

31641

**YENİ BİR HEPARİNOİD OLAN
RAPARİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Ecz. LÜTFİ GENÇ

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman : Prof. Dr. Erden GÜLER

Nisan 1993

**YENİ BİR HEPARİNOİD OLAN
RAPARİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Ecz. LÜTFİ GENÇ

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof.Dr. Erden GÜLER

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Nisan 1993

Lütfi GENÇ'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı " YENİ BİR HEPARİNOİD OLAN RAPARİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR " başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

16.04.1994

Üye :

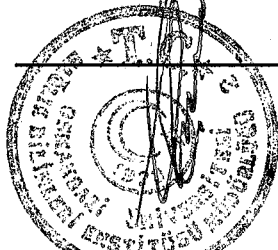
Üye :

Üye :

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.20.04.1994..... gün ve212/546.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ASLI GİBİDİR
28 NISAN 1994

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Nurettin BAŞARAN
Enstitü Müdürü




Mehmet MÜSMUL
Enstitü Sekreteri

1916'da bulunan heparin elde edilen kaynaklara ilaveten , deniz hayvanları üzerinde sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında deniz salyangozundan raparin adlı madde 1991 yılında izole edilmiştir. Bu çalışmada raparin'in Sephadex G kolonundan fraksiyonlanması yapılmıştır. Değişik tekniklerle elde edilen raparin'lerden iki fraksiyon elde edilmiş ve bu fraksiyonların metakromatik, rekalsifikasyon, heptest ve hepaclot testleri ile incelenmesi yapılmıştır. Metakromaziyi yalnızca raparin RH₅₀₀ fraksiyon I'in Azur A ve Toluidin mavisiyle gösterdiği tesbit edilmiştir. Metilen mavisiyle hiçbir raparin ve onun fraksiyonu metakromazi vermemiştir. Bunun yanında rekalsifikasyon testinde bütün fraksiyonlar aktivite göstermişlerdir. Rekalsifikasyon deneylerinde en yüksek aktivite raparin RKL₁₀ fraksiyon I'e aittir. Heptest'le bütün raparin ve fraksiyonlarının aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. Hepaclot deneyine sadece raparin RHP₁₀ fraksiyon II cevap vermiştir.



SUMMARY

Heparin was first isolated at 1916, from some land animal sources. Later some studies for this purpose were carried on sea animals. The most recent substance raparin was isolated from a marine animal, namely *Rapana venosa* in 1991. In this study; raparin was extracted by three different techniques from hepatopankreas part of *Rapana venosa* and these were fractionated through Sephadex G 50 column and two fractions were obtained from each. On these fractions recalcification time, heptest, hepaclot test and metachromatic activity assay studies were carried and only fraction I of raparin (RH₅₀₀) showed metachromatic activity with the dyes Azur A and Toluidine Blue but non of the raparins and their fractions showed any activity with Methylene Blue. However every fractions showed activity in recalcification time assay and fraction I of raparin (RKL₁₀) showed the greatest activity in this assay. According to heptest results all fractions showed activity but only fraction II of raparin (RHP₁₀) showed activity with hepaclot test.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında büyük bir anlayış ve iyi niyetle her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Hocam, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Erden GÜLER'e,

Yakın ilgisinden, materyel temini ve çalışmaların yürütülmesine katkılarından dolayı Sayın Prof.Dr. Kasım Cemal GÜVEN'e,

Fakültemizin Dekanı ve teknik imkanlarından yararlandığım Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nin Müdürü Sayın Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e

Yardımlarından dolayı Sayın Dr. Yıldız ÖZSOY'a, Kimya Yüksek Müh. Sayın Mine Kürkçüođluna ve TBAM personeline,

Anlayış ve sabırla her zaman yanımda olan eşim Asiye GENÇ'e Teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	: iv
SUMMARY.....	: v
TEŞEKKÜR.....	: vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	: vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	: vii
GİRİŞ ve AMAÇ.....	: 1
1. KURAMSAL KISIM.....	: 2
1.1.Mukopolisakkaritler.....	: 2
1.2. Heparin hakkında genel bilgiler.....	: 3
1.2.1. Elde edilişi.....	: 4
1.2.2. Fiziksel özellikleri.....	: 5
1.2.3. Kimyasal özellikleri.....	: 6
1.2.3.1. Yapısı.....	: 6
1.2.3.2. Tanınması.....	: 6
1.2.3.2.1. UV spektrumu.....	: 6
1.2.3.2.2. IR spektrumu.....	: 6
1.2.3.2.3. Kağıt kromatografisi.....	: 7
1.2.3.2.4. İnce tabaka kromatografisi.....	: 7
1.2.4. Farmakolojisi.....	: 7
1.2.4.1. Antikoagülan aktivitesi.....	: 7
1.2.4.2. Lipolitik aktivitesi.....	: 10
1.2.4.3. Kullanılma yerleri.....	: 10
1.2.5. Fraksiyonlandırılması.....	: 11
1.2.5.1. Fraksiyonlu Çöktürme.....	: 11
1.2.5.2. Jel Kromatografisi.....	: 11
1.2.6. Miktar Tayini.....	: 13
1.2.6.1. Metakromatik Tayin.....	: 13
1.2.6.2. Antikoagülan aktiviteye dayanan tayinler.....	: 14
1.2.6.2.1. Rekalsifikasyon Zamanı Tayini.....	: 15
1.2.6.2.2. Heptest Metodu.....	: 15
1.2.6.2.3. Hepa clot Metodu.....	: 15
1.2.6.2.4. Tam kan yöntemi.....	: 16
1.2.6.2.5. Trombin yöntemleri.....	: 16
1.2.6.2.6. Plazma yöntemi.....	: 17

İÇİNDEKİLER (Devam)

1.3. Heparinoidler.....	: 17
1.3.1. Rapana Venosa ile ilgili genel bilgiler.....	: 17
1.3.1.1. Taksonomik Durum.....	: 17
1.3.1.2. Türün Tanımı.....	: 18
1.3.1.3. Türün Biyolojik Özellikleri.....	: 19
1.3.2. Raparin Hakkında Bilgiler.....	: 19
1.3.2.1. Raparin'in Elde Edilişi.....	: 19
1.3.2.2. Tanımlanması.....	: 20
1.3.2.2.1. IR Spektrumu.....	: 20
1.3.2.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi.....	: 20
2. DENEYSEL KISIM.....	: 21
2.A. Kullanılan Maddeler.....	: 21
2.B. Kullanılan Aletler.....	: 21
2.1. Raparin'in Elde Edilişi.....	: 22
2.1.1. Raparin RH ₅₀₀ 'ün Elde Edilişi.....	: 22
2.1.2. Raparin RHP ₁₀ 'un Elde Edilişi.....	: 22
2.1.3. Raparin RKL ₁₀ 'un Elde Edilişi.....	: 22
2.2. Raparin'in Fraksiyonlandırılması.....	: 23
2.3. Metakromatik Deneyler.....	: 23
2.3.1. Kullanılan Maddeler.....	: 23
2.3.2. Yöntem.....	: 23
2.4. Rekalsifikasyon Deneyleri.....	: 24
2.4.1. Kullanılan Maddeler.....	: 24
2.4.2. Yöntem.....	: 24
2.5. Biyolojik Metodlarla Miktar Tayini.....	: 24
2.5.1. Heptest Metodu.....	: 24
2.5.2. Hepaclot Metodu.....	: 25
3. BULGULAR.....	: 26
3.1. Raparin RH ₅₀₀ 'e ait Bulgular.....	: 26
3.2. Raparin RHP ₁₀ 'a ait Bulgular.....	: 30
3.3. Raparin RKL ₁₀ 'a ait Bulgular.....	: 34
3.4. Metakromatik Tayine ait Bulgular.....	: 38

İÇİNDEKİLER (Devam)

3.5. Rekalsifikasyon Deneylerinin Bulguları.....	: 41
3.6. Biyolojik Metodlarla Miktar Tayini Bulguları.....	: 42
3.6.1. Heptest'inden Elde Edilen Bulgular.....	42
3.6.2. Hepaclo'tan Elde Edilen Bulgular.....	: 43
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	: 44
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	: 46
ÖZGEÇMİŞ.....	: 53



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.A. Koagülasyon mekanizması.....	8
1.B. Heparin - Antitrombin III - Faktör Xa etkileşmesi.....	9
3.1. Raparin RH ₅₀₀ 'ün Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi.....	27
3.2. Raparin RH ₅₀₀ (a), Fr. I (b) ve Fr. II'nin (c) UV spektrumu.....	27
3.3. Raparin RH ₅₀₀ 'ün IR spektrumu.....	28
3.4. Raparin RH ₅₀₀ fraksiyon I'in IR spektrumu.....	28
3.5. Raparin RH ₅₀₀ fraksiyon II'nin IR spektrumu	29
3.6. Raparin RHP ₁₀ 'un Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi.....	31
3.7. Raparin RHP ₁₀ (a), Fr. I (b) ve Fr. II'nin (c) UV spektrumu.....	31
3.8. Raparin RHP ₁₀ 'un IR spektrumu.	32
3.9. Raparin RHP ₁₀ fraksiyon I'in IR spektrumu.....	32
3.10. Raparin RHP ₁₀ fraksiyon II'nin IR spektrumu.....	33
3.11. Raparin RKL ₁₀ 'un Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi.	35
3.12. Raparin RKL ₁₀ (a), Fr. I (b) ve Fr. II'nin (c) UV spektrumu.....	35
3.13. Raparin RKL ₁₀ 'un IR spektrumu.	36
3.14. Raparin RKL ₁₀ fraksiyon I'in IR spektrumu.....	36
3.15. Raparin RKL ₁₀ fraksiyon II'nin IR spektrumu.....	37
3.16. Heparin Sigma grade I'in IR spektrumu.....	37
3.17. Azur A ve azur A-raparin RH ₅₀₀ fraksiyon I'in UV Spektrumu.....	38
3.18. Toluidin mavisi ve toluidin mavisi-raparin RH ₅₀₀ fraksiyon I'in UV spektrumu.....	38
3.19. Raparin RH ₅₀₀ fraksiyon I'in azur A ile kompleksinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	39
3.20. Raparin RH ₅₀₀ fraksiyon I'in toluidin mavisi ile kompleksinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

viii

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.A Mukoid bileşiklerin bazılarının genel özellikleri.....	2
3.1. Raporin RH ₅₀₀ 'ün Sephadex G-50 süper fine 'dan elde edilen elüatlarının absorbanları.....	26
3.2. Raporin RHP ₁₀ 'un Sephadex G-50 süper fine 'dan elde edilen elüatlarının absorbanları.....	30
3.3. Raporin RKL ₁₀ 'un Sephadex G-50 süper fine 'dan elde edilen elüatlarının absorbanları.....	34
3.4. Raporin'lerden elde edilen fraksiyonların farklı konsantrasyonlarının azur A ile kompleksinin maksimum dalga boyları ..	40
3.5. Raporin'lerden elde edilen fraksiyonların farklı konsantrasyonlarının toluidin mavisi ile kompleksinin maksimum dalga boyları.....	41
3.6. Raporin'lerden elde edilen fraksiyonların farklı konsantrasyonlarının metilen mavisi ile kompleksinin maksimum dalga boyları.....	41
3.7. Farklı konsantrasyonlardaki raporin fraksiyonlarının rekalsifikasyon zamanları.....	42
3.8. Raporin ve fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlarının heptest sonucu elde edilen pıhtılaşma zamanla.....	42
3.9. Raporin ve fraksiyonlarının hepaclot testi sonucu elde edilen pıhtılaşma zamanları.....	43

GİRİŞ ve AMAÇ

1916 yılından buyana değişik hayvanların karaciğer, akciğer ve barsaklarından heparin elde edilmiş, bunlar daha sonra fraksiyone edilmiş ve bu şekilde tedavide değişik heparinler kullanılmıştır. Koagülasyon mekanizması , değişik etkilere sahip olan heparin'in tedavide kullanılışı fraksiyon aktivitelerine bağlı olarak ayarlanmaktadır. Heparin moleköl yapısında 4000-20000 arasında değişen farklı maddeleri içermektedir. Deniz hayvanlarından elde edilen heparinoid ise iki Cucumber sınıfına aittir. Deniz salyangozundan elde edilen heparinoid üzerinde ise fraksiyonlama yapılmamıştır. Bu çalışmada deniz salyangozundan elde edilen raparin fraksiyone edilmiş ve elde edilen fraksiyonların IR ve UV spektrumları çizdirilmiş, rekalsifikasyon deneyleri, metakromazi deneyleri , heptest ve hepaclot testleri yapılarak farklılıklar saptanmıştır.

1. KURAMSAL KISIM

1.1. Mukopolisakkaritler

Mukopolisakkaritler çok defa mukoid maddeler olarak adlandırılan bir grup bileşiklerin bir kısmı olarak sınıflandırılmışlardır. Bu bileşiklerin özelliklerini içeren kimyasal bilgi o kadar sınırlıdır ki sayısız isimlendirme yapılmıştır ve bunlardan hiçbirisi genellikle kabul edilmemiştir. Çizelge 1.A mukoid bileşiklerin bazılarının genel özelliklerini belirtmektedir.

Çizelge 1.A. Mukoid bileşiklerin bazılarının genel özellikleri

<u>% karbohidrat</u>	<u>İsimler</u>	<u>Örnekler</u>
0	Protein	İnsülin
15	Glikoprotein, Protein	Albüminler, Globülinler
10-85	Mukoproteinler	Üriner mukoproteinler, kros-mukoid kan grubu bileşikleri
65-100	Mukopolisakkaritler	Hyaluronik asit, Kontroitin sülfat, Chitin, Heparin
100	Polisakkaritler	Selüloz, Hemiselüloz

Genelde mukopolisakkaritler içerdikleri polisakkaritler olarak tarif edilirler. Bağ dokusu biyokimyası aşağıda belirtildiği şekildedir.

- Kollagen ve lifli proteinler
- Bağlanma dokuları
- Polisakkaritler, Mukopolisakkaritler, Mukolipidler, vs.
- Virüs enzimleri
- Amino şekerleri
- Mukoid bileşikler
- Bağ dokularının fizyolojisi
- Bağ dokularının hastalıkları
- Kan grubu maddeleri

Hekzozamin proteinlere bağlıdır, fakat basit tekniklerle proteinden ayrılabilirler. Bu tarife göre belirli bakteriel ve fungal polisakkaritler hayvansal kaynaklardan izole edilenlere ilaveten mukopolisakkaritleri düşündürebilir. Karbohidrat ve/veya amino asit içeren yalnızca yüksek molekül ağırlıklı bileşikler ifade ederler. Bileşikler amino asit ve karbohidrat'ın rölatif miktarlarına göre sınıflandırılırlar. Ancak kesin belirleme çizgilerinin olmamasını vurgulamak gerekir (71).

Muko kelimesi "mukus" dan alınmıştır. Bu grup maddeler metakromatik metod ile dokuda tesbit edilmiştir. Bunlar yapılarında sülfat grubu veya asetat grubu içeren polisakkaritlerdir. Polisakkaritin monomeri glukuronik asit ve glukoz amindir. Sülfat grubu hidroksil ile esterleşmiş veya glukozaminin amino grubuna sülfonik asit şeklinde bağlanmıştır.

Biyolojik rolü büyük olan polisakkaritlerdir. Mukopolisakkaritler hayvani menşeli hekzozamin havi polisakkaritler olarak tanımlanırlar. Bunlar saf veya proteine bağlı olarak bulunurlar (77). Bu kelimenin başında bulunan muko eki mukus maddeleri ile ilgili görülerek polisakkarit kelimesine eklenmiştir. Mukopolisakkaritler için glikozamin (77) , ayrıca uronik asit ve sülfat grubunun bünyede bulunmamasının şart olmadığı ifade edilmiştir. Bugün mukopolisakkarit deyimi;

a) Protein polisakkarit

b) Lipid-polisakkarit kompleksleri için kullanılır ve burada daha çok glikoprotein (glikopeptid) ve glikolipid deyimi kabul edilir. Buna rağmen uronik asit ve hekzozamin havi heteroglikanlar (iki veya daha fazla monosakkarit üniteden meydana gelen polisakkarite verilen isim) için mukopolisakkarit deyiminin kullanılmasında temayül fazladır. Heparin'in dahil olduğu asidik mukopolisakkarit grubuna, hyaluronik asit, kontroitin sülfat, kitin, keratosülfat, heparitin sülfat dahildir.

Sülfat grubu içerenlerden heparinler, asetat grubu içerenlerden kontroitin sülfat vardır. Bunlar arasında en önemli yeri heparin teşkil eder. Heparin Amerika'da Howell'in fizyoloji laboratuvarında tıp öğrencisi olan Mc Lean tarafından 1916 yılında izole edilmiş ve antikoagülan aktivitesi tesbit edilmiştir (62).

Mukopolisakkaritler doğal ve yapay olarak ikiye ayrılırlar. Doğal grup içerisinde heparin bulunur. Heparinoid adı verilen (heparin like substances) heparin'e benzer maddeler grubu içerisinde ise doğal olarak raparin ve yapay olarak monosakkarit sülfatları vardır.

Buna ilaveten doğal maddelerden olan alg polisakkaritlerinden heparin'e benzer şekilde antikoagülan aktivite gösteren galakton sülfatlar vardır. Bunun yanında birçok madde bu gruptan olarak izole edilmiştir (33).

Doğal mukopolisakkaritleri iki gruba ayırabiliriz;

a) Heparin

b) Heparinoidler

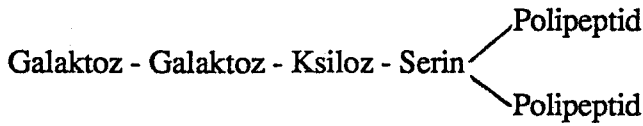
1.2. Heparin hakkında genel bilgiler

Heparinin elde edilmesi 1928 yılına kadar değişik uygulamalarla yürütülmüş ve takipeden senelerde Jorpes, Fisher ve Scott tarafından birçok modifikasyonlar yapılmıştır. Yeni tarihlerde de heparin'in tek madde olmadığı, bir karışım olduğu ve farklı molekül tartılı polisakkaritler bileşiminden oluştuğu tesbit edilmiştir. Bunun sonucu olarak molekül tartısı 40000 civarında bulunmuştur. Bu karışımın değişik uygulamalarla; etanol ile çöktürme, fraksiyonlama, depolimerizasyon ile (benzilasyonu takiben alkali depolimerizasyon, nitroz asitle depolimerizasyon, peroksidatif depolimerizasyon , enzimatik depolimerizasyon (heparinaz ile) exhaustive nitroz asit ile depolimerizasyon,

izoamil nitrat depolimerizasyonu) farklı molekültartılı heparinler ayrılmıştır. Heparin ayrıca Sephadex G kolonundan fraksiyonlandırılmıştır. Bunun sonucu olarak farklı fraksiyonlar ilk yapılan çalışmalarda bulunmuş ve fraksiyonlar tesbit edilmiştir.

3410, 3800, 4900, 5500, 6221, 6400, 6511, 7322, 12500 ve 15000 molekül tartılı heparinler elde edilmiştir. Genelde molekül tartısı 7500'ün üstünde olanlara yüksek molekül tartılı (HMW) ve 2500'ün altında olanlara düşük molekül tartılı (LMW) heparin adı verilmektedir. Bütün bu ayrımlara rağmen değişik firmaların hazırladığı heparin'lerin içinde farklı molekül ağırlığında heparin'lerin bulunduğu saptanmıştır. Bu şekilde ayrılan heparin'lerin farklı etkilere sahip olduğu tesbit edilmiştir. Düşük molekül tartılı heparin Heptest'te heparin'e nazaran daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Düşük molekül tartılı heparin'in Anti-Xa etkisinin heparin'den yüksek olduğu saptanmıştır.

Heparin'in yapısı tetrasakkarit ünitesine bağlı olarak;



şeklinindedir. Yapıda görüldüğü gibi elde etme metodundan gelen proteinin yanında moleküle bağlı poliipeptid yapıları mevcuttur. Her ne kadar tripsin ile fermentasyon (triptik fermentasyon) yapılmasına rağmen ticari heparinler içerisinde proteinin uzaklaştırılmadığı bilinmektedir (34).

Heparin'in biyolojik tayininde;

- a) Pıhtılaşma zamanı (Howell time)
- b) Protrombin zamanı
- c) Trombin zamanı
- d) EEZ
- e) Heptest
- f) Hepaclot
- g) Anti-Xa yöntemleri kullanılmaktadır.

Heparin koyun, sığır, domuz ve köpek dokularından elde edilir. İlk defa Mc Lean tarafından izole edilmiştir (62).

