



T.C  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİNERALLİ SULARIN VE SIĞIR JELATİNİNİN  
EKSTRENEK PIHTILAŞMA SİSTEMİNE ETKİSİ**

HATİCE ÖZER

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU

İSTANBUL  
2020



T.C  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİNERALLİ SULARIN VE SIĞIR JELATİNİNİN  
EKSTRENEK PIHTILAŞMA SİSTEMİNE ETKİSİ**

HATİCE ÖZER

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU

İSTANBUL  
2020

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, sabrını, özverisini ve engin deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik ve kişisel gelişimimde karşılaştığım tüm zorluklar karşısında her zaman yanımda olan, örnek aldığım çok kıymetli hocam İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ'ye ve tez çalışmam esnasında yardımını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Dr.Öğr. Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU'na bilgilerini benden esirgemeyen hocam sayın Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI'na, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş.Görevlileri Feyza BAYRAMOĞLU, Çağrı ÇAKICI ve Ünsal Veli ÜSTÜNDAĞ'a

İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü görevlileri Göknil ERBATU ÇELİK, Birgül BARDA, Esin YETKİN, Rabia CİNEL ve Gizem GULİZAR'a

Tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımını gördüğüm, hayatımın her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam İstanbul Esenyurt Üniversitesi Dr. Öğr. Üyesi Duygu VARDAĞLI'ya, Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji hocası Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül HOŞ'a,

Hayatımın her anında yardımına koşan ve manevi desteğini esirgemeyen hem yol arkadaşım hem de meslektaşım Merve TAYLAN'a ,

Yüksek lisan dönem arkadaşım yardımını esirgemeyen Gizem KELEÇOĞLU'na

Araştırmanın yapıldığı süre boyunca yardımlarını esirgemeyen Medipol Mega Hastanesi Biyokimya Laboratuvar bölümünde çalışan görevlilerine,

Büyük özveri ve fedakârlıklarla doğduğum günden bu günlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini, tükenmeyen hoşgörülerini, sonsuz sevgilerini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkürler dilerim.

# İÇİNDEKİLER

No

TEZ ONAYI FORMU .....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.. .....	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Hemostatik Sistem .....	6
4.2. K Vitaminine Bağlı Pıhtılaşma Faktörleri .....	22
4.3. Kollajenin Yapısı ve Özellikleri .....	31
4.4. Jelatinin Yapısı ve Özellikleri .....	33
4.4.1. Jelatinin Pıhtılaşma Sisteminde Etkisi.....	35
4.5. Minerallerin Pıhtılaşma Sistemindeki Etkisi .....	35
5. MATERYAL ve METOD .....	37
5.1.Kullanılan Kimyasal maddeler .....	37
5.2.Kullanılan Cihazlar.....	38
5.3. Protrombin Zamanı (PTZ) Testinin yapılışı.....	38
5.3.1. Protrombin Zamanı Testi İçin Kan Toplanması .....	39
5.3.2. Protrombin Zamanı Testi İçin Kuzu Akciğerinden Tromboplastin Hazırlanması .....	39
5.3.3. Protrombin Zamanı Testi İçin Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> ) Çözeltisinin Hazırlanması .....	40
5.3.4. Protrombin Zamanı (PTZ) Testinin Yapılışı .....	40
5.4. Sığır Jelatinin Çözeltisinin Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testi.....	41
5.5. Mineral Sularının Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testi .....	44
5.6. Sığır Jelatinin ve Mineral Suların Karışımlarının Kombinasyonların Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testin Ölçülmesi .....	45

5.7. Bradford Yöntemi ile Protein Ölçümü .....	47
5.8. Sığır Jelatininin Poliakrilamid (SDS-PAGE) İçin Örnek Hazırlanması.....	48
5.9. Tromboplastin SDS-PAGE İçin Örnek Hazırlanması.....	49
5.10. Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) İçin Jellerin Hazırlanması ve Yapılışı .....	50
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>54</b>
6.1. Tromboplastin (TF) Aktivitesinin PTZ Testi Değeri .....	54
6.2. Sığır Jelatinin PTZ Etkisi .....	55
6.3. Mineralli Suların Protrombin Zamanı (PTZ) Etkisi .....	56
6.4. Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonu ile PT Testin Değerlendirilmesi .....	58
6.5. Tromboplastin (DF) ve Sığır Jelatininin Poliakrilamid (SDS-PAGE ) Değerleri .....	62
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>73</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>10. ETİK KURULU ONAYI.....</b>	<b>81</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>84</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

ADP: Adenozin Difosfat

PTZ: Protrombin Zamanı Testi

aPTT: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı

FI: Fibrinojen

FII: Protrombin

FIII: Doku faktörü

FIV: Kalsiyum klorür

FV: Faktör V

FVII: Faktör VII

FVII : Faktör VIII

FIX: Faktör IX

FX: Faktör X

FXII: Faktör XII

FXIII: Faktör XIII

HMWK: Yüksek Mol Ağırlıklı Kininojen

PAI: Plazmin Aktivatör İnhibitörü

TrF3: Trombosit Faktör 3

SJ: Sığır Jelatini

MS: Mineralli Su

SF: Serum Fizyolojik

INR: International Normalization Ratio

DS: Distile Su

tPA: Doku Plazminojen Aktivatörü

GLY: Glisin

HYP: Hidroksiprolin

PRO: Prolin

CYS: Sistein

MET: Metiyonin

HIS: Histidin

$\mu$ L: Mikrolitre

mL: Mililitre

mg: Miligram

HCL: Hidroklorik Asit

BSA: Sığır Serum Albümini

SDS: Sodyum dodesil sülfat

APS: Amonyum persülfat

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

## **TABLolar LİSTESİ**

Tablo 4.1.1. Pıhtılaşma faktörleri ve Özellikleri

Tablo 4.1.2. Protrombin Zamanı Testinin Değişik İfadeleri

Tablo 4.2.1. Bazı Besinlerin K Vitamini Değerleri

Tablo 4.2.2. K vitaminine bağımlı proteinler

Tablo 4.2.3. K Vitaminine Bağımlı Pıhtılaşma Faktörlerinde Eksik Olan Durumlar

Tablo 4.2.4. K vitaminine Bağımlı Koagülasyon Proenzimlerinin Bazı Özellikleri

Tablo 4.3.1. Kollajenin gruplandırılması

Tablo 5.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 5.2.1. Çalışma Sürecinde Kullanılan Cihazlar

Tablo 5.3.4.1. Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Quick Metodu

Tablo 5.4.1. Sığır Jelatini Konsantrasyonları ve Miktarları

Tablo 5.4.2. Sığır Jelatini İlavesi ile PTZ Testi Protokolü

Tablo 5.5.1. Mineralli Suların Kalsiyum ve Potasyum miktarları

Tablo 5.5.2. Mineral Suların İlavesi ile PTZ Testi Protokolü

Tablo 5.6.2. Sığır Jelatini - Mineral Suları Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Testi Protokolü

Tablo 5.10.1. SDS-PAGE İçin Jel Miktarları

Tablo-6.1.1. Tromboplastin aktivitesinin PTZ Değeri

Tablo 6.2.1. Sığır Jelatininin SF'de Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Etkisi

Tablo 6.3.1. Mineralli Suların Protrombin Zamanı (PTZ) Etkisi

Tablo-6.4.1. Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Etkisi

Tablo 6.5.1. Bradford Yöntemi ile Doku Faktörü ve Sığır Jelatinin Protein Tayini



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Hemostatik Sistemin Özeti

Şekil 4.1.2. Trombosit aktivasyon oluşum aşaması

Şekil 4.1.3. Bir Transmembran Protein Olarak Doku Faktörü

Şekil 4.1.4. Fibrinoliz sisteminde aktivatör ve inhibitör etkileri

Şekil 4.1.5. Protrombin zamanı testinde gerçekleşen reaksiyonlar

Şekil 4.1.6. Klinikte kullanılan bazı pıhtılaşma testleri

Şekil 4.2.1. K vitaminin yapısal formları

Şekil 4.2.2. K vitaminin aktive ve inhibe eden reaksiyon ve enzimler

Şekil 4.2.3. K vitamini karboksilasyonun kimyasal yapısı

Şekil 4.2.4. K Vitaminine Bağlı Pıhtılaşma Faktörleri Aktivasyonu ve İnaktivasyonu

Şekil 4.3.1. Kollajen Proteinin Moleküler Yapısı

Şekil 4.3.2. Kollajende moleküler düzeyde çapraz bağların görünümü

Şekil 4.4.1. Kollajen ve Jelatinin Biyopolimer Oluşumu

Şekil 5.7.1. Bovin Serum Albümin (BSA) Standart Eğirisi

Şekil 6.2.1. Sığır Jelatinin SF'de Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Etkisi

Şekil 6.3.1. Mineralli Suların PT Testi Değerler Grafiği

Şekil 6.4.1. Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Grafiği

Şekil 6.4.2. Mineralli Su-SJ Karışımları ve Mineralli Su Numunelerinin Protrombin Zamanına Etkilerinin Karşılaştırma

## **RESİMLER LİSTESİ**

Resim 4.1.1. Damar duvarı tabakaları

Resim 5.3.2.1. Tromboplastinin alikodlanmış görünümü

Resim 5.4.1. Sığır Jelatini

Resim 5.4.2. Jelatinin tartımı ve çözündürme görüntüleri

Resim 5.4.3. Fibrin oluşumu

Resim 5.9.1. Tromboplastinin ekstraksiyon görünümü

Resim 5.10.1. Elektroforez güç kaynağı ve cam aparatı

Resim 6.5.1. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

## 1.ÖZET

### MİNERALLİ SULARIN VE SIĞIR JELATİNİNİN EKSTRENEK PIHTILAŞMA SİSTEMİNE ETKİSİ

Ekstrenek pıhtılaşma sisteminde bazı proteinlere postranslasyonel modifikasyonla karboksil grubu bağlanır. Bu reaksiyon için K vitamini gereklidir. Çünkü karboksilazların koenzimi K vitaminidir. 1990' lü yılların başından beri bilinen bu mekanizma tromboza bağlı MI, serebrovaskuler, periferel damar hastalığı olan kişilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tedavinin amacı K vitaminini baskılayarak pıhtı oluşumunu, kanamaya sebebiyet vermeden engellemektir. Tedavide kullanılan ilaçların doz ayarı ekstrenek pıhtılaşma sisteminin göstergesi olan protrombin zamanı testi(PTZ) ile takip edilir. Tedavinin etkinliğinde diyet önemlidir. Bu çalışmada; kandaki kalsiyum iyonunun pıhtılaşma sisteminde etkisini dikkate alarak, ayrıca jelatinle yapılmış pıhtılaşma ile ilgili çeşitli çalışmalar incelenerek mineralli suların ve jelatinin ekstrenek pıhtılaşma zamanına etkisini araştırmayı amaçladık.

PTZ testi için gerekli olan doku faktörü kuzu akciğerinden elde edildi. Plazmaya ilave edilen mineralli sular ve sığır jelatininin etkisi Quick metodu ile ölçülen PTZ testi ile değerlendirildi. Sığır jelatini konsantrasyonu arttıkça pıhtılaşma arttı. Jelatin konsantrasyonlarından %1 ile %2,5 arasında pıhtı oluşumunun en yüksek düzeyde olduğu görüldü. 13 farklı mineralli su kullanıldı. 5'inin pıhtı oluşumunun kısalttığını diğerlerinin ise pıhtı oluşumunu geciktirdiği görüldü. Mineralli su ve sığır jelatini karışım kombinasyonunda PTZ etkisinde MS5 suyun pıhtı oluşumunda sinerjst etki görüldü, diğer mineralli sular ise pıhtı oluşumunda antagonist etki gösterdi. SPSS spearman kolerasyon analizinde mineralli suların PTZ etkisi ile kalsiyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Mineralli su-jelatin kombinasyonu ile pıhtı oluşumu yönünden potasyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Ayrıca DF ve jelatinin protein bantlarının molekül ağırlıklarının SDS PAGE'de 220 ile 45 kDa arasında olduğu görüldü. Sonuç olarak; in vitro şartlarda ekstrenek pıhtılaşma sistemi ile ilgili yapılan bu çalışmanın, in vivo yapılacak çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** PTZ, sığır jelatini, mineralli sular, K vitamini

## **2. ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF MINERALIZED WATER AND BOVINE GELATINE ON EXTRINSIC COAGULATION SYSTEM**

In extrinsic coagulation system carboxyl group is attached to proteins with posttranslational modifications. For this reaction vitamin K is necessary. Because the coenzyme of carboxylases is vitamin K. Known since the early 1990's this mechanism has been used for the treatment of patients with MI related with thrombosis, cerebrovascular, peripheral vascular disease. The aim of this treatment by suppressing vitamin K is to prevent clot formation without causing bleeding. The dosage adjustment of drugs used in the treatment is followed by the prothrombin time test (PTZ) which is the indication of extrinsic coagulation system. Diet is important in the effectiveness of treatment. In this research we aimed to search the effect of mineral waters and beef gelatin to extrinsic coagulation time by considering the effect of calcium ion in blood in the coagulation system.

Tissue factor required for PTZ test derived from lamb lung. The effect of mineral water and bovine gelatin added to plasma was evaluated by PTZ test measured by quick method. As the concentration of bovine gelatin increased, the coagulation increased. In gelatin concentrations between %1 and %2,5 clot formation was observed to be the highest. 13 different mineral waters were used. 5 of them were observed to shorten the clot formation and the others delay the clot formation. In the combination of mineral water and bovine gelatin under the PTZ effect the synergist effect of MS5 water was observed in clot formation. Other mineral waters showed an antagonistic effect to the clot formation. In the analyses of SPSS spearman correlation and calcium amount in the mineral waters with the effect of PTZ no significant relation was found. A significant relation found between mineral water-gelatin combination and potassium amount in terms of clot formation. ( $p < 0,05$ ). Besides DF and molecular weights of gelatin protein bands was observed in SDS PAGE between 220 and 45 kDa. As a result we think that this research which was about extrinsic clot formation in vitro conditions has the quality to shed light to the researches in vivo conditions.

**Key Words:** PTZ, bovine gelatin, mineral water, vitamin K

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemostatik sistem, sağlıklı bir yaşam için normal çalışması gereken fizyolojik bir olaydır. Hemostaz, en kısa şekilde kanamanın durdurulması olarak tanımlanır. Damarlarda veya dokularda oluşan bir yara veya kanama pıhtılaşma sisteminde bazı reaksiyonların olmasına ve vücudun kanamaya karşı pıhtı üretmesine sebep olur. Böylece yaralanmış bölge onarılmış olur ve yaralanmış damar çeperinin sağlamlığını kaybetmemesi amacıyla yaralanmadan önce oluşturulan pıhtı, fibrinolitik mekanizma ile parçalanmaya başlar. Günümüzde doku faktörü (DF)' nün koagülasyon sisteminin her basamağında etkili olduğu da kabul edilmektedir (1,2,3,5).

Koagülasyon veya kan pıhtılaşma olayı, doku hasarına karşı oluşan hızlı bir yanıttır. Hemostaz, damar hasarı sonucunda kanamayı durdurmak için fibrin ağının oluşumunu düzenleyen plazmadaki pıhtılaşma proteinlerinin koagülasyon kaskadıdır ve ana başlangıcı olan doku faktörü (tromboplastin) hemostaz, tromboz, anjiyogenez, kanser ve bağışıklıkta hayati rol oynar. Pıhtılaşma sisteminde trombin ve kollajen güçlü ajanlardır. Trombin ve kollajen aktive olduğunda trombositler uyarılır ve membrandan fosfolipidlerinin dışa doğru yönelmesine yol açar ve bu da koagülasyon faktörlerinin etkin bir şekilde bağlanmasını sağlar. Serin proteaz faktörler, intrinsek yolda enzimatik komplekslerinde kritik rol oynar. Hemostatik sistemde K vitamini kofaktör görevi yapar. K vitaminine bağlı pıhtılaşma proteinlerinde bulunan glutamik asite bir karboksil grubu bağlayarak gama-karboksiglutamik asit meydana gelir. Pıhtılaşmanın artışı ile birlikte bu bağlanma, pıhtılaşma faktörlerinin plazma inhibitörlerinden korunması için önemlidir. (4,6,7).

K vitamini, bazı pıhtılaşma proteinlerin karboksilasyonundan sorumludur. Genellikle koagülasyon üzerinde önemli bir röle sahip olan K vitamininin günümüzde kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve glisemik vb. hastalıklarla ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca K vitamini antagonistleri arasından yer alan varfarin (kumadin) bilişsel fonksiyon üzerine etkilerinin olduğu düşünülmektedir.(64).

Diyet posası; pıhtılaşma gibi kardiyovasküler risk faktörlerini etkilemektedir.. Fazla posa alımı gastrointestinal şikayetlere ve çeşitli minerallerin emilim bozukluklarına neden olabilir. Çözünür posa olan psilyum ise varfarin gibi ilaçların emilimini azaltabilmektedir (65). Aynı zamanda kronik hastalıkların tedavisinde kullanılan ilacaların vitamin düzeylerini etkilemektedir. Varfarin (kumarin) gibi ilaçların K vitamini işlevini inhibe etmektedir. Çünkü, gereğinden fazla K vitamini alımı kumarinlerin antikoagülan etkisini Gla-karboksilasyonunu sağlayarak engel olmaktadır. Bu yüzden varfarin gibi ilaçların doz ayarı önemlidir ve besinler arasında da gözlenebilen etkileşimler klinik olarak önem arz eder.( 66).

Minerali sular, yerkabuğunun çeşitli derinliklerinden teknik usullerle çıkarılan, mineral içeriği, kalıntı elementler ve diğer bileşenleri ile tanımlanan, her türlü kirlenme riskine karşı korunmuş, mikrobiyolojik yönden uygun olan su olarak tanımlanır. Uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca; suların kimyasal bileşenleri, yeraltındaki kayaçların formasyonları hakkında bilgi edinebilme olanağı da sağlamaktadır. Minerali sular saf su niteliği taşımamaktadır. Bu mineral ve elementlerin bir kısmı, beslenme fizyolojisinde önemli yere sahiptir. Türkiye'de minerali sular maden suyu olarak geleneksel adıyla bilinmektedir ve özellikle mide, bağırsak ve kardiyovasküler hastalıklarda iyileştirici olarak faydalanılmaktadır. Bikarbonat, sülfat, klorür, florür, magnezyum, sodyum, kalsiyum, potasyum ve demir gibi mineralleri intiva eden su, önemli bir besin ögesidir. Vücutta birçok fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli rol oynayan minerallerin günlük ihtiyacının karşılanmasında minerali sular önem arz eder (15,67).

Jelatin, sığır, koyun, keçi ve domuz gibi hayvanların bağ dokularından ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajenin kısmi hidrolizi ile üretilen, yapısal olarak geri dönüşümsüz saf bir proteindir. Üretim öncesi kollajen olmayan materyallerden temizlenen deri ve kemikler, asit veya alkali muamelesi sonrası sulu ortamda ısıtılıp işleme tabi tutulur ve bulunduğu ortamdan ekstrakte edilerek saflaştırılır. Bu işleme moleküller arasındaki H bağları ve diğer çapraz bağlar zayıfladığı gibi bazı amino asitler arasındaki kovalent bağlar da kopar ve daha küçük moleküllü yapılar ortaya çıkar. Böylece, ortalama 300 - 350 kDa olan kollojen molekülünün ağırlığı, jelatinde

10 - 65 kDa'a kadar düşmektedir. Jelatinin protein içeriği %85 – 92 arasında değişir. Jelatin çok yönlü özelliğinden ötürü birçok alanda yer almaktadır. Eklem kırık doku mühendisliğinde, jelatinin fibrin yapıştırıcılara eklenerek in vitro kırık doku rejenerasyonun geliştirmesi açısından umut verici olduğu kanıtlanmıştır (16,17,18,19).

Hemostaz sisteminde aşırı kanamalar, ölüm nedeni olabilmektedir. Aşırı kan kaybının azaltılması birinci önceliktir. Geçmiş yıllarda ve günümüzde kullanılabilirliği halen sürdürülen kanama komplikasyonlarını azaltmak adına jelatin içeren hemostatik ajanlar kullanılmaktadır. Bu hemostatik ajanlar aynı zamanda iyi biyouyumluluğa sahip, kullanıma hazır, hafif olması aynı zamanda ekonomik olarak ucuz olması açısından da tercih edilmektedir (19,20,21).

Birçok hemostatik ajanlar bulunmaktadır. Travma sonrası kanamalarda tedavi amaçlı trombin içerikli hemostatik ajan kullanılmaktadır. Bir biyoterapötik olarak trombinin kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir ve olumsuz reaksiyonlarla ilgili önemli sayıda rapora rağmen sığır ürünü hemostatik bir ajan olarak kullanılmaya devam etmektedir (22).

Bu çalışmanın amacı; kandaki kalsiyum iyonunun ve kollajenin hemostatik sistemdeki önemini dikkate alarak, mineralli suların ve kollajenden üretilen jelatinin ekstremsel pıhtılaşma zamanına etkisini incelemektir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Hemostatik Sistem

Endotel hücreleri ile kaplı damarlarda dolaşan kan pıhtılaşmaz. Endotel hücrelerinden pek çok kimyasal maddeler salınarak çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar ile birlikte dolaşan kanın pıhtılaşmasına engel olur. Kan, endotel dışında kesici veya sivri bir aletle karşılaştığında hemen pıhtılaşır. Dolaşan kanda mikro düzeyde dahi bir pıhtı olması, kılcal damarları tıkararak ilgili organın hem oksijenlenmesini hem de beslenmesini engelleyecek şekilde hayati tehlike oluşturacaktır. Bu fizyolojik olaylar sistematik olarak çeşitli bölümler arasındaki biyokimyasal dengenin iyi işlenmesine bağlıdır. Bu sistemin tümüne hemostaz adı verilir (1-7).

Hemostaz sistemindeki mekanizmanın temeli 1892' de Alexander Schmidt ve 1904'de Morawitz tarafından atılmıştır. O tarihlerde pıhtılaşma ile ilgili bilgiler, ekstresek sisteminin baş aktörü olan doku faktörünün kalsiyum iyonu varlığında protrombini trombine dönüştürmesi, trombinin de fibrinojeni fibrine dönüştürmesi şeklindeydi. Bu bilgiler günümüz için de geçerli olan bilgilerdir. Trombin 1845 yılında Buchanan tarafından tanımlanmıştır (3).

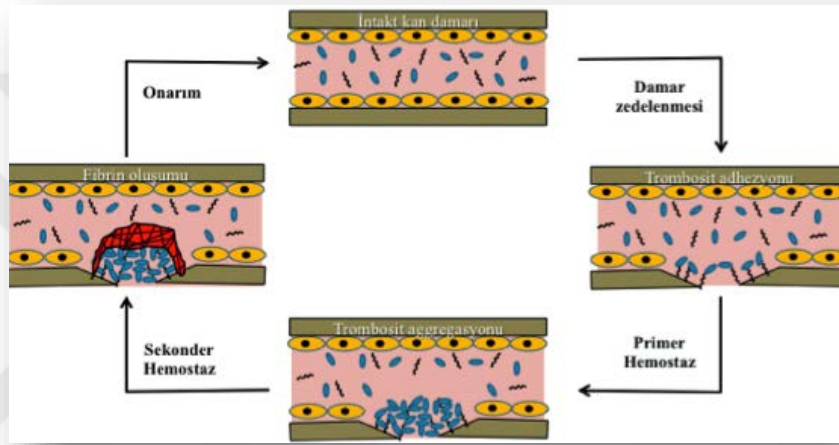
1900' lü yılları takip eden uzun bir süreçte pıhtılaşma mekanizmasındaki gelişmeler, doku faktörü yani ekstresek sistem merkezli olmuştur. 1904 yılındaki bulgular günümüzde halen geçerliliğini korumaktadır. Altın standart olarak kabul edilen protrombin zamanı testi (PT), teşhis ve tedavide kullanılmaktadır. 1947'de Owren, pıhtının oluşması için Faktör V' nin gerekli olduğunu bildirmiştir. Daha sonra diğer pıhtılaşma proteinlerini takip etmiştir. Pıhtılaşma sisteminde, protrombinin trombine dönüşümü ile ilgili çalışmalar 1905-1950 yılları arasında yoğun gelişmeler sağlanmıştır. Bugünkü pıhtılaşma kaskadının oluşturulması 1964' te Davie ve Ratnoff tarafından gerçekleştirilmiştir (8,10).



