

Defibrotid Uygulamasının Yüksek Kolesterolü Diyet Uygulanan Tavşanlarda Kalp ve Karaciğer Dokusunda Antioksidan Duruma Etkisi

The Effects of Defibrotide Administration on Antioxidant Status in Heart and Liver Tissues of Rabbits Fed with High Cholesterol Diet

Handan Ak Çelik*

Can Duman***

Hikmet Hakan Aydın*

Ece Onur Aydemir****

Ceyda Kabaroğlu**

Oya Bayındır**

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir

*** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kocaeli

**** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Amaç: Defibrotid endotel hücre fonksiyonlarını düzenleyen, arter, ven ve kılcal damarlarda antitrombik etkileri bulunan bir polideoksiribonükleotiddir. Çeşitli araştırmalar farklı doku ve organ iskemisi modellerinde defibrotidin koruyucu etkisini ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, kolesterolden zengin diyet sonrası uygulanan defibrotidin doku ve kan örneklerinde lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler, antioksidan tiyol bileşiği glutatyon ve vazoaktif bir mediatör olan nitrik oksidin regülasyonu üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 40 adet, erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanların standard diyet (Grup I ve III) ve yüksek kolesterol (Grup II ve IV) içerikli diyet ile beslenmeleri sağlandı. Araştırmanın başlangıcında Grup III ve Grup IV'deki hayvanların diyetine defibrotid (60 mg/kg/gün) eklendi (standard diyet alan ve yüksek kolesterolü diyet alan). Çalışmanın başında ve 10 haftalık sürenin sonunda defibrotidin etkilerini değerlendirmek için serumda total kolesterol, kalp ve karaciğer dokusunda malondialdehid, glutatyon, nitrik oksid metabolitlerinin düzeyleri ile katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S transferaz aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: Bazal değerler ile kıyaslandığında serum kolesterol konsantrasyonları Grup II ve IV'de anlamlı olarak yüksekti. Grup II'de malondialdehid konsantrasyonları katalaz aktivitesindeki düşmeye paralel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup IV'ün ortalama nitrik oksid düzeyleri Grup II'nin düzeyleri ile karşılaştırıldığında kalp dokusunda 3.62 kat (430.8'e karşı 118.8 µmol/g yaş doku) ve karaciğerde 2.35 kat (595.5'e karşı 253.2 µmol/g yaş doku) artış tespit edildi (sırasıyla).

Sonuç: Bulgularımız uzun süreli defibrotid tedavisinin vazoaktif nitrik oksid salınımı ve antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artış yoluyla dokular için koruyucu olabileceğini desteklemektedir.

Sonuçlarımız ayrıca aterogenik diyetin malondialdehid düzeylerini arttırdığını ve katalaz aktivitesini düşürdüğünü göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Ateroskleroz, defibrotid, malondialdehid, katalaz, glutasyon, nitrik oksid

ABSTRACT

Objective: Defibrotide, a polydeoxyribonucleotide, has been found to modulate endothelial cell function and to have an antithrombotic effect on arteries, veins and capillaries. A significant amount of evidence has been found about the protective role of defibrotide in different models of tissue and organ ischemia. The aim of this study was to evaluate the effects of defibrotide administration in the modulation of lipid peroxidation, antioxidant enzymes, antioxidant thiol compound glutathione and nitric oxide, a vasoactive mediator, following a high cholesterol diet.

Material and Methods: The study involved 40 New Zealand male rabbits, fed with standard (Groups I and III) and high cholesterol (Groups II and IV) chow. At the beginning of the study, animals in Group III and Group IV were allocated to treatment with defibrotide (60 mg/kg/day). After a 10 week period, effects of defibrotide administration was evaluated by measuring serum cholesterol and malondialdehyde, catalase, GSH, NOx, glutathione reductase, and glutathione S-transferase concentrations in heart and liver tissues.

Results: Compared to the baseline values, serum cholesterol concentrations were increased in Groups II and IV, significantly. In Group II, malondialdehyde concentrations were significantly higher with a parallel decrease in catalase activity. Defibrotide treatment in Group IV, compared to Group II, increased the mean heart and liver nitric oxide levels by 3.62 folds (430.8 vs. 118.8 µmol/g wet tissue) and 2.35 folds (595.5 vs. 253.2 µmol/g wet tissue), respectively.

Conclusion: Our observations suggest that long term defibrotide therapy can be protective for the tissues by increasing the nitric oxide levels and antioxidant enzymes activities. Our data also imply that atherogenic diet increases malondialdehyde levels and decreases catalase activity.

Key Words: Atherosclerosis; defibrotide; malondialdehyde; catalase; glutathione; nitric oxide

GİRİŞ

Defibrotid domuz ve sığır mukozasından elde edilen ortalama 20 kDa ağırlığında fibrinolitik ve anti-trombotik etkilere sahip olan kompleks, tek zincirli bir polideoksiribonükleik asittir (1-3). Defibrotidin ABD ve Avrupa'daki klinik deneyleri ağır veno-oklusif hastalıkta yararlı etkilerini ortaya koymuştur (4,5). Defibrotid, pıhtılaşmayı önleyici eikosonoidlerin salınımını artırır (6) ve doku plazminojen aktivatörünün salınımını artırıp, inhibitörlerini azaltarak fibrinolitik aktivite gösterir (7). Daha güncel çalışmalar, Defibrotidin endotel hücrelerinden nitrik oksid (NO) salınımına neden olarak akut inflamatuvar hastalıklarda sitoprotektif etkileri olabileceğini göstermektedir (8).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hiperkolesterolemik aterosklerozun gelişiminde rolü olduğu bilinmektedir (9). Hiperkolesterolemi bir çok yol ile oksidatif stress oluşturabilir

(10). Defibrotidin serum kolesterolünü düşürücü ve hiperkolesterolemik ateroskleroz ile ilişkili doku hasarını azaltıcı/önleyici etkilerinin hem antioksidan ve hem de hipolipidemik mekanizmalar ile olduğu öne sürülmektedir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada, aterosklerotik diyet ile beslenen tavşanların aort ve beyin dokusunda defibrotidin koruyucu etkisini göstermiştik (11). Bu çalışmada ise kolesterolden zengin diyetle beslenen tavşanlarda uzun süreli defibrotid tedavisinin kalp ve karaciğer dokusunda antioksidan aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır.