1.2.1. Elde edilişi

Heparin ilk defa karaciğerden izole edildikten (39) sonra, değişik doku ve sıvılardan da elde edilmiştir (84). Bugün heparin'in mast hücrelerinde bulunduğu görüşü kabul edilmektedir. Mukopolisakkarit yapısında olan heparin heksozamin içerir. Heparin normal şartlarda organizmada serbest halde bulunmayıp bir proteine bağlıdır. Bu nedenle elde edilmesinde proteinden ayırmak için değişik teknikler kullanılmıştır. İlk olarak kurutulup, ufalanmış köpek karaciğeri metanolle kaynatılmış, sonra serum fizyolojikle ekstre edilip aseton ile çöktürülmüştür. Ortamdaki glikojenler, takadiastas ile yapılan dijestiyonla, protein ise kalsiyum klorür ile berteraf edilmiştir (39). Daha sonra heparin elde edilmesinde, proteinin uzaklaştırılması için asetik asit içindeki Lloyd reaktifi (alüminyum silikat) (40), ısı ve tripsin ile dijestiyon tavsiye edilmiştir (13).

Heparin'in saflaştırılması için baryum klorür (40), brusin (25), benzidin hidroklorür (14), piperidin n-pentilamin, izopentilamin (72), dodesilamin (64), dekametilendiamin (55) ve dimetiltionin (3) kullanılmıştır. Benzidin tuzu yönteminde, ham heparin benzidin ile tuz haline getirilerek çöktürülür, süzülür, çökelti metanolla yıkanır, sonra su ile çalkalanarak süspansiyon haline getirilir, üzerine amonyum hidroksit ilave edilip heparin serbest hale geçirilir veya baryum asetat ile muamele edilip heparin baryum tuzuna geçilir ve daha sonra heparin baryum tuzundan heparin sodyum tuzuna geçilerek saflaştırma yapılır (14).

Heparin'in saflaştırılması için kromatografik yolda denenmiştir. Bunun için dietilaminoetilselüloz (anyon değiştirici) ile yapılan sütun kromatografisi çalışmasında, önce 0.5 M sodyum klorür sonra 1.2 M sodyum klorürle yapılan elüsyon ile ele geçen elüata etanol ilavesi ile heparin çöktürülerek ayrılır ve böylece başlangıçta 110 IU/mg olan heparin'in aktivitesi 165 IU/mg'a yükseltilir (81).

Heparin'in endüstride elde edilmesinde sığır karaciğeri veya akciğeri kullanılır. Parçalanmış bu organlar doğrudan doğruya veya 24 saat otolize bırakıldıktan sonra ekstre edilir. Ekstraksiyon için amonyum sülfat ile doyurulmuş N sodyum hidroksit çözeltisi kullanılır. Karışım 50°C'de dikkatle bir saat ısıtılır. Bu sıcaklıkta koagülasyon olmaz ve heparin dokudan ekstre edilir. Bu karışım daha sonra 70°C'ye ısıtılır ve denatüre olan protein çöker. Karışım sıcakken süzülür, süzüntünün pH'sı 2-2.5 olacak şekilde derişik sülfürik asit ilave edilir. Çöken kısmın büyük miktarı heparin'dir. Bakiye etanolde (%95) 20 saat süspansiyon halinde tutulur. Bu şekilde yağlı kısımlar etanole geçer. Alkol aktarılarak ayrılır ve kalan kısım santrifüje edilerek çökelti alınır, suda çözündürülür ve pH'sı 8'e ayarlanır. Üzerine tripsinin sudaki çözeltisi ile az miktarda ksilen ilave edilir. 36°C'de 36 saat enkübasyona bırakılır. Bu esnada her 12 saatte bir pH yeniden 8'e ayarlanır. Dijestiyondan sonra karışıma etanol ilave edilir ve vasat turnusola karşı hafif asit reaksiyon gösterene kadar hidroklorik asit ilave edilir. Bu çözelti 24 saat bekletildikten sonra süzülür, çökelti alınır, 0.5 N sodyum hidroksitte çözündürülür ve 75°C'de ısıtılarak tripsin tahrip edilir. Çökelti soğutulduktan sonra santrifüje edilir. Üstteki sıvı kısım alınır, üzerine iki misli aseton ilavesi ile heparin çöktürülür. Saflaştırılması için elde edilen ham heparin, baryum klorür ile pH 4.5'ta muamele edilir. Meydana gelen baryum heparinat ayrılır, sonra buradan sodyum karbonat ile sodyum heparinata geçilir. Bu işlemin bir çok kere tekrarı ile mg'daki aktif heparin miktarı artırılır.

1.2.2. Fiziksel özellikleri

Beyaz veya hafif krem rengine, kokusuz, higroskopik, amorf bir tozdur. %1'lik çözeltisinin pH'sı 5.0-7.5 arasındadır (80). Parşömen membrandan dializ olmaz ancak kollodyon membrandan çok yavaş dializ olur (67).

20 k suda, alkol, aseton ve glasiyal asetik asitte çözünür. Heparin uzun zaman aktivitesini kaybetmeden saklanabilir (67).

1.2.3. Kimyasal özellikleri

1.2.3.1. Yapısı

Heparin, ekimoleküler miktarlarda glikozamin ve glukuronik asidin münavebeli olarak dizelenmesi ve α -1,4 glikozidik bağlarla bağlanarak meydana gelmiş uzun zincirli bir mukopolisakkarittir (83, 48).

Heparin'in α ve β olmak üzere iki formu vardır. β heparin sığır karaciğerinden heparin ekstraksiyonu esnasında yan ürün olarak elde edilir. Yapısı β -D-glikozidik bağla bağlanmış ekimoleküler miktarlarda uronik asit ve 2-asetamido-2-deoksi-D-galaktoz (N-asetilkondrozamin) dur. Molekül ağırlığı yaklaşık 16000 dalton civarındadır. Ayrıca her tetrasakkarit ünitesinde iki sülfat ester grubu içerir.

Bugün kullanılan heparin α heparin'dir. Molekül ağırlığı yaklaşık 15000 - 20000 dalton civarındadır. Yapısında % olarak 22.9 C, 3.4 H, 1.9 N, 12.9 S içerir .

Yapısal farklılıklar, zincir uzunluğunun yanı sıra, sülfatlanma derecesine, sülfat gruplarının yerlerine, ester sülfat veya amin sülfat şeklinde bulunmasına, asetil grubunun mevcut olup olmamasına göre ortaya çıkar (16).

1.2.3.2. Tanınması

1.2.3.2.1. UV spektrumu

Heparin'in UV spektrumu bir çok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen bunların verdiği UV değerleri birbirlerini tutmamaktadır. Bunların bir kısmına göre saf heparin 230-300.0 nm'de absorpsiyon göstermez. Diğer bir kısmının belirttiğine göre de 265-292.0 nm arasında maksimum ve 240-260.0 nm'de ise minimum absorpsiyon gösterir (5). Bulguların böyle çelişkili olması heparin'in saf olmayışına bağlanmış ve saf heparin'in bu bölgede absorpsiyon göstermediği belirtilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda heparin'in 205.0 nm'de uronik asidin karboksil gruplarından dolayı maksimum verebileceği düşünülmüştür (76). Diğer bir araştırmacı da heparin'in UV spektrumu için 190.0 nm'lere kadar inilmesi gerektiğini belirtmiştir (51). Daha önceleri alınan UV spektrumlarının, ticari heparinlerde yüksek ekstinksiyon göstermesinin sebebi içerdiği fenol muhtevastından dolayı olduğu, kuru heparin sodyumdan hazırlanan sulu çözeltilerde bunun mevcut olmadığı tesbit edilmiştir (52).

1.2.3.2.2. IR spektrumu

Heparin'in IR spektrumu incelenmiş, fakat bu çalışmanın interpretasyonu kaydedilmemiştir (11).Diğer bir çalışmada ticari heparin'in IR spektrumunun 1600-1500 cm^{-1} arasında yine bir mukopolisakkarit olan kondroitin sülfat ile mukayesesi yapılmıştır (86).

1.2.3.2.3. Kağıt kromatografisi

Heparin, kağıt kromatografisi ile, n-propanol : su (40 : 60) solvan sisteminde sürüklendikten sonra , reaktif olarak toluidin mavisi püskürtülerek leke tesbiti yapılmış ve mavi zeminde pembe renkte (Rf:0.57) teşhis edilmiştir (63, 1). 0.04 N amonyum formiyat : isopropanol (60 : 40) (65), propanol : formik asit : su (30 : 10 : 40) (4), amonyum formiyat : metanol (45 : 55) (12), sürükleyici karışımları kullanılmıştır. Kromatogramda lekelerin teşhisi azur A ve toluidin mavisi reaktifleri ile yapılmıştır.

1.2.3.2.4. İnce tabaka kromatografisi

Selüloz ve Sephadex adsorbanlarında mukopolisakkaritlerin ayrılması yapılmıştır.

Selüloz MN 300 adsorbamı ile yapılan bir çalışmada solvent sistemi olarak: 1) amonyak : piridin : su (60 : 35 : 5), 2) Su, 3) butanol : asetik asit : su (3 : 1 : 1) kullanılmış ve reaktif olarak: 1) 10 mg Acridine Orange'ın 10 ml sudaki çözeltisi, 2) 10 mg bromkrezol yeşili'nin 10 ml sudaki çözeltisi, 3) 5 mg azokarmin G'nin 10 ml sudaki çözeltisi püskürtülmüştür. Neticede reaktif 1 ile 1 leke, reaktif 2 ile 2 leke ve reaktif 3 ile 3 leke elde edilmiştir. Bu lekelerin renkleri ve Rf değerleri bir tablo halinde verilmiştir (35).

Sephadex jelinde, n-propanol : isopropanol : absolü etanol : 0.037 M sitrat tamponu (pH 3.1) (1 : 4 : 2 : 13) karışımı ile çalışılmış ve tankın 3 saat doyurulması tavsiye edilmiştir. Reaktif olarak toluidin mavisi kullanılmıştır. Heparin'in starttan itibaren plağın yarısına kadar devam eden uzun bir leke halinde sürüklendiği tesbit edilmiştir (7).

1.2.4. Farmakolojisi

Heparin'in kullanılışı önemli iki özelliğinden dolayıdır. Bunlar antikoagülan ve lipolitik aktiviteleridir.

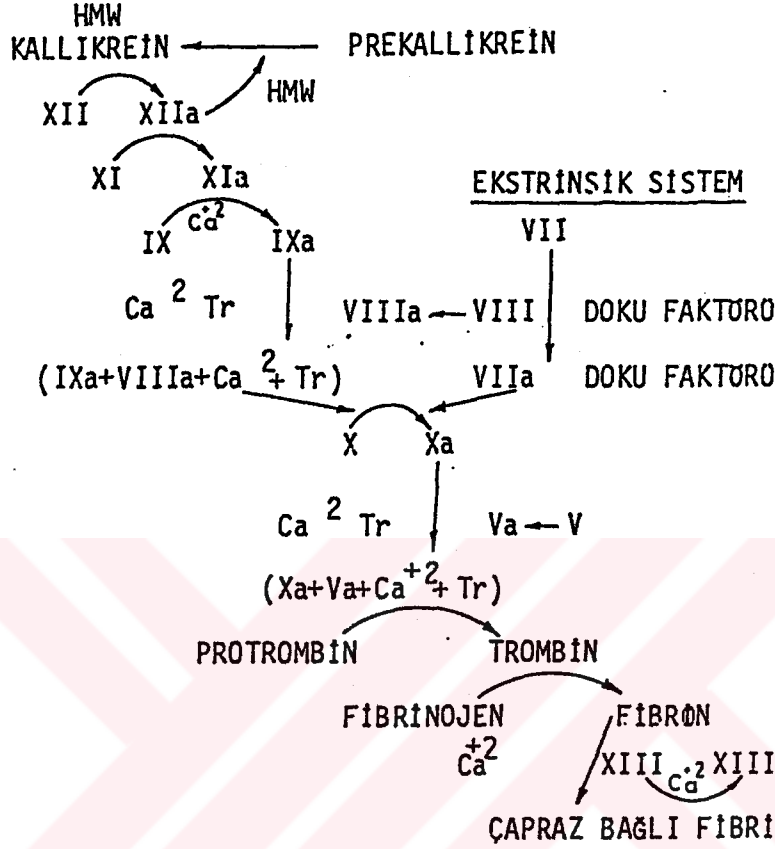
1.2.4.1. Antikoagülan aktivitesi

Koagülasyon mekanizmasının kademeleri Şekil A'da verilmiştir (24).

Bu diagram kompleks bir seri proteaz, zimojenler, aktivatörler, inhibitörler ve kofaktörler ağı şeklindedir. Bir çok dönüşüm ve yükseltgeme işlemleri bu diagramı düzenler. Heparin ve komponentleri bu proteaz ağını çeşitli bölgelerde modüle ederek Faktör Xa ve IIa'nın inhibisyonuna sebep olurlar. Xa ve IIa'nın dışında heparin'in Faktör XII, Faktör XI ve Faktör IX aktivasyonunu etkilediği, kallikrein'in etkisini azalttığı tesbit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda heparin'in tek başına antikoagülan etkisinin az olduğu fakat antitrombin III gibi bir endojen koagülasyon enzimi inhibitörü ile kompleks halinde kullanıldığında Xa faktörünü inhibe etme gücünün çok arttığı tesbit edilmiştir. Bu Şekil B'de şematik olarak gösterilmiştir (68).

INTRİNSİK SİSTEM



Şekil 1.A. Koagülasyon mekanizması

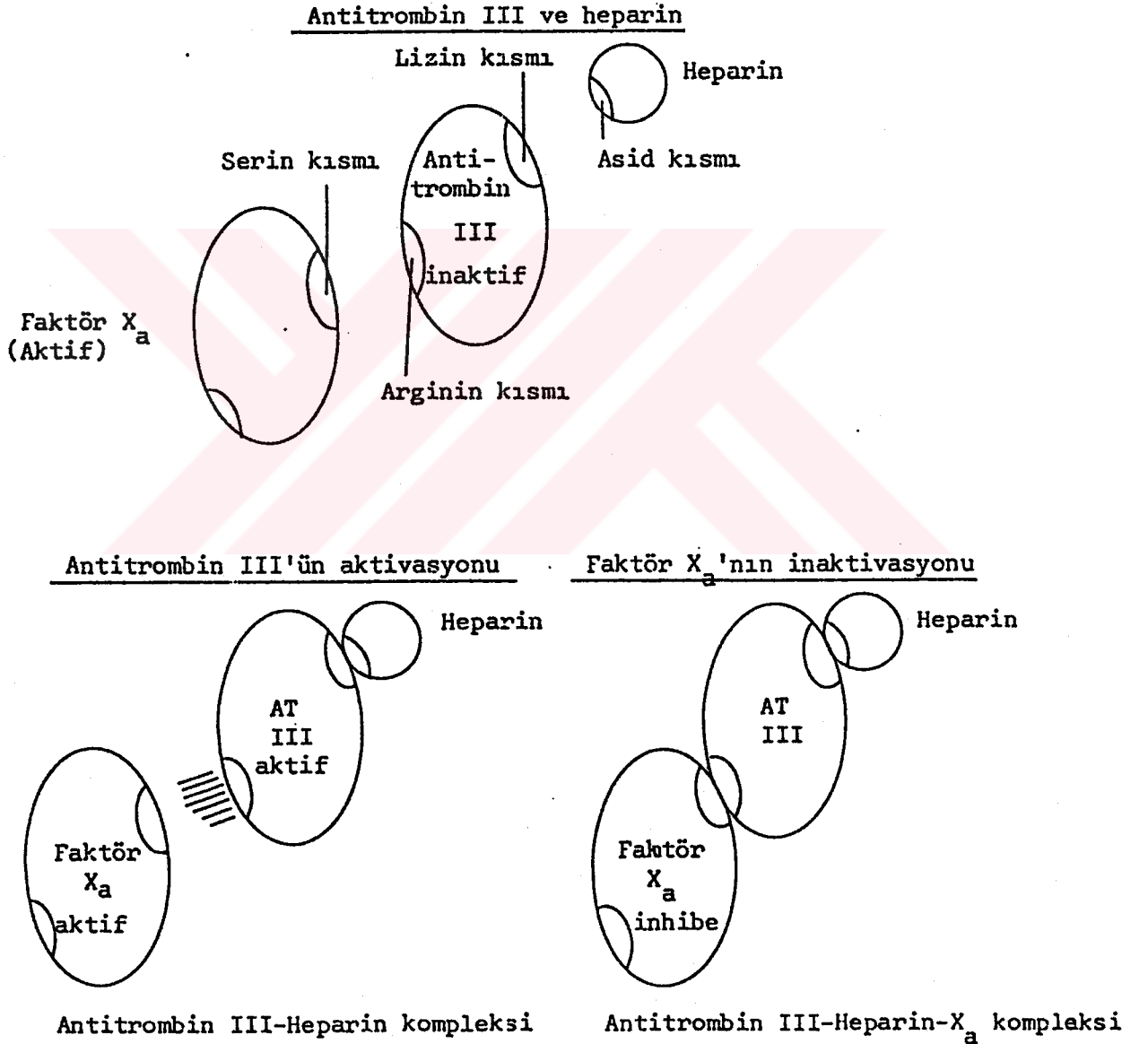
Son zamanlarda heparin'in endotel hücre cidarlarından fibrinolitik prosesleri arttıran doku plasminogen aktivatörünü açığa çıkardığı bulunmuştur. Ayrıca plazmada antitrombin III'ten başka heparin ko-faktör II adı verilen başka bir heparin ko-faktör'ü olduğuna ve bununda antitrombin III'ten ayrı olarak trombinin inhibisyonunda rol oynadığına inanılmaktadır (24).

Pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini veya sentezini bozarak bu olayı inhibe eden ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan ilaçlara antikoagülan ilaçlar denir. Özellikle venöz trombuslarının oluşmasını önleyebilir. Arteriyel tromboza karşı etkileri zayıftır.

Pıhtılaşma, pıhtılaşma faktörleri adı verilen ve çoğu birer plazma proteini olan doğal maddelerin kendi aralarında belirli bir hiyerarşik düzene göre etkileşmeleri sonucu oluşan kompleks bir olaydır. Pıhtılaşma faktörlerinin başlıcaları şunlardır(48);

- Fibrinojen (I)
- Protrombin (II)
- Doku tromboplastini (III)

- Ca^{++} (IV)
- Labil faktör (akseleratör, globulin) (V)
- Prokonvertin (VII)
- Antihemofilik globulin (VIII)
- Christmas faktörü (Plazma tromboplastini ögesi) (IX)
- Stuart faktörü (X)
- Plazma tromboplastini öncüsü (XI)
- Hageman faktörü (Cam faktörü) (XII)
- Yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMW - K , Fitzgerald faktörü)
- Prekalikrein (Pre - K , Fletcher faktörü)
- Kalikrein (Ka)



Şekil 1.B. Heparin-Antitrombin III-Faktör X_a etkileşmesi

1.2.4.2. Lipolitik aktivitesi

Heparin yemekten sonra görülen hiperlipemi sonucu plazmada meydana gelen bulanıklığı azaltır. Bu etkiye lipemiyi berraklaştırıcı etki (lipemia clearing factor) denir. Heparin in vitro olarak plazmaya ilave edilirse berraklaştırma yapmaz. Fakat lipemik plazma , heparin enjekte edilmiş bir hayvandan alınan plazmaya ilave edilirse berraklaşma görülür. Gerçekte berraklaştırma trigliseridlerin hidrolizini yapan ve heparin tarafından serbest hale geçirilen bir lipaz'a (lipoprotein lipaz) aittir.

Plazma trigliseridleri proteinler ile birleşik halde bulunur. Enzim tarafından tedricen ayrılan yağ plazmada görülür. Muhtemelen yüksek moleküllü ve düşük dansiteli β -lipoproteinler alçak molekül ağırlıklı ve yüksek dansiteli α -lipoproteine dönüşür. Heparin, berraklaştırıcı faktörü serbest hale geçirir. Heparin'in burada etken enzim ile substrat arasında bir köprü rolü oynadığı belirtilmiştir. Bu etki için gerekli heparin miktarı çok düşüktür. Sıçanlarda 1 mg/kg, tavşanlarda 2mg/kg dan küçüktür. Yalnız, büyük dozda yüksek aktivite görülürse artan miktar ile etki artışı orantılı değildir.

Yukarıda belirtildiği gibi heparin'in lipolitik aktivitesi dolaylı olarak meydana gelir. Bu lipoprotein lipaz adı verilen bir enzimin deşarjı (29) yanında ayrıca değişik enzimlerin plazmaya geçtiği bildirilmiştir (56, 57). Diğer bir çalışmada heparin'in alçak dozda enjeksiyonundan sonra heterojen ve kompleks enzimlerin lipolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Lipolitik aktivitede bir veya bir çok enzimin rol oynadığı kabul edilir. Buna göre insan post heparin plazması lipolitik aktiviteye sahiptir ve aynı yağ asitlerinin mono ve tri gliseridlerine karşı değişik özellikler gösterirler. Monogliserid lipolizi, trigliserid lipolizden 6 defa daha hızlıdır, ayrıca bu protamin sülfat veya N sodyum klorür inhibisyonuna daha az hassastır.

