



Depolanan Eritrositlerde Zamana Bağlı Olarak Biyokimyasal Depo Lezyonlarında Gözlenen Değişiklikler: Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asitin Koruyucu Etkisi

Program Kodu: 1002

Proje No: 216S474

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. M. Ramazan ŞEKEROĞLU

Araştırmacılar:

Dr. Öğr. Üyesi Erdem ÇOKLUK

Dr. Öğr. Üyesi Zübeyir HUYUT

Ağustos 2018
SAKARYA

Önsöz

Bu çalışmada antioksidan özellik gösterdiği bilinen, **Rosmarinik Asit** ile yine antioksidan özelliklerinin yanısıra glukoz ve enerji metabolizmasına kofaktör olarak katkı sağlayan **Alfa Lipoik Asitin**, depolanan eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, antioksidan kapasite, antioksidan enzim düzeyleri ile beraber, ortalama eritrosit hacmi ve sayısı, eritrositlere enerji sağlayan ATP ve 2,3-bifosfogliserat (2,3 BPG) düzeyleri üzerinde zamana bağlı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışma için 18-30 yaşları arasında sağlıklı ve gönüllü 12 birey belirlenerek bunlardan CDPA-1 içeren kan torbalarına alınan kan örnekleri, lökositlerden uzaklaştırılarak SAGM'li torbalarda eritrosit paketi şeklinde 2-6 °C'de depolanmıştır. Her bir vericiden elde edilen eritrosit paketleri 3'lü transfer torbaya eşit şekilde aktararak 3 grup oluşturulmuştur. Birinci grup içerisine herhangi bir madde ilave edilmeyen sağlıklı kontrol grubu, ikinci grup içerisine 2-10 µg/mL konsantrasyonda Rosmarinik Asit ilave edilen grup ve üçüncü grup da içerisine 10 µg/mL konsantrasyonda Alfa Lipoik Asit ilave edilen gruptur. Her gruptaki eritrosit paketlerinden 0 (başlangıç), 14, 28, 42 ve 56'ıncı günlerde numuneler alınarak eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit sayısı, ATP ve 2,3-bifofogliserat (2,3-BPG) düzeyleri ile total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviyeleri (TOS) ölçülüp oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. Ayrıca hücre içi antioksidan savunma sisteminde rol oynayan CAT, SOD, GSH-Px ve GSH düzeylerinin zamana bağlı değişimi incelenmiştir. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 1002 programı 216S474 nolu proje olarak desteklenmiştir. Projeye başvuru Yüzüncü Yıl Üniversitesi adına yapılmış ancak Yürütücünün Sakarya Üniversitesine Kurum değişikliği yapmasından dolayı proje Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalının araştırma alt yapısı da kullanılarak Sakarya Üniversitesi adına yürütülmüştür.

İçindekiler

Önsöz.....	9
İçindekiler	10
Tablo listesi	11
Şekil listesi	12
Özet	13
Abstract.....	14
Sonuç Raporu Ana Metni	16
1.Giriş	16
2.Literatür özeti.....	18
3.Gereç ve Yöntem.....	21
3.1. Numunelerin toplanması ve grupların oluşturulması	21
3.2. Eritrositlerin in vitro oksidasyona duyarlılığının ölçümü.....	22
3.3. Total oksidan seviye (TOS), total antioksidan seviye (TAS) ölçümü, oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplaması	22
3.4. Malondialdehit (MDA) ölçümü.....	22
3.5. Eritrosit paketlerinde Hemoglobin (HGB) ölçümü	24
3.6. Redükte Glutasyon (GSH) ölçümü	24
3.7. Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSHPX), Adenozin trifosfat (ATP) ve 2,3-Bifosfogliserat (2,3BPG) ölçümü.....	24
3.8. Eritrosit sayısı (RBC), Ortalama eritrosit hacmi (MCV), Ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), Hematokrit (HCT) ve diğer biyokimyasal test ölçümleri.....	27
3.9. İstatistiksel değerlendirme	27
4. Bulgular	28
5. Tartışma ve Sonuç.....	46
6. Kaynaklar.....	52
7. Ekler	56

Tablo listesi

Tablo 1. Parametrelerin başlangıç /0. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması.....	29
Tablo 2. Parametrelerin 14. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	30
Tablo 3. Parametrelerin 28. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	31
Tablo 4. Parametrelerin 42. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	32
Tablo 5. Parametrelerin 56. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	33

Şekil listesi

Şekil 1. Depo kanların bulunduğu torbaların şematik görünümü.....	22
Şekil 2. MDA standart numunelerine ait pikler	23
Şekil 3. Bir MDA numunesine ait örnek pik.....	24
Şekil 4. Stok standart çözeltilerinden her test için belirtilen konsantrasyonlarda seri dilüsyon yapılarak standart örneklerinin hazırlanması	25
Şekil 5. Ölçüm işleminin şematik görünümü (Numune antikor kaplı kuyucuklara pipetlenir, üzerine işaretli antikor ve kromojen madde içeren solusyon ve reaksiyonu durdurucu solusyon pipetlenir.)	26
Şekil 6. Örnek bir testin standart değerleri ve karşılık gelen optik yoğunluk değerleri eşleştirildikten sonra standartların doğrusal regresyon eşitlik grafiği	27
Şekil 7. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren kontrol grubuna ait grafik.....	34
Şekil 8. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren rosmarinik asit grubuna ait grafik ..	35
Şekil 9. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren lipoik asit grubuna ait grafik.....	36
Şekil 10. Malondialdehit düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi.....	36
Şekil 11. İn-vitro oksidasyon duyarlılığının başlangıç gününe göre değişimi	37
Şekil 12. Katalaz düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi.....	38
Şekil 13. Glutatyon peroksidaz düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi	38
Şekil 14. Süperoksit dismutaz üzerindeki etkisinin başlangıç gününe göre değişimi.....	39
Şekil 15. Total oksidan kapasitenin başlangıç gününe göre değişimi	39
Şekil 16. Total antioksidan kapasitenin başlangıç gününe göre değişimi.....	40
Şekil 17. Oksidatif stres indeksinin başlangıç gününe göre değişimi	41
Şekil 18. Adenozin trifosfat düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi	41
Şekil 19. 2,3 bifosfogliserat düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi.....	42
Şekil 20. Kırmızı kan hücreleri ortalama sayısının başlangıç gününe göre değişimi	43
Şekil 21. Ortalama eritrosit hacminin başlangıç gününe göre değişimi	43
Şekil 22. Hematokrit seviyelerinin başlangıç gününe göre değişimi.....	44
Şekil 23. Hemoglobin seviyelerinin başlangıç gününe göre değişimi	44
Şekil 24. Ortalama hemoglobin hacminin başlangıç gününe göre değişimi	45
Şekil 25. Ortalama hemoglobin yoğunluğunun başlangıç gününe göre değişimi	45

Özet

Transfüzyon için depo edilen eritrositler 2-6 °C'de ve uygun şartlar altında 42 gün kadar depolanabilmektedir. Depolanan eritrositlerde, depolamanın ilk evresinden başlamak üzere morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel birtakım değişiklikler meydana gelmekte ve bunların tümü "depo lezyonları" olarak isimlendirilmektedir. Bu depo lezyonlar, geçen zamana bağlı olarak eritrositlerin yaşam sürelerini ve verimliliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Eritrositlerin maksimum depolama süreleri ve etkinlikleri, depolandıkları ortam ve koruyucu solüsyonların içeriğine bağlıdır. Bu nedenle eritrositlerin depolama sürelerini daha uygun bir şekilde artırmak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaca yönelik olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, depo lezyonlarının en aza indirilmesi ve eritrositlerin yaşam sürelerinin uzatılması için çeşitli koruyucu solüsyonlar geliştirilmiş ve bu solüsyonlara vitamin E, vitamin C, melatonin gibi çeşitli antioksidanların ilavesinin olumlu koruyucu etkileri rapor edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada antioksidan özellikleri bilinen Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit'in depolanmış insan eritrositlerindeki zamana bağlı biyokimyasal depo lezyonlarına karşı koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla sağlıklı 10 gönüllüden CPDA (sitrat-fosfat-dekstroz-adenin) içeren kan torbalarına birer ünite kan alınarak lökositleri uzaklaştırıldı ve SAGM (saline, adenin, glukoz, mannitol) içeren eritrosit torbalarında depolandı. Her vericinin eritrosit paketi üç eşit parçaya bölünerek transfer torbalara aktarıldı. Birinci gruptaki eritrositlere herhangi bir işlem yapıldı ve bu grup kontrol grubu olarak kabul edildi (n=10). İkinci grup eritrosit paketlerine 10 µg/mL Rosmarinik Asit, üçüncü grup eritrosit paketlerine 10 µg/mL Alfa Lipoik Asit ilave edildi (sırasıyla Rosmarinik Asit ve Lipoik Asit grubu). Her üç grupta da +4 °C'de bekletilen eritrosit paketlerinden başlangıç, 14, 28, 42 ve 56'ncı günlerde numuneler alındı. Bu numunelerde eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, Total oksidan Seviye (TOS), Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü, Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplaması, ATP, 2,3-bifosfogliserat, katalaz (CAT), süperoksid dizmutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), redükte glutatyon (GSH), ortalama eritrosit sayısı ve hacmi belirlendi.

Parametreler başlangıç günü ile karşılaştırıldığında MDA ve invitro oksidasyon duyarlılık düzeylerinin zamanla arttığı (p<0,05), katalaz ve GSHPx düzeylerinin 14. günde artmış olduğu, OSI'nin 28., 42. ve 56. günlerde yükseldiği (p<0,05) tespit edildi. SOD, ATP, 2,3BPG, MCV, HGB, MCH, MCHC düzeylerinde ise zamanla değişiklik olmadığı ölçüldü.

Bu sonuçlar; rosmarinik asit ve lipoik asitin depo eritrositlerde kısmen ATP'yi koruyucu etkilerini gösterse de; ne oksidan-antioksidan statü ne de biyokimyasal depo lezyonlarını önleyerek eritrosit yaşam kalitesi üzerine kayda değer olumlu bir etkilerini göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: Depo eritrosit, lipoik asit, rosmarinik asit, biyokimyasal depo lezyonları

Abstract

The stored erythrocytes for transfusion can be stored at 2-6 ° C and under suitable conditions for up to 42 days. In the stored erythrocytes, morphological, biochemical and functional changes occur starting from the initial stage of storage, all of which are called "storage lesions". These storage lesions affect the life span and productivity of erythrocytes negatively depending on the elapsed time. The maximum storage times and activities of erythrocytes depend on the contents of the environment and preservative solutions they contain. Therefore, intensive studies are carried out to increase the storage times of erythrocytes more appropriately. In various studies for this purpose, various preservative solutions have been developed for minimizing storage lesions and prolonging the life span of erythrocytes, and positive protective effects of the addition of various antioxidants such as vitamin E, vitamin C, melatonin to these solutions have been reported. In this study, we aimed to investigate the protective effects of Rosmarinic and Alfa Lipoic Acid, which have antioxidant properties against time-dependent biochemical storage lesions in stored human erythrocytes.

For this purpose, blood was collected from 12 healthy individuals with blood units containing CPDA (citrate-phosphate-dextrose-adenine) to remove leukocytes and stored in erythrocyte bags containing SAGM (saline, adenine, glucose, mannitol). The erythrocyte package of each donor was divided into three equal parts and were transferred to null bags. No procedure was performed on the erythrocytes in the first group and this group was accepted as the control group (n = 10). 10 µg / mL of Rosmarinic Acid was added to the second group of erythrocyte packages and 10 µg / mL of Alpha Lipoic Acid was added to the third group of erythrocyte packs (respectively Rosmarinic Acid and Lipoic Acid group). Samples were taken from erythrocyte packs kept at + 4 ° C in the beginning, 14th, 28th, 42nd and 56th days in all three groups. In these samples, erythrocytes oxidation susceptibility, total oxidant level (TOS), total antioxidant level (TAS) measurement, oxidative stress index (OSI), ATP, 2,3-biphosphoglycerate, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), reduced glutathione (GSH), mean erythrocyte count and volume were determined.

Although the differences in the mean values of the measured parameters compared to the three groups were somewhat different, these differences were not meaningful in that they were completely different from Rosmarinic and Alpha Lipoic Acid groups or from the control group of these two groups ($p > 0.05$). However, when the means of the parameters measured in the groups were compared with the beginning day means in themselves, the MDA and invitro oxidation susceptibility levels were increased with time in all three groups ($p < 0,05$) and catalase and GSHPx levels increased on the 14th and 56th day ($p < 0.05$). ATP



was decreased in the control group ($p < 0,05$) but not in rosmarinic acid group ($p > 0,05$) and also lipoic acid group was significantly decreased at 56 days ($p < 0,05$). SOD, ATP, 2,3BPG, MCV, HGB, MCH, MCHC levels did not change in time ($p > 0.05$).

These results shown that; although rosmarinic acid and lipoic acid show some protective effects on ATP in storage erythrocytes, neither oxidant-antioxidant status nor biochemical storage lesions have been shown to have a favorable effect on erythrocyte quality of life.

Keywords: Storage erythrocytes, lipoic acid, rosmarinic acid, biochemical storage lesions

Sonuç Raporu Ana Metni

1.Giriş

Transfüzyon için depo edilen eritrositler 2-6 °C'de ve uygun şartlar altında 42 gün kadar depolanabilmektedir. Depolanan eritrositlerde, depolamanın ilk evresinden başlamak üzere depo lezyonları olarak adlandırılan morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel birtakım değişiklikler meydana gelmekte ve bunların tümü "depo lezyonları" olarak isimlendirilmektedir. Bu depo lezyonlar, geçen zamana bağlı olarak eritrositlerin yaşam sürelerini ve verimliliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Depolanan kanlarda eritrositlerin oksidasyona duyarlılığını azaltmak ve antioksidan kapasitelerini korumak amacıyla, koruyucu solüsyonlara antioksidan maddelerin eklenmesinin olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. Eritrositlerin maksimum depolama süreleri ve etkinlikleri, depolandıkları ortam ve koruyucu solüsyonların içeriğine bağlıdır. Bu nedenle eritrositlerin depolama sürelerini daha uygun bir şekilde artırmak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaca yönelik olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, depo lezyonlarının en aza indirilmesi ve eritrositlerin yaşam sürelerinin uzatılması için çeşitli koruyucu solüsyonlar geliştirilmiş ve bu solüsyonlara vitamin E, vitamin C, melatonin gibi çeşitli antioksidanların ilavesinin olumlu koruyucu etkileri rapor edilmiştir. Yaptığımız bu literatür taramaları sonucu antioksidan özellikleri bilinen Rosmarinik Asit ile yine antioksidan özellikleri ile birlikte glukoz ve enerji metabolizmasına katkı sağlayan Alfa Lipoik Asitin depolanan eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, antioksidan kapasite, antioksidan enzim aktiviteleri gibi zamana bağlı olarak değişebilen biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma tespit edilmedi. Biz de yapmayı planladığımız bu çalışma ile, Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit'in depolanan eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, antioksidan kapasite, bazı antioksidan enzim düzeyleri ile beraber, ortalama eritrosit hacmi ve sayısı, eritrositlere enerji sağlayan adenzin trifosfat (ATP) ve 2,3-bifosfogliserat (2,3 BPG) düzeyleri üzerinde zamana bağlı koruyucu etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

Amacımız doğrultusunda bu çalışmamızda:

Depo kanlarda veya depolanmış eritrositlerde şu ana kadar koruyucu etkileri araştırılmamış olan, antioksidan özellik gösterdiği bilinen, ülkemizde bolca yetişen fesleğen, ada çayı, mercan kökü, nane, biberiye, perilla gibi bitkilerde doğal olarak bulunan **Rosmarinik Asit** ile yine vücudumuzda doğal olarak bulunan, günlük diyetle ıspanak, brokoli gibi sebzelerin yanında karaciğer, böbrek gibi sakatatlarda da bol miktarda bulunan, antioksidan özelliklerinin yanısıra glukoz ve enerji metabolizmasına kofaktör olarak katkı sağlayan **Alfa Lipoik Asitin** koruyucu etkileri araştırıldı.

- 1- Elde edilecek muhtemel olumlu sonuçlar ile **dahiliye klinisyenleri ve hematologlar** ile birlikte konu ile ilgili diğer bileşenlere önemli yeni bilgiler kazandırılması arzulandı. Ayrıca bekleme süresine bağlı olarak ortaya çıkan depo lezyonlarından dolayı, depolanan kanlar veya eritrositler belirli bir süre sonra imha edildiğinden dolayı **materyal, zaman, emek ve bütçe kayıpları** söz konusu olmaktadır. Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit'in, depo edilen eritrositlerin yaşam süresine yapacağı muhtemel olumlu etkileri göz önüne alındığında ayrıca bu çalışma ile **ekonomik katkı** da sağlanabileceği düşünüldü.

2.Literatür özeti

Akut kan kaybı, yaralanma ve anemi gibi pek çok hastalık tablosunda, kan transfüzyonu sayesinde tedavide başarıya ulaşılabilmektedir (Guppy, Sabaratnam et al. 1990). Yaklaşık olarak her yıl dünyada 80 milyon ünite kan alınmakta ve sadece Amerika'da %70'i perioperatif hastalarda olmak üzere 14 milyon ünite kan transfüze edilmektedir (Lei and Xiong 2015). Ülkemizde ise 2014 yılında sadece Kızılay aracılığıyla yaklaşık 2 milyon ünite kan alındığı belirlenmiştir. Toplam ihtiyaç dikkate alındığında bu sayının 2.5 milyon ünite kan olması gerektiği de ifade edilmektedir (<http://www.kizilay.org.tr>). Ancak, transfüzyonda kullanılmak üzere depo edilen eritrositlerde, zamana bağlı olarak "depo lezyonları" olarak adlandırılan metabolik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler gözlenmektedir (Kızılay). Eritrositlerdeki depo lezyonlarına maruz kalan muhtemel yapılar, eritrosit membranlarındaki protein ve lipid yapılarıdır (Mustafa, Al Marwani et al. 2016). Bazı araştırmacılar depolama esnasında eritrositlerde gözlenen olumsuz değişimlerden ve buna bağlı olarak yaşam sürelerinin kısalmasından antioksidan savunma sistemi kaybını ya da oksidatif stres artışını sorumlu tutmaktadır (Şekeroğlu, Huyut et al. 2012, Huyut, Şekeroğlu et al. 2016). Membranlardaki bu değişimler, eritrosit membran bütünlüğünün bozulmasına, osmotik fragilitede artışa ve antioksidan savunma kapasitesinde azalmaya yol açmaktadır (Aslan, Sekeroğlu et al. 1997, Mustafa, Al Marwani et al. 2016). Yapılan çeşitli çalışmalarda, depolama süresince serbest radikal artışına bağlı olarak eritrosit lipid peroksidasyonunun arttığı, katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD) ve glutayon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaların meydana geldiği rapor edilmiştir (Mustafa, Al Marwani et al. 2016).

