

**BRASSICA OLERACEA VAR. ACEPHALA'DAN ELDE EDİLEN
EKSTRENİN ANTİBAKTERİYEL ETKİSİ, MUS MUSCULUS
BALB/C FARELERİNİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ
VE KISMİ SAFLAŞTIRILMASI**

**PARTIAL PURIFICATION AND ANTIBACTERIAL EFFECTS OF
BRASSICA OLERACEA VAR. ACEPHALA EXTRACT AND
INVESTIGATIONS OF ITS EFFECTS ON THE PLASMA PROTEINS
OF MUS MUSCULUS BALB/C MICE**

Ersin BAYRAKDAR* - Ertuğrul YURTSEVER* - Turay YARDIMCI*

SUMMARY

When the antibacterial activity of the extract was examined using the diffusion method against the standart bacteria strains obtained from ATCC, it has been observed that the extract has inhibited the multiplication of the *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *B. cereus*. The extract caused increase in total plasma protein level after 15 days treatment from 40.01 ± 1.72 mg / ml to 52.62 ± 5.44 mg / ml (n = 10). In the mice with solid EAT, the total plasma protein level was 46.06 ± 1.45 mg / ml while in the normal mice was 40.35 ± 1.71 mg / ml. The total protein level in plasma was determined by Lowry method. When plasma protein distribution was examined with DAVIS - PAGE, increases were detected in albumin and γ - globulin fractions after extract treatment for 15 days, these increases were statistically significant (n= 7). The plasma protein distribution was also examined with isocratic HPLC, 55000 Da protein was detected in the plasma of EAT mice and in the plasma of 15 days extract applies normal mice, the protein disappeared in EAT mice after the treatment with the extract. When plasma proteins were examined with SDS - PAGE , 4 proteins which have molecular weights of 10000, 17000, 52000, 65000 Da were detected. The 95 % cut $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation of the extract and dialysis gave 9500 , 15500, 55000, 66000 Da proteins. After acetone precipitation of the extract only one protein with a molecular weight of 63000 Da was isolated. When 20mg extract / 0.5 ml phosphate buffer (0.1 M, pH=7), was applied to HPLC column as 25 μ l, only one protein which has a molecular weight of 65000 Da was detected.

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı , 81010
Haydarpaşa / İSTANBUL

ÖZET

ATCC'den elde edilen standart bakteri suşlarına karşı difüzyon metodu ile ekstrenin antibakteriyel etkisi incelendiğinde *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus*, *E. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerinin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Ekstrenin in vivo olarak normal farelerin total plazma konsantrasyonunu 15 günde ($40,01 \pm 1,72$) mg / ml'den ($52,62 \pm 5,44$) mg/ml 'ye çıkardığı (n = 10) görülmüştür. Bu değerler normal fareler için ($40,35 \pm 1,71$, katı EAT tümörlü fareler için ise $46,06 \pm 1,45$ mg/ml olarak bulunmuştur (n = 10). Total plazma protein konsantrasyonu Lowry yöntemiyle ölçülmüştür. Plazma protein dağılımı DAVIS - PAGE yöntemiyle incelendiğinde, albumin ve γ -globulin fraksiyonlarında, 15 gün ekstre uygulanması sonucu, istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulunmuştur (n =7). Plazma protein dağılımı izokratik HPLC ile incelendiğinde, 55000 Da molekül ağırlığındaki bir proteinin normalde bulunmadığı, in vivo ekstre uygulanması sonucu ortaya çıktığı ve aynı proteinin tümörlü farelerde de bulunduğu, ekstre ile tedaviden sonra kaybolduğu bulgularımız arasındadır (n = 7). Ekstrenin SDS - PAGE analizinde molekül ağırlıkları 10000, 17000, 52000, 65000 Da olan 4 protein görülmüştür. Ekstredeki proteinler % 95 kesitli $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ile çöktürülüp diyaliz yapıldıktan sonra SDS - PAGE analizi yapıldığında ise molekül ağırlıkları 9500 , 15500, 55000, 66000 Da olan 4 protein görülmüştür. Ekstre asetonla çöktürülüp SDS - PAGE analizi yapıldığında 63000 Da molekül ağırlığında tek bir protein bulunmuştur. 20mg ekstre / 0,5 ml (0,1 M, pH=7) fosfat tamponu, 25 μ l olarak HPLC kolonuna uygulandığında 65000 Da molekül ağırlığında tek bir protein görüldü.

