

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKAFERD VE DEFİBROTİD'İN ENDOTEL HÜCRE MODELİNDE *ENDOTELYAL  
PROTEİN C RESEPTÖRÜ (EPCR), PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR-1  
(PAI-1) VE TROMBİN RESEPTÖRÜ (PAR-1) GEN EKSPRESYONLARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI***

**AFİFE KARABIYIK**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Doç. Dr. Erkan Yılmaz**

**ANKARA  
2011**

**Ankaferd ve Defibrotid'in endotel hücre modelinde *Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR)*, *Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1)* ve *Trombin reseptörü (PAR-1)* gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması**

**ÖZET**

Ankaferd; *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum*, *Urtica dioica* bitkilerinden oluşan bir karışımdır ve kanamayı durdurucu ve pleyiotropik etkilerinden dolayı bir topikal hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. ABS, vital eritroid agregasyonu ile protein ağı oluşumunu indükler. Defibrotid ise antitrombotik, profibrinolitik, antiiskemik, antikoagülan ve antiadeziv özelliklere sahip DNA bazlı polidispers bir oligonükleotiddir. Trombin Reseptörü olan PAR1, hemostaz, tümör oluşumu, enfeksiyon, apoptozis ve inflamasyon kesişim noktalarında yer almaktadır. Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR), birçok hemostatik, vasküler ve immünolojik olayda yer alır. Aynı şekilde Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 de fibrinolizis, enfeksiyon, neoplazia, obezite ve yara iyileşmesi için çok önemli bir biyolojik mediyatördür.

Bu çalışmanın amacı, ABS ve Defibrotid'in İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücre (HUVEC) modelinde Lipopolisakkarit (LPS) varlığı ya da yokluğunda EPCR, PAI-1 ve PAR1 gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Bu amaçla, 5 dakika (dk), 25 dk, 50 dk, 6 saat (s) ve 24 s'lik zaman periyotlarında ABS (10 µL ve 100 µL) ve 1 s, 6 s, 24 s, 48 s ve 72 s'lik periyotlarda Defibrotid (12,5µg/mL, 50 µg/mL, 200 µg/mL and 800 µg/mL) 10 µg/mL LPS varlığında ve yokluğunda HUVEC' lere uygulandı. HUVEC'lerden total RNA'lar izole edildi ve sonra EPCR, PAI-1 ve PAR1 mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi.

Yapılan mikroskopik incelemede HUVEC'lere Ankaferd uygulamasından sonra hücrelerin yüzeyden kalkıp toplanarak birbirlerine yapıştıkları gözlemlendi. 24 saat sonra ise hücreler normal büyüme ve gelişmelerine geri döndüler. HUVEC'lere yalnızca LPS verildiğinde, LPS azalmış PAR1 ekspresyonu ve artmış EPCR ve PAI-1 ekspresyonuna neden oldu. Biz insane umbilical ve endotel hücrelerinde ABS aracılı doz bağımlı geri dönüşümlü EPCR, PAI-1 ve PAR1 downregülasyonu ve Defibrotid aracılı EPCR ve PAR1 upregülasyonunu gözlemledik. Bu bulgular doğrultusunda, ABS ve Defibrotid'in hemostazın birçok basamağında role sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** HUVEC, Ankaferd, Defibrotid, EPCR, PAR-1, PAI-1

**Studying of the effects of Ankaferd and Defibrotide on *EPCR*, *PAI-1* and *PAR-1* gene expressions inside the endothelial cells**

**ABSTRACT**

Ankaferd Blood Stopper (ABS) comprises a mixture of the plants including *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum*, *Urtica dioica* and has been used as a topical haemostatic agent because of its antihemorrhagic effect and pleiotropic actions. ABS induced formation of the protein network with vital erythroid aggregation. Defibrotide, a DNA base polydisperse oligonucleotide, has antithrombotic, profibrinolytic, anti-ischemic, anticoagulant and antiadhesive properties. Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is located in the crossroads of hemostasis, inflammation, infection, apoptosis and tumorigenesis. Endothelial Protein C Receptor (EPCR) is involved in numerous hemostatic, vascular and immunological actions. Likewise, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a very important biological mediator for fibrinolysis, infection, neoplasia, obesity and wound healing.

The aim of this study is to assess the effects of ABS and Defibrotide on EPCR, PAI-1 and PAR-1 gene expressions with and without Lipopolysaccharides (LPS) in the Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) model. For this purpose, ABS (10 µL and 100 µL) and Defibrotide (12,5µg/mL, 50 µg/mL, 200 µg/mL and 800 µg/mL), had been applied to HUVECs within for 5 minutes (min), 25 min, 50 min, 6 hours (h) and 24 h time periods of ABS and 1 h, 6 h, 24 h, 48 h and 72 h time periods of Defibrotide with and without 10 µg/mL LPS. Total RNAs were isolated from HUVECs and then EPCR, PAR1 and PAI-1 mRNA expression levels were investigated.

It was microscopically observed that cells arised from the surface and adhered to each other after the ABS application to the HUVECs. Also, after 24 hours cells returned the normal growth and physiology. When LPS was given alone to HUVEC, it caused decreased PAR1 expression and increased EPCR and PAI-1 expressions. We observed dose-dependent reversible EPCR, PAI-1 and PAR-1 down-regulation mediated by ABS and dose-dependent EPCR and PAR-1 up-regulation by Defibrotide inside the human umbilical vein endothelial cells. According to this findings, ABS and Defibrotide might have a role on numerous steps of hemostasis is supposed.

**Key Words:** HUVEC, ABS, Defibrotid, EPCR, PAR-1, PAI-1

## **TEŞEKKÜR**

Çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na;

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayarak bilimsel olarak kattığı yardımların dışında, hayatımda çok önemli bir yeri olan ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a;

Tecrübelerini, bilgisini benimle paylaşan ve her aşamada önerileriyle bana yol gösteren, hayatımın önemli anlarında desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a;

Sabrı, koşulsuz yardımları, sevgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olmasının yanında bilimin bana sunduğu en büyük hediye olan Uzm. Bio. Şükrü GÜLEÇ'e;

Bilimsel hayatın sıcak taraflarını hissettiren sevgili hocam Uzm. Bio. Ece AKAR'a;

Zorlukların üstesinden beraber geldiğim sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Didem TORUN'a;  
AÜTF Pediatrik Moleküler Genetik ailesine;

Ayrıca; eğitimim boyunca her aşamayı benimle beraber atlatan, sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, sabırlarını, desteklerini ve tüm imkanları bana sunan, huzurlu ve sevgi dolu bir hayat sürmemi sağlayan değerli aileme çok teşekkür ederim.

**Afife KARABIYIK**

**Ankara, 2011**

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No:</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
GRAFİKLER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. HEMOSTAZ.....	3
2.1.1. Vazokonstrüksiyon.....	4
2.1.2. Primer ve Sekonder Hemostaz .....	5
2.1.2.1. Primer Hemostaz.....	5
2.1.2.2. Sekonder Hemostaz.....	7
2.1.3. Fibrinolitik Sistem.....	9
2.2. PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR-1 .....	11
2.3. ENDOTELYAL PROTEİN C RESEPTÖRÜ ve TROMBİN RESEPTÖRÜ .....	17
2.3.1. PAR1 .....	17
2.3.2. EPCR.....	20
2.4. DEFİBROTİD .....	24
2.5. ANKAFERD KAN DURDURUCU-ANKAFERD BLOOD STOPPER.....	28
2.5.1. Ankaferd İsminin Kökeni.....	29
2.5.2. Ankaferd'in İçeriği.....	29
2.5.3. Ankaferd'in Etki Mekanizması .....	32
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>40</b>
3.1. Materyal .....	40

3.1.1. Hücre Kültürü.....	40
3.1.1.1. Hücre Kültürü Tipleri.....	40
3.1.1.2. Tarihçe.....	41
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması .....	45
3.2.1.1. Endotel Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü .....	45
3.2.1.2. Tripsinle Hücre Kaldırma ve Pasajlama .....	45
3.2.1.3. Hücrelerin Ankaferd ve Defibrotid Muamelesine Hazırlanışı .....	46
3.2.1.4. Hücrelere Defibrotid ve Ankaferd Uygulaması .....	46
3.2.2. Total RNA Eldesi.....	47
3.2.3. cDNA Eldesi .....	48
3.2.4. Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi.....	48
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	51
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>52</b>
4.1. HUVEC Hattına Ankaferd Uygulaması.....	52
4.2. HUVEC Hattına Defibrotid Uygulaması .....	58
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>82</b>
Yayımlar.....	82
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>110</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1: Hemostaz Dengesi.....	3
Şekil 2.2: Hemostatik Tıkaç Oluşumu.....	4
Şekil 2.3: İntrinsik ve Ekstrinsik Yol.....	8
Şekil 2.4: Fibrinolizis.....	10
Şekil 2.5: PAR1'in thrombin tarafından aktifleştirilmesi.....	18
Şekil 2.6: Protein C aktivasyonu .....	22
Şekil 2.7: ABS'nin etki mekanizması.....	33
Şekil 3.1: TaqMan tekniğinin aşamaları .....	50
Şekil 4.1: HUVEC hattı'na Ankaferd uygulanmasının ilk 5 dakikadaki görüntüsü .....	52
Şekil 4.2: HUVEC hattı'na Ankaferd uygulanmasının 24 saat sonundaki görüntüsü .....	53

## GRAFİKLER DİZİNİ

### Grafik

### Sayfa No:

<b>Grafik 4.1:</b>	10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi .....	54
<b>Grafik 4.2:</b>	10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAI-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi .....	54
<b>Grafik 4.3:</b>	10 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi .....	55
<b>Grafik 4.4:</b>	100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi .....	55
<b>Grafik 4.5:</b>	LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, ve 6 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	56
<b>Grafik 4.6:</b>	LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 6 saatlik muamelesinin PAI-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	57
<b>Grafik 4.7:</b>	LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 6 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	58
<b>Grafik 4.8:</b>	12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	59
<b>Grafik 4.9:</b>	10 µg/mL'lik LPS uygulamasının EPCR ve PAR-1 gen ekspresyonları üzerindeki etkisi .....	59
<b>Grafik 4.10:</b>	LPS varlığında , 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	60
<b>Grafik 4.11:</b>	12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi .....	61
<b>Grafik 4.12:</b>	LPS varlığında, 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	61



## SİMGELER DİZİNİ

°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
ABS	:	Ankaferd Blood Stopper
DF	:	Defibrotid
dk	:	Dakika
EPCR	:	Endotelyal Protein C Reseptörü
g	:	Gram
HUVEC	:	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
kDa	:	Kilo dalton
LPS	:	Lipopolisakkarit
M199	:	Medyum 199
ml	:	Mililitre
mg	:	Miligram
ng	:	Nanogram
PAI-1	:	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PAR1	:	Trombin Reseptörü
s	:	Saat
vWF	:	von Willebrad Faktör

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde pıhtılaşmayı sağlayan ve önleyen birçok etken madde bulunmasına rağmen bazılarının moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Pıhtılaşmayı önleyen ajanlardan biri olan Defibrotid (DF)'in endotel hücre fonksiyonlarını düzenlediği, fibrinolizi arttırdığı, antitrombotik, antiaterosklerotik, apoptotik, antiiskemik, antianjiyogenik etkiler gösterdiği, vasküler endotelyal büyümede görevli molekülleri etkilediği bildirilmiştir (Paul et al. 1993; Eissner et al. 2002; Kornblum et al. 2006). Klasik koagülasyon kaskad sisteminden bağımsız olarak protein ağ ortamında vital fizyolojik eritrosit agregasyonu yoluyla hemostatik etki göstererek pıhtılaşmayı sağlayan Ankaferd (ABS) ise hemofilik, diyabetik, antikoagülan ve antiagregan kullanan hastalarda diş ve diş kanamalarının kontrolünde kullanılmaktadır. Pıhtılaşma faktörlerinden bağımsız olarak süratle hemostazı sağlamaktadır. Doku onarımına izin verecek düzeyde kanamayı durdurmayı sağlamaktadır (Goker et al. 2008). Ancak, bu ajanların moleküler etki mekanizması tam olarak belirlenemediğinden etkili bir şekilde kullanılamamaktadırlar. Bu sebeple etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için sinyal iletim yollarının çözülmesi gerekmektedir. Plazminojen aktivasyon sisteminin üyelerinden biri olan Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), serin proteinaz inhibitör (SERPIN) ailesinden olup, doku tip plazminojen aktivatörünün (t-PA) major fizyolojik inhibitörüdür ve birçok biyolojik süreçte rol oynar (Czekay et al. 2003). Trombin Reseptörü (PAR1) ve Endotelyal Protein C Reseptörü (EPCR) ise koagülasyonda, inflamasyonda ve vasküler hemostazda kritik roller oynamaktadırlar. DF ve ABS'nin etkilerini hemostazın sağlandığı yollarda rol alan EPCR, PAI-1 ve PAR-1 üzerinden mi gerçekleştiriyor oldukları sorusu tezin hipotezini oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma lipopolisakkarit (LPS) stimülasyonunun ardından ABS ve DF'in bu genler üzerindeki etkilerinin araştırılması açısından da önem teşkil etmektedir. Bu maddelerin daha iyi değerlendirilebilmesi için elde edilen verilere bir diğerinin eklenmesi ve bu ajanların mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

Kanama üzerinde etkili iki farklı ajanın yine bu yolda rol aldığı bilinen genlerin ekspresyonları üzerindeki etkisinin saptanması sonucu moleküler mekanizmalarına sağlanacak katkı tezin multidisipliner bir alan olan Biyoteknoloji açısından da önemini belirtmektedir. Biyoteknoloji çatısındaki her bir bilim dalının da yardımıyla bu maddelerin

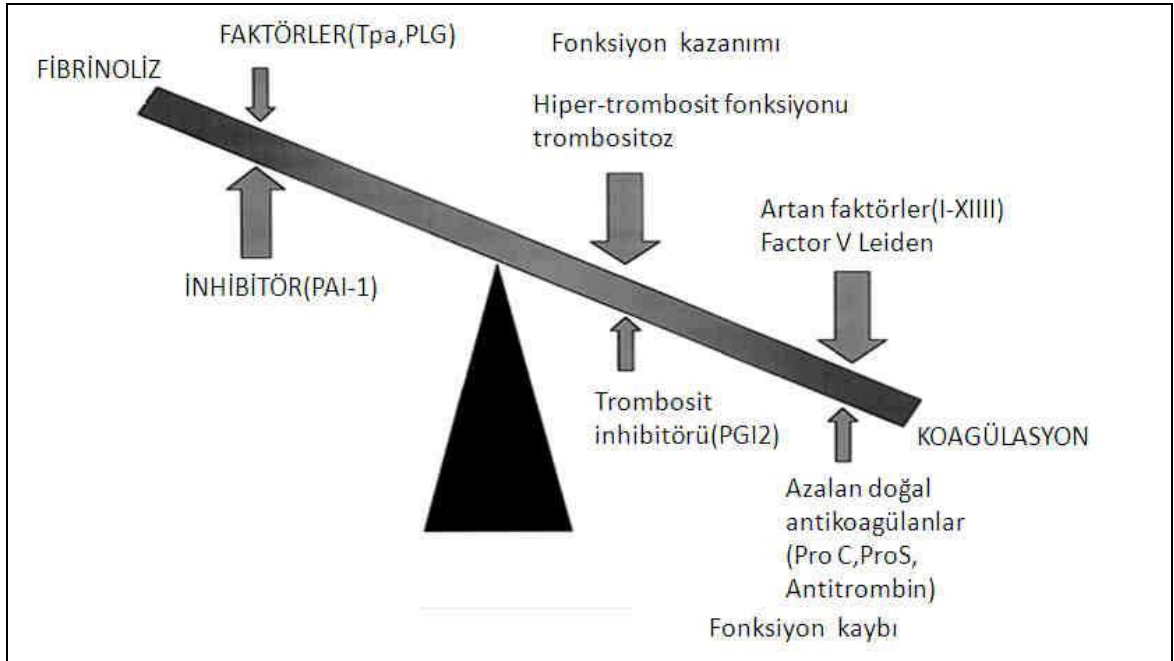
daha etkili bir şekilde kullanıma sunulması mümkün olacaktır. İnsan endotel hücre modelinde (HUVEC) gerçekleştirilen deneyler sonucunda, genetik faktörlerin incelenmesinin de gittikçe önem kazanmaya başladığı göz önüne alındığında, klinik uygulamalarda ABS'nin ve DF içerikli etken maddelerin daha etkili kullanılması mümkün kılınabilecektir. Bu anlamda hastalara verilecek etken madde dozlarında ve uygulama zamanında yeniden düzenlenme ve olası kanama risklerinde de iyileştirme söz konusu olabilecektir. Etken maddelerin uygun doz ve zamandaki etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra, etki mekanizmalarında rol alan sistemlerde yer alan her bir proteinin bulunuşu ve bunların kendi aralarındaki etkileşimlerinin saptanması da önemlidir. ABS ve DF'in prokoagülanların, antikoagülanların ve profibrinolitik proteinlerin üzerinde etkili olup olmadıklarının belirlenebilmesiyle optimal düzeyde kullanımları mümkün hale gelecektir.

Bu çalışmada, pıhtılaşma önleyici özelliği gösterilmiş, ancak moleküler mekanizması tam olarak belirlenmemiş DF etken maddesinin ve kanamayı durdurucu bir bitki karışımı olan ABS'nin endotel üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) kullanılarak, hemostazda rol alan *EPCR*, *PAI-1* ve *PAR-1* gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin gösterilmesi yoluyla mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunabilmek, farklı doz ve zamanlarda oluşturdukları değişiklikleri incelemek ve klinik uygulamalarda ABS'nin ve DF içerikli etken maddelerin daha etkili kullanılmasını mümkün kılmak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

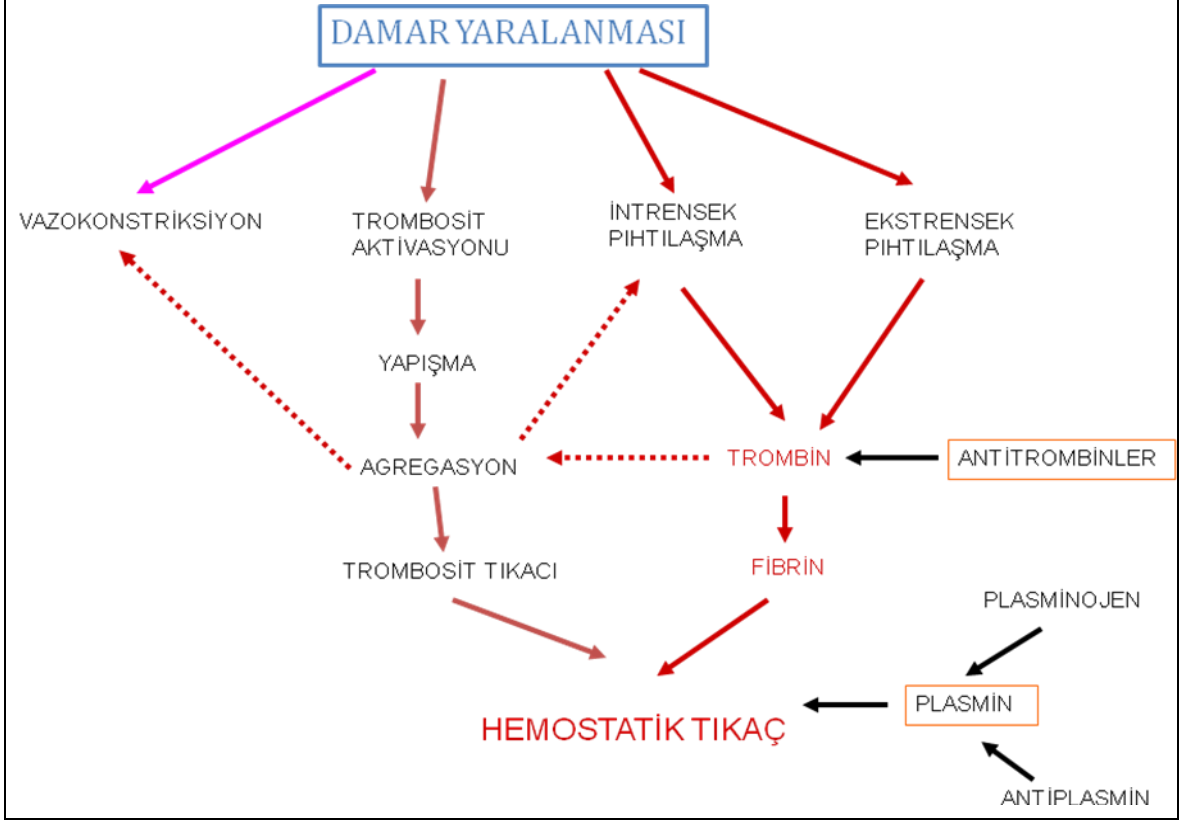
### 2.1. HEMOSTAZ

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi ve kanamanın durdurulması olarak tanımlanmaktadır. Damar duvarındaki yaralanmayı takiben pıhtı oluşumunu ve doku tamiri ile sonuçlanan süreçleri içerir. Damar duvarı, plazma proteinleri ve trombositler arasındaki ilişkilerin düzenlenmesi ile kan kaybı önlenir. Damar duvarında bir zedelenme olduğunda, kan akımının engellenmeden kanamanın durdurulması ve damar bütünlüğünün sağlanması için bu fizyolojik sistemlere ihtiyaç duyulur. Bir damar zedelendiğinde ya da yırtıldığında çeşitli mekanizmalarla hemostaz sağlanır. Damar spazmı, trombosit tıkaçının oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki değilin kalıcı olarak kapatılması bu mekanizmalar arasındadır (Kumar et al. 2003). Hemostaz, koagülasyon ve fibrinolizis arasındaki hassas dengenin korunduğu fizyolojik bir süreçtir (Şekil 2.1). Primer hemostazı trombositler ve vasküler endotel sağlarken, sekonder hemostazda fibrinolitik sistem elemanları ve koagülasyonda rol oynayan proteinler görev alır. Hemostaz dengesinin sağlanması için birçok feed-back sistem kontrol mekanizması sağlamaktadır.



Şekil 2.1. Hemostaz Dengesi (Kottke-Marchant 2002)

Vazokonstriksiyon, primer ve sekonder hemostaz ve fibrinolitik sistem üç önemli hemostaz komponentidir (Şekil 2.2) (Guyton et al. 2007).



Şekil 2.2. Hemostatik tıkaç oluşumu

### 2.1.1. Vazokonstriksiyon

Kan damarı travmaya maruz kaldıktan sonra, trombositlerden kaynaklanan lokal humoral faktörler ve sinirsel reflekslerin etkisiyle hasarlanan damar duvarında kas spazmı meydana gelir. Küçük damarlardaki vazokonstriksiyonun büyük kısmından vazokonstrüktör bir madde olan Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)'yi serbestleştiren trombositler sorumludur. Zedelenme ne kadar büyükse spazmın derecesi de o kadar büyük olur ve bu spazm etkisi dakikalar ve saatlerce sürebilir. Bu süre içinde trombosit tıkaçı ve kan pıhtılaşması gelişir (Guyton et al. 2007).

## 2.1.2. Primer ve Sekonder Hemostaz

### 2.1.2.1. Primer Hemostaz

Yaralanma yerlerindeki trombosit plak oluşum sürecidir ve saniyeler içinde meydana gelir. Primer hemostaz, kapiller kan kaybını durdurmada esas önceliğe sahiptir. Bileşenleri vasküler endotel ve trombositlerdir. Normal koşullar altında trombositler diğer trombositlerle ya da damar endoteli ile etkileşmeden serbestçe kan damarında dolaşırlar. Endotelde zedelenme olması durumunda pıhtı oluşumuna neden olan bir olaylar zinciri tetiklenir. Trombositler hasarlı bölgeye gelerek adezyon, aktivasyon, agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarını yerine getirirler (Weiss 1975).

**Trombosit adezyonu:** Adezyonu başlatan olay temastır ve trombositler yaralı damar bölgesine yığılırlar. Zarar gören bölge, adeziv proteinler aracılığı ile trombositler tarafından örtülür. Vasküler hasar sonucu açığa çıkan subendotelyal bölgedeki kollajene ya doğrudan glikoprotein Ia/IIa reseptörü aracılığı ile veya trombosit glikoproteini Ib-IX kompleksi ile damar endotelyal hücreler tarafından sentezlenen von Willebrand (vWF)'e bağlanarak yapışırlar. Bu bağlanma trombositlerin adezyonuna ve aktivasyonuna yol açar (Roth 1992).

**Trombosit aktivasyonu:** Trombosit aktivasyonu, hücre dışı sinyallere, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmelerine, membran birleşmelerine ve trombositlerde bulunan üç farklı granül ( $\alpha$ -granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar) içeriğinin dışarı çıkarılmasına (sekresyona) cevap oluşturan bir komplekstir (Ginsberg et al. 1980; Stenberg et al. 1984). Genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak trombosit aktivasyonuna neden olan bir uyarı vardır. Agonistlerin trombositlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır. Daha sonra, hücre içindeki ikincil mesajcılar uyarıyı iletirler. Ardından oluşan cevap sonucu trombosit aktivasyonu gerçekleşmektedir. Cevap, trombositin şekil değiştirmesi, trombositlerin fibrinojen aracılığı ile yapışıp küme oluşturmaları ve granül sekresyondur. Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler zayıf (ADP, epinefrin vb.) ve güçlü (kollajen, trombin vb.) olarak sınıflandırılırlar. Trombosit agonist reseptörleri çoğunlukla transmembran uzantıları da olan plazma membran proteinleridir ve çoğu "G proteinleri ile

kenetli reseptörler" gurubundandır. Bu reseptörlerin ortak özellikleri yedi adet transmembran kıvrımı olan tek bir polipeptid yapısında olmaları ve oluşturdıkları uyarıyı ikincil mesajcılara ileten, G proteinleri olarak adlandırılan adaptör proteinler kullanmalarıdır (Koca et al. 2007).

**Trombosit sekresyonu:** Hasara uğrayan damar yüzeyine, kollajen liflere ve hasarlı endotel hücrelerine dokunan trombositlerde bulunan aktif faktörler içeren  $\alpha$ -granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomların içeriği dışarı çıkarılır ve granüller serbestlenir, yapışkan hale gelir. Hasarlı doku içine sızan vWF'ye tutunurlar. Adenozindifosfat (ADP), fibrinojen, fibronektin, platelet faktör-4, transforming growth faktör- $\beta$ , TXA2 ve kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) salınır. ADP ve TXA2 etkisiyle çevredeki diğer trombositler de aktive edilir ve başlangıçta oluşmuş aktif trombositlere yapışmaları sağlanır. Böylece aktif trombosit sayısı gittikçe artar ve trombosit tıkaçı oluşur. Damarda küçük bir hasar mevcutsa kan pıhtısı yerine trombosit tıkaçıyla onarım sağlanır. ADP'nin reseptörüne bağlanmasını kalsiyumun hızla sitoplazmaya akması, hücre içi kalsiyum depolarının hareketi, şekil değişikliği, adenil siklazın inhibisyonu,  $IP_3$  oluşumunun uyarılması, yüzey glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ifadesi, fosfolipaz  $A_2$ 'nin uyarılması, yoğun granüllerin ve alfa granüllerinin içeriklerinin salgılanması takip etmektedir (Nurden et al. 1995).

**Trombosit agregasyonu:** Trombositlerin bir arada toplanıp küme oluşturması için özellikle trombosit üzerinde bulunan GPIIb/IIIa reseptörü ve fibrinojen gereklidir. Trombosit aktivasyonu ile GPIIb/IIIa konformasyonel bir değişime uğrar. Bunu genelde protein ligandlarıyla, kısmen de fibrinojenle uygun bir bağlanma yapabilmek için yapar. Fibrinojen, GPIIb/IIIa reseptörlerine bağlanarak trombositler arasında bağ oluşturur (Poncz et al. 1987). Trombositler aracılığıyla oluşan pıhtı zayıftır. Bu pıhtının stabil hale gelmesi için fibrin gereklidir. Fibrin de koagülasyon sistemi sonucu oluşur.

Özetle, *in vivo* ortamda bir damarın hasara uğramasından sonra şu olaylar gelişmektedir: Dolaşan trombositler normal endotele veya birbirlerine yapışmazken endotel bütünlüğü bozulunca, trombositler açığa çıkan subendotelyal kollajene ve ayrıca diğer hücreler ve ekstrasellüler matriks moleküllerine (immobilize vWF, laminin, fibronektin) de yapışırlar. Buna trombosit adezyonu denir. Bu olayda, endotelyal hücreler tarafından yapılan vWF,

trombosit ile subendotelyumu birleştiren köprü vazifesi görür. Adezyonu takiben, trombositler birçok yeni reseptör-substrat bağlanması ile sıkı bir şekilde yayılırlar. Kollajen, ADP, epinefrin, trombin gibi herhangi bir agonist trombosit yüzeyindeki reseptörüne yapıştığı zaman hücrede belirgin biyokimyasal değişikliklere neden olur (aktivasyon). Aktive olması neticesinde trombositin şekli değişir ve diğer hücrelerle etkileşimleri uyarılır. In vitro şartlarda aktivasyonu takiben trombositlerin biçim değiştirir ve uzun psödopodlar olustururlar. Aktin iskeleti tarafından meydana getirilen bu şekil değişimi ile hücre yüzeyi ve trombositlerin birbirleri ile temas alanları artar. şekil değişiminin ve trombosit aktivasyonunun neticesinde GPIIb/IIIa reseptöründe konfigürasyonel değişiklik meydana gelir ve trombositler bu reseptörün ligandı olan fibrinojeni bağlayarak kümeleşirler (agregasyon). Agregasyonun ilk aşaması tersinebilir. Takiben, yoğun ve granül içerikleri salgılanır (sekresyon) ve bu granüllerin yapısında bulunan agonistlerin de katkısıyla agregasyon tersinemez hale gelir. Hasarlı bölgede trombositlerin de katkılarıyla oluşan pıhtının büzüşerek yara uçlarını birbirine yaklaştırdığı kabul edilmektedir (retraksiyon). Pıhtı büzüşmesinde trombosit aktin iskeletinin görev yaptığı ve bu süreçte integrin GPIIb/IIIa'nın düzenleyici rolü olduğu düşünölmektedir (Kayaalp 1990; Koca et al. 2007).

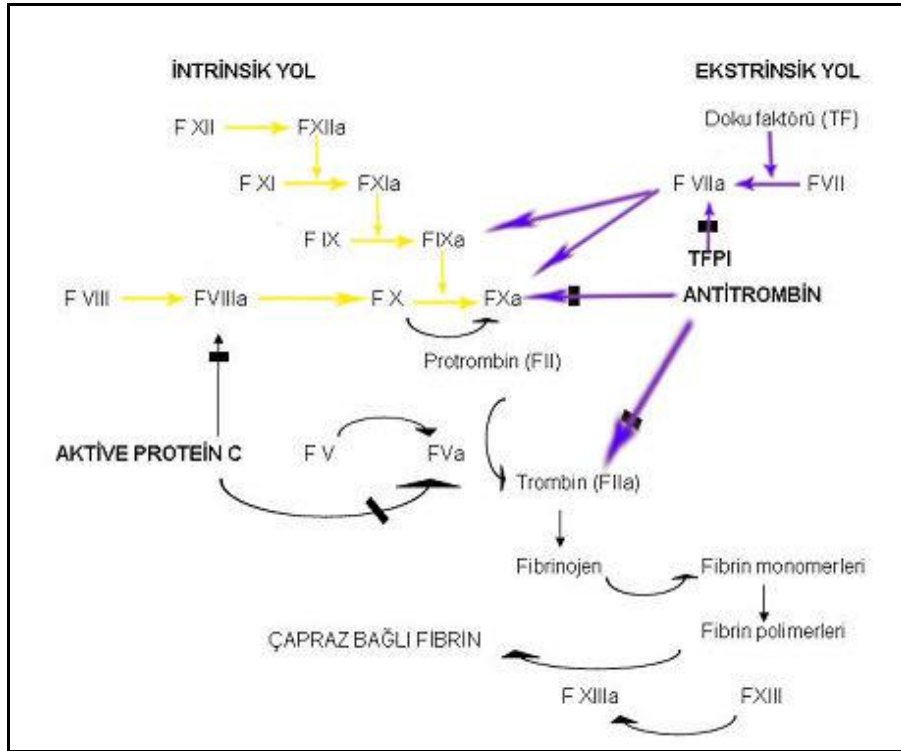
### **2.1.2.2. Sekonder Hemostaz**

Primer ve sekonder hemostaz birbiriyle yakından ilişkilidir. Sekonder hemostaz, trombosit tıkaçının kanamayı durdurmakta yetersiz kaldığı daha büyük yaralanma durumlarında koagölasyon proteinlerinin de aktive olmasıyla başlamakta olup, fibrin oluşumu ile sonuçlanan plazma koagölasyon sistemi reaksiyonlarını içerir. Koagölasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı oluşumu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Bu basamaklar; intrinsik yol (yavaş ve en önemli basamak), ekstrinsik yol (hızlı ve erken aktive olan basamak) ve ortak yol (fibrin yapımı için gerekli son basamak)'dur (şekil 2.4). Günümüzde koagölasyonun başlamasında primer yolun ekstrinsik yol olduğu bilinmektedir (Colman et al. 2004). Pıhtılaşmayı oluşturan olaylar zincirinin, pıhtılaşmanın plazmadaki (intrinsik) veya dokudaki (ekstrinsik) başlatıcı sistemlerinin aktivasyonu ile başlatılmasında yalnızca ilk kısım farklıdır. Sonraki kısım her iki durum için de ortaktır (Weitz 1997). Kan pıhtılaşma olayı karmaşık bir süreçtir. Pıhtı oluşumu ve fibrinolizis dinamik bir denge oluşturur. Bu denge, dolaşım sisteminin yapısal içeriğinde bir bozulma



oluşturduğu zaman, hastayı kanama veya pıhtılaşmanın ölüme götürmesini engeller. Birçok faktör bu dengeyi bozar (Paiement 1998).

**Ekstrinsik Yol:** Bu yol, dokuda oluşan tromboplastin olarak bilinen doku faktörü (TF/Faktör III) tarafından başlatılan ve hızla aktive olan bir yoldur. TF, primer olarak endotel hasarlanması ile salınmaktadır. Ayrıca trombositler ve monosit/makrofajlar tarafından da sentezlenmektedir.  $Ca^{++}$  iyonunun varlığında TF, hızla faktör VII (FVII)'yi aktive edip (FVIIa) onunla bir kompleks oluşturmaktadır. TF/FVIIa kompleksi de hızla bir taraftan faktör IX (FIX)'u aktive ederken, diğer yoldan da direkt olarak faktör X (FX)'u FXa'ya dönüştürür. Faktör III hem direkt olarak, hem de FIX'u aktive etmek suretiyle indirekt olarak,  $Ca^{++}$  yardımı ile, FX'u aktive eder; yolun bundan sonraki kısmı endojen yol ile ortaktır. Aktive olan FXa, FVa ve FII (protrombin) ile beraber protrombinaz adı verilen kompleksi oluşturur ve protrombinin trombine (FIIa) dönüşümü sağlar. Trombinin primer rolü fibrinojenden fibrin oluşturarak hemostatik plağın inşa edilmesidir. Trombin, fibrinojen molekülünden önce fibrinopeptid A ve B fragmanlarını kopararak fibrin monomerlerini ve daha sonra monomerlerin bir araya gelmesi ile fibrin polimerlerini oluşturur. Aynı zamanda fibrin stabilize eden faktör olan FXIII'ü aktive ederek fibrin polimerlerinin çapraz bağlarının oluşmasını ve güçlü fibrin pıhtısının meydana gelmesini sağlar (Greenfield 1994; Weitz 1997; Ferhanoğlu 2003) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İntrinsik ve Ekstrinsik Yol

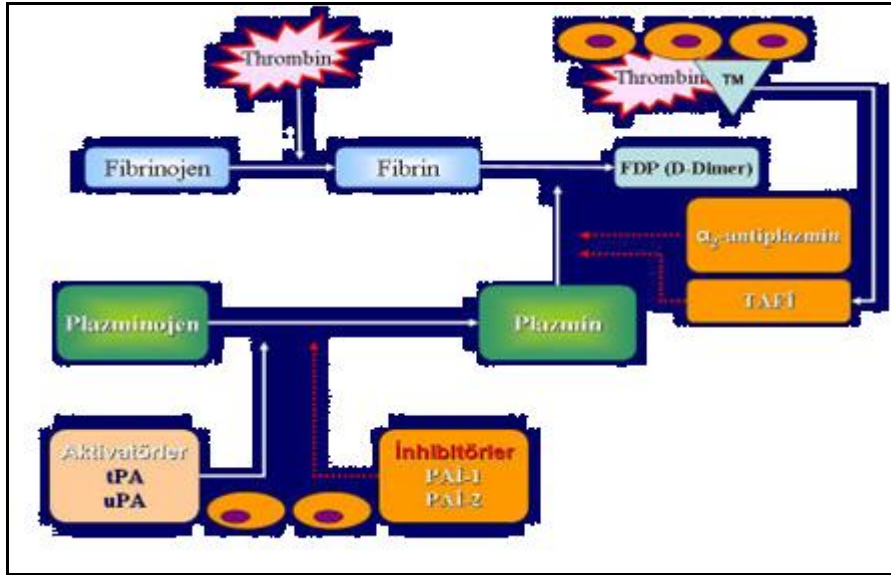
**İntrinsik Yol:** Bu yol, plazma içinde oluşur. İntrinsik yolun başlangıcı son derece komplekstir ve FXII'nın herhangi bir proteolitik basamak gerektirmeden kanın herhangi bir yabancı yüzeyle (kollajen) teması ile aktive olmaktadır. Zedelenen damar çeperindeki subendotelial kollajene temas sonucunda Hegeman faktörü (Faktor XII) aktive olur. FXIIa, FXI'i FXIa'ya dönüştürür. FXIa, FIX'u aktif hale getirir. Kofaktörü olan FVIIIa ile beraber FIXa ve FX tenaz kompleksini oluşturarak, FX'u FXa'ya dönüştürür. Bundan sonraki aşamada yine ekstrinsik yolun aktivasyonuna bağlı koagülasyonda olduğu gibi, protrombinaz kompleksi aracılığı ile trombin ve fibrin oluşumu görülür. Faktor XIIa'nin başlattığı reaksiyon zincirindeki faktörlerden her biri  $Ca^{++}$  ve diğer bazı faktörlerin yardımıyla kendisinden sonra gelen faktörü aktive eder (Greenfield 1994; Weitz 1997; Ferhanoglu 2003) (Şekil 2.3).

