



**T.C.**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL HEMORAJİK SİSTİT MODELİNDE  
ANKAFERD'İN ETKİLERİ**

**Dr. ZEYNEP SEÇKİN KÜÇÜKBAYRAK**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DÜZCE-2010**





**T.C.**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL HEMORAJİK SİSTİT MODELİNDE  
ANKAFERD'İN ETKİLERİ**

**Dr. ZEYNEP SEÇKİN KÜÇÜKBAYRAK**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**1.Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Seyit ANKARALI**

**2.Tez Danışmanı : Prof. Dr. Şenol DANE**

**DÜZCE-2010**

## TÜRKÇE ÖZET

### DENEYSEL HEMORAJİK SİSTİT MODELİNDE ANKAFERD'İN ETKİLERİ

**Amaç:** Siklofosfamid ile indüklenen hemorajik sistit modelinde Ankaferd'in etkinliğini araştırmak.

**Gereç ve Yöntem:** 8-12 haftalık 24 adet dişi Wistar albino rat randomize olarak sekizerli üç gruba ayrıldı. Grup 1'e (kontrol grubu) CP dozu kadar intraperitoneal (i.p) saline enjekte edildi. Grup 2'ye sadece ürotoksik doz olan 100 mg/kg i.p. CP verilirken, Grup 3'e i.p. CP yanında, CP enjeksiyonundan 60 dakika önce ve CP enjeksiyonundan sonraki 12'nci, 24'üncü, 36'ncı, 48'inci ve 60'ıncı saatlerde intravezikal olarak Ankaferd verildi. Deney sonunda hayvanlar uyutularak mesaneler çıkarıldı ve iki eşit parçaya ayrıldı. Yarıları SOD ve MPO aktivitesi ile MDA ve NO seviyelerinin saptanması için -80 °C'de muhafaza edildi. Diğer yarıları ise histolojik değerlendirme için 24 saat boyunca % 10'luk formaldehid solüsyonunda bekletildi.

**Bulgular:** CP verilerek HS oluşturulan grupta oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyeleri yüksek saptanmakla beraber, Ankaferd tedavisi MDA seviyelerini azalttı ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Antioksidan bir enzim olan SOD düzeyleri de Ankaferd tedavisi alan gruplarda anlamlı olarak artmıştı. MPO aktivitesinde Ankaferd tedavisi alan grupta CP alan gruba göre anlamlı bir azalma bulundu. Ancak her üç grup arasında da NO seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı. Kontrol grubundaki tüm ratlarda mesane histolojileri ödem hariç normaldi. Bunun da mesanenin çıkarılması esnasında travmaya bağlı olabileceği düşünüldü. CP uygulanan grupta mikroskopik olarak ciddi mukozal hasar saptandı. Ankaferd'in ise histolojik hasara karşı koruyucu etkisi olmadı. Mesane ağırlıklarının tüm vücut ağırlığına oranı da mesane histolojisiyle uyumlu olarak CP+Ankaferd alan grupta sadece CP alan gruba göre anlamlı olarak artmıştı. CP ile CP+Ankaferd alan gruplar arasında hematüri açısından da anlamlı bir fark saptanmadı.

**Sonuçlar:** Klinik ve histopatolojik iyileşme sağlanabilmesi için Ankaferd'in hangi dozda ve hangi sürede verileceğine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** Hemorajik sistit, siklofosfamid, Ankaferd, rat, oksidatif stres.

## İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

### THE EFFECTS OF ANKAFERD ON THE EXPERIMENTAL MODEL OF HEMORRHAGIC CYSTITIS

**Aim:** We investigated the effect of Ankaferd on cyclophosphamide (CP) induced hemorrhagic cystitis (HC) in rats.

**Materials and Methods:** Twenty four female Wistar rat ages between 8-12 weeks were divided into three groups by random sampling method. Group 1 (Control) animals were injected with the same amount of saline. Group 2 (CP) received only 100 mg/kg urotoxic dose of CP, Group 3 (CP+Ankaferd) received CP and Ankaferd. Ankaferd was given in dosage of 0,5 cc/kg intravesical one hour before CP injection and 12, 24, 36, 48, 60 hours after CP injection. The bladder tissues were cut into two equal pieces from top to the bottom. One half was stored at -80 °C for determination of SOD and MPO activities with MDA and NO concentration and the other half was fixed for 24 hours in 10 % buffered formaldehyde for histological evaluation.

**Results:** Cyclophosphamide injection which caused HC increased MDA levels indicating oxidative stress, while Ankaferd reduced MDA levels in the bladder and this was statistically meaningful. SOD, an antioxidant enzyme, activities increased in the tissue samples of CP+Ankaferd group as a meaningful. MPO activities decreased more significantly at the group treated by Ankaferd than CP group. There was no difference between three groups at the point of NO levels. Control animals had histologically normal bladders except edema. The reason of that edema was estimated as the trauma happened during expulsion of the bladder. CP caused severe microscopic bladder mucosal injury. Ankaferd didn't show histological protection against bladder damage of CP. The ratio of the bladder weight to total body weight increased at the CP+Ankaferd group more significantly than CP group. This result is convenient to bladder histology. An important difference about hematuria was not found between CP and CP+Ankaferd groups.

**Conclusion:** New studies about the dosage and usage time of Ankaferd are needed to have better clinical and histopathological results.

**Keywords:** Hemorrhagic cystitis, cyclophosphamide, Ankaferd, rat, oxidative stress.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                      | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------|--------------|
| Özet.....                                                            | i            |
| İngilizce Özet (Abstract).....                                       | ii           |
| İçindekiler.....                                                     | iii          |
| Simgeler ve Kısaltmalar.....                                         | v            |
| 1. Giriş ve Amaç.....                                                | 1            |
| 2. Genel Bilgiler.....                                               | 3            |
| 2.1. Hemorajik Sistit.....                                           | 3            |
| 2.1.1. Etyoloji.....                                                 | 3            |
| 2.1.2. Mikroskopik bulgular.....                                     | 4            |
| 2.1.3. Patogenez.....                                                | 4            |
| 2.1.4. Korunma (Profilaksi).....                                     | 6            |
| 2.1.5. Tedavi.....                                                   | 8            |
| 2.2. Serbest Radikaller.....                                         | 8            |
| 2.3. Serbest Oksijen Radikal Türleri.....                            | 10           |
| 2.4. Serbest Radikal Oluşum Sebepleri.....                           | 10           |
| 2.5. Serbest Radikallerin Hücre Üzerine Olan Etkileri.....           | 10           |
| 2.5.1. Lipidler üzerine olan etkileri.....                           | 10           |
| 2.5.2. Proteinler üzerine olan etkileri.....                         | 11           |
| 2.6. Antioksidanlar.....                                             | 11           |
| 2.6.1. Enzimatik antioksidanlar.....                                 | 11           |
| 2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....                         | 12           |
| 2.7. Siklofosfamid.....                                              | 13           |
| 2.7.1. Kullanım alanları.....                                        | 13           |
| 2.7.2. Yan etkileri.....                                             | 14           |
| 2.8. Ankaferd Blood Stopper.....                                     | 14           |
| 2.8.1. Glycyrrhiza glabra (meyan).....                               | 14           |
| 2.8.2. Timus vulgaris (kekik).....                                   | 15           |
| 2.8.3. Vitis Vinifera (koruk).....                                   | 15           |
| 2.8.4. Alpinia oppicinarrum (havlıcan).....                          | 15           |
| 2.8.5. Urtica dioica (ısırgan).....                                  | 15           |
| 2.8.6. Hemostaz sistemi.....                                         | 15           |
| 2.8.7. Ankaferd Blood Stopper'nin etki mekanizması.....              | 16           |
| 2.8.8. Ankaferd Blood Stopper ile ilgili yapılan çalışmalar.....     | 16           |
| 3. Gereç ve Yöntem.....                                              | 22           |
| 3.1. Denek Seçimi.....                                               | 22           |
| 3.2. Deney Protokolü.....                                            | 22           |
| 3.3. Mesane Ağırlığı (ma), Vücut ağırlığı (va), (ma/va) Tespiti..... | 23           |
| 3.4. Hematüri Düzeyleri Tespiti.....                                 | 24           |
| 3.5. Makroskopik Değerlendirme (Mesane Hasar Skoru).....             | 24           |
| 3.6. Patolojik Değerlendirme.....                                    | 24           |
| 3.7. Biyokimyasal Ölçümler.....                                      | 24           |
| 3.7.1. MDA seviyelerinin ölçümü.....                                 | 24           |
| 3.7.2. NO seviyelerinin ölçümü.....                                  | 25           |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.3. SOD enziminin aktivite ölçümü.....                        | 27 |
| 3.7.4. MPO enziminin aktivite ölçümü.....                        | 28 |
| 3.7.5. Numunelerde protein tayini.....                           | 28 |
| 3.8. Deneylede Kullanılan Aletler.....                           | 29 |
| 3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....              | 29 |
| 4. Bulgular.....                                                 | 30 |
| 4.1. Biyokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi.....              | 30 |
| 4.1.1. Mesane dokusunda SOD aktivite düzeyleri.....              | 30 |
| 4.1.2. Mesane dokusunda MDA seviyeleri.....                      | 31 |
| 4.1.3. Mesane dokusunda MPO aktivite düzeyleri.....              | 32 |
| 4.1.4. Mesane dokusunda NO seviyeleri.....                       | 33 |
| 4.2. Mesane Dokusunun Histolojik Olarak Değerlendirilmesi.....   | 34 |
| 4.3. Vücut Ağırlığı/Mesane Ağırlığı Oranı Değerlendirilmesi..... | 37 |
| 4.4. Mesane Dokusunun Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi.....  | 38 |
| 4.5. Hematürinin Değerlendirilmesi.....                          | 39 |
| 5. Tartışma.....                                                 | 41 |
| 6. Sonuçlar.....                                                 | 46 |
| 7. Kaynaklar.....                                                | 47 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                |                                            |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| a                              | : Molar ekstinsiyon katsayısı              |
| b                              | : Işık yolu                                |
| c                              | : Konsantrasyon                            |
| mEq                            | : milieqivalan                             |
| ABS                            | : Ankaferd Blood Stopper                   |
| Abs                            | : Absorbans                                |
| Abs <sub>kör</sub>             | : Absorbans kör                            |
| Abs <sub>num</sub>             | : Absorbans numune                         |
| BSA                            | : Bovin serum albumin                      |
| CuSO <sub>4</sub>              | : Bakır sülfat                             |
| CAT                            | : Katalaz                                  |
| CP                             | : Siklofosfamid                            |
| 4-HC                           | : 4-hidroksiperoksisiklofosfamid           |
| eNOS                           | : Endotelyal nitrik oksit sentaz           |
| GSPE                           | : Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | : Hidrojen peroksit                        |
| HOCl                           | : Hipoklorik asit (HOCl)                   |
| HO <sub>2</sub>                | : Perhidroksil radikali                    |
| HS                             | : Hemorajik Sistit                         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : Sülfirik asit                            |
| i.p.                           | : İntraperitoneal                          |
| iNOS                           | : İndüklenebilen nitrik oksit sentaz       |
| MDA                            | : Malondialdehit                           |
| MPO                            | : Myeloperoksidaz                          |
| Mesna                          | : 2-Mercaptoethane sulfonate               |
| NO                             | : Nitrik oksit                             |
| NOS                            | : Nitrik oksit sentaz                      |
| nNOS                           | : Nöronal nitrik oksit sentaz              |
| NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>   | : Nitronyum iyonu                          |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | : Azot dioksit                             |
| NO <sub>3</sub>                | : Nitrat                                   |
| NaOH                           | : Sodyum hidroksit                         |
| NNDA                           | : N-naftiletillen diaminin                 |
| NBT                            | : Nitro blue tetrazoliumu                  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>    | : Süperoksit anyonu                        |
| ONOO <sup>-</sup>              | : Peroksinitrit                            |
| OH <sup>-</sup>                | : Hidroksil iyonu                          |
| PCO                            | : Proantosiyanidin                         |
| ROD                            | : Reaktif oksijen deriveleri               |
| RND                            | : Reaktif nitrojen deriveleri              |
| SOD                            | : Süperoksit dismutaz                      |
| SF                             | : Serum fizyolojik                         |
| TAC                            | : Total antioksidan aktivitesini           |
| TBA                            | : Tiyobarbitürik asit                      |
| TCA                            | : Trikloroasetikasit                       |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemorajik Sistit (HS); Siklofosfamid (CP) başta olmak üzere çeşitli ilaç, toksin, radyasyon ve enfeksiyöz ajanların mesane transizyonel epitel hücrelerini ve kan damarlarını tahrip etmesi sonucu oluşan bir hastalıktır (1). Yüzyılımızın hastalığı olarak bilinen kanserin tedavisinde kullanılan nitrojen mustard grubu alkilleyici bir ajan olan siklofosfamid etyolojide suçlanan en önemli ajandır (2-4).

Siklofosfamid'in üroepitelyum üzerine olan toksik etkisinde alkilleyici özelliği yanında hepatik mikrozomal enzimatik hidroksilasyon yoluyla üretilen 4-hidroksi metabolitleri ve özellikle de renal akrolein salınımında sorumlu tutulmaktadır (5). Siklofosfamid'in bu yan etkisini önlemek üzere bir sülfidril bileşiği olan mesna (2- merkapttoethan sodyum sulfonat) 1970'den bu yana sistemik üroprotektif bir ajan olarak kliniklerde kullanılmaktadır (6). Ancak mesna uygulamasına rağmen hastalarda hematüri, dizüri, pollaküri gibi HS'e bağlı klinik semptomlar görülmeye devam edebilmektedir.

Siklofosfamid'in mesane üzerindeki toksik etkilerini anlamak üzere yapılan pek çok çalışma, bu toksik etkinin ortaya çıkması için artmış nitrik oksit (NO) seviyelerine ihtiyaç olduğunu göstermiştir (7). Bu toksisiteye muhtemelen inflamasyon bölgesinde reaktif nitrojen radikali olarak nitrik oksit ve oksijenin reaksiyonu sonucu oluşan Peroksinitrit'in (ONOO<sup>-</sup>) sebep olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla Peroksinitrit, NO toksisitesinin başlıca sorumlusudur (8).

Ankaferd Blood Stopper (ABS); *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinin karışımından oluşan ve geleneksel tıpta kanama durdurucu olarak kullanılan bir ajandır (9). Bu etkisi protein ağı oluşturup eritrosit aglütinasyonu sağlamasıyla gerçekleşmektedir. Ankaferd'in antioksidan özelliği olduğu da bilinmektedir. İn vivo oksidatif hasarı önleyerek, lipid peroksidasyonuna ve buna bağlı arterioskleroz oluşumuna engel olmaktadır. Bunların yanında; anti-inflamatuar, antibakteriyel, anti-trombin, ve anti-tümör etkinlikleri de gösterilmiştir (10,11).

Bu çalışmada amacımız, siklofosfamid uygulanarak hemorajik sistit oluşturulan ratlarda hemostatik etkili bir ajan olan Ankaferd Blood Stopper'in

mesane kanaması üzerine olan etkileriyle beraber oksidatif stresle ilişkili markerlar üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemorajik Sistit

Hemorajik sistit; ilaçların, toksinlerin, enfeksiyöz ajanların veya radyasyonun mesane transizyonel epitel hücrelerini ve kan damarlarını harap etmeleri sonucunda oluşmaktadır (1). Ancak klinikte en sık karşılaşılan sebep Siklofosamid ve onun sentetik bir analogu olan ifosfamid olmakla beraber doza bağımlıdır ve tedaviyi kısıtlar (2-4). Klinik olarak hematüri, dizüri, pollaküri, suprapubik ağrı, gibi semptom veya bulgularla ortaya çıkar (12). Üriner inkontinans genelde mevcuttur. Hastalarda boyutları artmış, hassas, palpable mesane bulunabilir. Pıhtı retansiyonu sıklıkla (13). Hematüri nedeniyle oluşan pıhtılar idrar akımını engelleyebilir ve obstrüktif üropati nedeni olabilir. Masif kanamalar ayrıca mesanede nekroz, fibrozis, kontraktür sebebi olabilmektedir (2). Hemorajik sistit insidansı CP dozu ile ilişkilidir. Uzun süreli ve düşük doz CP ile tedavi gören hastalarda yeterli üroprotektif tedavi verilmediği takdirde yan etkilerin görülme sıklığı %2-40 arasında bildirilmiştir. Bunun yanında yüksek doz ve intravenöz CP tedavisi alan hastalarda HS görülme sıklığı %75, masif hemoraji ise %2-4 olarak bildirilmiştir (14). Pelvik radyasyon alan hastalarda ise bu oran %10 civarındadır (15).

#### 2.1.1. Etiyoloji

HS etiyolojisi 3 ana başlık altında toplanabilir.

1. Radyasyon
2. Enfeksiyon
3. İlaçlar ve Toksinler

**Radyasyon:** Pelvik radyasyona maruziyet, hastalığın görülme sıklığını arttırmaktadır. Çocuklarda erişkinlere oranla daha sık görülmektedir. Hemorajik sistit radyasyona maruziyetle birlikte akut olarak veya uzun zaman sonra ortaya çıkabilir. Bu hastalarda hematüri radyasyon aldığı sırada veya aylar yıllar sonra görülebilir. Radyasyon hasarına bağlı mukozal hasarlanma buradaki arterlerin inflamasyonuna sekonder gelişen hipoksik yüzey hasarına, ülserasyona ve kanamaya bağlı olarak ortaya çıkar. Radyasyon sistitinin oluşumuna neden olan faktörler arasında mesane

çıkış obstrüksiyonu, daha önceden radyasyon alımı veya cerrahi öyküsü ve aşırı radyasyon dozajı yer almaktadır (16).

