

T.C
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RATLARDA ASİRİNLE İNDÜKLENEN MİDE HASARINDA
KANAMA DURDURUCU ANKAFERD'İN OKSİDATİF
MUKOZAL HASAR ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
RUKİYE HASGÜL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FERAH ARMUTCU

Ankara – 2012

Fatih Üniveritesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi P530610915_2
Tarafından Desteklenmiştir.



FATİH ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

25.01.2012

Enstitünüz TIBBİ BİYOKİMYA Anabilim Dalı 53011001 numaralı yüksek lisans öğrencisi RUKİYE HASGÜL' ün hazırlayarak enstitüye teslim ettiği, **Ratlarda aspirinle indüklenen mide hasarında kanama durdurucu Ankaferd'in oksidatif mukozal hasar üzerine koruyucu etkileri** adlı tezi, tez jüri üyeleri huzurunda **60** (*) dakika ile savunulmuş ve sonuçta adayın tezi hakkında, **Ö.Y. BİRLİĞİ** (**) ile **KABUL** (***) kararı verilmiştir.

Jüri Üyesi : Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU
Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

U. R. M. K.

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ferah ARMUTCU
Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hakan BOYUNAĞA
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

*savunma süresi el ile yazılacaktır. (savunma süresi, en az 45 en çok 90 dakikadır)

**oybirliği / oyçokluğu el ile yazılacaktır.

***kabul / red ve düzeltme el ile yazılacaktır.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanım sayın Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU'na ve danışman hocam sayın Prof. Dr. Ferah ARMUTCU, değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin ERDAMAR ve diğer öğretim üyesi hocalarım ile araştırma görevlisi Dr. Sema UYSAL'a, ayrıca maddi manevi desteklerini esirgemeyen başta babam, annem ve eşime teşekkür ederim.

Rukiye HASGÜL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
ŞEKİL ve GRAFİKLER	x
ÇİZELGELER ve RESİMLER.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANAMALARI	2
2.2. ASPİRİN	2
2.2.1. Aspirinin Yan Etkileri.....	3
2.3. ANKAFERD BLOOD STOPPER.....	3
2.3.1. Glycyrrhiza glabra (meyan)	4
2.3.2. Thymus vulgaris (kekik).....	4
2.3.3. Vitis vinifera (koruk)	4
2.3.4. Alpinia oppicinarrum (havlıcan).....	4
2.3.5. Urtica dioica (ısırgan)	5
2.4. SERBEST RADİKALLER	6
2.4.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller	6
2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	7
2.4.1.2. Hidrojen peroksit	8
2.4.1.3. Hidroksil Radikali.....	8
2.4.1.4. Singlet Oksijen.....	8
2.4.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	9
2.4.2.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikaller.....	10

2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklı Serbest Radikaller	10
2.5. SERBEST RADİKALLERİN HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	10
2.5.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	10
2.5.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	12
2.5.3. Karbonhidratlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler ...	13
2.5.4. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	14
2.6. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI SAVUNMA MEKANİZMALARI	14
2.6.1. Antioksidan Sistemler	14
2.6.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	15
2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
2.6.1.1.2. Katalaz	16
2.6.1.1.3. Glutatyon Peroksidaz	17
2.6.1.1.4. Glutatyon-S-Transferazlar	17
2.6.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	18
2.6.1.2.1. Glutatyon	18
2.6.1.2.2. Askorbik Asit	18
2.6.1.2.3. Melatonin	18
2.6.1.2.4. Serüloplazmin	19
2.6.1.2.5. Transferrin-Laktoferrin	19
2.6.1.2.6. Haptoglobulin	19
2.6.1.2.7. Ferritin	19
2.6.1.2.8. Diğerleri	19
2.7. LİPİD PEROKSİDASYONU VE YIKIM SON ÜRÜNÜ; MALONDİALDEHİT (MDA)	20
2.8. NİTRİK OKSİT (NO)	21
2.8.1. Sentezi ve Etki mekanizması	21

2.8.2. Nitrik Oksitin Etkileri	21
2.8.2.1. Zararlı Etkileri.....	21
2.8.2.2. Koruyucu Etkileri	22
2.8.2.3. Düzenleyici Etkileri	22
2.9. Myeloperoksidaz (MPO)	22
2.10. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)	23
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	24
3.2. GEREÇLER	25
3.3. GEREKLİ KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	25
3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	25
3.4.1. Plazma MDA Tayini	25
3.4.2. Doku MDA Tayini	26
3.4.3. Plazma SOD Aktivitesi	27
3.4.5. Serum Nitrik Oksit (NO) ölçümü	28
3.4.6. Serum MPO aktivitesi ölçümü.....	29
3.4.7. Serum TNF- α düzeyleri ölçümü	30
3.5. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER	30
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. SERUM MDA.....	35
4.2. DOKU MDA.....	35
4.3. SERUM SOD.....	36
4.4. DOKU SOD	36
4.5. NO	37
4.6. MPO	37
4.7. TNF-ALFA	38
4.8. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULARI	39

4.8.1. Kontrol Grubu	39
4.8.2. Ankaferd Grubu.....	40
4.8.3. Aspirin Grubu	41
4.8.4. Ankaferd +Aspirin Grubu:	42
4.9. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	43
5. TARTIŞMA	44
6. KAYNAKLAR.....	50

ÖZET

Yüksek lisans tezi

RATLARDA ASPIRİNLE İNDÜKLENEN MİDE HASARINDA KANAMA DURDURUCU ANKAFERD'İN MUKOZAL OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİ

Rukiye HASGÜL

Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferah ARMUTCU

Ocak 2012, 50 sayfa.

Aspirinin klinik kullanımında gastrointestinal kanamalara neden olduğu bilinmektedir. Bu alışma deneysel olarak aspirinle indüklenen mukozal hasarda arttığı bilinen oksidatif stres üzerine Ankaferd Blood Stopper'ın etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Onbir aylık ortalama 375 gr ağırlığında 24 erkek Wistar Albino ratlar rastgele; Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin + Ankaferd olarak 4 gruba ayrılmıştır. Gruplara ait uygulamalardan 15 gün sonra kan ve doku örnekleri alınarak serumda MDA, SOD, NO, MPO ve TNF- α düzeyleri, doku örneklerinde SOD aktivitesi ve MDA düzeyleri ölçülmüştür. Gruplara ait bulunan ortalama değerler kendi aralarında SPSS 16.0 programı kullanılarak ANOVA varyans analizi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak bizim çalışmamızda da aspirinle indüklenen mide mukoza hasarında oksidatif stres artmıştır. Ayrıca artan bu oksidatif stresin ankaferdin antioksidan etkisiyle normale döndüğü görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Aspirin, Gastrointestinal Kanama, Ankaferd, Oksidatif Stres

ABSTRACT

M . Sc. Thesis

**PROTECTIVE EFFECT OF BLOOD STOPPER ANKAFERD ON
ASPIRİN-INDUCED MUCOSAL OXİDATIVE DAMAGE İN A
RAT MODEL OF GASTRİC İNJURY**

Rukiye HASGÜL

Fatih University

Institute of Health Sciences

Department of Biochemistry

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ferah ARMUTCU

January 2012, 50 pages

It is known that clinical use of aspirin causes gastrointestinal hemorrhage. This study is planned to explore the effects of Ankaferd Blood Stopper on oxidatif stres which is experimentally known to increase in aspirin-induced mucosal injury. 11 Month-old and weighing average 375 gram, 24 male Wistar Albino rats are randomly separated into 4 groups as Contol, Ankaferd, Aspirin and Aspirin+Ankaferd. After 15 days, by taking blood and tissue samples from implementations belonging to groups, MDA, SOD, NO, MPO and TNF- α levels in serum, SOD activities and MDA levels in tissue samples are measured. Found average values which belong to the groups are compared statistically among themselves according to ANOVA variance analysis in SPSS 16.0 program. As a consequence, oxidatif stress in aspirin-induced mucosa injury increased in our study as well. Furthermore, it is seen that increasing oxidatif stress returned to normal with the antioxidant effect of Ankaferd.

Key Words: Aspirin, Gastrointestinal Bleeding, Ankaferd, Oxidative Stres

ŞEKİL ve GRAFİKLER

Şekil- 1 : Aspirinin Kimyasal Yapısı

Şekil- 2 : Ankaferd Blood Stopper'ın Temel Mekanizması

Şekil- 3 : Lipid Peroksil Radikal Oluşum Reaksiyonu

Grafik-1: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait serum MDA düzeyleri

Grafik-2 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait doku MDA düzeyleri

Grafik-3 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait serum SOD düzeyleri

Grafik-4 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait doku SOD düzeyleri

Grafik-5 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait NO düzeyleri

Grafik-6 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait MPO düzeyleri

Grafik-7 : Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait Tnf- α düzeyleri

ÇİZELGELER ve RESİMLER

Çizelge 1 : Serbest Radikal Kaynakları

Çizelge 2 : Histolojik takip basamakları

Çizelge 3 : Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

Çizelge 4 : Grupların istatistiksel değerlendirilmesi

Çizelge 5 : Mukozal hasar evrelendirilmesi

Resim 1 : Grup 1 Kontrol grubuna ait normal histomorfolojik özellikler gösteren mide mukozası (HEX100)

Resim 2 : Grup 2 Ankaferd grubu Kontrol grubuna benzer normal histomorfolojik özellikler gösteren mide mukozası (HEX100)

Resim 3 : Grup 3 Aspirin verilen grupta mukoza kalınlığının %50'sini geçmeyen mukozal haraplanma (HEX100)

Resim 4 : Grup 4 Aspirin ve ankaferd verilen grupta yüzey epitel kaybı, gastrik pitleri döşeyen hücrelerin eksfoliyasyonu (HEX100)

SİMGELER ve KISALTMALAR

L	Litre
ml	Mililitre
dl	Desilitre
U	Ünite
µg	Mikrogram
GIS	Gastrointestinal Sistem Kanamaları
ASA	Asetil salisilik asit
NSAI	Non steroid antiinflamatuvar
ABS	Ankaferd Blood Stopper
NaCl	Sodyum Klorür
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
O ₂ ^{·-}	Süperoksit Radikali
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO [·]	Hidroksil Radikali
OH	Hidroksi Molekülü
PUFA	Poliansatüre Yağ Asiti
LOO [·]	Lipid Peroksil Radikali
L [·]	Lipid Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit Dismutaz
NO	Nitrik Oksit
MPO	Myeloperoksidaz
TNF	Tümör Nekroz Faktör
Mn-SOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
Cu-Zn SOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Organizmadaki normal koşulların sürekliliğinin sağlanmasına homeostaz denir. İlaçlara (aspirin v.b.) bağlı kanamaların tedavisinde bazı trombosit süspansiyonları, K vitamini, taze donmuş plazma ve protamin sülfat kullanılmaktadır. Kullanılan bu ilaçların yan etkilerinin olması bilim adamlarını farklı metodlar bulmaya yönlendirmiştir. Ankaferd blood stopper farklı bir yoldan kanama durdurucu etki gösteren bitkisel bir karışımdan oluşan yeni bir ajandır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) çeşitli stres durumları ile oluşumunun hızlandığı ve bu oluşumun lipid peroksidasyonuna yol açtığı görülmüştür. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar sonucu plazmadaki ve dokudaki MDA değerinin arttığı, SOD düzeylerinin azaldığı görülmüştür.

Ankaferd Blood Stopper'in içerisinde bulunan Thymus Vulgaris, Glycyrrhiza glabra, Vitis vinifera bitkilerinin antioksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir (1).

Son yıllarda intestinal mukoza hasarı gelişiminde serbest radikaller, yani oksidatif hasarın etkisi üzerinde durulmaktadır. Bu tez çalışmasında aspirinle indüklenen deneysel mukoza hasarında oksidatif stresin etkilerinin araştırılması ve buna karşı ABS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANAMALARI

Gastrointestinal sistem kanamaları yaygın ve ciddi klinik bir sorundur. GIS kanamaları herhangi bir yerde; yemek borusu, mide ve onikiparmak bağırsağı, ince bağırsak ve kolon gibi organlarda ortaya çıkabilir. Akut GIS kanaması olan hastaların yarısı 60 yaş üstündeki kişilerdir (2).