**Ortak Yol:** Pıhtılaşma yolunun ortak kısmında; Faktor Xa,  $Ca^{++}$ 'un, Labil faktör'ün (Faktor V) ve trombosit kaynaklı fosfolipid misellerinin yardımı ile protrombini (Faktor II) trombine (Faktor IIa) dönüştürür. Faktor IIa, pıhtılaşma olayının gözle görünen kısmı olan fibrinojenin (Faktor I) fibrine dönüşmesi olayını başlatır. Önce Faktor I'in iki peptid zincirinin her birinden iki ufak peptid parçası koparılır ve fibrin monomerleri (Faktor Ia) oluşur. Bir transglutaminaz'ın (aktive edilmiş faktor IIIa) yardımı ile Faktor Ia kovalent çapraz bağlarla polimerize olur; böylece suda çözünmeyen ve plazmin ve diğer proteolitik enzimlere oldukça dirençli olan fibrin oluşur. Fibrin iplikleri, dolaşımdaki eritrositleri ve kimi zaman da lökositleri hapseden kırmızı pıhtının matriksini oluşturur. Koagülasyon kaskadı böylelikle pıhtı oluşumu ve büyümesiyle sonuçlanır. Faktor IIa, Faktor XIII'ün aktivasyonunu da katalize eder. Ayrıca, trombosit agregasyonunun güçlü bir stimülatörüdür (Greenfield 1994; Weitz 1997; Mann 1999).

### 2.1.3. Fibrinolitik Sistem

Fibrinoliz, kan pıhtısının engellenmesi ve çözülmesi için fibrinin fiziksel yıkımı olarak açıklanmaktadır. Fibrinolizin düzenlenmesi endotel yüzeyinde olur. Damar içi fibrinolitik aktivite, t-PA ve ürokinaz plazminojen aktivatörleri (u-PA) ve PAI-1 ve  $\alpha 2$ -antiplazmin gibi inhibitörler arasındaki denge ile gerçekleştirilir (Şekil 2.4) (Cesarman-Maus et al. 2005). Zimojen olarak bulunan plazminojen, bir serin proteaz olan plazmin'e dönüştüğünde fibrinin ilk degradasyonu sağlanır. Fibrin, plazminojenin aktivasyonu için bir kofaktör olarak rol oynarken, plazmin için de substrat görevi görür. t-PA, fibrin

varlığında plazminojeni fibrin proteolizini sağlayan plazmine dönüştürür. Fibrin degradasyonu fazla plazminojen aktivasyonunu engeller. Plazmin, fibrin ve matriks bileşenlerinin hücreye yakın bölgelerde parçalanmalarını kolaylaştırır (Wiman et al. 1978). Fibrinoliz çoğunlukla antiplazmin, PAI-1 ve trombin aktive edici fibrinoliz inhibitörü (TAFI) tarafından kontrol edilir (Mosnier et al. 2006). Vasküler endotel hücreleri t-PA ve PAI-1'i sentezleyip, salgırlar. Dokunun tamiri ve yenilenmesi eninde sonunda fibrin bazlı pıhtının çözünmesini gerektirir. Doku plazminojen aktivatörü ve ürokinaz dolaşımdaki zimojen plazminojen üzerine etki ederek aktif fibrinolitik enzim olan plazmine dönüşmesini sağlar. Ayrıca, intrinsek yol aktivatörleri olan kallikrein, XIIa ve XIa da plazminojenin plazmine dönüştürülmesine yardımcı olurlar. Plazmin, fibrin matriksini çözer ve çözünür fibrin peptitleri ve D-dimer oluşur. Plazmin aynı zamanda hasarlı dokuyu parçalayan metalloproteinazları da etkin hale getirir. Fibroblastlar ve lökositler yara içine göç ederler. Bu hücreler, lökositlerden ve aktif hale gelmiş trombositlerden salınan büyüme faktörleri ile uyumlu olarak damarın onarımı ve dokunun yenilenmesi için çalışırlar.



Şekil 2.4. Fibrinolizis

## 2.2. PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖRÜ-1 (PAI-1)

Plazminojen, u-PA veya t-PA tarafından aktif formu olan plazmine dönüştürülen bir proteozimidir. Proteolitik bir enzim olan plazmin, bağ doku proteinleri ve bazal zarları parçalayabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca diğer latent proteolitik enzimleri aktive ederek, parçalanacak protein spektrumunu genişletir. Plazmin; pıhtı yıkımında, dokuların yeniden biçimlendirilmesinde, inflamasyonda, tümör hücre yayılımında, yara iyileşmesinde, trofoblast invazyonunda, metastaz gelişimi ve angiogenez mekanizmalarında anahtar enzim rolü oynamaktadır (Iishi et al. 1995). u-PA ve t-PA, proteolitik kesim sonucu plasminojeni plazmine dönüştüren zayıf proteolitik enzimlerdir. u-PA, hücre göçü, yara iyileşmesi ve doku biçimlendirilmesi gibi birçok fiziksel ve patolojik durumda hücre proteolizde yer almaktadır. t-PA ise intravasküler pıhtı eritilmesine aracı olmaktadır (Ossowski 1988). Plazminojen aktivatörleri ve plazmin'in fonksiyonları; fibrinoliz, doku yapılanması, hücre migrasyonu ve doku yıkımıdır. u-PA'nın bağlanma bölgesi uPA reseptörü (uPAR) olarak adlandırılır. Bir glikoprotein olan uPAR, u-PA'yı hücre yüzeyine bağlarken, aynı zamanda plazminojeni aktive etme görevini gerçekleştirir. PAI-1, PAI-2, PAI-3 ve nexin proteini olmak üzere bilinen dört adet ürokinaz ve doku plazminojen aktivatörü inhibitör proteini bulunmaktadır. Bu proteinlerin hepsi aktivasyon düzeyinde proteolize aracılık eden regülatör proteindir. PAI-1, tPA ve uPA'nın temel inhibitörüdür. Hemostazı düzenlemenin yanında plazminojen veya plazmin aktivasyonuna bağımlı birçok biyolojik olayda rol oynar. PAI-1 fibrine bağlanır ve fibrin bağı PAI-1, tPA aracılı pıhtı lizisini inhibe edebilir. PAI-1, antiproteolitik aktivitesinden bağımsız bir mekanizma ile de hücre adezyonu ve/veya migrasyonunda da rol alır. PAI-1 uPARa bağlanarak, uPARın indüklediği kemotaksisi inhibe eder, bu da hücre göçünü düzenler (Kwaan et al. 1991; Degryse et al. 2001).

Plazminojen aktivasyon sisteminin üyelerinden biri olan PAI-1, serin proteinaz inhibitör (SERPIN) ailesinden olup, t-PA'nın major fizyolojik inhibitörüdür ve birçok biyolojik süreçte rol oynar (Czekay et al. 2003). Bu serpine has olan özelliği konformasyonel ve fonksiyonel özellikleri arasında sıkı bir ilişki olmasıdır. 7. kromozomun uzun kolunda q22.1 de lokalize olan gen, 9 ekzon ve 8 introndan oluşmaktadır. 50 kDa moleküler ağırlığında, 379 amino asitten oluşan tek zincirli globüler bir glikoproteindir (Erickson et al. 1984; Strandberg et al. 1988). PAI-1; aktive, latent ve kesik olmak üzere üç farklı

formda bulunur ve temel görevi plazminojen aktivasyon sisteminin direk inhibisyonudur. Bunun dışında, bir adezyon glikoproteini olan vitronektin ile olan etkileşimi sonucu metastaz ve doku modellemesinde de görev alır. İkinci görevi proteinaz inhibisyon özelliğinden bağımsızdır.

PAI-1, ilk olarak insan endotel hücre kültüründe ve daha sonra da trombosit, plazma, fibrosarkom hücreleri ve hepatositlerde elde edilmiştir (Kruithof 1988). Vasküler düz kas hücreleri, fibroblast, monosit/makrofajlar ve yağ dokusunun stroma hücreleri tarafından da üretilir (Francis 2002). PAI-1'in elde edildiği dokular, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinin ana üretim yeri olduğunu göstermiştir. PAI-1 dışında plasentada PAI-2, idrarda PAI-3 bulunur. PAI-1'in inaktif formunu içeren trombositler dışında, hücrelerde depolanmaz ve sentezden sonra hızlıca sekrete edilir. PAI-1, kapiller gelişim ile ortaya çıkan u-PA'nın artmasını ("upregulation") önler, böylece anjiyogenik damarların ucundaki lokal olaylara karşı proteolizisi kısıtlar. PAI-1 düzeyleri tromboembolik hastalıklarda (Wiman et al. 1990), koagülasyon, damar duvarı formasyonu, hücre birleşmesi ve ayrılması, yara iyileşmesi, anjiyogenezis, gr (-) sepsis, gebeliğin 2.-3. trimesteri, obezite ve diğer insülin rezistansı durumlarında artar. PAI-1, ateroskleroz ve bozulmuş fibrinolizisin belirleyicisidir, fibrinolizi inhibe eder. PAI-1 plazminojen aktivasyonunu inhibe ederken, oluşan plazmin ise alfa 2 anti-plazmin tarafından inhibe edilir. Alfa 2 anti-plazmin karaciğerde sentez edilerek plazmin ile kompleks yapar ve plazminin fibrine bağlanmasını engeller. Plak etrafında hiperkoagülabilitateye neden olur. Plak rüptürü sırasında trombus oluşumunda majör rol oynar (Ngo et al. 2001).

PAI-1 plazminojenden plazmin oluşumunu inhibe ederek koagülasyon ve fibrinolitik sistem dengesinde önemli rol oynar. PAI-1 azalması, plazminojen aktivatör aktivasyonunda artış ile artmış plazmin oluşumuna neden olur. Artmış plazmin fibrinolitik ekti ile birlikte doku matrix metaloproteinazların da aktivasyonuna yol açar. Böylece aktive olan MMP'nin de extraselüler matrix yıkımına neden olur (Ercan et al. 2004). Azalmış PAI-1 düzeyleri nedeniyle oluşan aşırı fibrinolizis kanama ile birlikte. 9 yaşında travma veya cerrahi sonrası kanama atakları olan bir kız hastada PAI-1'in tam eksikliği bildirilmiştir (Fay et al. 1992).

Endotel, dolaşan PAI-1 seviyesi için önemli sentez bölgesidir ve endotelial hücre kültürlerinde hormonal, metabolik veya inflamatuvar uyaran yokluğunda bile bolca sentezlenir (Lijnen et al. 1997; Vaughan 2005). PAI-1'in sentez ve sekresyonu PDGF, trombin, IL-1, TGF- $\beta$ , fibroblast growth factor gibi büyüme faktörleri, ATII, östrojen, hormonlar, endotoxin, sitokin ve forbolester gibi pek çok agonistlerle kontrol edilir (Dawson et al. 1991). Bu özelliği, ateroskleroz ve inflamasyonda önemli rol oynadığını düşündürmektedir. AT II ve AT IV'de *in vivo* ve *in vitro* olarak vasküler dokuda PAI-1 mRNA sentezini artırır. PAI-1'in büyük kısmı plazmada dolaşır. Plazmada tespit edilebilir sınırlarda olup, normal değeri 5-40 ng/ml olarak belirtilmiştir. Yaşlı popülasyonda hafif yüksek olma eğilimindedir (Vaughan 2005).

PAI-1 sentezinin genetik olarak regüle edildiğine dair deliller vardır. PAI-1 geninin polimorfik lokusundaki genetik varyasyon, değişik plazma PAI-1 düzeyleri ile birlikte seyredir. Mutasyon sonucu gen fonksiyonunda defekt veya dokuya özel olarak PAI-1 ifadenmesinde azalma görülmektedir. Ayrıca PAI-1 ifadenmesini veya aktivasyonunu kontrol eden vitronektin gibi, herhangi bir faktördeki bir mutasyon da PAI-1 fonksiyonunda bozulmaya neden olabilir (Fay et al. 1997). PAI-1 promotor bölgesindeki tek guanine insersiyon veya delesyonu PAI-1 gen ekspresyonunda önemli rol oynar. 4G aleli daha yüksek PAI-1 düzeyleri ile birlikte dir. PAI-1 4G/5G polimorfizmi ve yüksek seviye PAI-1'in spontan düşüklerle ilişkilendirilen venöz trombozembolizm riskini arttırdığı düşünülmektedir (Schenk et al. 2008; Oguzulgen et al. 2009).

Artan plazma PAI-1 aktivitesinin kalp spazmı, diyabet ve miyokard infarktından kurtulan bireylerde azalmış fibrinolitik aktiviteden büyük ölçüde sorumlu olduğu gözlenmiştir. Kanseri, obezite, renal hastalıklar ve metabolik sendromlar gibi hastalıklarda PAI-1 seviyesi ve aktivitesinde artış gözlenmektedir. Fibrinolizisin inhibe edilmesine bağlı olarak ortaya çıkan koroner kalp hastalıkları ve miyokard enfarktüsü yine PAI-1'in yüksek seviyeleriyle ilişkilendirilmektedir. Böbreklerdeki ürokinazın ana inhibitörü olarak da fibrinin plazminojen tarafından yıkımını azaltır (Ma et al. 2009). Yüksek seviyede bulunuşuyla obezite arasındaki ilişkinin tip II diyabete ve kardiyovasküler komplikasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Schalkwijk et al. 2006). PAI-1 aktivitesi ve vücut kitle indeksi, serum trigliseritleri veya insülin, PAI-1 genotipine göre homojenlik

göstermektedir (Henry et al. 1997). Muhtemelen gen-çevre etkileşimi bu asosiasyonu komplike etmektedir. İnsülin rezistans sendromunda artmış PAI-1 düzeyleri gözlenmiştir. Plazma PAI-1 düzeyleri ile vücut kitle indeksi, trigliserit, insülin düzeyleri ve sistolik kan basıncı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (Juhan-Vague et al. 1991). Diyet, egzersiz ve oral antidiyabetik ilaçlarla gelişen insülin direnci plazma PAI-1 düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır. İnsülin rezistans sendromlu hastalarda, PAI-1 düzeyinin azalması sonucu fibrinolitik aktivite artmaktadır (Tenkanen et al. 1995).

Farelerle yapılan çalışmalarda, PAI-1 in yara iyileşmesi, ateroskleroz, obezite ve insülin rezistansı gibi metabolik hastalıklar, tümör anjiogenezi, kronik stres, kemiğin yeniden şekillenmesi, astım, romatoid artrit, fibroz, glomerulonefrit ve sepsis gibi olaylarda fonksiyonel rolü olduğu gösterilmiştir (Lijnen 2005).

PAI-1 geninin uzun yaşamla ilişkili olabileceğini öne sürüldüğü bir çalışmada, fibrinolitik aktivite veya proteoliz modülatörlerinin yaşlanma veya yaşlılıkla ilgili hastalıklarda genel bir etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (Reiner et al. 2005).

Adiposit hücre kültürü çalışmalarında artmış inflamatuvar belirteçlerin PAI-1 mRNA sentezini uyardıkları gösterilmiştir (Crandall et al. 1999).

Fibrinolitik sistemde PAI-1 inaktivasyonu fibrin yıkımını önler ve yüksek PAI-1 tromboz riskini artırır (Kohler et al. 2000). Artmış PAI-1 seviyeleri artmış aterotrombotik olay riski ve vasküler hastalığın progresyonu ile ilişkilidir (Vaughan 2005). Artmış PAI-1 koroner tromboz riskinde artışla birlikte (Vaughan 2005). PAI-1 iskemik kardiyovasküler hastalık gelişiminde etkilidir (Kohler et al. 2000). Düşük plazma fibrinolitik aktivitesi artmış PAI-1 aktivitesini yansıtır, buda genç iskemik kalp hastalığında önemli etken gibi görülmektedir (Rott et al. 2009). Trombin, endotel hücre yüzeyindeki trombomodulin reseptörüne bağlanınca protein C aktive olur ve koagülasyon kofaktörlerinin parçalanmasını ve PAI-1'in inaktivasyonunu sağlar (Stein et al. 1998). Azalmış fibrinolitik aktivite, artmış PAI-1 plazma konsantrasyonu veya t-PA serbestleşmesinde bozulma MI için artmış risk ile birlikte. Akut koroner sendromlarda bu prokoagulan aktivitenin

önemli olduğu düşünülür (Rott et al. 2009). Konvansiyonel risk faktörlerinden bağımsız olarak orta yaşlı akut MI hastalarında yüksek plazma PAI-1 seviyesi tespit edilmiştir (Thogersen et al. 1998). Plazminojen ve kombine t-PA/u-PA yetersiz farelerde trombotik kapasitenin azaldığı tespit edilmiştir (Vaughan 2005). Erkeklerde artmış PAI-1 aktivitesinin venöz tromboembolizm, koroner arter hastalığı, akut myokard infarktüsü gibi fibrinolitik kapasitenin azaldığı bazı trombotik hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir. Defektif fibrinolizis ve venöz trombozlu hastalarda bu durum düşük konsantrasyondaki tPA veya artmış PAI-1 nedeniyle meydana gelebilmektedir. Spontan veya tekrarlayan derin ven trombozu olan zayıf fibrinolitik yanıtı hastaların %35inde venöz okluzyon gözlenmiştir. Bunların %25inde tPA eksikliği, %75inde PAI-1 artışı saptanmıştır (Juhan-Vague et al. 1987).

PAI-1, obezite gelişimi sırasında adipoz dokunun büyümesini içeren santral doku yeniden şekillenmesi ve periselüler proteolizde önemli rol oynar. Artmış plazma PAI-1 seviyesi vücut adipoz doku dağılımı ile koreledir ve kilo verme ile normale düşer (Crandall et al. 1999). Aterosklerotik plaklarda PAI-1'in arttığı gösterilmiştir (Schneiderman et al. 1992; Lupu et al. 1993).

Hayvan modelleriyle yapılan diğer pek çok çalışmada, artmış PAI-1 düzeylerinin in vivo fibrin depolanmasıyla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Juguler ven trombozlu deneysel hayvan modellerinde monoklonal antikor kullanarak PAI-1 inhibisyonu, endojen trombolizise ve trombüs yayılımının inhibisyonuna neden olmuştur (Erickson et al. 1990).

İnsan PAI-1 geni için genetik yapısı değiştirilmiş farelerde doğumdan sonraki 3 gün içinde kuyruklarda venoz tromboz geliştiği, ancak arteriyel tromboz gözlenmediği saptanmıştır. Dahası, genetik yapısı değiştirilerek total olarak fonksiyonel PAI-1 eksikliği yaratılan farelerde, endotoksin injeksiyonundan sonra venoz trombüs, yabancı tipe göre inflamasyon benzer olmasına rağmen daha az sıklıkta gözlenmiştir. Bu bulgular da venöz trombüs gelişiminde PAI-1'in nedensel rolünü desteklemektedir. Yine PAI-1 eksikliği olan farelerdeki çalışmalar, trombositten zengin arteriyel trombüs lizisine rezistansta PAI-1'in major rol oynadığını göstermiştir (Zhu et al. 1999). Genetiği değiştirilmiş farelerde yapılan



diğer çalışmalarda PAI-1 düzeyi ile tromboz arasındaki ilişki vurgulanmıştır. Genetiği değiştirilmiş bu farelerde arteriyel veya venöz tromboz bulgularının 4 aya kadar gözlenmediği, 6 aydan büyük farelerin %90'ında spontan oklüzyonların gözlendiği bildirilmiştir (Eren et al. 2002; Lijnen et al. 2004). Bu nedenle PAI-1 düzeylerinin kronik yükselişinin farelerde yaş bağımlı koroner arter trombozuyla ilgili olduğu söylenebilmektedir.

Artmış PAI-1 düzeyleri ile aterosklerozun ilerlemesi arasında ilişkili bulunmuştur (Schneiderman et al. 1992). Ateroskleroz Risk Komitesinin çalışmasında yüksek bazal PAI-1 düzeyleri ile damar duvar kalınlığı arasında ilişki saptanmıştır (Salomaa et al. 1995). Bu da PAI-1 düzeyi ile hücre duvarı hasarı arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. PAI-1, aterosklerozun önlenmesi veya tedavisinde terapötik hedef olabilir.

Sepsiste artmış PAI-1 düzeylerinin kötü prognozla birlikte olduğu saptanmıştır. PAI-1'in aşırı üretiminin septik şoklu hastalarda disemine intravasküler koagülasyona eğilim oluşturduğu bildirilmiştir (Mesters et al. 1996).

Fareler üzerinde PAI-1 gen dağılımının, organ gelişimi, üreme, hemostaz, tromboz ve trombolizis üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Şaşırtıcı olarak PAI-1 eksikliği olan fareler canlı ve fertildir, organ anomalisi göstermemiştir. Bu da üreme ve gelişmenin PAI-1 yokluğunda da normal olarak sürebileceğini göstermiştir. Plazminojen ve/veya plazmin azalmasına yol açan diğer proteinaz inhibitörlerinin PAI-1 eksikliğini kompanse edebileceği veya farelerdeki PAI-1 eksikliğini sadece hafif hiperfibrinolitik durum ortaya çıkarabildiği düşünülmüştür. PAI-1 eksikliği olan farelerde spontan kanama veya gecikmiş yeni kanama gözlenmemiştir. Bu durum *in vivo* gözlemle çelişkilidir. İnsan ve fare fenotipleri arasındaki bu farklılık aktif PAI-1'in farelerde insanlardan 5 kat daha az olmasıyla açıklanabilir. Yine tPA ve fibrinolitik sistemin diğer bileşenlerinin de türe özgü plazma düzeyleri rol oynayabilir. Tüm bu farklılıklara rağmen PAI-1'in çeşitli biyolojik olaylardaki rolü fare modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

## **2.3. ENDOTELYAL PROTEİN C RESEPTÖRÜ (EPCR) ve TROMBİN RESEPTÖRÜ (PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 1; PAR1)**

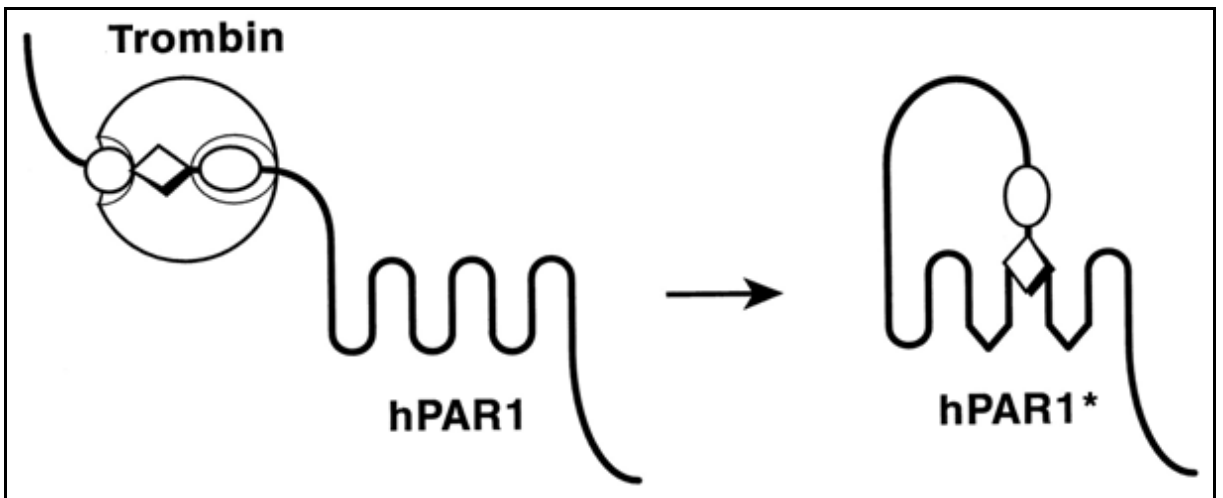
### **2.3.1. PAR1**

Trombin, hemostaz ve tromboz'da en merkezi rolü üstlenir. Fibrin pıhtıyı oluşturmak için çeşitli koagülasyon faktörlerini uyararak moleküler düzeyde etki gösterirken, damar endotel hücrelerini ve trombositleri aktive ederek hücreSEL düzeyde faaliyet gösterir. Trombin bir serin proteaz sınıfı enzimdir ve trombine bağımlı hücreSEL etkiler G-Proteinine kenetli reseptörlerin aktivasyonu ile olur. Reseptörlerini amino ucundan keserek kendisine bağlanabileceği aktif bir yeni amino-ucu ortaya çıkarır (Vu et al. 1991). Trombinin bu aktivasyonu bir G-proteinine (Gq) kenetli reseptör olan trombin reseptörü, proteazla-aktifleştirilmiş reseptör 1 (PAR1) için de geçerlidir. Trombosit agregasyonunun aktifleştirilmesi ve granül salınımı hemostazın korunması için en önemli adımlardandır ve trombin tarafından kontrol edilmektedir (Lasne et al. 1995). Endotel hücrelerinin trombin tarafından aktifleştirilmesi; vWF salınımı, prostasiklin (PGI2) ve nitrik oksit (NO) sentezi ile hücreSEL proliferasyon gibi çeşitli etkilerle sonuçlanır (Garcia et al. 1992; Garcia et al. 1993; Tesfamariam et al. 1993; Tesfamariam 1994; Garcia et al. 1995). Endotelden salınan NO ve PGI2, trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe eder (Kanthou et al. 1995; Griendling et al. 1996; Cines et al. 1998). Trombin, endotel hücrelerini ve trombositleri PAR1 üzerinden uyardığı için bu reseptörün hücre yüzeyindeki miktarı ve aktivitesi tromboz ve hemostazda çok önemli bir yer tutmaktadır.

PAR1 geni çok büyük bir intron (22kb) tarafından bölünmüş 2 eksondan oluşmaktadır ve 5. kromozomda q11.2 - q13.3.15 pozisyonunda lokalizedir (Kahn et al. 1998). Genin önündeki düzenleyici dizilerin analizi yapıldığında diğer birçok G-proteini bağı reseptörlerin genlerinde olduğu gibi, çok önemli diziler olan TATA ve CAAT sekanslarının öngörülen bölgelerde olmadıkları görülmüştür (De Backer et al. 1998). Promotor bölgesinde SP1, Ets, GATA, gibi transkripsiyon faktörleri için regülatör dizileri bulunmuştur (Schmidt et al. 1996).

PAR1 sentezi trombositlerde, endotel hücrelerinde ve merkezi sinir sisteminde yapılır. PAR1'in trombin tarafından uyarılmasıyla proinflatuar etkiler, anjiyogenez,

nörodejenerasyon gibi mekanizmalar da aktive olur. Böylece PAR1'e antagonistik etki yapabilecek maddelerin kullanımı geniş terapötik sonuçlar doğurabilir. Bugüne kadar dört PAR üyesi belirlenmiştir. Bunların koagülasyondan ve inflamatuvar hücreler tarafından üretilen birçok proteaz tarafından işlenip aktifleştirildikleri bilinmektedir. PAR-1 bir 7 transmembran domainidir, trombin tarafından primer olarak kesilen G-proteini bağlı bir reseptördür. Reseptörün yeni N terminali, reseptörün proteolitik aktivitesinden sonra meydana çıkmıştır, böylelikle intraselüler sinyal olayları başlar (Sambrano et al. 2001). PAR1'in trombin tarafından kesimlenmesi LDPR↓SFLLRN aminoasit dizisinden gerçekleştirilmektedir. LDPR tetrapeptidi ayrıldıktan sonra SFLLRN dizisinden ekstrasellüler bölgeye bağlı kalarak reseptörü aktive eder ve sinyal iletim mekanizmalarına yol açar (Şekil 2.5). Mekanizmanın gerçekten böyle işlediğine dair değişik çalışmalar yayınlanmıştır. Bunlardan birinde, kesimlenme bölgesinde site directed mutagenesis ile oluşturulan mutasyonlar sayesinde, trombin kesimlenmesi görülmemiş ve sinyal iletiminin oluşmadığı gözlenmiştir (Vu et al. 1991). İkinci olarak yine mutant oluşturulan kesimlenme dizisinde trombin kesimlenme dizisi yerine barsaklarda tripsinojeni tripsine çeviren bir enzim olan enterokinaz kesim bölgesinde trombinin değil ancak enterokinazın kesim yaptığı görülmüştür (Vu et al. 1991). Üçüncü olarak bağlanma ligand domainini taklit eden sentetik peptidler kullanılarak (SFLLRN) PAR1'in aktifleştirilmesi sağlanmıştır (Vu et al. 1991; Scarborough et al. 1992). Daha ileri bir fiziksel kanıt ise bu motifi tanıyan antikor ile trombositler muamele edilerek trombinin bağlanması ortadan kaldırılmış olur (Brass et al. 1994).



**Şekil 2.5 .** PAR1'in trombin tarafından aktifleştirilmesi (Coughlin 1999)

Trombinin peptidleri arjinin aminoasitinden ayırdığı bilinmektedir, kesimleme işlemi öncesinde LDPR sekansını tanıdığı daha önce zimojen protein C’de gösterilmiştir (LDPR↓I). Trombinin negatif yüklü “anyon bağlanma bölgesi” kesimleme için kritiktir, bu bölgenin negatif yüklü olması reaksiyonun 100 kat daha etkin olarak gerçekleştirilmesini sağlar (Bouton et al. 1995).

Trombin birincil görevi olan pıhtı oluşumunun yanında değişik hücre tiplerini de etkileyerek vasküler hasara ve sistemik yanıtı katılmasındır. Damarlarda oluşan hasarların tamiri, yeniden damar oluşumu, immün cevabın oluşturulması ve sinir yenilenmesinde rol alır. Trombositler, endotel, düz kas hücrelerinin yanında nötrofil, lökosit, nöron ve glial hücreleri de etkiler (Macfarlane et al. 2001). Trombinin geniş spektrumlu fizyolojik etkilerini PAR1 üzerinden gerçekleştirdiğini söylemek mümkündür.

PAR1 koagülasyonda, inflamasyonda ve vasküler hemostazda kritik roller oynamasının yanında, Aktive Protein C (APC) / EPCR sistemiyle de aktifleştirilmektedir. PAR1’in APC tarafından aktifleştirilmesi EPCR bağımlı bir aktivitedir. APC/EPCR/PAR1 sinyal mekanizmasının koruyucu ve anti-apoptotik etkileri bilinmektedir. APC-EPCR-PAR-1 sinyali, yara iyileşmesinde kuvvetli bir rolü olan insan keratinosit proliferasyonunu artırır. PAR-1’in APC aktivasyonu sepsis gibi inflamatuvar hastalıklarda önemlidir. EPCR’nin bu etkilerini gösterebilmesi için APC ve PAR1 gerekmektedir (Esmon 2006).

FVa ve VIIIa inaktivasyonuna ek olarak, APC’nin hücresele seviyede antikoagulan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu apoptotik aktiviteye en azından kısmen, PAR-1 kesiminde yer alan APC-EPCR kompleksi aracılık eder. Bu etkilerin çoğu, PAR-1’in proteolitik kesimine aracılık eden APC ve membrandaki PAR-1 ve EPCR’nin eşzamanlı olarak varlıklarına dayanır (Esmon 2000). APC’nin antiapoptotik aktivitesi, ya APC (EPCR bağımlı davranış) ya da PAR-1 aktivasyon peptidlerinin fareyi iskemik inmeden koruyabildiği gözlemiyle desteklenen PAR-1 aktivasyonu boyunca gözlemlenmiştir. PAR-1’in APC’nin *in vivo* TNF $\alpha$  salınımını, monositlerden TNF $\alpha$  salınımını ve nükleer faktör kappa  $\beta$  nükleer translokasyonunu inhibe ettiği, *in vivo* lökosit adhezyonunu bloke ettiği, PAR-1 aktivasyonunun artışı bloke ettiği,

PAR-1 aktivasyonunun arttığı doku faktörü ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Esmon 2003).

APC'nin EPCR bağımlı ve PAR-1 bağımlı bir durumdaki göbek venleri ya da insan beyin endotelindeki sürekli değişim halindeki sitozolik  $Ca^{++}$ 'u değiştirdiği saptanmıştır. Ayrıca, APC, caspase-3 aktivasyonunun azalması, Bax / Bcl-2 oranının normalizasyonu ve tümör baskılayıcı p53'ün transkripsiyonel bağımlı inhibisyonu boyunca hipoksik insan beyin endotelinde apoptozisi engellerler. APC'nin bu etkileri EPCR ve PAR-1'e bağımlıdır. Ayrıca, hem faredeki inme modelinde hem de kültüre edilmiş kortikal nöronlarda EPCR bağımlı ve PAR-1 bağımlı APC'nin nöroprotektif olduğu da gösterilmiştir. In vivo yararlı etkilerin endotel hücrelerin apoptozisini azaltıp azaltmadığı, kan akışı boyunca antiinflamatuvar etkilere aracılık edip etmediği, nöronlardaki direkt sitoprotektif etkilere sebep olup olmadığı henüz tam olarak belirlenmemiştir (Dahlback et al. 2005).

### **2.3.2. EPCR**

Protein C (PC) antikoagülant sistemi, koagülasyon ve inflamasyon arasındaki ara yüzey noktasında durur, koagülasyonun düzenlenmesi için önemlidir. Bu yolun düzenlenmesi ve prokoagülan aktive FV ve FVIII'in degradasyonu, APC ve protein S aracılığı ile olur. APC, major bir doğal antikoagülandır. Pıhtılaşma faktörleri FVa ve FVIIIa'yı proteolitik olarak inaktive eder. PC, plazmada bir zimojen olarak dolaşır ve trombinin kendi endotel reseptörü trombomoduline bağlanmasıyla aktive edilir. Trombin trombomoduline bağlanırken var olan potent prokoagülan fonksiyonlar tersine işler ve PC'ye doğru yönelir. Bunu takiben, PC, endotel hücre yüzeyinde trombin-trombomodulin kompleksi ile aktive olur (Esmon 1992). PC'nin aktivasyonu için önemli diğer bir protein de EPCR'dir. EPCR, PC'yi bağlar ve trombin-trombomodulin kompleksiyle PC'nin aktivasyonunu daha da artırır (Mosnier et al. 2007).

EPCR bir tip 1 transmembran glikoproteini olmasına rağmen, plazmada solubl halde (sEPCR) de bulunmaktadır. MHC-sınıf 1/CD1 ailesi molekülleriyle homoloji göstermektedir. İlk kez endotel hücresinden izole edilmiş ve klonlanmıştır ve PC ve

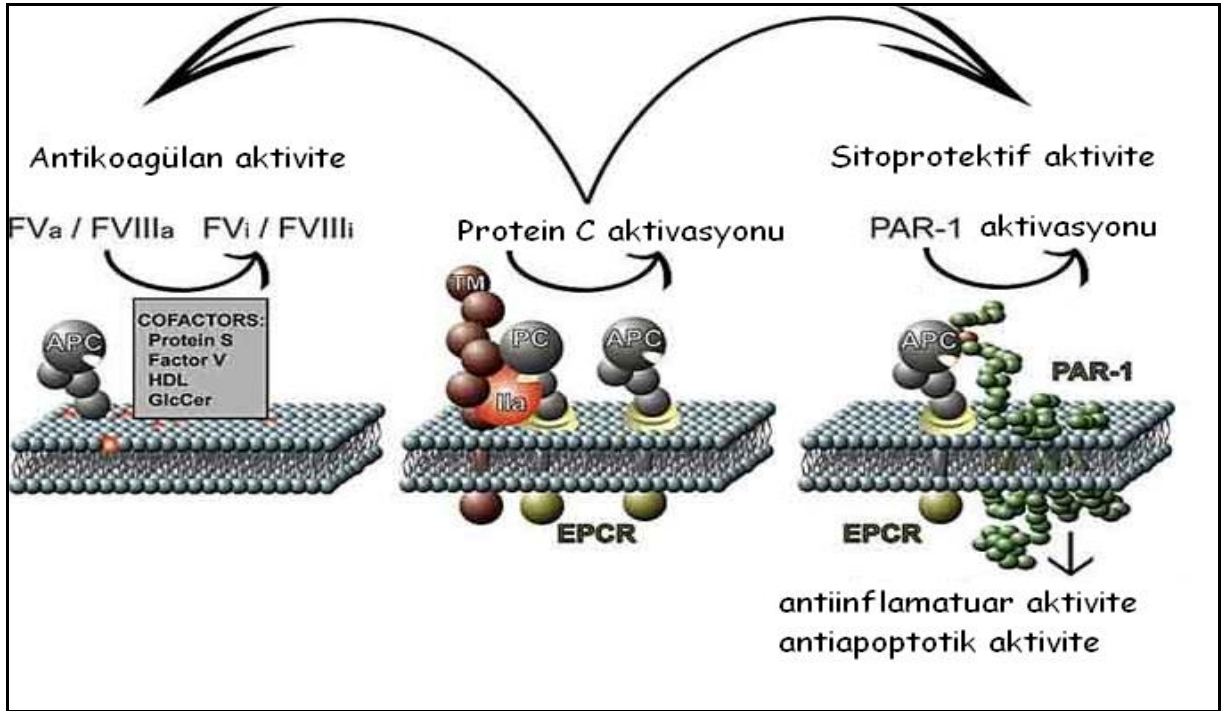
APC'ye yüksek bağlanma aktivitesi gösterir (Fukudome et al. 1994). Trombin-trombomodülin kompleksi varlığında PC EPCR'ye bağlanarak aktif hale geçer. APC antikoagulan yolu; protein S, yüksek yoğunluklu lipoproteinler, fosfatidilserin, kardiolipin ve glukozilseramid gibi çeşitli faktörlerin yardımıyla pıhtılaşma faktörleri Va ve VIIIa'nın proteolitik inaktivasyonu sağlar. Endotel üzerinde APC'ye bağlı yolakların çalışması için EPCR ve PAR1 gereklidir (Vu et al. 1991). APC'nin hücre koruyucu etkisi, gen ekspresyon profillerini arttırması, anti-apoptotik etkisi ve anti-inflamatuar etkisi, endotelial bariyerlerin korunmasında etkilidir (Joyce et al. 2001; Riewald et al. 2002; Nick et al. 2004).

*EPCR* genindeki 23 bazlık bir insersiyonun erken miyokard infarktüsüne ve derin ven trombozuna yatkınlık oluşturduğu öne sürülmüştür (Akar et al. 2002). Ayrıca, *EPCR* geninde 4 farklı haplotip tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan A3 Haplotipi ile sEPCR seviyeleri arasında güçlü bir bağlantı vardır ve A3 Haplotipi artan plazma EPCR seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (Saposnik et al. 2004). Bu artan plazma seviyeleri, kısmen bu formun artan salınımıyla açıklanmıştır (Qu et al. 2006). Bu form membranda muhafaza edilmez, fakat sekrete edilir. A3 Haplotipi taşıyan populasyonlardaki sEPCR'nin plazmadaki yüksek seviyeleri yalnızca membran bağlı EPCR'nin artan ektodomain salınımından değil, ayrıca alternatif mRNA işlenmesinden de meydana gelebilir. Artan sEPCR'nin biyolojik sonuçları artan prokoagulant aktiviteyle ilişkilendirilmektedir (yüksek tromboz riski gibi) (Margarethe 2008). Ayrıca, ekzon 4'de tanımlanan diğer bir polimorfizmin etkisi de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *EPCR* geni 3'UTR'daki c.4678G>C polimorfizmi (A1 haplotipi) dolaşımdaki APC'nin artan seviyeleriyle ilişkilendirilmiş ve venöz tromboembolizm (VTE) riskini azalttığı öne sürülmüştür. FVL taşıyıcılarında, EPCR geninin 4678C allelinin varlığı VTE riskini azaltan, telafi edici bir antitrombotik etkiyi meydana getirir (Medina et al. 2005) .