Hemostaz birbirini takip edep dört aşamadan geçerek, kanayan bölgede pıhtı oluşup kanamanın durmasını ve fibrinolitik sistemle pıhtının eritilerek o bölgedeki kan akışının normale dönmesidir. Bu aşamalar şu şekildedir;

- ✚ Damar sistemi
- ✚ Trombositler sistem
- ✚ Koagülasyon sistemi
- ✚ Fibrinolitik sistem

Bu aşamaların in vivo gerçekleşmesi Şekil 4.1.1.'de görülmektedir.



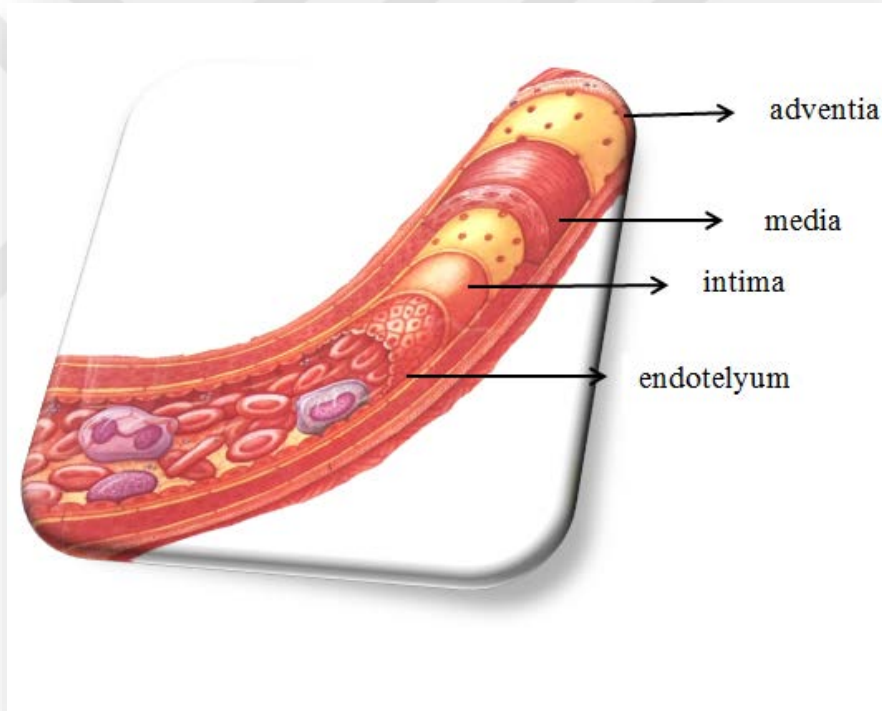
Şekil 4.1.1. Hemostatik Sistemin Özeti (32).

Koagülasyon mekanizması intrinsek yol, ekstrinsek yol ve ortak yol olmak üzere üç basamaktan oluşur. İntrinsik yol, yavaş ve önemli basamaktır. Ekstrensel yol, hızlı ve erken aktive olan basamaktır ve ayrıca koagülasyon sistemini başlatır. Çünkü, damar duvarı ve dokuların hasar veya travmaya uğramasıyla başlar, intrinsek yol ise kanın kendi içinde başlar. Son basamak ise ekstrinsek ve intrinsek yolağın birleşimi olan ortak yol fibrin yapımı için gerekli yoldur (Şekil 4.1.1.).

Hemostatik sistem, kanama ve pıhtılaşmayı içine alan bir kavram olup fizyolojik bir olaydır. Yukarıdaki belirtilen aşamalarda bulunan kimyasal reaksiyonların ürünleri biyokimyasal olarak ölçülebildiği için kanama ve pıhtılaşma ile seyredilen hastalıkların tanısında ve tedavinin yönlendirilmesinde iyi bir araçtır.

## Vasküler Sistem

Vasküler sistem hemostazın ilk aşamasıdır. Endotel hücreler hasar gördüğünde kanın dışarı akmaması, endotelden salınan kimyasallar ile damar daralır. Böylece endotel hücreler damar duvarı ve kan arasında dinamik olarak görev alır. Eğer bu dinamik bağı bozulursa tromboza meyil artar. Endotel hücreleri, damarları saran ve subendotel üzerine yerleşen, non trombojenik olan çok özel hücrelerdir. Bu yüzden dolaşan kan pıhtılaşmaz. Çünkü endotel hücreler, plazma ve kanın hücresel elementleri ile reaksiyona girmezler. Subendotelin görevi kanın pıhtılaşması için doku faktörü (FIII), kollajen gibi moleküllerle temas etmesi gerekir.



**Resim 4.1.1.** Damar duvarı tabakaları (3)

Damar duvarı intima, media ve adventia olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır (Resim 4.1.1.). Endotel hücreler ince bir tabaka yapısı olarak damarın içini kaplayan çok özellikli hücrelerdir.

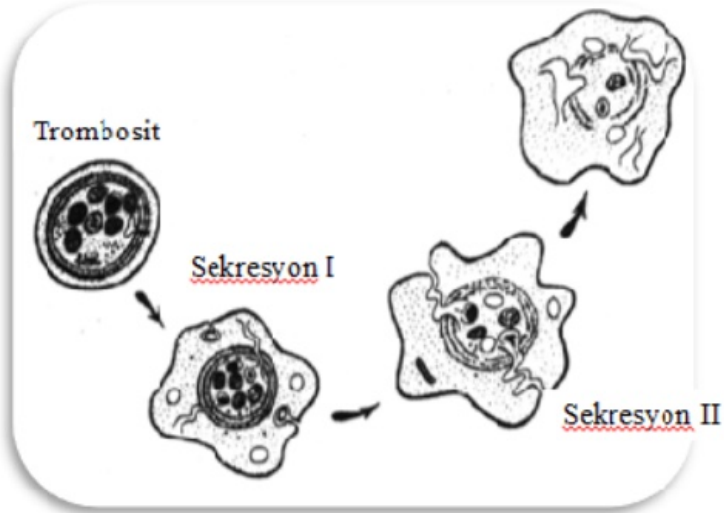
Vazokonstriksiyon işlemi trombositlerin içinde bulunan serotonin ve damar içindeki serotonin yani 5-hidroksi triptamin trombosit membranından salınan tromboksan A2 (TXA2) ile beraber vazokonstriksiyon işlemi gerçekleşip daha sonra trombosit tıkaçı ve pıhtı için fibrin oluşumu ile devam eder. Kısacası, travma veya damar hasarı sonrası 1-2 saniye içinde zedelenen damarda kasların kasılmasına vazokonstriksiyon denir.

### **Trombositler Sistem**

Endotel hücreleri kanın pıhtılaşması için pek çok maddeler sentezler ve bunlar arasında denge oluşturur. Aktivatör ve inhibitör etki gösteren bu maddeler endotel hücrelerin permeabilitesi için histamin, serotonin, bradikinin gibi maddelere bağlıdır. Vazokonstriksiyon işleminde serotonin trombositlerden salınır ve böylece trombositlerin agregasyonu safhasına geçilir. Trombositler primer hemostaz yani kanın pıhtılaşmasını başlatan sekonder hemoztazın safhası olan intrensek yolağı başlatan kan proteindir. Trombositler bu safhada adezyon (yapışma), sekresyon (salgılama) ve agregasyon (kümeleşme) gibi fonksiyonlarda yer alır. Amaç burada hasarlı bölgeyi trombosit tıkaçı oluşturarak ilk pıhtıyı yani gevşek pıhtıyı oluşturmaktır. Endotel hasarında adezyon olan trombositlerden adenosin difosfat (ADP), serotonin, tromboksan A2, trombosit faktör 4 (TrF4) oluşan PDGF (büyüme faktörü) sekresyona (salınarak) uğrayıp trombositleri sorunlu bölgeye çeker (3,23).

Trombositlerin endotele adezyonu yani yapışması kollajen, vWF açığa çıkmasıyla oluşur. Ayrıca GPIb reseptörü trombositlerin adezyonunda primer olarak görev alır. Trombositlerin uyarılmasıyla membranda fosfolipaz enzimiyle araşidonik asitten tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sentezlenir ve trombosit agregasyonuna neden olur.

Trombositler agregasyonda birbirlerine yapışırlar. Trombosit membranında bulunan bazı maddeler (agonistler) glukoproteinlere bağlanarak trombosit agregasyonunu ve ileri aktivasyonunu gerçekleştirirler. Trombositler endotel dışı yüzeyle temas eder ve aktifleşir. Aktifleşen trombositler daha sonra sekresyona uğrar ve agregasyonla trombosit tıkaçı yapar ve bu olaya primer hemostaz denir(Şekil 4.1.2).



**Şekil 4.1.2.** Trombosit aktivasyon oluşum aşaması (23).

### **Koagülasyon Kaskadı**

Koagülasyon mekanizmasında bütünlüğünü sağlayan yollardan biri de sekonder hemostazdır. Buna gerçek pıhtı veya kalıcı pıhtı da denilebilir. Bu aşamada kanda bulunan pıhtılaşma faktörlerinin bulunmakta ve üç yoldan geçmektedir. Koagülasyon (pıhtılaşma) kaskatında pıhtılaşma faktörleri bulunur ve faktör (F) olarak isimlendirilir. Pıhtılaşma faktörleri bulunuş sırasında göre numaralandırılır. Romen rakamı ile gösterilmektedir (Tablo 4.1.1.)

**Tablo 4.1.1. Pıhtılaşma faktörleri ve Özellikleri (3)**

NO	ADI	YAPISI	FONKSİYONLARI
<b>F I</b>	Fibrinojen	Plazma proteini	Ortak yol, fibrin öncüsü, pıhtı oluşturur
<b>F II</b>	Protrombin	Vit. K bağımlı serin proteazı	Ortak yol, trombin öncüsü, IIa,I,V,VII,VIII,XI,XIII, Protein C ve trombositleri aktifleştirir
<b>F III</b>	Doku Faktörü tromboplastin	lipoprotein	Ekstresek yol, VIIa'nın kofaktörü
<b>F IV</b>	Kalsiyum	İyon	Pıh. fak.lerinin fosfolipidlere bağlanması, intrinsek yolun ilk iki basamağı dışındaki tüm reaksiyonların başlatılması, hızlandırılması, K vit. bağımlı faktörlerin aktivasyonu
<b>F V</b>	Proakselerin Labil Faktör	Seruloplazmin benzeri protein	Ortak yol, X'un kofaktörü, protrombinaz kompleksini oluşturur
<b>F VII</b>	Prokonvertin-Otoprotrombin I	Vit k bağımlı serin proteaz	Ekstresek yol, proenzim, IX ve X'nu aktifleştirir
<b>F VIII</b>	Antihemofilik faktör A	Seruplazmin benzeri protein	İntrensek yol, IX'un kofaktörü, tenaz kompleksini oluşturur
<b>F IX</b>	Chiristmas Faktör-Antihemofilik faktör B- Otoprotrombin II	Vit k. Bağımlı serin proteaz	İntrensek yol, proenzim, X'nu aktifleştirir, VIII'le tenaz kompleksini oluşturur
<b>F X</b>	Stuart-Power Faktör-Otoprotrombin III	Vit k. Bağımlı serin proteaz	Ortak yol, proenzim, II'yi aktifleştirir, V'le protrombinaz kompleksini oluşturur
<b>F XI</b>	Antihemofilik Faktör C	Serin proteaz öncüsü	İntrensek yol, proenzim, IX'u aktifleştirir
<b>F XII</b>	Hageman Faktör	Serin proteaz	İntrensek yol, proenzim, faktör XI,VII ve prekallikrein'i aktifleştirir
<b>F XIII</b>	Fibrin Stabilize Edici Faktör FSF	Transglutaminaz	Ortak yol, proenzim, fibrin monomerlerini fibrin polimerlerine dönüşümü, fibrinin çapraz bağlanması
	Von Willebrand Faktör (vWF)	Multimerik yapıda protein	Trombosit adezyonu,VIII'e ve subendoteldeki kollajene bağlanma, FVIIIc için taşıyıcı protei
	Prekallikrein, Fletcher Faktör	Serin proteaz	Enzim, XII ve prekallikrein'i aktifleştirir, HMWK'yı böler
	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen (HMWK)	Bağlanma proteini	Kofaktör, XII, XI ve prekallikrein'in karşılıklı aktivasyonu

Pıhtılaşma proteinlerinde özel adlandırma da bulunur. Özellikle kanama bozukluğunda (kanama diyatezi) belli eden ilk hastalıkların isimleridir. İlk bulunan pıhtılaşma proteini faktör I (FI) fibrinojendir. Daha sonra protrombin (FII) yani faktörII keşfedilmiştir. Trombositlerden sentezlenen faktörler ise romen rakamıyla değil normal sayı ile gösterilir. Örneğin, trombosit faktör 3 (Tr F3) şeklinde pıhtılaşma sisteminde görev alır (3,7).

Pıhtılaşma sistemi oral antikoagülan kullanan hastaların takibi için kullanılan PTZ testi ile kontrol edilen ekstrensek sistem ve heparin kullanan hastaların takibi için kullanılan APTT testi ile kontrol edilen intrinsek sistem olarak iki şekilde incelenir. İntrensek ve ekstrensek sistem FX aktivasyonundan itibaren ortak yol olarak devam eder. Aşağıda bu yollar kısaca özetlenmiştir:

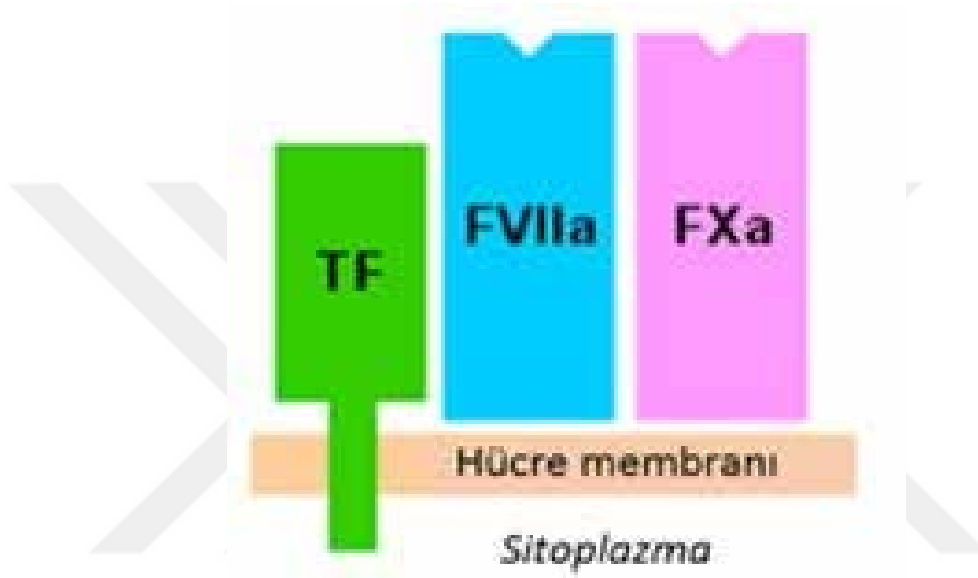
### **Ekstrensek Yol**

Ekstrensek yol, endotel hücre yabancı yüzeyle karşılaşır ve doku faktörü (DF) tarafından başlayıp erken aktive olur. Doku faktörü (DF) diğer adı tromboplastin de denilmektedir. Hücre hasarı sonrası DF kandan dokulara sızabilmektedir. Böylece koagülasyon (pıhtılaşma) sistemindeki ekstrensek yol başlatılır. Doku faktörü endotel hasarı sonrası dokularda, trombositlerde ve monosit/makrofajlar tarafından da sentezlenmektedir. Aynı zamanda DF, ekstrensel yolda fosfolipitler ile önemli bir proteolitik enzim içeren bir lipoprotein kompleksidir. Bu yolda Faktör VII (F VII) bulunur ve DF ile aktifleşerek (FVIIa)  $Ca^{++}$  iyonu varlığında ekstrensek sistemin kompleksi oluşturur. Doku faktörü hem direkt olarak, hem de indirekt FIX'u aktive ederek FX'u FXa'ya dönüştürür yani aktifleştirir. Bundan sonraki kısım intrinsek ile ortak yolla koagülasyon kaskadı devam eder. Aktifleşmiş Faktör X, ortamdaki fosfolipitlerle birlikte FV ile birleşerek protrombin aktivatörü adı kompleksi oluşturur ve protrombinin (FII) trombine (FIIa) dönüşümü sağlar (Şekil 4.1.3.).

Doku Faktörü; Hemostaz sistemi içinde koagülasyonu (pıhtılaşmayı) ilk başlatan, sorumlu bir transmembran glikoproteini olan doku faktörüdür. Doku faktörü diğer adı tromboplastin, bir apoprotein kısmı ve parsiyal tromboplastin aktivitesinin ekspresyonu için gerekli olan bir fosfolipid kısmından meydana gelir.

Endotel hücre hasarı oluşumunda, ilk doku faktörü (DF) kana sızar ve  $Ca^{++}$  varlığında Faktör VIIa (FVIIa) ile bir araya gelerek kompleks bir yapı oluşturur.

Bu oluşum, ekstrinsek yolun başlanması ve aynı zamanda intrinsek yolda Faktör IX (FIX)'u aktifleştirir. Böylece primer pıhtılaşmadan sekonder pıhtılaşmaya geçiş sağlanmıştır (Şekil 4.1.3.).



**Şekil 4.1.3.** Bir Transmembran Protein Olarak Doku Faktörü (9)

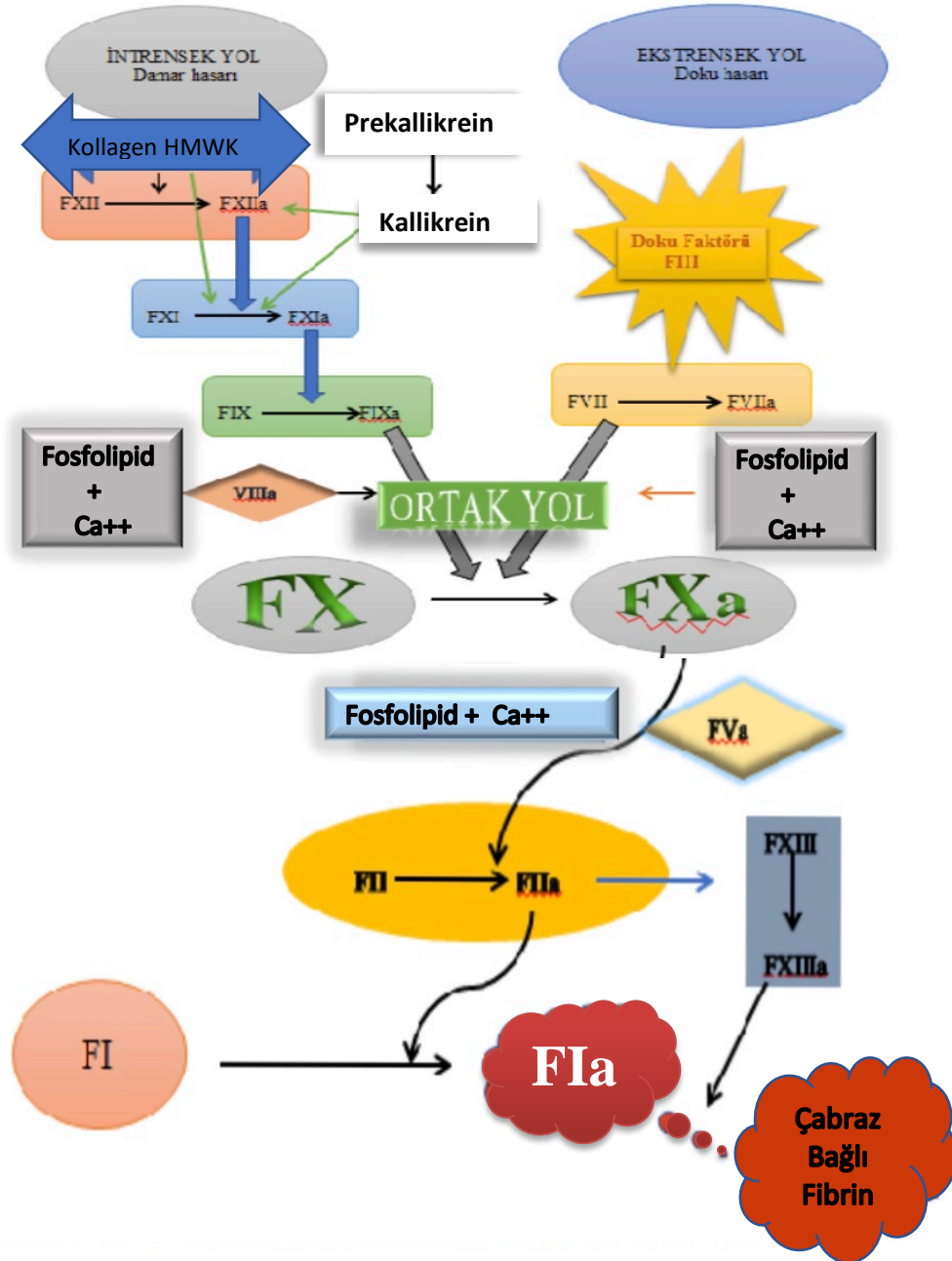
Doku faktörü, kan damarlarının adventia tabakasından ve epidermal, stromal, glial hücreleri tarafından sentezlenir. Pıhtılaşma proteinleri yapısal homoloji gösterirken, sadece doku faktörü Tip 2 sitokin reseptörleri ile homoloji gösterir. Doku faktörü (TF), birçok dokuda bulunan bir transmembran proteindir ve çeşitli biyolojik reaksiyonlarda aktiftir. Sitokin, reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve bu özellik nedeniyle CD 142 olarak adlandırılır. TF ayrıca pıhtılaşma sisteminde Faktör III olarak bilinir ve FVII / VIIa'ya bağlanır. TF ve FVIIa kompleksinin hem prokoagulan hem de sinyal aktiviteleri vardır. Ekstresek sistem, damar hasarı sonucundaki kanamalarda ve damar dışındaki DF ile temas durumunda pıhtılaşma sürecini başlatır. DF aktif olup FVII ile bağlandığında, hızlı bir şekilde FVIIa'ya dönüştürülür. FVIIa-DF kompleksi, FIX ve FX'u aktifleştirmektedir. Pıhtılaşma

sistemde koagülasyon kaskadı pıhtı oluşumu için çok önemlidir. Koagülasyon kaskatında Ca iyonu kofaktör olarak faktörlerin aktifleşmesinde rol alır. Sadece ekstrensek sistemde Ca<sup>++</sup> yer almaz. DF, ekstrensek ve intrinsek koagülasyon mekanizmasının tetikleyicisi durumunda olup, yaşamsal organları tehdit eden arteriyel tromboembolizmin ve koagülasyon inflamasyon olaylarında önemli yer tutar (9,11,13,14,25).

### **İntrinsek Yol**

Koagülasyon sisteminde bu yol kanın travmaya uğraması ya da kanın travmatize bir damar duvarındaki kollajenle teması sonucu başlar. Kanın yabancı yüzeyle karşılaşması ile bu yolakta ilk FXII (Faktör XII) ve trombosit fosfolipitlerinin aktifleşmesine ve trombosit fosfolipitlerinin serbestleşmesine neden olur. Damar hasarında subendotel veya derin tabakalarda bulunan kollajen hem FXII hem de trombositler için güçlü bir uyarıcıdır. FXII aynı zamanda endotelde bulunan yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) ve kollajenle reaksiyona girer ve aktifleşmiş FXII (FXIIa)'ye dönüşür. Bununla birlikte prekallikrein, kallikreine dönüşür ve FXII'nin aktifliğinde rol oynar.





Şekil 4.1.3. Koagülasyon kaskadı ve fosfolipid,  $Ca^{++}$  bulunduğu basamaklar (Kaynak 12'den modifiye edilmiştir.)

Bir damar hasarında bu yabancı yüzey, subendotel veya daha derin tabakalarda bulunan kollajendir. Kollajen hem FXII hem de trombositler için güçlü bir uyarıcıdır. Bu şekilde uyarılan FXII pıhtılaşma sisteminin başlaması için tetiği çekmiş olur. FXII, endotelde bulunan yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) ile reaksiyona girer.

