

## ATEROSKLEROZLU OLGULARDA DEFİBROTİDİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN PAGE YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF DEFIBROTIDE ON PLASMA PROTEINS OF ATHEROSCLEROTIC SUBJECTS BY POLYACRYLAMIDE GEL ELEKTROPHRESIS

Ersin BAYRAKDAR\* - Turay YARDIMCI\* - Musa Ş. UĞUR\* - Orhan N. ULUTIN\*\*

#### 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 levels in plasma were determined by the Lowry method. The protein concentrations were  $90.16 \pm 9.60$  mg/ml and  $94.40 \pm 7.40$  mg/ml before and after defibrotide, respectively. This increase was insignificant.

The protein contents of plasma protein fractions were determined by gel densitometer after DAVIS - PAGE. The albumin concentrations were  $45.90 \pm 6.60$  mg/ml and  $46.75 \pm 6.80$  mg/ml, the  $\alpha_1 + \alpha_2$  -globulin concentrations were  $3.75 \pm 2.00$  mg/ml and  $4.90 \pm 2.50$  mg/ml, the  $\beta$  - globulin concentrations were  $5.40 \pm 2.40$  mg/ml and  $7.00 \pm 3.60$  mg/ml, the  $\gamma$  - globulin concentrations were  $34.84 \pm 5.97$  mg/ml and  $37.80 \pm 7.56$  mg/ml before and after defibrotide respectively. The increases were insignificant.

The plasma proteins were also separated according to their molecular weights by SDS - PAGE. 2 hours after a single administration of defibrotide, although some increases on the protein content of some of the fractions were observed, these differences 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 toplam protein konsantrasyonu Lawry yöntemi ile ölçüldü. Kontrol değerleri 90, 16  $\pm$  9,60 mg/ml iken defibrotid sonrası değerlerinin 94,40  $\pm$  7,40 mg/ml olduğu görüldü.

Plazma protein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları DAVIS - PAGE yöntemi ve jel dansitometresi kullanılarak ölçüldü. Albumin değerlerinin 45,90  $\pm$  6,60 mg/ml iken

\* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,  
Nişantaşı / İSTANBUL

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

46,75 ± 6,80 mg/ml,  $\alpha_1 + \alpha_2$  - globulin değerlerinin 3,75 ± 2,00 mg/ml iken 4,90 ± 2,50 mg/ml,  $\beta$  - globulin değerlerinin 5,40 ± 2,40 mg/ml iken 7,00 ± 3,60 mg/ml,  $\gamma$  -globulin değerlerinin 34, 84 ± 5,97 mg/ml iken 37,80 ± 7,56 mg/ml olduğu görüldü. Artışlar anlamsız bulundu.

Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımında SDS - PAGE yöntemi kullanıldı. Jel dansitometresi yardımıyla protein bantlarının protein konsantrasyonları mg/ml olarak ölçüldü. Bantların protein konsantrasyonlarında anlamsız değişimler gözlemlendi.

## GİRİŞ

Defibrotid 16000 molekül ağırlığında bir polideoksiribonükleik asittir. Sığır akciğerinden saflaştırılan DNA'nın, depolimerizasyonu ile elde edilir. Özellikle endoteli aktive etmektedir ve ilaç olarak tedavide kullanılmaya başlanmıştır (1).

Koagülasyon üzerine açık bir etkisi olmamakla beraber bir çok modellerde hem in vitro hem de in vivo deneylerde doza bağlı olarak trombus oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (2). Defibrotidin doza bağlı olarak fibrinolitik aktive üzerine etkisi, fibrinolitik aktivasyon mekanizmalarının uyarılması ve inhibitör aktivitesinin indirgenmesi yoluyla olmaktadır (3). Defibrotid prostasiklinin ( $\text{PGI}_2$ ) ve prostaglandin  $\text{E}_2$  'nin damar endotelinden yapım ve salgılanımını uyarır (4,5). Ayrıca defibrotidin hayvan modellerinde kalp kasını koruduğu gösterilmiştir (6).

Farelerde yaptığımız çalışmalarda defibrotidin total plazma protein konsantrasyonu ile birlikte bazı protein fraksiyonlarının konsantrasyonlarını artırdığı ve karaciğer protein sentezini stimule ettiği gözlemlendi (7,8).

Ayrıca bir başka çalışmada endotel hücre kültüründe protein sentezini artırdığı rapor edilmiştir (9).