Defibrotidin hiperkolesterolemik tavşan modelinde doku hasarını azaltıcı özellikleri ile ilgili olarak daha önce bir çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmanın temel amacı tavşanlarda kontrollü bir deney modelinde hiperkolesterolemi ile ilişkili oksidan strese defibrotidin kalp ve karaciğer dokularını koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal sarf malzemesi Sigma'dan (Deisenhofen, Almanya) sağlanmıştır.

Deney hayvanları

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Bilim dalından temin edilen, ağırlığı 2-2.5 kg (8-12 haftalık) olan Yeni Zelanda türü beyaz erkek tavşanlar çalışmada kullanılmıştır. Çalışma başlangıcında toplam kırk tavşan rastgele on hayvanlık dört gruba ayrılmıştır (Tablo 1).

Grup I : Standard diyet

Grup II : Yüksek kolesterolü diyet

Grup III : Standard diyet + defibrotid

Grup IV : Yüksek kolesterolü diyet + defibrotid

Çalışma süresince istedikleri kadar su içmelerine izin verilen tavşanlar, 12 saatlik aydınlık/karanlık periyodlarında tutulmuşlardır. 2 haftalık bir adaptasyon süreci sonrası, bazal total kolesterol, malondialdehid (MDA), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSG-Rx) düzeylerinin tespiti için hayvanlardan venöz kan alınmıştır. Daha sonraki 8 hafta boyunca deney gruplarına Tablo 1'de özetlenen protokol uygulanmıştır. Defibrotid, per oral yol ile içme suyuna katılarak deneklere verilmiştir. İki aylık deney protokolünün sonunda, hayvanlara anestezi ile ötanazi yapıldı ve karaciğer ve kalpleri belirtilen parametrelerin çalışılması için çıkarıldı.

Homojenatların hazırlanması

Ötanazi sonrası, karaciğer ve kalp hemen çıkarılarak soğuk salin ile yıkandı. Dokular küçük parçalara ayrıldıktan sonra yaş olarak tartıldı ve 2 ml soğuk tampon (50 nM TRIS, 0.1 mM EDTA, pH 7.60) içinde 4°C'de cam homojenizatör başlığı kullanılarak 2 dakika 1500 r.p.m.'de homojenize edildi. Sitolitik fraksiyonları elde etmek için homojenatlar 4°C'de 30 000 x g'de 60 dakika santrifüj edildi. Analizler, 4°C'de korunan supernatantlardan 24 saat içinde yapıldı.

Serum total kolesterol (TC) ölçümü

Serum total kolesterol düzeyleri Technicon Dax 48 otomatik analizörde (Bayer Diagnostics, Tokyo, Japonya) kinetik enzimatik metodla ölçüldü (Bayer Diagnostics, Toshiba, Tokyo, Japan).

Homojenatta protein ölçümü

Doku örneklerin protein miktarı Lowry yöntemi ile otomatik analizörde kantite edildi (Hitachi 704, Boehringer Mannheim GmbH Mannheim, Almanya).

Malondialdehid (tiyobarbitürik asid-reaktifi) ölçümü

MDA, 532 nm dalga boyunda bir post-kolon fotodiyot dedektörü ile normal faz HPLC ile ölçüldü (Shimadzu LC 10A, Shimadzu, Kyoto, Japonya) (12). Seperasyon C18 kolon kullanılarak (4.6 x 25.5 µm Shimpack HRC-ODS) 10 mmol/L potasyum dihidrojen fosfat, pH 6.80: metanol (60:40, (v/v)) ile 0.5 ml/dakika akım hızında yapıldı. MDA kantitasyonu için 1, 3, 3, 3-tetraethoxipropane (TEP) standard olarak kullanıldı.

Tablo 1. Deney grupları.

Gruplar	Diyet tipi/ tedavi	Diyet içeriği
I (n=10)	Standard diyet	standard tavşan yemi
II (n=10)	Yüksek kolesterolü diyet	%1 kolesterol ve %1.4 tereyağ eklenmiş standard tavşan yemi
III (n=10)	Standard diyet + defibrotid	standard tavşan yemi + 60 mg kg vücut ağırlığı ⁻¹ gün ⁻¹ defibrotid (PO)
IV (n=10)	Yüksek kolesterolü diyet + defibrotid	%1 kolesterol ve %1.4 tereyağ eklenmiş standard tavşan yemi + 60 mg kg vücut ağırlığı ⁻¹ gün ⁻¹ defibrotid (PO)

Katalaz (CAT) ölçümü

Doku katalaz aktivitesi spektrofotometrik olarak 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Homojenat H₂O₂ substratı ile inkübe edildikten sonra reaksiyon amonyum molibdat ile durduruldu. Molibdat ve H₂O₂ ile oluşan sarı renk kompleksinin yoğunluğu ölçülerek katalaz aktivitesi belirlendi (13).

Redükte glutasyon (GSH) ölçümü

Doku homojenatlarında GSH analizi Hitachi 704 otomatik analizörde gerçekleştirildi (Boehringer Mannheim GmbH Mannheim, Almanya). GSH ve DTNB (5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asid) reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin yoğunluğu 405 nm dalga boyunda ölçüldü (14).

Glutasyon redüktaz (GSH-Rx) ölçümü

Doku homojenatlarındaki enzim aktiviteleri Hitachi 704 otomatik analizörde (Boehringer Mannheim GmbH Mannheim, Almanya) tespit edildi. (15). Yöntem reaksiyon karışımındaki GSH'nin NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından redükte edilmesine ve NADPH absorbansındaki düşmenin 340 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır.

