

Süperoksit dismutaz uygulamasının trombopoez üzerine etkileri

Serdar YARDIMCI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD, ANKARA

Bu çalışmada, raflara SOD uygulamasının trombopoez üzerine etkisi araştırıldı. Radarda 2 cc/100 gr vücut ağırlığı oranında kan alındı. Böylece trombosit sayısının (kütlesinin) belirgin şekilde düşmesi sağlandı ve trombo-poez stimüle edildi. Trombosit sayısı, SOD uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede erken normale döndü. SOD uygulanan grupta kandaki trombosit sayısının artışı ile birlikte megakaryositlerin büyüklüğü ve rastlanma sıklığında, çekidek lob sayısında ve sitoplazma miktarında da artışlar gözlemlendi.

SOD uygulamasının, serbest radikallerin (özellikle Of) zararlı tesirlerini önleyerek megakaryositer se-riyi korumak ve trombosit membran stabilitesini artırmak yoluyla etki olabileceği sonucuna vanıldı. [Türk Tıp Araştırma 1992, 10(1):2-7]

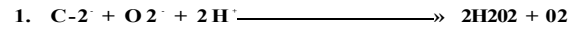
Anahtar Kelimeler: Trombopoez, Antioksidan savunma sistemi, Süperoksit dismutaz, Serbest radikaller, Oksijen toksisitesi

Yaşam için vazgeçilmez olan oksijenin organizmaya alınması, taşınması ve oksidatif metabolizma içinde kullanılması sırasında düşük düzeylerde fakat sürekli bir şekilde serbest oksijen radikalleri oluşur (1,2,3,4,5,6,7). Oksidatif metabolizma hızının arttığı durumlarda oksijen radikallerinin oluşum hızları da artar (3,4,5,6). Oksijen türevlerinin potansiyel zararlarına karşı canlılar ekstrasellüler ve intrasellüler antioksidan savunma sistemleri ile donatılmışlardır (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11). Normalde açığa çıkarı oksijen türevleri ve antioksidan savunma gücü dinamik bir denge içinde olduğu için toksik etkiler gözlenmez (1,7,9). Ancak; oksidatif metabolizmanın önemli derecede hızlandığı veya dolaşımdaki kan miktarının ya da dokulara kan akımının azaldığı hallerde serbest radikal oluşumu artar ve antioksidan savunma yetersiz kalabilir (3,4,6,12,13,14). Etkin bir şekilde detoksifiye edilemeyen serbest radikaller hücre zarı,

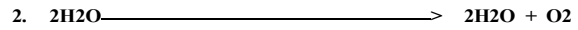
hücre içi komponentleri ve çeşitli enzim sistemleri üzerinde toksik etkiler gösterebilirler (1,2,3,4,6,8,11,12,13,15,16). Bu etkiler, hücrelerde ve dokularda yapsal değişiklik ve fonksiyonel kayıplardan, hücre ölümüne kadar gidebilen pek çok olumsuz sonuçlar şeklinde ortaya çıkarlar (1,4,16).

İntrasellüler antioksidan savunma sistemi başlıca iki basamakta etkisini gösterir (1,2,3,4,7,8,9).

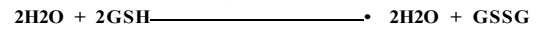
Süperoksit dismutaz



Katalaz



Glutasyon Peroksidaz



Sunulan çalışmada sıçanlara Süperoksit Dismutaz (SOD) uygulaması ile antioksidan savunmanın birinci basamakta kuvvetlendirilmesinin trombo-poez aktivite üzerine etkisi araştırıldı. Elde edilen bulgular, yalnız başına serum fizyolojik verilen kontrol grubu ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

Geliş Tarihi: 26.4.1991

Kabul Tarihi: 13.12.1991

Yazışma Adresi: Serdar YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji ABD, Morfoloji Binası
Sıhhiye-ANKARA