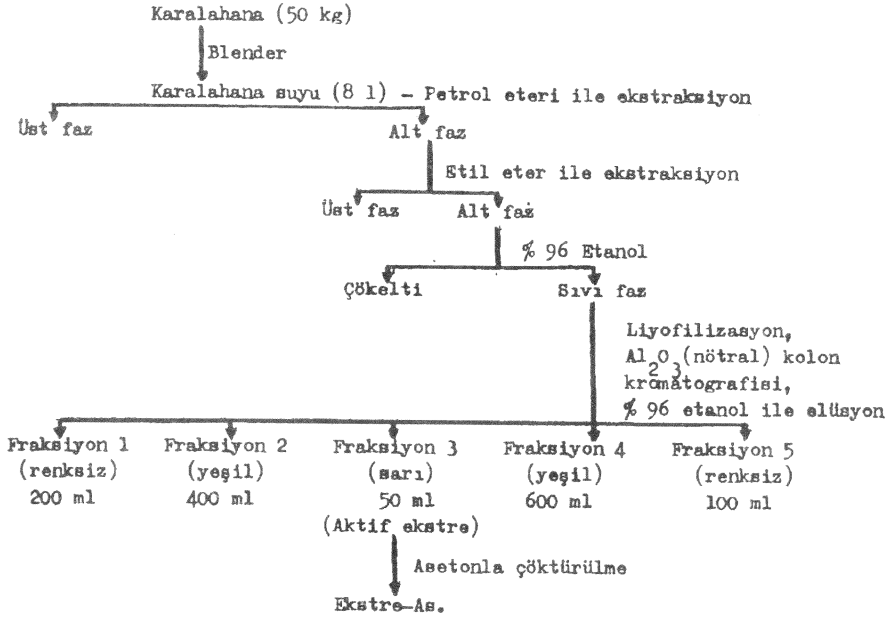
GİRİŞ VE AMAÇ

Son senelerde lahana, Brüksel lahanası, karnıbahar vb. gibi Cruciferae bitkilerinin içeriklerinin karsinogenesi etkilediğini gösteren raporlar dikkati çekmektedir. Söz konusu bitkilerin tüketilmesi ile insanlarda çeşitli kanser türlerinin azalması arasında ilişki görülmektedir (1,2). Bu bitkilerden izole edilen bazı maddelerin hayvanlarda karsinogenesi inhibe ettiği bildirilmiştir (3,4). Bu bitkilerin antitümoral, antibakteriyel (5) ve guatrojenik (6) etkileri yanında koagülasyona etkisi de (7) rapor edilmiştir.

Brassica Oleracea Var. *Acephala* yapraklarından eter, petrol eteri, etil alkol ekstraksiyonu, Al_2O_3 ile kolon kromatografisi sonucu elde ettiğimiz ekstrenin antitümoral, antiagregan, profibrinolitik ve antitrombotik etkileri (8), in vitro olarak doku kültüründe bir eritrolösemi hücre dizisi olan K 562 'ye karşı sitotoksik etki gösterdiği, normal fare dalak hücrelerine karşı etkisiz kaldığı (9) önceki yayınlarımızda rapor edilmiştir. Bu kadar önemli biyolojik aktivite gösteren bu ekstrenin mikrobiyolojik ve biyokimyasal yönden etkilerinde araştırılmasını gerekli gördüğümüzden bu çalışmamızda ekstrenin in vivo olarak antibakteriyel etkisi, normal ve tümörlü farelerde in vivo olarak plazma proteinleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Ekstrenin elde edilişi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil - 1 : Karalahana eksterisinin elde edilişi.