Glutasyon S-transferaz (GSH-ST) ölçümü

Doku homojenatlarında enzim aktivitesi, 1-kloro 2,4 dinitrobenzenin (CDNB) ve glutasyon konjugatının yoğunluğunun 340 nm'de Hitachi 704 otomatik analizörde (Boehringer Mannheim GmbH Mannheim, Almanya) ölçülmesi ile belirlendi (16).

Nitrik oksid metabolitleri (NOx) (Nitrat/nitrit) ölçümü

Dokularda nitrik oksid üretimi NO₂⁻/NO₃⁻ tespitine dayanan bir metod ile ölçüldü ve

üretilen NO metabolitleri (NOx) olarak ifade edildi (17). Nitrat konsantrasyonu Aspergillus sp.'den (EC 1.6.6.2) elde edilen nitrat redüktaz kullanılan enzimatik, end-point bir metodla ölçülmüştür. Yöntem, beta-NADPH'nin oksidasyonu sonucu 340 nm'deki absorbans düşüşünün ölçülmesine dayanmaktadır.

İstatistiksel Analiz

Örneklerin istatistiksel analizi için ANOVA testi kullanıldı. Dört gruptaki farklılıkların istatistiksel anlamlılıklarının belirlenmesi için Duncan testi uygulandı. Çoklu kıyaslamada tip I hata Bonferroni testi ile kontrol edildi. Sonuçlar ortalama ± S.D. olarak verildi ve p < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler SPSS 13 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Tavşanların serum kolesterol düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir. Serum kolesterol düzeyleri kontrol grubunda (Grup I) 86.88 ± 9.35 mg/dl, kolesterol ile beslenen Grup II'de (Yüksek kolesterolü diyet) 397.68 ± 78.01 mg/dl ve Grup IV'de (kolesterol + defibrotid grubunda) 208.71 ± 61.13 mg/dl bazal düzeylerden yüksek bulundu (p < 0.05). Kolesterol düzeyleri Grup II'de 6.8 kat artmıştı fakat defibrotid grubu için (Grup III) serum kolesterol düzeylerinde bir farklılık bulunamadı.

4 farklı grup için kalp ve karaciğer dokularındaki malondialdehid düzeyleri Tablo 3 ve Tablo 4'te gösterilmiştir. MDA miktarı kolesterol ile beslenen Grup II'de tüm diğer grupların kalp ve karaciğer düzeyleri ile kıyaslandığında yüksek bulundu (p < 0.05) (Şekil 1). Kalp ve karaciğer dokularında kolesterol-defibrotid grubu (Grup IV) ile kontrol (Grup I)

Tablo 2. Deney gruplarında bazal ve deney sonrası kolesterol düzeyleri.

Serum Kolesterol (mg/dl)	Grup I Kontrol (n=9)	Grup II Kolesterol (n=8)	Grup III Defibrotid (n=9)	Grup IV Kolesterol+defibrotid (n=6)
Bazal	63.2 ± 11.15	58 ± 9.38	54.1 ± 5.90	56.6 ± 8.43
Deney sonunda	86.88 ± 9.35	397.68 ± 78.01	52.37 ± 5.26	208.71 ± 61.13

Tablo 3. Kalp dokusunda deneysel parametrelere ait ölçüm sonuçları.

Parametre (kalp dokusunda)	Grup I Kontrol (n=9)	Grup II Kolesterol (n=8)	Grup III Defibrotid (n=9)	Grup IV Kolesterol+defibrotid (n=6)	Gruplar arasında anlamlı farklılıklar (p < 0.05)
MDA (nmol/g yaş doku)	28.7 ± 7.0	57.6 ± 6.9	34.7 ± 3.0	46.3 ± 4.5	II>I,III,IV; IV>I,III
Katalaz(U/mg protein)	765.4 ± 236.1	261.2 ± 46.3	659.5 ± 178.0	383.5 ± 46.4	II<I,III,IV; IV<I,III
GSH (mg/g yaş doku)	891.7 ± 1328.6	134.5 ± 36.2	707.2 ± 38.0	257.8 ± 34.7	II<I,III; IV<I,III
GSH-Rx (mU/mg protein)	227.2 ± 39.7	171.2 ± 9.4	222.5 ± 42.3	189.8 ± 20.9	II<I,III; IV<I,II
GSH-ST (mU/mg protein)	105.1 ± 30.3	60.6 ± 11.9	85.0 ± 11.0	79.1 ± 10.1	II<I,III,IV
NOx (µmol/g yaş doku)	1640.6 ± 785.1	118.8 ± 55.0	1300.8 ± 497.5	430.8 ± 64.3	II<I,III; IV<I,III

Örnekler gereçler ve yöntemde belirtilen yöntemlerle izole ve kantite edilmiştir. Veriler ortalama değer ± S.D formatında verilmiştir. * p< 0.05 Gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık.

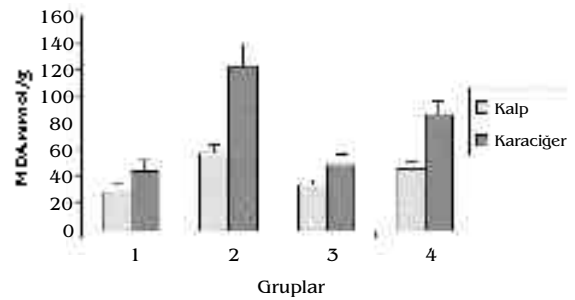
Tablo 4. Karaciğer dokusunda deneysel parametrelere ait ölçüm sonuçları.

