

Venöz Tromboz Oluşturulan Tavşanlarda Defibrotide'in Antitrombotik Etkisinin Araştırılması

Behzet NOYAN*
Naciye İŞBİL*
Kasım ÖZLÜK*
Orhan N. ULUTİN**

ÖZET

Bu çalışmada tavşanlarda trombojenik bir ajan olan tavşan beyin tromboplastini enjeksiyonu ve stazla birlikte vena jugularis externa'da venöz tromboz oluşturuldu. Profilaktik olarak hayvanlara intravenöz ve cilt altı farklı dozlarda defibrotide enjeksiyonları yapıldı. Sonuçta i.v. 5 mg/kg tek dozun ve 5 mg/kg cilt altı üç gün tekrarlanan dozun tam olarak antitrombotik etki gösterdiği görüldü.

SUMMARY

A Study on the Antithrombotic Effects of Defibrotide on Venous Thrombosis Formed in Rabbits

In this study a venous thrombosis was formed by injection of a thrombogenic agent, thromboplastin of rabbit brain and together with stasis in rabbits. Defibrotide injections were implemented by the way of intravenous and subcutane for prophylaxis. At result; complete antithrombotic effects were observed by the way of

* U.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.

** İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

intravenous single dose of 5 mg/kg and subcutane repeated doses of 5 mg/kg for three days.

Defibrotide memeli hayvanların dokularından ekstrakte edilip kontrollü bir depolimerizasyonla elde edilen 16.000 mol ağırlığında doğal bir deoksiribonükleik asit derivativesidir^{1,2}. Hemostatik sistemde birçok fonksiyonel farmakolojik etkilere sahip olmasına rağmen *in vitro* testlerde hiç aktivite göstermemektedir. *In vivo* çalışmalarda ise ilacın kuvvetli antitrombotik etkisi olduğu tesbit edilmiştir^{1,2,3,4}. Yapılan birçok çalışmada defibrotidin deney hayvanları ve insanlarda t-PA (doku plazminojen aktivatörü), PGI₂ (prostasiklin) oluşumu ve salınımına, trombosit c-AMP seviyesi ve TXA₂ (Tromboksan) oluşumuna etkili olduğu gösterilmiştir.

Bizim de yaptığımız bu çalışmada, prokoagülan ve antikoagülan maddelerin etkilerini araştırabilmek için daha önce geliştirdiğimiz venöz staz tromboz modeli⁵ kullanılarak defibrotidin trombus oluşumuna etkisi araştırıldı ve koagülasyona ışık tutacak kan testleri yapıldı.







GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezinden sağlanan erişkin erkek ve dişi tavşanlar kullanıldı.

Kontrol grubu olarak bir grup tavşanda tavşan beyin tromboplastini enjeksiyonu ile izole jugular ven segmentinde venöz tromboz oluşturuldu. Çalışmamız venöz tromboz oluşumu üzerine defibrotidin akut (tek doz) ve kronik (üç gün tekrarlayan doz) etkilerinin araştırılması için iki grup halinde yapıldı. Gruplar defibrotidin intravenöz ve cilt altı enjeksiyonuna göre ayrıldı. Akut ve kronik defibrotide dozlarının herbirisinde üçer adet tavşan kullanıldı. Her doz için sonuçlar üç tavşanın ortalaması alınarak ifade edildi. İlk grupta tavşanlara akut olarak 1 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg olacak şekilde üç ayrı dozda ve kronik olarak da 1 mg/kg dozda intravenöz defibrotide enjeksiyonları yapıldı. İkinci grupta akut ve kronik 1 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg olacak şekilde üçer tavşana cilt altı defibrotide enjeksiyonları yapıldı. Defibrotide enjeksiyonlarından 30 dakika sonra deneyler öncesinde cerrahi olarak hazırlanmış olan jugular ven segmentinde trombus oluşturulmaya çalışıldı. Bu amaçla trombojenik bir ajan olan tavşan beyin tromboplastini enjeksiyonu ile birlikte jugular vene alt ucundan staz yapıldı. 30 dakikalık stazdan sonra venin üst uçları da bağlanıp kesilmek suretiyle vücuttan çıkarıldı. Ven segmenti yarılarak kan ve pıhtı içeriği 0 (hiç pıhtı yok) dan beş artıya (+, +, +, +, +, tam pıhtı) kadar subjektif olarak değerlendirildi (Tablo: I).