a) Al_2O_3 kolon kromatografisi

280 g nötral Al_2O_3 , 150 ml etanolde karıştırılıp, 4 cm çapında 40 cm yüksekliğindeki cam kromatografi kolonuna dolduruldu. 250 ml etanolla yıkandı. 20 g karalahana konsantresi, 40 ml etanolde çözülerek, kolona uygulandı. Elüsyona etanolla devam edildi. 200 ml'den sonra 400 ml klorofil içeren 2. kısım toplandı. 3. etapta 50 ml sarı renkli fraksiyon toplandı. Bütün fraksiyonlar liyofilize edildi. Yapılan hayvan deneylerinde 3. fraksiyonun antitümoral aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bu deneylerde, liyofilize edilerek konsantre edilen bu fraksiyondan 20 mg tartılarak 0,5 ml serum fizyolojikte çözüldü ve (i. p.) olarak farelere enjekte edildi.

b) Ekstrenin antibakteriyel etkisinin incelenmesi

Deneylerde standart nutrient agar besi yeri kullanıldı. Standart suşların buyondaki bir gecelik kültürlerinden hazırlanan taze bakteri suspansiyonları 1 / 100 oranında sulandırılarak besi yeri üzerine pastör pipetiyle 0,1 ml yayıldı ve kurutuldu. Daha sonra özel mantar delicisiyle açılmış kuyulara, karalahana ekstresi çeşitli konsantrasyonlarda (steril distile suda çözülerek hazırlanmış) 0,1 ml konuldu. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmeye geçildi.

c) Hayvan deneyleri

Deneylerde Mus Musculus Balb / C türü fareler kullanıldı. 15 gün boyunca her gün (20 mg ekstre / 0,5 ml serum fizyolojik) alınan kan örnekleri deney grubu, 0,5 ml serum fizyolojik uygulanan normal farelerden alınan kan örnekleri ise kontrol grubu olarak kullanıldı.

Ayrıca katı Ehrlich Ascites tümörlü (EAT) farelerden 15 gün boyunca her gün (20 mg ekstre / 0,5 ml serum fizyolojik) uygulananlardan alınan kan örnekleri deney grubu, 0,5 ml serum fizyolojik uygulananlardan alınan kan örnekleri ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Uygulamalar (i. p.) olarak yapıldı.

Farelerin kuyruklarından hematokrit tüpleriyle alınan kanlar hematokrit cihazında 10000 rpm'de çevrilerek plazma kısmı alındı. Deneylerde kullanılmak üzere - 20 °C'de saklandı.

d) Plazma proteinlerinin incelenmesi

1) Plazma total protein konsantrasyonu Lowry yöntemi (10) ile ölçüldü.

2) Karalahana ekstresinin plazma protein fraksiyonları üzerine etkileri DAVIS - PAGE yöntemi (11) ile incelendi.

Marker solüsyonu : 2,85 g tris, 12,8 ml 1N H₃PO₄, 20 g sucrose, 2 g bromophenol blue, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Anod solüsyonu (pH= 8,1) : 12,1 g tris, 50 ml 1N HCl, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı

Katod solüsyonu (pH= 8,7) : 6,32 g tris, 3,94 g glisin, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Boyama solüsyonu : 0,625 g comassie brillant blau R- 250 , 113,5 ml methanol, 113,5 ml distile su , 23 ml asetik asit.

Boyama süresi 30 dakikadır. Jellerin döküldüğü tüplerin boyu 8, çapı ise 0,56 cm'dir. Bu tüplere 6 cm yüksekliğinde ayırma jeli, bu jelin üstünde 1 cm kalınlığında konsantrasyon jeli döküldü.