Daha sonra prekallikrein ve FXI ile reaksiyona giren FXII, bu reaksiyonlar sonunda FXI'yi aktifleştirmiş olur. Diğer adı Hegaman faktörü olan FXII sekonder hemostazın başlama tetiğidir. FXIIa' da FXI'yi aktifleştirir ve FXIa'da, FIX'u aktifleştirir (FIXa). Şekil 4.1.3.'de gösterildiği gibi daha sonra FXa için FIXa ve FVIIIa'nın da katıldığı reaksiyonda yine trombosit fosfolipitleri ve travmatize trombositlerden salınan "trombosit faktör 3" (TrF3) birlikte etki göstererek FX'u aktive ederler. FXIIa'nın başlattığı insrensek yoldaki zincirlerle faktörlerden her biri kalsiyum iyonu ve diğer faktörler ile etkileşime girip kendinden sonraki faktörü aktive eder. Ca<sup>++</sup> iyonu diğer adı faktör FIV olup aynı zamanda ekstrinsek ve ortak yolda reaksiyon zincirinde bulunur. İntrensek yolun son basamağı ve ekstrinsek yolun son basamağı birleşirler, ortak yol başlamıştır (3).

### **Ortak Yol**

Bu yolda hem intrensek hem de ekstrinsek yolun kompleksidir ve faktör X (FX) için substrattır. FX aktifleşerek Ca<sup>++</sup> , membran fosfolipidleri ve Faktör V (labil faktörü) yardımları ile protrombini (FII) trombine (FIIa) dönüştürür. Kalsiyum iyonu bu yolda her aşamada gereklidir. FIIa ise pıhtılaşma faktörlerinin son basamağı olan fibrinojenin (FII) fibrine dönüşmesini başlatır. Ayrıca FIIa trombosit agregasyonunun iyi bir uyarıcı etkisi vardır. Buradan da fibrin peptid zincirleri koparak fibrin monomerleri (FIa) oluşur. Bu fibrinin çözünmemesi için fibrini stabilize eden faktörün (FSF) yani FXIII, trombinle aktifleşerek (F XIIIa) oluşarak polimerize olup böylece suda ve plazmada çözünmeyen forma dönüşür. Fibrin, hasarlı bölge iyileşene kadar çözünmemektedir.

FIIa aynı zamanda pıhtılaşma sisteminde prokoagulant ve antikoagulant olarak işlevde bulunan bir moleküldür. Trombinin pıhtılaşma sisteminde aynı anda 5 farklı etki oluşturmaktadır. Bu 5 farklı etki sıralama şu şekildedir:

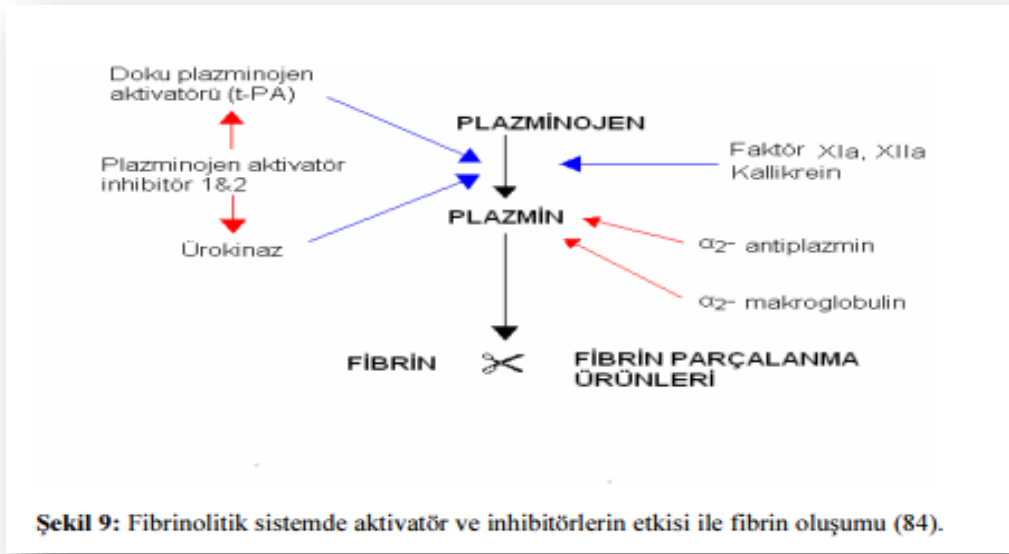
- ❖ FI (fibrinojen)'den FIIa oluşumu
- ❖ Faktör III etkisi ile fibrin polimerizasyonu oluşumu
- ❖ FV ile FVII kompleksi (bu etki protein C vasıtası ile yapar)
- ❖ İntrinsik sistemin başlatan FXII'yi aktifleşmesi
- ❖ Protein C aktivitesi

Hemostaz sisteminde hasarlı bölgede kanın pıhtılaşmasını aktive eden birçok faktörler vardır. Aynı zamanda 50'den fazla da kanın pıhtılaşmasını etkileyen maddelerin bulunduğu görülmüştür. Bunlar pıhtılaşmayı inhibe edenlerdir ve bu maddelere antikoagülan denir. Yaralı bölgede akan kanın pıhtılaşp pıhtılaşmaması, bu maddeler arasındaki etkileşime bağlıdır. Koagülasyon faktörlerinin arasında çok düşük konsantrasyonlarda olan ve bunların yüksek seviyede glukozillenmiş bir plazma proteinleridir. Doku faktörü dışındaki pıhtılaşma faktörleri plazmada bulunur ve aktifleşmeleri için bir proteolitik aktivasyona ihtiyaç duyarlar.

### **Fibrinolitik Sistem**

Hemostaz sisteminde pıhtının oluşması statik değil dinamik bir olaydır. Oluşan fibrin pıhtısı belirli bir zaman sonra çözünmesi ve oradaki kan dolaşımının eski haline gelmesi gerekir. Hemostaz sisteminde bu olaya fibrinolitik (fibrinoliz) sistem denir. Başka bir ifadeyle damar duvarında oluşan fibrin pıhtının erimesi olayına denir. Fibrinolitik sistemde ilk aktif görev yapan plazminojen bir proenzimdir. Plazminojen, plazmine dönüşür. Plazmin de fibrini parçalar ve fibrin yıkım ürünleri meydana gelir. Bu aktivasyonu sağlayan iki enzim vardır.

Bunlar doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz aktivatörleridir ve mekanizmada görev alır. Doku plazminojen aktivatörü (tpA) molekül ağırlığı 70



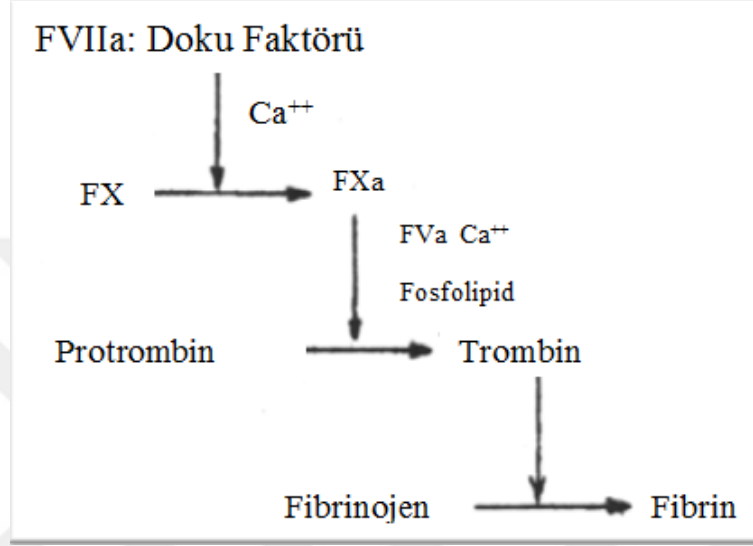
**Şekil 4.1.4.** Fibrinolitik sisteminde aktivatör ve inhibitör etkileri (Kaynak 3'ten modifiye edilmiştir).

kDA olup fibrin molekülündeki bir dizi bağı hidrolitik olarak parçalar ve oluşan ürünler monosit-makrofajlar tarafından uzaklaştırılır. Aktif plazmin, plazmin aktivatör inhibitörü (PAI) ve alfa2-antiplazmin antifibrinolitik ajanlardır. Bu ajanlar plazmin ve plazminojeni inaktive eder. Ayrıca fibrin tarafından tutulan plazmin, alfa2-antiplazmin etkisinden substratı olan fibrin yoluyla korunur ve olan pıhtıyı çözene kadar aktiftir. İnstrinsek yoldaki pıhtılaşma faktörleri olan FXII, kallikrein ve HMWK gibi pıhtılaşma temas faktörlerinin aktivasyonu ve plazminin oluşumunda etkilidir. Aşağıdaki şekillerde fibrinin çözünmesi ile ilgili mekanizma görülmektedir.

#### **Bir Safhalı Protrombin Zamanı Testi (PTZ)**

Kan bozukluklarının tespitinde klinik testlerin önemi büyüktür. Damar dışına alınan kanın, çeşitli aktivatör maddelerle pıhtılaşma süreleri ölçülerek yapılır. Koagülasyon sistemi ve kullanılan testler aşağıda Şekil 4.1.5.2.'de gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan test Protrombin zamanı testi (PTZ)'dir.

Bu test ekstrensek sistemi göstergesidir ve doku faktörü (DF) kullanılır. Laboratuvarlarda *in vitro* şartlarda DF ve  $Ca^{++}$  iyonu ilave edip pıhtının oluşma süresi ölçülür. Bu test oral antikoagulan - örneğin varfarin (kumarin) - kullanan hastaların tedavi sürecinde takip testidir. Aşağıdaki şekilde ekstrensek pıhtılaşma sisteminin akış şeması ile pıhtılaşma faktörleri görülmektedir.



**Şekil 4.1.5.** Protrombin zamanı testinde gerçekleşen reaksiyonlar (3).

PT testinde kullanılan kanın pıhtılaşmamış olması istenir. Normalde plazma içinde pıhtılaşma proteinleri kalsiyum iyonu ile bağlanıp pıhtılaşır. Kalsiyum olmadığı zaman kan hiçbir şekilde pıhtılaşmaz. PT testi için kan plazmasının pıhtılaşması istenmez. Alınan kanlar sodyum sitrat veya etilen diamin tetra asetik asid (EDTA) içerikli mavi tüplere konulur. Yani kanda kalsiyumu bağlayan ajanlar kullanılır. Bu nedenle belirli konsantrasyonda sodyum sitrat ve EDTA'lı çözeltiler laboratuvarlarda antikoagulant olarak kullanılmaktadır.

Bu test Quick'in 1950'li yıllarda tarif ettiği metoda göre yapılan ve bugün hala çok geçerli olan bir yöntemdir. Hastalardan alınan kan plazması kullanılarak tromboplastin aktivitelerine bu yöntemle bakılır. Tromboplastin kaynağı doku homojenatıdır ve sığır, kuzu, koyun akciğerlerinden ve beyinden elde edilir. 0,02M'lık  $CaCl_2$  çözeltisi ilave edildikten sonra pıhtı oluşumu (fibrin) için geçen süre kronometre ile tayin edilir. Tromboplastin aktivite ile süre ters orantılıdır.

Normal şartlar altında sağlıklı kişilerde protrombin zamanı 11-16 saniye (sn) arasında değişir. Tromboplastin aktivitesi kaynağına göre bazen fazla bazen de az aktif olabilir. Bu yüzden her laboratuvarın kendine göre oluşturduğu standardizasyonu vardır.

Quick metodu (1935) bir safhalı protrombin zamanı (PT) çok pratik bir testtir. Her laboratuvarın kullandığı tromboplastin farklı olduğundan bir standardizasyona gidilmiştir.

ISI= International Sensitivity Index

INR= International Normalized Ratio

Biyokimya laboratuvarlarında sonuçlar farklılık göstermektedir. Bu yüzden yukardaki yukardaki ISI ve INR' ye göre standardizasyon getirilmiştir. Normal PT 12 sn ve hastanındaki 24 sn ise bunların birbirine bölümü  $24:12=2.0$  olur. Değer oran olarak verilmiştir. Fakar ISI katsayısıda gözardı edilmemelidir.

$INR = \frac{\text{Hasta PT}}{\text{Normal PT}}^{ISI}$

ISI = Laboratuvarın tromboplastini/Standart tromboplastin

Quick metodu ile yapılan bir safhalı protrombin zamanı testi (PTZ) manuel veya fotooptik yöntemlerle yapılabilir.

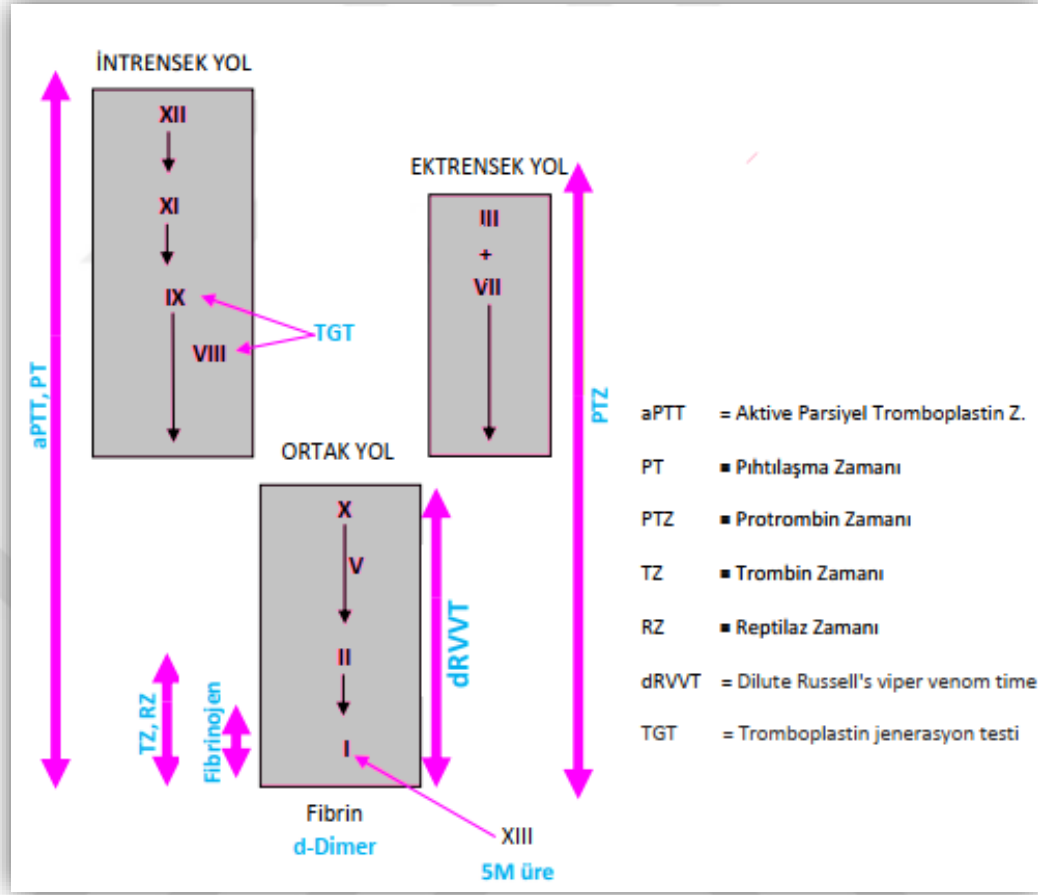
Tromboplastin yukarıda da belirtildiği gibi farklı kaynaklarda elde edilebilir. Sonuçlar farklı çıkacağından değerlendirme sisteminde oluşan karışıklığı ortadan kaldırmak, özellikle oral antikoagulan tedavide belirli standartları sağlayabilmek için INR (uluslararası normalleştirme oranı) sistemi kullanılmaya başlanmıştır. INR hasta protrombin zamanının normal kontrolün protrombin zamanı ile kıyaslanması ve bu değerini ISI uluslararası zamanının normal kontrolün protrombin zamanı ile kıyaslanması ve bu değerini ISI (uluslararası duyarlılık indeksi) üssünün alınması ile hesaplanır. ISI ise laboratuvarın tromboplastininin standart tromboplastine oranlanması ile elde edilir. Hesaplanması karmaşık matematiksel işlemler ve geniş mukayeseli çalışmalar gerektirdiğinden bu değer tromboplastin ayırıcını hazırlayan ticari firmalar tarafından bildirilir. INR hesaplanmasındaki amaç oral antikoagulan kullanan hastalarda monitorizasyonunun sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesidir. INR hemostaz sisteminde veya trombotik durumların başlangıcı için kullanılmamalıdır.

INR, pıhtılaşma faktörlerinin plazma yarılanma süreleri farklıdır. Bunun nedeni oral antikoaglan tedavisinin erken evrelerinde sadece F VII üzerindeki etkiyi aksettirebildiğinden doğru sonuç olmayabilir. Hasta stabil bir evreye geçtiğinde INR değeri daha güvenilirdir. WHO biyolojik standartlarına göre sınırlar 2-4 arasında olmalıdır. Aşağıda protrombin zamanı testinin değişik ifadeleri görülmektedir (Tablo 4.1.2.).

**Tablo 4.1.2.** Protrombin Zamanı Testinin Değişik İfadeleri (3).

PT Oran	PT Zaman	PT İndeks	(%) Aktivite	INR
1.0	12	100	100	1.0
1.1	13.2	91	74	1.2
1.2	14.4	83	57	1.5
1.3	15.6	77	48	1.8
1.4	16.8	71	41	2.2
1.5	18	67	35	2.7
1.6	19.2	62	31	2.9
1.7	20.5	59	28	3.4
1.8	21.6	56	25	3.9
1.9	22.9	53	23	4.4
2.0	24	50	21	4.9
2.1	25.5	48	20	5.5
2.2	26.5	45	18.5	6.1
2.3	27.6	43	17.4	6.8
2.4	28.8	42	16.4	7.5
2.5	30	40	15.4	8.2
3.0	36	33	12	12.5

PT: Protrombin zamanı INR: Uluslararası normalleştirme oranı



Şekil 4.1.6. Klinikte kullanılan bazı pıhtılaşma testler (5,7,24,26).

#### 4.2. K Vitaminine Bağlı Pıhtılaşma Faktörleri (3,27-36)

K vitamini, sağlık için oldukça önemli ve eksikliğinde ciddi sorunlara yol açabilir. K vitamini 1929 yılında Danimarka'lı Henrick Dam tarafından tavuklar üzerine yapılan bir çalışmada yağsız yemlerle beslenen tavukların kanama yüzünden öldüğünü gözlenmiş ve tesadüfen keşfetmiştir. Bu yüzden K vitamini yağda eriyen bir esansiyel vitamin olduğu söylenmiştir. "K" harfi Danimarka dilinde "Koagulation" anlamına gelen pıhtılaşma demektir. Başka bir çalışmada yeşil yapraklı kaba yonca ile beslenen grupta kanama olmadığı gözlemlenmiş ve besinlerde antihemorajik (hemostazı destekleyen madde) bir faktörün varlığını keşfedilmiştir. K vitamini karaciğerde ilk defa karboksilaz enzim aktivitesi 1975 yılında tespit edildi.

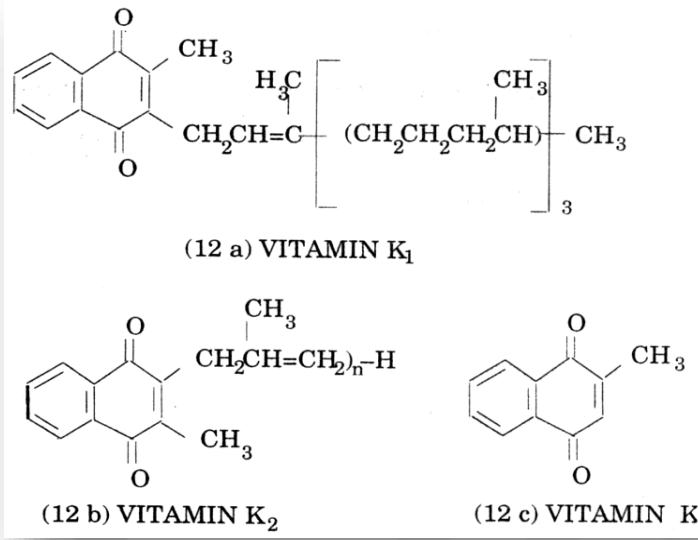


K vitamininin enzimatik reaksiyonlarda önemli görevi vardır. K vitaminine bağlı bazı pıhtılaşma proteinlerin biyosentezi sırasında proteinde bulunan glutamik asidin (Glu),  $\gamma$ -karboksi glutamik aside (Gla) dönüştüğü reaksiyondur. K vitamini pıhtılaşma sistemi üzerine keşfedildikten sonra biyolojik olarak önemli çalışmalar yapılmıştır:

- Kalsiyum metabolizma düzenlenmesinde, hücre büyümesinde, oksidatif stres, inflamatuvar reaksiyonlar
- K vitamin antikoagülasyonlarda farmakolojik ajanlar yönünden tanınması
- Protein-membran arasındaki bağlılık için proteinlere metal bağlama özelliğinde olan  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin keşfi
- K vitaminine bağlı proteinlerin biyosentezinde  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin(Gla) keşfi
- Pıhtılaşma sisteminde glutamik aside CO<sub>2</sub> bağlanmasını katalizleyen bir enzimatik aktivitenin (K vitaminine bağımlı karboksilaz) bulunması
- Pıhtılaşma sisteminde proteinlerin (K vit. Bağı) sentezi sırasında propeptid basamağının saptanması

K vitamini normalde doğada iki şekilde bulunur. Yağda çözünür olup K<sub>1</sub> vitamini ve K<sub>2</sub> vitaminidir. Daha sonra sentetik olarak K<sub>3</sub> suda çözünür formu olup vücuda alındığında karaciğerde K<sub>2</sub> vitaminine dönüştürülür. K vitamininde kinon halkası bulunur (Şekil 4.2.1.).

- ✓ K<sub>1</sub> vitamini (fillokinon) bitkilerde vardır. İnsan diyetinin ayrılmaz parçasıdır.
- ✓ K<sub>2</sub> vitamini (menakinon-n) genellikle bakteriler tarafından sentez edilir.
- ✓ K<sub>3</sub> vitamini(menadion) sentetik olup vücutta K<sub>2</sub>' ye dönüşür.



Şekil 4.2.1. K vitaminin yapısal formları (3)

K vitamini kivi, avokado, yeşil üzüm, brokoli, ıspanak, ve marul gib birçok sebze ve meyvelerde bulunur. Aynı zamanda kanola, soya fasulyesi ve zeytinyağı gibi yağlarda da bulunmaktadır. Diyetle alınan bitki kaynaklı K<sub>1</sub> vitamini ve bakteriyel kaynaklı K<sub>2</sub> vitaminleri farklı etkiler gösterebilir. Aşağıda bazı besinlerde K vitamini miktarları bulunmaktadır (Tablo 4.2.1.).

K vitaminlerin emilimi bağırsaklarda gerçekleşir. Bağırsak hücrelerine gelen K vitaminleri şilomikronlar aracılığıyla lenf sistemine, oradan karaciğere daha sonra da kana geçer. K<sub>1</sub> vitamini ve K<sub>2</sub> vitaminin emiliminde safra tuzları ve yağların önemli yeri vardır. K<sub>3</sub> (menadion) suda çözünen bir vitamin olduğu için emilimi safra ve yağlara bağlı değildir. Günlük K vitamini ihtiyacı diyetle 70-140 mikrogram olarak kabul edilmektedir.

