

## EDOFERON-KA'NIN SIÇAN NÖTROFİL ADEZİVİTESİ VE BAZI KAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

### Effects of edoferon-KA on neutrophil adhesivity and some blood parameters in rats

Cahit BAĞCI<sup>1</sup>, Ecir Ali ÇAKMAK<sup>2</sup>, Mehmet YÜNCÜ<sup>3</sup>, Necip KUTLU<sup>4</sup>, Özer ALTUĞ<sup>5</sup>

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada özellikleri itibariyle asetil salisilik asite benzeyen yeni bir teknikle (holotransformasyon) üretilen paramagnetik, nonspesifik immünmodülatör ve antineoplastik kimyasal bir ajan olan edoferon-KA ile Asetil salisilik asitin *in vivo* olarak sıçan nötrofil adezivitesi ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi araştırıldı.

**Gereç ve yöntem:** Ortalama ağırlıkları 190 - 245 gr. olan üç aylık 17 adet *Rattus norvegicus* türü beyaz sıçan kullanıldı. Birinci gruba (Kontrol, n = 5) dimetil sülfoksit (DMSO) 0.2ml, ikinci gruba (n = 6) 16mg./kg. asetil salisilik asit ve üçüncü gruba (n=6) 16mg./kg. edoferon-KA DMSO içinde çözündürülerek 0.2 ml i.p olarak 7 gün süreyle verildi. Deney sonunda sıçanlardan intrakardiyak olarak heparinli tüplere 2 ml kan örnekleri alındı. Alyuvarlar, akyuvarlar, hemoglobün miktarı, hematokrit değeri ve nötrofil adezivitesi yönünden değerlendirildi.

**Bulgular:** Sırasıyla alyuvar sayısı kontrol grubunda  $6.2 \times 10^6 \pm 0.3/mm^3$ , edoferon-KA grubunda  $6.0 \times 10^6 \pm 0.5/mm^3$ , asetil salisilik asit grubunda  $6.2 \times 10^6 \pm 1.2/mm^3$ , akyuvar sayısı,  $6.4 \times 10^3 \pm 1.6/mm^3$ ,  $5.8 \times 10^3 \pm 1.6/mm^3$ ,  $5.5 \times 10^3 \pm 0.5/mm^3$ , hemoglobün miktarı (g/dl),  $12.8 \pm 0.5$ ,  $11.9 \pm 1.2$ ,  $12.3 \pm 1.1$ , hematokrit değeri yüzdesi,  $43.6 \pm 2.1$ ,  $41.1 \pm 3.0$ ,  $40.7 \pm 3.3$ , nötrofil adezivite yüzdesi ise kontrol grubunda  $25.1 \pm 2.4$ , edoferon-KA grubunda  $39.9 \pm 3.4$  ve asetil salisilik asit grubunda ise  $31.1 \pm 1.6$  şeklinde bulundu.

**Sonuç:** Edoferon-KA ve asetil salisilik asitin alyuvar sayısı, hemoglobün miktarı ve hematokrit değeri üzerine istatistiksel anlamda etkili olmadığı ( $p < 0.05$ ), ancak nötrofil adezivitesini artırdığı gözlemlendi ( $p < 0.001$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Edoferon-KA, Nötrofiller, Adhesivite

#### Summary

**Purpose:** In this study the effects of acetyl salicylic acid and edoferon-KA on neutrophil adhesivity and some blood parameters in rats were investigated *in vivo*. Edoferon-KA is a paramagnetic, nonspecific, immunomodulator and antineoplastic chemical agent which is produced by holotransformation.

**Material and methods:** Seventeen male rats (*Rattus norvegicus*, weighing 190-245 g aged three months) were used. The animals were divided into three groups; those in the first (n=5), second (n=6) and third groups (n=6) received 0.2 ml dimethyl sulphoxide (DMSO), 16 mg/kg acetyl salicylic acid and 16 mg/kg edoferon-KA respectively for seven days. Acetyl salicylic acid and Edoferon-KA were dissolved in DMSO. At the end of the experiment (on the morning of the 8th day), 2 ml blood samples from heart were taken into the heparinized tubes. White (WBC) and red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Htc) and neutrophil adhesivity were determined in each of the three groups.

