

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**CRUCIFERAE ve CHENOPODIACEAE BİTKİLERİNİN
ANTIAGREGAN, FİBRİNOLİTİK, ANTİTROMBİNİK ve
ANTİMİTOTİK AKTİVİTELERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DENEYİMLERİ MERKEZİ

99004

Ecz. Gamze Yüksel

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. K. Turay Yardımcı
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

İstanbul, 2000



Tezimi hazırlarken yardımlarını ve desteğini esirgemeyen başta değerli danışmanım M.Ü. Rektörü Prof. Dr. K. Turay YARDIMCI olmak üzere M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tüm öğretim elemanlarına çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
KISALTMALAR.....	iii

1.GİRİŞ.....1

1.1. <i>Cruciferae</i> ve <i>Chenopodiaceae</i> Bitkileri ve Biyolojik Aktiviteleri.....	2
1.2. Hemostaz.....	3
1.2.1. Trombosit agregasyonu ve inhibitörleri.....	5
1.2.2. Fibrin oluşumu ve antitrombinikler.....	10
1.2.3. Fibrinoliziz.....	11

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler.....	13
2.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri.....	13
2.3. Olguların Seçimi.....	14
2.4. Proteinlerin İzolasyonu.....	14
2.5. Trombosit Agregasyon Testi.....	17
2.6. Fibrinolitik Aktivite Testleri	
2.6.1. Fibrin plak testi.....	17
2.6.2. Euglobulin erime zamanı.....	18
2.7. Trombin Zamanı.....	19
2.8. Antimitotik Etki.....	19
2.9. Trombosit Sayımı.....	20

2.10. SDS-PAGE ile Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Tayini.....	20
2.10.1. Gerekli çözeltiler.....	20
2.10.2. Yöntem.....	21
2.11. İstatistiksel Analizler.....	23

3. BULGULAR

3.1. Protein Ekstrelerinin ADP ile İndüklenen Trombosit Agregasyonuna Etkileri.....	24
3.2. Protein Ekstrelerinin Fibrinolitik Sisteme Etkileri	
3.2.1. Fibrin plak eritme kuvveti.....	27
3.2.2. Protein ekstrelerinin EEZ'ye etkileri.....	29
3.3. Protein Ekstrelerinin Trombin Zamanına Etkileri.....	33
3.4. Protein Ekstrelerinin Mitoz Bölünmeye Etkileri.....	36
3.5. Protein Ekstrelerinin Moleküler Ağırlıkları.....	38

4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
----------------------------------	-----------

5. KAYNAKLAR.....	42
--------------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada, *Cruciferae* familyasına ait beyaz lahanaya, brüksel lahanası ve kara lahanaya ile *Chenopodiaceae* familyasına ait ıspanak ve pazı sebzelerinden aseton ve amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilen proteinlerin antiagregan, fibrinolitik, antitrombinik ve antimitotik aktiviteleri araştırıldı. Bu proteinlerin SDS-PAGE (Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile moleküler ağırlıkları belirlendi.

Bryston agregometresinde yapılan ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu çalışmalarında, ıspanak dışındaki örneklerin doza bağımlı olarak trombosit agregasyonunun primer ve sekonder dalgalarını inhibe ettikleri görüldü. Örneklerin fibrinolitik aktiviteleri fibrin plak (Astrup) ve EEZ (Euglobulin erime zamanı, Copley) yöntemleriyle değerlendirildiğinde, doza bağımlı olarak fibrin plakta eritme alanlarını arttırdıkları (n:5) ve EEZ'yi kısalttıkları belirlendi (n:7). Bütün örneklerin trombin zamanını uzattıkları yani antitrombinik etki gösterdikleri görüldü (n:7). ıspanak dışındaki örneklerin fasulye ve mercimek filizlerinde büyümeyi durdurdukları veya yavaşlattıkları yani antimitotik etkili oldukları gözlemlendi (n:2).

SDS-PAGE analizinde, sırasıyla brüksel lahanasına, beyaz lahanaya, kara lahanaya, pazıya ve ıspanağa ait 61.200 ve 16.400 Da; 61.200 ve 9.300 Da; 60.000, 57.300 ve 53.400 Da; 55.700, 42.600 ve 31.000 Da ile 34.000 Da moleküler ağırlıkta protein bantları gözlemlendi.

SUMMARY

In this study, the antiaggregative, fibrinolytic, antithrombinic and antimitotic activities of proteins obtained by acetone and ammonium sulfate precipitation from the *Cruciferae* (cabbage, kale, brussel sprouts) and *Chenopodiaceae* (spinach and swiss chard) families were investigated. The molecular weights of these proteins were determined by SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

When ADP-induced aggregation was performed in Bryston aggregometer, it was found that all samples except spinach inhibited primary and secondary waves of platelet aggregation dose-dependently. When fibrinolytic activity of samples were examined by fibrin plate method (Astrup) and EEZ (Euglobulin lysis time) test, it was found that all of the samples increased lysis zones on fibrin plate (n:5), and shortened euglobulin lysis time dose-dependently (n:7). It was also found that all of the samples extended thrombin time that they had antithrombinic activity (n:7); and all samples except spinach stopped or slowed the growth of beans and lentil shoots thus demonstrating an antimitotic effect (n:2).

In SDS-PAGE analysis, brussel sprouts, cabbage, kale, swiss chard and spinach had protein bands respectively with molecular weights of 61.200 and 16.400 Da; 61.200 and 9.300 Da; 60.000, 57.300 and 53.400 Da; 55.700, 42.600 and 31.000 Da; 34.000 Da.

KISALTMALAR

AC	: Adenilat siklaz	PGH ₂	: Prostaglandin H ₂
ADP	: Adenozindifosfat	PKC	: Protein kinaz C
APS	: Amonyum persülfat	PIP ₂	: Fosfoinozitol difosfat
AT-III	: Antitrombin-III	PLA ₂	: Fosfolipaz A ₂
ATP	: Adenozintrifosfat	PLC	: Fosfolipaz C
BFB	: Bromfenol mavisi	SDS	: Sodyumdodesilsülfat
BSA	: Sığır serum albumini	SF	: Serum fizyolojik
c-AMP	: Siklik AMP	TEMED	: N,N,N',N',- tetrametiletilendiamin
DAG	: Diaçilgliserol	TF	: Trombosit faktörü
EEZ	: Euglobulin erime zamanı	t-PAI	: Doku plazminojen aktivatörü inhibitörü
FV	: Proakselerin	TxA ₂	: Tromboksan A ₂
FVII	: Serum protrombin konversiyon akseleratörü	PRP	: Trombositten zengin plazma
FVIII	: Antihemofilik faktör-A	PPP	: Trombositten fakir plazma
FIX	: Antihemofilik faktör-B		
FX	: Stuart faktörü		
FXI	: Antihemofilik faktör-C		
FXII	: Hageman faktörü		
FXIII	: Fibrin stabilize edici faktör		
Gi	: İnhibitör G proteini		
Gp	: Pertussis toksinine duyarlı G proteini		
Gs	: Stimülan G proteini		
GP	: Glikoprotein		
IP ₃	: İnozitoltrifosfat		
MET	: Merkaptoetanol		

1. GİRİŞ

Yurtsever ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, Brassica oleracea var. capitata ve var. acephala (Beyaz lahana ve kara lahana) yapraklarından elde edilen protein yapısındaki bir maddenin antiagregan, profibrinolitik, antitrombotik, antitümoral (1-7) ve antibakteriyel (7,8) etkileri tesbit edilmiştir. Aynı madde in vivo olarak Mus musculus farelerde lökosit sayısını ve formülünü (9-12), % hematokrit değerini, hemogloblin düzeyini, eritrosit sayısını, glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeylerini (12-14), lipid peroksidasyonunu (15), değişik dokularda çinko, bakır ve magnezyum seviyelerini (16), böbrek fonksiyonlarını ve serum elektrolitlerini (17) etkilediği de gösterilmiştir. Beta vulgaris L.cicla bitkisinin (Pazı) antidiabetik etkili olduğu saptanmıştır (18).

Bu çalışmadaki amaç, Cruciferae familyasına ait brüksel lahanası, beyaz lahana ve kara lahana ile Chenopodiaceae familyasına ait pazı ve ıspanak sebzelerinden aseton ve amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilen proteinlerinin in vitro olarak trombosit agregasyonuna, fibrin plak eritme alanına, euglobulin erime zamanına, trombin zamanına ve in vivo olarak antimitotik etkilerini incelemektir.

1.1. *CRUCIFERAE* ve *CHENOPODIACEAE* BİTKİLERİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Cruciferae bitkilerinin (Resim 1.1) kimyasal özelliği, glikozidler (19) ve bunların hidroliz ürünleri olan tiyosiyanatlar (19) ve indol-3-karbinol gibi aktif bileşikler (19-21) ile arginin ve lizin aminoasitleri, fenol ve A vitamini (22) taşımalarıdır. Beyaz lahananın antibiyotik özelliğe sahip olduğu, kobay ileum ve uterusunda, sıçan ileumunda ve horoz çekumunda kontraktüran etkili olduğu, izole kurbağa kalbini negatif inotrop etkiyle durdurduğu (22) ve guatrojenik etki gösterdiği (19,22) belirtilmiştir.

Chenopodiaceae bitkilerinin (Resim 1.1) kimyasal özelliği protoalkaloidler ve basit yapılu alkaloidler ile fenilalanin, triptofan, ornitin ve lizin türevleri ve saponinler taşımasıdır (23). Pazının antidiabetik (18) ve alerjik (24); ıspanağın antidiabetik (25), yatıştırıcı, diüretik, dokuları kasıcı ve taş eritici etkileri vardır (26).



Brassica oleracea var. *acephala*
(Kara lahana)



var. *gemmifera*
(Brüksel lahanası)



Brassica oleracea var. *capitata*
(Beyaz lahana)



Beta vulgaris L. *cicla* (Pazı)

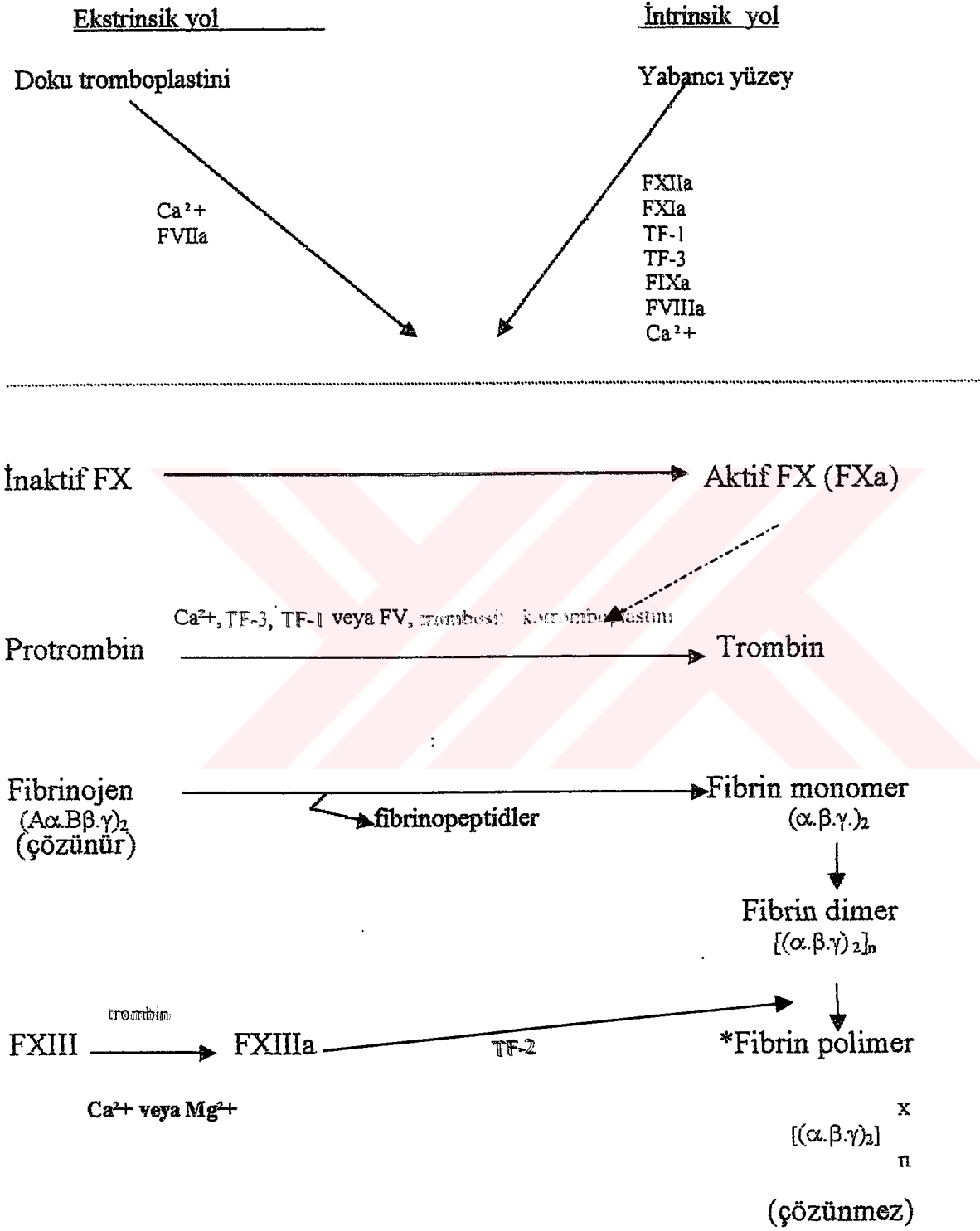


Spinacea oleracea (Ispanak)

Resim 1.1 : *Cruciferae* ve *Chenopodiaceae* bitkileri

1.2. HEMOSTAZ

Endotel bütünlüğünün bozulduğu bölgede vasküler spazm gerçekleştikten sonra (27), trombositler açığa çıkan kollajen, laminin gibi subendotelyal yapılara GPIIb/IX kompleksiyle (27-29) ve subendotelyal bölgedeki von Willebrand faktörü (27-30) aracılığıyla yapışır (Trombosit adhezyonu). Kollajen tarafından aktive edilen trombositlerden salınan ADP, GPIIb/IIIa'da konformasyonel değişikliğe yol açarak bu kompleks üzerindeki fibrinojen reseptörünün ortaya çıkmasına neden olur (27,28). Fibrinojen, bu reseptöre bağlanarak Ca^{2+} varlığında trombositler arasında köprüler kurarak kümeleşmelerine neden olur (27,28). Bu olaya trombosit agregasyonu denir (27,28). Agregasyonla birlikte, yoğun cisimciklerin ve α -granüllerin içeriği yüzeye bağlı açık kanaliküler sistem ve mikrotübüller aracılığıyla ATP'den elde edilen enerjiyle ortama salınır (30). Bu olaya da sekresyon denir (30). Trombositlerden ve hasar görmüş dokulardan salınan faktörlerle (27,30) lokal olarak uyarılan pıhtılaşma mekanizması sonucunda oluşan trombin (27, 29-32) (Şekil 1.1), diğer trombositleri de aktif hale getirerek pıhtıya daha çok trombositin katılmasını sağlar (29). Fibrinojenden oluşan fibrin ağı (27, 29-32) (Şekil 1.1) sayesinde daha stabil bir yapı kazanan pıhtı, aktomyozin benzeri bir trombosit kontraktil proteini olan *trombostenin* etkisiyle büzülür (30). Son olarak da pıhtı plazminle eritilir ki bu olaya fibrinoliziz denir (27-29).