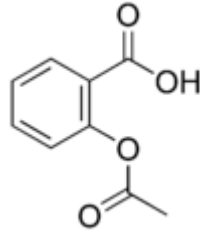
GIS kanamalarının salgın hastalıklarla değişen görüntüsü, gençlerde peptik ülserle bağlı kanamalarda azalma, yaşlılarda ise aspirin ve non-steroid antiinflamatuar ilaç kullanımına bağlı kanamalarda artış görülmektedir (3).

Genellikle tüm gastrointestinal sistem kanamalarının % 85'i üst GIS kaynaklı olup, bu kanamaların çoğu kendiliğinden durur (4,5,6). Üst gastrointestinal sistem kanamaları, özefagusun üst kısmı ile Treitz ligameni arası herhangi bir yerden lümen içine olan kanamaları kapsar (7). Üst gastrointestinal sistem kanamasının görülme sıklığı; her 100.000 kişide yaklaşık 40 – 150 civarındadır ve hastalığa bağlı mortalite % 6-10 arasında değişmektedir (8,9).

2.2. ASPIRİN

Aspirin ya da asetilsalisilik asit (kısaca ASA), genellikle hafif ağrı ve sızılar için kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü bir ilaçtır. Aspirinin ortaya çıkması, kimyager Felix Hoffmann'ın 1897'de saf asetilsalisilik asit (ASA) üretmesiyle mümkün olmuştur. ASA, ağrı kesici ve ateş

düşürücü olarak kullanılan aspirinin etken maddesidir. Kaynağı ise dünyanın her yerinde yetişen söğüt ağacıdır (10). Ayrıca kan seyreltici etkisi vardır ve kalp krizine karşı koruma sağlaması amacıyla uzun dönem düşük dozda kullanılır. Aşırı dozda kullanımı yüzünden her yıl yüzlerce kişi ölümcül etkilere maruz kalsa da, genel olarak aspirinin faydalı bir ilaç olduğu kabul edilir (11).



Şekil 1: Aspirinin Kimyasal Yapısı

2.2.1. Aspirinin Yan Etkileri

Aspirin zayıf bir organik asittir (pKa: 3,5) ve siklooksijenazı geriye dönüşümsüz olarak işlevsiz hale getirdiği için diğer NSAİ'lardan farklıdır (12). NSAİ kullanımından sonra ortaya çıkan yan etkiler, tedavinin sonlandırılmasına veya başka bir ilaç gruplarıyla kombine tedavi uygulanmasına neden olmaktadır (13).

2.3. ANKAFERD BLOOD STOPPER

Ankaferd blood stopper (ABS); tıpta uzun bir süredir kanama durdurucu olarak kullanılmaktadır. Ankaferd; *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinden oluşmuş bir karışımdır (14).

2.3.1. Glycyrrhiza glabra (meyan)

Damar oluşumunu inhibe eder, vasküler endotelial growth faktör oluşumunu azaltır ve sitokin ilişkili neovaskülarizasyonu azaltır. Aynı zamanda anti-enflamatuar, anti-trombin, anti-platelet, anti-oksidan, anti-ateroskleroz ve anti-tümör etkiye sahiptir (15,16,17).

2.3.2. Thymus vulgaris (kekik)

Anti-oksidan etkisi vardır, bu sayede in vivo oksidatif hasarı önler, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı arteroskleroz oluşumunu önler (18). Bunlarla beraber anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral, anti-protozoan, bronşiyal anti-spazmotik ve ekspektoran özelliklere de sahiptir (19).

2.3.3. Vitis vinifera (koruk)

Proteinlere karşı direnç sağlar. Anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri de vardır (20,21). Aynı zamanda anti-oksidan, sitotoksik, kemopreventif ve sitoprotektif etkisi olduğu da bilinmektedir (22).

2.3.4. Alpinia oppicinarrum (havlıcan)

Nitrik oksit oluşumunu azaltır (23). Anti-spazmotik ve anti-bakteriyel özelliklere sahiptir (24).

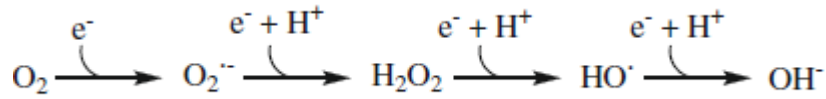
2.4. SERBEST RADİKALLER

Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapılar oluşmaktadır. Bu bağlar ya elektronun bir atomdan diğerine geçmesi ya da iki atom tarafından ortaklaşa kullanımı ile meydana gelir. Eğer bir atomdan diğerine elektron geçmesi ile bağ oluşmuşsa buna iyonik bağ (örn; NaCl) denir. Elektron ortaklaşa kullanılmış ise buna kovalent bağ denir ki, iki oksijen atomunun yan yana gelerek O₂ molekülünü oluşturması buna örnektir (27). Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesi ile oluşurlar. Dolayısıyla yörüngelerinde çiftleşmemiş tek elektron bulunduran atom ya da moleküllere serbest radikal denir. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin en önemli kaynağı oksijendir (28,29).

2.4.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller

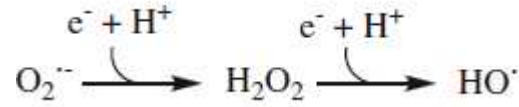
Reaktif oksijen türevleri (ROT) aerobik metabolizmalarda bazı fizyolojik olaylar esnasında oluşurlar. Bunların fizyolojik şartlardaki başlıca kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir. Genellikle hücrelerce kullanılan oksijenin % 95'i mitokondrilerde aşamalı olarak dört elektron ilavesiyle suya indirgenir. Normal şartlar altında, bu mitokondriyal olay sırasında oksijenin % 1-2'si de O₂^{-•}'e dönüştürülür (30,31). ROT, enzim ve protein gibi hayati makromoleküllerle, lipidlerle ve nükleik asitlerle (DNA ve RNA) reaksiyona girip hücre yapısı ve fonksiyonunu bozarak birçok patolojik olaylarda rol oynarlar. Serbest radikallerin hücrel hasar yaptığının en iyi tanımlandığı durumlar; **I.**

Pulmoner oksijen toksisitesi, **II.** Post iskemik reperfüzyon hasarı, **III.** İltihabi durumlar, **IV.** Radyasyon hasarı ve **V.** Birçok kimyasalların toksik etki göstermesi örnek olarak verilebilir. Bunlara ilaveten Alzheimer hastalığı, yaşlanma, ateroskleroz ve diğer birçok patolojik durumlarda serbest radikallerin rol oynadığı gösterilmiştir. Aktive olmuş fagositlerden serbest radikal oluşur. Stres durumlarında katekolamin düzeyi artar, katekolaminlerin oksidasyonuylada serbest radikaller oluşur (32,33,34).



2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Son iki orbitalinde birer tane eşleşmemiş elektron bulunduran moleküler oksijen, kolaylıkla elektron alarak radikale dönüşür. Bu radikale süperoksit radikali denir ve dış yörüngesinde çiftleşmemiş elektron içerdiğinden hem bir radikal, hem de protondan daha fazla elektron içerdiğinden anyondur (35,36). Süperoksit radikal, moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. Milisaniyelik bir yarı ömrüyle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. Süperoksit radikali aynı zamanda oksidatif strese yol açan bir dizi reaksiyonu başlatabilir (29,37). Bu reaksiyonlardan en kritik olanı Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen süperoksit radikalının ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) demir varlığında etkileşerek son derece reaktif hidroksil radikaline (HO^{\cdot}) dönüşmesi reaksiyonudur (38).



2.4.1.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır. Oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (33,39).

2.4.1.3. Hidroksil Radikali

H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$ ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan OH^{\cdot} radikale dönüşür. H_2O_2 , serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken yine OH^{\cdot} radikali oluşur. Buna “fenton reaksiyonu” da denir (33,39).

2.4.1.4. Singlet Oksijen

Oksijenin uyarılmış haline “singlet oksijen” denir. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan

tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (39).

2.4.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında olabildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest radikal oluşturucu mekanizmalar endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılmaktadır. Vücudumuzda oluşan radikallerin sayısı yüzlerce çeşit olarak ifade edilsede, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalinin özel yerleri vardır (40,41).

Çizelge 1: Serbest radikal kaynakları (42)

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal ETZ	İlaç oksidasyonları (Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler	Güneş ışığı
Ksantin oksidaz	X-ışınları
İndolamin dioksijenaz	UV ışınları
Triptofan dioksijenaz	Isı şoku
Galaktoz oksidaz	
Siklooksijenaz	
Lipooksijenaz	
Mono aminooksidaz	
Fagositik hücreler	Glutasyonu okside eden maddeler
Nötrofiller	Ortam havası
Monosit ve makrofajlar	Sigara dumanı
Eozinofiller	Ozon
Endotelyal hücreler	Kükürt dioksit
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	Egzos gazları

2.4.2.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikaller

Metabolizmanın normal seyrinde, çeşitli basamaklarda serbest radikal yapısına sahip ara ürünler meydana gelmektedir. Metabolik sürecin ilerleyebilmesi için bu bileşiklerin ara ürün olarak oluşmaları kaçınılmazdır.

2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklı Serbest Radikaller

Organizmanın doğasından kaynaklanmayan, sadece dış etkenlerin varlığında oluşan reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller açığa çıkabilir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

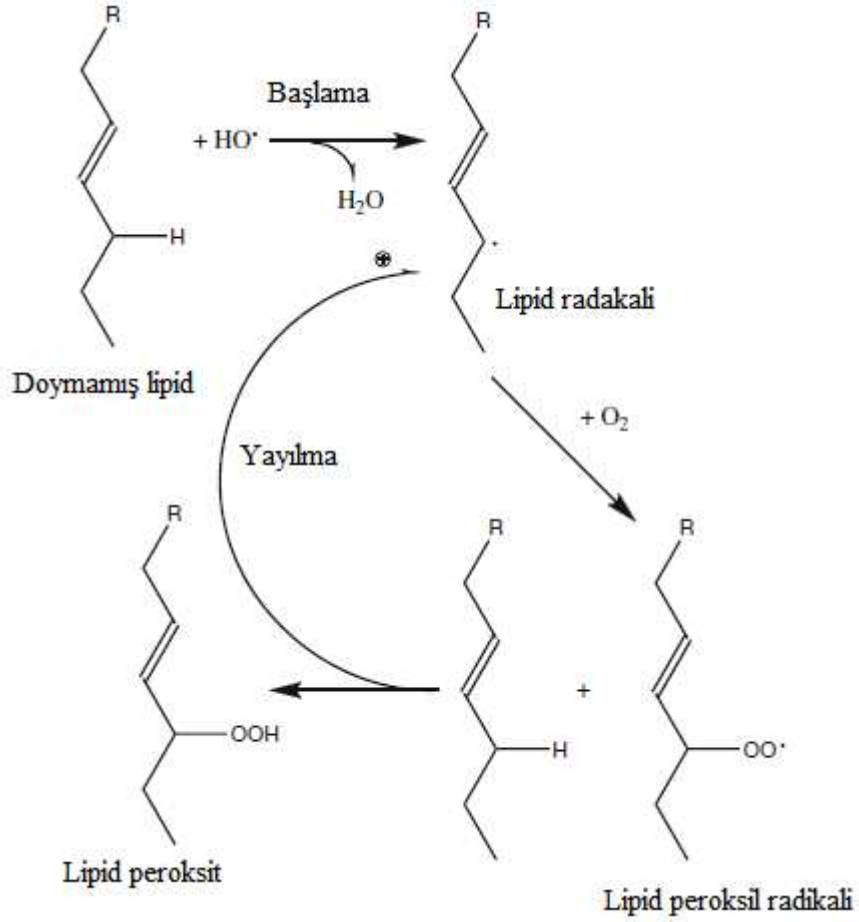
- Antineoplastik ajanlar
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar: Ksenobiyotikler (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar).
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (35,43).