MATERYEL VE METOD

Çalışmada her iki cinsten ortalama 175 ± 4 gram ağırlığıyla 83 adet albino rat kullanıldı. Kontrol grubunda 48, deney grubunda 35 deney hayvanı yer aldı. Ratlarda hafif eter anestezisi altında vücut ağırlığının her 100 gramı başına 2 cc kan intrakardiyak yolla alındı. Bu kanda, hayvanların normalde sahip oldukları trombosit sayıları saptandı. Kontrol grubuna, alman kan hacmi miktarında serum fizyolojik intraperitoneal yolla verildi. Deney grubu hayvanlarına ise aynı miktar serum fizyolojik içinde SOD (Sigma Chemical Company) 1 mg/kg vücut ağırlığı dozunda yine intraperitoneal yolla uygulandı.

Anabilim dalımızda yapılmış olan diğer bir çalışmada 1 mg/kg dozda SOD'un optimum düzeyde etkinliğe sahip olduğu gözlenmiş olduğundan (17), bu çalışmada da aynı doz kullanıldı. Önce kontrol grubu ve deney grubu hayvanları, herbiri 7 ile 9 denekten oluşan altışar alt gruba ayrıldı. Bu 6 alt gruptaki deneklerden öğle saatlerinde ilk kan alımı yapıldı. Birinci gruptaki hayvanlardan ilk kan alımını takiben 2 saat sonra, ikinci gruptaki hayvanlardan ilk kan alımını takiben 1 gün sonra, üçüncü gruptaki deneklerden ilk kan alımını takiben 3 gün sonra, beşinci gruptaki hayvanlardan ilk kan alımını takiben 4 gün sonra, altıncı gruptaki sıçanlardan da ilk kan alımını takiben 5 gün sonra ve yine öğle saatlerinde olmak üzere ikinci defa kan alınarak kan sayımları yapıldı. Ayrıca kemik iliği yayma preparatları usûlüne uygun şekilde hazırlandı. Işık mikroskobu düzeyinde incelendi ve fotoğraflandı. Kontrol ve deney grubundan elde edilen sonuçlar student t, paired t ve varians analiz testleri ile karşılaştırıldı ve değerlendirildi. Ölçümlerin tanımlayıcı değerleri ortalama (X) \pm standart hata (SE) olarak verildi.

SONUÇLAR

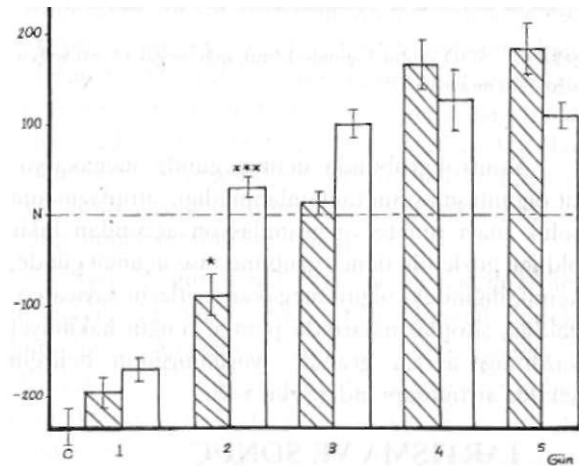
Kontrol grubunda (n:48) başlangıçta $869.000 \pm 21.000/\text{mm}^3$ olarak bulunan ortalama trombosit sayısı, kan alımını takiben ikinci saatte en düşük değere ($631.000 \pm 55.000/\text{mm}^3$) ulaştı. $238.000 \pm 38.000/\text{mm}^3$ 'lük fark istatistiksel olarak önemli bulundu (Serbestlik Derecesi (SD): 94; t:4.04, $p < 0.01$). Kontrol grubunda kan alımını takiben birinci günde (n:8) ulaşılan trombosit sayısı normal değerden $195.000 \pm 25.000/\text{mm}^3$ düşük bulundu. İkinci saat değerine göre bu artış önemli değildi (SD: 54, t: 0.48, $p > 0.05$). Kontrol grubunda ikinci günde (n:9) saptanan trombosit sayısı, ikinci saat değerine göre belirgin bir artış göstermekle birlikte, normal

değerden $89.000 \pm 40.000/\text{mm}^3$ kadar düşüktü (SD: 55, t: 1.66, $p > 0.05$). Bu grupta normal değerlere üçüncü günde ulaşıldı (Şekil 1).