**Tablo 4.2.1.** Bazı Besinlerin Vitamin K Değerleri ( $\mu\text{g} / 100\text{g}$  da)(3)

Besin	Miktar	Besin	Miktar
Tereyağı	30	Peynir	35
İnek sütü	1	İnsan sütü	0.3
Yumurta	11	Dana Karaciğeri	92
Tavuk Karaciğeri	7	Domuz Karaciğeri	25
Mısır Yağı	3	Ayçiçeği Yağı	3
Soya Fasulyesi Yağı	193	Ekmek	4
Yulaf	10	Pirinç	3
Beyaz Un	4	Kepekli Un	17
Yeşil Fasulye	40	Brokoli	175
Marul	129	Peas	29
Patates	1	İspanak	415
Domates	10	Şalgam	650
Muz	2	Portakal	1
Şeftali	8	Çilek	10
Kahve	38	Yeşil Çay	712
Tütün	5000	Kola	2

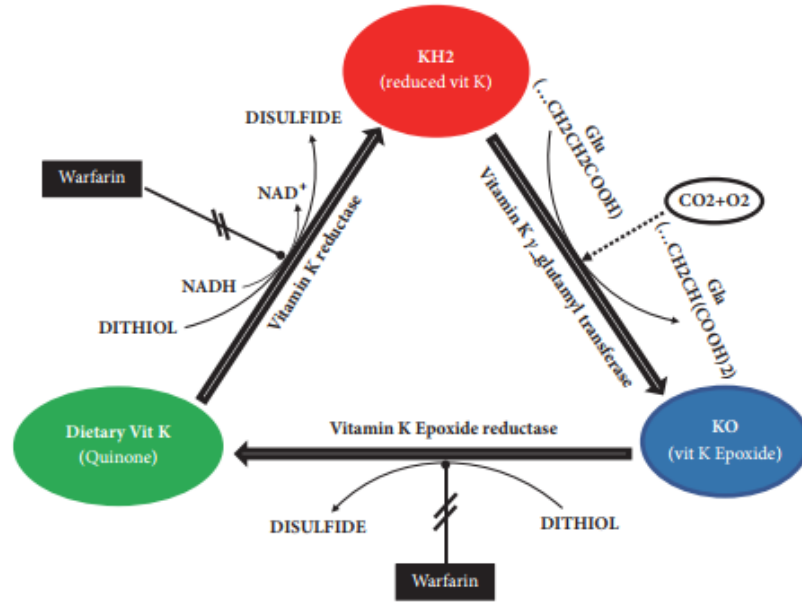
K vitamininin büyük bir kısmı karaciğerde depolanır ve kalan kısım lipoproteinler tarafından diğer dokulara transfer edilip  $K_2$  vitaminine katılacaktır. Karaciğer  $K_1$  vitamini ve  $K_2$  vitamininin uzun zincirli formlarını depolar (61). K vitaminlerin depolama miktarları her organda aynı değildir. Bu nedenle, K vitaminin eksikliği tüm dokuları eşit derecede etkilemez. Karaciğer, K vitamini yetersizlik veya eksiklik durumunda etkilenen en son organdır. Çünkü depolama yeri genel olarak buradadır. K vitamini eksikliğinde yapılan çalışmalarda kanser, kardiyovasküler hastalıklar, yumuşak doku kalsifikasyonu ve osteoporoz gibi hastalıklarla ilişkisi olduğu tespit edilmiştir.

K vitamini geri dönüşümlü olup vücutta tekrar kullanılabilir. Vücudun ihtiyacı kadar K vitamininin geri dönüşümü sağlanır. K vitaminine bağlı pıhtılaşma proteinleri genel olarak iki grupta incelenebilir. Bunlar kan pıhtılaşma proteinleri ve diğer proteinlerdir (Tablo 4.2.2.).

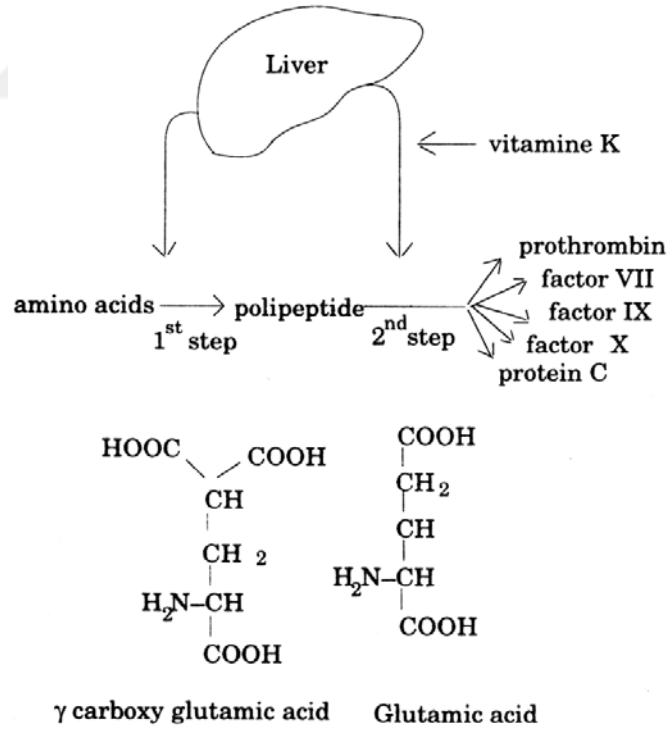
**Tablo 4.2.2.** K vitaminine bağımlı proteinler (3)

<b>Pıhtılaşma Sistemi Proteinleri</b>	<b>Diğer Proteinler</b>
<b>Protrombin (FII)</b> <b>Faktör VII</b> <b>Faktör IX</b> <b>Faktör X</b> <b>Protein C</b> <b>Protein S</b> <b>Protein Z</b>	Osteokalsin Matriks Gla proteini Nefrokalsin Prolince zengin Gla Proteini 1 (PRGP 1) Prolince zengin Gla Proteini 2 (PRGP 2) Plak Gla Proteini Gas 6 “Conantokin” G “Conantokin” T K vitamini karboksilaz enzimi

Protrombin(FII), Faktör VII, Faktör IX ve Faktör X ile antikoagulan olarak görev yapan protein C ve protein S hemostaz sistemine hemostaz ve tromboz sisteminin işlem yapabilmesi için bilinen K vitaminine bağımlı proteinlerdir. Şekil 4.2.2.’de görüldüğü üzere K vitamini hücrelere girer ve hedef proteinler içerisinde bulunan glutamat kalıntısını karboksilatlayan yani  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin (Gla) oluşumunu sağlar ve bu proteinlerin kalsiyuma bağlanması için bir kofaktör işlevi görür. Bu reaksiyon endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Daha sonra diyetle alınan K vitamini, redüktaz enzimi ile indirgenmiş formu olan hidrokinona (KH<sub>2</sub>) dönüşür. Çünkü hidrokinon  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin(Gla)’in gerçekleşmesi için proteinlerin Glu ucuna bir karboksil grubunun bağlanmasında görev alır ve bu oluşum sırasında CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>’ de bulunur. K vitamini geri dönüşümlüdür. Bu yüzden antikoagulan kullanan kişilerde varfarin (kumarin) gibi ilaçlar bu döngünün antagonistidir. Şekil 4.2.2’de görüldüğü üzere bu döngüde varfarin, K vitamini epoksit redüktazın antagonistidir ve K vitamininin geri dönüşümüne müdahale eder. Ayrıca yapılan bir çalışmada kumadine (varfarin) dirençli olan farelerin karaciğerde hidrokinonun anlamlı derecelerde bulunduğu kanıtına varılmıştır. Bu da varsayımların doğruluğunu desteklemiştir. Başka bir çalışmada ayrıca,  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin (Gla)’in birçok karboksilasyonu katalizleyen, çok önemli bir enzim olduğu kanıtlanmıştır. Aşağıda K vitamininin döngüsü şematize edilmiş ve K vitamininin karboksilasyonu gösterilmiştir.



Şekil 4.2.2. K vitaminin aktive ve inhibe eden reaksiyon ve enzimler (27)



Şekil 4.2.3. K vitamini karboksilasyonun kimyasal yapısı (3)

Şekil 4.2.3.'de sığır protrombininden gama karboksiglutamik asid içeren bir tetra peptid izole edilmiş fakat bu tetra peptidin dikumarol ile beslenen sığırlarda olmadığı

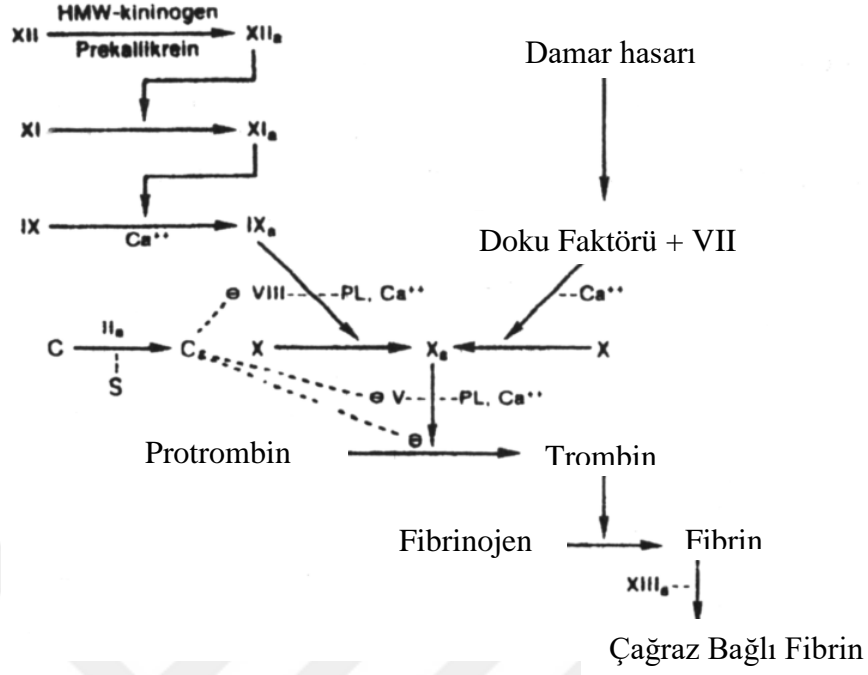
görülmüştür. Böylece, K vitamininin postranslasyonel modifikasyonda görev yaptığını anlaşılmıştır. K vitamini protrombinden başka F VII, IX, X, protein C'nin postranslasyonel modifikasyonunu yapmaktadır. Daha sonra birçok yeni proteinlerin de Gla içerdiği gösterilmiştir. Koagulasyonda yer alan bu proteinlerin bir kısmı prokoagulant bir kısmı ise antikoagulan özellik göstermektedir.

### **K vitamini inhibitörleri**

K vitamini antagonisti olarak sentez edilen komarin türevleri (Varfarin, dikumarol gibi) koagulasyon proteinlerinin karboksilasyonunu yani Gla proteinlerin oluşumunu engel olmaktadır. Oral antikoagulanlar kanda pıhtılaşmayı önlemek için trombus riski olan hastalarda daha çok tedavi amaçlı kullanılır. Koagulasyon faktörlerinin etkisini azaltarak pıhtılaşmaya meyili yani trombus oluşumunu azaltmaktadır. Bu hastalarda protrombin (FII) sürekli olarak kontrol edilir. Protrombin zamanı, ekstresek pıhtılaşma zamanının göstergesidir ve saniye olarak ölçülür. Burada hastanın ekstresek pıhtılaşma süresinin normalin altında olması istenir. Eğer anormal bir durum olduğunda ilaçların dozu ayarlanır. Oral antikoagulan olarak verilen varfarin gibi ilaçların dozu buna göre ayarlanır. Geçici olarak bu ilaçların etkisi 12-24 saat aralığında sürmektedir (Şekil 4.2.4.).

## İNSTRENEK SİSTEM

## EKSTRENEK SİSTEM



**Şekil 4.2.4.** K vitaminine bağlı pıhtılaşma faktörleri aktivasyonu ve inaktivasyonu (3)

K vitamini eksikliği görüldüğü zaman K vitamini tedavisi yapılır özellikle yeni doğanlarda kanamalar görülmektedir. Eğer tedavi düzelirse K vitamini eksikliği olduğunun göstergesidir. K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinde eksik olan durumlar ve K vitaminine bağlı proteinlerin bazı özellikleri aşağıda Tablo 4.2.3'de ve Tablo 4.2.4. belirtilmiştir:

**Tablo 4.2.3.** K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinde eksik olan durumlar (3)

Yeni doğanlarda görülen kanamalar
Düşük yağlı diyetle beslenmek, malnutrition
Çeşitli nedenlerle safra yolunun tıkanması
Çeşitli malabsorpsiyon (emilin) bozuklukları
Karaciğer hastalıkları
Kumarin (varfarin) benzeri oral antikoagulan kullanılması.
Sefalosporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması
Yüksek dozda A ve E vitaminlerinin alınması

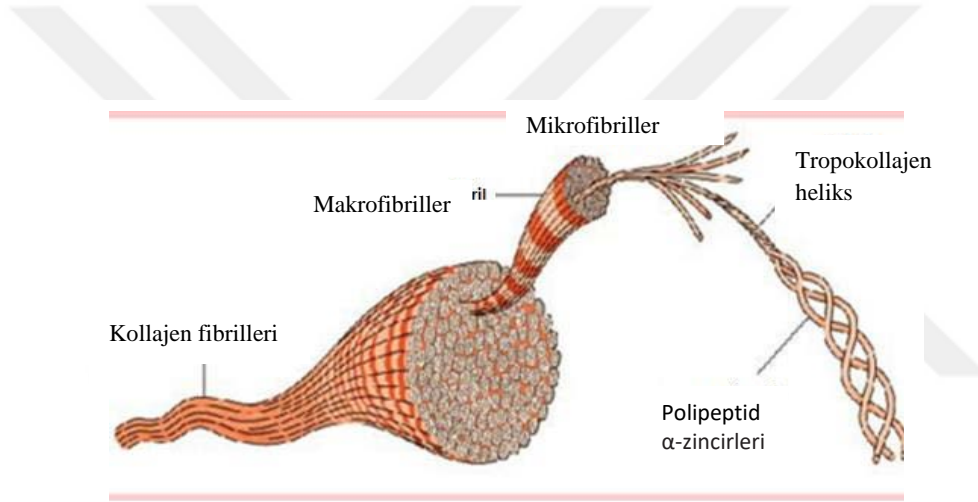
**Tablo 4.2.4.** K vitaminine bağımlı koagülasyon proenzimlerinin bazı özellikleri (3)

Özellikleri	Faktörler				Proteinler			
	<b>II</b>	<b>X</b>	<b>IX</b>	<b>VII</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>Z</b>
<b>Plazma Miktarı</b> (µg/ml)	100	20	3	1	10	1	< 1	< 1
<b>Moleküler</b> <b>Ağırlık (kDa)</b>	72	55	55	46	57	69	50	55
<b>Korbohidrat</b> <b>Yüzdesi</b>	8	13	26	13	8	+	+	+
<b>Peptit Zinciri</b>	1	2	1	1	2	1	1	1
<b>Gla Sayısı</b>	10	12	12	10	11	10	+	13



### 4.3. Kollajenin Yapısı ve Özellikleri

Kollajen, insan ve hayvanlarda bulunan bir glikoproteindir. Daha çok kemik, deri ve tendon gibi bağ dokularının yapı taşıdır. Vücudun toplam proteine oranı kadar %60'ı kadar kollajen içerir. Kollajen molekülleri üçlü polipeptid alt birimlerinden oluşan  $\alpha$ -zincirleri sarmal şekilde kendi etrafında dönerek molekül oluştururlar. Şekil 1 de görüldüğü üzere bu sarmal zincirler tropokollajen heliksleri, bunlarda mikrofibriller, mikro fibrillerini daha sonra da makro fibrilleri oluşturular. Makro fibriller de bir araya gelerek kollajen fibrillerini meydana gelirler. Yapılan çalışmalara göre kollajenin tek bir tip protein olmadığı ve yaklaşık olarak 27 tip kollajen tespit edilmiştir (9). Aşağıda kollajenin yapısı ve tipleri gösterilmiştir.

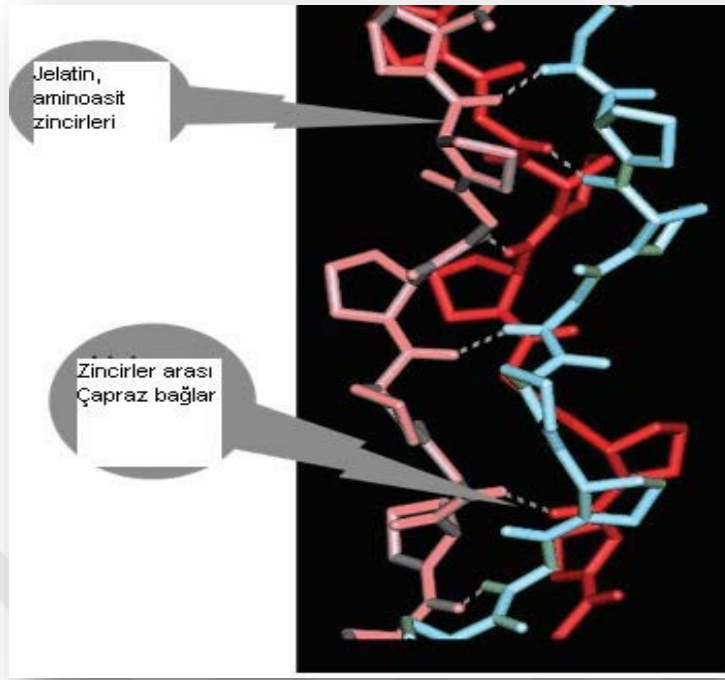


Şekil 4.3.1. Kollajen Proteinin Moleküler Yapısı ( 38).

Tablo 4.3.1. Kollajenin gruplandırılması (9)

Kollajen	Bulunduğu Yerler
Tip I	Bağ doku; Deri, kemik, tendonlarda bulunur.
Tip II	Kıkırdak Dokularda.
Tip III	Yaşa bağlı olarak değişiklik gösterir. Çok genç ciltlerin yarısını oluşturabilir ama zamanla %5-10'a düşer.
Diğer Tipler	Çok düşük miktarlarda ve çok spesifik organlarda bulunur.

Kollajenin en önemli yapı taşı yukarıda da denildiği gibi tropokollajendir. Çünkü tropokollajen 3 farklı polipeptid ( $\alpha$ -zincirleri) bir araya gelip sarmal şekilde dönerek oluşur. Her bir polipeptid zincirinin molekül ağırlığı yaklaşık 100 000 g/mol'dür. Bu zincirlerin genel aminoasit sıralaması GLY-X-Y şeklindedir. Bu aminoasitler arasında H bağları bulunur. Glisin (GLY), her 3 aminoasitten biri olup sarmal yapının oluşmasında önemli olup kollajen molekülün karakteristik özelliğini belirler. GLY-X-Y diziliminde X ve Y çoğunlukla prolin (PRO) ve hidroksprolin (HYP)'dir. HYP ise prolinin hidroksillenmiş halidir. Amino asit dizilimindeki GLY yalnızca %33'ünü, PRO ve HYP ise %22'sini oluşturur. X ve Y yerine triptofan (TRP) ve sistein (CYS) aminoasitleri dışında DNA tarafından kodlanan başka aminoasitler yer alabilirler. Kollajen yapısında az bulunan aminoasitler metiyonin (MET), fenilalenin (FEH), histidin (HIS) ve trozin (TYR) dir. Kollajende PRO ve HYP oran olarak bulunduğu kaynağa bağlı değişir. Kollajen ve jelatinin miktarını HYP belirlemektedir. Kollajenin oluşmasında bağlar önemli rol oynamaktadır. Glisin- prolin – hidroksprolin arasında hidrojen bağları ile bu üç dizilim oluşur ve bu da kollajen yapının sağlamlığının bir göstergesidir. Alfa zincirleri arasında ise su ile yapılan hidrojen bağları da önemli yer tutar. Alfa zincirinde bulunan yan gruplarda iyonik etkileşim (asidik veya bazik) olduğundan kollajen molekül oluşumunda önemlidirler. Ayrıca kollajen molekülünde lizin LYS'ler kovalent çapraz bağlarla bağlıdır. Kısaca kollajen molekülü ve kollajen fibrilleri (molaküller arası ve molaküller içi) kollajen yapısının sağlam ve karalı yapıda olması bu çapraz bağlara borçludur (Şekil 4.3.2).



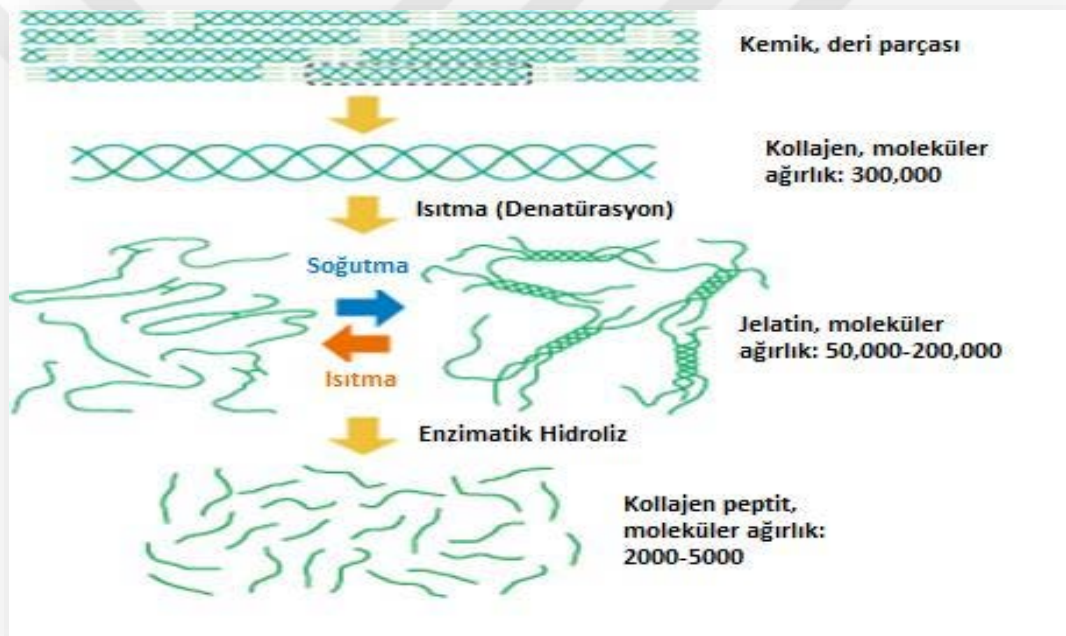
**Şekil 4.3.2.** Kollajende molaküler düzeyde çapraz bağların görünümü ( 16,40)

#### **4.4. Jelatinin Yapısı ve Özellikleri (16,37-45)**

Jelatin genellikle, sığır ve domuz gibi hayvanların bağ dokularında bulunan kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen bir proteindir. Kollajen, deri, kemik, kıkırdak ve tendon gibi dokularda bulunmaktadır. Kollajen asit ve baz çözeltiler ile muamele edilip A tip ve B tip jelatin elde edilir. Kollajen jelatine dönüştürülürken ön muamele (asit veya bazik) ve ekstraksiyon ile uygulanan ısı işlemlerle, molekül içi ve moleküller arası H ve kovalent bağlar kopar ve böylece kollajenin üçlü sarmal yapısı bozulur. Amino asitler arasında kovalent bağlarda kopmalar meydana gelir. Bu sarmal yapı çubuk şeklinden yumak şeklindeki bir yapıya dönüşür. Artık bu yapı suda çözünür formda jelatin adını alır. Jelatinin elde edilmesindeki amaç kollajenin suda çözünmeyen formundan hidroliz edilerek daha küçük formuna getirilmesidir. Jelatinin, kollajen tiplerinden dolayı protein içeriği değişmektedir. Kollajenin tipine göre jelatinin protein içeriği de %85-%92 arasında değişmektedir. Kalan diğer kısımlar mineral tuzları ve kurutma işlemi sonrasında kalan sudur. Aynı zamanda kollajenin molekül ağırlığı normalde 300-350 kDa arasında iken bu değer jelatinde 10-65 kDa arasında görülmektedir. Jelatinde bazı amino asitler yok denecek kadar

azdır. Bunlar, metiyonin, sistein ve tirozin aminoasitleridir ve triptofan ise hiç bulunmamaktadır. Bu sebeple jelatin besin değeri zengin olmamakla beraber kıvam arttırıcı, yapıştırıcı, jelleştirici ve su tutma özelliğe sahip iyi bir hidrokolloiddir (Şekil 4.4.1.).

Jelatin, kollajene göre çok daha fonksiyonlu yapı oluşturur. Ticari olarak daha ucuz ve biyoyumlu, biyoçözünür olması ve çeşitli özelliklerde bulunması jelatinle ilgili daha çok araştırma yapılmasına olanak sağlayan bir hidrokolloiddir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca modern ilaç ve fotoğraf endüstrisi ve sağlık alanında da yerini almıştır.