2.5. SERBEST RADİKALLERİN HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

2.5.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlara, serbest radikallerin etki etmesi ile lipid peroksidasyonu üzerinden

poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açabilir. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir fenomendir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO[•]) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar. Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile rölatif olarak daha stabil olan son ürün MDA oluşur. Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir. MDA'nın kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde birçok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur (29,37,44).



Şekil 3: Lipid Peroksil Radikal Oluşum Reaksiyonu

2.5.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Protein ve nükleik asitler serbest radikal etkilerine karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (33,45).

2.5.3. Karbonhidratlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agregasyonuna sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir. Serbest radikaller, bu etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar. Diabetes Mellitus ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (46). Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (33). Glikozaminoglikan olan ve sinovyal sıvının viskositesinde önemli rol oynayan hyalüronik asitin reaktif oksijen türleri ile etkilenmesi ile bağ dokusu stabilitesi bozulur. Hyaluronik asit parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovyal sıvının karakteristik bir özelliğidir. Gözün vitröz sıvısında da bol miktarda hyaluronik asit bulunurken, oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (47).

2.5.4. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller, DNA’da tek veya çift bağ kırıklarına yol açarak hücrede mutasyona ve hücre ölümüne neden olurlar. DNA’da hasarın oluşması için serbest radikallerin spesifik bölgelere yüksek konsantrasyonda bağlanarak, zincir kırılmalarına yol açmaları veya replikasyon olmadan önce DNA tamir sistemlerini etkisiz hale getirerek mutasyonlara yol açmaları gerekir (48). *In vitro* şartlarda DNA’da oluşturulan hasarın çoğu diffüzyonla geçen OH radikaline bağlıdır. OH radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA’da değişikliklere yol açar. DNA zincirindeki kırılmaların daha çok radikallerin şeker-fosfat çatısı ile reaksiyonu sonucu veya DNA’nın δ ışını, O_2^- , H_2O_2 ve enzim kaynaklı oksijen radikallerinin maruz kalması sonucudur (48). O_2^- ’e maruz bırakılan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir.

2.6. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI SAVUNMA MEKANİZMALARI

2.6.1. Antioksidan Sistemler

Vücuttaki reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (49). Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini sağlayan bu maddelere “*antioksidan*” maddeler denilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu

engelleyerek yada reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedirler. Aerobik hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmaktadır (33,49,50).

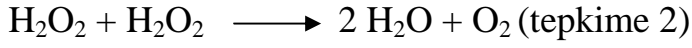
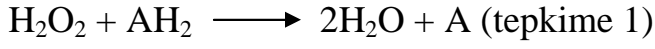
Enzimatik antioksidanlar içinde en önemlileri; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidazlar, glutatyon S-transferazlar, glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve hidroperoksidazlar iken, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında; glutatyon, askorbik asit (C vitamini), melatonin, serüloplazmin, transferin-laktoferrin, haptoglobulin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin, ürik asit ve albumin yer almaktadır (51,52). Likopenin de son yıllarda antioksidan kapasiteye sahip olduğu rapor edilmektedir (53).

2.6.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanid ile inhibe edilir. Mn-SOD mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. SOD' un fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2

H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



2.6.1.1.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, hidrojenperoksidin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H₂O₂'in redüksiyonunu katalizler (57).

2.6.1.1.4. Glutatyon-S-Transferazlar

Glutatyonun tiyol grubuna toksik bileşik veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerinin bağlanmasını katalize eden, karaciğer sitoplâzmasında ve daha az miktarda diğer dokularda bulunan zehirsizleştirmede görev alan enzimdir. Son zamanlara kadar GST'lar katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmakta idiler (aril transferaz, alkil transferaz, epoksit transferaz, aralkil transferaz ve alken transferaz gibi). Daha sonra yapılan çalışmalar bu enzimlerin söz konusu reaksiyonların herhangi birine özgül olmadığı, iç içe geçmiş substrat özgülüğüne sahip olduğu ortaya konmuş ve bunlar 'glutatyon-S-transferaz'lar adı altında toplanmıştır.

2.6.1.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son basamağında bulunan sitokrom oksidaz süperoksidi detoksifiye eden enzimdir. Vücutta sürekli devam eden bu

olay yakıt maddelerinin oksidasyonunu tamamlar ve bol miktarda enerji üretir.

2.6.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.6.1.2.1. Glutatyon

Bir tripeptid (γ -glutamil-sistein-glisin), peptid bağı ile birbirine bağlanmış üç aminoasit içeren bir peptittir. Üç tane çift bağı vardır. Glutatyon, hücreleri serbest radikallerden koruyan bir antioksidandır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur (58).

2.6.1.2.2. Askorbik Asit

Vitamin C olarak bilinir. Güçlü indirgen özelliğinden dolayı kuvvetli bir antioksidandır. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH\bullet$) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir (58).

2.6.1.2.3. Melatonin

En zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ($OH\bullet$) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (58).

2.6.1.2.4. Serüloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan serüloplazminden kaynaklanır. Ferröz demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder (58).

2.6.1.2.5. Transferrin-Laktoferrin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (58).

2.6.1.2.6. Haptoglobulin

Oksidatif aktivite sonucu eritrositlerden plazmaya salınan serbest hemoglobini bağlar, hasara uğrayan böbreklerden ileri gelen demir kaybını önler (59).

2.6.1.2.7. Ferritin

Dokudaki demiri bağlar (58).

2.6.1.2.8. Diğerleri

Bilirubin; süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (59). **Sistein**; süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (58). **Metiyonin**; Metiyonin türevi olan S-adenozil metiyonin, enzimatik reaksiyonlarda metil grubu vericidir. **Ürik asit**; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet

oksijeni temizler. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır (58). *Albumin*; LOOH ve HOCl toplayıcısıdır (58).

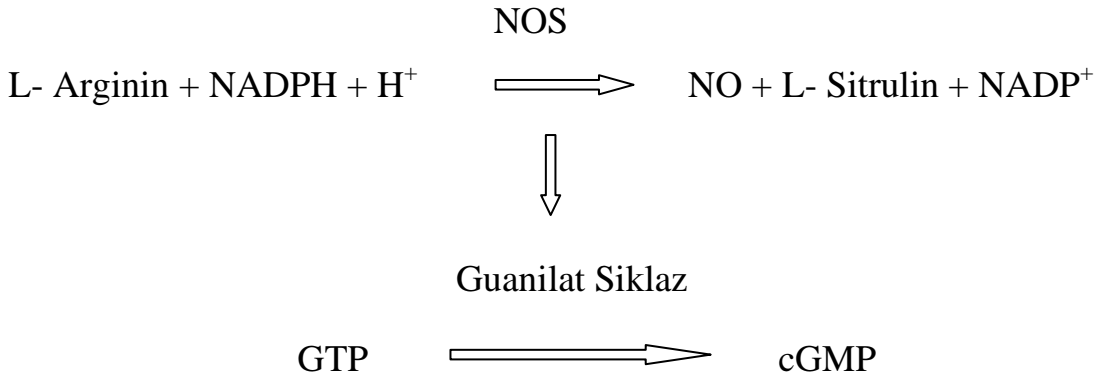
2.7. LİPİD PEROKSİDASYONU VE YIKIM SON ÜRÜNÜ; MALONDİALDEHİT (MDA)

İnflamasyonda oluşan hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri hücre zarındaki poliansature yağ asitlerini hasara uğratar (60). Hasarlı hücre zarı lipidleri ve lipid peroksidasyonunun son ürünleri, hücrelerin hatta dokuların canlılığı için risk oluşturur. Biyolojik sistemlerde oksidanlarca lipid hidroperoksidasyonu ile hücre zarı yüzeyindeki okside yağ asitleri ve poliansatüre lipidlerin yıkılması sonucunda aldehitler oluşur (61). Malon-dialdehit [tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS)] de bu sırada oluşan bir çeşit aldehittir ve dokularda ve serum gibi vücut sıvılarında reaktif oksijen maddelerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonunun dolaylı bir göstergesidir (61). Biyolojik ortamlarda MDA hem serbest hem de proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküllerin SH ve NH₂ gruplarına bağlı olarak bulunur. Biyolojik örneklerde çok küçük miktarlarda serbest MDA bulunur. Bundan dolayı, genellikle total (serbest ve bağlı) MDA değerlendirilir (58). DNA ve proteinlerle etkileşimi potansiyel olarak mutajenik ve kanserojenik olduğunu göstermiştir. Biyolojik örneklerde MDA'nın esas kaynağı iki veya daha fazla metilenle çift bağı kesilen poliansature yağ asitleri peroksidasyonudur.

2.8. NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit (NO), nitrojenin oksitlenmesiyle elde edilen, renksiz zehirli bir gaz olarak tanımlanır. Bir nitrojen ile bir oksijen atomunun bileşiminden meydana gelen bir moleküldür. Bu molekülün insan hayatı için son derece önemli bir özelliği bulunmaktadır. Son yirmi yıldaki yoğun araştırmalar bu molekülün, hücreler arası haberleşmede temel bir görev üstlendiğini ortaya çıkarmıştır. Bu alandaki bilimsel çalışmaların sonuçları göstermiştir ki nitrik oksit, insan vücudunda doğal olarak üretilen bir hormon, yani kimyasal bir habercidir; sinir, dolaşım, savunma, solunum ve üreme sistemlerinin hayati fonksiyonlarının düzenlenmesinde stratejik bir rol oynamaktadır (62,63).

2.8.1. Sentezi ve Etki mekanizması



2.8.2. Nitrik Oksitin Etkileri

2.8.2.1. Zararlı Etkileri

Antioksidanları tüketmesi, enzim inhibisyonları, DNA hasarları, lipid peroksidasyonu, diğer toksik etkenlere duyarlılığı arttırması (63).

2.8.2.2. Koruyucu Etkileri

Antioksidan fonksiyonu, anti inflamatuvar etkileri, TNF toksisitesine karşı etkileri(63).

2.8.2.3. Düzenleyici Etkileri

Nörotransmitör etkileri, platelet agregasyonunun inhibisyonu, Renal ve intestinal görevleri, düz kasların gevşemesi, hücre adhezyonunun kontrolü, damar geçirgenliğine etkileri, immün sistemdeki fonksiyonları (63).

2.9. Myeloperoksidaz (MPO)

Enzimler protein kökenli katalizörlerdir ve hücrelerin lizozomlarında depolanırlar. Biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler. Ayrıca aktivasyon enerjisini de düşürerek oluşan reaksiyonu kolaylaştırırlar. Myeloperoksidaz (MPO), (verici H_2O_2 oksidoredüktaz) memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Fagolizozom içinde meydana gelen hidrojen peroksit miktarları, bakterilerin etkili şekilde öldürülmelerini sağlayacak yeterlilikte değildir. Ancak, nötrofillerin azurofil granüllerinde bulunan myeloperoksidaz enzimi (MPO), klor iyonu (Cl^-) gibi bir halid varlığında hidrojen peroksiti hipokloröz asite ($HOCl$) dönüştürür. Hipokloröz asit, güçlü bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır. Enzimin I, II ve III olarak tanımlanmış 3 tipi mevcuttur. Kristal yapısı X ışınlarıyla incelenmiş olup, her MPO molekülünün 2 alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir.

Enzimin total ağırlığının ortalama %3-4'ü karbonhidrattır. Bir çok enzimde olduğu gibi spesifik inhibitörü de bildirilmiştir, Asidik olarak da bilinen bu inhibitör MPO aktivitelerini bloke etmektedir. MPO'nun salyada bulunduğuna dair deliller mevcuttur. Ancak kökeni tükrük bezi hücreleri olduğundan peroksidaz olarak tanımlanmaktadır. MPO, H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ile birlikte tiyosiyonat iyonların veya halojen (halit) iyonlardan (iyodit, bromit, klorit) birinin de beraber bulunduğu bir ortamda antibakteriyel etki (oksijene bağlı) göstermektedir (64).