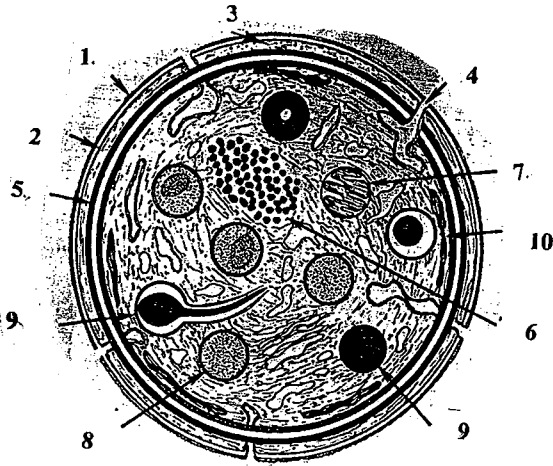
Şekil 1.1 : Pıhtılaşma düzeni (27,29-32).

*çapraz bağı fibrin monomerleri, a : aktif

TRT
T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
MİLLÎ HAYAT VE SAĞLIK BAKANLIĞI
MİLLÎ HAYAT VE SAĞLIK BAKANLIĞI
MİLLÎ HAYAT VE SAĞLIK BAKANLIĞI

1.2.1. Trombosit agregasyonu ve inhibitörleri

Trombositler 1.5-3.0 μm çapında olan çekirdeksiz hücrelerdir. Megakaryositlerin sitoplazmik parçaları olmalarına rağmen aktif bir metabolizmaya sahiptir (28). Trombositler periferik, sol-gel ve organel zonlar ile membran sistemlerinden oluşmuştur (28-30). Periferik zonu oluşturan dış kabuk (glikokaliks) glikoproteinler içermesi (29,30); ünit membran TF-3 benzeri aktivite göstermesi (30) ve submembran alan ise trombositlerin diskoid şeklini koruması açısından önemlidir (29). Sol-gel zonda bulunan mikrofilamentler ve mikrotübüller trombositlerin aktin ve miyozindir (29). Organel zondaki α -granüller ve yoğun cisimcikler (29,30), trombosit fonksiyonları ve pıhtılaşma mekanizması için çok önemli maddeler içerir (28-30). Membran sistemlerinden biri olan yüzeyel açık kanaliküler sistem plazma kaynaklı maddeleri alabilmesi ve salgımlı reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi için trombosit yüzeyini genişletir (28,30). Yoğun tübüler sistem ise araşidonik asit metabolizması sitesidir ve kalsiyum pompasıdır (28,29) (Şekil 1.2).

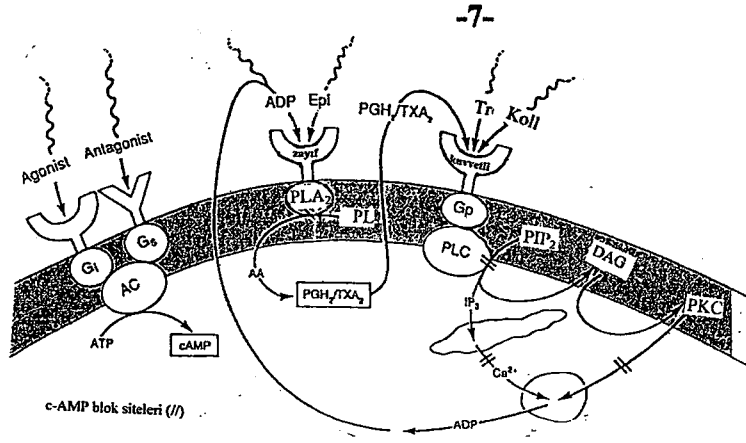


Şekil 1.2 : Diskoid trombositler. 1.Glikokaliks, 2.Trilaminar ünit membran, 3.Submembran alan filamentleri, 4.Kanaliküler sistem, 5.Mikrotübüller, 6.Glikojen, 7.Mitokondri, 8.Granül, 9.Yoğun cisimcik, 10.Yoğun tübüler sistem (29)

Trombosit agregasyonu iki aşamada gerçekleşir. Trombositlerin şekil değişikliğine uğrayarak ve psödopodlar çıkararak küçük agregatlar oluşturması primer agregasyondur (30,31). Yoğun cisimciklerin ve α -granüllerin içeriğinin enerji bağımlı salınımı ve daha sıkı agregatların oluşması sekonder agregasyondur (30,31).

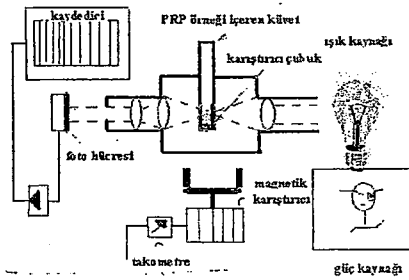
Trombosit agregasyonu için trombositlerin agonistler tarafından uyarılmaları ve aktive olmaları gerekir (28,29,33). Agonistler ve antagonistler trombosit membranındaki kendilerine özgü reseptörlere bağlanır. Uyarıların hücre içine iletilmesi G-proteiniyle gerçekleşir (28,29,33). G-proteini bazı membran enzimlerinin aktivasyonuna neden olarak ikincil uyarıcıların ortaya çıkmasına neden olur. İkincil uyarıcılar aktivatörler için DAG ve IP₃; inhibitörler için c-AMP'dir (28,29,33) (Şekil 1.3).

Sekresyon reaksiyonu, salınım indükleyicilerinin tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak gelişir. ADP gibi zayıf agonistler sadece yoğun cisimciklerin salınımına (Sekresyon-I) neden olurken; kollajen ve trombin gibi kuvvetli agonistler α -granüllerinin de salınımını (Sekresyon-II) sağlar (30,31). Zayıf agonistlerle sekresyon prostaglandin ve tromboksan A₂ sentezine bağlıdır ve aspirinle inhibe edilebilir (28,29). Kuvvetli agonistlerle sekresyon ise fosfoinozitol yoluna bağlıdır (29) ve aspirinle kısmen önlenir (28) (Şekil 1.3).



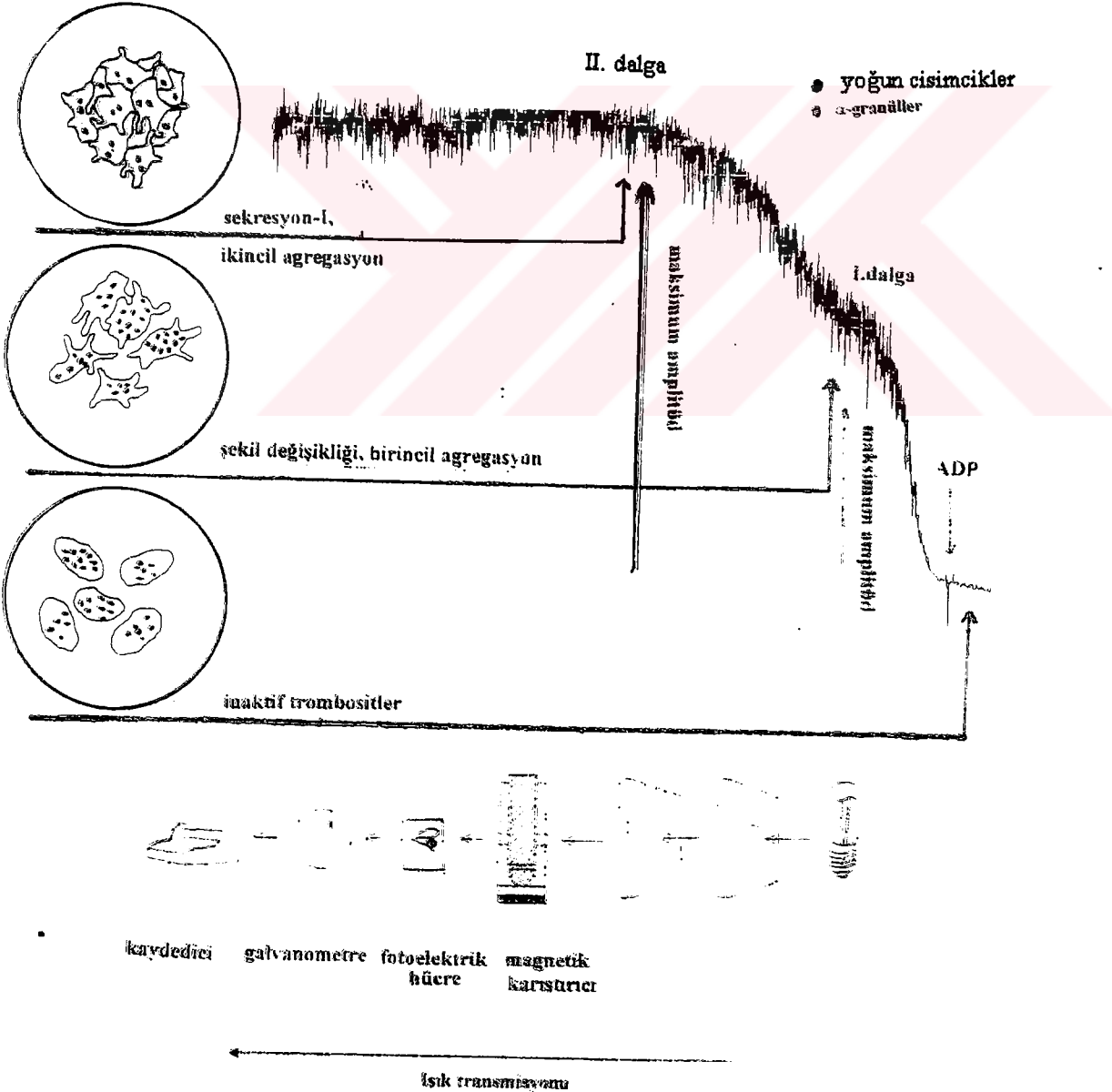
Şekil 1.3 : Trombosit aktivasyonu ve inhibisyonu mekanizması. ADP : Adenozindifosfat, PLA₂ : Fosfolipaz A₂, AA : Araşidonik asit, PL : Fosfolipid, PGH₂ : Prostaglandin H₂, TXA₂: Tromboksan A₂, Gp : Pertussis toksinine duyarlı G proteinini, PIP₂ : Fosfotidilinozitol difosfat, PLC : Fosfolipaz C, IP₃ : İnozitol trifosfat, DAG : Diaçilgliserol, PKC : Protein kinaz C, Gi : İnhibitör, Gs : Stimülan, ATP : Adenozintrifosfat, AC : Adenilat siklaz. c-AMP : Siklik AMP (29)

Trombosit agregasyonu agregometre ile ölçülür. Optik agregometreler, PRP örneğinden ışık geçişi vasıtasıyla PRP (Trombositten zengin plazma)'nin optik yoğunluğunun PPP (trombositten fakir plazma)'ninkiyile karşılaştırılmasını sağlar (34). PRP 100.000-300.000 trombosit/mm³ içerir; geçirgen olmayan bir çözeltilidir. PPP ise, az veya hiç trombosit içermediğinden berrak bir sıvıdır (34). PRP silikonize edilmiş cam küvette sabit bir hızda ve 37°C'de, magnetik bir çubuk vasıtasıyla karıştırılır (27,34). Devamlı karıştırılan PRP, trombositlerin diske benzer şekilleri nedeniyle girdaplar oluşturur (35); buna ADP, kollajen, trombin, araşidonik asit gibi agregasyon ajanları eklendiğinde trombositler kümeleşir (27,33-35). Böylece PRP berrak hale gelir (34) ve plazmadan ışığın geçişi artar (27,34,35). Bu artış bir foto hücre tarafından ölçülür ve grafik kaydedici kaleminin hareketiyle kaydedilir (27,34) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 : Agregometre düzeneği (34)

Normal kandan elde edilen PRP'de ADP ile trombosit agregasyonu ADP konsantrasyonuna bağılı olarak mono veya bifaziktir (27,30,31). Primer dalga, geri dönüşümlü primer agregasyondur. Sekonder dalga ise sekresyonla ilişkili geri dönüşümsüz agregasyondur (27,31). Agregasyon eğrisinin maksimum amplitüdü, inhibitörlerin etki şiddetini belirler (33) (Şekil 1.5). Kullanılan agregometre, karıştırma, örnek sıcaklığı, kan alımından itibaren geçen süre, örneğin pH'ı (34), trombosit sayısı (30), ilaçlar (Tablo 1.1), trombostenia hastalığı (27-30), siklooksijenaz enzimidaki defektler (27), granül defektleri (29), diabet (35) gibi hastalıklar agregasyon testlerini etkiler.