Depolanmış eritrositlerin güvenli ve etkili bir şekilde transfüzyonu, uzun yıllardır transfüzyon tedavisinin merkezinde olmuştur. Birçok araştırmacının on yıllardır yaptıkları çalışmalar, eritrositlerin 42'inci güne kadar depolanmasına izin veren çeşitli solüsyonların gelişimine katkı sağlamıştır. Nitekim günümüzde de eritrositler 2-6 °C'de ve uygun şartlar altında 42 güne kadar bekletilebilmektedir (Gültekin, Akdoğan et al. 2000). Eritrositler için maksimum depolama süresi olarak görülen iki kriter vardır. Bunlar; *depolama süresince eritrositlerdeki hemoliz oranının %1'i geçmemesi ve transfüzyondan sonraki 24 saat içinde verilen eritrositlerin en azından %75'inin canlı kalmış olmasıdır* (Lei and Xiong 2015).

Depo kanların raf ömrünü artırmak amacıyla alınan kan örneklerine çeşitli solüsyonlar ilave edilmektedir. Depo kanlarına bu amaçla ilave edilen en yaygın kombinasyonlar sitrat-fosfat-dekstroz (CPD), asit-sitrat-dekstroz (ACD) ve sitrat-fosfat-dekstroz-adenin (CPDA-1)'dir (Blasi, D'alessandro et al. 2012). Ayrıca, Avrupa'da standart ekleme solüsyonu olarak saline-adenin-glukoz-mannitol (SAGM) kullanılmaktadır. SAGM solüsyonu, membran stabilizatörü ve serbest radikal giderici olarak mannitol içerir. Bu da SAGM'li solüsyonlara, kırmızı kan

hücrelerinin korunmasında önemli bir avantaj sağlamaktadır (Van't Erve, Wagner et al. 2015). Ancak yapılan çalışmalar, bu şekilde uygun koşullarda bekletilen kanlarda da, bekletilme süresine bağlı olarak, özellikle lipid peroksidasyonunun ve eritrositlerde osmotik frajilitenin arttığını ve antioksidan kapasitenin azaldığını göstermektedir (Huyut, Şekeroğlu et al. 2016, Mustafa, Al Marwani et al. 2016).

Koruyucu solüsyonların gelişimine yönelik en önemli çabalar, eritrositlerdeki ATP ve 2,3-BPG seviyelerinin korunmasına yönelik olmuştur (Valeri, Valeri et al. 1982). Reinfüzyondan sonra depolanmış eritrositlerin dokulara gereği gibi oksijeni verebilmeleri gerekmektedir. Depolanan eritrositlerin 2,3-BPG kaybından dolayı oksijene afiniteleri artacağından, reinfüzyondan sonra bu eritrositlerin dokulara oksijen verme kabiliyeti azalır (D'Amici, Mirasole et al. 2012). Depolanmış eritrositlerin ATP ve 2,3-BPG seviyelerini sürdürmek için askorbik asit, belirli ksantin seviyeleri, dihidroksiaseton gibi çeşitli koruyucuların kullanılabileceği rapor edilmiştir (Beutler 2006). Ayrıca yapılan başka çalışmalarda, eritrositlerin oksidasyona duyarlılığını azaltmak ve antioksidan kapasitelerini korumak amacıyla, antioksidan maddeler gibi bazı ilave maddelerin eklenmesinin olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (Matsuyama, Niklasson et al. 1989, Orlov and Karkouti 2015, Mustafa, Al Marwani et al. 2016). Knight ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada vitamin E, vitamin C gibi antioksidanlığı bilinen maddelerin depo kanlara ilavesinin, antioksidan savunma kapasitesine olumlu katkı yaptığı, lipid peroksidasyon seviyesinde önemli azalmalara yol açtığı ve eritrositlerin daha uzun süre canlılıklarını korumaya yardımcı olduğunu bulmuşlardır (Knight, Voorhees et al. 1992). Ayrıca Racek ve ark. yaptıkları çalışmada depo kanlarına β -karoten, vitamin C, vitamin E ve selenyum ilavesinin depolanmış eritrositlerin toplam antioksidan kapasitelerine olumlu katkı yaptığı sonucuna varmışlardır (Racek, Herynková et al. 1997). Biz de daha önce yaptığımız bir çalışmada, depo kanlara melatonin ve propofol ilavesinin eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı ve antioksidan kapasitelerinin korunmasına olumlu katkı yaptığını göstermiştik (Huyut, Şekeroğlu et al. 2016).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksid dismutaz, glutatyon transferaz (GST), glutatyon peroksidaz glutatyon (GSH), katalaz ve stokrom oksidazdır (Şekeroğlu, Huyut et al. 2012) Ayrıca, yapılan çalışmalarda, total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) düzeyi ile birlikte oksidatif stres indeksinin de tespit edilmesi, antioksidan kapasitenin düzeyini belirlemek için sıklıkla kullanılan parametrelerdendir (Alpınar, Torun et al. 2012, Torun, Tanyeri et al. 2013). Antosik ve ark. SAGM'de depolanan ve 20 gün bekletilen kırmızı kan hücrelerinde, 50 Gy radyasyona maruz bırakılan eritrositlerin GSH ve TAS düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir (Antosik, Czubak et al. 2015).

Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, metal iyonlarıyla kompleks oluşturma (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme, serbest radikalleri temizleme gibi özelliklerinden ve genellikle fenol radikallerinin rezonans kararlılığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbohidrat, nükleik asit v.b.) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için, aromatik halkalarındaki hidroksil guruplarında bulunan hidrojeni verebilmektedirler. Bu yüzden fenolik antioksidanlar çok iyi bir H^+ ve e^- donörleridir (Öztürk Sarıkaya 2009).

Fenolik asitler yaygın şekilde meyve, sebze, hububat ve içeceklerde bulunan, fenolik bileşiklerden doğal olarak meydana gelen ikincil bitki metabolitleridir (Peng, Wang et al. 2016). Çalışmada kullanılacak olan Rosmarinik Asit, antioksidan olarak in vitro ve in vivo çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılan ve en iyi bilinen hidroksisinnamik asit esteridir. *Lamiaceae* bitki ailesinden fesleğen, ada çayı, mercan kökü, nane, biberiye, perilla gibi bitkilerde bulunmaktadır. Çok sayıda çalışma, Rosmarinik Asit'in antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca yiyeceklerde gıda maddelerinin bozulmasını önleyici olarak ek gıda katkı maddesi ve kozmetik ürünlerde de ek koku maddesi olarak kullanılmaktadır (Fonteles, de Souza et al. 2016, Peng, Wang et al. 2016).

Alfa Lipoik asit (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid), diyetimizde doğal olarak bulunan, hücrelerin su ve lipid bileşiminde çözünebilir bir organosülfür bileşiğidir. Alfa Lipoik asit'in oksidatif strese karşı glutatyon, vitamin E, vitamin C gibi antioksidanlardan daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Su, Liu et al. 2016) (24). Alfa Lipoik asit aynı zamanda glukoz ve enerji metabolizması ile ilişkili pruvat dehidrogenaz ve alfa ketoglutarat dehidrogenaz enzim komplekslerinin de kofaktörüdür. Daha önce yapılan bir çalışmada endojen Alfa Lipoik Asit üretiminin fare embriyolarının gelişiminde zorunlu olduğu rapor edilmiştir. Bu bilimsel çalışmalar Alfa Lipoik Asit'in önerilen antioksidan fonksiyonlarına ek olarak, enerji metabolizmasının normal düzeylerde sürdürülmesi için de zorunlu olduğunu göstermektedir (Hiller, DeKroon et al. 2016)(25). Fenolik asitlerin total olarak en iyi antioksidan özellik gösterdiği konsantrasyon, genelde $10\mu g/mL$ 'dir. Daha yüksek konsantrasyonlarda asidoz gelişebildiğinden, farklı deney ortamlarında antioksidan fonksiyonlarını kaybedebilmekte ve hatta prooksidant etki gösterebilmektedirler (Gülçin 2006, Ding, Chou et al. 2010). Biz de çalışmamızda SAGM solüsyonunda depolanan her mL eritrosit başına $10\mu g$ antioksidan ilave ettik.

Depolanma sürecinde eritrositlerde oluşabilecek depo lezyonunun engellenmesi, fiziki bütünlüklerinin ve antioksidan kapasitelerinin korunması, transfüzyondan sonra dokulara oksijen verebilme kabiliyetini sağlayan ATP ve 2,3-BPG değerlerinin normal düzeylerde tutulması ve raf ömürlerinin artırılması oldukça önem arz etmektedir. Çalışmamızda, zamana bağlı olarak eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı ve antioksidan kapasitelerindeki değişiklikler

(oksidatif stress indeksi) ile, hücre canlılığını ve devamlılığını sağlayan ATP ve 2,3-BPG moleküllerin seviyelerini araştırdık. Ayrıca ilgili parametreler üzerine, antioksidan etkileri bilinen ve depo kanlarda koruyucu etkisi ile ilgili şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamış olan Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit'in koruyucu etkileri de araştırıldı. Ek olarak depo eritrositlerinde, ortalama eritrosit hacmi ve eritrosit sayısı üzerine Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asitin koruyucu etkileri de ortaya konularak, depolanan eritrositlerde zamana bağlı hemoliz oranı da belirlendi.

3.Gereç ve Yöntem

Çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul izni alındı. (05/05/2016 tarih ve 07 karar no'lu etik kurul izni Ek1.)

3.1. Numunelerin toplanması ve grupların oluşturulması

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'nde cinsiyet, yaş, kilo, boy, kan grubu olarak benzer özelliklere sahip sağlıklı gönüllü (18-30 yaş arası, karaciğer, böbrek ve tiroid fonksiyonları normal, diyabet, hipertansiyon vb kronik hastalığı olmayan, son 3 ay içinde antioksidan vitamin/ilaç kullanımı olmayan ve sigara/alkol/madde kullanımı sorgulanan) 12 bireyden CDPA-1 içeren kan torbalarına (**şekil 1.**) alınan kan örnekleri, lökositlerden uzaklaştırılarak SAGM'li torbalarda eritrosit paketi şeklinde 2-6 °C'de depolandı. Her bir vericiden elde edilen eritrosit paketleri 3'lü transfer torbaya eşit şekilde aktarıldı ve aşağıdaki gruplar oluşturuldu:

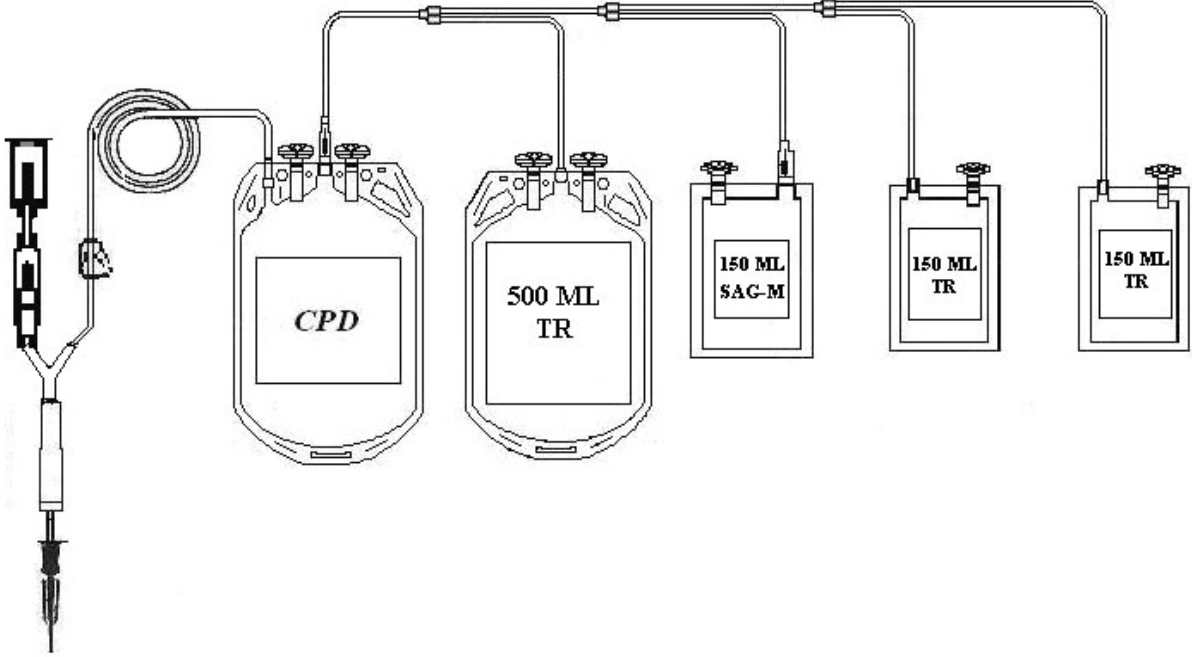
1-Herhangi bir madde ilave edilmeyen sağlıklı kontrol grup (n=12)

2-10 µg/mL konsantrasyonda Rosmarinik Asit ilave edilen grup (n=12)

3-10 µg/mL konsantrasyonda Alfa Lipoik Asit ilave edilen grup (n=12)

Her gruptaki eritrosit paketlerinden 0 (başlangıç), 14, 28, 42 ve 56'ıncı günlerde numuneler alınarak izotonik çözeltide (%0,9'luk NaCl) 1/1 oranında süspansiyon edildi ve eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı Stocks ve ark. (Stocks, Offerman et al. 1972)'nin modifiye yöntemi ile saptandı. Ayrıca her numunede lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA) TBARS (tiyobarbitürat ile reaksiyon veren madde) yöntemiyle (Khoschorur, Winkhofer-Roob et al. 2000) yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC) cihazında, redükte glutatyon (GSH) Fairbanks ve Klee (1994)'nin metoduna göre spektrofotometrik olarak (Burtis and Bruns 2014), katalaz, SOD ve GSH-Px düzeyleri ticari enzim bağlı immünabsorbant yöntemle çalışan kitler ile ölçüldü (Optima®, Zhejiang, China). Eritrositlere enerji sağlayan, hücre canlılığını ve devamlılığını koruyan ATP ve 2,3-bifosfogliserat düzeyleri yine ticari enzim bağlı immünabsorbant yöntemle çalışan kitler ile ölçüldü (Optima®, Zhejiang, China). Depo eritrositlerde zamana bağlı olarak eritrosit lezyonunu gösteren parametrelerden olan

ortalama eritrosit hacmi ve eritrosit sayısı otomatize tam kan sayımı cihazında (Swelab Alfa Boule Medical AB, İsveç) ölçüldü. Çalışma 56 gün süre zarfında gerçekleştirildi ve böylece her depo kandan çalışma süresince beş kez örnek alınarak çalışmalar tekrarlanmış oldu.



Şekil 1. Depo kanların bulunduğu torbaların şematik görünümü

3.2. Eritrositlerin in vitro oksidasyona duyarlılığının ölçümü

Eritrosit süspansiyonuna 1/1 oranında hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi ilave edilerek, $37^\circ C$ 'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat sonunda TBA yöntemi ile MDA seviyesi belirlendi. Bunun için; 50 μL numune alınarak bir tüpe konuldu. Üzerine 750 μL 0.44 M H_3PO_4 , 250 μL TBA ve 450 μL distile su ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak 60 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra buzda veya çeşme suyunda soğutulacak ve üzerine alkalin metanolden (50 ml metanol + 4.5 mL ve 1 M NaOH) 1:1 oranında (1.5 mL) ilave edilerek, 2500 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst bölümde kalan süpernatandan 200 μL alınarak bir vialde aktarıldı ve HPLC cihazında ölçüm yapılarak, sonuçlar nmol/gHb olarak ifade edildi.

3.3. Total oksidan seviye (TOS), total antioksidan seviye (TAS) ölçümü, oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplaması

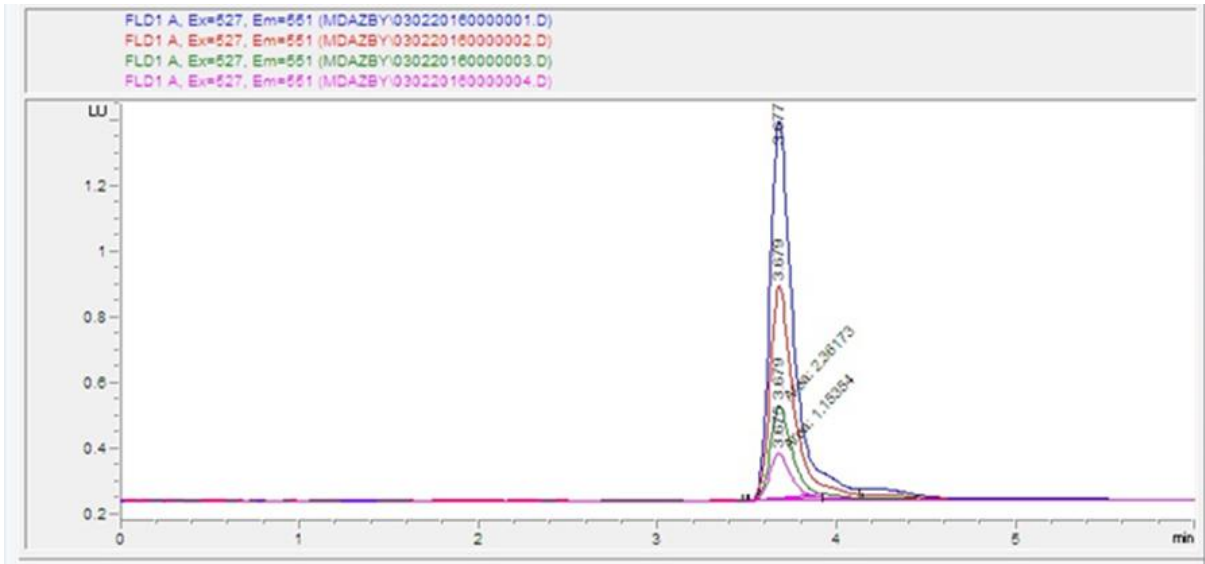
TAS ve TOS ölçümü elisa kiti (Optima, Zhejiang, China) ile sandviç modeli çift antikor enzim bağlı immünoabsorbent yöntemi ile çalışıldı. Birimleri IU/ml olarak ifade edildi. OSI ise toplam oksidan seviyenin (TOS) toplam antioksidan seviyeye (TAS) bölünmesi ile hesaplandı.

