

ATEROSKLEROZLU OLGULARDA DEFİBROTİDİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İZOKRATİK HPLC İLE İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DEFİBROTIDE ON PLASMA PROTEINS OF ATHEROSCHLEROTIC SUBJECTS BY ISOCRATIC HPLC

Ersin BAYRAKDAR* - Ertuğrul YURTSEVER* - Turay YARDIMCI*

SUMMARY

In this work 10 mg / kg defibrotide was injected (i. v.) to 8 cases with atherosclerosis. Blood samples were taken before and 2 hours after defibrotide administrations. The total protein concentrations in plasma were determined by Lowry method. The protein concentrations were 90.16 ± 9.60 mg / ml and 96.40 ± 7.40 mg / ml before and after defibrotide applications respectively. This increase was insignificant. The plasma proteins were also separated according to their molecular weights by isocratic HPLC. Although some increases on the protein content of all the fractions two hours after a single administrations of defibrotide were observed, these increases were statistically insignificant.

ÖZET

Bu çalışmada 8 aterosklerozlu hastaya 10 mg / kg defibrotid damardan enjekte edildi. Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra alınan kan örnekleri kontrol ve deney grubu olarak kullanıldı. Plazmadaki total protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile ölçüldü. Kontrol değerleri $90,16 \pm 9,60$ mg / ml iken defibrotid sonrası değerlerinin $96,40 \pm 7,40$ mg / ml olduğu görüldü.

Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımında izokratik HPLC kullanıldı. Tek doz defibrotid uygulamasından 2 saat sonra bütün protein fraksiyonlarının protein konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamsız bulunan bazı artışlar gözlemlendi

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 81010 Haydarpaşa / İSTANBUL.

GİRİŞ VE AMAÇ

Sığır akciğerinden saflaştırılan DNA'nın depolimerizasyonu ile elde edilen defibrotid 16000 Da molekül ağırlığındadır. Defibrotidin koagülasyon üzerine açık bir etkisi olmamakla birlikte, in vitro ve in vivo olarak bir çok modellerde trombus oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (1). Defibrotidin doza bağlı olarak fibrinolitik aktivite üzerine etkisinin fibrinolitik aktivasyon mekanizmalarının uyarılması ve inhibitör aktivitesinin indirgenmesi yoluyla olduğu gösterilmiştir (2). Defibrotidin, prostasiklinin ve prostaglandin E₂'nin damar endotelinde yapılmasını ve salgılanmasını uyardığı (3,4) ve ayrıca hayvan modellerinde kalp kasını koruduğu gösterilmiştir (5). Farelerle yapılan çalışmalarda defibrotidin total plazma protein konsantrasyonu ile birlikte bazı fraksiyonların protein konsantrasyonlarını arttırdığı (6) ve karaciğer protein sentezini uyardığı gösterilmiştir (7). Ayrıca bir başka çalışmada da endotel hücre kültüründe protein sentezini arttırdığı gösterilmiştir (8). Bu çalışmada ise aterosklerozlu hastalarda tek dozluk defibrotid uygulamasının plazma proteinleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 8 aterosklerozlu hastaya 10 mg / kg defibrotid (i. v.) olarak uygulandı. Uygulamadan önce ve 2 saat sonra EDTA'lı kan örnekleri alınarak 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerden plazma kısımları alınarak kontrol ve deney grupları olarak kullanıldı. Total protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile ölçüldü. Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımında izokratik HPLC kullanıldı. Cihaz : Model 510 pompa (Waters), Kolon : Protein PAK- 300 SW (Waters), Enjektör : Valf tipi, Model U6K (Waters), Dedektör : Değişken dalga boylu-UV, 280 nm, 0,05 AUFS Model 481 (Waters), Kaydedici : Data module, Model 730 (Waters), Mobil faz : 0,1 M fosfat tamponu (pH= 7), Akış hızı : 1 ml / dak. , Kağıt hızı : 1 cm / dak.

Plazmalar HPLC kolonuna 25 µl enjekte edildi. Kaydedicinin verdiği kromatogram pik alanları ve Lowry yöntemi ile bulunan total protein konsantrasyonu değerleri yardımıyla her bir pikin protein konsantrasyonu mg / ml olarak hesaplandı. Piklerin molekül ağırlıkları Sigma standart proteinleri yardımıyla hesaplandı. Standart proteinlerin log (mol . ağı.) ve R_t değerleri yardımıyla regresyon denklemi bulundu. Piklere ait R_t değerleri bu denklemde yerine konularak her bir pikin molekül ağırlığı değeri hesaplandı.