Şekil 4.4.1. Kollajen ve Jelatinin Biyopolimer Oluşumu (43)

#### 4.4.1. Jelatinin Pıhtılaşma Sisteminde Etkisi

Hemostatik ajan olarak kullanılan jelatin, düşük toksisite, biyouyumluluk, biyobozunurluk özelliğe sahip ve düşük maliyetli olması nedeniyle hemostatik bir malzeme olarak çok dikkat çekmiştir.

Jelatin suda çözünebilen kimyasal yapısından kaynaklı emilebilir bu yüzden trombosit agregasyonunda aktive edebilme özelliği taşımaktadır. Aynı zamanda bu ajanlar genellikle birçok çeşit doğal polimerle karıştırılabilir.

Hemostaz sisteminde aşırı kanamalar ölüm nedeni olabilmektedir. Aşırı kan kaybının azaltılması birinci önceliktir. Geçmiş yıllarda ve günümüzde kullanılabilirliği halen sürdürülen kanama komplikasyonlarını azaltmak adına hemostatik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar aynı zamanda iyi biyouyumluluğa sahip, kullanıma hazır, hafif ve aynı zamanda ekonomik olarak ucuz olması açısından tercih edilmektedir. Hemostatik ajanlar jelatin kitosan gibi ajanlar kullanılmaktadır. Kullanım alanları çok geniş olup, endüstriyel gıda üretimlerinde, kozmetik ürünlerinde, ilaç mühendisliği, doku mühendisliğinde ve sağlık alanlarında fonksiyonel bir biyopolimer olarak kullanılmaktadır.

#### 4.5. Minerallerin Pıhtılaşma Sistemindeki Etkisi

Mineralli suların, yerkabuğunun çeşitli derinliklerinde uygun jeolojik şartlarda doğal olarak oluşan, bir veya daha fazla kaynaktan yeryüzüne kendiliğinden çıkan veya teknik usullerle çıkarılan, mineral içeriği, kalıntı elementler ve diğer bileşenleri ile tanımlanan, her türlü kirlenme riskine karşı korunmuş, mikrobiyolojik yönden uygu olan su olarak tanımlanır. Uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca suların kimyasal bileşenleri yeraltındaki kayaçların formasyonları hakkında bilgi edinebilme olanağı da sağlamaktadır. Mineralli sular saf su niteliği taşımamaktadır. Bu mineral ve elementlerin bir kısmı beslenme fizyolojisinde önemli yere sahiptir. Türkiye'de mineralli sular maden suyu olarak geleneksel adıyla bilinmekte ve özellikle mide, bağırsak ve kardiyovasküler hastalıklarda iyileştirici olarak faydalanılmaktadır. Bikarbonat, sülfat, klorür, florür,

magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir gibi mineralleri intiva eden su, önemli bir besin ögesidir. Vücutta birçok fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli rol oynayan minerallerin günlük ihtiyacının karşılanmasında mineralli sular önemli bir yere sahiptir. Sulardaki mineral içerikleri her kaynakta farklılıklar göstermektedir (65).



## 5. MATERYAL ve METOD

### 5.1.Kullanılan Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Aşağıdaki tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.1.1.** Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal olan/olamayan maddeler	Markası	Kullanılan yer
Serum fizyoloji(SF) %0.9 izotonik	Polifarma	PT tayini
Distile su(dh <sub>2</sub> O)		PT tayini/SDS-PAGE
Kalsiyum klorür((CaCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich (ABD)	PT tayini
Etil alkol (%96)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Sığır jelatini(hazır toz)	Havelet Gıda San.	PT /SDS-PAGE
İnsan plazması(havuz)		PT /SDS-PAGE
Tromboplastin(DF)	Kendi hazırladığımız	PT tayini/SDS-PAGE
Mineral suları	13 farklı (yerli-ithal)	PT tayini
Akrilamid(%30)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Bisakrilamid(%0,8)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Tris-base	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
HCl	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Amonyum persülfat (APS)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
TEMED	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Asetik asit	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Metanol	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Yürütme Tamponu(10x)-hazır temin edildi	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Laemmlı tamponu-hazır temin edildi	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Comassie birillant blue G-250	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Marker hazır ambajında	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Etanol	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Fosforik asit	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
İsopropanol alkol	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE
Phosphate buffered saline (PBS)- 0,01 M	Sigma Aldrich (ABD)	SDS-PAGE

## 5.2.Kullanılan Cihazlar

**Tablo 5.2.1.** Çalışma Sürecinde Kullanılan Cihazlar

Araç-gereç-cihazlar	Markası
Hassas terazi	Shimadzu ATX224 (Japonya)
Blender	Standart ev tipi
Makas-ustura	
Gazlı bez(steril)	
Sıcak su banyosu(37 derece)	Nüve NB5 (Türkiye)
Vortex karıştırıcı	Velp Classic (Italy)
Manyetik ısıtıcı-karıştırıcı	Scilogex MS-H280-Pro (ABD)
Buzdolabı-derin dondurucu -20 ve -80	
ince uçlu mikropipet(10 µL)	Eppendorf
Eppendorf	ISO-LAB
ince uçlu mikropipet (100 µL)	Eppendorf
Deney tüpü	ISO-LAB
Falkon tüpü	ISO-LAB
Beher	ISO-LAB
Cam şişe	ISO-LAB
Mezura	ISO-LAB
Balon jöje	ISO-LAB
Manyetik balık	ISO-LAB
Poliakrilamid (SDS-PAGE) elektroforez cihazı	BİO-RAD
Santrifuj	Nüve- NF 800
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800/06431
Ph metre	Nüve
Kronometre	ISO-LAB
Distile Su Cihazı	

## 5.3. Protrombin Zamanı (PTZ) Testinin Yapılışı (4)

Çalışmamızda protrombin zamanı testi (PTZ), İstanbul Medipol üniversitesi Biyokimya laboratuvarında yapıldı. İstanbul Medipol Üniversitesi Mega kompleks hastanesine PTZ testi için gelen hastaların atık kan plazmalarının buz içinde kavacık kampüsüne getirildi. Geliş sırasında soğuk zincir halkası bozulmadı. 100 erkek 100 kadın olmak üzere, 18-60 yaş arası sağlıklı kişilerden kan örnekleme oluşturularak seçildi. Toplanan kan plazması sağlıklı kişilerden alınmasına ve trombositten fakir plazma (sitratlı plazma) olmasına dikkat edildi.



### 5.3.1. Protrombin Zamanı Testi İçin Kan Toplanması

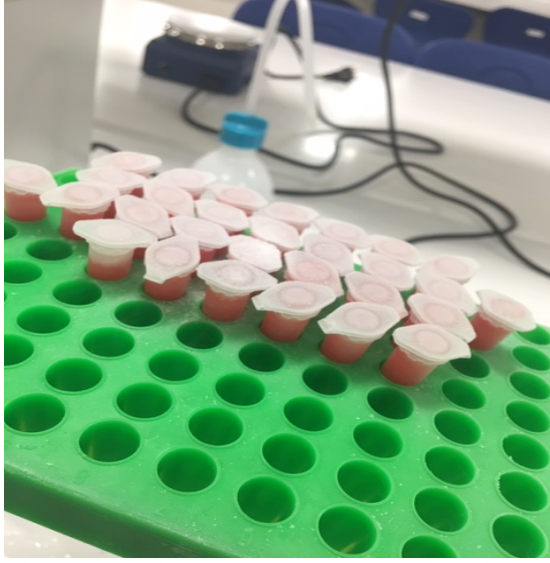
Alınan kan örnekleri trombositten fakir plazma (sitratlı plazma)'dır. Sağlıklı kişiden sitratlı kan (9ml kan + 1 ml % 3.8'lik sitrat) alınır ve mavi kapaklı sodyum sitratlı tüpe alınan ve 1500 x g'de 15 dakika oda ısısında santrifüj edilen plazmadır.

Dışlama kriterleri: oral antikoagulan kullanan hastalar, herhangi bir cerrahi operasyon geçirmiş hastalar, 18 yaş altı ve 60 yaş üstü kişiler.

### 5.3.2. Protrombin Zamanı Testi İçin Kuzu Akciğerinden Tromboplastin Hazırlanması

Çalışma İstanbul medipol Üniversitesi Biyokimya laboratuvarında yapıldı. Tromboplastin (DF) homojenatı elde edilmesinde taze kesilmiş kuzu akciğeri Beykoz /İstanbul'da bulunan Adak Kurban satış merkezinden temin edilmiştir. Kuzu akciğerinden tromboplastin (DF) hazırlanması (yiğitbaşı,emekli 2015).

- Kuzu akciğeri buz içinde laboratuvara getirildi.
- Makas-ustura yardımıyla buz üstündeki akciğerlerin doku kısımları küçük parçalar halinde behere konuldu.
- Zarı ayrılmış akciğer dokusunun miktarı terazide ölçüldü. Ölçülen miktar kadar serum fizyolojik (SF) ilave edilip, homajenize edildi.
- Homojenat uygun büyüklükte bir erlenmayere 8 katlı gazlı bezden geçirilerek süzdürüldü. Gazlı bez önceden SF geçirildi.
- Süzülen homojenat buzdolabında 8 saat, her yarım saatte bir cam baget ile karıştırılarak bekletildi.
- 2 mL'lik eppendorf tüplere doldurulup -80 °C'de saklandı.
- Çalışma esnasında gereken miktar kadar eppendorf çıkarıldı.



**Resim 5.3.2.1.** Tromboplastinin alikodlanmış görünümü

### 5.3.3. Protrombin Zamanı Testi İçin Kalsiyum Klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) Çözeltisinin Hazırlanması

0,2 M 100 mL stok  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi için 2,22 g  $\text{CaCl}_2$  tartıldı, 100 mL'lik balon jode biraz distile su içinde çözündürüldü ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. + 4 e saklandı.

0,02 M seyreltik  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi için 1 mL stok  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi üzerine 9 mL distile su (DS) eklenerek karıştırıldı. Deney yapılacağı zaman taze hazırlandı.

### 5.3.4. Protrombin Zamanı (PTZ) Testinin Yapılışı

PTZ aşağıdaki tablodaki protokole göre yapılmıştır (yiğitbaşı ve emekli 2015)

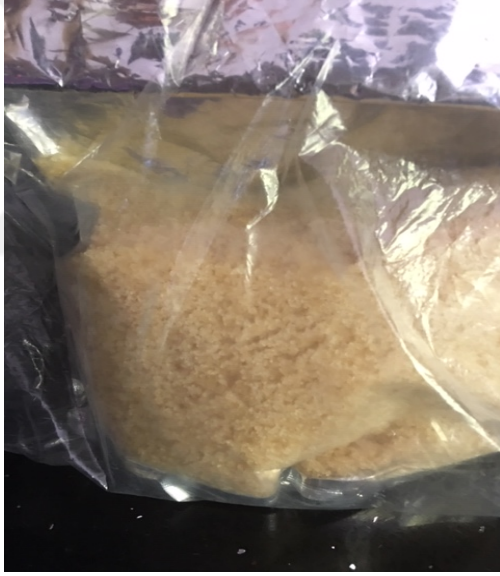
Tablo 5.3.4.1. Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Quick Metodu

	Denet tüpü içine
Tromboplastin (doku faktörü)	0,1 ml(100 $\mu\text{L}$ )
	2 dakika inkübe edilir.
Plazma	0,1 ml(100 $\mu\text{L}$ )
	Vortexle 1 dakika inkübe edilir.
0.02 M'lık $\text{CaCl}_2$ Çözeltisi	0,1 ml(100 $\mu\text{L}$ )
Pıhtı oluşumu için geçen süre	Kronometre ile tayin edilir.

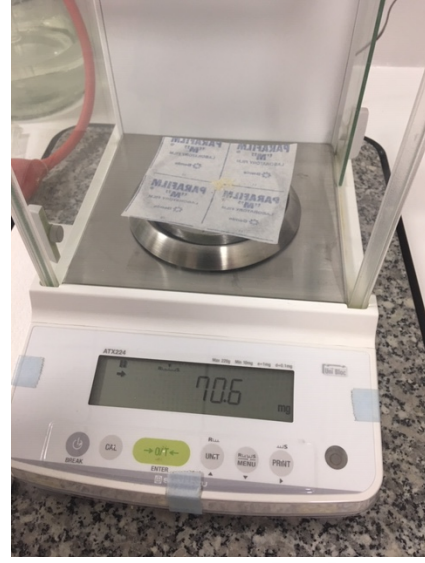
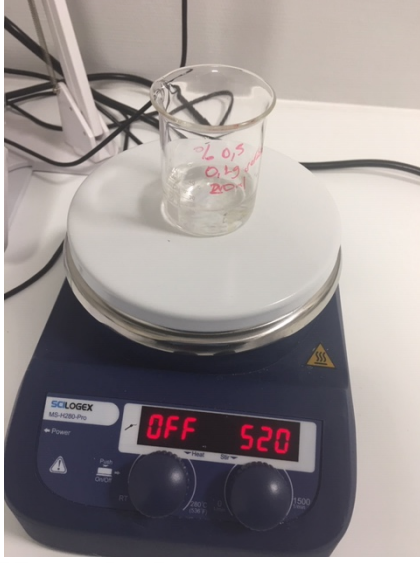
Tüm çalışma 37 °C'lik su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Pıhtılaşma süresi saniye olarak ölçülmüştür.

#### **5.4. Sığır Jelatinin Çözeltisinin Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testi**

Sığır jelatini (SJ) Tuzla/İstanbul Halavet Gıda Deri Sanayi Organizatör merkezinden hazır toz şeklinde satın alınmıştır (Resim 5.4.1.). Sığır jelatini %0,05-2,5 (w/v) aralığında olacak şekilde toplam 14 konstantrasyonlarda jelatin miktarları hesaplandı (Tablo 5.4.1.). Hassas terazide tartıldı ve 10 mL serum fizyolojikte çözüldü. Otomatik manyetik karıştırıcıda sıcaklık 37 °C'nin üstüne çıkmayacak şekilde çözdürüldü (Resim 5.4.2.). Çünkü protein yapıda olduğundan protein denatürasyonu olmamalıdır. Çözeltiler her deney için taze hazırlandı. Jelatin miktarı arttıkça çözünme süreside artmıştır.



**Resim 5.4.1.** Sığır Jelatini



**Resim 5.4.2.** Jelatinin tartımı ve çözündürme görüntüleri

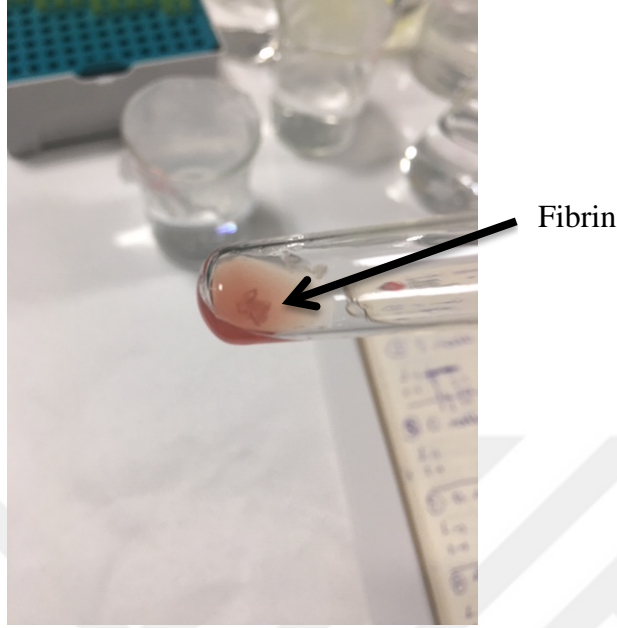
**Tablo 5.4.1.** Sığır Jelatini Konsantrasyonları ve Miktarları

Sığır jelatini konsantrasyonları %(w/v)	Sığır jelatini miktarları (mg)
0,05	5
0,1	10
0,2	20
0,3	30
0,4	40
0,5	50
0,6	60
0,7	70
0,8	80
0,9	90
1	100
1,5	150
2	200
2,5	250

Sığır jelatini ilavesi ile protrombin zamanı ölçümü;

Sığır jelatinin polimerleşme özelliğinden kaynaklı belli konsantrasyonlarda çalışıldı. PT testi ile ölçülen pıhtılaşma proteinlerinin karboksilasyonuna olası etkisi incelenirken, kan plazmasınının (9ml kan + 1 ml % 3.8'lik sitrat) yani kanın

antikoagülana oranı 9:1 olduğundan, bundan ötürü çalışmamızda jelatin ve mineralli sularının 9:1 oranı uygulanacak şekilde planlanmıştır (Tablo 5.4.2.).



**Resim 5.4.3.** Fibrin oluşumu

**Tablo 5.4.2.** Sığır Jelatini İlavesi ile PTZ Testi Protokolü

	Denet tüpü içine
Tromboplastin (doku faktörü)	0,1 mL (100 µL)
	2 dakika inkübe edilir.
Plazma	0,09 mL(90 µL)
Sığır Jelatini (çözünmüş)	0,01 mL (10 µL)
	Vortexle 1-2 dakika inkübe edilir.
0.02 M'lık CaCl <sub>2</sub> Çözeltisi	0,1 mL (100 µL)
Pıhtı oluşumu için geçen süre	Kronometre ile saniye olarak ölçülür

Her deney 3 tekrar yapıldı ve ortalaması alındı. Jelatin çözeltileri taze hazırlandı. Tüm malzemeler 37 oC lik su banyosundadır.

### 5.5. Mineral Sularının Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testi

Çalışmamızda kullanılan mineral sularını (MS), yerli ve yabancı dahil olmak üzere piyasada bulunan en çok tercih edilen 13 farklı çeşit temin edildi. Mineral suları sıvı olduğundan deneye direkt olarak kullanıldı. Çalışma için belli kodlamalar yapıldı. Bu kodlar: MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9, MS10, MS11, MS12 ve MS13 şeklindedir. Kalsiyum ve potasyum içerikleri aşağıda gösterilmiştir.

**Tablo 5.5.1.** Mineralli Suların Kalsiyum ve Potasyum miktarları

Mineralli Sular	Kalsiyum	Potasyum
MS1	326 mg/L	53,6 mg/L
MS2	235,5 mg/L	63,01 mg/L
MS3	49,5 mg/L	15,12 mg/L
MS4	393 mg/L	5,36 mg/L
MS5	173 mg/L	0 mg/L
MS6	288,9 mg/L	8,23 mg/L
MS7	153,3 mg/L	28,2 mg/L
MS8	116,8 mg/L	10,68 mg/L
MS9	22,8 mg/L	0,4 mg/L
MS10	160 mg/L	0,9 mg/L
MS11	164 mg/L	2,2 mg/L
MS12	101,99 mg/L	22,79 mg/L
MS13	53,8 mg/L	96,3 mg/L

Minerali suların ilavesi ile protrombin zamanını ölçümü;

Mineral suları rengi berrak ve sıvı olduğu için herhangi bir muameleden geçmeden direkt kullanıldı. Yine aynı şekilde plazma içerisinde kanın antikoagülana oranı 9:1 şekline planlanmıştır (Tablo 5.5.2.).

**Tablo 5.5.2.** Mineral Suların İlavesi ile PTZ Testi Protokolü

	Denet tüpü içine
Tromboplastin(doku faktörü)	0,1 mL(100 µL)
	2 dakika inkübe edilir.
Plazma	0,09 mL (90 µL)
Mineral Suyu	0,01 mL(10 µL)
	Vortexle 1-2 dakika inkübe edilir.
0.02 M'lık CaCl <sub>2</sub> Çözeltisi	0,1 mL (100 µL)
Pıhtı oluşumu için geçen süre	Kronometre ile saniye olarak ölçülür

Her deney 3 tekrar yapıldı ve ortalaması alındı. Tüm malzemeler 37 oC lik su banyosundadır.

### **5.6. Sığır Jelatinin ve Mineral Suların Karışımlarının Kombinasyonların Hazırlanması ve Protrombin Zamanı Testin Ölçülmesi**

Sığır jelatini (SJ) ve mineral sularının (MS) kombinasyonu için jelatinimiz mineral sularında çözdürüldü. Çünkü çalışma esnasında protrombin zamanı (PT) ölçümünde görüldü ki, mineral ve jelatin deney tüpüne ayrı ayrı eklenip 1 dakika inkübe edildikten sonra deney aşamasının son eklenen CaCl<sub>2</sub> (0,02 M) deney tüpüne koymadan pıhtılaşma sisteminin başlatıldığı görülmüştür. Mineral sularının kalsiyum minerali bulunduğundan pıhtılaşmayı daha erken başlattığı kansına varılmıştır. Normalde Quick metodunda CaCl<sub>2</sub> (0,02 M) eklendikten sonra pıhtılaşma sistemi başlanır.

Bu metoda aykırı bir durum olacağından mineral sularının yani SF yerine mineral suları kullanıldı. Terazide tartılan sığır jelatini ve mineral suyunu behere koyuldu. Manyetik karıştırıcıda jelatin çözünene kadar 37 derecede beklenildi (Tablo 5.6.1.).

**Tablo 5.6.1.** Mineral Suları ve Sığır Jelatini Karışım Kombinasyonları

Mineralli suları (mL)	Kullanılan SJ konsantrasyonları (w/v)
MS1	%0,05-%2,5
MS2	%0,05-%2,5
MS3	%0,05-%2,5
MS4	%0,05-%2,5
MS5	%0,05-%2,5
MS6	%0,05-%2,5
MS7	%0,05-%2,5
MS8	%0,05-%2,5
MS9	%0,05-%2,5
MS10	%0,05-%2,5
MS11	%0,05-%2,5
MS12	%0,05-%2,5
MS13	%0,05-%2,5

Mineralli suların- sığır jelatini kombinasyon ilavesi ile protrombin zamanı ölçümü;

**Tablo 5.6.2.** Sığır Jelatini - Mineral Suları Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Testi Protokolü

	Denet tüpü içine
Tromboplastin(doku faktörü)	0,1 mL (100 µL)
	2 dakika inkübe edilir.
Plazma	0,09 mL (90 µL)
SJ – Mineral suyu karışım kombinasyonu	0,01 mL (10 µL)
	Vortexle 1-2 dakika inkübe edilir.
0.02 M'lık CaCl <sub>2</sub> Çözeltisi	0,1 mL (100 µL)
Pıhtı oluşumu için geçen süre	Kronometre ile tayin edilir.



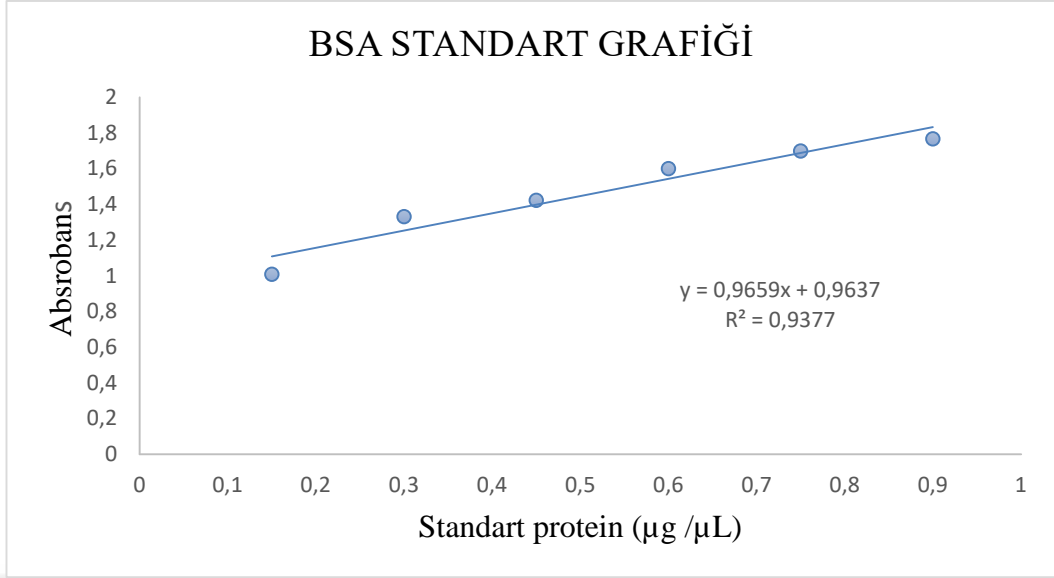
## 5.7. Bradford Yöntemi ile Protein Ölçümü (50)

Bunun için bradford yöntemini kullanıldı. Sığır serum albümini (BSA) standart protein olarak kullanıldı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiğinin eğrisi hazırlandı. Kör için distile su kullanıldı. Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktifi bu yöntemde negatif yüklüdür ve proteindeki pozitif yüke bağlanıp oluşan mavi renkin absorbansı 595 nm’de okunur değeri verir. Aşağıda bradford reaktifinin hazırlanışı gösterilmiştir.