Şekil 1.5 : ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu prensibi (27,31,33)

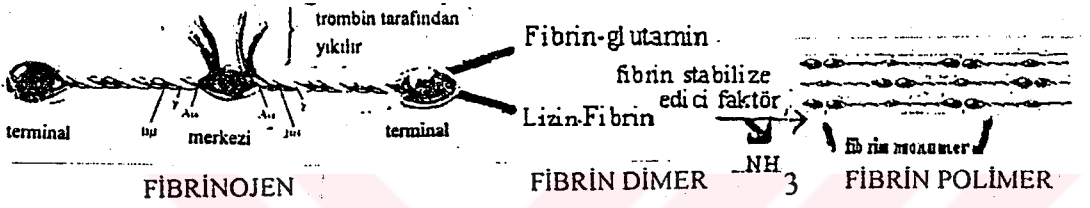
Prostasiklin gibi endotelden salınan fizyolojik inhibitörlerle (27) flavonoidler (36,37), kumarin, forskolin (36), “ajoene” (37), gingerol (38) ve apiraz (39) gibi bitkisel kaynaklı bileşikler ve diyetle alınan yağ asitleri (36) trombosit agregasyonunu inhibe eder. Trombosit agregasyonunu inhibe eden ilaçlar Tablo 1.1’de görülmektedir.

Tablo 1.1 : Trombosit agregasyonunu inhibe eden ilaçlar (27,29,30)

Sınıflar	Müstahzarlar	Etken maddeler
Analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar	Aspirin	Asetilsalisilik asit
	Adafen	Asetaminofen (Parasetamol)
	Aprol	Naproksen sodyum
Koroner vazodilatatör	Vazodil	Dipiridamol
Bronkodilatör	Aminocardol	Aminofilin (Teofilin etilendiamin)
Santral sinir sistemi stimülanı	Adafen	Kafein
Oksitoksik	Cerviprost	Prostaglandin E ₂
Ca ²⁺ kanal antagonistleri (Antianjinal, antihipertansif, antiaritmik)	Diltizem	Diltiazem
	Adalat	Nifedipin
	Veroptin	Verapamil HCl
β-adrenoseptör blokerleri (Antianjinal, antihipertansif, antiaritmik)	Dideral	Propranolol
	Tensinor	Atenolol
Diüretikler	Fuomid	Furosemid
Antibiyotikler	Deposilin	Penisilin G-benzatin
Trisiklik antidepresanlar	Tofranil	Imipramin HCl
Antiplatelet	Agretik	Tiklopidin HCl
Antikoagülanlar	Calciparine	Heparin kalsiyum
Trombolitikler	Streptaz	Streptokinaz

1.2.2. Fibrin oluşumu ve antitrombinikler

Fibrinojen 3 çift homolog polipeptid zinciri taşıyan çözünür bir plazma proteindir (32) (Şekil 1.6). Trombin spesifik olarak fibrinojendeki 4 arginin-glisin bağlarını yıkarak fibrinopeptidlerin salınımına ve fibrin ağının oluşumuna neden olur (32) (Şekil 1.1).

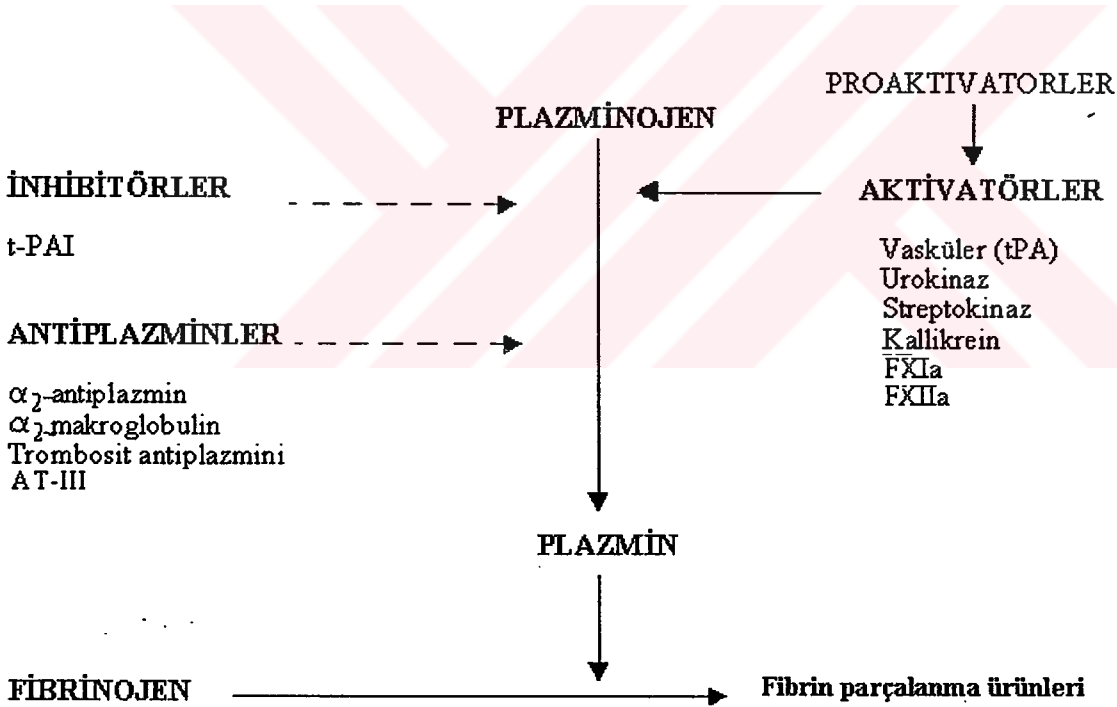


Şekil 1.6 : Fibrin yapısı (32).

Antitrombinikler trombin etkisini azaltan maddelerdir. Direkt antitrombinikler, trombin oluşumu inhibitörleri (ω -3 yağ asitleri) ve trombin reseptörü antagonist peptidleri trombini bloke etmek için kullanılır (40). Direkt antitrombinikler antitrombin III, α_1 -antitripsin, α_2 -antiplazmin, α_2 -makroglobulin, protein C, trombomodulin gibi fizyolojik inhibitörlerle (27,29) *Hirudo medicinalis* (sülük)'den elde edilen *hirudindir* (37,40). Bunlardan en önemlisi olan antitrombin III, trombinin aktif sitesine bağlanarak irreversibl etki gösterir (27,32). Bunun yanısıra FIXa, FXa, FXIa, FXIIa ve plazmini de yıkar (27,29,32). Heparin antitrombinin aktivitesini artırır (29).

1.2.3. Fibrinoliziz

Fibrin yıkımına fibrinoliziz (27-29); fibrinojen yıkımına fibrinojenoliziz denir (29,30). Fibrinolitik sistem komponentleri prekallikrein, prourokinaz gibi proaktivatörler, plazminojen, plazminojen aktivatörleri ve plazmindir (27-29). Plazminojen, aktivatörlerin etkisi sonucu arginin-valin bağlarının kopmasıyla aktif hali olan plazmine dönüşür (29). Plazmin, fibrinojen/fibrin yıkım ürünlerinin oluşumuna neden olur (27,29). Fibrinolitik sistem aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları arasındaki denge ile düzenlenir (27,28). (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: Fibrinoliziz. tPA : Doku plazminojen aktivatörü, tPAI : Doku plazminojen aktivatörü inhibitörü (27,29,30).

Stanozolol (41), defibrotid (42) gibi ilaçlar ile brinaz (43), apiraz (39) gibi bitkisel kaynaklı maddeler de fibrinolitik aktiviteyi artırır.

Fibrinolitik aktivite ölçümleri fibrin plakta eritme çapı veya alanı ölçümü ile euglobulin erime zamanı testiyle saptanır. Fibrin plak yöntemi bir fibrinoliziz yöntemi olup normalde kanda plazminojen aktivatör veya plazmin düzeyini ölçmek için kullanılır. Kalınlığı sabit olan fibrin tabakası üzerine damla şeklinde ve belirli bir hacimde konulan plazma veya başka bir örnek fibrin tabakasına difüzyon yoluyla girer. Tatbik edilen örnek eğer fibrinolitik aktiviteye sahipse, belirli bir süre sonra bir eritme alanı (liziz alanı) oluşturur. Bu alanın genişliği örneğin fibrinoliziz yapma kuvvetine ve konsantrasyonuna bağlıdır (35).

Euglobulin erime zamanı testinin prensibi fibrinojenin, plazminojenin, koagülasyon faktörlerinin ve bitkisel ekstraktlar gibi başka etken maddelerin asetik asitle birlikte çöktürülmesi esasına dayanır. Üst fazda inhibitörler bulunur. Plazminojenin ve etken maddelerin fibrinojen üzerindeki aktivitesi tayin edilir (27,35). Etken maddesiz PPP ile alınan normal değerler 60'-170' arasında değişir (27). Etken madde ile alınan değerlerin normalden kısa olması maddenin fibrinolitik etkili olduğunu gösterir (35). Afibrinogenemi, yaş ve sigara alışkanlığı EEZ testlerini etkiler (27).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler

Blender (Molineks ve King), Analitik santrifüj (Beckman R Model J.21B, Rotor no : J20), Klinik santrifüj (Heraeus Sepatech Labofuge 200), Eppendorf santrifüjü (Appligene-Oncoe), Bryston Lumi-Agregometre (Chrono-Log Corporation), Spektrofotometre (Schimadzu Spektrofotometer UV-120-02), Spektrofotometre (Beckmann), Elektroforez aygıtı (Sigma), Faz kontrast mikroskobu (Olympus BH), Kan sayımı aleti (Counter T-660) kullanıldı.

2.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri

Amonyum sülfat, aseton, sodyum sitrat, kalsiyum klorür, asetik asit, borik asit, boraks, sodyum klorür, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, sodyum-potasyum tartarat, bakır sülfat, Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi, gliserol, metanol, hidroklorür, sülfirik asit, amonyum oksalat ve etanol Merck Firmasından; ADP (adenozindifosfat, Katalog no : 885-5), fibrinojen (F-8630), Owren's tamponu, akrilamid, bisakrilamid, tris (hidroksiaminometan), SDS (sodyumdodesilsülfat), APS (amonyumpersülfat), glisin, MET (merkaptolanol), BFB (bromfenolmavisi), Coomassie Brilliant Blue R-250, BSA (sığır serum

albumini), yumurta albumini, karbonik anhidraz, tripsin inhibitörü, α -laktalbumin Sigma'dan; TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) Fluca'dan ve trombin (1000 U/flakon, Katalog no : 896) ise Stago Diagnostica'dan temin edildi.

Sarf malzemeleri olarak dializ tüpü (Sigma), konsantre edici tüpler (Millipore Ultrafree MC Katalog No : UFC 3LTK25) ve Centriprep-10 santrifugal konsantre ediciler (Amicon) kullanıldı.

2.3. Olguların Seçimi

Klinik bulgulara göre normal, 18-60 yaş grubu, deneylerden 15 gün önce aspirin gibi antikoagülanları almamış olgularla çalışıldı.

2.4. Proteinlerin İzolasyonu

2.4.1. I. Yöntem :

Yaprak suyunun eldesi, asetonla çöktürme, konsantrasyon işlemlerini içeren yöntemdir. Beyaz lahanası ve brüksel lahanası blenderde sıkıldı. Elde edilen sular çift katlı gazlı bezden süzüldü. Süzüntülerden dializle ve 1500 rpm'de 10' santrifügasyonla klorofilli kısım

uzaklaştırıldı. Supernatantlar, buz banyosunda 1:2 (hacim/hacim) oranında asetonla çöktürüldü. 8000 rpm'de 20'de santrifügasyonla elde edilen çökeltiler distile suda çözüldü (44). Elde edilen protein çözeltileri Centriprep-10 santrifugal konsantre edicilerde konsantre edildi (45). Centriprep-10 ile konsantre edilenler (ara konsantreler) ve bunların ilk halleri aktivite testlerinde kullanıldı. Ara konsantreler, konsantre edici tüplerde tekrar konsantre edildi ve SDS-PAGE'ye tatbik edildi (Şekil 2.1). Ekstrelerin protein konsantrasyonları Lowry metoduna göre ölçüldü (46).

2.4.2. II. Yöntem :

Posa ve yaprak kurutulması, maserasyon, amonyum sülfatla çöktürme, konsantrasyon işlemlerini içeren yöntemdir. Kara lahana blenderde sıkılarak posası alındı ve açık havada kurutuldu. Pazi ve ıspanak yaprakları direkt olarak açık havada kurutuldu, ince parçalar halinde kesildi ve tartıldı. Kurutulmuş kara lahana posası, pazi ve ıspanak yaprakları 70 g kurutulmuş posa/yaprak : 200 mL sıcak distile su olacak şekilde bir behere konuldu ve kaynar su banyosunda 30' bekletildi. Karışım süzgeç kağıdından süzüldü. Filtratlar buz banyosunda son konsantrasyon %96 olacak şekilde kristal amonyum sülfatla çöktürüldü (44). 8000 rpm'de 20' santrifügasyonla ayrılan protein çökeltileri distile suda çözüldü. Protein çözeltileri dializ tüplerine alındı ve amonyum sülfatın uzaklaştırılması için +4°C'de ve distile suda 24 saat dialize tabi tutuldu. Dializ esnasında dializ suyu devamlı değiştirildi (44). Elde edilen protein çözeltileri pazi hariç Centriprep-10 santrifugal

konsantre edicilerde konsantre edildi (45). Çözeltilerin ilk halleri ve ara konsantreler aktivite testlerinde kullanıldı. Pazı ve ara konsantreler SDS-PAGE'ye tatbik edilmek üzere konsantre edici tüplerde tekrar konsantre edildi (Şekil 2.1).

