

KOBAYLARDA NORMALDE VE YÜKSEK BASINÇ ALTINDA SERUM PROTEİNLERİ

Dr. Sema YAVUZER(*)

Dr. Enis DALKILIÇ(**)

Dr. Mithat TORUNOĞLU (***)

Daha önce anestezi edilmiş kediler üzerinde yapılan bir çalışmada (29) yüksek basıncın kan proteinleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve yayınlanmıştı. Bu çalışmada özellikle alpha-1 ve alpha-2 globulin fraksiyonlarında tesbit edilen dikkati çekecek azalma, alfa-1 globulin — alfa-1 antitripsin ve surfaktan ilişkileri bakımından literatür ışığı altında (4, 24, 26) değerlendirilerek, oksijenin akciğerler üzerindeki toksik etkisinin temelindeki nedenleri araştırmak üzere bir seri deneysel çalışmaya girişilmişti. Halen devam etmekte olan bu çalışmanın anestezi edilmemiş kobaylar üzerinde yapılmakta olması nedeniye;

a — Yüksek basınçta hava ya da oksijenin değişik türler üzerindeki etki ve derecesinin farklı olabilmesi,

b — Hayvanların anestezili ya da anestezi edilmeden basınç altında tutulmalarında etki ve derecesinin farklı olabilmesi olasılıkları,

c — Literatürde ilk bulgularımıza tamamen ters düşen (yüksek basıncın serum globulin fraksiyonlarında dikkati çekecek bir değişmeye neden olmadığı) yolunda verilerin bulunuşu (22),

d — Alpha-1 ve alpha-2 globulin fraksiyonları içerisinde sıralanan, toksik, infeksiyöz durumlarda ve stres hallerin-

*A. Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Kürsüsü Doçenti.

** A. Ü. Tıp Fakültesi Fizyopatoloji Kürsüsü Uzmanı.

***A. Ü. Tıp Fakültesi Fizyopatoloji Kürsü Başkanı.

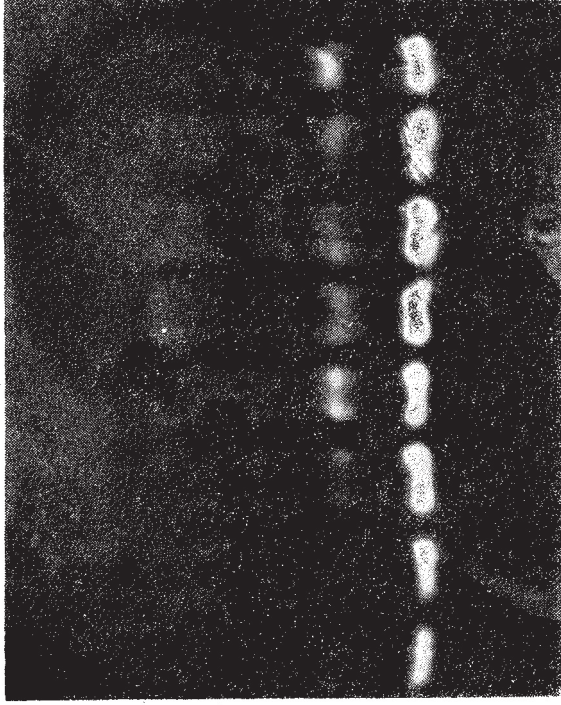
de aktif değişiklik göstererek organizmanın defans cevabını büyük oranda etkileyen akut faz reaktan proteinlerin fonksiyonel önemi (32) bizi sunduğumuz çalışmaya itici nedenler oldu.

Böylece: a) anestezi kedilerden elde edilen bulguları anestezi edilmemiş kobaylarda verifiye etmek, b) dolayısı ile akciğer çalışmalarını daha direkt ilgili ve sağlam bir temel üzerinde yürütmek amacıyla uyanık kobaylarda, normalde ve yüksek basınç altında serum proteinlerini inceleyip karşılaştırmak üzere bu çalışma yapıldı.