Heparin'le kalp homojenatı fraksiyonlarının in vitro şartlarda enkübasyonunda lipoprotein lipaz'ın arttığı tesbit edilmiştir (27). Bununla beraber plazmanın esterolitik aktivitesini lipolitik aktiviteden ayrı olarak düşünmek gerekir. Lipolitik aktivite tayini hayvanlar üzerinde yapılır. Bunun için tavşan veya fareler kullanılır. Heparin enjeksiyonundan sonra sitrat tamponu içeren bir tübe alınan kan santrifüje edilir, plazma ayrılır. Plazma üzerine fosfat tamponu ve %1 konsantrasyonunda substrat (bir yağ emülsiyonu) ilave edilir ve hemen numune alınarak 1 saat 37°C'de enkübasyona bırakılır. Tekrar numune alınır. Bu, önce ve sonra alınan numunelerde serbest yağ asitleri miktarı tayin edilir. Bu serbest yağ asitlerinin miktarı, titrimetrik yöntemlerle (19, 28), optik dansiteye dayanan yöntemlerle (2) ve kolorimetrik yöntemlerle (20, 53) tayin edilebilir.

1.2.4.3. Kullanılma yerleri

Heparin ve oral antikoagülanların kullanılma yerleri şunlardır :

- Derin ven trombozu,
- Romatizmal kalp kapakçığı hastalıkları,
- Miyokard infarktusu,

- Kalp ile ilgili diğer durumlar,
- Serebrovasküler hastalıklar,
- Periferik arter hastalıkları,
- Gebelik,
- Diğer durumlar : Kalp ve damar üzerindeki cerrahi girişimler sırasında ve organ transplantasyonu ameliyatları yapılırken heparin ile antikoagülasyon yapılır ve yeterli bir süre devam ettirilir (48).

1.2.5. Heparin'in fraksiyonlandırılması

1.2.5.1. Fraksiyonlu çöktürme

Heparini çöktürme ile fraksiyonlandırmak için değişik yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan biri etanol ve dioksanla çöktürmedir (58). Etanolla yapılan çöktürmede 15 g heparin 450 g distile suda çözündürülür ve 4°C'ye soğutulur, bu çözeltiliye ilk çökme meydana gelinceye kadar aynı sıcaklıktaki mutlak alkol ilave edilir. Bu çökelti yavaşça karıştırılır ve bir gece bekletilir, daha sonra üstteki sıvı kısım aktararak ayrılır. Yapılan hesaplamalarda ilk çökmenin %30 v/v etanolla meydana geldiği bulunmuştur. Daha sonra alkol miktarı %5'lik basamaklar halinde artırılarak diğer fraksiyonlarda ayrı ayrı çöktürülür ve liyofilize edilir. Bu yöntemle 8 fraksiyon elde edilmiştir. Bunların molekül ağırlıkları, ana heparine göre % oranları, azot, kükürt yüzdeleri ve antikoagülan aktiviteleri tayin edilmiştir.

1.2.5.2. Jel kromatografisi

Raparin'in fraksiyonlandırılmasında heparin'in fraksiyonlandırma yöntemlerinden faydalanılmıştır. Heparin'in molekül ağırlıkları farklı moleküllerden oluşması nedeni ile jel filtrasyonu metodu ile molekül ağırlıkları farklı fraksiyonlara ayrılmıştır. Raparin'in de jel kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılabilmesi düşünülmüş ve bu düşünceyle muhtelif adsorbanlar kullanılarak fraksiyonlandırma yapılmıştır.

Yöntemin esası, ayrılacak karışımdaki maddelerin, bir cam boruya doldurulmuş çok ince partiküller halindeki bir adsorbana karşı farklı adsorpsiyon değişimlerine sahip olmalarına dayanır. Cam borudaki adsorbana stasyoner faz, ayrılmak üzere sütuna konan maddeler karışımını içeren çözeltiliye solut, solutun sütun içinde ilerleyip adsorbe ve desorbe olmasını sağlayan taze çözücüye de mobil faz adı verilir. Sütun boyunca gelen taze solventin (mobil faz) etkisi ile adsorpsiyon ve desorpsiyon devam eder ve solut, derece derece aşağı doğru yer alan bandlar meydana getirir. Soluttaki maddelerin adsorpsiyon değişimleri arasındaki fark ve sütunun uzunluğu yeterli ise, daha hızlı hareket eden yani daha az adsorplanan madde, diğerlerinin önüne geçer ve nihayet alttan sütunu terk eder. Maddelere ait fraksiyonlar ayrı ayrı sütundan alınır.

Eğer solutun içerdiği maddeler renkli ise, bunlar sütunda renkli bandlar halinde görülür; renkli olmamalarına rağmen floresans özelliğe sahip iseler UV ışıkla görünür duruma getirilebilirler.

Sütun kromatografisinde genellikle maddelerin ayrı fraksiyonlar halinde sütundan alınarak değerlendirilmeleri yöntemi kullanılır.

Kromatografi sütununda kullanılacak adsorbanın iyi bir ayırım yapabilmesi için;

Yüksek fakat seçimli bir adsorpsiyon gücüne sahip olması,

Yüzey alanının büyük olması,

Her birim ağırlığının yüksek bir yüzey alanına sahip olabilmesi için ince parçalara bölünmüş olması gerekir (21).

Adsorban olarak en çok 1,6- α -D-glikozido-glikoz polimeri olan dekstran'ın modifiye şekli olan Sephadex kullanılmaktadır. Dekstran molekülleri, polisakkarit zincirleri ile üç boyutlu bir şebeke verecek şekilde çapraz bağlanmışlardır. Fazla hidroksil grupları sebebiyle Sephadex kuvvetli hidrofilik karakterdedir ve taneleri suda, elektrolit çözeltilerinde şişerler. Bu şişme esnasında bağladıkları su miktarı muhtelif Sephadex tiplerinde farklıdır, bunun neticesi olarak her Sephadex tipinin, molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlandırma sahaları farklılıklar gösterir. Çalışmalarda en mühim nokta bu bakımdan uygun Sephadex'i seçmektir.

"G" serisi Sephadex'ler şunlardır; G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, G-100, G-150 ve G-200. Su tutma kapasiteleri G sayılarının onda birine eşittir. Her tipin çok ince, ince, orta ve kaba taneli olanları vardır. Çok ince taneliler çok hassas analitik çalışmalarda ve ince tabaka kromatografisinde kullanılır, bunlardan elüanin akış hızı çok yavaştır. Tane büyüklüğü arttıkça ayırmada hassasiyetin azalmasına mukabil, akış hızı artar. Kaba taneliler preparatif işlemlerde kullanılır, ayırmadaki sürat mahsurunu telafi eder.

"G" serisi Sephadex'ler sudan başka, dimetilsülfoksit, formaldehid ve glikol ile de şişerler. Fakat tuttıkları su miktarı, solvent miktarına eşit değildir. Sephadex G-10 ve G-15 ayrıca dimetil formamid'de de şişerler (74).

Flodin'e (26) göre jel filtrasyonu şu faktörlere dayanır: bir maddenin elüsyon hacmi onun molekül ağırlığına tabi olup maddenin konsantrasyonuna ve solvanın akış hızına kati surette bağlı değildir (konsantrasyon, solvanın konsantrasyonundan fazla ise durum değişiktir.).

Bir madde jel fazında kendisine tayin edilen zamandan daha fazla kalıyorsa (bu zaman solvanda diffussion dengesine göre tayin edilir) jel fazındaki bazı kuvvetlerin tesiri altında kalıyor demektir. Bu kuvvetler şunlar olabilir; a) Kolondaki elektrik yüklü kısımda iyonlar arasındaki Coulomb hadisesi (ion exclance), b) Bütün jel fazı ile katı madde arasındaki Van der Waals bağları, c) Jeli yapan yüksek molekül ağırlıklı maddelerin adsorpsiyonu (74).

Sephadex G-200 kullanılarak yapılan bir çalışmada, domuz mukozasından elde edilen heparin 50 mg/ml olacak şekilde 45x2.5 cm'lik kolona tatbik edilmiş ve 9 k 0.12 M sodyum klorür + 1 k %0.05 sodyum azid içeren 0.12 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.4)

ile akış hacmi 11.55 ml/saat olacak şekilde 5'er ml'lik porsiyonlar halinde toplanmıştır (37).

Başka bir çalışmada da Sephadex G-200 ve G-100 sütunu kullanılarak beş fraksiyon elde edilmiştir (66, 18). Sephadex G-100 ile yapılan bir başka çalışmada 3 g heparin'in 10 ml 0.2 M sodyum klorürdeki çözeltisi 90 x 5 cm'lik kolona tatbik edilmiş ve 0.2 M sodyum klorürle elüsyon hızı 60 ml/saat olacak şekilde 15'er ml'lik porsiyonlar halinde elüe edilmiştir (54).

Sephadex G-75 kullanılarak yapılan bir çalışmada ise elüan olarak 3N ve 1.5 N sodyum klorür kullanılmış ve 4 fraksiyon elde edilmiştir (15).

Sephadex G-50 medium grade kullanılan bir diğer çalışmada ise 45x2.5 cm kolon kullanılmış ve distile su ile 36 ml/saat hızla elüe edilmiştir. Elüatlar 1'er ml olarak toplanmış ve her elüattan 50 ml alınıp 3 ml %0.0025 toluidin mavisi çözeltisi ile karıştırılarak 500.0 nm'de transmittansı ölçülerek yapılan değerlendirme sonucu 4 fraksiyon elde edilmiştir (30).

1.2.6. Miktar tayini

1.2.6.1. Metakromatik tayin

Metakromazi kelime anlamı olarak yer değiştirme demektir. Metakromazi absorpsiyon maksimumunun daha alçak dalga boylarına kayması, absorbansının azalması şeklinde ilk olarak Lison (59) tarafından tanımlanmıştır. Metakromazi gösteren maddelere kromotrop maddeler denir. Kromotropik maddeler genel olarak biyolojik menşeli , yüksek molekülü polianyonlardır.

Metakromazi üzerinde ortamın pH'sının da etkili olduğu, pH'nın artmasıyla metakromatik indeksin arttığı bildirilmiştir (82). Metakromazi gösteren boyalar Beer yasasına uymazlar. Metakromazide makromoleküllerin mevcut olması veya olmaması değil yalnız boya-boya intramoleküler birleşmesi bahis konusudur. Normal metakromatik boyalar (metilen mavisi, toluidin mavisi), fibrin, jelatin, doku ve hücre ile karıştırılırsa ortakromatik renk görülür (78). Yalnız metakromazinin değişik maddeler ile ortaya çıkması, bu tayinin heparin için spesifik olmadığını gösterir. Bu tayinde, belli oranda sodyum klorür ve metanol ilave edilmesi metakromaziyi bozmaz. Fakat %5 sodyum klorür, %20 alkol ilave edilmesi veya ısı artması metakromaziyi bozar. Metakromaziye dayanan ölçme pH 9'dan aşağıda sodyum klorürlü vasatta yapılır. Dokuda yapılan tayinde ayrıca meydana gelen renk kırmızı ve erguvani arasında değişir. Buna α , β , γ tip metakromazi denir. Boyanın cinsine göre renk değişimleri aşağıdaki şekilde meydana gelir:

Bismark kahverengisi ile portakal rengi	sarıya
Azur A ile mavi	kırmızıya
Parlak krezil mavisi ile mavi	erguvani renge
Brom krezol mavisi ile mavi	erguvani renge
Krezil viole ile mavi	erguvani renge
Nil mavisi sülfat ile yeşil mavi	kırmızı maviye
Nötral kırmızı (pH 6-7) ile kırmızı	portakal rengine

dönüşür. Bazik fuksin, kırmızı renkte değişme gösterir. Pyronin, akriflavin ise fluoresansını kaybeder (89)

Çok düşük konsantrasyondaki mukopolisakkarit, bir çok boya moleküllerinin sekonder bağlar (hidrojen bağları) ile birbirine bağlanmasına imkan verir. Böylece polimer teşekkül eder ve yeni renk meydana gelir. Alkol ve aseton sekonder bağları kaldırır ve yüksek değerli anorganik iyonlar başlangıç bileşiğinin teşekkülüne sebep olan primer değerli bağlar ile interfere olur (89). Dializ ile alkol kaldırılırsa metakromazi tekrar ortaya çıkar. Boya-heparin bileşiği suda güç, eter ve kloroformda ise kolay çözünür. Suda iyonize olur ve mevcut diğer katyon ve anyonlarla denge halinde bulunur. Jaques metakromaziye dayanan tayini Azur A ile geliştirmiştir (42). 80-90°C'de ısıtma metakromatik rengi tahrip eder. Metakromatik tayin ilk olarak MacIntosh tarafından toluidin mavisi ile yapılmış ve heparin potensisi tesbit edilmiştir. Bu tayinde heparin'le muameleden sonra vasatta kalan boyanın tesbitini yaparak heparin miktar tayini yapılmıştır (61). Bunu takiben yapılan çalışmalarda değişik boyalar kullanılmıştır. Bunlar arasında değişik Azurlar, metilen mavisi, nil mavisi, gece mavisi, gibi boyalar kullanılmıştır.

Metakromazide kullanılmış ve pozitif reaksiyon alınmış boyalar (59); Parafuksin, Violet d'Hoffmann (Dahlia), Violet de Methyle R, 2R, 4R, Anilin Blue, Victoria Blue R, Victoria Blue B, Glacier Bleu, Setocyanine O, Cresyl Brilliant Blue, Oxanine, Nouveau Blue B, Nil Blue, Violet de Louth (Thionine), Toluidin Blue, Azur de Methylene A, B, C, Blue de Methylene Nouveau, Rouge Nutre Extra, Violet Neutra Extra, Safranine T, Indazin M, Blue Janus (Naphtindone BB), Vert Janus, Heliotrope au Tannin, Rose de Magdala, Rouge d'acridine 3B.

Metilen mavisi 665.0 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Fakat metilen mavisi ve kondroitin sülfat kompleksi 570.0 nm'de maksimum absorpsiyon vererek metakromazi gösterir (47). Yine başka bir çalışmada nükleik asitlerin toluidin mavisi ile metakromazi verdiği bulunmuştur (85). İnsanlara, köpeklere, tavşanlara ve koyunlara heparin injekte edilmiş ve direkt olarak veya benmidin'le çöktürüldükten sonra idrar da metakromatik aktivite ölçülmüştür (43).

1.2.6.2. Antikoagülan aktiviteye dayanan tayinler

Antikoagülan etkinin tayini yöntemleri çok güçtür. Bu tayinde değişik faktörler rol oynar. Bu heparin'in sülfatlanma derecesine bağlıdır (8, 38). Burada kalsiyum miktarının düşüklüğü, toluidin mavisi ve protamin mevcudiyeti inhibitör rol oynarlar. Ayrıca asit

ortam (%11 asetik asit) heparin'in antikoagülan aktivitesi azalır (87). Muhtelif farmakopelerde heparin miktarı antikoagülan aktiviteye dayanarak ünite/mg veya ml olarak verilmiştir. Bir heparin ünitesi 0°C'de 1 ml kedi kanının pıhtılaşmasını önleyen heparin miktarıdır. USP üniteyi 1 ml sitratlanmış koyun plazmasını %1'lik kalsiyum klorür çözeltisi katılmasından sonra bir saat boyunca pıhtılaşmaktan alıkoyan miktar olarak tanımlanır (80). Antikoagülan aktiviteye dayanarak yapılan miktar tayinlerinde değişik yöntemler kullanılır.

1.2.6.2.1. Rekalsifikasyon zamanı tayini

Heparin'in antikoagülan aktivitesinin tayini için kullanılan bir diğer yöntemde rekalsifikasyon zamanının tayinidir. Bu yöntemde 37°C'lik su banyosunda, silikonlanmış tüplere heparin çözeltisi, %0.9'luk sodyum klorür ve koyun plazması konur, üzerine 0.025 M kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilerek anında kronometre çalıştırılır, kısa aralıklarla bir telle karıştırılarak ilk pıhtı teşekkül ettiği an tayin edilir (31).

1.2.6.2.2. Heptest metodu

Heparin'in tek başına antikoagülan özelliği çok düşüktür ancak heparin'in ko-Faktör 1 adı verilen antitrombin III ile antikoagülan aktivitesi son derece artar ve aktif pıhtılaşma faktörü Faktör Xa'yı ve trombini inhibe eder. Bu inhibisyon çok düşük heparin dozlarında bile meydana gelir. Faktör Xa'nın inhibisyonu zamana bağlı olarak ortamdaki heparin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bundan istifade ederek Faktör Xa'ya bağlı Heptest adı verilen miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.

Bu metod heparin tarafından faktör Xa'nın inhibisyonu esasına dayanır. Heptest adı verilen bu metoda göre, heparin miktarı tayin edilecek plazmadan 0.1 ml tüpe alınır. Üzerine 0.1 ml faktör Xa ilave edilerek 120 saniye 37°C'de su banyosunda inkübe edilir. Sonra bu karışıma 0.1 ml Recalmix'in ilavesiyle pıhtılaşma süresi tayin edilir. Elde edilen bu pıhtılaşma zamanı daha önceden standart heparinle elde edilmiş standart eğriye tatbik edilerek plazma içindeki heparin U/ml cinsinden hesaplanır (88).

1.2.6.2.3. Hepaclot metodu

Metodun esası, AT III üzerinden heparin miktarının saptanmasına dayanır. Bu metoda göre test plazmasından 50 µl 37°C'deki su banyosunda bekletilen tüplere alınır. Üzerlerine 50 µl AT III ilave edilir. 60 saniye sonra 100 µl faktör Xa, 90 saniye sonra da substrat plazmadan 100 µl konulur. 30 saniye sonra 100 µl 0.025 M kalsiyum klorür ilave edilerek pıhtılaşma süreleri tayin edilir (46).

1.2.6.2.4. Tam kan yöntemi

Koagülasyon zamanı tayini, parafinlenmiş pyrex tüp içinde havasız ortamda yapılır. Her tüp 0.2 ml dilüe heparin çözeltisi ve cam boncuk içerir. 5 tüpe standart heparin diğer 5 tüpe ise miktar tayini yapılacak heparin konur. Seyreltilmiş heparin çözeltisi birincide 10, ikincide 5 mg madde taşır. Kan alınır ve tüplere konur. Okuma 2, 4, 8 ve 24'üncü saatlerde yapılır. Cam boncukların çökme hızının azalması koagülasyonun başladığını gösterir. Koagülasyonun başlangıcı ve sonu zaman olarak tesbit edilir (41).

Sülfatlanmış tam kan yöntemi antikoagülan aktivite tayini için kullanılmıştır (10). Bu yöntemde heparin'in sudaki çözeltisi tam kanı dilüe etmede kullanılır. Böylece kan yüksek konsantrasyonda tuz ile koagüle olmaz şekilde getirilir. Taze alınmış öküz kanı hacminin 1/2'si oranında %7 anhidrid sodyum sülfat içeren çözelti ile karıştırılır. Bu karışım 4°C'de 3-4 hafta saklanabilir. Koagülasyon zamanının kısaltılması için asetonda kurutulmuş öküz beyini ilave edilir. Deney oda temperaturünde yapılır

Deney: Standart preparatın 1.28, 1.6, 2.0 IU/ml olmak üzere sudaki üç çözeltisi hazırlanır. Her çözeltiden 1 ml alınıp, 6 test tübüne konur, üzerine 0.2 ml trombokinaz ilave edilir. Daha sonra bu karışıma 1 ml sülfatlanmış kan ilave edilir ve dikkatle alt üst edilir (bu karıştırmada hava kabarcığının karışmamasına dikkat edilmelidir). Her tüpte bu ilaveden 15 saniye sonra ilk pıhtı teşekkülüne kadar geçen süre ölçülür. Bu yöntemin çok basit olduğu ve kısa sürede tayine imkan verdiği belirtilmiştir.

1.2.6.2.5. Trombin yöntemleri

Bu yöntem, ilk olarak taze alınmış veya oksalatlı öküz tam kanı üzerinde denenmiştir (44). Daha sonra Kjems ve Wagner oksalatlı plazma üzerinde çalışmışlar, bunun için değişik miktarda heparin'e (2.5 IU/ml içeren çözeltiden 0.04-0.1 ml) 1 ml oksalatlı öküz plazması ve belli miktar trombin ilave etmişler ve koagülasyon zamanını 20 saniyeden 60 saniyeye kadar tayin etmişlerdir (49).

Trombin yönteminin geliştirilmiş şekli sitratlı öküz plazması ile yapılmıştır. Bu yöntemin tatbik edilişi aşağıdaki şekildedir (75).

Öküz kanı sitrat ilave edilmiş tübe alınır, santrifüje edilir, plazma ayrılır. Üzerine seyreltilmiş trombin ilave edilir. Sonra trombin zamanı tayini için, 0.2 ml heparin üzerine damlatılır ve plazma ilavesinden sonra platin iğne daldırılır, hareket ettirilir ve pıhtı görüldüğü an tesbit edilir. Sıfır noktası 20 saniye olmalıdır. Bu şekilde elde edilen kurbun yalnız çıkan kısmı kullanılır. Plazma trombin yöntemi için bir çok tenkitler yapılmış ve neticenin %20 civarında fazla çıktığı bildirilmiştir (70).