3.4. Malondialdehit (MDA) ölçümü

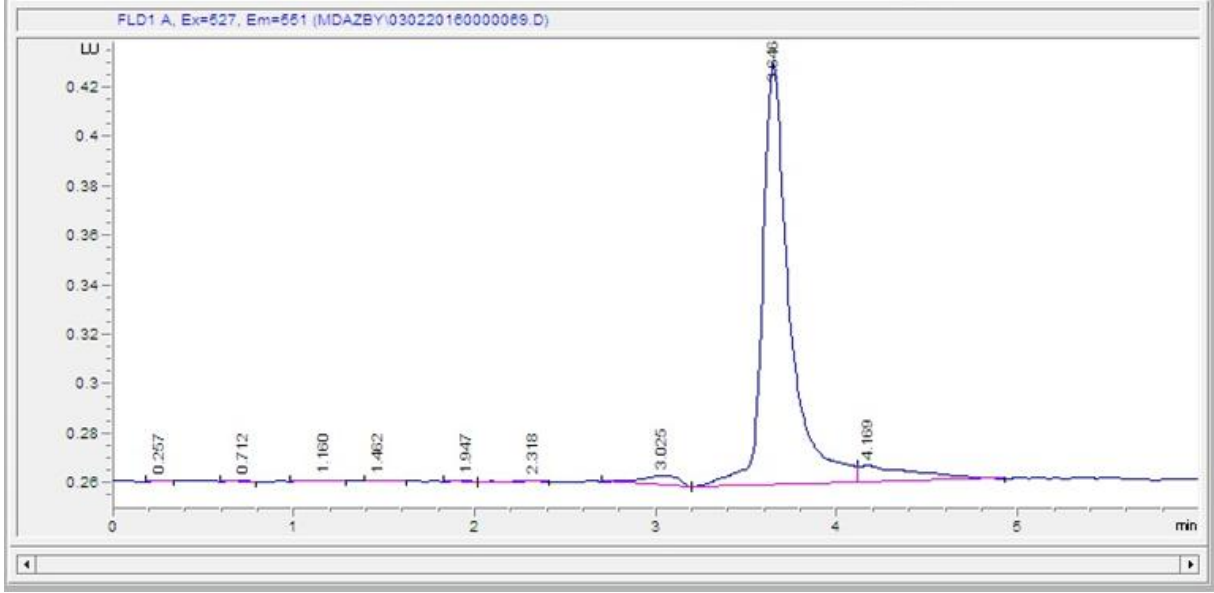
1/1 oranında süspanse edilen eritrosit paketleri 2500 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant alındı. 50 μL süpernatant örneği bir tüpe konularak, üzerine 750 μL 0.44 M H_3PO_4 , 250 μL TBA ve 450 μL distile su ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak

60 dk. kaynar su banyosunda bekletildikten sonra, buzda veya çeşme suyunda soğutuldu. Üzerine alkali metanolden (50 mL metanol + 4.5 mL ve 1 M NaOH) 1:1 oranında (1.5 mL) ilave edildi, 2500 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst bölümde kalan süpernatandan 200 µL alınarak bir vialle konuldu ve HPLC cihazına verildi. Numunelerde Hb miktarı ölçülerek, elde edilen MDA değerleri nmol/gHb olarak ifade edildi. Ölçümler Agilent Technologies, 1200 Infinity Series (Almanya) HPLC sisteminde yapıldı.

HPLC için ölçüm kolonu olarak 150x4.6 mm ve 5µm partikül genişliği olan RP18 kolon kullanıldı. Mobil faz için 400 mL 50 mM fosfat tamponu (pH:6.8) ve 600 mL metanol karıştırılarak hazırlandı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya, enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. 527 nm eksitasyon 551 nm emisyon dalga boylarında floresan dedektörde farklı konsantrasyonda hazırlanan standart numunelere karşı okuma yapıldı. Standard numunesine ait grafik şekil 2'de gösterilmiştir. MDA numune sonucuna ait örnek pik ise şekil 3'te gösterildi.



Şekil 2. MDA standart numunelerine ait pikler



Şekil 3. Bir MDA numunesine ait örnek pik

3.5. Eritrosit paketlerinde Hemoglobin (HGB) ölçümü

Eritrosit paketlerinde HGB ölçümü Fairbanks ve Klee (1986)'nin metoduna göre (Fairbanks and Klee 1986) hemoglobinde bulunan Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e yükseltgenmesi ile oluşan siyanomethemoglobin yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla 5 mL drabkin çözeltisi bulunan tüplere 20 mL hemolizat ilave edildi ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Spektrofotometrede 540 nm'de transmittans ölçülerek daha önce hazırlanan standart eğriden HGB konsantrasyonu hesaplandı ve gr/dL olarak ifade edildi.

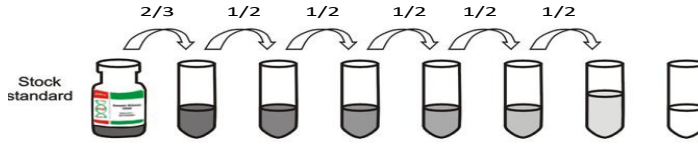
3.6. Redükte Glutasyon (GSH) ölçümü

Eritrosit redükte glutasyon değerleri Fairbanks ve Klee (1994)'nin metoduna göre spektrofotometrik olarak tespit edildi (30). Eritrositlerdeki protein olmayan sülfidril grupları normal olarak redükte GSH formundadır. Bir disülfid kromojen olan DTNB, eritrositlerdeki redükte glutasyonun sülfidril grupları tarafından sarı renkli bileşiğe indirgenir. İndirgenmiş kromojen 412 nm'de maksimum absorbanans verir (30). Bu kompleksin konsantrasyonu direkt olarak GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Elde edilen GSH değerleri mg/gHb olarak verildi.

3.7. Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSHPX), Adenozin trifosfat (ATP) ve 2,3-Bifosfogliserat (2,3BPG) ölçümü

SAGM'li torbadan alınan eritrosit paketleri gerekli olduğu oranda süspanse edildikten sonra, ilgili parametrelerin ölçümü, Optima (Eastbiopharm®, Zhejiang, China) marka ticari elisa kiti

ile sandviç modeli çift antikor enzim bağlı immünoabsorbent yöntemi ile çalışıldı (şekil 5). Ticari eliza kitleri ile birlikte gönderilen stok standart çözeltilerinden her test için belirtilen konsantrasyonlarda seri dilüsyon yapılarak standart örnekleri hazırlandı (şekil 4). Standart örnekleri kuyucuklara test kullanım prosedüründe belirtilen hacimlerde pipetlendi. Kör numunesi olarak dilüsyon tamponu kullanıldı.



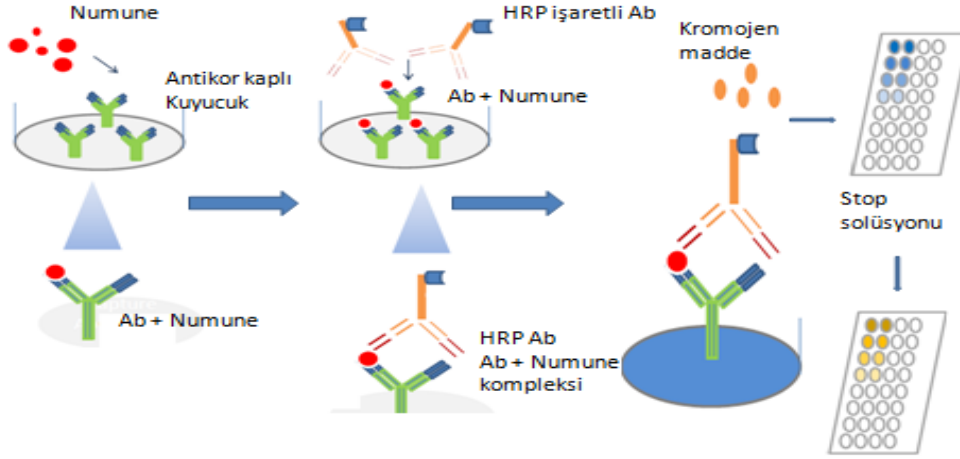
Şekil 4. Stok standart çözeltilerinden her test için belirtilen konsantrasyonlarda seri dilüsyon yapılarak standart örneklerinin hazırlanması

Çalışma şu şekilde yapıldı (şekil 5):

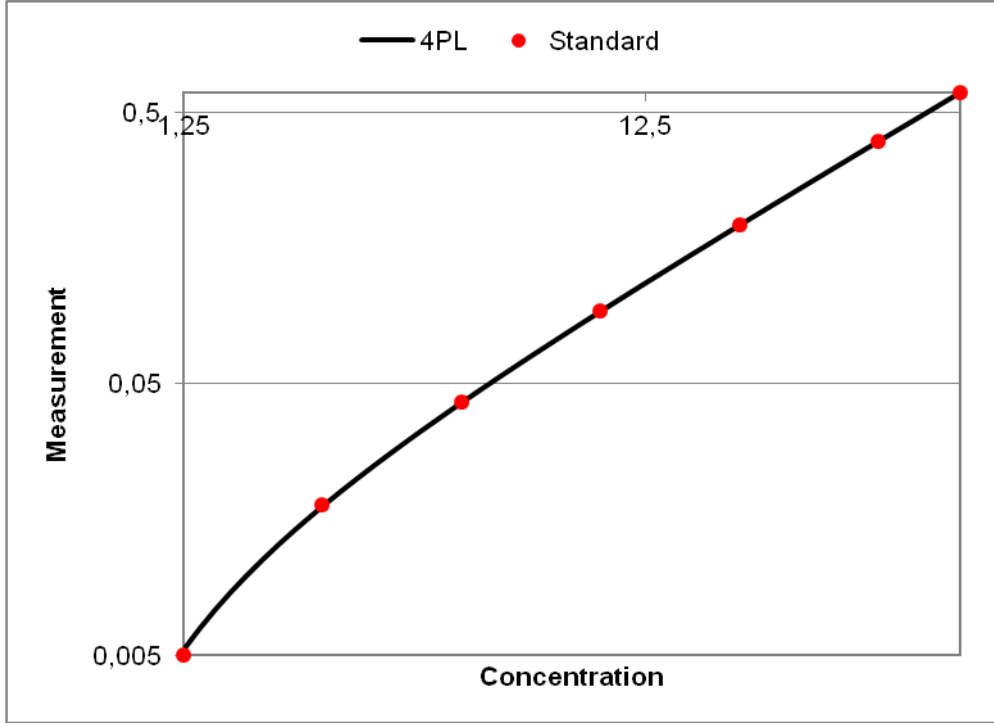
- 1- Monoklonal antikorları ile kaplı kuyucuklara numuneler uygun hacimde pipetlendi.
- 2- Kuyucuklardaki antikorlara numunelerin bağlanması için 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 3- Kuyucuklardaki antikorlara bağlanmış numunedeki partiküllere bağlanmak üzere işaretli monoklonal antikorları pipetlendi.
- 4- İnkübasyon sonrası bağlanmamış antikorlardan fazla numuneleri uzaklaştırmak için yıkama işlemi uygulandı
- 5- Kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara streptavidin-HRP konjugatı pipetlendi ve reaksiyona girmesi için 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 6- İnkübasyon sonrası numune ile bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için yıkama işlemi tekrar uygulandı.
- 7- Oluşan bileşiği renklendirmek için kromojen A ve B solüsyonlarından sırası ile eklendi ve 37⁰C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 8- Reaksiyon sonunda mavi renk oluştu ve reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa stop solüsyonundan eklendi. Reaksiyonun sonlandığı oluşan mavi rengin sarıya dönmesi ile anlaşıldı. Oluşan sarı rengin yoğunluğu ile numunelerde bulunan madde konsantrasyonu doğru orantılı olarak korelasyon göstermektedir.
- 9- Ölçüm uygun dalga boyuna ayarlanan mikroelisa okuyucuda kolorimetrik olarak yapıldı.
- 10- Standart değerleri ve karşılık gelen optik yoğunluk değerleri eşleştirildikten sonra standartların doğrusal regresyon eşitlik grafiği oluşturuldu. Numunelerin optik yoğunluk

değerleri ile standart grafiğindeki konsantrasyonlar eşleştirildikten sonra numune konsantrasyonları otomatik olarak hesaplandı(şekil 6). Sonuçlar IU/ml olarak verildi.

Üretici firma tarafından yapılmış presizyon çalışmasında kitlerin çalışma içi ve çalışmalar arası %CV'si <%10 olarak verilmiştir.



Şekil 5. Ölçüm işleminin şematik görünümü (Numune antikor kaplı kuyucuklara pipetlenir, üzerine işaretli antikor ve kromojen madde içeren solusyon ve reaksiyonu durdurucu solusyon pipetlenir.)



Şekil 6. Örnek bir testin standart değerleri ve karşılık gelen optik yoğunluk değerleri eşleştirildikten sonra standartların doğrusal regresyon eşitlik grafiği

3.8. Eritrosit sayısı (RBC), Ortalama eritrosit hacmi (MCV), Ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), Hematokrit (HCT) ve diğer biyokimyasal test ölçümleri

Eritrosit paketleri 1/2 oranında izotonik çözelti ile seyreltildikten sonra otomatize (Boule Medical AB, İsveç) kalite kontrollü Swelab Alfa tam kan sayım cihazında çalışılarak ortalama eritrosit sayısı (milyon/mm³), ortalama eritrosit hacmi (fL), hematokrit (%), ortalama eritrosit hemoglobini (pg) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (g/dL) belirlendi.

Araştırmamız için kan alınan sağlıklı gönüllülerin seçimleri esnasında ölçülen açlık kan şekeri, üre, kreatinin, Alanin amino transferaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) seviyeleri kolorimetrik olarak, tiroit uyarıcı hormon (TSH) ve serbest T4 seviyeleri ise kemülimunessans mikropartikül yöntemi ile Architect C15200; (Abbott Diagnostics, USA) cihazı ile, cihaza ait ticari kitler kullanılarak tespit edildi.

3.9. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22 (Inc, Chicago, Illinois, USA) istatistik analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde frekans dağılımları, tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. Normal dağılıma uygunluk Kolmogorov-Smirnov Testi ile analiz edildi. Sayısal değerler parametrik test koşullarını sağlamadığından ikiden fazla değişkenli bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis, grup içi ikili

karşılaşmalarda Mann-Whitney U analizleri yapıldı. Tekrarlı ölçümlerin analizlerinde varyans analizinin koşulları sağlanmadığından bağımlı grupların çoklu karşılaştırmalarında Friedman testi, ikili karşılaştırmalarında ise Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. P değerinin 0.05'in altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. Bulgular

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'nde sağlıklı gönüllü 12 bireyden (Gönüllülerin seçimleri esnasında ölçülen açlık kan şekeri, üre, kreatinin, ALT, AST, TSH ve serbest T4 seviyeleri normal aralıkta tespit edildi.) CDPA-1 içeren kan torbalarına alınan kan örnekleri, lökositlerden uzaklaştırılarak SAGM'li torbalarda eritrosit paketi şeklinde 2-6 °C'de depolandı. Her bir vericiden elde edilen eritrosit paketleri 3'lü transfer torbaya eşit şekilde aktarıldı. Torbalar sırası ile herhangi bir madde ilave edilmeyen sağlıklı kontrol grup (n=12), 2-10 µg/mL konsantrasyonda Rosmarinik Asit ilave edilen grup (n=12) ve 3-10 µg/mL konsantrasyonda Alfa Lipoik Asit ilave edilen grup (n=12) olarak ayrıldı. Her gruptaki eritrosit paketlerinden 0 (başlangıç), 14, 28, 42 ve 56'ncı günlerde numuneler alınarak izotonik çözeltide (%0,9'luk NaCl) 1/1 oranında süspanse edildi ve eritrositlerin in vitro oksidasyona duyarlılığı, malondialdehit, redükte glutatyon, katalaz, SOD ve GSH-Px, ATP ve 2,3-bifosfogliserat düzeyleri tespit edildi. Ayrıca TOS ve TAS düzeyleri belirlendi ve oksidatif stres indeksi hesaplandı. Depo eritrositlerde zamana bağlı olarak eritrosit lezyonunu gösteren parametrelerden olan ortalama eritrosit hacmi ve eritrosit sayısı ve bunlarla birlikte belirlenen hemoglobin, hematokrit, ortalama hemoglobin hacmi ve konsantrasyonu otomatize tam kan sayımı cihazında ölçüldü. Çalışma 56 gün süre zarfında gerçekleştirildi ve böylece her depo kandan çalışma süresince beş kez örnek alınarak çalışmalar tekrarlanmış oldu. Kontrol, rosmarinik asit ve lipoik asit gruplarına ait başlangıç, 14., 28., 42. ve 56. gün ortalama değerleri ve gruplar arası karşılaştırmalar tablo 1, 2, 3, 4 ve 5'te sırası ile gösterilmektedir.

Tablo 1'e bakıldığında, başlangıç (0. Saat) kontrol ve rosmarinik asit grubunda CAT'ın lipoik asit grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildiği görülmektedir ($p<0,05$).