MATERYEL VE METOD

Deneylerde ortalama 600 gr. ağırlığında her iki seksten 37 kobay kullanıldı. Bunlar, önce kalbden 1 ml kadar kan alındıktan sonra basınç kamarasına (Bethlehem Hyperbaric Chamber) konuldular. Basıncı hava verilerek hızlı bir şekilde 5 atmosfer basınca ulaşıldı. Dakikada 2 lt lik ventilasyona müsaade edilmek suretiyle 2 saat süreyle kamarada 5 atmosfer basınç devam ettirildi. İki saatin sonunda ortalama 10 dakika içinde chamber havası boşaltıldı. Basınç kamarasından çıkarılan hayvanlardan yine 1 ml kan alındı.

Deney öncesi ve sonra alınan kan örneklerinden usulüne göre serum elde edildi. Serum proteinleri «Halena Laboratories elektroforez» yöntemine göre fraksiyonlarına ayrıldı. Bu amaçla, HR buffer (pH 8.6) ve Titan III sellüloz asetat plağı kullanıldı. Her sellüloz asetat plağına aynı anda sekiz serum uygulandı (Resim - 1). Usulüne uygun olarak 180 V luk akım 17 dakika tatbik edildi. Daha sonra preparatlar «Ponceau S» ile boyandı (4 dakika). Her defasında 2 dakikalık süre olmak üzere % 5 lik asetik asit ile 3 defa yıkandı.



Resim — 1 : Deneylerde titan-III Selluloz asetat plakları kullanıldı. Her plağa aynı anda 8 serum örneği uygulandı.

Saf metanol içinde 2 dakika, 1/4 asetik asit - metanol karışımı ile muamele edildikten sonra selüloz asetat plakları 80 C° de kurutuldu. Dansitometrik değerlendirme 525 mm lik bir flitre ile yapıldı ve fraksiyon yüzdeleri hesaplandı. Bulgular istatistiki olarak değerlendirildi.

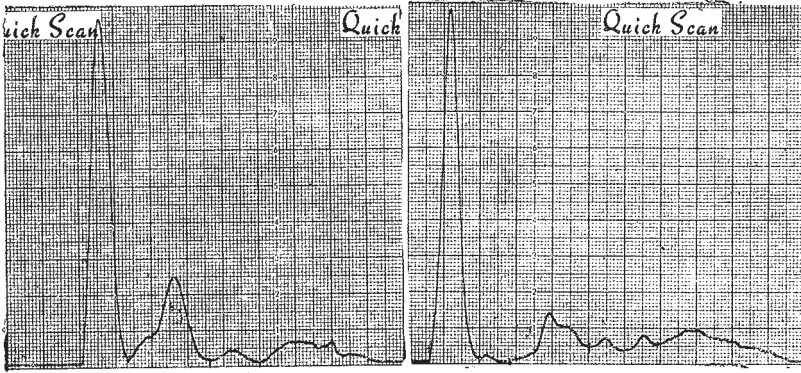
BULGULAR

37 kobayın normal ve basınç altında ortalama serum protein fraksiyonları yüzde değerleri Tablo -I de görülmektedir.

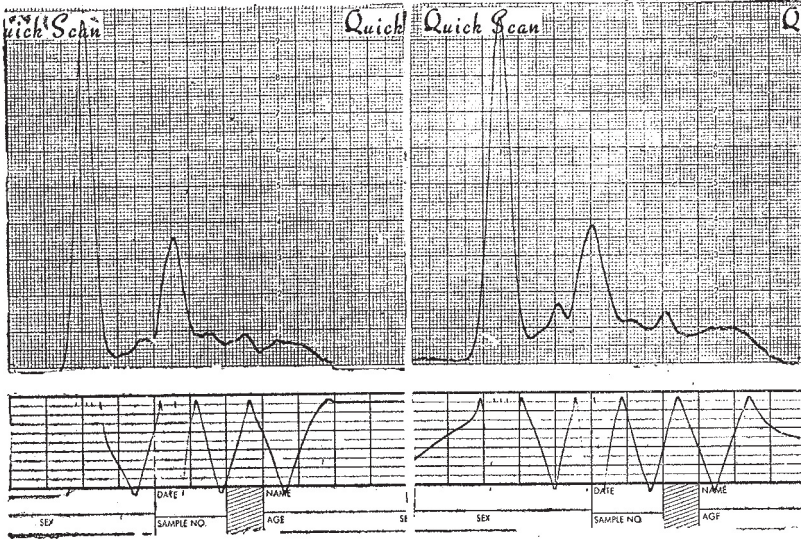
TABLO — 1 : Kobayda normalde ve basınç sonrası serum protein fraksiyonları ortalama yüzde değerleri.