EPCR sinyal yolu inflamasyonu azaltabilir. Yapılan maymun deneyleriyle APC'nin EPCR'ye bağlanmasının, *E.coli* sepsisinden kurtardığı gösterilmiştir (Taylor et al. 2000). Ayrıca LPS'e bağlı endotoksemide kardiyoprotektif etkisi fareler üzerinde gösterilmiştir (Iwaki et al. 2005). Hücre membranına bağlı EPCR'ye ilave olarak, soluble EPCR'de lökositler üzerindeki integrin CD11b/CD18 ile bağlanabilir. Bu ilişki ile EPCR'nin lökosit

adezyonuna etki ettiği söylenebilir (Kurosawa et al. 2000). EPCR, aortik endotel hücreleri, monosit yüzeyi, CD56 NK hücreleri, nötrofil ve eosinofiller, olgunlaşmamış hematopoetik kök hücreleri, beyin kapiller endotelial hücreleri, embriyonik dev trofoblast hücreleri ve sistemik vasküler düz kas hücreleri dahil olmak üzere birçok dokuda eksprese edilmektedir (Fukudome et al. 1994; Galligan et al. 2001; Gu et al. 2002; Domotor et al. 2003; Sturn et al. 2003; Balazs et al. 2006; Stephenson et al. 2006; Bretschneider et al. 2007).

EPCR'nin hücre içinde etkisini gösterip ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2)'yi fosforlayabilmesi için PAR1'e ihtiyacı vardır. PAR1 varlığının yanı sıra APC de gereklidir. EPCR varlığında PC aktivasyonu antikoagulan ve sitoprotektif aktiviteler gerçekleştirilmektedir. Antikoagulan aktivitesini FVa ve FVIIIa'yı degrade ederek göstermektedir. APC/EPCR'nin PAR1'i aktive etmesiyle ise sitoprotektif aktivitesi gerçekleştirilmektedir. Bu da PAR1 aracılı antiinflamatuvar ve antiapoptotik aktiviteyle sonuçlanır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Protein C aktivasyonu

EPCR biyolojisinin endotel ve hematopoetik hücreler gibi farklı biyolojik fonksiyonları olan hücrelerde eksprese olduğu ve iş gördüğü söylenebilir (Riewald et al. 2002; Domotor et al. 2003). Endotelyal olmayan hücre tiplerinde (düz kas hücreleri, erken hematopoetik kök hücreleri, serebral düz kas hücreleri) EPCR'nin kesin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

EPCR'nin hasar görmüş veya inflamasyona uğramış damarların tedavisinde potansiyel yeni bir tedavi hedefi olması da söz konusudur. Yeni EPCR agonistleri APC/PC'nin hücre koruyucu mekanizmaları üzerine etki edebilecektir. Esmon'un EPCR'nin hücre membranından içeri ve hatta çekirdekten içeri translokasyonunun mümkün olduğu hipotezi de gündeme gelmiş ancak, radyoaktif sistein aminoasiti işaretli protein ile yapılan deneyde hücre içi bir trafiğe rastlanmamıştır (Esmon 2000). Diğer yandan, APC hipoksi durumunda hücre çekirdeğine girerek transkripsiyonel aktivitelerde hücreyi koruma ve hayatta kalmaya bağlı etkilere de sahiptir. Ancak, EPCR olmadığı durumlarda bu etkinin tamamen ortadan kalktığı ve hücrenin öldüğü izlenmiştir (Cheng et al. 2003). EPCR-APC-PAR1 mekanizmasının normal ve hasar görmüş damar endotel hücreleri için hayati bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır. APC-EPCR-PAR-1 mekanizmasının keratinosit gelişiminde katkısı olduğu ve yara iyileşmesinde rol aldığı belirtilmiştir (Xue et al. 2005).

PC antikoagülan yolu, kan pıhtılaşması ve inflamasyon arasında iş görmektedir ve antifosfolipid antikorlarının bulunmasına da hassasiyet gösterdiği saptanmıştır (Hurtado et al. 2004). Fetal ölümlerde anti-EPCR antibadilerinin bulunması tromboz oluşumu ve deri nekrozu ile birlikte görülmektedir. Bu ilginç gözlemler, EPCR'nin direk olarak immün cevap mekanizmasına girdiği ve inflamasyonda rolü olabileceğine kanıttır. EPCR'nin yapısal olarak MHC tip1 sınıfı proteinlere benzemesi, otoantikorların esas hedefi değildir. Ancak, oluşuma aktif olarak katılan bir hedef olduğunu söylemek mümkündür (Oganesyan et al. 2002). EPCR'nin normalden fazla üretildiği fare modelinde ise dış görünüş olarak normal ve kendiliğinden herhangi bir hemostaz problemi görülmemiştir. Deneysel olarak FXa ile muamelede tromboz oluşumuna ve daha ilginç olarak *E.coli* infeksiyonlarına ve endotoksin muamelesine daha dirençli hale gelerek, sepsiste çok önemli bir hale gelmiştir (Li et al. 2005). EPCR'yi fazla üretmenin organizmaya bir avantaj sağladığını söylemek mümkündür.



EPCR'nin akciğerlerde pnömositlerde bulunması, astım gibi inflamatuvar akciğer hastalıklarında anti-inflamatuvar etkiyi düzenlemede etkili olduğunu göstermiştir (Hataji et al. 2002). İlk olarak geniş kan damarlarının endotelinde bulunmuştur. Fakat, dendritik hücreler ve lökositlerde de ifade edilir. Bu dendritik hücre ekspresyonu doğuştan gelen bağışıklıkta önemli çıkarımlara sahip olabilir (Yalcindag et al. 2008). Bu dendritik hücre ekspresyonu, vasküler endotelde trombomodulin ve EPCR seviyeleri azaltıldığında inflamatuvar bağırsak hastalıklarında önemli olası etkilere sahip olabilir. (Sturn et al. 2003; Faioni et al. 2004; Nick et al. 2004). Nötrofillerde de düşük düzeylerde eksprese olmaktadır. Böylece, APC buraya bağlanarak kemotaksi olayını geciktirerek akciğerlere göçü engellemekte ve olası akciğer hasarından organizmayı korumaktadır (Nick et al. 2004). EPCR öncelikli olarak endotelde üretilmesine rağmen, hematopoetik kök hücrelerde de ekspresyonu gözlenmiştir (Balazs et al. 2006). Potansiyel olarak kök hücrenin direk gelişimine veya endotelden gelecek sinyaller sayesindeki gelişime katkısı olması olasıdır.

#### **2.4. DEFİBROTİD**

DNA temelli bir etken madde olan DF, bir polideoksiribonükleotid sodyum tuzu olup, polydispers karışımı olarak %90 tek iplikli oligonükleotit şeklinde bulunmaktadır. Tek iplikli deoksiribonükleik asit benzeri yapıda bir etken maddedir. Bugüne kadar iki tane trombin bağlayan tek zincir sekans tanımlanmıştır (5'-GGTTGG-ATT-GGTTGG-3' ve 5'-GGTTGG-ATC-GGTTGG-3'). Moleküler ağırlığı yaklaşık 15-30 kDa'dur. Dana akciğer veya domuz mukozasından kontrollü polimerizasyon ile elde edilen pıhtılaşmayı önleyici bir ajandır. Çeşitli sistemler üzerine multipl etkileri olan oldukça potent bir preparattır. Heparin ve Varfarin'in aksine, yüksek kanama riski olan hastalıklar için DF ılımlı bir antikoagülandır. Pıhtılaşma kaskadında bulunan antitrombin III ile birlikte kullanılır. Oral, intravenöz veya intramuskular şeklinde kullanımı bulunmaktadır. (Palmer et al. 1993; Falanga et al. 2003; Koehl et al. 2007).

DF etken maddesinin etkileriyle ilgili günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Fibrinolitik sistem üzerindeki etkileri, Heparinle sinerjistik etkileri, trombositler üzerindeki

antitrombotik etkileri, vazokonstriksiyon üzerindeki etkileri, nötrofiller üzerindeki etkileri, anti-aterosklerotik etkileri, anti-iskemik etkileri, immün sistem üzerindeki etkileri ve miyokard ve karaciğer üzerindeki etkileri de dahil olmak üzere pek çok sistem üzerinde etkilidir.

DF'in fibrinolitik aktiviteyi arttırdığı insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fibrinolitik aktivitesindeki artış, t-PA'nın seviyesinde yükselme ve PAI-1'in seviyesindeki azalma ile açıklanabilmektedir. Bu etken madde, pıhtı oluşumunu önlerken kan içinde doku plazminojen aktivatörünün (t-PA), prostaglandinin ve prostasiklinin miktarını artırır ve aynı zamanda PAI-1 fonksiyonunu da azaltarak etki gösterir (Violi et al. 1992).

Heparinle sinerjistik etkisi heparin yükselme testi ve tavşan juguler ven trombozu modelinde gösterilmiştir. Tavşanlara heparinle DF'in birlikte verilmesi halinde, heparin düzeylerinin daha fazla arttığını ve plazma seviyelerinin daha uzun süre kaldığı gözlenmiştir (Pescador et al. 1989). Sağlıklı gönüllülerle yapılan bir çalışmayla da DF'in heparinle sinerjistik etkisi doğrulanmıştır (Pogliani et al. 1989).

DF'in trombositler üzerindeki inhibe edici etkisinin çalışıldığı bir araştırmada, TxA<sub>2</sub> oluşumunu azalttığı, trombositlerdeki cAMP ve prostasiklin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde heparinin sinerjistik etkisine benzer bir şekilde PC ve S düzeylerini arttırdığı gözlenmiştir. Bu doğal inhiböterlerin (PC ve S) artışı, DF'in tromboembolizm üzerindeki önleyici ve anti-trombotik etkilerinden sorumlu faktörlerden birisidir (Ulutin et al. 1990).

DF önemli sistemik antikoagülan olmamasına rağmen (Falanga et al. 2003), endotel koruyucu, anti-trombotik, anti-iskemik, anti-inflamatuar ve apoptotik etkileri olduğu bilinmektedir (Paul et al. 1993; Eissner et al. 2002; Kornblum et al. 2006). DF'in fibrinolizisi arttırdığı, antiaterosklerotik etkiler gösterdiği bilinmesinin yanında, prelinik sonuçlara göre antianjiogenik etkisinin bulunduğu da gösterilmiştir. Ancak ek olarak in

vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Carmeliet 2003). DF, özellikle allojenik kök hücre transplantasyonu sonrası endotel komplikasyonlarını önlemek amacı ile tedavide kullanılmaktadır (Echart et al. 2009).

Çeşitli araştırmalar DF'in farklı doku, organ ve iskemi modellerinde koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Antiaterosklerotik etki gösterdiği düşünülen DF'in ateroskleroz hastaları üzerinde etkili olduğu gözlenmekle birlikte bu konuyla ilgili çalışmalar hala sürmektedir (Sevin 2003).

Deneysel çalışmalarda DF'in aterosklerotik plak oluşumunu belirgin olarak azalttığı saptanmıştır. Hiperkolesterolemide, araşidonik asit metabolizmasında değişikliklerle seyreden trombosit hiperreaktivitesi bulunmaktadır. Bu değişiklikler, aterosklerotik plak oluşum alanında vasküler PGI<sub>2</sub> sentezinde düşmeye ve TxA<sub>2</sub>'nin artışına yol açmaktadır. DF trombositleri hiperreaktivite oluşumundan korumaktadır. Bunun mekanizması olasılıkla, artmış vasküler PGI<sub>2</sub> üretimi ve PGI<sub>2</sub>'ye karşı trombositlerin uyarılması ile ilişkilidir (Lobel et al. 1989). DF'in serum kolesterol ve kalsiyum düzeylerini etkilemeksizin, aorta kolesterol ve kalsiyum düzeylerini azaltarak antiaterosklerotik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Pescador et al. 1989). Diğer yandan DF tedavisi, aterosklerozda yükselen beta-tromboglobulin (βTG) ve platelet faktör 4 (PF<sub>4</sub>) düzeylerini azaltmaktadır (Ulutin et al. 1990).

DF'in miyokard, karaciğer ve böbrek iskemisine karşı koruyucu etki yaptığı bilinmektedir. Ratlarda yapılan çalışmalarda, postiskemik reperfüzyon hasarında DF'le tedavi sonrası böbreklerin korunduğu gösterilmiştir (Ferrero et al. 1993).

Vazokonstriksiyon üzerine etkilerine bakıldığında ise, DF'in tavşan aortunda kontraksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. İskemik tavşan kalbinde miyokardiyal kontraksiyonu önlemektedir. DF, ateroskleroz prosesinde azalan prostasiklin ve NO'yu arttırmaktadır. Ayrıca endotel hücrelerinden salgılanan ve düz kas tonusünü arttırıp trombositleri aktive eden bir ajan olan endotelin de defibrotid tarafından azaltılmaktadır.

Bu olumlu etkilerinden dolayı strok ve MI (miyokard infarktüsü) da iskemik alanın azalmasına neden olmaktadır (Ulutin et al. 1990; Di Perri et al. 1991).

Yüksek doz kemoterapi sonrasında ve hematopoetik hücre transplantasyonunda gözlenen Vasküler Oklusiv Hastalık (VOH) tedavisinde en ümit verici ajanlardan biri DF'dir. VOH, artmış PAI-1, düşük PC, fibrin, fibrinojen, antitrombin düzeyinin azalması ile karakterize edilen endotel hücre hasarıdır (Echart et al. 2009). Transplant hastalarında, ameliyat sonrası tromboz ve tümör gelişimi gözlenebilmektedir. Bu durumlarda tedavi amacıyla DF kullanılmaktadır. Ciddi VOH olan hastalarda DF ile anlamlı yanıtlar elde edilmiştir (Violi et al. 1992; Korte 1997; Richardson et al. 1998; Chopra et al. 2000).

Trombomodulin, trombinin endotel hücredeki reseptörüdür. Trombin trombomoduline bağlanınca vitamin K bağımlı bir proteaz olan PC aktive olur. APC, pıhtılaşma faktörlerinden FV ve FVIII'i inaktive eder ve fibrinolitik aktiviteyi artırır. DF'in insan endotel hücrelerindeki trombomodulin ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir. DF, trombomodulin sentezini tetikleyen, trombosit aggregasyonunu azaltıcı etki gösteren, endojen t-PA'yı arttıran ve PAI-1'i azaltan bir nükleotiddir. Hepatik SOS (sinusoidal obstruct syndrome) tedavisinde kullanımı kesinleşmiştir (Zhou et al. 1994; Pescador et al. 1996).

Prostaglandinler immün cevabı düzenleyici lipid mediatörleridir. Kısmen prostaglandin E (PGE) serisi ve özellikle de PGI<sub>2</sub> in vitro olarak T hücre proliferasyonunu, interlökin-2 (IL2) sentezini, sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu ve lenfosit migrasyonunu inhibe etmektedir. Yüksek doz DF immünosupresif etkiye sahiptir. DF, PGE<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> salınımını arttırmaktadır. DF'in immunosupresif etkisinde de PGI<sub>2</sub> ve PGE<sub>2</sub> sentezini indüklemeye kapasitesinin etkili olduğu; bu şekilde T hücre yanıtını, B hücreleri tarafından antikor üretimini ve nötrofil aktivasyonunu inhibe ettiği öne sürülmektedir (Lobel et al. 1989).

DF'in antitrombotik etki ile PGG<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, trombomodulin ve endotelin 1 gibi faktörleri modüle ederek diyabetik retinopatiyi (kan şekeri regülasyonu) yavaşlattığı ortaya konmuştur (Vingolo et al. 1999).

DF'in sitoprotektif etkisi ile ilgili çalışmalar, bu etkinin nötrofil bağımlı olduğunu düşündürmektedir. Nötrofil oksijen patlamasında görülen artmış serbest radikal oluşumunun, DF ile inhibe edildiği görülmüştür. DF'in kalsiyum bağımlı nötrofil aktivasyonunu inhibe ettiği öne sürülmektedir. Aktive edilmiş nötrofillerden köken alan sitotoksik faktörlerin oluşumunu azaltmaktadır (Di Perri et al. 1991).

Bu etken madde, endotel hücreleri koruyarak apoptotik hücre ölümünü kontrol eder. Aynı zamanda, immun efektör hücrelerde anti-inflamatuvar etki gösterirken endotel hücrelerde kemoterapi sonrası uyarılan allojenik sitotoksik T lenfositlerini azaltır (Koehl et al. 2007). Anti-neoplastik potansiyeli vardır ve kemoterapi sırasında kanser hücrelerinin hassaslaştırılmasını sağlar. Bu mekanizma tam olarak anlaşılammıştır, en azından tümör hücrelerinin besin elde etmesini azalttığı bilinmektedir (Mitsiades et al. 2009).

Anjiogenez çok basamaklı olarak gerçekleşen hücresel bir olaydır. Bu durum metastaz gelişiminde önemlidir. Buradaki soru, endoteli koruyan etken madde olan DF'in tümör anjiogenezinde neden antagonist etki yaptığıdır. Oligonükleotit temelli ilaçlar anjiogenez inhibisyonunda başarılıdırlar. DF, adezyon ve migrasyonun azaltılmasında görevlidir. İleride kansere karşı kullanılabilceği düşünülmektedir (Koehl et al. 2007).

DF'in yukarıda belirtilen etkileri nedeniyle periferel oklüziv hastalıkları (POVH), derin ven trombozu (DVT) ve strok tedavisinde kullanımı mümkündür (Ulutin et al. 1990).

## **2.5. ANKAFERD KAN DURDURUCU- ANKAFERD BLOOD STOPPER (ABS)**

T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan ruhsatlı ilk Türk tıbbi ürünü olan ABS, vücut dışı yaralanmalar, travmatik kesikler, diş operasyonları ve spontan ya da cerrahi girişimler sonrası oluşan minor ve major kanamaların durdurulmasında kullanılmaktadır. ABS, etki mekanizmasının ortaya çıkarılmasını takiben Herbal PDR literatürü ve folklorik kullanımı yanı sıra stabilite, toksisite, sterilite, iritabilite testlerinden başarıyla geçmesi sonrası, T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü tarafından eksternal kanamaların

kontrolünde kullanılmak üzere ara ürün olarak ruhsatlandırılmıştır. Acil Servis ve 112 ilk yardım ambulanslarında da rutin kullanımı başlamıştır. Uygulanması kolay, antibakteriyel özelliğe sahip, hızlı etki gösteren, normal dokuya zarar vermeyen, nöral yapı üzerinde bası etkisi oluşturmayan, kanama ve pıhtılaşma bozukluğu olan vakalarda etkin, iyi bir hemostatik ajanın sahip olması gereken özellikleri taşıyan bir bitkisel karışımdır. Direkt uygulama için ampul, sprey, tampon gibi çeşitli formları bulunmaktadır.

ABS, ülkemizde dental uygulamalarda Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmaktadır. Kanama bozuklukları yada antikoagülan tedavi nedeniyle diş çekimi operasyonlarında problem yaşanan olgularda, lokal kanamayı kontrol etmeye yönelik diş kavitesine uygulanarak, akut dönemde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Baykul et al. 2010).

### **2.5.1. Ankaferd İsminin Kökeni**

**Anka:** Mitolojik bir dağ olan Kafdağı'nda yaşadığına inanılan, doğu mitolojileri ve efsanelerinde Zümrüdü Anka Kuşu, Batı kültürlerinde ise Phoenix adlarıyla anılan bir kuştur. Adı uzun boynu veya boynundaki beyaz halkadan gelmektedir. Her hayvandan bir iz taşıyan, rengarenk tüylü, yüzü insana benzeyen mitolojik bir hayvandır. Ömrünün sonuna gelince bahar ağacı yapraklarından yaptığı yuvasını ateşe verip kendini yakarak, yeniden dünyaya gelir. Batı'da M.Ö.V.yy'dan itibaren mitolojik anlatımları başlayan Anka kuşu Hristiyanlıkta yeniden dirilmenin sembollerinden biri olarak görülmüştür. **Ferd:** Osmanlıcada, tek, bir, yekta, eşi benzeri olmayan anlamına gelmektedir (<http://www.ankaferd.com/ankaferd.php>, 2011).

### **2.5.2. Ankaferd'in İçeriği**

ABS, geleneksel olarak Türk tıbbında kullanılan beş bitkisel içeriğin çeşitli oranlarda kullanılması suretiyle hazırlanan hemostatik bir ajandır. Aynı zamanda, damar endoteli, kan hücreleri, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri olan bitkisel bir karışımdır. Bitkilerden alınan ekstraktların standardize karışımından oluşan stabil ve steril bir üründür: 100 ml'lik ekstraktta 7 g *Glycrrhiza glabra* (Meyan), 8 g *Vitis vinifera*

(Asma), 7 g *Alpinia officinarum* (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, 5 g *Thymus vulgaris* (Kekik) kurutulmuş ot ekstresi ve 6 g *Urtica dioica* (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi içerir (Haznedaroglu 1998; Goker et al. 2008; Kosar et al. 2009) . Buradaki her bir bitkinin etkisi farklıdır.

***Glycyrrhiza glabra* (Meyan):** Bitkinin tıbbi olarak kullanılan kısımları soyulmamış kurutulmuş kök ve saçakları, soyulmuş kurutulmuş kökler ve köklü rizomlarıdır (Thomson Healthcare Inc. 2007). Meyan içerisindeki bazı bileşiklerin metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* türleri üzerinde antibakteriyel etkileri olduğu, meyan yapraklarının antifungal ve antibakteriyel etkili bileşikler içerdiği, köklerinden elde edilen ekstrenin antiprotozoal bir ilaç için temel yapı teşkil ettiği bildirilmiştir (Christensen et al. 1994; Vaya et al. 1997; Nagumo et al. 1999; van Rossum et al. 1999; Hatano et al. 2000). Meyanın aspirinle indüklenen gastrik ülserde koruyucu etkileri olduğu ve gastrik mukozadan mukus sekresyonu oranını arttırdığı ve antiülser etki için potansiyel bir mediyatör olan endojen sekretin salınımını sağladığı bildirilmiştir (Shiratori et al. 1986; Dehpour et al. 1994). Hepatit A virüsü ile enfekte olmuş insan hepatoma hücrelerinde viral antijen ekspresyonunu baskılayarak ve hücre membran akışkanlığını azaltarak virüsün penetre olmasını önlemektedir (van Rossum et al. 1998). Virüs hücre bağlanmasını interfere ederek replikasyonu inhibe ederek ve dev hücre formasyonunu baskılayarak HIV virüsü üzerinde antiviral etki göstermektedir (Nakashima et al. 1987). Meyan köklerinden elde edilen ekstraktın in vitro hücre dizilerinde anjiogenezi inhibe ettiği, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimini azalttığı ve sitokinlerle indüklenen neovaskülarizasyonu azalttığı bilinmektedir (Sheela et al. 2006). SARS hastalığına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Cinatl et al. 2003). Öte yandan meyan kökünün kan basıncını yükselttiği saptanmıştır (van Rossum et al. 1998).

***Vitis vinifera* (Asma):** Bitkinin tıbbi olarak kullanılan kısmı yapraklar, meyve ve meyvenin suyudur. Üzüm çekirdeği ekstresi bazı kanser hücrelerine karşı sitotoksosite gösterirken, intestinal adenom oluşumunu engelleyici olduğu da gösterilmiştir (Arii et al. 1998; Ye et al. 1999). Plazma lipitleri üzerine yararlı etkiler yaptığı, plazma trigliserid, LDL kolesterol ve apolipoprotein B ve E düzeylerini azalttığı ve kardiyoprotektif özellikte olduğu bildirilmektedir (Shiratori et al. 1986; Yamakoshi et al. 1999; Zern et al. 2005). *Vitis vinifera* yaprakları üzerindeki aşılama deneyleri büyüyen patojenlere karşı direnç

geliştirmiştir ve antitümöral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bileşiğin güçlü antioksidan etkilerine bağlı olan antitümör destekleyici aktivitesi deneysel hayvan modellerinde de gösterilmiştir (Zhao et al. 1999; Barka et al. 2000). Üzüm çekirdeği ekstresinin karaciğer hücrelerinin apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü ve DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı ve bacaklardaki venöz problemler gibi semptomları azalttığı bildirilmiştir (Bombardelli et al. 1995; Ray et al. 1999).

***Alphina officinarum* (Havlıcan):** Tıbbi olarak kullanılan kısmı rizomudur. LPS ile aktive edilmiş fare peritoneal makrofajında nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği saptanmıştır (Matsuda et al. 2006). Bitkinin antispazmotik ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Thomson Healthcare Inc. 2007).

***Urtica dioica* (Isırgan):** Tıbbi kısmı, taze, kurutulmuş, çiçek açmış bitki ve kökleridir. Isırgan yaprağı ekstresi osteoartrit, romatoid artrit ve gut ile ilişkili eklem ağrısında diklofenak ile sinerjistik etki göstermektedir (Chrubasik S 1997). Isırgan kökünün idrar hacminde artış, maksimum üriner akım artışı ve rezidüel idrar azalmasına neden olduğu, sıvı kök ekstresinin benign prostat hiperplazisi tedavisinde çok etkili olduğu bulunmuştur (Hryb et al. 1995). Planlanmış tedavi edici dozların doğru uygulanması halinde hiçbir sağlık riski bulunmamakla beraber, hafif gastrointestinal şikayetler ve seyrek olarak azalmış idrar oluşumu ve nadiren ödem bildirilmiştir (Schneider HJ 1995). Antifungal ve antiviral etkiler göstermektedir (Bombardelli et al. 1997; Lichius et al. 1997). *Urtica dioica*, endotelial hipotansif tepkiler üretebilir. Bunu NO'nun serbest bırakılması, potasyum kanallarının açılması ve negatif inotropik hareketin sağlanmasıyla meydana gelen damar vasodilatör etki aracılığı ile yapar (Testai et al. 2002).

***Thymus vulgaris* (Kekik):** Tıbbi kısmı, taze, çiçek açmış bitki, kurutulmuş yapraklar ve dilimlenmiş kuru yapraklardan ekstre edilen yağdır. Antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiprotozoan özelliklere sahiptir (Thomson Healthcare Inc. 2007). *Thymus vulgaris* yaprakları, bilinen antioksidanlar olan alfa-tokoferol ve butile hidroksitoluenle kıyaslanabilir düzeyde antioksidan etki göstermektedir. Aterosklerozla ilişkili lipid peroksidasyonu gibi canlıdaki oksidatif hasarı azaltacak anti-oksidan etki gösterir. Ancak bu etkisini kaybetmemesi için bünyesindeki uçucu yağın ısı işlemler vb. gibi etmenlere maruz kalmaması gerekmektedir (Lee SJ 2007; Rana et al. 2008).

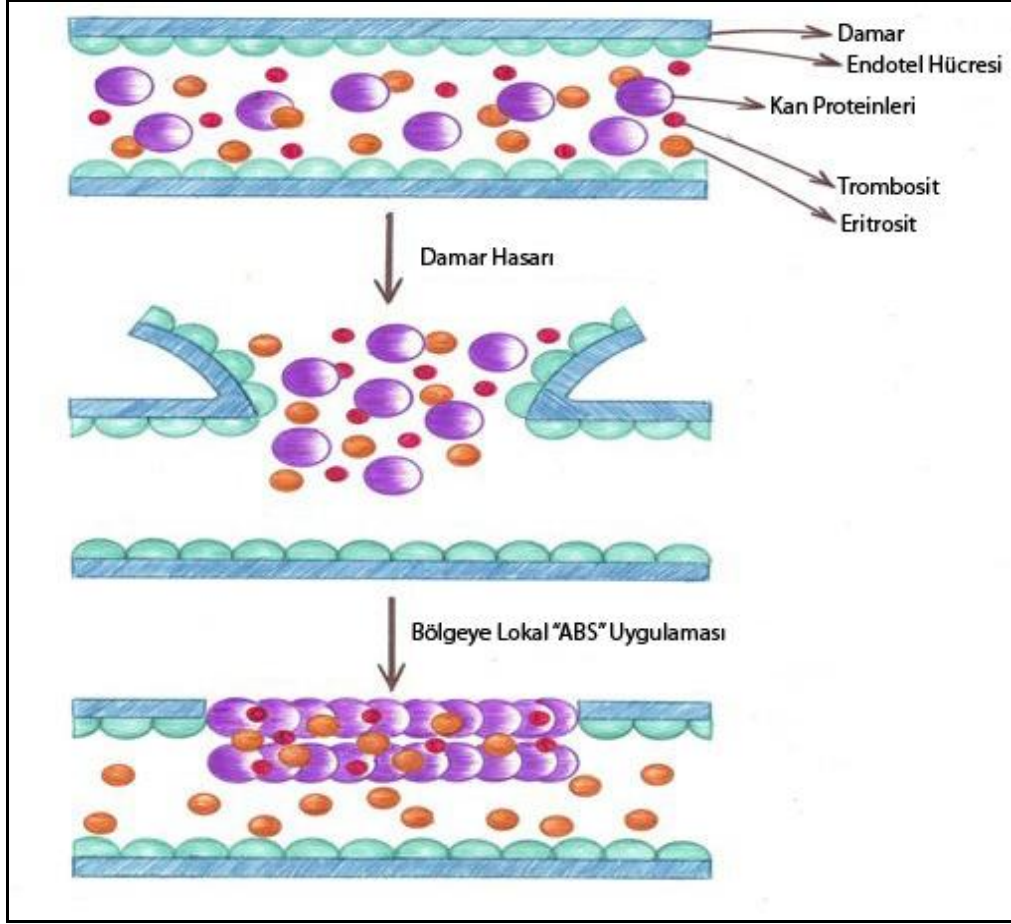


Bu bitkilerin tümünün tek başına endotel, kanın şekilli elemanları ve yeni damar oluşumu üzerinde etkileri olduğu gibi, birlikte kullanıldıklarında da vasküler dinamikler ve mediatörler üzerinde hemostaza katkıda bulunabilecek etkileri vardır. ABS'nin içeriğindeki bu bitkilerin birleşiminin pıhtılaşma faktörlerinin etkisini bozmadan doku oksijenasyonunu ve fizyolojik hemostatik süreci sağladığı anlaşılmıştır (Goker et al. 2008).

### **2.5.3. Ankaferd'in Etki Mekanizması**

ABS, fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ve eritrositlerin plazma ve serumda "protein ağı" meydana getirmesi suretiyle etkisini göstermektedir. Etkisi çok hızlı başlamaktadır ve ABS'nin seruma eklenmesi ile tıkaç etkisi sağlayan en kapsüle protein ağı formasyonu bir saniyeden daha kısa sürede meydana gelmektedir. ABS'nin etkilerine bağlı olarak oluşan ağın koagülasyon ve hemostaz adına muhtemel reaksiyonları durdurma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.7).

ABS pıhtılaşma faktörleri dışında tüm fizyolojik süreci etkilemektedir. Bu yüzden ABS hem normal hemostaz parametlerine sahip bireylerde hem de primer hemostazı bozuk hastalarda ve/veya yaygın damar içi koagülasyonu olan hastalarda (faktör eksiklikleri, DIC vb.) etkili olmaktadır. Pıhtılaşma faktörleri ABS'den etkilenmese de, protein agregasyonu sayesinde anti-hemorajik süreç başlamaktadır (Reinhart et al. 1995; Goker et al. 2008).



**Şekil 2.7.** ABS'nin etki mekanizması

Eritrosit agregasyonu, yüksek molekül ağırlıklı plazma proteinlerinin (örneğin; fibrinojen ve immunglobulinler) tespitiyle saptanmaktadır (Reinhart et al. 1995). ABS'nin hemostatik etkisini oluşturan temel mekanizma yapılan bir laboratuvar çalışmasıyla ortaya konmuştur. Bu çalışmada, ABS, plazma ve serum icinde çok hızlı (1 saniyeden kısa; saliseler düzeyinde) protein ağı oluşumuna sebep olmuştur. Plazma ve serumdaki ağ oluşumları, ABS'nin fibrinojen ve diğer proteinleri ağ oluşturmak için çöktürdüğüne işaret etmektedir. Plazmaya ABS eklenmesini takiben plazma fibrinojen aktivitesi ve fibrinojen antijeninde belirgin bir düşüş olmakta ve buna bağlı trombin zamanı (TT) da uzamaktadır. Fibrinojen azaldıkça eritrosit agregasyonu artar. Böylece ABS, fibrinojen–eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır. Tıkaç etkisi gösteren bu protein ağı oluşumu sırasında ayrıca plazmada; total protein, albumin ve globulin seviyelerinin de anlamlı oranda düştüğü görülmüştür (Goker et al. 2008). Ancak, yapılan biyokimyasal ölçümlerde, pıhtılaşma faktörleri üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXIII, ağ oluşumdan

etkilenmediği için muhtemel kanamayı durdurma sürecinin ABS'nin fibrinojen ve diğer protein moleküllerinin aglütinasyonunu sağlayarak bir ağ oluşturması yoluyla olduğu düşünülmektedir. Eritrositler ve plateletler bir araya gelerek ağ oluşumuna katılmışlardır. Yani ABS'nin temel etki mekanizması, eritrosit yığınları için odak noktası olan protein ağı oluşumuna neden olmasıdır. Bu gözlemlere dayanarak ABS ağının herhangi bir pıhtılaştırıcı faktörü eşit olmadan etkileyerek tüm fizyolojik hemostaz sürecini kapsadığı hipotezi geliştirilebilir. ABS'nin varlığında kırmızı kan hücreleri eritrosit blokları oluşturmak için bir araya gelmişlerdir. Bu andan sonra normal hemostatik elemanlar ağ oluşumu süresince ayrılmışlar, muhtemel kanama durma süreci özellikle protein aglütinasyonuna bağlı olarak yürütülmüştür. Belli bölgede ABS'ye maruz kalınması doku oksijenasyonu ile birlikte herhangi bir pıhtılaştırıcı faktörünü devreye sokmadan fizyolojik süreci sağlamaktadır. Bu benzersiz mekanizma ABS'ye diğer hemostatik etkili aktif bitki özlerine göre avantaj sağlamaktadır. Bu süreçte doku onarımına izin verecek düzeyde kan durdurulması işlemi temel olarak protein eritrosit etkileşimi ile bağlantılıdır. Kan hücreleri de bu ağa eşlik ederler. ABS ağında fizyolojik hemostatik işlem doku faktörü-bağlantılı kan pıhtılaşımı yapısından bağımsız olarak, bu sistemi bozmadan gelişir (Akar et al. 2008; Goker et al. 2008; Aydin 2009).

ABS ile yapılan ilk in vivo çalışmada, kedi ve köpek yaralarında kanamanın kontrolü ve durdurulmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, alerjik ve kimyasal reaksiyon oluşturmamakla beraber güvenle kullanılabilir bir madde olduğu da ortaya konmuştur (Bilgili 2006).

ABS klinikte ilk olarak, hemofili A tanısıyla takip edilen ve sünnet sonrası sızıntı tarzında kanaması olup, yüksek dozda faktör VIII tedavisine yanıt vermeyen ve ilave olarak alınan önlemlere rağmen kanaması devam eden bir hastada denenmiştir. ABS'nin kanayan yere yüzeysel olarak sürülmesini takiben birkaç dakika içinde kanamanın tamamen durduğu görülmüştür (Oner et al.).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, gruplardan birine serebral doku üstüne 1 ml serum fizyolojik ve diğerine 1 ml ABS uygulanmış ve gruplar değerlendirildiğinde her iki grupta

da belirgin ödem, nöronal dejenerasyon, inflamatuvar hücre olmadığı ve nöron sayılarında normale göre belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu, AB'nin beyin cerrahisi ameliyatlarında hemostaz için kullanılabileceği düşünülmektedir (Ulaş 2009).

Domuzda arter, ven, karaciğer, yüzeysel ve derin cilt kesisi kanamalarında etkin hemostaz sağlamaktadır. Ayrıca, farklı preparat ve uygulama şekillerinin de etkisi araştırılmıştır. Sprey, ampul ve tampon şeklinde kullanımının cilt yaralanmalarında güçlü hemostatik etki gösterdiği, ancak damar yaralanmalarında tampon formunun daha etkili olduğu saptanmıştır (Bilgili et al. 2009).

ABS ürününün kısa dönem hematolojik ve biyokimyasal güvenliliği oral yoldan sistemik uygulama ile tavşanlarda gösterilmiştir (Bilgili et al.).

Topikal ABS kullanımı, aspirin, warfarin ve enoksaparin kullanılarak antikoagulan tedavi uygulanan ratlarda, kanama süresini ve miktarını anlamlı derecede azaltmıştır. Böylelikle ABS'nin *in vivo* ortamda da etkili olduğu ortaya konmuştur (Cipil et al. 2009; Kosar et al. 2009).

Böbrek dokusu üzerindeki hemostatik etkinliği de araştırılmıştır. Bu çalışmada, ABS uygulaması sonucunda histopatolojik olarak eritrosit agregasyonu görülmüştür. Bu da ABS'nin hemostatik mekanizmasının böbrekte de oluştuğunu desteklemektedir. ABS'nin, renal travma sonrası gelişen kanama üzerindeki etkinliği de araştırılmıştır. ABS uygulanmasıyla, böbrek dokusunda, histopatolojik olarak dev hücre reaksiyonu, akut inflamasyon, fibrozis, adezyon, tiroidizasyon, fibroblast aktivasyonu, kalsifikasyon ve glomerüler nekroz saptanmıştır. Bu bulgular ABS'nin renal doku üzerindeki pozitif etkileri arasındadır. Ayrıca, eritrosit agregasyonu, mikrovasküler proliferasyon gibi böbrek histopatolojisinde olumlu değişiklikler de gözlenmiştir (Huri et al. 2009).

Glanzman trombasteni, kalıtsal trombositopeni, afibrinojemi ve vWF eksikliğine bağlı trombosit adezyon bozukluğu ile birlikte FVIII düzeyleri düşük olan olgularda, standart yöntemlerle kontrol altına alınamamış kritik kanamaların topikal kontrolünde ABS kullanımıyla başarılı sonuçlar alındığı ve güvenle kullanılabilceğini gösteren çalışmalar da yapılmıştır (Çalışkan et al. 2008; Çalışkan et al. 2008; Çalışkan et al. 2008; Turgut et al. 2008; Baykul et al.).