Tablo 1. Parametrelerin başlangıç /0. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırması

Parametre	Grup	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Maks.
O. Gün MDA (U/ml)	K	6,104±0,965	5,600	6,610
	R	5,956±0,387	4,800	6,240
	L	5,945±0,406	5,570	7,110
O. Gün in vitro Oksidasyon Duyarlılık (U/ml)	K	9,305±0,819	8,830	10,400
	R	9,307±0,921	9,170	10,690
	L	10,965±0,865	9,900	12,780
O. Gün SOD (U/ml)	K	17,175±7,875	8,950	32,750
	R	16,962±5,451	2,130	22,430
	L	18,813±,609	11,390	38,750
O. Gün CAT (U/ml)	K	225,416±27,446 ^b	192,550	285,600
	R	220,987±30,136 ^c	187,900	301,600
	L	302,237±40,096 ^{b,c}	250,300	380,550
O. Gün GSHPX (U/ml)	K	16,009±0,834	9,640	12,540
	R	16,006±12,397	9,990	55,010
	L	17,12±2,216	11,830	17,980
O. Gün TOS (U/ml)	K	0,695±0,691	0,310	2,780
	R	1,29±0,749	0,440	2,000
	L	1,341±0,625	0,880	1,870
O. Gün TAS (U/ml)	K	29,352±6,906	14,340	33,380
	R	23,858±5,951	20,050	29,750
	L	29,357±4,391	24,260	39,350
O. Gün ATP (U/ml)	K	17,395±2,688	8,360	16,360
	R	16,017±3,329	7,960	19,390
	L	17,330±3,894	8,760	23,660
O. Gün 2,3BPG (U/ml)	K	13,005±1,663	11,570	16,630
	R	14,942±2,432	12,440	20,830
	L	16,225±2,831	12,960	23,630

K; kontrol grubu, L; lipoik asit grubu, R; rosmarinik asit grubu, Min.; en düşük değer, Maks.; en yüksek değer, MDA; malondialdehit, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-PX; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidatif kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenzin trifosfat, 2,3BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz

^a Kontrol grubu ile rosmarinik asit grubu karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

^b Kontrol grubu ile lipoik asit grubu karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

^c Rosmarinik asit grubu ile lipoik asit grubu karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

Tablo 2’de görüldüğü gibi, ölçülen parametrelerin tümüne ait 14. gün değerlerinin gruplara arası karşılaştırmasında anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 2. Parametrelerin 14. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Parametre	Grup	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Maks.
14. Gün MDA (U/ml)	K	7,751±0,676	6,55	8,89
	R	8,847±0,814	7,13	9,9
	L	7,168±0,591	5,86	8,05
14. Gün Oksidasyon in vitro Duyarlılık (U/ml)	K	10,2383±0,762	8,8	11,73
	R	10,877±0,892	9,53	12,55
	L	11,165±0,986	9,54	12,1
14. Gün SOD (U/ml)	K	20,075±6,123	10,71	34,96
	R	16,120±8,178	15,73	37,79
	L	18,710±6,586	8,95	26,19
14. Gün CAT (U/ml)	K	261,480±81,990	246,45	544,5
	R	258,175±100,615	242,75	589,5
	L	237,795±387,402	285,6	1600
14. Gün GSHPX (U/ml)	K	15,814±3,078	9,3	19,94
	R	12,704±1,409	9,81	14,71
	L	13,387±1,767	11,21	16,29
14. Gün TOS (U/ml)	K	0,961±0,357	0,29	1,44
	R	1,23±0,714	0,26	2,42
	L	1,284±0,706	0,7	3,39
14. Gün TAS (U/ml)	K	25,083±5,344	16,92	33,38
	R	27,941±6,624	20,05	41,23
	L	25,930±4,545	18,19	35,03
14. Gün ATP (U/ml)	K	12,429±2,488	7,96	15,98
	R	13,438±2,642	9,57	19,39
	L	12,825±2,522	8,97	18,64
14. Gün 2,3BPG (U/ml)	K	17,7308±2,179	9,47	16,11
	R	15,0158±2,815	10,69	20,3
	L	14,185±1,530	10,69	15,93

K; kontrol grubu, L; lipoik asit grubu, R; rosmarinik asit grubu, Min.; en düşük değer, Maks.; en yüksek değer, MDA; malondialdehit, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-PX; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidatif kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenozin trifosfat, 2,3BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz

Parametrelere ait ortalama değerlerin 28. gün gruplar arası karşılaştırmasında sadece CAT ortalamaları kontrol grubunda rosmarinik asit ve lipoik asit grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (tablo 3, $p<0,05$).

Tablo 3. Parametrelerin 28. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Parametre	Grup	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Maks.
28. Gün MDA (U/ml)	K	11,333 \pm 0,833	10	12,44
	R	11,251 \pm 0,909	9,89	12,47
	L	10,865 \pm 0,601	9,9	11,93
28. Gün in vitro Oksidasyon Duyarlılık (U/ml)	K	13,953 \pm 1,052	11,66	15,52
	R	13,252 \pm 0,920	12	14,71
	L	17,005 \pm 1,787	13,59	19,92
28. Gün SOD (U/ml)	K	14,559 \pm 302,749	0	1065
	R	18,233 \pm 26,267	5,59	101,34
	L	18,610 \pm 5,967	8,58	30,59
28. Gün CAT (U/ml)	K	404,887 \pm 601,938 ^{a,b}	118,5	2400
	R	219,745 \pm 26,646 ^a	190,8	278,45
	L	215,475 \pm 19,201 ^b	186,55	247,45
28. Gün GSHPX (U/ml)	K	14,973 \pm 1,154	12,54	16,56
	R	13,053 \pm 1,640	11,47	17,23
	L	14,437 \pm 1,356	13,04	16,98
28. Gün TOS (U/ml)	K	1,668 \pm 1,234	1,39	4,51
	R	1,692 \pm 0,797	0,83	3,08
	L	1,849 \pm 0,217	1,05	1,76
28. Gün TAS (U/ml)	K	27,837 \pm 2,464	16,61	25,15
	R	21,160 \pm 11,279	0,54	27,75
	L	6,591 \pm 6,083	0,54	15,3
28. Gün ATP (U/ml)	K	16,187 \pm 3,668	11,93	24,2
	R	13,833 \pm 2,293	11,49	20,13
	L	13,877 \pm 3,222	10,64	22,35
28. Gün 2,3BPG (U/ml)	K	16,428 \pm 2,701	12,26	22,05
	R	18,555 \pm 5,321	13,31	34,11
	L	13,605 \pm 3,316	9,99	20,48

K; kontrol grubu, L; lipoik asit grubu, R; rosmarinik asit grubu, Min.; en düşük değer, Maks.; en yüksek değer. MDA; malondialdehit, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-PX; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidatif kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenzin trifosfat, 2,3BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz

^a Kontrol grubu ile rosmarinik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

^b Kontrol grubu ile lipoik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

Tablo 4'te gösterilen 42. gün grup ortalaması karşılaştırmaları incelendiğinde MDA değerleri kontrol grubunda rosmarinik asit grubuna göre anlamlı olarak yüksekken ($p < 0,05$), SOD değerleri hem rosmarinik asit hem de lipoik asit grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0,05$).

Tablo 4. Parametrelerin 42. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Parametre	Grup	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Maks.
42. Gün MDA (U/ml)	K	17,848±1,329 ^a	15,6	19,8
	R	12,085±1,032 ^a	10,21	13,32
	L	16,066±1,295	13,81	18
42. Gün in vitro Oksidasyon Duyarlılık (U/ml)	K	19,794±1,065	18,06	21,52
	R	16,462±1,899	13,02	18,64
	L	19,057±1,691	16,18	21,74
42. Gün SOD (U/ml)	K	13,172 ±4,044 ^{a,b}	4,5	19,49
	R	20,683 ±8,270 ^a	10,4	37,01
	L	20,777 ±8,324 ^b	9,87	35,98
42. Gün CAT (U/ml)	K	332,483±29,144	207,4	311,5
	R	328,787±47,533	210,05	380,8
	L	437,180±27,058	204,85	273,7
42.Gün GSHPX (U/ml)	K	14,765 ±3,050	12,21	22,94
	R	15,603 ±1,712	12,81	18,79
	L	15,184 ±1,870	13,13	19,11
42. Gün TOS (U/ml)	K	1,405 ±0,179	1,16	1,82
	R	1,587 ±0,220	1,25	1,92
	L	1,625 ±0,398	1,16	2,53
42. Gün_TAS (U/ml)	K	20,524 ±7,882	3,1	27,9
	R	17,701 ±9,461	0,54	30,73
	L	15,249 ±8,012	7,7	34,43
42. Gün ATP (U/ml)	K	13,318 ±2,073	10,92	18,9
	R	15,767 ±4,194	11,06	27,06
	L	15,778 ±3,694	12,05	25,38
42. Gün 2,3BPG (U/ml)	K	15,599 ±2,157	12,26	21,18
	R	18,292 ±5,768	11,39	33,41
	L	15,629 ±4,394	11,39	24,85

K; kontrol grubu, L; lipoik asit grubu, R; rosmarinik asit grubu, Min.; en düşük değer, Maks.;en yüksek değer, $\bar{x} \pm SD$;ortalama±standart sapma. MDA; malondialdehit, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-PX;glutasyon peroksidaz, TOS; total oksidatif kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenozin trifosfat, 2,3BPG;2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz

^a Kontrol grubu ile rosmarinik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında (p <0,05).

^b Kontrol grubu ile lipoik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında (p<0,05).

Tablo 5. Parametrelerin 56. gün ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Parametre	Grup	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Maks.
56. Gün MDA (U/ml)	K	23,023±1,965	18,53	26,32
	R	19,482±1,436	17,53	21,88
	L	24,229±1,957	20,49	27,56
56. Gün in vitro Oksidasyon Duyarlılık (U/ml)	K	29,435±2,168	25,59	32,07
	R	22,732±1,379	20,42	25,07
	L	30,457±2,521	26,69	33,99
56. Gün SOD (U/ml)	K	20,730±6,694	10,93	35,30
	R	26,339±7,902	8,58	36,67
	L	17,991±283,685	0,00	76,50
56. Gün CAT (U/ml)	K	270,062±230,650	230,65	324,45
	R	328,604±79,252	256,15	531,00
	L	333,725±116,042	126,55	624,50
56. Gün GSHPX (U/ml)	K	10,812±3,604 ^{a,b}	12,81	23,46
	R	16,000±1,495 ^a	13,74	18,61
	L	14,201±6,359 ^b	0,00	23,81
56. Gün TOS (U/ml)	K	2,371±0,322	1,16	2,41
	R	1,820±0,325	1,29	2,37
	L	1,268±0,447	1,38	2,77
56. Gün TAS (U/ml)	K	19,264±4,792 ^{a,b}	12,83	27,90
	R	14,601±5,152 ^{c,a}	14,82	31,08
	L	22,578±6,985 ^c	19,33	42,83
56. Gün ATP (U/ml)	K	11,395±5,864	12,05	29,52
	R	14,087±3,460	13,06	24,47
	L	12,825±2,682	14,50	23,85
56. Gün 2,3BPG (U/ml)	K	15,105±4,027	11,57	24,50
	R	15,977±2,665	12,79	23,45
	L	19,497±2,465	16,46	24,85

K; kontrol grubu, L; lipoik asit grubu, R; rosmarinik asit grubu, Min.; en düşük değer, Maks.; en yüksek değer, MDA; malondialdehit, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-PX; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidatif kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenzin trifosfat, 2,3BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz

^a Kontrol grubu ile rosmarinik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

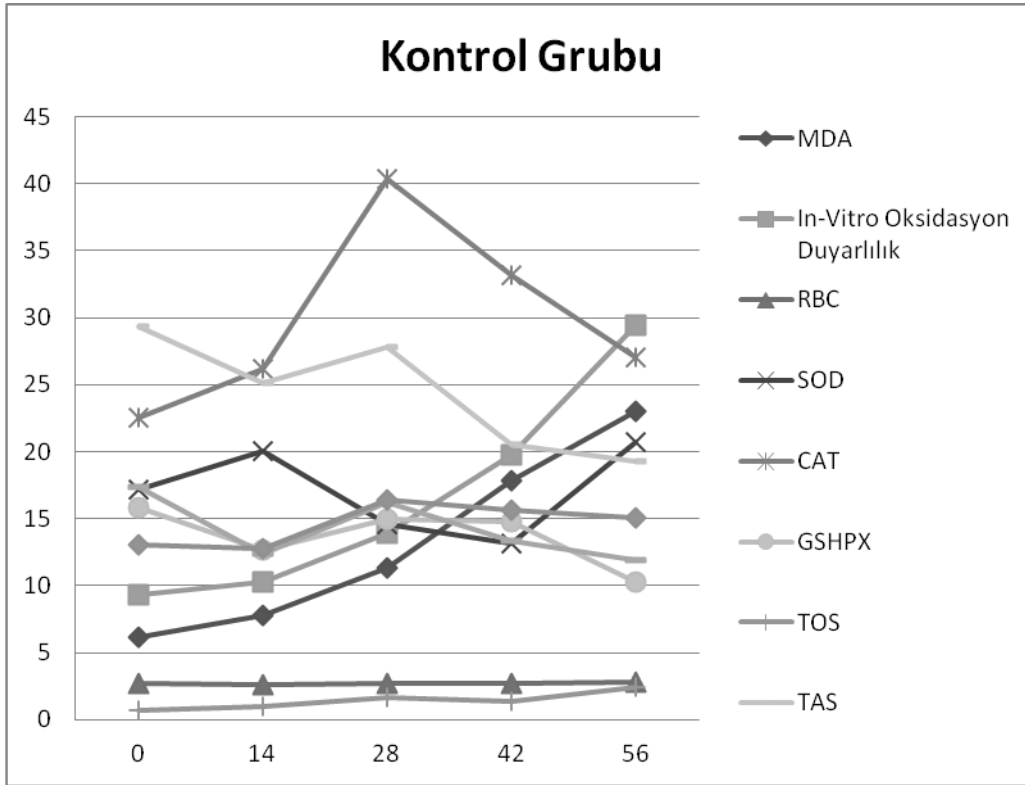
^b Kontrol grubu ile lipoik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

^c Rosmarinik asit grubu ile lipoik asit grubu ortalama değerler karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

GSH-Px'in 56. gün ortalama değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubu ortalamaları hem lipoik hem de rosmarinik asit grubunda düşüktü (tablo 5, $p < 0,05$). Yine 56. gün TAS değerleri grupları arası karşılaştırıldığında kontrol grubunun rosmarinik asit grubundan yüksek lipoik asit grubundan ise düşük olduğu; rosmarinik asit grubunun

ortalama değerlerinin ise lipoik asit grubundan daha düşük olduğu tespit edildi (tablo5, $p<0,05$).

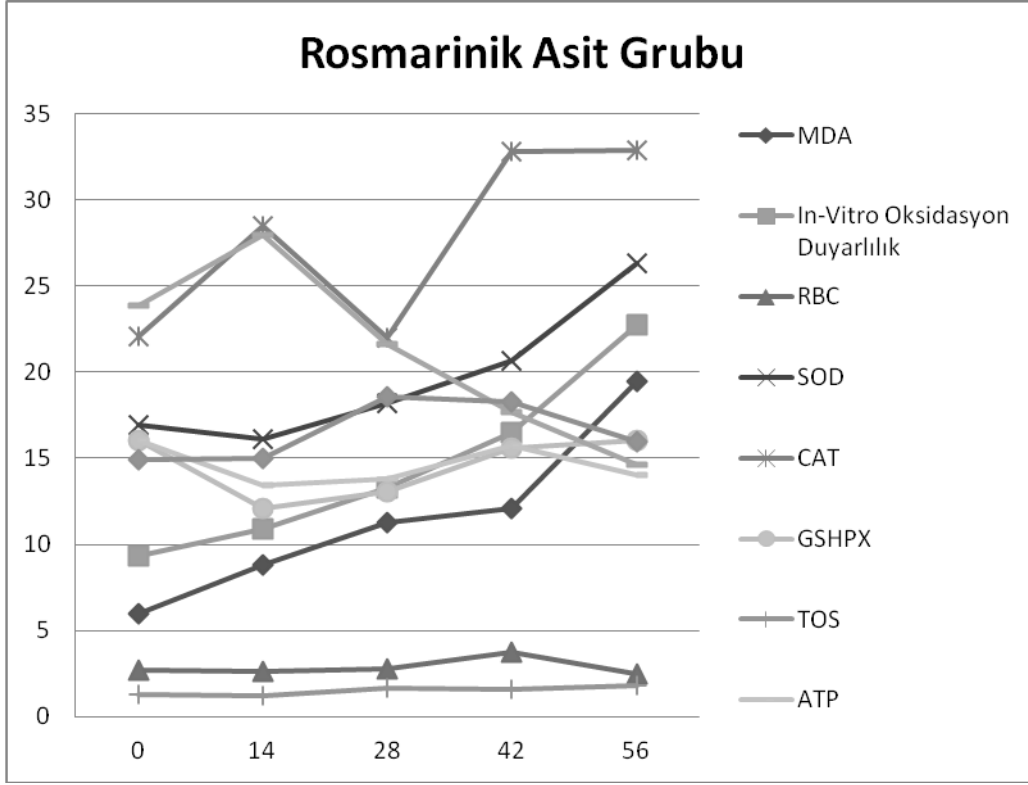
Parametrelere ait ortalama değerlerin günler arası ve değişimini izlemek amacı ile kontrol, rosmarinik asit, lipoik asit gruplarına ait tüm parametreleri gösteren grafikler şekil 7, 8 ve 9'da ayrı ayrı gösterilmiştir. Bunu yaparken parametre sayısının fazla olmasından (11 adet) dolayı, tüm parametrelerin sonuçları tek bir grafikte göstermek için sayısal değeri diğer parametrelerinkinden oldukça yüksek olan katalaza ait aritmetik ortalama 0,1 ile çarpıldı. Böylece aynı gruba ait tüm parametrelerin tek bir grafikte gösterilmesi sağlandı. Dolayısı ile şekil 7, 8 ve 9'da ifade edilen katalazın gerçek değerlerine ulaşmak için 10 ile çarpılması gerekmektedir.



Şekil 7. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren kontrol grubuna ait grafik

MDA; malondialdehit, MDA₀; oksidasyon duyarlılık, RBC; kırmızı kan hücre sayısı, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidasyon kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenozin trifosfat, 23BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz.