**Results:** In the first, second and the third groups RBC values were  $6.2 \times 10^6 \pm 0.3/mm^3$ ,  $6.0 \times 10^6 \pm 0.5/mm^3$ ,  $6.2 \times 10^6 \pm 1.2/mm^3$ ; WBC values were  $6.4 \times 10^3 \pm 1.6/mm^3$ ,  $5.8 \times 10^3 \pm 1.6/mm^3$ ,  $5.5 \times 10^3 \pm 0.5/mm^3$ ; Hb concentrations (g/dl) were  $12.8 \pm 0.5$ ,  $11.9 \pm 1.2$ ,  $12.3 \pm 1.1$ ; Htc values (%) were  $43.6 \pm 2.1$ ,  $41.1 \pm 3.0$ ,  $40.7 \pm 3.3$  and neutrophil adhesivity values (%) were  $25.1 \pm 2.4$ ,  $39.9 \pm 3.4$  and  $31.1 \pm 1.6$ .

**Conclusion:** Edoferon-KA and acetyl salicylic acid increased neutrophil adhesivity ( $p < 0.001$ ) however, they did not have any significant effect on WBC, RBC, Hb and Htc values in rats.

**Key Words:** Edoferon-KA, Neutrophils, Adhesiveness,

Son yıllarda özellikle hücreli ve humoral savunmayı kuvvetlendirmeye yönelik araştırmalar yoğunlaşmakta ve yeni yeni kimyasal ajanlar sentezlenerek denemeler yapılmaktadır. Edoferon-KA da böyle bir kimyasal madde olup, laser reaktöründe sentetik olarak holotransformasyonla

üretilmiş yeni bir kimyasal ajan olup nonspesifik immünmodülatör, antineoplastik özelliklere sahiptir (1, 2).

Edoferon-KA ile yapılan çalışmalarda bu maddenin asetil salisilik asit ile iyon özelliklerinin benzerliği, (3) biyolojik aktivitesi ile ilgili değerlendirmede toksik dozunun aspirin dozunun üç katı kadar olduğu ve fagositik aktivitede etkili olduğu bildirilmektedir (4, 5).

\* XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, MANİSA

Fizyoloji. Doç. Dr.<sup>1</sup>, Yard. Doç. Dr.<sup>2</sup>

Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Doç. Dr.<sup>2</sup>

Histoloji-Embriyoloji. Yard. Doç. Dr.<sup>3</sup>

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İZMİR

Uzm. Vet. Hek.<sup>3</sup>

Geliş Tarihi: 29.5.1997

Tedavide kullanılan birçok preparat kanın bileşimini ve hücrelerin fonksiyonlarını etkilemektedir. Edoferon-KA'nın böyle bir etkisinin olup olmadığı yeterince bilinmemektedir.

Bilindiği üzere nötrofiller, vücuda giren mikroorganizmalara karşı hücrel savunmada önemli bir yer tutar. Temel görevleri fagositoz ve mikroorganizmaların yok edilmesidir. Uyarıya ilk yanıt dolaşımında bulunan nötrofillerin "marginasyonu" ve takiben damar endoteline yapışmasıdır. Damar endoteline yapışan nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedezle ekstravasküler alana geçerler ve mikroorganizmalara karşı kemotaksi göstererek onları fagosite ederler. Nötrofillerin damar endoteline yapışması olayı adherens veya nötrofil adezivitesi olarak bilinir.

Bu çalışmada yeni bir kimyasal madde olan edoferon-KA ile asetil salisilik asitin nötrofil adezivitesi ve bir kısım kan parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlanan 3 aylık, 190-245 g ağırlığında 17 adet *Rattus norvegicus* türü beyaz sıçan kullanıldı. Bütün hayvanlar aynı rasyon ile (Sıçan pellet yemi) beslendi ve yeterince su içmeleri sağlandı.

Hayvanların genel sağlık kontrolleri yapıldıktan sonra üç gruba ayrıldı. Kontrol olarak kullanılan birinci gruba (n=5) dimetil sülfoksit 0.2 ml, ikinci gruba (n = 6) 16mg./kg. asetil salisilik asit DMSO içinde çözüldü, üçüncü gruba (n=6) 16mg./kg. edoferon-KA, yine DMSO içinde çözüldürülerek 0.2 ml olacak şekilde i.p olarak 7 gün süreyle verildi. Deneyin sonunda heparinli tüplere 2 ml kan intrakardiyak olarak alındı.

Nötrofil adezivitesi, Stecher ve Chinae metodu olarak bilinen Fortham ve arkadaşlarının modifiye ettiği nötrofillerin naylon fibril kolonlara yapışma esasına dayanan yöntemle yapıldı (6).