Aynı zamanda, ABS'in in vitro antibakteriyel aktivitesi de Gram negatif bakteriler için bakteriostatik etkisinin saptanmasıyla ortaya konmuştur (Akkoç et al. 2008) ABS'nin antagonistik aktivitesi, insan ve gıdalar için patojen Gram pozitif ve Gram negatif 26 bakteri için değerlendirilmiş, tüm patojenler için efektif bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bir gıda koruyucusu olarak kullanılan Nisin isimli bakteriyosinin gram negatif bakterilerin bir çoğunda inaktif olduğu görülmüştür. Buna karşın ABS, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler için çok değişken sıcaklık koşullarında bile stabil kalmış ve Nisin ile karşılaştırıldığında yüksek derecede inhibitör etki göstermiştir (Akkoç et al. 2009). ABS'nin aralarında insan patojeni ve gıda bozulma etmeni bakterilerin de bulunduğu, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek inhibitör aktivite gösterdiği, antifungal etkinliğinin olduğu, antimikrobiyal aktivitesinden enfeksiyon hastalıkları ile hastane enfeksiyonlarının tedavisinde ve gıdaların korunmasında faydalanabileceği de yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Berктаş et al. 2008; Akkoç et al. 2009; Saribas et al. 2010). ABS'nin çok sayıda patojen için antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Bu patojenlere *A.baumannii*, *E.coli*, *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, MRSA, methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus*, vancomycin susceptible *Enterococcus* ve vancomycin resistance *Enterococcus* dahildir (Tasdelen Fişgin et al. 2009).

Üst gastrointestinal sistem kanamasında endoskopik olarak biyopsi alınan bir olguda biyopsi bölgesine topikal ABS uygulamasıyla da ani kanama kontrolü sağlanmıştır (Kurt et al. 2008).

Nazal cerrahi sırasında ve sonrasında normal tampon uygulamasına oranla ABS emdirilmiş tamponların kanama miktarı ve sıklığını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı ve yara iyileşmesinin daha iyi olduğu saptanmıştır (Karabulut H 2008).

Koroner arter bypass greft cerrahisinde kanama alanına ABS çözeltisi püskürtülmesi suretiyle, tüm olgularda, mediastinal yapılardan kanamanın durduğu, şiddetli kanama nedeniyle cerrahi revizyon gereksinimi olmadığı ve mediasten kanamasının ciddi bir sorun teşkil ettiği açık kalp ameliyatlarında ABS'nin kanama kontrolü için umut vadeden bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır (Dogan 2008).

Lokal kanaması olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalarında da, ABS'in hemostaz üzerine etkinliği ve yan etkileri araştırılmıştır. Diş eti, hemoroid kanamaları ve intravenöz enjeksiyon bölgesindeki cilt kanamalarında lokal kullanımıyla kanamayı kontrol altına aldığı, sistemik yan etki, ilacı tolere edememe ve irritasyon, ödem, kızarıklık kasıntı, döküntü benzeri lokal yan etkilerin görülmediği bildirilmiştir (Bodur 2008).

ABS uygulamasının antihemorajik ve hemostatik etkinliği, kemik iliği transplantasyonu yapılmış bir olgunun epistaksis kontrolünde de emniyetle kullanılabilmiştir ve tekrarlayan epistaksis ataklarında nazal tamponla birlikte ABS uygulanmasının kanama tekrarını önlediği bildirilmiştir (Göker H 2008; Kurt et al. 2009).

ABS'nin erken dönem kemik doku iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni kemik doku yapımını anlamlı derecede arttırdığı, iltihap ve nekroz oranlarını anlamlı derecede düşürdüğü, sonuç olarak ABS'nin erken dönem kemik doku iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Isler et al. 2010).

ABS'nin fonksiyonel proteomik analizi ile koagülasyon üzerindeki etki mekanizmasını aydınlatmak amacı ile yapılan bir çalışmada, ABS içeriğindeki bitkisel proteinler tanımlanmıştır. Bunlar; NADP-bağımlı malik enzim, Ribuloz bisfosfatkarboksilaz büyük zinciri, Maturaz K, ATP sentaz beta altünitesi, ATP sentaz alfa altünitesi, Chalcon flavonon isomeraz-1, Chalcon flavonon izomeraz 2, Aktin-depolimerizasyon faktörü'dür.

Ayrıca ABS kapsamında koagülasyon için oldukça önemli çeşitli insan proteini benzeri proteinler de tanımlanmıştır. Bu proteinler ise, ATP sentaz, Musin16 (CD164-sialomüsin-benzer-2 protein), Helezonal kangal taşıyan protein-141, Hipotetik protein LOC283638 izoform 1, Hipotetik protein LOC283638 izoform 2, Dinaktin 5, Kompleks 1 intermedia ilişkili protein 30, Mitokondrial protein, NADH dehidrogenaz (Ubiquinone) 1 alfa altkompleksi, TP sentaz H<sup>+</sup> taşıyıcı protein, Mitokondrial aktin bağlayıcı protein 1, LIM kangal ve aktin bağlayıcı alt ünite 1 izoform a, LIM kangal ve aktin bağlayıcı alt ünite 1 izoform b, Spektrin alfa non eritrotik 1, Prolaktin salgılatırıcı hormon reseptörü, Utrophin, tet onkogen aile üyesi 2 izoform b, Protein fosfotaz 1 regulatory altünit 12A, NIMA-ilişkili kinaz, ATP-bağlayıcı protein C12, Homo sapiens malik enzim 1, Mitokondrial NADP (+) bağımlı malik enzim 3, ME2 protein, Nükleer faktör 1, Abihidrolaz kangal taşıyıcı protein, SUMO-protein ligaz PIAS2, Alfa-1,2-glukosiltransferaz ALG10-A, Kofilin, 18 kDa fosfoprotein, p18, Aktin-depolimerizan faktör, ADF, Twinfilin-1, Ankirin tekrarlayan ve FYVE kangalı içeren protein 1, Usherin öncüsü, Urotensin II reseptör'dür. Proteomik analizler sonucu elde edilen proteinler ABS'nin hemostatik, yara iyileştirme ve anti-inflamatuvar etkilerinin araştırılmasına ışık tutacak ve açıklayıcı olacak niteliktedir (Demiralp DO 2010).

ABS'nin endotel üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, HUVEC üzerindeki olası transkripsiyon faktör değişikliklerinin incelemesinin amaçlandığı diğer bir çalışmada, transkripsiyon faktörleri AP2, AR, CRE/ATF1, CREB, E2F1-5, E2F6, EGR, GATA, HNF-1, ISRE, Myc-Max, NF-1, NFkB, p53, PPAR, SMAD 2/3, SP1, TRE/AP1, YY1 düzeyleri incelenmiştir. Sonuçta HUVEC'lere ABS uygulaması sırasında mikroskopik gözlem olarak hücrelerin plastik yüzeyden kalkıp birbirlerine yapıştığı gözlenmiştir. Düşük doz uygulaması sırasında (5 µL) 15 dakika muamele edildiğinde bütün transkripsiyon faktörlerinin en yüksek seviyelerine çıktığı daha yüksek dozda ise (50 µL) çok etkilenmediği gözlenmiştir. Eritrosit süspansiyonuna ABS uygulaması sırasında yine doz-bağımlı olarak hücrelerin birbirlerine yapıştıkları gözlenmiş olup, değişik dozlarda oluşan hücre birlikteliklerinin (pellet) büyüklükleri de farklı olmuştur. Eritrosit membran izolasyonundan sonra denatüre edilmesine rağmen, protein komplekslerinin dağılmadan kaldığı gözlenmiştir. Oluşan protein kompleksinin ısı ve deterjanlara dayanıklı olduğu söylenebilir. Sonuçlar göz önüne alındığında, ABS'nin hücreler arasında inanılmaz hızlı

kompleks oluşturma hızı ile kanamaları durdurmada son derece etkili olduğu teyit edilmiş, kompleks içinde oluşan bağın son derece sağlam olduğu sonucuna varılmıştır. Düşük dozlarda hücrelerin sadece dışında değil içinde de çok etkili olduğu hücre içinde birçok mekanizmayı etkileyebileceği düşünölmektedir (Özel Demiralp D 2008; Özel Demiralp D 2008; Yılmaz E 2010).

ABS'nin hücrenel ve vasküler proliferasyon üzerindeki kombine etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda ise, doku beslenmesini arttırdığı, cilt fleplerinde nekroz oranını anlamlı biçimde azalttığı bildirilmiştir (Karasoy Yesilada A 2008).

Antineoplastik etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, in vitro ortamda osteosarkom hücrelerinin ve insan kolon kanseri hücrelerinin invazyonunda doza bağlı inhibisyon ve canlılıklarında ise azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir (Göker H 2008; Göker H 2008). Mezenkimal kök hücre gelişimi üzerinde ise, ortamda yoğun agregasyon nedeniyle költür vasatında negatif yönde etki ettiği tespit edilmiştir (Kılıç E 2008).



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Hücre Kültürü**

Biyolojik özellikleri değerlendirmenin *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki temel yöntemi bulunmaktadır. *In vitro* deneyler, *in vivo* deneylerin aksine, deney faktörlerinin kontrol edilebilir olması avantajına sahiptirler. Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ile *in vitro* olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir (Freshney 1986). Hücre kültürü çalışmaları, hücre metabolizmasının organizmanın ölümünden sonra bir süre daha devam ettiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Hücre ve doku kültürlerinin kullanılması ile son yıllarda moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi, teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Davis 1996).

##### **3.1.1.1. Hücre kültürü tipleri**

Primer Hücre Kültürleri: Orijinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşımaktadır. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme subkültür adı verilmektedir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluşturmaktadırlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişmek şartı ile farklı oranlarda subkültüre izin vermektedirler. Ancak bu hücrelerin deneysel ortamlarda çoğalmaları sınırlıdır (Davis 1996; Hanks et al. 1996).

Devamlı Hücre Kültürleri: Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Herhangi bir kültürün, devamlı doku kültürü olabilmesi için en az 70 kere subkültürünün olması gerekmektedir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar (Davis 1996).

Devamlı hücre hatları, standart kültür örnekleri olarak embriyonik veya kanserli dokulardan kodlanmış ve kullanıma sunulmuştur.

Diploid Hücre Kültürleri: Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilmektedirler. Ancak bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini % 85 oranında korumaktadırlar. Diploid kültürlerde, bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilmektedir. Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde primer hücrelerin devamlı hücrelere oranla daha etkili oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevaplar arasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Devamlı hücre kültürleri genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonu daha kolaydır (Feigal et al. 1985; Schmalz 1994).

### 3.1.1.2. Tarihçe

Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllara dek uzanmaktadır. İlk olarak 1866 yılında *in vitro* doku kültürü çalışılarak amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmesi başarılmış; ardından Wilhelm Roux 1885 yılında, tavuk embriyosu sinir plaklarının birkaç gün canlı kalabilmesini sağlamış; 1887 yılında Arnold, kurbağalara kemik iliği fragmanları implante etmiş; 1898'de Ljungren, insan derisini *in vitro* koşullarda bir-iki gün yaşatabilmiş ve 1903 yılında Jolly, *in vitro* koşullarda hücre canlılığı ve bölünmesi ile ilgili birtakım çalışmalar yaparak semenderden elde ettiği lökositleri bir aydan fazla süreyle canlı tutmayı başarabilmiştir (Paul 1970). Bu dönemlerde henüz hücre kültürü vasatlarıyla beraber antibiyotikler kullanılmadığı için, dokuların bu şekilde canlı kalmalarını sağlamak oldukça büyük başarı kabul edilmektedir. 1910–1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde büyük adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve gerçek anlamda ilk doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1926 yılında çalışmalar hücre üretme vasatları üzerine yoğunlaşmış ve analitik yöntemlerle hücre kültür vasatları hazırlanmıştır. 1952'de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü besiyerleri hazırlanmıştır (Freshney 1986). 1960'lı yıllarda hücre füzyonu çalışmaları ile monoklonal antikor üretimine öncülük edilmiş ve ilk olarak 1961 yılında Barski ve arkadaşları *in vitro* koşullarda somatik hücre hibridlerini elde etmişlerdir (Hart 1983). 1979 yılında Green ve

arkadaşları, epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır (Green et al. 1979). 1980'li yıllarda, endotelial hücrelerden kapiller damarların oluşturulmasına çalışılmış ve 1989 yılında, hücre kültürü teknolojisi, homograft yapımı ve rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır (Davis 1996).

Son 20 yıldır hücre kültürü, yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak, dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir. Yalnızca akademik araştırmalarda değil, fertilizasyon, yapay organ, medikal ve toksikoloji çalışmalarında hayvanların yerini alması yolunda yeni uygulamalar geliştirilmiştir. Hücre kültürlerinin günümüzdeki yaygın kullanım alanları mevcuttur. Viral aşı üretimi ve viral teşhis amaçlı, monoklonal antikorlar ile antikor üretimi, interferon üretimi, enzim üretimi, insekt aşı üretimi, interleükin üretimi, hormon üretimi, büyüme faktörlerinin üretimi, somatik gen tedavisi, tümör aşılı ve canlı hücrelerin greft amaçlı kullanılması (Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması, kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması, Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması, organizma dışında hücre modifikasyonu) amaçlarıyla kullanılmaktadırlar (Poot A 1992).

Hücreler günümüzde rutin olarak kültüre edilmektedirler. Kültür ortamında hücrelerin yaşaması, beslenmesi ve çoğalması için bazı şartların yerine getirilmesi gerekmektedir. *In vitro* hücre kültürü deneylerinde, hücrelerin yaşatılması için açık ya da kapalı sistem inkübatörleri kullanılmaktadır. Açık sistemde; kültür ortamı ile inkübatör içerisindeki hava ilişkidir. Bu tür inkübatörlerde ortama, sisteme bağlı olan bir tüpten CO<sub>2</sub> gelmekte, hücre ve dokuların yaşatılması için, genellikle, 37°C'de , % 5 CO<sub>2</sub>'li ve % 95 nemli ortam sağlanmaktadır. Uzun süreli kültürlerde, mutlaka açık sistem kullanılmalı ve birkaç gün ara ile kültür besiyeri yenilenmelidir. Bu işlem metabolizma artıklarının uzaklaştırılıp yeni, geliştirici ve besleyici faktörlerin sağlanması için yapılmaktadır. Hücre metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması için kullanılan besiyerlerinde, bazı belli maddelerin varlığı gerekmektedir. Hücre bu maddeleri kendileri sentezleyememekte ve bu gerekli maddeler ortama ilave edilen besiyerlerinden sağlanmaktadır. Besiyeri içerisinde; enerji kaynağı olarak glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır. Hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltılabilmeleri için

en uygun ortam, *in vivo* ortamlarına en yakın olan ortamdır (Sharp 1977; Freshney 1986; Davis 1996).

Hücreler, çoğalıp mevcut yüzeyi doldurduklarında replikasyon durmakta ve farklılaşma fazına girmektedir. Eğer böyle hücreler yeniden süspanse edilir (örneğin tripsinizasyon ile) ve dilüe edilirse, yeniden büyümeye başlamakta ve bir günlük yavaşlama periyodunu takiben, yaklaşık 24 saatlik bir sürede hücre sayısı iki katına çıkmaktadır. Bu süre hücre kültürlerinin yaşına ve besiyerindeki serumun miktarına bağlı olarak değişmektedir (Freshney 1986).

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanınmaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi, deneylerde kullanılacak hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir (Browne 1988; Schmalz 1997). Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur. Hücre kültürüyle, örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelmektedirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da çalışan kişilerin homojenitesi ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır. Hücre kültürleri ekonomiktir. *In vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak % 10'una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90'lara çıkabilmektedir. Hücre kültürleri ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu daha kolay hale gelmiştir (Freshney 1986).

Tüm bu avantajların yanı sıra, dezavantajları da mevcuttur. Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve

bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir. Deneyim çok önemli bir faktördür. *İn vitro* çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirmektedir. Hücre kültürleri, *in vivo* yöntemlere oranla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (Freshney 1986; Kang et al. 1993; Davis 1996).

### 3.2. Yöntem

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Laboratuvarında yapılmıştır. ABS ve DF'in farklı zaman dilimlerindeki farklı konsantrasyonlarının EPCR, PAI-1 ve PAR1 ekspresyonları üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak ve etki mekanizmasını belirlemek üzere ticari olarak alınan HUVEC hattı kullanılmıştır. Hücreler 6 cm. petri dish'lerde 5'er ml M199 besiyeri içerisinde 4 pasajın ardından geliştirildikten sonra, petri alanını %80 oranında kapladıklarında ABS ve DF'e maruz bırakılmışlardır. HUVEC'lere 10 µl (toplam hacmin 1/50'si kadar) ve 100 µl (toplam hacmin 1/500'ü kadar) konsantrasyonlarda ABS 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saat (s)'lik sürelerde uygulanmıştır. Ayrıca 10 µg/ml LPS (Sigma LPS from E.coli O26:B6 – 1mg, Almanya) ile 1 saatlik muamelenin ardından hücreler 10 µl ve 100 µl konsantrasyonlarda ABS'ye yine 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 24 saatlik süreler boyunca maruz bırakılmışlardır. Yani, LPS varlığında ve yokluğunda ABS ile muamele edilmişlerdir. Ayrıca dört farklı konsantrasyonda (12.5 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 800µg/ml) DF, beş farklı sürede (1 s, 6s, 24s, 48s ve 72s) hücre hattına uygulanmıştır (Falanga, Vignoli et al. 2003). Bu işlem de yine ABS'de olduğu gibi 10 µg/ml LPS ile 1 saatlik muamelenin ardından tekrarlanmıştır. Kontrol olarak ise ABS ve DF'le muamele edilmemiş hücre hattı kullanılmıştır. Deneylerin birbirinden bağımsız şekilde üç kez tekrarlanmasının ardından, hücrelerden trizol (Trizol Reagent, Invitrogen, Amerika) yöntemine uygun olarak total RNA izolasyonu yapılmış, 'Roche First Strand cDNA synthesis' kiti kullanılarak revers transkriptaz (RT) reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA) eldesi sağlanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri EPCR, PAI-1 ve PAR1'e özgü primerler ve TaqMan hidroliz problemleri kullanılarak 'Roche Light Cycler' cihazında

ekspresyon analizine tabi tutulmuştur. 'Light Cycler' cihazından alınan floresan sinyal değerleri uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilmiş ve DF ve ABS uygulanan hücrelerdeki gen ekspresyonlarındaki değişimler kontrole kıyasla saptanmıştır.

### **3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması**

#### **3.2.1.1. Endotel Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü**

Çalışmamızda HUVEC hattı kullanılmıştır. Hücreler kriyotüpler içinde saklandıkları sıvı nitrojenden (-196°C) çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve hemen olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar flowa alındı. Hafifçe pipetlenerek hücreler dağıtıldı ve %20 Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, Logan, Utah) ve %1 penisilin/streptomisin (Hyclone, Logan, Utah) içeren M199 (Sigma, Amerika) kültür besiyerinin olduğu steril bir tüpe alındı. 5 dakika süreyle 800 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj bittiğinde tüp tekrar alkolle silinerek laminar flow'a alındı. Santrifüj sonrası üstte kalan medyum çekilip atıldı. Tüp içerisindeki hücreler, içinde %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin olan M-199 besi ortamı ile T25 cm<sup>2</sup> hücre kültürü üretme kabına (flask) alındı. Laminar flow'dan alınarak 37°C'deki % 5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içeren inkübatöre koyuldular. Dondurmayı takiben ilk kez çözülmüş olan hücrelerin besiyerleri ertesi gün değiştirilerek tazelendi. Daha sonraki değiştirmeler ise hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir yapıldı.

#### **3.2.1.2. Tripsinle Hücre Kaldırma ve Pasajlama**

Sayıları oldukça artan, sıkı bağlantılar kurarak birbirlerine iyice yaklaşan ve konfluent olan (çoğaldıkları yüzeyi tam olarak dolduran) hücreler daha rahat çoğalacakları flaska bölünebilir, eğer gerekiyorsa bir kısmı bu numaralı pasajda dondurularak saklanabilir ya da deneye alınabilirler. Hücrelerin kültür kabı yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları ve çoğalmaları/bölünmeleri hücre kültürü mikroskobu (invert mikroskop) (Leica, Almanya) kullanılarak kontrol edildi. Pasajlanarak çoğalmaya devam edecek hücrelerin, tripsin ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılmaları gerekmektedir. Bunun için flasklar önce alkolle silinerek laminar flow'a alındı. Üzerlerindeki medyum alındı ve yerine kültür ortamındaki

hücre metabolizma yan ürünlerinin ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla, divalent katyonları (Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>) içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) (Hyclone, Logan, Utah) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzeyi yıkandı. Bunun nedeni serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisini inhibe etmesidir. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve yerine 4 ml tripsin / EDTA (Sigma, Almanya) solüsyonu ile yıkanarak tripsinize edildi ve 37° C'deki inkübatörde yaklaşık 3–8 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları görüldü. Sonra üzerine 8-10 ml kadar medyum ilave edildi ve yerlerinden kalkmış hücreleri içeren karışım 800 rpm devirde 3 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyum steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan pelletin üzerine medyum konularak pipetlendi ve 37°C sıcaklıkta, % 10 serum ve % 1 antibiyotikli M-199 besi ortamı ile tek hücre halinde olacak şekilde pipetlenerek homojenize edildi ve hücre süspansiyonu 3 adet T25 kültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlandı ve bu şekilde 4 seri pasaj yapıldı.

### **3.2.1.3. Hücrelerin ABS ve DF Muamelesine Hazırlanışı**

Logaritmik üreme fazında olan, kültür kablarında (T75,75 cm<sup>2</sup>) aktif ve yüzeyi % 80-90 oranında kaplamış hücreler, pasajlama işleminde olduğu gibi, kültür kabı yüzeyinden ayrıldı ve serumlu besi ortamı ile hücre süspansiyonu hazırlandı. 6 cm. hücre üretme kapları için istenilen hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra, hücreler % 10 FBS, % 1 antibiyotik içeren M-199 besi ortamı ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 6 cm. hücre üretme kaplarına taksim edildi ve 37°C'lik % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücre üretme kaplarındaki hücrelerin inverted doku kültürü mikroskobunda üremeleri ve ortamın sterilitesi kontrol edildi. Daha sonra kültür ortamındaki M-199 besi ortamı uzaklaştırıldı ve yerine taze medyumdan 5'er ml ilave edildi.

### **3.2.1.4. Hücrelere DF ve ABS Uygulanması**

Deneye hazır haldeki kültür hücrelerinin besiyerleri atılarak, yerine yeni besiyeri eklendikten sonra ABS muamelesi için 12 adet 6 cm.'lik dish hazırlandı. Ardından, 10 µl (toplam hacmin 1/50'si kadar) ve 100 µl (toplam hacmin 1/500'ü kadar)

konsantrasyonlarda ABS 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik sürelerde HUVEC'lere uygulandı. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere bir hücre grubuna da ABS uygulaması yapılmadı. Diğer 12 adet hazırlanmış 6 cm.'lik dishler ise 10 µg/ml LPS ile 1 saat boyunca muamele edildi ve ardından hücreler 10 µl ve 100 µl konsantrasyonlarda ABS'ye 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 24 saatlik süreler boyunca da maruz bırakıldılar.

Diğer bir hücre grubunda ise; 12,5 µg/mL, 50 µg/mL, 200 µg/mL ve 800 µg/mL konsantrasyonlardaki DF aynı şekilde besiyerlerine eklendi. Her bir konsantrasyon için ayrı ayrı 1 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildi. Ayrıca 1 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreleri boyunca 10 µg/ml LPS ile muamelelenin ardından hücreler 12,5 µg/mL, 50 µg/mL, 200 µg/mL ve 800 µg/mL DF'e 1 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik sürelerde maruz bırakıldı. Böylece, LPS verilen hücreler için 1 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat'lik LPS muamelesi kontrol olarak kullanılmıştır.

### **3.2.2. Total RNA Eldesi**

ABS ve DF uygulamasından sonra, hücreler RNA'ları izole edilene kadar -80 °C'de dondurularak saklandı. Hücreler daha sonra tüm hücre RNA'larının izolasyonu işlemine tabi tutuldu. Hücreler medyumlarıyla beraber 6 cm.'lik dishlerden kazınarak her biri ayrı bir 15 ml'lik tüpe alındı ve tüm aşamalarda tüpler buz içerisinde saklandı. RNA izolasyonu için gerekli malzemeler sterilize edildikten sonra kullanıldı. Besi ortamı, tüplerin 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edilmesinin ardından hücrelerden uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler +4 °C'de saklanan PBS ile yıkandıktan sonra, üzerlerine 1 mL Trizol eklendi. Çok kısa bir inkübasyondan sonra, hücreler pipetlenmek suretiyle 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Üzerlerine 200 µL kloroform ilave edildikten sonra, tüpler içerisindeki Trizol-kloroform el ile sallanmak suretiyle karıştırıldı ve tüpler buz içerisine kondu. Daha sonra 14.000 g devirde 15 dk santrifüj edildikten sonra tüplerde üç faz ayrımı görüldü. Üstte bulunan RNA'ya ait olan kısım pipet ile başka bir 1,5 ml'lik tüp içine konarak buza alındı. Daha sonra RNA'ların çöktürülmesi için 500 µL iso-propanol (Sigma, Almanya) eklendi ve 14.000 g devirde 10 dk santrifüj edildi ve çöktürülen RNA'lar beyaz bir nokta halinde tüp dibinde görüldü. İso-propanol uzaklaştırıldıktan sonra, üzerlerine 500 µL 80%'lik etanol eklendi ve 14.000 g devirde 20 dk santrifüj edildi. Etanolün uzaklaştırılmasının



ardından oda sıcaklığında 5 dk beklemek suretiyle tüp içinde kalan alkol uzaklaştırıldı ve RNA pelletinin büyüklüğüne göre sterilize edilmiş su konularak RNA'ların çözülmesi sağlandı. Daha sonra elde edilen RNA'nın saflığı ve miktar tayini (konsatrasyonları-ng/ $\mu$ L) nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılarak 260/280 nm absorpsiyon oranına göre ölçüldü. Bu ölçüm örneklerin 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak analizine dayanır. 260/280 nm oranı yaklaşık 2 olan örnek saf RNA olarak kabul edildi. Absorbans değerleri saptandıktan sonra, mililitredeki RNA miktarı  $\mu$ g/ $\mu$ L olarak hesaplandı.

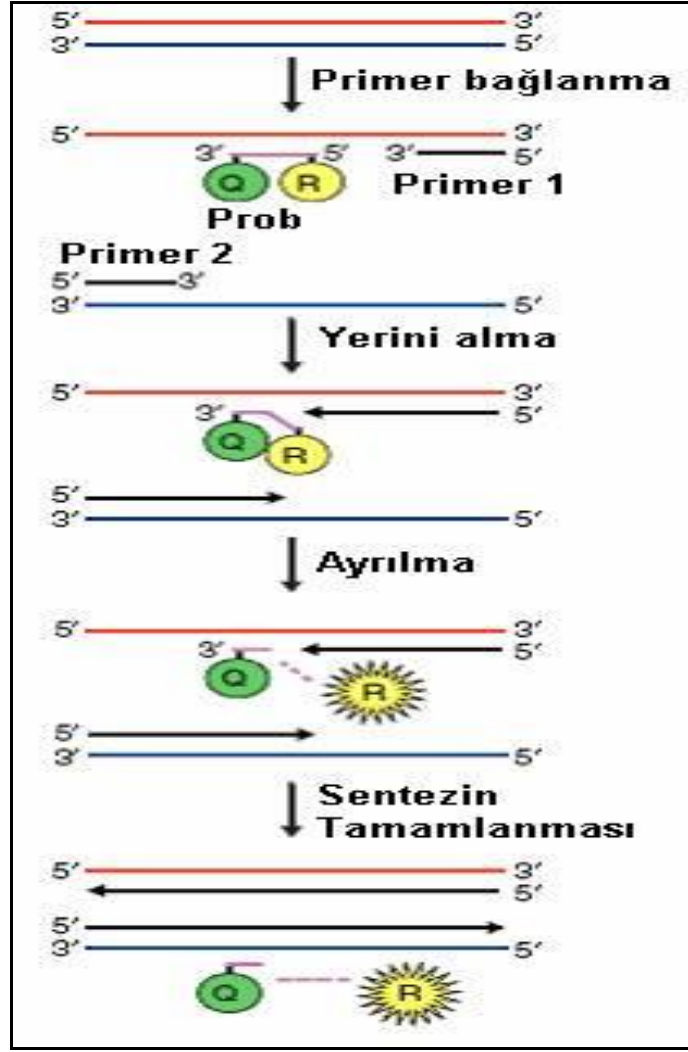
### **3.2.3. cDNA Eldesi**

Genlerin mRNA ekspresyonlarına bakabilmek için ilk olarak elde edilen total RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. RNA izolasyonunu takiben "Roche First Strand cDNA Synthesis Kiti" (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak reverse transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA eldesi sağlanmıştır. Bu işlem için tüm total RNA havuzundaki küçük poli(A) havuzuna spesifik primerler olan oligo(dT) primerler kullanılır. Komplementer primerler RNA sekanslarına bağlandıktan sonra boşa kalan 3'-OH grubundan itibaren reverse transkriptaz enzimi ile cDNA eldesi sağlanır. Total RNA miktarı hesaplandıktan sonra, toplam hacmin 20  $\mu$ l olduğu cDNA reaksiyon tüpüne 1  $\mu$ g/ $\mu$ L RNA olacak şekilde her bir örneğe ait RNA miktarı, su ile 11  $\mu$ L'ye tamamlanacak şekilde tüplere konuldu. Ardından 2  $\mu$ L oligo(dT) primer eklendi. 65 °C de 10 dk. inkübasyonun ardından tüpler buza alındı. Transkriptör Reverse Transkriptaz Reaksiyon Buffer (1X), RNaz İnhibitör (20 ünite), Deoksinükleotid mix (her birinden 1mM) ve Transkriptör Reverse Transkriptaz (10 ünite)'dan oluşan karışımdan 7'şer  $\mu$ L buz üzerindeki her bir tüpe dağıtıldı. 50 °C'de 60 dk, 85 °C'de 5 dk. inkübe edildi.

### **3.2.4. Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi**

Elde edilen cDNA örnekleri her gene (EPCR, PAR1,PAI-1) özgü primerler ve TaqMan Hidroliz Probları (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak Roche Light Cycler

cihazında (Roche Light Cycler 1.5 Basel, İsviçre) ekspresyon analizine tabi tutulmuştur. TaqMan sistemi prob hidrolizi olarak da tanımlanmaktadır. Sistemde bir proba bağlı iki floresan boya kullanılmaktadır. Probun 5'-ucuna raportör ve 3'- ucuna baskılayıcı floresan boyları ilave edilmiştir. Bu prob ekspresyonuna bakılacak gen mRNA'sı için spesifiktir ve mRNA spesifik oligo primer bağlanma sekansının önünde yer alacak şekilde düzenlenmiştir. Ekspresyonuna bakılacak gen mRNA'sı için kullanılan oligo primerler, denatüre olmuş primer spesifik cDNA sekansına bağlanır ve bunu takiben DNA polimeraz oligo primeri kullanarak mRNA karşıt zincirini sentezlemeye başlar. Kullanılan DNA polimeraz enzimi 5' nükleaz aktivitesine sahiptir. Hazırlanan probun ucundaki boyalar mRNA sekansına bağlandıklarında herhangi bir ışımaya vermemektedir. mRNA sekans dizisini çoğaltan DNA polimeraz, prob ile karşılaştığında, probun 5' ucundaki boyanın hidrolize olmasına neden olur ve buna bağlı olarak da bir ışımaya meydan gelmektedir (Şekil 3.1) (Holland et al. 1991; Livak et al. 1995).



**Şekil 3.1.** TaqMan tekniğinin aşamaları. Probu'nun iki ucunda floresan raportör ve baskılayıcı boyalar bulunmaktadır. Bu boyalar birbirlerini baskırlar. Uzama esnasında prob kırılır ve boyaların birbiri üzerindeki baskısı kalkar ve ışığa gözlenir.

Bu ışımın miktarı ekspresyonuna bakılacak gen mRNA miktarı ile doğru orantılıdır. Bu ışım cihaz tarafından detekte edilir ve siklus eşiği (cycle threshold CT) değeri olarak ifade edilir. EPCR, PAI-1 ve PAR-1'e özgü prob (sırasıyla; Universal ProbeLibrary Probes 50, 19 ve 17) ve primerler kullanılarak elde edilen bu değerler, referans gen olarak kullanılan 18S (Universal ProbeLibrary Probes 48) veya GAPDH (Universal ProbeLibrary Probes 60) mRNA'larına göre normalize edilmiştir. Böylece hedef gen mRNA ekspresyonu belirlenmiştir. Bu hesaplama kısaca karşılaştırmalı Ct metodu kullanılarak yapılabilir. Metod şu şekilde ifade edilir:

$$2^{-[\text{delta}][\text{delta}]C_t} \text{ ve } [\text{delta}][\text{delta}]C_t = [\text{delta}]C_t (\text{hedef gen}) - [\text{delta}]C_t (\text{referans gen})$$

Referans gen olarak da 18S ve GAPDH genleri kullanılmıştır. Farklı doz ve zamanlarda ABS ve DF uygulanan hücrelerdeki EPCR, PAI-1 ve PAR-1 ekspresyonlarındaki farklar, hiçbir ajanla muamele edilmeyen hücredeki ekspresyon baz alınarak saptanmıştır. Böylece ABS ve DF uygulamasının EPCR, PAI-1 ve PAR1 mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi uygun istatistiksel analizler sonucunda kontrollere kıyasla saptanabilmektedir.

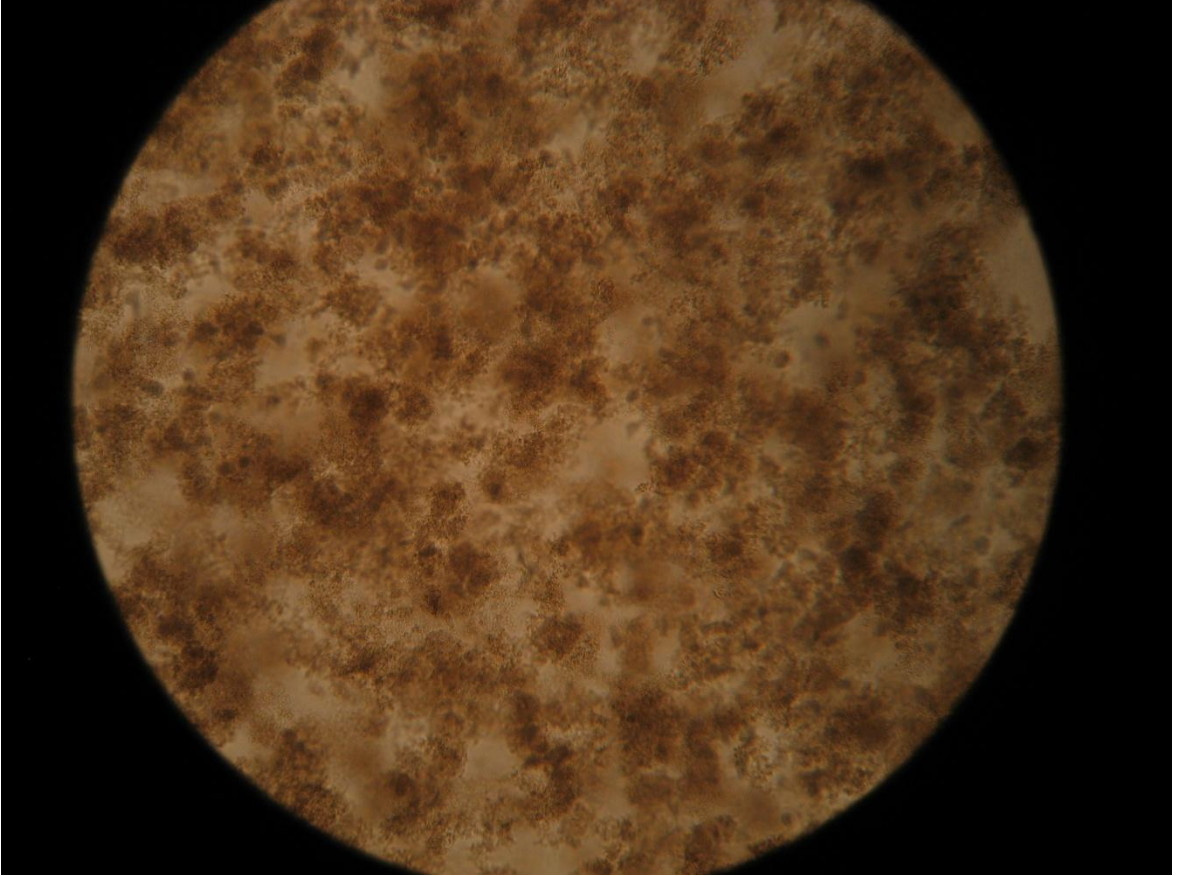
### **3.2.5. İstatistiksel Analiz**

Sonuçların istatistiksel analizi two way - ANOVA testi ve student t-test ile GraphPad Prism versiyon 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

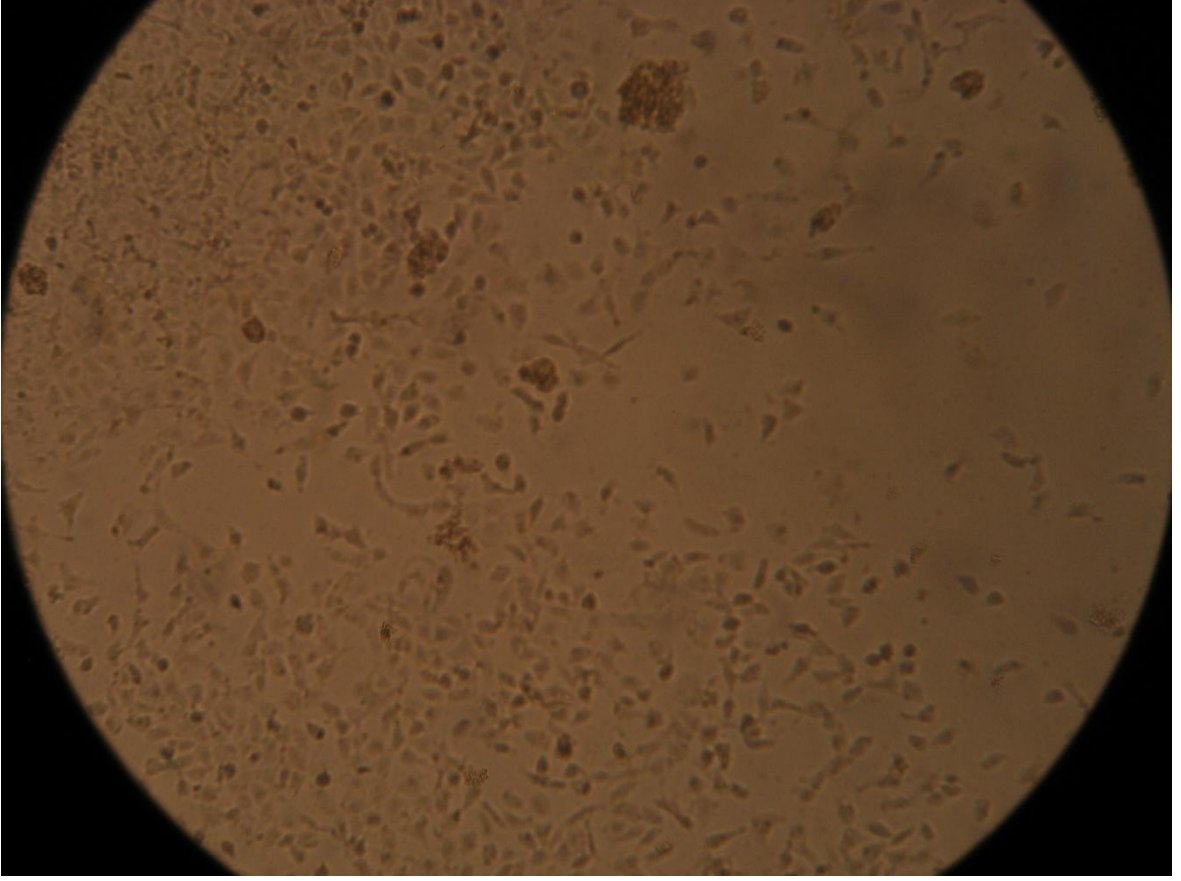
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. HUVEC Hattı'na Ankaferd Uygulanması

İnsan umbilikal ven endotelyumunda, LPS varlığı ve yokluğunda EPCR, PAI-1 ve PAR-1 üzerindeki ABS etkisi gösterilmiştir. HUVEC'lere ABS muamelesi boyunca, mikroskopik olarak hücreslerin yüzeyden kalktığı ve birbirlerine yapıştığı ve 24 saat sonra ise normal büyümelerine ve fonksiyonlarına döndükleri gözlemlenmiştir.



