



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SIĞIR KARACİĞERİNDEKİ ADENOZİN DEAMİNAZ
ENZİM KİNETİĞİ ÜZERİNE TAXUS BACCATA
(PORSUK AĞACI) VE PERSEA
AMERİCANA(AVOKADO) YAPRAKLARINDAN ELDE
EDİLEN METANOL EKSTRELERİNİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Meşküre CANBOLAT

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. İlker DURAK

ANKARA 2016

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR KARACİĞERİNDEKİ ADENOZİN DEAMİNAZ
ENZİM KİNETİĞİ ÜZERİNE TAXUS BACCATA
(PORSUK AĞACI) VE PERSEA
AMERICANA(AVOKADO) YAPRAKLARINDAN ELDE
EDİLEN METANOL EKSTRELERİNİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Meşküre CANBOLAT

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. İlker DURAK

ANKARA 2016

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sığır Karaciğerindeki Adenozin Deaminaz Enzim Kinetiği Üzerine Taxus Baccata (Porsuk Ağacı) ve Persea Americana (Avokado) Yapraklarından Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle Tez Danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Meşküre CANBOLAT

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında

Meşküre CANBOLAT tarafından hazırlanan

“Sığır Karaciğerindeki Adenozin Deaminaz Enzim Kinetiği Üzerine Taxus Baccata(Porsuk Ağacı) ve Persea Americana(Avokado) Yapraklarından Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	2
1.1.1.Adenozin Deaminaz ile İlgili Çalışmaların Tarihi Gelişimi	2
1.1.2.Adenozin Deaminazın Bulunduğu Yerler	4
1.1.3.Adenozin Deaminazın Katalizlediği Reaksiyonlar	5
1.1.4. İzoenzimleri ve Molekül Kütlesi	7
1.1.5. Aktivatörler ve İnhibitörler	8
1.1.6. Klinik Önemi	9
1.1.7. Taxux Baccata Hakkında Genel Bilgi	10
1.1.8. Persea Americana Hakkında Genel Bilgi	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler	16
2.1.1.Kullanılan Cihazlar	16
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Türleri	17
2.2. Metodlar	17
2.2.1. Karaciğerin Homojenizasyonu	17
2.2.2. Protein Tayini	18
2.2.2.1.Metodun Prensibi	18
2.2.2.2. Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanması	19
2.2.2.3. Deneyin Yapılışı	19
2.2.3.Adenozin Deaminaz Aktivitesinin Tayini	20

2.2.3.1. Metodun Prensibi	20
2.2.3.2. Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanması	21
2.2.3.3. Deneyin Yapılışı	22
2.2.4. Bitki Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.5. Homojenize Edilen Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	24
2.2.5.1. Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Adenozin Deaminaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	24
2.2.6. ADA Aktivite Üzerine <i>Taxus baccata</i> Kuru Ham Ekstraktının Etkisi	24
2.2.7. ADA Aktivite Üzerine <i>Persea americana</i> Kuru Ham Ekstraktının Etkisi	28
3. BULGULAR	32
3.1. Homojenize Edilen Enzimin Kinetik Özelliklerine Ait Sonuçlar	32
3.1.1. Değişen Adenozin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri	32
3.1.2. <i>Taxus Baccata</i> Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri	34
3.1.3. <i>Persea americana</i> Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri	40
4-TARTIŞMA	53
5-SONUÇ VE ÖNERİLER	58
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	71

ÖNSÖZ

Klinik açıdan önemli bir enzim olan adenozin deaminaz, kısmen saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin incelendiği pekçok çalışma yayınlarda yer almaktadır. Biz bu çalışmamızda, adenozin deaminazın fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini karakterize etmek, bunun yanısıra *Taxus baccata* ve *Persea americana*nın invitro olarak enzimin kinetik özelliklerinde ne gibi değişiklikler meydana getireceğini araştırmayı istedik. Bu çalışmanın biyokimyasal açıdan çok faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Doktora eğitimimin süresince yakın desteğini gördüğüm danışmanım ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. İlker DURAK'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK'e, Sayın Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR'a, Sayın Prof. Dr. Aslıhan AVCI'ya, Sayın Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER'e, Sayın Prof. Dr. Erdiç DEVRİM'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Bilim Dalı Eski Başkanı Sayın Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU'na, Sayın Laborant Ömer SAVRAN'a, Sağlık Teknisyeni Sayın Sema ÖZTÜRK'e, Kimya Mühendisi Sayın Nurdan TORUNOĞLU'na, sekreteryaya Sayın Nurhan GÖDELEKOĞLU'na, Sayın Kadime KIZILIRMAK'a,

Tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen yakın desteğini gördüğüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa KAVUTCU'ya,

Tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sağlık Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yasemin İşgör'e,

Tüm yaşamım boyunca desteğini her zaman hissettiğim aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ L : Mikrolitre

ADA : Adenozin deaminaz

AK : Adenozin kinaz

mL : Mililitre



ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. <i>Taxus baccata</i> bitkisi	11
Şekil 1. 2. <i>Persea americana</i> bitkisi	14
Şekil 2. 1. Protein standart eğrisi	20
Şekil 3. 1. Değişen L-Adenozin konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	33
Şekil 3. 2. Değişen L-Adenozin konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	33
Şekil 3. 3. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	34
Şekil 3. 4. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	35
Şekil 3. 5. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	36
Şekil 3. 6. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	36
Şekil 3.7. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	37
Şekil 3. 8. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	38
Şekil 3. 9. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	39
Şekil 3. 10. <i>Taxus baccata</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	39
Şekil 3. 11. <i>Persea americana</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis-Menten grafiği)	40
Şekil 3. 12. <i>Persea americana</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	41
Şekil 3. 13. <i>Persea americana</i> ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)	42

Şekil 3. 14. Persea americana ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver Burk grafiği)	42
Şekil 3. 15. Persea americana ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)	43
Şekil 3. 16. Persea americana ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver Burk grafiği)	44
Şekil 3. 17. Persea americana ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)	45
Şekil 3. 18. Persea americana ekstraktının enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver Burk grafiği)	45
Şekil 3. 19. %50 Taxus baccata ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)	46
Şekil 3. 20. %50 Taxus baccata ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	46
Şekil 3. 21. %10 Taxus baccata ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)	47
Şekil 3. 22. %10 Taxus baccata ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)	48
Şekil 3. 23. %50 Persea americana ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)	49
Şekil 3. 24. %50 Persea americana ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)	49
Şekil 3. 25. %10 Persea americana ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)	50
Şekil 3. 26. %10 Persea americana ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)	51

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. İnsan dokusundaki ADA dağılımı	5
Çizelge 2. 1. Protein standart eğrisinin oluşturulması için deney şeması	19
Çizelge 2. 2. ADAaktivite ölçümü için deney şeması	22
Çizelge 2. 3. Farklı konsantrasyonlarda L-Adenozin için deney şeması	24
Çizelge 2. 4. 30 dk bekletilmiş %50'lik -Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması	24
Çizelge 2. 5. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	25
Çizelge 2. 6. 120dk bekletilmiş %50'lik Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması	25
Çizelge 2. 7. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	26
Çizelge 2. 8. 30 dk bekletilmiş %10'lik -Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması	26
Çizelge 2. 9. Taxus baccatakuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	27
Çizelge 2. 10. 120 dk bekletilmiş %10'luk Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması	27
Çizelge 2. 11. Taxus baccatakuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	27
Çizelge 2. 12. 30dk bekletilmiş %50'lik Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması	28
Çizelge 2. 13. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	28
Çizelge 2. 14. 120dkbekletilmiş %50'lik Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması	29
Çizelge 2. 15. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	29
Çizelge 2. 16. 30dk bekletilmiş %10'luk Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması	30

Çizelge 2. 17. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	30
Çizelge 2. 18. 120dk bekletilmiş %10'luk Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması	31
Çizelge 2. 19. Persea americanakuru hamekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması	31
Çizelge 3. 1. Değişen L-Adenozin Konsantrasyonunun Enzim Aktivite Tesirine Ait Deney Sonuçları	32
Çizelge 3. 2. 30 dk bekletilmiş %50'lik Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	34
Çizelge 3. 3. 30 dk bekletilmiş %10'luk Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	35
Çizelge 3. 4. 120 dk bekletilmiş%50'lik Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	37
Çizelge 3. 5. 120 dk bekletilmiş %10'luk Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	38
Çizelge 3. 6. 30 dk bekletilmiş %50'lik Persea americana kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	40
Çizelge 3. 7. 30 dk bekletilmiş %10'luk Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	41
Çizelge 3. 8. 120 dk bekletilmiş %50'lik Persea americana kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	43
Çizelge 3. 9. 120 dk bekletilmiş %10'luk Persea americana kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları	44

1.GİRİŞ

Pürin katabolizmasında görev alan anahtar enzimlerden birisi Adenozin deaminaz (ADA) (E.C.3.5.4.4; ADA; Adenozin aminohidrolaz)dır. Enzim amonyağın ayrılıp sırasıyla inozin ve deoksi inozin oluşması reaksiyonlarını katalizler(Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

ADA pürin kurtarma yolu enzimi olarak da kabul edilir. Adenozinden ürik aside kadar olan reaksiyonda ara ürün olarak açığa çıkan hipoksantin salvage ara yola substrat olarak girer (Balis, 1985). Hücrelerde genetik bilgi DNA molekülleri aracılığıyla taşınır. RNA sentezi ve bütün hücre proteinlerinin biyosentezi gerçekleştirilir. Bilindiği gibi kanser hücrelerinde DNA turnoveri ve buna bağlı olarak da nükleotidlerin salvage ara yolu normal hücreye göre çok hızlanmıştır. Bu olay kanser hücresinin ihtiyaç duyduğu pürin nükleotidlerinin artışı ile birliktedir. Kanserli hücrelerde metabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler kanser hücresinin enzimatik profilini yansıtması açısından önemlidir (Sheid, 1985). Ayrıca ADA aktivitesinin immün sistem hastalıkları, hepatit, pankreatit, hemolitik anemi gibi değişik hastalıklarda arttığı veya azaldığına ait pekçok çalışma mevcuttur (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

İnsanlar yüzyıllar boyunca binlerce bitkiyi geleneksel tedavi yönteminde kullanmışlardır (Eisenhauer, E.A; Vermorken, J.B, 1998). Dolayısıyla gerek laboratuvar ortamında gerekse alternatif tıpta kullanımı sonucunda binlerce bitkinin bazılarında elde edilen ekstraktlar yine bazı kanserli hücrelerin oluşması, bazılarında çoğalmasını, bazılarının yayılmasını engelleyebildiği izlenmiştir. Sonucu olarak da önleyici ve tedavi edici özellikleriyle de kanser tedavisinde uygun bitkisel ajanlar oluşturmuşlardır(Arbuck, S.G; Blaylock, B.A, 1995).

Yapılan araştırmalar sonucunda ülkemiz bitki florasında dokuz binin üzerinde bitki çeşidi bulunmaktadır. Yaklaşık bin çeşidinin gerek ilaç gerekse şeker

endüstrisinde kullanıldığı, kozmetik, diş macunu, sabun sanayinde, bir kısmında baharat olarak tüketildiği bilinmektedir(Croom, 1995).

Günümüzde çeşitli hastalıkların teşhisi, tiplendirilmesi, prognozların takibi ve tedavilerinde klinik açıdan önem arzeden enzimlere ait pek çok çalışma mevcuttur. Bu enzimlerden biri olan adenzin deaminazın saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini gösteren çalışmalarda yayınlarda yer almaktadır. Yine yayınlarda enzimin saflaştırıldıktan sonra, bazı kinetik özelliklerini karakterize eden, bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda mevcuttur.

Literatürlerde özellikle enzimin saflaştırıldıktan sonra *Taxus baccata* ve *Persea americana*nın enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu çalışmamızda kullandığımız bitkilerdeki bileşenlerin toplam biyolojik aktivite için önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu yoldan hareketle klinik açıdan önem arzeden adenzin deaminazın fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini karakterize etmek, bunun yanı sıra *Taxus baccata* ve *Persea americana*nın invitro olarak enzimin kinetik özelliklerinde ne gibi değişiklikler meydana getireceğinin araştırılmasının biyokimyasal açıdan çok faydalı olacağına da inanmaktayız. Bu tür bir çalışmanın bu amaca yönelik diğer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

1.1.Genel Bilgiler

1.1.1. Adenzin Deaminaz ile İlgili Çalışmaların Tarihi Gelişimi

Adenzin deaminaz aktivitesi ilk detaylı çalışma 1939 yılında Conway&Cook tarafından rat dokusunda yapılmıştır. Bunların bağırsakta yüksek konsantrasyonda bulunduğu ve kuvvetli vazodepresand olan adenzinin ona göre rölatif olarak inaktif olan inozine çevrilmesinde ve diğer dokularda varlığında biyosentetik reaksiyonlarda

nötralizasyon için amonyak kaynağı olarak etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Brady, T.g , O'Donovan, C.I, 1965)

Clarke ve arkadaşları 1952 yılında rat, fare ve kedi gibi hayvanların dokularındaki deaminazların miktarını birbirleriyle karşılaştırmalı olarak çalışarak adenozine yüksek duyarlılık gösteren reseptörlerle assosiyasyonda savunma mekanizması gibi bir rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Makarewicz&Zydowo vertebranın böbreğinde amonyak üreten enzimlerin bir kısmını, Purzyeka 1962'de rat dokusundaki dağılımını çalışmışlardır.

Stern ve ark. (1952); Jordan ve ark. (1959), Block&Johnson (1954), de pürin metabolize eden enzimlerle ilişkilerini, Solomon (1960); Fisher ve ark.(1962), de büyüme süresince değişimini gerek dokuda gerek intraselüler dağılımda keşfetmek amacıyla araştırmışlardır.

ADA aktivitesini rat, quinea-pig, fare, kedi, köpek ve bazı sığır dokularında çalışarak optimum pH'sını, izoelektrik noktasını ve bazı elektroforetik davranışlarını incelemiştir (T.G.Brady). Ayrıca dokulara göre ADA aktivitesini yüksek ve düşük aktiviteli olarak sınıflandırmışlardır (Brady & O'Donovan, 1965).

Dana dalağında N.Pfrogner, ADA'yı izoelektrik presipitasyon, amonyum sülfat fraksiyonu ve değişik dolgu maddeleri kullanarak saflaştırmışlardır.

1967-68'li yıllarda değişik hayvanların farklı organ ve dokularından Pang F.Ma ve J.R.Fisher, ADA'yı saflaştırarak substrat spesifitesi, Vmax, Km, değişik izoenzimlerinin varlığını keşfederek molekül ağırlıkları, izoelektrik noktaları v.s. gibi fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini tespit etmişlerdir (Fisher, 1969).

1969 yılında yaptıkları çalışma ile P.M.Murphy ve arkadaşları da sığır mukozasından iyon değiştirme kromatografisi ile ADA'yı saflaştırarak değişik

substratları deneyerek onlara ait hız ve Km değerlerini; değişik efektörlere karşı (üre,sıcaklık,p-merküribenzoat)izoenzimlerinin davranışlarını incelemiştir (Akedo, H; Nishihara, H; Shinkai; K, Komatzu,, 1970).

Değişik kimyasal maddelere karşı dana bağırsak mukozasından saflaştırdıkları enzimin davranışı ve molekül ağırlıkları yanısıra aminoasit dizisini tayin etmişlerdir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Bitkilerden ve mantarlardan, besin maddelerinde (yumurta akı) enzimle ilgili çok sayıda çalışmalarda tayin edilerek ileri derecelerde saflaştırılmış ve enzimin reaksiyon mekanizması açıklanmıştır (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

1.1.2. Adenozin Deaminazın Bulunduğu Yerler

Doku ve organlara göre ADA'nın dağılımı gösteren pek çok çalışma tespit edilmiştir (Fisher, 1969). Buldukları dokulara göre dağılımı farklılık göstermektedir (Adams, A; Harkness, R.A, 1976).

T.G.Brady enzim aktivitesinin farklı hayvan organ ve dokularında dağılımını tespit etmiştir. Genel olarak hayvanların mukoza ve dalaklarında aktivitenin yüksek olduğunu daha önceki çalışmalarla kıyaslayarak tesbit etmiştir (Brady & O'Donovan, 1965).

Ma&Fisher ve Zielke&Suelter değişik organ ve dokularda ADA aktivitesini tayin etmişlerdir (Fisher, 1969).