BULGULAR

Sigma standart proteinleri, molekül ağırlıkları, bunlara ait HPLC kromatogramından saptanan R_t değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Sigma standart proteinlerinin molekül ağırlıkları, log (mol. ağı.), R_t değerleri.

Standart protein	Mol. ağı. (Da)	log (mol. ağı.)	R_t (dak.)
Tyroglobulin			
Bovine	669000	5,83	1,0
Apo ferritin	443000	5,65	2,0
B - Amylase	200000	5,30	3,0
Alcohol Dehydragenase	150000	5,18	4,0
Albumin Bovine Serum	66000	4,82	5,67
Carbonic Anhydrase	29000	4,46	7,37
Cytochrome C	12400	4,09	9,16

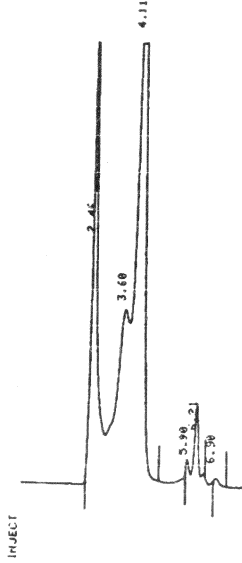
Regresyon denklemi $y = 6,013 - 0,210x$ olarak bulundu. HPLC kromatogramındaki protein piklerinin R_t değerleri x yerine konarak, regresyon denkleminde \log (mol. ağı.) değerleri, bu değerlerdende her bir protein pikinin molekül ağırlığı hesaplandı (Tablo 2).

Tablo 2 : HPLC kromatogramındaki plazma protein piklerinin R_t , log (mol. ağı.), molekül ağırlığı değerleri.

Pik no	R_t (dak.)	log (mol.ağı.)	Mol. ağı.
1	2,46	5,50	313600
2	3,60	5,26	180700
3	4,11	5,15	141200
4	5,90	4,77	59400
5	6,21	4,71	51100
6	6,90	4,56	36600

Plazma total protein konsantrasyonu değerleri defibrotid uygulamasından önce $90, 16 \pm 9,16$ mg / ml iken uygulamadan 2 saat sonra $96,40 \pm 7,40$ mg/ ml olarak bulundu. ($n = 8, p > 0,05$)

HPLC kromatogramlarındaki (Şekil 1) plazma protein piklerinin protein konsantrasyonlarına ait c_{kontrol} ve c_{deney} değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

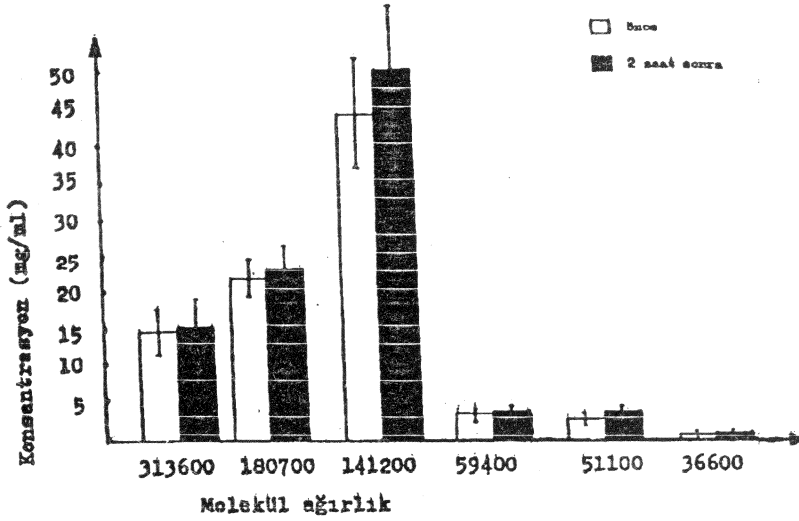


Şekil - 1 : Plazma proteinlerine ait bir HPLC kromatogram örneği.

Tablo 3 : HPLC kromatogramlarındaki plazma protein piklerinin protein konsantrasyonlarına ait c_{kontrol} ve c_{deney} değerleri (n= 8).

Pik no	Mol. ağı.	c_{kontrol} (mg/ml)	c_{deney} (mg / ml)	İst. değ.
1	313600	14,4 ± 3,3	15,0 ± 4,2	p > 0,5
2	180700	22,4 ± 2,5	23,2 ± 3,4	p > 0,5
3	141200	44,7 ± 7,3	50,1 ± 7,8	p > 0,1
4	59400	3,2 ± 0,8	3,5 ± 0,9	p > 0,1
5	51100	2,9 ± 0,6	3,4 ± 0,7	p > 0,1
6	36600	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	p > 0,05

Tablo 3'deki değerlerin sütun grafikleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil - 2 : c kontrol ve c deney sütun grafikleri.

