

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI**

**KANAMA DURDURUCU AJAN ANKAFERD BLOOD STOPPER'İN  
SEREBRAL DOKU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK  
OLARAK İNCELENMESİ VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE  
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Ali Kemal Ulaş**

**SAMSUN 2009**

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI**

**KANAMA DURDURUCU AJAN ANKAFERD BLOOD STOPPER'İN  
SEREBRAL DOKU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK  
OLARAK İNCELENMESİ VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE  
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ali Kemal Ulaş**

**TEZ DANIŞMANI**

**Yrd. Doç. Dr. YAŞAR BAYRİ**

**Doç. Dr. KERAMETTİN AYDIN**

**Prof. Dr. FAHRETTİN ÇELİK**

**SAMSUN 2009**

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, yetiŐmemde katkıları olan değerli hocalarıma, birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, bu çalıŐmanın yapılıp ortaya konmasında büyük yardım olan sayın Yr. Doç. Dr. Yurdanur Süllü'ye, sayın Özge ađađ'a, sayın Özlem Sayar'a sabır ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teŐekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b>	<b>II</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>III</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Hemostaz</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Vazokonstrüksiyon</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2. Primer ve Sekonder Hemostaz</b>	<b>2</b>
<b>2.1.3. Endotel İlişkili Fibrinoliz</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4. Cerrahide Hemostazın Önemi</b>	<b>7</b>
<b>2.1.5. Cerrahide Hemostazı Sağlamak İçin Kullanılan Teknikler</b>	<b>8</b>
<b>2.1.6. Cerrahide Kullanılan Hemostatik Ajanlar</b>	<b>9</b>
<b>2.1.7. Pasif Topikal Hemostatik Ajanlar</b>	<b>9</b>
<b>2.1.8. Aktif Topikal Hemostatik Ajanlar</b>	<b>11</b>
<b>2.1.9. Topikal Hemostatik Ajanlar İçin İdeal Özellikler</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Ankaferd Blood Stopper ( ABS )</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Cerrahi İşlem</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Patoloji</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler</b>	<b>17</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>18</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>26</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>30</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>31</b>

## **SİMGE VE KISALTMALAR**

**ABS** Ankaferd Blood Stopper

**F** Faktör

**HMWK** Yüksek molekül ağırlıklı kininojen

**PAI- 1** Plazminojen aktivatör inhibitörü-1

**PK** Prekallikrein

**SF** Serum Fizyolojik

**vWF** Von williebrant faktör

**TF** Doku faktörü

**t-PA** Doku plazminojen aktivatörü

**H-E** Hematoksilen-Eozin

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 2-1</b> Cerrahi esnasında kanama faktörleri	8
<b>Tablo2-2</b> Cerrahi esnasında efektif hemostaz yapmanın avantajları	8
<b>Tablo 2-3</b> Cerrahi hemostaz teknikleri	11
<b>Tablo4-1</b> Kontrol (K) grupları, ABS uygulanan gruplar (A) ve normal (N) ratlarda bakılan parametreler	19
<b>Tablo 4-2</b> Mann- Whitney U Test Statistics (b)	20
<b>Tablo 4-3</b> ABS ve SF verilen fareler için değerler	21
<b>Tablo 4-4</b> SF verilen fareler için nöron sayısı frekans tablosu	21
<b>Tablo 4-5</b> ABS verilen fareler için nöron sayısı frekans tablosu	22
<b>Tablo 4-6</b> ABS ve SF verilen gruplardaki ödem oluşumu değerlerinin istatistiksel verileri	24
<b>Tablo4-7</b> Fisher'in Exact testi	24
<b>Tablo 4-8</b> ABS ve SF verilen gruplardaki inflamatuvar hücre varlığının istatistiksel verileri	25
<b>Tablo 4-9</b> Ki-kare testi	25

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2-1 Trombositlerin adezyon ve agregasyonu	4
Şekil 2-2 Koagülasyon basamakları	6
Şekil 2-3 Trombosit fibrin pht>s>n> s>n>rlayan dengeli fibrinoliz	7
Şekil 2-4 Lokal olarak ABS uygulanmasının şema ile gösterilmesi	14
Şekil 3-1 Rat beynine yapılan insizyon ve bölgenin ekartasyonu işlemi	16
Şekil 3-2 Rat beynine yapılan burholl uygulaması ve ABS uygulanması	16
Şekil 3-3 a – b: Rat beyinlerinin alttan ve üstten görünümü	
c - d: Rat beyinlerinin formaldehitli solüsyon içerisinde fikse edilmesi	17
Şekil 4-1 Hafif ödem ve inflamasyon gözlenen olgu, Hematoksilen-Eozin, X 200(a), X 400 (b)	18
Şekil 4-2 Kontrol grubuna ait olgu, Hematoksilen-Eozin, X 400	18
Şekil 4-3 SF uygulanan farelerin histogram grafiği	22
Şekil 4-4 ABS uygulanan farelerin histogram grafiği	23

## ÖZET

### **KANAMA DURDURUCU AJAN ANKAFERD BLOOD STOPPER'İN SEREBRAL DOKU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beyin cerrahisi olgularında kanama en büyük sorunlardan biridir. Bugüne kadar beyin cerrahisinde kanamanın durdurulması için çok farklı yöntemler kullanılmıştır. İyi bir hemostatik ajan olduğu kanıtlanmış bitkisel kaynaklı Ankaferd Blood Stopper'in kanama kontrolünün çok önemli olduğu beyin cerrahisi pratiğinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için öncelikle bu ilacın beyin dokusu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 16 adet erişkin erkek Spraque - Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar iki gruba ayrıldı. Sıçanlara sağ frontal kraniotomi yapılarak grublardan birine serebral doku üstüne 1 ml Serum Fizyolojik ve diğerine 1 ml Ankaferd Blood Stopper uygulandı. Ameliyattan 15 gün sonra sıçanlar giyotin ile dekapite edilerek beyinleri formaldehitte fikse edilip parafin bloklar oluşturularak Hematoksilen- Eozin ile boyandı. Ödem, inflamatuvar hücre, nöronal dejenerasyon varlığı ve nöron sayısı değerlendirilerek Mann- Whitney U testi ve Fisher'in Exact testi ile değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar değerlendirildiğinde her iki grupta da belirgin ödem, gliozis, nöronal dejenerasyon, inflamatuvar hücre olmadığı ve nöron sayılarında normale göre belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu çalışmadaki bulgulara göre serebral doku üzerine Ankaferd Blood Stopper ve Serum Fizyolojik uygulamasında belirgin bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak Ankaferd Blood Stopper'in beyin cerrahisi ameliyatlarında hemostaz için kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Ankaferd Blood Stopper, Hemostatik ajan, Beyin



## **ABSTRACT**

### **HISTOPATHOLOGICALLY ANALYZING EFFECT OF HAEMOSTATIC AGENT ANKAFERD BLOOD STOPPER ON BRAIN TISSUE AND USABILITY IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM**

Bleeding is the most important problem in neurosurgical procedures. A lot of techniques and agents have been used for haemostasis in neurosurgery. Ankaferd Blood Stopper is a plant extract mixture which is known as a good haemostatic agent in traditional Turkish Medicine. In this study our aim is survey the Ankaferd Blood Stopper's effect on brain tissue. We used 16 adult sprague – Dawley rats and split it control and ABS applied group. We performed right frontal craniotomy to all rats. We applied 1 ml saline solution on control group and 1 ml Ankaferd Blood Stopper solution on Ankaferd Blood Stopper group to brain tissue. After 15 days of procedure decapitation were performed with guillotine to all rats. All brain fixed with formaldehyde and embedded in the paraffine blocs and stained with Haematoxiline – Eosine. Edema, inflammatory cell count, neuron count and presence of neuronal degeneration evaluated and compared statistically with Mann Whitney U and Fisher's exact tests. In both groups we didn't detect prominent edema, gliosis, inflammatory cell and neuronal degeneration and inequality on neuron count. We didn't observe any differentiation on two groups. As a result we think that Ankaferd Blood Stopper can use on Neurosurgical procedures as a haemostatic agent.

**Key Words:** Ankaferd Blood Stopper, Haemostatic agent, Brain

## GİRİŞ VE AMAÇ

Cerrahi kanamalar ameliyat sırasında çalışmayı engelleyen, cerrahinin uzun sürmesine ve postoperatif komplikasyonlara neden olabilen en büyük sorunlardan biridir. Karın boşluğu gibi alanlara oluşan masif kanamalar organ fonksiyonları açısından tolere edilebilirken beyin dokusu içine olacak küçük miktarlarda kanamalar dahi hayatı tehdit eden durumlara neden olabilir. Bu nedenle de iyi ve güvenli bir kanama kontrolü sağlamak beyin cerrahisinin temel kuralıdır.

Direkt kompresyon uygulamak ya da damarı ipe bağlamak gibi mekanik yöntemler beyin ameliyatlarında uygulanabilir değildir. Bipolar koter ve koter tüm kanama alanlarını kontrol edemediğinden komşu vasküler ve nöral yapılara termal etki ile zarar verebileceği için kullanılmıdır. Bu yüzden de yurt dışında üretilip ithal edilen sünger (spongostan), okside selüloz (surgicell) ve fibriller kollajen gibi kanama kontrolü sağlayan ajanlar diğer cerrahi branşlarda olduğu gibi beyin cerrahisi pratiğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada geleneksel Türk tıbbında kanamayı durdurmak için kullanılan, beş adet bitki ekstresinin standart oranlarda karışımından oluşan ve Ankaferd Blood Stopper ticari ismi ile patent alan çok etkili bir hemostatik ajan olan ürünün beyin cerrahisi pratiğinde kullanılabilirliğinin tartışılabilmesi için öncelikle beyin dokusu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemostaz

Hemostaz, damar duvarında bir zedelenme olduğunda, kan akımının engellenmeden kanamanın durdurulması ve damar bütünlüğünün sağlanması için gereken fizyolojik sistemlerin bütünüdür (1). Damar duvarı, plazma proteinleri ve trombositler arasındaki ilişkilerin düzenlenmesi ile kan kaybı önlenir. Bir damar zedelendiğinde ya da yırtıldığında çeşitli mekanizmalarla hemostaz sağlanır. Normal hemostaz, damar duvarındaki yaralanmayı takiben pıhtı oluşumunu ve doku tamiri ile sonuçlanan süreçleri içerir. Hemostaz'ın vazokonstriksiyon, primer ve sekonder hemostaz ve fibrinolitik sistemden oluşan üç önemli komponenti vardır (2). Damarın zedelenmesi ile oluşan kanamada hemostaz, bu sistemlerin devreye girmesi ile sağlanacaktır. Hemostaz sırasında zamanlama açısından birçok sürenin birbirinin içine girdiği veya paralel seyrettiği unutulmamalıdır (1).

#### 2.1.1. Vazokonstriksiyon

Kan damarı travmaya maruz kaldıktan sonra, hasarlanan damar duvarında; miyojenik spazm oluşur. Trombositlerden kaynaklanan bölgesel humoral faktörler ve sinirsel refleksler etkisiyle spazm meydana gelir. Küçük damarlarda vazokonstriksiyonun büyük kısmından tromboksan A2 oluşumunu sağlayan 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 oluşur ve kan pıhtılaşması gelişir (2).