SERUM PROTEİN FRAKSİYONU	NORMAL	Basınç Sonrası	Ortalamalar Arasındaki Farkın Değerlendirilmesi	
			İSTATİSTİKİ	YÜZDE
ALBUMİN	52,955 ± 1,278	52,555 ± 0,869	Önemsiz t = 0,260	0,75 Azalma
ALPHA - 1 GLOBULİN	6,928 ± 0,268	5,929 ± 0,206	ÖNEMLİ t = 2,973	14,5 Azalma
ALPHA - 2 GLOBULİN	19,781 ± 0,899	892'0 ± 218'91	ÖNEMLİ t = 2,534	14,5 Azalma
BETA GLOBULİN	11,042 ± 0,951	9,485 ± 0,378	Önemsiz t = 1,538	14 Azalma
GAMMA GLOBULİN	9,053 ± 0,455	13,793 ± 0,676	ÖNEMLİ t = 5,781	52,7 Artma
			p < 0,05	
			p < 0,01	
			p < 0,001	

Deneylerde basınç etkisi ile albuminde anlamlı bir değişik-
lik olmadı. Alpha - 1 globulinde (t 2,973, $p < 0,01$), alpha - 2 glo-
bulinde ($t=2,534$, $p < 0,05$) olmak üzere normal ve basınç altın-

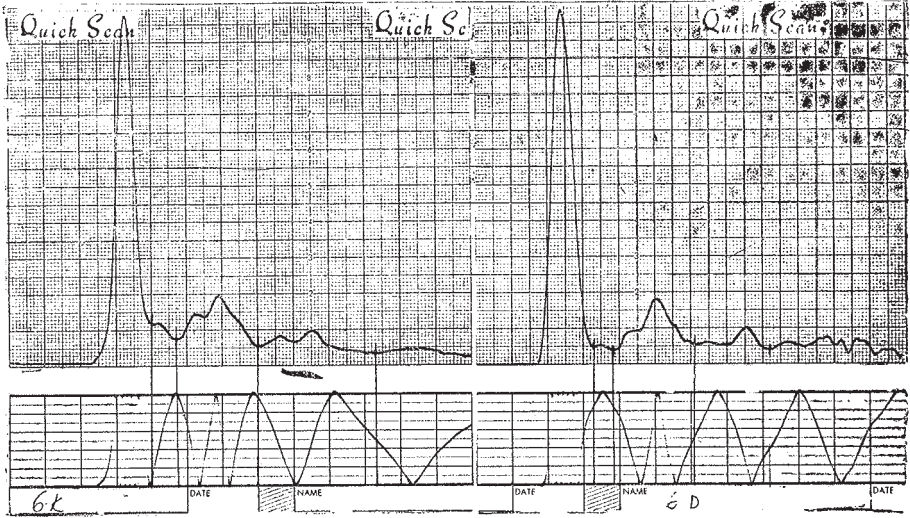


Grafik — 1 : 7 nolu deneyde basınç öncesi ve basınç sonrası serum
protein fraksiyonları görölmektedir.