I. YÖNTEM

II. YÖNTEM

Beyaz lahana
Brüksel lahanası

Kara lahana yaprakları → Pazı sıkma Ispanak yaprakları
Kara lahana posası

sıkma
süzme

kurutma
30' maserasyon
süzme

Beyaz ve brüksel lahanası
süzüntüleri

Süzüntüler

dializ
santrifügasyon

amonyum sülfatla
çöktürme (%96)
santrifügasyon

Supernatantlar

asetonla çöktürme
santrifügasyon

Çökeltiler

Çökeltiler

distile suda çözme

Protein çözeltileri

Centriprelerde konsantre
etme (pazı hariç)

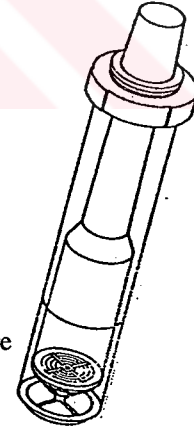
Aktivite
testleri

Ara konsantreler

Eppendorflarda konsantre
etme

En konsantreler

SDS-PAGE analizi



Şekil 2.1. Proteinlerin izolasyonu

2.5. Trombosit Agregasyon Testi*

Trombositten zengin plazma (PRP) hazırlamak için 10-20 mL venöz kan 9:1 oranında % 3.8'lik sodyum sitratlı alındı. 1200 rpm'de 7' santrifüj edildi. Üst kısımdaki PRP dikkatlice alt kısımdaki eritrosit süspansiyonunu karıştırmadan pipetle alındı. PRP, trombosit peleti elde etmek için 3000 rpm'de 30' santrifüj edildi. Sigma Diagnostics Firmasına ait teknik prosedüre (no : 885) göre ve reaktif olarak ADP kullanılarak trombosit agregasyonu testi deneyi yapıldı. Önceden 37°C'ye getirilmiş agregometre sıfır ayarı 500 µL PPP ile yapıldı. PRP, serum fizyolojik ve 100 µM ADP 450 : 50 : 1 µL ve 447.5 : 50 : 2.5 µL olacak şekilde karıştırılarak agregometreye kondu ve kontrol eğrisi çizdirildi. Başka tüplerde plazma ve örnek karışımının 37°C'de 10' inkübasyonundan sonra ADP aynı oranlarda eklenerek agregasyon eğrisi çizdirildi. Primer ve sekonder dalgaların maksimum amplitüdleri cm olarak ölçülerek değerlendirme yapıldı (Şekil 1.5).

2.6. Fibrinolitik Aktivite Testleri

2.6.1. Fibrin plak yöntemi**

0.1 g liyofilize edilmiş sığır serum fibrinojeni (fraksiyon-I), köpük oluşturmayacak şekilde 10 mL Owren's tamponunda çözüldü. Ayrı bir

* Born, G.V.R :Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 194 : 927-929, 1962.

tüpe 1 mL 50 mM CaCl₂, 0.8 mL Owren's tamponu ve 0.5 mL 200 U/mL trombin ilave edildi. Fibrinojen çözeltisine ikinci karışımdan 0.8 mL homojen bir şekilde karıştırılarak eklendi ve petri kutusuna döküldü. Oda sıcaklığında pıhtı oluşması beklendi. 30 µL örnek plaklara tatbik edildi. Petri kutusunun üstü süzgeç kağıdıyla kapatılarak 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildi, eritme alanı oluşup oluşmadığı incelendi, oluşan zonların çapları ölçüldü ve πr^2 formülüyle eritme alanları hesaplandı. Fibrin tabakalarının her yerde aynı kalınlıkta olmasına ve etüvde uygun derecede rutubet bulunmasına dikkat edildi.

2.6.2. Euglobulin erime zamanı testi***

Ekstreden ve serum fizyolojikten 0.1 mL alındı; üzerlerine PPP'den 0.9 mL eklendi. Bu karışımlar 10' 37°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Her ikisinden de 0.5 mL alındı ve üzerlerine 9.5 mL taze hazırlanmış 10.24 mM CH₃COOH eklendi. Bu karışımlar 2000 rpm'de 7' santrifüj edildikten sonra üstteki kısımlar döküldü. Tüpler ters çevrilip 2'-3' bekletildi. Çökelti plastik bir bagetle iyice ezilerek 0.25 mL EEZ tamponu (11.25 g borik asit, 4 g boraks ve 2.20 g NaCl 1 L distile suda çözüldü, pH=7.2) ilave edildi. 50 mM CaCl₂'den 0.25 mL eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 1'-3' pıhtılaşması beklendi. Pıhtılaşma anı başlangıç alınarak pıhtı erime süresi belirlendi (Şekil 2.2).

** Astrup, T., Mullertz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Bioch. Biophys., 40 : 345, 1952

*** Copley, E.A., Niewiarowski, S. : A micromethod of euglobulin fibrinolysis in plasma of human subjects and laboratory animals. J. Clin. Med., 53 : 468-471, 1959.

2.7.Trombin Zamanı*

1:9 oranında karıştırılan örnek ve PPP karışımı 37°C'lik su banyosunda 10' inkübe edildi. Bu karışımdan 200 µL alındı. Buz banyosunda tutulan 5 U/mL trombinden 200 µL eklendi. Pıhtılaşma süresi tesbit edildi (Şekil 2.2).

← pıhtılaşma



→ pıhtı erime süreci

Şekil 2.2 : Pıhtı oluşumu ve erime süreci (31)

2.8. Antimitotik Etki

25°C'de, yarı güneşli bir ortamda, nemli pamukta 5 günde çimlendirilen ve boyları 2.0-6.5 cm arasında değişen fasülye ve mercimek filizleri 5. günde kontrol ve deney olarak ikiye ayrıldı. Kontrollere günde 1 mL distile su, deneylere ise herbirinden günde 1 mL olmak üzere beyaz lahana (7 µg/mL), kara lahana (10 µg/mL), pazı (10 µg/mL) ve brüksel lahanası (33 µg/mL) protein ekstraktları ilave edildi. Hergün filizlerin boyları ölçüldü (47).

- Bang, N.U., Beller, F.K., Deutsch, E., Mammen, E.G. : Thrombosis and Bleeding Disorders. Academic Press. N.Y., s.257, 1971.

2.9. Trombosit Sayımı*

Eritrosit pipetinin 1 çizgisine kadar PRP; 101 çizgisine kadar da amonyum oksalat (%1) çekildi. Eritrositlerin hemoliz olması için pipetlerdeki kan iyice karıştırıldı. Thoma sayma kamarası %90'lık etanol çözeltisiyle iyice temizlendi. Nemli bir petri kutusu hazırlamak için bir süzgeç kağıdı daire şeklinde kesildi, ıslatıldı ve yapışırcaasına yerleştirildi. Pipetten çıkan ilk 4 damla atıldı. Doldurulan thoma sayma kamarası, sıvının buharlaşmasının önlenmesi ve trombositlerin dibeye çökmesinin sağlanması için 20'-30' petri kutusunda bekletildi. Trombosit sayımı faz kontrast mikroskopunda yapıldı.

2.10. SDS-PAGE ile Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Tayini

2.10.1. Gerekli çözeltiler

a-Stok akrilamid çözeltisi (%30) : 73 g akrilamid ve 2 g bis-akrilamid belli bir miktarda suda çözüldü. Distile suyla 250 mL'ye tamamlandı.

b-Stok ayırma jel tamponu : 45.4 g Tris ve 1.0 g SDS distile suyla 250 mL'ye tamamlandı (pH=8.8).

* Brecher, G., Cronkite, E.P. : Morphology and enumeration of human blood platelets. J. Appl. Physiol., 3 : 365, 1950.

c-Stok paketleme jel tamponu : 15.5 g Tris ve 1.0 g SDS distile suyla 250 mL'ye tamamlandı (pH=6.8).

d-Amonyum persülfat (%10) : 0.1 g APS ve 1 mL distile su

e-Elektroforez tamponu (0.192 M Glisin, 0.025 M Tris ve %0.1 g/mL SDS) : 28.8 g glisin, 6.0 g Tris ve 2.0 g SDS ayrı ayrı suda çözüldükten sonra karıştırıldı. 2000 mL'ye tamamlandı.

g-Boyama çözeltisi : 0.25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 25 mL glassial asetik asit, 100 mL distile su ve 125 mL metanol.

h-Boya çıkarma çözeltisi : 50 mL metanol üzerine 450 mL distile su eklendi.

ı-TEMED çözeltisi (%99)

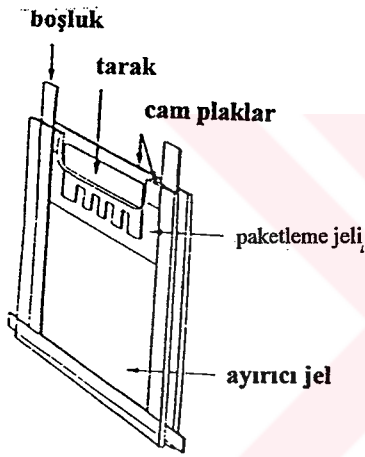
i-Düşük molekül ağırlıklı standart protein karışımı : Standart olarak sığır serum albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da), karbonik anhidraz (29.000 Da), tripsin inhibitörü (20.010) ve α -laktalbumin (14.200 Da) kullanıldı. Sığır serum albumininden ve yumurta albumininden 25 mg alınıp 2.5 mL distile suda çözüldü. Diğerlerinden ise 5 mg alınıp 0.350 mL suda çözüldü. Total standart çözeltisi toplam 2 mL olarak hazırlandı ve küçük hacimler halinde derin dondurucuda stoklandı .

2.10.2. Yöntem

%9 'luk alt jel (ayırma jeli)in hazırlanması için 6 mL akrilamid, 5 mL stok ayırma jel tamponu ve 9 mL distile su karışımı 10' degaze edildikten sonra üzerine 50-75 μ L APS ve 10-15 μ L TEMED eklendi.

Bu karışım elektroforez aygıtına kondu (Şekil 2.3). Alt jelin polimerize olup olmadığı enjektörde bırakılan çözülden anlaşıldı.

%5'lik üst jel (paketleme jeli)in hazırlanması için 0.75 mL akrilamid, 1.25 mL paketleme jel tamponu, 3 mL distile su karışımı 10' degaze edildikten sonra üzerine 20 µL APS ve 10 µL TEMED ilave edildi. Üst jel bir enjektör yardımıyla hava kabarcığı olmamak kaydıyla alt jel üzerine tabakalandırıldı. Tarak yerleştirildi. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak çıkartıldı.



Şekil 2.3 : Elektroforez düzeneği (48)

Elektroforez aygıtı elektroforez tankına yerleştirildi. Örnek ve standart proteinler konsantrasyonları en az 10 µg/mL olacak şekilde kuyulara Hamilton enjektör yardımıyla uygulandı. 20 mA akım uygulanarak proteinlerin yürümesi sağlandı. 5-6 saat sonra jel boyama çözeltisi içine daldırıldı ve 1 gün bekletildikten sonra boya çıkarma çözeltisine daldırıldı, 3 gün boyunca çözelti sürekli değiştirilerek protein bantlarının iyice belirginleşmesi sağlandı.

Standart proteinlerin moleküler ağırlıklarının logaritma değerleri ordinata; standart proteinlere ait bandların orjinden ilerledikleri yere kadar olan uzaklıklarının orjin-bitiş arası uzaklığa oranı olan Rf değerleri de apsise yazılarak $\log_{(\text{moleküler ağırlık})}$ -Rf grafiği elde edildi. Örnek proteinlerin de Rf değerleri aynı şekilde hesaplanarak grafikten onlara karşılık gelen molekül ağırlıkları hesaplandı (48).

