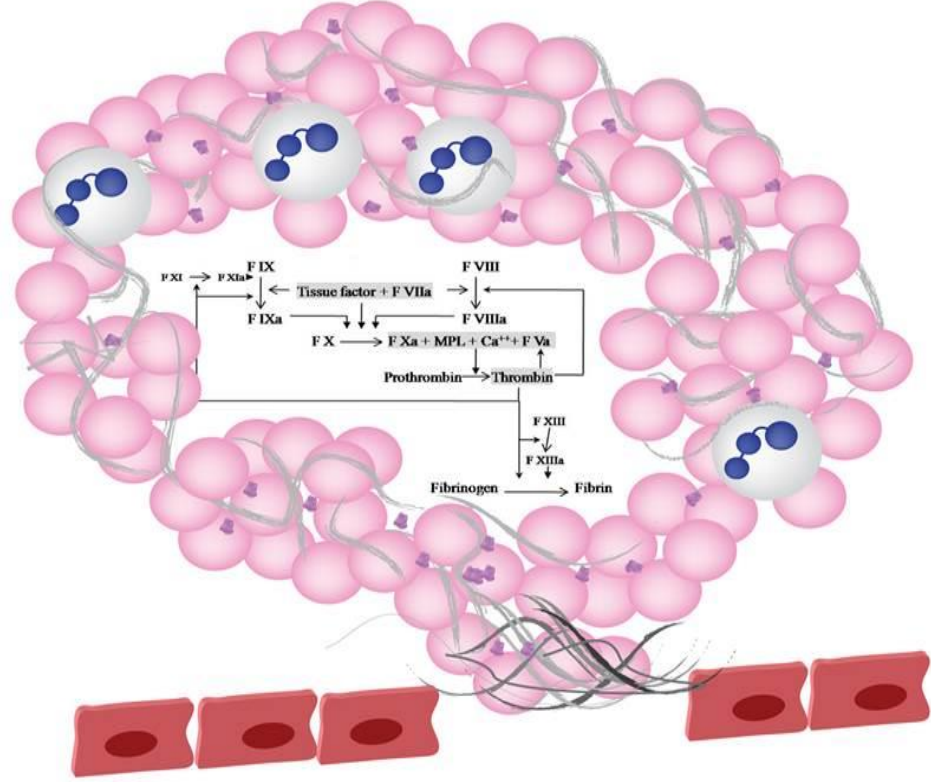


Ankaferd Hemostat (Ankaferd Blood Stopper, ABS) ülkemizde yeni geliştirilmiş bir topikal hemostatik ajandır.¹ ABS, Thymus vulgaris, Glycyrrhiza glabra, Vitis vinifera, Alpinia officinarum, ve Urtica dioica bitkilerinin standart hale getirilmiş bir karışımından oluşur; bu bitkilerin her birinin endotel, kan hücreleri, anjiyogenez, hücre proliferasyonu, vasküler dinamikler ve/veya hücre mediyatörleri üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir.¹ Ankaferd Blood Stopper hakkında çok sayıda klinik ve laboratuvar çalışması yapılmıştır. Bu derlemenin amacı mevcut klinik çalışmaları özetlemek ve bunla ilgili perspektif üzerinde durmaktır.

Ankaferd-bağımlı özgül protein network oluşumu ve vital eritroid aggregasyon global fizyolojik hemostatik süreçleri yönetir. Ankaferd Blood Stopper uygulaması sonrası gelişen hemostatik ağın farklı hücresel ve biyolojik temelleri vardır. Vital eritroid aggregasyon, Ankaferd Blood Stopper uygulaması sonrası eritrosit yüzeylerinde bulunan spektrin ve ankrin reseptörleri ile gerçekleşir (Figür 1). Bu proteinler ve gereken ATP biyoenerjisi Ankaferd Blood Stopper protein kütüphanesinde bulunur. Ankaferd ayrıca intraselüler olarak GATA/FOG transkripsiyon sistemini aktive ederek eritroid fonksiyonları yönetir. Urotensin II de Ankaferd Blood Stopper uygulaması sonrası travmadan hasar görmüş vasküler endotel, adezif proteinler ve aktive eritroid hücreler arasında bağlantı kurmada görev alır. Ankaferd Blood Stopper'ın hemostaz sürecindeki pleiotropik etkilerinin altında yatan mekanizmaya yönelik bu hipotetik kavramlar, MALDI-TOF proteomik moleküler analizler, sitometrik yöntemler, transkripsiyon analizleri ve SEM ultrastrüktürel incelemeleriyle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda elde edilmiştir.

Ankaferd Blood Stopper'ın hemostatik etki mekanizması ve doku hasarını iyileştirmesi Ankaferd-bağımlı vital eritroid aggregasyon ve özgül protein ağı oluşturmak yoluyla fizyolojik yara iyileşmesine hizmet ederek gerçekleşir.