**Enfeksiyon:** Rapor edilen enfeksiyon ajanları *Escherichia coli*; *adenovirus 7*, *11*, *21* ve *35*, *papovavirus* ve *influenza A* dır (17). Adenovirüsler içinde en fazla tip 11 suçlanır. Bu virüsün üriner sisteme tropizmi vardır. İmmünsüpresyonla reaktif olur. Sağlıklı çocukta HS' nin en sık sebebidir (18). Polyoma virüs grubunda BK virüs (BKV), JC Virüs (JCV) ve Simian virüs bulunmaktadır (19,20). İnsan polyoma virüsleri birincil enfeksiyon sonrası renal epitelde latent kalabilen yegane virüslerdir (21). Baskılanmış hücrel immünite durumlarında reaktif olur. Çocukluk çağında çocukların çoğunu etkiler (22).

**Toksinler ve ilaçlar:** İnsektisit, Siklofosamid, İfosamid, Busulfan, bu grupta en çok suçlanan ajanlardır.

### 2.1.2. Mikroskopik bulgular

Tek doz CP uygulamasını takiben 24 saat içinde mikroskopik değişiklikler gözlenmeye başlar. Bunlar HS'nin ana özelliği olan epitelyal hasarlanma, transmural ödem, hemoraji, mukozal ülserasyon ve epitelyal nekrozdur (23). Mikroskopik olarak en önce süperfisyal tabakada epitelyal dökülme gözlenir. Bu olay akut ya da kronik hematüri ile direkt ilişkilidir. 18'inci saat sonunda genellikle erozyon veya ülserasyon ilerleyerek mukoza-submukoza sınırına ulaşır ve bazal membran ile subepitelyal kapillerler çevresinde harabiyete neden olur. Bundan sonra mesane dokusu iyileşme sürecine girer. Mukozada hiperplazi ve papillada proliferasyon başlar. Takip eden günlerde lökosit infiltrasyonu ve neovaskülarizasyon görülür (24, 25).

### 2.1.3. Patogenez

Siklofosamid karaciğerin mikrozomal P-450 sistemi tarafından hidroksilasyonla 4-hidroksiperoksiklofosamide (4-HC) dönüştürülür. Bu metabolit dokularda aldofosamid ve ardından akrolein ve fosforamid mustard haline getirilir.

Fosforamid mustard aktif antitümöral ajan iken, ürotoksik etki CP'in toksik metaboliti olan acroleinin mesane ile direkt temasına bağlıdır (5,12).

Akrolein üriner sisteme geçtiğinde mukoza hiperemisi, ülserasyon, hemoraji ve nekroz oluşturabilir. Epitelin yerini telenjiyektazik subepitelyal damarların da katıldığı bir granülasyon dokusu alır. Mesane epitelisi temas süresi ile de ilişkili olarak en fazla risk altında olan doku olmakla birlikte üriner sistem epitelinin tümünün hasar görme olasılığı vardır. Mesane mukozası makroskopik olarak ödemli ve hiperemiktir ve kanama odakları görülür (26).

Son yıllarda yapılan çalışmalar Siklofosfamid'in indüklediği hemorajik sistit patogenezinin interlekin-1 beta (IL-1 beta), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa), platelet aktive edici faktör (PAF) gibi inflamatuvar mediatörlerin aracılık ettiğini göstermiştir (27,28). Bununla birlikte artmış NO seviyelerinin Siklofosfamid'in mesaneye olan zararlı etkilerinden sorumlu olan en önemli mediatör olduğu bildirilmiştir (29). Nitrik oksit fizyolojik hadiselerde antioksidan gibi davranırken, patofizyolojik hadiselerde oksidan rolü oynar. Nitrik oksit guanilat siklaz aktivasyonu ile vasküler tonusun düzenlenmesi, sitokrom oksidaz inhibisyonu ile hücre solunumunda rol alması yanında, lipid peroksidasyonundan da koruyucu görevi vardır. Ancak süperoksit ( $O_2^-$ ) düzeyinin arttığı durumlarda ise  $O_2^-$  ile reaksiyona girerek peroksinitritin oluşumuna sebep olur (30).

Mesnanın akroleine bağlı HS semptomlarını tamamen düzeltilmediği bilinmektedir. Dolayısıyla CP ile indüklenen HS'de oluşan hasarın sadece akroleinin mesane yüzeyi ile temasla meydana gelmediği, bunda reaktif oksijen ürünleri (ROD) ve reaktif nitrojen ürünlerinin (RND) de rol oynadığı bildirilmiştir (31). Bu toksisiteye muhtemelen inflamasyon bölgesinde reaktif nitrojen radikali olarak NO ve oksijenin ( $O_2$ ) reaksiyonu sonucu oluşan Peroksinitrit'in ( $ONOO^-$ ) sebep olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla Peroksinitrit, NO toksisitesinin başlıca sorumlusudur (32).

Peroksinitrit serbest radikal değildir ancak prekürsörlerinden çok daha reaktiftir. Aynı zamanda güçlü bir oksidandır. Mikroorganizmaların sebep olduğu oksidatif zararda faydalı inflamatuvar hadiseler aracılık eder (33). Buna karşın peroksinitritin kontrolsüz aşırı artışı konak hücrede istenmeyen oksidasyona ve yapısal destrüksiyona sebep olur (32,33).

Nitrik oksit; vasküler tonus, polimorf nüveli lökosit adhezyonu ve inflamasyon gibi önemli fizyolojik ve patofizyolojik olayları düzenleyen serbest radikal bir gazdır. Nitrik Oksit L-Arginin aminoasitinden Nitrikoksit sentaz yardımıyla üretilir (32). Nitrik oksit sentaz'ın; nöronal NOS (tip I, nNOS), endotelial NOS (tip II, eNOS) ve indüklenbilir NOS (tip III, iNOS) olmak üzere üç farklı izoenzimi vardır. İnsan vücudunda bazal NO seviyeleri sağlayan, nNOS ve eNOS'tur. Bu izoenzimler Ca bağımlıdır. İndüklenbilir nitrik oksit sentaz ise makrofaj, fibroblast, epitelyum hücresi başta olmak üzere birçok hücrede gösterilmiştir. Aynı zamanda Ca bağımsızdır. İndüklenir nitrik oksit sentaz immün sistemle korele çalışır ve normal şartlar altında NO salgılamadığı halde TNF alfa, IFN gama, IL-1 gibi immün sistem elemanları tarafından aktive edilerek NO salgılar. İndüklenir nitrik oksit sentaz tarafından sentezlenen NO toksiktir ve iNOS seviyesini arttırdığı bilinen bu faktörlerin artışı, aşırı miktarda NO üretimine neden olur. Bunun sonucu vazodilatasyon ve ödem meydana gelir. Mesane dokusunda artmış ROD ve RND miktarı, membran lipidlerini peroksidasyona uğratır ve beraberinde protein denatürasyonu ve DNA hasarı görülür (8,32).

#### 2.1.4. Korunma (profilaksi)

Siklofamid ile ilişkili ürotoksisiteyi önleyen birtakım yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımların temel prensibi akroleinin nötralizasyonu ve detoksifikasyonu şeklindedir. Tüm merkezlerde aynı şekilde uygulanmakta olan standart bir profilaksi yoktur. Uygulanan yöntemler birbirine benzemekle beraber farklı alternatiflerden söz edilebilir. Bunun nedeni bu yöntemler arasında etkinlik yönünden çok büyük farklılıklar olduğunun gösterilememiş olmasıdır.

1. **Hiperhidrasyon:** Bu yöntemle amaç çıkarılan idrar miktarını arttırmaktır. Böylelikle idrardaki akrolein konsantrasyonu azaltılır ve mesaneyle temas süresi de kısalmış olur. Günlük verilecek sıvı miktarı 3 L/m<sup>2</sup>'dir. Tercih edilecek sıvı örneği: 1/2 NS + 100 mEq sodyum bikarbonat/L +10 mEq KCl /L şeklinde olabilir. Bu uygulamaya tedaviden 12 saat önce başlanmalı ve tedavi sonrası 24.'üncü saati kapsayacak şekilde devam etmelidir. Sıvı yüklenmesi ihtimaline karşı hastanın çıkardığı idrar miktarı ve kilo takibi yapılmalıdır. İdrar miktarı 1.5 mL /kg/saat

miktarının altında ise veya hasta ağırlığında 2 Kg.'dan fazla artış varsa diüretik yapılır. Mutlaka hiponatremi ve diğer elektrolit dengesizlikleri açısından serum elektrolitlerinin de izlenmesi gerekir (26).

**2. Mesna:** Bir sülfidril bileşiği olan mesna (2-merkaptioethan sodyum sulfonat) 1970'den bu yana sistemik üroprotektif bir ajan olarak kliniklerde kullanılmaktadır (34). Mesnanın sistemik uygulanması üriner sistemde bölgesel detoksifikasyon sağlamaktadır (35,36). Mesna kendisi küçük bir molekül olmakla birlikte üzerinde bir sülfidril grubu taşır ve ROD'ları etkisiz hale getirir. Bu etkisizleştirme üzerindeki iki adet sülfidril grubu tarafından gerçekleştirilir (37). Akrolein Mesna ile etkileşime girince inaktif olan tioetere dönüşür. Bu etkisiz ürün üriner sistem epiteline zarar vermeden idrarla atılır (38). Ancak HS ortaya çıktıktan sonra mesna kullanımının efektif olmadığı bilinmektedir.

Mesna, CP'in indüklediği HS'te etkili bir ajan olarak kullanılmasına rağmen, epizodik olarak hastalarda mikroskobik ya da makroskobik hematüri, idrar yapma sıklığında artma gibi semptomlardan oluşan HS klinik olarak hala karşımıza çıkmaktadır (39).

Mesnanın akroleine bağlı HS semptomlarını tamamen düzeltemediği ve NO artışının HS patogenezinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CP ile indüklenen HS'de oluşan hasarın sadece akroleinin mesane yüzeyi ile temasla meydana gelmediği, bunda ROD ve RND'lerin de rol oynadığı bildirilmiştir (40).

İntravenöz bolus olarak verilen mesnanın CP ile oluşan hasarın azaltılmasında devamlı infüzyon uygulamasına göre daha üstün olduğu gösterilmiştir (41). Mesna, verilmesinden 20 dakika sonra en yüksek doku konsantrasyonuna ulaşır (42). Yarı ömrü yirmi dakika kadar olduğundan yaklaşık bölünmüş dozlarda uygulanmalı (doz aralıklarının 3 saatten daha uzun olmamasında yarar vardır) veya devamlı infüzyon ile verilmelidir. Mesna dozu, uygulanan CP dozunun %100-160'ı kadar olmalıdır. CP ile birlikte başlanmalı ve son CP dozundan sonraki 24 saati kapsayacak şekilde uygulanmaya devam edilmelidir (26). Mesnanın yan etkileri arasında ateş artralji, myalji, EKG değişiklikleri ve gecikmiş hipersensitivite reaksiyonu olarak eritroderma ile derinin bülloz lezyonları sayılabilir (43).

**3. Mesane irrigasyonu:** Irrigasyon için 3 lümenli idrar sondası kullanılarak, serum fizyolojik ile 250-1000 mL /saat hızında mesane yıkaması yöntemi ile de HS

profilaksisi yapılabilir. Ancak bu yöntemin de bazı sakıncaları vardır. Bunlar arasında; hastanın duyacağı rahatsızlık hissi ve üriner infeksiyon riski yanında üst üriner sistemin bu yöntemle akroleinden arındırılmasının mümkün olmaması sayılabilir (26).

### **2.1.5. Tedavi**

Siklofosfamidle indüklenen hemorajik sistit olgularının mikroskopik hematüri veya dizüri gibi hafif belirtilerle seyreden olguları spontan gerileyebilmekte veya çok basit girişimlerle düzelebilmektedir. Ancak ağır şekilleri tedaviye dirençli olabilmekte ve cerrahi müdahale gerektirebilmektedir. Bu nedenle öncelikle profilaktik girişimlere önem vermek gerekir.

Hemorajik sistit gelişen hastalara öncelikle 5-6 L/m<sup>2</sup>/24 saat, intravenöz (İ.V.) hiperhidrasyon başlanmalıdır. Bununla beraber hastalar sıvı yüklenmesi, konjestif kalp yetmezliği ve elektrolit dengesizliği gelişimi açısından izlenmelidir. Yeterli idrar çıkışını sağlamak üzere diüretik yapılabilir. Ancak hiperhidrasyon kolik ağrıyı arttırmaktadır. Mesane spazmını azaltmak için düz kas gevşetici, ağrıyı gidermek için narkotik analjezik verilebilir.

Hemorajik sistite bağlı mesane kanaması olan hastalarda kanamanın kontrolünde ilk adım foley kateterle mesane irrigasyonudur. Bu method başarısız olduğunda sonraki adım genellikle sistoskopi ve kanayan lezyonun koterizasyonudur. Bu tedavi yöntemlerine yanıt alınamayan kanamalarda ise intravezikal tedaviye başlanmalıdır. Bu amaçla klinikte kullanılan alum, formolin, prostaglandin gibi ajanların da avantajlarının yanında dezavantajları da mevcuttur (26, 44).

## **2.2. Serbest radikaller**

Serbest radikaller; eşleşmemiş elektronu sayesinde organizmada çeşitli moleküllerle kolayca kimyasal reaksiyona girebilen atom, molekül ve iyonlardır. Biyolojik sistemde serbest radikaller sıklıkla Oksijen, Nitrojen ve Sülfür moleküllerinden elde edilir. Serbest radikaller reaktif oksijen ürünleri ve reaktif nitrojen ürünleri olarak adlandırılan moleküllerin birer parçasıdır. Örneğin ROS;

süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), perhidroksil radikali ( $HO_2$ ), hidroksil radikali ( $OH$ ), Nitrik Oksit ( $NO$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $O_2$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi serbest radikalleri içerir. Serbest nitrojen radikalleri de  $NO$ 'un  $O^-$  ile reaksiyona girip peroksinitrite dönüşmesiyle oluşur. Reaktif sülfür ürünleri ise tiolün ROS ile reaksiyona girmesiyle oluşur. Reaktif sülfür ürünleri, hücre metabolizması ve fonksiyonel aktivitesi sırasında oluşur ve hücre sinyali, apoptozis, gen ekspresyonu ve iyon transportu gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (45). Bununla birlikte ROS'un aşırı üretiminin protein, lipid, RNA ve DNA'yı da içine alan birçok molekül üzerine zararlı etkileri vardır. Bu oksidatif hasardan sorumlu olan en güçlü oksidan ajan ise hidroksil radikalidir. Serbest oksijen radikalleri, nötrofil aktivasyonu aracılığıyla da epitelyal hasara yol açarlar. Aktive olan nötrofiller fazla miktarda oksijen tüketimine ve hücre membranındaki Nikotinamid adenindinükleotid Fosfat (NADP) enziminin katalizörlüğündeki bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonların oluşumuna yol açar. Ardından süperoksit dismutaz (SOD) ve myeloperoksidaz (MPO) enzimlerinin katalizörlüğünde  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  ve hipoklorik asit oluşur (46). Myeloperoksidaz enzimi, dokularda polimorfonükleer lökositlere spesifik bir enzimdir. Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, gibi birçok proteini ortama salıp prostoglandin ve serbest radikalleri oluşturarak mikrovasküler hasarı başlatırlar (47).

Normalde hücreler, intrasellüler enzimleri sayesinde ROS seviyelerini düşük düzeyde tutarak homeostazisi sağlar ve kendilerini ROS'un zararlı etkilerinden korurlar. Ancak çevresel stres ve hücre disfonksiyonuna bağlı olarak ROS seviyeleri ciddi miktarlarda artarak önemli hücre hasarlarına sebep olabilir. Böylece oksidatif stres, çeşitli inflamatuvar hastalıklar, kardiovasküler hastalıklar, kanser, diabet, Alzheimer, katarakt, otizm ve yaşlanma gibi pek çok hastalığın patogeneze katkıda bulunur (48,49). İnsanlar ve diğer mikroorganizmalar ROS'un indüklediği oksidatif stresi azaltmak ya da önlemek için metal şelasyonu yapan ve serbest radikallerin etkisini azaltan ya da nötralize eden enzim sistemleri içeren bir antioksidan defans sistemi geliştirmiştir. Ayrıca diyetle alınan antioksidan ajanlarda organizmanın antioksidan kapasitesini arttırabilir (50).

### 2.3. Serbest Oksijen Radikal Türleri

**Süperoksit;** oluşumunun organizmada en iyi bilinen sebebi oksijenli solunum sırasında elektron transport zincirinde NAPH oksidaz aracılığı ile redükte NAD'ın okside NAD'a dönüşmesi sırasında meydana gelmesidir (51).

**Hidrojen peroksit;** Süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak üretilmektedir. Kendisi radikal olmamakla beraber  $O_2^-$  ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan  $OH^-$  radikalini oluşturabilir (52).

**Hidroksil;**  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan  $OH^-$ 'e dönüşür.  $H_2O_2$ , serbest  $Fe^{+2}$  ile reaksiyona girerse demir okside olurken yine  $OH^-$  radikali oluşur. Buna fenton reaksiyonunda denir (53).

### 2.4. Serbest Radikal Oluşum Sebepleri

Enflamasyon

Radyasyon

Parsiyel oksijen basıncı yüksekliği ( $pO_2$ )

Ozon ( $O_3$ ) ve azot dioksit ( $NO_2$ )

Kimyasal maddeler ve ilaçlar

Yaşlanma.

### 2.5. Serbest Radikallerin Hücre Üzerine Olan Etkileri

#### 2.5.1. Lipidler üzerine etkileri

Serbest radikallerin lipidler üzerine olan etkileri hücre membranı üzerinden gerçekleşir. Hücre membranında bulunan yağ asidi ve kolesterolün sahip olduğu doymamış bağlar serbest radikallerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Oluşan zincirleme reaksiyonların son ürünleri malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal'dir (54). MDA ise lipid peroksidasyon belirteci olarak kullanılmaktadır.