Çalışmada deneyler öncesinde ve jugular ven segmenti vücuttan çıkarılmadan hemen önce kan örnekleri alındı. Pıhtılaşma zamanı, protrombin zamanı, fibrinojen miktarı ve trombosit sayımları yapıldı.

Tablo: I- Tavşanların İzole Edilmiş Jugular Ven Segmentlerinde Pıhtıların Değerlendirilmesi

PIHTI SINIFLAMASI	PIHTI İÇERİĞİ
0	 YALNIZ KAN
+	 KANLI
++	 KANLI
+++	 KANLI
++++	 BİRAZ KANLI
+++++	 HIÇ KAN YOK TAM PIHTI

BULGULAR

Kontrol grubunda yaptığımız çalışmada tavşan beyin tromboplastini enjeksiyonu ve stazla tavşanlarda vena jugulariste beş artılık tam pıhtılar oluştuğu gözlemlendi. Bu da daha önceki çalışmalarımıza uygunluk göstermektedir⁵.

İlk grupta intravenöz 1 mg/kg tek doz ve 1 mg/kg üç gün tekrarlayan dozun trombusu önleyemediği diğer yandan 5 mg/kg ve 10 mg/kg tek dozların tam olarak antitrombotik etki gösterdiği gözlemlendi (Tablo: II). Trombusun önlenemediği dozlarda pıhtılaşma zamanı ve protrombin zamanında bir artış, fibrinojen miktarı ve trombosit sayısında bir azalma görüldü. Tam antitrombotik etki gösteren dozlarda ise kan parametrelerinde büyük bir değişim olmadığı saptandı (Tablo: II).

İkinci grup olan cilt altı defibrotide enjeksiyonlarında ise 1 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg akut dozlar trombus oluşumunu önleyemezken, yalnızca kendi içerisinde defibrotide dozunun artışına bağlı olarak venöz trombozu azalttığı görüldü (Tablo: III). Cilt altı kronik 1 mg/kg'lık dozda etkisiz kalırken 5 mg/kg ve 10 mg/kg'lık kronik dozların ven segmenti içinde trombus oluşumunu tam olarak önlediği gözlemlendi. İntravenöz kan değerlerine paralel olarak bu grupta da tam antitrombotik etki gösteren dozlarda kan parametrelerinde değişiklik oluşmazken, trombusun önlenemediği dozlarda pıhtılaşma zamanı ve protrombin zamanında bir artış, fibrinojen miktarı ve trombosit sayılarında ise bir azalma saptandı (Tablo: III).

Tablo: II- İntravenöz Defibrotide Enjeksiyonlu Tavşanlarda Trombus ve Kan Testleri Sonuçları

DEFİBROTİDE KONSAN- TRASYONLARI	PIHTI DEĞER- LERİ	PIHTILAŞMA ZAMANI (\bar{X})			PROTROMBİN ZAMANI (Sn) (\bar{X})			FİBRİNOJEN MİKTARI (mg/100 ml) (\bar{X})			TROMBOSİT SAYISI ($X10^3/mm^3$) (\bar{X})		
		Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark
1 mg/Kg	+++	8'	9'15"	1'15"	12"	15"	3"	380	330	50	270	200	70
5 mg/Kg	0, Hiç Pıhtı Yok	8'50"	8'35"	15"	13"	12"	1"	253	247	6	260	258	2
10 mg/Kg	0, Hiç Pıhtı Yok	10'	9'30"	30"	13"	13"	—	245	248	3	440	436	4
1 mg/Kg 3 gün tekrarlayan doz	++	9'	9'30"	30"	12"	14"	2"	370	320	50	300	270	30

Tablo: III- Cilt Altı Defibrotide Enjeksiyonlu Tavşanlarda Trombus ve Kan Testleri Sonuçları