Tablo 3'den de görüldüğü gibi protein konsantrasyonlarına ait artışlar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

TARTIŞMA

Aterosklerozlu hastalarda defibrotidin etkisi in vivo olarak çalışılmış ve defibrotidin, aterosklerozda azalan prostasiklini (9), cAMP seviyesini arttırdığı (10,11), yine aterosklerozda arttığı bilinen trombosit fonksiyonlarını inhibe ettiği (12,13), anlamlı olarak azalan protein C'yi artırırken yine anlamlı olarak azalan protein S'ye etkisiz kaldığı gösterilmiştir (14). Yine defibrotidin trombosit membranını da in vivo olarak etkilediği, aterosklerozda defektif olan glukoz transportunu artırırken (15,16), trombosit membranının integral bir proteini olan γ - glutamil transferazı da arttırdığı gösterilmiştir (17). Aterosklerozlu hastalarda PAGE yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise albumin, α_1 , α_2 , β , γ - globulin fraksiyonlarında anlamsız artışlar görülmüştür (18). Bu çalışmada tek dozluk defibrotid uygulamasından 2 saat sonra plazma total protein konsantrasyonu ile plazma protein piklerinin protein konsantrasyonlarında görülen artışlar, istatistik bakımından anlamsız olmakla birlikte, defibrotidin uzun süreli kullanılmasında dokularda büyük bir olasılıkla seçici olarak protein sentezini ve / veya salgılanmasını artırıcı etkisi olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Ulutin, O. N., Tunali, H., Aytış, S. Y., Uğur, M. Ş., Balkuv - Ulutin, Ş. : *Haemostas.*, **12**, 130 (1985).
2. Balkuv - Ulutin, Ş., Ulutin, T., Özsoy, L., Göker, B., Ferhanoglu, B., Ulutin, O. N. : *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 59, 1988
3. Çizmeçi, G., Ulutin, O. N : *Thrombas.*, *Haemostas.*, **54** 87 (1985).
4. Çizmeçi, G., Ulutin, O. N : *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*. İstanbul, 1986, s. 199 - 204.
5. Thiemarmann, C., Loebel, P. : *Am. J. Cardiol.*, **56**, 978 (1989).
6. Bayraktar, E., Uğur, M. Ş., Çevikbaş, A., Ulutin, O. N., Yardımcı, T. : *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı* , s. 60, Ankara, 1988.
7. Çevikbaş, A., Ulutin, O. N., Çevikbaş, U., Yardımcı, T., Erbenği, T. : *IX Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kongre Kitabı*, s. 255, İstanbul, 1989.
8. Bilsel, S., Taga, Y., Yalçın, S., Emerk, K., Ulutin O. N. : *Hematoloji Vol. IX. Türk Hematoloji Derneği XIX. Kongresi*, s. 61 - 65, Bursa 1988.
10. Yardımcı, T., Uğur, M. Ş., Kılıç, M. Y., Ferhanoglu, B., Ulutin, O. N. : *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 55, Ankara, 1988.
11. Yardımcı, T., Emekli, N.B., Uğur, M. Ş., Ulutin, O. N. : *IV. Meeting of Asian Pacific Div. FISH*. Abs. A - T, Seoul, Korea, 1979.
12. Uğur, M. Ş. : *Defibrotidin Trombosit Ultrastruktürüne etkisi, Doktora Tezi*, İst. Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embryoloji Bilim Dalı, s. 75 , İstanbul, 1986.
13. Ulutin, O. N., Balkuv - Ulutin, Ş., Uğur, M. Ş., Ulutin, T., Erbenği, T. Ferhanoglu B., Yardımcı, T. : *VI th Meeting of Danubian League agonist Thrombosis and Memorrhagic Disorders* p. 48, Vienna, 1989.
14. Ulutin, T., Balkuv - Ulutin, Ş., Yardımcı, T., Demirkol, F., Ferhanoglu, B., Ulutin, O. N. : *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet kitabı*, s. 57, Ankara, 1988.
15. Yardımcı, T., Ulutin, O. N. : *Weiner Kpinische Wochenchrift*, 98, 221 (1986).
16. Göker, B., Yardımcı, T. : Ulutin, O. N. : *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 56, Ankara, 1989.
17. Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O. N. : *XI. Int. Cong. on Thrombos. abs.* 33, Lubljana, Yugoslavia, 1990.
18. Bayraktar, E., Yardımcı, T., Uğur, M. Ş., Ulutin, O. N. : *Mar. Üniv. Ecz. Der.* 6(1), 57 - 62 (1990).