Protokol sıvısı, 100 µl reaksiyon hacmi için 50 µl marker, distile su 48 µl, örnek plazma 2 µl konularak hazırlandı. Jel üzerine 50 µl uygulandı. Protokol sıvısı, konsantrasyon jelini geçene kadar 2 mA, geçtikten sonrada 4 mA akım uygulandı (1 jel için). Protokol sıvısı jelin bitimine 1 cm yaklaştığında akım kesildi. DAVIS - PAGE jellerinin akrilamid konsantrasyonu % 7,5 idi. Kontrol ve deney gruplarının plazma protein bantlarını içeren jeller, jel dansitometresine konarak jel diyagramları elde edildi. Bu diyagramlardaki plazma protein pikleri albumin, $\alpha_1 + \alpha_2$ - globulin, β - globulin, γ - globulin fraksiyonları olarak gruplandırılarak, toplam alana karşı % 'de fraksiyon alanları bulundu. Lowry yöntemiyle bulunan total protein konsantrasyonu değerlerinden her bir fraksiyonun protein konsantrasyonu mg / ml olarak bulundu.

3) Plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımında ve ekstrenin kısmi saflaştırılmasında izokratik HPLC kullanıldı.

Cihaz : Model 510 pompa (Waters)

Enjektör : Valf tipi, Model U6K (Waters)

Dedektör : değişken dalga boylu UV, 280 nm, 0,05 AUFS Model 481 (Waters)

Kolon : Protein PAK - 300 SW (Waters)

Kaydedici : Data module, Model 730 (Waters)

Mobil faz : 0,1 M fosfat tamponu (pH=7)

Akış hızı : 1 ml / dak

Kağıt hızı : 1 cm / dak

Plazmalar ve 20 mg ekstre / 0,5 ml (0,1 M, pH=7) fosfat tamponu HPLC kolonuna 10 µl uygulandı.

e) Karalahana ekstresinde protein analizleri

1) Amonyum sülfat presipitasyonu : 800 mg ekstre 4 ml distile suda çözüldü. 0°C 'de 1 ml'ye 630 mg %95 kesitli sulp (NH₄)₂SO₄ olacak şekilde konarak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen çözelti 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek çökelek en az 0,1 M sodyum fosfat tamponunuda (pH = 7) eritildi ve aynı tamponda +4 C'de 2 gün diyalize tabi tutuldu. Diyaliz tüplerinden alınan diyaliz sıvısı liyofilize edilerek deneylerde kullanıldı.

2) Ekstreden asetonla çöktürülen kısmın elde edilişi

Al₂O₃ kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyon - 3 aseton içine damlatılarak çöktürüldü. Çöken beyaz madde aseton içinde bir gece bekletildi. Çöken madde alınarak bir kaç kere asetonla yıkandı ve kurutuldu. Hidroskopik özellikte olan bu beyaz toz deneylerde kullanıldı.

3) Karalahana ekstresindeki proteinlerin molekül ağırlıklarının ölçülmesi : Ölçümlerde SDS - PAGE yöntemi kullanıldı. (12). Jellerde akrilamid konsantrasyonu % 5 idi. Standart molekül ağırlığı kiti olarak Sigma 6H kiti kullanıldı. Örnek tamponu : 1, 02 g Na₂HPO₄, 0.442 g NaH₂PO₄. H₂O, 1,0 g SDS , 1 ml 2 - MET, 0.015 g BFB, 36 g üre distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Jel tamponu : NaH₂PO₄.2H₂O'den 8,84 g, Na₂HPO'den 20,45 g, % 10'luk SDS'den 20 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Fiksatif çözeltisi : 400 ml metanol, 70 ml asetik asit, 530 ml distile su. Boyama çözeltisi : 400 ml metanol, 70 ml asetik asit, 2,5 g comassie brillant blau R - 250 distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 µl örnek, 100 µl örnek tamponu alınarak karıştırıldı. bu karışım 100°C'de 1 dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi ve jel başına 30 µl uygulandı. Aynı işlem standart proteinler içinde yapıldı. Jel başına 8 mA akım uygulandı. Jeller fiksatif çözeltisinde 15, boyama çözeltisinde 12 saat tutularak boyama işlemi tamamlandı. Standart proteinlere ait R_f değerleri ve log (mol. ağı.) değerleri yardımıyla regresyon denklemi bulundu. Karalahana ekstresindeki proteinlerin R_f değerleri, jellerden hesaplanarak, regresyon denkleminde yerine konuldu. Denklemden bulunan log (mol. ağı.) değerleri yardımıyla her bir proteinin molekül ağırlığı hesaplandı.