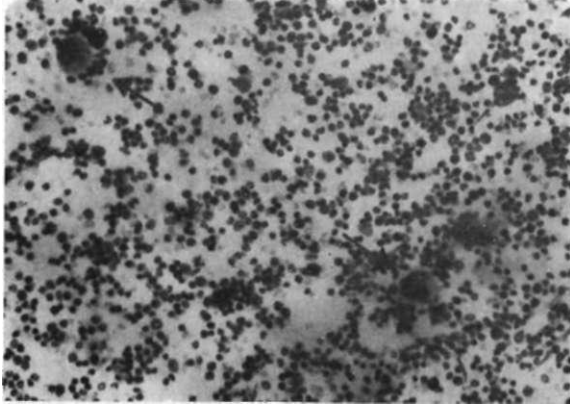
SOD uygulanan deney grubunda ise ikinci günde (n:7) saptanan trombosit sayısının normal değerleri $31.000 \pm 23.000/\text{mm}^3$ aştığı görüldü. Bu artış istatistiksel olarak önemli bulundu (SD: 53, t:2.68, $p < 0.01$). SOD uygulaması trombosit sayısının normal düzeye getirilme hızını artırdı. Bu etki, kontrol grubu ile kıyaslandığında kan alımını takiben ikinci günde (SD: 14, t: 3.03, $p < 0.01$) ve üçüncü günde (SD: 12, t: 5.57, $p < 0.001$) belirgindi (Şekil 1).

Kemik iliğinin günlük takibi sonucunda, kan trombosit sayısındaki artışı destekler biçimde önemli değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Megakaryosit yoğunluğu kontrol grubunda üçüncü günde (n:7) ve dördüncü günde (n:8) maksimuma ulaşırken, SOD uygulaması ile bu artışın üçüncü günde (n:8) maksimuma ulaşırken, SOD uygulaması ile bu artışın üçüncü günde (n:7) çok daha belirgin olarak ortaya çıktığı saptandı (Şekil 2-4).

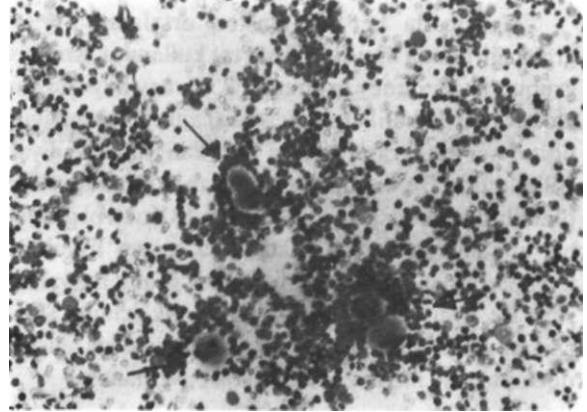
Megakaryosit büyüklüğü de akut kanamayı takiben her iki grupta artış gösterdi. Megakaryosit çapı kontrol grubunda üçüncü günde, deney grubunda ikinci günde maksimuma ulaştı. Deney grubunda çekirdek lob sayısı ve hücre çapı daha belirgin olarak artmış bulundu (Şekil 5-8). Kemik iliği megakaryosit yoğunluğu, SOD uygulaması sonucu daha kısa sürede maksimuma ulaştı.