#### 2.1.2. Primer ve Sekonder Hemostaz

##### 2.1.2.a. Primer Hemostaz Sistemi

Yaralanma yerlerinde trombosit plak oluşum sürecine primer hemostaz denir, saniyeler içinde meydana gelir ve kapiller kan kaybını durdurmada esas önceliğe sahiptir. Bileşenleri vasküler endotel ve trombositlerdir. Trombositler hasarlı bölgeye gelerek adezyon, sekresyon ve agregasyon fonksiyonlarını yerine getirirler (3).

#### Trombositlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Yuvarlak ya da oval, 1,5- 3 mikrometre çapında ufak disklerdir. Kemik iliğindeki megakaryositlerden oluşurlar. Yapılarında çekirdekleri olmamasına ve

çoğalmamalarına rağmen hücrenin birçok fonksiyonel özelliğini taşırlar. Stoplazmalarında trombositlerin kasılmalarını sağlayan aktin, miyozin, trombastenin molekülleri, enzim sentezleyen ve kalsiyum depolayan endoplazmik retikulum, ATP ve ADP oluşturabilen enzim sistemleri, prostoglandin sentezleyebilen enzim sistemleri, fibrin stabilize edici faktör ve damar endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar çoğalma ve büyümelerini ve hasarlı damar duvarının tamiri için gerekli hücre sel büyüme yi sağlayan büyüme faktörü bulunmaktadır. Membran yüzeyini kaplayan glikoprotein örtüsü trombositlerin normal endotele yapışmasını önlerken zedelenen damar çeperlerinin hasarlanan alanlarına ve derinlerde açığa çıkan kollajene yapışmasını sağlar (4).

### **Adezyon**

Trombositlerin yaralı damar bölgesine yapışma işlemidir. Vasküler hasar sonucu açığa çıkan subendoteliyal bölgedeki kollajene doğrudan glikoprotein Ia / IIa reseptörü aracılığı ile veya glikoprotein Ib – IX / V reseptörü ile endoteldeki von Willebrand faktör'e bağlanarak yapışırlar. Bu bağlanma trombositlerin adezyonuna ve aktivasyonuna yol açar (1, 5).

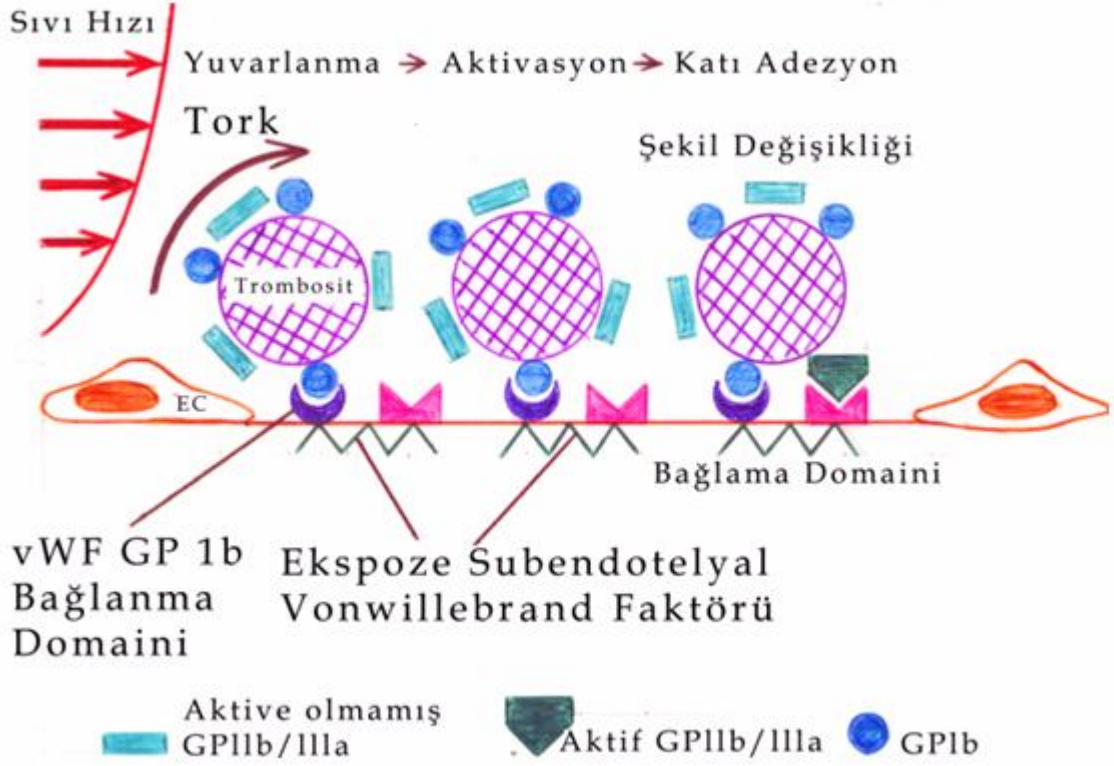
### **Salınım**

Trombositler hasara uğrayan damar yüzeyine, kollajen liflere ve hasarlı endotel hücrelerine dokunduklarında özelliklerini yitirerek düzensiz bir şekil alır ve yüzeylerinden sayısız psödotoplar uzatırlar. Kasılabilme özelliğine sahip proteinler kasılarak aktif faktörler içeren granüller serbestlenir, yapışkan hale gelir, plazmadaki hasarlı doku içine süzulan von Willebrand faktörü isimli proteine tutunurlar. Başta ADP olmak üzere birçok protein (fibrinojen, fibronektin, platelet faktör-4, transforming growth faktör-β), TXA2 ve koagülasyon sistemi için gerekli olan kalsiyum (Ca ++ ) salınır. ADP ve TXA2 çevredeki diğer trombositleri aktive ederek başlangıçta oluşmuş aktif trombositlere yapışmalarını sağlar. Gittikçe artan sayıda trombositin aktive olması ve aktifleşen trombositlerin de yeni trombositleri aktive etmesiyle gelişen bu kısır döngü, trombosit tıkanıklığının oluşumu sağlar. Damardaki hasarın çok küçük olduğu durumlarda delik kan pıhtısına yerine trombosit tıkanıklığı ile kapatılır (4).

### **Agregasyon**

Trombositlerin bir arada toplanıp küme oluşturması işlemidir. Bu işlem için özellikle trombosit üzerinde bulunan glikoprotein 2b3a reseptörü ve fibrinojen

gereklidir. Fibrinojen, glikoprotein 2b3a reseptörlerine bağlanarak trombositler arasında bağ oluşturur (5). Trombositler aracılığıyla oluşan pıhtı zayıftır. Bu pıhtının stabil hale gelmesi için fibrin gereklidir. Fibrin de koagülasyon sistemi sonucu oluşur.



Şekil 2-1 Trombositlerin adezyon ve agregasyonu

EC: Endotel Hücresi vWF: Von willebrant Faktörü GP: Glikoprotein

### 2.1.2.b. Sekonder Hemostaz Sistemi

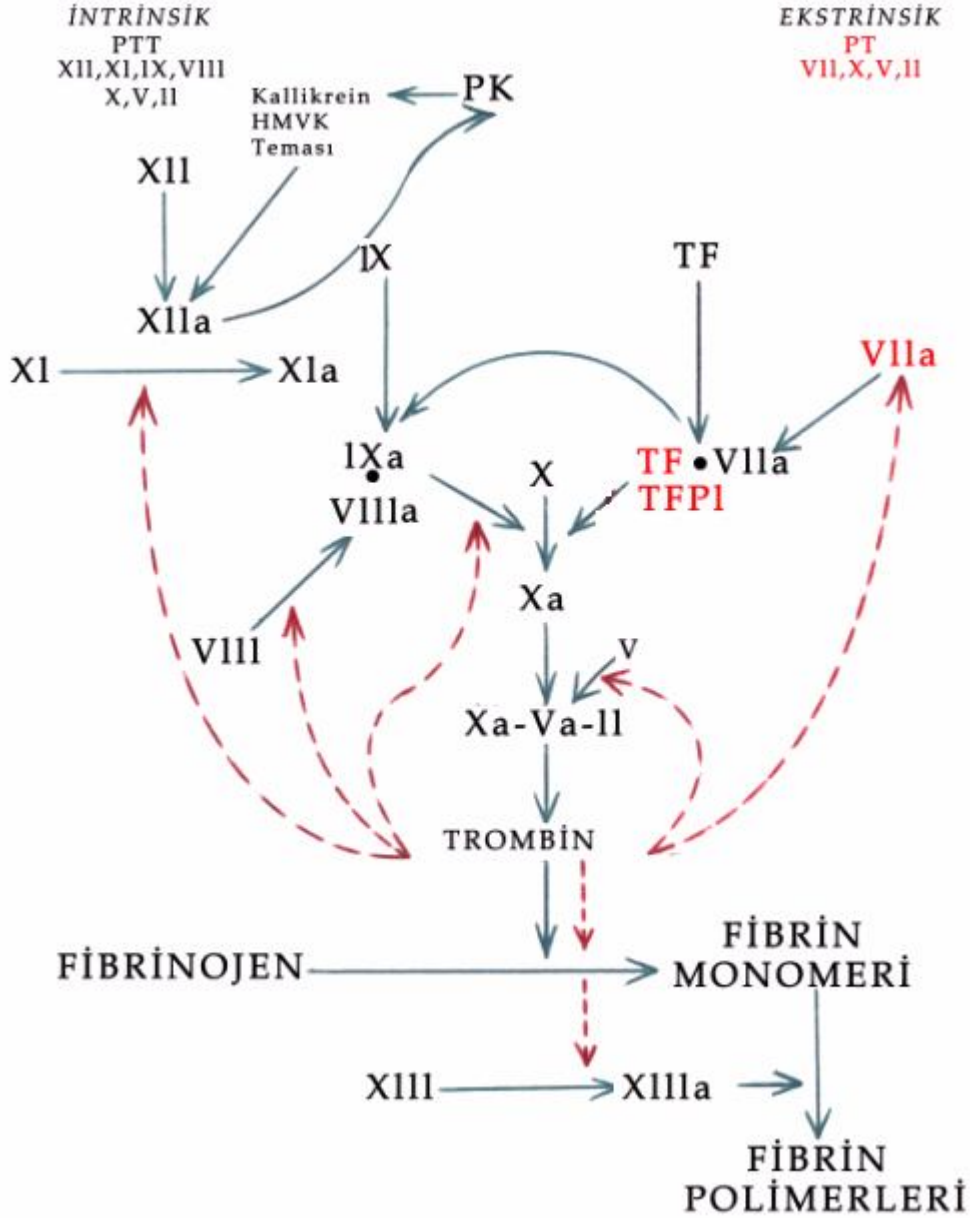
Trombosit tıkaçının kanamayı durdurmakta yetersiz kaldığı daha büyük yaralanmalarda, koagülasyon proteinlerinin de aktive olmasıyla sekonder hemostaz başlar. Primer ve sekonder hemostaz birbiriyle yakından ilişkili olup, sekonder hemostaz, fibrin oluşumu ile sonuçlanan plazma koagülasyon sistemi reaksiyonlarını içerir. Tamamlanması için birkaç dakikaya ihtiyaç vardır. Fibrin bağları primer hemostatik plağın güçlenmesini sağlar (3). İntrinsik yol ve ekstrinsik yol olmak üzere iki ana yolu vardır. Önceleri her iki yolun da koagülasyon sistemi için eşit öneme sahip olduğu kabul edilirken, günümüzde koagülasyonun başlamasında primer yolun ekstrinsik yol olduğu bilinmektedir (5).