Grafik — 2 : 4 nolu deneyde normalde ve basınçtan sonra serum protein
fraksiyonları.

daki ortalama değerler arasındaki fark istatisti kolarak önemli bulundu. Yüksek basınçta hava etkisi ile alpha — 1 globulinde ortalama % 14.5, alpha - 2 globulinde yine yaklaşık % 14.5 oranında azalma saptandı. Beta globulinde anlamlı bir değişiklik olmadı. Gamma globulin fraksiyonunda ise normal ve basınç sonrası ortalama değerler arasındaki fark önemli olarak saptandı ($t=5,781$, $p < 0,001$). Bu fraksiyonda basınç etkisi ile ortalama % 52.7 oranında bir artış meydana geldi (Grafik 1 - 2,3)



Grafik — 3 : 6 nolu deneyde kobayda normalde ve 5 atmosfer basınç altında 2 saat kaldıktan sonra erum protein fraksiyonları.

TARTIŞMA

37 kobaydan elde edilen bulgulara göre kobayda gamma globulin seviyesi oldukça düşük görünmektedir. Bu, belki kobaylara özgü bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, bu konuda literatür verileri de oldukça çelişkili durumdadır. Tiselius metoduna göre yapılan bir çalışmada gamma globulin seviyesi $\% 5,6 \pm 0,3$, Moore'un 15 kobaydan elde ettiği bul-

gulara göre % 8 ± 4 ve 8 kobayda elde edilen diğer bir bulguya göre % 14,6 olarak saptanmıştır (5). Değişik çalışmalarda elde edilen değerlerin bu derece farklı olmasında muhtemelen kobayların hayvan laboratuvarlarında yetiştirilme koşullarının önemli derece rolü olsa gerektir. Çünkü gamma globulin seviyesinde genetik faktörler yanında çevre faktörünün de önemli oranda bir etkiye sahip olduğu, çeşitli çevre şartlarına tabi populasyonlarda oldukça geniş bir şekilde araştırılarak saptanmış durumdadır (17,23).

Yüksek basıncın serum proteinleri üzerindeki etkisine gelince; değişik fraksiyonlarda değişik biçimde ortaya çıkan bir etkinin varlığı Tablo - 1 de açıkça görülmektedir. Ancak bu değişmelerin bir hemokonsantrasyon ya da hemodilüsyona bağlı olabileceği akla gelebilirse de, benzer şartlar altında yüksek basınca maruz bırakılmış kobaylarda hematokritte anlamlı bir değişimin olmadığı saptanmış durumdadır (31). Serum albumin seviyesinde significant bulunmayan bir azalma muhtemelen bu küçük moleküllü proteinin çok az bir kısmının damar dışına kaçmasına bağlı olsa gerektir. Zira, damar içi ve damar dışı sıvı kompartımanlar arasındaki sıkı ilişki ve değişim nedeniyle albumin konsantrasyonunda önemli ve mutlak bir azalma olmadan bunun serum albumin seviyesinde yansımıyacağı israrla ileri sürülmektedir (14). Ancak Radomski ve Bennette (5) kısa süreli yüksek basınç altında kalan insanlarda serum albumin seviyesinde significant bir azalma tesbit ettiklerini belirtmektedirler.

Yine aynı araştırmacılar serum albumin seviyesinde saptadıkları anlamlı azalmaya karşılık globulin fraksiyonlarında herhangi bir değişiklik olmadığını ileri sürmektedirler. Bu çalışmada ise kediler üzerinde yapılmış olana (29) çok benzer bir şekilde alpha - 1 ve alpha - 2 globulin fraksiyonlarında anlamlı bir azalma saptanmış durumdadır. Bizce yüksek basıncın en önemli, beklenmeyen ve dolayısıyla anlamlı etkisi bu iki fraksiyon üzerinde kendini göstermektedir. Çünkü toksik, infeksiyöz ve stresör etkenlere karşı genel sistemik defans reaksiyonu içinde bu iki fraksiyonun büyük kısmını