### 2.5.2. Proteinler üzerine etkileri

Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Dolayısıyla kolaylıkla reaksiyona girebilirler (55).

## 2.6. Antioksidanlar

### 2.6.1. Enzimatik antioksidanlar

Bilinen en önemli antioksidan enzim sistemleri;

Süperoksit dismutaz (SOD)

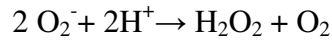
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Katalaz (CAT)

Bunların dışında biyolojik sistemlerde; melatonin, seruloplazmin, transferin, miyoglobin hemoglobin ve ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ile albuminin de antioksidan etkinliği olduğu bilinmektedir.

#### 2.6.1.1 Süperoksit dismutaz

Süperoksit serbest radikalının ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen bir metalloenzimdir. 2 izoenzimi vardır. Sitozolde bulunan formu bakır ve çinko içerirken, mitokondride bulunan formu manganez içerir. Katalizlediği reaksiyon Şekil-1’de görülmektedir.



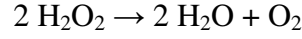
**Şekil 1.** SOD enziminin katalizlediği reaksiyon.

Antioksidan enzim sistemleri arasında en önemli rolü oynayan SOD oksijeni metabolize eden hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korur (56).

#### 2.6.1.2. Katalaz

$H_2O_2$ ’yi su ve moleküler oksijene parçalayan hemoprotein yapıda bir enzimdir. Böylelikle hidroksil radikalının oluşumu önlenmiş olur. Katalaz esas

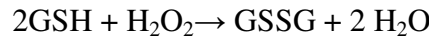
olarak peroksizomlarda daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunur. Katalizlediği reaksiyon Şekil-2’de görülmektedir.



**Şekil 2.** Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon (57).

#### 2.6.1.3. Glutasyon peroksidaz;

Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir. Yapısında selenyum bulunur. Katalizlediği reaksiyon Şekil-3’de görülmektedir.



**Şekil 3.** Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

Redükte glutasyon yükseltgenirken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  de suya çevrilmiş olur. Eritrositler için en kuvvetli antioksidandır. Membran lipitlerini ve hemoglobini oksidan hasara karşı korur (58).

### 2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

#### 2.6.2.1. C vitamini

Plazmanın en önemli antioksidan ajanı olup suda eriyen vitaminlerdendir.  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{OH}^-$  radikallerini temizleyici rolü vardır. Elektron transport zincirinde görevli sitokrom-a, sitokrom-c ve moleküler oksijen gibi moleküllerin indirgenmesinde görevlidir (59).

#### 2.6.2.2. E vitamini

Yağda eriyen vitaminlerdendir. Hücre membranı ve lipoprotein yapısında bulunur. Membranlardaki oksijen radikallerini temizleyerek membranı lipid peroksidasyonuna karşı korur (60).

#### 2.6.2.3. Beta-karoten

Süperoksit radikalini temizleyen ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşime giren A vitamini türevi bir antioksidandır (61).

#### 2.6.2.4. Melatonin

En zararlı serbest radikal olan OH<sup>-</sup> radikali ile reaksiyona girerek indolil radikalini oluşturur. Bu radikalde O<sub>2</sub><sup>-</sup>'yi etkisiz hale getirir (62).

#### 2.6.2.5. Glutasyon

Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesi yanında, proteinlerdeki sülfhidril (SH<sup>-</sup>) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Ayrıca aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar (63).

### 2.7. Siklofosfamid

CP { (2-[bis(2-chloroethyl) amino] tetrahydro - 2H - 1,3,2 oxazaphosphorine 2-oxide), (CP) }; nitrojen mustard grubundan alkilleyici bir ajandır. Sitotoksik immünosüpresif ilaçların en güçlüsü olduğu kabul edilir; ancak toksisitesinin fazlalığı nedeniyle immünosüpresif ilaç olarak kısıtlı sayıdaki endikasyonlarda kullanılır.

Bazen süpresör T lenfositleri baskılamak suretiyle paradoksik olarak immünostimülasyon yapar. B lenfositler üzerinde, T'lerde olduğundan daha etkilidir. İntravenöz ve oral yolla uygulanabilir. Karaciğerde aktif metaboliti olan fosforamid hardalına dönüşür. Alkilleyici ajanlar, sitotoksik etkilerini hücre yapısında bulunan fosfat, amino, sülfidril, hidroksil, karboksil ve imidazol gibi nükleofilik gruplara kovalan bağlanarak gösterirler (64).

#### 2.7.1. Kullanım alanları

Siklofosfamid antitümoral kemoteröpotik etkinliği olup bu amaçla tek başına veya diğer kemoteröpotiklerle kombine edilebilir.

Akut lenfositik lösemi ve akut myelositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, kronik myelositik lösemi, over kanseri ve meme kanserini içeren birçok durumda kullanılan bir ilaç olmakla birlikte, immünolojik böbrek hastalıkları, bazı granüloamatöz hastalıklar veya vaskülit tipleri ve klasik tedaviye dirençli romatoid artrit gibi nonneoplastik hastalıklar da siklofosfamid ile etkin biçimde tedavi edilmektedir (65).

### 2.7.2. Yan etkileri

İlacın sık görülen yan etkileri bulantı, kusma, alopesi, stomatit, aspermi, amenore ve çabuk başlayıp kısa süren baş ağrısıdır. Akut lösemi ve mesane kanseri de nadir yan etkilerindendir (66). Daha az olarak deri ve tırnaklarda hiperpigmentasyon, enjeksiyon sırasında metalik tat, alerji, halsizlik, karaciğer enzimlerinde yükselme görülür. Yüksek dozlarda verildiğinde nadir de olsa hipotiroidi, katarakt, sarılık, kardiyak nekroz ve çok masif dozlarda akut miyoperikardite neden olabilir. İlacın en önemli ve doz sınırlaması gerektiren yan etkileri kemik iliği süpresyonu (özellikle lökopeni) ve hemorajik sistittir (64). Deneysel hayvan modellerinde de (fare ve ratlarda) sistemik ya da intraperitoneal olarak uygulanan siklofosfamidin doza bağlı olarak hemorajik sistit oluşturduğu bilinmektedir (67, 68).

### 2.8. Ankaferd blood stopper

Ankaferd blood stopper (ABS); Türk halkı arasında geleneksel tıpta yüzyıllardır kanama durdurucu olarak kullanılmaktadır. Ankaferd; *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinin karışımından oluşan bir üründür (69). İçeriğindeki her bir bitkinin farklı etkileri mevcuttur.

#### 2.8.1. Glycyrrhiza glabra (meyan);

Anjiogenezisi önler, vasküler endotelial growth faktörü'yi düşürür ve sitokin ilişkili neovaskülarizasyonu azaltır. Aynı zamanda anti-inflamatuar, anti-trombosit, anti-oksidan, anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri bulunmaktadır (70). Ayrıca anti-ülser, ekspektoran, antifungal ve antibakteriyel etkileri de bildirilmiştir (71,72).

### **2.8.2. Timus vulgaris (kekik)**

Anti-oksidan etkisi vardır. Bu sayede in vivo oksidatif hasarı önler, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı arterioskleroz oluşumunu önler (73). *Bunlarla beraber* antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoan, bronşiyal antispazmotik ve ekspektoran özelliklere de sahiptir (74).

### **2.8.3. Vitis vinifera (koruk)**

Proteinlere karşı direnç sağlar. Anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri de vardır (75-77). Aynı zamanda antioksidan, antiaterosklerotik, sitotoksik, kemopreventif ve sitoprotektif etkisi olduğu bilinmektedir. (78).

### **2.8.4. Alpinia oppicinarrum (havlıcan)**

Nitrik oksit oluşumunu azaltır (79). Antispazmotik ve antibakteriyel özelliklere sahiptir (11).

### **2.8.5. Urtica dioica (ısırgan)**

Antifungal ve antiviral etki göstermektedir (80).

### **2.8.6. Hemostaz sistemi**

Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik mekanizmadır. Bu mekanizmalar damar spazmı, trombosit tıkaç oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır.

Hemostaz mekanizmasında çalışan 3 ayrı faktör vardır:

1-Ekstravasküler faktör: Damarları çevreleyen dokular ve kanama sırasında damar dışına çıkan kanın yaptığı basınç kanamayı sınırlandırır.

2-Vasküler faktör: Lokal vazokonstriksiyon ile hasara karşı ani yanıt oluşturur.

3-İntravasküler faktör: Trombositler, pıhtılaşma faktörleri ile önce hemostatik tıkaç sonra da fibrin pıhtısı oluşur.

#### **2.8.7. Ankaferd Blood Stopper'in etki mekanizması**

Ankaferd Blood Stopper'in en temel etki mekanizması enkapsüle protein ağı oluşturup, bu sayede eritrosit aglütinasyonu sağlamasıdır. ABS'nin seruma eklenmesi ile bir saniye içinde protein ağı oluşmaktadır. Bu protein ağı eritrositin fonksiyonları ve kan proteinleri sayesinde olmaktadır. Pıhtılaşma faktörleri, ABS'den etkilenmiyor olsa da anti-hemorajik süreç protein agregasyonu sayesinde başlamaktadır. ABS pıhtılaşma faktörleri dışında tüm fizyolojik süreci etkilemektedir. ABS'nin etki mekanizmasının pıhtılaşma faktörlerinden bağımsız olması sebebiyle, kanama diyatezi olan hastalarda da etkin olduğu gösterilmiştir. 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 ölçüde düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca bu tıkaç etkisi gösteren protein ağı oluşumu sırasında plazmada; total protein, globulin ve albumin seviyelerinin de anlamlı ölçüde düştüğü görülmüştür. Bu yüzden, ABS, fibrinojen–eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır (81,82).

#### **2.8.8. Ankaferd Blood Stopper ile ilgili yapılan çalışmalar**

Ankaferd Blood Stopper'in etkinliği pek çok deneysel ve klinik çalışmada gösterilmiştir. Gönüllü normal olgularda yapılan bir çalışmada Ankaferd Blood Stopper'in biyokimyasal, hematolojik ve hemostaz parametrelerinde tampon öncesi ve sonrası arasındaki farklar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (83). İnsanlarda ise cilt ve cilt altı kesilerde, hemofili hastalarında, afibrinojenemide, trombositopenide ve dissemine intravasküler koagülasyonda etkili

bir hemostatik ajan olduğu gösterilmiştir (84). Deneysel olarak Ankaferd hemostatik ajanın toksik etkisi olmadığı gösterilmiştir (85).

Ankaferd klinikte ilk olarak, hemofili A tanısıyla takip edilen ve sünnet sonrası sızıntı tarzında kanaması olan 16 yaşındaki erkek hastada denenmiştir. Yüksek dozda faktör VIII tedavisine yanıt vermeyen, ilave olarak siklofosamid ile prednizolon verilen ve bu önlemlere rağmen kanaması devam eden olguda, ABS'nin kanayan yere yüzeysel olarak sürölmesini takiben birkaç dakika içinde kanamanın tamamen durduğu bildirilmiştir (86). Kanama diyatezi olan bir diğer hemofili A hastasında da aynı şekilde sünnet sonrası kanamanın kontrolünde başarılı sonuç alındığı bildirilmiştir (87). Glanzman trombasteni, kalıtsal trombositopeni, afibrinogenemi, vWF eksikliğine bağlı trombosit adezyon bozukluğu ile birlikte faktör VIII düzeyleri düşük olan olgularda, standart yöntemlerle kontrol altına alınamamış kritik kanamaların ABS kullanımıyla başarılı sonuçlar alındığı ve güvenle kullanılabileceği bildirilmektedir (88-92).

ABS ile normal steril spançın cilt, cilt altı kesilerinde meydana gelen kanamanın kontrolü üzerine etkileri arasında fark olup olmadığının araştırılması için yapılan bir çalışmada, ABS kullanılan hastalarda kanamanın daha kısa sürede durdurulduğu ve daha az oranda tekrarladığı ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı çıktığı bildirilmiştir (84). Böbrek yetmezliği, dissemine intravasküler koagölasyon, ilaç kullanımı ve kalıtsal kanama diyatezli olguların yüzeysel kanamalarında ve hepatik yetmezlik ve hipersplenizme bağlı edinsel kanama diyatezlerinde de ABS kullanımıyla kritik kanamalara ait topikal kontrole ilişkin olgu çalışmaları da bildirilmiştir (92,93). Doğumsal ve edinsel kanama bozuklukları yada antikoagölün tedaviye bağlı olarak diş çekimi sırasında lokal kanama problemiyle karşılaşılan olgularda, kanamayı kontrol etmek amacıyla diş kavitesine uygulanarak, akut dönemde başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (91).

Ankaferd'in böbrek dokusu üzerine olan etkisiyle ilgili çalışmalar da mevcuttur. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada parsiyel nefrektomi modeli oluşturulmuş ve ABS uygulanarak böbrek dokusu makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde eritrosit agregasyonu görölmüş, bunun ABS'nin hemostatik mekanizmasının böbrekte de oluştuğunu desteklediği, beraberinde kalsifikasyon ya da glomerüler nekrozla

karşılaşılmamış olmasının da renal doku üzerine olan olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (94). Ankaferd'in, renal travma üzerine etkisiyle ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Ratlarda oluşturulan böbrek travması modelinde ABS uygulanmasıyla birlikte, böbrek dokusunda, histopatolojik olarak dev hücre reaksiyonu, akut inflamasyon, fibrozis, adezyon, tiroidizasyon, fibroblast aktivasyonu, kalsifikasyon, glomerüler nekroz saptanmadığı, bununla birlikte mikrovasküler proliferasyon siderofaj, eritrosit agregasyonu gibi böbrek histopatolojisinde olumlu değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir (95).

Ankaferd uygulamasıyla ilgili bir başka olgu da üst gastrointestinal sistem kanaması olan bir hastaya endoskopik biyopsi bölgesine topikal ABS uygulamasının da ani kanama kontrolünde etkili olduğu bildirilmektedir (96). Ankaferd'in çalışıldığı bir başka alanda nazal cerrahidir. Nazal cerrahi sırasında ve sonrasında ABS emdirilmiş tamponların normal tampon uygulamasına oranla kanama miktarı ve sıklığını istatistiksel olarak anlamlı oranda azaltması yanında yara iyileşmesinin daha iyi olduğu da bildirilmiştir (97). Kemik iliği transplantasyonu yapılmış bir olguda, ABS uygulamasının epistaksis kontrolünde güvenle kullanılabileceği ve tekrarlayan epistaksis ataklarında nazal tamponla birlikte ABS uygulanmasının tekrarlayan kanamaları önlediği bildirilmiştir (98, 99).

Lokal kanaması olan kırım Kongo kanamalı ateşli hastalarında da, ABS'in hemostaz üzerine etkinliği ve yan etkileri araştırılmış, epistaksis, diş eti, hemoroid kanamaları ve intravenöz enjeksiyon bölgesindeki cilt kanamalarında lokal kullanımıyla kanamayı kontrol altına aldığı, sistemik yan etki, ilacı tolere edememe ve irritasyon, ödem, kızarıklık, kaşıntı, döküntü benzeri lokal yan etkilerin görülmediği bildirilmiştir (100). Koroner arter bypass greft cerrahisinde bypass sütür çizgisine veya kanama alanına ABS çözeltisi püskürtülmesi suretiyle, tüm olgularda, sütür çizgisi de dahil olmak üzere mediastinal yapılarda kanamanın durduğu, şiddetli kanama nedeniyle cerrahi revizyon gereksinimi olmadığı ve mediasten kanamasının ciddi bir sorun teşkil ettiği açık kalp ameliyatlarında ABS'in kanama kontrolü için umut vadeden bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır (101). Ankaferd'in, penil kavernoza cerrahilerinde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, histopatolojik olarak kavernoza dokuda eritrosit agregasyonu oluşturduğu, hemostatik ve antienflamatuar etki gösterdiği, böylelikle kavernoza doku iyileşmesi

üzerindeki olumlu etkileriyle penil kavernozaal cerrahilerde hemostatik ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (102).

Ankaferd'in erken dönem kemik doku iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni kemik doku yapımını anlamlı derecede arttırdığı, iltihap ve nekroz oranlarını anlamlı derecede düşürdüğü, dolayısıyla ABS'in erken dönem kemik doku iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (103). Ankaferd Blood Stopper'ın hücresel ve vasküler proliferasyon üzerindeki kombine etkisini değerlendirmek üzere yapılmış çalışmalarda, doku beslenmesini arttırdığı, cilt fleplerinde nekroz oranını anlamlı biçimde azalttığı bildirilmiştir (104). Ankaferd Blood Stopper'ın antineoplastik etkisi kolon kanseri hücre modelinde gösterilmiş olup, bu etkinin hangi mekanizma ile geliştiği henüz bilinmemektedir (105). Ankaferd Blood Stopper'ın antineoplastik etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada, in vitro ortamda osteosarkom hücrelerinin ve insan kolon kanseri hücrelerinin invazyonunda doza bağlı inhibisyon ve canlılıklarında ise azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (106). Mezenkimal kök hücre gelişimi üzerinde ise, ortamda yoğun agregasyon nedeniyle költür vasatında negatif yönde etki ettiği tespit edilmiştir (107). Ankaferd Blood Stopper'ın hemostatik etkisine ek olarak antimikrobiyal etkinliği de söz konusudur. ABS ile aralarında insan patojeni ve gıda bozulma etmeni bakterilerin de bulunduğu *Staphylococcus carnosus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis* 12, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Lysteria monocytogenes* gibi çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı yüksek inhibitör aktivite göstermektedir (108, 109). Bununla beraber antifungal etkinliğinin olduğu, antimikrobiyal aktivitesinden enfeksiyon hastalıkları ile hastane enfeksiyonlarının tedavisinde ve gıdaların korunmasında faydalanabileceği bildirilmiştir (110). Ayrıca arka bacağına amputasyon yapılan sıçanlarda da kanama zamanını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (111).

Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda, topikal ABS kullanımının, Warfarin, aspirin ve enoksaparin kullanılarak antikoagölan tedavi uygulanan ratlarda kanama süresini ve miktarını anlamlı derecede azalttığı böylelikle in vivo ortamda da etkili olduğu ortaya konmuştur (112).

Ankaferd içindeki üzüm çekirdeği ekstresindeki proantosiyanidin (PCO) serbest oksijen radikalleri üzerinde konsantrasyon bağımlı inhibisyon yapmaktadır. Bir çalışmada, proantosiyanidin antioksidan etkisinin vitamin C ve vitamin E süksinat ile karşılaştırıldığında daha potent olduğu görülmüştür (113). Bileşik aynı zamanda fosfatidilkolin lipozomlarının peroksidasyonunu da inhibe etmektedir (114). Bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresi serbest radikalleri tutmuş ve oluşumlarını durdurmuş, özellikle lipid peroksidasyonunu geciktirmiş ve bağ dokusu yapısını indirgeyebilen enzimlerin yıkıcı etkisini inhibe etmiştir. Üzüm çekirdeği ekstresindeki PCO'ların antioksidan aktivitesi, vitamin C ve vitamin E'ninkinden çok daha fazladır (yaklaşık 50 kat) ve mikrovasküler hastalıkların terapötik kontrolünde bu bileşiklerin kullanımı için güçlü bir gerekçe oluşturmaktadır (115).

Diğer bir in vitro çalışmada, üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerin, UV-C ışınları aracılığı ile oluşan çoklu-doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (116). Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi (GSPE) ile beslenmiş farelerde, reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, karaciğer ve beyin dokusunda DNA parçalanması ve lipid peroksidasyonunu indükleyen 12-Otetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) azalmıştır. GSPE, doz çalışmalarında, vitamin C, vitamin E süksinat veya bu vitaminlerin kombinasyonu ve beta-karotenden daha iyi bir serbest radikal süpürücüsü ve oksidatif doku hasarının inhibitörüdür (117).

Araştırmacılar, çift-kör, plasebo kontrollü bir çalışmada 20 genç gönüllü üzerinde PCO PhytosomeR'un antioksidan etkilerini değerlendirmişlerdir. Phytosome yöntemi, iki kısım fosfatidilkolin ile bir kısım üzüm çekirdeği PCO ekstresinin bir araya gelmesidir. Ortaya çıkan sonuç, merkezdeki PCO molekülünün iki fosfatidilkolin molekülü ile kaplandığı tamamen yeni bileşiktir. Deneklere, 5 gün boyunca, 300 mg PCO Phytosome içeren 2 kapsül veya plasebo verilmiştir. C ve E vitamini seviyelerinin de bakıldığı antioksidan aktivite tayini için çalışmanın başında ve sonunda deneklerden kan alınmıştır. En az 2 haftalık dinlenme periyodundan sonra denekler diğer gruba çaprazlanmıştır. Proantosiyanidin Phytosome'un serum C ve E vitamini seviyeleri üzerine etkisi olmazken, serum total antioksidan aktivitesini (TAC) oldukça artırmıştır. Beşinci günde dozdan 1 saat sonra TAC 408'den 453  $\beta$ mol/l trolox eşitliğine artmıştır (118).

Meyan kökünün aseton ekstresinde antioksidan özelliklere sahip 7 tane bileşik tespit edilmiştir. Aköz serbest radikal oluşturan bir madde kullanılarak yapılan antioksidan aktivite testinde E vitamini antioksidan bir etkinlik göstermezken ekimolar miktardaki sözü edilen meyan bileşiklerinin (formononetin hariç) %65-85 oranında LDL oksidasyonu engellediği gözlenmiştir (119). Glisirizinik asitsiz alkollü meyan ekstresi, sağlıklı erkeklerin plazmalarından izole edilen LDL oksidasyonunu ex vivo olarak plaseboya göre azaltmıştır. In vitro analiz sonuçları ekstrenin baskın izoflavanı olan (%11.6) glabridinin %75-85'inin LDL'ye bağlandığını göstermiştir (120, 121).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Araştırma Laboratuvarı'nda, etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi.

#### 3.1. Denek Seçimi

Çalışmada, genç ve sağlıklı 8-12 haftalık, ağırlıkları ortalama 200-250 gram arasında olan 24 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23°C) bulunduruldu ve standard yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Sıçanlar rastgele olarak sekizerli 3 gruba ayrıldı. Sekiz adet sıçan ile serum fizyolojik uygulanacak kontrol grubu, 8 adet sıçan ile Siklofosfamid uygulanacak olan grup, 8 adet sıçan ile de Siklofosfamid ve Ankaferd uygulanacak olan grup oluşturulmuştur.

#### 3.2. Deney Protokolü

Deney başlangıcında ratların ağırlıkları tartıldı. Uygulanacak olan ilaç dozları hayvanların ağırlıklarına göre hesaplanarak verildi. Genel anestezi için 10 mg/kg xylazine (Rompun flakon, 23.32 mg/ml) ve 90 mg/kg ketamin (ketalar flakon 50 mg/ml) intraperitoneal (i.p.) olarak yapıldı. Siklofosfamid (Endoxan 1 gr flakon) ürotoksik doz olan 100 mg/kg, ABS ampul (Ankaferd sağlık ürünleri A.Ş Beykoz, İstanbul) 0,5 cc/kg ve serum fizyolojik (SF) ise CP dozu kadar uygulandı.

Grup 1 (Kontrol grubu): Sadece CP dozu kadar i.p. SF verildi.

Grup 2 (CP grubu): Ürotoksik doz olan 100 mg/kg tek doz i.p. CP verildi.

Grup3 (CP+Ankaferd grubu): Bu grupta ise yine 100 mg/kg tek doz i.p. CP enjeksiyonuna ek olarak Ankaferd 0,5 cc/kg dozunda CP enjeksiyonundan 60 dakika önce ve CP enjeksiyonundan sonraki 12'inci, 24'üncü, 36'ncı, 48'inci ve 60'ıncı saatlerde olmak üzere 6 kez intravezikal olarak verildi (45, 73).

**Tablo 1.** Deney işleyiş şeması.

| Uygulama Zamanı                    | Grup1     | Grup2            | Grup3                               |
|------------------------------------|-----------|------------------|-------------------------------------|
| CP enjeksiyonu<br>Öncesi 1. saat   | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu                     | SF        | CP100 mg/kg, i.p | CP100 mg/kg, i.p                    |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 12. saat | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 24. saat | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 36. saat | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 48. saat | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 60. saat | SF        | SF               | Ankaferd<br>0.5 cc/kg, intravezikal |
| CP enjeksiyonu<br>sonrası 72. saat | Sakrifiye | Sakrifiye        | Sakrifiye                           |

Deney 3 gün sürdü ve 3. günün sonunda tüm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edildi. Çıkarılan mesaneler tepeden orta hat boyunca ikiye ayrıldı; yarısı histopatolojik inceleme için % 10'luk tamponlanmış formalinde 24 saat fikse edilmek üzere bekletilirken, diğer yarısı enzim ölçümleri için -80 °C'ye kaldırıldı.

### **3.3. Mesane Ağırlığı (ma), Vücut Ağırlığı (va), (ma/va) Tespiti**

Hayvanların, deney öncesi gruplama yapmak amacıyla ağırlıkları ölçülmüştür. Üçüncü gün deneyin sonlandırılmasıyla beraber mesaneler çıkarılmış ve mesane masajı yapılarak rezidü idrar boşaltılmıştır. Bu şekilde tartılan mesanelerin ağırlıkları kaydedilmiş ve hesaplamalarda bu değerler kullanılmıştır.

### **3.4. Hematüri Düzeylerinin Tespiti**

Abdominal masajla alınan idrar örnekleri dip-stick analizi yapılarak sıfırdan dörde dek skorlanmıştır. Tüm grupların birinci günden deneyin sonlandırılışına dek her gün saat 11.00'da ve 17.00'da abdominal masajla alınan idrar örneklerine dipstick ile bakılmıştır.

### **3.5. Makroskopik Değerlendirme (Mesane Hasar Skoru)**

Patolog tarafından yapılan değerlendirmede mesaneler gözle görülür ödem ve kanama açısından 0'dan 3'e kadar skorlandı. Ödem açısından; mesane iç ve dış duvarında ödem 3 (şiddetli), internal mukozada ödem 2 (orta derece), hafif derece ödem (orta normal arası) 1, ödem yokluğu 0 olarak değerlendirildi. Kanama açısından; mesane içinde pıhtı 3, mukozada hematoma 2, telenjektazi ve damar dilatasyonu 1, normal mesane 0 olarak değerlendirildi (12).

### **3.6. Patolojik İnceleme**

% 10'luk tamponlanmış formalinde 24 saat fikse edildikten sonra parafin bloklara gömülen mesane dokularından yaklaşık 5µ'luk en az 4 kesit alınarak hematoxilen eozinle boyandı. Ardından patolog tarafından ödem, inflamasyon, hemoraji ve mukozal ülserasyon açısından değerlendirilip 1'den 4'e dek skorlandı. Normal mesane mukozası 0, epitelyal dökülmeler 1, mukozada fokal ülserasyon 2, geniş epitelyal ülserasyon 3, submukozal ülserasyon 4 olarak değerlendirildi (122).

### **3.7. Biyokimyasal Ölçümler**

#### **Homojenizat hazırlanması**

Elde edilen mesane doku örneklerinin bir bölümü tartılarak 1:9 (a/v) oranında % 1,15 KCl içeren 50 mM soğuk potasyum fosfat tamponu (pH 7,4) içinde homojenize edildi.

### 3.7.1 MDA ölçümü

Malondialdehit (MDA) ölçümü için, Draper ve Hadley'in yöntemi kullanıldı (123). Metodun prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu sonucu oluşan pembe renk absorbansının spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Malondialdehit ölçümünde kullanılan en yaygın test olan TBA testi yöntemi, Draper ve Hadley yönteminin bir modifikasyonu olup çift kaynatma esasına dayanır. Birinci ısıtmada bağlı olan MDA proteinlerin çöktürülmesiyle serbestleştirilirken, ikinci ısıtmada total MDA, TBA ile reaksiyona girer. Tiyobarbitürik asit -Malondialdehit kompleksinin oluşturduğu renkli bileşiğin absorbansı 532 nm'de ölçülerek MDA'nın molar ekstinsiyon katsayısından yararlanılarak konsantrasyonu hesaplanır. Bu yöntemde oluşabilecek hatalar ve etkileşimler en aza indirilmiştir.

**Gerekli Reaktifler:** % 10 Trikloroasetikasit (TCA) çözeltisi ve % 0.67'li Tiyobarbitürikasit (TBA) çözeltisi.

**Deneyin Yapılışı:** Kör ve numune olmak üzere iki deney tüpü hazırlandı. Her iki tüpe de 2.5 mL % 10 TCA konuldu. Numune tüpüne 0.5 mL homojenizat, kör tüpüne ise 0.5 mL distile su eklendi. Her iki tüpün ağzı sıkıca kapatılarak önceden 99 °C'ye kadar ısıtılmış su banyosu içinde 15 dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak akan su altında soğutuldu. Üç bin rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatandan 2'şer mL temiz tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 1 mL % 0.67'lik TBA eklendi ve aynı şekilde ağızları sıkıca kapatılarak 99 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler su altında soğutuldu. Homojenizat MDA konsantrasyonları, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1602 Japan) 532 nm'de köre karşı numunenin absorbans değerleri okunduktan sonra, MDA-TBA kompleksinin molar ekstinsiyon katsayısı ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı.

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / a \times b$$

$$c = [A / (1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}) \times (1 \text{ cm})] \times \text{dilüsyon faktörü}$$

$$c \text{ (nmol/mL)} = A \times 58,27$$

(A=absorbans, a=molar ekstinsiyon katsayısı, b= ışık yolu, c= konsantrasyon)

### 3.7.2 NO düzeyleri ölçümü

Vücutta endojen olarak üretilen NO'nın doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (124). Çünkü NO, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite daha sonra da nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenizat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebildiğinden Griess reaksiyonu ile ölçüm yönteminde bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenizat önce deproteinize edilip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonları Griess reaksiyonu ile ölçülür (125). Çalışmamızda total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile ölçüldü. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize homojenizat süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletilen daiminin (NNDA) diazotizasyon tepkimesi sonucu oluşan pembe rengin, 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi.

Gerekli reaktifler:  $\text{ZnSO}_4$  75 mmol/L, NaOH 55 mmol/L, kadmiyum granülleri, glisin-NaOH tamponu (pH 9.7), sülfanilamid, N-naftiletilen daimin (NNDA),  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi 5 mmol/L,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 mol/L ve standart solüsyon (0.1 mol/L,  $\text{NaNO}_2$ , 0.1 mol/L  $\text{KNO}_3$ ).

**Deneyin yapılışı:** Deproteinizasyon işlemi: 200  $\mu\text{L}$  numune + 800  $\mu\text{L}$  75 mmol/L  $\text{ZnSO}_4$  ile karıştırıldıktan sonra, 1 mL 55 mmol/L NaOH ilave edilip vortekslenir ve 3500 rpm de 15 dakika santrifüj edilir. Berrak süpernatant nitrat tayininde deproteinize numune olarak kullanılır.

**Nitrat Tayini:** Glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir. Üzerine 1 mL deproteinize numune ve 2 mL deiyonize su ilave edilir, tüplerin ağzı kapatılır. 90 dakika oda ısısında karanlık ortamda ara ara kadmiyumlu tüpler alt-üst edilerek inkübe edilir. Inkübasyon sonunda nitrit çalışma tablosunda numune veya standart olarak kullanılır.

**Tablo 2.** Nitrit çalışma şeması.

|                          | <b>Kör (mL)</b> | <b>Numune (mL)</b> | <b>Standart</b> |
|--------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Deproteinize homojenizat | -               | 2                  | 2               |
| Distile su               | 2.5             | 0.5                | 0.5             |
| Sulfanilamid             | 1               | 1                  | 1               |
| N-naftiletilen diamin    | 1               | 1                  | 1               |

Vortekslendikten sonra, 45 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir ve 545 nm’de köre karşı okunur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar (1, 5, 10, 20, 40, 100 µmol/L), numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve spektrofotometrik okumalardan elde edilen değerler ile standart garfik (Optik dansite-µmol/L) çizildi. Bu grafik kullanılarak oluşturulan eğim sabiti, elde edilen numune değerlerine tatbik edilerek NO miktarı, µmol/L olarak hesaplandı.

### **3.7.3. SOD enzimin aktivite tayini**

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesi; Sun ve arkadaşlarının (126) metodunda, Durak ve arkadaşlarının (127) yaptığı modifikasyona göre çalışıldı. Metod ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan O<sub>2</sub> ortamdaki NBT’yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm’de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme tepkimesi sonucu mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgemesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte, enzim bulunmayan (kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans (Abs) değerleri hesaba katılır.

#### **Hesaplama:**

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar, U/mL olarak ifade edilir.

#### **SOD aktivitesinin hesaplanması:**

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune (AN)}] / (\text{AK}) \times 100$$

% 50’lik inhibisyona 1 Ü denildiği için;

%50 inhibisyon = (% inhibisyon / 50) × 1 / 0.1 = U / mL = (AK-AN) / AK × 20 =  
Spesifik aktivite (SA) birimi: U/mL

**Gerekli reaktifler:** Ksantin 0.3 mmol/L, Na<sub>2</sub>EDTA 0.6 mmol/L, NBT 150 µmol/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400 mmol/L, bovin serum albumin (BSA) 1g/L, CuCl<sub>2</sub> 0.8 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) 2 M ve XO 167 U/L.

#### **Deneyin Yapılışı:**

**Tablo 3.** SOD çalışma şeması.

|                        | Kör (mL) | Numune (mL) |
|------------------------|----------|-------------|
| Ölçüm reaktifi         | 2.85     | 2.85        |
| Ekstrakt (Etanol fazı) | -        | 0.10        |
| Bidistile su           | 0.10     | -           |
| 167 U/L XO             | 0.05     | 0.05        |

25 °C’de 20 dakika inkübasyondan sonra hemen;

|                             |   |   |
|-----------------------------|---|---|
| 0.08 mM/L CuCl <sub>2</sub> | 1 | 1 |
|-----------------------------|---|---|

ilave edilerek reaksiyon durdurulur, distile suya karşı kör ve numuneler 560 nm’de okunur.

#### **3.7.4. MPO enziminin aktivite ölçümü**

MPO aktivite düzeylerini belirlemek için 4-aminoantpyrine %2 fenol solüsyonu kullanıldı. MPO aracılı oksidasyon için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı ve 510 nm’de absorbans değişikliği kaydedildi. 25°C’de 1 dakikada 1 mikromol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ’yi yıkan MPO düzeyi, 1u/g protein olarak belirlendi (129).

#### **3.7.5. Numunelerde protein tayini**

**Deneyin prensibi:** Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (128). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu

reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

**Kullanılan reaktifler:** CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>Sitrat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi.

**Deneyin yapılışı:** Standart grafiği çizmek için konsantrasyonunu bildiğimiz sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “Optik dansite (OD) – mg/ml protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

**Hesabı:** Protein (mg/ml) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0.5 ml)/numune hacmi (0.010ml) = 50

Not: Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği distile su hacmi ile ters orantılı olarak tüpe pipetlenir.