2.11. İstatistiksel Analizler

Deney sayısı 7 olan ve herbiri aynı olguya ait olan kontrol ve deney değerlerinin ortalamalarının kıyaslaması student-t testine göre yapıldı. Standart sapmalar ve t değerleri Graphpad-Instat programına göre hesaplandı. p değerleri t tablosuna göre bulundu*

3. BULGULAR

3.1. Protein Ekstrelerinin ADP ile İndüklenen Trombosit Agregasyonuna Etkileri

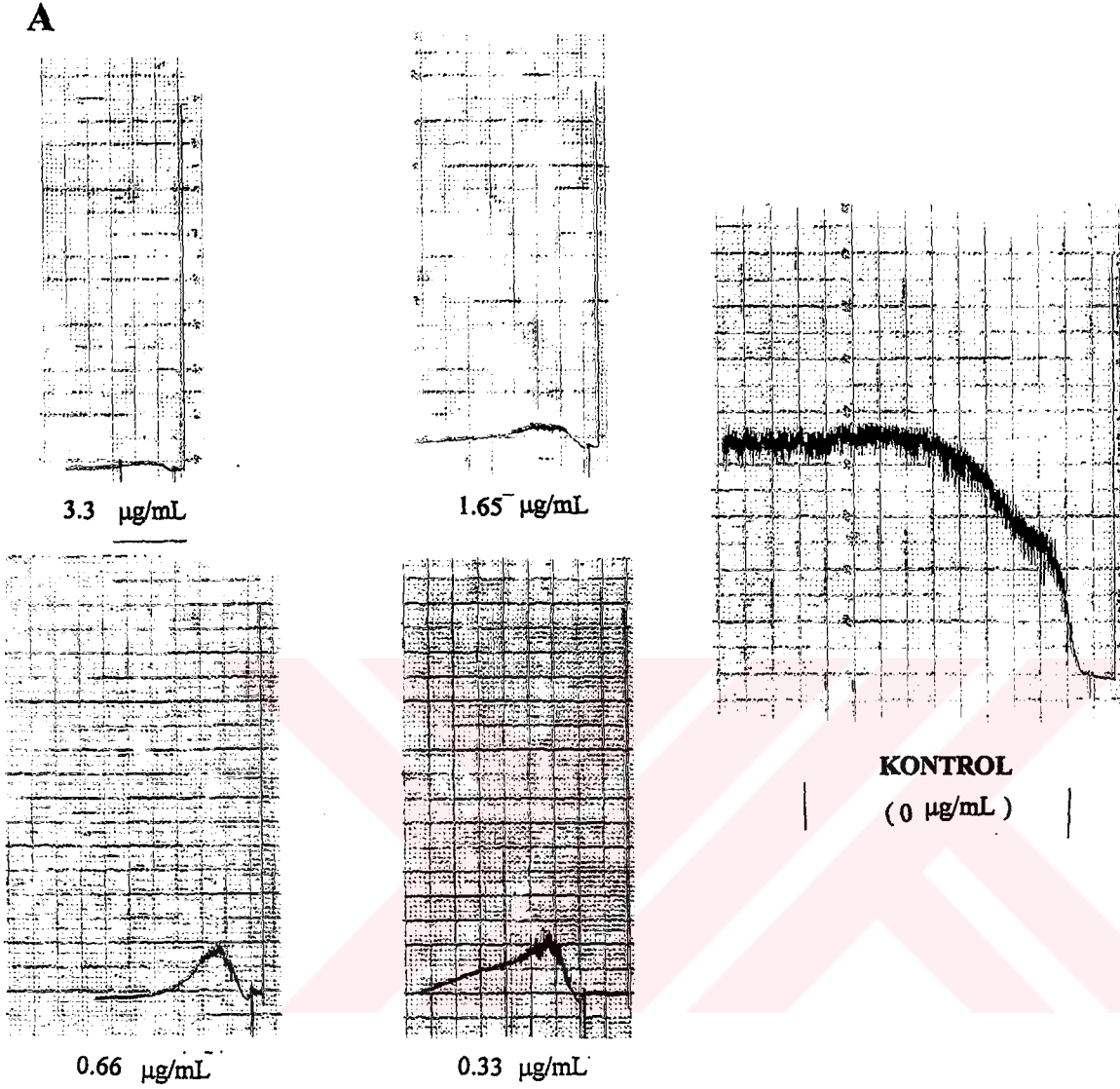
ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu çalışmalarında, brüksel lahanası, kara lahanası, beyaz lahanası ve pazı (3.3 µg/mL) ile beyaz lahanası (0.7 µg/mL) protein ekstraktları doza bağımlı olarak primer ve sekonder dalgaları inhibe etti (Tablo 3.1, Şekil 3.1,3.2).

* Velicangil, S : Biyoistatistik (Biyoloji, Tıp, Dişhekimliği ve Eczacılık Bilimlerinde). Filiz Kitabevi, İstanbul, 1984.

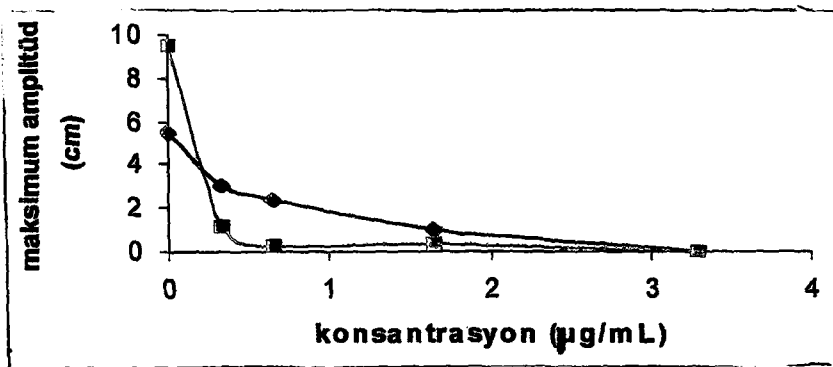
Tablo 3.1 : Ekstrelerin ADP ile indüklenen trombosit agregasyonuna etkileri

[ADP] (μM)	Trombosit sayısı (tr/mm^3)	Ekstre	[protein] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Primer dalga (cm)	İnhibisyon (%)	Sekonder dalga (cm)	İnhibisyon (%)		
2	194000	Brüksel Lahanası (Yöntem-I)	3.3	0	100	0	100		
			1.65	1	81	0.4	96		
			0.66	2.4	56	0.3	96		
			0.33	3	45	1.2	87		
			0	5.5	0	9.5	0		
5	185000	Pazı (Yöntem-II)	3.3	0.1	97	0.2	97		
			1.65	1	73	1.8	70		
			1	1.4	62	3.6	39		
		Kara lahanası (Yöntem-II)	3.3	0.5	86	0.9	85		
			1.65	1.2	68	2.8	53		
			1	1.5	59	3.8	36		
		Beyaz lahana (Yöntem-I)	3.3	0.8	78	0	100		
			1.65	1.2	68	2.8	53		
			0.7	2.5	32	3.4	43		
		0	3.7	0	5.9	0	0		
		2	228000	Beyaz lahana (Yöntem-I)	0.7	3.4	34	2.2	83
					0.35	4	25	2.2	83
0.175	4				25	6.1	53		
0	5.2				0	13.2	0		

1 μL : 2 μM ve 2.5 μL : 5 μM ADP

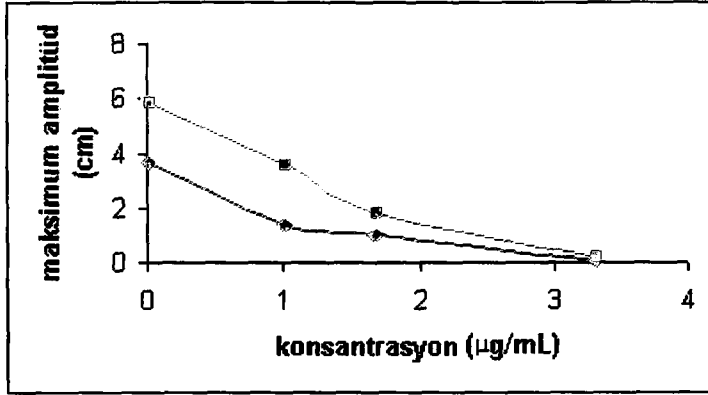


B



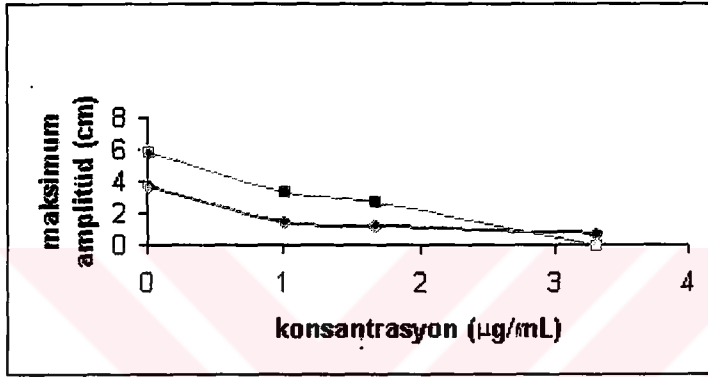
Şekil 3.1 : Asetonla çöktürülmüş brüksel lahanası protein ekstresinin ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu primer ve sekonder dalgaları maksimum amplitüdlere doza bağımlı etkisi. A : Agregasyon kurbları; B : Maksimum amplitüd vs konsantrasyon grafiği

A



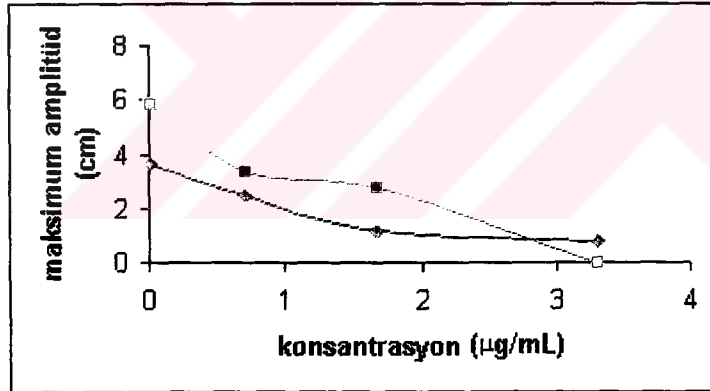
primer
sekonder

B



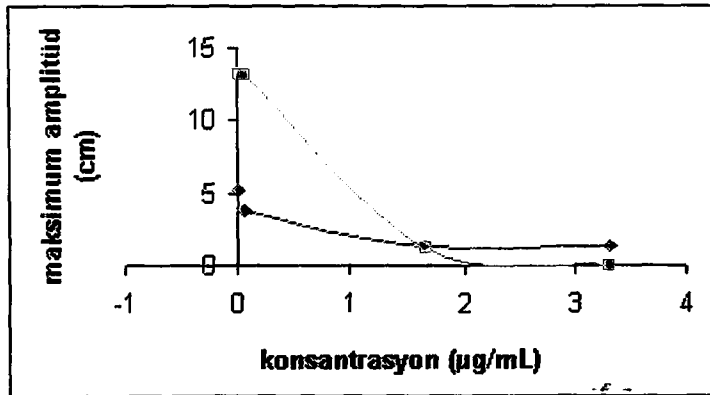
primer
sekonder

C



primer
sekonder

D



primer
sekonder

Şekil 3.2 : Protein ekstralarının ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu primer ve sekonder dalgaları maksimum amplitüdlerine doza bağımlı etkileri. A : Pazi, B : Kara lahana, C : Beyaz lahana (3.3 µg/mL), D : Beyaz lahana (0.7 µg/mL). Tablo 3.1'deki değerler alındı.

3.2. Protein Ekstrelerinin Fibrinolitik Sisteme Etkileri

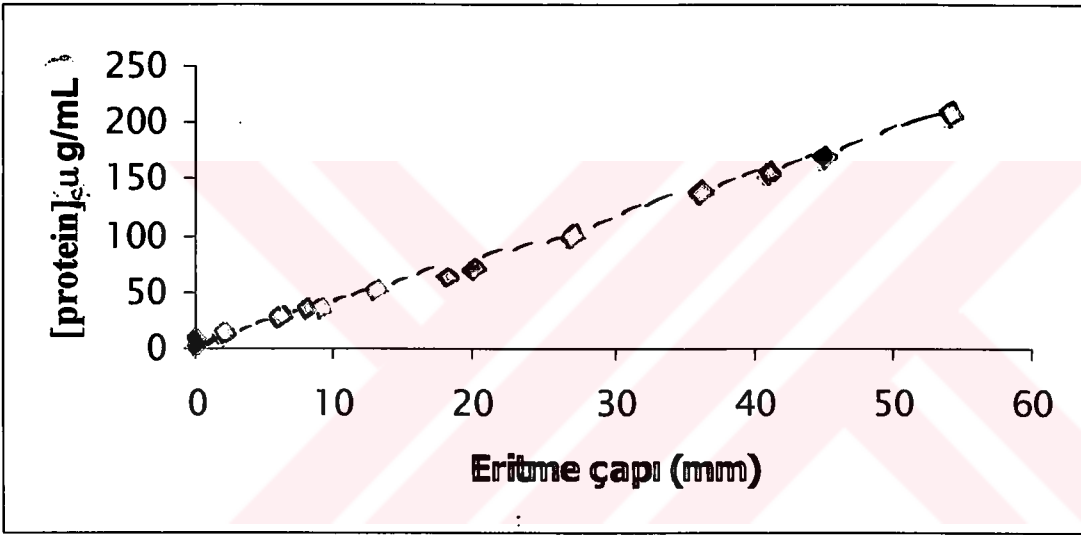
3.2.1. Fibrin plak eritme kuvveti

Fibrin plağa uygulanan ıspanak, kara lahana, brüksel lahanası, beyaz lahana ve pazı protein ekstreleri 7 µg/mL konsantrasyonda eritme alanı oluşturmadı. Daha yüksek protein konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak fibrin plakta eritme çap ve alanlarını arttırdı (Tablo 3.2, Şekil 3.3).

Tablo 3.2 : Cruciferae ve Chenopodiaceae bitki ekstrelerinin fibrin plakta doza bağımlı olarak oluşturdukları eritme alanları

Ekstreler	[Protein] (µg/mL)	Eritme çapı (mm)	Eritme alanı (mm ²)
Serum fizyolojik	0	0	0
Ispanak (Yöntem-II)	7	0	0
	70	20	314.00
Kara lahana (Yöntem-II)	7	0	0
	62	18	254.34
	135	36	1017.36
Brüksel lahanası (Yöntem-I)	7	0	0
	33	9	63.59
	150	41	1319.85
Beyaz lahana (Yöntem-I)	7	0	0
	165	45	1589.63
Pazı (Yöntem-II)	7	0	0
	10	2	3.14
	25	6	28.26
	34	8	50.24
	50	13	132.67
	100	27	572.27
	200	54	2289.06

- Ispantak
- Kara lahana
- Brüksel lahanası
- Beyaz lahana
- Pazi



Şekil 3.3 : Protein konsantrasyonuna bağlı fibrin plak çapları

3.2.2. Protein Ekstrelerinin EEZ'ye Etkileri

EEZ testinde ekstreli PPP'ye ait değerlerin ekstresiz PPP'ye ait kontrol değerlerine kıyasla euglobulin erime zamanında ne kadar kısaltmaya neden olduğu belirlendi. beyaz lahana (7 µg/mL), kara lahana (10 µg/mL), ıspanak (12 µg/mL), brüksel lahanası (16.5 µg/mL ve 33 µg/mL) ve pazı (40 µg/mL) protein ekstrilerinin fibrinolitik sistem üzerine aktive edici etkileri EEZ yöntemiyle değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamsız bulundu (n:7, Tablo 3.3). Pazı (70 µg/mL), kara lahana (135 µg/mL), ıspanak (140 µg/mL), brüksel lahanası (150 µg/mL), beyaz lahana (165 µg/mL) ve pazı (200 µg/mL) protein ekstrileri anlamlı etki gösterdi.