oluşturan çok sayıda proteinin (akut faz reaktan proteinler) serum konsantrasyonlarının arttığı bilinmektedir (6,7, 14,20,27,28). 5 Ata lık yüksek basınçta hava atmosferi de sahip olduğu bir atmosfer üzerindeki oksijenin toksik etkisi ile, en azından fizik ve psikolojik bir stresör ajan olarak akut faz reaktanları, dolayısıyla de alpha -1 ve alpha -2 globulin fraksiyonları seviyelerini yükseltmeliydi. Olay beklenildiği şekilde gelişseydi, yüksek basınçta hava ya da oksijen başta akciğerler olmak üzere organizma üzerinde muhtemelen bu derece zararlı olmayacaktı. Ancak, organizma bir bütün olarak ele alındığında herhangi bir kompartımanın tek başına düşünülmesi olağanı kuşkusuz söz konusu değildir. Burada önemli olan sanırız olayların sıralanışı ve etkilenme dereceleridir. Yüksek basınçta hava ya da oksijenin sadece bir stresör ajan olarak bile sinirsel santral etki ile böbrek üstü korteksini stimüle ettiği bilinmektedir (2,25). Glukokortikoidler ise akut reaktanlardan bir kısmının sentezini stimüle etmekle birlikte (12, 18), çoğunun oldukça hızlı olan sentezlerini (18,27) azaltmaktadır (8,14). Yine, değişik tip travma ve stressör ajanının lisosomal membran permeabilitesi artışı ve asid hidrolazların salınımına neden olduğu, lisosomların ise çeşitli yollarla AP reaktanların sentezini affekte edebildikleri ileri sürülmektedir (3,14). Ayrıca en önemli sentez yerleri olan karaciğer de yüksek basınç altında önemli derecede etkilenmekte, karaciğer de dahil olmak üzere bütün organizmada metabolik olayların hızı azalmaktadır (19, 21, 22, 30). Ancak sentezleri azalmış olsa bile, iki saat gibi kısa bir deney süresi içinde serum **konsantrasyonlarında** bu derece yansıması, ya da olayın sadece bu yönden açıklanması herhalde mümkün olmayacaktır. Aynı zamanda yüksek basınç altında artmış bir yıkım ya da hiç değilse bazılarında aktivite azalması olsa gerektir. Bu bakımdan yüksek basınçta azalmış olan PH herhalde en önemli etken olmaktadır (1,11,13,24,29).

Yüksek basınç uygulandıktan sonra deney hayvanları serumunda beta globulin fraksiyonu hafif bir azalma göstermekle beraber, istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak bu bulgu da yine alpha -1 ve alpha -2 globulinlerdeki anlamlı azalmanın genel bir damar permeabilitesi artışı nedeni ile

damar dışına kaçma gibi pasif bir olaydan çok, aktif nedenlerle ortaya çıktığına işaret eder niteliktedir.

Gamma globulin fraksiyonundaki önemli derece yükselme ilk bakışta adrenokortikal aktivitenin artışına bağlanabilir görünmektedir. Çünkü glukokortikoidlerin lenfoid hücrelerin lizisine bağlı olarak yaklaşık ilk bir kaç saat içinde dolaşımdaki antikor seviyesini artırdıkları bilinmektedir (16). Ancak son yıllarda, organizmada immunoglobulinlerin fonksiyonları ile alpha - 1 —antitripsin fonksiyonu arasında yakın bir ilişkinin varlığına işaret edilmektedir (9). Ayrıca, alpha-1 —antitripsin eksikliği bulunan bazı vakalarda IgM veIgG gibi bazı immünglobulin seviyelerinin önemli derecede yükselmiş olduğu da tesbit edilmiştir (9,10). Buradaki mekanizma da henüz bilinmemekle birlikte yüksek basınç altında meydana gelen tabloyla bir çok bakımlardan benzer oluşu dikkat çekicidir. Şöyle ki - AP proteinlerin en önemlilerinden birisi olan alpha-1 antitripsin, alpha - 1 globulin fraksiyonunun çok büyük bir kısmını oluşturduğuna göre, yüksek basınç altında kuşkusuz azalmaktadır. Yine alpha - 1 antitripsin eksikliklerinde ortaya çıkan pek çok akciğer bulgusu yüksek basınç altında da kendini göstermektedir. İlişki deneylerimizde iki saat gibi çok kısa bir süre içinde ortaya çıktığına göre, bilinen genetik faktörlerin dışında, alpha ve gamma globulinler arasında daha çok çevresel koşullarla etkilenen ortak bir temel fonksiyonel mekanizma, ya da ortak bir kontrol mekanizma mevcut gibi görünmektedir.