Trombin yönteminde son zamanlardaki deneylerde insan kanı plazması kullanılmıştır (36, 45).

1.2.6.2.6. Plazma yöntemi

Sodyum sitrat (%8) içeren bir kaba koyun kanı alınır, hafif karıştırılıp, santrifüje edilir, plazma ayrılır. Bunun üzerine kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilip, dondurulur. Gerektiği zaman 37°C'de su banyosunda eritilerek kullanılır (80).

Referans heparin %0.9 sodyum klorür çözeltisinde çözündürülür, üzerine yukarıda belirtilen plazma ilave edilir. Burada heparin miktarı 1-1.5 USP ünitesine tekabül edecek şekilde ayarlanır. Bu referansın %5 artan şekilde aritmetik bir dizi tüpler içinde hazırlanır. Bunların üzerine %1 kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilip derhal zaman kaydedilir, tüpler kapatılıp üç defa yavaşça alt üst edilir. Aynı işlem ml'de 1 mg heparin içeren çözeltinin standart preparata uygun şekilde seyreltilmesini takiben yapılır. Kalsiyum klorür ilavesinden sonra bir saatlik süre içinde her tüpteki pıhtılaşma derecesi tayin edilir. Burada 0.25, 0.50 ve 0.75 olmak üzere üç derece alınır ve tam pıhtılaşma "1" olarak derecelendirilir. Bunu takiben verilen formüle göre (M) değeri hesaplanır. USP heparin ünitesinde mg da sodyum heparin potansi $P = \text{Antilog } M$ 'dir.

USP yönteminde kullanılan sitratlı plazmaya diatome silikat reaktifi ilave edilerek antikoagülan aktiviteye dayanan başka bir miktar tayini yöntemi de önerilmiştir (73).

1.3. Heparinoidler

Heparin'in elde edilme gücü nedeniyle sentetik ve yarı sentetik, antikoagülan etkinlik gösteren ilaçların yapılması için araştırmalara girilmiş ve çeşitli heparinoid ilaçlar bulunmuştur. Heparinoidler genellikle, sülfatlanmış polisakkaridlerdir. Antikoagülan etkileri kısmen, vücuttaki bağlanma yerlerinden heparin ve heparin benzeri maddeleri açığa çıkarmalarına bağlıdır. Antikoagülan etkilerine ilave olarak, lipemiyi berraklaştırıcı etki de gösterirler. Toksik etkileri fazla olduğu için heparin kadar sık kullanılmazlar. En çok denemiş heparinoidler Paritol (aljinik asit sülfat) ve Treburon (pektin sülfat)'tır. Birincinin anaflaktik şok ve ikincinin saç dökülmesi yaptığı bildirilmiştir.

Dekstran sülfat'lar, heparinoid ilaçlar olarak klinikte denenmişlerdir. Yarı-sentetik bazı glikozaminoglikan bileşikleri de heparin benzeri etki yaparlar (48).

Deniz hayvanlarından heparinoid bir madde izolasyonu yapılmıştır. Elde edildiği deniz canlısı Cucumber (deniz hıyarı) sınıfından Stichopus Japonicus (SJAMP) ve Halotluria Leucospilota (HLAMP)'dır (22,23,69).

Rapana venosa'dan ilk defa raparin adı verilen bir heparinoid elde edilmiştir (32).

1.3.1. Rapana venosa ile ilgili genel bilgiler

1.3.1.1. Taksonomik durum

Mollusca filumunun Gastropoda klasisinin Muricidae familyasından olan Rapana venosa önceleri Rapana bezoar olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra bu türün tropikal

form olduğu bu nedenle Karadeniz'de yaşayan formun *Rapana thomasiana* olduğu ileri sürülmüştür. 1987 yılında FAO tarafından hazırlanan yayında Karadeniz'de ve Marmara Denizinde yayılış gösteren bu Gastropod *Rapana venosa* olarak tanımlanmıştır. *Rapana thomasiana* halen kullanılan diğer bir ad olarak da belirtilmektedir (79).

1.3.1.2. Türün tanımı

Vücut baş, ayak, sırtta iç organlar olmak üzere 3 kısımdan oluşur.

Deniz salyangozunda kabuk tek parçalı olup iç organlar torbasının şeklini almıştır; kabukta ilk kıvrımın bulunduğu yere tepe (apeks), son kıvrımın nihayetlendiği açıklığa kabuk ağzı, kabuk ağzının kenarına da dudak (labr) denir. Deniz salyangozu sifonlu olduğundan labrı da bir oluk şeklinde uzayarak sifonun etrafını sarmıştır. Sifonlu çıkıntı orta boyda, genellikle geniş ve kanalı boydan boya açıktır.

Kabuk vücuda kolumella kası ile bağlıdır. Ayağın sırt tarafından çıkan bu kas son kabuk kıvrımının başlangıcında kolumellaya tesbit edilmiştir. Kabuk kası sayesinde, tüm vücut kabuğun içine çekilir. Bu vaziyette kabuğun ağzı, ayağın metapodium kısmı üzerine teşekkül eder, keratinden yapılmış yuvarlağımsı operkulum vasıtasıyla kapatılır.

Ağız başın ön tarafında, dışarı uzatılabilen bir hortum ucundadır. Ağız boşluğunun tavanında iki yan çene; boşluğun zemininde, kıkırdak parça ile desteklenmiş kaslı bir dil vardır. Dilin üzeri radula ile kaplı olup, radula 3 dişli ve uçları sivri veya üçgenimsidir. Ortadaki diş diğerlerine nazaran daha iridir. Yemek borusu dar ve uzundur. Ancak ucu, oval şekilde ve iç yüzeyi bir çok ince kıvrımlarla kaplı büyük bir kursağa açılır.

Kursağın yanlarından bir çift büyük tükürük bezi uzanır. Kursağı, arkaya doğru uzanan bir tüp izler. Mide "U" şeklinde ve kısmen hepatopankreas içine gömülmüş haldedir. Hepatopankreas iç organlar kitlesinin yukarı kısmını tamamen dolduracak kadar büyük ve lopludur. Barsak oldukça dar bir koni şeklinde olup, kısa ve düzdür.

Solunum organları ilkel olan ktenidiyumdur. Manto boşluğunda yalnız bir ktenidiyum bulunur. Kalp sölomun özel bir bölümü olan perikard ile ihata edilmiştir.

Boşaltım organları, iç organlar kitlesinin dorsal tarafında yer almaktadır. Duyu organları gözler, statosistler, koklama organları ve osphradium'lardır. Koklama organları tentaküllerin üzerinde yer alan hücre grupları halindedir. Osphradium'lar bir eksenle bunun iki yanında sık bir şekilde sıralanmış lamellerden müteşekkil olup ktenidyumların diplerinde yer alırlar. Bunlar kimyasal duyu organları olup, solunum suyunu kontrol ederler.

Deniz salyangozu ayrı eşeyli olup, iç organları kitlesinin dorsal tarafında yer alan, dallı bir tek gonad (testis veya ovaryum) ile bir gonoduct (sperma veya yumurta kanalı) bulunur (17).

Deniz salyangozunda iç dölleme vardır. Yumurtalar parşömen gibi kapsüllerin içinde bulunurlar. Her kapsül çok sayıda yumurtadan başka, gelişen embriyolara besin ödevi gören albuminli bir sıvı da içerir. Ekseriya kapsül içindeki yumurtaların bir kısmı gelişir, diğerleri ise gelişen embriyolar tarafından gıda olarak kullanılır. Kapsüller ekseriya grup halinde taşlara, yosunlara tesbit edilir. Gelişme metamorfozludur.

Gelişmelerinde veliger larvası teşekkül eder.

Boyları esas orijini olan ülkelerde 20 cm. ye kadar olabilen *Rapana* Karadeniz'de 12-13 cm. ye kadar ulaşabilmektedir. Deniz salyangozu kabuk yapısı bakımından açık sarıdan kahverenginin çeşitli tonlarına kadar değişiklik gösterir. Kabuk kalsiyum karbonat'tan müteşekkil olup, deriden ifraz edilen salgılarla oluşturulur (79, 60).

1.3.1.3. Türün biyolojik özellikleri

Rapana venosa'nın en önemli özelliği karnivor olmasıdır. Hareketi çok ağır olan bu form midye ve istiridye gibi sesil formlarla beslenme durumundadır. Yapılan gözlemlerde ergin bir bireyin günde birkaç midyeyi parçaladığı saptanmıştır. Bu nedenle Karadeniz havzasındaki midye ve istiridye stokları üzerinde olumsuz etkiler yaratmıştır.

Gelişmesi metamorfozlu olup, larval evresi pelajikte geçer. Uzun yaşamlı olan larvaları su hareketleriyle geniş mesafelere taşınabilir. Bu nedenle Karadeniz'i istilası kısa zamanda gerçekleşmiştir. Düşük ve yüksek sıcaklıktan etkilenmezler ve hatta su dışında 36 saat yaşantılarını sürdürebilirler. Türün esas yayılış bölgesindeki tuzluluk %0.33-34 olmasına rağmen Karadeniz'deki düşük tuzluluğa (%0.17) dayanabilmekte ve hatta tuzluluk derecesi çok daha düşük nehir ağızlarına yakın bölgelerde bile rastlanmaktadır.

Karadeniz'deki interspesifik ilişki tek yönlü olup, *Rapana venosa*'nın lehinedir. Diğer bir değişle esas yayılış alanında tür üzerinden beslenen deniz yıldızları Karadeniz'de yoktur. Bu nedenle Karadeniz'de midyeler üzerinden rahatlıkla beslenen türü besin olarak kullanan başlıca bir canlı olmadığından populasyon yoğunluğu hızla artmıştır (79).

1.3.2. Raparin hakkında genel bilgiler

1.3.2.1. Raparin'in elde edilişi

Raparin, *Rapana venosa*'nın hepatopankreas ve glande salivare'sinden elde edilmiştir. Kuizenga (50) ve Charles (13) tarafından heparinin elde edilmesinde kullanılan tekniklerden yararlanılmıştır.

45 kg dondurulmuş doku ezilir ve 16 litre distile su ile karıştırılır. Karışım 35°C'de yarım saat bekletilir. Daha sonra oda temperaturünde 24 saat bekletilir. Koruyucu olarak 400 ml ksilen ilave edilir. Karışıma 45 litre 0.75 N sodyum hidroksit ve 7.6 litre doymuş amonyum sülfat ilave edilir ve karıştırılır. 55°C'de su banyosunda 2 saat bekletilir ve temperatur 80°C'ye yükseltilir, bu sıcaklıkta yarım saat tutulur. Karışım sıkılarak süzülür. Posası atılır. Süzüntünün pH'sı sülfürik asit'le 2.5'a ayarlanır. Santrifüje edilir, çöken kısım alınır ve çökelti yağdan kurtarılacak için 3-4 defa alkolle yıkanır, alkollü kısım santrifüje edilerek ayrılır. Çökelti 4 litre su ile karıştırılır ve 2 N sodyum hidroksit ile pH 8.5'a ayarlanır. 30 g tripsin eklenir. pH 8-8.5 civarında sabit tutulur ve 38°C'de 60 saat bekletilir. Karışıma hacminin iki katı kadar alkol ilave edilerek çöktürülür ve santrifüje edilir. Alkollü kısım ayrılır ve dipte kalan posası suyla karıştırılır. Bu karışım

75°C'de 35-45 dakika tutulur. Böylece proteinler çöktürülmüş olur. Su banyosundan alınıp üzerine aseton ilave edilerek heparinoid madde çöktürülür (50).

1.3.2.2. Raparin'in tanımlanması

1.3.2.2.1. IR spektrumu

Potasyum bromür tabletteki IR spektrumu alınmış ve 1625, 1400, 1175, 1020, 950 ve 850 cm⁻¹'lerde pikler tesbit edilmiştir (32).

1.3.2.2.2. İnce tabaka kromatografisi

İTK analizlerinde adsorban olarak cellulose 300, çözücü sistemi olarak Amonyak (%25)/Piridin/Su (60:35:5) karışımı ve reaktif olarak Azur A çözeltisi kullanılmıştır. R_f değerleri hesaplanmış ve heparin ile mukayese edilmiştir (32).



2. DENEYSEL KISIM

2.A. Kullanılan maddeler

Rapana venosa	Karadeniz, Boğaziçi açıklığından toplanmış örnekler (dipfrizde saklanmış)
Azur A	Gurr
Metilen mavisi	Merck
Toluidin blue	Merck
Destran blue	Merck
Kalsiyum klorür	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sephadex G-50	Pharmacie
Sheep plazma	Kraeber CO (Hamburg)
İnsan plazması	L. Genç, E. Havuççuoğlu
Ksilen	Atabay
Trypsin	Sigma (10 G T 8128) USA
Sülfürik asit	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Amonyum sülfat	Merck
Aseton	Atabay
Alkol	Tekel
Petrol eteri	Merck
Heptest	Haemachem, Inc. USA
Hepaclot	Diagnostica Stago (France)
Heparin	Sigma grade I (178 U/mg)

2.B. Kullanılan aletler

Spektrofotometre (UV)	Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160 A
Spektrofotometre (IR)	Shimadzu IR 435
Liyofilizatör	Lyovac GT 2 Leybold, Heraeus
pH metre	pH meter model 101, Bilmar
Kronometre	Serkisof
Hamilton Enjektör	0.025, 0.100, 0.250 mcl
Kromatografi kolonu	70 x 2.8 cm
Otomatik pipet	Nichiryo Mad. in Japan
Termostatlı su banyosu	Thermomix 1419 B. Braun (Germany)

2.1. Raparin'in elde edilişii

2.1.1. Raparin RH₅₀₀'ün elde edilişii

Rapana venosa'nın kabukları kırıldıktan sonra hepatopankreas kısmı ayrıldı ve dipfrizde donmaya bırakıldı. Dondurulmuş hepatopankreas tartıldı (380 g) ve bir bistüri vasıtasıyla kıyıldı. Üzerine 1:1 oranında etil alkol ilave edildi ve 1 gece dipfrizde maserasyona bırakıldı, süzöldü ve bakiye alındı. Bakiyeye 140 ml distile su ve 1 ml ksilen ilave edilerek 24 saat maserasyona bırakıldı. 400 ml 0.75 N sodyum hidroksit ve 50 ml doymuş amonyum sülfat ilave edildi ve 55°C'de 2 saat, 60°C'de 30 dakika su banyosunda bekletildi. 3-4 katlı tölbentten süzöldü. Koyu kıvamlı süzöntü 80°C'de 30 dakika bekletildi. Sülfürik asitle pH 2.5'a getirildi. Çökelti kısım santrifüjle ayrıldı. Çökelti alkol ile muamele edilerek yıkandı, santrifüje edildi ve elde edilen bakiye raparin RH₅₀₀ olarak isimlendirildi.

2.1.2. Raparin RHP₁₀'un elde edilişii

Rapana venosa'ların hepatopankreasları ayrıldı, iyice parçalandı ve petroleteri ile 1 gece maserasyona bırakıldı. Petrol eterli kısım ayrıldı. Bakiye alkolle 1 gece dipfrizde masere edildi. Bir saat karıştırıcıyla karıştırıldı ve süzöldü. Bakiye üzerine 0.75 N sodyum hidroksit ve doymuş amonyum sülfat ilave edildi ve 55°C'de iki saat, 60°C'de 30 dakika su banyosunda bekletildi. 3-4 katlı tölbentten süzöldü. Koyu kıvamlı süzöntü 80°C'de 30 dakika bekletildi. Sülfürik asitle pH 2.5'a getirildi. Santrifüje edildi. Çökelti alkol ile birkaç defa yıkandı, santrifüje edildi ve elde edilen bakiye raparin RHP₁₀ olarak isimlendirildi.

2.1.3. Raparin RKL₁₀'un elde edilişii

Bölüm 1.3.2.1. de anlatılan Kuizenga'nın (50) heparin elde etme tekniğı kullanılmıştır.

263 g hepatopankreas iyice parçalandı, 97 ml distile su ilave edildi ve 35°C'de ara sıra karıştırarak 30 dakika su banyosunda bekletildi. 1 ml ksilen ilave edildi ve ağız kapalı bir şişede 24 saat oda temperaturünde maserasyona bırakıldı. 275 ml 0.75 N sodyum hidroksit ve 46 ml doymuş amonyum sülfat ilave edildi. 55°C'de su banyosunda iki saat bekletildi, sıcaklık 80°C'ye yükseltildi ve bu sıcaklıkta 30 dakika bekletildi. 3-4 katlı tölbentten sıkılarak süzöldü ve posa atıldı. Süzöntünün pH'sı sülfürik asitle 2.5'a ayarlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 30 dakika santrifüje edildi ve üstteki berrak kısım ayrıldı. Dipteki bakiye alkolle süspande edildi ve tekrar santrifüje edildi. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı ve alkollü kısımlar ayrıldı. Bakiye 25 ml distile su ile karıştırıldı ve 2 N sodyum hidroksitle pH 8.5'a ayarlandı. 0.100 g tripsin ilave edildi. 38°C'de su banyosunda 60 saat triptik fermentasyona tabi tutuldu. Fermentasyondan sonra hacminin

iki katı kadar alkol ilave edildi ve santrifüje edilerek alkollü berrak kısım ayrıldı. Çökelti su ile süspande edilerek alındı ve 75°C'de 40 dakika su banyosunda bekletildi. Aseton ilave edilerek raparin çöktürüldü. Santrifüje edildi, çöken kısım raparin RKL₁₀ olarak isimlendirildi.

2.2. Raparin'in fraksiyonlandırılması

Sephadex G-50 super fine kolonunda fraksiyonlandırma yapıldı. 35 g Sephadex G-50 super fine distile suda üç saat şişirildikten sonra 90 derecelik bir açıyla spora tutturulmuş 70 x 2.8 cm uzunluğundaki kolona dolduruldu. 55 cm yüksekliğinde, 338 cm³ hacminde sütun hazırlandı. Dekstran blue 2000 ile elüsyon hacmi (V₀) tayin edildi ve 105 ml olarak bulundu.

200 mg raparin (RH₅₀₀, RHP₁₀ ve RKL₁₀ ayrı ayrı) 4 ml distile suda çözüldürüldü, santrifüje edildi ve süzüldükten sonra kolona tatbik edildi. Kolon yukarıdan distile su ile beslenerek akış hızı 50 ml/saat olacak şekilde elüe edilerek 5'er ml'lik elüatlar toplandı. Elüatların absorbansları 190-200.0 nm'de okundu ve bu absorbans değerlerine karşı hacim grafiği çizildi.

Elde edilen fraksiyonlar liyofilize edildi. Fraksiyonların ve hareket maddelerinin 190-390.0 nm arasında UV spektrumları ve 4000-400 cm⁻¹ arasında IR spektrumları alındı.

2.3. Metakromatik deneyler

2.3.1. Kullanılan maddeler

Raparin fraksiyonlarının çözeltileri: 500-1000 mcg/ml'lik distile sudaki çözeltileri hazırlandı.

Boya çözeltisi: Azur A, metilen mavisi ve toluidin mavisinin 25mg/100 ml'lik stok çözeltileri kullanılacakları zaman taze olarak hazırlandı.

Tampon çözeltisi: 100 ml barbiton tampon çözeltisi (pH 8.50) taze olarak hazırlandı. Barbiton tampon çözeltilisini hazırlamak için 1.105 g barbiton tartıldı, üzerine 10 ml 0.5 M sodyum hidroksit ve 10 ml distile su ilave edildi, çözüldürüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.2. Yöntem

Deney tüplerine stok çözeltilerden 0.2, 0.4 ve 0.6 ml'lik çözeltiler Hamilton enjektörlerle ayrı ayrı konuldu. Bu miktarlar distile su ile 1.1 ml'ye tamamlandı. Yine hamilton enjektörle 50 µl barbiton tampon çözeltisi ve 50 µl boya çözeltisi konarak total çözelti 1.2 ml olacak şekilde hazırlandı.

Daha sonra boyaların ve boya-raparin karışımlarının UV spektrofotometrede maksimum dalga boyları tesbit edildi. Hazırlanan çözeltilerin (1.2 ml) UV

spektrofotometresinde, kullanılan boyanın maksimum dalga boyuna göre farklı konsantrasyonlardaki absorbanları okundu.

Metakromazi deneyleri 3 değişik raparin'den elde edilen 6 fraksiyon ile 3 farklı boya kullanılarak yapıldı ve her bir işlem 5 kez tekrarlandı.

2.4. Rekalsifikasyon deneyleri

2.4.1. Kullanılan maddeler

Rekalsifikasyon deneyleri 3 değişik raparin'den elde edilen 6 fraksiyon üzerinde yapıldı. Deneylerde koyun plazması (Kraeber Co.), serum fizyolojik ve 0.025 M kalsiyum klorür kullanılmıştır.

2.4.2. Yöntem

Deneylerde kullanılacak tüpler iyice yıkanıp kurutulduktan sonra silikon çözeltilisinden (1 k stok silikon + 17 k distile su) geçirildi ve etüvde 240°C'de 5-6 saat bekletildi.