EEZ'yi 107.42 ± 24.43 dakikadan kara lahana (135 µg/mL) ekstresi 64.71 ± 22.57 , ıspanak (140 µg/mL) ekstresi 64.85 ± 23.90 , brüksel lahanası (150 µg/mL) ekstresi 63.42 ± 19.72 ve beyaz lahana (165 µg/mL) ekstresi 57.71 ± 18.72 dakikalara kısalttı (n:7, Tablo 3.4).

Yine 107.42 ± 24.43 dakikadan pazı (40 µg/mL, 70 µg/mL ve 200 µg/mL) protein ekstrileri sırasıyla 94.28 ± 23.09 , 77.00 ± 19.46 ve 47.57 ± 18.38 dakikalara kısalttı (n:7, Tablo 3.5). Ayrıca; pazı (200 µg/mL) protein ekstresinin tek olguda doza bağımlı olarak EEZ'yi kısalttığı görüldü (Tablo 3.6, Şekil 3.4).

Tablo 3.3 : Cruciferae bitkileri ve ıspanak protein ekstralarının düşük dozlarda EEZ'ye etkisi (dakika)

Olgu no	Yaş	K	PPP + B. L.	PPP + K. L.	PPP + I	PPP + Br. L.	
		PPP + SF	(7 µg/mL)	(10 µg/mL)	(12 µg/mL)	(16.5 µg/mL)	(33 µg/mL)
1	20	90	88	87	87	86	80
2	20	92	90	90	90	87	83
3	20	94	92	91	91	89	84
4	21	95	94	93	92	90	85
5	35	98	97	96	95	93	83
6	53	120	117	116	115	113	106
7	55	158	156	155	155	153	146
X		106.71	104.86	104.00	103.57	101.57	95.28
± SD		± 24.76	± 24.54	± 24.44	± 24.49	± 24.48	± 23.99
p < 0.2							

K : Kontrol, SF : Serum fizyolojik, B. L. : Beyaz lahana (Yöntem-I), K. L. : Kara lahana (Yöntem-II), Br. L. : Brüksel lahanası (Yöntem-I), I : Ispanak (Yöntem-II)

Tablo 3.4 : Cruciferae bitkileri ve ıspanak protein ekstralarının yüksek dozlarda EEZ'ye etkisi (dakika)

Olgu no	Yaş	PPP + SF	PPP + K. L.	PPP + I	PPP + Br. L.	PPP + B. L.
			(135 µg/mL)	(140 µg/mL)	(150 µg/mL)	(165 µg/mL)
1	20	90	52	50	48	43
2	25	92	54	53	50	45
3	20	94	56	55	52	47
4	35	98	40	40	56	51
5	29	100	62	60	58	53
6	53	120	82	90	78	70
7	55	158	107	106	102	95
X		107.42	64.71	64.85	63.42	57.71
± SD		± 24.43	± 22.57	± 23.90	± 19.72	± 18.72
p < 0.01						P < 0.001

K : Kontrol, SF : Serum fizyolojik, B. L. : Beyaz lahana (Yöntem-I), K. L. : Kara lahana (Yöntem-II), Br. L. : Brüksel lahanası (Yöntem-I), I : Ispanak (Yöntem-II)

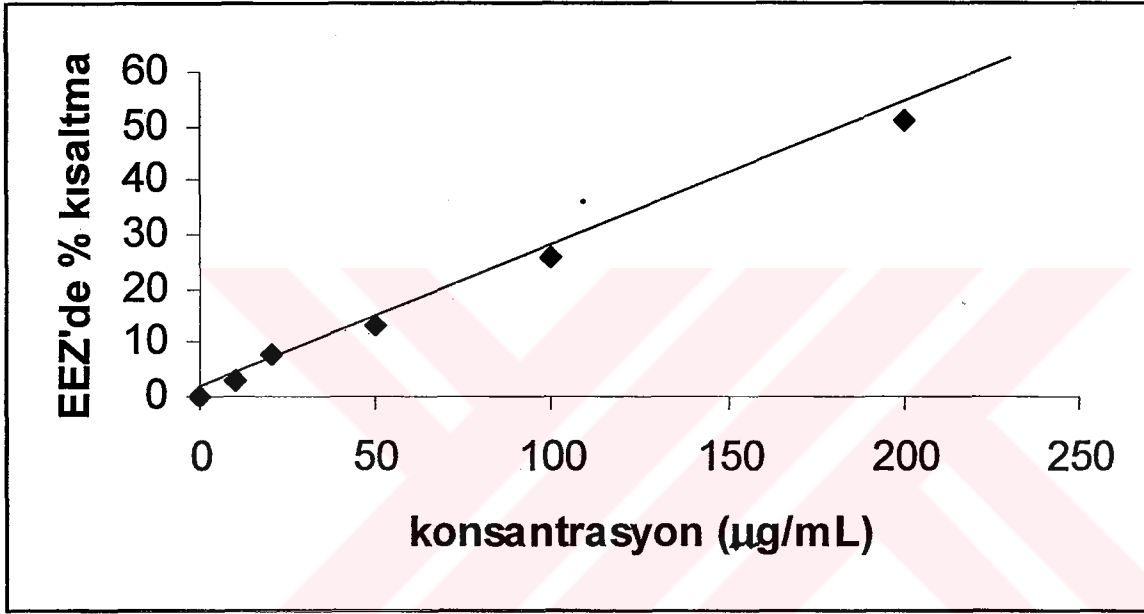
Tablo 3.5 : *Pazı protein ekstresinin doza bağımlı olarak EEZ'ye etkisi (dakika)

Olgu no	Yaş	PPP + SF	40 µg/mL	70 µg/mL	200 µg/mL
1	20	90	78	68	33
2	25	92	80	64	35
3	20	94	78	67	37
4	35	98	86	70	41
5	29	100	89	72	43
6	53	120	108	78	60
7	55	158	141	120	84
X		107.42	94.28	77.00	47.57
± SD		± 24.43	± 23.09	± 19.46	± 18.38
			p < 0.2	p < 0.02	p < 0.001

Tablo 3.6 : *Pazı protein ekstresinin tek olguda doza bağımlı olarak EEZ'ye etkisi

Konsantrasyon (µg/mL)	EEZ (dakika)	Aktivasyon (%)	Kısaltma (%)
200	94	49	51
100	144	74	26
50	169	87	13
20	179	92	8
10	189	97	3
0	194	100	0

*Pazı protein ekstresi Yöntem-II'ye göre elde edilmiştir.



Şekil 3.4 : Pazi protein ekstresinin tek olguda EEZ'ye doza bağımlı etkisi

3.3. Protein Ekstrelerinin Trombin Zamanına Etkileri

Trombin zamanı testinde, ekstreli PPP'ye ait değerlerin ekstresiz PPP'ye ait değerlere kıyasla pıhtılaşma süresinde ne kadar uzamaya neden olduğu belirlendi. Ekstrelerin trombin zamanına etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde beyaz lahana (0.35 µg/mL), kara lahana (0.50 µg/mL) protein ekstraktları az anlamlı (Tablo 3.7), ıspanak (0.60 µg/mL), brüksel lahanası (1.65 µg/mL), beyaz lahana (1.65 µg/mL), kara lahana (6.75 µg/mL) ve pazı (10.00 µg/mL) protein ekstraktları anlamlı bir uzamaya neden oldu.

Trombin zamanını kara lahana (0.35 µg/mL), ekstresi 15.42 ± 4.57 saniyeden 20.14 ± 4.48 saniyeye, kara lahana (0.50 µg/mL) ekstresi aynı değerden 20.71 ± 4.60 saniyeye (Tablo 3.7), ıspanak (0.60 µg/mL) ekstresi 14.14 ± 5.01 saniyeden 21.28 ± 3.68 saniyeye (Tablo 3.8), brüksel lahanası (1.65 µg/mL) ekstresi 17.14 ± 5.64 saniyeden 46.85 ± 10.17 saniyeye (Tablo 3.9), beyaz lahana (1.65 µg/mL) ekstresi 15.42 ± 5.38 saniyeden 44.71 ± 6.21 saniyeye (Tablo 3.10) ve kara lahana (6.75 µg/mL) ekstresi 12.71 ± 3.59 saniyeden 99.57 ± 9.90 saniyeye (Tablo 3.11) ve pazı (10.00 µg/mL) ekstresi 16.57 ± 6.60 saniyeden 190.00 ± 9.00 saniyeye (Tablo 3.12) uzattı (n:7).

Tablo 3.7 : Beyaz lahana (0.35 µg/mL) ve kara lahana (0.50 µg/mL) protein ekstralarının trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + ¹ B.L. (saniye)	PPP + ² K. L. (saniye)
1	27	10	15	16
2	23	13	15	15
3	27	13	19	18
4	20	13	18	20
5	20	16	24	25
6	26	20	25	25
7	21	23	25	26
X ± SD		15.42 ± 4.57	20.14 ± 4.48	20.71 ± 4.60
p < 0.05				

Tablo 3.8 : Ispanak (0.60 µg/mL) protein ekstresinin trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + ³ Ispanak (saniye)
1	36	6	15
2	20	11	20
3	23	13	20
4	27	13	24
5	20	16	20
6	26	20	24
7	24	20	26
X ± SD		14.14 ± 5.01	21.28 ± 3.68
p < 0.02			

Tablo 3.9. Brüksel lahanası (1.65 µg/mL) protein ekstresinin trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + Br. L. (saniye)
1	27	10	40
2	27	13	36
3	23	13	37
4	20	16	50
5	26	20	65
6	21	23	50
7	25	25	50
X		17.14	46.85
± SD		± 5.64	± 10.17
p < 0.001			

Tablo 3.10. Beyaz lahanası (1.65 µg/mL) protein ekstresinin trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + B. L. (saniye)
1	35	10	40
2	20	11	40
3	23	11	47
4	23	13	43
5	26	20	38
6	24	20	50
7	21	23	55
X		15.42	44.71
± SD		± 5.38	± 6.21
p < 0.001			

Tablo 3.11. Kara lahanası (6.75 µg/mL) protein ekstresinin trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + K. L. (saniye)
1	35	10	90
2	20	11	100
3	23	11	100
4	23	11	110
5	21	11	115
6	26	15	90
7	24	20	92
X		12.71	99.57
± SD		± 3.59	± 9.90
p < 0.001			

Tablo 3.12. Pazı (10.00 µg/mL) protein ekstresinin trombin zamanına etkisi

Olgu no	Yaş	PPP + SF (saniye)	PPP + Pazı (saniye)
1	36	6	180
2	20	13	190
3	23	13	190
4	20	16	200
5	26	20	200
6	21	23	180
7	25	25	180
X		16.57 ±	188.57
± SD		6.60	± 9.00
p < 0.001			

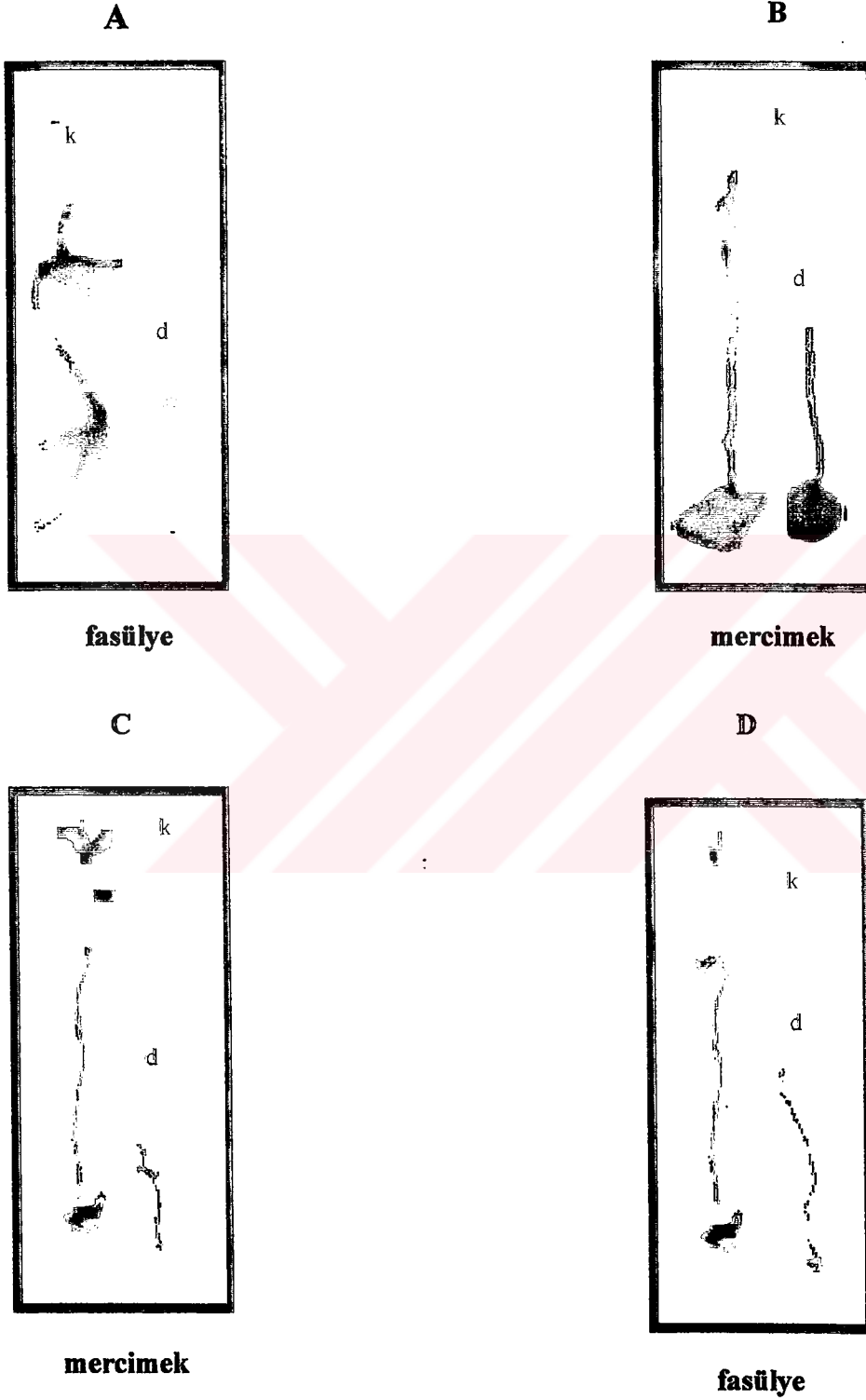
3.4. Protein Ekstrelerinin Mitoz Bölünmeye Etkileri

Beyaz lahana, kara lahana, pazı ve brüksel lahanası protein ekstrilerinin çimlendirilmiş fasülye ve mercimek filizlerinde uzamayı durdurdukları veya yavaşlattıkları yani mitoz bölünmeyi inhibe ettikleri belirlendi (Tablo 3.13, Resim 3.1).