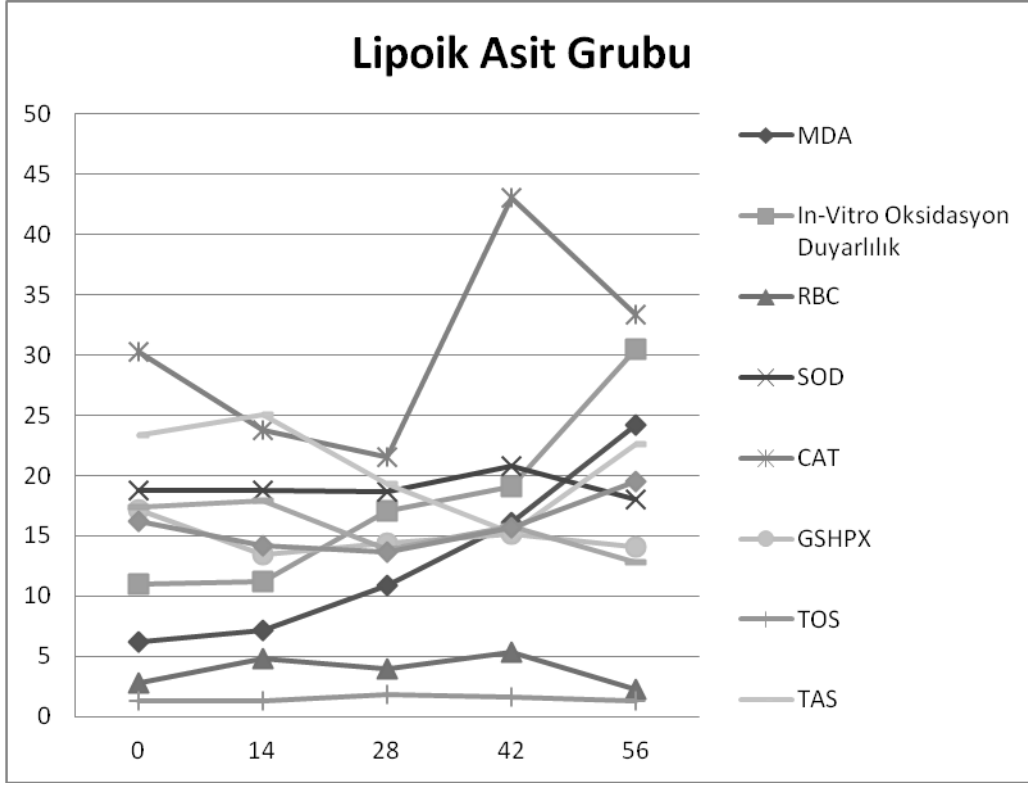
X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir.



Şekil 8. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren rosmarinik asit grubuna ait grafik

MDA; malondialdehit, MDA₀; oksidasyon duyarlılık, RBC; kırmızı kan hücre sayısı, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidasyon kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenozin trifosfat, 23BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz.

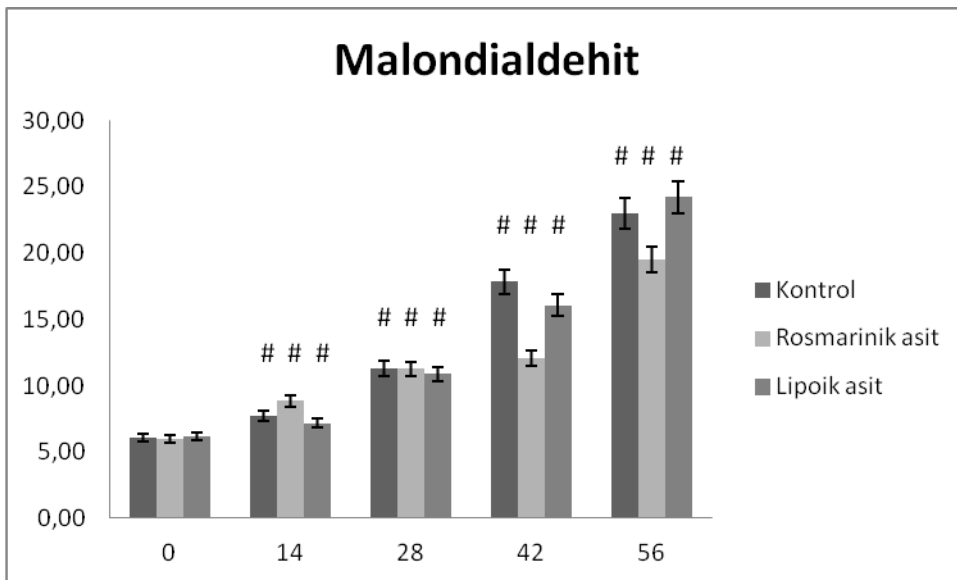
X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımısını ifade etmektedir.



Şekil 9. Parametrelerin günler arası değişimini gösteren lipoik asit grubuna ait grafik

MDA; malondialdehit, MDA₀; oksidasyon duyarlılık, RBC; kırmızı kan hücre sayısı, SOD; süper oksit dismutaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz, TOS; total oksidasyon kapasitesi, TAS; total antioksidan kapasite, ATP; adenosin trifosfat, 23BPG; 2,3 bifosfogliserat, CAT; katalaz.

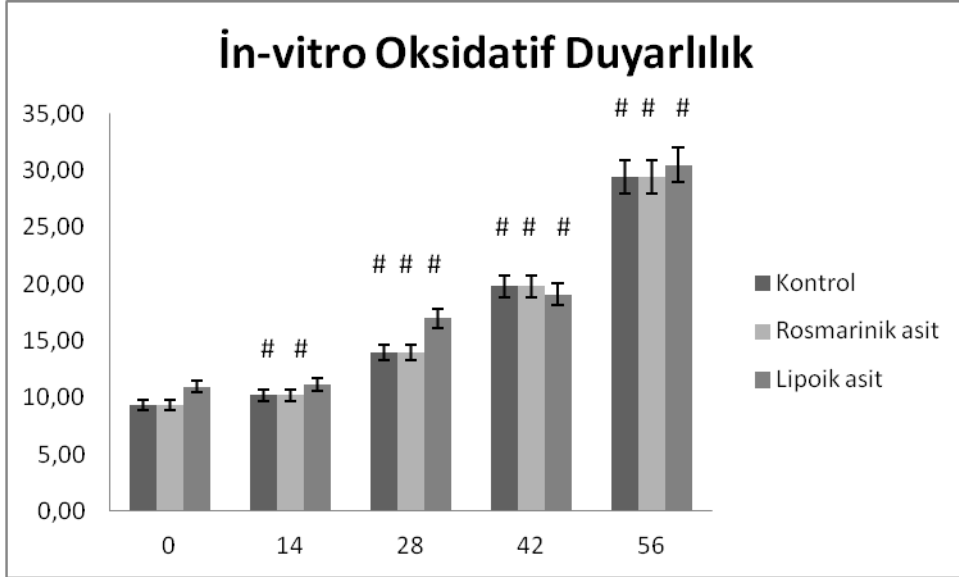
X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımısını ifade etmektedir.



Şekil 10. Malondialdehit düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

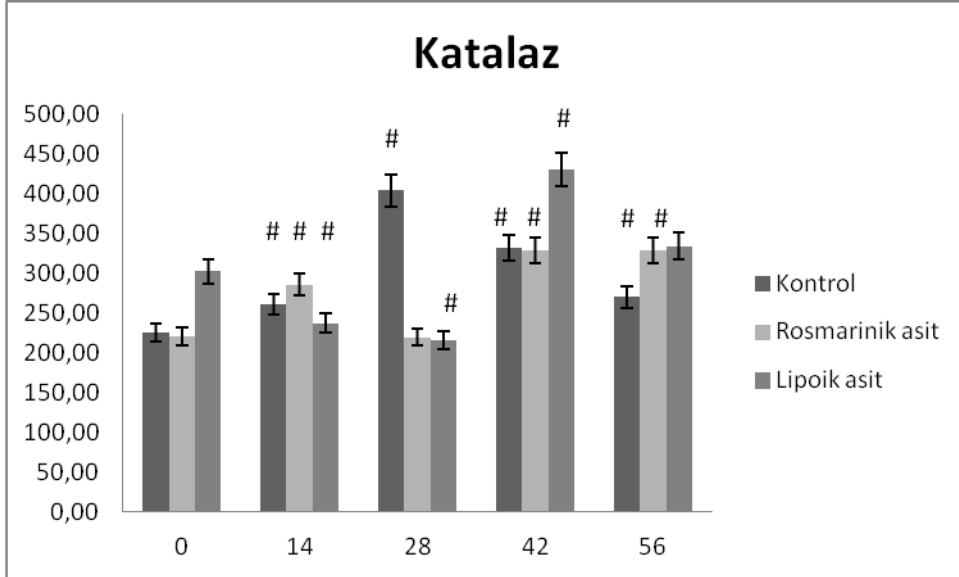
Başlangıç günü ile karşılaştırıldığında 14., 28., 42. ve 56. gündeki eritrosit MDA seviyeleri her üç grupta da anlamlı olarak yüksek olarak tespit edildi (şekil 10., $p<0,05$).



Şekil 11. İn-vitro oksidasyon duyarlılığının başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

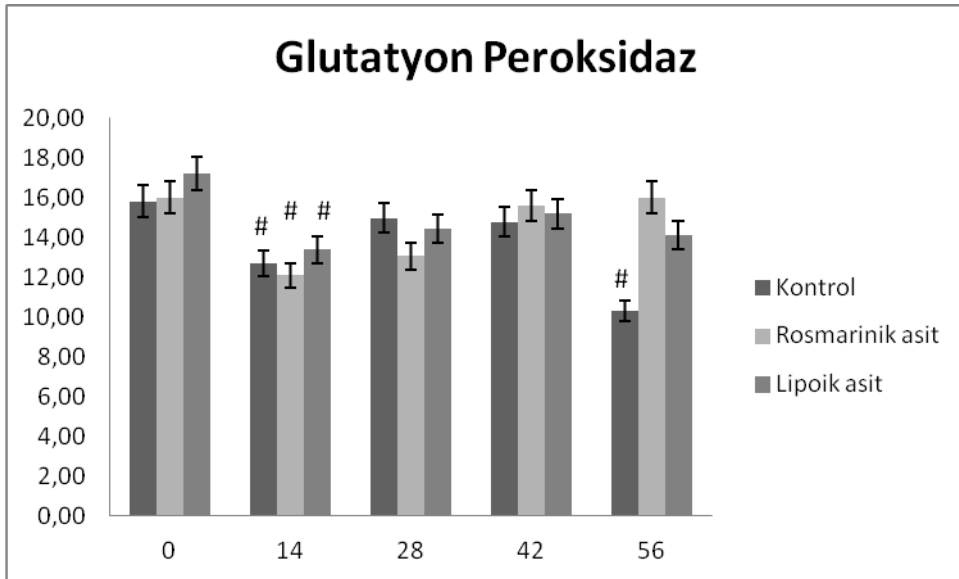
Şekil 11’de kontrol ve Rosmarinik asit grubunun 14. günden itibaren, lipoik asit grubunda ise 28. günden itibaren başlangıç değerlere göre (0. Saat) eritrositlerin invitro oksidasyona duyarlılıklarının zamana bağlı olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 12. Katalaz düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.

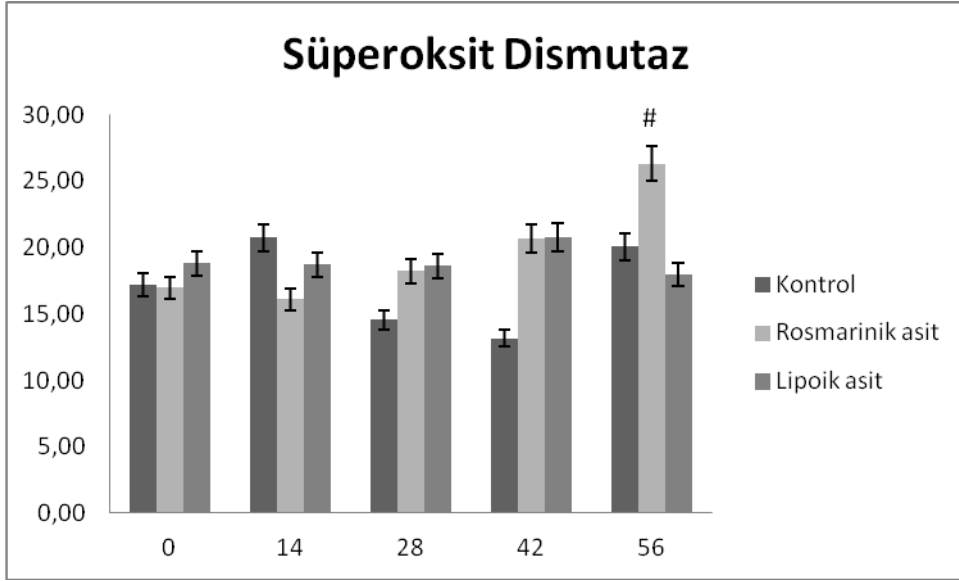
Şekil 12'deki grafikte de görüldüğü gibi rosmarinik asit için 28. Gün ve lipoik asit için 56. Gün istisna olmak üzere her üç grubun katalaz seviyeleri başlangıç değerlerine göre (0. Saat) anlamlı olarak değişim gösterdi ($p < 0,05$).



Şekil 13. Glutasyon peroksidaz düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.

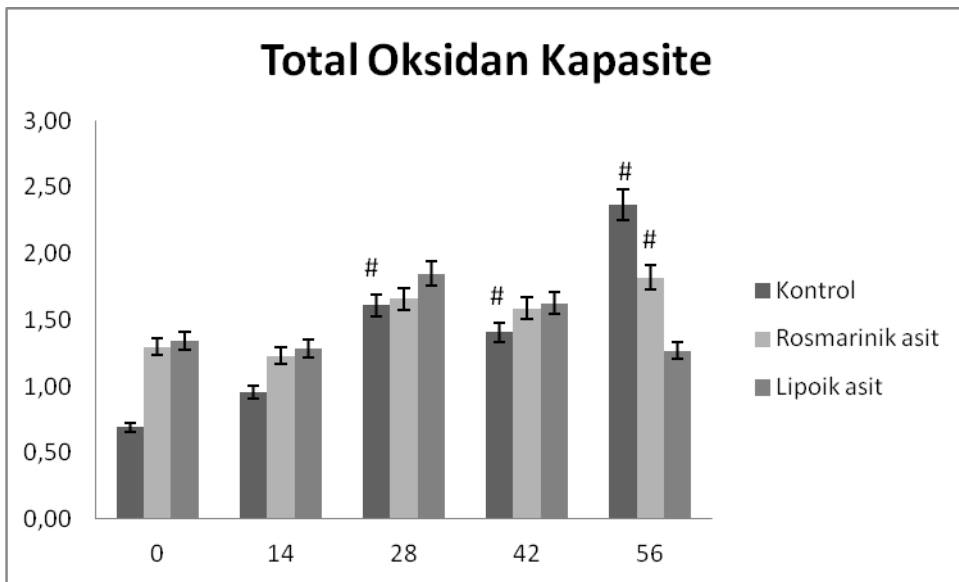
Glutasyon peroksidaz seviyeleri başlangıç günü ile karşılaştırıldığında 14. günde her üç grupta 56. günde ise sadece kontrol grubunda anlamlı olarak düştü (şekil 13., $p>0,05$).



Şekil 14. Süperoksit dismutaz üzerindeki etkisinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruptaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

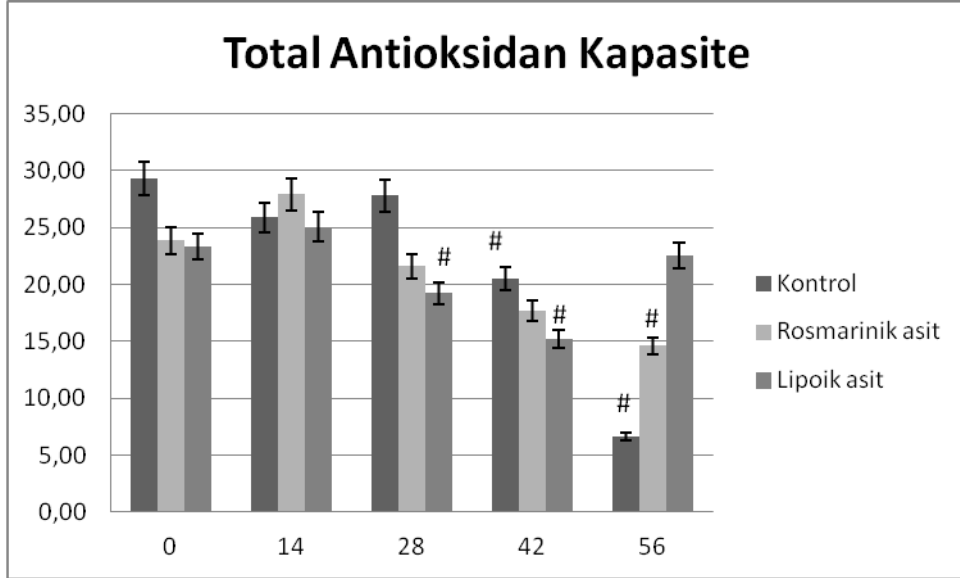
SOD seviyeleri sadece 56. günde rosmarinik asit grubunda başlangıç gününe göre anlamlı olarak yüksek belirlendi (şekil14, $p <0,05$).