Parametre (karaciğer dokusunda)	Grup I Kontrol (n=9)	Grup II Kolesterol (n=8)	Grup III Defibrotid (n=9)	Grup IV Kolesterol+defibrotid (n=6)	Gruplar arasında anlamlı farklılıklar (p < 0.05)
MDA (nmol/g yaş doku)	44.2 ± 8.1	122.4 ± 16.3	48.8 ± 8.3	86.1 ± 9.4	II > I,III,IV; IV > I,III
Katalaz(U/mg protein)	3540.4 ± 370.0	2217.6 ± 177.5	3389.1 ± 122.7	2618.0 ± 101.4	II < I,III; IV < I,III
GSH (mg/g yaş doku)	2.1956 ± 0.393	1.1100 ± 0.1765	2.0088 ± 0.2980	1.5483 ± 0.1273	II < I,III,IV; IV < I,III
GSH-Rx (mU/mg protein)	167.3 ± 23.66	111.5 ± 19.39	165.22 ± 23.51	131.5 ± 28.66	II < I,III
GSH-ST (mU/mg protein)	3517.7 ± 1014.9	1344.2 ± 403.0	3246.1 ± 757.8	2725.0 ± 624.4	II < I,III; III,IV < I
NOx (µmol/g yaş doku)	2366.3 ± 1130.4	253.2 ± 104.0	1537.5 ± 866.6	595.5 ± 126.4	II < I,III; IV < I

Örnekler gereçler ve yöntemde belirtilen yöntemlerle izole ve kantite edilmiştir. Veriler ortalama değer ± S.D formatında verilmiştir. * p< 0.05 Gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık.

ve defibrotid grubu (Grup III) arasında anlamlı farklar tespit edildi (p < 0.05) (Şekil 1).

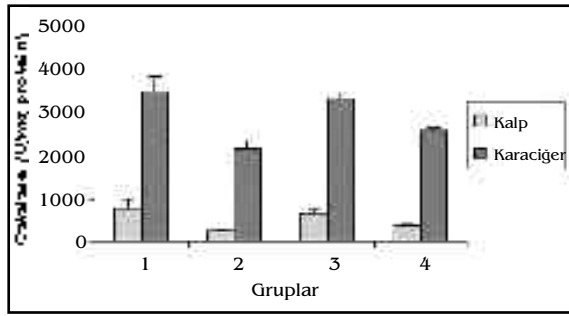
Deney gruplarında ölçülen doku katalaz aktiviteleri Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmiştir. Tüm gruplarda, katalaz düzeylerinin kalp dokusuna kıyasla karaciğer dokusunda daha yüksek olduğu belirlendi (p < 0.05). Kontrol grubunda (Grup I) kalp ve karaciğer dokusu katalaz düzeyleri sırasıyla 764.4 ± 236.1 ve 3540.4 ± 370 U/mg protein olarak ölçüldü. Bu değerler kolesterol ile beslenen (Grup II) ve kolesterol + defibrotid diyeti ile beslenen (Grup IV) grupların kalp ve karaciğer katalaz aktivitelerinden anlamlı olarak yüksek (p < 0.05). Kalp dokusundaki katalaz aktivitesi defibrotid grubunda (Grup III), kolesterol grubu (Grup II) ve kolesterol + defibrotid grubuna (Grup IV) kıyasla yüksek bulundu (Grup III > Grup II ve IV) (p < 0.05). Gruplar arası farklılıklar karaciğer katalaz düzeyleri



Şekil 1. Defibrotidin in vitro MDA düzeyine etkisi. Sonuçlar mmol/g yaş doku olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotid diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama ± SD değerleridir.

için de benzerdi ve defibrotid grubunda (Grup III), Grup II ve Grup IV'e kıyasla artmış bulundu (p < 0.05) (Şekil 2).

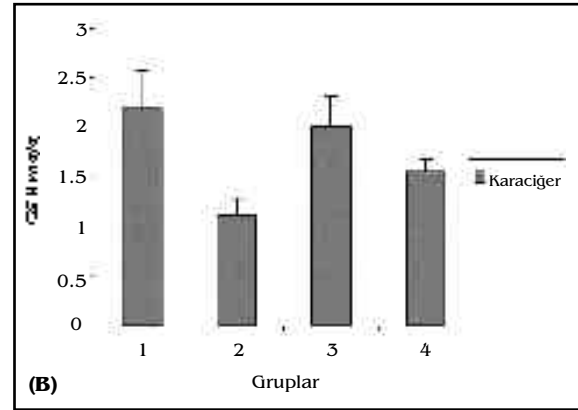
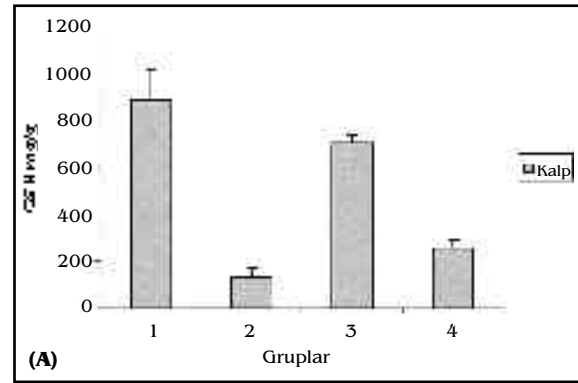
Kalp dokusunda GSH düzeyleri kolesterol grubunda (Grup II), kontrol (Grup I), defibrotid



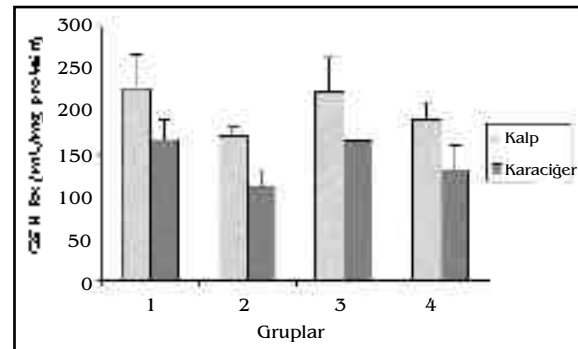
Şekil 2. Defibrotidin kontrol ve çalışma Gruplarında kalp ve karaciğer katalaz aktivitesi üzerine etkisi. Sonuçlar U/mg protein olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotif diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama \pm SD değerleridir.