Diğer bir çalışmaya göre enzim hücrelerin ekstraselüler kompartımanında, sitoplazmasında ve düşük oranda da nükleusunda bulunduğunu, iskelet kası, deri ve ciltte aktivitenin hiç olmadığı veya çok az miktarlarda olduğu da bildirmektedir (Guisti, 1974).

Timüs, dalak, mide ve eritrositlerde enzimin düşük ağırlıklı formu (40.000g/mol) daha fazladır. Karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta enzimin molekül ağırlığı yüksek olan formu (20.0000g/mol) bulunmaktadır. Ayrıca lenfoid de mukoza dokusu kadar ADA aktivitesine sahiptir (Lal & Fisher, 1987).

İnsan dokusunda yaptıkları çalışma sonucu Martin B.ve ark.'ı ADA' nın dokulara göre dağılımını şu şekilde sıralamaktadırlar (Wenden Wander & Kelly, 1976).

Çizelge 1. 1. İnsan dokusundaki ADA dağılımı

DOKU	SPESİFİK AKTİVİTE (nmol /dak/mg.prot.)	TOPLAM AKTİVİTENİN YÜZDESİ		
		LARGE	INTERMED	SMALL
Duodenum	127	9	0,7	89
Mide	89	2	0,3	96
Pankreas	27			
Beyin	27			
Lenf Nodu	23			
Testisler	13			
Kalp Kası	11			
Karaciğer	9	59	12	24
Akciğer	7	74		
Böbrek	6	86		
Tiroid	4			

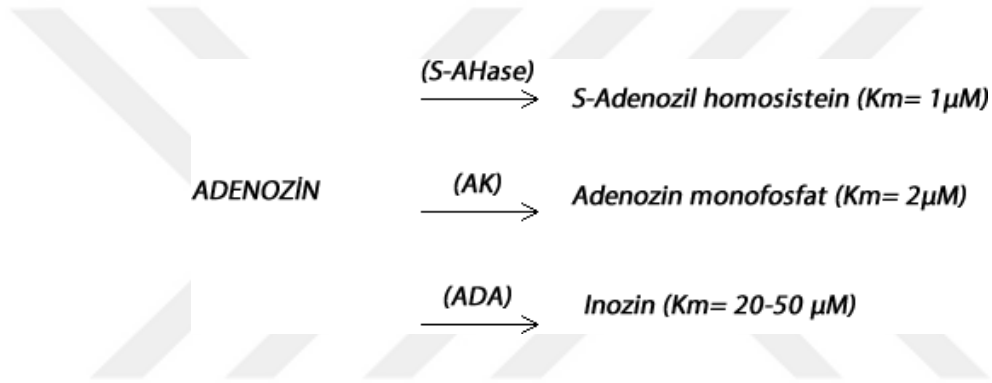
1.1.3.Adenozin Deaminazın Katalizlediği Reaksiyonlar

Birçok araştırmacı tarafından ADA' nın katalitik özellikleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Çalışmalar sonucu enzimin amino, hidroksiamino, kloro ve metoksil gruplarının pürin ribonükleozidlerinin 6 nolu atomdan ayrılmasını katalizlemektedir (Maguire & Sim, 1971).

Adenozin, deoksiadenozin, cordycepin(32deoksiadenozin), 6-kloropürin ribozid ve 2,6-diaminopurin ribozid'i P.F.Ma ve J.R.Fisherde deneyerek en iyi sonucu adenozinden elde etmişlerdir.(relatif olarak adenozin için $v=1$ iken deoksiadenozin için 0.35-0.70dir) (Fisher, 1969).

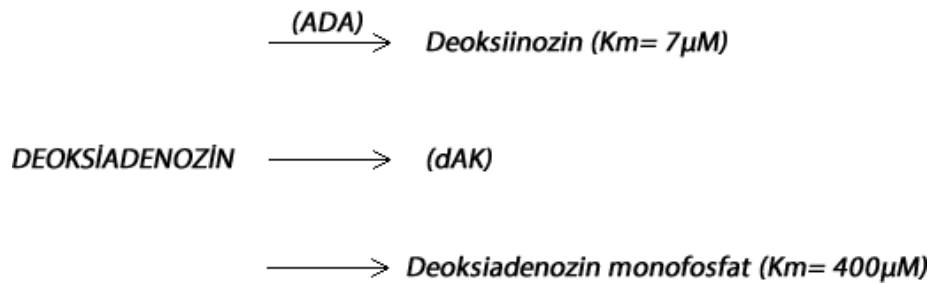
Adenozin, adenozin kinaz(AK) ve S-adenozil homosistein hidrolaz(S-AHase) enzimlerinin de substratıdır. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucu ürün olarak, sırasıyla adenozin monofosfat ve S-adenozil homosistein meydana gelir. Deoksiadenozin ise, deksinükleozit kinazında substratıdır. Ürün olarak sırasıyla deoksiinozin ve deoksiadenozin monofosfat meydana gelir(Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Enzimlerin hücrelerdeki önem ve rollerini açıklamada bu enzimlerin kinetik özelliklerinin incelenmesi bir fikir verebilir (Seemiller, 1985). İlgili reaksiyonları şu şekilde gösterebiliriz.



Buradan da açıkça görüleceği üzere adenozine karşı ilgisi en fazla olan S-AHase ve AK'dır. Maksimum hızları (V_{max}) incelendiğinde ADA'nın V_{max} değeri daha da yüksektir. Buda ADA'nın adenozini metabolize etme kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir(Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

ADA'nın diğer substratı deoksiadenozindir. Buda ADA ve deksinükleozit kinazın substratıdır.



Yukarıdaki reaksiyonlar incelendiğinde ADA'nın deoksiadenozine olan ilgisi adenozeine olandan daha fazladır (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

ADA'nın K_m ve V_{max} değerleri yapılan çalışmalar sonucu saflaştırılan kaynağa ve organa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Yaptığımız literatür araştırmaları sonucu ADA'nın ve izoenzimlerinin adenozin substratına karşı K_m değerinin (0,05-0,1 M pH 7-7,4 fosfat veya Tris/HCl tamponu kullanılarak)30-400 μ M arasında değiştiği ifade edilmektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1987).

ADA'nın aktif merkezinde Zn metali ve onunla valans bağı yapmış histidin, glutamik asit ve sistein amino asitlerinin olduğu X-ışınları ile yapılan kimyasal analizler sonucu belirlenmiştir (Grosshans & Wolfenden, 1993).

ADA'nın ilk defa katalizlediği reaksiyonla ilgili etki mekanizması 1971 tarihinde M.Helen Maguire ve ark. tarafından yapılmıştır. Daha sonra birçok ayrıntılı çalışmalar devam etmiş ve reaksiyonun bir çevrim şeklinde gerçekleştiği anlaşılmıştır (Grosshans & Wolfenden, 1993).

1.1.4. İzoenzimleri ve Molekül Kütlesi

P.F.Ma ve J.R.Fisher Sephadex kromatografisi ile tavuk karaciğerinden saflaştırdıkları enzimin iki ayrı formunun bulunduğunu tayin etmişlerdir. İlk olarak ADA'nın izoenzimleri ve molekül kütleleri ile ilgili bilgilerden bahsetmektedirler. Bunlardan molekül ağırlığı büyük olanına (110.000 mol.wt)large', küçük olanına da(30.000 mol.wt) small' ADA adını vermişlerdir (Fisher, 1969). Kurbağa dokusundan saflaştırdıkları enzimleri A,B ve C şeklinde sınıflandırarak molekül ağırlıklarını sırasıyla 180.000, 100.000, 35.000 olarak tespit etmişlerdir. B formunun karaciğerde, C formunun ise duedonumda baskın olduğu belirlenmiştir. Bu formlar ADA aktivitesinin sırasıyla %7, 68 ve 25'ini teşkil etmektedir. Bu çalışmalarına başka canlı ve dokularda devam ederek yaklaşık aynı sonuçları elde etmişlerdir (Fisher, 1969).

J.Phelan ve arkadaşları sığır intestinal mukozasından ADA saflaştırdıktan sonra aminoasit dizisini tayin ettikten sonra molekül kütlesini sedimentasyon sabiti metoduyla ortalama 34.500 olarak hesaplamışlardır (Phelan, McEvoy, Rooney, & Brady, 1970).

Sağlıklı insan akciğeri ve mide dokusundan iki tür ADA olduğunu Akedo ve ark'ları 1970 yılında tespit etmiş ve bunlar büyük molekül ağırlıklı ve küçük molekül ağırlıklı olarak isimlendirmişlerdir.

İnsan dokusunda ADA'nın farklı molekül ağırlıklarını yaklaşık 36.000, 114.000 ve 298.000 (sırasıyla small, intermedia ve large) ifade ederek bunların birbirlerine dönüşür olduğunu göstermişlerdir (Akedo, H; Nishihara, H; Shinkai; K, Komatzu,, 1970).

1.1.5. Aktivatörler ve İnhibitörler

ADA'nın inhibisyonu ile ilgili olarak pürin nükleozit analogları, civalı organik bileşikler, Cu, Ag, Cr, gibi ağır metallere birlikte (+1 yüklü katyonlar) Li, Na, K, Rb, Cs, NH₄ ile (+2 yüklü katyonlar) Mg, Ca ve Ba denenmiştir. Bunlardan +1 yüklü katyonların Etanol ve tedavi amacıyla kullanılan bazı sedativ, ankiyalitik, analjezik ve relaksand ilaçların da enzimin modülatörleri olduğu belirtilmektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988). Enzimi aktive etmesine rağmen (Ag hariç)⁺² yüklü katyonların inhibe ettiği belirtilmektedir (Morisaki, Fujii, & Miva, 1985).

Ayrıca hem karaciğer hem de hızlı gelişen hepatoma 3924 A da ADA inozin tarafından son ürün inhibisyonuna uğramaktadır (Jackson & Weber, 1978). İnsan eritrositinden afinite kromatografisiyle J.M.Aran ve arkadaşları tarafından saflaştırdıkları ADA'nın pürin ribozid tarafından tersinir olarak inhibe edildiğini ve bu inhibisyonun inozinin etkisinden daha fazla olduğunu belirtmektedir (Aran, Canela, & Franco, 1990).

Ayrıca aynı araştışıcılar Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) (EHNA)'in pürin ribozitten daha kuvvetli ADA inhibitörü olduğunu belirtmektedir (Aran, Canela, & Franco, 1990). İnsan serumundan elde ettikleri ADA izoenzimlerinden ADA₁ ve ADA_{1+cp} nin EHNA tarafından inhibe edilmesine karşılık EHNA 'nın ADA₂ yi etkilemediğini elektroforetik olarak J.P.J.Ungerer ve arkadaşları 1992'de göstermişlerdir.

Coformisin, pentostatin ve 2'-kloropentostatin'in de spesifik ADA inhibitörü olduğu H.Ratech ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. (Ratech & Hirschorn, 1995).

1.1.6. Klinik Önemi

ADA adenzinin inozine (veya deoksi adenzinin deoksi inozine) çevrilmesinde rol oynadığı için pürin metabolizmasının anahtar enzimlerindenir. Adenzin merkezi sinir sisteminde nöromodulator veya nörohormon olarak kabul edildiği için bu çevrim çok önemlidir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

ADA'nın immünolojik cevabın gelişmesinde ve monositlerin olgun makrofajlara dönüşümünde önemli fonksiyonlara sahip olduğu düşünülmektedir (Holton R. , Kim, C., & al., 1994).

EHNA ile invitro olarak ADA inhibe edildiğinde, monositlerin sitotoksitesinin efektör gelişiminin engellenmesi (monosit kemotaksisi, makrofajların tümör hücrelerine bağlanması) metilasyon reaksiyonlarının engellenmesinden ileri gelmektedir (Holton R. , Kim, C., & al., 1994).

ADA'nın eksikliğiyle ilişkili olarak insanlarda kombine immün sistem bozuklukları gözlenmiştir. Bu tip hastalarda hem humoral hemde hücre sel immünite defektler ortaya çıkmaktadır (Andrian & Hutton, 1983).

ADA ko-formisin, deoksi formisin, eritro-9-adenin ile inhibe edildiğinde toksik nükleotid seviyelerinin arttığı ve hücrel toksiteden bu artan toksik nükleotidlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Artan bu toksik nükleotidler DNA sentezini engellemekte ve sitolize sebep olmaktadır (Bontepms & Berghe, 1989).

ADA inhibe edildiği zaman substratları olan adenozin ve deoksiadenozin hücrelerde birikir. Adenozin ve deoksi adenzinden sırasıyla fazla miktarda ATP ve dATP oluşmaktadır. Artan dATP ribonükleotid redüktazı allosterik olarak inhibe etmektedir. Ribonükleotid redüktazın inhibisyonu sonucu deoksinükleotidlerin seviyeleri azalır. Deoksinükleotidler DNA'nın prekürsörleri olduklarından DNA sentezi bozulmakta ve esas olarak lenfositik toksisitede sorumlu tutulmaktadır. Diğer substratı olan adenzinin artışı S-adenozil homosistein hidrolaz enziminin kataliziyle meydana gelen S-adenozil homosistein (SAH)miktarını artırmaktadır. Bu artış S-adenozil metiyonin tarafından gerçekleştirilen metilasyon reaksiyonlarını inhibe etmektedir. DNA sentezi içinde gerekli olan bu metilasyon reaksiyonlarının engellenmesi hücreler için zararlıdır (Rodriguez-Carpena, Morcuende, & al., 2011).

1.1.7. *Taxus Baccata* Hakkında Genel Bilgi

Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Sistematığı ve Özellikleri

Alem	:	<i>Plantae</i>
Bölüm	:	<i>Pinopsida</i>
Takım	:	<i>Pinales</i>
Familya	:	<i>Taxaceae</i>
Cins	:	<i>Taxus</i>
Tür	:	<i>Taxus baccata</i>

Porsuk(*Taxus*),*Taxus* cinsinden porsukgiller(Taxaceae) familyasına ait ibrelili ağaç türlerine verilen isimdir.

Çoğunlukla boylu çalı veya 20 metreye kadar boylanabilen bir ağaçtır. Gövde kabuğu kırmızımsı kahverengi, yaşlı fertlerde pul ve şeritler halinde ayrılır, soyulur.

Genç sürgünler yeşil, iğne yaprakların üst yüzü koyu yeşil, altta yeşil şerit belirgin değildir. Karadeniz Bölgesi'nde (Özellikle Rize, Sinop, Zonguldak, Karabük, Düzce, Bolu, Demirköy Ormanlarında), Kaz Dağlarında, Sultan Dağlarında, Akdeniz Kıyı Ormanlarında, Amanoslarda rastlanmaktadır. Kireççe zengin, rutubetli ve yarı gölgeli yerlerde iyi gelişir. Yavaş büyür. Kütük sürgünü oluşturur.

Porsuk ağacı yetiştirilmesi oldukça güçtür. Kırmızı portakal sarısı renklerinin yanında yeşil renkte olan kendisine has meyveleri genellikle çok tatlı olup meyvelerin içerisinde bulunan çekirdeklerin çıkarılması halinde yenilebilmektedir. Porsuk ağacı iki evcikli dir. Dolayısıyla erkek ve dişi organ farklı ağaçlarda bulunur (Wani, Taylor, et al, 1971).



Şekil 1. 1. Taxus baccata bitkisi

Kuzeybatı pasifikte yetişen Taxus brevifolia Nutt.'nın kabuklarından 1971 yılında ilk kez düşük miktarda (% 0.02) taxol izole edilmiştir(Wani, Taylor, & al, 1971).

Ayrıca bu türün yanında diğer Taxus türlerinin de taksol içerdiği tespit edilmiştir(Croom, 1995).

Taksol taksan diterpen iskeletine (pentametiltrisiklo pentadesen; IUPAC nomenklatürü) sahip, toplam 11 stereomerkez taşıyan, sekiz okso grubu ve bir yan zincir (N-benzoil fenilzoserin) ile doğada nadir bulunmaktadır(Wani, Taylor, & al, 1971).

Taxus türlerinin az bulunması, yavaş büyümesi, öte yandan bu ağaçlarda bulunan taksol miktarının düşük olması nedeniyle ilaç hammaddesinde çok kullanıldığı için yeryüzünde kaynaklar araştırılmaktadır(Croom, 1995).