Koyun plazmasının çözeltilisinin hazırlanışı: Liyofilize halde bulunan koyun plazması 10-15 dakika kaynatılmış ve soğutulmuş distile suda çözüldürülerek 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 2 ml'lik porsiyonlar halinde tüplere alındı ve dipfrize konuldu. Kullanılacağı zaman dipfrizden çıkartıldı.

Standart olarak 10 U/ml heparin sigma GI (178 U/mg) çözeltilisi kullanıldı.

Deney, içinde termostatlı ısıtıcı ve karıştırıcı bulunan su banyosunda 37+0.5°C'de yapıldı. Tüm fraksiyonların 500 mcg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı, bunlardan ayrı ayrı deney tüplerine 0.050, 0.100, 0.200 ve 0.400 ml çözeltilerden konuldu. Herbirinin üzerine 0.180 ml plazma ilave edildikten sonra serum fizyolojik ile 1.0 ml'ye tamamlandı. Sonra bu çözeltilerin üzerine 0.200 ml 0.025 M kalsiyum klorür çözeltilisi ilave edildi ve hemen kronometre çalıştırıldı. Her 30 saniyede bir ucu kıvrık bakır bir tel çözeltiliye batırılıp pıhtılaşmanın oluşumu gözlenerek ilk pıhtı teşekkülünde kronometre durdurularak pıhtılaşma zamanı tayin edildi.

2.5. Biyolojik metodlarla miktar tayini

1 k sodyum sitrat (%3.8) ile 9 k taze kan karıştırılıp santrifüje edilerek plazma ayrıldı ve testlerde bu plazma kullanıldı.

2.5.1. Heptest metodu

Elde edilen üç raparin'in ve bunların fraksiyonlarının 1 mcg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stoklardan 25, 50 ve 75 µl alındı ve 37°C'lik su banyosunda tüplere konuldu. Üzerlerine 25'er µl insan plazması ilave edildi. Bunun üzerine 0.1 ml faktör Xa ilave

edildi ve anında kronometreye basıldı, 120 saniye sonra 0.1 ml recalmix (domuz plazması fraksiyonu içinde çözüldürülmüş optimum miktarlarda kalsiyum klorür ve beyin sefalini içeren bir karışımdır.) ilave edildi ve ikinci bir kronometreye basılarak pıhtılaşma zamanları tayin edildi. Deney bir defa da raparin ilave edilmeden yapıldı ve pıhtılaşma zamanı tayin edildi.

2.5.2. Hepaclot metodu

Yine raparinlerin ve fraksiyonlarının 1 mcg/ml'lik stok çözeltileri kullanıldı. 37°C'de su banyosunda çalışıldı. 25 µl raparin çözeltisi üzerine 50 µl AT III çözeltisi ilave edildi, 60 saniye sonra 0.1 ml faktör Xa ilave edildi, 90 saniye bekletildi; sonra 37°C'de bekletilmiş olan substrat plazmadan 0.1 ml ilave edildi ve 30 saniye sonra 0.1 ml 0.025 M kalsiyum klorür ilave edildi ve hemen kronometreye basılarak pıhtılaşma zamanı tayin edildi. Aynı deney bir defa da raparin ilave edilmeden yapılarak pıhtılaşma zamanı tayin edildi.

3. BULGULAR

3.1. Raparin RH_{500} ' e ait bulgular

Sephadex G-50 süper fine sütununda yapılan fraksiyonlandırmada elde edilen elüatların 196.0 nm'deki absorbanları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Raparin RH_{500} 'ün Sephadex G-50 süper fine'daki elüatlarının absorbanları.

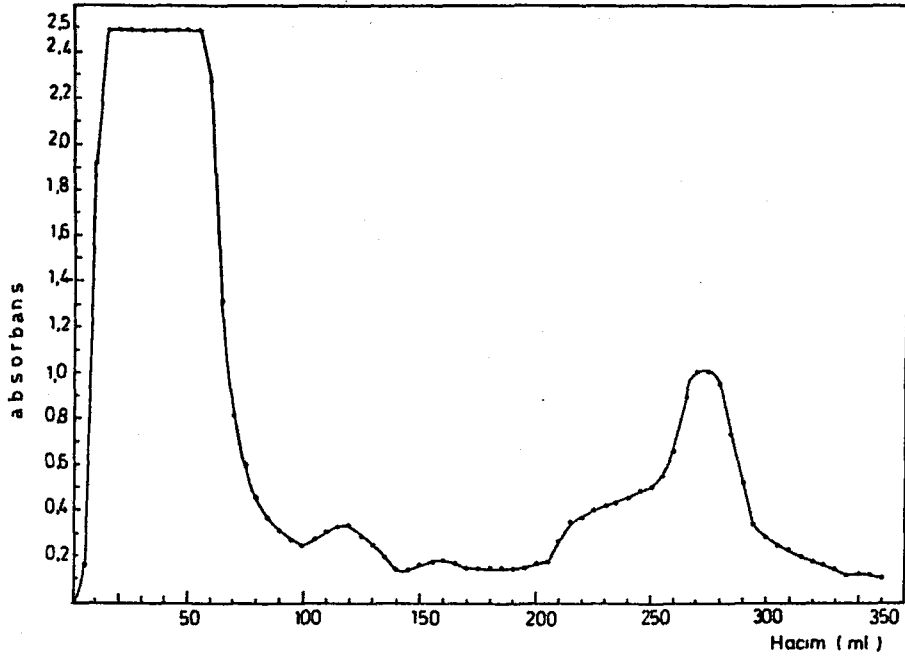
V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.
5	0.163	75	0.589	145	0.141	215	0.357	285	0.738
10	1.917	80	0.453	150	0.163	220	0.371	290	0.532
15	2.494	85	0.361	155	0.171	225	0.403	295	0.347
20	2.494	90	0.309	160	0.184	230	0.421	300	0.288
25	2.494	95	0.273	165	0.169	235	0.438	305	0.250
30	2.494	100	0.242	170	0.154	240	0.456	310	0.228
35	2.494	105	0.280	175	0.152	245	0.485	315	0.205
40	2.494	110	0.306	180	0.151	250	0.509	320	0.184
45	2.494	115	0.328	185	0.145	255	0.553	325	0.165
50	2.494	120	0.329	190	0.143	260	0.661	330	0.146
55	2.494	125	0.280	195	0.153	265	0.893	335	0.124
60	2.268	130	0.251	200	0.166	270	1.009	340	0.135
65	1.309	135	0.198	205	0.179	275	1.002	345	0.122
70	0.813	140	0.139	210	0.271	280	0.954	350	0.110

Bu absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

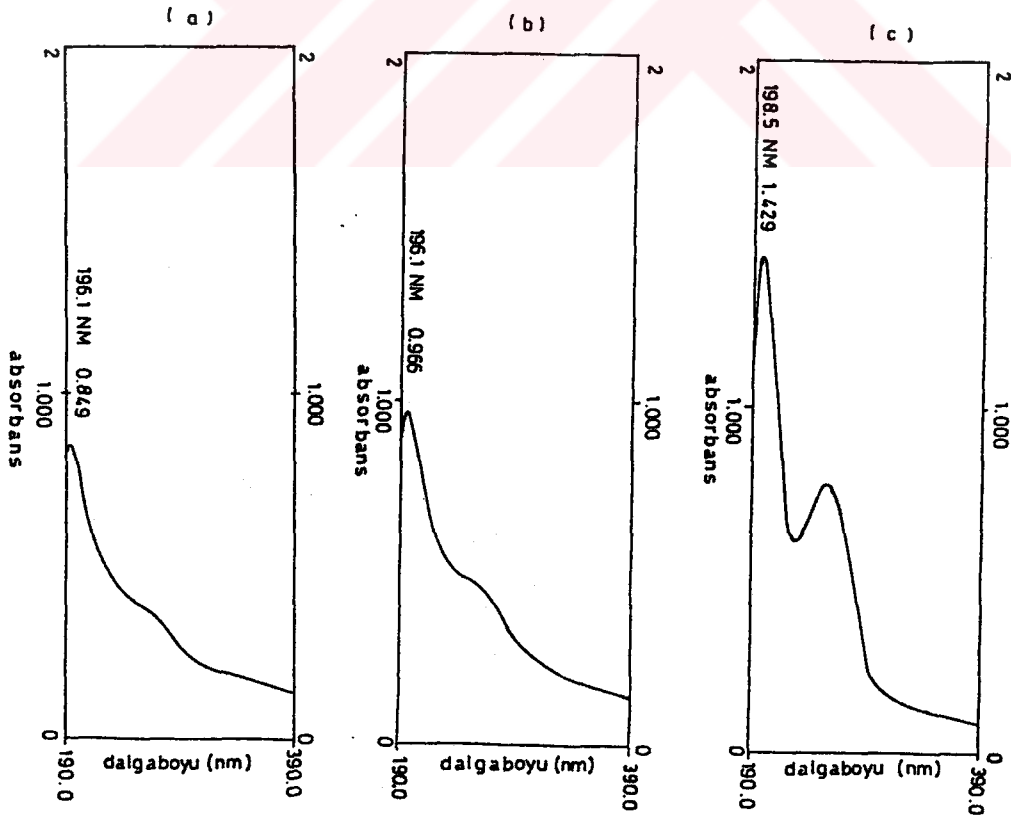
Grafikte de görüleceği gibi V_0 'dan sonra ilk 90 ml ve 205-300 ml'ler arasında olmak üzere iki fraksiyon elde edilmiştir.

Sütuna tatbik edilen raparin RH_{500} miktarına göre fraksiyon I %32.75 ve fraksiyon II %4.15 oranında elde edilmiştir. Toplam verim %36.90 civarındadır.

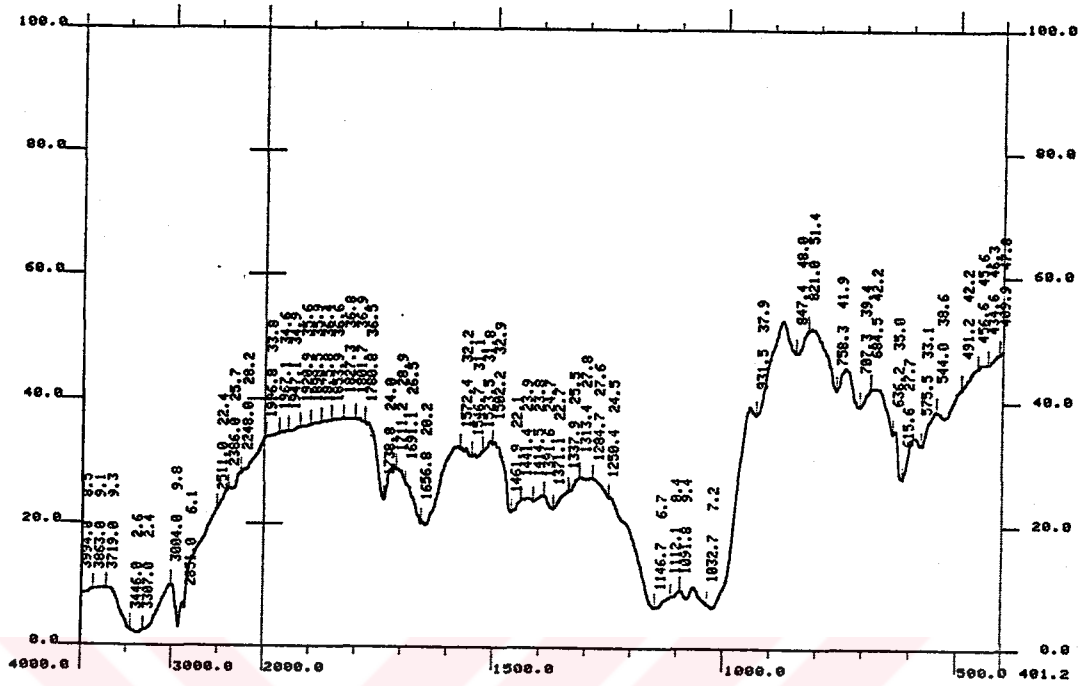
Raparin RH_{500} ve elde edilen iki fraksiyonunun UV spektrumları Şekil 3.2'de, yine bunların IR spektrumları Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5'de gösterilmiştir.



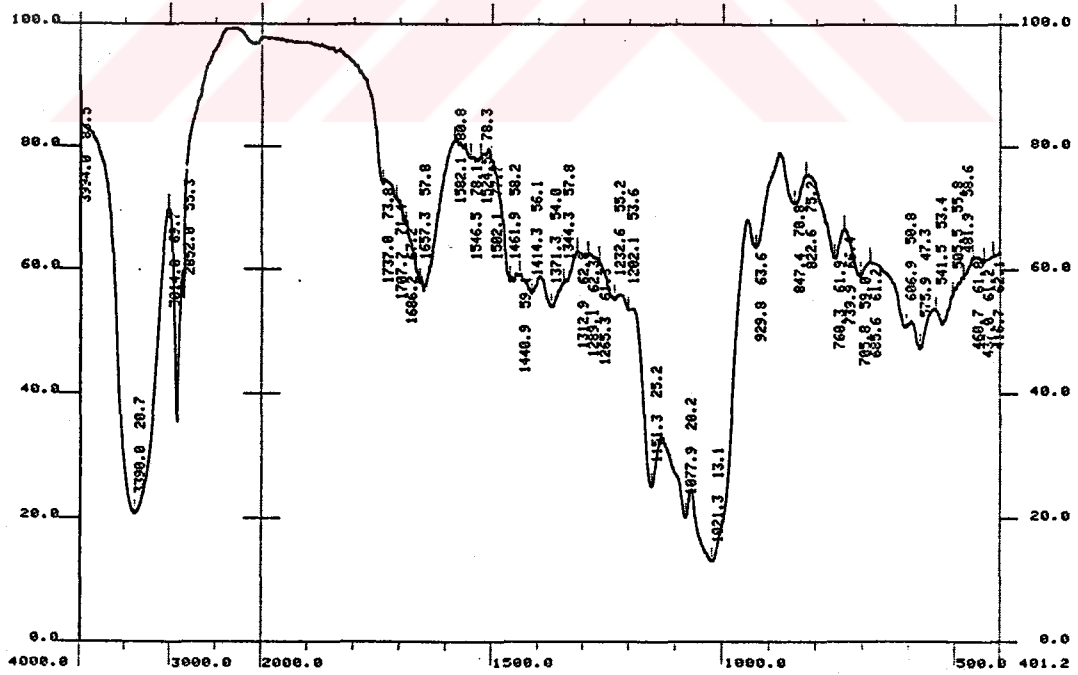
Şekil 3.1. Raporin RH₅₀₀'ün Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi



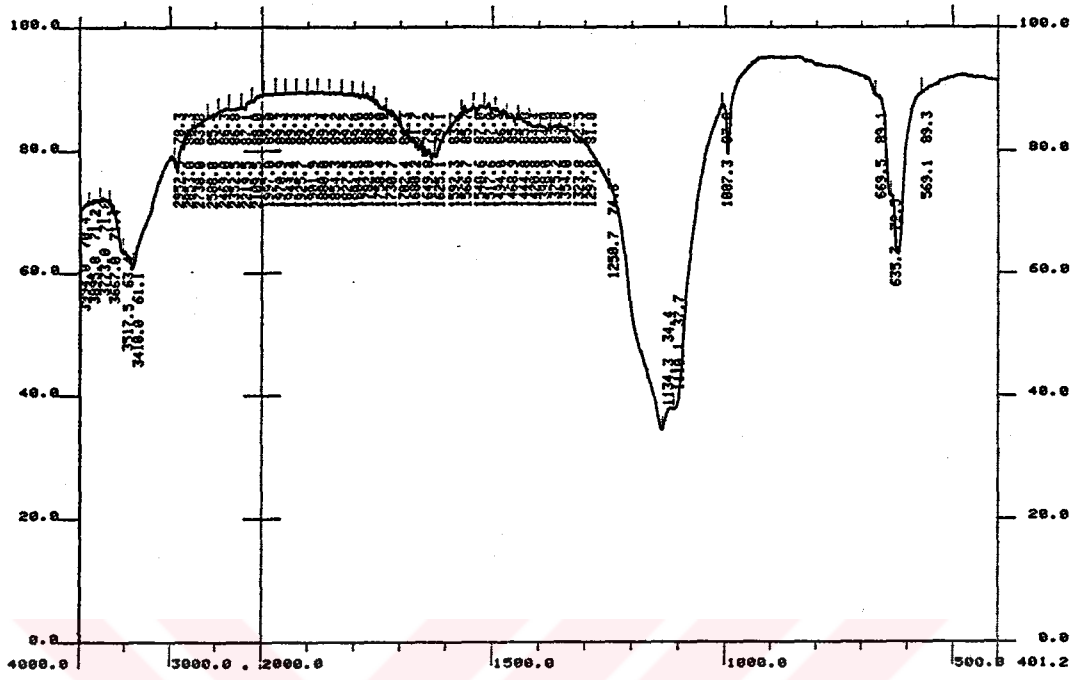
Şekil 3.2. Raporin RH₅₀₀ (a), Fr. I (b), Fr. II'nin (c) UV spektrumları



Şekil 3.3. Raparin RH₅₀₀'ün IR spektrumu



Şekil 3.4. Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon I'in IR spektrum



Şekil 3.5. Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon II'nin IR spektrumu

3.2. Raparin RHP₁₀'a ait bulgular

Sephadex G-50 süper fine sütununda yapılan fraksiyonlandırmada elde edilen elüatların 194.0 nm'deki absorbanları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Raparin RHP₁₀'un Sephadex G-50 süper fine'daki elüatlarının absorbanları

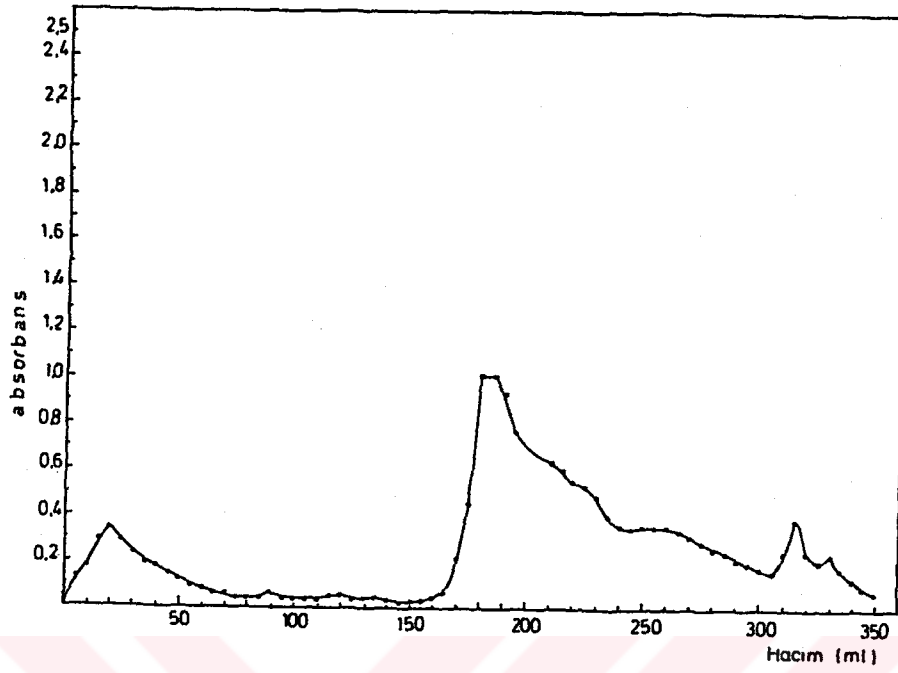
V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.
5	0.129	75	0.045	145	0.010	215	0.592	285	0.241
10	0.177	80	0.035	150	0.023	220	0.553	290	0.215
15	0.287	85	0.039	155	0.020	225	0.528	295	0.192
20	0.338	90	0.056	160	0.033	230	0.480	300	0.171
25	0.281	95	0.042	165	0.050	235	0.392	305	0.155
30	0.234	100	0.029	170	0.205	240	0.350	310	0.220
35	0.188	105	0.030	175	0.450	245	0.345	315	0.392
40	0.166	110	0.018	180	1.084	250	0.351	320	0.224
45	0.139	115	0.041	185	1.068	255	0.352	325	0.204
50	0.117	120	0.043	190	0.928	260	0.352	330	0.241
55	0.093	125	0.025	195	0.770	265	0.331	335	0.173
60	0.070	130	0.029	200	0.664	270	0.307	340	0.128
65	0.061	135	0.036	205	0.632	275	0.286	345	0.099
70	0.050	140	0.023	210	0.628	280	0.259	350	0.082

Bu absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

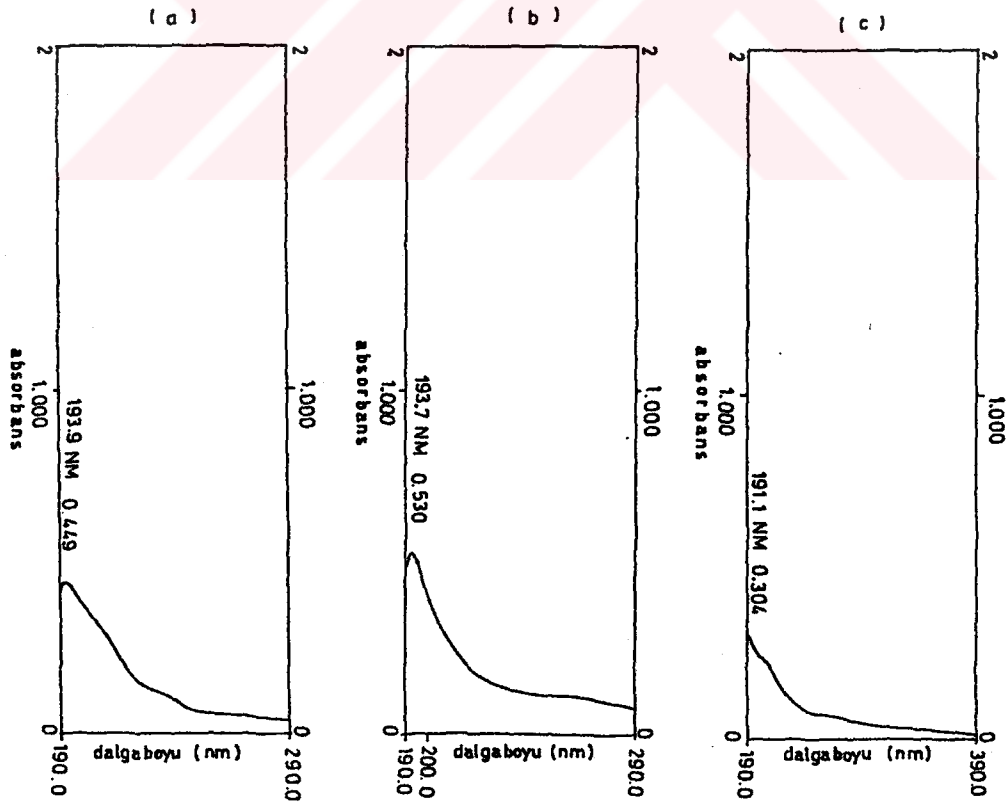
Grafikte de görüleceği gibi Vo'dan sonra ilk 60 ml'de ve 170-240 ml'ler arasında olmak üzere iki fraksiyon elde edilmiştir.