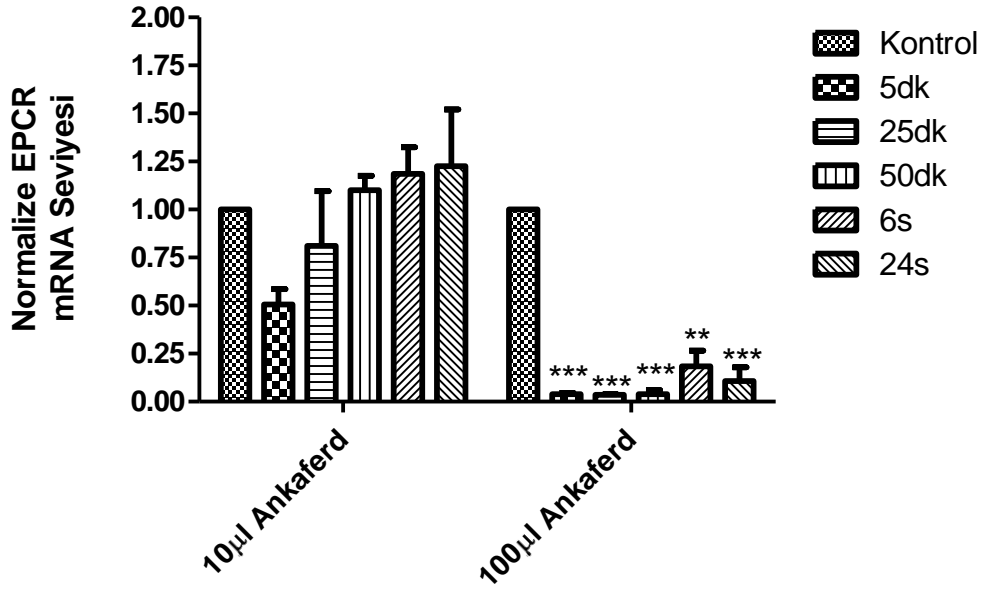
Şekil 4.1. HUVEC hattı'na Ankaferd uygulanmasının ilk 5 dakikadaki görüntüsü



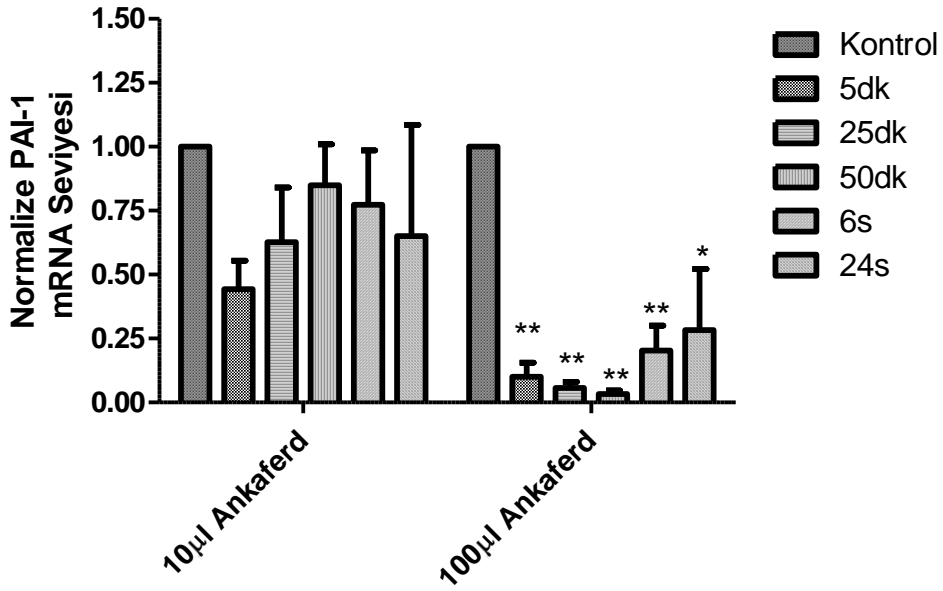
**Şekil 4.2.** HUVEC Hattı'na Ankaferd uygulanmasının 24 saat sonundaki görüntüsü

ABS, doz bağımlı olarak EPCR ekspresyonunu azaltır. ABS miktarının az olduğu durumda (10  $\mu$ L), 5. dakikada (dk) azalan EPCR ekspresyonu 50. dk'dan sonra normale dönmektedir. Doz arttığında (100 $\mu$ L) ise EPCR ekspresyonu daha da azalmakta ve ABS'nin EPCR üzerindeki etkisi daha da artmaktadır (Grafik 4.1).

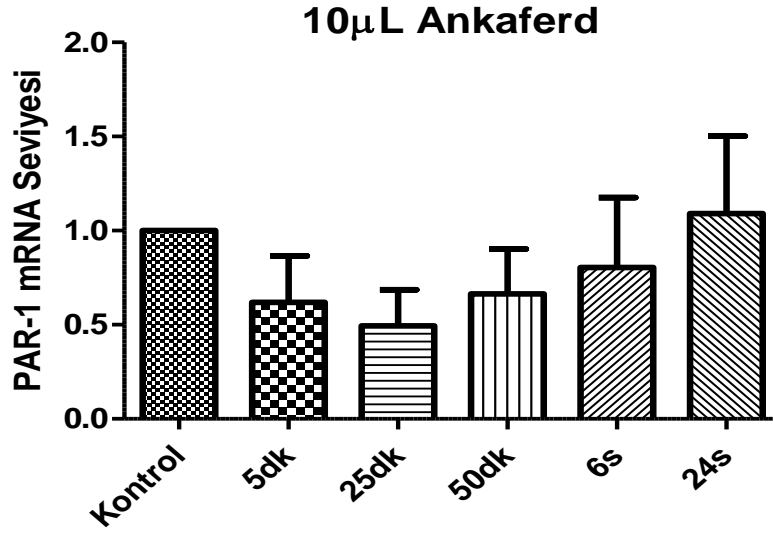
PAI-1 gen ekspresyonu doz bağımlı olarak ABS tarafından baskılanmaktadır. Düşük dozda 5. dk'da PAI-1 ekspresyonunda azalma görülürken, doz arttığında bu etki daha da belirginleşmektedir. 100  $\mu$ L'lik ABS uygulaması sonucu 50. dk'da ekspresyondaki azalış en fazla görülmektedir (Grafik 4.2).



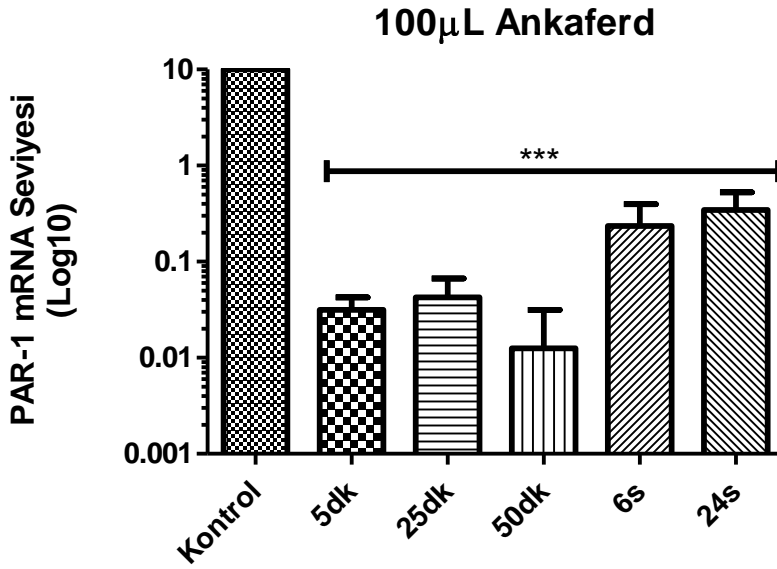
**Grafik 4.1.** 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).



**Grafik 4.2.** 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAI-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*p< 0.05; \*\*p< 0.01).



**Grafik 4.3.** 10  $\mu$ L Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.



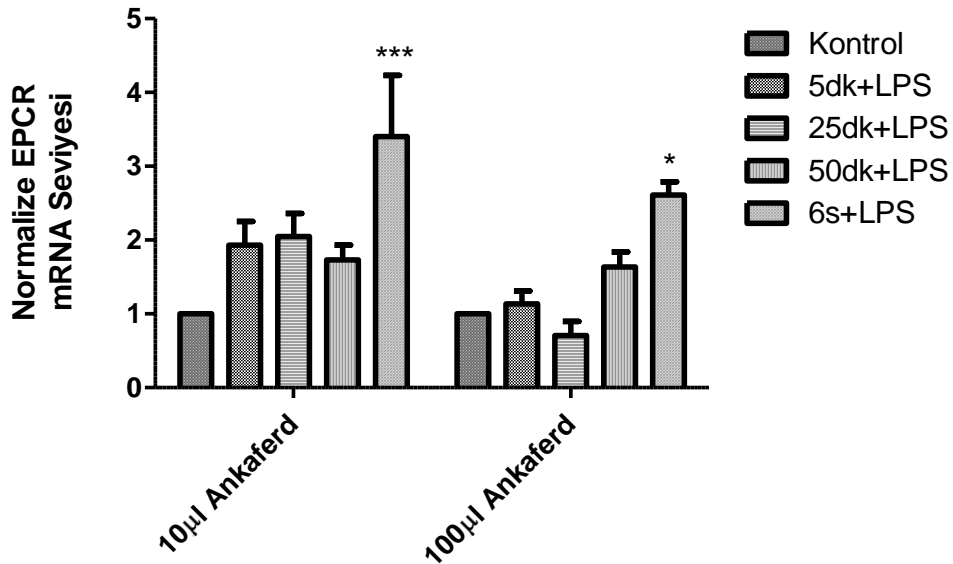
**Grafik 4.4.** 100  $\mu$ L Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*\*\*) $p < 0.001$ ).



ABS muamelesi sonrası doz bağımlı geri dönüşümlü PAR-1 inhibisyonu görülmektedir. 100 µl'lik uygulamada, ABS, PAR-1 ekspresyonunu aşırı derecede azaltmaktadır (Grafik 4.4). 10 µl'lik uygulamada bile, %40'lık bir azalma söz konusudur (Grafik 4.3). Bu sonuçlar doğrultusunda ABS'nin PAR-1 üzerindeki etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir.

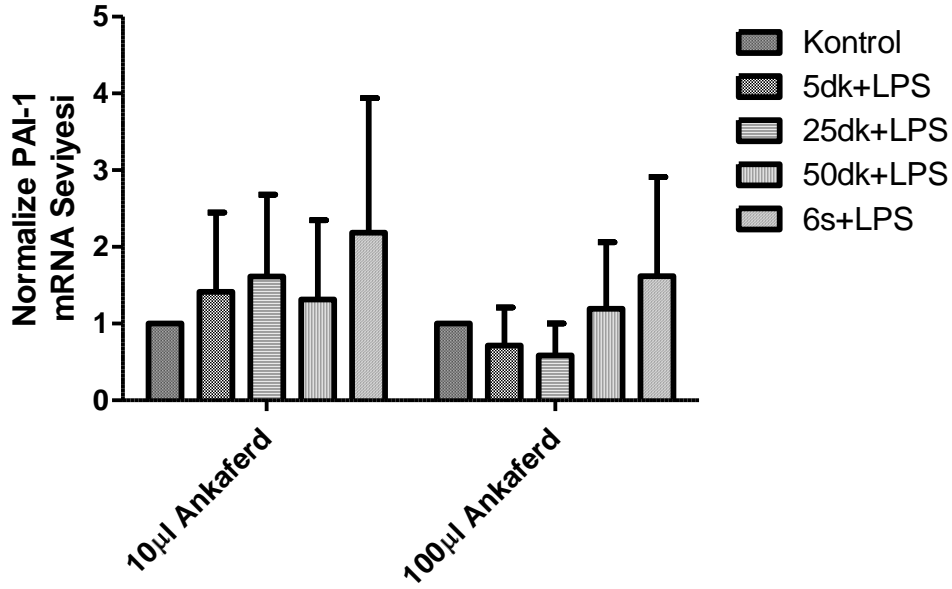
LPS muamelesinden sonra da ABS verilen HUVEC'lerdeki EPCR, PAR-1 ve PAI-1 ekspresyonları incelenmiştir. Bir saat 10 µg/ml LPS'e maruz bırakılan hücrelerde EPCR ve PAI-1 gen ekspresyonlarında artış gözlenmekle birlikte, PAR-1 ekspresyonunda azalma görülmüştür.

Hücrelerin LPS'e verdiği yanıt güçlü olmakla beraber, LPS stimülasyonunda, EPCR ekspresyon seviyesi artar. ABS, her ne kadar EPCR ekspresyonunu azaltsa bile, LPS kadar güçlü bir yanıt oluşturamamaktadır (Grafik 4.5).



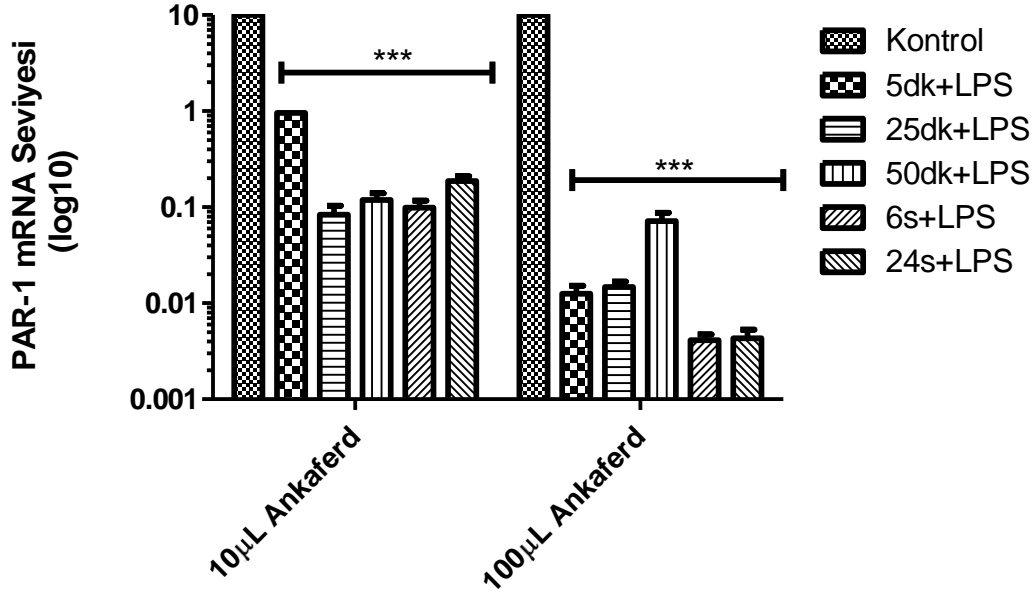
**Grafik 4.5.** LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk, ve 6 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*p<0.05; \*\*\*p<0.001).

ABS'ye maruz kalan hücrelerdeki PAI-1 ekspresyonundaki patern, LPS ile muamele edilmeyenlerle benzer sonuçlar vermektedir. PAI-1 seviyelerinin inflamasyonda arttığı göz önüne alındığında, artan ABS miktarının PAI-1 ekspresyonunu azaltmak yoluyla inflamasyonu azaltıyor olabileceği düşünülmektedir (Grafik 4.6).



**Grafik 4.6.** LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 6 saatlik muamelesinin PAI-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi

LPS muamelesinin ardından PAR-1 gen ekspresyonunda bir düşüş meydana gelmektedir. ABS etkisiyle de yine doz bağımlı olarak PAR-1 ekspresyonunda bir azalma görülmektedir (Grafik 4.7).

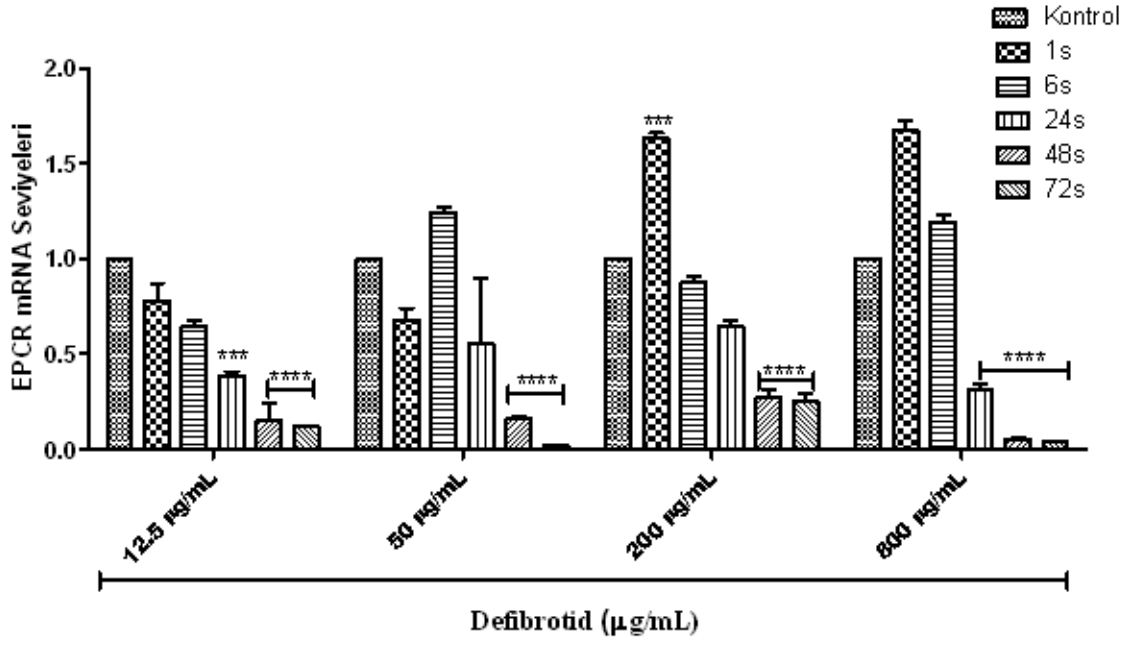


**Grafik 4.7.** LPS uygulamasından sonra 10 µL ve 100 µL Ankaferd'in 5 dk, 25 dk, 50 dk ve 6 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

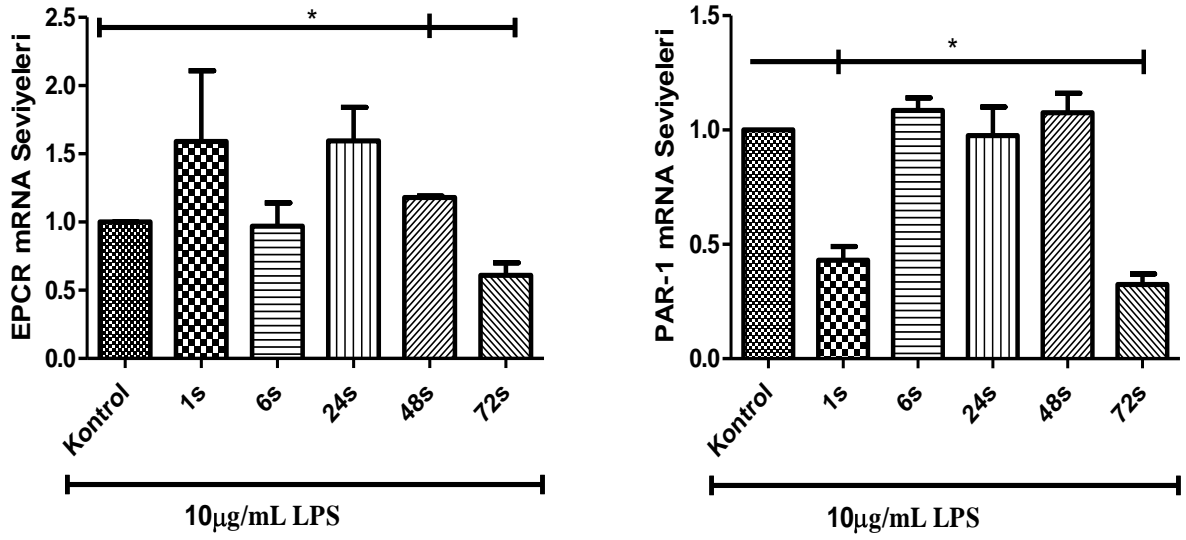
#### 4.2. HUVEC Hattı'na DF Uygulanması

HUVEC modelinde, LPS varlığı ve yokluğunda EPCR, PAI-1 ve PAR-1 üzerindeki DF etkisi gösterilmiştir. LPS varlığında ve yokluğundaki 12,5-50-200 ve 800 µg/ml konsantrasyonlardaki DF'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin ardından EPCR,PAI-1 ve PAR-1 mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırıldığı deney sonuçları grafik 4.8- 4.9- 4.10- 4.11- 4.12'de gösterilmiştir.

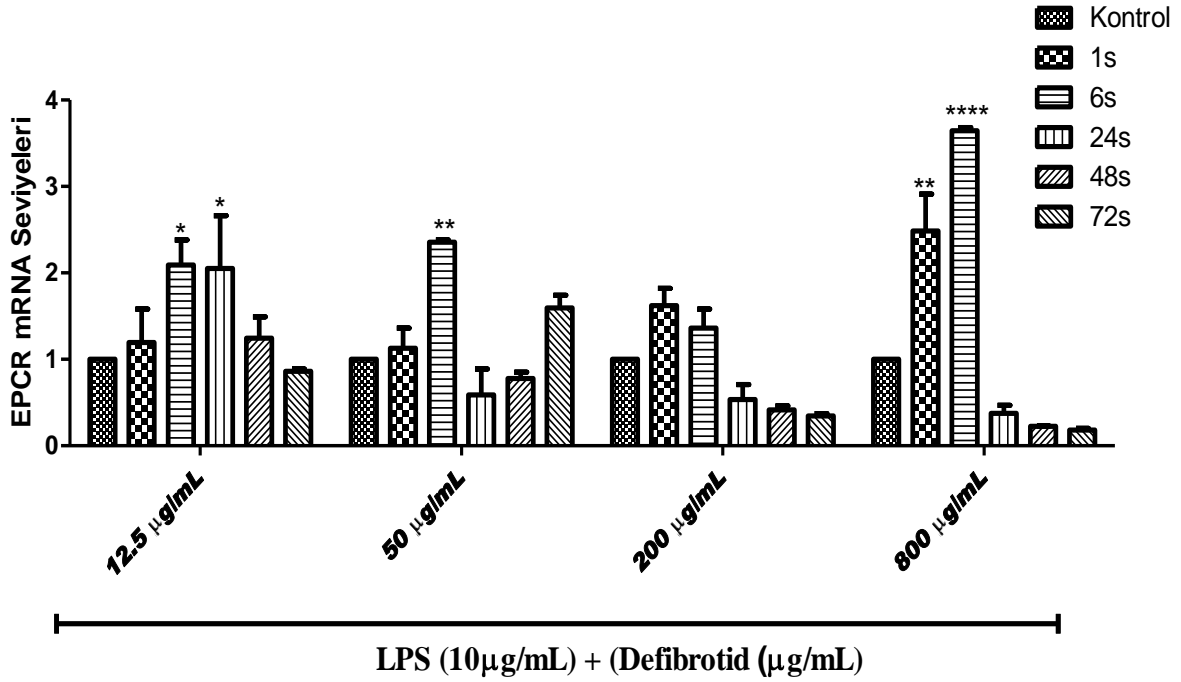
200 µg/mL ve 800 µg/mL'lik DF muamelesiyle birinci saatte EPCR ekspresyonunda artış görülmektedir ve doz arttıkça, EPCR ekspresyonu üzerindeki etkisi daha da artmaktadır. Zamanla bu etki azalmaktadır (Grafik 4.8).



**Grafik 4.8.** 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*\*\*) $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$  ).



**Grafik 4.9.** 10 µg/mL'lik LPS uygulamasının EPCR ve PAR-1 gen ekspresyonları üzerindeki etkisi: *student-t test* (\* $p < 0.05$ )

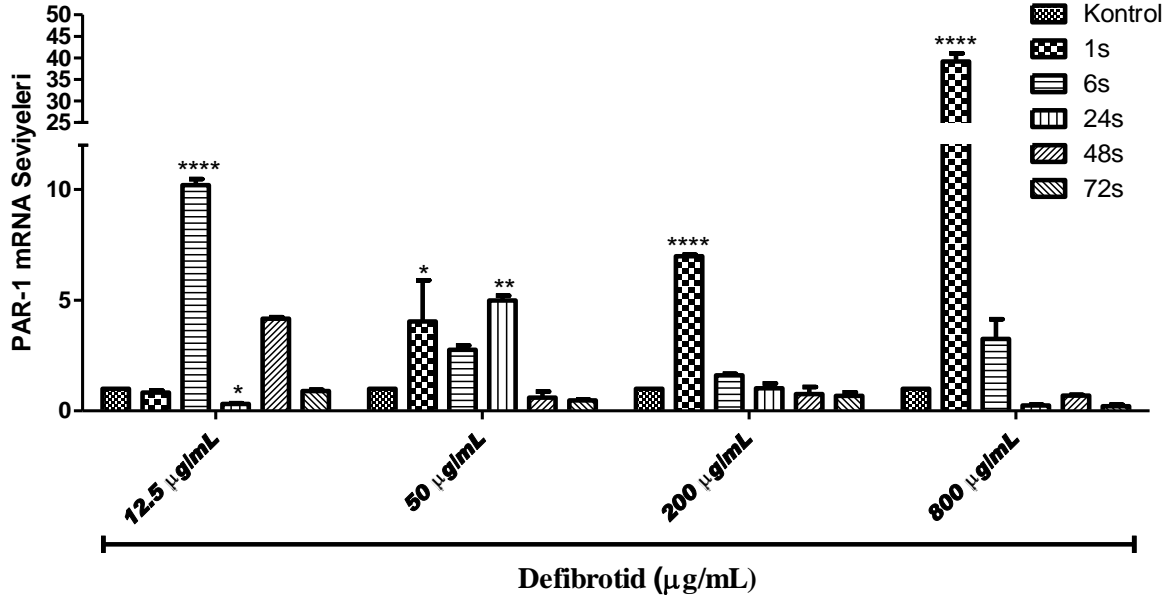


**Grafik 4.10.** LPS varlığında , 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*\*p<0.0001 ).

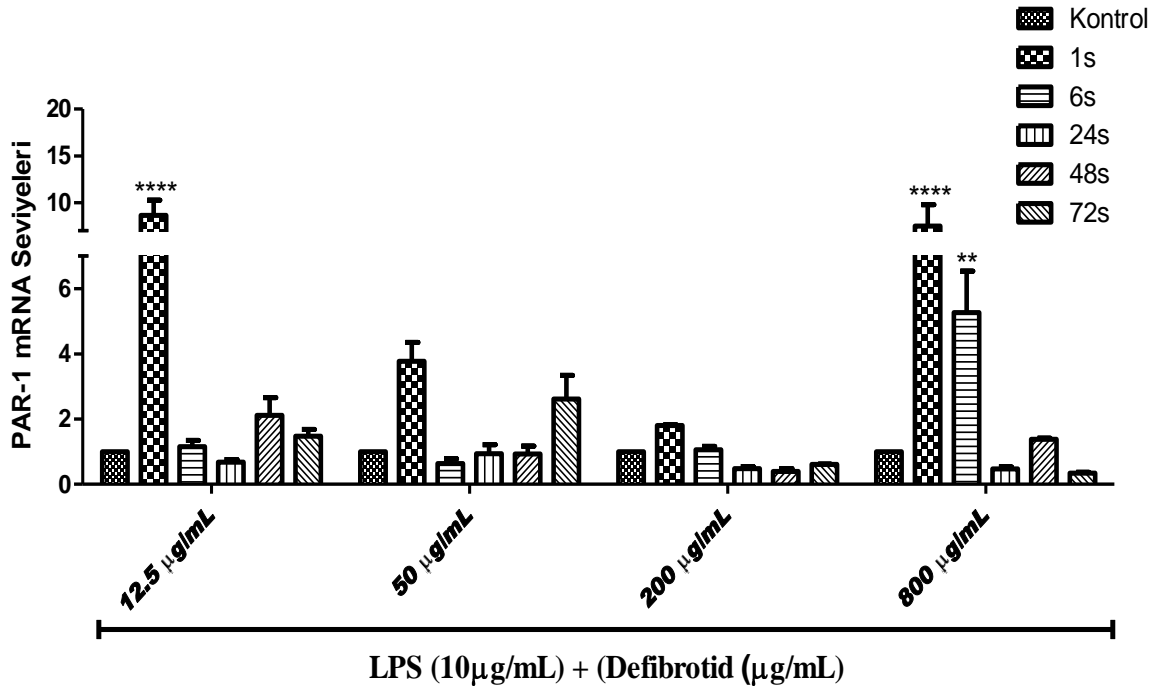
LPS varlığında artan EPCR ekspresyon seviyesi (Grafik 4.9), DF varlığından da doza bağlı olarak etkilenmektedir (Grafik4.10).

1 saatlik sürede 200 ve 800 µg/ml'lik DF muamelesinde PAR-1 ekspresyonunda artış görülmektedir. Zaman içinde bu artış azalmaktadır (Grafik 4.11).

LPS varlığında azalan PAR-1 ekspresyon seviyesi (Grafik 4.9), DF verildiğinde ise artma eğilimindedir (Grafik 4.12).



**Grafik 4.11.** 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin PAR-1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*p<0.05\*\*p<0.01\*\*\*\*p<0.0001).



**Grafik 4.12.** LPS varlığında, 12,5-50-200 ve 800 µg/ml Defibrotid'in 1-6-24-48 ve 72 saatlik muamelesinin EPCR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi (HUVEC) (\*\*p<0.01\*\*\*\*p<0.0001).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pıhtılaşmayı önleyen ajanlardan biri olan DF'in endotel hücre fonksiyonlarını düzenlediği, fibrinolizi arttırdığı, antitrombotik, antiaterosklerotik, apoptotik, antiiskemik, antianjiyogenik etkiler gösterdiği, vasküler endotelyal büyümede görevli molekülleri etkilediği bildirilmiştir (Paul, Gresele et al. 1993; Eissner, Multhoff et al. 2002; Kornblum, Ayyanar et al. 2006). Etkileri göz önüne alındığında, sepsis gibi tedavisi tam olarak gerçekleştirilemeyen proinflamatuvar hastalıklar ve kanser üzerinde DF'in kullanımı terapötik sonuçlar doğurabilir.

Normal koşullarda kan damarında antikoagülan ve koagülanlar denge halinde bulunarak kan akışı sağlanmaktadır. Damarda herhangi bir hasar olması durumunda ise koagülasyon faktörleri aktive olur. Koagülasyon yolağındaki trombin ve antikoagülasyon yolağındaki APC birer serin proteazdırlar ve etkilerini gerçekleştirebilmek için Proteazla Aktifleştirilmiş Reseptörlere (PAR) gereksinim duyarlar. Trombozda merkezi rolü üstlenen trombin, endotel hücreleri ve trombositleri PAR1 üzerinden uyardığı için bu reseptörün aktivitesi önem teşkil etmektedir. Pıhtı oluşumunda, damarlarda oluşan hasarların tamiri, yeniden damar oluşumu, immün cevabın oluşturulması ve sinir yenilenmesinde rol alan trombin, etkisini PAR1 üzerinden gerçekleştirmektedir. Trombin ayrıca trombositleri, endotel hücreleri, düz kas hücrelerini, nötrofil, lökosit, nöron ve glial hücreleri de etkiler. Uyarılmasıyla proinflamasyon, anjiyogenez, nörodejenerasyon, pıhtı oluşumu, damar hasarı tamiri, immün cevap oluşumu, yara iyileşmesi gibi mekanizmalarda aktive olan ve trombositlerde, endotel hücrelerde ve merkezi sinir sisteminde sentezlenen PAR1, hem EPCR ile hem de trombinle ilişki içerisindedir (Macfarlane et al. 2001). 1 saatlik sürede 200 ve 800 µg/ml'lik DF muamelesinde PAR-1 ekspresyonunda artış görülmektedir. Zaman içinde bu artış azalmaktadır (Grafik 4.11). LPS varlığında mekanizmanın daha çok EPCR üzerinden gitmesi yönüne kaydığı düşünülmektedir. DF verildiğinde, EPCR ile olan ilişkisini güçlendirmek, antikoagülan aktivitesini arttırmak için PAR-1 ekspresyonunda artış olabilir. EPCR ile olan ilişkisini güçlendirmek için antikoagülan aktivitesini arttırmak için o tarafa dönmek isteyebilir/ artış olabilir (Grafik 4.12).

EPCR bağımlı APC'nin antiapoptotik etkilerinin çoğu, esas endotel hücreler ya da endotel benzeri hücre hatları kullanılarak gösterilmiştir. Kültüre edilmiş insan göbek veni endotel hücrelerinde, APC'nin, NF- $\kappa$ B ile regüle olan genlerinin ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur. İnsan göbek veni endotel hücrelerinin APC ile muamele edilmesinden sonra, apoptozisle alakalı genler bastırılmış ve gen ekspresyon profili bir antiapoptotik ve antiinflamatuvar yöne değişmiştir. APC varyantları, sepsis ya da inmede terapötik değere sahiptir (Esmon 2003). 200  $\mu$ g/mL ve 800  $\mu$ g/mL'lik DF muamelesiyle birinci saatte EPCR ekspresyonunda artış görülmektedir ve doz arttıkça, EPCR ekspresyonu üzerindeki etkisi daha da artmaktadır. Zamanla bu etki azalmaktadır (Grafik 4.8). LPS varlığında artan EPCR ekspresyon seviyesi (Grafik 4.9), DF varlığından da doza bağlı olarak etkilenmektedir (Grafik 4.10). EPCR ve DF'in antikoagülasyon mekanizmasında etkili oldukları düşünüldüğünde; DF'in, etkisini EPCR üzerinden gerçekleştirme ihtimali olabilir.

DF ve EPCR ve PAR1'in etkilerini birbirleriyle aynı yollar üzerinde sürdürmeleri,'in bu genler ile ilişkilendirilen mekanizmalar üzerine mi etki ettiği sorusunu akıllara getirmektedir ve dolayısıyla elde edilen bulgular doğrultusunda günümüzde çeşitli hastalıkların semptomlarının azaltılması ya da giderilmesinde kullanılan DF etken maddesinin kullanımı daha da etkili olabilecektir.

Türk buluşu olan ABS, Türk sermayeli şirketler tarafından üretilip insanlığın hizmetine sunulmaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan ruhsatlı ilk Türk ürünüdür. % 100 bitkiseldir ve hiç bir inorganik/sentetik katkı içermez. İritasyona neden olmaz. Sterildir, steril özelliğini kaybetmez. İçerisinde ve uygulandığı yerde mikrop barındırmaz. Alerjik etkisi yoktur. Bilinen yan etkisi yoktur. İnsan sağlığı açısından risk içermez. Likit formdadır, bu sebeple uygulaması çok kolaydır. Uyguladıktan sonra bölgeden temizlenmesi gerekli değildir. Özel bir saklama koşulu yoktur, soğuk zincir vs. gerektirmez. Oldukça yeni bir ürün olan ABS'ye ait şimdilik çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmaların büyük kısmı da, ABS'nin hemostatik etki mekanizması, etkinliği ve kanama kontrolünün çok önemli olduğu farklı cerrahi alanlarındaki kullanımına yöneliktir. ABS'nin etkin bir şekilde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için bu ilacın mekanizmasının aydınlatılması öncelikli çalışma konularının arasında olmalıdır.



ABS'nin farklı doz ve sürelerdeki etkisini incelemek amacıyla ilk olarak bir endotel hücre modeli olan HUVEC'lere 10 µl ve 100 µl ABS verilerek 5 dk, 25 dk, 50 dk, 6 saat ve 24 saat sonundaki ekspresyonlara bakılmıştır. HUVEC'lere ABS uygulaması sırasında yapılan mikroskopik incelemede hücrelerin yüzeyden kalkıp bir araya toplanarak birbirlerine yapıştıkları ve 24 saatin sonunda büyüme ve gelişmelerinin normale döndüğü gözlenmiştir. Bu, ABS'nin etkisinin geri dönüşümlü olduğu ve zamanla azaldığı anlamına gelebilir. Başlangıçta ekspresyonlarda da gözlenen ani değişimin zamanla azalması gözlemi, ABS'nin etkisinin geri dönüşümlü olduğu anlamına gelebilir. Bu etki dozun artışıyla birlikte daha da net gözlenmektedir (Grafik 4.1, 4.2, 4.3, 4.4).