(Grup III) ve kolesterol + defibrotid Gruplarına (Grup IV) kıyasla azaldığı tespit edildi (Grup II < Grup I, III ve IV) ($p < 0.05$) (Şekil 3A). GSH düzeyleri ayrıca kolesterol + defibrotid grubunda kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu (Grup IV < Grup I, III) ($p < 0.05$). (Tablo 3) (Şekil 3A). Kolesterol grubunda (Grup II) ölçülen kalp dokusu GSH değerlerine benzer şekilde aynı grubun karaciğer dokusu GSH düzeyleri de kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla düşük bulundu (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 3B) (Tablo 4). Ek olarak, GSH düzeylerinin kolesterol + defibrotid grubunda, kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla düşük olduğu belirlendi (Grup IV < Grup I and III) ($p < 0.05$) (Şekil 3B) (Tablo 4).

Deney sonunda, kalp dokusu GSH-RX enzim aktiviteleri kolesterol grubunda (Grup II), kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (Grup II < I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 4) (Tablo 3). Kalp dokusu değerleri ile uyumlu olarak karaciğer dokusunda da, GSH-Rx enzim aktiviteleri kolesterol ile beslenen grupta kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla daha düşük değerlere sahipti (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$). Ayrıca, benzer düşüş eğilimi kolesterol + defibrotid grubunda kontrol ve kolesterol grupları ile kıyaslandığında belirlendi (Grup IV < Grup I, II) ($p < 0.05$) (Şekil 4) (Tablo 4).

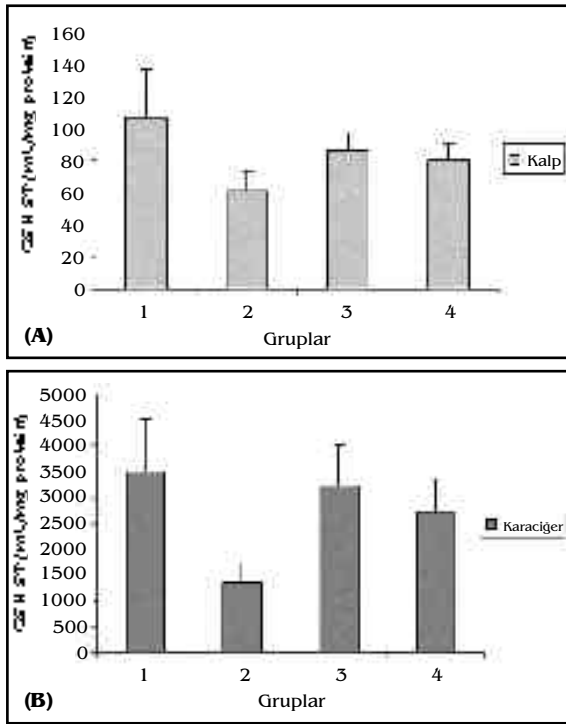


Şekil 3. GSH düzeylerinde A) kalp ve B) karaciğer dokularındaki değişiklikler. Sonuçlar mg/g yaş doku olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotif diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama \pm SD değerleridir.



Şekil 4. GSH-Rx aktivitesindeki değişiklikler mU/mg protein olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotif diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama \pm SD değerleridir.

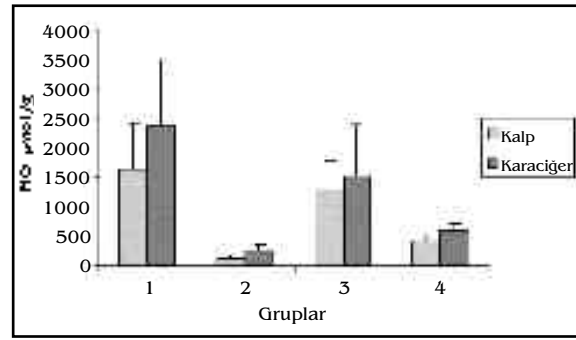
Kalp dokusu glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri kolesterol ile beslenen grupta kontrol ve defibrotid gruplarına göre düşük



Şekil 5. Defibrotidin A) kalp ve B) karaciğer dokusunda GSH-ST düzeylerine etkisi. Sonuçlar mU/mg yaş doku olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotid diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama \pm SD değerleridir.

bulundu (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 5A). Enzim aktivitesi kontroller ile karşılaştırıldığında defibrotid ve kolesterol + defibrotid gruplarında daha düşüktü (Grup III, IV < Grup I) ($p < 0.05$) (Şekil 5A) (Tablo 3). Karaciğer dokusunda, GST enzim aktivitesinin kolesterol grubunda kontrol ve defibrotid gruplarına göre daha düşük olduğu ortaya kondu (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 5B). Ek olarak, GST enzim aktivitesi kolesterol + defibrotid grubunda kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu (Grup IV < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 5B) (Tablo 4).