Karalahana ekstresindeki ve fare plazmalarındaki proteinlerin molekül ağırlıkları sigma standart proteinleri yardımıyla HPLC

kromatogramlarından ölçüldü. Standart proteinlerin R_t ve \log (mol. ağı) değerleri yardımıyla regresyon denklemi bulundu. Molekül ağırlığı bulunmak istenen proteinin R_t değeri bu denklemde yerine konuldu.

BULGULAR

a) Karalahana ekstresinin in vitro olarak antibakteriyel etkisi

Kuyulara (50 mg ekstre / 0,5 ml steril distile su) karışımından 0,1 ml konularak bulunan antibakteriyel etki Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo - 1 : Karalahana ekstresinin antibakteriyel etkisi.

Bakteriler	Kodu	İnhibisyon zonu (mm)
Micrococcus enter	ATCC 9041	0
Proteus mirabilis	ATCC 14153	0
E. coli	ATCC 8739	3
E. coli	ATCC 11229	4
Pseudomonas auruginosa	ATCC 25019	0
Enterococcus hirae	ATCC 8043	4
Staphylococcus aureus	ATCC 6338	3
Bacillus subtilis	ATCC 6633	7
Bacillus cereus	ATCC 11778	7

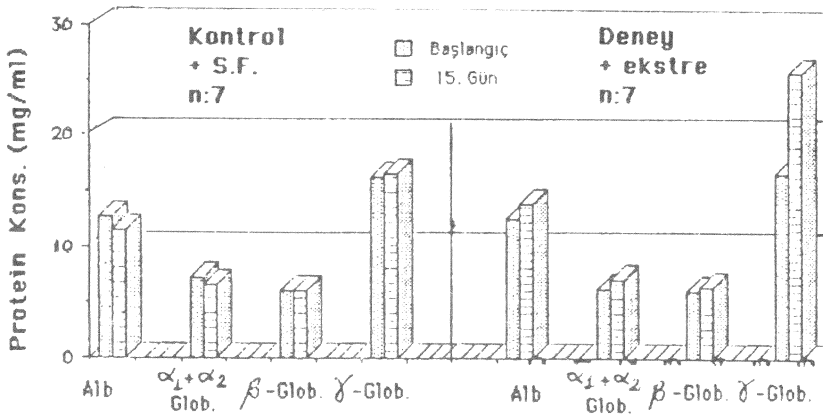
b) Karalahana ekstresinin normal farelerin total plazma protein konsantrasyonu üzerine etkisi

Lowry yöntemiyle yapılan ölçümlerde, karalahana ekstresinin normal farelerin total plazma protein konsantrasyonunu 15 günde $40,01 \pm 1,7$ mg / ml'den $52, 62 \pm 5,44$ mg / ml'ye arttırdığı görülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (n =10).

Diğer taraftan normal farelerde total plazma protein konsantrasyonu $40, 35 \pm 1,71$ mg / ml iken tümörlü farelerde $46,06 \pm 1,45$ mg / ml olarak bulunmuştur.

c) Karalahana ekstresinin normal farelerin plazma protein fraksiyonları üzerine etkisi

DAVIS - PAGE jel diyagramlarında 17 protein piki görüldü. Karalahana ekstresinin 15 gün uygulanması sonucu 1. pik (albumin) ve 12., 13., 17. piklerde (γ - globulin fraksiyonu) istatistiksel bakımdan anlamlı artışlar görüldü. Bu 17 protein pikinin düzenlenmesiyle elde edilen protein fraksiyonları üzerine karalahana ekstresinin etkisi Şekil 2'de gösterilmiştir.