Figür 1. Ankaferd'in temel hemostatik etki mekanizması: Vital eritroid aggregasyon ve özgül protein ağı oluşumu

***In vitro* çalışmalar**

In vitro hemostaz çalışmalarında; Ankaferd Blood Stopper'in normal plazmaya, seruma ve tam kan örneğine eklenmesi, çok hızlı bir şekilde (1 saniyeden daha kısa) protein ağı oluşumu ile sonuçlanmıştır. Plazmaya Ankaferd Blood Stopper eklenmesi, pıhtılaşma faktörlerinin

(koagülasyon faktör II, V, VII, VIII, IX, X, XI ve XIII) düzeylerini etkilememiştir. Kan hücreleri (eritrositler ve trombositler), özellikle eritrositler, Ankaferd Blood Stopper varlığında hızla (<1 saniye) kümeleşmiş ve ağ oluşumuna katılmışlardır. Pıhtılaşma faktörlerinin düzeyi etkilenmediği için ve plazma ve serumdaki ağ oluşumunun işaret ettiğine göre, Ankaferd Blood Stopper'ın bir ağ (network) oluşturmak için fibrinojen ve diğer protein moleküllerinin aglütinasyonunu sağladığı düşünülmüştür. Kan hücreleri (eritrositler ve plateletler) kümeleşerek, özellikle eritrosit kitlesi oluşturarak ağ oluşumuna katılmışlardır. Temel etki mekanizması, eritrosit yığınları için odak noktaları olan kapsülleşmiş bir protein ağının oluşumu gibi görünmektedir. Bu gözlemlere dayanarak Ankaferd Blood Stopper'ın yol açtığı ağın, herhangi bir pıhtılaştırıcı faktörünü dengesizce etkileyerek bozmaksızın, tüm fizyolojik hemostaz sürecini sardığı ileri sürülebilir. Bundan dolayı Ankaferd Blood Stopper, hem normal hemostaz parametrelerine sahip bireylerde hem de, dissemine intravasküler koagülasyon da dahil olmak üzere primer ve/veya sekonder hemostaz yetersizliği olan hastalarda etkili olabilir.

Yayınlanan bir çalışmada gerçekleştirilen proteomik analiz Ankaferd Blood Stopper'ın fonksiyonel proteomik analizi ile koagülasyon üzerine etki mekanizmasını aydınlatmak amacı ile yapılmıştır.² Bu çalışmada; iki boyutlu jel elektroforezi ve MALDI-TOF ile kütle spektrometresi analizleri ile Ankaferd Blood Stopper içeriğinde tanımlanan bitkisel proteinler şunlardır:

- NADP-bağımlı malik enzim
- Ribuloz bisfosfatkarboksilaz büyük zinciri
- Maturaz K
- ATP sentaz beta altünitesi

- ATP sentaz alfa altünitesi
- Chalcon flavonon isomeraz-1
- Chalcon flavonon izomeraz 2
- Aktin-depolimerizasyon faktörü

Ayrıca Ankaferd Blood Stopper kapsamında koagülasyon için oldukça önemli çeşitli insan proteini benzeri proteinler de tanımlanmıştır. Bu proteinler şunlardır:

- ATP sentaz
- Musin16 (CD164-sialomüsin-benzer-2 protein)
- Helezonal kangal taşıyan protein-141
- Hipotetik protein LOC283638 izoform 1
- Hipotetik protein LOC283638 izoform 2
- Dinaktin 5
- Kompleks 1 intermedia ilişkili protein 30
- Mitokondrial protein
- NADH dehidrogenaz (Ubiquinone) 1 alfa altkompleksi
- TP sentaz H⁺ taşıyıcı protein
- Mitokondrial aktin bağlayıcı protein 1
- LIM kangal ve aktin bağlayıcı alt ünite 1 izoform a

- LIM kangal ve aktin bağlayıcı alt ünite 1 izoform b
- Spektrin alfa
- Prolaktin salgılatırıcı hormon reseptörü
- Utrophin
- tet onkogen aile üyesi 2 izoform b
- Protein fosfotaz 1 regulatory altünit 12A
- NIMA-ilışkili kinaz
- ATP-bağlayıcı protein C12
- Homo sapiens malik enzim 1
- Mitokondrial NADP (+) bağımlı malik enzim 3
- ME2 protein
- Nükleer faktör 1
- Abihidrolaz kangal taşıyıcı protein
- SUMO-protein ligaz PIAS2
- Alfa-1,2-glukosiltransferaz ALG10-A
- Kofilin
- 18 kDa fosfoprotein