Düşük doz ABS (10 µl), PAR-1 mRNA ekspresyonunda negatif etkiye neden olur. Buna rağmen, 24 saat içinde PAR-1 ekspresyon seviyesi başlangıca geri döner. Aynı PAR-1 seviyesini azaltıcı etki oldukça yüksek doz ABS ile de saptanmıştır. PAR-1 ekspresyonundaki azalma ABS'nin bu yüksek dozuyla daha da ileri derecede görülmüştür ve PAR-1 mRNA seviyesindeki azalış 24 saat içinde tamamıyla eski haline geri dönmemiştir. Üstelik LPS ve 10 µl ABS HUVEC'lere eşzamanlı olarak uygulandığında da, PAR-1 ekspresyonu zamanla azalmıştır. Bununla beraber, LPS ve 100 µl ABS birlikte verildiğinde, PAR-1 ekspresyonu 24 saat sonunda ve ilk saat boyunca düşüktür. PAR-1 ekspresyonu, LPS artı 10 µl ABS ye kıyasla, LPS artı yüksek doz (100 µl) ABS ile anlamlı bir şekilde çok daha fazla azalmıştır. LPS, hücre içindeki birçok sinyal yolağını aktive etmektedir. PAR-1 de hem trombin hem EPCR ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle ABS, trombin merkezli pıhtılaşma mekanizmasından bağımsız diğer yollar üzerinde de etkili olabilir. Bu çalışmada, insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde ABS tarafından yöneltilen doza bağımlı geri dönüşümlü PAR-1 transkript inhibisyonu gözlenmiş ve LPS varlığında ABS devamlı olarak PAR-1 inhibisyonunu indüklemiştir. Yapılan çalışmalarda, koagülasyon proteinleri Faktör II,V,VII,VIII,IX,X,XI ve XIII'ün, *in vitro* ortamda ABS'den ayrı ayrı etkilenmediği görülmüştür. Ayrıca, ABS uygulamasından protrombin zamanı (PT) ve aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanı (aPTT) da etkilenmemiştir. Bununla beraber, trombin zamanının (TT) uzatıldığı gözlemlenmiştir (Goker et al. 2008). PAR-1 en önemli trombin reseptörü olduğu için, ABS ile PAR-1 düşüşü ABS'den dolayı uzatılmış TT'yi açıklayabilir. ABS primer yada sekonder hemostazı bozuk olan kişilerde ve normal hemostatik parametrelere sahip kanamalı kişilerde klinik olarak efektiftir. Ancak, klinik yada prelinik araştırmalar boyunca ABS'ye bağlı tromboz oluşumu

gözlenmemiştir. Dolayısıyla, ABS aracılı doz bağımlı geri dönüşümlü PAR-1 seviyesindeki azalış bu dengelenmiş hemostatik etkiye tromboz ya da doku nekrozuna yol açmadan topikal kanamayı kontrol ederek hizmet edebilir. ABS aracılı önemli PAR-1 azalışı, ABS'nin genel hemostaz üzerinde dengeli etkilere sahip olduğunu gösterir. PAR-1'in hemostatik fonksiyonu esas olarak protrombotiktir. PAR'lar aracılı trombin sinyali platelet aktivasyonu, intimal hiperplazia, inflamasyon ve vasküler bariyer fonksiyonunun korunması sebep olur (Leger et al. 2006). PAR-1 inhibisyonu tromboz, inflamasyon, sepsis ve neoplastik bozukluklarda terapötik bir araç olarak düşünülmektedir (Nantermet et al. 2002; Kahn 2008; Schouten et al. 2008; Garcia-Lopez et al.). ABS'nin PAR1 inhibe edici etkisi bu açıdan önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, HUVEC'lere LPS uygulanması ABS ile indüklenene ek olarak sürekli ve önemli PAR-1 mRNA ekspresyonundaki seviyesinde azalışa neden olmuştur. Ayrıca LPS varlığında ABS tarafından değiştirilen EPCR ve PAI-1 molekülleri, vasküler dinamiklerin, kontraksiyonun, hücrel proliferasyonun, hipertropinin, anjiogenezin ve neoplazia'nın düzenlenmesinde PAR-1 in partnerleri olarak düşünülürler (Haznedaroglu 2009). Bundan dolayı, ABS'nin anti infektif, yara iyileşmesi, vasküler dinamikler ve apoptotik proseslerdeki pleiyotropik hücrel etkilerinin altında yatan moleküler bağlar vardır. LPS varlığındaki ABS aracılı anlamlı PAR-1 transkript seviyesinin azalışı endotelial hasara karşı koruyucu bir role sahip gibi görünmektedir.

100 µl ABS, 24 saatlik zaman skalasında PAI-1 ve EPCR ekspresyonu üzerinde negatif etkiye sahiptir. Buna rağmen, bu negatif etki 10 µl ABS ile muamele edilen hücrelerde gözlenmemiştir. Bu bulgular, PAI-1 ve EPCR gen ekspresyonlarına dayanan doz bağımlı ABS etkisine işaret etmektedir. HUVEC'lere yalnızca LPS verildiğinde, LPS eklenmeyene kıyasla EPCR ve PAI-1 ekspresyonunda artış gözlenmektedir. LPS'in ardından 10 µl ve 100 µl ABS verildiğinde ise, PAI-1 ekspresyonunun 50. dakikalık periyotda kontrol çevresinde stabil kaldığı gözlenmiştir. Buna rağmen, LPS ve 10 µl ve 100 µl ABS verildiğinde, EPCR ekspresyonu ilk saat boyunca çok düşük olmakla birlikte 6. saatin sonunda ekspresyonunda artış gözlenmiştir.

ABS, vasküler endotel hücre modeli olan HUVEC'ler içinde endotelial hemostatik moleküller olan EPCR ve PAI-1 üzerinde de çeşitli çift yönlü dinamik geri dönüşümlü etkilere sahiptir. ABS muamelesinin ardından antikoagulan olan EPCR'nin ve prohemostatik PAI-1 ekspresyonunun ani olarak baskılandığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ABS'nin ani kanama durdurucu etkisinin saptandığı diğer çalışmalarla bağdaştırılabilir. Bu genlerin ekspresyonları üzerinde de ABS'nin zamana bağlı etkisi mevcuttur. Ayrıca ekspresyonlardaki hızlı değişim göz önüne alındığında ABS'nin artan konsantrasyonlarda etkisini daha da fazla gösterdiği söylenebilir. ABS'nin saptanan birçok etkisinin yanı sıra, bu çalışmamızdaki bulgularımızla da vasküler antikoagülasyon (EPCR aracılı) ve antifibrinolitik (PAI-1 aracılı) yollarındaki etkisi de saptanmıştır. Bu da, ileride pıhtılaşma defekti olan kişilerde hemostazın düzenlenmesinde dengeyi sağlayacak bir etkiye sahip olabileceğini akıllara getirmektedir.

ABS, hemostatik etkisinin yanında bakteri gelişimini de önlemektedir (Akkoç et al. 2008). Travmatik enfeksiyonlu yaralanmalarda hemostatik etkisi için kullanıldığı bölgelerde, ABS'nin anti-infektif aktivitesi bir avantaj sağlamış olacaktır. Ancak, ABS'nin bu anti-infektif etkisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. EPCR, şiddetli enfeksiyonlara biyolojik cevabın regülasyonunda önemli bir moleküldür. LPS ile indüklenen endotoksi EPCR ve PAI-1'in enzimatik aktif bölgesine ihtiyaç duymaktadır. Bu çalışmada, ABS'nin LPS varlığında EPCR ve PAI-1 ekspresyonlarını upregüle ettiğini gözlemledik. ABS'nin anti-infektif etkileri, vasküler endotelium ve koagülasyonun farklı basamaklarını etkileyen hemostatik fonksiyonlarıyla ilişkili olabilir.

Önceki gözlemler enfekte olmuş dental bölgeler, rektal ülserler ya da neoplastik lezyonlar gibi farklı klinik durumlarda ABS'nin yara iyileştirme fonksiyonuna sahip olabileceğini göstermiştir. PAI-1 doku ya da yara tamirini korumada fonksiyonlara sahiptir. Çalışmamızda ABS'nin PAI-1 üzerindeki etkisi gözlenmiştir. ABS muamelesinin ardından PAI-1 ekspresyonundaki değişim göz önüne alındığında, ABS'nin biyolojik etkileri üzerinde fibrinolizis regülatörlerinin önemini araştırılması bir sonraki basamağı oluşturabilir. PAI-1 ayrıca tümör yanıtında da rol alır. ABS de topikal olarak tümör anjiyogenezini inhibe etmektedir. Bu açıdan bu çalışmadaki gözlemlerin bir dayanak noktası oluşturmasıyla PAI-1'in protrombotik etkisi ileride çalışılabilir.

Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; ABS, HUVEC hattına (75cm<sup>2</sup> yüzeyde; ~75% dolulukta), 5 µL ve 50 µL hacimlerde 5 ve 15 dakika uygulanmış olup, bu hücrelerden çekirdek izole edilmiş ve transkripsiyon faktörleri seviyeleri ölçülmüştür. Kandan eritrosit izolasyonu ve eritrosit membran izolasyonu yapılmıştır. Transkripsiyon faktörlerinden AP2, AR, CRE/ATF1, CREB, E2F1-5, E2F6, EGR, GATA, HNF-1, ISRE, Myc-Max, NF-1, NFκB, p53, PPAR, SMAD 2/3, SP1, TRE/AP1, YY1'in aktivasyonlarında artış gözlenmiştir. Kandan eritrosit membranı izolasyonundan sonra, protein komplekslerinin denatürasyona rağmen çözünmemiş halde kaldığı ve bu kompleksler sıcaklığa ve deterjana dayanıklı olduğu görülmüştür. Sonikasyon ve tripsin muamelesinden sonra bu kompleksin ayrıştığı ve eritrosit membran proteinlerinin ortaya çıktığı SDS-PAGE'de gözlemlenmiştir. Hemostatik ajan ABS'nin kanamaları durdururken çok hızlı ve sağlam bir ağ oluşturduğu ve uygulandığı bölgedeki hücrelerin içinde de etkili olup transkripsiyon faktörleri seviyelerini de etkileyerek birçok mekanizmalar üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Yılmaz 2010). Transkripsiyon faktörlerinin yanısıra EPCR, PAR-1 ve PAI-1 ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin saptanmasıyla da ABS'nin etki mekanizması üzerinde dramatik sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, HUVEC'lere ABS muamelesi boyunca, mikroskopik olarak hücrelerin yüzeyden kalktığı ve birbirlerine yapıştığı ve 24 saat sonra ise normal büyümelerine ve fonksiyonlarına döndükleri gözlemlenmiştir. Bu da ABS'nin adeziv hücre sel fonksiyonlarının geri dönüşümlü olduğu ve muamelenin ardından zaman geçtikçe başlangıç durumuna döndüğünü fikrini ileri sürmektedir. Sonuçlar göz önüne alındığında, hemostatik ajan ABS'nin HUVEC'lerde EPCR, PAR-1 ve PAI-1 ekspresyonu üzerinde doz ve zamana bağlı etkisinin varlığı saptanmıştır. Hücreler immünolojik ve hemostatik yanıtları test etmek için bir toksin olarak rol oynayabilen LPS'e maruz bırakıldığında da, hücreler üzerinde ABS benzer bir etki göstermekte, doz arttıkça daha da etkili hale gelmekte ve zamanla etkisini yitirmeye başlamaktadır. Bu çalışmada LPS varlığında ABS'nin çeşitli genler üzerindeki etkilerini göstererek, topikal bir biyolojik yanıt düzenleyici olarak rol oynadığını öne sürmekteyiz. Bu bulgular aracılığıyla, ABS'nin ani kanama durdurucu etkisine ışık tutulmuştur. Hemostaz mekanizmaları üzerinde olabileceği gibi ABS'nin hücre içinde birçok mekanizmayı da etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu etkileşimlerin daha net gösterilmesi ve sonuçların daha da açıklanabilmesi için ileriki çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

- Akar, N., Demiralp, D. O. Haznedaroglu, I. 2008. Functional Proteomics of Ankaferd Blood Stopper. *Blood*, 112; 4103.
- Akar, N., Gokdemir, R., Ozel, D. Akar, E. 2002. Endothelial cell protein C receptor (EPCR) gene exon III, 23 bp insertion mutation in the Turkish pediatric thrombotic patients. *Thromb Haemost*, 88 (6); 1068-9.
- Akkoç, N., Akçelik, M., Haznedaroglu, I. C., Göker, H., Turgut, M., Aksu, S., Kirazli, S. Fırat, H. C. 2009. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd medicinal plant extract. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29; 410–415.
- Akkoç, N., Akçelik, M., Haznedaroglu, I. C., Göker, H., Aksu, S., Kirazli, S. Fırat, H. C. 2008. In Vitro Anti-Bacterial Activities Of Ankaferd Blood Stopper. . *Int J Lab Hematol*, 30; 95.
- Arii, M., Miki, R. Hosoyama, H. 1998. Chemopreventive effect of Grape Seed extract on intestinal carcinogenesis in the ape Mouse. *Proc Am Assoc Cancer Res* 39; 20.
- Aydin, S. 2009. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*, 37 (1); 279.
- Balazs, A. B., Fabian, A. J., Esmon, C. T. Mulligan, R. C. 2006. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood*, 107 (6); 2317-21.
- Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J. Audran, J. C. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 186 (1); 91-5.
- Baykul, T., Alanoglu, E. G. Kocer, G. 2010. Use of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent: a clinical experience. *J Contemp Dent Pract*, 11 (1); E088-94.
- Berktaş, M., Yaman, G., Ayhan, H., Aksakal, A., Güdücüoğlu, H., Öztürk, Ö. Parlak, M. 2008. Ankaferd BloodStopper: aynı zamanda ideal bir antibiyotik öncülü mü? 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0146 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,
- Bilgili. 2006. Rapor No 2. Ankaferd Blood Stopper hemostatik test raporları,
- Bilgili, H., Captug, O., Kosar, A., Kurt, M., Kekilli, M., Shorbagi, A., Kurt, O. K., Ozdemir, O., Goker, H. Haznedaroglu, I. C. 2010. Oral systemic administration of Ankaferd blood stopper has no short-term toxicity in an in vivo rabbit experimental model. *Clin Appl Thromb Hemost*, 16 (5); 533-6.
- Bilgili, H., Kosar, A., Kurt, M., Onal, I. K., Goker, H., Captug, O., Shorbagi, A., Turgut, M., Kekilli, M., Kurt, O. K., Kirazli, S., Aksu, S. Haznedaroglu, I. C. 2009. Hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in a swine bleeding model. *Med Princ Pract*, 18 (3); 165-9.
- Bodur, H. 2008. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında Lokal Ankaferd Blood Stopper Deneyimi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çeşme, İzmir,
- Bombardelli, E. Morazzoni, P. 1997. *Urtica dioica*. . *L Fitoterapia* 68; 387–402.
- Bombardelli, E. Morrazzoni, P. 1995. *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia*, 66; 291–317.
- Bouton, M. C., Jandrot-Perrus, M., Moog, S., Cazenave, J. P., Guillin, M. C. Lanza, F. 1995. Thrombin interaction with a recombinant N-terminal extracellular domain of the thrombin receptor in an acellular system. *Biochem J*, 305 ( Pt 2); 635-41.
- Brass, L. F., Pizarro, S., Ahuja, M., Belmonte, E., Blanchard, N., Stadel, J. M. Hoxie, J. A. 1994. Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J Biol Chem*, 269 (4); 2943-52.

- Bretschneider, E., Uzonyi, B., Weber, A. A., Fischer, J. W., Pape, R., Lotzer, K. Schror, K. 2007. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res*, 100 (2); 255-62.
- Browne, R. M. 1988. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials--does it have a role? *Int Endod J*, 21 (2); 50-8.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9 (6); 653-60.
- Cesarman-Maus, G. Hajjar, K. A. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*, 129 (3); 307-21.
- Cheng, T., Liu, D., Griffin, J. H., Fernandez, J. A., Castellino, F., Rosen, E. D., Fukudome, K. Zlokovic, B. V. 2003. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*, 9 (3); 338-42.
- Chopra, R., Eaton, J. D., Grassi, A., Potter, M., Shaw, B., Salat, C., Neumeister, P., Finazzi, G., Iacobelli, M., Bowyer, K., Prentice, H. G. Barbui, T. 2000. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease: results of the European compassionate-use study. *Br J Haematol*, 111 (4); 1122-9.
- Christensen, S. B., Ming, C., Andersen, L., Hjerne, U., Olsen, C. E., Cornett, C., Theander, T. G. Kharazmi, A. 1994. An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Med*, 60 (2); 121-3.
- Chrubasik S, E. W., Bauer R. 1997. Evidence for the antirheumatic effectiveness of herba *Urtica dioica* et in acute arthritis: A pilot study. *Phytomedicine*, 4; 105-108.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. Doerr, H. W. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*, 361 (9374); 2045-6.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. Stern, D. M. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91 (10); 3527-61.
- Cipil, H. S., Kosar, A., Kaya, A., Uz, B., Haznedaroglu, I. C., Goker, H., Ozdemir, O., Koroglu, M., Kirazli, S. Firat, H. C. 2009. In vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15 (3); 270-6.
- Colman, R. W., Hirsh, J. Moider, V. J. 2004. Hemostasis And Trombosis. Basic Principles And Clinical Practice. Lippincott Williams, 4; 381-400.
- Coughlin, S. R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20); 11023-7.
- Crandall, D. L., Quinet, E. M., Morgan, G. A., Busler, D. E., McHendry-Rinde, B. Kral, J. G. 1999. Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 by human preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (9); 3222-7.
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A. Loskutoff, D. J. 2003. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*, 160 (5); 781-91.
- Çalışkan, Ü., Uçar Albayrak, C. Acıpayamlı, C. 2008. Afibrinojenemili bir vakada cilt kesisine bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0137 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,
- Çalışkan, Ü., Uçar Albayrak, C. Acıpayamlı, C. 2008. Glanzmann trombastenili bir vakada diş çekimi ve sünete bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0140 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,

- Çalışkan, Ü., Uçar Albayrak, C. Acıpayamlı, C. 2008. Tar sendromlu bir vakada dış çekimine bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0139 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,
- Dahlback, B. Villoutreix, B. O. 2005. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (7); 1311-20.
- Davis, J. M. 1996. *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. Oxford University Press INC., New York,
- Dawson, S., Hamsten, A., Wiman, B., Henney, A. Humphries, S. 1991. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb*, 11 (1); 183-90.
- De Backer, M. D., Loonen, I., Verhasselt, P., Neefs, J. M. Luyten, W. H. 1998. Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem J*, 335 ( Pt 3); 663-70.
- Degryse, B., Sier, C. F., Resnati, M., Conese, M. Blasi, F. 2001. PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase receptor. *FEBS Lett*, 505 (2); 249-54.
- Dehpour, A. R., Zolfaghari, M. E., Samadian, T. Vahedi, Y. 1994. The protective effect of liquorice components and their derivatives against gastric ulcer induced by aspirin in rats. *J Pharm Pharmacol*, 46 (2); 148-9.
- Demiralp DO, H. I., Akar N. 2010. Functional proteomic analysis of Ankaferd Blood Stopper. *Turk J Hematol* 27; 70-7.
- Di Perri, T., Pasini, F. L., Ceccatelli, L., Pasqui, A. L. Capecchi, P. L. 1991. Defibrotide inhibits Ca<sup>2+</sup> dependent neutrophil activation: implications for its pharmacological activity in vascular disorders. *Angiology*, 42 (12); 971-8.
- Dogan, O. F., U. Ozyurda, O.K. Uymaz, S. Ercetin, I.C. Haznedaroğlu. 2008. New anticoagulant agent for CABG surgery. *Eur. J. Clin. Invest.*, 38; 341-341.
- Domotor, E., Benzakour, O., Griffin, J. H., Yule, D., Fukudome, K. Zlokovic, B. V. 2003. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood*, 101 (12); 4797-801.
- Echart, C. L., Graziadio, B., Somaini, S., Ferro, L. I., Richardson, P. G., Fareed, J. Iacobelli, M. 2009. The fibrinolytic mechanism of defibrotide: effect of defibrotide on plasmin activity. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 20 (8); 627-34.
- Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., Kirchner, S., Bauer, S., Haffner, S., Sondermann, D., Andreesen, R. Holler, E. 2002. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood*, 100 (1); 334-40.
- Ercan, E., Tengiz, I., Duman, C., Sekuri, C., Aliyev, E., Mutlu, B., Ercan, H. E. Akin, M. 2004. Decreased plasminogen activator inhibitor-1 levels in coronary artery aneurysmatic patients. *J Thromb Thrombolysis*, 17 (3); 207-11.
- Eren, M., Painter, C. A., Atkinson, J. B., Declerck, P. J. Vaughan, D. E. 2002. Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation*, 106 (4); 491-6.
- Erickson, L. A., Fici, G. J., Lund, J. E., Boyle, T. P., Polites, H. G. Marotti, K. R. 1990. Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Nature*, 346 (6279); 74-6.

- Erickson, L. A., Ginsberg, M. H., Loskutoff, D. J. 1984. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest*, 74 (4); 1465-72.
- Esmon, C. T. 1992. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb*, 12 (2); 135-45.
- Esmon, C. T. 2000. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost*, 83 (5); 639-43.
- Esmon, C. T. 2003. The protein C pathway. *Chest*, 124 (3 Suppl); 26S-32S.
- Esmon, C. T. 2006. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost*, 32 Suppl 1; 49-60.
- Faioni, E. M., Ferrero, S., Fontana, G., Gianelli, U., Ciulla, M. M., Vecchi, M., Saibeni, S., Biguzzi, E., Cordani, N., Franchi, F., Bosari, S., Cattaneo, M. 2004. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in the intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease. *Crit Care Med*, 32 (5 Suppl); S266-70.
- Falanga, A., Vignoli, A., Marchetti, M., Barbui, T. 2003. Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. *Leukemia*, 17 (8); 1636-42.
- Fay, W. P., Parker, A. C., Condrey, L. R., Shapiro, A. D. 1997. Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene. *Blood*, 90 (1); 204-8.
- Fay, W. P., Shapiro, A. D., Shih, J. L., Schleef, R. R., Ginsburg, D. 1992. Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation. *N Engl J Med*, 327 (24); 1729-33.
- Feigal, R. J., Yesilsoy, C., Messer, H. H., Nelson, J. 1985. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol*, 30 (8); 609-13.
- Ferhanoğlu, B. 2003. Hemostaz Mekanizması. *Kanama ve Tromboza Eğilim*, 36; 9-16.
- Ferrero, M. E., Corsi, M., Parise, M., Marni, A., Gaja, G. 1993. Defibrotide use during preservation favors the metabolic function of grafted kidneys in rats. *Transplant Proc*, 25 (4); 2531-3.
- Francis, C. W. 2002. Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. *Arch Pathol Lab Med*, 126 (11); 1401-4.
- Freshney, R. I. 1986. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford.
- Fukudome, K., Esmon, C. T. 1994. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 269 (42); 26486-91.
- Galligan, L., Livingstone, W., Volkov, Y., Hokamp, K., Murphy, C., Lawler, M., Fukudome, K., Smith, O. 2001. Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol*, 115 (2); 408-14.
- Garcia-Lopez, M. T., Gutierrez-Rodriguez, M., Herranz, R. 2010. Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy? *Curr Med Chem*, 17 (2); 109-28.
- Garcia, J. G., Fenton, J. W., 2nd, Natarajan, V. 1992. Thrombin stimulation of human endothelial cell phospholipase D activity. Regulation by phospholipase C, protein kinase C, and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Blood*, 79 (8); 2056-67.
- Garcia, J. G., Patterson, C., Bahler, C., Aschner, J., Hart, C. M., English, D. 1993. Thrombin receptor activating peptides induce Ca<sup>2+</sup> mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *J Cell Physiol*, 156 (3); 541-9.



- Garcia, J. G., Pavalko, F. M. Patterson, C. E. 1995. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 6 (7); 609-26.
- Ginsberg, M. H., Taylor, L. Painter, R. G. 1980. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood*, 55 (4); 661-8.
- Goker, H., Haznedaroglu, I. C., Ercetin, S., Kirazli, S., Akman, U., Ozturk, Y. Firat, H. C. 2008. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*, 36 (1); 163-70.
- Göker H, A. S., Haznedaroğlu İC, Ateş İK, Alkan A, Büyükaşık Y, Avcı G, Özcebe Oİ. 2008. Aplastik anemide allojenik kök hücre transplantasyonu sonrası aplazik dönemde trombosit tranfüzyonuna refrakter epistaksis tedavisinde lokal Ankaferd uygulaması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P232 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,
- Göker H, K. E., Uçar Çetinkaya D, Büyükaşık Y, Aksu S, Turgut M, Haznedaroglu İC. 2008. Ankaferd'in in vitro ortamda insan kolon kanseri hücreleri üzerine olan antikanser aktivitesi. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı P044 no'lu bildiri, Antalya,
- Göker H, U. Ç. D., Kılıç E, Haznedaroglu C, Kirazlı S, Firat HC. 2008. Ankaferd BloodStopper'in (ABS) in vitro ortamda osteosarkom hücre dizilerinde olan antikanser aktivitesi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P066 no'lu bildiri, İzmir,
- Green, H., Kehinde, O. Thomas, J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (11); 5665-8.
- Greenfield, L. 1994. Venous and lymphatic disease. *Principles of surgery*, 6; 9891014.
- Griendling, K. K. Alexander, R. W. 1996. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J*, 10 (2); 283-92.
- Gu, J. M., Crawley, J. T., Ferrell, G., Zhang, F., Li, W., Esmon, N. L. Esmon, C. T. 2002. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem*, 277 (45); 43335-43.
- Guyton, A. C. Hall, J. E. 2007. *Tıbbi Fizyoloji 11*. Baskı. Nobel Yayıncılık; 457-467.
- Hanks, C. T., Wataha, J. C. Sun, Z. 1996. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, 12 (3); 186-93.
- Hart, I. R. 1983. Tumor cell hybridization and neoplastic progression. *Symp Fundam Cancer Res*, 36; 133-43.
- Hataji, O., Taguchi, O., Gabazza, E. C., Yuda, H., Fujimoto, H., Suzuki, K. Adachi, Y. 2002. Activation of protein C pathway in the airways. *Lung*, 180 (1); 47-59.
- Hatano, T., Shintani, Y., Aga, Y., Shiota, S., Tsuchiya, T. Yoshida, T. 2000. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48 (9); 1286-92.
- Haznedaroglu, I. 2009. Molecular Basis of the Pleiotropic Effects of Ankaferd Blood Stopper. *IUBMB Life*, 61; 290-290.
- Haznedaroglu, I. C. 1998. Time to take a healthier view of history. *Nature*, 396 (6707); 108.
- Henry, M., Chomiki, N., Scarabin, P. Y., Alessi, M. C., Peiretti, F., Arveiler, D., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Poirier, O., Cambien, F. Juhan-Vague, I. 1997. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (5); 851-8.

- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. Gelfand, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16); 7276-80.
- Hryb, D. J., Khan, M. S., Romas, N. A. Rosner, W. 1995. The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta Med*, 61 (1); 31-2.
- Huri, E., Akgul, T., Ayyildiz, A., Ustun, H. Germiyanoglu, C. 2009. Hemostatic role of a folkloric medicinal plant extract in a rat partial nephrectomy model: controlled experimental trial. *J Urol*, 181 (5); 2349-54.
- Huri E, A. T., Ayyıldız A, Üstün H, Germiyanoglu C. 2008. Ankaferd Blood Stopper'in renal travmada kanamaya olan etkinliginin degerlendirilmesi: Hayvan Deneyi. . 34. Ulusal Hematoloji Kongresi,
- Hurtado, V., Montes, R., Gris, J. C., Bertolaccini, M. L., Alonso, A., Martinez-Gonzalez, M. A., Khamashta, M. A., Fukudome, K., Lane, D. A. Hermida, J. 2004. Autoantibodies against EPCR are found in antiphospholipid syndrome and are a risk factor for fetal death. *Blood*, 104 (5); 1369-74.
- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Yano, H., Uehara, H. Nakaizumi, A. 1995. Suppression by amiloride of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane. *Int J Cancer*, 63 (5); 716-9.
- Isler, S. C., Demircan, S., Cakarer, S., Cebi, Z., Keskin, C., Soluk, M. Yuzbasioglu, E. 2010. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper on early bone healing. *J Appl Oral Sci*, 18 (4); 409-14.
- Iwaki, T., Cruz, D. T., Martin, J. A. Castellino, F. J. 2005. A cardioprotective role for the endothelial protein C receptor in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in the mouse. *Blood*, 105 (6); 2364-71.
- Joyce, D. E., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B. Grinnell, B. W. 2001. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*, 276 (14); 11199-203.
- Juhan-Vague, I., Alessi, M. C. Vague, P. 1991. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia*, 34 (7); 457-62.
- Juhan-Vague, I., Valadier, J., Alessi, M. C., Aillaud, M. F., Ansaldi, J., Philip-Joet, C., Holvoet, P., Serradimigni, A. Collen, D. 1987. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 57 (1); 67-72.
- Kahn, M. L. 2008. Counteracting clotting in sepsis. *Nat Med*, 14 (9); 918-9.
- Kahn, M. L., Hammes, S. R., Botka, C. Coughlin, S. R. 1998. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem*, 273 (36); 23290-6.
- Kang, U. J., Fisher, L. J., Joh, T. H., O'Malley, K. L. Gage, F. H. 1993. Regulation of dopamine production by genetically modified primary fibroblasts. *J Neurosci*, 13 (12); 5203-11.
- Kanthou, C., Dennehy, U., Kakkar, V. V. Benzakour, O. 1995. Structural domains of thrombin involved in the induction of mitogenesis in cultured human vascular smooth muscle cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 6 (7); 634-42.
- Karabulut H, A. B., Babademez MA, Günbey G, Karasen RM. 2008. Alt konka rezeksiyonlarından sonra "Ankaferd BloodStopper"li tampon uygulaması. 30. Ulusal KBB ve Bas Boyun Cerrahisi Kongresi / 4. Türk-Amerikan KBB ve Bas Boyun Cerrahisi Ortak Toplantısı, İstanbul,

- Karasoy Yesilada A, T. S., Bayraktaroglu SB, Sakız D, Bai L. 2008. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın flep yasanabilirliğine etkisinin ratlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma. 34.Ulusal hematoloji kongresi, İzmir,
- Kayaalp, O. 1990. Koagülasyon ve hemostaz. Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2, 5. baskı; 1353-1421.
- Kılıç E, Ç. D., Haznedaroglu İC, Turgut M, Aksu S, Kirazlı S, Göker H. 2008. Ankaferd BloodStopper'in (ABS) in vitro ortamda mezenkimal kök hücre gelişimi üzerine etkisi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P065 no'lu bildiri, İzmir,
- Koca, E., Haznedaroglu, İ. C. Büyükaşık, Y. 2007. Trombosit aktivasyonu. Türk J Cardiol 10; 82-90.
- Koca E, H. İ. C., Büyükaşık Y. 2007. Trombosit aktivasyonu. Türk J Cardiol 10; 82-90.
- Koehl, G. E., Geissler, E. K., Iacobelli, M., Frei, C., Burger, V., Haffner, S., Holler, E., Andreesen, R., Schlitt, H. J. Eissner, G. 2007. Defibrotide: an endothelium protecting and stabilizing drug, has an anti-angiogenic potential in vitro and in vivo. Cancer Biol Ther, 6 (5); 686-90.
- Kohler, H. P. Grant, P. J. 2000. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. N Engl J Med, 342 (24); 1792-801.
- Kornblum, N., Ayyanar, K., Benimetskaya, L., Richardson, P., Iacobelli, M. Stein, C. A. 2006. Defibrotide, a polydisperse mixture of single-stranded phosphodiester oligonucleotides with lifesaving activity in severe hepatic veno-occlusive disease: clinical outcomes and potential mechanisms of action. Oligonucleotides, 16 (1); 105-14.
- Korte, W. 1997. Veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation: is hypercoagulability really part of the problem? Blood Coagul Fibrinolysis, 8 (7); 367-81.
- Kosar, A., Cipil, H. S., Kaya, A., Uz, B., Haznedaroglu, I. C., Goker, H., Ozdemir, O., Ercetin, S., Kirazli, S. Firat, H. C. 2009. The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. Blood Coagul Fibrinolysis, 20 (3); 185-90.
- Kottke-Marchant, K. 2002. Genetic polymorphisms associated with venous and arterial thrombosis: an overview. Arch Pathol Lab Med, 126 (3); 295-304.
- Kruithof, E. K. 1988. Plasminogen activator inhibitors--a review. Enzyme, 40 (2-3); 113-21.
- Kumar, V. Cotran, R. S. 2003. Robbins basic pathology. Philadelphia, Saunders,
- Kurosawa, S., Esmon, C. T. Stearns-Kurosawa, D. J. 2000. The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. J Immunol, 165 (8); 4697-703.
- Kurt, M., Disibeyaz, S., Akdogan, M., Sasmaz, N., Aksu, S. Haznedaroglu, I. C. 2008. Endoscopic application of ankaferd blood stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: a case report. Am J Gastroenterol, 103 (8); 2156-8.
- Kurt, M., Oztas, E., Kuran, S., Onal, I. K., Kekilli, M. Haznedaroglu, I. C. 2009. Tandem oral, rectal, and nasal administrations of Ankaferd Blood Stopper to control profuse bleeding leading to hemodynamic instability. Am J Emerg Med, 27 (5); 631 e1-2.
- Kwaan, H. C., Keer, H. N., Radosevich, J. A., Cajot, J. F. Ernst, R. 1991. Components of the plasminogen-plasmin system in human tumor cell lines. Semin Thromb Hemost, 17 (3); 175-82.

- Lasne, D., Donato, J., Falet, H., Rendu, F. 1995. Different abilities of thrombin receptor activating peptide and thrombin to induce platelet calcium rise and full release reaction. *Thromb Haemost*, 74 (5); 1323-8.
- Lee SJ, U. K., Shibamoto T, et al. 2007. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 91; 131-137.
- Leger, A. J., Covic, L., Kuliopulos, A. 2006. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*, 114 (10); 1070-7.
- Li, W., Zheng, X., Gu, J., Hunter, J., Ferrell, G. L., Lupu, F., Esmon, N. L., Esmon, C. T. 2005. Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost*, 3 (7); 1351-9.
- Lichius, J. J., Muth, C. 1997. The inhibiting effects of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. *Planta Med*, 63 (4); 307-10.
- Lijnen, H. R. 2005. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*, 3 (1); 35-45.
- Lijnen, H. R., Collen, D. 1997. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*, 39 (4); 343-50.
- Lijnen, H. R., Van Hoef, B., Umans, K., Collen, D. 2004. Neointima formation and thrombosis after vascular injury in transgenic mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *J Thromb Haemost*, 2 (1); 16-22.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4 (6); 357-62.
- Lobel, P., Schror, K. 1989. Stimulation of vascular prostacyclin and inhibition of platelet function by oral defibrotide in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 80 (1); 69-79.
- Lupu, F., Bergonzelli, G. E., Heim, D. A., Cousin, E., Genton, C. Y., Bachmann, F., Kruithof, E. K. 1993. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb*, 13 (7); 1090-100.
- Ma, L. J., Fogo, A. B. 2009. PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci*, 14; 2028-41.
- Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., Plevin, R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53 (2); 245-82.
- Mann, K. G. 1999. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 82 (2); 165-74.
- Margarethe, G. 2008. "Soluble protein C receptor: why?" *Blood*, 111
- Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M. 2006. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem*, 14 (1); 138-42.
- Medina, P., Navarro, S., Estelles, A., Vaya, A., Bertina, R. M., Espana, F. 2005. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost*, 94 (2); 389-94.
- Mesters, R. M., Florke, N., Ostermann, H., Kienast, J. 1996. Increase of plasminogen activator inhibitor levels predicts outcome of leukocytopenic patients with sepsis. *Thromb Haemost*, 75 (6); 902-7.

- Mitsiades, C. S., Rouleau, C., Echart, C., Menon, K., Teicher, B., Distaso, M., Palumbo, A., Boccadoro, M., Anderson, K. C., Iacobelli, M., Richardson, P. G. 2009. Preclinical studies in support of defibrotide for the treatment of multiple myeloma and other neoplasias. *Clin Cancer Res*, 15 (4); 1210-21.
- Mosnier, L. O., Bouma, B. N. 2006. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (11); 2445-53.
- Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V., Griffin, J. H. 2007. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 109 (8); 3161-72.
- Nagumo, S., Fukuju, A., Takayama, M., Nagai, M., Yanoshita, R., Samejima, Y. 1999. Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by components of licorice root. *Biol Pharm Bull*, 22 (10); 1144-6.
- Nakashima, H., Matsui, T., Yoshida, O., Isowa, Y., Kido, Y., Motoki, Y., Ito, M., Shigeta, S., Mori, T., Yamamoto, N. 1987. A new anti-human immunodeficiency virus substance, glycyrrhizin sulfate; endowment of glycyrrhizin with reverse transcriptase-inhibitory activity by chemical modification. *Jpn J Cancer Res*, 78 (8); 767-71.
- Nantermet, P. G., Barrow, J. C., Lundell, G. F., Pellicore, J. M., Rittle, K. E., Young, M., Freidinger, R. M., Connolly, T. M., Condra, C., Karczewski, J., Bednar, R. A., Gaul, S. L., Gould, R. J., Prendergast, K., Selnick, H. G. 2002. Discovery of a nonpeptidic small molecule antagonist of the human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg Med Chem Lett*, 12 (3); 319-23.
- Ngo, T. H., Hoylaerts, M. F., Knockaert, I., Brouwers, E., Declercq, P. J. 2001. Identification of a target site in plasminogen activator inhibitor-1 that allows neutralization of its inhibitor properties concomitant with an allosteric up-regulation of its antiadhesive properties. *J Biol Chem*, 276 (28); 26243-8.
- Nick, J. A., Coldren, C. D., Geraci, M. W., Poch, K. R., Fouty, B. W., O'Brien, J., Gruber, M., Zarini, S., Murphy, R. C., Kuhn, K., Richter, D., Kast, K. R., Abraham, E. 2004. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood*, 104 (13); 3878-85.
- Nurden, P., Savi, P., Heilmann, E., Bihour, C., Herbert, J. M., Maffrand, J. P., Nurden, A. 1995. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest*, 95 (4); 1612-22.
- Oganesyan, V., Oganesyan, N., Terzyan, S., Qu, D., Dauter, Z., Esmon, N. L., Esmon, C. T. 2002. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem*, 277 (28); 24851-4.
- Oguzulgen, I. K., Yilmaz, E., Demirtas, S., Erkekcol, F. O., Ekim, N., Demir, N., Numanoglu, N., Ozel, D., Ulu, A., Akar, N. 2009. The role of plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism, factor-V-Leiden, and prothrombin-20210 mutations in pulmonary thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15 (1); 73-7.
- Oner, A. F., Dogan, M., Kaya, A., Sal, E., Bektas, M. S., Yesilmen, O., Ayhan, H., Acikgoz, M. New coagulant agent (ankaferd blood stopper) for open hemorrhages in hemophilia with inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost*, 16 (6); 705-7.
- Ossowski, L. 1988. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol*, 107 (6 Pt 1); 2437-45.