Kalp dokusunda, nitrik oksid metabolitlerinin (NOx) düzeyleri kontrol ve defibrotid gruplarına kıyasla kolesterol grubunda azalmıştı. (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 6) (Tablo 3). Kalp dokusu NOx düzeyleri kolesterol + defibrotid grubunda kontrol ve defibrotid gruplarından anlamlı olarak daha



Şekil 6. Defibrotidin A) kalp ve B) karaciğer dokusunda NOx düzeyine etkisi. Sonuçlar, μ mol/g yaş doku olarak verilmiştir. Sonuçlar, sırasıyla kontrol (n=9), kolesterol diyeti (n=8), defibrotid diyeti (n=9) ve kolesterol + defibrotid diyeti (n=6) ile beslenen Grupların ortalama \pm SD değerleridir.

düşüktü (Grup IV < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 6) (Tablo 3). Karaciğer dokusunda, NOx düzeyleri benzer şekilde kontrol ve defibrotid gruplarıyla karşılaştırıldığında kolesterol grubunda (Grup II) azalmıştı (Grup II < Grup I, III) ($p < 0.05$) (Şekil 6) (Tablo 4). Ayrıca, karaciğer dokusu NOx düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında kolesterol + defibrotid grubunda da anlamlı olarak daha düşüktü (Grup IV < Grup I) ($p < 0.05$) (Şekil 6) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Defibrotid memeli organlarından ekstrakte edilen ve kontrollü depolimerizasyon ile hazırlanan moleküler ağırlığı 15-30 kDa arasında olan tek zincirli bir polideoksiribonükleotiddir (1,2). Defibrotidin etki mekanizması henüz kesin olarak belirlenmemiştir fakat in vitro ve in vivo çalışmalar defibrotidin trombomodulin, t-PA, prostasiklin ve prostoglandin E2 salınımını stimüle ettiğini, trombin oluşumunu, doku faktörlerinin ekspresyonunu, PAI-1 salınımını ve endotelin aktivitesini ise azalttığını göstermiştir (18-22). Dolayısıyla, defibrotidin hücrelerdeki etki mekanizmalarının belirsizliği yeni araştırmaları gerekli kılmaktadır.

DeneySEL ateroskleroz çalışmaları için tavşan iyi bir model oluşturmaktadır. Nispeten, spontan ateroskleroza dirençli olmalarına karşın, diyetlerine kolesterol eklenmesi sonucu birkaç ay içinde kolesterole bağlı yaygın lezyon-

lar oluşmaktadır (23). Literatürde, tavşanlarda hiperkolesterolemik diyetin vasküler hücreler üzerine etkilerini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (24-25). Bununla beraber, hiperkolesterolemide defibrotidin doku antioksidan enzimler ve antioksidan sistem molekülleri üzerine olan etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmada hiperkolesterolemide defibrotidin olası koruyucu etkileri ve antioksidan enzim sistemleri ve oksidatif stress moleküllerinin bu etkilerin oluşumundaki rollerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Tavşanlarda kolesterol ile beslenme sonrası lipid peroksid düzeylerinin hem karaciğer hem de aort dokusunda arttığı bildirilmiştir (26). Birçok araştırmacı kolesterol ile beslenme sonrasında aort ve kalp dokusunda antioksidan dengenin değiştiğini tespit etmiştir (27-28). Bu çalışmada, hiperkolesterolemik tavşanlarda diyetle eklenen defibrotidin kolesterol düzeylerini düşürdüğünü bulduk. Bu sonuçlar Pescador ve ark. (29)'nin daha önce bildirdiği sonuçlar ile uyumlu değildir. Çalışmada, ayrıca hiperkolesterolemik tavşanların kalp ve karaciğer dokularında defibrotidin yararlı koruyucu etkileri bulunduğu tespit edilmiştir. Defibrotid tedavisi oksidan stres moleküllerinin konsantrasyonlarında ve antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı değişikliklere yol açmaktadır. Ayrıca, defibrotidin belirlenen koruyucu etkisi doku özgünlüğüne bağlı olabilir. Tavşanlarda deney başlangıcındaki bazal düzeyler göz önüne alındığında, GSH düzeyleri, katalaz ve GSH-Rx enzim aktiviteleri kalp dokusunda daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber, NOx düzeyleri ve GSH-ST enzim aktiviteleri ise karaciğer dokusunda daha yüksekti. Kolesterolde zengin diyet kalp dokusunda karaciğer dokusuna kıyasla katalaz enzim aktivitesinde ve GSH düzeylerinde daha fazla bir düşüşe yol açmaktadır (Katalaz için 2.93 kat'a karşın 1.6 kat düşüş; GSH düzeyleri için 6.63 kat'a karşın 2 kat düşüş tespit edilmiştir). Buna karşın, MDA ve NOx bazal düzeyleri ve GSH-ST

enzim aktivitesi karaciğerde daha yüksekti. Hiperkolesterolemik diyet, kalp dokusu ile kıyaslandığında MDA düzeylerinde ve GSH-ST enzim aktivitesinde daha dramatik bir düşüşe yol açmıştır (MDA için 2.77 kat'a karşın 2 kat; GSH-ST için 2.62 kat'a karşın 1.74 kat düşüş tespit edilmiştir). Fakat, karaciğerde bazal NOx düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen, kolesterolden zengin diyet kalp dokusunda NOx düzeylerinde daha dramatik bir düşüşe sebep olmuştur (13.8 kat'a karşın 9.34 kat düşüş). Bu araştırmanın en önemli bulgusu Defibrotidin hiperkolesteroleminin sebep olduğu oksidan strese karşı koruyucu etkisinin gösterilmesidir. Defibrotid hiperkolesteroleminin sebep olduğu oksidan stresi kalp dokusunda GSH ve NOx düzeyleri ve katalaz enzim aktivitesini etkileyerek azaltmaktadır. Buna karşın defibrotidin koruyucu etkisi karaciğer dokusunda daha belirgin olarak MDA düzeyleri ve GSH-ST aktivitesi üzerine olduğu belirlenmiştir.