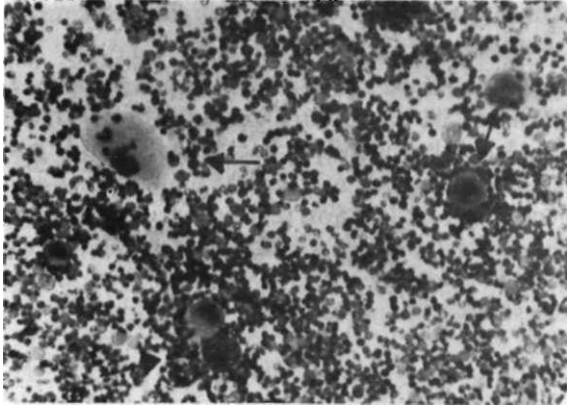
Şekil 1. Akut kan kaybını takiben Kontrol ve SOD uygulanan deney grubunda, trombosit değerlerinde beş günlük takip süresi içinde meydana gelen değişiklikler görülmektedir. N: Kanatmadan önceki normal değerdir (CD :Kontrol,BB:SOD:p<0.05, ***:p<0.001)



Şekil 2. Kontrol grubu 0. gün kemik iliği megakaryosit yoğunluğu (Giemsa x 100).



Şekil 3. Kontrol grubu 3. gün kemik iliği megakaryosit yoğunluğu (Giemsa x 100).



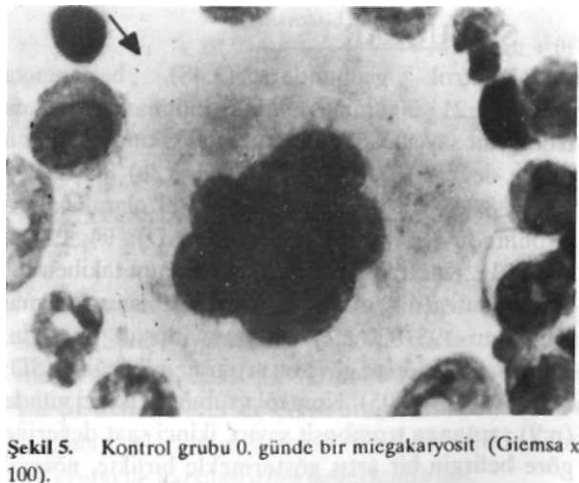
Şekil 4. SOD grubu 3. günde kemik iliği megakaryosit yoğunluğu (Giemsa x 100).

Kontrol grubunda, üçüncü günde megakaryosit olgunlaşmasının tamamlanmadığı, sitoplazmanın soluk mavi renkte ve granülasyon açısından fakir olduğu gözlemlendi, deney grubunda ise üçüncü günde, kemik iliğindeki olgun megakaryositlerin sayıca çoğaldığı, sitoplazmalarında pembe rengin hakimiyet kazandığı ayrıca granül yoğunluğunun belirgin şekilde arttığı saptandı (Şekil 5-8).

TARTIŞMA VE SONUÇ

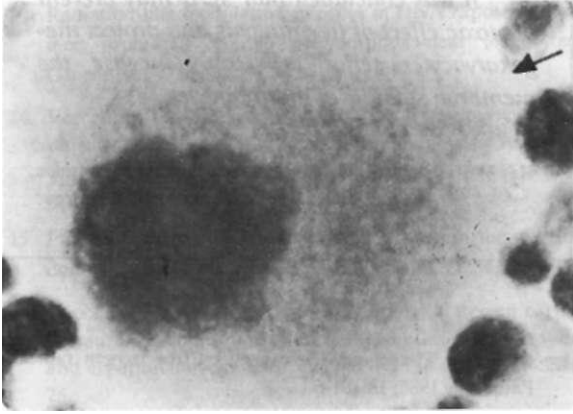
Kemik iliğinde metabolik olaylar sırasında (8), hemopoetik hücrelerin çoğalma ve farklılaşmaları aşamalarında (2,18), nötrofil ve makrofajların aktiviteleri sırasında (2,3) serbest oksijen radikalleri üretilir. Hemopoetik stem hücreleri oksijen radikal-