Tablo 3.13 : Lahana ve pazı protein ekstrilerinin mitoz bölünmeye etkileri

Ekstreler	°B. lahana (7 µg/mL)				¹ K. lahana (10 µg/mL)				² Pazı (10 µg/mL)				³ Br. lahanası (33 µg/mL)					
	Gün	5.	6.	7.	8.	5.	6.	7.	8.	5.	6.	7.	8.	5.	6.	7.	8.	
Fasülye	FİLİZ BOYU (cm)	K	3	4	6	7	2	4	6	7	2	4	5	6	7	14	16	18
		D	3	4	4	4	2	2	3	3	2	2	2	2	7	9	10	10
Mercimek	FİLİZ BOYU (cm)	K	3	4	5	6	2	4	6	7	2	5	7	9	5	7	9	11
		D	3	4	4	4	2	2	3	3	2	2	2	2	5	6	6	6

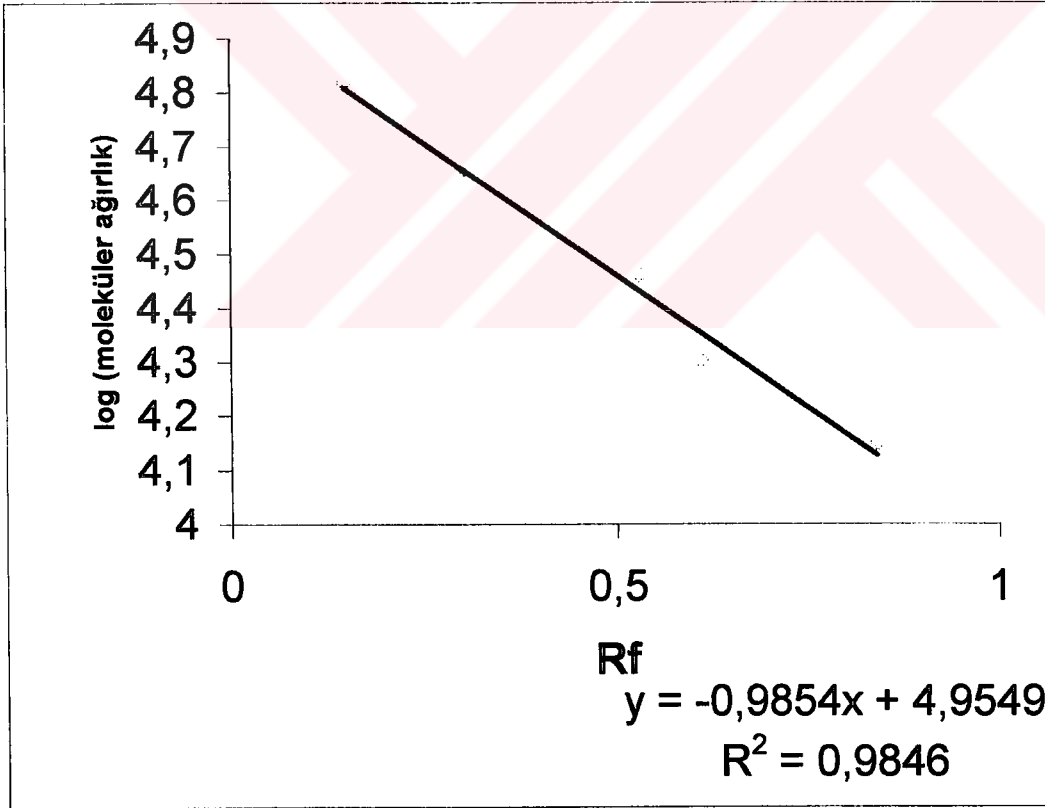
K : kontrol, D : deney, 0,3 : Yöntem-I, 1,2 : Yöntem-II



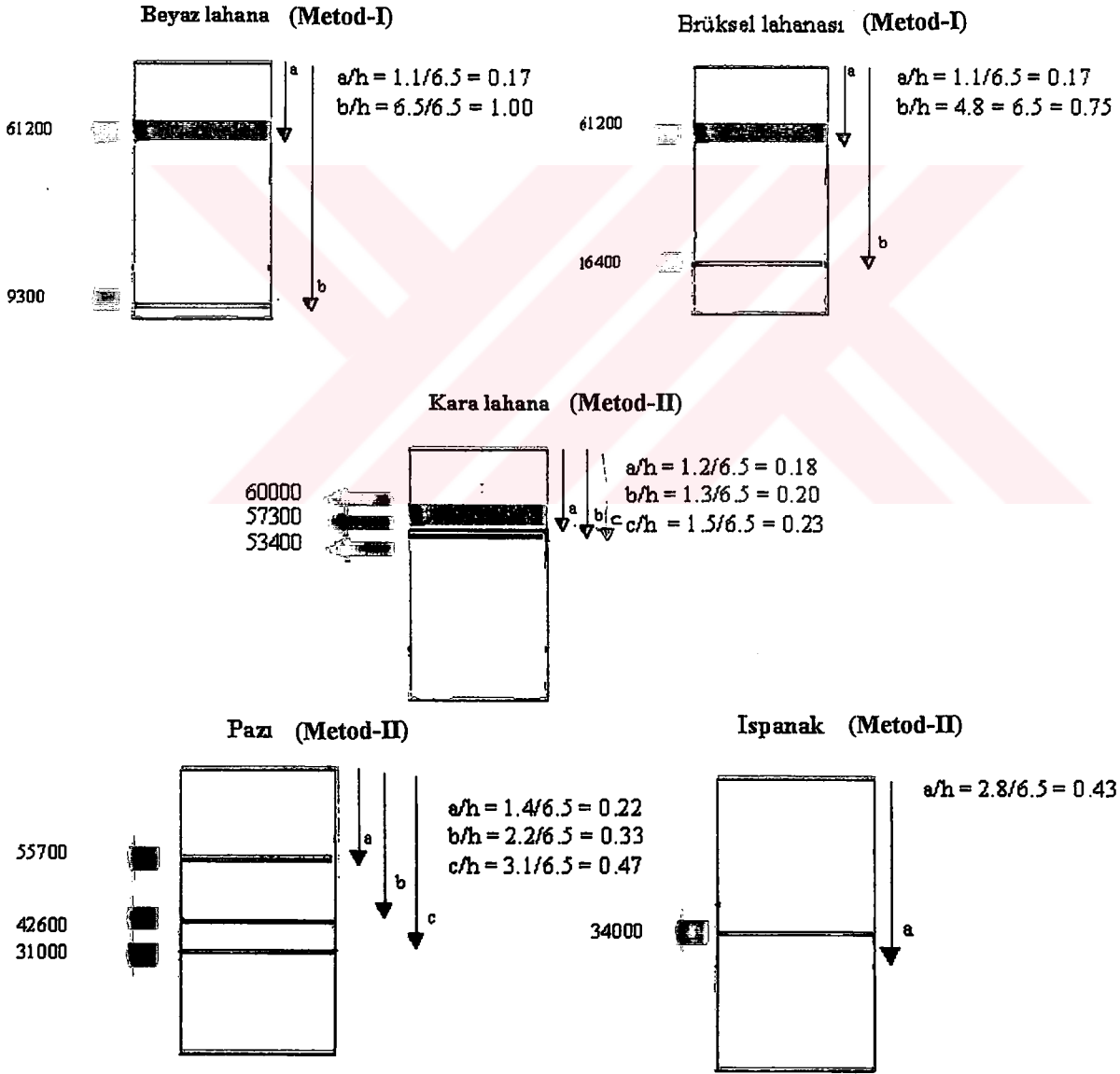
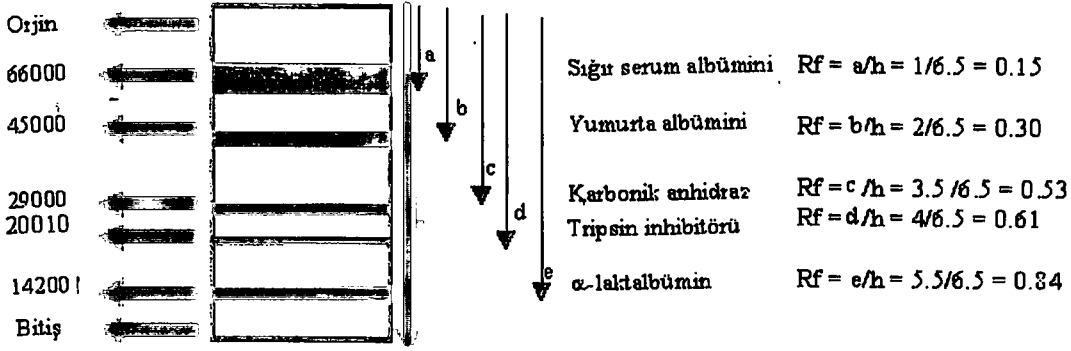
Resim 3.1 : Protein ekstralarının mitoz bölünmeye etkileri. A. Beyaz lahana, B : Kara lahana, C : Pazı, D : Brüksel lahanası, k : kontrol, d : deney, A,D : Yöntem-I, B,C : Yöntem-II

3.5. Protein Ekstrelerinin Moleküler Ağırlıkları

Düşük moleküler ağırlıklı protein standart karışımı kullanılarak yapılan SDS-PAGE analizinde, beyaz lahanaya ait 61.200 ve 9.300 Da, brüksel lahanasına ait 61.200 ve 16.400 Da, kara lahanaya ait 60.000, 57.300 ve 53.400 Da, pazıya ait 55.700, 42.600 ve 31.000 Da ve ıspanağa ait 34.000 Da moleküler ağırlıkta protein bandları belirlendi (Şekil 3.5,3.6).



Şekil 3.5 : SDS-PAGE protein standart karışımlarının moleküler ağırlıkları ile Rf değerleri arasındaki ilişki



Şekil 3.6 : Protein standartlarına ve örneklere ait SDS-PAGE bandları

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmalarda, beyaz lahananın ve kara lahananın antiagregan, fibrinolitik, antitrombinik ve sitolitik etkileri gösterilmiştir (1,3,5,47). Literatürde, beyaz lahana tohumundaki 10.000 Da moleküler ağırlıktaki bir proteinin Stuart faktörü, trombin ve plazmine bağlanarak antikoagulan etki gösterdiği bildirilmiştir (49). Beyaz lahana suyunun doku kültüründe yetiştirilen sıçan embriyoblast fibroblast hücrelerinde bozulmalara yol açtığı da belirtilmiştir (50). Sitolitik etkiden sorumlu etken maddenin yapısı belirlenememiştir (51).

Yurtsever ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, asetonla çöktürülmüş beyaz lahana ve kara lahana protein ekstralarının ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu (I. ve II. dalga) inhibe ettikleri bulunmuştur (1,3,5). Aynı ekstraların fibrin plakta erime alanları oluşturarak ve EEZ'yi sırasıyla beyaz lahana ekstresinin 134.20 ± 15.65 dakikadan 116.90 ± 12.16 dakikaya ve kara lahana ekstresinin 133.25 ± 16.69 dakikadan 118.30 ± 13.22 dakikaya kısaltarak fibrinolitik aktivite gösterdikleri görülmüştür (1,3,5). Trombin zamanını beyaz lahana ekstresinin 10.80 ± 1.60 saniyeden 16.40 ± 1.68 saniyeye ve kara lahana ekstresinin 11.40 ± 1.93 saniyeden 16.65 ± 2.17 saniyeye uzatarak antitrombinik etki gösterdikleri belirlenmiştir (1,3,5). SDS-PAGE analizinde kara lahana ekstresine ait 63.000 Da moleküler ağırlıkta tek protein bandı gözlenmiştir (3).