Ö Z E T

Anestezi edilmemiş kobaylarda normalde ve 5 Ata lık hava basıncı altında 2 saat kaldıktan sonra serum proteinleri elektroforetik olarak incelendi. Her iki koşulda elde edilen bulgular karşılaştırılarak yüksek basınçta havanın serum proteinleri üzerindeki etkisi saptandı.

Bulgularımıza göre yüksek basınç altında :

a) serum albumin ve beta globulin fraksiyonlarında ' anlamlı bir değişiklik olmadı.

b) Alpha - 1, alpha - 2 globulinlerde azalma ve gamma globulin fraksionunda istatistiki olarak önemli derecede bir artma meydana geldi.

SUMMARY

Serum proteins in guinea - pigs under normal and pressurised conditions.

Non anaesthetised Guinea - pigs left 2 hours under normal and 5 atmospheric pressurised conditions and serum proteins studied electrophoretically. In both circumstances findings were examined and effects of the high atmospheric pressure on the serum proteins evaluated.

According to our findings under high atmospheric pressure:

a) No changes were noticed in serum albumin and beta (β) globulin fractions

b) Alpha - 1, alpha - 2 globulins decreased and Gamma globulin fraction statistically showed considerable increase.

LITERATUR

- 1 — Andersen, T.H., Hustvedt, B.E.: Acid-Base Change in Diving Ducts. *Acta Physiol. Scand.*, 63: 128, 1965.
- 2 — Bean, J.B.: Hormonal Aspects of Oxygen Toxicity. *Proc. Under Water Physiol. Symp. Natl. Res. Council Publ.*, No: 377, 1955, p, 13.
- 3 — Bimes, Ch., Guilhem, A., Mansat, A., Pontonnier, G., Barthelemy, R.: *Bull. Ass. Anat.*, 57: 443, 1973.
- 4 — Cohen, A. B.: Interrelationships Between the human alveolar macrophage and alpha-1 antitrypsin. *J. Clin. Invest.*, 52: 2793, 1973.
- 5 — Cohrs, P., Jaffé, R., Meessen, H.: *Pathologie Der Laboratoriumstrier.* Springer Verlag, Heidelberg, 1958, p, 213.
- 6 — Evans, G. W., and Weideranders, R.E.: Effect of hormones on ceruloplasmin and copper concentration in the plasma of the rat. *Am. J. Physiol.*, 214: 1152, 1968.