Diğer antimitotik bileşiklerden farklı olarak vinca alkaloidleri, kolşisin mikrotübüllerde tübülün polimerizasyonunu artırarak dayanıklı mikrotübül toplulukları oluşturarak etki göstermektedir(Horwitz, 1992).

Elde edilmesindeki ve formülasyonundaki güçlükler nedeniyle bileşiğin klinikte uygulanması için çalışmalar uzun yıllar almıştır(Suffness, 1995).

Bugüne kadar HOLTON(Holton R. , Kim, C., & al., 1994), NICOLAOU(Nicolaou, Dai, & Guy, 1994) ve DANISHEFSKY(Danishefsky, Masters, Young, & al., 1996) tarafından üç ayrı yolla total sentezi gerçekleştirilmiştir.

Taxus baccata L.'nin ağaca zarar vermeden toplanabilen ve yenilenebilir kısmı olan yapraklarından yüksek oranda (% 0.1) elde edilen 10-deasetilbakkatin III(Eisenhauer, E.A; Vermorken, J.B, 1998) ve bakkatin III'den (Arbuck, S.G; Blaylock, B.A, 1995) hareketle yarısentez sonucu taksol (Holton, Biediger, & Boatman, 1995) ve bugün tedavide kullanılan taxotere (Aggarwal, 2008), (docetaxel) (Holton, Biediger, & Boatman, 1995) sentezlenmiştir.

Son yıllara kadar yarısentez sonucu elde edilen taksol ilaç hazırlanmasında kullanılmıştır(Croom, 1995).

Çok yeni olarak Taxus baccata yapraklarından elde edilen bakkatin III ve 10-deasetil türevinden biyotransformasyon yoluyla elde edilen taksol de ilaç hazırlanmasında kullanılmaktadır (Wall, M.E; Wani, M, 1998).

Taxus türlerinden taksol ve diğer taksanları bitki hücre ve doku kültürü metodları ile üretmek için çeşitli gruplar çalışmaktadır. Bu yolla taksol üretimi sağlanmıştır(Drexler, Gaedicke, & Minowada, 1987).

Ayrıca *Taxus brevifolia*'dan elde edilen endofitik bir mantar olan *Taxomyces andreana*'nın da taksol ve benzeri taksanları ürettiği belirlenmiştir(Wani, Taylor, & al, 1971).

Daha sonra diğer *Taxus* türlerinde de taksol üreten mikroorganizmaların varlığı belirlenmiştir(Strobel, Yang, Sears, & al., 1996).

Taksol (1, Paclitaxel) doğal antikanser bileşiklerden birisidir. Ovaryum, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Çeşitli kanserlerin tedavisinde de ümit verici görülmektedir(Arbuck, S.G; Blaylock, B.A, 1995). Ancak bu üretim alternatifleri henüz ticari olarak uygulanabilir değildir. Taksol'ün artan ihtiyacı ve üretiminin biyolojik metotlar üzerine kurulması(Cragg, Schepartz, & al., 1993), taksol biyosentezinin ayrıntılı açıklanmasını gerektirmiştir. Bu nedenle dünyada birçok grup tarafından taksolün biyosentez basamakları araştırılmıştır. Son yıllarda Taksol'ün biyosentez basamakları ile ilgili bilgiler, açıklanmayan bazı ara basamaklar olmakla birlikte belirlenebilmiştir(Hezari, M; Croteau, R, 1997).

1.1.8. *Persea Americana* Hakkında Genel Bilgi

Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Sistematığı ve Özellikleri

Alem	:	<i>Plantae</i>
Bölüm	:	<i>Angiosperms-magnoliids</i>
Takım	:	<i>Lurales</i>
Familya	:	<i>Lauraceae</i>
Cins	:	<i>Persea</i>
Tür	:	<i>Persea americana</i>

Persea cinsi tarçın ve önemli ağaç türlerini içine alan Lauraceae familyasının 50 cinsinden biridir (Özcan, S.; E, Gürel; M, Babaoğlu, 1994). Persea americanada 3 botaniksel ırk vardır. Bunlar; Meksika, Guatemala ve Antil olarak bilinir (Whiley, 1991). Persea alt türüne ait, Persea americana'nın her bir üyesi coğrafik olarak farklı mikro çevrelere adapte olabilen alt türler veya birkaç çeşitten oluşan polimorfik türlerdir.



Şekil 1. 2. Persea americana bitkisi

Avokado (*Persea americana*), kapalı tohumlular sınıfındandır. Defnegiller familyasına ait bir ağacın meyvesinin adıdır.

Avokado ağaçları şekil olarak farklılıklar gösteren, 8 ila 20 metreye kadar büyüeyebilen herdem yeşil ağaçlardır (Jackson, 1986). Yaprığı basit yaprak formundadır. Yaprakları oval ve eliptik şekildedir. Yaprak uzunlukları 7,5-35,5 cm'ye kadardır. Olgunlaşmamış yaprakların rengi açık yeşildir. Genç sürgünler kırmızının tonları ve beyazımsı renkte olurlar. Meyve şekli armut (pyriform) veya oval şekildedir. Meyveler çeşitli büyüklük, şekil, renk ve özelliklere sahiptir. Ağırlıkları 200-600gram arasında değişir (Nakasone & Paul, 1998).

Avokado meyvelerinin etli olduğu yüksek yağ içerdiği (%7-25) bilinmektedir. (Özcan, S.; E, Gürel; M, Babaoğlu, 1994).

Meyveler klimatrik özellik göstermektedir. Avokado meyveleri ağaç üzerinde olduğunda yenmez, ağaçtan koparıldıktan sonra klimatrik yükselme ve solunum pikinden sonra tam olgunluk meydana gelir (Phan, Pantastico, & al., 1975). Bu

nedenle tereyağı kıvamına kadar yumuşayınca tüketilir. Meyve eti sarı, fıstık yeşili ve soluk yeşil arasında değişir, besleyici ve kalıncadır.

Avokadonun anavatanı Orta Meksikadır. Akdeniz iklimine sahip çeşitli bölgelerde, subtropikal iklimde, tropikal iklime sahip bölgelerde de sıklıkla yetiştirilmektedir. Ülkemizde de Antalya'dan İskenderun'u içine alan Akdeniz iklimine sahip geniş bir alanda ve Doğu Karadeniz Bölgesinde de yetiştirilmektedir.

A, D, E vitaminleri ile Fe, P, Mg, S ve Cu elementleri bakımından zengindir. Doymamış yağ oranı yüksektir (%30) (Yeşiloğlu, 2006).

Avokado bitkisinin kendine has bir aroması olup, bu aroma bitkiyi kapsayan yağından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu bu yağın insan beslenmesindeki önemi yeni yeni kavranmaktadır. Tek zincirli doymamış oleik asit yağ asidi içerir. Kandaki düşük yoğunluktaki lipoprotein (LDL) seviyesini düşürmektedir (Pahua-Ramos, Ortiz-Moreno, & et al, 2012).

Yapılan çalışmalarda avokado diğer besinlerden daha yüksek seviyede antioksidan bulundurmaktadır. İçerdiği A, B, E vitaminleri ile çözülebilir lif bulunması nedeniyle kalp sağlığında önem teşkil ettiği anlaşılmaktadır (Ja, DR, & et al., 2007).

Yine yapılan araştırmalar sonucu avokadonun kloroform-metanol ekstraksiyonu sonucu anti diyare etkisinin görüldüğü anlaşılmış dolayısıyla ilerleyen zamanlarda ishale karşı ilaçlarda etkili olacağı düşünülmektedir (Christian, Parker, & al., 2004). Ayrıca içerisindeki özgün yağı nedeniyle kozmetik endüstrisinde çok kullanılmaktadır. Özellikle yüz ve saç bakım kremleri, sabun ve el losyonları biçiminde çok kullanılmaktadır. Fransa ve İtalya'da avokado yağı fazla tüketilmektedir (Anonim, 2007). Kolon, özafagus kanseri üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur (Yeşiloğlu, 2006).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Sartorius Basic Model Dijital Terazi

Waring Blender

Heidolph DIA 900

Braun Melsungen homojenizatör

Heldoph marka magnetik karıştırıcı

Wrilmix marka vortex karıştırıcı

Grant instruments CB₂ 5O₂ su banyosu

Shimadzu model UVmini 1240 spektrofotometre

Heraeus marka sepatech spektrofotometre

Braun marka 10-100; 100-250 ve 250-1000µl'lik otomatik pipetler

Plastik ve cam laboratuvar malzemeleri

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma esnasında kullanılan bütün kimyasal maddeler analiz için gereken biyokimyasal saflıktadır.

Amonyum sülfat(NH₄)₂SO₄; Potasyum dihidrojen fosfat KH₂PO₄; Disodyum hidrojen fosfat Na₂HPO₄

Adenozin

Hipoklorit ise ticari olarak satılanlardan temin edildi ve hipoklorit miktarı titrasyonla belirlendikten sonra uygun seyreltmeler yapılmak suretiyle kullanıldı.

Protein standardı olarak sigmadan temin edilen sığır serum albümini (BSA) kullanıldı.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Türleri

Bu çalışmada Lauraceae Familyasına ait *Persea americana* yaprakları ile Taxaceae Familyasına ait *Taxus baccata* dal ve yaprakları kullanılmıştır. *Persea americana* yaprakları Akdeniz bölgesinden, *Taxus baccata* dal ve yaprakları ise Karadeniz bölgesindeki ormanlık alanlardan toplanmıştır.

2.2. Metodlar

Çalışmalar iki safhada gerçekleştirilmiştir. Birinci safhada kısmen izolasyon işlemi yapılarak sığır karaciğerinden ADA enzimi izole edildi. İkinci safhada adenozin substratının, değişik efektörlere (*Taxus baccata* ve *Persea americana* nın etkisi araştırılmış) karşı aktivitesi tayin edilerek Michaelis-Menten ve Lineweaver-burk grafikleri çizilerek kinetik davranışları hakkında bilgiler elde edildi.

2.2.1. Karaciğerin Homojenizasyonu

Çalışma materyali olarak taze kesilen sığır karaciğeri alınarak temiz naylon torbaya konulup etrafı buz-su karışımı ile kaplı kap içerisinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na getirildi. Karaciğer küçük dilimler halinde kesilerek naylon torbalara konuldu. Çalışılacağı gün 2 gram alınarak 10 ml

serum fizyolojik ile 2 dakika yavaş 2 dakika hızlı devirde waring blender ile homojenize edilerek ham homojenat 5000 devirde 30 dk santrifüj edildi.

II.basamak: I. basamakta elde edilen süpernatanın kloroform/etanol karışımından eşit miktarlardan alınarak vortekslendi ve 5.000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek süpernatın kısmı alındı.

2.2.2. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry tarafından tarif edilen metod kullanılmıştır.(Lowry,O.,Rosenbrough,N.,Farr AL.,Randal RJ,1951)

Miktar tayini standart eğri üzerinden hesaplanarak elde edilmiştir.

Protein standartı olarak BSA kullanıldı. 0,02-0,2mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafik çizildi ve grafiğin eğiminden numunelerdeki protein miktarı hesaplanmıştır.

2.2.2.1.Metodun Prensibi

Alkali ortamda bakırın proteinle oluşturduğu kompleks, fosfomolibdat fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol) indirgeyerek, koyu mavi renk oluşturur. Oluşan mavi renk protein konsantrasyonuyla orantılıdır. Bu deneyde dikkat edilecek nokta Folin reaktifinin alkali ortamda parçalanması, buna karşın indirgenme reaksiyonunun alkali ortamda oluşmasıdır. Bu nedenle Folin reaktifi deneye ilave edilir edilmez yıkılıma zaman bırakmadan karıştırılmalıdır.

2.2.2.2. Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanması

A reaktifi: 0,50g CuSO₄.5H₂O ve 1g Na₃sitrat 100ml distile suda çözülür.

B reaktifi: 20g Na₂ CO₃ 1L 0,1N NaOH içinde çözülür.

C reaktifi: 50ml B reaktifinden alınır ve üzerine 1ml A reaktifi eklenir.

D reaktifi: (Folin-Ciocalto-Fenol reaktifi) 500ml'lik bir balona 100g sodyum tungstat(Na₂WO₄.2H₂O), 25g sodyum molibdat(Na₂MoO₄.2H₂O), 700ml bidistile su, 50 ml %85'lik fosforik asit ve 100ml derişik HCl ilave edilerek geri soğutucu altında 10 saat yavaşça ısıtılır. Soğutulduktan 100 g lityum sülfat, 50ml bidistile su ve 5 damla brom ilave edilir. Bromun fazlası uçurulur. Bu işlem geri soğutucusuz olarak yapılır. Çözelti 1 lt'lik balona aktarılır ve distile suyla 1 litreye tamamlanır. Çözelti koyu renkli şişede muhafaza edilir. Kullanılabilir şartlarda reaktifin rengi sarıdır. Yeşil renge dönüşmesi bozulmayı gösterir. 1/1 seyreltilerek kullanılır.

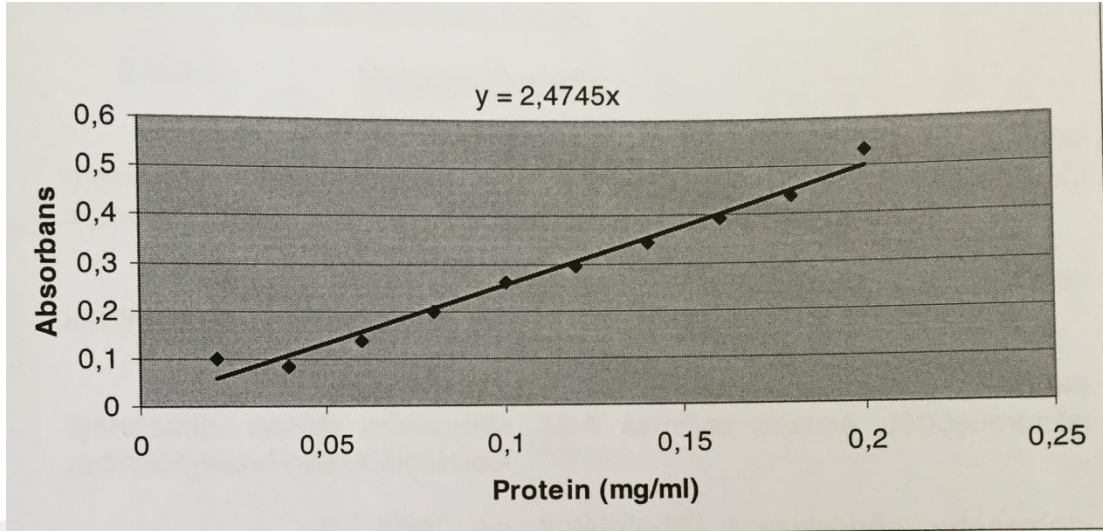
2.2.2.3. Deneyin Yapılışı

Protein Tayini için aşağıdaki deney şeması kullanılmıştır.

Çizelge 2. 1. Protein standart eğrisinin oluşturulması için deney şeması

Reaktif(µl)	Kör	Test
Numune	-	10
Distile su	500	490
C Reak.	2.500	2.500
Karıştır	10dak.	bekle
D Reak.	250	250

Ağızı kapalı olarak karıştırılır. 30 dk. 25⁰C bekletilir ve köre karşı 700nm.de numune okunur.



Şekil 2. 1. Protein standart eğrisi

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\Delta \text{Absorbans}}{\text{Eğim}}$$

Hesaplama:

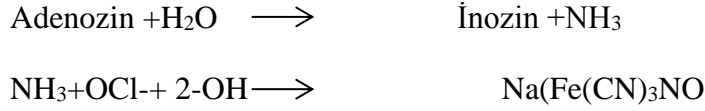
$$\text{Protein (mg/ml)} = (\Delta \text{Absorbans} \times 0,404) \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

2.2.3. Adenozin Deaminaz Aktivitesinin Tayini

ADA aktivitesinin tayini için literatürde değişik metodlar mevcuttur. Biz çalışmamızda uygunluğu ve tekrar edilebilirliği açısından Guisti tarafından tarif edilen metodu kullandık.(Guisti,G,1974)

2.2.3.1. Metodun Prensibi

ADA, adenozinden inozin oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucunda açığa çıkan amonyak, sodyum hipoklorit ile alkali ortamda fenol çözeltisiyle mavi renkli indofenol bileşiğine çevrilir. Bu reaksiyonda sodyum nitropurissiyat katalizör olarak görev yaparken oluşan amonyak konsantrasyonu indofenol ile orantılıdır.