Sütuna tatbik edilen raparin RHP₁₀ miktarına göre fraksiyon I %0.30 ve fraksiyon II %51.75 oranında elde edilmiştir. Toplam verim %52.05 civarındadır.

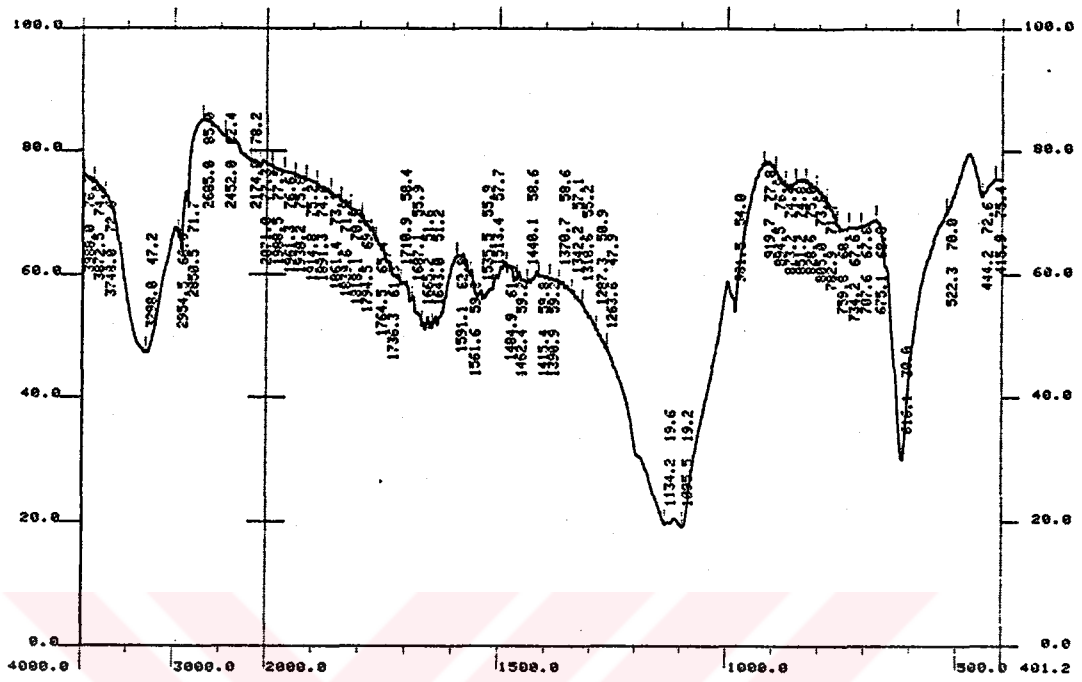
Raparin RHP₁₀ ve elde edilen iki fraksiyonunun UV spektrumları Şekil 3.7'de, yine bunların IR spektrumları Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10'da gösterilmiştir.



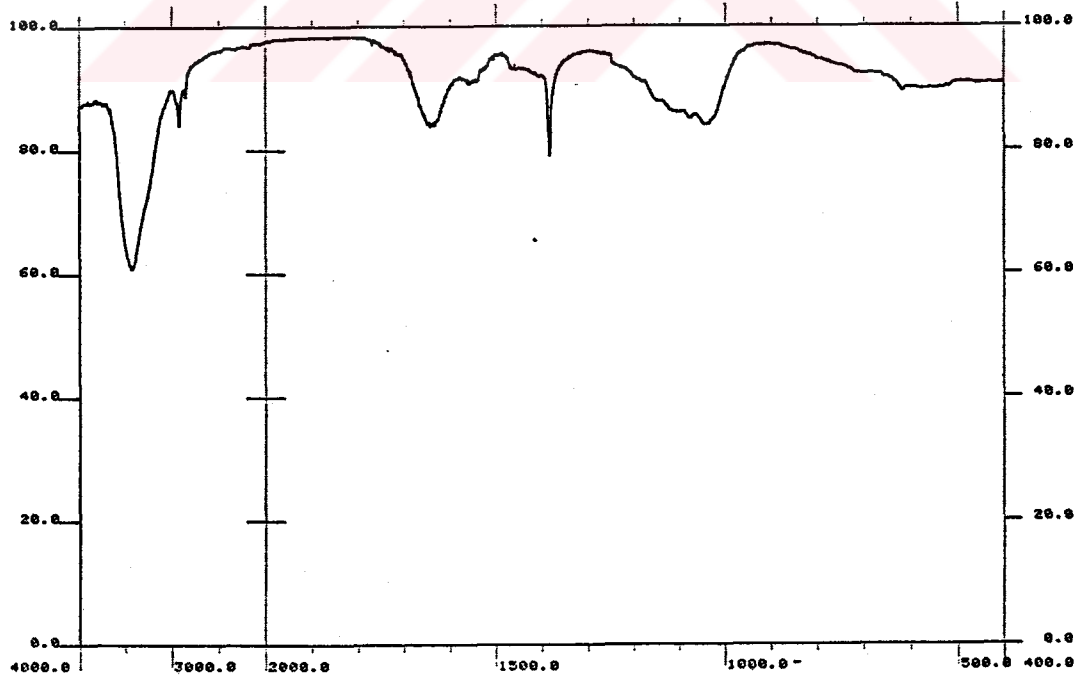
Şekil 3.6. Raparin RHP₁₀'un Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi



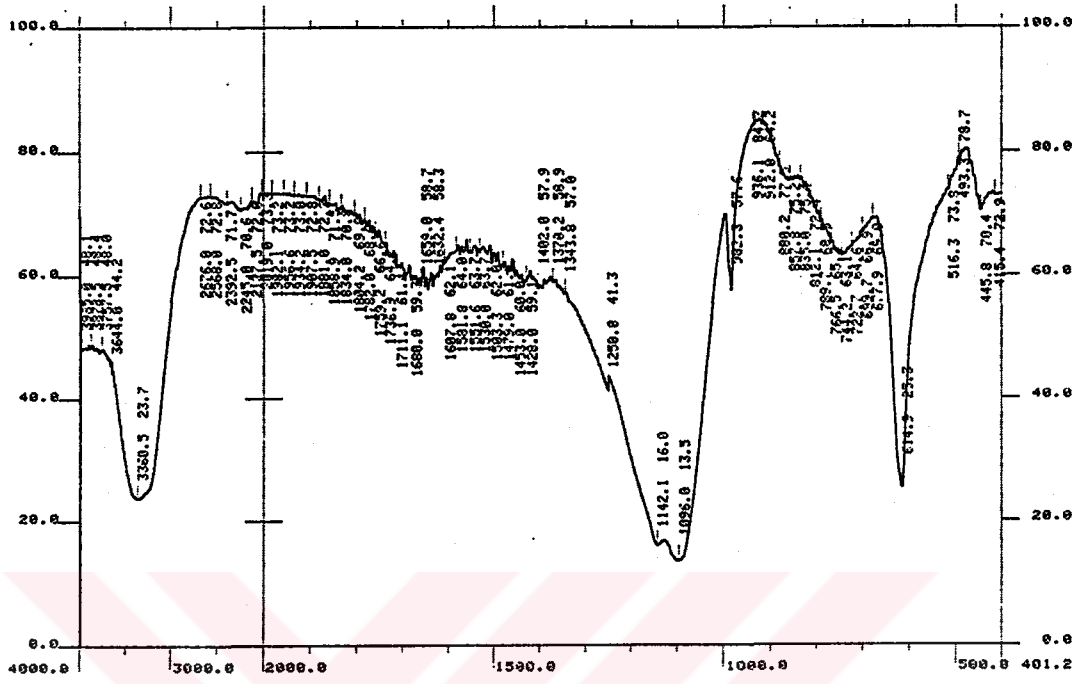
Şekil 3.7. Raparin RHP₁₀ (a), Fr. I (b) ve Fr. II'nin (c) UV spektrumları



Şekil 3.8. Raparin RHP₁₀'un IR spektrumu



Şekil 3.9. Raparin RHP₁₀ Fraksiyon I'in IR spektrumu



Şekil 3.10. Raparin RHP₁₀ Fraksiyon II'nin IR spektrumu

3.3. Raparin RKL₁₀'a ait bulgular

Sephadex G-50 süper fine sütununda yapılan fraksiyonlandırmada elde edilen elüatların 199.0 nm'deki absorbanları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Raparin RKL₁₀'un Sephadex G-50 süper fine'daki elüatlarının absorbanları

V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.
5	0.354	75	1.091	145	0.578	215	2.270	285	0.532
10	1.106	80	0.923	150	0.596	220	2.270	290	0.631
15	2.179	85	0.846	155	0.614	225	2.270	295	0.741
20	2.270	90	0.808	160	0.661	230	2.270	300	0.719
25	2.270	95	0.781	165	0.674	235	2.270	305	0.454
30	2.270	100	0.782	170	0.797	240	2.270	310	0.266
35	2.270	105	0.698	175	0.937	245	2.270	315	0.203
40	2.270	110	0.689	180	1.161	250	2.270	320	0.175
45	2.270	115	0.634	185	1.567	255	2.270	325	0.174
50	2.270	120	0.586	190	2.156	260	1.609	330	0.164
55	2.270	125	0.564	195	2.270	265	1.146	335	0.130
60	2.270	130	0.578	200	2.270	270	0.802	340	0.121
65	1.585	135	0.567	205	2.270	275	0.626	345	0.096
70	1.159	140	0.595	210	2.270	280	0.484	350	0.079

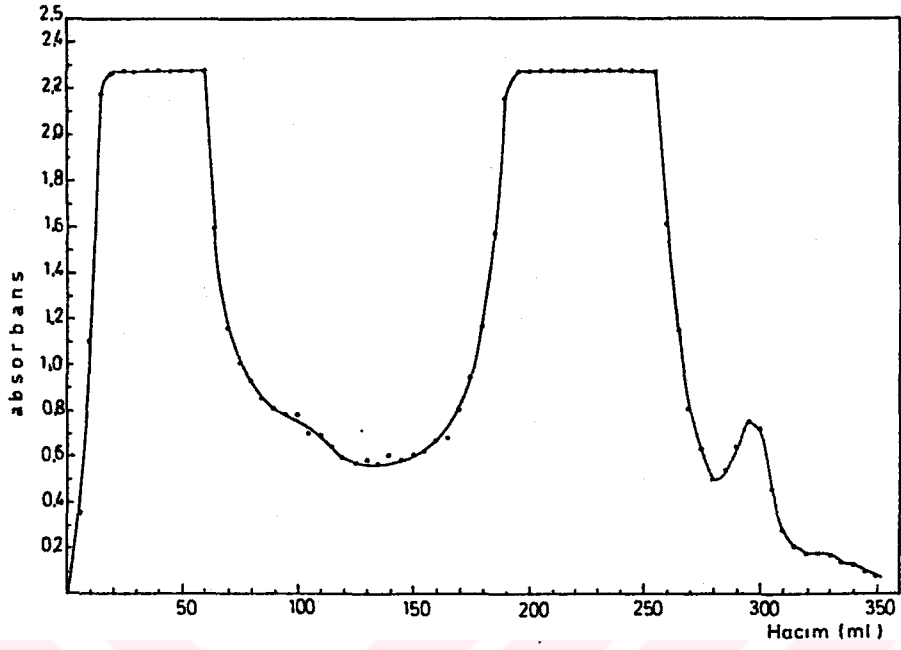
Bu absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

Grafikte de görüleceği gibi Vo'dan sonra ilk 100 ml'de ve 160-280 ml'ler arasında olmak üzere iki fraksiyon elde edilmiştir.

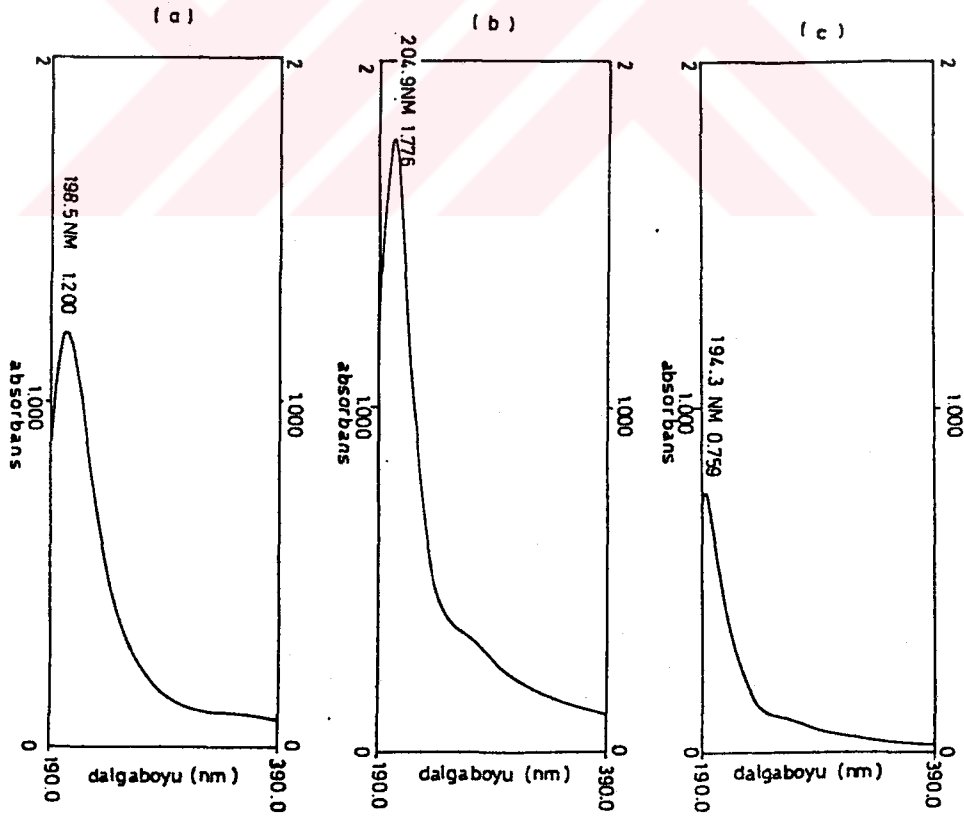
Sütuna tatbik edilen raparin RKL₁₀ miktarına göre fraksiyon I %12.70 ve fraksiyon II %30.60 oranında elde edilmiştir. Toplam verim %43.30 civarındadır.

Raparin RKL₁₀ ve elde edilen iki fraksiyonunun UV spektrumları Şekil 3.12'de, yine bunların IR spektrumları Şekil 3.13, 3.14 ve 3.15'de gösterilmiştir.

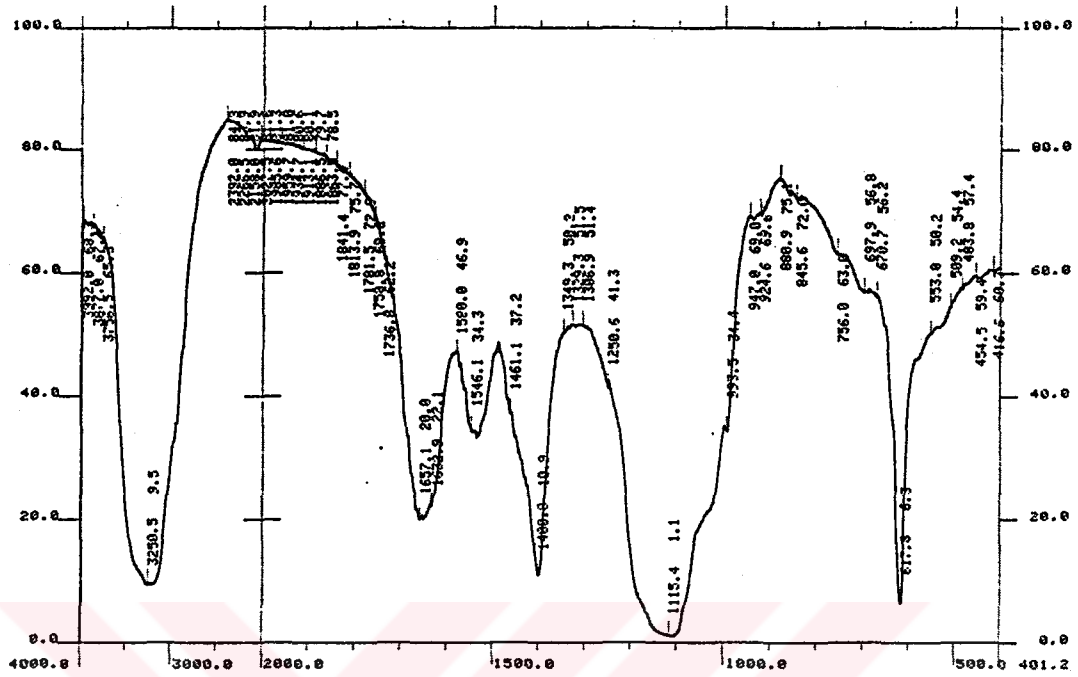
Ayrıca çizdirilen IR spektrumlarıyla karşılaştırmak için heparin'in IR spektrumu Şekil 3.16'da verilmiştir.