lerine karşı çok duyarlı hücrelerdir (6,9,10,19). Bu çalışmada, ratlardan her 100 gr vücut ağırlığı başına 2 cc kan alınarak trombosit sayısında önemli bir azalma sağlanmıştır. Bu yolla trombopoez stimüle edilmiştir. Akut kan kaybına bağlı olarak hemopoezin stimülasyonu sonucu stem hücrelerinde oksidatif metabolizma hızlanmaktadır. Bunun sonucunda da serbest radikal üretimi artmakta ve hemopoez zayıflamaktadır (1,4,6,9,14). Kanatılmayı takiben serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda kanatılma öncesi değerlere ancak üçüncü günde ulaşılabilmiştir. SOD uygulaması ile anliksidan sistemin kuvvetlendirildiği deney grubunda ise, serbest oksijen radikallerinin hemopoetik stem hücreleri üzerine toksik etkileri engellenebilmiş ve eksilen trombosit sayısı ikinci günde normale ulaşmıştır. Dördüncü ve

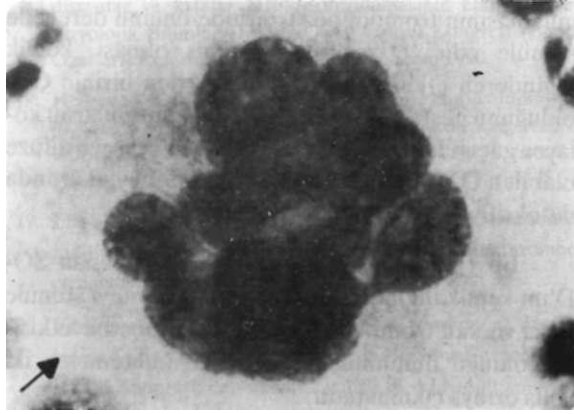


Şekil 5. Kontrol grubu 0. günde bir megakaryosit (Giemsa x 100).

SÜPEROKSİT DİSMIJTAZ UYGULAMASININ TROMBOPOEZ ÜZERİNE ETKİLERİ



Şekil 6. Kontrol grubu 3. günde bir megakaryosit (Giemsa x 100).



Şekil 7. SOD grubu uygulanan grupta 2. günde bir megakaryosit (Giemsa x 100).



Şekil 8. SOD uygulanan grupta 3. günde bir megakaryosit (Giemsa x 100).

beşinci günlerde ölçülen trombosit değerleri SOD uygulanan grupta, kontrol grubuna göre daha düşük seviyede kalmıştır (Şekil 1). Bu sonuç, SOD uygulanan grupta, üçüncü günde sayıları belirgin şekilde artan trombositlerin, trombopoc/. üzerine inhibitör bir etki yapabileceklerini düşündürmektedir. Bu inhibitör etki SOD grubunda, dördüncü ve beşinci günlerde trombosit sayısı artışının azalması ile kendini belli ediyor olabilir. Ancak literatürde bu olasılığı destekleyecek bir veriye raslanmamıştır.

Serbest oksijen radikalleri hücre membranı ve çeşitli sitoplazma komponentlerinin çapı ve fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemekte; DNA, RNA ve polimerazları ile, çok sayıda enzim üzerine toksik