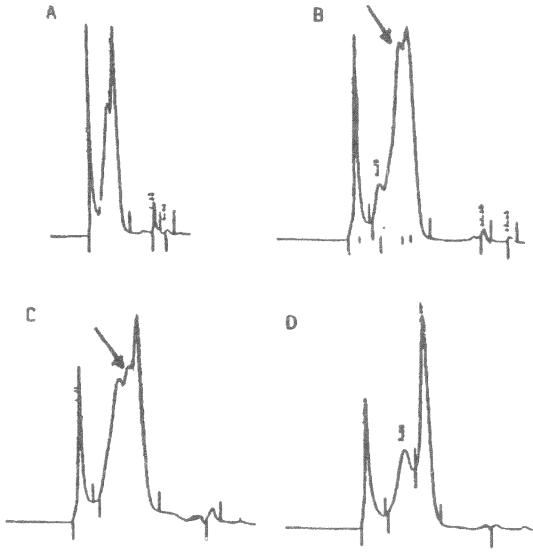
Şekil - 2 : Karalahana eksteresinin normal fare plazma protein fraksiyonları üzerine etkisi.

Plazma protein fraksiyonları

Kontrol grubundaki değişimler istatistiksel bakımdan anlamsız bulunmuştur. deney grubunda ise albumin ve γ - globulin fraksiyonlarındaki artışlar istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur.

d) Karalahana Ekstresinin normal ve tümörlü farelerin plazma proteinleri üzerine etkisi

Normal ve tümörlü farelerin plazma proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre dağılımı izokratik HPLC ile incelendi. Bunlara ait HPLC kromatogram örnekleri Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil - 3 : Normal ve tümörlü fare plazma proteinlerinin HPLC kromatogram örnekleri. A) Normal fareler (Kontrol grubu) ; B) Normal fareler (Deney grubu) ; C) Tümörlü fareler (Kontrol grubu) ; D) Tümörlü fareler (Deney grubu).

HPLC kromatogram örnekleri incelendiğinde 55000 Da molekül ağırlığındaki protein pikinin (şekilde işaretlenmiştir) normal farelerde bulunmadığı, *in vivo* olarak karalahana ekstresinin uygulanması sonucu ortaya çıktığı ve tümörlü farelerde aynı protein pikinin bulunduğu, karalahana ekstresi uygulanması sonucu kaybolduğu görülmektedir. (n = 7).

Normal ve tümörlü farelerde karalahana ekstresinin plazma protein dağılımına etkisinin izokratik HPLC ile değerlendirilmesi Tablo 2'de gösterilmiştir.

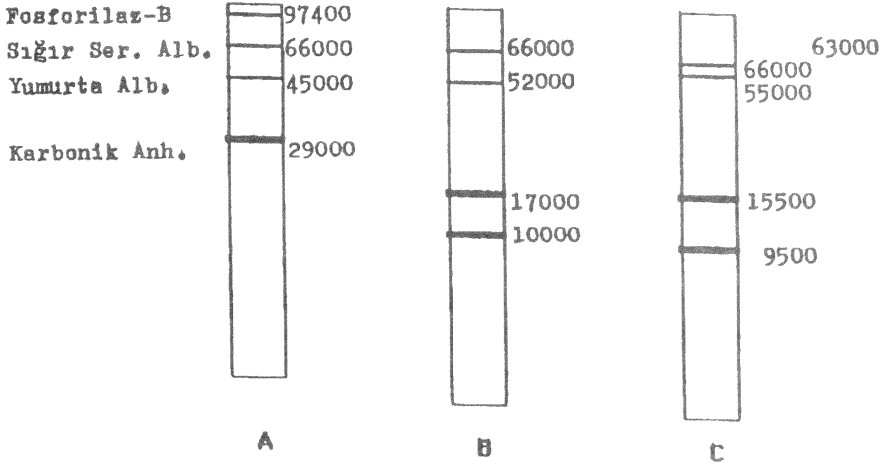
Tablo 2: Normal ve tümörlü farelerin plazma proteinleri üzerine karalahana ekstresinin etkisinin izokratik HPLC ile değerlendirilmesi (Tablodaki değerler % pik alanlarını göstermektedir. n = 7)