DEFİBROTİDE KONSANTRAS- YONLARI	PIHTI DEĞER- LERİ	PIHTILAŞMA ZAMANI (\bar{X})			PROTROMBİN ZAMANI (Sn) (\bar{X})			FİBRİNOJEN MİKTARI (mg/100 ml) (\bar{X})			TROMBOSİT SAYISI ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (\bar{X})		
		Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark	Önce	Sonra	Fark
1 mg/Kg	++++	9'30"	13'	3'30"	12"	15"	3"	428	354	74	290	240	50
5 mg/Kg	+++	10'30"	13'	2'30"	13"	15"	2"	320	280	40	315	280	35
10 mg/Kg	++	8'30"	11'	2'30"	13"	13"	—	362	347	15	378	360	18
1 mg/Kg 3 gün tekrarlayan doz	+++	8'	11'	3'	11"	14"	3"	369	347	22	287	248	39
5 mg/Kg 3 gün tekrarlayan doz	0, Hiç Pıhtı Yok	8'30"	8'40"	10"	13"	13"	—	330	324	6	352	347	5
10 mg/Kg 3 gün tekrarlayan doz	0, Hiç Pıhtı Yok	8'40"	9'	20"	13"	14"	1"	266	246	20	320	312	8

TARTIŞMA

Defibrotide in vitro olarak 100 µg/ml konsantrasyona kadar insan plazmasının koagülasyon ve profibrinolitik görünümüne etkisi olmayan bir ajandır^{1,2,6}. Bunun yanısıra deney hayvanları, sağlıklı insanlar, aterosklerozlu, derin ven trombuslu, cerrahi müdahalede bulunmuş ve Burger hastalıklı insanlarda yapılan in vivo çalışmalarda defibrotidin çok iyi bir antitrombotik, profibrinolitik ve trombolitik ajan olduğu sonucuna varılmıştır^{1,4,6-9}.

Çalışmamızda defibrotidin intravenöz yolla trombusu önleyen minimal akut dozu 5 mg/kg olarak bulundu. Ulutin ve arkadaşları² benzer bir çalışmada trombus oluşturdıkları tromboplastine karşı defibrotidin intravenöz enjeksiyonu ile 5 mg/kg dozun trombus oluşumunu tamamen önlediğini belirtmişlerdir. Niada ve arkadaşları da³ tavşanların femoral venlerinde oluşturdıkları trombusların kuru ağırlıklarını ve protein içeriğini ölçmüşler ve koruyucu olarak defibrotide kullandıkları hayvanlarda doza bağlı olarak trombus oluşumunun inhibe olduğunu göstermişlerdir.

Cilt altı çalışmalarımızda üç gün tekrarlayan 5 ve 10 mg/kg defibrotide dozunun trombusu tamamen önlediği görüldü. Böylece cilt altı kronik tam etkili defibrotide dozu 5 mg/kg olarak tesbit edildi. Bulabildiğimiz literatürlerdeki defibrotide ile ilgili çalışmalarda onun etki mekanizmasının trombosit adezyon ve agregasyonuna etkili ve damar endotel fonksiyonlarını düzeltici yönde olduğu ifade edilmektedir.

Çizmeçi¹⁰, Ulutin ve arkadaşları^{1,2,6,11} yaptıkları çeşitli araştırmalarda defibrotide tedavisinin trombosit cAMP seviyesini yükselttiğini, Tromboksan (TXA₂) ve MDA (malonildialdehit) seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar plazmada 6-keto PGF_{1α} seviyesinde de defibrotide verilmesiyle bir artış olduğunu ve böylece defibrotidin Prostaglandin (PGI₂) yapımını arttırdığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmalar defibrotidin trombositlerin aktivasyonunu inhibe ettiğini ve böylece antitrombotik bir etki gösterdiğini açıklamaktadır.

Köpeklerde vena femoralisde elektrikle trombus oluşturulan bir çalışmada¹² kontrol köpekte trombozlu bölgede düzensiz endotel hücre hiperplazisi ve yer yer endotel hücrelerinin yok olduğu belirtilirken defibrotide tedavisi uygulanan hayvanlarda bu değişimlerin oluşmadığı rapor edilmiştir. Bu bulgular bize defibrotidin endoteli koruyucu bir etkisi olduğunu kanıtlamaktadır. Bizim de kronik tedavide başarılı olduğumuz 5 ve 10 mg/kg dozlarda defibrotidin antitrombotik etki göstermesi, belki de literatürde de^{1,2,3,6,10,12} bildirildiği gibi damar endotelinden t-PA oluşumunu ve salınımını arttırmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Koagülasyona ait test sonuçlarımız literatürdeki bilgilerle paralellik göstermektedir. Yukarıda bahsettiğimiz antitrombotik etki gösteren mekanizmalar sayesinde etkinin intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma sistemi üzerine olmadığı sonu-

cu çıkmaktadır. Trombusun önlendiği dozlarda kan parametrelerinde değişim olmaması bu düşünceyi desteklemektedir.