2.2.3.2. Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanması

1-Fosfat Tamponu:(50mM, pH:6,5) 4,73g $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 5,62g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ distile su ile çözüldü ve hacim 1.000ml'ye tamamlanır.

2-Adenozin çözeltisi: (21mM Adenozin, 50mM Fosfat Tamponu pH:6,5)25ml'lik balon jojeye 140mg adenozin konulup üzerine 15ml fosfat tamponu ilave edildikten sonra sıcak su banyosuna yerleştirilir. Arasına karıştırılarak tamamen çözülmeye kadar sıcak su banyosunda bekletilir. Ardından musluk suyu altında soğutulur. pH: 6,5'a ayarlanır ve fosfat tamponu ile 25ml'ye tamamlanır.

3-Amonyum sülfat stok çözeltisi:(15mM) 1,982g anhidr amonyum sülfat, distile su ile çözümlenerek hacim 1.000ml'ye tamamlanır.

4- Amonyum sülfat standart çözeltisi:(75 μ M) 0,5ml Amonyum sülfat stok çözeltisinden alınıp fosfat tamponuyla 100ml'ye ayarlanır.

5-Fenol-Nitroprussiyat çözeltisi: (106mM Fenol, 0,17 mM Na nitroprussiyat) 10g Fenol ve 50mg Na nitroprussiyat 500ml distile suda çözülür ve hacim 1.000ml'ye tamamlanır.

6-Alkali hipoklorit çözeltisi:(11mM NaOCl, 125 mM NaOH)125ml 1N NaOH ve 16,4 ml %5 hipoklorit çözeltisi karıştırılıp hacmi 1.000ml'ye tamamlanır.(Kullanılan hipoklorit çözeltisi yaklaşık %5 w/v NaOCl ihtiva etmektedir) Buradaki klor miktarı tayin edilerek %5 klor bulunduran çözelti hazırlanmış ve bu çözelti kullanılmıştır.

2.2.3.3. Deneyin Yapılışı

ADA aktivitesinin tayini için aşağıdaki deney şeması uygulanmış ve reaktifler verilen sıra ile ilave edilmiştir.

Çizelge 2. 2. ADAaktivite ölçümü için deney şeması

Reaktifler	Numune	NumuneKörü	Standart	Standart Kör
AdenozinÇözeltisi(ml)	1	1	-	-
Örnek(µl)	50	-	-	-
Standart Çözeltisi	-	-	50	-
Fosfat Tamponu(ml)	-	-	1	1
Distile Su(µl)	-	-	-	50
Tüpler karıştırılıp ağızları parafilmle kapatılır,37 °C su banyosunda 60dakika inkübe edilir.				
Fenolnitroprusid Çözeltisi (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5
Örnek (µl)	-	50	-	-
Alkalihipoklorid (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5

Tüpler karıştırılıp 37 °C su banyosunda 30 dk inkübe edilir ve 628nm.de distile suya karşı okunur.

Bütün çözeltiler 0-4 °C'de saklanmalıdır. 3 ve 5 nolu reaktifler kahverengi şişede saklanmalıdır.5 nolu reaktifin rengi yeşil ya da kahverengiyeye dönerse yeniden hazırlanmalıdır. Absorbans 1.000'in üstüne çıkarsa distile su ile 2-5 kez seyreltilerek deney tekrarlanmalıdır.

Hesaplama:

$$ADA \text{ Aktivitesi} = \frac{OD (Numune) - OD (Numune Körü)}{OD (Standart) - OD (Standart Körü)} \times 50 = iü / L$$

Formüldeki x50 değerimiz;

A=axbxC

A=Absorbsiyon

a= Molar absorpsiyon katsayısı

C =Soğurucunun konsantrasyonu

b =Işının katettiği yol

$axb=k$

$A=k.C$

$A_N = k.C_N$ (A_N : Numune absorpsiyonu)

$A_{st} = k.C_{st}$ (A_{st} : Standart absorpsiyon)

$C = A_N / A_{ST} \times C_{ST}$

$A_N / A_{ST} \times 150 / 60 \times 0,05 = 50$

150=Amonyum sülfat reaksiyonundaki 2mol amonyak miktarı

2.2.4. Bitki Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitkiler *Taxus baccata* (porsuk ağacı dalı ve yaprağı), *Persea americana* (avokado yaprağı) toplandıktan sonra serin, rutubetsiz bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulmuş bitkiler ev tipi rondoda öğütülerek toz haline getirilmiştir. Kurutulan bitkiler tartıldı. Avokado yaprağı yaklaşık 60g, porsuk ağacı 100g. olduğu tespit edildi. Ağırlıklarının 3 katı metanol eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta üç gün boyunca bekletilmiştir. Üç gün sonunda süzüldü, süzüntü buharlaştırıldı, kurutuldu. Tekrar tartım yapıldı. Avokado 5,16g, porsuk 5g olarak tespit edildi. Elde edilen ekstratlar kullanılıncaya kadar +4⁰ C de muhafaza edilmiştir.

Yüzde verimlilik(g/g): $\frac{\text{Ekstraksiyon sonrası elde edilen özüt}}{\text{Başlangıçta ölçülen kuru bitki miktarı}} \times 100$

Persea americana % verimlilik: $5,16/60 \times 100 = 8,6$

Taxus baccata % verimlilik: $5/100 \times 100 = 5$

Metanol özütlerinin verimliliği *Persea americana* için %8,6, *Taxus baccata* için % 5 dir.

2.2.5. Homojenize Edilen Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

2.2.5.1. Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Adenozin Deaminaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yaptığımız deneyin bu kademesinde 21mM'lık stok adenozin çözeltisi hazırlandı. Bu stok standart çözeltiden 0,42 (1no'lu tüp); 0,21 (2 no'lu tüp); 0,10 (3 no'lu tüp); 0,04 (4 no'lu tüp); 0,02 (5 no'lu tüp); 0,002 (6 no'lu tüp) mM'lık çözeltiler hazırlanarak ADA enzimi aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı (Çizelge 2.3)

Çizelge 2. 3. Farklı konsantrasyonlarda L-Adenozin için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip(ml).	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

2.2.6. ADA Aktivite Üzerine Taxus baccata Kuru Ham Ekstraktının Etkisi

Karaciğer Süpernatanı 30 dakika Çizelge 2.4 de gösterildiği şekilde Taxus baccata kuru ham ekstraktı çözeltisi ile inkübe edildi. Bu çalışma için 2g Taxus baccata 2 mL suda çözülerek %100'lik çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 2. 4. 30 dk bekletilmiş %50'lik -Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatan	1,0ml
Taxus baccata ektrat	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan *Taxus baccata* kuru ham ekstraktı Çizelge 2.5. daki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Taxus baccata için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip K_m değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 5. *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nmde köre karşı okunur.						

Karaciğer 120 dakika Çizelge 2.6 da gösterildiği şekilde *Taxus baccata* kuru ham ekstraktı ile inkübe edildi.

Çizelge 2. 6. 120 dk bekletilmiş %50'lik *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0 ml
<i>Taxus baccata</i> ekstrakt	1,0 ml

Bu deneyde hazırlanan *Taxus baccata* kuru ham ekstraktı Çizelge 2. 7. deki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Taxus baccata için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip K_m değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 7. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nmde köre karşı okunur.						

Karaciğer Süpernatanı 30 dakika Çizelge 2.8 de gösterildiği şekilde Taxus baccata kuru ham ekstraktı çözeltisi ile inkübe edildi. Bu çalışma için % 10'luk çözelti Çizelge 2.4 te hazırlanan %50'lik çözelti 2.5 kat seyreltilerek yeterli miktarda %20 lik çözelti hazırlanmış ve enzim ekstraktı ile 1:1 oranında karıştırıldığında % 10'luk çözelti elde edilmiştir.

Çizelge 2. 8. 30 dk bekletilmiş %10'luk -Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0 ml
Taxus baccata ekstrakt	1,0 ml

Bu deneyde hazırlanan Taxus baccatakuru ham ekstraktı Çizelge 2. 9. daki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Taxus baccata için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip Km değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 9. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nmde köre karşı okunur.						

Karaciğer 120 dakika Çizelge 2.10 da gösterildiği şekilde Taxus baccata ekstraktı ile inkübe edildi.

Çizelge 2. 10.120dk bekletilmiş %10'luk Taxus baccata kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0ml
Taxus baccata ekstrakt	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan Taxus baccata kuru ham ekstraktı Çizelge 2. 11. deki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Taxus baccata için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip K_m değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 11. Taxus baccatakuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

2.2.7. ADA Aktivite Üzerine Persea americana Kuru Ham Ekstraktının Etkisi

Karaciğer Süpernatanı 30 dakika Çizelge 2.12 de gösterildiği şekilde Persea americana ekstraktı ham ekstraktı çözeltisi ile inkübe edildi. Bu çalışma için 2g Persea americana 2 mL suda çözülerek %100'lik çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 2. 12. 30 dk bekletilmiş %50'lik Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0ml
Persea americana ekstraktı	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan Persea americana kuru ham ekstraktı Çizelge 2. 13. deki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Persea americana için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip Km değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 13. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

Karaciğer 120 dakika Çizelge 2.14 de gösterildiği şekilde Persea americana ekstraktı ile inkübe edildi.

Çizelge 2. 14.120 dk bekletilmiş %50'lik *Persea americana* kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0ml
<i>Persea americana</i> ekstrakt	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan *Taxus baccata* kuru ham ekstraktı Çizelge 2.15. deki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi tayin edildi.

Taxus baccata için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip Km değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 15. *Persea americana* kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

Karaciğer Süpernatantı 30 dakika Çizelge 2.16 da gösterildiği şekilde *Persea americana* kuru ham ekstraktı çözeltisi ile inkübe edildi. Bu çalışma için % 10'luk çözelti Çizelge 2-12 te hazırlanan %50'lik çözelti 2.5 kat seyreltilerek yeterli miktarda %20 lik çözelti hazırlanmış ve enzim ekstraktı ile 1:1 oranında karıştırıldığında % 10'luk çözelti elde edilmiştir.

Çizelge 2. 16. 30dk bekletilmiş %10'luk Persea americana kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0ml
Persea americana ekstrakt	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan Persea americana kuru ham ekstraktı Çizelge 2.17. deki deney şemasına göre ADAenzim aktivitesi ölçüldü.

Persea americana için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip K_m değeri hesaplandı

Çizelge 2. 17. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

Karaciğer 120 dakika Çizelge 2.18'de gösterildiği şekilde Persea americana ekstraktı ile inkübe edildi.

Çizelge 2. 18. 120 dk bekletilmiş %10'luk *Persea americana* kuru ham ekstraktının hazırlanması

Tüp	Numune
Süpernatant	1,0ml
<i>Persea americana</i> ekstrakt	1,0ml

Bu deneyde hazırlanan *Persea americana* kuru ham ekstraktı Çizelge 2. 19. daki deney şemasına göre ADA enzim aktivitesi ölçüldü.

Persea americana için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilip Km değeri hesaplandı.

Çizelge 2. 19. *Persea americana* kuru ham ekstraktının ADA aktivitesine etkisi için deney şeması

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Adenozin(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enz.Ext(N) μ l	50	50	50	50	50	50
Karıştırılıp, 37 °Cde su banyosunda 60 dk. inkübe edilir.						
FNP(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enz.Ext.(K) μ l	50	50	50	50	50	50
Alk.Hip.(ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tüpler 37 °Cde 30dk inkübe edilir. 628 nm.de köre karşı okunur.						

3. BULGULAR

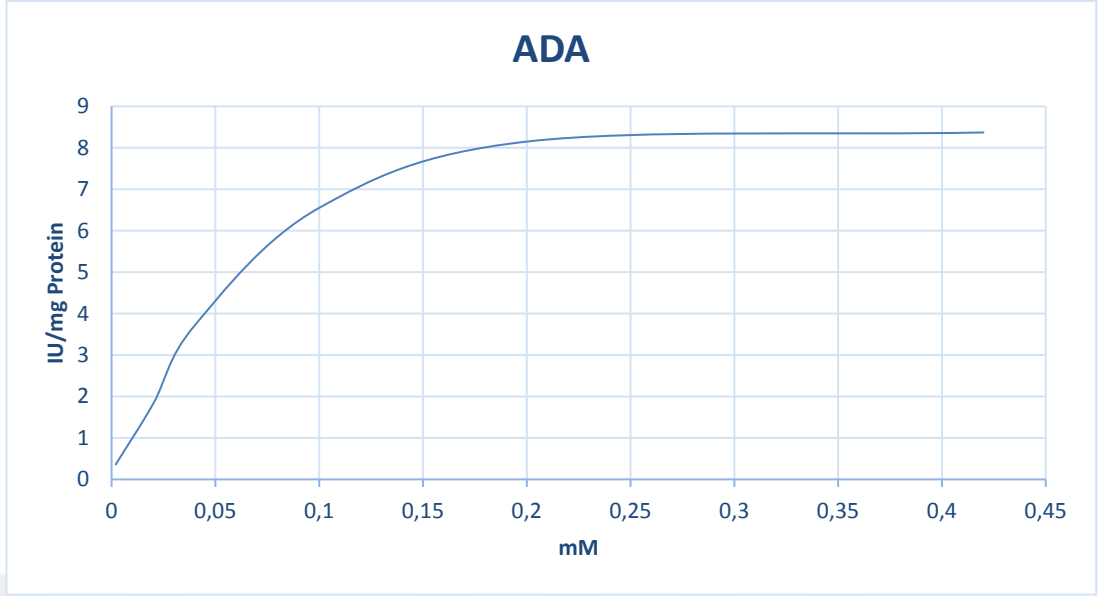
3.1. Homojenize Edilen Enzimin Kinetik Özelliklerine Ait Sonuçlar

3.1.1. Değişen Adenozin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri

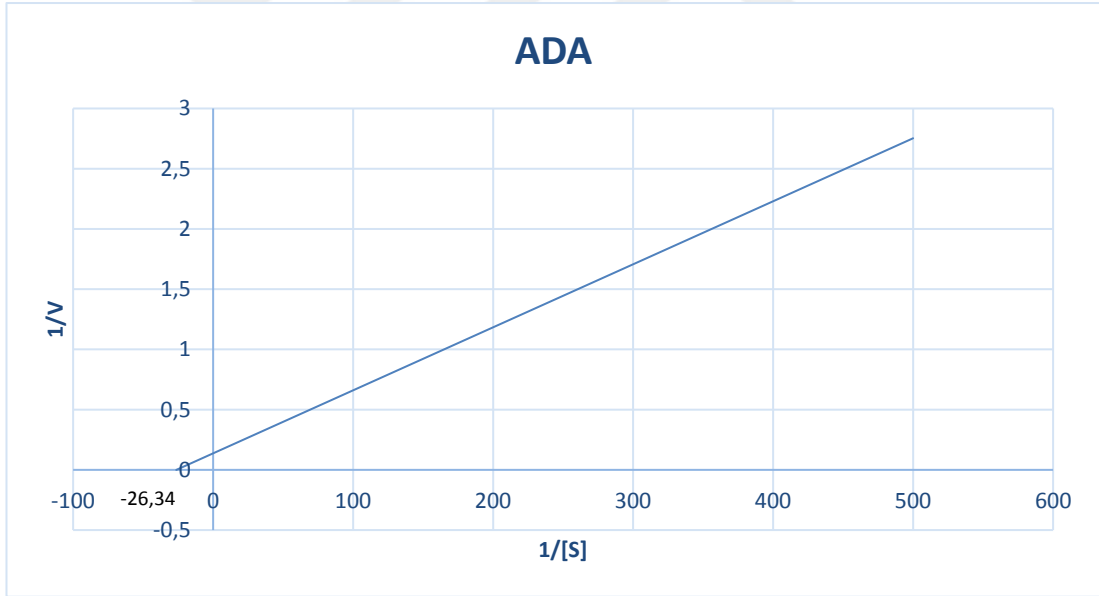
2.Bölümde açıklandığı şekilde farklı konsantrasyonlarda L-Adenozin çözeltilerine ait deney sonuçları Çizelge 3.1'de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 3.1'de ve Lineweaver-Burk Şekil 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3. 1. Değişen L-Adenozin Konsantrasyonunun Enzim Aktivite Tesirine Ait Deney Sonuçları

