., Çevikbaş, A. Ulutin, O.N., Yardımcı, T.: *XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*. s.60, Ankara, 1988.
14. Çevikbaş, A., Ulutin, O.N., Çevikbaş, U. Yardımcı, T., Erbenği, T.: *IX. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kongre Kitabı*, s.255., İstanbul, 1989.
15. Bilsel, S., Taga, Y., Yalçın, Emerk, K. and Ulutin, O.N. *Haematol. Rev.* **3**, 29 (1989).

(Received May 15, 1990)