### 3.8. Deneylerde Kullanılan Aletler

1. Hassas terazi (Shimadzu AX200-Japonya)
2. Otomatik pipetler (Eppandörf-Almanya)
3. Vorteks (karıştırıcı) (Nüve NM 100-Türkiye)
4. Derin dondurucu (İndesit 6SF 2200-İtalya)
5. Homojenizatör (Heidolph Diax 900-Almanya)
6. UV spektrofotometre (Shimadzu UV 1602-Japonya)
7. Soğutmalı santrifüj (Hettich-D 78532-Almanya)

### 3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmanın analizi SPSS 13 istatistik programında yapıldı. Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edildi ve p değeri 0.05 ve daha küçük olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde parametrik bir test olan tek yönlü varyans analiz(ANOVA) ve postHoc test olarak da Least Significant Difference Test (LSD) kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi

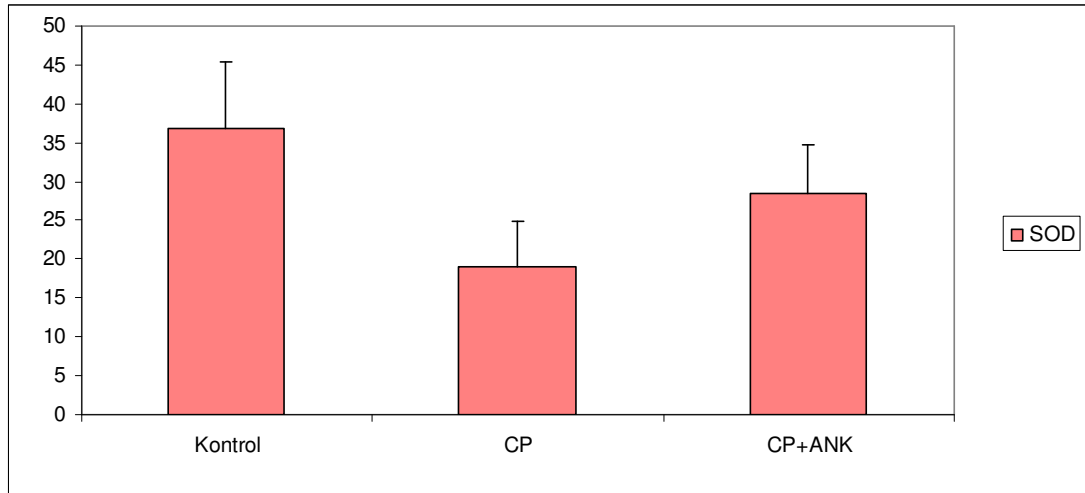
#### 4.1.1. Mesanede SOD aktivite düzeyleri

Tablo 4’de kontrol grubu, CP grubu ve CP+Ankaferd grubundaki SOD enzim aktivite düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar verilmiştir. Buna göre SOD aktivite düzeyleri en yüksek olarak kontrol grubunda bulundu ( $36.77 \pm 8.71$ ). Siklofosfamid alan grupta ( $19.14 \pm 5.74$ ) bu düzeylerin azaldığı ancak CP+Ankaferd grubunda ( $19.14 \pm 5.74$ ) CP grubuna göre arttığı gözlemlendi. Bu farkların gruplar arasında Oneway ANOVA’ya göre anlamlı olduğu bulundu.

**Tablo 4.** Mesane dokusunda SOD aktivite düzeyleri.

| Gruplar                                  | SOD (U/mg protein) |
|------------------------------------------|--------------------|
| Kontrol                                  | $36.77 \pm 8.71$   |
| Siklofosfamid                            | $19.14 \pm 5.74$   |
| Siklofosfamid + Ankaferd                 | $28.47 \pm 6.30$   |
| <b>P değerleri</b>                       |                    |
| Kontrol - Siklofosfamid                  | $p < 0.05$         |
| Kontrol - Siklofosfamid + Ankaferd       | $p < 0.05$         |
| Siklofosfamid - Siklofosfamid + Ankaferd | $p < 0.05$         |

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil 4.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunda SOD düzeyleri.

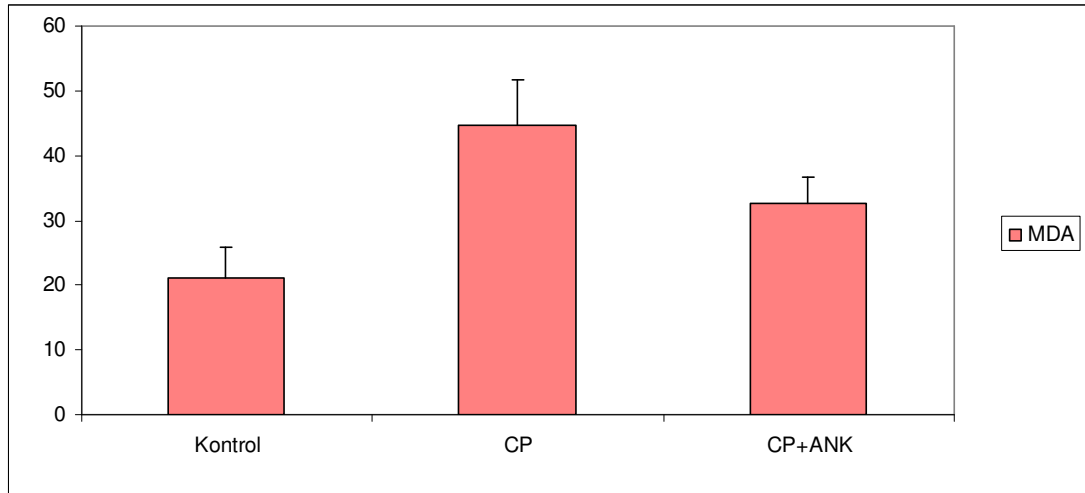
#### 4.1.2. Mesane dokusunda MDA düzeyleri

Tablo 5’de kontrol grubu, CP grubu ve CP+Ankaferd grubundaki MDA düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar verilmiştir. Buna göre MDA düzeyleri en düşük olarak kontrol grubunda bulundu ( $21.12 \pm 4.71$ ). Siklofosfamid uygulanan grupta bu düzeylerin anlamlı ölçüde arttırdığı gözlemlendi ( $44.57 \pm 7.26$ ). Siklofosfamidle beraber ankaferd alan grupta ise bu değerlerde ( $21.12 \pm 4.71$ ) CP alan gruba göre önemli ölçüde azalma gözlemlendi ve istatistiksel olarak da anlamlıydı.

**Tablo 5.** Mesane dokusunda MDA seviyeleri.

| Gruplar                                  | MDA (nmol/mg protein) |
|------------------------------------------|-----------------------|
| Kontrol                                  | $21.12 \pm 4.71$      |
| Siklofosfamid                            | $44.57 \pm 7.26$      |
| Siklofosfamid + Ankaferd                 | $32.74 \pm 4.01$      |
| P değerleri                              |                       |
| Kontrol - Siklofosfamid                  | $p < 0.05$            |
| Kontrol - Siklofosfamid + Ankaferd       | $p < 0.05$            |
| Siklofosfamid - Siklofosfamid + Ankaferd | $p < 0.05$            |

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil 5.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunda MDA düzeyleri.

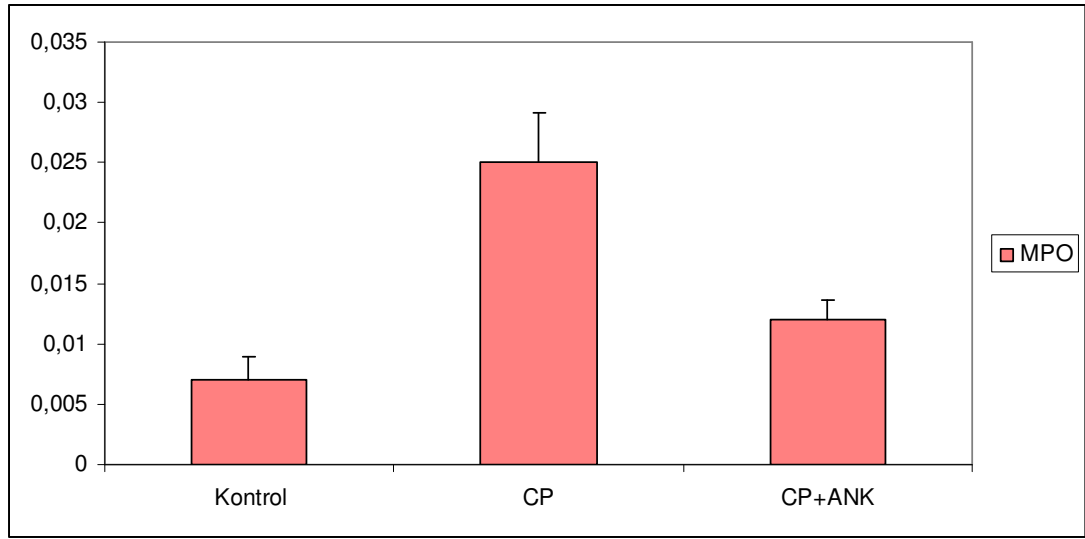
#### 4.1.3. Mesane dokusunda MPO aktivite düzeyleri

Tablo 6’da kontrol grubu, CP grubu ve CP+Ankaferd grubundaki MPO enzim düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar verilmiştir. Buna göre CP uygulanan grupta MPO enzim düzeyleri önemli ölçüde ( $0.025 \pm 0.0042$ ) yüksek bulundu. CP+Ankaferd uygulamasının ise MPO düzeylerini azalttığı gözlemlendi. Sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlılık mevcuttu.

**Tablo 6.** Mesane dokusunda MPO aktivite düzeyleri.

| Gruplar                                  | MPO ( u/g protein) |
|------------------------------------------|--------------------|
| Kontrol                                  | $0.007 \pm 0.0019$ |
| Siklofosfamid                            | $0.025 \pm 0.0042$ |
| Siklofosfamid + Ankaferd                 | $0.012 \pm 0.0016$ |
| P değerleri                              |                    |
| Kontrol - Siklofosfamid                  | $p < 0.05$         |
| Kontrol - Siklofosfamid + Ankaferd       | $p < 0.05$         |
| Siklofosfamid - Siklofosfamid + Ankaferd | $p < 0.05$         |

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil 6.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunda MPO düzeyleri.

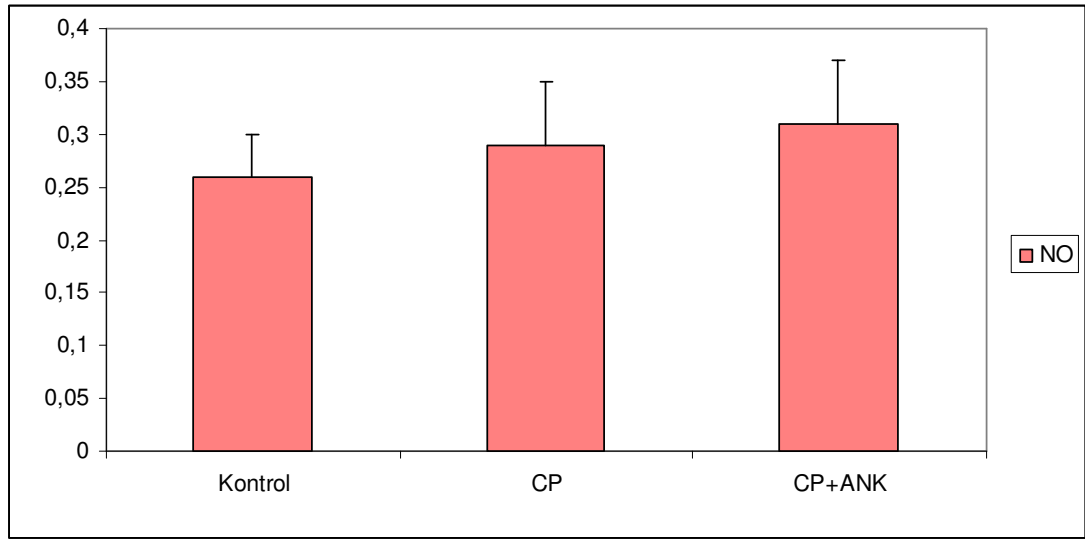
#### 4.1.4. Mesane dokusunda NO seviyeleri

Tablo 7’de kontrol grubu, CP grubu ve CP+Ankaferd grubundaki NO değerlerine ait istatistiksel sonuçlar verilmiştir. NO düzeyleri en yüksek CP+Ankaferd grubunda bulundu ( $0.312 \pm 0.0570$ ). Kontrol grubunda bu değerleri en düşük ( $0.255 \pm 0.042$ ) olduğu, CP grubunda ise kontrole göre artmış olduğu ( $0.293 \pm 0.056$ ) gözlemlendi. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

**Tablo 7.** Mesane dokusunda NO seviyeleri.

| Gruplar                                  | NO (umol/g protein) |
|------------------------------------------|---------------------|
| Kontrol                                  | $0.26 \pm 0.04$     |
| Siklofosfamid                            | $0.29 \pm 0.06$     |
| Siklofosfamid + Ankaferd                 | $0.31 \pm 0.06$     |
| <b>P değerleri</b>                       |                     |
| Kontrol - Siklofosfamid                  | AD                  |
| Kontrol - Siklofosfamid + Ankaferd       | AD                  |
| Siklofosfamid - Siklofosfamid + Ankaferd | AD                  |

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. AD: anlamlı değil.



Şekil 7. Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunda NO düzeyleri.

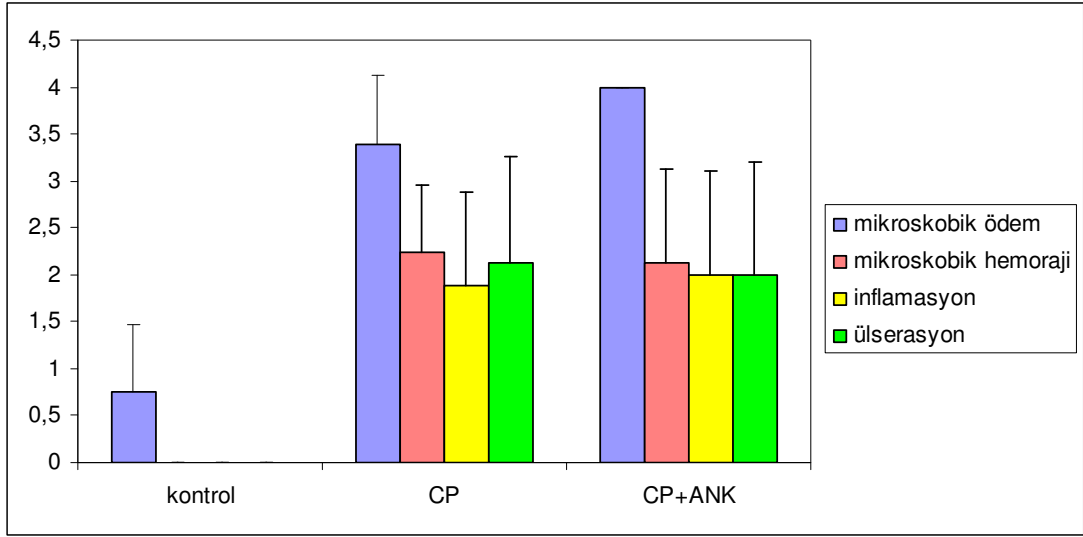
#### 4.2. Mesane Dokusunun Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

Mikroskobik ödem en düşük olarak kontrol grubunda gözlemlendi. Ancak bu gruba ait hemoraji, inflamasyon ve ülserasyona rastlanmadı. Siklofosfamid ve CP+Ankaferd alan grup arasında da hemoraji, inflamasyon ve mukozal ülserasyon açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak CP+Ankaferd alan grupta ( $4.0 \pm 0.0$ ) CP alan gruba göre ( $3.38 \pm 0.74$ ) daha belirgin ödem artışı mevcuttu ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

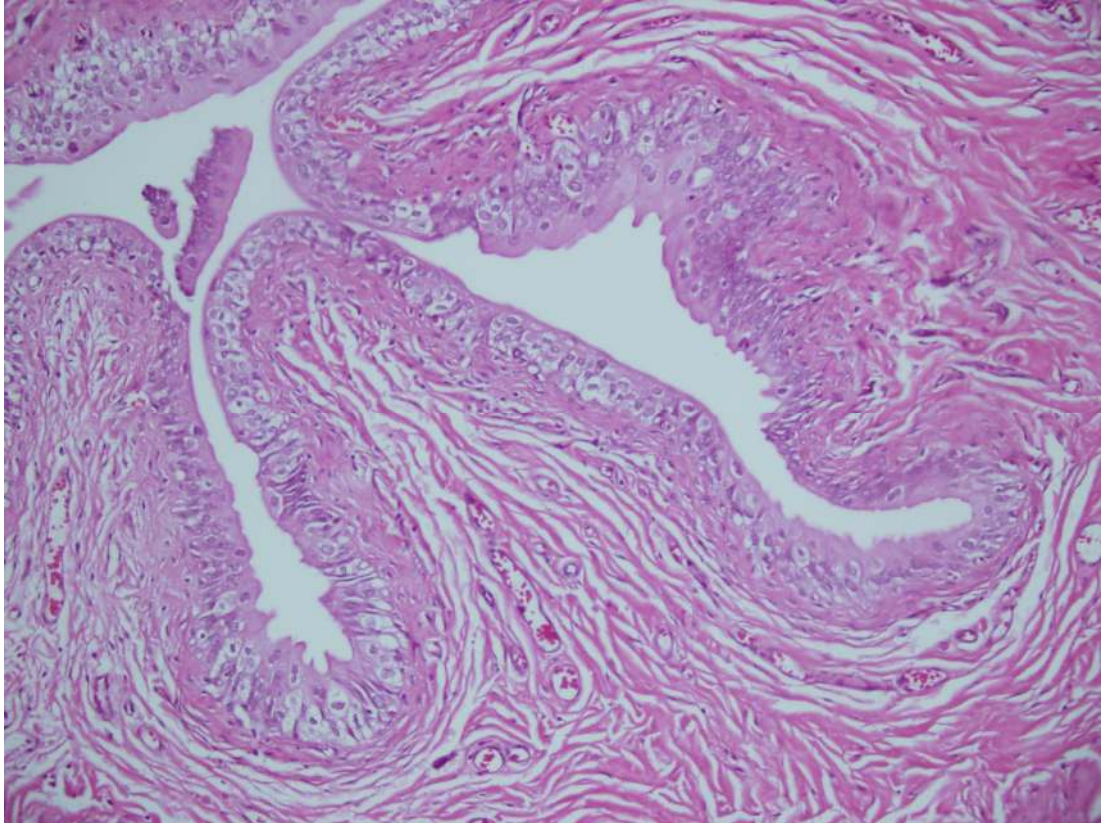
**Tablo 8.** Mesane dokusunda ödem, hemoraji, inflamasyon ve mukozal ülserasyon.