Bir ml lik enjektörlerin pistonları çıkarılarak içerisine 20 mg naylon fibril (Merck 4086-4) 0.1

çizgisine gelecek şekilde sıkıştırıldı ve etüvde 37 °C de 15 dakika kadar bekletilerek vücut ısısına gelmesi sağlandı. Heparinize kan örneğinden 300 µl'lik miktar alınarak enjektörlerin açık ucundan boşaltıldı ve piston yeniden takılarak kan sütununun alt ucu naylon fibril kolonun alt ucuna gelinceye kadar hafifçe itildi. On dakika 37 °C de inkübasyona bırakıldı ve daha sonra pistonu ileriye doğru iterek kan numunesi enjektörün ucuna yerleştirilen bir tüp içerisine toplandı. Bu süzülen kan örneğinden ve orjinal kan örneklerinden lökosit sayımları ve periferik yaymalar yapıldı. Yaymalar Wright boyası ile boyanarak nötrofil yüzdeleri bulundu. Bu yüzdeler lökosit sayıları ile çarpılarak dolaşım kanındaki mutlak nötrofil sayıları hesaplandı. formülü ile hesaplandı.

$$\text{Nötrofil adezivitesi (\%)} = \frac{\text{Orjinal örnekteki mutlak nötrofil sayısı} - \text{Süzüntüdeki mutlak nötrofil sayısı}}{\text{Orjinal örnekteki mutlak nötrofil sayısı}} \times 100$$

Alyuvar ve akyuvar sayıları Thoma lamı, Hb miktarı da Sahli hemoglobinometresi ile belirlendi. Hematokrit değeri ise mikrohematokrit yöntemle ölçüldü.

Sonuçlar bilgisayara uyarlanmış InStat 2.0 (Graph Pad Software and San Diego U.S.A) programı kullanılarak Kruskal - Wallis nonparametrik varyans analizi ile değerlendirildi. Fark bulunan gruplara student t testi uygulanmıştır.

## BULGULAR

Araştırmada nötrofil adezivite yüzdelerinin ortalamaları Tablo 1'de verilmiş, olup gerek edoferon-KA grubunda gerekse asetil salisilik asit grubunda kontrol grubuna oranla adezivitede bir artış gözlenmiştir (p < 0.001). Ayrıca edoferon-KA grubu ile asetil salisilik asit grubunda da anlamlı bir fark bulunmaktadır (p < 0.001).

Alyuvar sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri ve akyuvar sayıları Tablo 2'de gösterilmiş olup gruplar arasında önemli bir fark yoktur (p>0.05).

**Tablo 1:** Edoferon KA ve asetil salisilat verilen ratlarda nötrofil adezivite yüzdeleri.

Gruplar	n	Nötrofil adezivite yüzdesi			
		$\bar{X}\pm SD$	Median	Minimum	Maximum
Kontrol	5	25.1±2.4	25.71	21.68	27.77
Edoferon-KA	6	39.9±3.4*	40.01	33.70	43.19
Asetil salisilik asit	6	31.1±1.6*	31.66	28.80	32.69
		KW: 14.235		*p<0.001	

**Tablo 2:** Edoferon -KA ve asetil salisilat verilen ratlarda bazı kan parametreleri.

Gruplar	n	Alyuvar sayısı ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )				Hemoglobin miktarı (g/dl)				Hematokrit değeri (%)				Akyuvar sayısı ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )			
		$\bar{X}\pm SD$	Med.	Min.	Max.	$\bar{X}\pm SD$	Med.	Min.	Max.	$\bar{X}\pm SD$	Med.	Min.	Max.	$\bar{X}\pm SD$	Med.	Min.	Max.
Kontrol	5	6.2±0.3	6.05	5.90	6.60	12.8±0.5	12.9	12.1	13.5	43.6±2.1	44.4	40.3	45.8	6.4±1.6	7.0	4.5	8.0
Edoferon-KA	6	6.0±0.5	6.62	4.17	7.47	11.9±1.2	12.1	10.5	13.6	41.1±3.0	40.7	37.5	45.5	5.8±1.6	6.4	3.4	7.3
Asetil salisilik asit	6	6.2±1.2	6.07	5.15	6.50	12.3±1.1	12.55	10.5	13.6	40.7±3.3	41.5	36.0	44.0	5.5±0.5	5.5	4.9	6.1
		KW= 1.2531		p>0.05		KW= 1.536		p>0.05		KW= 2.8645		p>0.05		KW= 1.1174		p>0.05	

## TARTIŞMA

Hücrel ve humoral savunmayı güçlendirmeye yönelik kullanılan kimyasal maddeler kan parametrelerini etkileyebilir ve ilgili hücrelerin işlevlerini değişikliğe uğratabilirler.

Çalışmamızda kullandığımız asetil salisilik asit benzeri olan edoferon-KA, laser reaktöründe sentetik olarak holotransformasyonla üretilmiş yeni bir kimyasal ajan olup nonspesifik immünomodülatör, antineoplastik özelliklere sahiptir (1-2).