### **Ekstrinsik Yol**

Günümüzde, koagülasyon mekanizmasının, bütünlüğü bozulan endotelden kana salınan doku faktörünün (TF), faktör (F) VII'i aktive ederek başladığı görüşü hakimdir. Başlangıç fazı olarak adlandırılan bu fazda; tromboplastin olarak bilinen TF, Ca<sup>++</sup> iyonu varlığında FVII'i, FVIIa'ya çevirir ve onunla bir kompleks oluşturur. TF - FVIIa kompleksi bir taraftan FIX'u aktive ederken diğer yoldan da direk olarak FX'u FXa'ya dönüştürür. Aktive olan FXa, FVa, FII (protrombin) ile beraber protrombinaz adı verilen kompleksi oluşturur ve protrombinin (FII) trombine (FIIa) dönüşümü sağlanır. Trombin fonksiyonları geniş bir yelpazededir. Primer rolü fibrinogenden fibrin oluşturarak hemostatik pıhtıyı inşa edilmesidir. Trombin, fibrinogen molekülünden önce fibrinopeptid A ve B fragmanları 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 (1).

### **İntrinsik Yol**

İntrinsik yolun başlangıcı olan FXII herhangi bir proteolitik basamak gerektirmeden kanın herhangi bir yabancı yüzeyle teması ile aktive olmaktadır. İn vitro olarak bu yüzey; cam, silikon veya plastik olabilirken in vivo olarak kollajendir. FXIIa, FXI'i FXIa'ya çevirir. 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 yukarıda belirtilen protrombinaz kompleksi aracılığı ile trombin ve fibrin oluşumu görülür. Pıhtı oluşumunda bu yolun minimal etkisi olduğu, FXII ve prekallikrein yetmezliği olan hastalarda kanama bozukluğu görülmemesiyle gösterilebilir (1).

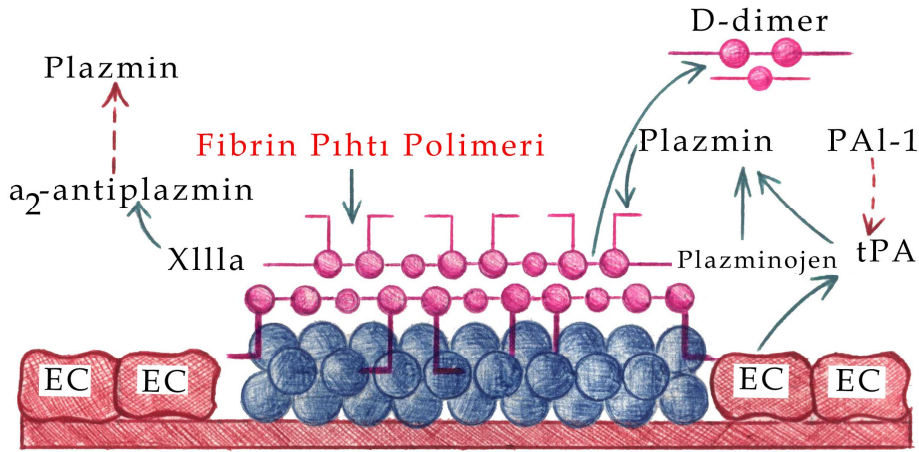


**Şekil.2-2** Koagülasyon Basamakları. Laboratuvar tanımlı ekstrinsek ve intrinsek yollar,  
**HMWK** = Yüksek molekül ağırlıklı kininojen      **PK** = Prekallikrein faktörü;  
**TFPI** = Doku faktör yolu inhibitörü                      **TF** = Doku faktörü

### 2.1.3. Endotel İlişkili Fibrinoliz

Damar içi fibrinolitik aktivite doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz gibi plazminojen aktivatörleri ve Plazminojen aktivatör inhibitörü -1 (PAI-1), a2-antiplazmin gibi inhibitörler arasında bir dengeden kaynaklanır (Şekil2-3). Fibrinolizin düzenlenmesi endotel yüzeyinde olur. Vasküler endotel hücreleri t-PA ve PAI-1'i sentezleyip salgırlar. Plazmin, fibrin ve matriks bileşenlerinin hücreye yakın bölgelerde

parçalanmalarını kolaylaştırır. Fibrinoliz ve makrofajlar da kritik role sahiptir. Makrofajlar plazmin gerektirmeyen bir mekanizmayla lizozomal proteoliz ile fibrin p>ht>s>n> parçalar. Dokunun tamiri ve yenilenmesi eninde sonunda fibrin bazlı p>ht>n>n 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 (Şekil 2-3). Plazmin fibrin matrisini çözer ve çözünür fibrin peptitleri ve D-dimer oluşur. Plazmin aynı zamanda hasarlı dokuyu parçalayan metalloproteinazlar> 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 onarım> ve dokunun yenilenmesi için çalışırlar (11).



Şekil 2-3 Trombosit fibrin p>ht>s>n> s>n>rlayan dengeli fibrinolizis

#### 2.1.4. Cerrahide Hemostazın Önemi

Cerrahi esnasında kanama ile hemostaz oluşturma arasında çok önemli bir denge vardır. Bu denge kanın cerrahi alana ve dokuya akmasının devamı, kan volümünde önemli bir azalma olmamasını sağlamak ile optimum cerrahi başarı arasında vardır (7, 8). Küçük damarlarda kan akmasının cerrahi esnasında devamı, cerrahi operasyon süresinin uzamasını, fizyolojik komplikasyon risklerinin artmasını ve kan transfüzyon riskini engeller. Cerrahi esnasında kanamaya neden olan faktörler hem hastanın özelliklerine hem de kullanılan cerrahi prosedürlere bağlıdır (tablo1).



**Tablo 2-1** Cerrahi Esnasında Kanamaya Neden Olan Faktörler

Kırık kemik (spinal rekonstrüktif süreçler vb.)
Diffüz kapiller alanlar (büyük alanlar)
Görülemeyen kanama odakları
Cerrahi insizyon
Sütür atlamayan dokular
Sütür hattındaki basıncın düşüklüğü
Strip adezyonu
Antikoagülan ilaç kullanımı
Koagülopatiler ve trombosit disfonksiyonları

Bu faktörler cerrahin hemostaz için efektif teknikler kullanması ile azaltılabilir (7, 8). Cerrahide efektif hemostaz hasta ve cerrah açısından birçok avantaj sağlar. Cerrahi esnasında kanamanın az olması sonucunda kan transfüzyon ihtiyacı ve transfüzyona bağlı oluşacak riskler de azalmaktadır (6, 9, 10). Kan transfüzyonunun azalması aynı zamanda hastanın hastanede kalma süresinin azalması ile de ilişkilidir. Cerrahi sırasında iki üniteden fazla kan kaybeden hastalarda enfeksiyon riski, solunum sistemine ait komplikasyonlar ve yoğun bakımda kalma süresi iki kattan fazla artmaktadır (10, 12). Cerrahi esnasında fazla kan kaybı aynı zamanda majör preoperatif komplikasyon riskini artırır. Hızlı ve efektif hemostaz (tablo 2-2) cerrahin, cerrahi alanı daha rahat ve daha iyi görmesini sağlar. Bu da cerrahi alanda oluşabilecek kazaları önleyecektir. Ayrıca efektif hemostaz cerrahi zamanın kısalmasını ve buna bağlı olarak da hastanın cerrahi maliyetini azaltmaktadır (13). Efectif hemostaz aynı zamanda cerrahi prosedüre bağlı olarak morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır (10, 14, 15).

**Tablo 2-2** Cerrahi esnasında efektif hemostaz yapmanın avantajları

Transfüzyona bağlı komplikasyonlarda azalma
Cerrahi alanın net görülmesi
Cerrahi zamanın azalması
Mortalite ve morbiditenin azalması

### 2.1.5. Cerrahide Hemostazı Sağlamak İçin Kullanılan Teknikler

Cerrahlerin kanama kontrolü için mekanik yöntemler, termal teknikler ve kimyasal ajanlardan (farmakoterapi ve topikal ajanlar) yararlanırlar. Kanama alanının üstüne direkt basma ve kompresyon birçok cerrahin kanama kontrolü için seçtiği bir

seçenektir. Kompresyon ve diğer mekanik teknikler birçok cerrahi süreçte uygun olmayabilir. Örneğin; kanamanın yaygın olması, kanama alanının ayırt edilememesi, hastanın koagülopatisinin olması, hastaya bağlı faktörler (hemodilüsyon ve hipotermi) veya hastanın antitrombosit, antikoagülan ilaç kullanması gibi (6, 8). Diğer mekanik yöntemler; sütür, stappler, ligasyon klipsidir. Bunlar eğer kanama alanı rahatlıkla fark edilebiliyorsa kullanılabilir yöntemlerdir. Son yıllarda, termal teknikler özellikle hemostatik skalpes ve lazer cerrahların gözde opsiyonlarıdır. Kemik yüzeyinde, parankimal dokuda, inflame damarlarda veya diffüz kapiller ağ içeren yapılarda bu yöntemleri kullanarak hemostazın sağlanması çok güçtür (8, 10). Cerrahi esnasında kimyasal teknikler diğerlerine oranla daha kullanışlıdır. Kimyasal tekniklerden farmakolojik metotlar doğal koagülasyon mekanizmasını geniş yüzeyde sağlamaktadır (13). Bunlar özellikle; epinefrin, desmopressin, topikal hemostatik ajanlar, doku sealantleri ve doku adhezinleridir (6, 10, 12, 16, 17, 18). Bununla beraber birçok materyal doku tarafından emilememekte ve kaldırıldığında tıkaçın yerinden oynamasıyla tekrar kanama oluşturabilmektedir(13). Bundan dolayı emilebilir hemostatik ajanlar geliştirilmiş ve kullanılabilir hale getirilmiştir (19).

#### **2.1.6. Cerrahide Kullanılan Topikal Hemostatik Ajanlar**

Cerrahide birçok topikal hemostatik ajan kullanılabilir. Bunlar iki ana gruba ayrılmaktadır. Aktif topikal hemostatik ajanlar ve pasif topikal hemostatik ajanlardır. Aktif topikal ajanlar biyolojik aktivitesi olan tıkaç kaskat mekanizmasını aktive eden ürünleri içermektedir. Bunlar trombin ve trombin ürünleridir. Pasif topikal ajanlar ise trombosit agregasyon ve gelişimini kontak aktivite ile pasif olarak oluşturanlardır (6). Pasif topikal hemostatik ajanlar sellüloz, kollajen ve jelatin içermektedirler (6, 19).