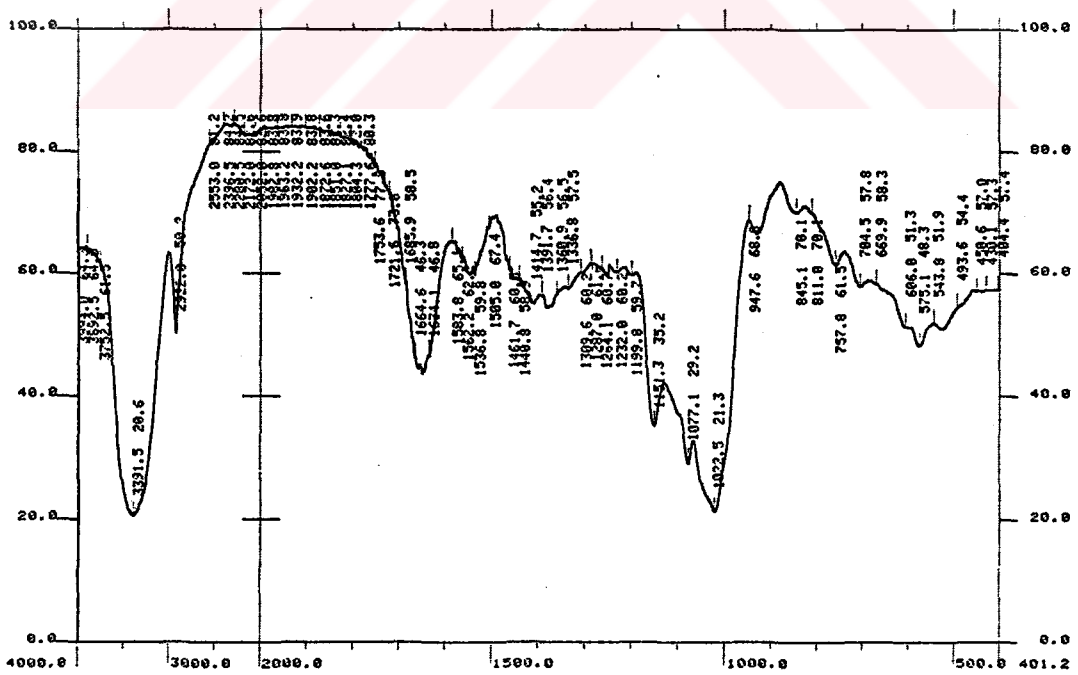
Şekil 3.11. Raporin RKL₁₀'un Sephadex G-50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi



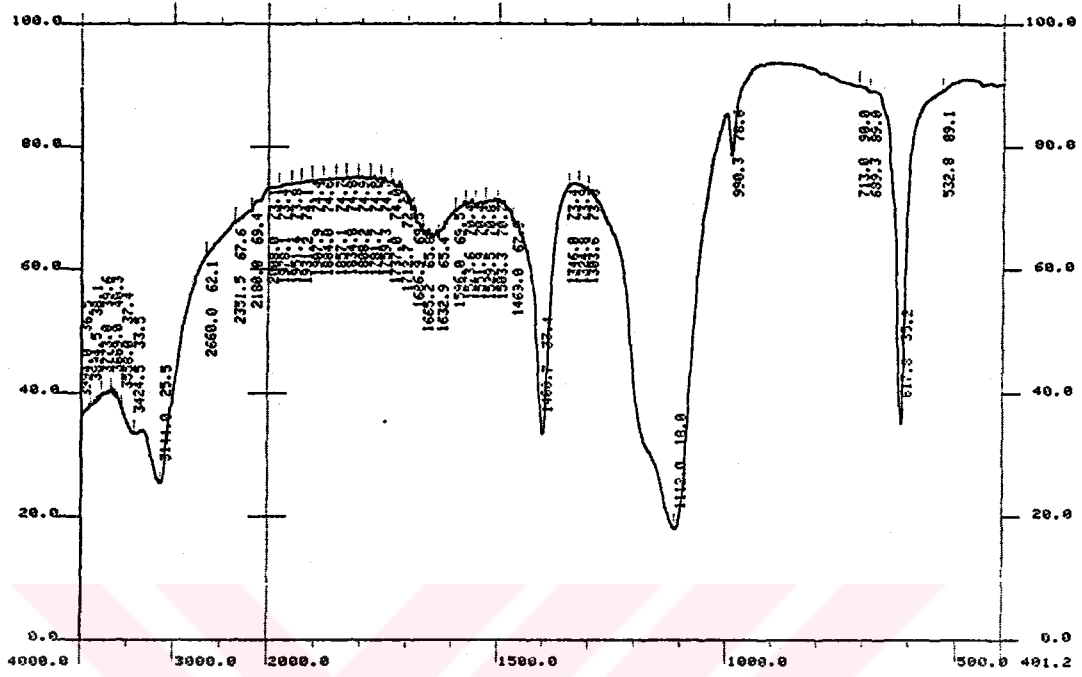
Şekil 3.12. Raporin RKL₁₀ (a), Fr. I (b) ve Fr. II'nin (c) UV spektrumları



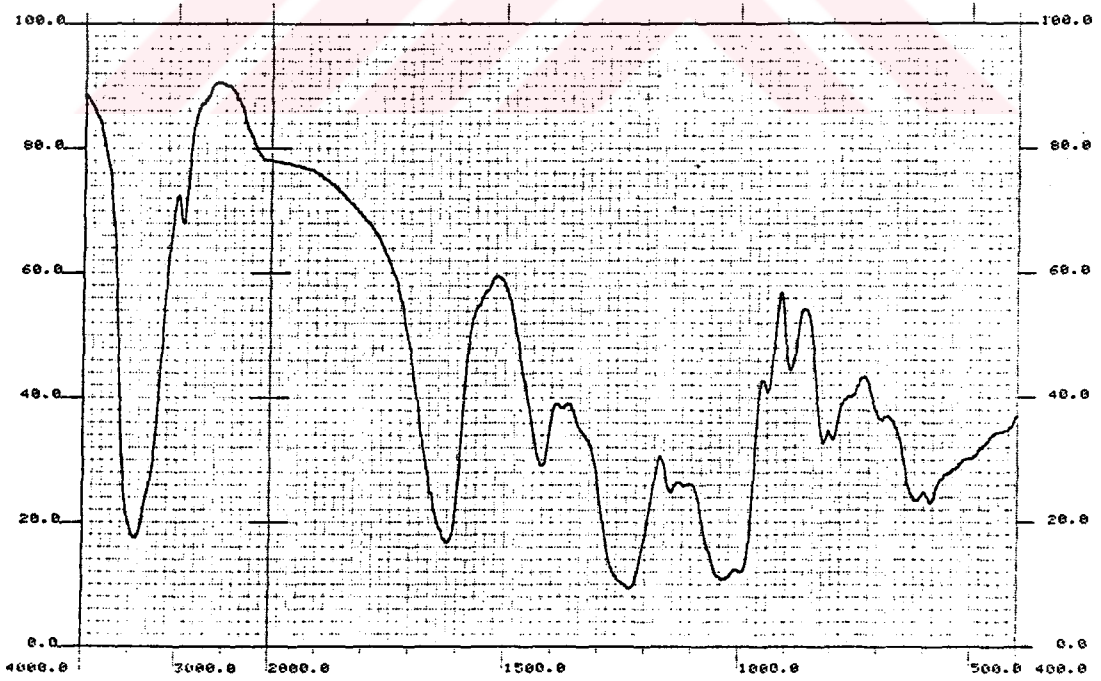
Şekil 3.13. Raporin RKL₁₀'un IR spekturmu



Şekil 3.14. Raporin RKL₁₀ Fraksiyon I'in IR spekturmu



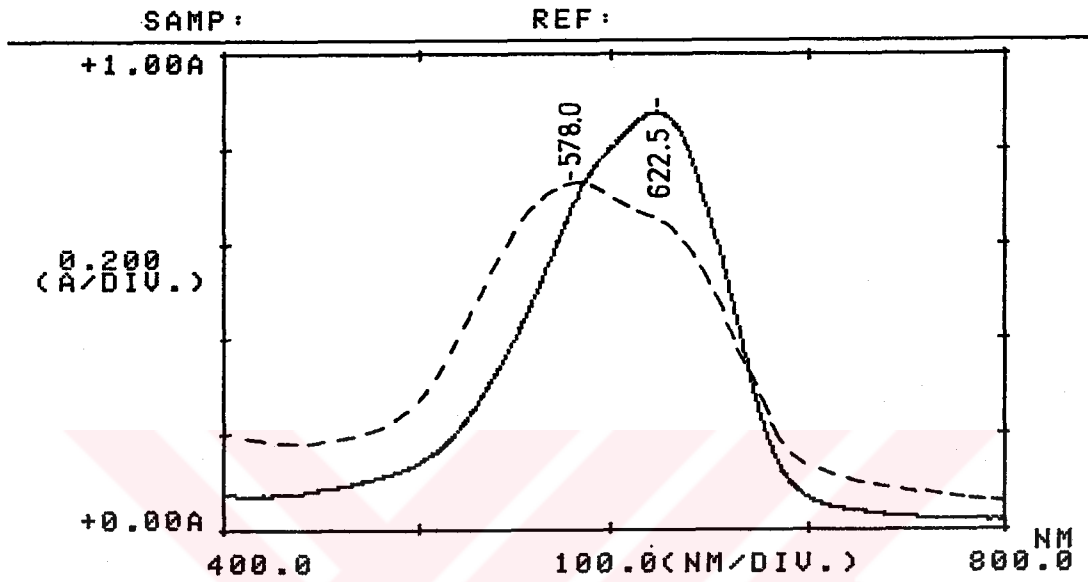
Şekil 3.15. Raparin RKL₁₀ Fraksiyon II'nin IR spektrumu



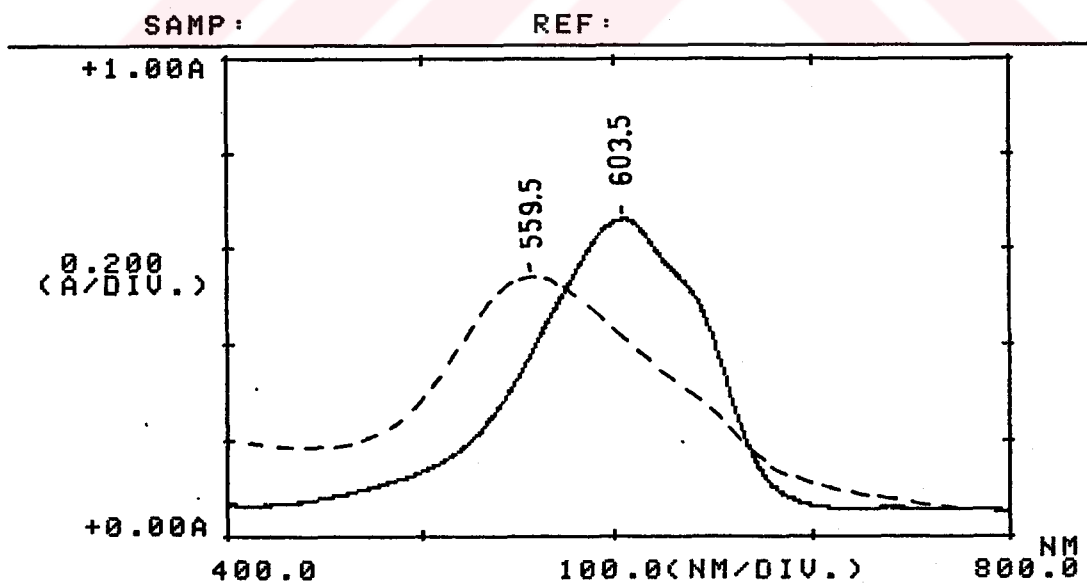
Şekil 3.16. Heparin Sigma grade I'in IR spektrumu

3.4. Metakromatik tayine ait bulgular

Bölüm 2.3.'de anlatıldığı gibi kullanılan boyaların ve boya-raparin çözeltilerinin UV spektrumları Şekil 3.17 ve 3.18'de verilmiştir.



Şekil 3.17. Azur A (————) ve Azur A-Raparin RH₅₀₀ Fr. I'in (-----) UV spektrumu

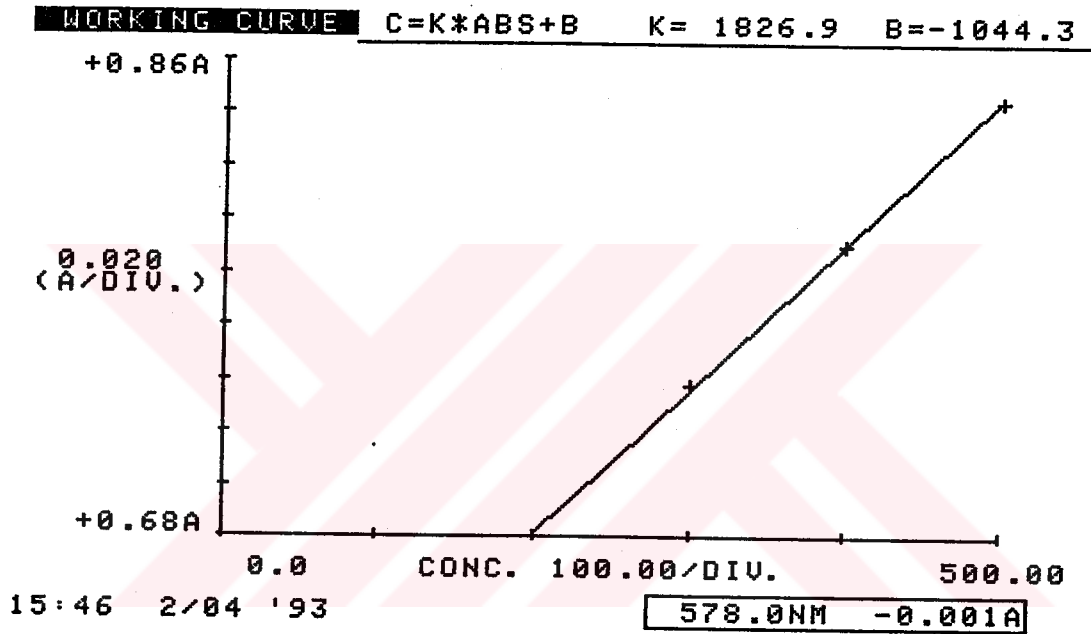


Şekil 3.18. Toluidin mavisi (————) ve Toluidin mavisi - Raparin RH₅₀₀ (-----) Fr. I'in UV spektrumu

Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon I'in farklı konsantasyonlarının Azur A ile komplekslerinin absorbansları UV spektrofotometrede 578.0 nm'de okundu. Elde edilen sonuçlara göre korelasyon katsayısı (r) ve doğru denklemi hesaplandı, kalibrasyon eğrisi Şekil 3.19'da gösterildi.

Kons. (mcg/ml)	Abs.
200.00	0.680
300.00	0.738
400.00	0.790
500.00	0.845

$$r = 0.9997, \quad y = 0.000547 x + 0.5718$$

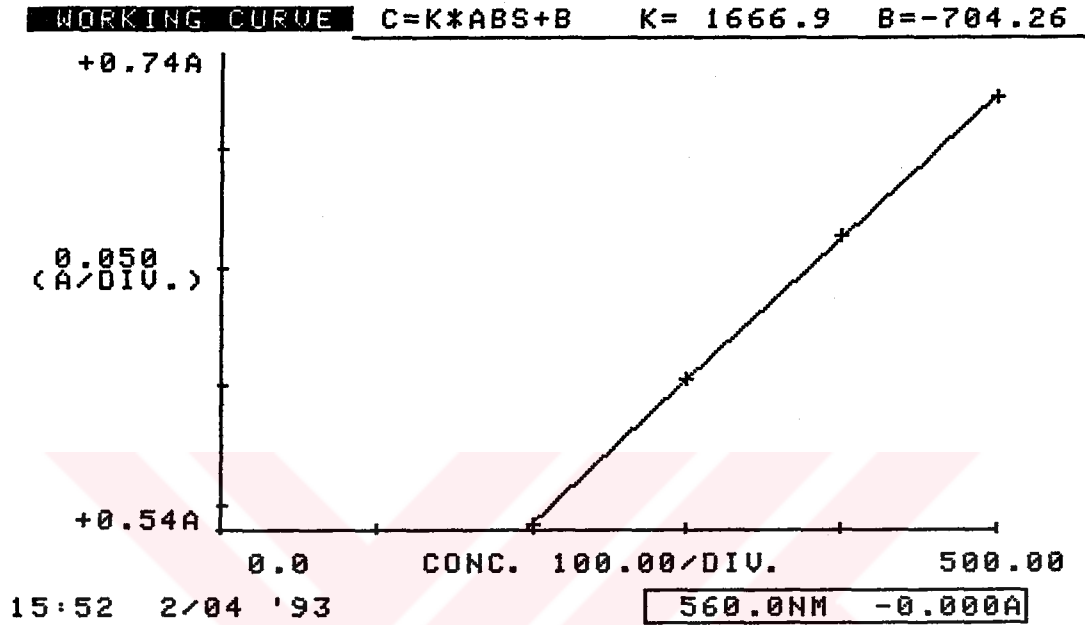


Şekil 3.19. Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon I'in Azur A ile metakromazisinde elde edilen kalibrasyon eğrisi

Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon I'in farklı konsantrasyonlarının Toluidin mavisi ile kompleksinin absorbansları UV spektrofotometrede 560.0 nm'de okundu. Elde edilen sonuçlara göre korelasyon katsayısı ve doğru denklemi hesaplandı, kalibrasyon eğrisi Şekil 3.20'de gösterildi.

Kons. (mcg/ml)	Abs.
200	0.542
300	0.603
400	0.663
500	0.772

$$r = 0.9999, \quad y = 0.0006 x + 0.4225$$



Şekil 3.20. Raparin RH₅₀₀ Fraksiyon I'in Toluidin mavisi ile metakromazisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi

Elde edilen raparin fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlarının Azur A, Toluidin mavisi ve Metilen mavisi ile kompleksinin maksimum dalga boyları Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.4. Raparin fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlarının Azur A ile kompleksinin maksimum dalga boyları

Raparin Fraksiyonları	Maksimum dalga boyları (nm)		
	50 mcg/1.2 ml	100 mcg/1.2 ml	200 mcg/1.2ml
RH ₅₀₀ Fr. I	622.5	621.0	579.0
RH ₅₀₀ Fr. II	622.5	622.5	621.5
RHP ₁₀ Fr. II	623.5	622.5	621.5
RKL ₁₀ Fr I	623.0	622.5	622.0
RKL ₁₀ Fr. II	622.5	622.5	621.5

Çizelge 3.5. Raparin fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlarının Toluidin mavisi ile kompleksinin maksimum dalga boyları

Raparin Fraksiyonları	Maksimum dalga boyları (nm)		
	50 mcg/1.2 ml	100 mcg/1.2 ml	200 mcg/1.2 ml
RH ₅₀₀ Fr. I	596.5	575.0	559.5
RH ₅₀₀ Fr. II	599.0	596.5	598.0
RHP ₁₀ Fr. II	600.5	599.5	599.5
RKL ₁₀ Fr. I	600.5	599.5	596.5
RKL ₁₀ Fr. II	599.5	600.0	599.0

Çizelge 3.6. Raparin fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlarının Metilen mavisi ile kompleksinin maksimum dalga boyları

Raparin Fraksiyonları	Maksimum dalga boyları (nm)		
	50 mcg/1.2 ml	100 mcg/1.2 ml	200 mcg/1.2 ml
RH ₅₀₀ Fr. I	664.5	664.5	664.5
RH ₅₀₀ Fr. II	664.5	664.0	664.0
RHP ₁₀ Fr. II	664.5	664.5	664.5
RKL ₁₀ Fr. I	664.5	664.5	664.0
RKL ₁₀ Fr. II	664.5	664.5	664.Q

3.5. Rekalsifikasyon deneylerinin bulguları

Bölüm 2.4. de belirtilen rekalsifikasyon deneylerinde elde edilen pıhtılaşma zamanları Çizelge 3.7'de verilmiştir. Raparin ilave edilmeden yapılan deneylerde (kontrol) pıhtılaşma zamanı 198 saniye olarak bulunmuştur. Yine aynı deney 0.25 U heparin sigma G I ile yapıldığında pıhtılaşma süresinin 385 saniyeye yükseldiği gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. Farklı konsantrasyonlardaki raparin fraksiyonlarının rekalsifikasyon zamanları

Raparin Fraksiyonları	Rekalsifikasyon zamanı (sn) Stok 500 mcg/ml			
	25 mcg	50 mcg	100 mcg	200 mcg
RH ₅₀₀ Fr. I	443.0	401.0	322.4	268.2
RH ₅₀₀ Fr. II	390.6	379.8	337.4	300.6
RHP ₁₀ Fr. II	454.0	378.6	308.2	237.8
RKL ₁₀ Fr. I	474.4	308.6	310.2	189.8
RKL ₁₀ Fr. II	470.2	393.0	291.4	207.0

Çizelge 3.7'de görüldüğü gibi değişik raparin fraksiyonlarının antikoagülan aktiviteye sahip olduğu tesbit edilmiştir.

3.6. Biyolojik metodlarla miktar tayinlerine ait bulgular

3.6.1. Heptest'inden elde edilen bulgular

Heptest 2.5.1'de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.8'de verilmiştir. Raparinsiz yapılan heptest sonucu pıhtılaşma süresi (kontrol) 20 saniye olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.8. Raparin ve fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki heptest sonucu pıhtılaşma zamanları

Raparinler ve Fraksiyonları	Pıhtılaşma zamanı (saniye)	
	25 mcg/ 25 µl	75 mcg/ 75 µl
RH ₅₀₀	20.0	40.0
RH ₅₀₀ Fr. I	19.8	39.0
RH ₅₀₀ Fr. II	21.0	38.2
RHP ₁₀	23.0	84.0
RHP ₁₀ Fr. II	21.0	48.0
RKL ₁₀	19.6	43.0
RKL ₁₀ Fr. I	19.2	33.8
RKL ₁₀ Fr. II	19.0	39.8

3.6.2. Hepaclot testinden elde edilen bulgular

Hepaclot testleri bölüm 2.5.2'de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.9'da verilmiştir. Raparinsiz yapılan Hepaclot testinde pıhtılaşma süresi (kontrol) 13.8 saniye olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.9.Raparin ve fraksiyonlarının Hepaclot testi sonucu elde edilen pıhtılaşma zamanları

<u>Raparinler ve Fraksiyonları</u>	<u>25 mcg / 25 µl'deki Pıhtılaşma zamanı (saniye)</u>
RH ₅₀₀	15.0
RH ₅₀₀ Fr. I	14.2
RH ₅₀₀ Fr. II	13.0
RHP ₁₀	14.0
RHP ₁₀ Fr. II	20.2
RKL ₁₀	14.0
RKL ₁₀ Fr. I	15.0
RKL ₁₀ Fr. II	15.2

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mukopolisakkaritler içinde en önemli yeri heparin tutmaktadır. Heparin domuz, öküz, koyun ve köpek dokularından elde edilmiştir (62). Heparinoid adı verilen ve heparine benzer aktiviteye sahip maddeler ise deniz hayvanlarından, *Stichopus Japonicus* (SJAMP) ve *Halotluria Leucospilota* (HLAMP)'dan elde edilmiştir (22, 23, 69). SJAMP ve HLAMP'den asidik mukopolisakkaritler izole edilmiştir. Bu iki deniz canlısı *Cucumber* (deniz hıyarı) sınıfına aittir. Bu elde edilen maddelerin molekül tartıları 30-50000 arasında olup yapısında galaktozamin, glukuronik asit, fukoz ve sülfat miktarının 1:1:1:4 olduğu saptanmıştır (69). SJAMP ve HLAMP üzerinde yapılan Partial Thromboplastin zamanı Trombin pıhtılaşma zamanı, Anti-Xa ve AT III testleri yapılmıştır. Ayrıca Platelet agregasyon testleri de uygulanmıştır. SJAMP ve HLAMP'inde thrombin zamanını uzattığı, Anti-Xa aktiviteyi yüksek konsantrasyonlarda dahi göstermediği, platelet agregasyonunu ise azalttığı saptanmıştır (69).