Pik no	Normal fareler (Kontrol grubu)	Normal fareler (Deney grubu)	İstatistik değerlendirme
1	20,90 ± 6,00	16,00 ± 1,60	p > 0,05
2	35,70 ± 18,80	4,80 ± 1,10	p < 0,01 Anlamlı
3	0,00 ± 0,00	32,40 ± 8,20	p < 0,01 Anlamlı
4	40,00 ± 19,00	39,70 ± 9,60	p > 0,5
5	2,60 ± 2,00	1,00 ± 1,10	p > 0,5
6	0,70 ± 0,20	1,30 ± 1,50	p > 0,5
7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	

Pik no	Normal fareler (Kontrol grubu)	Normal fareler (Deney grubu)	İstatistik değerlendirme
1	16,10 ± 2,20	19,10 ± 6,50	p > 0,01
2	30,50 ± 6,10	21,40 ± 5,20	p < 0,02 Anlamlı
3	14,80 ± 4,30	0,00 ± 0,00	p < 0,01 Anlamlı
4	36,80 ± 4,60	55,70 ± 3,50	p > 0,01 Anlamlı
5	0,10 ± 0,20	0,50 ± 0,90	p > 0,5
6	1,70 ± 1,10	2,80 ± 2,40	p > 0,5
7	0,10 ± 1,10	0,60 ± 1,10	p > 0,5

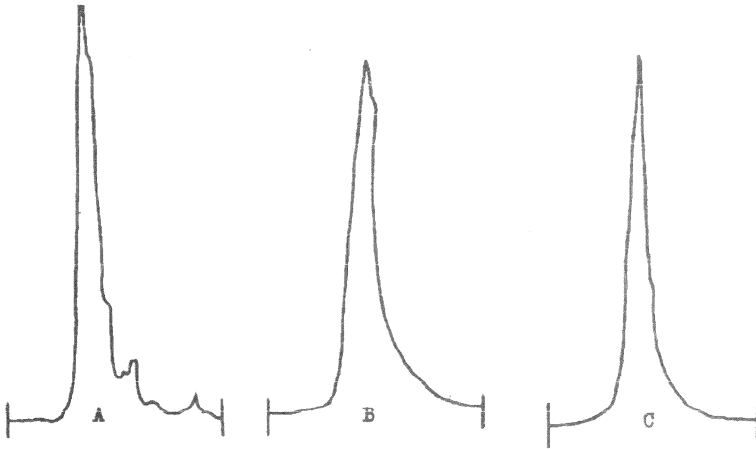
e) Karalahana ekstresindeki proteinler ile ilgili bulgular

Karalahana ekstresindeki proteinlere ait SDS - PAGE bulguları Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil - 4 : Karalahana ekstresindeki proteinlere ait SDS - PAGE bulguları. A) Sigma 6H standart proteinleri ; B) Karalahana ekstresindeki proteinler ; C) Karalahana ekstresinden $(NH_4)_2SO_4$ ile çöktürülen kısma ait proteinler ; D) Karalahana ekstresinden asetonla çöktürülen kısma ait proteinler.