#### **2.1.7. Pasif Topikal Hemostatik Ajanlar**

Ana mekanizma tıkaçın etrafında trombositler ile çevreleyerek fiziksel yapıyı oluşturmaktır (20). Spanç, sünger (spongostan) ve okside selüloz (surgicel) en çok bilinen cerrahide uygulanan pasif hemostaz sağlayan topikal ajandır (12). Kollajen bazlı ürünler trombosit agregasyonunu ve kontak aktivasyonu sayesinde kan ile kollajen arasında direkt kontakt oluşumu ile pasif hemostaz sağlarlar (6, 19). Hayvansal orjinli kollajenler allerjik veya immün reaksiyona neden olabilmektedirler (6, 19). Total

popülasyonun %2 veya %4'ünde hayvansal orjinli kollajenlere karşı allerjik reaksiyonlar görülmektedir. Sellüloz bazlı ürünlerden yeni jenerasyon olarak kullanılan okside selülozler, kontak aktiviteyi sağlarlar ancak nasıl hemostaz yaptığına dair kesin mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (21). Sellülozlu ajanlar cerrahi esnasında istenilen boyda ve oranda küçük parçalar halinde uygulanabilirler. Bunlar işlem sırasında kullanılan cerrahi aletlere ve eldivene yapışmazlar (6, 19). Okside sellüloz diğer ürünler gibi absorbe edilemez. Okside selüloz kullanmış hastalar tekrar cerrahiye alındığında birçok vakada rezidü parçaların tekrar organize olduğu rapor edilmiştir (12). Bütün bunlardan dolayı mümkün olduğu kadar az kullanmak ve hemostaz aktivitesi sağlandıktan sonra ürünün konulduğu yerden kaldırılması önerilmektedir (8, 12).

Jelatin içeren pasif topikal hemostatiklerin özelliği değişik, irregüler geometrik yapılarda kullanılabilmesidir (6, 8). Kanamanın olduğu bölgeye uygulandığında yuvarlak veya o bölgenin şeklini alan bir yapı oluşturarak tampon etkisi ile pasif hemostaz sağlamaktadırlar (6). Şişebilen jelatin partikülleri kan akışları ve oluşan tıkaçın etrafında matriks oluştururlar (6). Tıkaç kontakt aktivasyon ile oluşur. Jelatin bazlı ürünler aynı zamanda cerrahi aletlere yapışabildiği için kullanım zordur (8). İn vitro ortamda pasif topikal hemostatik ajanların koagülasyon mekanizmasında mikrofibriller kollajenin en etkili ajan olduğu diğerlerinin de etkilerine göre sırasıyla; kollajen sünger, jelatin sünger, okside sellüloz olduğu saptanmıştır (12, 22). Bunların kullanılmasında oluşturduğu etkiler cerrahi işleme ve cerrahın tecrübesine göre değişiklik gösterebilmektedir. Uygulanan birçok cerrahi prosedürde; laparoskopik, endoskopik, robotik, minimal invaziv insizyonlu yaklaşımlarda kan tıkaçı, damarların büzüşmesi veya dokunun yapıştırılması önem kazanır. Bioglue gibi yüzey örtücüleri ve topikal hemostazın pozitif hemostatik etkisi olmadığını düşünen az bir grup da vardır (12, 23, 24).

**Tablo 2-3** Cerrahi hemostaz teknikleri

<b>1- Mekanik Teknikler</b>
a- Direkt bas
b- Sutür
c- Stappler
d- Ligasyon klibi
e- Ped
f- Sünger
g- Kan ürünleri/replasman tedavisi
<b>2- Termal Teknikler</b>
a- Elektrokoter
b- Hemostatik scalpe
c- Laser
<b>3- Kimyasal Teknikler</b>
a- Farmakoterapi
- Hipotansif anestezi
- Epinefrin
- Vitamin K
- Protamin
- Desmopressin
- Aminocaproic asid
- Traneskamic asid
b- Topikal hemostazlar
- Kollajen
- Selüloz
- Jelatin
- Trombin
c- Topikal yapıştırıcılar
- Fibrin yapıştırıcıları
- Sentetik bioglue

### **2.1.8. Aktif Topikal Hemostatik Ajanlar**

Aktif topikal hemostatik ajanlar; biyolojik aktivitede direkt olarak kanama tıkaçı sağlayan koagülasyon kaskadının son basamağına etki ederler. Cerrahide kullanılan aktive ajanlar trombin ve kombine trombin ürünleri içerirler. Aktif topikal hemostatik ajan olan trombin geniş bir yelpazede cerrahide kullanılmaktadır (16) Hemostatik etkinlik için fibrinojenin dolaşımında olması gereklidir. Çünkü fibrinin pıhtı oluşturabilmesi için trombinin fibrinojen ile reaksiyona girerek aktif hale gelmesi gerekir. Fibrinojenin primer yetersizliği trombinin tıkaç oluşturmasını engelleyen nadir nedenlerdendir (6, 25). Jelatin sünger gibi belirli pasif topikal ajanlar genellikle trombin ile kombine edilerek son ürünün aktivitesini ve kullanılabilirliğini artırabilirler. Birçok

sealant ürünü ile trombin kombine edilebilir. Bu karışım 90'lardan sonra cerrahide yüzey örtücü olarak kullanılmaktadır. Fibrinojen ve trombin birleştiği zaman trombin fibrinojeni monomerlerine ayırır. Bu monomerler de polimerize olarak, çözülebilir formdaki fibrinin kalıcı pıhtıyı oluşturan çözünmez fibrinlere dönüşümüne öncülük eden yumuşak plak oluşumunu sağlar (9, 16).

### **2.1.9. Topikal Hemostatik Ajanlar İçin İdeal Özellikler**

İdeal topikal ajanların özellikleri cerrahi tiplerine ve farklı gerekliliklere göre değişkendir. Fakat bazı genel özellikleri şunlardır.

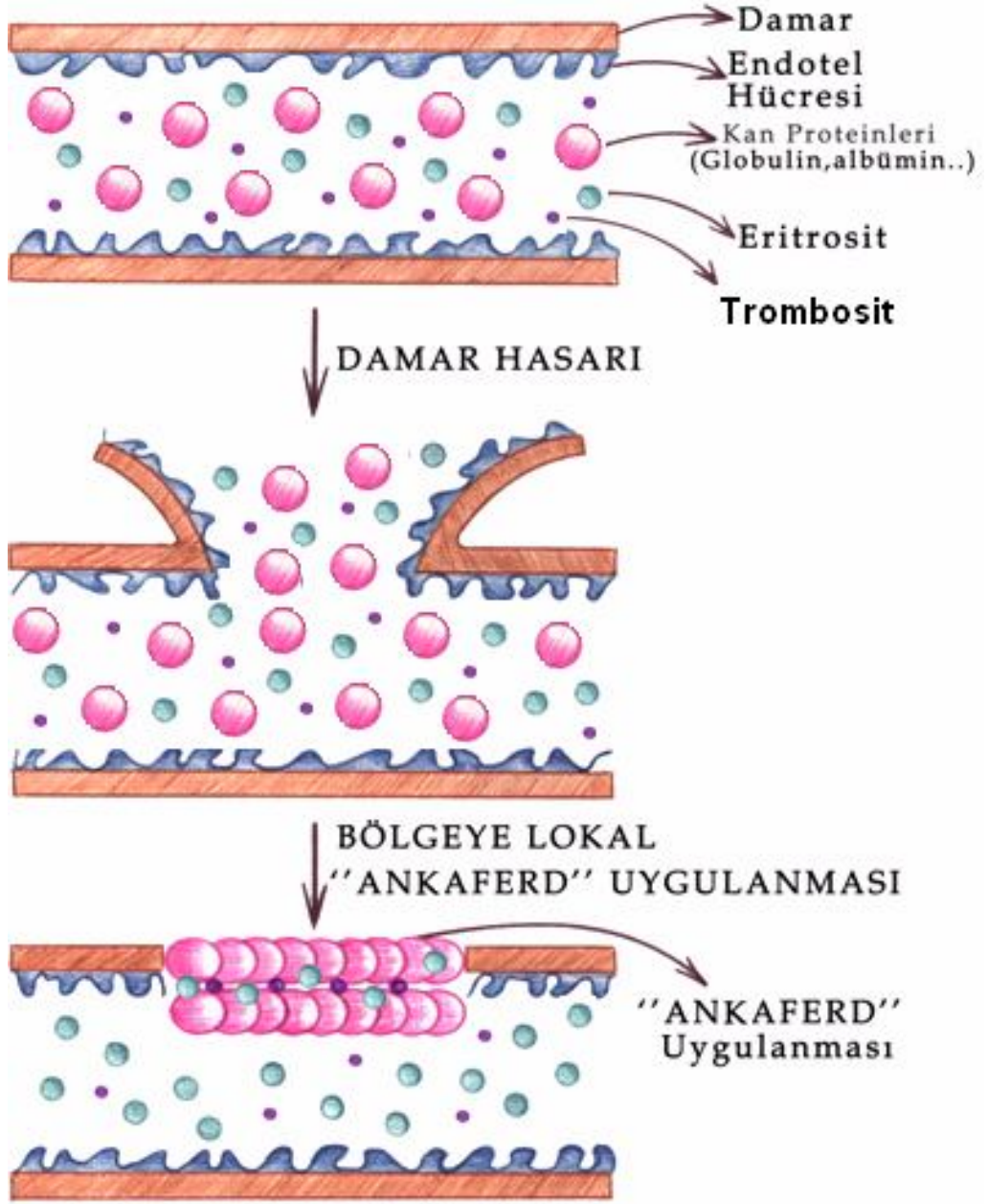
- 1- Hızlı ve efektif kontrol ile kanamayı durdurabilmelidir.
- 2- Kanayan yüzey alanı ile efektif kontakt oluşturabilme kapasitesi olmalıdır.
- 3- Kabul edilebilir ters reaksiyon profili olmalıdır.
- 4- Kolay uygulanabilmelidir.
- 5- Değişik kanama türlerinde etkili olmalıdır.
- 6- Dokudaki aktivasyonu fizyolojik olmalıdır (9).

### **2.2. Ankaferd Blood Stopper (ABS)**

ABS; *timus vulgaris*, *glycyrrhiza glabra*, *vitis vinelera*, *alpinia oppicinorium* ve *vitico dioica* bitkilerinin karışımından oluşan stabil ve steril bir üründür (26). Buradaki her bir bitkinin etkisi farklıdır. (26, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39) *Glycyrrhiza glabra*; anjiogenezisi önler, VEGF'yi düşürür ve sitokin ilişkili neovaskülarizasyonu azaltır. Aynı zamanda anti-inflamatuar, anti-trombin, anti-trombosit, anti-oksidan, anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri bulunmaktadır (32). *Timus vulgaris*in anti-oksidan etkisi vardır. Bu da in vivo oksidatif hasarı önler, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı arterioskleroz oluşumunu önler (33). *Vitis vinolera*; proteinlere karşı direnç sağlar aynı zamanda anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri vardır (34, 35, 36, 37). *Alpinia oppicinarrum* NO oluşumunu azaltır (38).