Edoferon-KA ile ilgili yapılan çalışmalarda bu maddenin moleküler ve iyon özelliklerinin asetil salisilik asitle önemli bir farkının bulunmadığı (3, 7), biyolojik aktivitesi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada rat embriyon kültürlerinde toksik dozunun salisinin üç katı olduğu, tümörlü farelerde yaşam süresini uzattığı, yine sıçanlar üzerine yapılan bir başka çalışmada bu maddenin periferik kan

hücrelerinin fagositik aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir (4, 6, 8).

Yaptığımız literatür taramasında asetil salisilik asitin nötrofil adezivitesi üzerine etkileri üzerine çalışmalar bulunurken, edoferon-KA ile ilgili bu konuda bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada Tablo 1'de görüldüğü gibi nötrofil adezivite yüzdeleri kontrol grubunda 25.1±2.4, edoferon-KA grubunda 39.9 ± 3.4 ve asetil salisilik asit grubunda ise 31.1±1.6 şeklinde bulunmuştur. Nötrofil adezivitesini hem asetil salisilik asidin hem de edoferon-KA'nın kontrol grubuna oranla artırdığı gözlenmiştir (p<0.001).

Erdal ve arkadaşları (9) çalışmalarında nötrofil adezivitenin sirkadiyan değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu husus dikkate alınarak kan

örnekleri aynı saatte alınmıştır.

Bulgularımız Asaka ve arkadaşlarının (10) aspirin ve salisilatın sıçan nötrofil adezivitelere etkileri konulu çalışmalarının sonuçlarıyla, yine Yoshida ve arkadaşlarının (11) yaptıkları aspirinin nötrofil adezivitesini artırdığı sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda ana konuyu teşkil eden nötrofil adezivitesi üzerine edoferon-KA'nın etkili olduğu, diğer kan parametreleri üzerine ise anlamlı bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Büyükkoca E, Berkem M L, Agasiev A A, Altun E, Şengil A Z, Akgüney Y. *Sufi materials: A new generation in advanced materials. 35th IUPAC Congress Abstract, 14 - 19 August 1995, İstanbul, Turkey, pp 477 - 478.*
2. Büyükkoca E. *Holotransformation: A new technique for evaluation of a forced convection equation from experimental data. Ed. Glasser P S, Scientific and Technical Data in New Era, Hemisphere Pub. 1990, pp 162 - 166,*
3. Şengil A Z, Uyanık B S, Alibey E, Çetinkaya Z. *Edoferon KA nın iyon özellikleri, 3. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Biyoteknoloji Sempozyumu Kongre Özet Kitabı, 11-14 Aralık 1996, Bursa, ss 57 - 58.*
4. Karabuluk A K, Duman S, Ulger M. *The effects of edoferon Kappa A (European P.90.31379.6. British P. 89.28160.4) on embryonic development. Teratology, 1995; 51: 25 A.*
5. Şengil AZ, Baykan M, Duman S, Gürbilek M, Baysal B, Büyükkoca E. *In vivo effectivity of edoferon - KA as a paramagnetic substance in treatment alone and in combination with antibiotic agents P. aeruginosa infections in rats. 4th BICON Conference, 30th August - 01 st September 1992, Praque, Czechoslovakia. Abstracts, p 157.*
6. Fortham, JN, Kirwan J, Cason J, et al. *Prolonged reduction in polymorphonuclear adhesion following oral colchicine. Ann Rheumatic Dis 1981, 40: 605-608.*
7. Gürbilek M, Şengil A Z, Kara H. *Bir biyomedulator ajan olan Edoferonun GC - MS'deki analizi. Biyokimya Dergisi 1992;17(suppl): B - 29.*
8. Şengil A Z, Gürbilek M, Büyükkoca E, Baysal B, Uysal H. *Effect of Edoferon - KA and aspirin on tumour nectosis factor - alpha in Balb / c mice with peritoneal ehrlich ascites tumours. In: Einhorn J, Nord CE and Norrby S R (eds). Recent Advances in Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1994, p 792*
9. Erdal S, Ündar L, Arslan A, Doğan B: *Nötrofil adezivitesinde sirkadiyan değişiklikler. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 1989; 11: 169-180.*
10. Asako H, Kubes P I, Wallace J, Wolf RE, Granger DN. *Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. Gastroenterology 1992;103: 146-152.*
11. Yoshida N, Takemura T, Granger D N, et al. *Molecular determinants of aspirin-induced neutrophil adherence to endothelial cells. Gastroenterology 1993; 105 : 715-724.*