Böylece defibrotidin ateroskleroz ve tromboembolizm tedavisinde yeni bir ajan olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. ULUTİN, O.N.: Tromboembolizm ve ateroskleroz tedavisinde yeni bir yöntem endotel hücre fonksiyonlarını düzeltici ilaçlar ve bu yolda ilk ilaç defibrotide. Türk Hematoloji Derneği XIX. Kongresi, Dizgi baskı ve ciltleme, İstanbul, 23-25 Şubat 1987, 61-65.
2. ULUTİN, O.N., FAREED, J., KUMAR, A., WALENGA, J.M., HOPPENSTEADT, D.A.: Pharmacologic profiling of the action of defibrotide on animal models of hemostatic and thrombotic disorders. Thrombosis and Hemorrhagic Diseases. (Ed: O.N. Ulutin and H. Vinazzer), Gözlem Printing and Publishing Co., İstanbul, 1986, 101-110.
3. NIADA, R., PESCADOR, R., FORTA, R., MANTOVANI, M., PRINO, G.: Defibrotide is antithrombotic and thrombolytic against rabbit venous thrombosis. Haemostasis., 16 (Suppl. 1): 3-8, 1986.
4. PESCADOR, R., MANTOVANI, M., PRINO, G.: Pharmacokinetics of defibrotide and of its profibrinolytic activity in the rabbit. Thromb. Res., 30: 1-11, 1983.
5. ÖZLÜK, K., NOYAN, B., ULUTİN, O.N.: Tavşanlarda deneysel yolla venöz tromboz oluşturulması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 15: 1, 47-54, 1988.
6. ULUTİN, O.N.: Clinical effectiveness of defibrotide in vaso-occlusive disorders and its mode of action. Semin. Thromb. Haemost., Supplement. 14: 58-63, 1988.
7. ULUTİN, O.N., ÖZSOY, Y., ULUTİN, T., DEMİRKOL, F., TABAK, F., FERHANOĞLU, B.: Bir protein eksikliği vakası. XXI. Ulusal Hematoloji Kongresi ve I. Ulusal Kemoterapi Kongresi, İstanbul, 11-14 Ekim 1989.
8. PERRI, D., VITTORIA, A., MESSA, G.L., CAPPELLI, R.: Defibrotide therapy for thrombophlebitis-controlled clinical trial. Haemostasis., 16(Suppl. 1): 42-47, 1986.
9. MOZZI, E., CHIURAZZI, D., GERMINIANI, R., PACINI, F.: Effectiveness of defibrotide for prophylaxis of deep venous thrombosis after general surgery. A-double-blind, placebo-controlled clinical trial. Haemostasis., 16 (Suppl. 1): 36-38, 1986.
10. ÇİZMECİ, G.: In vivo effects of defibrotide on platelet c-AMP and blood prostanoid levels. Haemostasis., 16 (Suppl. 1): 31-35, 1986.

11. ULUTİN, O.N., BALKUV-ULUTİN, Ş., ÖZER, M., İLHAN-BERKEL, N., TUNALI, H., ÇİZMECİ, G.: Some clinical observation with defibrotide. Thrombosis and Hemorrhagic Diseases. (Ed. by O.N. Ulutin and H. Vinazzer) Gözlem Printing and Publishing Co., İstanbul, 1986, 198.
12. ULUTİN, O.N., TUNALI, H., UĞUR, M.Ş., AYTİŞ, Ş., ERBENGİ, T., BALKUV-ULUTİN, Ş.: Effect of defibrotide in electrically induced thrombosis in dogs. Haemostasis., 16 (Suppl. 1): 9-12, 1986.

Araş. Gör. Behzat NOYAN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
BURSA