ABS'nin en basit etki mekanizması eritrosit aglütinasyonu için belli noktalar içeren enkapsüle protein ağı oluşturmasıdır. ABS'in seruma eklemesi ile tıkaç etkisi sağlayan protein ağının oluşum süresinin bir saniyenin altında olduğu görülmüştür. Bu tıkaç, muhtemelen daha ileri koagülasyon ve hemostatik reaksiyonların tetiklenmesiyle sağlanmaktadır. Rutin yapılan hemostatik ve biyokimyasal testlerde

görülmüştür ki ABS ile ilişkili tıkaç etkisi sağlayan protein ağı oluşumu, kan proteinleri ve eritrositlerin fonksiyonlarına bağlı olarak oluşmaktadır Burada pıhtılaşma faktörleri, ABS'den etkilenmese de, protein agregasyonu sayesinde anti-hemorajik süreç başlamaktadır. ABS pıhtılaşma faktörleri dışında tüm fizyolojik süreci etkilemektedir. Bu yüzden hem sağlıklı insanlarda hem de hemostaz bozukluğu olan insanlarda (faktör eksiklikleri, DIC vb.) etkili olmaktadır. Eritrosit agregasyonu, yüksek molekül ağırlıklı plazma proteinlerinin (örneğin; fibrinojen ve immunglobulinler) tespitiyle saptanmaktadır. Fibrinojen azaldıkça, agregasyon artar. Yapılan çalışmalarda plazma fibrinojen aktivitesi ve fibrinojen antijen seviyelerinin plazmaya ABS eklenmesi ile belirgin oranda düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca bu tıkaç etkisi gösteren protein ağı oluşumu sırasında plazmada; total protein, albumin ve globulin seviyelerinin de anlamlı oranda düştüğü görülmüştür. Bu yüzden, ABS, fibrinojen–eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır (26, 28, 29). Aynı zamanda yapılan çalışmalarla ABS'in Gram (-) bakteriler için bakteriyostatik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (27)



**Resim 2-4** Lokal olarak Ankaferd Blood Stopper uygulanmasının şema ile gösterilmesi

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi laboratuvarında etik kurul iznini takiben gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları ortalama 300-400 gram arasında olan 16 adet erişkin erkek Spraque - Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar iki gruba ayrıldı, 8 adet sıçan ile ABS uygulanacak grup, 8 adet sıçan ile de serum fizyolojik (SF) uygulanacak kontrol grubu oluşturuldu.

#### 3.1. Cerrahi işlem

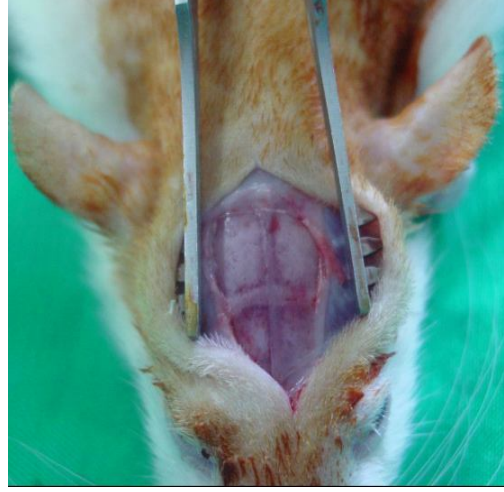
Xylazine (Rompun® Bayer) 10mg/kg intraperitoneal yolla verilerek sedatize edilen deneklere cerrahi işlem öncesi anestezik ajan olarak ketamin hidroklorür (Ketalar® Parke Davis) 80mg/kg intraperitoneal yolla uygulandı.

Anestezi sonrası denekler operasyon masasına alındı. Cerrahi saha traş edildikten sonra %10'luk povidon iyot solüsyonu (Betadin® Kansuk) ile cilt antisepsisi sağlandı. Ardından sagittal sütür boyunca 3 cm'lik orta hat insizyonu ile cilt, cilt altı geçildi. Dental drill kullanılarak orta frontal girusları ortalayacak şekilde sağ paramedian yaklaşık olarak 0.4cm<sup>2</sup>'lik kraniektomi alanı oluşturuldu. Duramater ve araknoid cerrahi mikroskop eşliğinde kaldırılarak piaya 3 mm boyunda bir kesi yapıldı. Uygulama grubunda 1 ml ABS (timus vulgaris, glycyrrhiza glabra, vitis vinifera, alpinia opncinorium ve vitico dioica) kesi bölgesine uygulandı. Kontrol grubunda ise pial zara aynı şekilde kesi yapılarak 1 ml SF kesi bölgesine uygulandı.

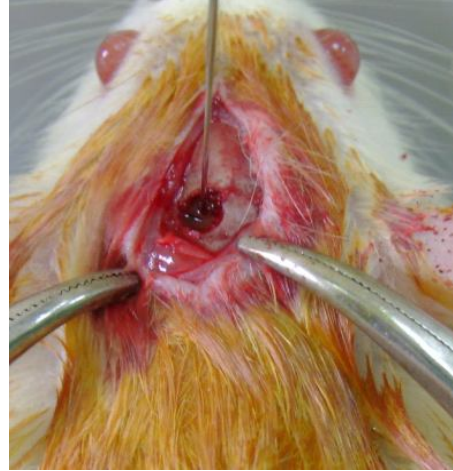
Deney ve kontrol gruplarındaki her denekte bu cerrahi işlem uygulandıktan sonra sırasıyla dura, cilt altı ve cilt sütüre edildi. Denekler daha sonra sırtta bulunan kafeslerine yerleştirildi. Burada uyanan deneklerin vücut sıcaklığı sabit tutuldu. Ayrıca işlem sonrası 3 gün boyunca içtikleri suyun içine parasetamol 2 mg/kg konuldu.

Tüm deneklere 15 gün sonunda intraperitoneal anestezi altında giyotinle dekapitasyon işlemi uygulandı ve beyinler çıkarıldı. % 10'luk formaldehit solüsyonu içinde fikse edilen beyinler kodlanarak patoloji bölümüne teslim edildi.

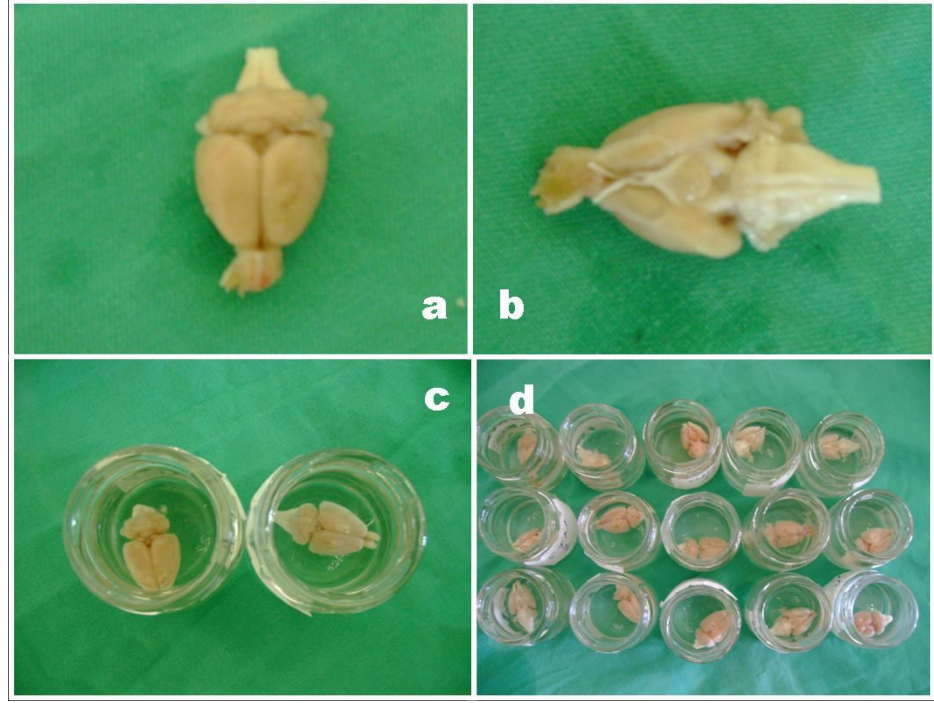




**Resim 3-1** Rat beynine yapılan insizyon ve bölgenin ekartasyonu işlemi



**Resim 3-2** Rat beynine yapılan burholl uygulaması ve ABS uygulanması



**Şekil 3-3** a–b: Rat beyinlerinin alttan ve üstten görünümü c–d: Rat beyinlerinin formaldehitli solüsyon içerisinde fikse edilmesi.

### 3.2. Patoloji.

Kırk sekiz saat süre ile formalinde fikse edilen dokulardan lezyon alanın örnekleyen kesitler alınarak doku takibi sonrasında parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5'er mikronluk kesitler alınarak Hematoksilen - Eozin ile boyandı. Işık mikroskopunda guruplardan habersiz patoloğ tarafından histopatolojik değerlendirme yapıldı. Hematoksilen - Eozin ile boyanmış kesitlerde ödem, inflamatuvar hücre ve nöronal dejenerasyon varlığı; hepsi için ayrı ayrı bu kriterler ile değerlendirilerek yok (0), hafif (1) ve belirgin (2) olarak skorlandı. Bu skorlar toplanarak non spesifik (0-3), hafif şiddette (4-6) ve şiddetli (7-9) olarak yorumlandı. Ayrıca bu kesitlerde 3 adet X40'lık büyütme alanındaki nöronlar sayılarak ortalamalar alındı.

### 3.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

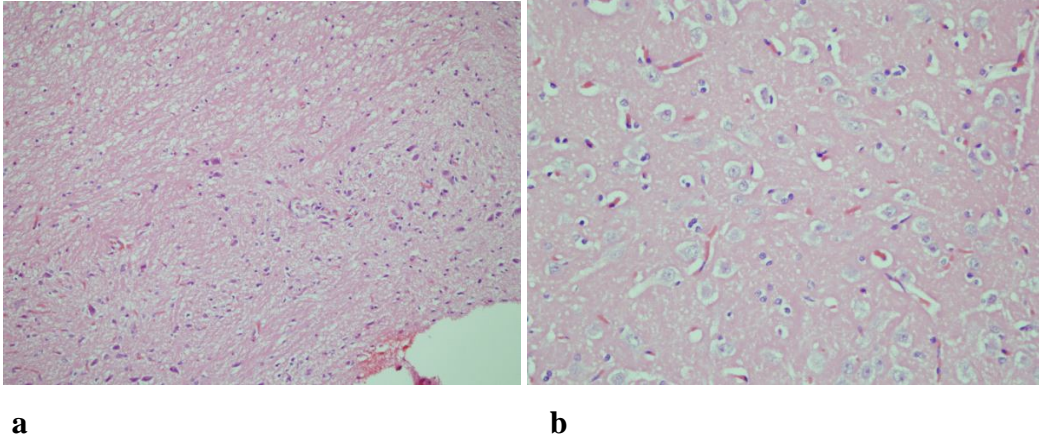
İki bağımsız grup karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca ödem açısından incelemede Fisher'in Exact testi ve inflamatuvar hücre varlığı içinde ki-kare testi kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR

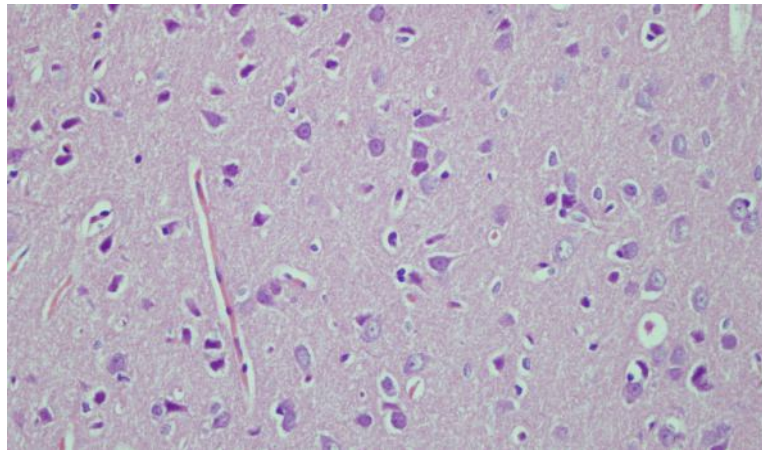
Çalışma süresi boyunca ABS ve SF uygulanan gruplarda enfeksiyon, nörolojik bozulma ve ölüm gözlenmemiştir. Hayvanlara yapılan dekapitasyon işlemi sırasında uygulama yapılan bölgelerde her iki grup da reorganizasyon ve fibrozis görülmemiştir.