Bradford protein tayini için reaktif 250 mL’ lik balon jode hazırlandı.

10 mL etanol %99.8	
20 mg Coomassie Brilliant Blue G 250	
	Behere konup vortexte karıştırıldı
20 mL fosforik asit	Vortete karıştırıldı
200 mL	Tamamlanana kadar dH <sub>2</sub> O eklendi Üstü parafilmle kapatılıp +4 buzdolabına konuldu.

Daha sonra BSA standart eğrisinin hazırlanmasında farklı konsantrasyonlarda protein tayini ölçümü yapıldı. Bunun için öncelikle BSA’yı 0.01 M ph:7,4’lük fosfat tampon tuzunda çözdürdük ve daha sonra bu stoktan 6 farklı konstantrasyonlarda ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) seyreltme yaparak spektrofometrede 595 nm de okundu. Aşağıda BSA standart eğiri grafiği gösterilmiştir.



**Şekil 5.7.1.** Bovin Serum Albümin (BSA) Standart Eğirisi

Poliakrilamid elektroforezi için örneklerimiz DF ve sığır jelatinidir. Protein tayini için BSA standart eğirisinden yararlanarak konsantrasyonları bulundu. Bunun içinde 5.3.10.'da anlatıldığı şekilde DF hazırlanıp ve sığır jelatini ise %1, %0,9 ve %0,8(w/v) konsantrasyonları hassas terazide ölçülüp 10 mL distile suda çözüldürüldü (37 derecede). Seçilen bu jelatin konsantrasyonlarının hem absorbans değerleri hem de jelatinin polimerleşme özelliğinden kaynaklı jel elektroforezi için uygunluğuna karar verildi. Daha sonra örnek: bradford reaktifi oranı 1:24 olacak şekilde spektrofotometrede 595 nm ayarlanıp absorbansı ölçüldü.

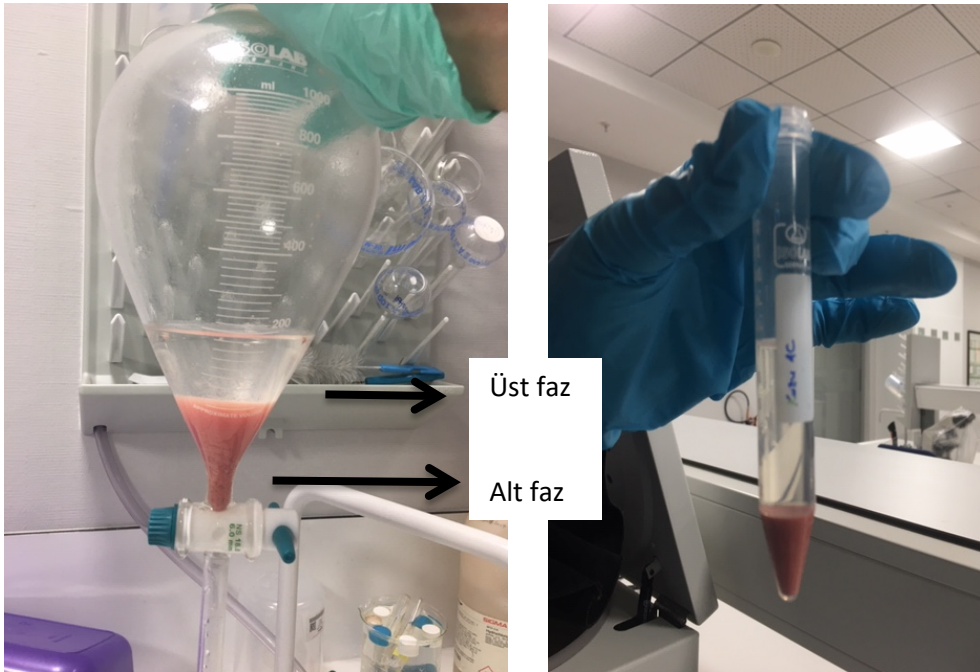
### 5.8. Sığır Jelatininin Poliakrilamid (SDS-PAGE) İçin Örnek Hazırlanması

Sığır jelatininin protein tayini yapıldı. Poliakrilamid jel elektroforez için jelatin konsantrasyonları % 1 ve % 0,9 ve % 0,8 (w/v) olarak seçildi. Poliakrilamid jel yükleme için 40 mikrogram protein içerikli olacak şekilde örnek:leamli oranı 22:5 olacak eppendorfa konulur. Proteinlerin denaturasyonu için 5 dakika 95-100 derecede ısıtıldı ve sonra eppendorflar buz üzerine konuldu. Bu şekilde örneğimiz yükleme için hazır hale gelmiştir.

## 5.9. Tromboplastin SDS-PAGE İçin rnek Hazırlanması

Akciğer dokusundan elde ettiğimiz tromboplastini (DF) ve jelatin zeltisini oda sıcaklığına getirildi. Tromboplastin 4 ml kadar ayırma hunisine konulup ve yaklaşık 3 katı kadar aseton eklendi. İyice çalkalandıktan sonra st ve alt faz oluştu. Amaç burada proteini diğer maddelerden ayırmaktı. st fazı alarak asetonu uzaklaştırıldı. Alt faza yani ken kısma biraz distile su eklendi. Tekrar oluşan çökeltiyi falkon tüpüne alarak 2000 rpm'de 1-2 dk santrifüj edilir. Pipetaj yapılarak filitreden geçirilir.

Daha sonra Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktifi ile hazırladığımız solüsyonla DF: Rektif oranı 1:24 şelinde küvete koyup spektrofotometrede 595 nm'de absorbansına bakıldı. Poliakrilamid jel elektroforez için örnek hazırlamada 40 mikrogram protein içerikli olacak şekilde DF: yükleme tamponu(leamli) oranı 25:6 eppendorfa koyulur. Protein denaurasyonu için 5 dakika 95-100 kuru ısıtıcıda bekletilir ve eppendorf buz üzerine konulur. Bu şekilde örneğimiz yükleme için hazır hale gelmiştir. Aşağıda tromboplastinin ekstraksiyon işlemi gösterilmiştir.



**Resim 5.9.1.** Tromboplastinin ekstraksiyon görünümü

## **5.10. Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) İçin Jellerin Hazırlanması ve Yapılışı**

SDS-PAGE için jel çözeltileri aşağıda tabloda gösterilmiştir.

### **Tris Baz-1 (1M, pH=6,8) özeltinin hazırlanması**

6,05g TRIS

50mL dh20

+4°C muhafaza edilir.

PH ayarlamak için: HCL ekle..

### **Tris Baz-2 (1,5M, pH=8,8) özeltinin hazırlanması**

9,08g TRIS

50mL dh20

+4°C muhafaza edilir.

PH ayarlamak için: HCL ekle..

### **SDS (%10'luk)'nin hazırlanması**

5g SDS

50mL dh20

### **Akrilamid-Bisakrilamid (%30'luk)'in hazırlanması**

15g akrilamid (%30)

0,4g bis-akrilamid (%0,8)

50mL dh20

+33°C'de özdürölür.

**APS (%10)'nin hazırlanması. Taze hazırlanmalı ve en son eklenmelidir.**

11mg APS

110uL dh20

TEMED hazır ambalajından kullanılır.

### **Yürütme tamponu (1X)**

Satın alınarak kullanıldı.

### **Laemmlı (yükleme tamponu)**

Satın alınarak kullanıldı.

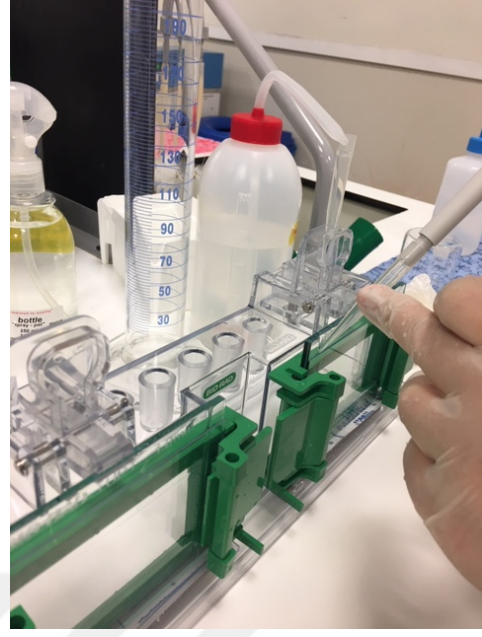
**Tablo 5.10.1. SDS-PAGE İçin Jel Miktarları**

<b>Ayrırma jeli için (alt faz)</b>	<b>% 12</b>
DS(distile su)	4,5 mL
Akrilamid- bisakrilamid (mL) (%30)	6 mL
1,5M'lık Tris HCl pH (8.8)	3,75 mL
% 10'luk SDS (uL)	150
% 10'luk APS (uL) *	900
TEMED (uL) *	6

<b>Yürütme jeli (üst faz)</b>	<b>%4,5</b>
DS (mL)	4.5
%30'luk akrilamid-bisakrilamid (mL)	1,34
1M'lık Tris HCl pH 6.8 (mL)	1
% 10'luk SDS (uL)	80
% 10'luk APS (uL)*	80
TEMED (uL)*	8

\* taze hazırlanmalı ve jeli dökme sırasında eklenmelidir. Temed hazır paketten kullandı.

Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için %12 lik ayırma jeli, %4,5 lik yürütme jeli kullanıldı. Şekil 5.3.11.' de tarife göre jeller hazırlanmalıdır. Ayırma jeli alt fazdır. İlk olarak jel haznesine yaklaşık 5 mL kadar yavaşça iki cam arasına ince uçlu pipetle ayırma jeli dökülür. APS ve TEMED en son eklenmelidir. Jelin üzerini kapatacak şekilde isopropanol eklenir. Çünkü jelin üzeri düz olmalıdır. 30-35 dk kadar bekletilir. Daha sonra donan jelin üzerindeki isopropanol dökülür ve filtre kağıdı ile kalan su temizlenmeli ve üst faz olan yürütme jeli eklenmelidir. APS ve TEMED en son eklenmelidir. Yürütme jeli cam izasına kadar eklenmelidir daha sonra tarak ili cam arasına yavaşça yerleştirilir. 30-35 dk bekletilir. Tarak yavaşça çıkartılır. Daha sonra kuyucuklarda oluşan kabarcıkları için yürütme tamponu ile kuyucuklar yıkanmalıdır. İki jel arasındaki boşluğa yürütme tamponu kuyucukların üstü kapatacak kadar dökülür. İlk kuyucuğa marker yüklenecek şekilde DF, sığır jelatini örnekler yüklenir. Yürütme tamponu 3/5'i dolacak şekilde tankın içerisine dökülür. Tankın kapağı kapatılır + ucu ve – ucu üst üste gelecek şekilde yerleştirilir. Diğer ucu ise güç kaynağına takılır. Bio-Rad cihazında ilk 70 voltaj ile başlatıldı. Yürütme fazı geçtikten sonra voltaj 110 a çıkartıldı. Yaklaşık olarak 1-1,5 saat proteinler yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra tankın kapağı açılıp cam aparatları çıkartıldı. Jel plakları bir alet yardımıyla ayrıldı. Çıkarılan jel bir düzgün bir kaba konulup üzerine hazırlanan boyama tamponu dökülüp ve 20 dk bekletildi. Daha sonra boyama tamponu dökülür ve yıkama tamponu ile boya çıkartıldı. Boyama tamponu bantların renklerini netleştirmek için kullanılır. Yıkama tamponu bir gece bekletildi. Aşağıda SDS-PAGE güç kaynağı, yürütme tankı ve ait görüntüsü bulunur.



**Resim 5.10.1.** Elektrofrez g¼ç kaynağı ve cam aparatı

## 6. BULGULAR

Protrombin zamanı testi koagülasyon kaskadında ekstresek yolun göstergesi kabul edilir. Quick (1935) yöntemi ile invitro ortamda yapılır. Bu çalışmamızda mineralli suların ve sığır jelatininin ekstresek pıhtılaşma sistemine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### 6.1. Tromboplastin (TF) Aktivitesinin PTZ Testi Değeri

Kuzu akciğer dokusundan elde ettiğimiz doku homojenatı (4) alıodlanarak -80 °C'de saklanılmıştır. 120 gram kuzu akciğerinden tromboplastin (DF) elde edilmiştir. Protrombin zamanı testi (PTZ) Quick (1935) metoda göre yapıldı. Hazırladığımız tromboplastinin yani doku faktörünün aktivite değeri aşağıdaki gibidir.

**Tablo-6.1.1.** Tromboplastin aktivitesinin PTZ Değeri

	1.deney	2.deney	3.deney	Ortalama
PT (sn)	18 sn	16 sn	17 sn	17 sn

PTZ testi sonucu laboratuvar ortam ve *in vitro* olarak yapılan deney göz önünde bulundurularak PTZ testi 17 saniye olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak aynı şekilde PT testi Quick (1935) metodu uygulandı. Kanda plazmanın sitrat oranı 9:1 olacak şekilde plazma 0,09 mL (90 µL) ve serum fizyolojik (SF) 0,01 mL (10 µL) denet tüpüne alınarak tayin edildi. Aşağıda kontrol grubu PT testi değerleri ve ortalaması görülmektedir.

Kontrol	1.deney	2.deney	3.deney	Ortalama
PT (sn)	23 sn	30 sn	27 sn	27 sn

Kontrol grubumuz PT testi 27 saniye olarak tüm çalışmamız için kabul edilmiştir.

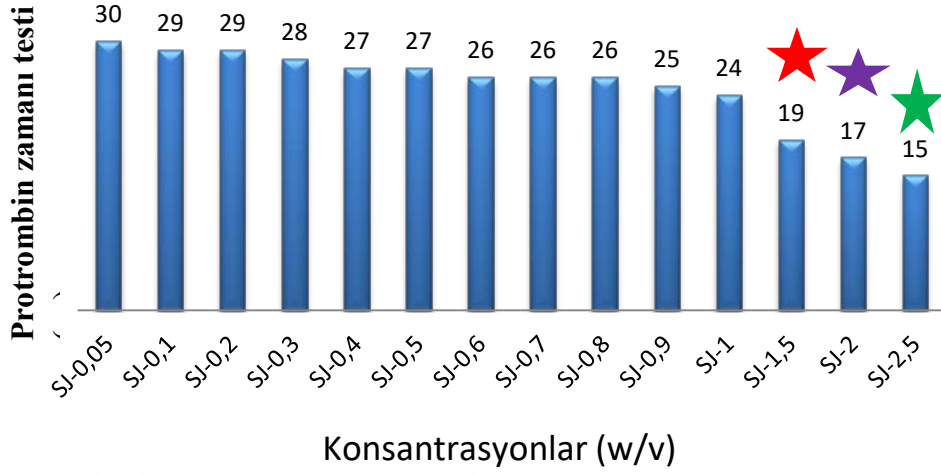


## 6.2. Sığır Jelatinin PTZ Etkisi

Çalışmamızda sığır jelatini (SJ) serum fizyolojik (SF)'de çözdürülmüştür. Her çözelti konsantrasyonu taze hazırlandı. Jelatinin sıvı ortamda polimerleşme ve kıyım arttırıcı özelliğinden kaynaklı olduğundan çalışmada %0,05-%2,5(w/v) arası konsantrasyonlar kullanıldı. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı ve ortalaması alındı. Quick(1935) Metoduna göre SJ protrombin zamanı testi yapıldı.. Aşağıdaki sığır jelatinin PT testi etkisi ve grafiği gösterilmiştir.

**Tablo 6.2.1.** Sığır Jelatininin SF'de Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Etkisi

Sığır Jelatini Konsantrasyonları (w/v)	Protrombin Zamanı (PT) (sn)
%0,05	30
%0,1	29
%0,2	29
%0,3	28
%0,4	27
%0,5	27
%0,6	26
%0,7	26
%0,8	26
%0,9	25
%1	24
%1,5	19
%2	17
%2,5	15
<b>Toplam değerlerin ortalaması</b>	<b>24,85714</b>



**Şekil 6.2.1.** Sığır Jelatinin SF’de Protrombin Zamanı Testi (PTZ) Etkisi

Yukarıdaki Şekil 6.2.1.’de sığır jelatininin konsantrasyonu arttıkça PT testinde sürenin kısaldığı yani pıhtılaşma arttığı görüldü. Jelatin konsantrasyonlarından % 1 ile %2,5 arasındaki jelatin konsantrasyonları PT değeri 19,17 ve 15 saniye çıkmıştır. Buda pıhtı oluşumunun en yüksek düzeyde olduğu gösterir. %1’lik jelatin konsantrasyonundan düşük olanlar ise PT değeri büyük çıkmıştır.

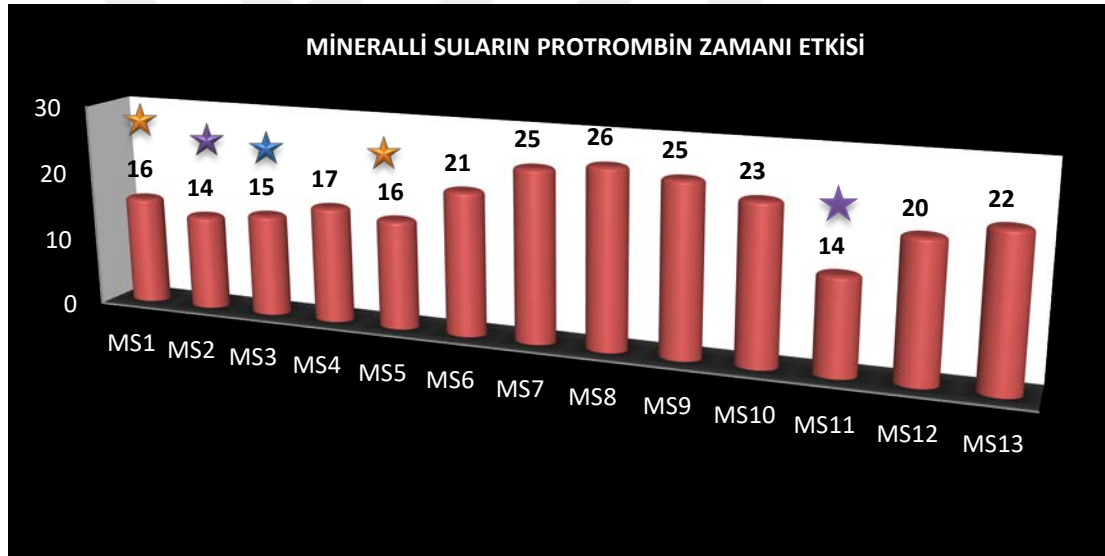
### 6.3. Mineralli Suların Protrombin Zamanı (PTZ) Etkisi

Mineral sularının PT testinde 9:1 oranını koruyarak Quick (1935) metodu kullanılmıştır. Mineralli suların PTZ etkisine ayrı ayrı bakılmıştır. Aşağıdaki tabloda mineralli suların protrombin zamanı testin etkisi ve grafik şekli gösterilmiştir.

**Tablo 6.3.1.** Mineralli Suların Protrombin Zamanı (PTZ) Etkisi

Mineralli Suların Kodları	Protrombin Zamanı testi (PTZ) (Saniye)
MS 1	16
MS 2	14
MS 3	15
MS 4	17
MS 5	16
MS 6	21
MS 7	25
MS 8	26
MS 9	25
MS 10	23
MS 11	14
MS 12	20
MS 13	22
Toplam değerlerin ortalaması	19,76923

Tabloya baktığımızda PTZ'nin ortalaması yaklaşık olarak 20 sn dir.



**Şekil 6.3.1.** Mineralli Suların PT Testi Değerler Grafiği

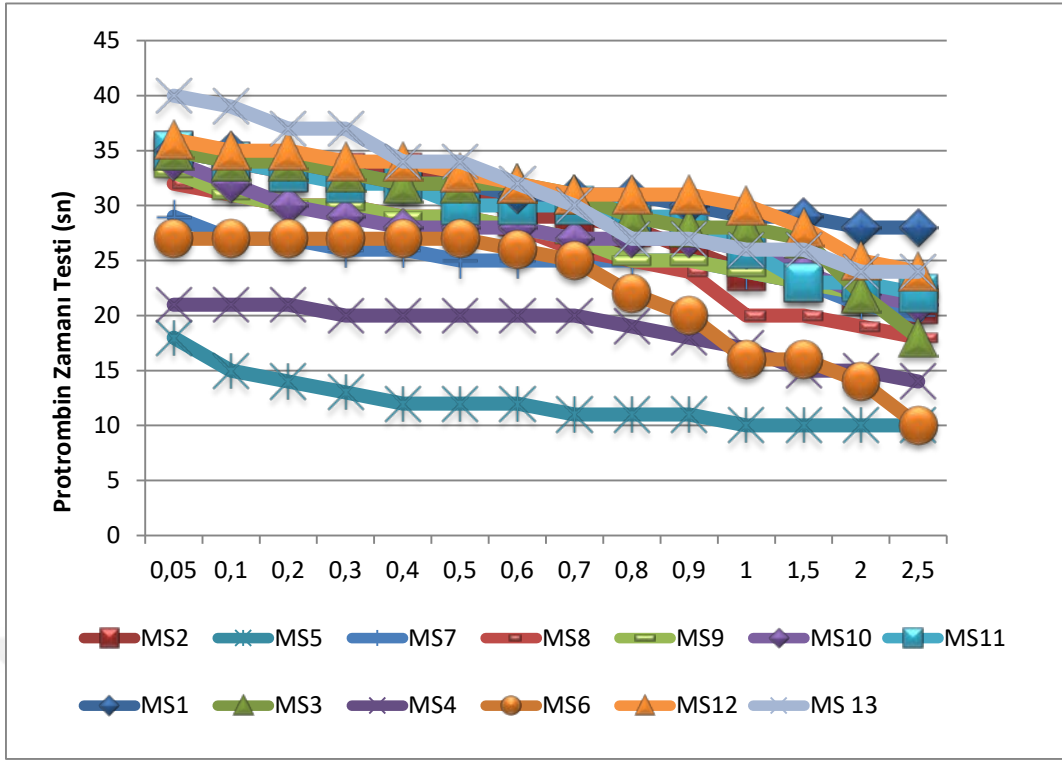
PT sonuçlarına bakıldığında yıldızlı olarak işaretlenen mineralli suların (MS) 5'inin pıhtı oluşumunu arttırdığı ve protrombin zamanları küçükten büyüğe doğru 14,15,16, ve 17 saniye olarak ölçüldü. Diğer mineralli suların PTZ değerlerinde ise pıhtı oluşumunun geciktirdiği görüldü.