Tüp No	Adenozin (mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	8,37	2,40	0,10
2	0,20	8,15	4,80	0,12
3	0,10	6,55	10	0,15
4	0,04	3,71	25	0,27
5	0,02	1,82	50	0,54
6	0.002	0,36	500	2,74



Şekil 3. 1. Değişen L-Adenozin konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)



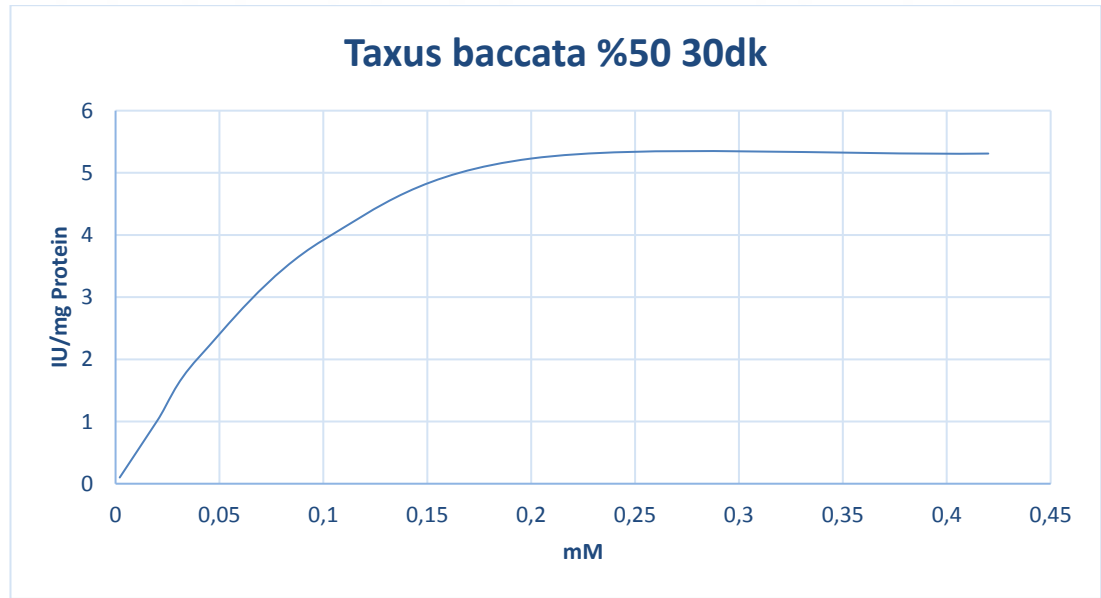
Şekil 3. 2. Değişen L-Adenozin konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

3.1.2. *Taxus baccata* Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri

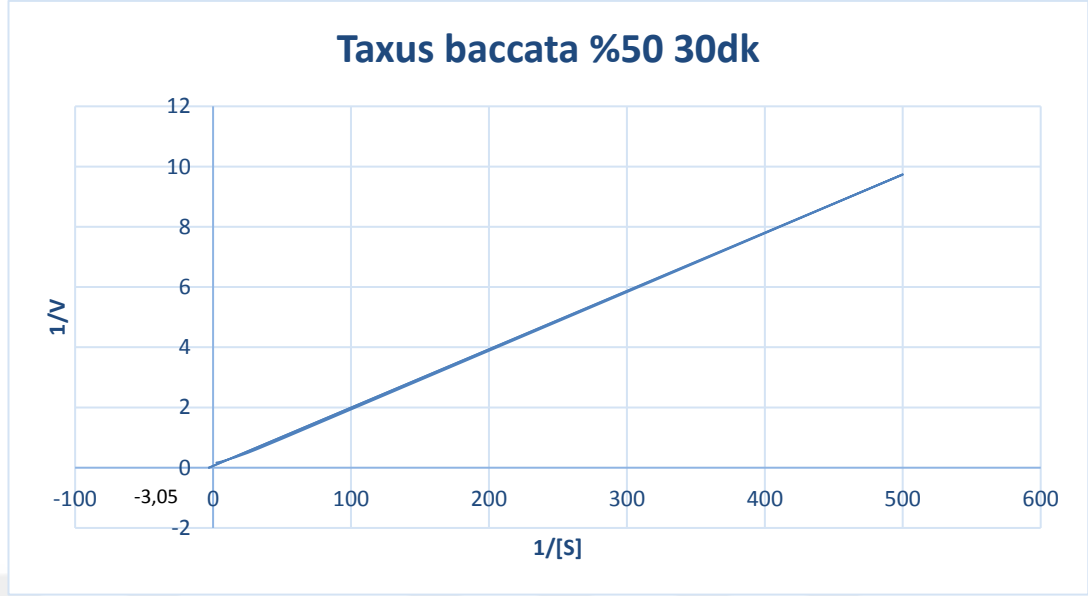
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı *Taxus baccata* konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.2 sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 3.3'de ve Lineweaver-Burk Şekil 3.4'de görülmektedir.

Çizelge 3. 2. %50-30 dk bekletilmiş *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	5,31	2,40	0,17
2	0,20	5,23	4,80	0,19
3	0,10	3,92	10	0,26
4	0,04	2,03	25	0,49
5	0,02	1,01	50	0,96
6	0,002	0,10	500	9,74



Şekil 3. 3. *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)

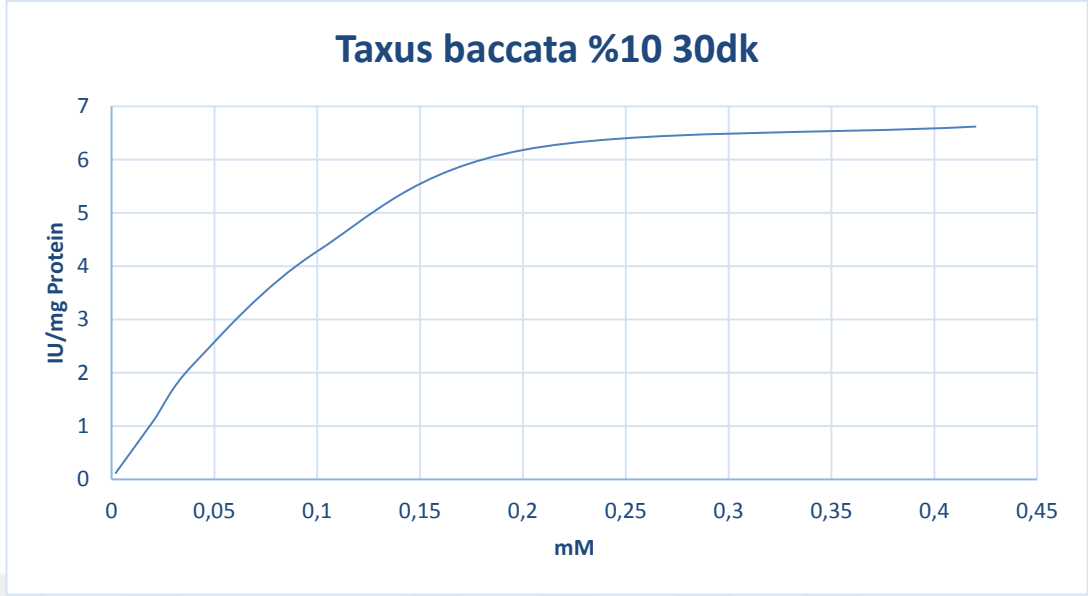


Şekil 3.4. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

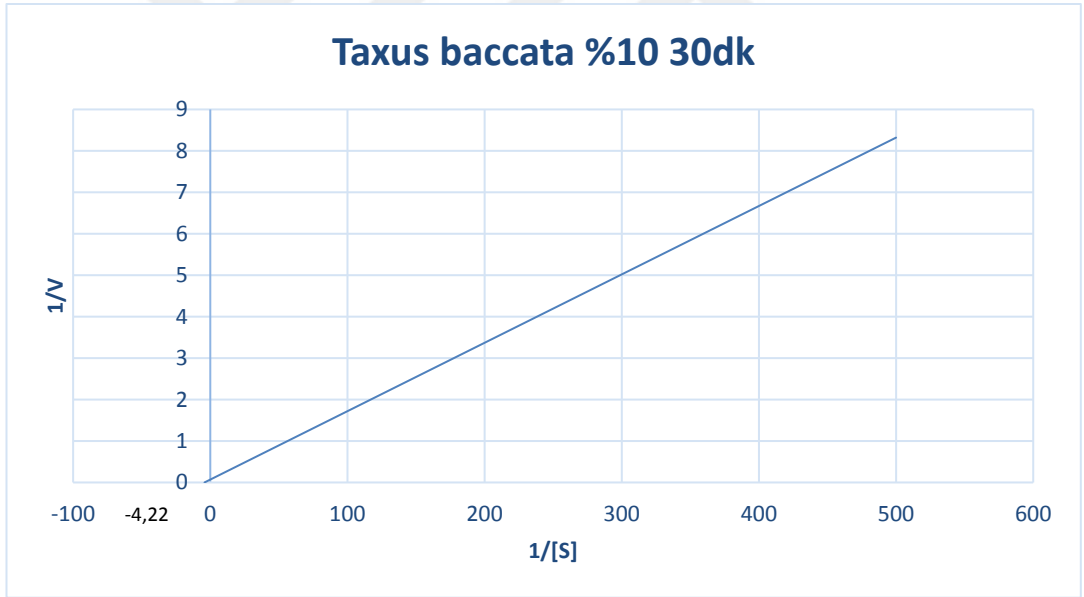
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Taxus baccata konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.3’de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 3.5’de ve Lineweaver-Burk Şekil 3.6’de görülmektedir.

Çizelge 3.3. %10-30dk bekletilmiş Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	6,62	2,40	0,13
2	0,20	6,18	4,80	0,15
3	0,10	4,28	10	0,23
4	0,04	2,17	25	0,45
5	0,02	1,08	50	0,91
6	0,002	0,12	500	8,32



Şekil 3. 5. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)



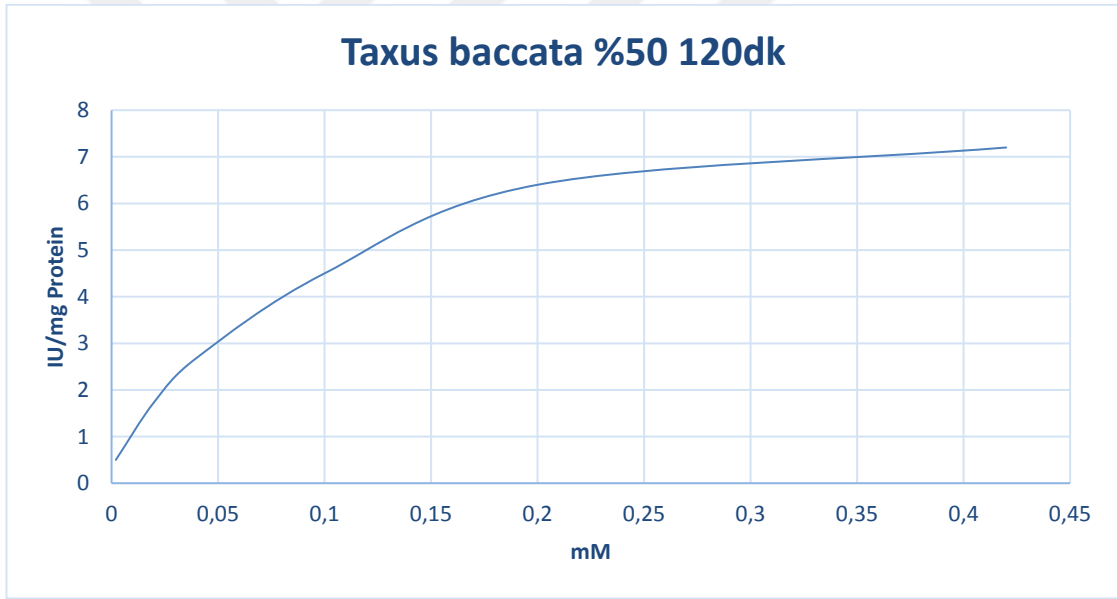
Şekil 3. 6. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Taxus baccata konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.4'de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk

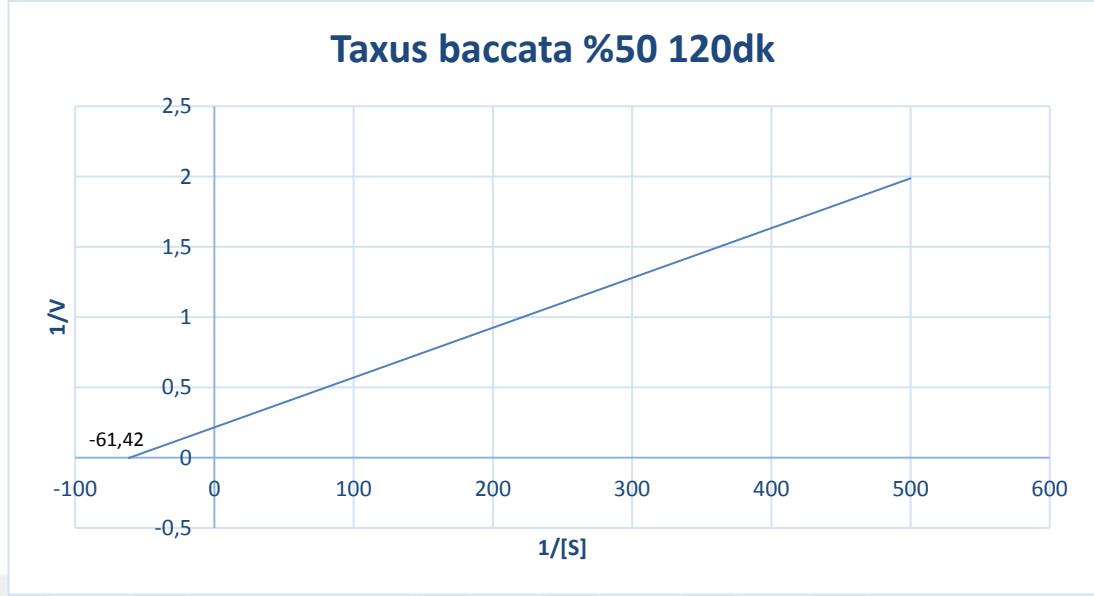
grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 3.7’de ve Lineweaver-Burk Şekil 3.8’de görülmektedir.