Çalışmada histopatolojik olarak ABS uygulanan grupta; ratların 3 tanesinde hafif düzeyde ödem, ratların 5 tanesinde hafif düzeyde inflamasyon gözlenmiştir. Ayrıca bu grupta yapılan incelemede ratların hiçbirinde nöronal dejenerasyon ve gliozis saptanmamış. Nöron sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

SF uygulanan grupta; ratların 2 tanesinde hafif düzeyde inflamasyon ve ödem gözlenmiştir. Bu grupta da ratların hiçbirinde nöronal dejenerasyon, ödem, nöron sayısında azalma gözlenmemiştir.



Şekil 4-1 Hafif ödem ve inflamasyon gözlenen olgu, H-E, X200 (a), X400 (b)



Şekil 4-2 Kontrol grubuna ait olgu, H-E, X400

**Tablo 4-1** Kontrol (K) grubu, ABS uygulanan grup (A) ve normal (N) ratlarda bakılan parametreler

Olgu No	Ödem-Spongiosis	Gliosis-Reaktif Astrositozis	Nöronal Dejenerasyon	İnflamatuvar Hücre Varlığı	Nöron Sayısı
K1	0	0	0	0	64
K2	0	0	0	0	74
K3	1	0	1	0	62
K4	0	0	0	0	44
K5	0	0	0	0	70
K6	0	0	0	0	44
K7	1	0	0	1	63
K8	0	0	0	1	70
A1	0	0	0	1	52
A2	1	0	0	1	38
A3	0	0	0	1	53
A4	1	0	0	1	67
A5	0	0	0	0	54
A6	0	0	0	0	69
A7	1	0	0	1	56
A8	0	0	0	0	83
N	0	0	0	0	66

ABS verilen grup ile SF verilen kontrol grubundaki nöron sayılarının karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

**Tablo 4-2** Mann-Whitney U Test Statistics (b)

	Veri
Mann-Whitney U	26.000
Wilcoxon W	62.000
Z	-.631
Asymp. Sig. ( 2-tailed )	.528
Exact Sig. [ 2* ( 1-tailed Sig. ) ]	.574(a)

Bu testin sonuçlarına göre;

$H_0$  = SF verilen fareler ile ABS verilen fareler arasında fark yoktur.

$H_1$  = SF verilen fareler ile ABS verilen fareler arasında fark vardır.

Test istatistiğinin sonucuna göre  $p=0.528$  çıkmıştır.

Bu değer %1 anlamlılık seviyesinde değerlendirildiğinde

$\alpha = 0.01$  için

$p > \alpha$  olduğundan  $H_0$  hipotezi kabul edilir.

SF verilen fareler ile kanama durdurucu etkisi olan ABS verilen fareler arasında %99 güvenle bir farklılık olduğu söylenemez. Yani bu iki gruptaki nöron sayıları aynıdır diyebiliriz.

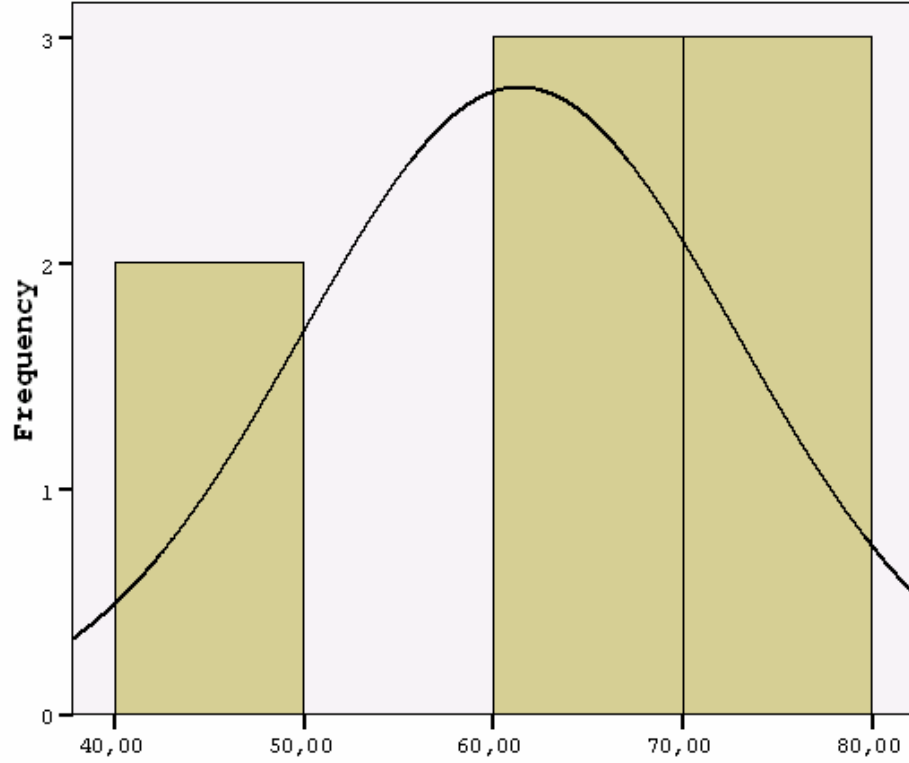
**Tablo 4-3** SF ve ABS verilen fareler için değerler

Grup		Statistic	Std. Error					
Veri	SF	Mean	61.3750	4.05735				
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		51.7809			
		Upper Bound	70.9691					
		5% Trimmed Mean	61.6389					
		Median	63.5000					
		Variance	131.696					
		Std. Deviation	11.47591					
		Minimum	44.00					
		Maximum	74.00					
		Range	30.00					
		Interquartile Range	21.50					
		Skewness	-.904		.752			
		Kurtosis	-.575		1.481			
		ABS	ABS		Mean	59.0000	4.81812	
					95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		47.6070
					Upper Bound	70.3930		
					5% Trimmed Mean	58.8333		
Median	55.0000							
Variance	185.714							
Std. Deviation	13.62770							
Minimum	38.00							
Maximum	83.00							
Range	45.00							
Interquartile Range	16.25							
Skewness	.404			.752				
Kurtosis	.515			1.481				

SF verilen fareler için;

**Tablo 4-4** SF verilen farelerin nöron sayılarına için frekans tablosu

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	44.00	2	25.0	25.0
	62.00	1	12.5	37.5
	63.00	1	12.5	50.0
	64.00	1	12.5	62.5
	70.00	2	25.0	87.5
	74.00	1	12.5	100.0
Total	8	100.0	100.0	



Şekil 4-3 SF uygulanan farelerin histogram grafiği

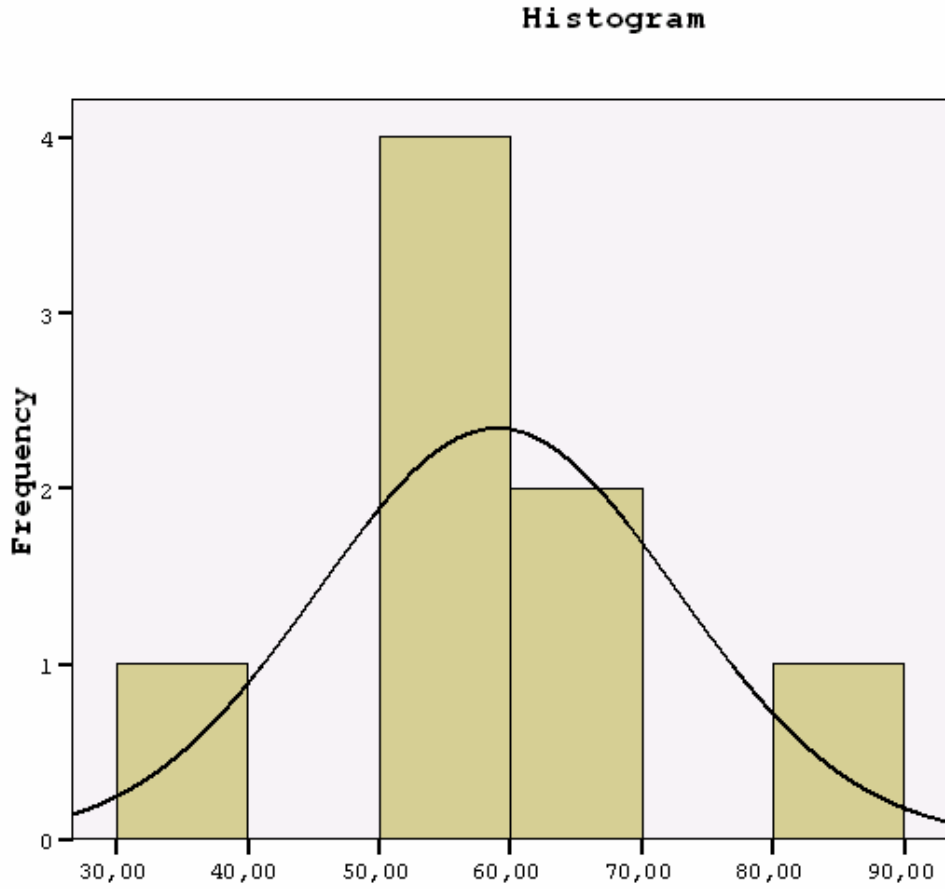
Nöron sayılar> SF uygulaması için

Mean = 61.380 N = 8 Std. Dev = 11,4760

Şekilden de görüldüğü gibi SF verilen farelerin nöron sayıları 60- 61 civarındadır

Tablo 4-5 ABS verilen farelerin nöron sayılar> için frekans tablosu

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	38.00	1	12.5	12.5	12.5
	52.00	1	12.5	12.5	25.0
	53.00	1	12.5	12.5	37.5
	54.00	1	12.5	12.5	50.0
	56.00	1	12.5	12.5	62.5
	67.00	1	12.5	12.5	75.0
	69.00	1	12.5	12.5	87.5
	83.00	1	12.5	12.5	100.0
	Total	8	100.0	100.0	



**Şekil 4-4** ABS uygulanan farelerin histogram grafiği

ABS için nöron sayılar

Mean = 59      N = 8      Std. Dev = 13,6280

Şekilden de görüldüğü gibi ABS verilen farelerin nöron sayılar 59- 60 arasındadır.

Normal farenin nöron sayı 66 dır. Bu istatistik sonucuna göre SF verilen farelerin ortalama nöron sayı: 61.375 ve %95 güvenle (51.78 ile 70.9691) arasındadır. ABS verilen farelerin ortalama nöron sayı: 59.00 ve %95 güvenle (47.67 ile 70.39) arasındadır. Bu da bize her iki grubunda güvenlik değerleri içerisinde olduğunu ve normal fare nöron sayısı ile bir fark olmadığını göstermektedir.

SF için standart sapma değeri: 11.475

ABS için standart sapma değeri: 13.627 dir.