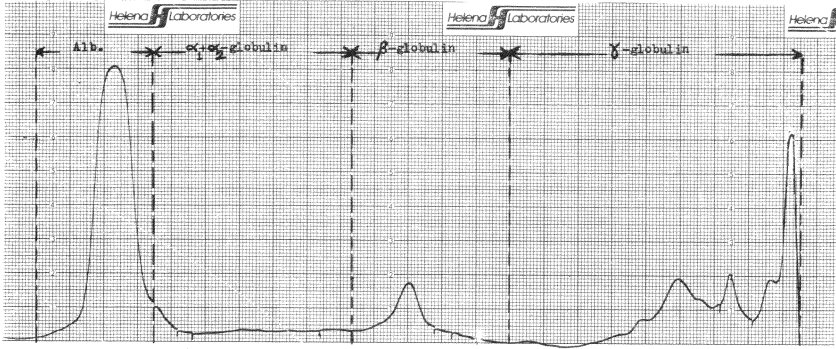
## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 8 aterosklerozlu hastaya 10 mg/kg defibrotid dardan enjekte edildi. Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra alınan kan örnekleri kontrol ve deney grupları olarak kullanıldı. Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak 3500 rpm'de 15 dakika çevrildi. Tüplerden plazma kısmı alınarak deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

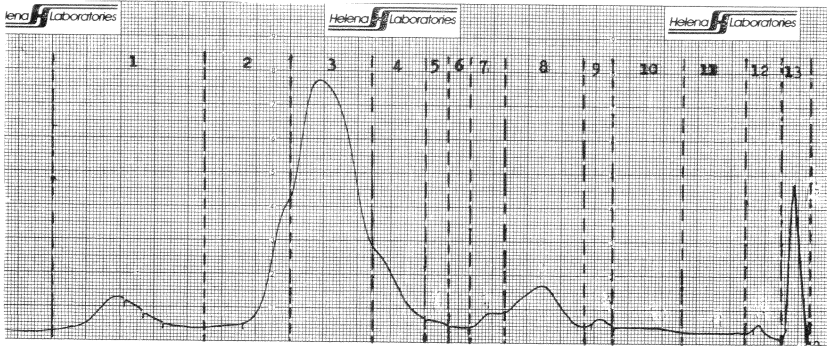
Plazmadaki toplam protein konsantrasyonu Lowry yöntemi (10) ile mg/ml olarak hesaplandı.

Plazma protein fraksiyonları DAVIS - PAGE Yöntemi (11) ile incelendi. Jellerde akrilamid konsantrasyonu % 7,5 idi. Bu yöntemle elde edilen kontrol ve deney gruplarının plazma protein bantlarını içeren jeller, jel dansitometresine konarak jel diyagramları elde edildi (Şekil 1). Bu diyagramlardan toplam alana karşı fraksiyon alanları % olarak bulundu. Lowry yöntemi ile hesaplanan toplam protein konsantrasyonu değerlerinden her fraksiyonun protein konsantrasyonu mg/ml olarak bulundu.

Plazma proteinleri molekül ağırlıklarına göre SDS - PAGE yöntemi ile incelendi (12). 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).



Şekil-1 : Bir aterosklerozlu hastanın DAVIS - PAGE jelinden elde edilen dansitometrik diyagramı.



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

Bu diyagramlardan toplam alana karşı protein bantlarının alanı % olarak bulundu. Lowry yöntemi ile hesaplanan toplam protein konsantrasyonu değerlerinden her protein bantının konsantrasyonu mg/ml olarak bulundu.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra Lowry yöntemi ile ölçülen plazmadaki toplam protein konsantrasyonunun ortalama değerleri ve istatistiki değerlendirme sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

Önce	mg/ml	2 saat sonra	mg/ml
90,16 ± 9,60		94,40 ± 1,40	

Defibrotid uygulamasından 2 saat sonra plazmadaki toplam protein konsantrasyonunda görülen artış anlamsız bulundu.

Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra DAVIS - PAGE yöntemi, jel dansitometresi ve Lowry yöntemi ile ölçülen plazma protein fraksiyonlarına ait protein konsantrasyonlarının ortalama değerleri ve istatistiki değerlendirme sonuçları Tablo -1'de gösterilmiştir.

**Tablo-1:** Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra plazma protein fraksiyonlarına ait protein konsantrasyonu değerleri.

Fraksiyon Adı	Önce	mg/ml	2 saat sonra	mg/ml
Albumin	45,90 ±	6,60	46,75 ±	6,80
$\alpha_1 + \alpha_2$ - globulin	3,75 ±	2,00	4,90 ±	2,50
$\beta$ - globulin	5,40 ±	2,40	7,00 ±	3,60
$\gamma$ - globulin	34,84 ±	5,97	37,80 ±	7,56

Bütün protein fraksiyonlarının, protein konsantrasyonlarında, defibrotid uygulamasından 2 saat sonra görülen artışlar anlamsız bulundu.

Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat 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 - 2'de gösterilmiştir.

**Tablo-2:** Defibrotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra plazma protein bantlarının molekül ağırlıklarına göre protein konsantrasyonları değerleri.

Bant No.	MW Dalton	Önce	mg/ml	2 saat sonra	mg/ml
1	353000	4,24 ±	1,45	4,14 ±	1,50
2	242000	0,56 ±	0,67	0,87 ±	0,85
3	203000	1,05 ±	0,97	1,24 ±	0,85
4	179000	1,00 ±	0,40	1,00 ±	0,50
5	166000	1,00 ±	0,70	0,70 ±	0,40
6	133000	2,10 ±	2,10	2,30 ±	2,90
7	123000	2,00 ±	1,30	1,80 ±	1,20
8	116000	1,50 ±	0,80	1,70 ±	0,90
9	98000	6,80 ±	3,70	7,10 ±	2,80
10	78000	48,10 ±	13,20	53,80 ±	10,50
11	64000	12,40 ±	4,30	12,10 ±	2,15
12	52000	1,70 ±	1,10	2,40 ±	1,20
13	28000	7,60 ±	2,20	7,20 ±	1,60

Bütün protein fraksiyonlarının, protein konsantrasyonlarında, defibrotid uygulamasından 2 saat sonra görülen değişimler anlamsız bulundu.