- Özel Demiralp D, A. N., Haznedaroğlu İC, Gümüştekin Ç, Göker H. 2008. Ankaferd'in kanama durdurucu etkisinin proteomik analizi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P025 no'lu bildiri, Çeşme, İzmir,
- Özel Demiralp D, A. N., Haznedaroğlu İC, Gümüştekin Ç, Göker H. 2008. Ankaferd'in kanama durdurucu etkisinin proteomik analizi. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, S04 no'lu bildiri, Antalya,
- Paiement, G. 1998. DVT prophylaxis after total joint arthroplasty. *Medscape Orthopaedics and Sports Medicine*, 2; 67.
- Palmer, K. J. Goa, K. L. 1993. Defibrotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders. *Drugs*, 45 (2); 259-94.
- Paul, J. 1970. *Cell and Tissue Culture*. 4th ed., Edinburgh, London,
- Paul, W., Gresele, P., Momi, S., Bianchi, G. Page, C. P. 1993. The effect of defibrotide on thromboembolism in the pulmonary vasculature of mice and rabbits and in the cerebral vasculature of rabbits. *Br J Pharmacol*, 110 (4); 1565-71.
- Pescador, R., Porta, R., Conz, A., Mantovani, M. Prino, G. 1989. Defibrotide decreases cholesterol amount in hypercholesterolemic rabbit aorta, with no modification of plasma or lipoprotein cholesterol. *Life Sci*, 44 (12); 789-97.
- Pescador, R., Porta, R. Ferro, L. 1996. An integrated view of the activities of defibrotide. *Semin Thromb Hemost*, 22 Suppl 1; 71-5.
- Pogliani, E. M., Salvatore, M., Fowst, C., Girardello, R. Marelli, C. 1989. Effects of a defibrotide-heparin combination on some measures of haemostasis in healthy volunteers. *J Int Med Res*, 17 (1); 36-40.
- Poncz, M., Eisman, R., Heidenreich, R., Silver, S. M., Vilaire, G., Surrey, S., Schwartz, E. Bennett, J. S. 1987. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem*, 262 (18); 8476-82.
- Poot A, B. T., Dekker A, Spijkers J, Van Mourik JA, Feijen J, Bantjes A, Van Aken WG. 1992. Dependence of Endothelial Cell Growth on Substrate-Bound Fibronectin. *Clin Mater*, 11; 151-155.
- Qu, D., Wang, Y., Song, Y., Esmon, N. L. Esmon, C. T. 2006. The Ser219-->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost*, 4 (1); 229-35.
- Rana, P. Soni, G. 2008. Antioxidant potential of thyme extract: alleviation of N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*, 27 (3); 215-21.
- Ray, S. D., Kumar, M. A. Bagchi, D. 1999. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch Biochem Biophys*, 369 (1); 42-58.
- Reiner, A. P., Diehr, P., Browner, W. S., Humphries, S. E., Jenny, N. S., Cushman, M., Tracy, R. P., Walston, J., Lumley, T., Newman, A. B., Kuller, L. H. Psaty, B. M. 2005. Common promoter polymorphisms of inflammation and thrombosis genes and longevity in older adults: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis*, 181 (1); 175-83.
- Reinhart, W. H. Nagy, C. 1995. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest*, 25 (7); 523-8.
- Richardson, P. G., Elias, A. D., Krishnan, A., Wheeler, C., Nath, R., Hoppensteadt, D., Kinchla, N. M., Neuberg, D., Waller, E. K., Antin, J. H., Soiffer, R., Vredenburg, J., Lill, M., Woolfrey, A. E., Bearman, S. I., Iacobelli, M., Fareed, J. Guinan, E. C.

1998. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population. *Blood*, 92 (3); 737-44.
- Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M. Ruf, W. 2002. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, 296 (5574); 1880-2.
- Roth, G. J. 1992. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today*, 13 (3); 100-5.
- Rott, D., Leibowitz, D., Finci-Yeheskel, Z., Barak, V., Chajek-Shaul, T., Weiss, T., Levin, M. Urieli-Shoval, S. 2009. The relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels to the ST deviation pattern of acute myocardial infarction. *Cardiology*, 112 (1); 56-9.
- Salomaa, V., Stinson, V., Kark, J. D., Folsom, A. R., Davis, C. E. Wu, K. K. 1995. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*, 91 (2); 284-90.
- Sambrano, G. R., Weiss, E. J., Zheng, Y. W., Huang, W. Coughlin, S. R. 2001. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, 413 (6851); 74-8.
- Saposnik, B., Reny, J. L., Gaussem, P., Emmerich, J., Aiach, M. Gandrille, S. 2004. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood*, 103 (4); 1311-8.
- Saribas, Z., Sener, B., Haznedaroglu, İ. C., Hascelik, G., Kirazli, S. Goker, H. 2010. Antimicrobial Activity of Ankaferd Blood StopperA (R) against Nosocomial Bacterial Pathogens. *Central European Journal of Medicine*, 5 (2); 198-202.
- Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Hung, D. T., Rose, J., Vu, T. K., Wheaton, V. I., Turck, C. W. Coughlin, S. R. 1992. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem*, 267 (19); 13146-9.
- Schalkwijk, C. G. Stehouwer, C. D. 2006. PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy. *Thromb Haemost*, 96 (6); 698-9.
- Schenk, J. F., Stephan, B., Zewinger, S., Speer, T. Pindur, G. 2008. Comparison of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in females with venous thromboembolism during pregnancy or spontaneous abortion. *Clin Hemorheol Microcirc*, 39 (1-4); 329-32.
- Schmalz, G. 1994. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent*, 22 Suppl 2; S6-11.
- Schmalz, G. 1997. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 1 (4); 154-62.
- Schmidt, V. A., Vitale, E. Bahou, W. F. 1996. Genomic cloning and characterization of the human thrombin receptor gene. Structural similarity to the proteinase activated receptor-2 gene. *J Biol Chem*, 271 (16); 9307-12.
- Schneider HJ, H. E., Masuhr T. . 1995. Treatment of benign prostatic hyperplasia: Results of a surveillance study in the practices of urological specialists using a combined plant-based preparation. *Fortschr Med* 113; 37-40.
- Schneiderman, J., Sawdey, M. S., Keeton, M. R., Bordin, G. M., Bernstein, E. F., Dilley, R. B. Loskutoff, D. J. 1992. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (15); 6998-7002.

- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. van der Poll, T. 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 83 (3); 536-45.
- Sevin, G. 2003. Defibrotid İle Tedavinin Tavşan Karatoid Arterinde İntimial Kalınlaşma ve Vasküler Reaktivite Üzerine Etkisi. Doktora Tezi,
- Sharp, J. A. 1977. *An Introduction to Animal Tissue Culture*. The Camelot Press Ltd., Southampton,
- Sheela, M. L., Ramakrishna, M. K. Salimath, B. P. 2006. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol*, 6 (3); 494-8.
- Shiratori, K., Watanabe, S. Takeuchi, T. 1986. Effect of licorice extract (Fm100) on release of secretin and exocrine pancreatic secretion in humans. *Pancreas*, 1 (6); 483-7.
- Stein, C. M., Brown, N., Vaughan, D. E., Lang, C. C. Wood, A. J. 1998. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *J Am Coll Cardiol*, 32 (1); 117-22.
- Stenberg, P. E., Shuman, M. A., Levine, S. P. Bainton, D. F. 1984. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol*, 98 (2); 748-60.
- Stephenson, D. A., Toltl, L. J., Beaudin, S. Liaw, P. C. 2006. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. *J Immunol*, 177 (4); 2115-22.
- Strandberg, L., Lawrence, D. Ny, T. 1988. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem*, 176 (3); 609-16.
- Sturn, D. H., Kaneider, N. C., Feistritz, C., Djanani, A., Fukudome, K. Wiedermann, C. J. 2003. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*, 102 (4); 1499-505.
- Tasdelen Fisgin, N., Tanriverdi Cayci, Y., Coban, A. Y., Ozatli, D., Tanyel, E., Durupinar, B. Tulek, N. 2009. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia*, 80 (1); 48-50.
- Taylor, F. B., Jr., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Ferrell, G., Chang, A. C., Laszik, Z., Kosanke, S., Peer, G. Esmon, C. T. 2000. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood*, 95 (5); 1680-6.
- Tenkanen, L., Manttari, M. Manninen, V. 1995. Some coronary risk factors related to the insulin resistance syndrome and treatment with gemfibrozil. Experience from the Helsinki Heart Study. *Circulation*, 92 (7); 1779-85.
- Tesfamariam, B. 1994. Thrombin receptor-mediated vascular relaxation differentiated by a receptor antagonist and desensitization. *Am J Physiol*, 267 (5 Pt 2); H1962-7.
- Tesfamariam, B., Allen, G. T., Normandin, D. Antonaccio, M. J. 1993. Involvement of the "tethered ligand" receptor in thrombin-induced endothelium-mediated relaxations. *Am J Physiol*, 265 (5 Pt 2); H1744-9.
- Testai, L., Chericoni, S., Calderone, V., Nencioni, G., Nieri, P., Morelli, I. Martinotti, E. 2002. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol*, 81 (1); 105-9.
- Thogersen, A. M., Jansson, J. H., Boman, K., Nilsson, T. K., Weinehall, L., Huhtasaari, F. Hallmans, G. 1998. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*, 98 (21); 2241-7.



- Thomson Healthcare Inc. 2007. Glycyrrhiza glabra. . PDR for Herbal Medicines. , 4th edition. ; 522–530.
- Thomson Healthcare Inc. 2007. Thymus vulgaris. . PDR for Herbal Medicines., 4th edition. ; 846–847.
- Thomson Healthcare Inc. 2007. Thymus vulgaris. . PDR for Herbal Medicines., 4th edition. ; 846–847.
- Turgut, M., Aslan, S., Çelebi, N., Pamuk, F., Haznedaroglu, I. C., Demircan, S., Aktas, A., Kalan, I., Göker, H., Atalar, E., Kirazlı, S. Fırat, H. C. 2008. Kritik kanamaların kontrolünde Ankaferd BloodStopper (ABS) uygulamaları. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, P242 no'lu bildiri, Antalya,
- Ulaş, D. A. K. 2009. Kanama Durdurucu Ajan Ankaferd Blood Stopper'ın Serebral Doku Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi ve Santral Sinir Sisteminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi,
- Ulutin, O. N., Balkuv-Ulutin, S., Ugur, M. S., Ulutin, T., Ozsoy, Y. Cizmeci, G. 1990. The pharmacology and clinical pharmacology of defibrotide: a new profibrinolytic, antithrombotic and anti-platelet substance. *Adv Exp Med Biol*, 281; 429-38.
- van Rossum, T. G., Vulto, A. G., de Man, R. A., Brouwer, J. T. Schalm, S. W. 1998. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, 12 (3); 199-205.
- van Rossum, T. G., Vulto, A. G., Hop, W. C., Brouwer, J. T., Niesters, H. G. Schalm, S. W. 1999. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J Gastroenterol Hepatol*, 14 (11); 1093-9.
- Vaughan, D. E. 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 3 (8); 1879-83.
- Vaya, J., Belinky, P. A. Aviram, M. 1997. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med*, 23 (2); 302-13.
- Vingolo, E. M., De Mattia, G., Giusti, C., Forte, R., Laurenti, O. Pannarale, M. R. 1999. Treatment of nonproliferative diabetic retinopathy with Defibrotide in noninsulin-dependent diabetes mellitus: a pilot study. *Acta Ophthalmol Scand*, 77 (3); 315-20.
- Violi, F., Ferro, D., Saliola, M., Quintarelli, C., Basili, S. Balsano, F. 1992. Effect of oral defibrotide on tissue-plasminogen activator and tissue-plasminogen activator inhibitor balance. *Eur J Clin Pharmacol*, 42 (4); 379-83.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. Coughlin, S. R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 (6); 1057-68.
- Vu, T. K., Wheaton, V. I., Hung, D. T., Charo, I. Coughlin, S. R. 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, 353 (6345); 674-7.
- Weiss, H. J. 1975. Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts). *N Engl J Med*, 293 (11); 531-41.
- Weitz, J. I. 1997. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med*, 337 (10); 688-98.
- Wiman, B. Collen, D. 1978. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*, 272 (5653); 549-50.
- Wiman, B. Hamsten, A. 1990. The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost*, 16 (3); 207-16.
- Xue, M., Campbell, D., Sambrook, P. N., Fukudome, K. Jackson, C. J. 2005. Endothelial protein C receptor and protease-activated receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. *J Invest Dermatol*, 125 (6); 1279-85.

- Yalcindag, F. N., Batioglu, F., Ozdemir, O., Cansizoglu, E., Egin, Y. Akar, N. 2008. Soluble endothelial protein C receptor levels in Behcet patients with and without ocular involvement. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246 (11); 1603-8.
- Yamakoshi, J., Kataoka, S., Koga, T. Ariga, T. 1999. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 142 (1); 139-49.
- Ye, X., Krohn, R. L., Liu, W., Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., McGinn, T. R., Bagchi, M., Preuss, H. G., Stohs, S. J. Bagchi, D. 1999. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 196 (1-2); 99-108.
- Yılmaz E, G., S, Haznedaroglu IC, Akar N. . 2010. The effects of Ankaferd Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and erythrocyte protein profile. *Turk J Hematol*;in press,
- Zern, T. L. Fernandez, M. L. 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*, 135 (10); 2291-4.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y. Agarwal, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20 (9); 1737-45.
- Zhou, Q., Chu, X. Ruan, C. 1994. Defibrotide stimulates expression of thrombomodulin in human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 71 (4); 507-10.
- Zhu, Y., Carmeliet, P. Fay, W. P. 1999. Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance. *Circulation*, 99 (23); 3050-5.

## **EKLER:**

Bu tez çalışması sonucunda iki bilimsel yayın ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri “Turkish Journal of Hematology” dergisi tarafından kabul edilmiş olup, basım aşamasındadır. Diğeri ise “Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis” dergisine kabul edilmiş olup, 21406410 nolu pubmed ID’si ile pubmed’de yer almıştır.

**TJH-90277** (Kabul edildi, basım aşamasında)

## **DUAL DIVERSE DYNAMIC REVERSIBLE ACTIONS OF ANKAFERD ON *EPCR* AND *PAI-1* INSIDE VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS WITH AND WITHOUT LPS**

**Afife Karabıyık<sup>1</sup>, Erkan Yılmaz<sup>1</sup>, Şükrü Güleç<sup>1</sup>, İbrahim Haznedaroğlu<sup>2</sup>, Nejat Akar<sup>1</sup>**

1.Department Of Pediatric Molecular Genetics, Ankara University, Ankara, Turkey

2.Department Of Hematology, Hacettepe University, Ankara, Turkey

**OBJECTIVE:** Ankaferd Blood Stopper (ABS) comprises a mixture of the plants *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica*. ABS has been used as a topical haemostatic agent because of its antihaemorrhagic effect. Its haemostatic mechanism of action remains to be investigated. ABS does not affect individual levels of the coagulation factors II, V, VII, VIII, IX, X, XI and XIII. The aim of this study was to investigate the effects of ABS on endothelium and immune response. So, we investigated the possible changes in *EPCR* and *PAI-1* without and with LPS-challenge inside HUVECs.

**METHODS:** 10 µL and 100 µL ABS is given to HUVECs in 5 min., 25 min., and 50 min., 6 hour and 24 hour time periods. 10 µg/ mL LPS has been added for one hour to observe the effects of LPS challenge on HUVECs and then the cells have been treated with ABS for the time period of 5 min., 25 min., 50 min. and 6 hours to observe ABS-effects on HUVECs. Total RNAs were isolated from HUVECs and then *EPCR* ve *PAI-1* mRNA expression levels were investigated.

**RESULTS:** It was microscopically observed that cells arised from the surface and adhered to each other after the ABS application to the HUVECs. Also, after 24 hours cells returned the normal growth and physiology. It suggests that the adhesive cellular functions of ABS

may be reversible. 10 µl ABS have negative effect on EPCR and PAI-1 expressions. Moreover the effects increases with 100 µl ABS. EPCR and PAI-1 expression increased by time with LPS and 10 µl ABS. Expressions were very low during the first hour when LPS and 100 µl ABS were given but at the end of 6 hour, EPCR and PAI-1 expression increased similar to LPS and 10 µl ABS experiment.

**CONCLUSION:** In this study, we observed that Ankaferd has dual diverse dynamic reversible actions depend on dose and concentration on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells in the model of HUVEC. ABS might have a role on numerous cellular mechanisms as well as its hemostatic actions.

## **INTRODUCTION**

Ankaferd Blood Stopper (ABS) is a unique medicinal plant extract, which has historically been used as a hemostatic agent in Turkish folkloric medicine among other traditional methods [1,2]. ABS comprises a standardized mixture of the plants *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* and *Urtica dioica*. After numerous preclinical experiments [3-7] and a clinical Phase I study [8], ABS as a medicinal product has been approved in the management of external hemorrhage, post-dental surgery and bleedings refractory to conventional anti-hemorrhagic measurements in Turkey [9-16]. The basic mechanism of action for ABS is the formation of an encapsulated protein network that provides focal attachment points for very rapid (< 1 sec.) vital erythrocyte aggregation, which known as the hemostatic “ABS-web” [1,17]. *Ankaferd*-induced protein network formation with blood cells particularly erythrocytes covers the primary and secondary hemostatic system without disturbing individual coagulation factors [1,5,7,17]. ABS also has anti-infective and anti-neoplastic actions [18-20]. There are distinct important molecular components of the *Ankaferd*-induced hemostatic network involving vascular endothelium, proteins, and blood cells [17,21-24].

Endothelial Protein C Receptor (EPCR) is involved in numerous hemostatic, vascular, and immunological actions [25-33]. Likewise, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a very important biological mediator for fibrinolysis, infection, neoplasia, obesity and wound healing [34-36].

The aim of this report is to search intracellular effects of ABS inside vascular endothelial cells in the context of EPCR and PAI-1. Potentially, in the area of ABS application, those molecules could be the novel administrators in the center of the Ankaferd-induced pleiotropic effects. Human Umbilical Vein Endothelial Cells served as the vascular platform in this search. Lipopolysaccharides (LPS) are large molecules acting as endotoxins and elicit strong immune responses within the vascular system [37]. "LPS challenge" refers to the process of exposing a biological environment to an LPS which may act as a toxin to test immunological and hemostatic responses. Hence, in order to investigate the effects of ABS on the endothelium and possible changes in EPCR and PAI-1 without and with "LPS-challenge" inside HUVEC were aimed in this present study.

## **MATERIALS AND METHODS**

In this study, the effects of ABS over EPCR and PAI-1 without and with "LPS-challenge" inside the human umbilical vein endothelium are examined. For this purpose ABS, 10  $\mu$ L and 100  $\mu$ L, is given to HUVECs (in 75  $\text{cm}^2$ ; ~75% fullness), in 5 minutes (min), 25 min., 50 min, 6 hours (h) ve 24 h time periods. Nucleus isolated from HUVECs and the expression levels of EPCR and PAI-1 were determined (Roche Light Cycler 1.5, Basel, Swiss). For expression analysis fleureusans marked primers for EPCR and PAI-1 were used. Water with a pH of 2 (likely to be a similar pH of ABS) was used as a control.

Furthermore, to observe the effects of "LPS challenge" on HUVEC and ABS-effects on HUVEC, 10  $\mu$ g/ mL LPS (Sigma, Germany) has been added for one hour to the test platform. Then, the cells have been administered ABS for the time period of 5 min., 25 min., 50 min., 6 h to measure ABS-induced EPCR and PAI-1 expressions in relation to LPS. All experiments were repeated at least two times.

Statistic; Two-way ANOVA statistical tests analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00; GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>.

## **RESULTS**

Consequently, it is microscopically observed that the cells arise from the plastic surface and adhere to each other, during the ABS application to the HUVECs. It is observed that, after 24 hours cells returned to normal growth and function suggesting that adhesive

cellular functions of ABS are reversible and could turn to baseline upon a given passed time after its exposure.

100  $\mu$ l ABS have negative effect on PAI-1 and EPCR expression in 24 hour time scale. (Figure 1-2), (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). However, this negative effect was not observed in 10  $\mu$ l ABS treated samples. Those findings indicated that dose-dependent effects of ABS rely on the PAI-1 and EPCR gene expressions.

When LPS was given alone to HUVEC, LPS increases EPCR and PAI-1 expression compared to those without LPS addition (data is not shown). When LPS and 10  $\mu$ l and 100  $\mu$ l ABS were given, it was observed that PAI-1 expression level were stable around control level in 6th hour period (Figure 3), However when LPS and 10  $\mu$ l and 100  $\mu$ l ABS were given, the expression of EPCR was very low during the first hour but its expression increased at the end of the 6th hour (Figure 4), (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

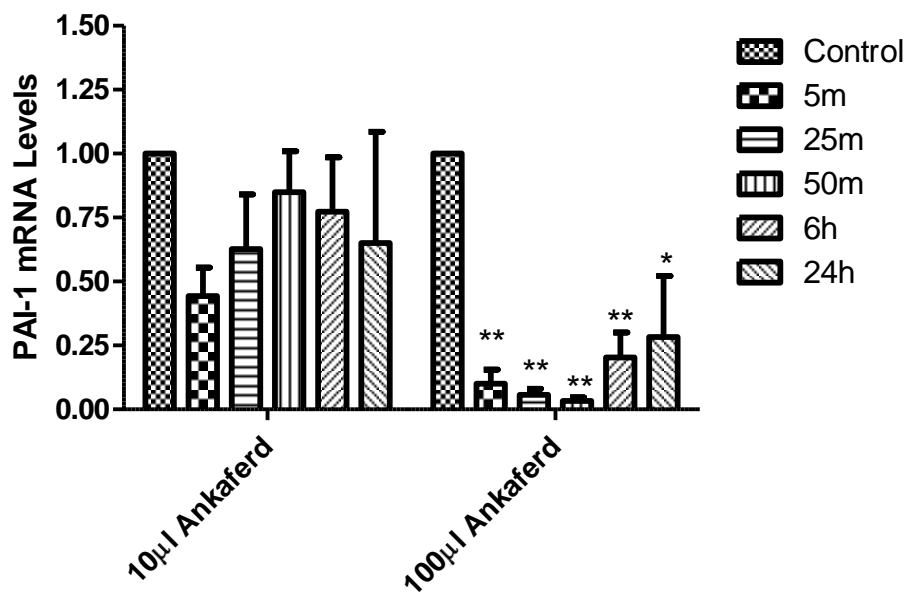


Figure 1: 10  $\mu$ L and 100  $\mu$ L Ankaferd effect on PAI-1 mRNA expressions at 5 min., 25 min., 50 min., 6 hour, and 24 hour (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

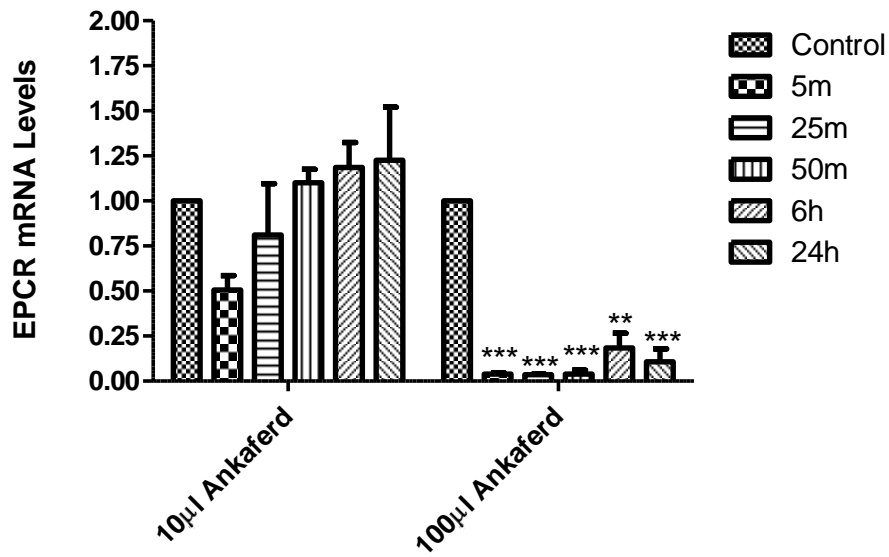


Figure 2: 10 µL and 100 µL Ankaferd effect on EPCR mRNA expressions at 5 min., 25 min., 50 min., 6 hour, and 24 hour ( \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

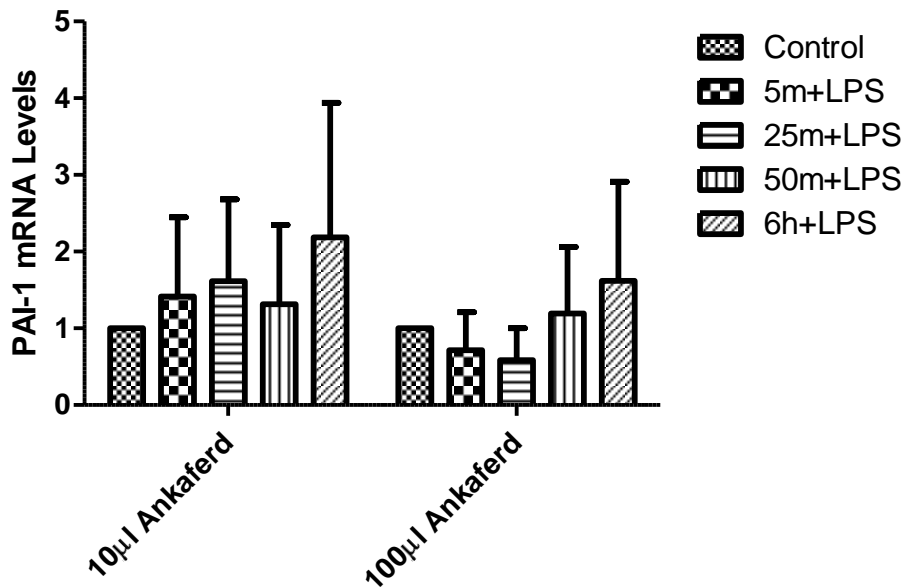


Figure 3: Effect of LPS and 10 µL and 100 µL Ankaferd concomitantly on PAI-1 mRNA expressions at 5 min., 25 min., 50 min., 6 hour.

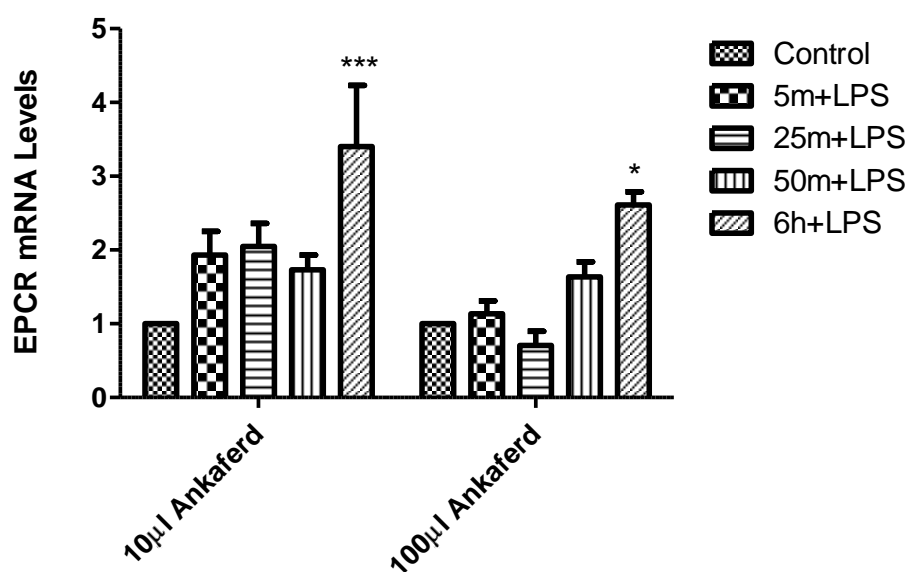


Figure 4: Effect of LPS and 10 µL and 100 µL Ankaferd concomitantly on EPCR mRNA expressions at 5 min., 25 min., 50 min., 6 hour (\* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001).

## DISCUSSION

In this study, we observed that Ankaferd has dual diverse dynamic reversible actions on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells in the model of HUVEC. Immediate enhanced expression of pro-hemostatic PAI-1 and down-regulated anti-coagulant EPCR upon the exposure of ABS are compatible with the sudden anti-hemorrhagic efficacy of Ankaferd previously tested in experimental [3-7] and clinical backgrounds [8-10,13-15,20]. Topical hemostatic efficacy of ABS has been previously tested in animals with normal [4,6] and defective hemostasis [5,7]. Experimental studies have set the preclinical stage for the development of this hemostatic product. Short-term hematological and biochemical safety of the oral systemic administration of Ankaferd to rabbits have been shown [3]. Acute mucosal toxicity, hematotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, and biochemical toxicity were not observed during the short-term follow-up of the animals [3]. Those preclinical results reflect a starting point to search any possible systemic confounding effect of ABS when applied to internal topical surfaces. The usage of ABS as a hemostatic agent in external hemorrhages and in dental treatment in humans constitutes the first hints on ABS's safety and efficacy in humans [8]. A phase I double-blinded, randomized, cross-over, placebo-controlled clinical study with a 5 days' wash-out period



between the cross-over periods in healthy volunteers indicated the safety of ABS. Physiological cell-based coagulation could be clinically managed via topical ABS application to prevent and treat bleeding in many distinct clinicopathological states [8-10,13-15,20]. There are distinct important molecular components of the Ankaferd-induced hemostatic network. Vital erythroid aggregation takes place with the spectrin ankryn and actin proteins on the membrane of red blood cells. Essential erythroid proteins (Ankryn recurrent and FYVE bundle containing protein 1, Spectrin alpha, Actin-depolymerisation factor, Actin-depolymerizing factor, LIM bundle and actine binding subunit 1 isoform a, LIM bundle and actine binding subunit 1 isoform b, NADP-dependent malic enzyme, NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex, Mitochondrial NADP (+) dependent malic enzyme 3, Ribulose biphosphatecarboxylase large chain, Maturase K) and the required ATP bioenergy (ATP synthase, ATP synthase beta subunit, ATP synthase alpha subunit, ATP-binding protein C12, TP synthase H<sup>+</sup> transporter protein, ADF, Alpha-1,2-glycosyltransferase ALG10-A) are included in the protein library of Ankaferd. Ankaferd also upregulates GATA/FOG transcription system affecting erythroid functions and urotensin II [21,23,24].

Initial vascular dynamic response to ABS is vasoconstriction while the late effect is vasodilatation [22]. The controlling of clinical critical bleeding states associated with deficiencies of either primary or secondary hemostasis have been previously examined [13, 38]. The patients with bleeding diathesis about controlling critical bleedings that could not be controlled with standard anti-hemorrhagic methods, with topical ABS are presented in several reports [9,13,16,38]. Our results in this study may provide further insight that ABS could also affect vascular anticoagulant (namely EPCR) and antifibrinolytic (namely PAI-1) pathways in a balanced way to regulate hemostasis even in individuals with clotting defects.

Ankaferd, besides its hemostatic activity, may also inhibit the growth of bacteria [19]. Anti-infectious activity of Ankaferd may represent an advantage over its current clinical use, since it inhibits the growth of bacteria in the area used mainly for its hemostatic activity such as traumatic infected wounds. The antimicrobial activity of Ankaferd was tested against many pathogens. The isolates included *A.baumannii*, *E.coli*, *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus*, vancomycin susceptible *Enterococcus* and VRE. Antibacterial activities of Ankaferd against several gram positive and gram negative food

and human pathogens, were also reported in another study [18]. The mechanism of action regarding the anti-infective effects of ABS is currently unknown. EPCR is an important molecule in the regulation of biological responses to severe infection [25,39]. LPS-induced endotoxemia requires the enzymatic active site of EPCR and PAR-1 [39]. In this study, we observed that ABS up-regulates the expressions of EPCR and PAI-1 in the presence of “LPS challenge”. Anti-infective actions of ABS may be related to its hemostatic functions affecting distinct steps of coagulation and vascular endothelium.

Preliminary observations disclosed that ABS may have a “wound healing” function in different clinical states, such as infected dental areas, rectal ulcers, or neoplastic lesions [12,14,17]. PAI-1 has some functions for preserving the tissue and wound repair [34,35]. Over-expressed PAI-1 upon the exposure of ABS in our present study represents an initial clue to set further experiments to search the importance of fibrinolysis regulators in the biological effects of ABS. PAI-1 is also involved in tumor responses [39-41]. In a case series, ABS has topically inhibited tumor angiogenesis [20], prothrombotic affect of PAI-1 in this respect shall also be further searched based on the observation in this study.

In summary, ABS has dual de novo affects on EPCR and PAI-1 in HUVEC cellular model. “LPS challenge” to HUVEC causes ABS-induced up-regulations in the expressions of EPCR and PAI-1 indicate that Ankaferd may act as a topical biological response modifier. Since ABS is currently being developed in basic and clinical grounds, those novel observations cast future studies focusing on the pleiotropic effects of this unique hemostatic agent.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

All of the authors had no "conflict of interest". "Ankaferd blood stopper" vials were supplied from the firm, Ankaferd Drug Inc., Istanbul-TURKEY.

## **REFERENCES**

1.Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, Firat HC: Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract ankaferd blood stopper. J Int Med Res 2008;36:163-170.

2. Haznedaroglu IC: Time to take a healthier view of history. *Nature* 1998;396:108.
3. Bilgili H, Captug O, Kosar A, Kurt M, Kekilli M, Shorbagi A, Kurt OK, Ozdemir O, Goker H, Haznedaroglu I: Oral systemic administration of ankaferd blood stopper has no short-term toxicity in an in vivo rabbit experimental model. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 Jul 14. [Epub ahead of print].
4. Bilgili H, Kosar A, Kurt M, Onal IK, Goker H, Captug O, Shorbagi A, Turgut M, Kekilli M, Kurt OK, Kirazli S, Aksu S, Haznedaroglu IC: Hemostatic efficacy of ankaferd blood stopper in a swine bleeding model. *Med Principl Pract* 2009;18:165-169.
5. Cipil H, Kosar A, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, Ozdemir O, Koroglu M, Kirazli S, Firat H: In vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract ankaferd blood stopper in rats pretreated with warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:270-6
6. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Ustun H, Germiyanoglu C: Hemostatic role of a folkloric medicinal plant extract in a rat partial nephrectomy model: Controlled experimental trial. *J Urol* 2009;181:2349-2354.
7. Kosar A, Cipil HS, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, Ozdemir O, Ercetin S, Kirazli S, Firat HC: The efficacy of ankaferd blood stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20:185-190.
8. Firat H, Ozdemir O, Kosar A, Goker H, Haznedaroglu I: Annual review of ankaferd 08-09. Istanbul, Naviga Scientific Publications, 2009: pp. 1-175.
9. Arslan S, Haznedaroglu IC, Oz B, Goker H: Endobronchial application of ankaferd blood stopper to control profuse lung bleeding leading to hypoxemia and hemodynamic instability. *Resp Med* 2009;2:144-146
10. Dogan OF, Ozyurda U, Uymaz OK, Ercetin S, Haznedaroglu I: New anticoagulant agent for CABG surgery. *Eur J Clin Invest* 2008;38:341.
11. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Germiyanoglu C: Hemostasis in retropubic radical prostatectomy with ankaferd bloodstopper: A case report. *Kaohsiung J Med Sci* 2009;25:445-447.
12. Ibis M, Kurt M, Onal IK, Haznedaroglu IC: Successful management of bleeding due to solitary rectal ulcer via topical application of ankaferd blood stopper. *J Altern Complement Med* 2008;14:1073-1074.
13. Kurt M, Akdogan M, Onal IK, Kekilli M, Arhan M, Shorbagi A, Aksu S, Kurt OK, Haznedaroglu IC: Endoscopic topical application of ankaferd blood stopper for neoplastic gastrointestinal bleeding: A retrospective analysis. *Dig Liver Dis* 2010;42:196-9.

- 14.Kurt M, Disibeyaz S, Akdogan M, Sasmaz N, Aksu S, Haznedaroglu IC: Endoscopic application of ankaferd blood stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: A case report. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2156-2158.
- 15.Kurt M, Kacar S, Onal IK, Akdogan M, Haznedaroglu IC: Ankaferd blood stopper as an effective adjunctive hemostatic agent for the management of life-threatening arterial bleeding of the digestive tract. *Endoscopy* 2008;40 Suppl 2:E262.
- 16.Oner A, Dogan M, Kaya A, Sal E, Bektas MS, Yesilmen O, Ayhan H, Acikgoz M: New coagulant agent (ankaferd blood stopper) for open hemorrhages in hemophilia with inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 June 14. [Epub ahead of print].
- 17.Haznedaroglu B, Haznedaroglu IC, Walker SL, Bilgili H, Göker H, Koşar A, Aktas A, Captuğ Ö, Kurt M, Özdemir O, Kirazlı Ş, Fırat HC: Ultrastructural and morphological analyses of the in vitro and in vivo hemostatic effects of ankaferd blood stopper. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 Oct 14. [Epub ahead of print].
- 18.Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroglu I, Goker H, Aksu S, Kirazli S, Fırat H: In vitro anti-bacterial activities of ankaferd blood stopper. *Int J Lab Hematol* 2008;30:95.
- 19.Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N: Antimicrobial activity of plant extract ankaferd blood stopper. *Fitoterapia* 2009;80:48-50.
- 20.Turhan N, Kurt M, Akdogan M, Haznedaroglu I: Topical ankaferd blood stopper administration to bleeding gastrointestinal carcinomas can decrease tumor vascularization. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2874-7.
- 21.Demiralp DO, Haznedaroglu IC, Akar N: Functional proteomics of ankaferd blood stopper. *Turkish Journal of Hematology* 2010 (in press).
- 22.Aktas A, Er N, Onur MA: Effects of ankaferd blood stopper on vascular response in rat carotid artery. *UHOD Int J Hematol Oncol* 2010 (in press).
- 23.Haznedaroglu IC: Molecular basis of the pleiotropic effects of ankaferd blood stopper. *IUBMB Life* 2009;61:290.
- 24.Yılmaz E, Gulec S, Haznedaroglu IC, Akar N: Effects of ankaferd on huvec transcription factors and erythrocyte protein profile: *Turkish Journal of Hematology* (submitted)
- 25.Esmon CT: The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol.* 2006 Sep;13(5): 382-5.