#### 6.4. Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonu ile PT Testin Değerlendirilmesi

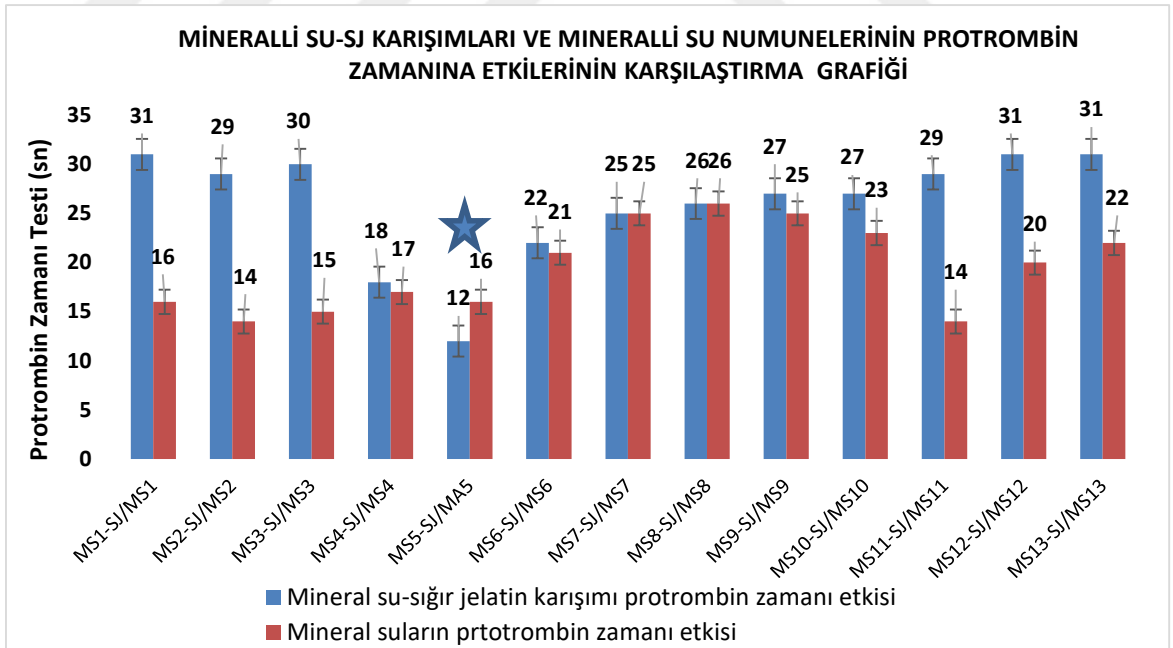
Sığır jelatini (SJ)- mineralli suların karışımlarının kombinasyonları ile PT testinde yine aynı şekilde Quick (1935) metoduna göre yapıldı. Karışık kombinasyonu ilavesinde jelatinin tüm konsantrasyonların (Tablo 6.4.1.) PTZ etkisine bakıldı (Şekil 6.4.2).

**Tablo-6.4.1.** Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Etkisi

%(w/v)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,5	2	2,5	Std	Ort(sn)
MS1-SJ	35	35	34	33	32	32	31	31	31	30	29	29	28	28	± 2,36736	31
MS2-SJ	35	34	33	33	33	32	29	29	28	26	24	23	22	21	± 4,810702	29
MS3-SJ	35	34	34	33	32	32	32	31	29	28	28	27	22	18	± 4,829511	30
MS4-SJ	21	21	21	20	20	20	20	20	19	18	17	15	15	14	± 2,437121	18
MS5-SJ	18	15	14	13	12	12	12	11	11	11	10	10	10	10	± 2,30265	12
MS6-SJ	27	27	27	27	27	27	26	25	22	20	16	16	14	10	± 5,937865	22
MS7-SJ	29	27	27	26	26	25	25	25	25	25	24	23	21	20	± 2,34872	25
MS8-SJ	32	31	30	30	29	29	28	26	25	24	20	20	19	18	± 4,838604	26
MS9-SJ	33	31	30	30	29	29	28	27	25	25	24	23	22	22	± 3,53009	27
MS10-SJ	34	32	30	29	28	28	28	27	27	27	26	24	22	21	± 3,499608	27
MS11-SJ	35	34	33	32	32	30	30	30	29	29	26	23	23	22	± 4,18527	29
MS12-SJ	36	35	35	34	34	33	32	31	31	31	30	28	25	24	± 3,65023	31
MS13-SJ	40	39	37	37	34	34	32	30	27	27	26	26	24	24	± 5,659282	31



Şekil 6.4.1. Sığır Jelatini – Mineralli Suların Karışımlarının Kombinasyonlarının PTZ Grafığı



Şekil 6.4.2. Mineralli Su-SJ Karışımları ve Mineralli Su Numunelerinin Protrombin Zamanına Etkilerinin Karşılaştırma

Mineralli Su-SJ karışımlarının kombinasyonu PTZ testin etkisinde yıldız olarak işaretlenen MS5-SJ'de 12 saniye olarak ölçülmüştür. Ardından 18 sn olan MS4-SJ' gelir. Mineralli su ve sığır jelatini karışım kombinasyonunda PTZ etkisinde MS5 suyun pıhtı oluşumunda sinerjst etki görüldü, diğer mineralli sular ise pıhtı oluşumuna antagonist etki gösterdi.



## Spearman Sıra Korelasyon analizi

	0,05d	0,1d	0,2d	0,3d	0,4d	0,5d	0,6d	0,7d	0,8d	0,9d	1d	1,5d	2d	2,5d	Minsjort	minsuort	kalsiyum	potasyum	
Spearman's rho	0,05d	1,000																	
	0,1d	,983**	1,000																
	0,2d	,982**	,985**	1,000															
	0,3d	,968**	,966**	,986**	1,000														
	0,4d	,966**	,950**	,962**	,987**	1,000													
	0,5d	,968**	,966**	,986**	1,000**	,987**	1,000												
	0,6d	,961**	,957**	,987**	,968**	,941**	,968**	1,000											
	0,7d	,921**	,931**	,945**	,912**	,884**	,912**	,965**	1,000										
	0,8d	,876**	,888**	,873**	,832**	,828**	,832**	,884**	,959**	1,000									
	0,9d	,883**	,887**	,869**	,806**	,797**	,806**	,877**	,946**	,976**	1,000								
	1d	,862**	,867**	,864**	,789**	,756**	,789**	,871**	,934**	,940**	,975**	1,000							
	1,5d	,850**	,875**	,871**	,806**	,751**	,806**	,862**	,916**	,896**	,922**	,966**	1,000						
	2d	,912**	,932**	,897**	,854**	,841**	,854**	,862**	,909**	,906**	,936**	,924**	,904**	1,000					
	2,5d	,820**	,844**	,791**	,760**	,759**	,760**	,722**	,767**	,772**	,817**	,806**	,804**	,957**	1,000				
	minsjort	,961**	,974**	,971**	,938**	,917**	,938**	,961**	,976**	,949**	,953**	,945**	,933**	,956**	,849**	1,000			
	minsuort	-,256	-,247	-,223	-,232	-,263	-,232	-,271	-,344	-,387	-,302	-,206	-,112	-,210	-,039	-,259	1,000		
	kalsiyum	-,412	-,319	-,430	-,415	-,391	-,415	-,456	-,361	-,216	-,284	-,361	-,376	-,279	-,282	-,352	-,403	1,000	
	potasyum	,610*	,641*	,635*	,667*	,640*	,667*	,567*	,505	,505	,435	,444	,546	,504	,451	,571*	-,099	-,022	1,000

\*\* (p<0.01 anlamlıdır)

\* (p<0,05 anlamlıdır)

IBM SPSS 23.0 versiyonunda Spearman kolerasyon analizi yapıldı. Protrombin zamanı testi değerlerin değişkenler arasında ilişkilere bakıldı. Bu değişkenler mineralli suların ve sığır jelatininin kombinasyonu, kalsiyum ve potasyum mineral miktarları ile PTZ değerleri arasında ilişkilere bakıldı. SPSS spearman kolerasyon analizinde mineralli suların PTZ etkisi ile kalsiyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Mineralli su-jelatin kombinasyonu ile pıhtı oluşumu yönünden potasyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda mineralli su- sığır jelatini kombinasyonlarında pıhtı oluşumu yönünden jelatin konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,01$ ).

## 6.5. Tromboplastin (DF) ve Sığır Jelatinin Poliakrilamid (SDS-PAGE )

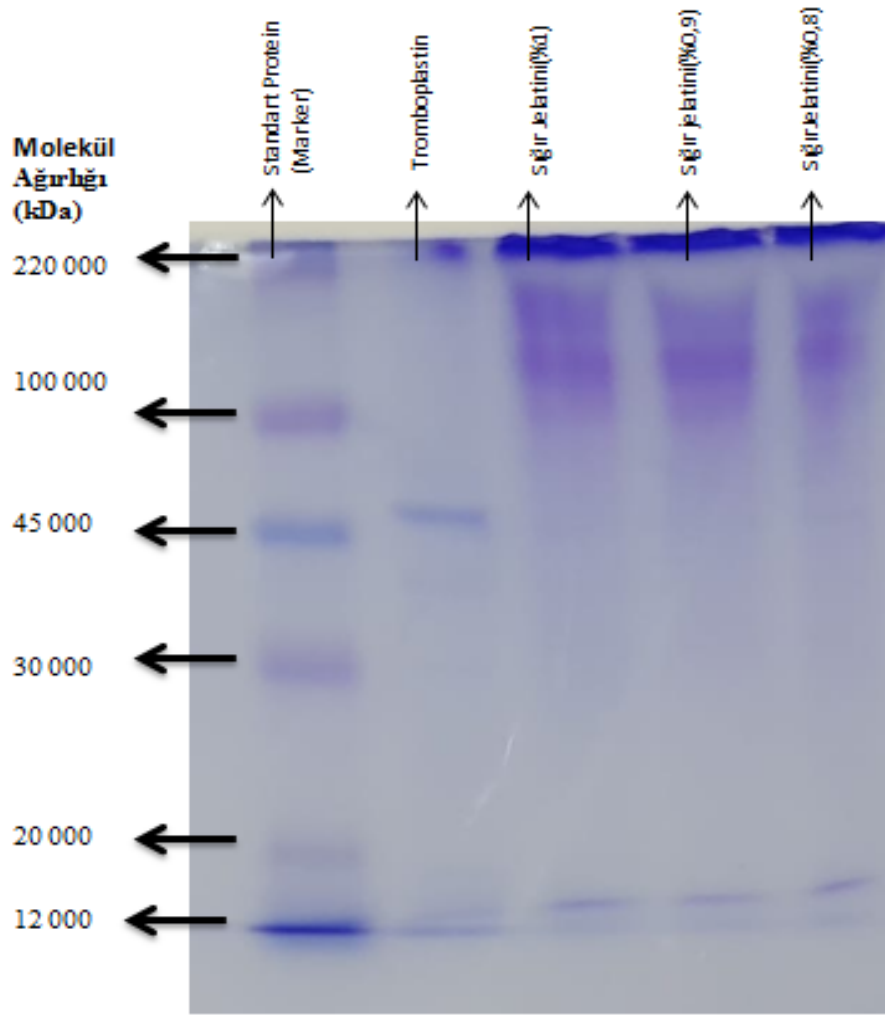
### Değerleri

Kuzu akciğer dokusundan elde ettiğimiz tromboplastin ve sığır jelatininin poliakrilamid jel elektroforezi ile az sayıda protein bandı elde edildi. Standart olarak kullanılan marker molekül ağırlığı (220,000-8.000 kDa) protein ile mukayese edildiğinde proteinlerin molekül ağırlıklarının 220 ile 45 kDa arasında görülmüştür. Aşağıda tromboplastin ve jelatin protein değerleri ve poliakrilamid jel görüntüsü gösterilmiştir.

**Tablo 6.5.1.** Bradford Yöntemi ile Doku Faktörü ve Sığır Jelatinin Protein Tayini

Örnek Proteinler	Absorbans (595nm)	Konsantrasyon( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )
Tromboplastin (DF)	1,094	0,135
% 1(w/v) jelatin	1,276	0,323
% 0,9 (w/v) jelatin	1,263	0,310
% 0,8(w/v) jelatin	1,248	0,294





**Resim 6.5.1.** Poliakrilamid (SDS PAGE) Jel Elektroforezi

## 7. TARTIŞMA

Travma nedeniyle kontrol edilemeyen kanamalar toplumun her kesiminde görülür. Savaş ya da çeşitli çatışmalarda acil önlem gerektiren bu durumlar daha büyük önem taşır. Bu nedenle bilim insanları tarih boyunca kanamayı durduran ve de özellikle çabuk durduran buluşlara yönelmişlerdir.

Bağ dokusunun temel proteini olan kollajen kan damarlarının yüzeyini kaplayan endotel hücrelerinin altındaki tabakada bulunur. Kan endotel kaplı damarlarda dolaştığı sürece pıhtılaşma olmaz. Çünkü endotel hücreleri dünyanın en üstün fabrikasından daha üstün yeteneklere sahiptir. Bu nedenle endotelde dolaşan kan pıhtılaşmaz. Endotel hasarı gerçekleştiğinde endotelin alt katmanlarında bulunan kollajen ile karşılaşan kan pıhtılaşır böylece kanın dışarıya akması önlenmiş olur. Ancak pıhtılaşmanın gerçekleşmesi için kandaki iyonize kalsiyuma ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasının tez başlığı olan mineralli sular ve jelatin bu bilgiler ışığında incelenmiştir (1, 16,20,21,37,39).

Bu çalışmanın amacı mineralli suların ve sığır jelatininin ekstresek sistem göstergesi olan PTZ testinin laboratuvar şartlarda in vitro olarak ekstresek pıhtılaşma sistemine etkisini incelemektir.

Hayvan proteinlerinin yaklaşık % 60'nı oluşturan kollajenden üretilen jelatin insan beslenmesinde kıvam artırıcı olarak kullanıldığı için en sık kullanılan ürünler arasında yer alır. 2011 yılında dünyada yaklaşık 300 bin ton civarında üretilen jelatinin bugünkü üretimi muhtemelen çok daha fazla artmıştır.Ülkemizde yine 2011 verilerine göre, yılda 5000 ton civarında jelatin kullanılmakta ve bunun tamamı ithal edilmektedir (16). Jelatinin oluşturduğu saydam, renksiz, kokusuz ve ağızda kolayca eriyen jel yapı nedeniyle tercih edilen, çeşitli kimyasal yöntemler kullanılarak kollajenden izole edilen doğal bir besin ürünüdür. Üretimini kolay olması ve hammadde sorunu olmaması nedeniyle ucuz fiyatla temin edilebilmektedir. Müslüman ve Musevi tüketicilerin domuz ürünlerinden kaçınması nedeniyle, son yıllarda jelatinin domuz dışındaki hayvansal kaynaklardan üretimi

artmıştır. Yapılan çalışmalar balık ve tavuk gibi hayvanların derisinden elde edilen jelatinin domuz jelatini kadar kaliteli olabileceğini göstermiştir (37,39).

Jelatinin diğer jelleştirici karbohidratlarla karşılaştırıldığında bazı avantajlar sağlaması nedeniyle halen tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajlar arasında, jelatinin düşük sıcaklıklarda (insan vücut sıcaklığı) kolayca eriyebilmesi ve erime ile jelleşme sıcaklığı arasında küçük fark olması en önemli kullanılma nedenleri arasındadır. Bununla birlikte jelatin suda kolay çözünür olması, tatsız ve kokusuz olması, içindeki çeşitli amino asitler olması kullanımında tercih nedenleri arasında yer alır. Ülkemiz ve diğer ülkelerde jelatin gıda olarak kabul edilmekte ve tüketimi sınırlandırılmamaktadır.

Jelatin gıdalara katkı maddesi olmanın dışında, kozmetik, ilaç, fotoğraf ve boya endüstrisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir endüstriyel bir üründür.

İnsan ve hayvan vücudunda pek çok fonksiyonları bulunan kalsiyum iyonu hemostatik sisteminin çeşitli kademelerinin de olmazsa olmazıdır. Hem trombosit fonksiyonlarında hem de pıhtılaşma sisteminin her kademesinde kalsiyum iyonuna ihtiyaç vardır. Biyokimya laboratuvar çalışmalarında kullanılan sitrat, okzalat ve EDTA gibi kimyasallar belirli konsantrasyonlarda kandaki kalsiyumu bağladıkları için antikoagulan olarak kullanılmakta, kanın pıhtılaşması önlenmekte, analizlerin plazmada yapılması mümkün olmaktadır.

Genel bilgiler bölümünde detaylı anlatılan yukarıdaki bilgiler ışığında bu çalışmadaki amacımız, mineralli suların ve jelatinin pıhtılaşma sistemine etkisini in vitro olarak incelemektir. Jelatin ve benzer ürünlerle yapılan çalışmalar pıhtılaşma ile ilgili in vivo çalışmalardır. Çalışmamız bu konuda birleştirici bir bulgu ortaya koymuştur.

Bu çalışmamızda mezbahadan taze kesilmiş kuzunun henüz doğal sıcaklığını yitirmemiş olan akciğerini, bir buz kabı içerisinde laboratuvara getirilip damarlarından ve diğer kısımlarından (bronş, zar vb.) temizlenmiştir. Homojenize edilip sonra alikodlanarak -80 °C' de saklanılmıştır. Çalışmamızda sığır jelatini ve 13 farklı mineralli suların PTZ etkisi incelenmiştir. Bu çalışmamızda jelatinin 14 farklı konsantrasyonlar da çalışıldı. Jelatin konsantrasyonları %0,05-%2,5 (w/v) arasındadır. Ayrıca mineralli suların jelatin ile karışım kombinasyonlarının PTZ testi ile değerlendirildi. IBM SPSS 23.0 versiyonunda Sperman kolerasyon analizi yapıldı. Windows microsoft excel 2010 sürümüyle verilerin standart sapmaları ortalamaları ve grafikler analiz edildi.

PTZ testi için gerekli olan doku faktörü kuzu akciğerinden elde edildi. Quick metodu ile PTZ testi 17 saniye olarak ölçüldü. Elde ettiğimiz tromboplastinin aktivitesi in vitro çalışmamız için uygun olduğu kanıtlandı.

Mineralli sular ve sığır jelatini plazmaya ilave edilip Quick metodu ile ölçülen PTZ testi ile değerlendirildi. Sığır jelatini konsantrasyonu arttıkça pıhtılaşma arttı. Jelatin konsantrasyonlarından %1 ile %2,5 arasında pıhtı oluşumunun en yüksek düzeyde olduğu görüldü. %1'in altındaki konsantrasyonlar ise pıhtı oluşumunu geciktirdiği görüldü. Minealli suların 5'inin PTZ testi 14,15 ve 16 saniye olarak ölçülüp pıhtı oluşumunun kısalttığı görüldü. Diğer mineralli suların ise pıhtı oluşumunu geciktirdiği yani inhibe etki gösterdiği görüldü. Mineralli su ve sığır jelatini karışım kombinasyonunda PTZ etkisinde MS5 suyun pıhtı oluşumunda sinerjst etki görüldü, diğer mineralli sular ise pıhtı oluşumuma antagonist etki gösterdi. SPSS spearman kolerasyon analizinde mineralli suların PTZ etkisi ile kalsiyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Mineralli su-jelatin kombinasyonu ile pıhtı oluşumu yönünden potasyum miktarları arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda mineralli su- sığır jelatini kombinasyonlarında pıhtı oluşumu yönünden jelatin konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,01$ ). Doku faktörü (DF) ve jelatinin proteinleri poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'nde protein bantlarına bakıldı. DF ve jelatinin protein bantlarının molekül ağırlıklarının SDS PAGE'de 220 ile 45 kDa arasında olduğu görüldü.

Hemostatik sistem, kanama ve pıhtılaşmayı içine alan bir kavram olup fizyolojik bir olaydır. Bu sistemde olan bazı pıhtılaşıma proteinleri, karaciğerde sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyon ile ilave bir karboksil grubu alarak pıhtılaşıma sisteminde etkin hale gelir. Bu reaksiyon için K vitamini gereklidir. Çünkü karboksilazların koenzimi K vitaminidir. 1990' lü yılların başından beri bilinen bu mekanizma tromboza bağılı MI, serebrovaskuler, periferel damar hastalığı olan kisilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kullanım esnasında da diyete dikkat çekilmektedir. Çünkü söz konusu pıhtılaşıma proteinlerine karboksil grubunun bağılanması K vitaminini gerektirir. Sentezi bağırsak bakterileri tarafından da yapılan K vitamini eksikliği, henüz bağırsakları steril olan yeni doğanda bazen kanama olarak kendini gösterir. K vitamini enjeksiyonundan sonra ilgili pıhtılaşıma proteinlerinin karboksilasyonu gerçekteşeceği için kanama durur. Bu tedavinin amacı K vitaminini baskılayarak pıhtı oluşumunu, kanamaya sebebiyet vermeden engellemektir. Tedavide kullanılan ilaçların doz ayarı ekstremek pıhtılaşıma sisteminin göstergesi olan protrombin zamanı testi (PTZ) ile Quick (1935) medonuna göre takip edilir (3).

Varfarin (Kumarin) gibi oral antikoagulanlar, kullananlarda K vitamini antagonistleri ile başarılı bir antikoagulan tedavisidir. Kanama riskini azaltan etkili bir antikoagulanlardır. Tedavi esnasında hastanın protrombin zamanı testinin (PTZ) dikkatle izlenmesi gerekir. PTZ pıhtılaşıma testi; karaciğer yetmezliğinde ve diğer hastalıklara bağılı koagülasyon bozukluklarında ve ameliyat öncesi gibi kanama riskinin tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Orjinal DF, hayvan ya da insan kaynaklı ekstraktlar ham dokudan elde edilir. Kumadin tedavisi gören hastaların K vitamini alınmasına dikkat edilmelidir. Çünkü gereğinden fazla alınır ise kumadin tedavisini antagonize edebileceğı gibi, bu gıdaların gereğinden az alınması da kumadin duyarlılığında artışa dolayısıyla aşırı antikoagülasyona neden olabilir. Bundan dolayı günlük alınacak K vitamini miktarını pek değıştirmemek uygun olur. Günlük önerilen miktar 56-80 µg dir. Fazlası sakıncalı olabilir. K vitamini yönünden zengin besinler koyu yeşil yapraklı sebzelerdir. Eğer yüksek miktarlarda K vitamini alınırsa, alternatif bir enzimatik yolak aracılığıyla varfarinin (kumarin) antikoagulan etkisini geri çevirmektedir. K vitamininin başlıca kaynakları: yeşil yapraklı sebzeler

(roka, brokoli, ıspanak, lahana gibi) dir. Bu sebzelerin tazelerinde K vitamini oranı daha fazladır (62).

Mineralli sular, uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Mineralli sular saf su niteliği taşımamaktadır. Bu mineral ve elementlerin bir kısmı, beslenme fizyolojisinde önemli yere sahiptir. Türkiye'de mineralli sular maden suyu olarak geleneksel adıyla bilinmektedir ve özellikle mide, bağırsak ve kardiyovasküler hastalıklarda iyileştirici olarak faydalanılmaktadır. Bikarbonat, sülfat, klorür, florür, magnezyum, sodyum, kalsiyum, potasyum ve demir gibi mineralleri intiva eden su, önemli bir besin ögesidir. Vücutta birçok fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli rol oynayan minerallerin günlük ihtiyacının karşılanmasında mineralli sular önemlidir (15).

Jelatin kemik, kıkırdak ve deride bulunan kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen çözünür bir proteindir. Jelatinin özellikleri hayvanın yaşına ve kollajen tipine göre değişiklik gösterir. 27 farklı kollajen tipi bulunur. En yaygın olanı bağ dokusunda bulunan tip I kollajenidir. Suda çözünmeyen kollajen asit veya baz ile muamele edilip suda çözünür formu olan jelatin elde edilir. Jelatin kollajene göre daha kullanışlıdır. Jelatin şişme ve çözünürlük yapısından dolayı jelleşme özelliği, kıvam arttırıcı ve su bağlama kapasitesi gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca emülsiyon, köpük oluşumu, adhezyon-kohezyon, koruyucu kolloid işlevi ve film oluşturma kapasitesini içeren yüzey davranışlarıyla ilgili özellikler içermektedir. Kollajen ve jelatin, beslenme veya ilaç uygulamalar için umut verici olarak sağlık alanında biyolojik etkiye sahiptir. Genellikle, kollajen ve jelatin hidrolizleri domuz veya sığır derisinden üretilir. Son yapılan çalışmalarda jelatin veya kollajen için, kıvam arttırıcı, köpürtücü ajanlar, kolloid stabilizatörler, hidrojeller, inceltici ajanlar, biyolojik olarak parçalanabilir ambalaj malzemeleri gibi ürünlerde uygulanmaktadır. Ayrıca jelatin veya kollajenler sentetik ajanların doğal ajanlara göre daha sık tercih edildiği bildirilmiştir (63).

Travma sonrası şiddetli kanama ölüm nedenlerinden bir tanesidir. Travmatik hastalarda koagülopati gelişir. Böylece pıhtılaşma faktörleri ve trombositlerin azalmasına neden olur. Koagülopati fibrin polimerizasyon bozukluğuna neden olmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan paketlenmiş kırmızı kan hücreleri, trombosit

konsantreleri ve taze donmuş plazma (TDP) kullanılır. Kullanılacak dozlar önemlidir. Chowdary ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, önerilen TDP dozlarının kritik hastalarda ciddi pıhtılaşma faktörü eksikliklerini düzeltmek için iki ya da üç katına çıkarılması gerektiği gösterilmiştir. Son yıllarda, çeşitli pıhtılaşma çalışma raporları TDP kullanımını desteklemek için tromboelastometri (TEM) metoduna dayanan algoritmaların kullanılması öne sürülmüştür. Fakat TEM teknolojilerinin doğrudan pıhtılaşma testleriyle ilişkisine bakılmamıştır(51).