| Gruplar                | Ödem            | Hemoraji         | İnflamasyon    | Mukozal ülserasyon |
|------------------------|-----------------|------------------|----------------|--------------------|
| Kontrol                | $0.75 \pm 0.71$ | $0.0 \pm 0.0$    | $0.0 \pm 0.0$  | $0.0 \pm 0.0$      |
| CP                     | $3.38 \pm 0.74$ | $2.250 \pm 0.7$  | $1.88 \pm 1.0$ | $2.13 \pm 1.13$    |
| CP + Ankaferd          | $4.0 \pm 0.0$   | $2.125 \pm 0.99$ | $2.0 \pm 1.1$  | $2.0 \pm 1.20$     |
| P değerleri            |                 |                  |                |                    |
| Kontrol – CP           | $p < 0.05$      | $p < 0.05$       | $p < 0.05$     | $p < 0.05$         |
| Kontrol – CP +Ankaferd | $p < 0.05$      | $p < 0.05$       | $p < 0.05$     | $p < 0.05$         |
| CP – CP + Ankaferd     | $p < 0.05$      | AD               | AD             | AD                 |

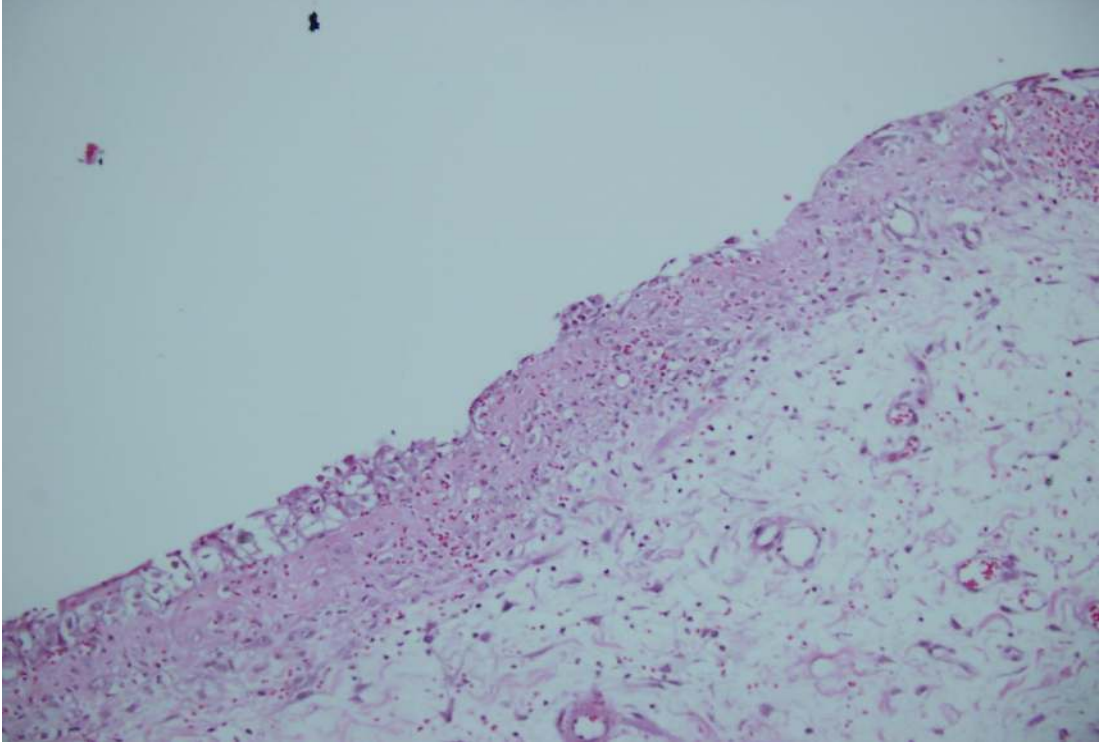
Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. AD=anlamlı değil.



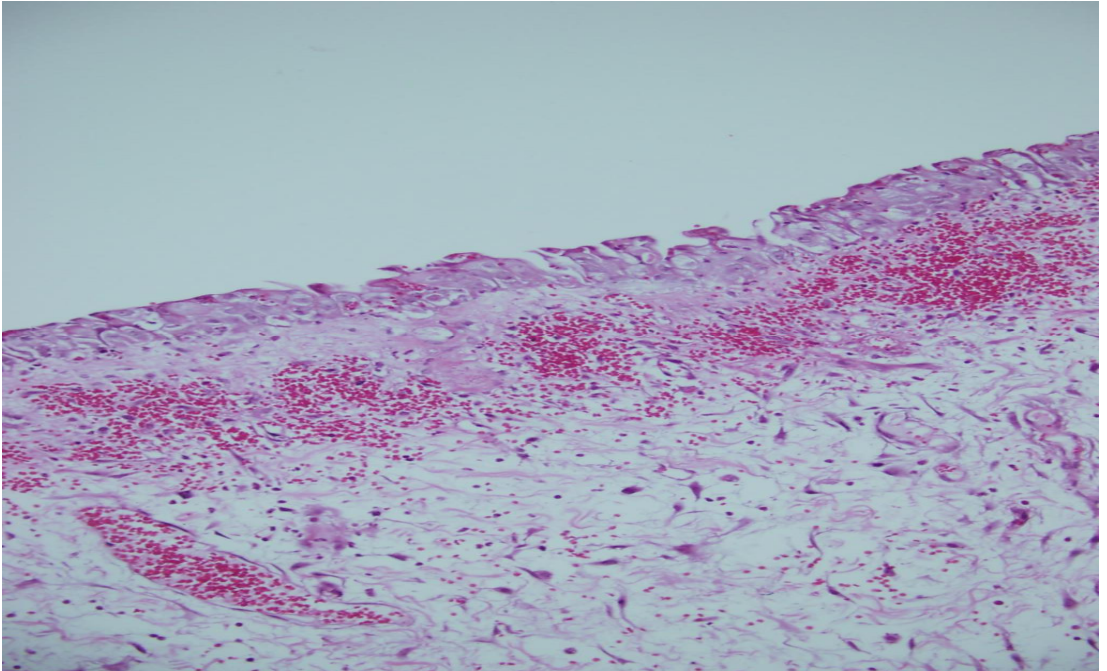
**Şekil 8.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubunun mesane dokularının histopatolojik incelenmesine ait mikroskopik ödem, mikroskopik kanama, inflamasyon ve ülserasyon değerleri.



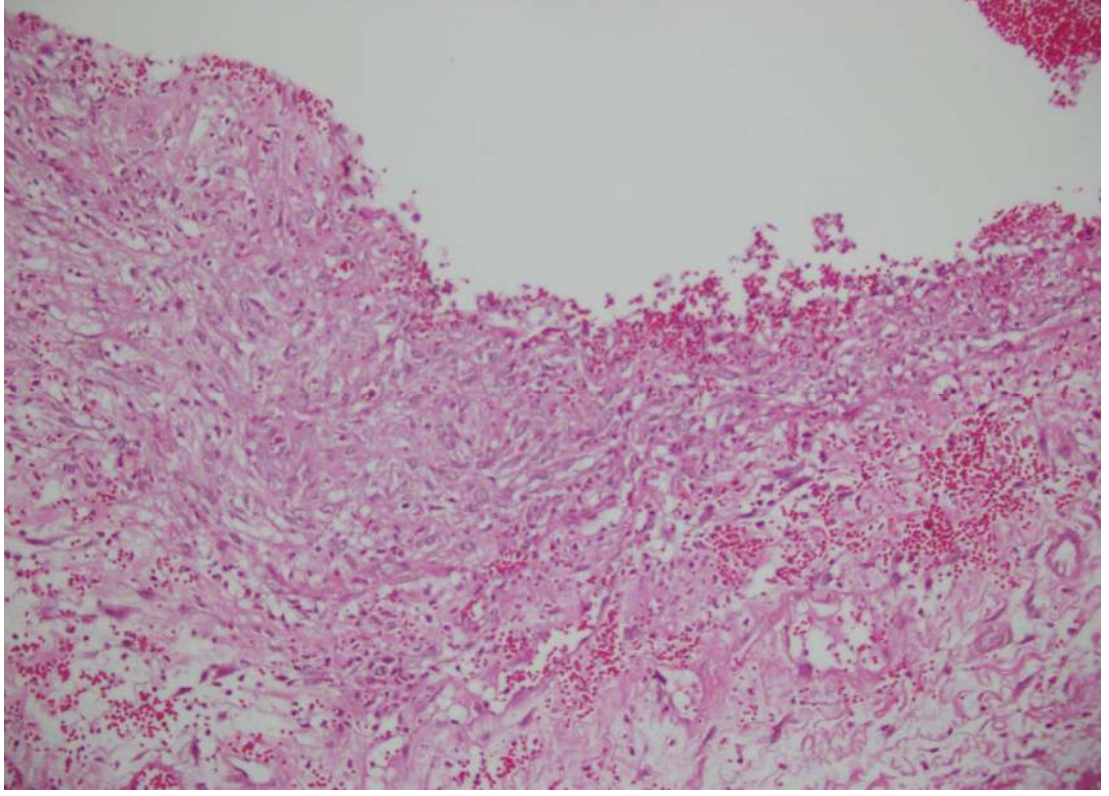
**Şekil 9.** Kontrol grubu; normal sınırlarda ürotelyal epitelyum ile örtülü mesane mukozası (HEX200).



**Şekil 10.** Siklofosfamid grubu; yüzeyde ülserasyon, ülser alanı tabanında fibrin varlığı ve fibrozis, dağınık halde hafif ekstravaze eritrositler, belirgin ödem (HEX200).



**Şekil 11.** Siklofosfamid grubu; yüzeyde ülserasyon, ülser alanı tabanında fibrin varlığı ve fibrozis, dağınık halde hafif ekstravaze eritrositler, belirgin ödem (HEX200).



**Şekil 12.** Siklofosfamid+Ankaferd grubu; yüzey epitelinde dökülme, yüzeyde ve submukozal alanda taze kanama alanları (HEX200).

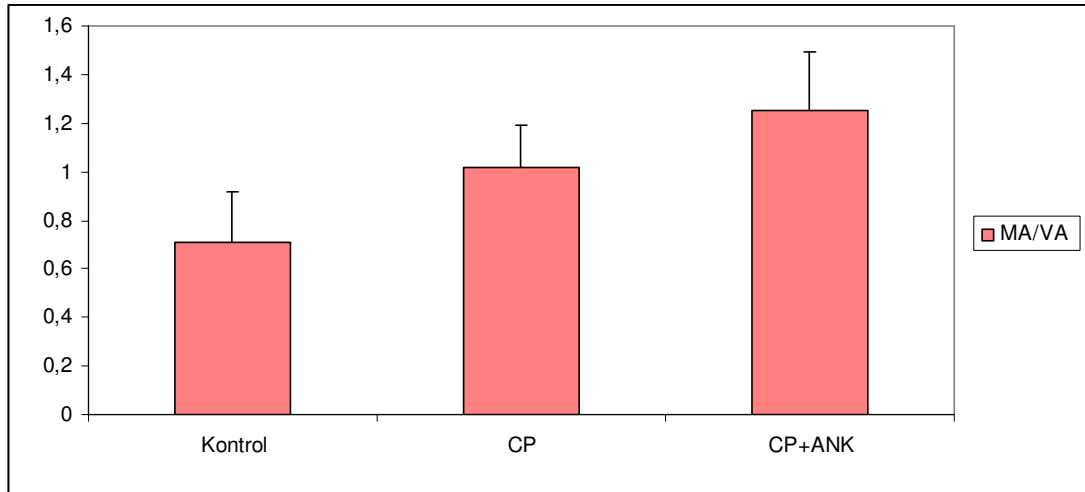
#### **4.3. Vücut Ağırlığı/Mesane Ağırlığı Oranı Değerlendirilmesi**

Hayvanların, deney öncesi gruplama yapmak amacıyla ağırlıkları ölçüldü. Üçüncü gün deneyin sonlandırılmasıyla beraber mesaneler çıkarıldı ve mesane masajı yapılarak rezidü idrar boşaltıldıktan sonra da mesane ağırlıkları tartıldı. Mesane ödemi gözlenen hayvanlarda mesane ağırlığının tüm vücut ağırlığına oranı kontrol grubuyla kıyaslandığında artmış olarak bulundu. Siklofosfamid alan grupta ( $1.02 \pm 0.17$ ) kontrol grubuna göre ( $0.71 \pm 0.21$ ) yaklaşık birbuçuk kat anlamlı bir artış gözlemlendi. CP+Ankaferd alan grupta da ( $0.3 \pm 0.06$ ) bu oran yalnız Siklofosfamid alan gruba göre yine anlamlı olarak yüksek bulundu.

**Tablo 9.** Vücut ağırlığı (VA), mesane ağırlığı (MA) ve VA/MA oranları.

| Gruplar                                 | MA/VA g/mg  |
|-----------------------------------------|-------------|
| Kontrol                                 | 0.71 ± 0.21 |
| Siklofosfamid                           | 1.02 ± 0.17 |
| Siklofosfamid + Ankaferd                | 1.25 ± 0.24 |
| <b>P değerleri</b>                      |             |
| Kontrol - Siklofosfamid                 | p<0.05      |
| Kontrol – Siklofosfamid + Ankaferd      | p<0.05      |
| Siklofosfamid - Siklofosfamid +Ankaferd | p<0.05      |

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil 13.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunun tüm vücut ağırlığına oranları.

#### 4.4. Mesane Dokusunun Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi;

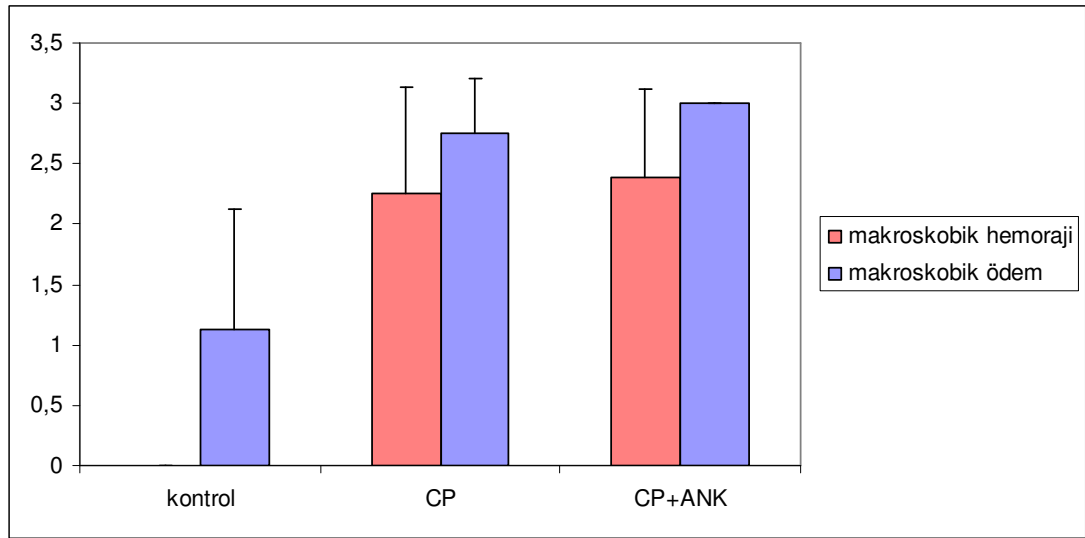
Makroskopik kanama ve makroskopik ödem en düşük olarak kontrol grubunda bulundu. Yalnızca siklofosfamid alan grupta hem makroskopik kanama hem makroskopik ödem kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu.

Siklofosfamid ve Ankaferd alan grupta da bu değerler yalnızca siklofosfamid alan gruba göre yüksek bulunsu da anlamlı değildi.

**Tablo 10.** Mesane dokusunda makroskopik kanama ve makroskopik ödem.

| Gruplar                 | Makroskopik hemoraji | Makroskopik ödem |
|-------------------------|----------------------|------------------|
| Kontrol                 | 0.0 ± 0.0            | 1.13 ± 0.99      |
| Siklofosfamid           | 2.25 ± 0.89          | 2.75 ± 0.46      |
| Siklofosfamid+Ankaferd  | 2.38 ± 0.74          | 3.00 ± 0.0       |
| <b>P değerleri</b>      |                      |                  |
| Kontrol - Siklofosfamid | p<0.05               | p<0.05           |
| Kontrol - CP+Ankaferd   | p<0.05               | p<0.05           |
| CP – CP+Ankaferd        | AD                   | AD               |

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. AD: anlamlı değil.



**Şekil 14.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait mesane dokusunda makroskopik ödem ve makroskopik hemoraji değerleri.