Bu çalışmada da asetonla çöktürülmüş beyaz lahana ve brüksel lahanası ile amonyum sülfatla çöktürülmüş kara lahananın ve pazı

protein ekstralarının doza bağımlı olarak ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu inhibe ettikleri, doza bağımlı olarak fibrin plakta erime alanları verdikleri ve EEZ'yi sırasıyla 107.42 ± 24.43 dakikadan beyaz lahana ekstresinin 57.71 ± 18.72 , brüksel lahanası ekstresinin 63.42 ± 19.72 , kara lahana ekstresinin 64.71 ± 22.57 ve pazı ekstresinin 47.57 ± 18.38 dakikalara kısalttıkları görüldü. Trombin zamanını beyaz lahana ekstresinin 15.42 ± 5.38 saniyeden 44.71 ± 6.21 saniyeye, brüksel lahanası ekstresinin 17.14 ± 5.64 saniyeden 46.85 ± 10.17 saniyeye, kara lahana ekstresinin 12.71 ± 3.59 saniyeden 99.57 ± 9.90 saniyeye ve pazı ekstresinin 16.57 ± 6.60 saniyeden 188.57 ± 9.00 saniyeye uzattıkları belirlendi. Protein ekstralarının nemli pamukta çimlendirilen fasülye ve mercimek filizlerinde biyümeyi yavaşlattıkları veya durdurdukları gözlemlendi. Ispanak ekstresinin ise sadece fibrinolitik ve antitrombinik etkileri belirlenebildi. SDS-PAGE analizinde beyaz lahana, brüksel lahanası, kara lahana, pazı ve ıspanak ekstralarına ait sırasıyla 61.200 ve 9.300 Da; 61.200 ve 16.400 Da; 60.00, 57.300 ve 53.400 Da; 55.700, 42.600 ve 31.000 Da ile 34.000 Da moleküler ağırlıktaki protein bantları gözlemlendi.

Sonuç olarak; beyaz lahana, brüksel lahanası, kara lahana ve pazı ekstralarının antiagregan, fibrinolitik, antitrombinik ve antimitotik aktivite göstermeleri yönünden önceki çalışmalara uygunluk gösterdikleri ve bu etkilerden sorumlu etken madde/maddelerin protein yapısında oldukları anlaşıldı.

Ispanak ekstresinin ise antiagregan ve antimitotik aktiviteleri araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yurtsever, E., Yardımcı, T., Ulutin, O.N. : The antiaggregative, profibrinolytic and antithrombotic activities of the extract of *Brassica oleracea* var. capitata. 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, 1998 (Abs No : 379)
2. Yurtsever, E., Yardımcı, K.T. : The in vivo effect of a *Brassica oleracea* var. capitata extract on Ehrlich ascites tumors of *Mus musculus* BALB/C mice. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 15 : 215-222, 1999.
3. Yurtsever, E. : *Brassica oleracea* var. acephala (Kara lahana) ekstresinin biyolojik aktiviteleri ve biyokimyasal yönden incelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 1991.
4. Yurtsever, E., Gürkan, E., Çevikbaş, A., Yardımcı, T. : The effect of an extract from *Brassica oleracea* var. acephala on solid Ehrlich ascites (EA) tumors *Mus musculus* BALB/C mice. 5th Meeting of the Mediterranean Blood Clup, Antalya, 1990, MBC-182 (53).
5. Yurtsever, E., Yardımcı, T., Çevikbaş, A., Uğur, Ş.M., Gürkan, E., Savaş, B., Akoğlu, T., Ulutin, O.N. : Kara lahana ekstresinin antitümoral, antiagregan, profibrinolitik ve antitrombotik etkileri. IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Ed. K.H.C. Başer, 1992 (s. 115-124).
6. Yardımcı, T., Yurtsever, E., Gürkan, E., Çevikbaş, A., Savaş, B., Kavalalı, G., Bayrakdar, E., Akoğlu, T. : The antitumoral effect of an extract isolated from *Brassica oleracea* var. acephala. *Int. Pharm. J.*, 1991 Suppl. F.I.P. Washington, D.C, U.S.A. (Abs No : 4P-MP-029).

7. Yurtsever, E., Bayrakdar, E., Yardımcı, T. : Brassica oleracea var. acephala'dan elde edilen antitümoral etkili maddenin antibakteriyel etkisi, Mus musculus BALB/C farelerin plazma protein dağılımına etkisi ve kısmi saflaştırılması. 7. Türk Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi, Kuşadası, 1992 (Abs No : 102).
8. Bayrakdar, E., Yurtsever, E., Yardımcı, T. : Brassica oleracea var. acephala'dan elde edilen ekstrenin antibakteriyel etkisi, Mus musculus BALB/C farelerinin proteinleri üzerine etkisi ve kısmi saflaştırılması. M.Ü. Ecz. Der., 9 : 25-36, 1993.
9. Yurtsever, E., Bayrakdar, E., Yardımcı, T. : Brassica oleracea var. acephala ekstresinin normal ve Ehrlich ascites tümörlü BALB/C farelerinin lökosit sayımına etkisi. XXXII. Ulusal Türk Tıp Kongresi, Adana, 1992 (Abs No : 42).
10. Yurtsever, E., Bayrakdar, E., Yardımcı, T. : Kara lahana ekstresinin normal ve tümörlü BALB/C farelerde lökosit formülüne etkisi. XXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, 1993 (Abs. No : 233).
11. Yurtsever, E., Yardımcı, T., Şener, A., Göker, B. : Beyaz lahana ekstresinin normal ve tümörlü BALB/C farelerde lökosit formülüne etkisi. XXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, 1999 (Abs No : P-253).
12. Yaman, A., Yurtsever, E., Özsvacı, M., Yardımcı, T. : The effect of Brassica oleracea extract on leucocyte count and percent hematocrite values. Mar. Üniv. Ecz. Der., 11 : 293-296, 1995.
13. Yurtsever, E., Yardımcı, T. : Ehrlich ascites solid tümörlü ve normal Mus musculus BALB/C farelerde % hematokrit, hemoglobin, eritrosit glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeyleri ve Brassica oleracea var. acephala ekstresinin bu parametrelere etkisi. II. Ulusal Biyokimya

- Kongresi. *Biyokimya Dergisi*, cilt XVII, özel ek, Antalya, 1992 (Abs No : B-23).
14. Yurtsever, E., Yardımcı, T. : The in vivo effect of *Brassica oleracea* var. *capitata* extract (EC) on erythrocyte glutathione peroxidase levels of BALB/C mice with and without Ehrlich ascites tumors. Second International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, İstanbul, 1998 (Abs No : P22).
 15. Yaman, A., Yurtsever, E., Özsavcı, M., Yardımcı, T. : The effect of *Brassica oleracea* var. *capitata* on lipid peroxidation in *Mus musculus* BALB/C mice. First International Meeting on Pharmacy Pharmaceutical Sciences, İstanbul, 1994 (Abs No : P.032)
 16. Yurtsever, E., Tamer, L., Bayrakdar, E., Yücebilgiç, T., İsbir, T., Yardımcı, T. : The effect of extract of *Brassica oleracea* var. *capitata* on zinc, copper and magnesium levels in different tissues of *Mus musculus* BALB/C mice. First International Meeting on Pharmaceutical Sciences, İstanbul, 1994 (Abs No : P.160).
 17. Yardımcı, T., Yurtsever, E., Turgay, F. : In vivo effect of *Brassica oleracea* var. *capitata* on renal functions and serum electrolytes in rats. *Int. Pharm. J. Suppl. F.I.P.* Stockholm, 1995 (Abs. No : 253).
 18. Tunali, T., Yarat, A., Yanardağ, R., Özçelik, F., Özsoy, O., Ergenekon, G., Emekli, N. : The effect of Chard (*Beta vulgaris* L. *cicla* var.) on the skin of streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmazie*, 53 : 638-640, 1998.
 19. Conn, E.E., Pros., A.E. : *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise Secondary Plant Products.* Academic Press, New York, s. 501-525, 1981.
 20. Wall, M.E., Taylor, H., Peremila, P., Wani, M.C. : Indoles in edible members of the Cruciferae. *J. Natl. Prod.*, 51 : 129-135, 1988.

21. Dunn, S.E., LeBlanc, G.A. : Hypocholesterolemic properties of plant indoles. Inhibition of acyl-CoA : cholesterol acyltransferase activity and reduction of serum LDL/VLDL cholesterol levels by glucobrassicins derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, 47 : 359-364, 1994.
22. Altinkurt, O., *Brassica oleracea* var. *capitata*'nın farmakolojik etkileri, *Türk Hijyen ve Tec. Biol. Der.*, 31 : 153-158, 1971.
23. Zeybek, N. : *Farmasötik Botanik*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, s.117, 1985.
24. Hoz, B., Fernandez-Rivas, M., Quirce, S., Cuevas, M., Fraj, J., Davila, I., Igea, J.M., Losada, E. : Swiss chard hypersensitivity : Clinical immunologic study. *Ann. Allergy*, 67 : 487-492 (Abstr.). 1991.
25. Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Alarcon-Aguilar, F.J. : Antihyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.*, 48 : 25-32 (Abstr.). 1995.
26. Khory, R.N., Katrak, N.N. : *Materia Medica of India and Their Therapeutics*. Neeraj Publishing House, Delhi-110052, s. 507, 1981.
27. Emekli, N. : *Basic and Applied Biochemistry*. M.Ü. yayın no : 556, Dişhekimliği Fakültesi yayın no : III, İstanbul, s. 341-382, 390, 391, 1994.
28. Ulutin, O.N., Cin, Ş. : *Hemostaz ve Tromboz*. Hemostaz ve Tromboz Günleri-I, 6-8 Mayıs 1996. Çocuk Hastalıkları Araştırma Vakfı, Ankara, s. 23-26,63-86, 1997.
29. Henry, J.B. : *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 9th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, s. 701-747, 1996.

30. Ulutin, O.N. : The Platelets Fundamentals and Clinical Applications. İstanbul, s. 7-36, 56-149, 176-216, 1976.
31. Akkerman, J.W.N., Bouma, B.N., Sixma, J.J. : Atlas On Hemostasis. Boehringer Ingelheim International GmbH, 77-82, 114-119, 1985.
32. Rawn, J.D. : Biochemistry. Neil Patterson Publishers, U.S.A., s.200-205, 1989.
33. Harborne, J.B., Dey, P.M. : Methods in Plant Biochemistry. Academic Press., New York, s.235-260, 1991.
34. Freilich, A. : Seminar On Aggregation. Chrono-Log Corporation, 2 West Park Road.
35. Berkarda, B., Eyüboğlu, H. :Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri. Basım Yayım ve Dağıtım A.Ş., İstanbul, s. 93-95, 252-254, 266-268, 288-292, 1983.
36. Kurucu, S. : Platelet agregasyonuna etki eden doğal ürünler. Eczacılıkta Yenilikler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları no : 60, s. 124-128, 1986.
37. Beretz, A., Cazenave, J.P. : Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. Planta Medica. 57 (Suppl.) : Issue I, 868-872, 1991.
38. Guh, J.H., Ko, F.N., Jong, T.T., Teng, C.M. : Antiplatelet effect of Gingerol isolated from Zingiber officinale. J. Pharm. Pharmacol., 47: 329-332, 1995.
39. Uğur, M.Ş., Oba, R., Yardımcı, T., Balkuv-Ulutin, Ş., Ulutin, O. : Patatesten elde edilen apirazin trombosit agregasyonuna ve fibrinolitik sisteme etkisi. IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Ed. K.H.C., Başer, 1992 (s. 318-322).

40. Harker, L.A., Hanson, S.R., Runge, M.S. : Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am. J. Cardiol.*, 75 : 12b-17b, 1995.
41. Noll, G., Lammle, B., Duckert, F. : Treatment with Stanazolol before thrombolysis in patients with arterial occlusions. *Thromb. Res.*, 37 : 529-532, 1985.
42. Pescador, R., Mantovari, M., Prino, G. : Pharmacokinetics of Defibrotide and of its profibrinolytic activity in the rabbit. *Thromb. Res.*, 30 : 1-11, 1983.
43. Larsson, L.J., Frisch, E.P., Torneke, K., Lindblom, T., Bjork, I. : Properties of the complex between α_2 -macroglobulin and brinase, a proteinase from *Aspergillus oryzae* with thrombolytic effect. *Thromb. Res.*, 49 : 55-68 (Abstr.). 1988.
44. Harris, E.L.V., Angal, S. : *Protein Purification Methods*. IRL Press (at Oxford University Press), s. 146-161, 1989.
45. Centriprep Centrifugal Concentrators. Operating Manual, Amicon, INC, Beverly USA, s. 12,13, 1996.
46. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.I. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
47. Gürkan, E., G., Köksal, The cytotoxic effect two Brassica species, *Fitoterapia*, LIX : 47-48, 1988.
48. Walker, J.M. : *Methods in Molecular Biology*. Vol. I, Humana Press, New Jersey s. 41-55, 1984.
49. Carter, T.H., Everson, B.A., Ratnoff, O.D. : Cabbage seed protease inhibitor : a slow tight binding inhibitor of trypsin with activity toward thrombin, activated Stuart factor (Factor Xa), activated

Hageman factor (Factor XIIa) and plasmin. Blood, 75 : 108-115, 1990.

50. Şengün, A., Çevikbaş, A., Özalpan, E. Gürkan, E. : Brassica oleracea var. capitata'nın doku kültüründe yetiştirilen hücreler ve bakteriler üzerine tesiri. IV. Bilim Kongresi, Ankara, 1973 (s. 1-4).

51. Gürkan, E., Rollas, S. : Brassica oleracea var. capitata'da sitolitik etki gösteren maddenin yapı tayini. IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Ed.K.H.C. Başer, 1992 (s. 125-130).



ÖZGEÇMİŞ

12.12.1973 İstanbul doğumluyum. İlk ve orta dereceli okulları İzmit'te bitirdim. Ocak-1996'da M.Ü. Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldum. Şubat-1997'de M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladım.



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yüksek Lisans öğrencisi Gamze YÜKSEL'in, çalışması jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Turay YARDIMCI

Üniversitesi : Marmara

T. Yardımcı

Üye : Doç.Dr.Fikriye URAS

Üniversitesi : Marmara

F. Uras

Üye : Yrd.Doç.Dr.Ertağrul YURTSEVER

Üniversitesi : Marmara

E. Yurtsever

ONAY

**Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28.1.2000 tarih ve 02...
ayılı kararıyla onaylanmıştır.**

S. Rollas
Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür

DEKRETE BAĞLI ON İMZA KUTUSU