Aterosklerozlu hastalarda defibrotidin etkisi *in vivo* olarak çalışılmış ve defibrotidin, aterosklerozda azalan prostasiklini (13) c-AMP seviyesini arttırdığı (14,15), yine aterosklerozda arttığı bilinen trombosit fonksiyonlarını inhibe ettiği (16,17), anlamlı olarak azalan protein C'yi artırırken yine azalmış olan protein S' e etkisiz kaldığı (18) gösterildi. Trombosit membranını da *in vivo* olarak etkilediği, aterosklerozda defektif olan glukoz transportunu arttırırken (19,20), trombosit membranının integral bir proteini olan ve aterosklerozda azalmış olan  $\gamma$ -glutamil transferazı da arttırdığı gösterildi (21,22,23).

Bu çalışmada ise tek dozluk defibrotid uygulamasından 2 saat sonra dahi plazmadaki toplam protein konsantrasyonunda ve plazma protein fraksiyonlarının protein konsantrasyonlarında istatistiki bakımdan anlamsız olmakla birlikte görülen artışlar, defibrotidin uzun süreli kullanılmasında dokularda büyük bir olasılıkla seçici olarak protein sentezini ve/veya salgılamasını arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Avellone, G., Mandala, V., Pinto, A., Marti O.A., Strano, A.: *Haemostas*. **16**: 55 (1986).
2. Ulutin, O.N., Tunalı, H., Girişkin, G., Aytış, Ş.Y., Uğur, M.Ş., Balkuv Ulutin, Ş.: *Haemostas*. **12**, 130 (1985).
3. Balkuv - Ulutin, Ş., Ulutin, T., Özsoy, L., Göker, B., Ferhanoglu, B., Ulutin, O.N.: *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 59, 1988.
4. Çizmecı, G., Ulutin, O.N.: *Thrombos. Haemostas*: **54**, 87 (1985).
5. Çizmecı, G., Ulutin, O.N.: *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*. Eds: O.N. Ulutin, H. Vinazzer. Gözlem Matbaacılık Koll. Şti. İstanbul, 1986, pp. 199 - 204.
6. Thiemarmann, C., Loebei, P.: *Am. J. Cardiol*: **56**: 978 (1989).
7. Bayraktar, E., Uğur, M.Ş., Çevikbaş, A., Ulutin, O.N., Yardımcı, T.: *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 60, Ankara, 1988.
8. Çevikbaş, A., Ulutin, O.N., Çevikbaş, U., Yardımcı, T., Erbenđi, T.: *IX. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kongre Kitabı*, s. 255, İstanbul, 1989.
9. Bilsel, S., Taga, Y., Yalçın, S., Emerk, K., Ulutin, O.N.: *Hematol, Rev*: **3**, 29 (1989).
10. Lowry, O., *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**, 440 (1969).
13. Ulutin, O.N.: *Hematoloji vol. IX. Türk Hematoloji Derneđi XIX. Kongresi*, s. 61 - 65, Bursa 1989.
14. Yardımcı, T., Uğur, M.Ş., Kılç, M.Y., Ferhanoglu, B., Ulutin, O.N.: *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özel Kitabı*, s. 55, Ankara, 1988.
15. Yardımcı, T., Emekli, N.B., Uğur, M.Ş., Ulutin, O.N.: *IV. Meeting of Asian Pacific. Div. FISH. Abs. A-T*, Seoul, Korea, 1979.
16. Uğur, M.Ş.: *Defibrotidin Trombosit Ultrastruktürüne Etkisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embryoloji Bilim dalı, s. 75, İstanbul 1986.
17. Ulutin, O.N., Balkuv - Ulutin, Ş., Uğur, M.Ş, Ulutin, T., Erbenđi, T., Ferhanoglu, B., Yardımcı, T.: *VI th Meeting of Danubian League against Thrombosis and Hemorrhagic Disorders*. P. 48, Vienna, 1989.
18. Ulutin, T., Balkuv - Ulutin Ş., Yardımcı, T., Demirkol, F., Ferhanoglu, B., Ulutin, O.N. *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 57, Ankara 1988.
19. Yardımcı, T., Ulutin, O.N: *Wiener Klinische Wochenschrift*: **98**, 221 (1986).
20. Göker, B., Yardımcı, T., Ulutin, O.N.: *XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı*, s. 56, Ankara 1989.
21. Yaman, A.: *Normal ve Aterosklerozlu Olguların Trombositlerinde Gamma Glutamil TransferazAktivitesi* Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. s. 58, İstanbul, 1990.
22. Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O.N.: *XI.Int. Cong. on Thrombos. abs. 33*, Lubljana, Yugoslavia, 1990.
23. Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O.N.: Yayınlanmamış gözlemler.