Raparin'in antikoagülan aktivitesi heptest metoduna göre 0.670 U/ml heparine ve hepaclot'ta 0.397 U/ml heparine denk olduğu saptanmıştır. Bu şekilde raparin'in potensinin 0.015-1 U/ml arasında değiştiği görülmüştür. Ayrıca anti-thrombin aktivitesi ve fibrinolitik aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir (32).

Bu çalışmada raparin'in elde edilmesinde kullanılan teknikler bazı değişikliklere uğratılmıştır. Ayrıca elde edilen raparin Sephadex G kolonunda fraksiyone edilmiştir. Sephadex G kolonu, keza heparin'in fraksiyonlandırılmasında da kullanılmıştır (37, 66, 18, 54). Burada da benzer teknikler uygulanmıştır. Fraksiyonlandırma sonucu RH₅₀₀'den iki fraksiyon elde edilmiştir. Birinci fraksiyonun, ikinciden daha zengin olduğu Şekil 1'deki kurbun durumundan anlaşılmaktadır. RH₅₀₀ ve fraksiyonlarının UV spektrumu 196.0 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği, bunun heparine uyduğu, RH₅₀₀ Fraksiyon II'de görülen omuzun heparin roth'un II. fraksiyonununkine benzediği görülmüştür

(6). IR spektrumunda ise RH₅₀₀ fraksiyon I'in RH₅₀₀'e uyduğu, RH₅₀₀ fraksiyon II'nin 1000 cm⁻¹'in altındaki kurbunun fraksiyon I'e benzemediği görülmüştür. RH₅₀₀ fraksiyon II yalnız 650 cm⁻¹'de küçük bir omuz vermiştir. Halbuki RH₅₀₀ ve RH₅₀₀ fraksiyon I 1000-500 cm⁻¹ arasında benzer omuzlar vermişlerdir.

Raparin RHP₁₀'dan da iki fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon I'in II'ye nazaran daha az madde içerdiği görülmüştür. Bunların UV spektrumları 193.0 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği, bunun ise heparin'in gösterdiği UV kurbuna denk olduğu görülmüştür. IR spektrumlarında ise 1800 ile 1100 cm⁻¹ arasında ve 1100 cm⁻¹'in altında farklılıklar görülmüştür. Raparin RHP₁₀'un IR spektrumu, RHP₁₀ fraksiyon II'ninkiyle aynıdır. Fraksiyon I belirgin bir spektrum vermemiştir. RHP₁₀ ve RHP₁₀ fraksiyon II'nin IR spektrumları heparin'inkine benzemektedir.

RKL₁₀'un Sephadex G ile fraksiyonlandırılması sonucu iki ana fraksiyon elde edilmiştir ve bu iki fraksiyonunda benzer zenginlikte olduğu görülmüştür. Bunların UV spektrumları ise 198, 204 ve 194 nm olarak saptanmıştır. Bu kurblar heparin roth ve heparin roth fraksiyon III'ün UV kurbuna benzemektedir (6). RKL₁₀ fraksiyon I'in IR spektrumu belirgin olarak heparin'in IR spektrumuna benzemektedir. RKL₁₀ fraksiyon I'in 1170, 1090, 1000 ve 590 cm⁻¹'lerde pikleri mevcuttur. RKL₁₀'da 1100 ve 610 cm⁻¹'lerde pik görülmüştür. RKL₁₀ fraksiyon II'de ise 1100, 950 ve 600 cm⁻¹'lerde pikler görülmüştür.

Metakromatik incelemede Azur A ve Toluidin mavisi ile yapılan tetkikte Azur A'nın maksimum absorbans verdiği dalga boyu 622.0 nm olmasına karşın, yalnız raparin RH₅₀₀ fraksiyon I bu dalga boyunu 578.0 nm'ye kaydırarak metakromazi göstermiştir. Aynı şekilde Toluidin mavisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 600.0 nm olmasına rağmen RH₅₀₀ fraksiyon I bu dalga boyunu 560.0 nm'ye kaydırarak metakromazi göstermiştir. Bu metakromatik bulgular koagülasyonla ilgili bulgularla farklılık göstermektedir. Buna göre yalnız RH₅₀₀'ün metakromatik yolla tayininin yapılabileceği görülmüştür. Metilen mavisi ile ise hiçbir raparin'de belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Rekalsifikasyon deneylerinde en yüksek aktivitenin 25 mcg'da olduğu tesbit edilmiştir. Bütün elde edilen raparin'ler ve bunların fraksiyonları antikoagülan aktivite göstermiştir. Rekalsifikasyon deneyinde en yüksek aktivite RKL₁₀ fraksiyon I'de görülmüştür.

Hepaclot deneyinde RHP₁₀ fraksiyon II'de aktivite görülmüştür. Heptest'te ise 75 mcg'lık konsantrasyonlarda, elde edilen raparin'lerin ve fraksiyonlarının hepsinde aktivite görülmüştür. En yüksek aktivite RHP₁₀'da gözlenmiştir. Rekalsifikasyon deneylerinde de RHP₁₀ fraksiyon II'de yine aktivite vardır.

Sonuç olarak elde edilen raparin'lerden RHP₁₀'un en yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Awe, W.; Studemann, K.D. : Paper chromatographic characterization of heparin, heparinoids and heparin like substances . *Arzneim.-Forsch.*, 6, 349 (1956)
2. Baker, S.P.: Heparin - activated clearing factor - standardized test, agewise application and clinical observations . *Circulation*, 14, 96 (1956). *Ibid.* 15, 889 (1957)
3. Bassiouni, M.: *J. Clin. Patho.*, 6, 39 (1953)
4. Bayer, J. : *J. Chromatog.*, 8, 117 (1962)
5. Bell, F.K. ; Kantz, J.C. : *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 39,94 (1950)
6. Bilaç, H.: Heparin Üzerinde Çalışmalar, Doktora Tezi (1988)
7. Bischel, M.D. ; Austin, J.H. ; Kemeny, M.D.; Hubble, C.M. ; Lear, R.K. : Sepn. and identification of acid polysaccharides by thin-layer chromatography .*J. Chromatog.*, 21, 40 (1966)
8. Blomback, B.; Blomback, M.; Corneliussen, E.V.; Jorpes, J.E.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 1031 (1953)
9. Brimacobe, J.S.; Webber, J.M.: *Mucopolysaccharides* Elsevier Publishing Company, Amsterdam, (1964)
10. British Pharmacopeia Volume I ., Heparin Calcium, Heparin Sodium. Published on the recommendation of the Medicines Commission, London Her Majesty's Stationery Office, p 220 (1980)
11. Burson, S.L. ; Fahrenbach, J.M. : Frommhagen, L.H. ; Riccardi, B.A.; Brown, R.A.; Brockman, J.A. ; Lewry, H.V. ; Stokstad, E.L.R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5874 (1956)
12. Castor, C.W.; Dorstewitz, E.L. : Identification of acid mucopolysaccharides by paper chromatography . *J. Chromatog.*, 13, 157 (1964)

13. Charles, A.F.; Scott,D.A.: Studies on heparin. I. The preparation of heparin . J. Biol. Chem. 102, 425 (1933)
14. Charles, A.F.; Scott, D.A. : Biochem. J. (London),30, 1927 (1936)
15. Cifonelli, C.A.: Structural studies on heparins with unusually high N - acetylglucosamine contents . Carbohydrate Research, 37, 145 (1974)
16. Coyne, E. : From heparin to heparin fractions and derivatives . Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Vol. 11(1), 10-12 (1985)
17. Çağlar, M.: Omurgasız Hayvanlar (Anatomi - Sistemik) II. kısım
İst.Üniv. Yayınları Sayı 712,Fen Fakültesi Yayınları Sayı 20
(1989)
18. Danielsson, A.; Björk, I.: Binding to antithrombin of heparin fractions with different molecular weight . Biochemical Journal, 193, 427 (1981)
19. Dole, V.P. : Relation between nonsteroidal fatty acids in plasma and the metabolism of glucose . J. Clin. Invest., 35, 150 (1956)
20. Duncombe, W.G. : Biochem. J. ,83, 6P (1962)
21. Ergenç, N.; Gürsoy, A.; Ateş, Ö.: İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini, IV. baskı, 137-138 (1989)
22. Fan, H.Z. ; Chen, J.D. ; Lin, K.Z. : Isolation of an acidic mucopolysaccharide from Stichopus Japonicus Selenka and some of its physical and chemical properties . Yao Hsueh Pao 15, 263 (1980) :C.A. 94, 52763 (1981)
23. Fan, H.Z. ; Chen, J.D. ; Lu, P. ; Hao, X.; Li, H.: Yaoxue Xucbao 18, 203 (1983) : C.A. 99, 19901 (1983)
24. Fareed, J. : Heparin, its fractions. fragments and derivatives . Seminars in Thrombos. Haemostas.,Vol.11/1,1 (1985)
25. Fischer, A.; Schmitz, A.; Heppe-Seyler's, Z.: Heparin as a growth inhibiting substance . Physiol. Chem., 216, 264,(1933)
26. Flodin, P.: J. Chromatog. 5, 103-115 (1961)

27. Gartnar, S.L.; Vahouny, G.V.: Myocardial metabolism. IV. metabolism of free and esterified cholesterol by the perfused rat heart and homogenates . Am. J. Physiol. 211, 1063 (1969)
28. Gordon, S.Jr.; Cherkes, A.; Gates, H.: Unesterified fatty acid in plasma (II) transport function of unesterified fatty acid . J. Clin. Invest.,36, 810 (1957)
29. Goth, A.; Tıbbi Farmakoloji Tercüme : Kaymakçalan, Ş.; Kayaalp, O.; Kıran, K.B. : Ankara Üniversitesi. Basımevi Yayını No: 251,464 (1971)
30. Graham, D.T.; Pomeroy, A.R.; Smythe, D.B.: Measurement of the heparin neutralizing capacity of protamine . Thromb. Haemostas.,42, 1598 (1979)
31. Güler, E.; Güven, K.C.: Correlation for the assay of heparin by metachromatic and recalcification time methods Acta Pharmaceutica Turcica Vol. XXX, 49-52 (1988)
32. Güven, K.C.; Özsoy, Y.; Öztürk, B.; Topaloğlu, B.; Ulutin, O.N.:Raparin a new heparinoid from Rapana venosa (Valenciennes) . Pharmazie ,46, H.7 ,547 (1991)
33. Güven. K.C.; Özsoy, Y.; Ulutin, O.N.: Anticoagulant , fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenus and alginic acid . Botanica Marina , vol. 34, 429-432 (1991)
34. Güven, K.C.; Arabacıoğlu, F.: Arzneim.-Forsch. 19,(1969)
35. Güven, K.C. ; Arabacıoğlu, F. ; Ertan, G. : Thin-layer chromatographic identification of heparin Eczacılık Bülteni, Vol. XVII, 76-80 (1975)
36. Güven, K.C.; Ertan, G.: The corralation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods III. vith night blue . Acta Pharm. Turcica vol. XXVI, 63 (1984)
37. Hall, M.; Ricketts, C.R.: J. Pharm. Pharmacol., 21, 626 (1969)
38. Hiyama, N.; Maki, M.; Miyazawa, Y.: Hirosaki Med. J., 7, 284 (1956) : C.A., 51,1398 (1957)
39. Howell, W.H.: Heparin an anticoagulant . Am. J. Physiol., 63, 434 (1922-23)

40. Howell, W.H.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 42, 199 (1928) ; Foster, A.B.;Huggard, A.J.: Heparin . Advances in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, New York, 10, 355 (1955)
41. Jalling, O.; Jorpes,J.E.; Linden, G.: J.Pharm. Pharmacol., 14, 1 (1941)
42. Jaques, L.B.: The reaction of heparin with proteins and complex bases . Biochem. J., 37, 189 (1943)
43. Jaques, L.B.; Napre, E.; Levy, W.: The metachromatic activity of urine following the injection of heparin Circulation Research Vol. 1, 321 (1933)
44. Jaques, L.B.; Charles, A.F.: Assay of heparin . Quart. J.Pharm. Pharmacol., 14, 1 (1941)
45. Jaques, L.B.; Kavanagh, L.W.; Mazurek, M.; Perlin, A.S.: Structure of heparin proton magnetic resonance spectarl observations . Biochem. Biohys. Res. Commun., 24/3, 447 (1966)
46. Kakkar, V.V.: Low dose heparin in the prevation of venous tromboembolisin : Rationale and results . Throm. Diath. Haem., 33, 87 (1974)
47. Kanta Pal, M.; Schubert, M.: Ultracentrifugal separation of the metachromatic compound of methylene blue and chondroitin sulfata J. Phys. Chem. 65, 872 (1961)
48. Kayaalp, O. : Rasyonel Tedavi Yönuinden Tibbi Farmakoloji, Cilt 2, 1025 (1982) Ulucan Matbaası Ankara
49. Kjems, H.; Wagner, H.: Acta Pharmacol., 4, 155 (1948)
50. Kuizenga, M.H.; Spaulding, L.: The preparation of the highly active barium salt of heparin and its fractionation into two chemically and biochemically different constituents . J. Biol. Chem. 148, 641 (1943)
51. Lasker, S.E. : The heterogeneity of heparin . Federation Proceeding, 36, 92-97 (1977)
52. Lathrop, K.A. ; Allen, J.G. : Ultraviolet absorption spectra of com. heparins . Am. Pharm. Assoc. Sci.Ed.,43,7,442 (1954)

53. Laurell, S.; Tibbling, G. : Colorimetric microdetn. of free fatty acids in plasma .
Clin. Chim. Acta, 16, 57 (1967)
54. Laurent, T.C.; Tengblad, A.; Thunberg, L.; Höök, M.; Lindah, U.: Diffusion of
macromolecules through compartments containing polysaccharides .
Biochem. J. , 175, 691 (1978)
55. Lee, J.; Berger, L.: Decamethylenediamine salt of heparin . U.S. Pat. 2, 561, 384
(July 24 1951) ; C.A., 45,10515 (1951)
56. Levy, S.W. : Heparin and blood lipides . Rev. Can. Biol., 17, 1 (1958)
57. Levy,S.W. : Plasma esterase and acid ribonuclease following the injection of heparin
in dogs . Can. J. Biochem., 46, 289 (1968)
58. Liberti, P.A.; Stivala, S.S.:Physicochem. studies of fractionated bovine heparin .
Arch. Biochem. Biophys., 119, 510 (1967)
59. Lison, L.: Arch. Biol.,46, 599 (1935)
60. Lupu, D.: Contributions a L'etude de L'anatomie Chez Rapana Thomasrana Crosse
1861 (Gastropoda, Muricidae, Rapaninae) de la mer Noire . Trav. Mus.
Hist.nat Gr. Antipa. Vol.XVIII,57-65 5 (1937)
61. MacIntosh, F.C.: Biochem. J., 35, 776 (1941)
62. Mc Lean, J. :The thromboplastic action of cephalin . Am. J. Physiol. 41, 250 (1916).
63. Molho, M.D. ; Molho-Lacroix, L. : The mode of action of 2 - phenyl -1, 3-
indandione, the seventh factor of coagulation . Compt. Rend., 235, 522
(1952)
64. O'Keefe, A.E.; Shannon, J.A. : Heparin preparations . U.S. Pat. 2, 552, 507 (May
15 1963) : C.A., 45, 6806 (1951)
65. Picard, J. : J. Chromatog., 7, 223 (1962)
66. Radoff, S.; Danishefsky, I.: High - activity heparin : Chain length, affinity for
antithrombin and anticoagulant activity . Arch. Biochem. Biophys. ,215,
163 (1982)
67. Remington's Pharm. Sciences 16'th Edition., p. 769 (1980)

68. Ringertz, N.R. ; Reichard, P.: Acta Chem.Scand., 14, 303 (1960)
69. Ruan, C.; Wu, Q.; Wang, Z.; Soria, J.; Soria, C.; Caen, J.P.: Med. J. Australia 144, HS 17 (1986)
70. Refn, I.; Vestergaard, L.: The titration of heparin with protamine . Scand. J.Clin. Lab. Invest., 6, 284 (1954) : C.A.; 49, 8362(1955)
71. Roseman. S.: Mucopolysaccharide metabolism . The American Journal of Medicine 26, 749 (1959)
72. Scott, D.A.; Charles, A.F.; Fischer, A.M.: Carbonic anhydrase .J. Biol. Chem. 144, 371 - 381 (1942)
73. Seip, F.W.; Carski, R.T.; Kramer, N.D.: Electromech. assay of heparin . J. Pharm. Sci., 56(10), 1304 (1967)
74. Sephadex- Gel Filtration in Theory and Practice, :Pharmacie Fine Chemicals (1966)
75. Studer, A.; Winterstein, A.: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 9, 6 (1950)
76. Sugisaka, N.; Petracek, F.C. : Rapid molecular size characterization of heparins by high pressure liquid chromatography . Federation Proceeding, 36, 89-92(1977)
77. Stacey, M.: Chem. Ind. (London) 52, 110 (1943): Advances in Carbohydrate Chemistry (Ed. M.L. Wolfrom), Academic Press, New York, 2, 161 (1946)
78. Szabo,I.; Kelentey, B.; Valyi-Nagy, T.: Arzneim.-Forsch., 13, 961(1963)
79. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü yayını. Seri B, yayın No 1,2-7(1990)
80. The United States Pharmacopeia XXI. United States Pharmaceutical Convention, Inc. p. 481(1980)
81. Toccaceli, N.: Chromatographic purification of heparin . U.S. Pat. 3, 099, 600 (Cl. 167-74) (July 30 1963) : C.A., 59, 11195 (1963)

82. Udupa, K.N.; Dunphy, J.E.: Effects of ascorbic acid on metachromasia in solns. of protein and acid polysaccharide . J. Histochem. Cytochem., 4, 448 (1956)
83. Walton, P.L. ; Ricketts, C.R. ; Bangham, D.R. : Heterogeneity of heparin . Brit. J. Haemat., 12, 310 (1966)
84. Wehrmacher, W.H.: Heparin fractions and derivatives . Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Vol. 11 (2), 218 (1985)
85. Weissman, N.; Carnes, H.; Rubin, P.S.; Fisher, J.: Metachromasy of toluidine blue induced by nucleic acids . J. Am. Chem. Soc. 74, 1423 (1952)
86. Wolfrom, M.L. ; Juliano, B.O. : Chondroitin sulfate modifications carboxyl - reduced chondroitin and chondrosine J. Am. Chem. Soc.,82, 2588 (1960)
87. Wolfrom, N.L.; Mc Neeley, W.H.: J. Am. Chem. Soc., 67, 748 (1945)
88. Yin, E.T.; Wessler, S.: Heparin - accelerated inhibition of activated Factor X by its natural plasma inhibitor . Biochim. Biophys. Acta, 201, 387 (1970)
89. Zelenin, A.V.; Stepanova, N.G.: Luminescent histochemistry of acid mucopolysaccharides Arkh. Anat. Cistol. Embriol., 54(2), 82 (1968) : C.A. 69, 640 (1968)

ÖZGEÇMİŞ

T.C. vatandaşı olan Lütfi GENÇ 1961 yılında Seyitgazi’de doğdu. İlk öğrenimini Ayvalı köyü ilkokulunda , orta öğrenimini Seyitgazi lisesinde tamamladıktan sonra 1984’te Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldu. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde kısa bir süre çalıştıktan sonra 1986 yılında I. Ordu ilaç deposunda Eczacı Asteğmen olarak vatani görevini tamamladı. Kasım 1986’da Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’da araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Şubat 1987’de Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’na araştırma görevlisi olarak naklen atandı. Aynı üniversitede eylül 1989’da Yüksek Lisansını tamamladı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Yabancı dili ingilizcedir.

Evli ve bir çocuk babasıdır

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