2.10. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktörü (TNF), birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir. 185 amino asitlik bir glikoprotein hormonudur, ancak bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir. İnsanlarda 7. kromozomda kodlanır. İki formu bulunmaktadır: 1. TNF alfa (TNF- α), 2. TNF beta (TNF- β). TNF- α , makrofajlar ve bazı diğer hücreler tarafından üretilir. TNF- β ise T hücre lenfositleri tarafından üretilir. TNF- α 17 kDa ağırlığında, retiküloendotelial sistemde bir çok hücre tarafından endotoksin, inflamatuvar mediatörler veya sitokinlerin uyarımı sonucu salınan bir polipeptiddir. Geniş biyolojik etkilere sahiptir. Hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak G protein sistemi aracılığıyla ikincil mesajcıları uyararak değişik hedef hücrelerde fosforilasyon reaksiyonlarını hızlandırır. TNF- α çeşitli endotel adezyon moleküllerinin salınımı, lökositlerin aktivasyonu ve trombosit aktive edici faktör sekresyonuna yol açarak iskeminin oluşumunda ve gelişiminde belirleyici bir etkiye sahip olabilir (65,66).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Bu çalışmada, aynı yaştaki (11 aylık) ortalama 375 gram ağırlığındaki 24 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. 12 saat ışık - 12 saat karanlık ortamda standart koşullar altında ayrı kafeslere yerleştirildi. Ratlara istenilen miktarda su ve standart sıçan yemi verildi. Ratlar rastgele 4 gruba (n=6) ayrıldı. Grup I'deki ratlara araç olarak 14 gün boyunca karboksimetilselüloz (CMC % 0.25) verildi, Grup II ratlarına sadece 14 gün boyunca Ankaferd 0,5 ml oral (gavaj yoluyla) verildi, Grup III ratlarına 14. gün boyunca 400 mg/kg oral Aspirin ile (Sigma, chemical, St Louis, USA) verildi. Grup IV ratlarına da 14 gün boyunca, CMC'de bekletilmiş 400 mg/kg oral Aspirin ve 30 dakika sonra 0,5 ml oral Ankaferd verildi; **Grup 1:** CMC uygulanan, **Grup 2:** ABS uygulanan, **Grup 3:** CMC + Aspirin uygulanan ve **Grup 4:** CMC + Aspirin + Ankaferd uygulanan gruplar olarak belirlendi.

15. Günün sonunda bütün ratlar kesilerek EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Santrifüj edilerek elde edilen plazma örnekleri -40 °C'de çalışma zamanına kadar saklandı. Kan ve doku MDA düzeyleri ile kan ve doku SOD aktivite düzeyleri ile kan MPO aktivite düzeyleri spektrofotometrik olarak, kan NO ve TNF-alfa düzeyleri ile ELISA yöntemi ile çalışıldı. Çıkarılan doku örnekleri %10'luk nötral formalinde tespit edildi. Rutin takip sonucu elde edilen parafin kesitler Hematoksilen-Eozinle boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.2. GEREÇLER

1. Terazı : Precia 205-A SCS
2. Pipet : 0.5,1 ve 5 ml'lik otomatik pipetler
3. Vorteks : Cliftone-Cyclone
4. Santrifüj : CR4 Jouan soğutmalı santrifüj
5. Su Banyosu : NÜVE, BM 402
6. Spektrofotometre : Shimadzu UV-1601 – Japan

3.3. GEREKLİ KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

MDA ölçümünde kullanılanlar:

1. Tri-Klor Asetik Asit Çözeltisi (CCl_3COOH):

TCA çözeltisi (% 10) : 100 g TCA tartılıp bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2. Tiobarbitürik Asit Çözeltisi:

TBA çözeltisi (% 0.675) : 0.675 g TBA tartılıp bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

3.4.1. Plazma MDA Tayini

MDA ölçümünde Draper ve Hadley'in tanımladığı metot kullanıldı. Reaksiyonun prensibi, MDA'nın alkali pH'da tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu 532nm'de maksimum absorbans veren

pembe renkli bileşimin oluşması esasına dayanır. Ölçülen absorpsiyon değerleri MDA standart grafiği kullanılarak $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplandı.

Deneyin Yapılışı: Her bir numune için deney tüpü hazırlandı. Her birine 2,5 ml TCA (%10) kondu. Daha sonra tüplerine her bir numuneden 0,5 ml eklendi. Ağızları sıkıca kapatılarak önceden ısıtılmış 90 °C'lik su banyosunda 15 dk bekletildi. Bekleme süresi sonunda bütün tüpler su banyosundan çıkarılarak akan çeşme suyu altında soğutuldu. 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatandan 2'şer ml başka boş tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 1 ml TBA (% 0.675) eklendi ve aynı şekilde ağızları kapatılarak 90 °C 'lik su banyosunda 15 dk bekletildi. Bu süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler akan çeşme suyunda soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'deki molar absorpsiyon katsayısı olan $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ den faydalanılarak nmol/ml cinsinden MDA'nın konsantrasyonu aşağıdaki gibi hesaplandı:

$A = a \times b \times c$ (A: Absorpsiyon, a:molar absorpsiyon katsayısı, b:ışık yolu, c:konsantrasyon)

3.4.2. Doku MDA Tayini

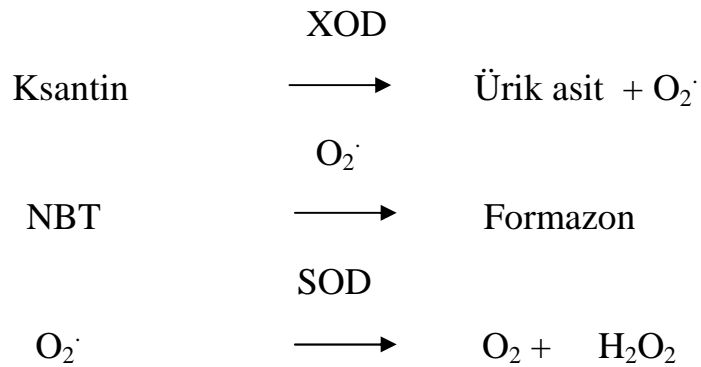
Doku numunesinde MDA ölçümü için çift ısıtma metodu kullanıldı. Yöntem tiyobarbitürik asidin (TBA) MDA ile tepkimesi sonucu oluşan rengin spektrofotometre ile saptanması esasına dayanır.

Deneyin Yapılışı: Dokular homojen hale getirilerek santrifüj tüplerine alındı. Üzerine 0,5 ml TCA (% 22,5) eklendi. Tüpler kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Akan çeşme suyunda soğutulduktan sonra 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kısımlarından 2 ml alınıp başka tüplere aktarıldı. Üzerlerine 1 ml (%o

6.7) TBA eklendi. Kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Solüsyon çeşme suyunda soğutulularak spektrofotometrede 532 nm’de absorbansları ölçüldü. MDA konsantrasyonu MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısı (absorbans katsayısı= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) vasıtasıyla hesaplanarak nmol g^{-1} protein olarak verildi (67).

3.4.3. Plazma SOD Aktivitesi

Oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan süperoksit radikalleri dismutasyona uğratarak hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu yöntemde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit (O_2^-) radikallerinin 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (p-iyodonitrozolium violet: INT) ile oluşturduğu kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikalini ortamdan uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe etmektedir. Sonuçta oluşan kırmızı renkteki azalmanın tespiti ile SOD aktivitesi ölçülmektedir. Kırmızı rengin şiddeti ile SOD aktivitesinin büyüklüğü arasında ters bir ilişki mevcuttur (68).



3.4.4. Doku SOD Aktivitesi

Toplam (Cu-Zn ve Mn) süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve ark.'nın metoduna göre hesaplandı. Metod nitroblue tetrazolyumun (NBT) süperoksit oluşturan bir sistem olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından azaltılmasının inhibisyonu esasına dayanmaktadır. Aktivitenin hesaplanması aynı volümdeki örneğe 1.0 mL etanol-kloroform karışımının (5:3, v/v) eklenip santrifüj edilmesini takiben süpernatanın etanol fazında yapılmıştır. Bir unite SOD, NBT azalma hızında %50 inhibisyona yol açan miktar olarak tayin edilmiştir. SOD aktivitesi $U\ mg^{-1}$ protein olarak belirtilmiştir (68).

3.4.5. Serum Nitrik Oksit (NO) ölçümü

NO ölçümü için Nitric oxide colorimetric assay ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra standart 500 μM konsantrasyona sahip stok standart hazırlandı. 10 dk tam çözünmesi beklendikten sonra seri dilüsyonlar ile 100-50-25-10-5-1-0,5-0 konsantrasyonlu standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 85 μL inkübasyon tamponu eklendikten sonra 5-85 μL (NO bağlı olarak) standartlar, kontroller ve serumlar pipetlendi. Daha sonra son hacim 85 μL oluncaya kadar solüsyon eklendi. Her bir kuyucuğa 10 μL sulandırılmış nitrat redüktaz ve 10 μL NADH çalışma solüsyonu eklenerek 20 dakika inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 50 μL Griess reagent 1 ilave edilerek biraz sallandı. Sonrasında 50 μL Griess reagent 2 eklendikten sonra 5 dakika inkübe edildi. 540 nm dalga boyunda absorbanslar okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla

Çizilen grafik yardımıyla serum Nitrik oksit konsantrasyonları hesaplandı.

3.4.6. Serum MPO aktivitesi ölçümü

Reaktifler:

- Na-K fosfat tamponu: 500mM/L, pH=7
- Potasyum fosfat tamponu 20mM, pH=7,4
- Potasyum fosfat tamponu 50mM, pH=6 (% 0,5 HETAB **H 5882** **SİGMA** (hexadecyltrimethylammonium bromid) ve % 0,146 EDTA içerecek)
- H₂O₂ (%30'luk): 1/10 dilüe edilir
- O-dianisidin (**SİGMA 3252**): %1'lik
- HCl: 3 M

Deneyin yapılışı (tüm volümler ml olarak verilmiştir):

	KÖR	NUMUNE
Na-K fosfat tamponu	0,2	0,2
H ₂ O ₂	0,09	0,09
O-dianisidin	0,1	0,1
NUMUNE	-	0,2
Distile Su	1,6	1,4
37°C'de 30 dakika bekletilir		
HCl	0,2	0,2

37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra HCl solüsyonu eklenmesiyle durduruldu. 410 nm'de optik dansite köre karşı okundu.

1 Ünite (Ü)= 37°C’de dk. oluşan optik dansite değişimi olarak kabul edildi. Spesifik aktivite= U/g olarak değerlendirildi.

3.4.7. Serum TNF- α düzeyleri ölçümü

Süpernatantda TNF- α ölçümü için invitrogen marka ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra standart dilüent tamponu ile 2000 pg/mL konsantrasyona sahip stok standart hazırlandı. 10 dk tam çözünmesi beklendikten sonra seri dilüsyonlar ile 1000-500-250-125-62,5-31,2-15,6-0 konsantrasyonlu standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 50 μ L inkübasyon tamponu eklendikten sonra 100 μ L standartlar, kontroller ve serumlar pipetlendi. Plate kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 kez 400 μ L yıkama yapıldı. 100 μ L Streptavidin-HRP solüsyonu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 4 kez 400 μ L wash solüsyonu ile yıkama işleminin ardından 100 μ L stabilize kromojen pipetlenmesiyle kuyucuklardaki sıvı mavi renge dönüşmeye başladı. Karanlıkta 30 dk inkübasyondan sonra 100 μ L stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda absorbanslar okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla çizilen grafik yardımıyla serum TNF- α konsantrasyonları hesaplandı.

3.5. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Çıkarılan dokular 24 saat %10’luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. İlk aşama olarak doku fiksasyonu (tespiti) metoduna göre sağlandı.

Çizelge 2: Histolojik takip basamakları

Sıra No	Kullanılan Madde	Süre
1	% 70 Alkol	1 saat
2	% 90 Alkol I	1 saat
3	% 90 Alkol II	1 saat
4	% 96 Alkol I	1 saat
5	% 96 Alkol II	1 saat
6	% 100 Alkol I	45 dk
7	% 100 Alkol II	45 dk
8	% 100 Alkol III	45 dk
9	Ksilol I	1 saat
10	Ksilol II	1 saat
11	Ksilol III	1 saat
12	Yumuşak Parafin	1 saat
13	Y. Parafin + Sert Parafin	1 saat
14	Sert Parafin	3 saat

Parafine gömülen dokulardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler preparat haline getirilerek, ışık mikroskopik inceleme için rutin hematoksilen-eozin boyasıyla boyandı.