- 7 — Evans, G. W., Myron, D. R., and Wiederanders, R. E.: Effect of protein synthesis inhibitors on plasma ceruloplasmin in the rat. *Am. J. Physiol.*, 216: 340, 1969.
- 8 — Evans, G. W., and Weinderanders, R. E.: Pituitary-adrenal regulation of ceruloplasmin. *Nature*, 215: 766, 1967.
- 9 — Falk, A. G., Siskind, G. W., and Smith, J. P.: Chronic obstructive Pulmonary Disease: A subgroup of patients identified by serum alpha-1-antitrypsin and immunoglobulin concentration. *Amer. Review. Res. Dis.*, 103: 18, 1971.
- 10 — Geisler, L. S., Bachmann, G. W., Laumen, F., Nolte, D., Wentzel, H., und Rost, H.: Alpha 1-antitrypsin und Immunglobuline bei Chronisch Unspezifischen Lungener Krankheiten und Lungentuberkulose. *Dtsch. Med. Wschr.*, 97: 329, 1972.
- 11 — Haugard, N.: Cellular Mechanism of Oxygen Toxicity. *Physiol. Rev.*, 48: 311, 1968.
- 12 — Heim, W. G., and Ellenson, S. R.: Adrenal Cortical Control of the Appearance of Rat Slow Alpha-2 Globulin. *Nature*, 213: 1260, 1967.
- 13 — Huguenard, P.: Les problèmes Physiques, Techniques et Biologiques Posés par L'oxigénothérapie Hyperbare. *La Presse Med.*, 75: 99, 1967.
- 14 — Koj, A.: Acute-Phase Reactants: Their Synthesis, Turnover and Biological Significance. In *Structure and Function of Plasma Proteins*. Plenum Press. London, 1974, p. 73.
- 15 — Krauss, S.: Response of Serum Haptoglobin to inflammation in Adrenalectomized Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112: 552, 1963.
- 16 — Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., and Inwood, M. J. H.: *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*. W. B. Saunders Comp. Philadelphia, 1969, p. 558.
- 17 — Maddison, S. E., and Reimer, C. B.: Normatif Values of Serum Immunoglobulins by Single Immunodiffusion: A Review. *Clin. Chem.*, 22: 594, 1976.
- 18 — Majumdar, C., Tsukada, K., and Lieberman, I.: Liver Protein Synthesis after Partial Hepatectomy and Acute Stress. *J. Biol. Chem.*, 242: 700, 1967.
- 19 — Malmejac, J.: Base Physiologiques du L'utilisation de L'oxygène Hyperbare. *Ann. Chir. Thor. Card.*, 5: 827, 1966.
- 20 — Meyer, B. J., Meyer, A. C., and Frieden, E.: *Am. J. Physiol.*, 194: 581, 1958.
- 21 — Puglia, C. D., Glauser, E. M., and Glauser, S. G.: Core Temperature Response of Rats During Exposure to Oxygen at High Pressure. *J. Appl. Physiol.*, 36: 149, 1974.
- 22 — Radomski, M. W., and Bennett, P. B.: Metabolic Changes in Man During Short Exposure to High Pressure. *Aerosp. Med.*, 41: 309, 1970.

- 23 — Reimer, C. B., and Maddison, S. E.: Standardisation of Human Immunoglobulin Quantitation. A Review of Current Status and Problems. *Clin. Chem.*, 22: 577, 1976.
- 24 — Rowley, P. T., and Dagmar, O.: Characteristics of Antitrypsin Activity of Human Serum. *J. Clin. Path.*, 26: 48, 1973.
- 25 — Rubin, R. T., Rahe, R. H., Ransom, J. A., and Brian, R. C.: Adrenal Cortical Activity Changes During Underwater Demolition Team Training. *Psychosom. Med.*, 31: 553, 1969.
- 26 — Tuttle, W. C., and Westerberg, S. C.: Alpha-1-Globulin Trypsin Inhibitor in Canine Surfactant Protein. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 146: 232, 1974.
- 27 — Weimer, H. E., and Benjamin, D. C.: Immunochemical Detection of an acute Phase Protein in rat Serum. *Am. J. Physiol.*, 209: 736, 1965.
- 28 — Werner, M., and Odenthal, D.: Serum Protein Changes after Gastrectomy as a Model of Acute Phase Reaction. *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 302, 1967.
- 29 — Yavuzer, S.: Yüksek Basıncın Bazı Kan Proteinlerine Etkisi. *A. Ü. Diş Hek. Fak. Mec.*, 2: 1, 1975.
- 30 — Yavuzer, S.: Yüksek Basıncın Vücut Isısı ve Kanın Oksido-redüksiyon Potansiyeline Etkisi. *A. Ü. Tıp Fak. Mec.*, 24: 34, 1971.
- 31 — Yavuzer, S., Yücel, G., Budak, H., Koç, E.: Yüksek Basıncın Kobay Kan Parametreleri Üzerine Etkisi. *A. Ü. Tıp Fak. Mec.*, 27: Suppl. No: 85, 1975.