#### 4.5. Hematürinin Değerlendirilmesi

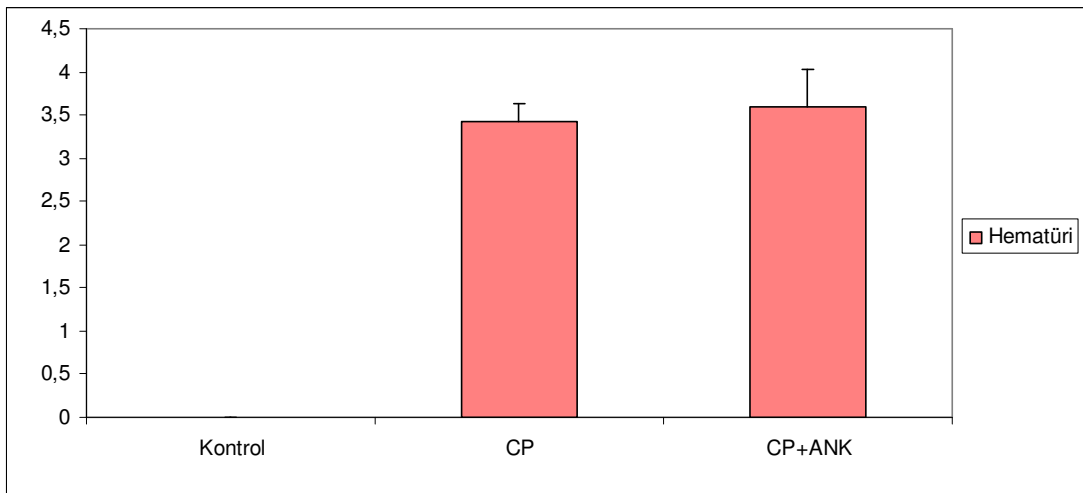
Tüm gruplara ait denekler çalışma boyunca hergün 2 defa hematüri yönünden incelenmiştir. Kontrol grubunun deney hayvanlarına ait hiçbir ölçümde hematüriye rastlanmamıştır. Tek doz siklofosfamid alan grupta, ilaç uygulamasını takiben 4 saat

sonra yapılan ölçümlerde hematüri gözlenmeye başlamıştır ( $3.43 \pm 0.2$ ) ve deney sonlandırılana dek devam etmiştir. Tek doz siklofosfamidten bir saat evvel ankaferd uygulanan grupta da siklofosfamid uygulamasını takiben 3. saate dipstick ile yapılan ölçümde eser miktarda hematüri gözlenmeye başlanmıştır. Ancak yine sonraki ankaferd uygulamalarını takiben yapılan ölçümlerde hematüri düzeylerinde azalma gözlenmemiştir. Tüm ölçümler göz önünde bulundurulduğunda ise; CP+Ankaferd alan grupta hematüri düzeyleri ( $3.6 \pm 0.43$ ) sadece Siklofosfamid alan gruba göre ( $3.43 \pm 0.2$ ) yüksek bulunsada istatistiksel olarak anlamlı değildi.

**Tablo 11.** Dipstick ile ölçülen hematüri düzeyleri.

| Gruplar                              | Hematüri       |
|--------------------------------------|----------------|
| Kontrol                              | $0.0 \pm 0.0$  |
| Siklofosfamid                        | $3.43 \pm 0.2$ |
| Siklofosfamid+Ankaferd               | $3.6 \pm 0.43$ |
| P değerleri                          |                |
| Kontrol - Siklofosfamid              | $p < 0.05$     |
| Kontrol – Siklofosfamid+Ankaferd     | $p < 0.05$     |
| Siklofosfamid-Siklofosfamid+Ankaferd | AD             |

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. AD: anlamlı değil.



**Şekil 15.** Kontrol, Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ankaferd grubuna ait hematüri düzeyleri.

## 5. TARTIŞMA

Yaptığımız literatür taramasında ankaferdin hemarajik sistit üzerine olan etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada mesane dokusunda oluşturulan bir kesi üzerine ankaferdin 2ml'lik bir enjektör içinde damla damla kanama durana dek uygulanması sonucu kanama zamanının kontrol grubuna göre yarı yarıya kısaldığı gösterilmiştir (130). Siklofosfamid ile oluşturulan hemorajik sistit modelinde literatürde bildirilen siklofosfamid dozu 100-200 mg/kg'dır. Biz de en sık kullanılan doz olan 100 mg/kg'ı tercih ettik. Ankaferd Blood Stopper, siklofosfamid uygulamasından 1 saat evvel ve uygulamayı takiben her 12 saate bir 0,5 cc/kg olarak 3 gün süreyle üretral bir kateter vasıtasıyla uygulandı. Yetmiş ikinci saat sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

Ankaferd içindeki üzüm çekirdeği ekstresindeki PCO'nun antioksidan etkisinin vitamin C ve vitamin E süksinat ile karşılaştırıldığında daha potent olduğu görülmüştür (114). Araştırmacılar, çift-kör, plasebo kontrollü bir çalışmada 20 genç gönüllü üzerinde PCO PhytosomeR'un antioksidan etkilerini değerlendirmişlerdir. Phytosome yöntemi, iki kısım fosfatidilkolin ile bir kısım üzüm çekirdeği PCO ekstresinin bir araya gelmesidir. Ortaya çıkan sonuç, merkezdeki PCO molekülünün iki fosfatidilkolin molekülü ile kaplandığı tamamen yeni bir moleküldür. Deneklere, 5 gün boyunca, 300 mg PCO Phytosome içeren 2 kapsül veya plasebo verilmiştir. C ve E vitamini seviyelerinin de bakıldığı antioksidan aktivite tayini için çalışmanın başında ve sonunda deneklerden kan alınmıştır. En az 2 haftalık dinlenme periyodundan sonra denekler diğer gruba çaprazlanmıştır. Proantosiyanidin Phytosome'un serum C ve E vitamini seviyeleri üzerine etkisi olmazken, serum total antioksidan aktivitesini (TAC) oldukça artırmıştır. Beşinci günde dozdan 1 saat sonra TAC 408'den 453  $\beta$ mol/l trolox eşitliğine artmıştır (119).

Bir tek elektronun transfer yoluyla oksijene verilip indirgenmesi ile O<sub>2</sub>- oluşmaktadır. Süperoksit dismütaz enzimi ise O<sub>2</sub>- serbest radikalının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> dönüşümünü katalizleyen bir metalloenzimdir. Ortamda O<sub>2</sub>- radikalının artması SOD enzim aktivitesini dolaylı olarak arttırmaktadır (131). Çalışmamızda CP verilerek HS oluşturulan grupta SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma

mevcuttu. Siklofosfamid ile beraber ankaferd alan grupta ise sadece siklofosfamid alan gruba göre SOD aktivite düzeylerinde artış gözlemlendi ve yine istatistiksel olarak anlamlıydı. Yalnızca siklofosfamid alan grupta SOD enzim aktivite düzeylerindeki azalma savunma esnasındaki harcanmaya bağlı olabilir. Siklofosfamid ile beraber ankaferd alan grupta yalnızca siklofosfamid alan gruba göre SOD enzim aktivite düzeylerindeki artış ise ankaferd içindeki üzüm çekirdeğinin antioksidan enzim kapasitesinde sebep olduğu artışa bağlı olabilir.

Oksidatif stres dokuda serbest oksijen radikali artışıyla sonuçlanır. Artan SOR düzeyleri membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu organizmada moleküler hasarlara sebep olarak önemli hücresel yapıları ve fonksiyonları etkiler. Serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu lipid peroksidasyonunun son ürünleri MDA ve 4-hidroksi nonenal'dir. Malondialdehit ise lipid peroksidasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (132). Serbest oksijen radikali üretiminin artması dokuda MDA birikimine neden olur. Ankaferd içindeki üzüm çekirdeği ekstresindeki PCO, fosfatidilkolin lipozomlarının peroksidasyonunu inhibe etmektedir (115). Bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresi serbest radikalleri tutmuş ve oluşumlarını durdurmuş, özellikle lipid peroksidasyonunu geciktirmiş ve bağ dokusu yapısını indirgeyebilen enzimlerin yıkıcı etkisini inhibe etmiştir. Diğer bir in vitro çalışmada, üzüm çekirdeği PCO'ların, UV-C ışınları aracılığı ile oluşan çoklu-doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (117). Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi (GSPE) ile beslenmiş farelerde, reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, karaciğer ve beyin dokusunda DNA parçalanması ve lipid peroksidasyonunu indükleyen 12-Otetradekanoilforbol-13-asetatı (TPA) azalmıştır. Yapılan çalışmalarda siklofosfamid ile indüklenen hemorajik sistit modelinde melatonin, alfatokoferol ve beta karoten uygulamasının dokularda MDA seviyesini azalttığını göstermişlerdir (124, 132). Bizim çalışmamızda da beklenildiği gibi CP alan grupta MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksekti. Siklofosfamid ve ankaferd alan grupta ise MDA seviyesinde belirgin bir azalma vardı ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

Ankaferd içindeki üzüm çekirdeği ekstresindeki PCO, serbest oksijen radikalleri üzerinde konsantrasyon bağımlı inhibisyon yapmaktadır(114). Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi, doz çalışmalarında, vitamin C, vitamin E süksinat veya bu vitaminlerin kombinasyonu ve beta-karotenden daha iyi bir serbest radikal süpürücüsü ve oksidatif doku hasarının inhibitörüdür (118).

Alfieri ve arkadaşları da CP verilen ratların mesane dokusundaki epitelyal hasarlanma, aşırı lökosit birikimi, ödem, vasküler konjesyon ve plazma protein ekstravazasyonu gibi HS bulgularından özellikle iNOS ve onun ürettiği NO'nun sorumlu olduğunu göstermişlerdir (133). Serbest oksijen radikalleri, nötrofil aktivasyonu ile birlikte lipid peroksidasyonuna ve epitelyal hasara yol açarlar. Aktive olan nötrofiller fazla miktarda oksijen tüketimine ve hücre membranındaki Nikotinamid adenindinükleotid fosfat (NADP) enziminin katalizörlüğündeki bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonların oluşumuna yol açar. Myeloperoksidaz enzimi, dokularda polimorfonükleer lökositlere spesifik bir enzimdir. Doku lökosit düzeyini göstermede yol göstericidir (134). Bizim çalışmamızda da siklofosfamid alan grupta MPO düzeyleri beklendiği gibi anlamlı olarak yükseldi. Siklofosfamid ile birlikte ankaferd alan grupta da yalnızca siklofosfamid alan gruba göre anlamlı olarak düşük gözlemlendi. Bu düşüş ankaferd içindeki üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresinin serbest radikalleri süpürücü ve oksidatif doku hasarı inhibisyonu yapıcı etkisine bağlı olabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda artmış NO seviyelerinin siklofosfamidin mesaneye olan zararlı etkilerinden sorumlu olan en önemli mediatör olduğu bildirilmiştir (12). Bununla birlikte Siklofosfamidin indüklediği hemorajik sistit patogenezinin IL-1 beta, TNF-alfa, PAF gibi inflamatuvar mediatörlerin aracılık ettiğini göstermiştir (7,28). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada da iNOS enziminin artmış olduğu CP'ye bağlı HS'de ratlara anti- TNF-alfa serumu verilmesinin mesane ödemi azalttığı ve bunun da NOS enziminin indüklenebilmesi için inflamasyonlu mesanenin TNF-alfa ve PAF gibi mediatörlere gereksinim duyduğunu göstermiştir (135). Alfieri ve arkadaşları da CP verilen ratların mesane dokusundaki ödem, epitel hasarı, yüksek oranda lökosit birikimi, , vasküler konjesyon ve plazma proteinlerinin ekstravazasyonu gibi HS bulgularından özellikle iNOS'un ve onun ürettiği NO'nun sorumlu olduğunu göstermişlerdir (136). Son zamanlarda çeşitli NOS inhibitörleri

kullanılarak NOS enziminin bloke edildiği deneysel HS modellerinde CP'ye bağılı hasarlanmanın histopatolojik olarak belirgin azaltıldığı gösterilmiştir (29, 136). Bizim çalışmamızda da Siklofosfamid alan grupta NO seviyeleri anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu. Siklofosfamidle beraber ankaferd alan grupta sadece Siklofosfamid alan gruba göre yüksek çıkmakla beraber anlamlı değildi. Bu çalışmada ankaferd uygulamasının NO düzeyleri üzerinde etkinliği bulunamadı.

Ankaferd ile normal steril gazlı bez, cilt, cilt altı kesilerinde meydana gelen kanamanın kontrolü üzerine etkileri arasında fark olup olmadığının araştırılması için yapılan bir çalışmada ABS kullanılan hastalarda kanamanın daha kısa sürede durdurulduğu ve daha az oranda tekrarladığı ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı çıktığı bildirilmiştir (84). Böbrek yetmezliği, disemine intravasküler koagülasyon, ilaç kullanımı ve kalıtsal kanama diyatezli olguların yüzeysel kanamalarında ve hepatik yetmezlik ve hipersplenizme bağılı edinsel kanama diyatezlerinde de ABS kullanımıyla ilgili kritik kanamalara ait topikal kontrole ilişkin olgu çalışmaları da bildirilmiştir (92, 92). ABS uygulamasıyla ilgili bir başka olguda Üst gastrointestinal sistem kanaması olan bir hastaya endoskopik biyopsi bölgesine topikal ABS uygulamasında ani kanama kontrolünde etkili olduğu bildirilmektedir (96). Lokal kanaması olan kırım Kongo kanamalı ateşi hastalarında da, ABS'in hemostaz üzerine etkinliği ve yan etkileri araştırılmış, epistaksis, diş eti ve hemoroid kanamaları ile intravenöz enjeksiyon bölgesindeki cilt kanamalarında lokal kullanımıyla kanamayı kontrol altına aldığı, sistemik yan etki, ilacı tolere edememe ve irritasyon, ödem, kızarıklık kaşıntı, döküntü benzeri lokal yan etkilerin görülmediği bildirilmiştir (100). Bizim yaptığımız çalışmada hayvanları hematüri yönünden takip için deney süresince günde 2 kez dipstick ile ölçümler yapıldı. Kontrol gruplarında herhangi bir kanama yoktu. Siklofosfamid alan grupta hematüri gözlemlendi. Ancak siklofosfamid ile beraber ankaferd alan grupta sadece siklofosfamid alan gruba göre hematüri yönünden anlamlı bir fark bulunmadı. Mesanenin histopatolojisi değerlendirildiğinde ise; kontrol grubunda, hemoraji, inflamasyon ya da mukozal ülserasyon saptanmadı ancak ödem geliştiği görüldü. Yalnızca siklofosfamid alan grupta ödem, hemoraji, inflamasyon ve ülserasyon gözlemlendi. Siklofosfamid ve ankaferd alan grupta da histopatolojik olarak yalnızca

siklofosfamid alan gruba göre, daha yüksek oranda ödem bulunsa da hemoraji, inflamasyon ve mukozal ülserasyon açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu sonuçlarla korele olarak da mesane ödemi belirteci olan, mesane ağırlığının tüm vücut ağırlığına oranı siklofosfamid ile ankaferd alan grupta sadece siklofosfamid alan gruba göre yine anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Mesanenin makroskopik incelenmesinde ise kontrol grubunda kanamaya rastlanmadı ancak ödem mevcuttu. Yalnızca siklofosfamid alan grupta ise ödem ve kanama anlamlı olarak artmış bulundu. siklofosfamid ve ankaferd alan grupta ise bu değerler siklofosfamid alan gruba göre artmış olarak bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol gruplarının mesanesinde ödem olması hayvanların sakrifiye edilmesi sırasında ya da sonrasında mesane üzerinde oluşan travmadan kaynaklanıyor olabilir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda ankaferd tedavisinin SOD enziminin aktivite düzeylerini arttırmasının, MPO aktivite düzeylerini azaltmasının, MDA seviyelerini düşürmesinin ankaferdin hemorajik sistitteki antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ancak NO seviyeleri ve histopatolojik hasara karşı yetersiz kalması, deneysel H.S’de ankaferd ilk kez kullanılmış olduğu için henüz standart bir ankaferd dozu bulunmaması ve deneysel HS’de ankaferdin hangi sürede verileceğinin tam olarak bilinmemesi olabilir. Bununla birlikte çalışma ankaferdin sadece akut dönemdeki etkilerine yöneliktir ve uzun vadede ilacın etkinliği bilinmemektedir. Klinik ve histopatolojik iyileşme sağlanabilmesi için ise ankaferdin hangi dozda ve hangi sürede verileceğine ve uzun vadedeki etkilerine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Del Pizzo JJ, Chew BH, Jacobs SC, Sklar GN. Treatment of radiation induced hemorrhagic cystitis with hyperbaric oxygen: long-term followup. *JUrol*. 1998; 160(3 Pt 1): 731-733.
2. West NJ. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. *Pharmacotherapy* 1997; 17(4):696–706.
3. Stillwell TJ & Benson RC (1988). Cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis - A review of 100 patients. *Cancer*, 61: 451-457.
4. Philips FS, Sternberg SS, Cronin AP & Vidal PM. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. *Cancer Research*. 1961; 21: 1577-1589.
5. Brock N, Pohl J, Stekar J. Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. 1. Experimental studies on the urotoxicity of alkylating compounds. *Eur J Cancer*. 1981; 17:595-607.
6. Katz A, Epelman S, Anelli A, Gorender EF, Cruz SM, Oliveira RM, et al. A prospective randomized evaluation of three schedules of mesna administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995; 121:128-131.
7. Souza-Filho MVP, Lima MVA, Pompeu MML, Ballejo G, Cunha FQ & Ribeiro RA. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *American Journal of Pathology*. 1997; 150: 247-256.
8. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 1996; 6:79.
9. Göker H, Haznederoğlu I, Erçetin S, Kirazlı S, Akman U, Öztürk Y, Erat H. Haemostatic Actions of the Folkloric Medicinal Plant Extract Ankaferd Blood Stopper. *The Journal of international Medical Research*. 2008; 36:163-170.
10. 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.