Çizelge 3: Hematoksilen - Eozin boyama protokolü

Kullanılan Madde	Süre
Ksilen (I)	10 dk
Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
% 100 (Absolü) Alkol	2 dk
% 96 Alkol	2 dk
% 80 Alkol	2 dk
% 70 Alkol	2 dk
Çeşme Suyu	2 dk
Hematoksilen	5 dk
Çeşme Suyu	4 dk
Eozin	30 s
% 80 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 96 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 100 (Absolü) Alkol	5 dk
Ksilen (I)	10 dk
Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
	Entellan ile kapat

Sonuç: Hücrelerin nükleusları hematoksin ile mavi-mor renk boyanırken, sitoplazma eozin ile pembe renkte boyanır. Her gruba ait gastrik mukoza kesitleri histolojik olarak inceleme yapılır.

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd grupları arasındaki anlamlılık SPSS 16,0 İstatistik paket programında ONE WAY ANOVA varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kabul edildi.

Çalışmamızda grupların dağılımı Shapiro Wilk Testi ile analiz edildi. Gruplara ait veriler normal dağılım gösterdiğinden, gruplar arası karşılaştırmalarda ikiden fazla grup olduğu için "ONE WAY ANOVA (varyans analizi)" kullanıldı. Yine varyanslar homojen olduğu için, ikili karşılaştırmalarda ise çoklu karşılaştırma testlerinden "Tukey testi" kullanıldı.

4. BULGULAR

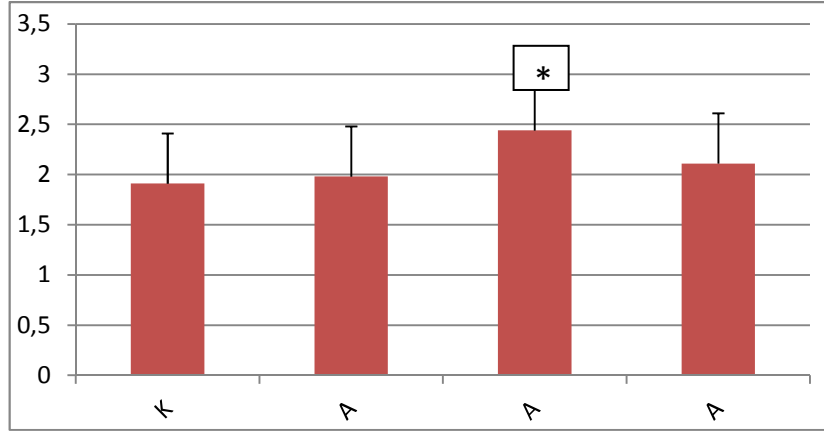
Tablo 4.1: Gruplara ait Serum MDA, Doku MDA, Serum SOD, Doku SOD, NO, MPO ve TNF-alfa değerlerinin karşılaştırılması. Değerler *ortalama ± standart sapma* olarak verilmiştir.

PARAMETRE	GRUP	SAYI	DEğERLER	P
SERUM MDA (µg/L)	Kontrol	6	1.91 ±0.19	0.020
	Ankaferd	5	1.98 ± 0.37	
	Aspirin	6	2.44 ± 0.36	
	Aspirin+Ankaferd	6	2.11 ± 0.15	
DOKU MDA (µg/g protein)	Kontrol	6	3.70 ± 0.49	0.000
	Ankaferd	5	3.87 ± 0.33	
	Aspirin	6	5.34 ± 0.45	
	Aspirin+Ankaferd	6	4.26 ± 0.2	
SERUM SOD (U/L)	Kontrol	6	17.16 ± 0.41	0.001
	Ankaferd	5	17.20 ± 0.35	
	Aspirin	6	15.95 ± 0.61	
	Aspirin+Ankaferd	6	16.45 ± 0.5	
DOKU SOD (U/g protein)	Kontrol	6	0.44 ± 0.54	0.03
	Ankaferd	5	0.45 ± 0.06	
	Aspirin	6	0.36 ± 0.047	
	Aspirin+Ankaferd	6	0.42 ± 0.06	
SERUM NO (µmol)	Kontrol	6	12.56 ± 1.31	0.005
	Ankaferd	5	10.43 ± 1.22	
	Aspirin	6	10.70 ± 1.09	
	Aspirin+Ankaferd	6	9.82 ± 1.14	
SERUM MPO (ng/ml)	Kontrol	6	61.81 ± 11.8	0.03
	Ankaferd	5	54.54 ± 7.7	
	Aspirin	6	73.79 ± 8.4	
	Aspirin+Ankaferd	6	64.87 ± 10.2	
SERUM TNF-Alfa (ng/ml)	Kontrol	6	20.41 ± 1.9	0.006
	Ankaferd	5	18.5 ± 4.2	
	Aspirin	6	25.70 ± 5.3	
	Aspirin+Ankaferd	6	20.54 ± 4.6	

Çizelge 4: Gruplara ait sonuçlar ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi. %5 önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (p <0.05). Bu duruma göre serum MDA, doku MDA, serum SOD, doku SOD, NO, MPO ve TNF-alfa düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur.

4.1. SERUM MDA

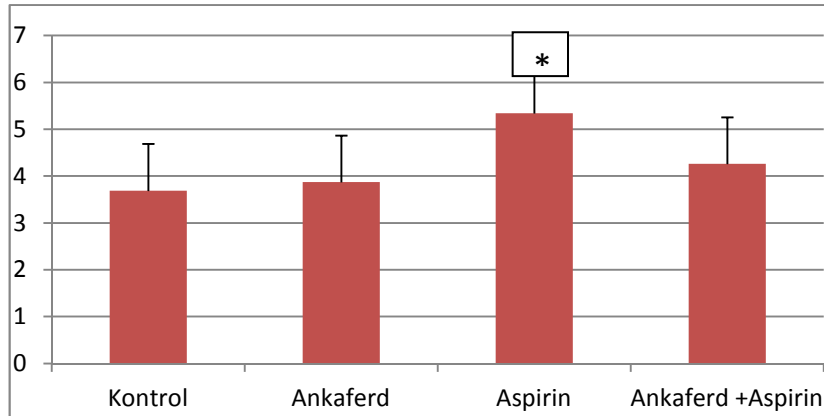
Gruplar arasında serum MDA düzeyleri arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.020$). Diğer gruplara göre aspirin grubunda serum MDA düzeyi yüksek bulundu.



Grafik-1: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait serum MDA düzeyleri

4.2. DOKU MDA

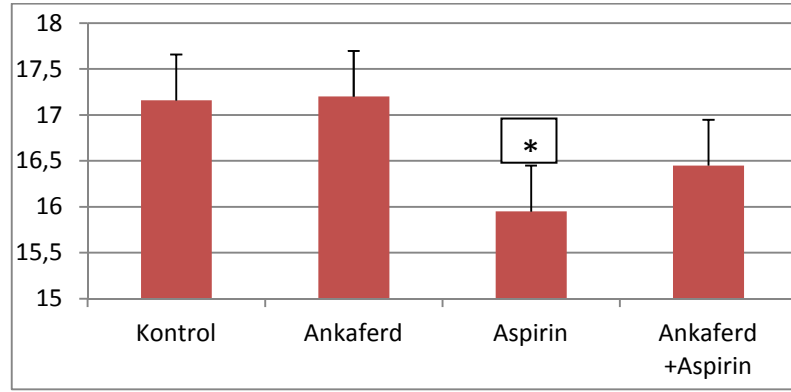
Gruplar arası doku MDA düzeyleri arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.000$). Diğer gruplara göre aspirin grubunda doku MDA düzeyi yüksek bulundu.



Grafik 2: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait doku MDA düzeyleri

4.3. SERUM SOD

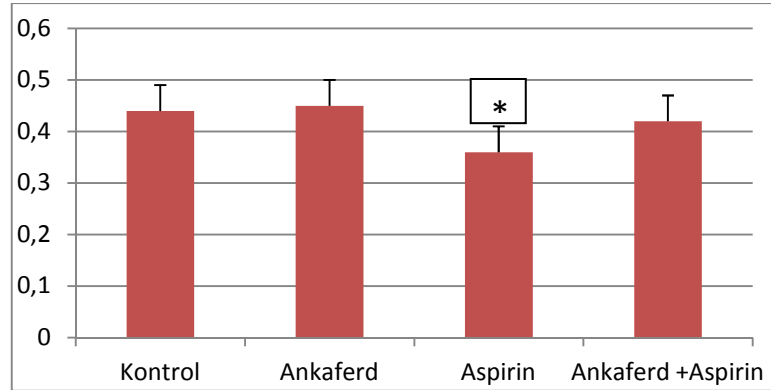
Gruplar arasındaki serum SOD aktivite düzeyleri arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.001$). Diğer gruplara göre aspirin grubunda serum SOD aktivite düzeyi düşük, diğer gruplara göre ankaferd grubunda yüksek bulundu.



Grafik-3: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait serum SOD düzeyleri

4.4. DOKU SOD

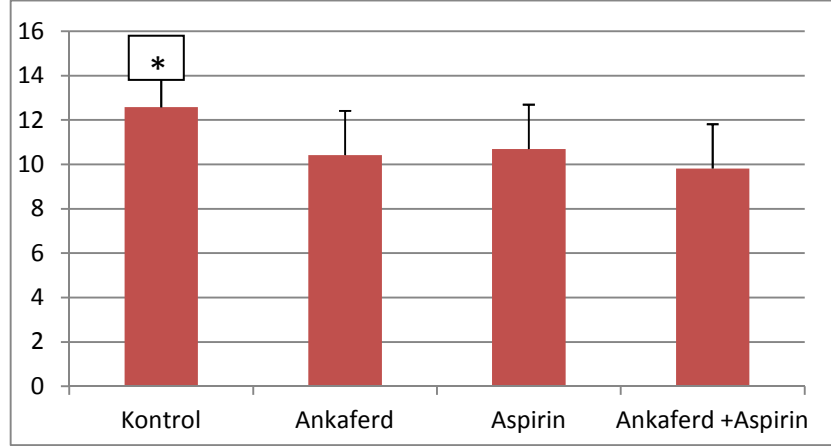
Gruplar arasındaki doku SOD aktivite düzeyleri arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.03$). Diğer gruplara göre aspirin grubunda doku SOD aktivite düzeyi düşük, ankaferd grubunda ise yüksek bulundu.



Grafik 4: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait doku SOD düzeyleri

4.5. NO

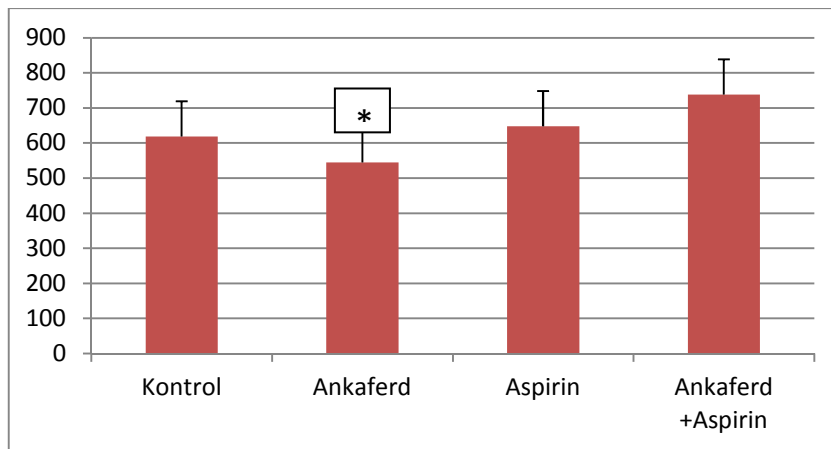
Gruplar arasındaki NO değerleri arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0.005$).