- p18
- Aktin-depolimerizan faktör
- ADF
- Twinfilin-1
- Ankrin tekrarlayan ve FYVE kangalı içeren protein 1
- Usherin öncüsü
- Urotensin II reseptör
- IL-4 reseptör
- IL-4 ligand
- Midkine

Proteomik analizler sonucu elde edilen proteinler Ankaferd Blood Stopper'in hemostatik, yara iyileştirme ve anti-inflamatuvar etkilerinin araştırılmasına ışık tutacak ve açıklayıcı olacak niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda, Ankaferd Blood Stopper'in insan umbilikal ven endotelinde transkripsiyon faktörleri ve eritrosit protein profili üzerine etkisi incelenmiştir.³ Ankaferd Blood Stopper'in uygulandığı bölgede potansiyel olarak yapabileceği yeni uyarımlar olması söz konusudur, bu etkilerin en merkezindeki yöneticiler ise transkripsiyon faktörleridir. Bunun için endotel üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla Ankaferd Blood Stopper'in insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC)'ler üzerindeki olası transkripsiyon faktör değişikliklerinin incelemesi amaçlanmıştır. Eritrositler arasındaki mekanizması belli olmayan ve bağ oluşturan yapıların

gözlemlenebilir olup olmadığı; olası protein profilinin gösterilmesi planlanmıştır. Bu amaçla HUVEC'lere (75cm²'de; ~%75 dolgunluk) 5 µL ve 50 µL ABS, 5 dak ve 15 dak zaman aralıklarında verilmiştir. HUVEC'lerden çekirdek izolasyonu yapılmış ve transkripsiyon faktörleri AP2, AR, CRE/ATF1, CREB, E2F1-5, E2F6, EGR, GATA, HNF-1, ISRE, Myc-Max, NF-1, NFkB, p53, PPAR, SMAD 2/3, SP1, TRE/AP1, YY1 düzeyleri incelenmiştir (Luminex 100, Marligen Biosciences). Eritrositler arası protein ağıının incelenmesinde 10 mL kan dansite gradientlerine göre ayrıştırılmıştır (Ficoll ayırım solüsyonu d=1.077). Eritrositler üç defa PBS ile yıkılarak Ankaferd Blood Stopper 25 µL/mL, 50 µL/mL ve 150 µL/mL uygulanmıştır. Eritrositlerden membran izolasyonu yapılarak %10'luk SDS-PAGE'de incelenmiştir. Sonuçta HUVEC'lere Ankaferd Blood Stopper uygulaması sırasında mikroskopik gözlem olarak hücrelerin plastik yüzeyden kalkıp birbirlerine yapıştığı gözlenmiştir. Düşük doz uygulaması sırasında (5 µL) 15 dakika muamele edildiğinde bütün transkripsiyon faktörlerinin en yüksek seviyelerine çıktığı daha yüksek dozda ise (50 µL) çok etkilenmediği gözlemlenmiştir. Eritrosit süspansiyonuna Ankaferd Blood Stopper uygulaması sırasında yine doz-bağımlı olarak hücrelerin birbirlerine yapıştıkları gözlemlenmiş, değişik dozlarda oluşan hücre birlikteliklerinin (pellet) büyüklükleri de farklı olmuştur. Eritrosit membran izolasyonundan sonra denatüre edilmesine rağmen protein komplekslerinin dağılmadan kaldığı gözlenmiştir. Oluşan protein kompleksinin ısı ve deterjanlara dayanıklı olduğu söylenebilir. Bu kompleksi açmak için tripsin ve sonikasyon yapıldığında birlikteliğin ayrıldığı ve SDS-PAGE'de eritrositlerin membran proteinlerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Sonuçlar gözönüne alındığında Ankaferd Blood Stopper'ın hücreler arasında inanılmaz hızlı kompleks oluşturma hızı ile kanamaları durdurmada son derece etkili olduğu teyit edilmiş, kompleks içinde oluşan bağın son derece sağlam olduğu sonucuna varılmıştır. Düşük dozlarda hücrelerin sadece dışında değil içinde de çok etkili olduğu hücre içinde birçok mekanizmaları etkileyebileceği düşünülmektedir.

REFERANSLAR

- 1.Koluman A, Akar N, Malkan UY, Haznedaroglu IC. Qualitative/Chemical Analyses of Ankaferd Hemostat and Its Antioxidant Content in Synthetic Gastric Fluids. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8957820.
2. Akar, N., Demiralp, D.O., Haznedaroglu, I.C., Goker, H. Functional Proteomics of Ankaferd Blood Stopper. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2008, 112: 4103.
3. Yilmaz E, Gulec S, Torun D, Haznedaroglu IC, Akar N. The effects of Ankaferd Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and erythrocyte protein profile. *Turk J Hematol* 2011, doi:10.5152/tjh.2011.39