11. Healthcare T. *Thymus vulgaris*. PDR for Herbal Medicines. 4. Baskı. Thomson, NJ. 2007:846-847.
12. Gray KJ, Engelmann UH, Johnson EH, Fishman IJ. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy. *J Urol*. 1986; 136(2):497–500.
13. Levine LA, Richie JP. Urological complications of cyclophosphamide. *J Urol*. 1989; 141(5):1063–1069.
14. Etlik O, Tomur A, Deveci S, Piskin I & Pekcan M. Comparison of the uroprotective efficacy of Mesna and HBO treatments in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *J Urol*. 1997; 158: 2296-2299.
15. De Vries CR, Freiha FS. Hemorrhagic cystitis: a review. *J Urol*. Jan 1990; 143(1):1-9.
16. Corman JM, McClure D, Pritchett R, Kozlowski P, Hampson NB. Treatment of radiation induced hemorrhagic cystitis with hyperbaric oxygen. *J Urol*. 2003; 169(6):2200-2.
17. Barouch DH, Faquin WC, Chen Y, Koralnik IJ, Davis BT. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in a Human Immunodeficiency Virus-infected patient. *Clin Infect Dis*. 2002; 1;35(3):326-9.
18. Lee HJ, Pyo JW, Choi EH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y, Kasel JA, Piedra PA. Isolation of adenovirus type 7 from the urine of children with acute hemorrhagic cystitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1996; 15(7):633-4.
19. Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *CID*. 2002; 35: 1081-1087.
20. Replogue M.D., Storch G.A., Clifford D.A. BK virus: A clinical review. *CID*. 2002; 33:191-202, 2001.
21. Fishman JA. BK Virus nephropathy – Polyomavirus adding insult to injury. *N. Eng. J. Med*. 2002; 347(7): 527-530.
22. Youn T, Trachtman H, Gauthier B. Clinical spectrum of gross hematuria in pediatric patients. *Clin Pediatr (Phila)*. 2006; 45(2):135-41.
23. Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis - identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol*. 1979; 28: 2045-2049.

24. West NJ. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. *Pharmacotherapy* 1997; 17(4):696–706.
25. Assreuy AM, Martins GJ, Moreira M, Brito GA, Cavada BS, Ribeiro RA, Flores CA. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol.* 1999; 161(6):1988-93.
26. Soysal T. Hemorajik Sistit. Türk hematoloji derneği kan ve kemik iliği transplantasyon kursu.192-194.
27. Gomes TNA, Santos CC, Souza-Filho MVP, Cunha FQ & Ribeiro RA. Participation of TNF- $\alpha$  and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1995; 28:1103-1108.
28. Ribeiro RA, Freitas HC, Campos MC, Santos CC, Figueiredo FC, Brito GA, Cunha FQ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol.* 2002; 167:2229-34.
29. Oter S, Korkmaz A, Oztas E, Yıldırım I, Topal T, Bilgic H. Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *Urol Res.* 2004; 32: 185-189.
30. Pratic`o D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* 2005; 181(2):215-24.
31. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991; 42(4): 569 – 605.
32. Virag L, Szabo E, Gergely P. and Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003; 140:113.
33. Beckman, J.S. and Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271: 14-24.
34. Katz A, Epelman S, Anelli A, Gorender EF, Cruz SM, Oliveira RM, et al. A prospective randomized evaluation of three schedules of mesna administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 128-131.

35. Elias AD, Eder JP, Shea T, Begg CB, Frei E III, Antman KH. Highdose ifosfamide with mesna uroprotection: a phase I study. *J Clin Oncol* 1990; 8: 170-178.
36. Scheulen ME, Niederle N, Bremer K, Schutte J, Seeber S. Efficacy of ifosfamide in refractory malignant diseases and uroprotection by mesna: results of a clinical phase II-study with 151 patients. *Cancer Treat Rev* 1983; 10 (Suppl A): 93-101.
37. Gressier B, Lebegue N, Brunet C, Luyckx M, Dine T, Cazin M, Cazin JC. Scavenging of reactive oxygen species by letosteine, a molecule with two blocked-SH groups. Comparison with free-SH drugs. *Pharm World Sci* 1995 26; 17(3): 76–80.
38. Brock N, Pohl J. The development of mesna for regional detoxification. *Cancer Treat Rev* 1983; 10 (Suppl A): 33-43.
39. Korkmaz A, Oter S, Deveci S, Ozgurtas T, Topal T, Sadir S, Bilgic H. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Urol* 2003; 170:2498–2502.
40. Uysal E. Ratlarda Siklofosfamid ile indüklenen hemorajik sistitte Kafeik Asit Fenetil Ester'in koruyucu etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Isparta 2009.
41. Skinner R, Sharkey IM, Pearson AD, Craft AW. Ifosfamide, mesna and nephrotoxicity in children. *J Clin Oncol*. 1993;11(1): 173–190.
42. Shaw IC, Graham MI, Jones MS. The fate of [14C]-mesna in the rat. *Arzneimittelforschung*. 1986; 36(3): 487–489.
43. Reinhold-KE, Mohr J, Christophers E, Nordmann K, Gross WL. Mesna Side Effect Which Imitate. *Clin Investig*. 1992 Aug; 70(8):698-704.
44. Güneş D, Uysal K.M. Yüksek doz kemoterapi ve hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanan çocuklarda hemorajik sistit. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2007; 17(2):118-128.
45. Vajragupta O, Boonchoong P, Berliner LJ. Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide

- dismutase activity and stability towards hydrolysis. *Free Radic Res.* 2004; 38:303–14.
46. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med.* 1999; 27(6):1100-4.
  47. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods.* 1987; 18(2):137-42.
  48. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res.* 1995; 339:73–89.
  49. Giles GI, Jacob C. Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biol Chem.* 2002; 383:375–388.
  50. Lü J.M, Lin P.H, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(4):840–860.
  51. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 2003; 21(3):291-296.
  52. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54(3):176-186.
  53. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* 2005; 21(1):24-8.
  54. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005; 16:577–586.
  55. Abu-Zidan FM, Winterbourn CC, Bonham MJ, Simovic MO, Buss H, Windsor JA. Small bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidised proteins in rats. *Eur J Surg.* 1999; 165(4):383-9.
  56. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase,

- catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 1982; 42:1955–61.
57. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 2005; 308:1909–11.
  58. Lindenmeier M, Burkon A, Somoza V. A novel method to measure both the reductive and the radical scavenging activity in a linoleic acid model system. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51:1441–6.
  59. 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.
  60. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(2): 319-327.
  61. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(1 Suppl):194S-200S. Review.
  62. Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustundag N. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res.* 2003; 35(3):212–20.
  63. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 2003; 189(1-2): 41-54.
  64. Kayaalp O. İmmün sistem bozuklukları ve immünomodülatör ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 11.Baskı Sayfa:344-353 Ankara 2005.
  65. Levine, A.L. and Richie, P.J.: Urological complications of cyclophosphamide. *J Urol.* 1989; 141:1063.
  66. Edward Chu, M.D. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual* 2007. Pages:98-102.
  67. Dantas ACB et al. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Experimental Urology.* 2010;25(1):2010-43
  68. Eichel L, Scheidweiler K, Kost J, Shojaie J, Schwarz E, Messing E, Wood R. Assessment of murine bladder permeability with fluorescein: validation with cyclophosphamide and protamine. *Urology.* 2001; 58:113-8.

69. Göker H, Haznederoğlu I, Erçetin S, Kirazlı S, Akman U, Öztürk Y, Erat H. Haemostatic Actions of the Folkloric Medicinal Plant Extract Ankaferd Blood Stopper. *The Journal of international Medical Research*. 2008; 36:163-170.
70. Swenson KK, Nissen MJ, Cernsky C. Comparison of side effects between sentinel node and axillary lymph node dissection for breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9:745-753.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Healthcare T. *Thymus vulgaris*. PDR for Herbal Medicines. 4. Baskı. Thomson, NJ. 2007:846-847.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, et al. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26:992-1000.

79. 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.
80. Bombardelli E, Morazzoni P. *Urtica dioica*. *L Fitoterapia*. 1997; 68:387-402.
81. Morsdorf S, Jung F, Seyfert UI, et al Erythrocyte hyperaggregation and thrombogenic dysfibrinogenemia. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1997; 17:13-19.
82. Reinhart WH, Nagy C. Albumin affects erthrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25:523-528.
83. Ankaferd BloodStopper ilaç etkinlikleri raporu, Baskı No 01.2, İstanbul, 2009:66-74.
84. Al B, Yıldırım C, Taysı S, Zengin S, Büyükaslan H. Ankaferd BloodStopper'ın tampon formu ile normal steril spançın cilt-cilt altı kesilerinde meydana gelen kanamada uygulanması. 4. Türkiye Acil Tıp Kongresi, S-076 no'lu bildiri, Antalya, 5-9 Kasım 2008.
85. Bilgili H, Captug O, Kosar A, Kurt M, Kekilli M, Shorbagi A, Kurt OK, Ozdemir O, Goker H, Haznedaroglu I. Oral Systemic Administration of Ankaferd BloodStopper Has No Short-Term Toxicity in an in Vivo Rabbit Experimental Model. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 (Epub ahead of print).
86. Öner AF, Dogan M, Kaya A, Sal E, Bektas MS, Aktar F, Yesilmen O, Ayhan H. Sünnet edilme yerinde durdurulamayan kanaması olan inhibitörlü hemofili A olgusunda Ankaferd Blood Stopper ile dramatic cevap. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı B051 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
87. Canatan D, Savas Ç, Kubulu AE, Çubukçu E, Anıl H, Duman H, Gürtuna A. İnhibitörlü hemofili A hastasında RFVIIA ve Ankaferd kullanımı. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, B056 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
88. Çalışkan Ü, Uçar Albayrak C, Acıpayamlı C. Glanzman trombastenili bir vakada dis çekimi ve sünnete bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0140 no'lu bildiri, İzmir: 2008.

89. Çalışkan Ü, Uçar Albayrak C, Acıpayamlı C. Tar sendromlu bir vakada dis çekimine bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0139 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
90. Çalışkan Ü, Uçar Albayrak C, Acıpayamlı C. Afibrinojenemili bir vakada cilt kesisine bağlı kanamanın Ankaferd ile durdurulması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P0137 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
91. Alanoglu G, Koçer G, Baykul T. Ankaferd BloodStopper deneyimimiz. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, B054 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
92. Turgut M, Aslan S, Çelebi N, Pamuk F, Haznedaroglu C, Demircan S, Aktas A, Kalan I, Göker H, Atalar E, Kirazlı S, Fırat HC. Kritik kanamaların kontrolünde Ankaferd BloodStopper (ABS) uygulamaları. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, P242 no'lu bildiri, Antalya: 2008.
93. Öner AF, Kaya A, Temel H, Melek M, Karaman K, Epçaçan S, Beger B, Ayhan H. Dissemine intravasküler koagülasyonlu bir hastada yüzeysel Ankaferd Blood Stopper kullanımı: Bir olgu sunumu. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, B052 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
94. Huri E, Akgül T, Ayyıldız A, Üstün H, Germiyanoglu C. Haemostatic role of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Bloodstopper® in rat partial nephrectomy model: controlled experimental trial. EAU 4th Southeastern European Meeting, Tiran: 2008.
95. Huri E, Akgül T, Ayyıldız A, Üstün H, Germiyanoglu C. Ankaferd Blood Stopper'in renal travmada kanamaya olan etkinliğinin değerlendirilmesi: Hayvan Deneyi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2008.
96. Kurt M, Disibeyaz S, Akdoğan M, Sasmaz N, Aksu S, Haznedaroglu İC. Endoscopic application of Ankaferd BloodStopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: A case report. Am J Gastroenterol. 2008; 103: 2156–2158.
97. Karabulut H, Acar B, Babademez MA, Günbey G, Karasen RM. Alt konka rezeksiyonlarından sonra “Ankaferd BloodStopper”li tampon uygulaması. 30. Ulusal KBB ve Bas Boyun Cerrahisi Kongresi / 4. Türk-Amerikan KBB ve Bas Boyun Cerrahisi Ortak Toplantısı, İstanbul: 2008.

98. Göker H, Aksu S, Haznedaroglu İC, Ates İK, Alkan A, Büyükaşık Y, Avcı G, Özcebe O. Aplastik anemide allojenik kök hücre transplantasyonu sonrası aplazik dönemde trombosit tranfüzyonuna refrakter epistaksis tedavisinde lokal Ankaferd uygulaması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P232 no'lu bildiri, İzmir: 2008.
99. Kurt M, Öztas E, Kuran S, Onal K, Kekilli M, Haznedaroglu C. Tandem oral, rectal and nasal administration of Ankaferd Blood Stopper to control profuse bleedings leading to hemodynamic instability. Am J Emergency Med. 2009; 27:631-632.
100. Bodur H. Kırım Kongo Kanamalı Atesi hastalarında lokal Ankaferd Blood Stopper Deneyimi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P082 no'lu bildiri, İzmir, 2008.
101. Dogan OF, Ozyurda U, Uymaz OK, Ercetin S, Haznedaroglu I. New anticoagulant agent for CABG surgery. 4th Clinical Vascular Biology Congress, Antalya, 2008.
102. Akgül T, Hurt E, Ayyıldız A, Üstün H, Germiyanoglu C. Haemostatic and histopatological effects of Ankaferd blood stopper, on penile cavernosal tissue in rats. International Journal of Hematology and Oncology. 2009; 19: 159–165.
103. Demircan S, \_sler C, Çakarer S, Yüzbalıoglu E, Soluk M ve ark. Ankaferd Blood Stopper'in erken dönem kemik dokusu iyileşmesi üzerine etkileri: Sıçanlar üzerinde deneysel bir çalışma. Oral Cerrahi Dernegi VIII. Uluslar arası kongre, 14. sözel sunum, Antalya, 2000.
104. Karasoy Yesilada A, Tatlıdede S, Bayraktaroglu SB, Sakız D, Bai L. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın flep yasanabilirliğine etkisinin ratlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma. 34. Ulusal hematoloji kongresi, İzmir, 2008.
105. Göker H, Kılıç E, Uçar Çetinkaya D, Büyükaşık Y, Aksu S, Turgut M, Haznedaroglu İC. Ankaferd'in in vitro ortamda insan kolon kanseri (CaCo-2) hücreleri üzerine olan anti-kanser aktivitesi. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, P044 no'lu bildiri, 2008, Antalya.
106. Göker H, Uçar Çetinkaya D, Kılıç E, Haznedaroglu C, Kirazlı S, Fırat HC. Ankaferd BloodStopper'in (ABS) in vitro ortamda osteosarkom hücre

- dizilerinde olan antikanser aktivitesi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P066 no'lu bildiri, İzmir, 2008.
- 107.** Kılıç E, Çetinkaya DU, Haznedaroglu İC, Turgut M, Aksu S, Kirazlı S, Göker H. Ankaferd BloodStopper'in (ABS) in vitro ortamda mezenkimal kök hücre gelişimi üzerine etkisi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, P065 no'lu bildiri, İzmir, 2008.
- 108.** Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia*. 2009; 80:48-50.
- 109.** Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroglu I, Goker H, Aksu S, Kirazli S, Firat H. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd BloodStopper. *Int J Lab Hematol*. 2008; 30 (suppl 1):95.
- 110.** Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia*. 2009; 80:48-50.
- 111.** Bilgili H, Kosar A, Kurt M, Onal IK, Goker H, Captug O, Shorbagi A, Turgut M, Kekilli M, Kurt OK, Kirazli S, Aksu S, Haznedaroglu IC. Hemostatic efficacy of Ankaferd BloodStopper in a swine bleeding model. *Med Princ Pract*. 2009; 18:165-9.
- 112.** Ankaferd BloodStopper ilaç etkinlikleri raporu, Baskı No 01.2, İstanbul, 2009:66-74.
- 113.** Bagchi D, Garg A, Krohn RL, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E, and a Grape Seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* Feb. 1997; 95(2):179-189.
- 114.** Thomson Healthcare Inc. *Vitis vinifera*. PDR for Herbal Medicines. 4th edition. 405-410: 2007.
- 115.** Facino MR, Carini M, adlini G, et al. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*: a mechanism for their capillary protective action (German). *Arzneimittelforschung*. 1994; 44(5):592-601.

116. Bouhamidi R, Prevost V, Nouvelot A. High protection by Grape Seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *C R Acad Sci III*. 1998; 321(1):31-38.
117. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, et al. Protective effect of Grape Seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol*. 1998; 30(5):771-776.
118. Nutall SL, Kendall MJ, Bombardelli E, et al. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized Grape Seed extract, Leucoselect. *J Clin Pharm Ther*. 1998; 23(5):385-389.
119. 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.
120. Fuhrman B, Buchs, Vaya J et al. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66:267-275.
121. Thomson Healthcare Inc. *Glycyrrhiza glabra*. PDR for Herbal Medicines. 4th edition. 522-530: 2007.
122. Topal T, Oztas Y, Korkmaz A, Sadir S, Oter S, Coskun O and Bilgic H. Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. *J. Pineal Res*. 2005; 38(4):272-277.
123. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186:421-431.
124. Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billiar TR, Schraut WH. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation*. 1994; 58:1309-1316.
125. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin. Chem*. 1990; 36:1440-1443.
126. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem*. 1988; 34:497-500.

127. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin. Chim. Acta.* 1993; 214:103-104.
128. Wei L, Wei H, Frenkel K. Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage. *Carcinogenesis.* 1993 May; 14(5):841-7.
129. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
130. Kilic O, Gonen M, Acar K, Yurdakul T, Avunduk M. C, Esen HH, Oz M. Haemostatic role and histopathological effects of a new haemostatic agent in a rat bladder haemorrhage model: an experimental trial. *BJU International.* 2009; 105:1722-1725.
131. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. *J Biol Chem.* 1969; 244(22):6049-6055.
132. Akkus I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Mimoza Yayınları, Konya. 1995; 1-132. Klotz LO, Sies H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett.* 2003; 140–141:125–132.
133. Alfieri AB, Cubeddu LX. Nitric oxide and NK(1) tachykinin receptors in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295(2): 824-9.
134. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods.* 1987; 18(2):137-42.
135. Ribeiro RA, Souza Fiho MVP, Santos CC. Involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *International Cancer Congress, Proceedings,* 227–231, Italy, 1998.
136. Souza- Fiho MV, Lima MV, Pompeu MM, Ballejo G, Cunha FQ, Riberio Rde A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. *Am J Pathol.* 1997; 150(1):247–256.