Grafik 5: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait NO düzeyleri

4.6. MPO

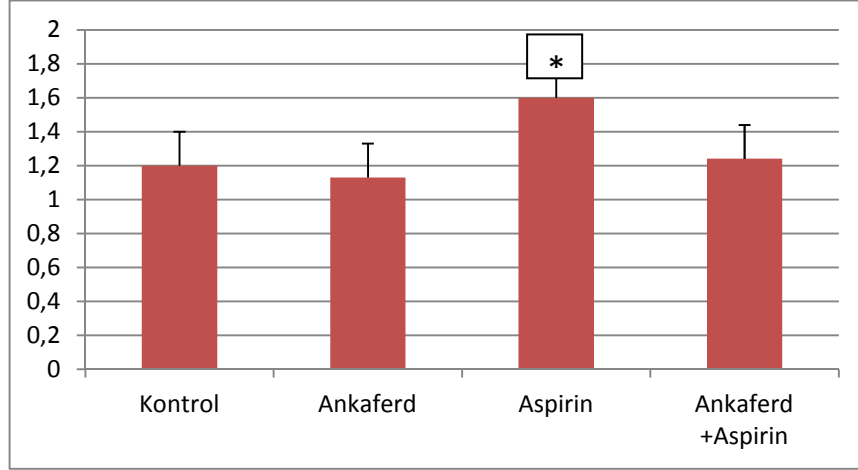
Gruplar arasındaki MPO değerleri arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0.03$).



Grafik 6: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait MPO düzeyleri

4.7. TNF-ALFA

Gruplar arasındaki TNF-alfa değerleri arasında anlamlı farklılık gözlemlendi (p=0.006)

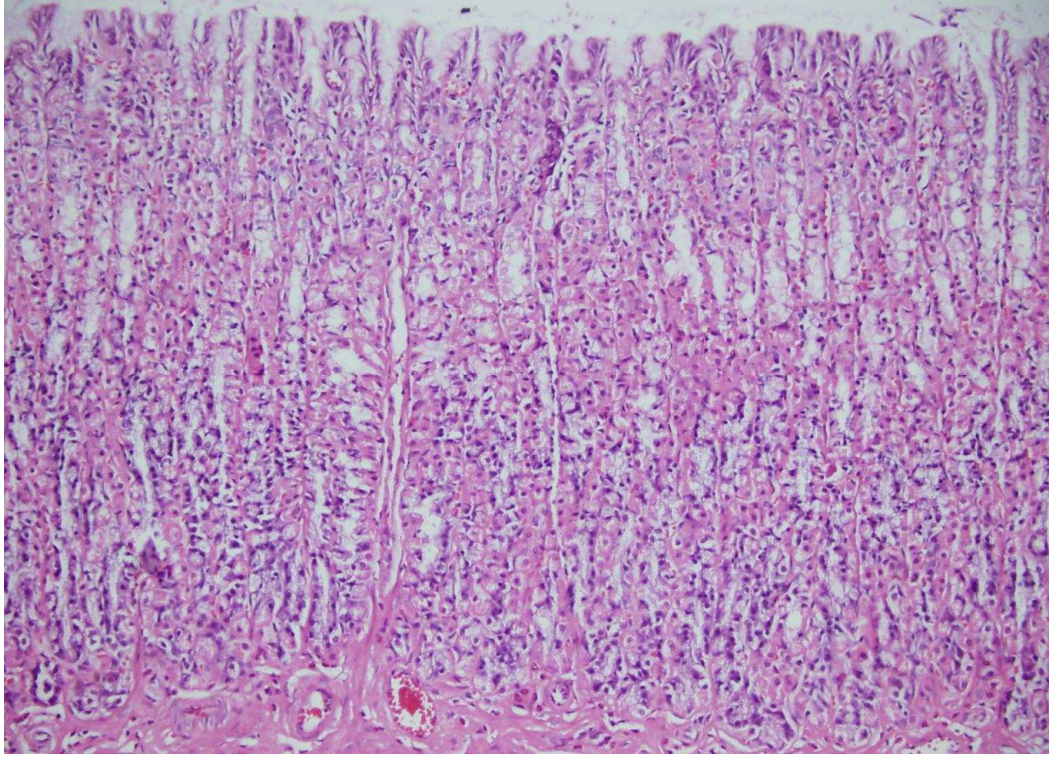


Grafik-7: Kontrol, Ankaferd, Aspirin ve Aspirin+Ankaferd gruplarına ait TNF-alfa düzeyleri

4.8. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULARI

4.8.1. Kontrol Grubu:

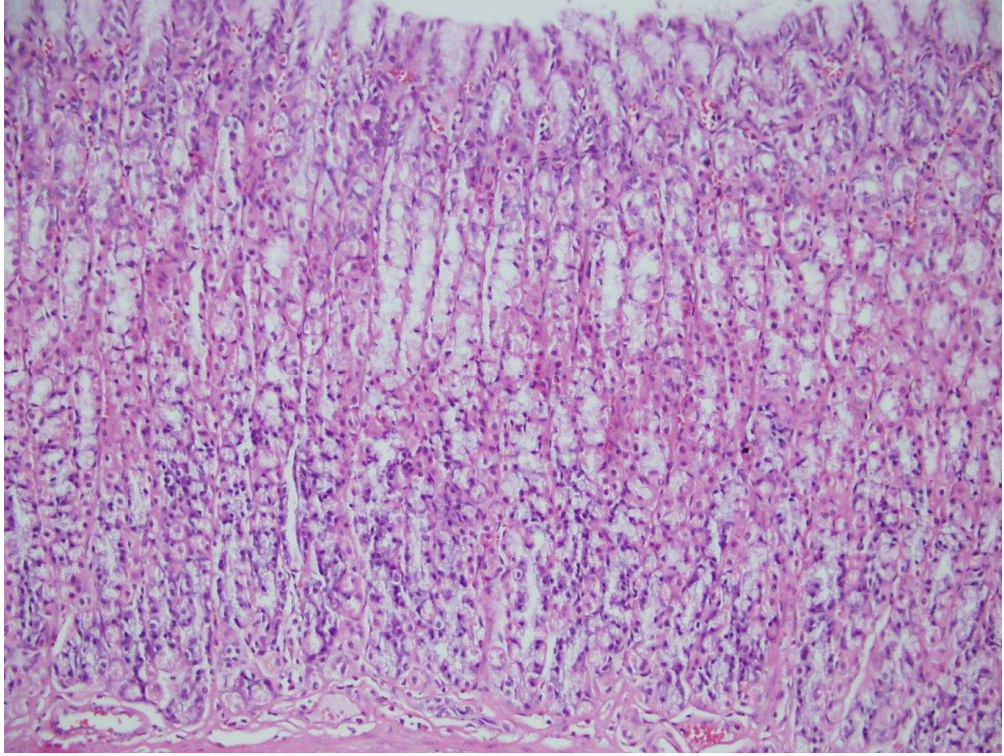
Kontrol grubundaki rat mide mukozalarına ait hematoxilen, eozin ile boyanmış kesitlerin incelenmesi sonunda normal histomorfolojik özellikler gösteren midemukozaı gözlenmiştir (Resim 1).



Resim 1: Grup 1 Kontrol grubuna ait normal histomorfolojik özellikler gösteren mide mukozası (HEX100)

4.8.2. Ankaferd Grubu:

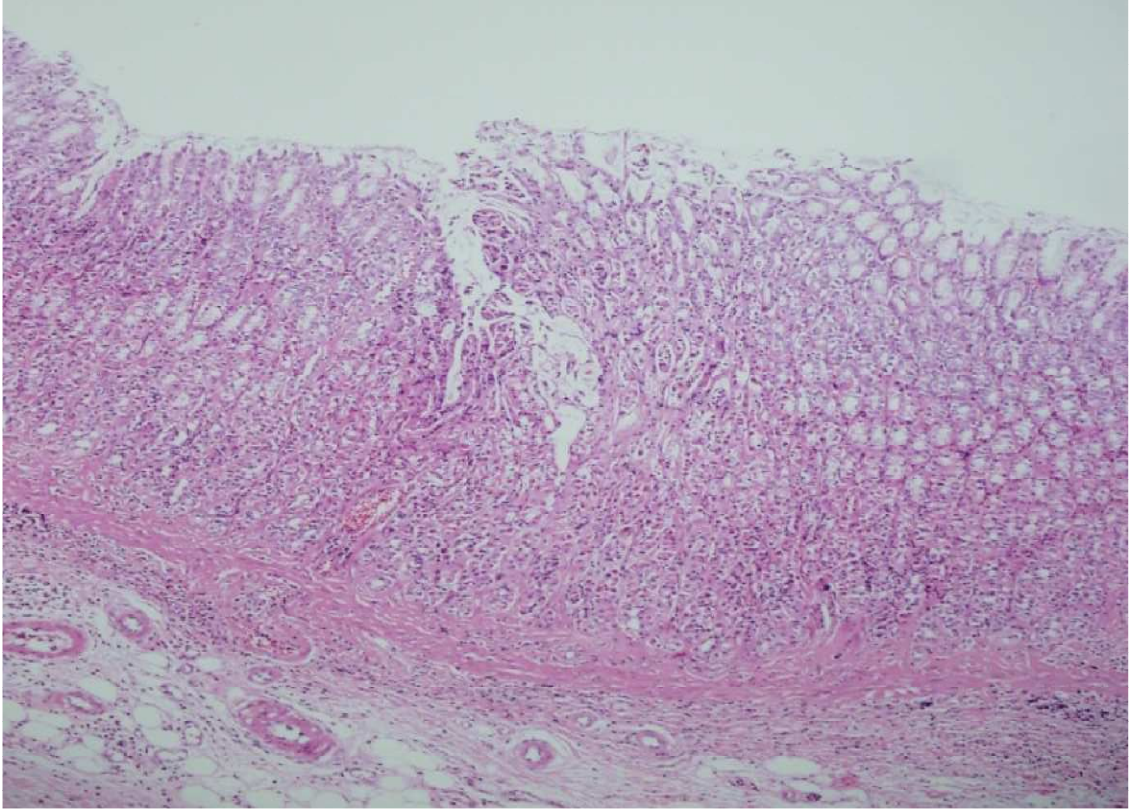
Ankaferd verilen gruba ait preparatlarda yapılan incelemeler sonucu kontrol grubuna benzer normal histomorfolojik özellikler gösteren mide mukozası izlemiştir (Resim 2).



Resim 2: Grup 2 Ankaferd grubu Kontrol grubuna benzer normal histomorfolojik özellikler gösteren mide mukozası (HEX100)

4.8.3. Aspirin Grubu

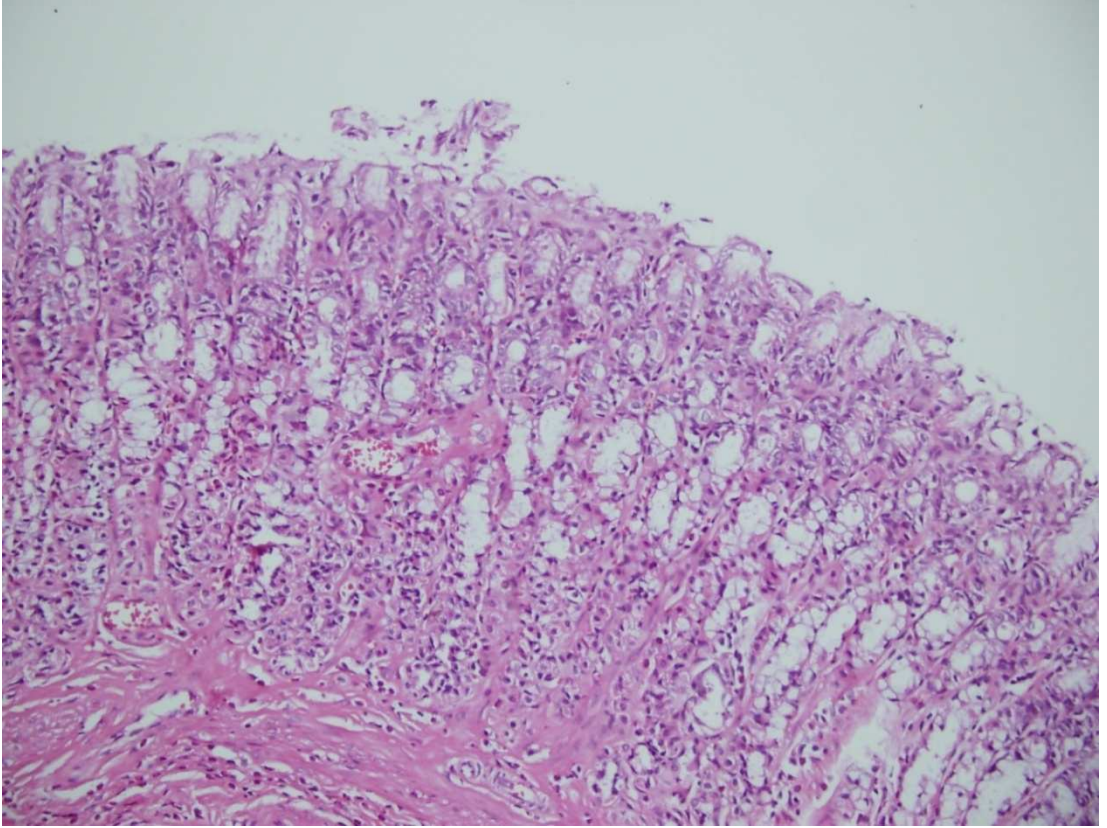
Aspirin verilen gruba ait preparatlarda yapılan incelemeler sonucu mukoza kalınlığının %50'sini geçmeyen mukozal haraplanma görülmüştür (Resim 3)