Birçok mekanizma kısmen de olsa hiperkolesteroleminin tetiklediği oksidan stresi açıklayabilir. Daha önce yapılan çalışmalar hiperkolesterolemik diyetin düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonunda artışa sebep olduğunu göstermiştir (30). Birçok çalışma 4 haftalık hiperkolesterolemik diyet sonrası bir lipid peroksidasyon markırı olan MDA düzeylerinde artış bildirmiştir (31-33). Diğer bir araştırma uzun süreli (3 ay) doymamış yağ asitleri ile beslenmenin tavşanların karaciğer ve aorta ekstraktlarında lipid peroksidasyonu arttırdığını göstermiştir (34). Ulutin ve ark. (35), defibrotidin trombositlerde PGI₂ üretiminde artışa, MDA'da azalışa ve tromboksan A₂ üretiminde düşüşe yol açtığını göstermiştir. MDA'ya zıt olarak, katalaz lipid peroksidasyonun detoksifikasyonunda rolü olan bir enzimdir (34). Bir hem-protein olan katalazın eritrositlerdeki aktivitesi serumdan daha yüksektir (30). Kalp dokusu yoğun aerobik metabolizma sebebiyle yüksek miktarda H₂O₂ üretir. Dolayısıyla, katalazın kalp dokusunda daha yüksek antioksidan aktivitesi

beklenen bir sonuçtur. Greco ve ark. (34), sature yağ asitleri ile beslenen tavşanların karaciğer ve aorta'larında artmış katalaz aktivitesini bildirmiştir.

Diğer bir koruyucu molekül olan glutatyon, reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu rolü olan glutatyon peroksidazın bir substratıdır. Oksidan stresin sonucunda glutatyon düzeyleri özellikle intrasellüler kompartımanlarda düşer (30). Plazma, aort ve karaciğer dokusu GSH düzeyleri aterosklerotik tavşanlarda düşük bulunmuştur (34,36). Farklı tip hayvan ve bitki yağ asitleri, ayrıca karaciğer GSH düzeylerini düşürmüştür (37). Ek olarak, GSH-Rx, GSSH redüksiyonunu katalizleyen anahtar bir enzimdir ve biyolojik olarak önemli olan glutatyonu serbest radikal hasarına karşı savaşmak için redükte formda tutar (38). Slim ve ark. (39), daha önce farklı lipid kombinasyonları ile beslenen tavşanlarda oksidan stress ile antioksidan enzim aktiviteleri arasındaki ters ilişkiyi bildirmiştir. Oksidatif stres durumunda, GSH miktarında düşüş ve GSH peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde azalış bulunmuştur. Irizar ve ark. (23), total glutatyon ve GSH-Rx aktivitesinde bir değişiklik bildirmemiştir fakat hiperkolesterolemik tavşanlarda karaciğer dokusunda azalmış GST aktivitesini göstermişlerdir. Diğer taraftan, başka bir araştırma grubu tavşanların aort dokusunda uzun süreli hiperkolesterolemi sonrası GST'deki düşüşe ek olarak azalmış GSH-Rx aktivitesi bildirmiştir (31). Glutatyon ile konjugasyonla, glutatyon S-transferaz tarafından katalizlenen sistem yaşayan bir organizmayı oluşturan reaktif elektrofillerden koruyan en etkili enzim sistemidir. Tavşanlara kolesterol verilmesi, diğer araştırmacıların bildirdiği gibi (40) glutatyon S-transferaz aktivitesinde belirgin bir azalmaya sebep olmuştur, bu da aterosklerotik hayvanların elektrofiller tarafından oluşturulan toksiste-ye özellikle yatkın olma olasılıklarını düşündürmektedir. Hücrede, GST ilk defans hatından (süperoksid dismutaz, katalaz ve

glutatyon peroksidaz) kaçan reaktif oksijen türleriyle hücre içi etkileşim ile oluşan ikincil oksidasyon ürünlerini detoksifiye eder (41).

Defibrotidin koruyucu mekanizmasında en önemli rolü olabilecek moleküllerden birisi nitrik oksid'tir. Bu pluripotent molekül hem otokrin hem de parakrin homeostaz mediatörüdür ve metabolizmasındaki bozukluk birçok patofizyolojik durumla bağlantılıdır (42). Dokuda hem artışı hem de eksikliği birçok hastalık durumunun gelişimi ile bağlantılıdır. Dolayısıyla NO üretiminin uyarılması veya inhibe edilmesi farmakolojik tedavilerde büyük bir terapötik değer taşır (42). Hellerman ve ark. (43), defibrotidin nitrik oksid sentazın aktivitesini ve miktarını artırdığını göstermiştir. Bu bilgilerin ışığı altında sonuçlarımız defibrotidin oksidatif strese sebep olan hiperkolesterolemi esnasında nitrik oksid salınımını stimüle ettiğini göstermektedir.

Sonuçlarımız, defibrotidin kalp dokusunda katalaz, glutatyon ve nitrik oksid üretimine etkisi olduğunu, MDA üretimi ve GSH-ST aktivitesinin ise karaciğer dokusunda daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Diğer taraftan, defibrotidin hem kalp hem de karaciğer dokusunda GSH-Rx aktivitesi üzerine belirgin bir etkisi bulunamamıştır. Sonuç olarak, bu çalışma defibrotidin oksidatif strese sebep olan deneysel hiperkolesterolemide ortaya çıkan doku hasarını düzeltici etkilerinin bulunduğunu desteklemektedir. Bu öncül bilgiler defibrotidin hiperkolesterolemik diyetin sebep olduğu oksidan stress tedavisinde alternatif olarak yararlı olabileceğine işaret etmektedir. Bununla beraber ilacın terapötik potansiyeli ve etkinliği günümüzde tedavide kullanılan ilaçlar ile kıyaslanarak yeni çalışmalarla tam olarak belirlenmelidir.

Teşekkür

Yazarlar Crinos Pharmaceuticals'a (Villa Guardia, Como, Italy) çalışmada kullanılan defibrotid'i sağladığı için teşekkür eder.