Çizelge 3. 4. %50-120dk bekletilmiş *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	7,20	2,40	0,13
2	0,20	6,40	4,80	0,15
3	0,10	4,50	10	0,21
4	0,04	2,69	25	0,37
5	0,02	1,74	50	0,56
6	0,002	0,50	500	1,97



Şekil 3.7. *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)

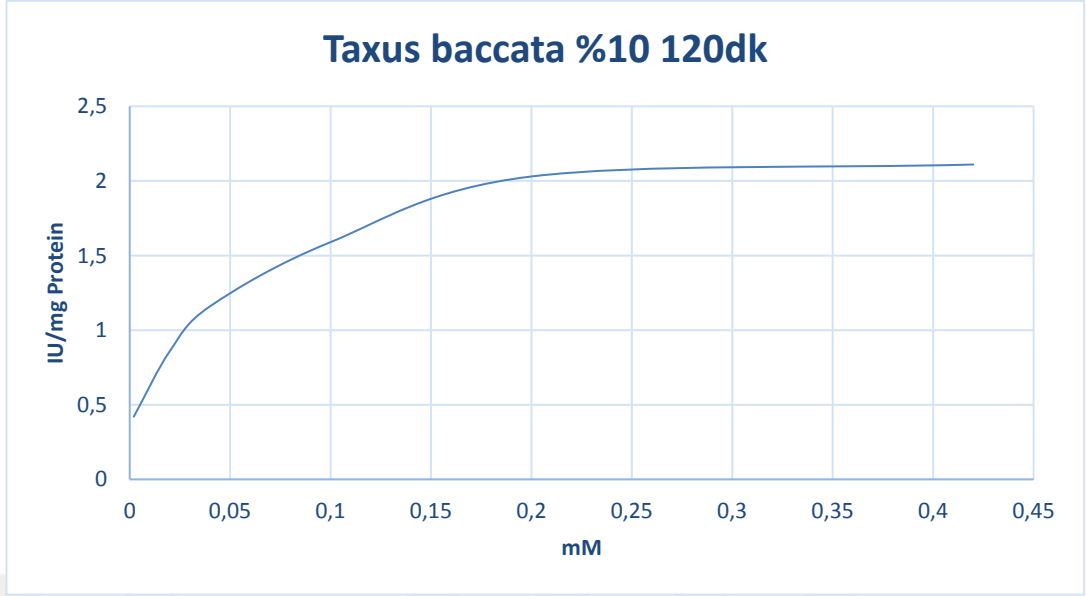


Şekil 3. 8. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

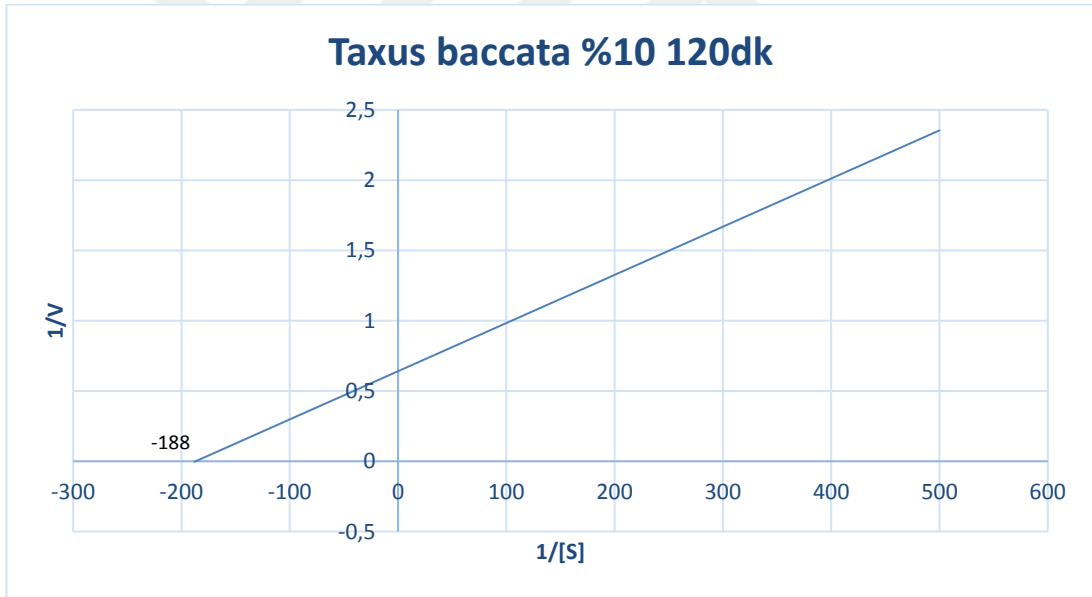
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Taxus baccata konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.5’de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 9’de ve Lineweaver-Burk Şekil 10’de görülmektedir.

Çizelge 3. 5. %10-120dk bekletilmiş Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	2,11	2,40	0,46
2	0,20	2,03	4,80	0,48
3	0,10	1,59	10	0,61
4	0,04	1,16	25	0,85
5	0,02	0,86	50	1,15
6	0,002	0,42	500	2,32



Şekil 3. 9. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)



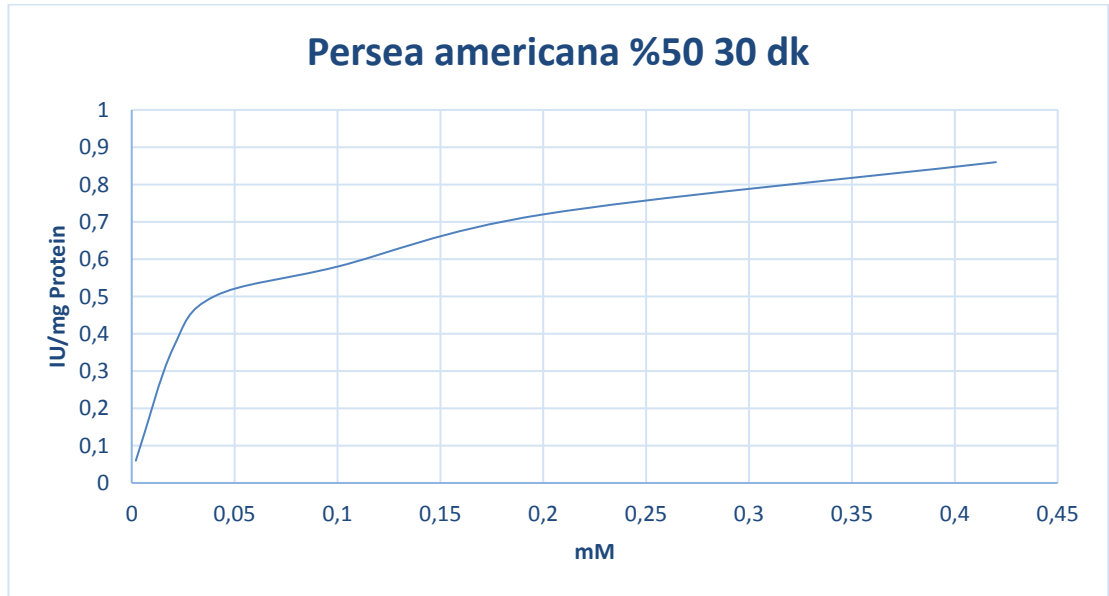
Şekil 3. 10. Taxus baccata kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

3.1.3. Persea americana Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Tesiri

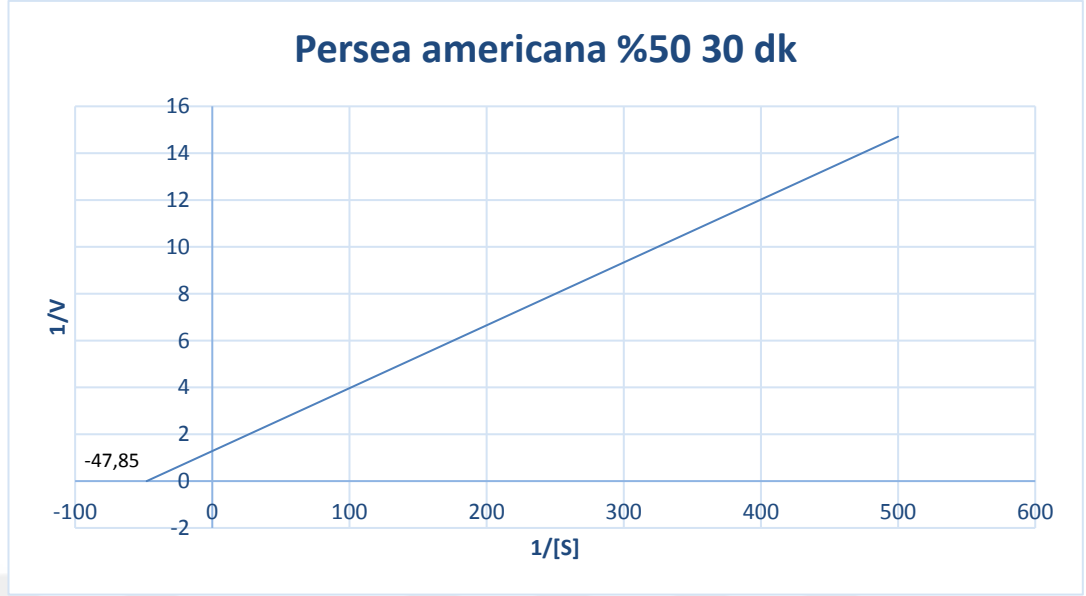
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Persea americana konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.6'de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 3.11'de ve Lineweaver-Burk Şekil 3.12'de görülmektedir.

Çizelge 3. 6. %50-30dk bekletilmiş Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	0,86	2,40	1,09
2	0,20	0,72	4,80	1,37
3	0,10	0,58	10	1,78
4	0,04	0,50	25	1,92
5	0,02	0,36	50	2,74
6	0,002	0,06	500	14,69



Şekil 3. 11. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten grafiği)

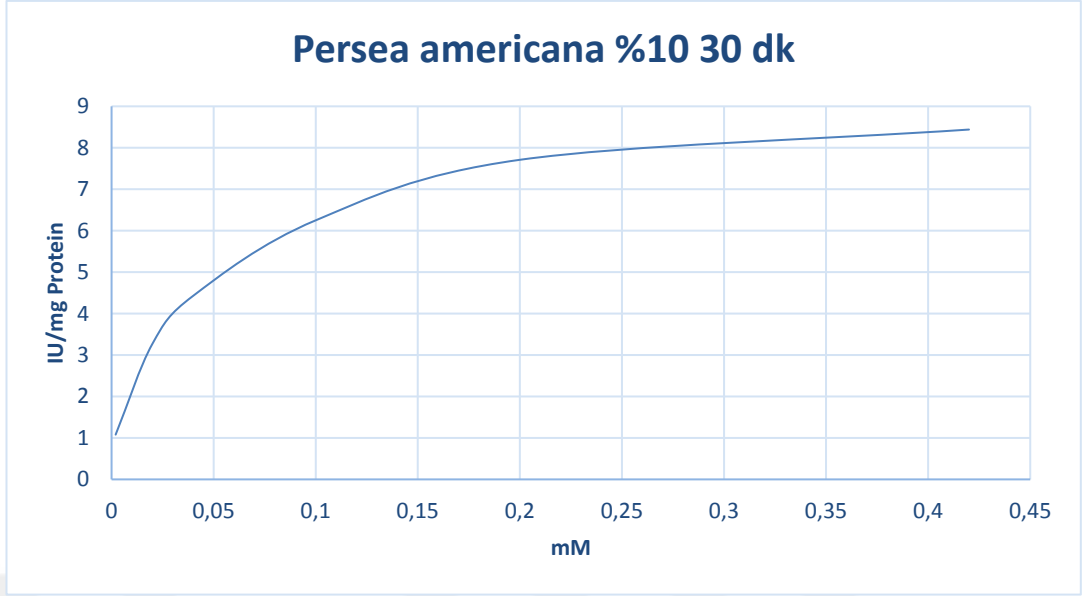


Şekil 3. 12. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

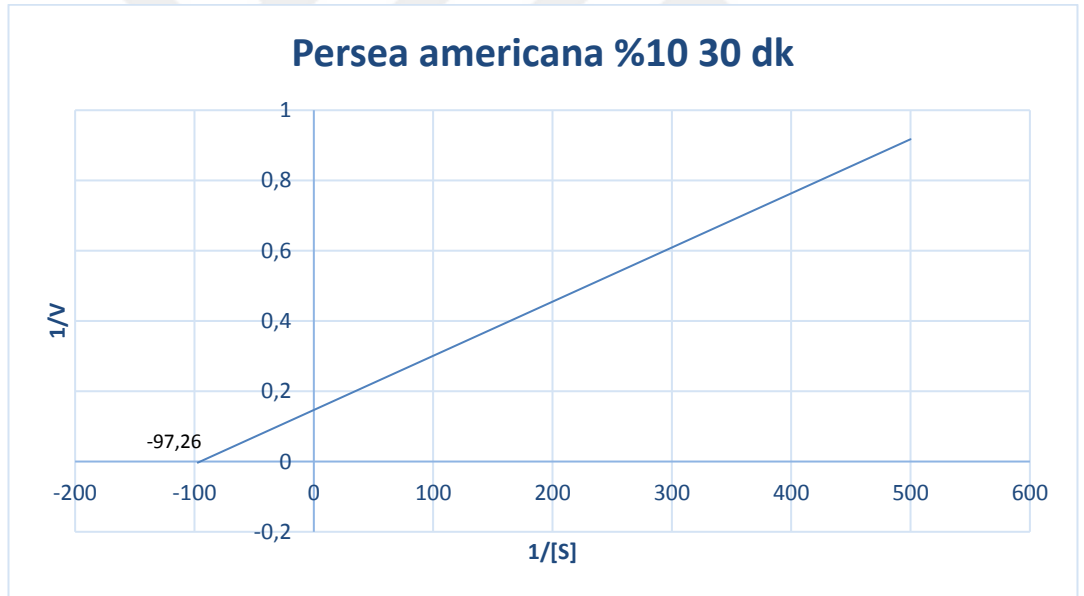
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Persea americana konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.7’de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil13’de ve Lineweaver-Burk Şekil 14’de görülmektedir.

Çizelge 3. 7. %10-30dk bekletilmiş Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	8,44	2,40	0,10
2	0,20	7,71	4,80	0,12
3	0,10	6,25	10	0,15
4	0,04	4,43	25	0,21
5	0,02	3,27	50	0,30
6	0,002	1,08	500	0,91



Şekil 3. 13. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)

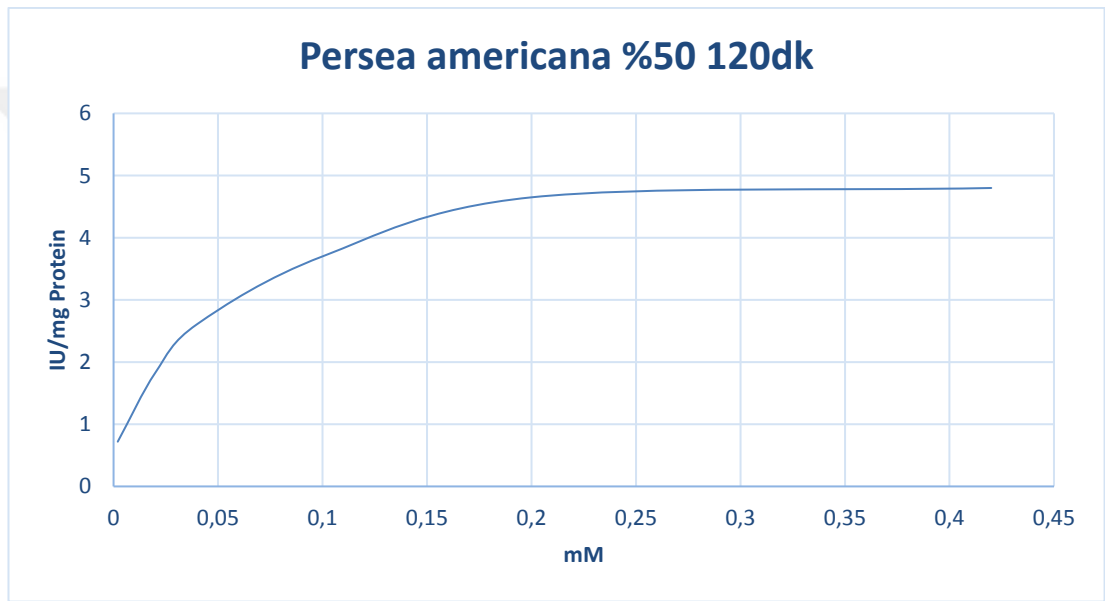


Şekil 3. 14. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver Burk grafiği)

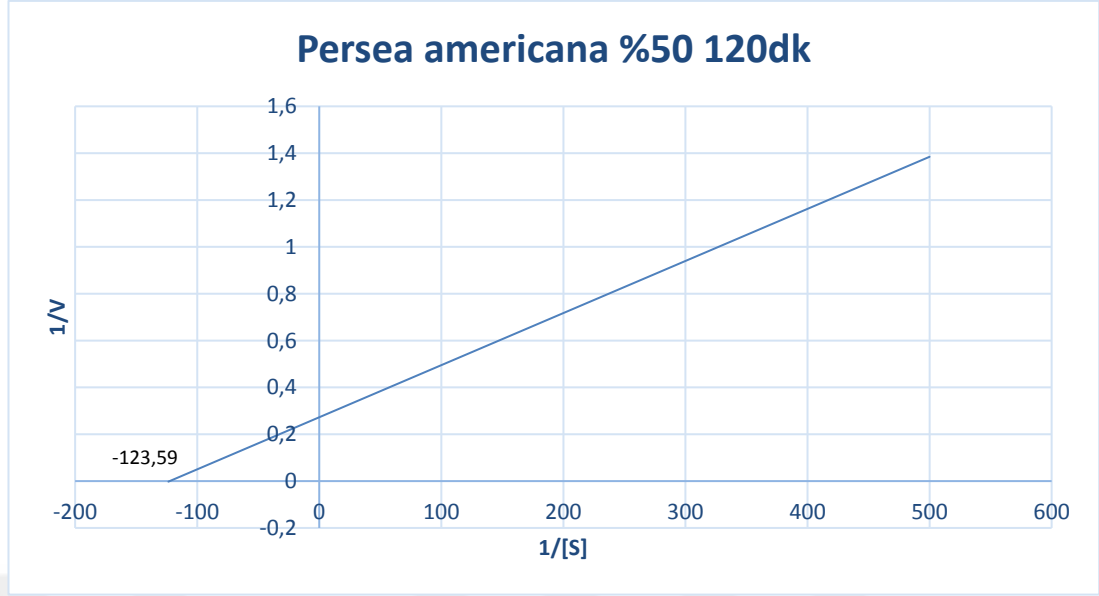
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Persea americana konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.8’de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 15’de ve Lineweaver-Burk Şekil 16’de görülmektedir.