Şekil 15. Total oksidan kapasitenin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımısını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

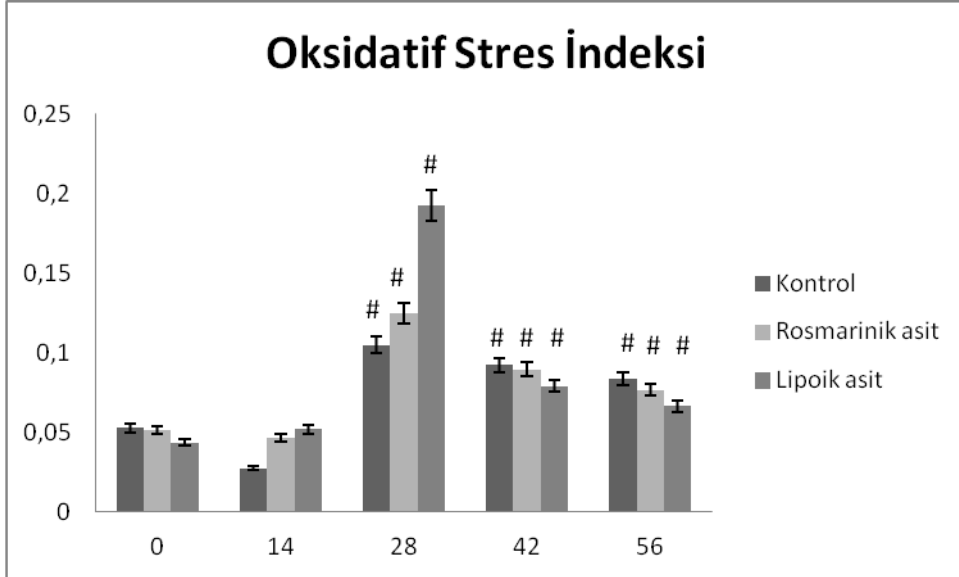
TOK seviyeleri başlangıç günü ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda 28., 42. ve 56. günlerde anlamlı olarak yüksek tespit edildi (şekil 15, $p<0,05$). Rosmarinik asit grubuna ait TOK ortalama seviyesi ise sadece 56. günde başlangıç seviyesine göre yüksekti (şekil 15, $p<0,05$)



şekil 16. Total antioksidan kapasitenin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

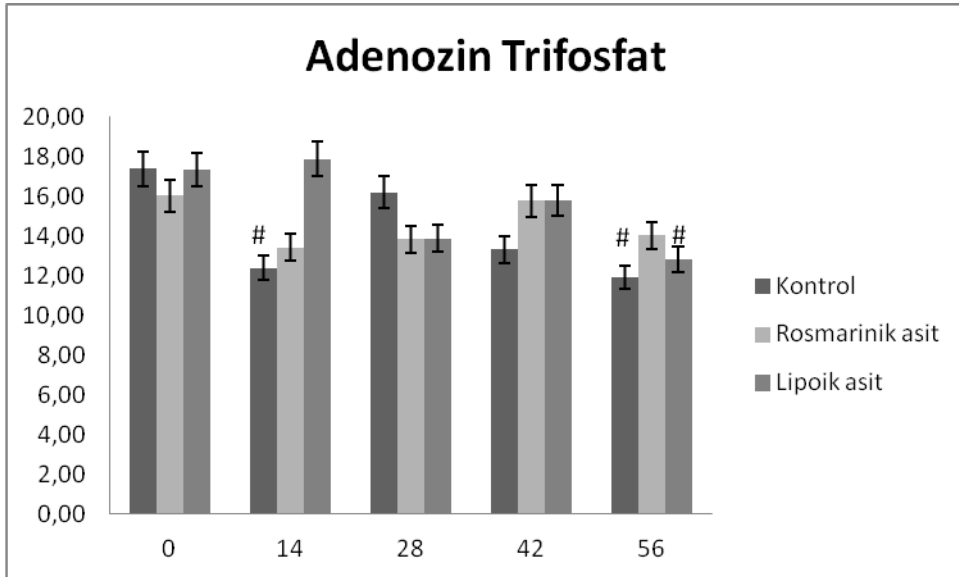
TAK seviyeleri 28. 42. günlerde lipoik asit 56. günde Rosmarinik asit grubunda 42. ve 56. günlerde ise kontrol grubunda başlangıç düzeyine göre anlamlı olarak düşük tespit edildi (şekil 16, $p<0,05$).



Şekil 17. Oksidatif stres indeksinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.

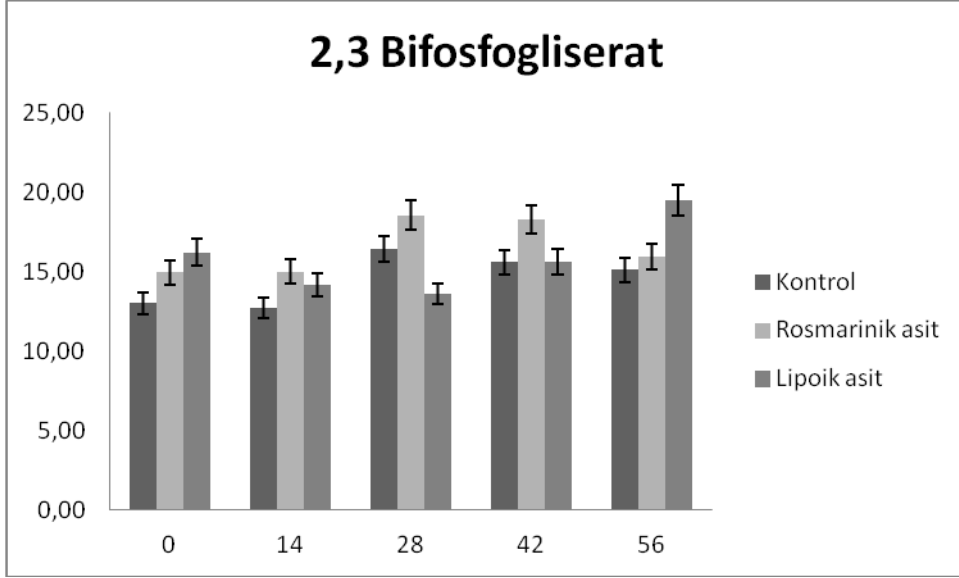
Oksidatif stres indeksi her üç grupta da 28. günden itibaren başlangıç seviyesinden anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 17, $p < 0,05$).



Şekil 18. Adenozin trifosfat düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi

X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.

Adenozin trifosfat düzeyi başlangıç gününe göre 14. ve 56. günde kontrol grubunda, yine 56. günde lipoik asit grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0,05$),

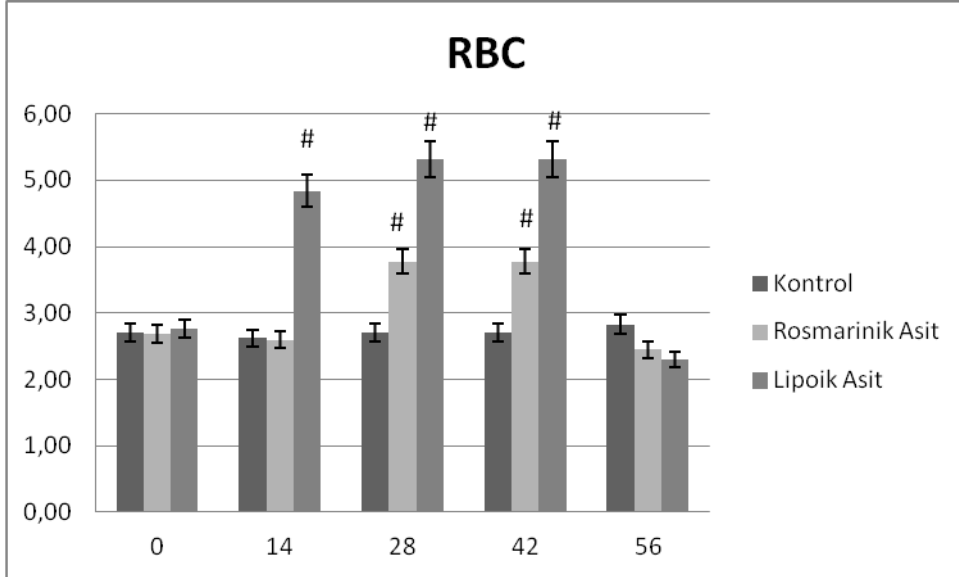


Şekil 19. 2,3 bifosfogliserat düzeyinin başlangıç gününe göre değişimi

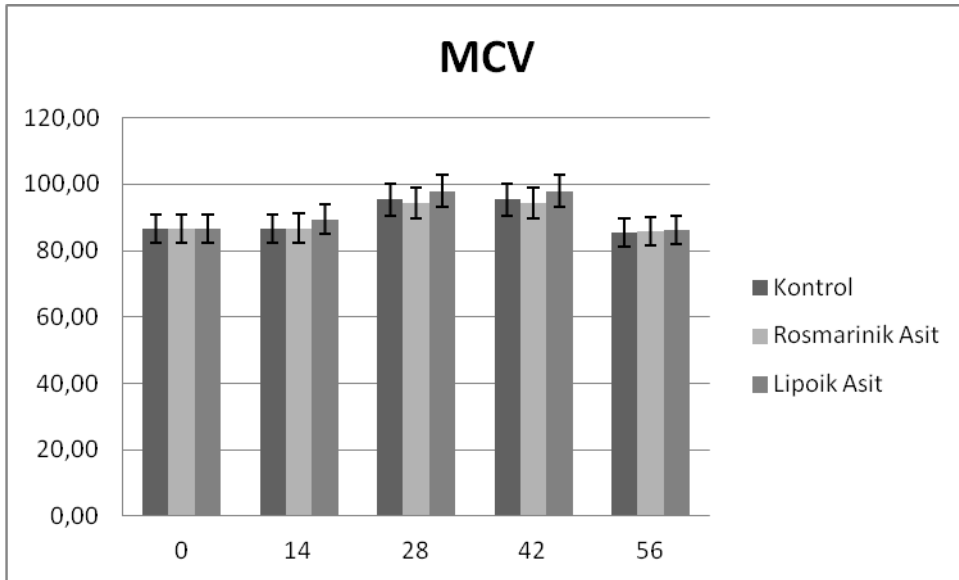
X eksenini günleri, Y eksenini değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımalarını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

Şekil 19'da görüldüğü üzere 2,3 bifosfogliserat düzeyinde üç grupta da başlangıç gününe göre zamana bağlı bir değişiklik izlenmemektedir ($p>0,05$).

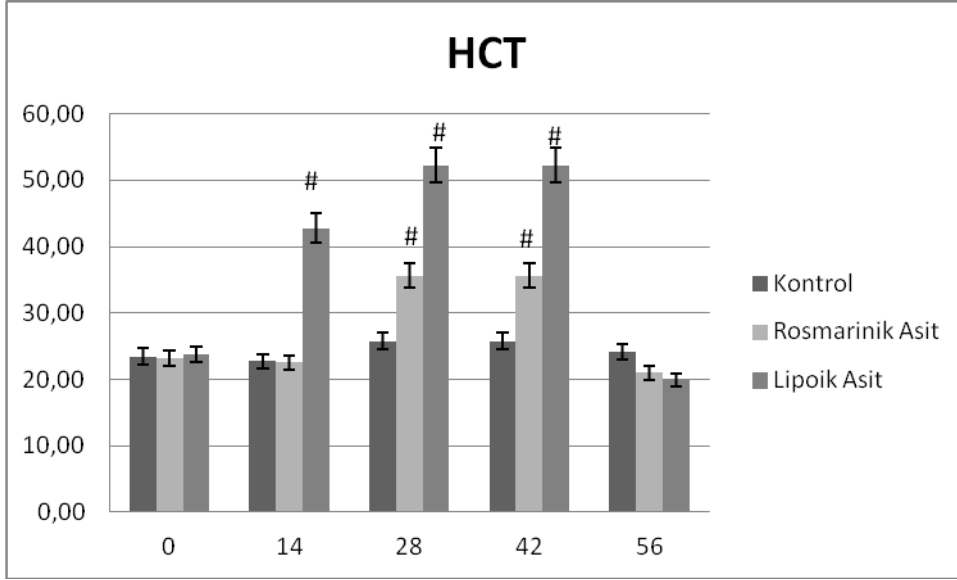
Eritrositlerin sayısı ve yapısal özelliklerini gösteren parametreler olan, ortalama eritrosit hacmi, hematokrit, hemoglobin, ortalama eritrosit hemoglobini, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu değerlerinin başlangıç günü ile karşılaştırmaları Şekil 20, 21, 22, 23, 24 ve 25'de gösterilmektedir.



Şekil 20. Kırmızı kan hücreleri ortalama sayısının başlangıç gününe göre değişimi RBC; kırmızı kan hücresi, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruptaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

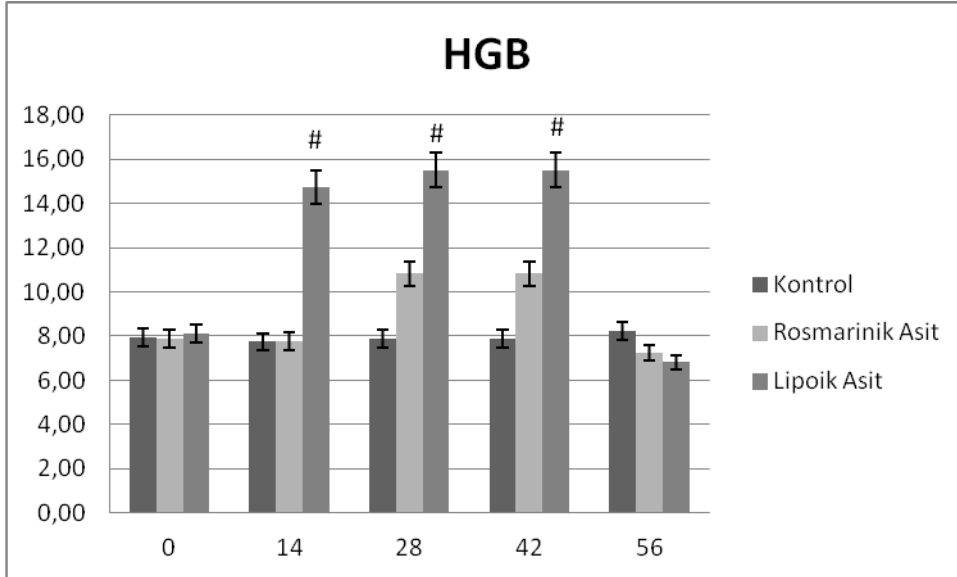


Şekil 21. Ortalama eritrosit hacminin başlangıç gününe göre değişimi MCV; ortalama kırmızı kan hücresi hacmi, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruptaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.



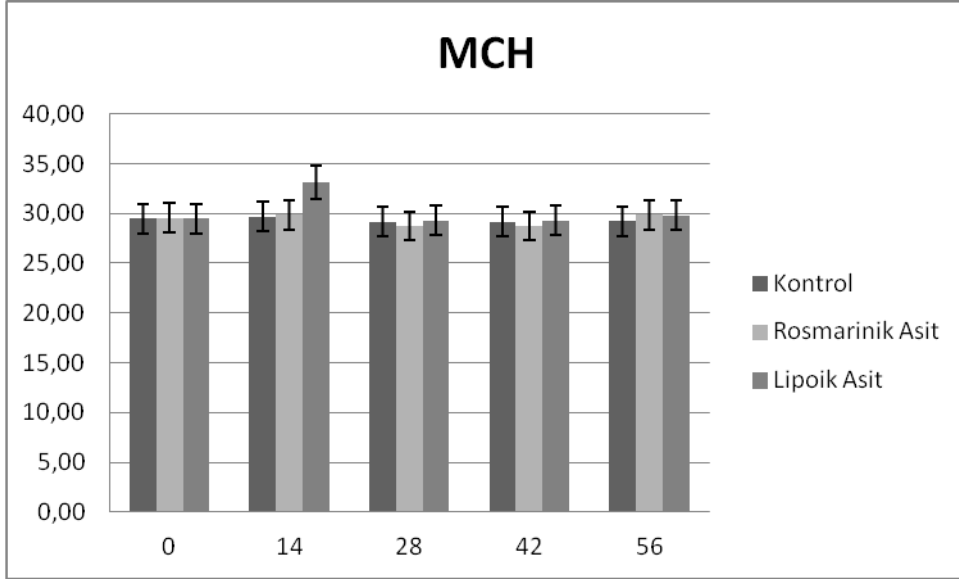
Şekil 22. Hematokrit seviyelerinin başlangıç gününe göre değişimi

HCT; hematokrit, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımısını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.

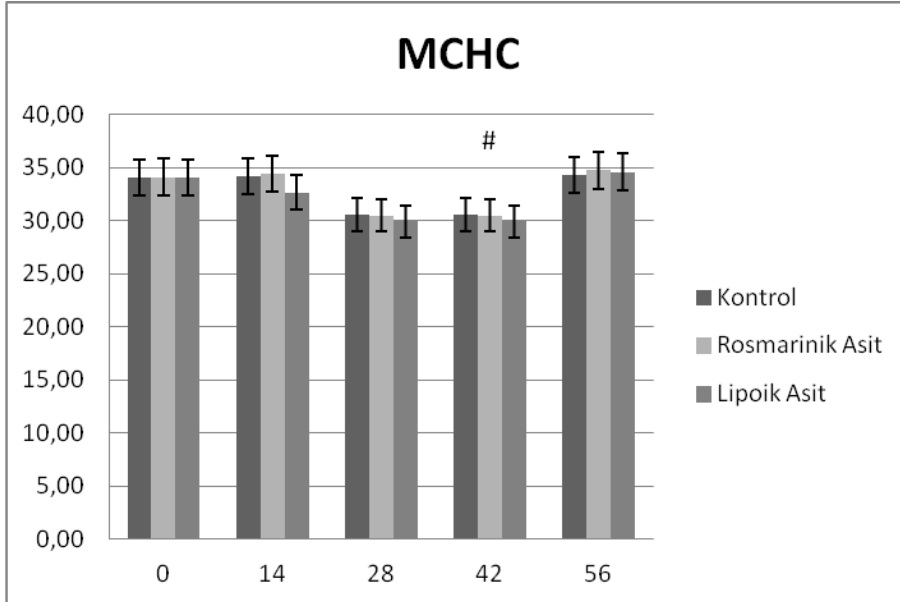


Şekil 23. Hemoglobin seviyelerinin başlangıç gününe göre değişimi

HGB; hemoglobin, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p < 0,05$.



Şekil 24. Ortalama hemoglobin hacminin başlangıç gününe göre değişimi MCH; ortalama hemoglobin hacmi, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımısını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.



Şekil 25. Ortalama hemoglobin yoğunluğunun başlangıç gününe göre değişimi MCHC; ortalama hemoglobin yoğunluğu, X eksenı günleri, Y eksenı değerleri göstermektedir. Sağ taraftaki semboller her bir parametrenin grafikteki yansımasını ifade etmektedir. # başlangıç gününe göre gruplardaki anlamlı değişimi göstermektedir $p<0,05$.