26. Akar N, Gokdemir R, Ozel D, Akar E: Endothelial cell protein c receptor (EPCR) gene exon iii, 23 bp insertion mutation in the turkish pediatric thrombotic patients. *Thromb Haemostas* 2002;88:1068-1069.
27. Eroglu A, Ulu A, Kurtman C, Cam R, Akar N: 23-bp endothelial protein c receptor (EPCR) gene insertion mutation in cancer patients with and without thrombosis. *Am J Hematol* 2006;81:220.
28. Kendirli T, Ince E, Ciftci E, Dogru U, Egin Y, Akar N: Soluble endothelial protein c receptor level in children with sepsis. *Pediatr Hematol Oncol* 2009;26:432-438.
29. Orhon FS, Ergun H, Egin Y, Ulukol B, Baskan S, Akar N: Soluble endothelial protein C receptor levels in healthy population. *J Thromb Thrombolysis* 2010;29:46-51.
30. Ulu A, Gunal D, Tiras S, Egin Y, Deda G, Akar N: EPCR gene a3 haplotype and elevated soluble endothelial protein c receptor (sEPCR) levels in Turkish pediatric stroke patients. *Thromb Res* 2007;120:47-52.
31. Yalcindag FN, Batioglu F, Ozdemir O, Cansizoglu E, Egin Y, Akar N: Soluble endothelial protein c receptor levels in behcet patients with and without ocular involvement. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:1603-1608.
32. Sipahi T, Kara A, Kuybulu A, Egin Y, Akar N: Congenital Thrombotic Risk Factors in Beta-Thalassemia. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15:581-4.
33. Yürürer D, Teber S, Deda G, Egin Y, Akar N: The Relation Between Cytokines, Soluble Endothelial Protein C Receptor, and Factor VIII Levels in Turkish Pediatric Stroke Patients. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15:545-51.
34. Ozturk MA, Ertenli I, Kiraz S, Haznedaroglu, IC, Celik I, Kirazli S, Calguneri M: Plasminogen activator inhibitor-1 as a link between pathological fibrinolysis and arthritis of Behcet's disease. *Rheumatol Int* 2004;24:98-102.
35. Providence KM, Higgins PJ: PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *J Cell Physiol* 2004;200:297-308.
36. Oguzulgen IK, Yilmaz E, Demirtas S, Erkekol FO, Ekim N, Demir N, Numanoglu N, Ozel D, Ulu A, Akar N: The role of plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism, factor-V-Leiden, and prothrombin-20210 mutations in pulmonary thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15:73-7.
37. Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR: Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ Health* 2006;5:7.

38. Turgut M, Tutkun F, Çelebi N, Muğlalı M, Goker H, Haznedaroglu IC: Topical ankaferd bloodstopper in the management of critical bleedings due to hemorrhagic diathesis. UHOD Int J Hematol Oncol 2010 (in pres).
39. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H: Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. J Exp Med 2007;204:2439-2448.
40. Angenete E, Langenskiold M, Palmgren I, Falk P, Oresland T, Ivarsson ML: Upa and PAI-1 in rectal cancer--relationship to radiotherapy and clinical outcome. J Surg Res 2009;153:46-53.
41. Fabre-Guillevin E, Malo M, Cartier-Michaud A, Peinado H, Moreno-Bueno G, Vallee B, Lawrence DA, Palacios J, Cano A, Barlovatz-Meimon G, Charriere-Bertrand C: PAI-1 and functional blockade of snail in breast cancer cell migration. Breast Cancer Res 2008;10:100.

Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis (PMID: 21406410):

**REVERSIBLE PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 1 (PAR-1) DOWN-REGULATION MEDIATED BY ANKAFERD BLOOD STOPPER (ABS) INDUCIBLE WITH LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) INSIDE THE HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVEC)**

**Afife Karabıyık<sup>1</sup>, Şükrü Güleç<sup>1</sup>, Erkan Yılmaz<sup>1</sup>, İbrahim Haznedaroğlu<sup>2</sup>, Nejat Akar<sup>1</sup>**

1. Department Of Pediatric Molecular Genetics, Ankara University, Ankara, Turkey

2. Department Of Hematology, Hacettepe University, Ankara, Turkey

**ABSTRACT**

Ankaferd Blood Stopper (ABS) is a novel topical hemostatic agent with pleiotropic actions indicated in clinical hemorrhages. Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is located in the

crossroads of hemostasis, inflammation, infection, apoptosis and tumorigenesis. ABS-induced formation of the protein network with vital erythroid aggregation covers the entire physiological hemostatic process. The aim of this study is to assess the effects of ABS on PAR-1 in the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) model, in relation to the “lipopolysaccharides (LPS)-challenge” to endothelium. For this purpose, ABS 10  $\mu$ L and 100  $\mu$ L, had been applied to HUVEC within the time periods of 5 minutes (min), 25 min, 50 min, 6 hours (h) and 24 h. The cells have lifted from the plastic surface and adhered to each other during the ABS application to the HUVECs. After 24 hours the cells returned to normal baseline level. We observed dose-dependent reversible PAR-1 down-regulation mediated by ABS inside the human umbilical vein endothelial cells. ABS induced sustained PAR-1 down-regulation in the presence of LPS. Those findings indicated that ABS hemostatic agent may act as a topical biological response modifier by acting on PAR-1 at the vascular endothelial and cellular level.

## **KEY WORDS**

Ankaferd Blood Stopper (ABS), Protease-activated receptor 1 (PAR-1), Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), Hemostasis, Thrombosis

## **INTRODUCTION**

Protease-activated receptor 1 (PAR-1), activated by the action of serine proteases such as thrombin, enables cells to detect, and therefore respond to proteases present in the local microenvironment (1-3). Endothelial PARs have pleiotropic actions contributing to the hemostasis, coagulation, pro-inflammatory responses, and participate in the regulation of vascular dynamics, contraction, cellular proliferation, hypertrophy, angiogenesis, and neoplasia (1, 4-10).

Ankaferd Blood Stopper (ABS), a novel topical hemostatic agent, is indicated in clinical hemorrhages, when the conventional control of bleeding by ligature and/or conventional hemostatic measures is ineffective (11-15). ABS-induced formation of the protein network with vital erythroid aggregation covers the entire physiological hemostatic process (16-18). Erythroid aggregation in relation to the topical ABS application takes place with the spectrin and ankrin receptors on the surface of red blood cells. Those erythroid proteins and the required ATP bioenergy are included in the ABS protein library (19). Ankaferd also upregulates GATA/FOG transcription system affecting erythroid functions (20). Urotensin II is also an essential component of Ankaferd and represents the link between injured vascular endothelium, adhesive proteins, and active erythroid cells (18, 19, 21, 22). Three ABS phase III studies with ABS (11, 13, 14) performed in vascular port insertion bleedings, anterior epistaxis, and post-tonsillectomy hemorrhages have lead to its approval as a hemostatic agent in Turkey and Bosnia-Herzegovina. Bleeding control by ABS in the settings of gastrointestinal disorders (23-33) and mediastinal bleedings (12, 34) shed further light on its hemostatic efficacy. ABS also has pleiotropic cellular actions (17, 22) acting on anti-infective (35, 36), wound healing (21, 30, 33, 37), vascular dynamics (38), and apoptotic processes (39).

We have previously investigated the effects of ABS on two important endothelial hemostatic molecules, Endothelial Protein C Receptor (EPCR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (23). We observed that ABS has dual diverse dynamic reversible actions on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells in the model of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Immediate enhanced expression of pro-hemostatic PAI-1 and down-regulated anti-coagulant EPCR upon the exposure of ABS were compatible with the sudden anti-hemorrhagic efficacy of Ankaferd.



Lipopolysaccharides (LPS), large molecules acting as endotoxins and elicit strong immune responses, application to HUVEC caused ABS-induced up-regulations in the expressions of EPCR and PAI-1 indicating that ABS could act as a topical biological response modifier (23). EPCR (8) and PAI-1 (1) molecules are considered as the associates of PAR-1 in numerous pathobiological occasions.

The aim of this study is to assess the effects of ABS on PAR-1 in the HUVEC model, in relation to the “LPS-challenge” to endothelium. PAR-1 is located in the crossroads of hemostasis, inflammation, infection, apoptosis and tumorigenesis (1, 4, 6, 40-45). The hypothesis of the study, therefore, was that pleiotropic profile of ABS could be ascribed to ABS actions on the pleiotropic molecule PAR-1.

## **MATERIALS AND METHODS**

In this study, the effects of ABS over PAR-1 inside the human umbilical vein endothelium with the presence and absence of “LPS-challenge” have been examined. For this purpose, ABS 10  $\mu$ L and 100  $\mu$ L, had been applied to the human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, (in 75  $\text{cm}^2$ ; ~75% fullness) within the time periods of 5 minutes (min), 25 min, 50 min, 6 hours (h) and 24 h. Nucleus isolated from HUVECs and then the expression levels of PAR-1 mRNA were determined (Roche Light Cycler 1.5, Basel, Swiss). For the expression analysis, fluorescent marked primers for PAR-1 were used. The water with a pH of 2, which was likely to be a similar pH of ABS, was used as a control.

Furthermore, to observe the effects of "LPS challenge" on HUVEC and ABS-effects on HUVEC, 10  $\mu$ g/ mL LPS (Sigma, Germany) has been added for one hour to the test

platform. Then, the cells have been administered ABS for the time period of 5 min, 25 min, 50 min, and 6 h to assess ABS-induced PAR-1 expressions in relation to LPS. All experiments were repeated at least two times.

Statistical analyses of the results were performed with two-way ANOVA test, via using the GraphPad Prism version 5.00; GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>.

## **RESULTS**

Consequently, it is microscopically observed that the cells arise from the plastic surface and adhere to each other, during the ABS application to the HUVECs. It is observed that, after 24 hours cells returned to normal growth and function suggesting that adhesive cellular functions of ABS are reversible and could turn to baseline upon a given passed time after its exposure.

The effects of ABS on PAR-1 inside the human umbilical vein endothelium without and with “LPS-challenge” were depicted in Figures 1 and 2. Low dose ABS, 10  $\mu$ l, had negative effect on PAR-1 mRNA expression. However within 24 hours, PAR-1 recovered to the baseline level in this setting (Figure 1A). The same PAR-1 down-regulatory effect existed with relatively high dose of ABS, 100  $\mu$ l (Figure 1B). Decrements in the PAR-1 expression were prominent with this dose of ABS. Moreover, PAR-1 mRNA down-regulation was not fully recovered within 24 hours.

When LPS and 10  $\mu$ l ABS were simultaneously applied to HUVEC, PAR-1 expressions were also decreased by time (Figure 2). However, when LPS and 100  $\mu$ l ABS were given together, PAR-1 expressions were lower during the first hour and at the end of 24

hours. The PAR-1 expressions upon exposure of ABS more significantly decreased with LPS plus high dose ABS, in comparison to LPS plus 10  $\mu$ l ABS experiment (Figure 2).

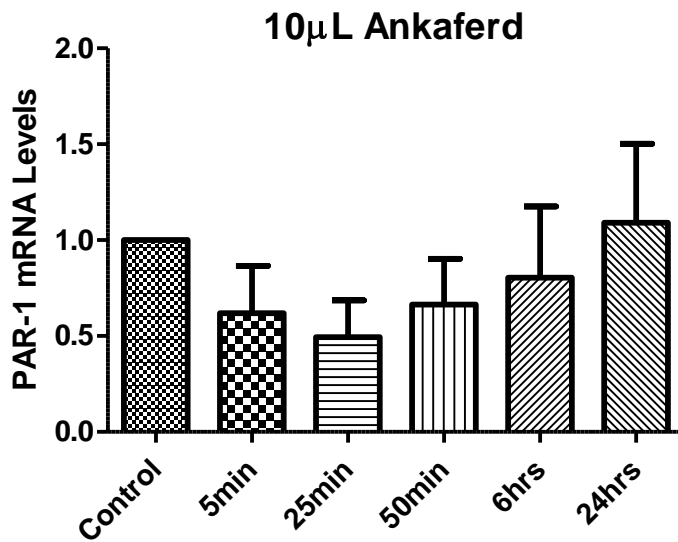
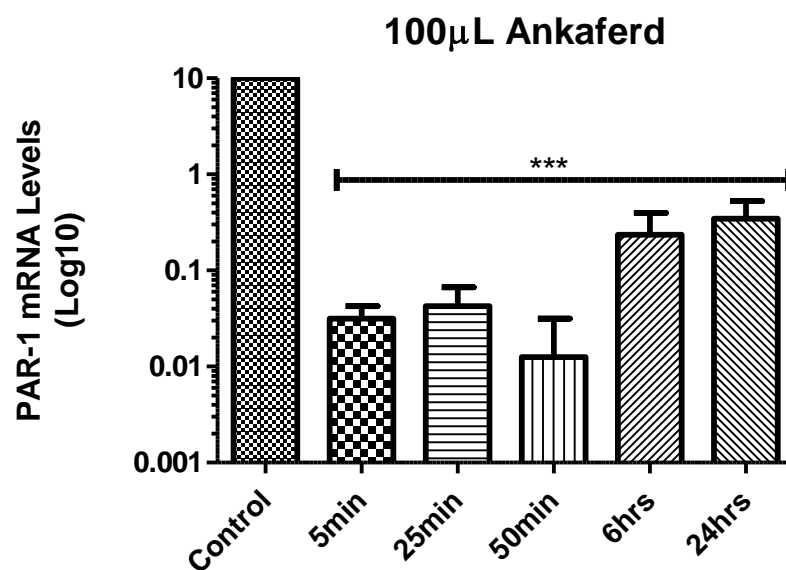
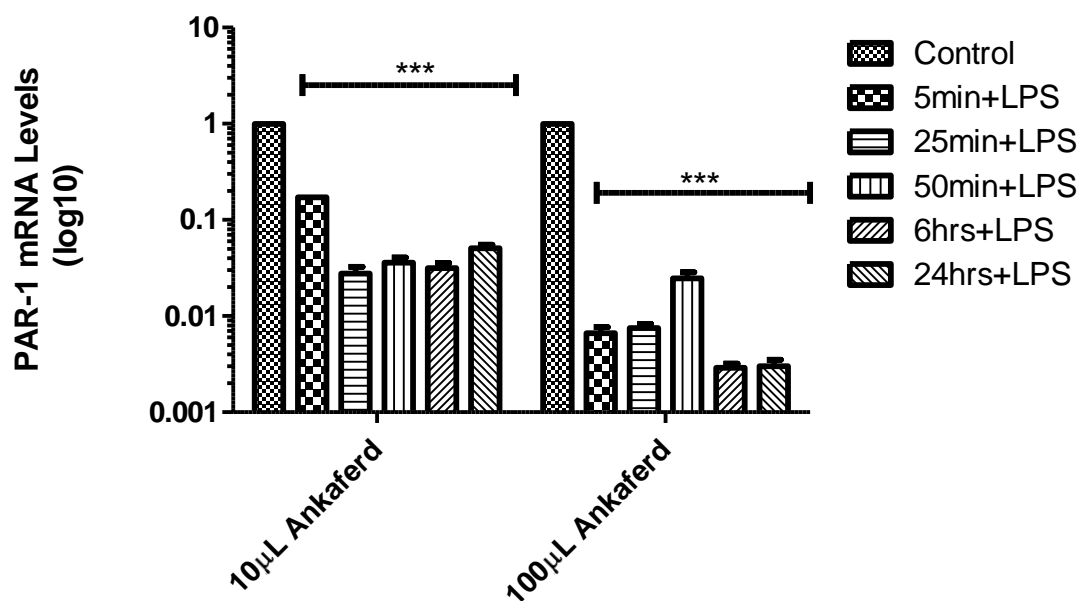


Figure 1A. Effects of 10  $\mu$ L Ankaferd on PAR-1 mRNA expressions in HUVEC after 5 min, 25 min, 50 min, 6 hours and 24 hours



**Figure 1B:** . Effects of 10  $\mu$ L Ankaferd on PAR-1 mRNA expressions in HUVEC after 5 min, 25 min, 50 min, 6 hours and 24 hours



**Figure 2:** Effects of 10  $\mu$ L and 100  $\mu$ L Ankaferd on PAR-1 mRNA expressions in HUVEC following the LPS application after 5 min, 25 min, 50 min, 6 hours and 24 hours

## DISCUSSION

In this study, we observed dose-dependent reversible PAR-1 down-regulation mediated by ABS inside the human umbilical vein endothelial cells. ABS induced sustained PAR-1 down-regulation in the presence of LPS. Those findings are compatible with our previous investigation focusing on the endothelial hemostatic molecules, EPCR and PAI-1 (23). ABS had dual diverse dynamic reversible actions on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells also in the model of HUVEC. We had explained sudden anti-hemorrhagic efficacy of ABS via immediate enhanced expression of pro-hemostatic PAI-1 and down-regulated anti-coagulant EPCR upon the exposure of ABS (23). Hemostatic function of PAR-1 is mainly prothrombotic. Thrombin signaling through PARs can cause platelet

activation, intimal hyperplasia, inflammation, and maintenance of vascular barrier function (4). PAR-1 down-regulation is considered as a therapeutic tool in thrombosis (46), inflammation (7), sepsis (41), and neoplastic disorders (47). Significant PAR-1 down-regulation mediated by ABS demonstrated in this study indicates that ABS has balanced effects on global hemostasis. Coagulation proteins, namely factor II, V, VII, VIII, IX, X, XI, and XIII were not affected in vitro individually by ABS (17). Likewise, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were normal via the application of ABS. However, prolonged thrombin time (TT) was evident (17). Since PAR-1 is the most important thrombin receptor, our major finding in this study, depression of PAR-1 with ABS, could explain the prolonged TT due to ABS. ABS is clinically effective in bleeding individuals with normal hemostatic parameters and in patients with deficient primary hemostasis and/or secondary hemostasis (11-14, 21, 23-33, 48-55). However, thrombosis due to ABS has not been observed during the preclinical (16, 38, 56-60) and clinical (11-14, 21, 23-33, 48-55) investigations with ABS. Hence, dose-dependent reversible PAR-1 down-regulation mediated by ABS could serve for this balanced hemostatic effect, i.e.; controlling the topical bleeding but not leading to thrombosis and tissue necrosis.

We suggested that ABS could act as a topical biological response modifier via demonstrating diverse actions of ABS in the presence of LPS. "LPS challenge" refer to the process of exposing a biological environment to an LPS which may act as a toxin to test immunological and hemostatic responses (20, 23). LPS application to HUVEC caused ABS-induced additional sustained significant down-regulations in the expressions of PAR-1 mRNA in this study (Figure 2). EPCR (8) and PAI-1 (1) molecules, also modulated by ABS in the presence of LPS (22) are considered as the partners of PAR-1 in the regulation of vascular dynamics, contraction, cellular proliferation, hypertrophy, angiogenesis, and

neoplasia. Therefore, there are molecular links underlying ABS-pleiotropic cellular actions (17, 22) acting on anti-infective (35, 36), wound healing (21, 30, 33, 37), vascular dynamics (38), and apoptotic processes (39). Sustained significant PAR-1 down-regulation mediated by ABS in the presence of LPS seems to have a protective role against endothelial injury.

There are distinct important molecular components of the ABS-induced hemostatic network involving vascular endothelium, proteins, and blood cells. The concept of ABS-induced hemostatic network has been developed via MALDI-TOF proteomic molecular analyses, cytometric arrays, transcription analysis, and SEM ultrastructural examinations as well as numerous investigations interacting with in vitro and in vivo research settings (18-20, 22, 23). Essential erythroid proteins (Ankryn recurrent and FYVE bundle containing protein 1, Spectrin alpha, Actin-depolymerisation factor, Actin-depolymerizing factor, LIM bundle and actine binding subunit 1 isoform a, LIM bundle and actine binding subunit 1 isoform b, NADP-dependent malic enzyme, NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex, Mitochondrial NADP (+) dependent malic enzyme 3, Ribulose biphosphatecarboxylase large chain, Maturase K) and the required ATP bioenergy (ATP synthase, ATP synthase beta subunit, ATP synthase alpha subunit, ATP-binding protein C12, TP synthase H<sup>+</sup> transporter protein, ADF, Alpha-1,2-glycosyltransferase ALG10-A) are included in the protein library of ABS. ABS also upregulates GATA/FOG transcription system affecting erythroid functions and urotensin II (19, 20). Further experimental search is needed to find out the molecules inside the ABS protein library leading to the ABS effect of PAR-1 down-regulation.

PAR-1 modulates programmed cell death, apoptosis. Activation of PAR-1 can induce or paradoxically inhibit apoptosis in endothelial cells, fibroblasts, and tumor cells depending on the dosage of its physiological agonist thrombin (61). ABS has been shown to affect

renal tubular apoptosis based on the level of hemorrhage in a previous study (39). When the bleeding associated with the surgery of partial nephrectomy is mild or moderate, ABS can initially increase renal tubular apoptosis. On the contrary; during the increased amount of massive bleeding from the kidney tissue, ABS decreases apoptosis in renal tubular cells (39). Therefore, ABS modulates the cellular apoptotic responses to hemorrhagic stress as well as its hemostatic hemodynamic activity. The finding of ABS-induced PAR-1 down-regulation gives an additional clue on the possible mechanism of ABS associated apoptosis modulation at the tissue level. Preliminary findings focusing on in vitro anti-neoplastic effects (62, 63) of ABS also prompt to begin for searching the ABS effects at the cellular level.

The possible significance of PAR-1 activation for the pathogenesis of infectious disease was also established (61, 64). Ankaferd, besides its hemostatic activity, may also inhibit the growth of bacteria (35, 65, 66). Anti-infectious activity of Ankaferd may represent an advantage over its current clinical use, since it inhibits the growth of bacteria in the area used mainly for its hemostatic activity such as traumatic infected wounds. The antimicrobial activity of Ankaferd was tested against many bacterial pathogens. The isolates included *A.baumannii*, *E.coli*, *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus*, vancomycin susceptible *Enterococcus* and vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) (35, 36, 65, 66). PAR-1 as an important regulator of endothelial barrier function and blood coagulation, is involved in the lethal sequelae of sepsis (67). On the other hand, the coagulant and inflammatory exacerbation in sepsis is counterbalanced by the protective protein C pathway. Activated PC (APC) was shown to use the EPCR as a co-receptor for cleavage of PAR-1 on endothelial cells (68). PAR-1 is, therefore, the target for EPCR-dependent APC signaling, suggesting a role for this receptor cascade in protection from

sepsis (68). The mechanism of action regarding the anti-infective effects of ABS is currently unknown. In this study, we observed that ABS down-regulates the expressions of PAR-1 in the presence of “LPS challenge”. Anti-infective actions of ABS may be related to its hemostatic functions acting on PAR-1, EPCR and PAI-1 (22) affecting distinct steps of coagulation and vascular endothelium.

ABS-induced acceleration in the healing rate at the early phase of the complicated wound healing process has been shown in radiation colitis (30, 33), infected dental areas (18, 21, 69), rectal ulcers (37), or gastrointestinal neoplastic lesions (25, 28, 49, 55). PAR-1 and thrombin could affect for preserving the tissue and wound repair (5, 8, 70-73). Down-regulated PAR-1 upon the exposure of ABS in our present study represents an initial clue to set further experiments to search the importance of endothelial regulators in the biological effects of ABS. PAR-1 is also involved in tumor responses (1, 6, 10, 43, 45, 47, 74). In a case series, ABS has topically inhibited tumor angiogenesis (55), angiogenic effects of PAR-1 in this respect shall also be further searched based on the observations in our present study.

In summary, ABS caused dose-dependent reversible PAR-1 down-regulation in HUVEC cellular model. “LPS challenge” to HUVEC enhanced ABS-induced sustained down-regulations in the expressions of PAR-1. Those findings indicated that ABS may act as a topical biological response modifier. Since ABS is currently being developed in basic and clinical grounds, those novel observations cast future studies focusing on the pleiotropic effects of this unique novel hemostatic agent.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

All of the authors had no "conflict of interest".

"Ankaferd blood stopper" vials were supplied from the firm, Ankaferd Drug Inc., Istanbul-TURKEY.



## REFERENCES

1. McEachron TA, Pawlinski R, Richards KL, et al. Protease-activated receptors mediate cross-talk between coagulation and fibrinolysis. *Blood* 2010 (in press).
2. Chintala M, Shimizu K, Ogawa M, et al. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: antagonism of the proteinase-activated receptor 1 for thrombin, a novel approach to antiplatelet therapy for atherothrombotic disease. *J Pharmacol Sci* 2008;108:433-8.
3. Hague S, Oehler MK, MacKenzie IZ, et al. Protease activated receptor-1 is down regulated by levonorgestrel in endometrial stromal cells. *Angiogenesis* 2002;5:93-8.
4. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 2006;114:1070-7.
5. Materazzi S, Pellerito S, Di Serio C, et al. Analysis of protease-activated receptor-1 and -2 in human scar formation. *J Pathol* 2007;212:440-9.
6. Qiao L, Zhang H, Wu S, et al. Downregulation of protease activated receptor expression and cytokine production in P815 cells by RNA interference. *BMC Cell Biol* 2009;10:62.
7. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008;83:536-45.
8. Xue M, Campbell D, Sambrook PN, et al. Endothelial protein C receptor and protease-activated receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. *J Invest Dermatol* 2005;125:1279-85.
9. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:147-53.
10. Uusitalo-Jarvinen H, Kurokawa T, Mueller BM, et al. Role of protease activated receptor 1 and 2 signaling in hypoxia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1456-62.
11. Al B, Yildirim C, Cavdar M, et al. Effectiveness of Ankaferd blood stopper in the topical control of active bleeding due to cutaneous-subcutaneous incisions. *Saudi Med J* 2009;30:1520-5.

12. Arslan S, Haznedaroglu IC, Oz B, et al. Endobronchial application of Ankaferd blood stopper to control profuse lung bleeding leading to hypoxemia and hemodynamic instability. *Respiratory Medicine* 2008;doi:10.1016/j.rmedc.2008.10.016
13. Meric Teker A, Korkut AY, Kahya V, et al. Prospective, randomized, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in patients with acute anterior epistaxis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:1377-81.
14. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, et al. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:1742-5.
15. Balcik OS, Koroglu, M., Cipil, H., Kaftan, O., Maral, S., Gurel, A., Goker, H., Haznedaroglu, I. C., Kosar, A. A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blinded, Cross-Over Phase I Clinical Study to Demonstrate Safety of Ankaferd Blood Stopper Topical Usage In Healthy Volunteers. *Int J Lab Hem* 2010;32(Suppl 1):126-127.
16. Bilgili H, Captug O, Kosar A, et al. Oral systemic administration of Ankaferd blood stopper has no short-term toxicity in an in vivo rabbit experimental model. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; 16:533-6.
17. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res* 2008;36:163-70.
18. Haznedaroglu BZ, Haznedaroglu IC, Walker SL, et al. Ultrastructural and morphological analyses of the in vitro and in vivo hemostatic effects of Ankaferd Blood Stopper. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010;16:446-53.
19. Demiralp DO, Haznedaroglu, I.C., Akar, N. Functional proteomic analysis of Ankaferd® Blood Stopper. *Turk J Hematol* 2010;27:70-77.
20. Yılmaz E, Gulec S, Haznedaroglu IC, Akar N. The effects of Ankaferd® Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and erythrocyte protein profile. *Turk J Hematol* 2010;in press.
21. Baykul T, Alanoglu EG, Kocer G. Use of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent: a clinical experience. *J Contemp Dent Pract* 2010;11:E088-94.
22. Haznedaroglu IC. Molecular Basis of the Pleiotropic Effects of Ankaferd Blood Stopper. *IUBMB Life* 2009;61:290-290.
23. A. Karabiyik EY, S. Gulec, IC Haznedaroglu, N Akar Dual diverse dynamic reversible actions of Ankaferd on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells with and without LPS. *Turk J Hematol* 2010 (in press).

24. Kurt M, Akdogan M, Ibis M, et al. Ankaferd blood stopper for gastrointestinal bleeding. *J Invest Surg* 2010;23:239.
25. Kurt M, Akdogan M, Onal IK, et al. Endoscopic topical application of Ankaferd Blood Stopper for neoplastic gastrointestinal bleeding: A retrospective analysis. *Dig Liver Dis* 2010;42:196-9.
26. Kurt M, Disibeyaz S, Akdogan M, et al. Endoscopic application of ankaferd blood stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: a case report. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2156-8.
27. Kurt M, Kacar S, Onal IK, et al. Ankaferd Blood Stopper as an effective adjunctive hemostatic agent for the management of life-threatening arterial bleeding of the digestive tract. *Endoscopy* 2008;40 Suppl 2:E262.
28. Kurt M, Onal I, Akdogan M, et al. Ankaferd Blood Stopper for controlling gastrointestinal bleeding due to distinct benign lesions refractory to conventional antihemorrhagic measures. *Can J Gastroenterol* 2010;24:380-4.
29. Kurt M, Oztas E, Kuran S, et al. Tandem oral, rectal, and nasal administrations of Ankaferd Blood Stopper to control profuse bleeding leading to hemodynamic instability. *Am J Emerg Med* 2009;27:631 e1-2.
30. Ozaslan E, Purnak T, Yildiz A, et al. The effect of Ankaferd blood stopper on severe radiation colitis. *Endoscopy* 2009;41 Suppl 2:E321-2.
31. Ozaslan E, Purnak T, Yildiz A, et al. The effect of a new hemostatic agent for difficult cases of non-variceal gastrointestinal bleeding: Ankaferd blood stopper. *Hepatogastroenterology* 2010;57:191-4.
32. Ozaslan E, Purnak T, Yildiz A, et al. A new practical alternative for tumoural gastrointestinal bleeding: Ankaferd blood stopper. *Dig Liver Dis* 2010;42:594-5.
33. Shorbagi A, Sivri B. Successful management of a difficult case of radiation proctopathy with Ankaferd BloodStopper: a novel indication (with video). *Gastrointest Endosc.* 2010 (in press).
34. Dogan OF, Ozyurda U, Uymaz OK, et al. New anticoagulant agent for CABG surgery. *European Journal of Clinical Investigation* 2008;38:341-341.
35. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, et al. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia* 2009;80:48-50.
36. Akkoc N, Akceik M, Haznedaroglu I, et al. In vitro anti-bacterial activities of ankaferd blood stopper. *International Journal of Laboratory Hematology* 2008;30:95-95.

37. Ibis M, Kurt M, Onal IK, et al. Successful management of bleeding due to solitary rectal ulcer via topical application of Ankaferd blood stopper. *J Altern Complement Med* 2008;14:1073-4.
38. Aktas A, Er N, Onur MA. Effects of Ankaferd Blood Stopper on vascular response in rat carotid artery. *UHOD Int J Hematol Oncol* 2010;in press.
39. Huri E, Haznedaroglu IC, Akgul T, et al. Biphasic effects of ankaferd blood stopper on renal tubular apoptosis in the rat partial nephrectomy model representing distinct levels of hemorrhage. *Saudi Med J* 2010;30:864-8.
40. Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, et al. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11104-9.
41. Kahn ML. Counteracting clotting in sepsis. *Nat Med* 2008;14:918-9.
42. Kai Y, Maeda Y, Sasaki T, et al. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: the role of thrombin receptor in cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Sci* 2008;108:426-32.
43. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:355-62.
44. Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, et al. Transcriptional inhibition of protease-activated receptor-1 expression by prostacyclin in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:534-40.
45. Salah Z, Maoz M, Pokroy E, et al. Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol Cancer Res* 2007;5:229-40.
46. Nantermet PG, Barrow JC, Lundell GF, et al. Discovery of a nonpeptidic small molecule antagonist of the human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:319-23.
47. Garcia-Lopez MT, Gutierrez-Rodriguez M, Herranz R. Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy? *Curr Med Chem* 2010;17:109-28.
48. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, et al. Hemostasis in retropubic radical prostatectomy with Ankaferd BloodStopper: a case report. *Kaohsiung J Med Sci* 2009;25:445-7.
49. Karaman K, Bostanci EB, Ercan M, et al. Topical Ankaferd application to presacral bleeding due to total mesorectal excision in rectal carcinoma. *J Invest Surg* 2010;23:175.

- 50.Oner A, Dogan M, Kaya A, et al. New Coagulant Agent (Ankaferd Blood Stopper) for Open Hemorrhages in Hemophilia With Inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010(in press).
- 51.Purnak T, Ozaslan E, Beyazit Y, et al. Upper Gastrointestinal Bleeding in a Patient With Defective Hemostasis Successfully Treated with Ankaferd Blood Stopper. *Phyther Res* 2010 (in press).
- 52.Sonmez M, Baltacioglu E, Sarac O, et al. The use of Ankaferd blood stopper in a patient with Glanzmann's thrombasthenia with gingival bleeding. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21:382-3.
- 53.Tuncer I, Doganay L, Ozturk O. Instant control of fundal variceal bleeding with a folkloric medicinal plant extract: Ankaferd Blood Stopper. *Gastrointest Endosc* 2010;71:873-5.
- 54.Turgut M, Tutkun F, Çelebi N, et al. Topical ankaferd bloodstopper in the management of critical bleedings due to hemorrhagic diathesis. *UHOD Int J Hematol Oncol* 2010;in press.
- 55.Turhan N, Kurt M, Shorbagi A, et al. Topical Ankaferd Blood Stopper administration to bleeding gastrointestinal carcinomas decreases tumor vascularization. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2874-7.
- 56.Cipil HS, Kosar A, Kaya A, et al. In vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:270-6.
- 57.Kalayci MU, Soylu A, Eroglu HE, et al. Effect of ankaferd blood stopper on hemostasis and histopathological score in experimental liver injury. *Bratisl Lek Listy* 2010;111:183-8.
- 58.Karakaya K, Ucan HB, Tascilar O, et al. Evaluation of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper in experimental liver laceration. *J Invest Surg* 2009;22:201-6.
- 59.Kilic O, Gonen M, Acar K, et al. Haemostatic role and histopathological effects of a new haemostatic agent in a rat bladder haemorrhage model: an experimental trial. *BJU Int* 2010;105:1722-5.
- 60.Tokgoz H, Karakaya K, Hanci V, et al. Protective value of a folkloric medicinal plant extract against mortality and hemorrhage in a life-threatening renal trauma model. *Urology* 2010;75:1515 e9-14.
- 61.Flynn AN, Buret AG. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis* 2004;9:729-37.

- 62.Goker H, Cetinkaya D, Kilic E, et al. Anti-cancer activity of ankaferd blood stopper on osteosarcom (SAOS-2) cell lines in vitro. In: Haznedaroglu I.C. GH, Ozdemir O, Kosar A, Firat H, editor. Ankaferd: Scientific perspectives and basic-clinical data. Istanbul: Naviga Publications; 2008. p. 109.
- 63.Goker H, Kilic E, Cetinkaya D, et al. Anti-cancer activity of Ankaferd on human colon cancer (CACO-2) in vitro. In: Haznedaroglu IC, Goker H, Ozdemir O, et al., editors. Ankaferd: Scientific Perspectives and Basic-Clinical Data. Istanbul: Naviga Publications; 2008. p. 108.
- 64.Ruf W. Is APC activation of endothelial cell PAR1 important in severe sepsis?: Yes. *J Thromb Haemost* 2005;3:1912-4.
- 65.Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroglu IC, et al. In Vitro Anti-Bacterial Activities of Ankaferd Medicinal Plant Extract. *Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi* 2009;29:410-415.
- 66.Saribas Z, Sener B, Haznedaroglu I, Hascelik G, Kirazli S, Goker H. Antimicrobial Activity of Ankaferd Blood Stopper® Against Nosocomial Bacterial Pathogens. *Central European Journal of Medicine* 2010;in press.
- 67.Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, et al. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol* 2007;8:1303-12.
- 68.Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880-2.
- 69.Erçetin S, Haznedaroglu IC, Kurt M, et al. Safety and efficacy of Ankaferd BloodStopper® in dental surgery and bleeding. *UHOD Int J Hematol Oncol* 2010;in press.
- 70.Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, et al. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* 1998;333 (Pt 1):121-7.
- 71.Connolly AJ, Suh DY, Hunt TK, et al. Mice lacking the thrombin receptor, PAR1, have normal skin wound healing. *Am J Pathol* 1997;151:1199-204.
- 72.Strukova SM, Dugina TN, Chistov IV, et al. [Thrombin--a regulator of reparative processes in wound healing]. *Bioorg Khim* 1998;24:288-92.
- 73.Umarova BA, Dugina TN, Shestakova EV, et al. Activation of rat mast cells upon stimulation of protease-activated receptor (PAR-1). *Bull Exp Biol Med* 2000;129:314-7.
- 74.Garnier D, Milsom C, Magnus N, et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res*;125 Suppl 2:S44-50.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Afife Karabıyık

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 06/12/1983

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim Adresi : Suadiye cad. 38 / 3 Yenimahalle / ANKARA

Tel : 0312 3447107 / 05067075378

e-mail : afifekrbyk@gmail.com

Eğitim Durumu;

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (1997-2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002-2006)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji (2006-2008)

### Yayınlar ;

1. Karabıyık A, Güleç S, Yılmaz E, Haznedaroğlu I, Akar N. Reversible Protease-Activated Receptor I Downregulation Mediated by Ankaferd Blood Stopper Inducible With Lipopolysaccharides Inside the Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Clin Appl Thromb Hemost. 2011 Mar 14.
2. Afife Karabıyık, Erkan Yılmaz, Sukru Gulec, Ibrahim Haznedaroğlu, Nejat Akar. Dual Diverse Dynamic Reversible Actions of Ankaferd on EPCR and PAI-1 Inside Vascular Endothelial Cells With and Without LPS (2011). Turkish Journal of Hematology. (Kabul edildi)
3. Afife Karabıyık, Erkan Yılmaz, Yonca Egin, Nejat Akar. The effects of Endothelial Protein C Receptor Gene Polymorphisms on sEPCR levels in Venous Thrombotic Patients (2011). Turkish Journal of Hematology. (Kabul edildi)
4. Afife Karabıyık, Nejat Akar. Endothelial Protein C Receptor gene expression in a woman with homozygous EPCR 23 bp insertion (2011). Turkish Journal of Hematology. (Kabul edildi)

5. Karabiyik A, Eroğlu A, Akar N. Protease activated receptor 1 gene -506 I/D polymorphism in cancer patients with and without venous thrombosis. Eur J Haematol. 2011 Mar 5. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01600.x.

6. Nejat Akar, Afife Karabiyik, Gülhis Deda . Endothelial Protein C Receptor and Pediatric Arterial Stroke (2011). Turkish Journal of Hematology. (submitted)

#### **Posterler ve Sözlü Sunumlar;**

1. Afife Karabiyik, Erkan Yılmaz, Sukru Gulec, Ibrahim Haznedaroglu, Nejat Akar. Reversible Actions of Ankaferd on EPCR and PAI-1 Inside Vascular Endothelial Cells With and Without LPS, 2010, Milan, Italya

2. Afife Karabiyik, Nejat Akar. The effects of Protease-activated Receptor 1 Gene Polymorphisms on sEPCR levels in Behçet and Venous Thrombotic Patients, 2010, Milan, Italya

3. 34. ve 36. Ulusal Hematoloji Kongrelerinde poster sunumu

4. Trombogenetik Sempozyumu'nda sözlü sunum, Mart 2009

5. II. Prof. Dr. Orhan Ulutin Tromboz Sempozyumu'nda 2 sözlü sunum, 30 Nisan 2010

#### **Burslar ve Ödüller;**

1. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ikinciliği

2. TÜBİTAK 2210-Yurtiçi Yüksek Lisans Programı Bursiyerliği (2006-2008)

3. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi. 8-11 Ekim 2008, İzmir. Genç Katılımcı Ödülü.

4. TÜBİTAK 2211- Yurtiçi Doktora Programı Bursiyerliği (2009- )

5. Young Investigator Award from the 56th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of ISTH, Cairo, Egypt, (2010)

6. 36. Ulusal Hematoloji Kongresi. Genç Araştırmacı Kongre Katılım Bursu,3-6 Kasım 2010