Çizelge 3. 8. %50-120dk bekletilmiş *Persea americana* kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	4,80	2,40	0,20
2	0,20	4,65	4,80	0,21
3	0,10	3,70	10	0,27
4	0,04	2,61	25	0,37
5	0,02	1,83	50	0,53
6	0,002	0,72	500	1,37



Şekil 3. 15. *Persea americana* kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)

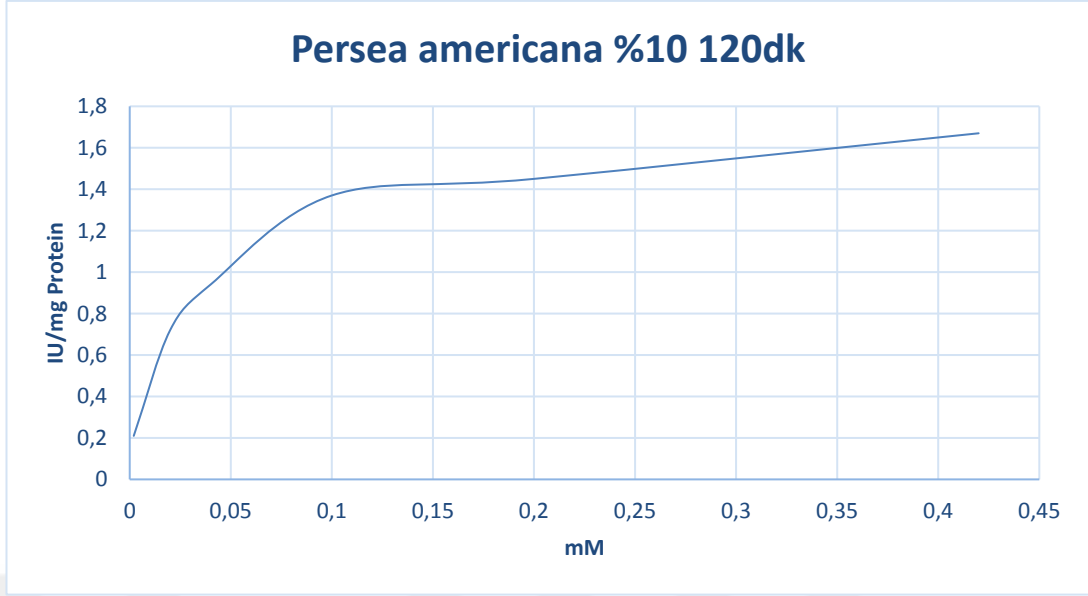


Şekil 3. 16. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver Burk grafiği)

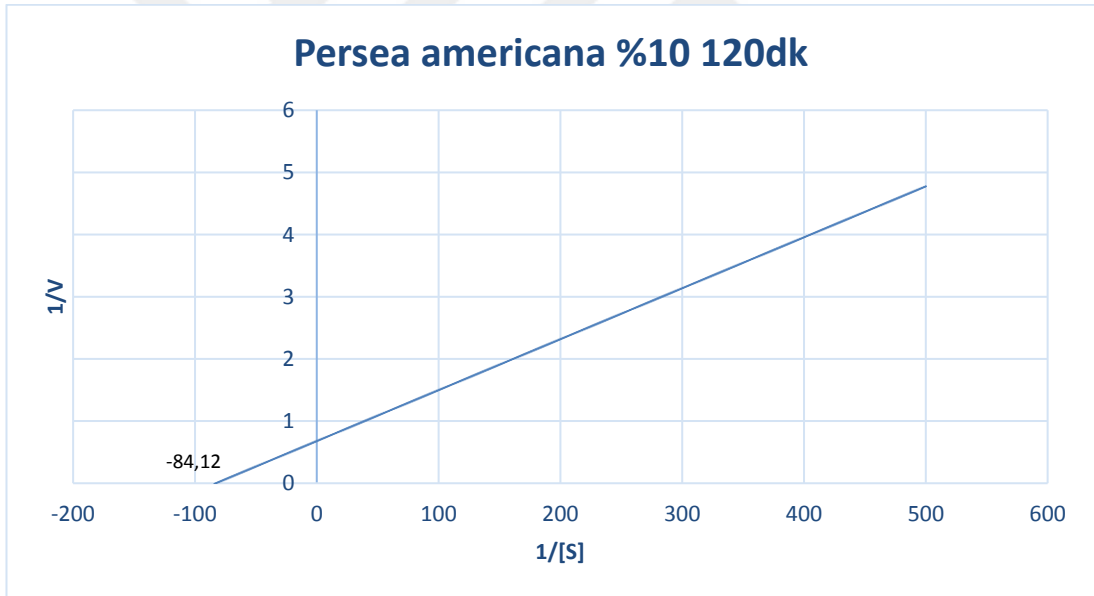
İkinci bölümde anlatıldığı şekilde farklı Persea americana konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine tesiri incelendi. Deneye ait sonuçlar Çizelge 3.9'de sunulmaktadır. Bu değerlerden yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten Şekil 17'de ve Lineweaver-Burk Şekil 18'de görülmektedir.

Çizelge 3. 9. %10-120dk bekletilmiş Persea americana kuru ham ekstraktının ADAenzim aktivitesi üzerine ait deney sonuçları

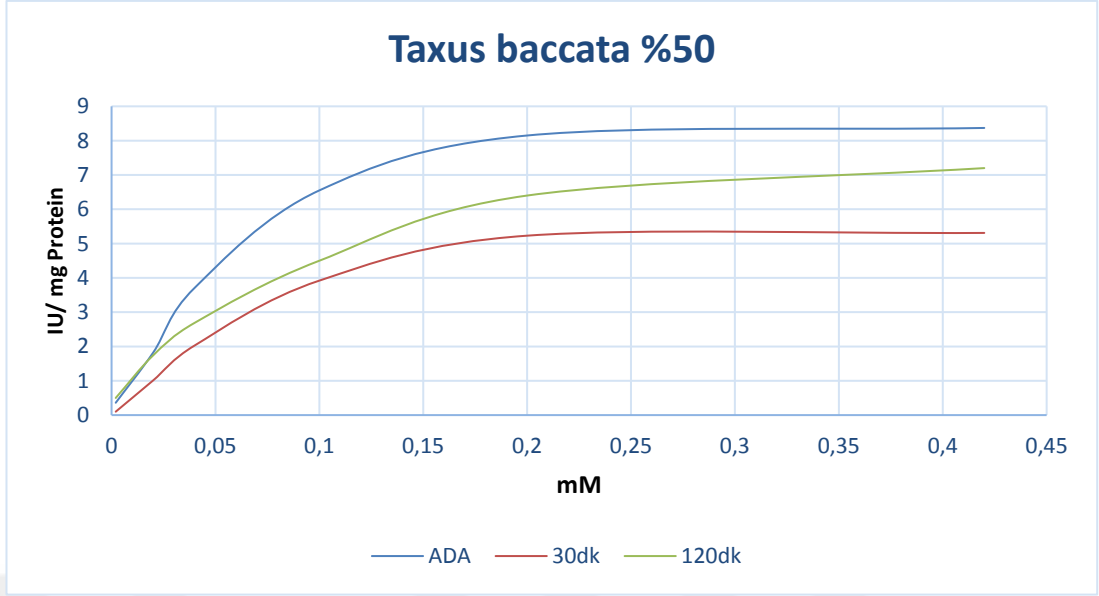
Tüp no	(mM)	Spesifik aktivite (IU/mg protein)	1/[S]	1/V
1	0,42	1,67	2,40	0,54
2	0,20	1,45	4,80	0,68
3	0,10	1,37	10	0,68
4	0,04	0,94	25	0,96
5	0,02	0,72	50	1,37
6	0,002	0,21	500	4,75



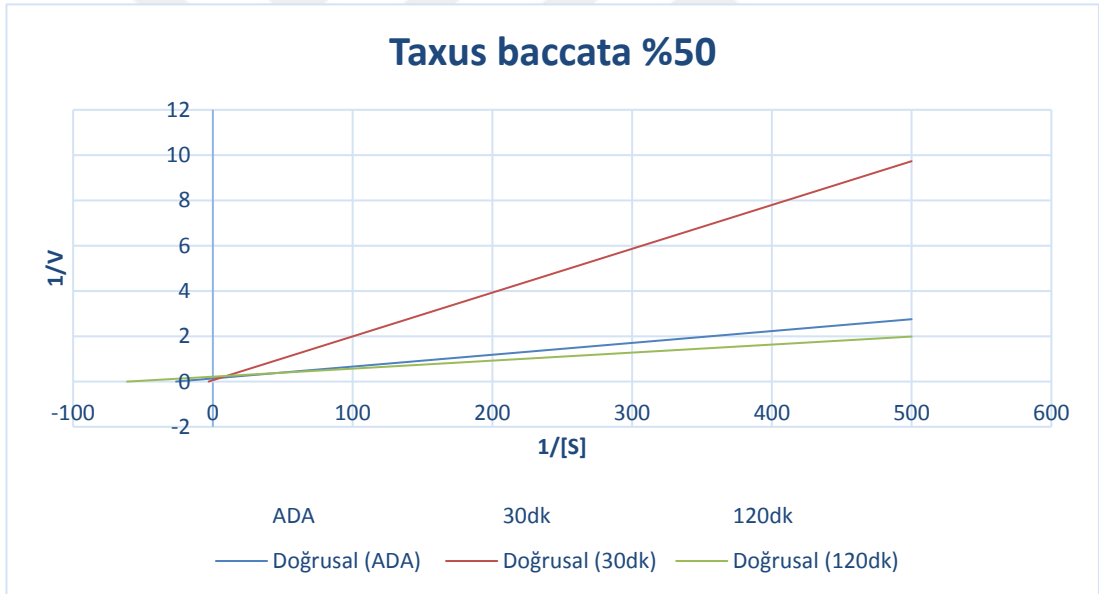
Şekil 3. 17. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)



Şekil 3. 18. Persea americana kuru ham ekstraktının ADA enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver Burk grafiği)



Şekil 3. 19. %50 Taxus baccata kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)



Şekil 3. 20. %50 Taxus baccata kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)

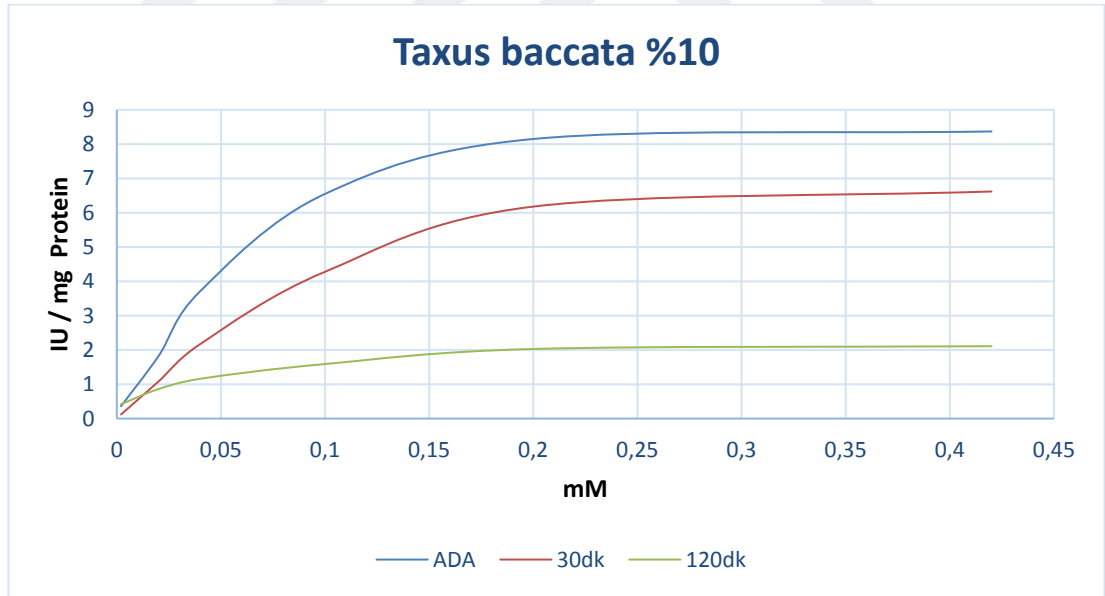
%50 Taxus baccata katkılı numunede substrat konsantrasyonunun 30-120dklık aktivite değerlerinin değişimi Şekil 3.19 de gösterilmektedir.

%50 30dk bekletilmiş *Taxus baccata* katkılı numunede V_{max} değeri 5,31, Şekil 3.3 de $V_{max/2}=2,65$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0,06mM$ olarak okunmuştur.

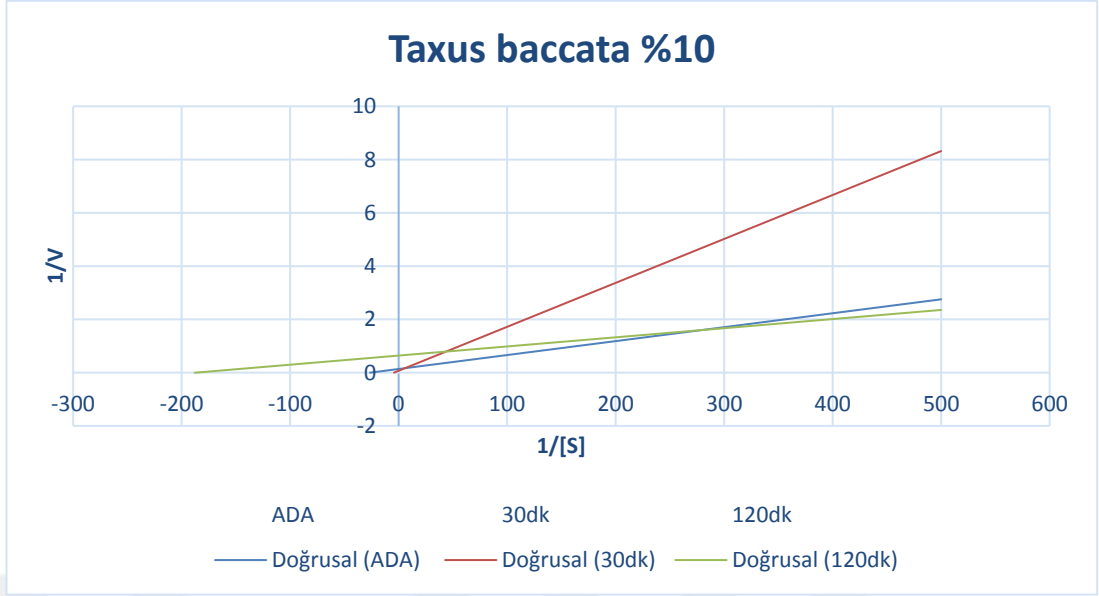
%50 120dk bekletilmiş *Taxus baccata* katkılı numunede V_{max} değeri 7,20, Şekil 3.7 de $V_{max/2}=3,60$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0,08mM$ olarak okunmuştur.

Şekil 3.19 da Michaelis Menten grafiğinde görüldüğü gibi ADA enziminin V_{max} değerini *Taxus baccata* düşürmektedir. %50-30dk *Taxus baccata* katkılı numunede K_m değeri de değişmemektedir.