**Tablo 4-6** ABS ve SF verilen gruplardaki ödem oluşumu değerlerinin istatistiksel verileri

			Ödem durumu		Total
			Var	Yok	Var
Farelerin durumu	SF veriliyor	Count	2	6	8
		Expected Count	2.5	5.5	8.0
		% within farelerin durumu	25.0%	75.0%	100.0%
		% within ödem durumu	40.0%	54.5%	50.0%
	ABS veriliyor	Count	3	5	8
		Expected Count	2.5	5.5	8.0
		% within farelerin durumu	37.5%	62.5%	100.0%
		% within ödem durumu	60.0%	45.5%	50.0%
Total		Count	5	11	16
		Expected Count	5.0	11.0	16.0
		% within farelerin durumu	31.3%	68.8%	100.0%
		% within ödem durumu	100.0%	100.0%	100.0%

Görüldüğü gibi beklenen değerlerden 5 den küçük değerler olduğu için Fisher'in Exact testinin sonucuna bakarız.

**Tablo 4-7** Fisher'in Exact testi

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.291(b)		.590		
Continuity Correction (a)	.000		1.000		
Likelihood Ratio	.292		.589		
Fisher's Exact Test				1.000	.500
Linear-by-Linear Association	.273		.602		
N of Valid Cases	16				

$H_0$ =ABS veya SF verilmesiyle ödem oluşması arasında ilişki yoktur.

$H_1$  = ABS veya SF verilmesiyle ödem oluşması arasında ilişki vardır.

$p = 1.00 > 0.01$  olduğu için  $H_0$  hipotezi kabul edilir. Yani SF veya ABS verilmesi ile ödem oluşması arasında anlamlı bir ilişki yoktur diyebiliriz.

### İnflamatuar hücre yönünden grupları incelediğimizde;

**Tablo 4-8** ABS ve SF verilen gruplardaki inflammatuar hücre varlığının istatistiksel verileri

		İnflamatuar hücre varlığı		Total
		Yok	Hafif	Yok
Grup SF verilen fareler	Count	6	2	8
	Expected Count	4.5	3.5	8.0
	% of Total	37.5%	12.5%	50.0%
ABS verilen fareler	Count	3	5	8
	Expected Count	4.5	3.5	8.0
	% of Total	18.8%	31.3%	50.0%
Total	Count	9	7	16
	Expected Count	9.0	7.0	16.0
	% of Total	56.3%	43.8%	100.0%

**Tablo 4-9** Ki-kare testi

	Value	Df	Asymp.Sig. (2-sided)	ExactSig. (2-sided)	ExactSig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.286(b)		.131		
Continuity Correction(a)	1.016		.313		
Likelihood Ratio	2.348		.125		
Fisher's Exact Test				.315	.157
Linear-by-Linear Association	2.143		.143		
N of Valid Cases	16				

$H_0$  = ABS veya SF verilmesiyle inflammatuar hücre varlığı arasında ilişki yoktur.

$H_1$  = ABS veya SF verilmesiyle inflammatuar hücre varlığı arasında ilişki vardır.

$P=0.315 > 0.01$  olduğundan  $H_0$  hipotezi kabul edilir. Yani %99 güvenlilikle ABS veya SF verilen gruplarda inflammatuar hücre görülmesi açısından ilişki yoktur diyebiliriz.

## 5.TARTIŞMA

Hemostaz damar duvarındaki yaralanmayı takiben pıhtı oluşumu ve doku tamiri ile sonuçlanan süreçleri içermektedir (2). Bilindiği gibi cerrahi sırasında olabilecek yüksek miktarlardaki kanamalar morbidite ve mortalite riskini artırmaktadır. Beyin cerrahisinde postoperatif az miktarlardaki kanamaların bile kitle etkisi ile kafa içi basıncı artırarak mortaliteyi ve morbiditeyi artırabileceği bilinmektedir. Ayrıca etkin bir hemostazın yapılamaması durumunda hastanın hastanede kalış süresi uzayabilecektir. Cerrahlar açısından da iyi bir hemostazın sağlanamaması durumunda cerrahi alanın görülmesi zorlaşmakta ve bu da komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Özellikle beyin cerrahisinde dar alanda ve mikrocerrahi yöntemler ile çalışılması hemostaz daha da önemli kalmaktadır. Beyin cerrahisinde kullanılacak olan hemostatik ajan hızlı ve efektif olarak kanamayı durdurabilmelidir. Bu ajan kolay uygulanabilmeli, enfeksiyonlara neden olmamalı, rezorbe olabilmeli ve cerrahi saha üzerinde ekstra bir tabaka oluşturmamalıdır. Günümüzde beyin cerrahisinde birçok madde ve yöntem (surgicell, spongostan, bipolar koter, fibrin doku yapıştırıcılar vb.) hemostaz için kullanılmaktadır. Fakat bunların hiçbiri yukarıda saydığımız kriterlerin tümüne sahip değildir. Bundan dolayı etkili ve hızlı hemostaz sağlayan ve bu arada normal dokuya da zarar vermeyen bir hemostatik ajan varlığı hem cerrah hem de hasta açısından çok önemlidir. Biz bu çalışmada vücut dışı kanamalardaki hemostazda etkinliği kanıtlanmış yeni bir ajan olan ABS'nin beyin cerrahisinde kullanımının mümkün olup olmadığı konusunda fikir vermesi açısından serebral nöral dokuya olan etkilerini inceledik. ABS kolay uygulanabilen, anti mikrobik özelliği olan (27), kısa sürede vücut tarafından absorbe edilen, beyin dokusu üzerinde mekanik bası etkisi oluşturmayan ve iyi bir hemostatik ajanın sahip olması gereken tüm özellikleri taşıyan bir karışımdır. Bu maddenin beyin cerrahisinde kullanılabilir olması cerrah ve hasta açısından birçok şeyi olumlu olarak etkileyebilir.

Hemostazın fizyopatolojisine bakıldığında kısaca vasküler yaralanma sonrasında, endotel hücresi ve trombositlerden çeşitli aktivatörlerin salgılanarak pıhtılaşma faktörlerini etkin hale getirip fibrin tıkaç oluşturduğu söylenebilir. Kullanılan değişik hemostatik ajanlar genel olarak bu hemostatik yolu takip ederek etkilerini göstermektedirler (1, 2, 3, 4, 5, 11). ABS hemostatik yol üzerindeki pıhtılaşma

faktörlerinden bağımlı olarak kan içerisindeki proteinleri etkilemekte ve tıkaç etkisi gösteren protein ağı oluşturmaktadır. Göker ve arkadaşlarının(26) yaptıkları in vitro çalışmada; plazma ya da seruma ABS eklenmesi ile tıkaç etkisi gösteren protein ağı oluşumu sırasında plazma fibrinojen aktivitesi ve fibrinojen antijen seviyelerinin belirgin oranda düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca protein ağı oluşumu sırasında plazmada total protein, albumin ve globulin seviyelerinin de anlamlı oranda azaldığını belirtmişlerdir. Bu ABS'in, fibrinojen-eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkileyerek eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu da özellikle pıhtılaşma faktör eksikliği olan (hemofili, DIC) hastalarda etkili bir hemostaz sağlamaya imkan verip cerrahi kanama sonrası yapılacak kan transfüzyonu ve transfüzyona sekonder oluşabilecek komplikasyonlardan hastaları korumuş olacaktır.

Bir hemostatik ajanın kısa sürede kanamayı durdurması çok önemlidir. Çünkü özellikle arteriyel kanamalarda ya da hayatı tehdit eden kanamalarda kan kaybı arttıkça pıhtılaşma faktörleri azalmakta, hemodilüsyon olmakta hemostaz cerrah için çok daha büyük bir problem haline gelmektedir. Ayrıca hemostazın uzaması cerrahi süreyi de uzatmaktadır. Cerrahide kullanılan aktif hemostatik etkili ajanlar ortalama etkilerini 1-5 dakika üzerinde oluşturmaktadırlar. ABS'nin hemostaz oluşturma süresi ise 1 sn'den daha kısadır. Dr. Göker ve arkadaşlarının (26) yaptıkları çalışmada normal plazma ve serum'a ABS eklenmesi ile protein ağı oluşumunun çok hızlı (1 sn'nin altında) bir şekilde oluştuğu gözlenmiştir. Bu kadar kısa sürede hemostaz sağlayabilmesi nedeniyle de ABS'nin iyi bir hemostatik ajan olabileceği düşünülmektedir.

Cerrahi sırasında kullanılan yöntemlerden mekanik yöntemlerin hemostazı sağlamakta yetersiz kaldığı bilinmektedir. Mekanik yöntemlerin yetersiz kaldığı yaygın kanamalarda, koagülopatilerde, antikoagülan ilaç kullanımında ABS'in belirgin derecede etkili olduğu görülmüştür.

Cerrahide hemostaz için kullanılan termal etkili ajanların Sabel ve arkadaşlarının (8) yaptıkları çalışmalarda kemik yüzeylerde, parankimal dokularda, inflame damarlarda veya diffuz kapiller içeren kanamalarda kullanımının mümkün olmadığı gösterilmiştir. ABS'in bu kanamalardaki hemostazlarda da etkin olduğu düşünülmektedir.

Sabel ve arkadaşlarının (8) yaptığı çalışmada jelatin bazlı ürünlerin cerrahi aletlere yapıştığı gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ABS'nin cerrahi aletlere

yapışmadığı görülmüştür. Bunun da operasyon esnasında cerrahiye kolaylaştıracağı ve istenmeyen oluşabilecek bazı komplikasyonlarında engelleyebileceği düşünülmektedir.

Bochicchio ve arkadaşlarının (13) farmakolojik ajanlar kullanarak uyguladıkları klinik çalışmalarda kullanılan materyallerin doku tarafında emilemediğini ve hemostaz için uygulandığı bölgeden kaldırılmaya çalışıldığında oluşan tıkaçın yerinden oynamasıyla tekrar kanamaların oluştuğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu materyaller burada bırakıldığında kitle etkisi ve epileptik odak oluşturabilirler. ABS'in etki mekanizması tamamen kan içerisinde bulunan proteinler üzerindedir. Sıvı bir materyal olduğu için yüzey boyunca yayılmakta ve kitle etkisi oluşturmamaktadır.

Hemostaz için kullanılan bir başka madde de okside seluloz (surgicell) 'dur. Bu madde topikal pasif hemostatik ajanlardan birisidir. Tomizawa ve arkadaşlarının (12) yaptığı bir çalışmada bu maddenin emiliminin yeterince gerçekleşmediği ve rezidü parçalar halinde kalarak tekrar organize olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ABS uygulanan ratların hiçbirinde uygulama alanında fibrozis ya da başka bir organize doku saptanmamıştır.

Charman ve arkadaşlarının (23) kollajen içeren ürünlerle yaptığı bir çalışmada bu maddenin hemostaz ortalama 78 saniyede sağladığı izlenmiştir. Yine bu çalışmada kollajen içeren ürünlerin enfeksiyon riskini artırdığı ve aktif kanamalarda etkisiz oldukları gösterilmiştir. Termal yöntemler de dokuyu koagüle ederken beslenmesini bozarak enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadırlar. Fışkın ve arkadaşları (27) yaptıkları çalışmada agar difüzyon yöntemi ile ABSin antimikrobik etkinliğini incelemiş ve ABS nin çalıştıkları tüm bakterilere karşı antimikrobik olarak etkin olduğunu saptamışlardır. Çalıştıkları bakteriler içinde bu antimikrobik etkinliğin Acinetobakter, MRSA ve ESBL (+) E. Coli'ye karşı daha fazla olduğu görülmüştür. Bu çok hızlı hemostaz sağlayan ABS'nin ek olarak sahip olduğu antimikrobik etkisinin postoperatif enfeksiyon riskini de azaltacağı ya da en azından ek bir risk getirmeyeceğini düşündürmektedir.