Resim 3: Grup 3 Aspirin verilen grupta mukoza kalınlığının %50'sini geçmeyen mukozal haraplanma (HEX100)

4.8.4. Ankaferd +Aspirin Grubu:

Ankaferd + Aspirin grubuna ait art mide mukozalarının histolojik incelenmesinde; yüzey epitel kaybı, gastrik pitleri döşeyen hücrelerin eksfoliyasyonu gözlemlenmiştir (Resim 4).



Resim 4: Grup 4 Aspirin ve ankaferd verilen grupta yüzey epitel kaybı, gastrik pitleri döşeyen hücrelerin eksfoliyasyonu. (HEX100)

4.9. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Mukoza lezyonlarının şiddeti 0 dan 4'e kadar skorlandı (69).

Evre 0: Mide mukoza hücreleri normal görünüm ve şekil, yerleşim ve yoğunlukta

Evre 1: Yüzeysel mukus hücre haraplanması

Evre 2: Yüzeysel epiteli hasarlanması ve gastrik pitleri döşeyen hücrelerin ayrılma ve eksfoliyasyonu

Evre 3: Gastrik pitler boyunca uzanan fakat mukozal kalınlığın %50'sinden azını tutan haraplanma

Evre 4: Mide mukoza kalınlığının %50 de fazlasını tutan yaygın mukoza haraplanması

Çizelge 5: Mukozal hasar evrelendirilmesi

	KONTROL	ANKAFERD	ASPIRİN	ASPIRİN+ANKAFERD
1.Rat	Evre 0	Evre 0	Evre 2	Evre 1
2.Rat	Evre 0	Evre 1	Evre 0	Evre 0
3.Rat	Evre 0	Evre 1	Evre 0	Evre 1
4.Rat	Evre 0	Evre 1	Evre 1	Evre 1
5.Rat	Evre 0	Evre 0	Evre 3	Evre 1
6.Rat	Evre 0	Yok	Evre 2	Evre 0

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Ankaferd blood stopper'ın aspirinle indüklenen gastrik mukoza kanamalarında durdurucu etkinliği ve mukozal oksidatif hasar üzerine koruyucu etkinliği incelenmiştir. Yapılan literatür incelemesinde ABS ile yapılmış bir çok çalışmaya rastlanmıştır.

Aspirin; kimyasal yapısı, uygulama dozu, süresi ve sıklığına bağlı olarak insan ve hayvanlarda gastrik mukozada kanama, ülserasyon ve perforasyona neden olmaktadır (70). Bu etkilerin oluşumunda; mukus sekresyonu ve mukozal kan akımında azalmayla birlikte iyonların geri difüzyonundaki değişimler yer almaktadır. Bununla birlikte etkinin çoğunluğu COX aktivitesinin baskılanmasına bağlı olarak gelişen PG sentezindeki azalma sonucu ortaya çıkmaktadır. Rat ve köpeklerde tek doz 100 mg/kg oral aspirin uygulamasının ilk 24 saat içerisinde gastrik mukozada hasar oluşturduğu gözlemlenmiştir (71). İnsanlarda NSAI'ların neden olduğu gastrik hasarların % 25'i asemptomatik olabilmekte ve % 50'sinde de klasik klinik bulgular gözlemlenmektedir (13).

Hücrelerimiz sürekli olarak çok çeşitli oksidanlara maruz kalmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere vücudumuzda antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas denge bozulduğunda hücre zedelenmesine kadar giden birçok fizyopatolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (34). Oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine artması "oksidatif stres" olarak tanımlanır.

Çalışmalar, ROS 'un bir taraftan sitotoksik etki ile parazitleri öldürürken diğer taraftanda hastaların vücut hücreleri, protein, lipid ve DNA'larında hasara neden olduğunu görmüşlerdir. Organizmada ROS

tarafından artmış olan lipid peroksidasyonu sonucu MDA düzeyi artar. Bizim çalışmamızda aspirin verilen gruptaki ratların MDA değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Serbest radikallerin uyardığı oksidatif strese karşı antioksidan defans sistemi bir bütün olarak mücadele eder. Tüm vücuttaki antioksidan durumu değerlendirmek için total antioksidan kapasite ölçümleri yapılmaktadır. Total antioksidan kapasiteye majör katkıyı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturmaktadır (72) .Bizim çalışmamızda aspirin verilen gruptaki SOD aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Ankaferd blood stopper tarihsel bir hemostatik ajan olarak Türk gelenekel tıpta kullanılan eşiz bir bitki özüdür. ABS, bitkilerin standardize karışımından oluşmuştur. 2 ml ampul içerisinde; 0.12 mg *Urtica dioica*, 0.16 mg *Vitis vinifera*, 0.18 mg *Glycyrrhiza glabra*, 0.14 mg *Alpina officinarum* ve 0,1 mg *Thymus vulgaris* bulunmaktadır. ABS'nin temel mekanizması protein ağı oluşturmaktır (14) .

Bu karışım; diş operasyonları, değişik sebeplerle oluşan yaralanmalar, travmatik kesikler ve spontan ya da cerrahi girişimler sonrası oluşan minör ve major kanamaların kontrolünde kullanılmaktadır (57,73). Çalışmamızda ABS verilen gruptaki kan SOD ve doku SOD aktiviteleri yüksek derecede anlamlı bulunmuştur.

Demiralp ve ark., ABS, kan hücreleri ve özellikle eritrositler ile oluşumunu indüklediği protein ağı sayesinde primer ve ikincil hemostatik sistem üzerine etkisini koagülasyon faktörlerini birebir hasarlamadan gerçekleştirir (74).

Kanama kontrolündeki etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olan Ankaferd'in, az sayıda hayvan çalışması ve olgu sunumları ile antimikrobiyal, antifungal, yara iyileşmesini hızlandırıcı etki ve antiseptik özelliklerinin olduğu da bildirilmiştir (73, 75,76).

Akkoç ve ark., Ankaferd'in in vitro antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada; karışımın, test edilen tüm bakterilere karşı etkinlik gösterdiğini tespit etmişler ve yara iyileşmesinde, hemostatik etkisine ek olarak anti-mikrobiyal özelliğinin de yararlı olabileceğine dikkat çekmişlerdir (77).

Erçetin ve ark., diş tedavisi sırasında kanama kontrolü sağlamak amacıyla uygulanan ABS'in, bu etkisi yanında, enfeksiyonu engellediğini ve yara iyileşmesini de olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir (78)

Yeşilada ve ark.'ları, henüz yayınlanmamış deneysel bir sıçan çalışmasında, Ankaferd'in McFarlane flebi oluşturulan 32 sıçanda nekroz oranını azalttığını ve flep sağkalımını artırdığını gözlemlemişlerdir (79). Diğer bir çalışmalarında ise, sırt ciltlerinde yara oluşturulan 20 sıçanda, Ankaferd'in sekonder yara iyileşme süresini kısalttığını tespit etmişlerdir (80).

Akgül ve ark., çalışmalarında; Ankaferd'in histopatolojik olarak, kavernoza dokuda eritrosit agregasyonu oluşturduğunu, hemostatik ve antienflamatuar etki gösterdiğini, fakat inflamasyonu etkilemediğini ve fibrozisi artırmadığını gözlemlemişlerdir (81).

Arslan ve ark., yaşlı bir hastada, travma sonrası oluşmuş yarada, Ankaferd uygulanması ile hızlı bir iyileşme süreci rapor etmişlerdir. Ekstrenin uygulanmasından 24 saat sonra yara ağzının kapanmaya

başladığı bu olgu ile, Ankaferd'in yaşlılarda yara iyileşmesinde yardımcı bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür (76).

Kalaycı ve ark., deneysel olarak oluşturdukları karaciğer yaralanmasında, Ankaferd'in; hemoraji, nekroz, fibrovasküler yapı, inflamatuvar eksuda ve rejenerasyon gibi histopatolojik olaylar üzerine etkilerini incelemişler ve bu olayları değerlendiren histopatolojik skorların, Ankaferd grubunda daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (82).

Bilgili ve ark.,ABS 'nin yüzeysel domuz kanama modelinde, derin cilt laserasyonunda ve orta/minör travma yaralanmalarında etkili bir hemostatik ajan olduğunu bildirmişlerdir (83).

Beyazıt ve ark., Ankaferd blood stopper'in geleneksel yöntemleri tamamlayıcı bir adjuvan olarak gastrointestinal kanamalarda modern topikal hemostatik ajan olarak etkili alternatif bir tedavi yöntemi olduğunu bildirmişlerdir (84).

Alvarez-Suare ve ark.,Çilek özleri ile ratlarda yapmış oldukları çalışmada, gastrik mukozada oluşan eksojen etanol-hasarı önlediği gözlemlenmiştir.Çileğin zengin bir diyetle mide hastalıklarında; reaktif oksijen türlerinin üretiminin önlenmesinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (85).

Ankaferd'in içeriğinde bulunan Thymus Vulgaris'in aterosklerozla ilişkili lipid peroksidasyonu gibi canlıdaki oksidatif hasarı azaltacak antioksidan etki yaptığı çalışmalar üzerinde kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamızda aspirin+ankaferd verilen gruptaki MDA değerleri aspirin verile gruba göre düşük bulunmuştur. Bunun yanı sıra; aspirin+ankaferd verilen gruptaki SOD aktivitesi aspirin grubuna göre yüksek bulunmuştur.

Nitrik oksit eşlenmemiş bir elektron içerdiği için oksijen, süperoksit radikalleri, Fe ve Cu gibi geçiş metalleriyle hızla reaksiyona girmektedir. Bu nedenle oksidatif ve nitrozatif serbest radikal oluşumundan söz edilmekte ve nitrik oksit varlığında lipid peroksidasyonunun arttığı ileri sürülmektedir(86). Hastalarda nitrit ve nitrat (NO) seviyesinin sağlıklı insanlara oranla daha yüksek çıktığı yapılan çalışmalar arasındadır.

Bizim çalışmamızda da NO değeri kontrol grubunda anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Ancak; Ankaferd+aspirin verilen grupta NO değeri düşük bulunmuştur.

ROS (reaktif oksijen radikalleri), oldukça güçlü prooksidanlardır. ROS iki ayrı mekanizma ile oluşmaktadır. Bunlardan birincisi intrasellüler parazit ile hemoglobin yıkımı sonucu ROS oluşumudur. Burada demir globinden ayrıldıktan sonra Fe⁺³ formuna okside olarak elektron açığa çıkarırlar, açığa çıkan bu elektronlar oksijen molekülleri ile reaksiyona girerek ROS oluştururlar. İkinci mekanizma ise fagositler üzerinde respiratory burst (solunumsal patlama) ve ROS'u artıran TNF- α ve INF- γ sitokinleri oluşturmasıdır (87) .