etki göstermektedirler (2,3,4,6,8,9,18). Çalışmamızdan elde ettiğimiz kemik iliği bulguları da oksijen radikallerinin aktive edilmiş hemopoetik stem hücreleri üzerine inhibitör bir etki yaptığını işaret etmektedir. Kontrol grubunda megakaryosit yoğunluğu üçüncü ve dördüncü günlerde artış göstermiş, SOD uygulanan grupla ise bu artış üçüncü günde ve çok daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. SOD uygulanan deney grubunda megakaryosit çapı ve çekirdek lob sayısı kontrol grubuna göre daha fazla artış göstermiş ve sitoplazmik olgunlaşma daha erken bir zamanda tamamlanmıştır. Bu bulgulardan SOD uygulamasının megakaryosiler seri hücreleri üzerine endomitozu ve olgunlaşmayı artırıcı yönde etki yaptığı anlaşılmaktadır. Oksijen radikalleri hücrelerin proliferatif kapasitelerini azaltabilmekte, protein sentezini, farklılaşma ve olgunlaşmayı bozabilmektedirler (1,2,3,4,6,8,9,10,18). Gelişmekte olan doku ve yeni sentez edilen proteinler üzerinde serbest oksijen radikallerinin daha da toksik bir etkiye sahip oldukları bildirilmektedir (5).

Ayrıca olgun kemik iliği hücrelerine göre hemopoetik farklılaşmanın erken dönemlerindeki hücrelerde anlioksidan enzimler (SOD, Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz) daha düşük seviyelerde bulunmaktadırlar (6,9,19). Böylece, kemik iliğinde özellikle oksijen radikallerinin üretiminin arttığı koşullarda hcmopoezin etkin bir supresyona uğraması kaçınılmaz olmaktadır (3,4,5,6,9,18).

02~, oksidatif metabolizma sırasında ilk kademede üretilen toksik bir oksijen metabolitidir (1,2). SOD, 02~'in H2O2'e dismutasyonuna aracılık et-

mektedir (1,2,3,4,5,6,8,18). Bu araştırmada SOD uygulamasının trombopoez üzerinde önemli derecede stimüle edici etkisinin gözlenmiş olması, kemik iliğinde en etkili serbest radikallerden birinin Ö2- olduğunu göstermektedir. Hücre membranlarını kolayca geçebilen ve üretildiği bölgeden çevreye difüze olabilen O2- (8), SOD uygulaması ile büyük oranda detoksifiye edilebilmektedir (1,2,5,9).

Bu çalışmada sistemik olarak uygulanan SOD'un kemik iliğinde tromboopetik aktiviteyi stimüle edici ve kan trombosit kitlesini koruyucu bir etkisinin olduğu bulunmuştur. Bu etki muhtemelen iki yolla ortaya çıkmaktadır.

1. Kemik iliğinde stem hücreleri ile çoğalma ve olgunlaşma olgunlaşma aşamalarındaki megakaryositler seri hücreleri SOD uygulaması ile oksijen radikallerinin toksik etkisinden korunmakta, proliferasyon, diferansiyasyon ve matürasyonları stimüle olmaktadır.

2. Kemik iliğinde ve periferde, çok firajil ve serbest radikallere karşı dayanıksız olan trombosit membranları oksijen radikallerine karşı korunmakta, böylece trombositlerin hızlı yıkımı ve kandan uzaklaştırılmaları önlenmektedir.

Oksidan stres hemopoetik sistem üzerinde önemli bir depresan faktördür (1,3,4,6,9,18,20). Akut kan kaybını takiben hemopoez aktive olmakta ve oksijen radikallerinin üretimi artmaktadır. Bu toksik etki sistemik olarak uygulanan SOD ile önemli derecede önlenmektedir. Ayrıca SOD uygulamasının trombositleri oksidan stresten koruyucu ve ömürlerini uzatıcı bir etkiye de hasip olması mümkündür.

The effect of superoxide dismutase on thrombopoiesis

The effect of SOD administration on thrombopoiesis was studied in rats. 2 cc blood was obtained from per 100 gr body weight of rats. So, thrombocyte number (mass) decreased manifestly and thrombopoiesis increased. Thrombocyte number normalized earlier significantly in the SOD group as compared with control group. Megakaryocyte number, megakaryocyte size, nuclear lobe count and cytoplasm volume all increased together with an increase in thrombocyte number in the SOD group.