Cerrahi sırasında çoğunlukla venöz kanamalar arterial kanamalara göre daha kolay durdurulabilmektedir. Persistan arterial kanamalarda aktif kanamayı önlemek için kullanılan mekanik yöntemler damarın görülmeye kadar kapatılması mümkün ise iyi bir hemostaz sağlar. Arteriyel kanamalarda hemostatik ajanların etkisi çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Ayrıca etkisini çok daha uzun sürelerde göstermektedirler. M. Kurt ve arkadaşlarının (31) bildirdiği bir olgu sunumunda daha önceden billroth- 2 cerrahisi

geçirmiş rektal kanamalı bir hastanın endoskopik cerrahisi esnasında gastrojejunal anastomoz bölgesinden abondan bir kanama olduğu görülmüş ve kanayan damara direkt 3 adet hemoklips koyularak hemostaz sağlanmaya çalışılmıştır. Fakat kanamanın aynı şekilde devam etmesi üzerine kanayan bölgeye 2 ml epinefrin uygulanmıştır. Bu hemostatik ajanında yetersiz kalması üzerine 12 ml ABS uygulanmış ve 2 sn içinde kanamanın durduğu gözlenmiştir. Bu ABS'in aktif arteriyel kanamalı hastalarda kullanılmasında da etkin bir hemostaz sağlayabildiğini göstermektedir.

Bu kadar hızlı ve aktif etkili bir hemostatik ajanın kullanılabilirliğinin cerrahide hasta ve cerrah için ne kadar rahatlık ve güven sağlayacağı ortadadır fakat bu materyalin nöral doku üzerine etkilerinin bilinmesi beyin cerrahisinde kullanılabilirliği ile ilgili yol gösterici olacaktır. Bu yüzden yaptığımız çalışmada ABS'nin nöral doku üzerine olumsuz bir etkisinin olup olmadığına bakıldı. Nörotoksisite kriteri olarak daha önce yapılmış çalışmalardaki histopatolojik kriterler esas alındı (40, 41, 42, 43). ABS uygulanan gruptaki ratlarda ödem, gliozis, nöronal dejenerasyon ve inflamatuvar hücre olmadığı, nöron sayılarının ortalama normal değerlerde olduğu görüldü ve uygulanan istatistik yöntemleri ile ABS uygulanan grup ile kontrol grubu olarak kullanılan SF uygulanan grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Ayrıca her iki grupta hiçbir işlem uygulanmayan bir rat beyni ile karşılaştırılmış ABS uygulanan grubdaki ratların 3 tanesinde ve SF uygulanan ratların 2 tanesinde hafif düzeyde ödem dışında ek patolojik bir değişiklik saptanmamıştır. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P=0.528). ABS uygulanan grupların 5 tanesinde ve kontrol gruplarının 2 tanesinde hafif düzeyde inflamatuvar hücre görülmüş bunun da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmış ve cerrahi işlem ve sürece bağlı olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak çalışma sonunda ABS uygulanan grup da ve SF uygulanan kontrol grubunda birkaç denekte ödem ve inflamatuvar hücre varlığı dışında nöronal dejenerasyon, gliozis veya nöron sayılarında azalma saptanmamıştır. Bu da ABS'nin nöronal dokularda da kullanılabileceğini düşündürmektedir.

## 6. SONUÇLAR

- 1- Cerrahi kanamalar cerrahın performansın ve hastanın morbidite ve mortalitesini etkileyen en önemli sorunlardan biridir.
- 2- Mevcut hemostatik yöntem ve ajanlar etkin ve güvenli bir hemostaz için yetersiz kalabilmektedir.
- 3- ABS hızlı, etkili, kolay uygulanabilir, arterial veya venöz tüm kanamalarda çok etkin bir ajandır.
- 4- Yapılan çalışmada ABS uygulanan grup ile SF uygulanan gruptaki deneklerde ödem, inflamasyon, nöronal dejenerasyon ve nöron sayısından anlamlı fark bulunamamıştır.
- 5- ABS'nin beyinde nöronal dokuda belirgin bir değişiklik yapmaması nedeni ile beyin cerrahi ameliyatlarında da kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ferhanođlu B. Hemostaz Mekanizmas›. Kanama ve Tromboza Eđilim, 2003;36:9-16.
2. Guyton AC, Hall JE. T›bbi Fizyoloji 11. Bask›, Nobel Yay›nc›lık, 2007, 457-467.
3. Handin RI, ev: Beyan C, Nevruz O, Kanama Ve Tromboz, K›s›m 10, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL(eds), Harrison İ Hastal›klar› Prensipleri, Nobel Kitabevleri, 2004, İstanbul 354-360.
4. Parise LV, Smyth SS, Collier BS, Platelet morphology, biochemistry and function Beutler E, Lichtman M, Collier B, Kipps T, Seligsohn U(eds.), Williams Hematology. Newyork, Medical publishing division, 2001, 1357-1409.
5. Colman RW, H›rsh J, Moider VJ ve ark. Hemostasis And Trombosis, Basic Principles And Clinical Practice. Lippincott Williams, 2004;4:381-400.
6. Oz MC, Rondinone JF, Shargill NS. FloSeal Matrix: new generation topical hemostatic sealant. J Card Surg. 2003;18 (6):486-493.
7. Renkens KL Jr, Payner TD, Leipzig TJ, et al. A multicenter, prospective, randomized trial evaluating a new hemostatic agent for spinal surgery. Spine. 2001;26(15):1645-1650.
8. Sabel M, Stummer W. The use of local agents: Surgicel and Surgifoam. Eur Spine J. 2004;13 (Suppl 1):S97-S101. Epub May 15, 2004.
9. Morikawa T. Tissue sealing. Am J Surg. 2001;182(2 Suppl):29S-35S.
10. Block JE. Severe blood loss during spinal reconstructive procedures: the potential usefulness of topical hemostatic agents. Med Hypotheses. 2005;65(3):617-621.
11. Richard T, Rinder HM, ev: Seluk M, Normal hemostaz. Thomas E.A, Charles C, Carpenter J, Robert CG, Benjamin IJ (eds.), Andreoli and Carpenter's Cecil Essentialss of Medicine, Nobel Kitapevleri 2008, İstanbul:531-538.
12. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. Artif Organs. 2005;8(3):137-142.
13. Bochicchio G, Dunne J, Bochicchio K, Scalea T. The combination of platelet-enriched autologous plasma with bovine collagen and thrombin decreases the need for multiple blood transfusions in trauma patients with retroperitoneal bleeding. J. Trauma. 2004;56(1):76-79.



14. Carreon LY, Puno RM, Dimar JR 2nd, Glassman SD, Johnson JR. Perioperative complications of posterior lumbar decompression and arthrodesis in older adults. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A(11):2089-2092.
15. McDonnell MF, Glassman SD, Dimar JR 2nd, Puno RM, Johnson JR. Perioperative complications of anterior procedures on the spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78(6):839-847.
16. Lundblad RL, Bradshaw RA, Gabriel D, Ortel TL, Lawson J, Mann KG. A review of the therapeutic uses of thrombin. *Thromb Haemost.* 2004; 91(5):851 -860.
17. Krebs VE, Higuera C, Barsoum WK, Helfand R. Blood management in joint replacement surgery: what's in and what's out. *Orthopedics.* 2006;29(9):801-803.
18. Albala DM, Lawson JH. Recent clinical and investigational applications of fibrin sealant in selected surgical specialties. *J Am Coll Surg.* 2006;202(4):685-697. Epub February 20, 2006.
19. Gabay M. Absorbable hemostatic agents. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 63 (13): 1244-1253.
20. Brunickardi FC, Anderson DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. Hemostasis, surgical bleeding, and transfusion. In: eds. *Schwartz's Principles of Surgery.* 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005:93.
21. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(2):343-354.
22. Wagner WR, Pachence JM, Ristich J, Johnson PC. Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents, *J Surg Res.* 1996;66(2):100-108.
23. Chapman WC, Wren SM, Lebovic GS, Malawer M, Sherman R, Block JE. Effective management of bleeding during tumor resection with a collagen-based hemostatic agent. *Am Surg.* 2002;68(9):802-807.
24. Chapman WC, Clavien PA, Fung J, Khanna A, Bonham A. Effective control of hepatic bleeding with a novel collagen-based composite combined with autologous plasma: results of a randomized controlled trial. *Arch Surg.* 2000;135(10):1200-1204.
25. Bishop PD, Lewis KB, Schultz J, Walker KM. Comparison of recombinant human thrombin and plasma- derived human alpha-thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32(Suppl 1):86-97.

26. Göker H, Haznederoğlu I, Erçetin S, Kirazlı S, Akman U, Öztürk Y, Frat H. Haemostatic Actions of the Folkloric Medicinal Plant Extract Ankaferd Blood Stopper. *The Journal of international Medical Research* 2008;36:163-170.
27. Akkoç N, Akçelik M, Haznedaroğlu IC, Göker H, Aksu S, Kirazlı S, Frat HC. In Vitro Anti-Bacterial Activities Of Ankaferd Blood Stopper. *Int J Lab Hematol.* 2008;30:95.
28. Morsdorf S, Jung F, Seyfert UI, et al Erythrocyte hyperaggregation and thrombogenic dysfibrinogenemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1997;17:13-19.
29. Reinhart WH, Nagy C. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:523-528.
30. Doğan OF, Ozyurda U, Uymaz OK, Erçetin S, Haznedaroğlu IC. New antikoagulant agent for CABG surgery. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:341.
31. Kurt M, Disibeyaz S, Akdoğan M, Şaşmaz N, Aksu S, Haznedaroğlu 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.
32. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP: Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol* 2006;6:494-498.
33. Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, et al: Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 2007;91:131-137.
34. Barka EA, Belarbi A, Hachet C, et al: Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186: 91-95.
35. Barka E, Gognies S, Nowak J, et al: Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol Control* 2002;24:135-142.
36. Zhao J, Wang J, Chen Y, et al: 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* 1999;20:1737-1745.

37. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, et al: Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999;142:139-149.
38. Matsuda H, Ando S, Morikawa T, et al: 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* 2006;14:138-142.
39. Testai L, Chericoni S, Calderone V, *et al*: Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol* 2002;81:105-109.
40. Guevara-López U, Covarrubias-Gómez A, Gutierrez-Acar H, Aldrete JA, López-Muñoz FJ, Martínez-Benítez B. Chronic subarachnoid administration of 1-(4chlorobenzoyl)-5methoxy-2methyl-1H-indole-3 acetic acid (indomethacin): an evaluation of its neurotoxic effects in an animal model. *Anesth Analg.* 2006 Jul;103(1):99-102.
41. Arai T, Hoka S. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics. *J Anesth.* 2007;21(4):540-1. Epub 2007 Nov 1.
42. Guevara-López U, Aldrete JA, Covarrubias-Gómez A, Hernández-Pando RE, López-Muñoz FJ. Absence of histological changes after the administration of a continuous intrathecal clonidine in Wistar rats. 2009 Mar-Apr; 9(2):22-9. Epub 2008 Nov 18.
43. Peter SH, Joseph MN, Pollock JE, Liu SS. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (Spinal) *Anesth Analg.* 1999 Jan; 88:797-809.