Karalahana ekstresindeki proteinlere ait HPLC kromatogramları Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil - 5 : Karalahana ekstresindeki proteinlere ait HPLC kromatogramları. A) Karalahana ekstresi ; B) Eksterden $(NH_4)_2$ ile çöktürülen kısım ; C) Eksterden asetonla çöktürülen kısım

HPLC kromatogramları, metod bölümündeki bilgilerden farklı olarak, Protein PAK - 125 kolonu kullanılarak, akış hızı = 2 ml / dak,

AUFS = 0,002 şartlarında elde edilmiştir. Örnekler HPLC kolonuna 25 µl uygulanmıştır. Elde edilen büyük protein pikinin ($R_t = 5,35$ dak.) molekül ağırlığı 65000 Da olarak bulunmuştur. Kromatogramlardan, $(NH_4)_2SO_4$ ve asetonla çöktürme metodlarının, karalahana ekstresini kısmi olarak saflaştırdığı görülmektedir.

TARTIŞMA

Karalahana ekstresinin, normal farelerin plazma proteinleri üzerine in vivo etkisi DAVIS - PAGE yöntemiyle incelendiğinde γ - globulin fraksiyonunda görülen anlamlı artış, bu ekstrenin immünolojik yönden etkili olabileceğini göstermektedir. Yine karalahana ekstresinin, normal ve tümürlü farelerin plazma proteinleri üzerine in vivo etkisi, izokratik HPLC ile incelendiğinde, 55000 Da molekül ağırlığındaki bir proteinin normal farelerde bulunmadığı, fakat 15 gün ekstre uygulanmasıyla ortaya çıktığı gözlenmiştir. Dikkati çeken bir başka nokta ise bu proteinin tümürlü farelerde bulunması ve ekstre ile 15 günlük tedavi sonucunda kaybolduğunun gözlenmesidir. İleri immünolojik çalışmaların bu konuyu aydınlayabileceği düşüncesindeyiz.

Ekstrenin asetonla çöktürülen kısmında tek bir protein bantının bulunması, bu yöntemin ekstreyi kısmi olarak saflaştırdığını göstermektedir. Ekstredeki proteinlere ait HPLC bulguları bu görüşü doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Graham, S. : *New York Cancer Res. Suppl.*, **43**, 2409 (1983).
- 2- National Research Council : *Diet Nutrition and Cancer*, p. 11, National Acedemy Press, Washington, DC, 1982.
- 3- Boyd, J. N., Babish, J. G., Stoewsand, G. S. : *Food Chem. Toxic.*, **20**, 47 - 50 (1982).
- 4- Schormuller, J. : *Handbuch der Lebensmittel che Springer-Verlag Berlin 1*, 1965, p. 539.
- 5- Şengün, A., Çevikbaş, A., Özalkan, A., Gürkan, E. : *IV. Bilim Kongresi Özet Kitabı*, 5 - 8 Kasım 1973, s. 1 - 4, Ankara.
- 6- Heaney, R. K., Fenwick, G. R. : *A Review Fo. Chem. Toxic.*, **26**, 59 - 70 (1988).
- 7- Carter, T. H., Everson, B. A., Ratnoff, O. D. : *Blood*, **75**, 108 - 115 (1990).
- 8- Yurtsever, E., Yardımcı, T., Gürkan, E., Uğur, Ş.M., Çevikbaş, A., Şavaş, B., Akoğlu, T., Ulutin, O. N. : *IX. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı özet kitabı*, Eskişehir, 16 - 19 Mayıs 1991, s. 18.
- 9- Yardımcı, T., Yurtsever, E., Gürkan, E., Çevikbaş, A., Savaş, B., Kavalalı, G., Bayraktar, E., Akoğlu, T. : *Int. Pharm. J. Supplement F. I. P. Abs*, 4 P - MP - 029, 1991.
- 10- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Randall, R. I. 0 *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 - 275 (1951).
- 11- Davis, B. J. : *A. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 - 427 (1964).
- 12- Weber, K., Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 - 4412 (1969).