TNF- α makrofajlardan salınması yanında aynı zamanda önemli bir aktivatörü olan bir sitokindir. Sitotoksik etkisi yanında, inflamatuvar reaksiyon ve inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptir.30-31 Kupffer hücreleri karaciğere yerleşik doku makrofajlarıdır. Aktive olduklarında bir çok sitokinle beraber, TNF- α ve MPO salgırlar. Bizim çalışmamızda da bi önceki çalışmaları destekleyerek aspirin verilen grupta TNF- α düzeyi yüksek bulunmuştur. Fakat MPO aktivitesi aspirin verilen gruba göre aspirin+ankaferd verilen grupta anlamlı bir şekilde en yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak; aspirin verilen gruptaki ratların mide mukozasında oluřan hasarlanma ile oksidatif stresin arttıđı ancak sonrasında verilen ankaferdin etkisiyle oksidatif stresin dūřtuđu görülmüřtür. Kuřkusuz ankaferdin açıđa kavuřturulmamıř birçok etki mekanizmasının olduđu dūřnlmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Healthcare T. *Thymus vulgaris*. PDR for Herbal Medicines. 4. Baskı Thomson, NJ. 2007:846-847.
2. Sabiston textbook of surgery, 17th ed. 2004;1241-1242
3. Hamoui N, Docherty SD, Crookes PF. Gastrointestinal hemorrhage: is the surgeon obsolete. *Emerg Med Clin North Am* 2003;21(4): 1017-1056.
4. Alican F. Abdomen: Genel konular. Alican F (ed). *Cerrahi Dersleri*. 2. baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçı; 1998. Cilt 1:419-491.
5. Memişoğlu K. Akut üst gastrointestinal sistem kanamalar. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2005;1(4):1-6.
6. Barkun A, Bardou M, Marshall JK. Consensus recommendations for managing patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann intern Med* 2003;139(10):843-857.
7. ASGE Standards of Practice Committee. ASGE guideline: the role of endoscopy in acute non-variceal upper-GI hemorrhage. *Gastrointest Endosc* 2004;60(4):497-504.
8. Oh DS, Pisegna JR. Management of upper gastrointestinal bleeding. *Clin Fam Pract* 2004; 6(3):631-645.
9. British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. Non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage: guidelines. *Gut* 2002;51:1-6.
10. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Nimesulid/Aspirin>
11. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aspirin>
12. Oktay Ş. Antienflamatuar ilaçlar. *Farmakoloji: Nobel Tıp Kitapevleri*; 401–19

13. Griffin M, 1998, Epidemiology of nonsteroidal anti- inflammatory drug associated gastrointestinal injury, American journal of medicine 104:23-29
14. Göker H, Haznederoğlu I, Erçetin S, Kirazlı S, Akman U, Öztürk Y, Fırat H. Haemostatic Actions of the Folkloric Medicinal Plant Extract Ankaferd Blood Stopper. The Journal of international Medical Research. 2008; 36:163-170.
15. Swenson KK, Nissen MJ, Ceronsky C. Comparison of side effects between sentinel node and axillary lymph node dissection for breast cancer. Ann Surg Oncol. 2002;9:745-753.
16. Hatano T, Shintani Y, Aga Y et al. Phenolic constituents of licorice. VII. Structures of glicophenone and glicoisoflavone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Chem Pharm Bull. 2000;48:1286-1292.
17. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. Free Rad Biol Med. 1997;23:302-313.
18. 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.
19. Endoscopic topical application of Ankaferd Blood Stopper® in gastrointestinal bleeding. Karaman A, Baskol M, Gursoy S, Torun E, Yurci A, Celikbilek M, Guven K, Ozbakir O, Yucesoy M. J Altern Complement Med. 2012 Jan;18(1):65-8

20. 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 growthpromoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186: 91-95.
21. 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 initiationpromotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 1999;20:1737-1745.
22. Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, et al. Smokeless tobacco, oxidative stres, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:992-1000.
23. Matsuda H, Ando S, Morikawa T, et al: Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharideactivated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem.* 2006;14:138-142.
24. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. *Fitoterapia.* 2009 Jan;80(1):48-50. Epub 2008 Oct 7.
25. Erçetin S, Haznedaroğlu İC, Kurt M, ve ark, Ağız, diş ve çene cerrahisinde Ankaferd Blood Stopper'in etkinliği ve güvenilirliği. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İzmir, 2008;P0143.
26. Bombardelli E, Morazzoni P. *Urtica dioica.* L *Fitoterapia.* 1997;68:387-402.

27. Gündüz N , Gündüz T , Özgüner S , Tüzün C ,Üneri S , Zeren A ; Temel Kimya,Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları , Ankara , 1991
28. Basaga, H,S ; Biochemical Aspects of Free Radicals , *Biochem. Cell. Bio* . 1990;989-990
29. Halliwell B ; Current status Review : Free radicals , reactive oxygen species and human disease ; a critical evaluation with special reference to atherosclerosis , *Br.J.Exp. Path* , 1999;737-357
30. Moslen, M.T. , Reactive oxygen species in normal physiology, *Cell injury and Phagocytosis* , *Advances in experimental medicine and biology* 1994;17-27
31. Rubanyı , G.M., and Vanhoutte , M., Oxygen-derived Free radicals , Endothelium , Responsiveness of Vascular Smooth Muscle , *Am.J.Physiol.*, 1986;815-821
32. Carolina,A.,Arısı,M.,Sımyı,K.,Kogake,M.,Bany,A.C.D.,Silva,M. A.S.,Barros,S.B.M.,Boverıs,A.,Vıdelı,L.A., Junqueira,V.B.C., Brain and Liver Lipid Proxidation Levels Following Acute and Short-Term Lindane Administration in The RAT , *Toxicology Letters* , 1994;61-68
33. Akkuş , I .Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri , Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım A.Ş., Konya ; 1995
34. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri , Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 1995

35. Nicotera ,T.M.,Free Radical Mechanism for Chromosomal Instability in Bloom's Syndrome, Advances in Experimental Medicine and Biology, 1994;29-41.
36. Basaga, H.S.:Biochemical Aspects of Free radicals Biyochem. Cell . Biol., 1990;68(7-8):989-98.
37. Reiter,R.J., Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain , faseb J. 1995;526-533
38. Cheeseman KH, Slater Tf. An introduction to free radical biochemistry . Br med Bull 1993;49:481-493
39. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp dergisi 2002;33:110-118.
40. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 1997;3-4:92-95.
41. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17): 7915-22.
42. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. T Klin J Med Sci 2002;22:442-48.
43. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. Clin Chem.1991;37(11):1932-7.
44. Shibamoto T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. J Pharm Biomed Anal. 2006;41(1):12-25.

45. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 1987; 46(1):13-26
46. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17): 7915-22.
47. Balogh G, Illes J, Szekely Z, Forrai E. Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 2003;410:76-82.
48. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease : free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47(5):412-426
49. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences,* 2002. 27: 483-486. Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen Radicals And Human Disease. *Annals. Int. Med.,* 1987;107:526-45.
50. Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen Radicals And Human Disease. *Annals . Int. Med.,* 1987;107:526-45.
51. Jialal I, Grundy SM. Effect of combined supplementation with alphatocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation.* 1993;88(6):2780-2786.
52. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(2):319-327.
53. Rao VA, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 2000;19:563-569

54. Durak İ, Canbolat O, Kavutçu M, Öztürk HS, Yurtaslanı Z. Activities of total cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab.* 1996;10:17-20.
55. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers biochemistry.* 2nd edition. Typo. 1991.
56. Anderson ME, Meister A. Glutathione moesters. *J. Anal. Biochem.* 1989;183:16-20.
57. Ceballos L, Triver JM, Nicole A. Age corralated modifications of cupper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activies in human erythrocytes. *J. Clin. Chem.* 1992;36(1):66–70.
58. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54:176-186
59. McGrotty YL, Knottenbelt, Ramsey IK, Reid AWJ, Eckersall PD Haptoglobin in a canine hospital population *The Veterinary Record* 2003;152:562- 564.
60. Mylonos C. Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo* 1999;13:295-309
61. Esterbaucher H. Schaur RJ. Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal. malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128
62. Palmer RMJ.Ashton DS. Moncada S. Vascular endothlial cells synthesize nitric oxide from L-arginin. *Nature* 1988;333:664-6
63. Knowles RG.Moncada S.Nitric oxide senthases in mammals.*Bichem J* 1994;298:249-58

64. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984;222:1–15.
65. Bienvenu J. Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil* 1995;189:545-555.
66. Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 regulation of TNF- α from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-149.
67. Gupta MP, Khanduja KL, Sharma RR. Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Toxicol Lett* 1998;41:107-114
68. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginin. *Nature* 1988;333:664-6
69. Murakami M., Saita H., Teramura S. *et al.* Gastric ammonia has a potent ulcerogenic action on the rat stomach. *Gastroenterology* 1993;105(6), 1710–1715.
70. 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 Hem* 2009;15:270-6.
71. Demiralp D, Haznedaroğlu C, Akar N. Functional proteomic analysis of Ankaferd Blood Stopper. *Turk J hematol* 2010;27:70-7
72. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J. Toxicology.* 1992;64(65):547–51.

73. Esterbauer and Cheeseman, 1990 H. Esterbauer and K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: L. Packer and A.N. Glazer, Editors; Methods in Enzymology, vol. 186, Oxygen Radicals in Biological Systems, Academic Press 1990;407-421.
74. Rao VA, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J Am Coll Nutr 2000;19:563-569
75. Sun Y, Oberley LW, Ying L A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1967;34:497-500.
76. Oxford Biomedical Research, A simple method for colorimetric Assay for Nitric Oxide
77. Akkoç N, Akçelik M, Haznedaroğlu İC, Kirazlı Ş, Fırat HC (2008c). Ankaferd Proteomix besin takviyesi ve Ankaferd Sır kozmetik preparatın in vitro anti-mikrobiyal etkinliklerinin karşılaştırılması. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, no'lu bildiri, 2008;P219
78. Erçetin S, Haznedaroğlu İC, Kurt M, Önal İK, Aktaş A, Göker H, Özdemir O, Kirazlı Ş, Fırat HC. Ağız ve diş çene cerrahisinde Ankaferd BloodStopper'ın etkinliği ve güvenilirliği. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, 2008;P0143
79. Arslan S, Yeşil Y, Ülger Z, ve ark. Yaşlı bir hastada yumuşak doku travmasına bağlı gelişen yara iyileşmesinde Ankaferd. Akad Geriatri Derg, 2010;2:58-60.
80. Canatan D, Savaş Ç, Kubulu AE, ve ark. İnhibitörlü hemofili A hastasında RFVIIA ve Ankaferd kullanımı. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İzmir, 2008;B056.

81. Saribaş Z, Şener B, Haznedaroğlu C, Haşçelik G, Kirazlı S, Göker H. Hemostatik bir ajan olan Ankaferd'in antibakteriyel etkinliğinin araştırılması. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Antalya, 2008;P220.
82. Akkoç N, Akçelik M, Haznedaroglu IC, et al. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd Medicinal Plant Extract. Int J Lab Hematol 2008;30:95.
83. Bilgili H, Çaptuğ Ö, Koşar A, Kurt M, Önal IK, Shorbagi A, Göker H, Kirazlı Ş, Aksu S, Haznedaroğlu IC Domuz kanama modelinde Ankaferd BloodStopper'in etkisi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, 2008;P0142
84. Yeşilada AK, Tatlıdede S, Sümer O, ve ark. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın flep sağkalımına etkisinin sıçanlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma, Ankaferd Bilimsel perspektif ve temel klinik veriler kitabı, İzmir, 2008.
85. Yeşilada AK, Tatlıdede S, Sümer O, ve ark. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın sekonder yara iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma, Ankaferd Bilimsel perspektif ve temel klinik veriler kitabı, İzmir, 2008.
86. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 1992;258:1898-1902.
87. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. J. Biochem. 1984;222:1-15.