Cerrahi operasyonlarda intravenöz yani hemodilüsyon (kan seyreltici) sıvılar kullanılmaktadır. Bu sıvılar kristalloid ve kolloid olmak üzere iki gruba ayrılır. Burada ki amaç, hem hastanın yeterli oksijen solunumu hemde plazma genişletici ve dolayısıyla kan hacmini yeterli düzeyde olması gerekmektedir. Aynı zamanda tedavi sürecinde pıhtılaşmayı ve sedimentasyon hızını bozulmaması gerekmektedir. Kolloid sıvılar damar içinde uzun süre kalabilme özelliğine sahiptir. Sıvı bağlama kapasitesi, ortalama molekül ağırlıkları, içlerindeki farklı moleküllerin ağırlıklarının dağılımı, kolloid madde yoğunluğu ve biyolojik yıkım şekilleri gibi özelliklere sahiptir. Günümüzde yapay kolloidler teknik olarak daha kolay olması nedeniyle özellikle hemodilüsyon sağlanması istenen durumlarda doğal kolloidlere göre çok fazla tercih edilmektedir (52). 2009 yılında yapılan bir çalışmada, koroner bypass veya kapak ameliyatı olan hastalarda, cerrahi ameliyat sırasında kolloid sıvılar kullanılmıştır. Çalışmada Gelofusin (jelatin içerikli solüsyon), Isohes (orta molekül ağırlıklı hidroksietil (HE) nişasta) ve Voluven (düşük molekül ağırlıklı HE nişasta) üç grup şeklinde ayrılmıştır. Bu çalışmada sığır jelatini kullanılmıştır. Ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası ilk 24. Saatte PT, aPTT, INR, BUN, kreatin, SGOT ve SGPT değerleri ölçüldü. Hemodinamik değerler kaydedildi. Çalışma sonucunda, fibrinojen değerleri hariç diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ve gruplar arasında anormal kanama durumuyla karşılaşılmadığı saptanmıştır. Bu yüzden Voluvenin kalp cerrahilerinde hemodinamik açısından Isohes ve jelatin içerikli Gelofusin gibi güvenle kullanılabilceği kanıtlanmıştır (53). Benzer bir çalışmada ise, hemostaz sisteminde kolloid sıvıların etkilerini ve etkinliğini kıyaslayarak , Voluven'in orta molekül ağırlıklı HE nişastalarıyla veya Gelofucine (jelatin) ile karşılaştırıldığında koagülasyon testlerini az yükselttiği ve normal değerlere daha çabuk ulaştığı kanıtlanmıştır (54).

Hemostaz sisteminde aşırı kanamalar ölüm nedeni olabilmektedir. Aşırı kan kaybının azaltılması birinci önceliktir. Geçmiş yıllarda ve günümüzde kullanılabilirliği halen sürdürülen kanama komplikasyonlarını azaltmak adına hemostatik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar aynı zamanda iyi biyouyumluluğu sahip, kullanıma hazır ve hafif olması aynı zamanda ekonomik olarak ucuz olması açısından tercih edilmektedir (56).

Hemostatik ajanlar olarak jelatin kitosan gibi ajanlar kullanılmaktadır. Kullanım alanları çok geniş olup, endüstriyel gıda üretimlerinde, kozmetik ürünlerinde, biyolojik iskelelerde, ilaç mühendisliğinde, doku mühendisliğinde, ve sağlık alanlarında fonksiyonel bir biyopolimer olarak kullanılmaktadır (48,49,57). Hemostatik ajan olan jelatinin düşük toksisite, biyouyumluluk ve biyoçözünürlük özelliğinin bulunması ayrıca düşük maliyetinin olması gibi mükemmel özellikleri nedeniyle hemostatik bir malzeme olarak çok dikkat çekmiştir (55).

Jelatin suda çözünebilen kimyasal yapısından kaynaklı emilebilir bir özelliği vardır bu yüzden trombosit agregasyonunda aktive edebilme özelliği taşımaktadır. Bu ajanlar genellikle birçok çeşit doğal polimerle karıştırılabilir. Buna dayanılarak Lan G. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, polimer özelliği olan jelatin-kitosan içerikli emilebilir sünger maddesini geliştirmek ve cerrahi sırasında hemostatik malzeme olduğunu göstermişlerdir. Kitosan, iyi bir viskoziteye sahiptir ve serbest amido grupları içerdiğinden dolayı jelatin ile çapraz bağlanabilmektedir. Jelatin ve kitosanın bu özellikleri, moleküller arasında polimer ağı oluşturmalarını ve bu sebeple yaralı bölgede kanın durmasını sağlayan yara bantlarına benzer gözenekli özellikler kazanmasını sağladığı görülmüştür. Bu çalışma, tavşanın karaciğer arter kanması modelinde uygulanmıştır. Kullanılan jelatin domuz kaynaklı ve bloom 300. Jelatin % 8 (w/w) konsantrasyonunda, 50 ° C' de distile su içerisinde çözülmüş. Çalışma sonucunda, jelatin – kitosan süngerinin trombin üretiminde hem aPTT hem de PT testleri ile belirgin bir fark gözlenmediği ancak trombosit agregasyonuna teşvik etmesi yönüyle hemostatik sistemde etkili olduğu kanıtlanmıştır (55).

Pıhtılaşma sisteminde, trombin (FIIa), fibrinojen (FII)' in fibrine (FIIa) dönüşümü için gerekli olan üründür. Aynı zamanda trombin-trombosit agregasyonunda, faktör VIII, faktör V, faktör XI, faktör XIII ve protein C'nin



aktifleşmesinden sorumludur. Trombin sadece hemostatik sisteminde değil, ayrıca hücre iyileşmesinde görevli reseptörlerle etkileşime girip mitojenik (hücresin mitoz geçirmesi) olayların sürecinde de işlev sağlar. Terapötik etkisi olarak trombinin hemostatik ajan olarak kullanılmasının yara iyileşmelerinde etkili olduğu söylenmiştir. Aynı zamanda topikal hemostaz ve yara iyileşmesinde trombine ek olarak kollajen preparatları (jelatin süngeri) kullanılmıştır. Ayrıntılı bilgi için kaynağa bakılabilir (60,61).

2009 yılında yapılan bir çalışmada, koagülasyonu normal hastalardan alınan kanlarda, *in vitro* koşullarda % 6 hidroksietil nişasta (HES) ve % 4 süksinilli jelatin solüsyonlarının koagülasyon üzerine etkileri çalışılmıştır. HES ve jelatin preparatları en sık kullanılan kolloid solüsyonlarıdır. Bu iki tip kolloid ile % 0, % 20, % 30 ve % 40 hemodilüsyon (kan seyrelmesi) sağlanmış kan örnekleri, trombelastograf cihazında bakılmıştır. Çalışma sonucunda, % 6 HES solüsyonlarının, koagülasyon eğiliminde tehlikeli artışı nedeni ile zayıflatılması gereken klinik durumlarda avantaj sağlayabileceği ve % 4 süksinilli jelatin solüsyonlarının ise koagülasyona meyilli saptanan durumlarda avantajlı olabileceği söylenmiştir. Ayrıca kesin etkilerin, daha geniş hasta içeren çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini de belirtilmiştir (58).

2014 yılında yapılan benzer bir çalışmada, elektif major ortopedik cerrahi geçiren 55 yaş üzerindeki hastalarda, %6 hidroksietil nişastanın (HES) ve %4 modifiye sıvı jelatinin, koagülasyon ve renal parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. 50 hastada çalışılmıştır. Hastaların ameliyattan önce ve ameliyattan sonra 4. 12. ve 24. saatte hemoglobinin (Hb), hematokrit (Hct), trombosit sayısı, protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), yüzde aktivasyon değeri, INR, kan üre azotu (BUN), kreatinin, sodyum, potasyum, klor, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransaminaz (AST) değerlerine bakılmıştır. PT, aPTT ve INR arasında fark olmadığı görülmüştür. Uygulanan dozlar, farklı parametrelerde değişikliklere neden olmuştur. Fakat ölçülen değerlerin tedavi gerektirmediği sonucuna varılmıştır. Sonuçta her iki kolloid solüsyonunun 55 yaş üstü hastalarda ve büyük cerrahilerde takip edilmesinin güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (59).

2012 yılında bir derlemede, açık parsiyel nefrektomi de hemostaz ajanların önemi vurgulanmaktadır. Tropikal hemostazlar arasında jelatin içeren spançlar bulunmaktadır. Bunlar kanama bölgesine yapıştıktan sonra trombositlerin yakalanmasına yol açmaktadır. Böylece pıhtılaşma mekanizmasını aktivite ederler. Bir araştırmacı hemostatik ajanı kuru spanç formunda daha sıklıkla tropikal trombinle kombine olarak kullanıldığına değinmiştir. Bu kombinasyon, jelatin hemostatlarda sağlanan önemli bir değişim olmaktadır. Bu spançın en önemli özelliği kanda veya sıvılarda kendi ağırlığının 40 katına kadar absorpsiyon yapabilmesi ve *in vivo* olarak kapasitesini %200 oranında arttırabilmesidir (60).

Travmalarda kontrolsüz kan kaybı, ölümün ana nedenidir. Buna bağlı olarak hemostatik ajanlar kullanılmaya başlanmış ve hemostatik ajanlar umut verici sonuçlar göstermiştir. Hemostatik ajanlar, büyük ve hızla kanayan bir yaranın iyileştirmesinde uygun olduğundan, 2004 yılında yapılan bir çalışmada, mineral olan zeolit, hemostatik ajan olarak *in vitro* yapılmıştır. Çalışma sonucunda kanama modelinde %83 oranda iyileşme sağlandığı kanıtlanmıştır (61).

Yapılan çalışmada Montmorillonite adlı kaya minerali, yüksek katyonik değişim kapasitesine sahip olup toprak kilden oluşmaktadır. Bu mineral parçacıkları Nano parçacıklarına dönüştürülerek *in vitro* olarak çalışılmıştır. Koagülasyon testlerindn kanama zamanı testine bakılarak analiz yapıldı. Analiz sonucunda kanama süresi 240 saniyeden standart test koşulları altında 40 saniye içinde pıhtı oluşumu kanıtlanmıştır ( 67).

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, pıhtılaşma sisteminde etkin rolleri olan mineral ve jelatinin, kuzu akciğerinden elde ettiğimiz doku faktörü ile protrombin zamanı testi (PTZ) etkisi in vitro şartlarda ekstrensek pıhtılaşma sistemi ile ilgili bu çalışmamız bulgularımız doğrultusunda in vivo yapılacak çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğunu göstermiştir.



## 9. KAYNAKLAR

1. Emekli N.Hemostatik sistem biyokimyası. İçinde: Biyokimyada Temel ve Özel Konular, Editörler:Yarat A, Akbay T.T, Alturfan EI. Akademisyen Kitabevi s.581-591, 2019.
2. Emekli N. Basic and Applied Biochemistry. Marmara Üniversitesi Yayınları, ISBN: 975-400-120-0-1, s. 402. 1994.
3. Emekli N. Temel ve Uygulamalı Biyokimya, Cem Ofset Matbaacılık San.A.Ş. ISBN: 975-92447-4-8, , s.378-458, 2004.
4. Yiğitbaşı T. ve Emekli, N. Öğrenciler için Biyokimya Laboratuvarı. İstanbul Medipol Üniversitesi Yayınlar, 3.Baskıs. 96-98,2019.
5. Demir, M. Geleneksel Pıhtılaşma Testleri ve Klinik Uygulamalardaki Yeri. İçinde: Klinik Biyokimya Editörleri: Emekli ve Yiğitbaş, s. 323-331. 2015.
6. Emekli N. Can Tissue Factor, A Multifactorial Molecule of the Hemostasis, be used As A Biomarker for Thrombosis, Inflammation and Cancer?. Acta Pharm. Sci. 55(3):93-104, 2017.
7. Tenekeciğil A. Koyun ve kuzu akciğerinden izole edilen doku faktörü aktivitesinde lipitlerin etkisi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 2016.
8. Emekli N.B, Aktulga A, Ulutin O.N. Protrombinin elde edilmesi ve gel filtrasyonla saflaştırılması. TÜBİTAK IV. Bilim Kongresi Kitabı, s. 1-7, 1973.
9. Taylan M, Polat H, Özer H, Kilit B. ve Emekli N. Amino Asitlerden Proteinlere Uzun İnce Bir Yol. İstanbul Medipol Üniversitesi Yayınları, ISBN: 978- 605- 4797- 28-8, s: 174-176, 2020.
10. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. Trends in cardiovascular medicine. 26.4:297-303, 2016.
11. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol. 134(5):1087-1097, 1989.

12. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 145: 1310-2, 1964.
13. Emekli NB, Ulutin ON. Some properties of autoprothrombin II-A anticoagulant, *Recent Progress in Blood Coagulation and Thrombosis Research. Biblioth Haem.* 44:15-20,1978.
14. Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 355(9215).1627-1632, 2000.
15. Uçar M.T. Tükiye’de Şişelenen Mineralli Suların Fiziko Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. Afyon K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s:1-7, 2016.
16. Yetim H. Jelatin Üretimi, Özellikleri ve Kullanımı, Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri. I.Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi Kitabı.s:86-94, 2011.
17. Ockerman H.W, Hansen C.L. *Animal By Product Processing*, Ellis Horwood Ltd., Chichester England. 366, 1988.
18. Chou CH, T. K. Cheng W, Kuo T.F, Sun J.S. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/ chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: The results of real-time polymerase chain reaction, *İnter Science*, p: 757-767, 2007.
19. Kozen B.G, Kircher S.J, Henao J, Godinez F.S, Johnson A.S. An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot, *Acad. Emerg. Med.* 15(1):74–81, 2008.
20. Kheirabadi B.S, Acheson E.M, Deguzman R, Crissey J.M, Delgado A.V, Estep S.J. et al. The potential utility of fibrin sealant dressing in repair of vascular injury in swine, *J. Trauma*. 62(1):94–103, 2007.
21. Johnson D, Bates S, Nukalo S, Staub A, Hines A. The effects of QuikClot combat gauze on hemorrhage control in the presence of hemodilution and hypothermia, *J. Ann. Med. Surg.* 21–25, 2014.
22. Roger L, Ralph A, Gabriel D, Thomas L, Lundblad B. Ortel, Jeffrey Lawson, Kenneth G. Mann. A review of the therapeutic uses of thrombin, *Thromb Haemost.* 91(5): 851– 60, 2004.

23. Ulutin O.N. The platelets: Fundamentals and Clinical Applications. Kağıt ve Basım İşleri, A.Ş., İstanbul, 1976.
24. Gezer S. Koagülasyon Testlerinin Klinikte Kullanımı. HematoLog, 2(2), s.9-10, 2012.
25. Tatsumi K, Mackman N. Tissue factor and atherothrombosis. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 22(6). 543-549, 2015.
26. Eser A, Aksu A.C, Uğurel E, Yalçın Ö. Koagülasyon Yolaklarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Hasta Başı Cihazlar. P(4), 2018.
27. Akbari S, and Rasouli-Ghahroudi A.A. Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies, "BioMed Research International", Article ID 4629383, p.8, 2018.
28. Nelsestuen G.L, Zytovicz T.H, Howard J.B, The mode of action of vitamin K. Identification of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. J.Biol.Chem. 249:6347-6350,1974.
29. S. L. Booth and J. W., Suttie, "Dietary intake and adequacy of vitamin K," Journal of Nutrition, 128(5):785–788, 1998.
30. Hamidi M. S, Gajic-Veljanoski O, Cheung A.M. "Vitamin K and Bone Health," Journal of Clinical Densitometry, 16(4): 409–413, 2013.
31. Sperling R, Furie B.C, Blumenstein M, Keyt B, Fruie B. Metal binding properties of  $\gamma$ - carboxyglutamic acid. Implications for the vitamin K dependent blood coagulation proteins., J.Biol.Chem., 253(11):3898-3906,1978.
32. Mann, K. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 82:165-174, 1999.
33. Schwalfenberg G.K. "Vitamins K1 and K2: The Emerging Group of Vitamins Required for Human Health," Journal of Nutrition and Metabolism. Article ID 6254836, 2017.
34. Stenflo P, Fernlund W, Roepstorff P. "Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 71(7):2730–2733, 1974.

35. Fasco M.J, Preusch P.C, Hildebrandt E, Suttie J.W. Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin – resistant rats. *J.Biol.Chem.* 258(7):4372- 4380,1983.
36. Morris D.P, Stevens R.D, Wright D.J, Stafford D.W. Processive posttranslational modification., *J.Biol.Chem.* 270:30491-30498,1995.
37. Boran G., Bir gıda katkısı olarak jelatin: Yapısı, özellikleri, üretimi, kullanımı ve kalitesi, *Gıda*, 36(2), 91-104, 2011.
38. Altınışık M. Ekstraselüler Matriks Bağ Doku Biyokimyası, <http://slideplayer.biz.tr/slide/2922168>, Erişim tarihi:4 Ocak 2020.
39. Schrieber R, Gareis, H. *Gelatine Handbook. Theory and Industrial Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p.335, 2007.
40. Engel J, Bachinger HP. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. In: *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK (eds), Springer, USA, pp. 8-24, 2005.
41. Zhang Y. Z, Venugopal J, Huang Z. M, Lim C. T, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofiber. *Polymer*, 47: 2911-2917, 2006.
42. Weiss J, Kanjanapongkul K, Wongsasulak S, Yoovidhya T. Electrospun fibers: fabrication, functionalities and potential food industry applications. In: Q. Huang (Ed.), *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries (1st ed.)*. Cambridge (UK): Woodhead Publishing Limited, 13:362-397, 2012.
43. Nitta Gelatin Inc. Collagen Material Business, <http://www.nittagelatin.co.jp/english/company/business.htm>, Erişim tarihi: 20 aralık 2019.
44. Chou CH, T. K. Cheng W, Kuo T.F, Sun J.S. et al. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/ chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: The results of real-time polymerase chain reaction, *Inter Science*, 758-767, 2007.

45. Alizadeh M, Abbasi F, Khoshfetratc A.B, Ghaleha H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze drying/leaching method, *Mater. Sci. Eng.* 33:3958–3967, 2013.
46. Kheirabadi B.S, Acheson E.M, Deguzman R, Crissey J.M, Delgado A.V, Estep S.J. The potential utility of fibrin sealant dressing in repair of vascular injury in swine, *J. Trauma* 62:94–103, 2007.
47. Johnson D, Bates S, Nukalo S, Staub A, Hines A, Leishman T. et al. The effects of QuikClot combat gauze on hemorrhage control in the presence of hemodilution and hypothermia, *J. Ann. Med. Surg.* 21–25, 2014.
48. P. baldrick, The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56:290–299, 2010.
49. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Delivery Rev.* 62:3–11, 2010.
50. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248- 254, 1976.
51. Tieu BH, Holcomb JB, Schreiber MA. Coagulopathy: its pathophysiology and treatment in the injured patient. *World J Surg.* 31: 1055-64, 2007.
52. Kayaalp OS. Plazma hacmini genişleten solusyonlar. İçinde: Kayaalp OS, *Tıbbi farmakoloji.* s. 1500-10, 5. Baskı. Feryal Yayıncılık, 1990.
53. Demirok M, Aşkın D, Emin İ, Güleç Ç, ve ark. Düşük Molekül Ağırlıklı Hidroksietil Nişastanın Açık Kalp Ameliyatlarında Kullanımı, *17(3):162-166*, 2009.
54. Langeron O, Doelberg M, Ang ET, Bonnet F, Capdevila X, Coriat P. Voluven, a lower substituted novel hydroxyethyl starch (HES 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than HES 200/0.5. *Anesth Analog*, 92:855-62, 2001.
55. Lan G, Lu B, Wang T, Wang L, et al. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136:1026–1034, 2015.



56. Rodeheaver GT, Hartsell L, Faulkner BC. et al. Influence of Biobrane Construction on Adherence. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*. 16:321-23, 1995.
57. Kohno H, Nagasue N, Chang Y.-C, et al. Comparison of Topical Hemostatic Agents in Elective Hepatic Resection: A Clinical Prospective Randomized Trial. *World J Surg*. 16:966-70, 1992.
58. Ulukaya S., Alper I., Balcıoğlu T.S., % 6 Hidroksietil Nişasta (130/0.4) ve % 4 Süksinilli Jelâtin Solüsyonlarının Koagülasyona Etkileri, *Türk Anest Rean Der.*,37(5):280-286, 2009.
59. Yanlı ve ark. Comparison of %6 Hydroxyethyl Starch and %4Gelatine Solutions in Major Orthopedic Surgery, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(5): 401-405, 2014.
60. Ener K, Okulu E, Kayıgil Ö. Açık Parsiyel Nefrektomide Kullanılan Hemostatik Ajanlar, *Üroonkoloji Bülteni*. 11(3), 231, 2012.
61. Hasan B, Alam MD, Zheng C, MD, PhD, Amin Jaskille MD. Application of a Zeolite Hemostatic Agent Achieves 100% Survival in a Lethal Model of Complex Groin Injury in Swine. *J Trauma*. 56:974–983. 2004.
62. Ekim M. Ve Ekim H., Derin Ven Trombozlu Hastaların Takibinde Biyokimyasal Parametrelerin ve Beslenmenin Önemi, *Bozok Tıp Der*. 8(1):38-44, 2018.
63. Gómez-Guillén M.C, Giménez B, López-Caballero M.E, Montero M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25: 1813-1827,2011.
64. Uğural A, Ayaz A. Diyetle K vitamini Alımı Bilişsel Performansı Etkiler mi?. : Derleme Hacettepe Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi, *Sakarya Tıp Dergisi*. 9(4):162-170, 2019.
65. Uçar E, Erzurum A.N. Kardiyovasküler Hastalıklarda Diyet Posasının Rolü, *Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, Derleme, 3(1): 1-10, 2020.

66. Bayraktar A, Demirkan K. Besin ve Besin Ögesi ile İlaç Etkileşimleri, Hacettepe Ü, Eczacılık Fakültesi, Beslenme ve Diyet Dergisi, Derleme. Ankara, 42(2):154-159,2014.
67. Thamarai Selvan.V, Gobinath.R, Thirumurugan.K, Mekala.N. Development of Electrospun Wound Dressing for Hemorrhage Control using Biominerals. International Journal of Recent Technology and Engineering (IJRTE). 8: 2277-3878, 2019.



## 10. ETİK KURULU ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.59602  
Konu : Etik Kurulu Kararı

31/10/2019

Sayın Ozan Emre Eyüpoğlu

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Mineralli Suların ve Sığır Jelatininin Ekstresek Pıhtılaşma Sistemine Etkisi” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 31.10.2019 tarihinde e-imzalanmıştır.  
Evrâğınızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 4FEFC140XC kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavaçık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavaçık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Minerali Suların ve Sığır Jelatininin Ekstresek Pıhtılaşma Sistemine Etkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Ozan Emre Eyüpoğlu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR**  
**ETİK KURULU KARAR FORMU**

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	<b>Karar No: 858</b>	<b>Tarih: 23/10/2019</b>		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ilknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hatice	<b>Soyadı</b>	ÖZER
<b>Doğum yeri</b>	Şanlıurfa	<b>Doğum tarihi</b>	01.05.1990
<b>E-mail</b>	ozerhatice88@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

<b>Yüksek Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Biyokimya
<b>Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Fakültesi / Beslenme ve Diyetetik
<b>Lise</b>	Açık Öğretim Lisesi

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
Beslenme ve Diyetetik Polikliniği	Özel Mediten Tıp Merkezi	2017-2018
Biyokimya Laboratuvarı	İstanbul Medipol Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Biyokimya	2019-2020

<b>Yabancı Diller</b>	<b>Okuduğunu anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Orta	Orta	Orta
Almanca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
ALES PUAN	60		
Diğer Puan			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Spss (Sosyal Bilimleri için İstatistik Programı)	İyi
Bebis (Beslenme Bilgi Sistemi)	Çok iyi