5. Tartışma ve Sonuç

Eritrositlerin in vitro depolama yönteminin geliştirilmesi, modern tıp alanında önemli başarılarından birini temsil eder, çünkü eritrositlerin bağışlanmasından transfüzyonun yapılacağı zamana kadar geçen süreyi uzatmaktadır. Bununla birlikte bağış ve transfüzyon arasındaki süre halen sınırlı olup, diğer tüm ilaçlarda olduğu gibi zaman aşımına uğradığında eritrositler de fonksiyonelliğini yitirmektedir (Lei and Xiong 2015). Eritrosit paketlerinin koruyucu madde içinde depolanması esnasında bir takım metabolik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere yol açtığı bildirilmekte ve bu değişiklik topluca “depolama lezyonları” olarak adlandırılmaktadır (Guppy, Sabaratnam et al. 1990, Lei and Xiong 2015).

Bu nedenle son yıllarda artan klinik talepleri karşılamak için kan bankalarında ve transfüzyon hizmetlerinde kullanılan kan bileşenlerinin korunması amacıyla fonksiyonel kan komponentlerini en uygun şekilde depolayarak muhafazaya büyük ilgi gösterilmeye ve bu konuda çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaya başlanmıştır (Marwaha and Sharma 2009). Quintero ve ark. manuel olarak elde edilen trombositlere kıyasla aferez ile elde edilenlerde oksidatif stresin azaldığını ve bu şekilde elde edilen depolanmış trombositlerdeki fonksiyonel belirteçlerde daha iyi sonuçlar gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Klinikte en çok kullanılan kan komponentlerinden biri de eritrositlerdir ve eritrosit paketlerinin muhafazası için uygun ortam geliştirilmesiyle ilgili de pek çok çalışma yapılmıştır (Quintero, Núñez et al. 2015). Al Marwani ve ark. 4°C'de saklanan SAGM'de muhafaza edilen lökosit azaltılmış eritrositli paketlerinde 42 günlük incelemelerinde elektron mikroskopik görüntülerde morfolojik değişiklikler gözlemlenmiş ve bu değişikliklerin ozmotik kırılma ve hematokrit ile korele olduğunu bildirmişlerdir (Mustafa, Al Marwani et al. 2016). Ayrıca, eritrositlerdeki MDA seviyesindeki artışın morfolojik değişikliklerle daha da bağlantılı olabildiğini, depolama sırasında oksidatif hasarın meydana geldiğini belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada 35 günlük AS-1'e kıyasla SAGM'de depolanan eritrositlerin oksidatif ve in vitro transfüzyon ilişkili streslere duyarlılığının anlamlı şekilde artmış olduğu bulunmuştur (Lei and Xiong 2015). Qasim ve ark (Qasim and Mahmood 2015) kreatinin insan eritrositlerini ve lenfositleri oksidatif hasara karşı koruma becerisini değerlendirdikleri çalışmalarında, eritrositler ve lenfositleri kreatinin varlığında ve yokluğunda 2, 2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi oksidanlara maruz bırakmışlardır. Sonuçta da kreatinin insan eritrositlerini ve lenfositleri oksitleyici maddelerin neden olduğu hasara karşı etkili bir şekilde koruyabildiğini, protein oksidasyonunu, glutatyonun azalmasını ve hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü önlediğini, aynı zamanda oksidatif hasardan lenfosit DNA'sını koruduğunu ve mitokondriyal enzimlerin oksidan varlığında bile aktif kalmasına izin verdiğini göstermişlerdir. Sadece depolama süresi değil, depo kanlara katılan katkı çözültisinin bileşimi, eritrositler ve katkı çözültisi arasındaki ilişki de depolanmış eritrositlerdeki

biyokimyasal değişikliklerin büyüklüğünü ve kinetiğini etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada SAGM koruma ortamındaki eritrositlerin 6 hafta 4°C'de saklanması, eritrosit şişmesine neden olarak ortalama eritrosit hacminin arttığı bildirilmektedir (Reinhart, Piety et al. 2015).

Oksidatif hasar, antioksidanlar ve prooksidanlar arasındaki denge kaybolduğunda ortaya çıkmaktadır. Fenton reaksiyonundan kaynaklanan hidroksil radikalleri, membranın bütünlüğünün zayıflamasıyla sonuçlanan eritrosit zarındaki yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna yol açabilmektedir. MDA ölçümü, lipit peroksidasyonun derecesinin değerlendirilmesinde yararlı bir belirteçtir. Böylece reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasar değerlendirilebilmektedir. Depolama süresince MDA seviyelerinin artış göstermesi, lipit peroksidasyonunun oluştuğunu ifade etmektedir. Sık kan transfüzyonu yüksek riskli hastayı, uzun süre bekleyen kan alımının bir sonucu olarak yan etkilere maruz bırakabilir. Bu olumsuz sonuçlar, saklama sırasında kırmızı kan hücrelerinin geliştirdiği metabolik, biyokimyasal değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Bu yan etkilerden biri, eritrositlerin depolama sırasında membranlarının deforme olmaları ile ilgilidir. İn vivo olarak, eritrositlerin sağ kalımlarını korumak için özellikle kılcal damarlardan ve dalaktan geçerken şekillerini adapte etmeleri gerekmektedir. Ek olarak, protein hücre iskeleti üzerinde meydana gelen hasar, eritrositlerin kırılabilirliğini arttıran ve yaşayabilirliklerini azaltan membran elastikiyetini azaltabilir (Hess 2014, Mustafa, Al Marwani et al. 2016). Pich ve ark. (Pich, Castagnoli et al. 2002) depolama sırasında oksidatif hasarı hafifletmek için antioksidanların kullanımını önermişlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada, oksidatif stresi azaltmak için ubiquinol ve Coenzyme Q kullanmışlar ve bu bileşiklerin, depolama ile ilişkili ortaya çıkan oksidatif stres için çözümün çok basit olmadığını kanıtlayan toksik etkiler gösterdiğini tespit etmişlerdir. Nitekim çalışmamızda da kontrol, rosmarinik asit ve lipoik asit gruplarının tümünde zamana bağlı olarak eritrosit MDA seviyeleri artmış, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuç, bu çalışma ile denediğimiz rosmarinik asit ve lipoik asitin, oksidatif strese yol açan lipit peroksidasyonunu önleyici belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

GSH'nin hücre içinde antioksidan savunmasını temsil eder ve azalması, serbest oksijen radikallerindeki bir artışla ilişkilidir. Depo kanlarda GSH'nin yaklaşık 2. günde % 50'ye varan oranda azaldığı ve bu değişimin depo kanlarda bulunan katkı maddelerinin formül ve bileşik konsantrasyonlarındaki farklılıkla değişebileceği bildirilmiştir (Quintero, Núñez et al. 2015)

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunun, H₂O₂ ve oksijenine dönüşümünü katalize eden güçlü bir antioksidan enzimdir. Yine glutatyon peroksidaz, yapısındaki glutatyonu da kullanarak, H₂O₂ veya organik peroksidlerin sırasıyla su ve alkole dönüşümünü katalizler.

SOD ve katalaz, detoksifiye edici maddeler olarak kullanılan ve serbest oksijen radikal ürünlerine karşı en güçlü enzimlerdir. Eğer ortamda GSH ve GSH-Px, serbest oksijen radikallerini süpürmek için yeterli değilse, SOD ve katalaz süpürücü rolü üstlenmektedir (Qasim and Mahmood 2015).

Eckstein ve ark. (Eckstein, Zimmermann et al. 2015) koruyucu olarak SAGM kullanılan kan torbalarındaki oksidatif değişimin zamana göre değişimini göstermeyi amaçladıkları çalışmalarında depo kanlarda SOD ve katalazın in vitro enzim aktivitelerini ölçmüş ve depolama süresi boyunca bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir farklılık göstermediğini gözlemlemiştir. Aynı çalışmada, MDA konsantrasyonu 28. ve 42. günlerde anlamlı olarak daha düşük tespit edilmiş olmasına rağmen depolama periyodu boyunca MDA seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığı ifade edilmektedir. MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı gerçeğinden yola çıkarak antioksidatif metabolizmanın daha önce tahmin edilene göre daha dirençli olduğu sonucunu savunmuşlardır. Ayrıca ölçümü yapılan Redükte GSH'ın, tüm depolama periyodu boyunca toplam GSH'nin yaklaşık yüzde yüzünü temsil ettiği de bildirilmektedir. Katalaz ve SOD'un azalan aktivitelerinin tespit edilmediği dolayısıyla, tüm bu sonuçların depolama periyodunun sonuna kadar RBC'lerin test edilmiş tüm antioksidatif mekanizmalarının işlevselliğini gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda SOD aktivitesi her üç grupta da anlamlı bir değişiklik göstermedi. Sadece rosmarinik asit grubunda 56. günde başlangıç seviyesine göre anlamlı olarak yüksekti. Katalaz ise her üç grupta da 14. Günden itibaren yükseldi ve bu yükseklik gruplara göre kısmen devam etti. GSH-Px aktiviteleri ise 14. günde üç grupta da düştü. Ancak daha sonra başlangıç seviyeleriyle kayda değer anlamlı değişiklik gözlenmedi. Bu sonuçlar üç grupta da SOD seviyelerinin zamana bağlı olarak değişmediğini, GSH-Px seviyelerinin geçici de olsa azaldığını ve oksidatif strese karşı koymak amacıyla özellikle antioksidan statüyü kompanse etmek amaçlı katalaz seviyelerinde artış olduğunu göstermektedir. Ancak bulgularımız rosmarinik asit ve lipoik asitin antioksidan kapasiteyi destekleyici ilave bir katkısının olmadığını da göstermektedir.

Her ne kadar hemoglobinin oksijen afinitesi üzerine birçok organik ve inorganik fosfatların etkisi varsa da, insan eritrositlerinde sadece 2,3-DPG ve ATP miktarı hemoglobinin oksijen afinitesini etkileyebilecek seviyededir. Oksijenini kaybetmiş eritrositlerde glikolitik aktivitenin daha fazla olduğu ve bu yüzden de daha çok 2,3-DPG sentezledikleri kaydedilmiştir. 2,3-DPG'nin eritrositlerin membran fosforilasyonunda ve kinaz enzimlerinin membranla birleşmesinde de düzenleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Kan bankalarında depo edilen kanlarda eritrosit içi 2,3-DPG ve daha az oranda ATP miktarı azalmakta ve bunun sonucunda hemoglobinin oksijen afinitesi artmaktadır. Organik fosfatların miktarlarının azalması hücre dışına çıkmalarından ziyade başka maddelere metabolize olmalarından dolayıdır. Böyle bir kan ağır bir hastaya verildiğinde fonksiyonunu tam yapamaz. Depo

edildikten sonra hastaya verilen kanın eritrositleri 2,3-DPG'ın % 50 kadarını 24 saatte tekrar kazanırlar (AKKUŞ, TÜRKMEN et al. 1988). Enerji kaynağı olarak ATP, hücre iskeleti esnekliğinin ve fosfolipit asimetrisinin idame ettirilmesi ve eritrositlerin genel işleyişi için önemlidir. Lagerberg ve ark. (Lagerberg, Korsten et al. 2017) yapmış oldukları zamana bağlı farklı ek solüsyonların etkisinin araştırıldığı çalışmalarında, depolamanın ilk üç haftası boyunca, ATP içeriğinin SAGM ve PAGGSM ile nispeten sabit kaldığı, daha uzun süreli depolamada, tüm eritrositlerde ATP seviyelerinin kademeli olarak azaldığı, 21. günde, SAGM'deki eritrosit ATP seviyelerinin, diğer AS'lere kıyasla anlamlı derecede düştüğünü bildirmişlerdir. 42. günde ise diğer AS'ler arasında ATP içeriğinde bir farklılık bulunmadığını göstermişlerdir. SAGM'deki torbalarda, artmış ortalama korpuskular hacim ve hematokrit düzeyleri bildirmişlerdir.

Eritrositlerin enerji durumunun muhafaza edilmesi, eritrosit fonksiyonu ve in vivo hayatta kalma açısından çok önemlidir. Hansen ve ark. (Hansen, Kurach et al. 2015) yaptıkları çalışmada eritrositlerde ATP ve 2,3-DPG seviyeleri arasında, hem 5. gün hem de 42. günde anlamlı farklılıklar olduğunu, bununla birlikte MCV değerlerinin de depolama süresince arttığını ifade etmişlerdir.

Belli bir kandaki kırmızı kan hücreleri tarafından işgal edilen hacim hematokrit olarak adlandırılmakta ve yaygın olarak tüm kan örneği hacminin bir yüzdesi olarak ifade edilmektedir. Mustafa ve ark. (Mustafa, Al Marwani et al. 2016) yaptıkları çalışmada 0. gün hematokritin değerini %63 ve 42. günde ise %70 olarak tespit etmişlerdir. Bu artışın, eritrosit membranında meydana gelen depo lezyonlarına bağlı olarak mikrohasara uğrayan zarlarının parçalarını kaybetmesi dolayısı ile yüzey alanı-hacim oranındaki azalmaya bağlı oluşan morfolojik değişikliklerin uzun süreli depolama sonucu hematokritin artması ile yansıtılması olarak açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda üç grupta da 2,3 DPG seviyelerinin değişmediği, ATP'nin ise kontrol grubunda azaldığı, ancak rosmarinik asit grubunda değişmediği, lipoik asit grubunda ise 56. günde anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Bu durumda 2,3 DPG düzeylerindeki düşüşü önlemede rosmarinik asit ve lipoik asitin koruyucu etkisi gözlenmezken, RBC, MCV, HCT, HGB, MCH, MCHC düzeylerinin gruplar arası ve zamana bağlı anlamlı değişiklikler göstermemesi bu moleküllerin ATP üzerine koruyucu etkilerinin bir yansıması olabileceğini düşündürmektedir.

Biz geçmiş yıllarda depo kanlarda oksidatif stres ve bu stresin neden olduğu olumsuzlukları önlemek amacıyla depo kanlara katılacak çeşitli koruyucuların etkileri üzerine bir dizi çalışma gerçekleştirdik. İlk olarak 1997 yılında yaptığımız çalışmada bir ay boyunca eritrosit membran ve plazma MDA formasyonunda ve transfüzyon için kullanılan tam kanda hücre içi antioksidan enzim statüsünde anlamlı bir şekilde değişiklik olduğunu, oksidatif stresin arttığını gösterdik (Aslan, Sekeroğlu et al. 1997). Daha sonra depo kanlarda çeşitli kimyasalların koruyucu etkilerini araştırmaya yöneldik. Bu amaçla Melatonin ve propofolün

depolanmış kanlarda lipit peroksidasyonu ve eritrositlerin antioksidan kapasiteleri üzerine olan etkilerini araştırdık ve melatoninin lipid peroksidasyonunu önlediğini, eritrositlerin in vitro oksidasyona direncini artırabileceğini ancak propofolun bu etkiyi göstermediğini belirledik (Şekeroğlu, Huyut et al. 2012). Bir başka çalışmamızda Resveratrol ve kafeik asitin eritrositlerde malondialdehid birikimini önlediğini ve glutasyon seviyelerini , glutasyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerini koruduğunu; Resveratrol, kafeik asit ve tanik asitin, depo kandaki eritrositlerin in vitro oksidasyonuna olan duyarlılığını azaltabileceğini ancak karbonik anhidraz aktivitesi üzerinde bu gibi etkiler göstermediğini gözlemledik (Huyut, Şekeroğlu et al. 2016). Yine Resveratrol ve serotoninin zamana bağlı olarak depo kanlardaki eritrositlerin antioksidan kapasitesi üzerindeki etkileri ve oksidasyona yatkınlığını araştırdığımız bir başka çalışmamızda resveratrolün eritrositlerin oksidasyona yatkınlığını azalttığını ve antioksidan kapasitelerini korumaya yardımcı olduğunu, karbonik anhidraz aktivitesini de zamana bağlı olarak kısmen koruduğunu gösterdik (Huyut, Şekeroğlu et al. 2018). Son olarak bu projedeki çalışmamızda ise total depo kanda çalışmak yerine artık son yıllarda daha çok tercih edilen depo eritrosit paketlerinde çalıştık. Böylece, lipoik asit ve rosmarinik asidin eritrosit paketlerindeki oksidatif stresin yanı sıra eritrositlerin enerji ve 2,3 bifosfogliserat düzeyleri de olmak üzere birçok biyokimyasal ve metabolik parametrelerin etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda depo eritrositler üzerine olumlu etkilerinin olacağını düşünerek lipoik asit ve rosmarinik asidi seçmemizin sebebi bunların güçlü antioksidan özelliğe sahip olmalarıdır. Nitekim Alfa lipoik asit (ALA), diyetlerimizde doğal olarak bulunan ve hücrenin hem sulu hem de lipit kısımlarında çözünebilen bir organosülfür bileşiğidir. ALA'nın, oksidatif strese karşı C vitamini, E vitamini ve glutatyondan daha etkili olan güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Shay, Moreau et al. 2009). Ayrıca Alfa-lipoik asit (1,2-ditiolan-3-pentanoik asit LA), (i) reaktif oksijen türleri-süpürücü aktivite; (ii) glutasyon ve C ve E vitaminleri ve (iii) metal-şelatlama aktivitesi gibi endojen antioksidanları yeniden üretme kapasitesi olarak üç farklı etki ile hareket edebilen güçlü bir antioksidandır (Favero, Rodella et al. 2015). Rosmarinic acid (RA) de güçlü antioksidan ve antienflamatuar aktiviteye sahip fenolik bir bileşiktir. RA'nın, reaktif oksijen türleri (ROS) atılımı yoluyla H₂O₂ kaynaklı hücre ölümünü modüle ederek güçlü antioksidan aktivite gösterdiği ve lipit peroksidasyonunu baskıladığı da bildirilmiştir. (Fonteles, de Souza et al. 2016). Ayrıca, RA, birçok patolojik durumda yaygın olarak görülen oksidatif strese bağlı DNA hasarına karşı güçlü bir koruyucu olarak kabul edilir. (Mushtaq, Schmatz et al. 2015). Yine RA, güçlü bir SOD benzeri radikal süpürücü aktivite sergilemektedir. Bunu da, muhtemelen dört hidroksil grubu ve diğer fenoliklere göre daha yüksek verim sağlayan CH = CH-COOH fonksiyonel grubunun varlığı nedeniyle ortaya çıkarmaktadır (Govindaraj and Pillai 2015). Bizim de çalışmamızda lipoik asit ve rosmarinik asidi seçmemizin ilk nedeni bu moleküllerin antioksidan özellikleridir. İkinci sebep de bu

moleküllerin şu ana kadar depo kanlar da ya da kan komponentlerinde koruyucu etkilerinin çalışılmış olmamasıdır.