KAYNAKLAR

1. Pescador R, Porta R, Mantovani M, Prino G. Cardio-protective effects of defibrotide: a minireview. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17 (Suppl 1): 96-100.
2. Ulutin ON, Balkuv-Ulutin S, Ugur MS, Ulutin T, Ozsoy Y, Cizmeci G. The pharmacology and clinical pharmacology of defibrotide: a new profibrinolytic, antithrombotic and anti-platelet substance. *Adv Exp Med Biol* 1990; 281: 429-38.
3. Pescador R, Porta R, Ferro L. An integrated view of the activities of defibrotide. *Semin Thromb Hemost* 1996;22 Suppl 1: 71-5.
4. Richardson PG, Elias AD, Krishnan A, Wheeler C, Nath R, Hoppensteadt D, Kinchla NM, Neuberg D, Waller EK, Antin JH, Soiffer R, Vredenburgh J, Lill M, Woolfrey AE, Bearman SI, Iacobelli M, Fareed J, Guinan EC. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population. *Blood* 1998; 92(3): 737-44.
5. Chopra R, Eaton JD, Grassi A, Potter M, Shaw B, Salat C, Neumeister P, Finazzi G, Iacobelli M, Bowyer K, Prentice HG, Barbui T. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease: results of the European compassionate-use study. *Br J Haematol* 2000; 111(4): 1122-9.
6. Niada R, Porta R, Pescador R, Mantovani M, Prino G. Protective activity of defibrotide against lethal acute myocardial ischemia in the cat. *Thromb Res* 1986; 42(3): 363-74.
7. Klocking HP. Acute t-PA release by defibrotide. *Thromb Res* 1992; 66(6): 779-85.
8. Palmer KJ, Goa KL. Defibrotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders. *Drugs* 1993; 45(2): 259-94.
9. Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001; 82(4): 674-82.
10. Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30(11): 849-54.
11. Aydemir EO, Duman C, Celik HA, Turgan N, Uysal A, Mutaf I, Habif S, Ozmen D, Nisli N, Bayindir O. Effects of defibrotide on aorta and brain malondialdehyde and antioxidants in cholesterol-induced atherosclerotic rabbits. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30(2): 101-7.
12. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43(7): 1209-14.
13. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51.
14. Beutler E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu Rev Nutr* 1989; 9: 287-302.
15. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Stratton Inc. Orlando, 1984, pp74-76.
16. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130-9.
17. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 41(6 Pt 1): 904-7.
18. Palmer KJ, Goa KL. Defibrotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders. *Drugs* 1993; 45: 259-94.
19. Nunziata A, Mariani MF, Cascone M, Calvani AB, Pescador R. Increased plasma t-PA activity and urinary PGE2 after repeated oral administration of defibrotide to the rat and the mouse. *Thromb Res* 1991; 64: 279-84.
20. Violi F, Ferro D, Saliola M, Quintarelli C, Basili S, Balsano F. Effect of oral defibrotide on tissue plasminogen activator and tissue-plasminogen activator inhibitor balance. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42: 379-83.
21. Zhou Q, Chu X, Ruan C. Defibrotide stimulates expression of thrombomodulin in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1994; 71: 507-10.
22. San T, Moini H, Emerk K, Bilsel S. Protective effect of defibrotide on perfusion induced endothelial damage. *Thromb Res* 2000; 99: 335-41.
23. Irizar A, Ioannides C. Marked inhibition of hepatic cytochrome P450 activity in cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Toxicology* 1998; 12(3): 179-83.
24. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cucurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990; 81(2): 127-35.
25. Greco AV, Mingrone G. Serum and biliary lipid pattern in rabbits feeding a diet enriched with unsaturated fatty acids. *Exp Pathol* 1990; 40(1): 19-33.
26. Sulyok S, Bar-Pollak Z, Feher E, Kemenes I, Kantor I, and Feher J. Liver lipid peroxidation induced by cholesterol and its treatment with a dihydroquinoline type free radical scavenger in rabbits. *Acta Physiol Hungar* 1984; 64: 437-42.

27. Del Bocchio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, and Cuccurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990; 81: 127-35.
28. Mantha SV, Prasad M, Kalra J, and Prasad K. Antioxidant enzymes in hypercholesterolaemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis* 1993; 101: 135-144.
29. Pescador R, Porta R, Conz A, Mantovani M, Prino G. Defibrotide decreases cholesterol amount in hypercholesterolemic rabbit aorta, with no modification of plasma or lipoprotein cholesterol. *Life Sci* 1989; 44(12): 789-97.
30. Ghazalpour A, Doss S, Yang X, Aten J, Toomey EM, Van Nas A, Wang S, Drake TA, Lusis AJ. Thematic review series: The pathogenesis of atherosclerosis. Toward a biological network for atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004; 45(10): 1793-805.
31. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990; 81(2): 127-35.
32. Lauridsen ST, Mortensen A. Probuocol selectively increases oxidation of atherogenic lipoproteins in cholesterol-fed mice and in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 142(1): 169-78.
33. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43(7): 1209-14.
34. Greco AV, Mingrone G. Serum and biliary lipid pattern in rabbits feeding a diet enriched with unsaturated fatty acids. *Exp Pathol* 1990; 40(1): 19-33.
35. Ulutin ON. Antithrombotic effect and clinical potential of defibrotide. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19(Suppl 1): 186-91.
36. Boger RH, Bode-Boger SM, Phivthong-ngam L, Brandes RP, Schwedhelm E, Mugge A, Bohme M, Tsikas D, Frolich JC. Dietary L-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis* 1998; 141(1): 31-43.
37. Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr* 1996; 15(3): 289-94.
38. Peng SK, Hu B, Morin RJ. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J Clin Lab Anal* 1991; 5(2): 144-52.
39. Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr* 1996; 15(3): 289-94.
40. Nakahama T, Fukuhara M, Ohkubo C, and Asano M. Modulation of hepatic and pulmonary drug-metabolizing enzyme activities of rabbits by dietary cholesterol. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992; 75: 57-68.
41. Hayes JD, McLennan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31: 273-300.
42. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82(12): 1598-610.
43. Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 1995;77(1): 87-96.

Yazışma adresi:

Dr. Handan Ak Çelik
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
35100 Bornova, İzmir
Tel & Faks: 0.232 373 70 34
E-mail: handan.celik@ege.edu.tr