It was concluded that SOD may prevent the toxic effect of free radicals and protect megakaryocyte series cells and increase the membran stability of thrombocytes.

[*Turk J Med Res 1992, 10 (J): 2-7*]

KeyWords: Thrombopoiesis, Antioxidant defence system, Superokside dismutase, Free radicals, Oxygen toxicity

KAYNAKLAR

1. Clark LA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. *Pathology* 1986; 18:181-6.
2. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-26.
3. Godlick LA, Kane AB. Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages. *Cancer Res* 1986; 107:526-45.
4. Haliwell B, Borish E, Pryor WA, Ames N, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107:526-45.
5. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase. *Cancer Treat Rev* 1986; 13:17-44.
6. Petkau A, Chelack WS, Palamar E, Gerrard S. in vitro response of human bone marrow progenitor cells to superoxide radicals. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1987; 57:107-16.
7. Rich IN. A role for the macrophage in normal hemopoiesis II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone marrow-derived macrophages in vitro. *Exp Hematol* 1986; 14:746-51.
8. Ghosh N, Adya S, Mukhopadhyay S, Chattopadhyay D, Chatterjee GC. Antioxidant protection mechanism of chick bone marrow: effect of toxicant induced stress. *Indian J Exp Biol* 1987; 25:253-5.
9. Meagher RC, Salvado AJ, Wright DG. An analysis of the multilineage production of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: Evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self renewal. *Blood* 1988; 72:273-81.
10. Petkau A, Kellu K, Chelack WS, Pleskach SD, Barefoot C, Meeker BE. Radioprotection of bone marrow stem cells by superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 67:1167-74.
11. Tribble DL, AW TY, Jones OP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7:377-87.
12. Benedetto C, Bocci A, Dianzani MU, Ghirringhello B, Slatyer TF, Tomast A, Vanini V. electron spin resonance studies on normal human uterus and cervix and on benign and malignant uterine tumors. *Cancer Res* 1981; 2936-42.

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ UYGULAMASININ TROMBOPOEZ ÜZERİNE ETKİLERİ

13. Frenkel K, Chrzan K, Troll W, Teebor GW, Steinberg JJ. Radiation-like modulation of bases in DNA exposed to tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res* 1986; 46:5533-40.
14. Vercellotti G, Stronck D, Jacob HS. Granulocyte oxygen radicals as potential suppressors of hemopoiesis: Potentiating roles of lactoferrin and elastase; inhibitory role of oxygen radicals scavengers. *Blood Cells* 1987; 13:199-206.
15. Funu S. The role of glutathione peroxidase in the antioxidant system of erythrocytes. *Br J Haematol* 1988; 68:263-71.
16. Groot HD, Noll T. The role of physiological oxygen partial pressures in lipid peroxidation: theoretical consideration and experimental evidence. *Chem Phys Lipids* 1987; 44:209-26.
17. Yardımcı S, Yavuzer S. Trombopoez üzerinde süperoksit dismutaz ve katalaz birlikte uygulamasının etkileri. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği XVI. Ulusal Kongresi (Bildiri Özetleri)* Kemer/Antalya, 29 Ekim-1 Kasım 1990.
18. Helgestad J, Mathisen IS, Lie SO. Endogenous inhibitors of human granulocyte/macrophage colony forming cells in vitro are inactivated by free radical scavengers. *Scand J Haematol* 1986; 37:395-403.
19. Ebbe S, Phalen E, Threatch G, Londe H. Modulation of radiation-induced hemopoietic suppression by acute thrombocytopenia. *Ann NY Acad Sci* 1985; 459:179-89.
20. Yardımcı S, Yavuzer S, Yıldırım G. Trombopoez üzerine antioksidan etkinlik. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği XJV. Ulusal Kongresi.* Pamukkale/Denizli 11 -12 Kasım 1988.