Sonuç olarak bu çalışmamızda, oksidatif hasarın iyi bir göstergesi olan eritrosit MDA ve invitro oksidasyona duyarlılık düzeylerinin tüm gruplarda zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte toplam oksidatif kapasite her ne kadar gruplar arasında farklılıklar gösterse de zamana bağlı olarak artmış ve oksidatif hasarın önlenme düzeyini gösteren total antioksidan kapasitenin de bu hasarı önleyecek düzeye çıkamadığı belirlenmiştir. Yine, hesaplanan oksidatif hasar indeksinin özellikle 28. günde en yüksek düzeye çıktığı, sonraki süreçte azalsa da yeterli antioksidan adaptasyonu sağlayamadığı gözlemlenmiştir. GSHPx, katalaz ve SOD seviyeleri de gruplar arasında farklılıklar gösterse de zamana bağlı olarak oksidatif hasarı bertaraf edebilecek düzeye erişememiştir. Bununla birlikte daha az potent bir antioksidan olan GSHPX aktivitesi zamana bağlı olarak yeterli aktiviteyi gösterememiştir. ATP ve 2,3 BPG düzeyleri hemoglobinin oksijene affinitesini ve enerji metabolizmasını etkileyecek iki parametre olarak çalışmamızda oksidatif stresin artmış olmasına rağmen kısmen korunmuştur. Bu da in-vivo olarak eritrositlerin halen aktivite gösterebileceği izlenimi vermektedir. RBC sayıları zamana bağlı sabit kalış olup, aynı zamanda hücre zarı lipid tabakanın canlılığını gösteren MCV seviyelerinde de anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. 2,3 BPG düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, ATP düzeyleri açısından özellikle rosmarinik asit grubu başta olmak üzere lipoik asit grubunda da başlangıç seviyesine göre önemli oranda korunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak depo eritrositlerde rosmarinik asit ve lipoik asitin oksidan-antioksidan statüye olumlu katkı sağlayacak kayda değer bir etkileri gözlenmezken ATP'yi koruyucu etkilerinin gözlendiği söylenebilir. Dolayısıyla rosmarinik asit ve lipoik asitin depo eritrositlerin "depo lezyonları" olarak bilinen biyokimyasal ve metabolik olumsuzlukları önleyerek depo kanlarda eritrosit yaşam kalitesi üzerine kayda değer bir etkisinin belirlenemediğini ifade etmek gerekir.

6. Kaynaklar

"Neonatal vitamin D status at birth at latitude 321720: evidence of deficiency."

Akkuş, İ., F. Türkmen And M. M. Yeğın (1988). "2, 3-Difosfogliserat (2, 3-DPG) Ve Klinik Önemi." Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences **8**(5): 363-367.

Alpınar, A., E. Torun, E. Özkaya, S. Uzuner and U. Erenberk (2012). "Anne sütü ve mama ile beslenen süt çocuklarında toplam antioksidan düzeylerinin karşılaştırılması." Türk Pediatri Arşivi **47**(2).

Antosik, A., K. Czubak, A. Gajek, A. Marczak, R. Glowacki, K. Borowczyk and H. M. Zbikowska (2015). "Influence of pre-storage irradiation on the oxidative stress markers, membrane integrity, size and shape of the cold stored red blood cells." Transfusion Medicine and Hemotherapy **42**(3): 140-148.

Aslan, R., M. Sekeroğlu, M. Tarakçioğlu and H. Köylü (1997). "Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood." Haematologia **28**(4): 233-237.

Beutler, E. (2006). Williams hematology, McGraw-Hill New York.

Blasi, B., A. D'alessandro, N. Ramundo and L. Zolla (2012). "Red blood cell storage and cell morphology." Transfusion medicine **22**(2): 90-96.

Burtis, C. A. and D. E. Bruns (2014). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book, Elsevier Health Sciences.

D'Amici, G. M., C. Mirasole, A. D'Alessandro, T. Yoshida, L. J. Dumont and L. Zolla (2012). "Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome." Blood Transfusion **10**(Suppl 2): s46.

Ding, H.-Y., T.-H. Chou and C.-H. Liang (2010). "Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*." Food Chemistry **123**(2): 254-262.

Eckstein, M., R. Zimmermann, T. Roth, B. Hauck-Dlimi, E. Strasser and W. Xiang (2015). "The effects of an overnight holding of whole blood at room temperature on haemoglobin modification and in vitro markers of red blood cell aging." Vox sanguinis **108**(4): 359-367.

Fairbanks, V. and G. Klee (1986). "Measurement of hemoglobin concentration in whole blood." Text Book of Clinical Chemistry: 1532-1534.

Favero, G., L. F. Rodella, L. Nardo, L. Giugno, M. A. Cocchi, E. Borsani, R. J. Reiter and R. Rezzani (2015). "A comparison of melatonin and α -lipoic acid in the induction of antioxidant defences in L6 rat skeletal muscle cells." Age **37**(4): 83.

Fonteles, A. A., C. M. de Souza, J. C. de Sousa Neves, A. P. F. Menezes, M. R. S. do Carmo, F. D. P. Fernandes, P. R. de Araújo and G. M. de Andrade (2016). "Rosmarinic acid

prevents against memory deficits in ischemic mice." Behavioural Brain Research **297**: 91-103.

Govindaraj, J. and S. S. Pillai (2015). "Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipototoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats." Molecular and cellular biochemistry **404**(1-2): 143-159.

Guppy, M., R. Sabaratnam, S. Devadason and M. Whisson (1990). "Fructose formation in stored blood." Biochemistry international **21**(2): 219-224.

Gülçin, İ. (2006). "Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid)." Toxicology **217**(2-3): 213-220.

Gültekin, F., M. Akdogan, I. Altuntas, N. Delikbaş and M. Kaptanagasi (2000). "Changes in erythrocyte lipid peroxidation and antioxidant potential and storage of blood and protective effect of melatonin." Turkish Journal of Biochemistry **25**(3): 83-91.

Hansen, A., J. Kurach, T. Turner, C. Jenkins, M. Busch, P. Norris, J. Dugger, P. Tomasulo, D. Devine and J. Acker (2015). "The effect of processing method on the in vitro characteristics of red blood cell products." Vox sanguinis **108**(4): 350-358.

Hess, J. (2014). "Measures of stored red blood cell quality." Vox sanguinis **107**(1): 1-9.

Hiller, S., R. DeKroon, E. D. Hamlett, L. Xu, C. Osorio, J. Robinette, W. Winnik, S. Simington, N. Maeda and O. Alzate (2016). "Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1860**(1): 36-45.

Huyut, Z., M. R. Şekeroğlu, R. Balahoroğlu and M. T. Huyut (2018). "Characteristics of resveratrol and serotonin on antioxidant capacity and susceptibility to oxidation of red blood cells in stored human blood in a time-dependent manner." Journal of International Medical Research **46**(1): 272-283.

Huyut, Z., M. R. Şekeroğlu, R. Balahoroğlu, T. Karakoyun and E. Çokluk (2016). "The Relationship of Oxidation Sensitivity of Red Blood Cells and Carbonic Anhydrase Activity in Stored Human Blood: Effect of Certain Phenolic Compounds." BioMed research international **2016**.

Khoschsorur, G., B. Winklhofer-Roob, H. Rabl, T. Auer, Z. Peng and R. Schaur (2000). "Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials." Chromatographia **52**(3-4): 181-184.

Kızılay. from <http://www.kizilay.org.tr/KizilayMedya/Reader/97/book6/page7>.

Knight, J., R. Voorhees and L. Martin (1992). "The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes." Annals of Clinical & Laboratory Science **22**(4): 207-213.

- Lagerberg, J. W., H. Korsten, P. F. van der Meer and D. de Korte (2017). "Prevention of red cell storage lesion: a comparison of five different additive solutions." Blood Transfusion **15**(5): 456.
- Lei, C. and L.-Z. Xiong (2015). "Perioperative red blood cell transfusion: what we do not know." Chinese medical journal **128**(17): 2383.
- Marwaha, N. and R. Sharma (2009). "Consensus and controversies in platelet transfusion." Transfusion and Apheresis Science **41**(2): 127-133.
- Matsuyama, H., F. Niklasson, C. de Verdier and C. Högman (1989). "Phosphoenolpyruvate in the rejuvenation of stored red cells in SAGM medium: Optimal conditions and the indirect effect of methemoglobin formation." Transfusion **29**(7): 614-619.
- Mushtaq, N., R. Schmatz, M. Ahmed, L. B. Pereira, P. da Costa, K. P. Reichert, D. Dalenogare, L. P. Pelinson, J. M. Vieira and N. Stefanello (2015). "Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats." Journal of physiology and biochemistry **71**(4): 743-751.
- Mustafa, I., A. Al Marwani, K. Mamdouh Nasr, N. Abdulla Kano and T. Hadwan (2016). "Time dependent assessment of morphological changes: leukodepleted packed red blood cells stored in SAGM." BioMed research international **2016**.
- Orlov, D. and K. Karkouti (2015). "The pathophysiology and consequences of red blood cell storage." Anaesthesia **70**: 29-e12.
- Öztürk Sarıkaya, S. (2009). "Bazı Fenolik Asitlerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (HCA-I VE HCA-II) Üzerine Etkilerinin İncelenmesi,(Doktora Tezi)." Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Peng, X., X. Wang, W. Qi, R. Su and Z. He (2016). "Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability." Food chemistry **192**: 178-187.
- Pich, M. M., A. Castagnoli, A. Biondi, A. Bernacchia, P. L. Tazzari, M. D'Aurelio, G. P. Castelli, G. Formigini, R. Conte and C. Bovina (2002). "Ubiquinol and a coenzyme Q reducing system protect platelet mitochondrial function of transfusional buffy coats from oxidative stress." Free radical research **36**(4): 429-436.
- Qasim, N. and R. Mahmood (2015). "Diminution of oxidative damage to human erythrocytes and lymphocytes by creatine: possible role of creatine in blood." PloS one **10**(11): e0141975.
- Quintero, M., M. Núñez, S. Mellado, M. Maldonado and S. Wehinger (2015). "Evaluation of store lesion in platelet obtained by apheresis compared to platelet derived from whole blood and its impact on the in vitro functionality." Transfusion and Apheresis Science **53**(3): 293-299.

- Racek, J., R. Herynková, V. Holeček, Z. Jeřábek and V. Sláma (1997). "Influence of antioxidants on the quality of stored blood." Vox Sanguinis **72**(1): 16-19.
- Reinhart, W. H., N. Z. Piety, J. W. Deuel, A. Makhro, T. Schulzki, N. Bogdanov, J. S. Goede, A. Bogdanova, R. Abidi and S. S. Shevkopyas (2015). "Washing stored red blood cells in an albumin solution improves their morphologic and hemorheologic properties." Transfusion **55**(8): 1872-1881.
- Shay, K. P., R. F. Moreau, E. J. Smith, A. R. Smith and T. M. Hagen (2009). "Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1790**(10): 1149-1160.
- Stocks, J., E. Offerman, C. Modell and T. Dormandy (1972). "The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease." British Journal of Haematology **23**(6): 713-724.
- Su, Q., J.-J. Liu, W. Cui, X.-L. Shi, J. Guo, H.-B. Li, C.-J. Huo, Y.-W. Miao, M. Zhang and Q. Yang (2016). "Alpha lipoic acid supplementation attenuates reactive oxygen species in hypothalamic paraventricular nucleus and sympathoexcitation in high salt-induced hypertension." Toxicology letters **241**: 152-158.
- Şekeroğlu, M. R., Z. Huyut and A. Him (2012). "The susceptibility of erythrocytes to oxidation during storage of blood: effects of melatonin and propofol." Clinical biochemistry **45**(4-5): 315-319.
- Torun, E., B. Tanyeri, N. Ünsal, A. D. Demir, S. Bayraktar and F. Öktem (2013). "The effect of phototherapy on oxidative stress in newborns with indirect hyperbilirubinemia." Dicle Medical Journal **40**(3): 379-383.
- Valeri, C., D. Valeri, A. Gray, A. Melaragno, R. Dennis and C. Emerson (1982). "Viability and function of red blood cell concentrates stored at 4 degrees C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2, or CPDA-3." Transfusion **22**(3): 210-216.
- Van't Erve, T. J., B. A. Wagner, S. M. Martin, C. M. Knudson, R. Blendowski, M. Keaton, T. Holt, J. R. Hess, G. R. Buettner and K. K. Ryckman (2015). "The heritability of hemolysis in stored human red blood cells." Transfusion **55**(6): 1178-1185.

7. Ekler

Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Karar Formu

*KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Depolanan Eritrositlerde Zamana Bağlı Olarak Gözlenen Depo Lezyonları: Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asitin Koruyucu Etkisi	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	Yok	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:07	Tarih: 05.05.2016
	Prof.Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu/oy birliği ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr. Oğuz TUNCER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr. Oğuz TUNCER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Şükran SEVİMLİ	Tıp Tarihi ve Etik	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Sıddık KESKİN	İstatistik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Hasan Ali GÜMRÜKÇÜOĞLU	Kardiyoloji	Özel Van Lokman Hekim Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Murat DOĞAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. M.Fatih GARÇA	KBB	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Hüseyin BEĞENİK	Dahiliye	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. M.Bilal ÇEĞİN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Numan ÇİM	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Ramazan ÜSTÜN	Fizyoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Ersoy ÖKSÜZ	Farmakoloji Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Fatma PEKER	Hukuk	Van Güvenlik Meslek Yüksek Okulu	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Çiğdem ÖNER	Üniversite Mezun	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr. Oğuz TUNCER
İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MEHMET RAMAZAN ŞEKEROĞLU
Proje No:	216S474
Proje Başlığı:	Depolanan Eritrositlerde Zamana Bağlı Olarak Biyokimyasal Depo Lezyonlarında Gözlenen Değişiklikler: Rosmarinik Ve Alfa Lipoik Asitin Koruyucu Etkisi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	8
Araştırmacılar:	ERDEM ÇOKLUK, ZÜBEYİR HUYUT
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	SAKARYA Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2017 - 01/07/2018
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	28150.0
Öz:	<p>Transfüzyon için depo edilen eritrositler 2-6°C'de ve uygun şartlar altında 42 gün kadar depolanabilmektedir. Depolanmış eritrositlerde, depolamanın ilk evresinden başlamak üzere morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel birtakım değişiklikler meydana gelmekte ve bunların tümü depo lezyonları olarak isimlendirilmektedir. Bu depo lezyonları, geçen zamana bağlı olarak eritrositlerin yaşam sürelerini ve verimliliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Eritrositlerin maksimum depolama süreleri ve etkinlikleri, depolandıkları ortam ve koruyucu solüsyonların içeriğine bağlıdır. Bu nedenle eritrositlerin depolama sürelerini daha uygun bir şekilde artırmak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaca yönelik olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, depo lezyonlarının en aza indirilmesi ve eritrositlerin yaşam sürelerinin uzatılması için çeşitli koruyucu solüsyonlar geliştirilmiş ve bu solüsyonlara vitamin E, vitamin C, melatonin gibi çeşitli antioksidanların ilavesinin olumlu koruyucu etkileri rapor edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada antioksidan özellikleri bilinen Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit'in depolanmış insan eritrositlerindeki zamana bağlı biyokimyasal depo lezyonlarına karşı koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.</p> <p>Bu amaçla sağlıklı 10 gönüllüden CPDA (sitril-fosfat-dekstroz-adenin) içeren kan torbalarına birer ünite kan alınarak lökositleri uzaklaştırıldı ve SAGM (saline, adenin, glukoz, mannitol) içeren eritrosit torbalarında depolandı. Her vericinin eritrosit paketi üç eşit parçaya bölünerek transfer torbalara aktarıldı. Birinci gruptaki eritrositlere herhangi bir işlem yapıldı ve bu grup kontrol grubu olarak kabul edildi (n=10). İkinci grup eritrosit paketlerine 10 µg/mL Rosmarinik Asit, üçüncü grup eritrosit paketlerine 10 µg/mL Alfa Lipoik Asit ilave edildi (sırasıyla Rosmarinik Asit ve Lipoik Asit grubu). Her üç grupta da +4°C'de bekletilen eritrosit paketlerinden başlangıç, 14, 28, 42 ve 56?ncü günlerde numuneler alındı. Bu numunelerde eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı, Total oksidan Seviye (TOS), Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü, Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplaması, ATP, 2,3-bifosfogliserat, katalaz (CAT), süperoksid dizmutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), redükte glutatyon (GSH), ortalama eritrosit sayısı ve hacmi belirlendi.</p> <p>Üç grup birbiriyle karşılaştırıldığında ölçülen parametrelerin ortalamaları arasında kısmen farklılık olsa da, bu farklılıklar Rosmarinik ve Alfa Lipoik Asit gruplarının birbirinden ya da bu iki grubun kontrol grubundan tamamen (ya da büyük oranda) farklılığını yansıtan anlamda değildi. Ancak gruplarda ölçülen Parametrelerinin ortalamaları kendi içlerinde başlangıç günü ortalamaları ile karşılaştırıldığında MDA ve invitro oksidasyona duyarlılık düzeylerinin üç grupta da zamanla arttığı, yine katalaz ve GSHPx düzeylerinin 14. günde artmış olduğu, OSI'nin 28., 42. ve 56. günlerde yükseldiği tespit edildi. ATP'nin ise kontrol grubunda azaldığı, ancak rosmarinik asit grubunda değişmediği, lipoik asit grubunda ise 56. günde anlamlı olarak düştüğü, gözlenmiştir SOD, ATP, 2,3BPG, MCV, HGB, MCH, MCHC düzeylerinde ise zamanla değişiklik olmadığı görüldü.</p> <p>Bu sonuçlar; rosmarinik asit ve lipoik asitin depo eritrositlerde kısmen ATP'yi koruyucu etkilerini gösterse de; ne oksidan-antioksidan statü ne de biyokimyasal depo lezyonlarını önleyerek eritrosit yaşam kalitesi üzerine kayda değer olumlu bir etkilerini göstermemiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Depo eritrosit, lipoik asit, rosmarinik asit, biyokimyasal depo lezyonları

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu
Mu?:

Hayır

TÜBİTAK