%50 *Taxus baccata* ekstraktının 30 dklık bekleme suresince enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde Nonkompetitif inhibisyon türü oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 21. %10 *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)



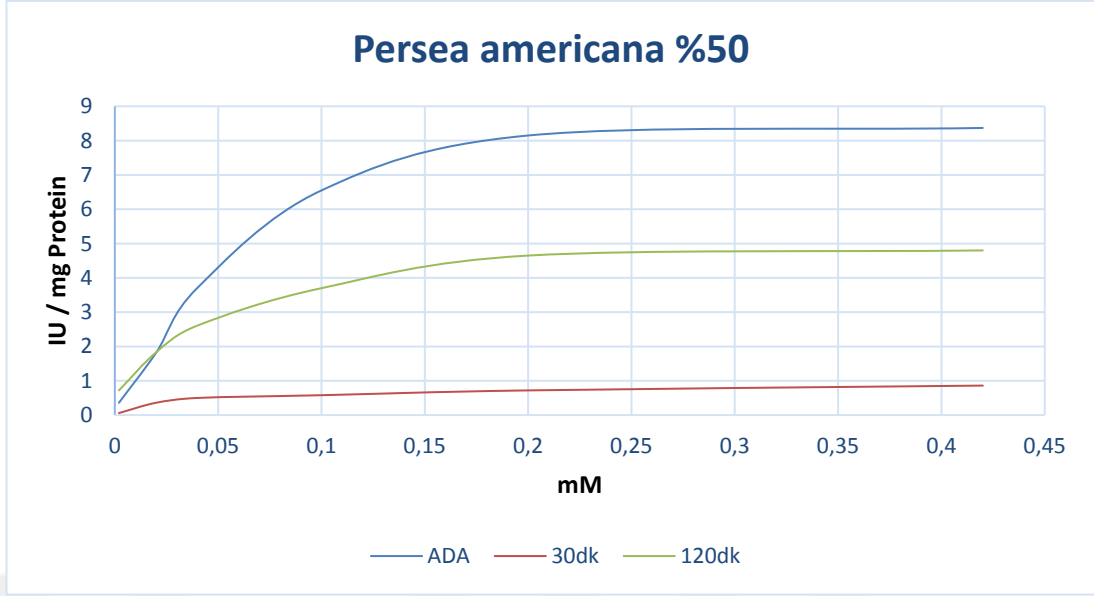
Şekil 3. 22. %10 *Taxus baccata* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

%10 30dk bekletilmiş *Taxus baccata* katkılı numunede V_{max} değeri 6,62 Şekil 3.5 de $V_{max/2}=3,31$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0,07mM$ olarak okunmuştur.

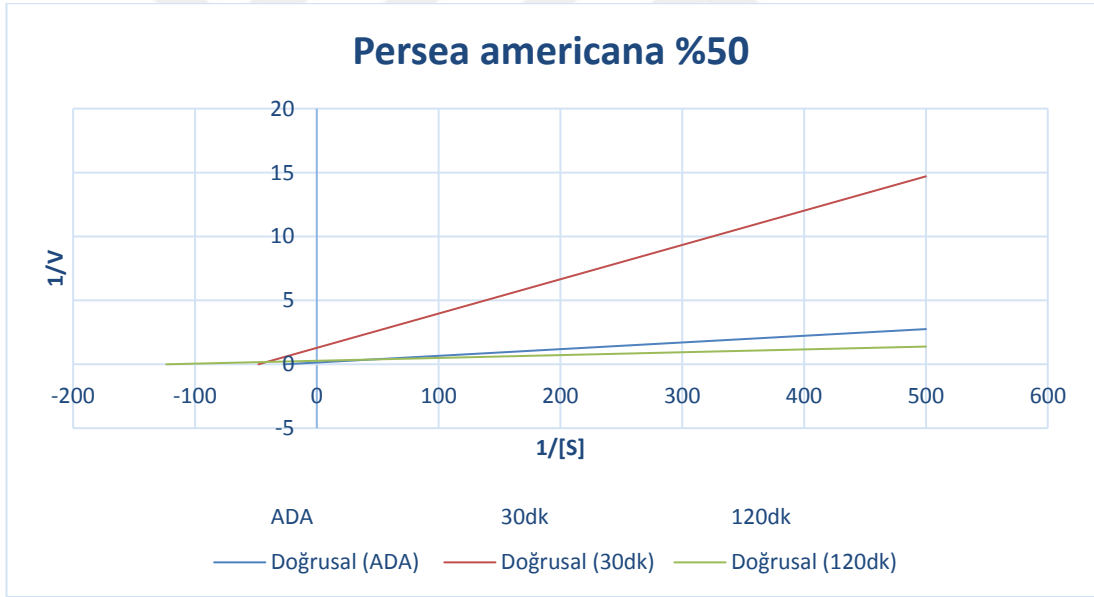
%10 120dk bekletilmiş *Taxus baccata* katkılı numunede V_{max} değeri 2,11 Şekil 3.9 de $V_{max/2}=1,05$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0,06mM$ olarak okunmuştur.

Şekil 3.21 de Michaelis Menten grafiğinde görüldüğü gibi ADA enziminin V_{max} değerini 30-120dklık katkılı *Taxus baccata* düşürmektedir.%10 30dklık *Taxus baccata* katkılı numunede K_m değeri yükselmekte, %10 120dklık *Taxus baccata* katkılı numunede K_m değeri değişmemektedir.

%10 *Taxus baccata* ekstraktının 120 dklık bekleme süresince enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde Nonkompetitif inhibisyon türü oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 23. %50 *Persea americana* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Michaelis Menten grafiği)



Şekil 3. 24. %50 *Persea americana* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi(Lineweaver-Burk grafiği)

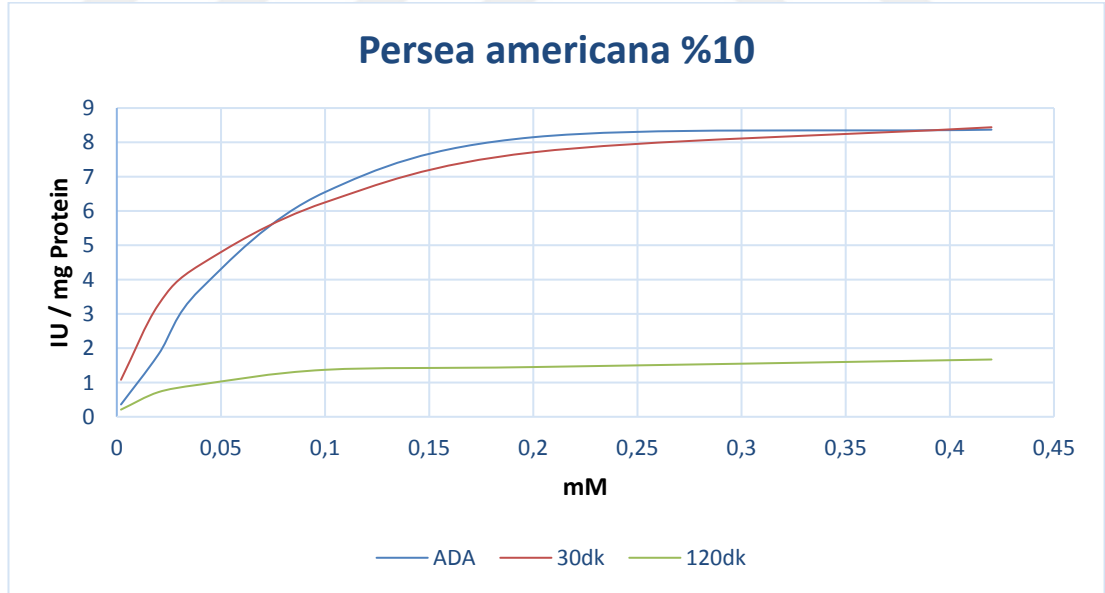
%50 *Persea americana* katkılı numunedeki substrat konsantrasyonunun 30 ve 120 dklik aktivite değerlerinin değişimi Şekil 3.23 de gösterilmektedir.

%50 30dk bekletilmiş *Persea americana* katkılı numunede V_{max} değeri 0,86, Şekil 3.11 de $V_{max}/2=0,43$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m=0,07mM$ olarak okunmuştur.

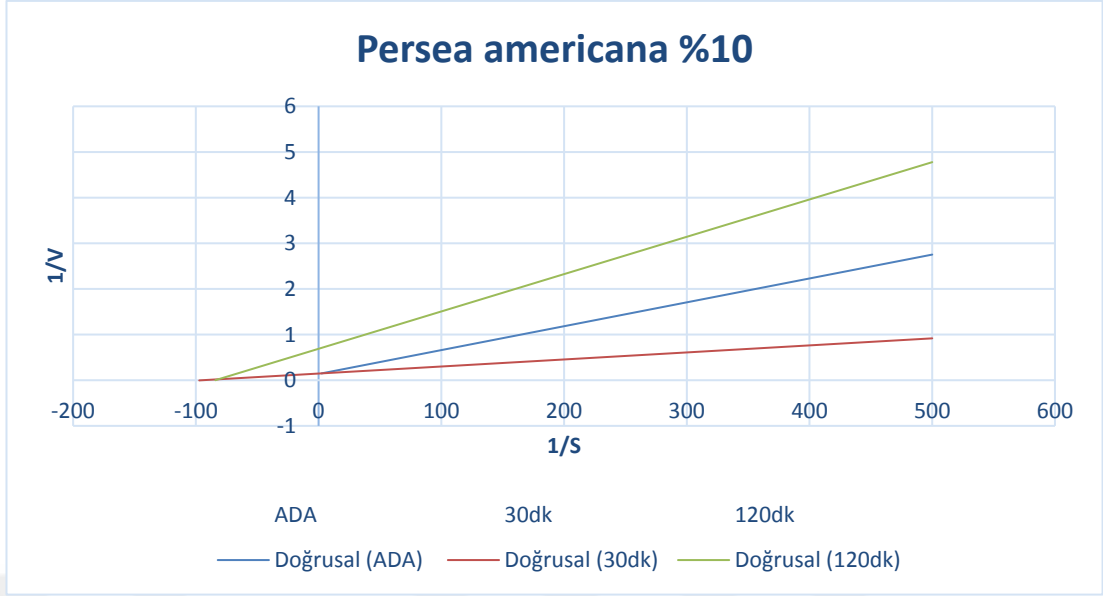
%50 120dk bekletilmiş *Persea americana* katkılı numunede V_{max} değeri 4,80, Şekil 3.15 de $V_{max}/2=2,40$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m=0,06mM$ olarak okunmuştur.

Şekil 3.23 da Michaelis Menten grafiğinde görüldüğü gibi ADA enziminin V_{max} değerini, %50-30dk bekletilmiş *Persea americana* düşürmektedir. %50-120dk *Persea americana* katkılı numunede K_m değeri de değişmemektedir.

Yine %50- 30 dklık bekletilme süre ile inhibisyon görülmemektedir. %50 - 120dklık bekletilme süresince oluşturduğu inhibisyonun Nonkompetetif tabiatlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 25. %10 *Persea americana* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Michaelis Menten grafiği)



Şekil 3. 26. %10 *Persea americana* kuru ham ekstraktının farklı zamanlarda enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

%10 *Persea americana* katkılı numunede substrat konsantrasyonunun 30-120 dklık aktivite değerlerinin değişimi Şekil 3.25 de gösterilmektedir.

%10 30dk *Persea americana* katkılı numunede V_{max} değeri 8,44, Şekil 3.13de $V_{max}/2=4,22$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0.06mM$ olarak okunmuştur.

%10 120dk *Persea americana* katkılı numunede V_{max} değeri 1,67, Şekil 3.17 de $V_{max}/2=0,83$ olmak üzere V_{max} değerine karşılık gelen $K_m= 0,06mM$ olarak okunmuştur.

Şekil 3.25 de Michaelis Menten grafiğinde görüldüğü gibi ADA enziminin V_{max} değerini %10-120dklık katkılı *Persea americana* düşürmektedir.%10-30 ile 120dklık *Persea americana* katkılı numunede K_m değeride değişmemektedir.

Yine 30 dklık bekletilme süre ile inhibisyon görülmemektedir. 120dklık sürede de inhibisyonun görülmektedir. Bu durum %10-120dklık *Persea americana* oluşturduğu inhibisyonun Nonkompetitif tabiatlı olduğunu göstermektedir.



4-TARTIŞMA

Pürin katabolizmasında görev alan insan ve hayvan dokularında bulunan enzimlerden biri Adenozin deaminazdır(ADA) (E.C.3.5.4.4; ADA; Adenozin aminohidrolaz). ADA nın kinetik özellikleri, metabolizması ve kinetik anlamı açısından çeşitli araştırmacılar tarafından detaylı olarak incelenmiş bir enzimdir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Yapılan çalışmalarda değişik dokularda ADA aktivitesinin farklılık gösterdiği bulunmuştur. Doku ve organlara göre farklılık gösteren pek çok çalışma tespit edilmiştir (Fisher, 1969). Kurbağa dokusundan saflaştırdıkları enzimleri A, B ve C şeklinde sınıflandırarak molekül ağırlıklarını sırasıyla 180.000, 100.000, 35.000 olarak tespit edip ADA aktivitesi sırasıyla %7, 68 ve 25'ini teşkil ettiği sonuçları elde etmişlerdir (Fisher, Multiple Adenosine Deaminases In The Frog, 1968). Sığır intestinal mukozasından ADA saflaştırdıktan sonra aminoasit dizisini tayin ettikten sonra molekül kütlesini sedimentasyon sabiti metoduyla ortamala 34.500 olarak hesaplamışlardır (Phelan, McEvoy, Rooney, & Brady, 1970).Sağlıklı insan akciğeri ve mide dokusundan iki tür ADA olduğu tespit etmiş ve bunlara büyük molekül ağırlıklı ve küçük molekül ağırlıklı olarak isimlendirmişlerdir (Akedo, H; Nishihara, H; Shinkai; K, Komatzu,, 1970).ADA'nın insan dokusunda farklı molekül ağırlıklarını yaklaşık 36.000, 114.000 ve 298.000 (sırasıyla small, intermedia ve large) ifade ederek bunların birbirlerine dönüşür olduğunu göstermişlerdir. Literatürden de anlaşılacağı üzere enzim aktivitesi alınan numunenin çeşitliliğine göre değişkenlik gösterir.

ADA aktivitelerindeki değişimler kanser hücrelerinin enzimatik profilini yansıtması açısından önemlidir (Sheid, 1985). Ayrıca ADA aktivitesinin immün sistem hastalıkları, hepatit, pankreatit, hemolitik anemi gibi değişik hastalıklarda arttığı veya azaldığının gösterilmesi aktivitenin test edilmesi açısından önemlidir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Birçok araştırmacı tarafından ADA' nın katalitik özellikleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır (Maguire & Sim, 1971). ADA'nın adenzini metabolize etme kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988). K_m ve V_{max} değerleri yapılan çalışmalar sonucu saflaştırılan kaynağa ve organa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. ADA'nın ve izoenzimlerinin adenzin substratına karşı K_m değerinin (0.05-0.1 M Ph 7-7.4 fosfat veya Tris/HCl tamponu kullanılarak) 30-400 μ M arasında değiştiği ifade edilmektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1987). ADA'nın inhibisyonu ile ilgili olarak pürin nükleozit analogları, civalı organik bileşikler, Cu, Ag, Cr, gibi ağır metallerle birlikte +1 yüklü Li, Na, K, Rb, Cs, NH₄ gibi katyonlar ile Mg, Ca ve Ba gibi +2 yüklü katyonlar denenmiştir. +2 yüklü katyonların inhibe ettiği belirtilmektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Coformisin, pentostatin ve 2'-kloropentostatin'in de spesifik ADA inhibitörü olduğu çalışmalarda elde etmişlerdir (Ratech & Hirschorn, 1995).

Enzimlerin hücrelerdeki önem ve rollerini açıklamada bu enzimlerin kinetik özelliklerinin incelenmesi bir fikir verebilir (Rodriguez-Carpena, Morcuende, & al., 2011).

Buradan da açıkça görüleceği üzere adenzine karşı ilgisi en fazla olan S-AHase ve AK'dır. Maksimum hızları (V_{max}) incelendiğinde ADA'nın V_{max} değeri yüksektir. Buda ADA'nın adenzini metabolize etme kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Centelles, Franco, & Bozal, 1988).

Farklı dokularda saflaştırılma işlemleri yapılarak izoenzimleri ve moleköl kütleleri hakkında detaylı pek çok sonuç elde edilmiştir (Fisher, 1968)

Bu çalışmada ADA'ı kısmen saflaştırdıktan sonra, adenzin substratını kullanarak kinetik çalışmalar yaptık. Saflaştırılan enzim üzerinde önce farklı konsantrasyonlarda adenzin çözeltileri hazırlayarak geniş bir aralıkta aktivite tayin

ederek en uygun konsantrasyon aralığını belirledik. Daha sonra bu aralıkta farklı konsantrasyonlarda adenzin çözeltileri hazırlayıp aktivite tayini yaparak Michealis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerini çizdik. Bu grafiklerden faydalanarak sığır karaciğer ADA'sına ait K_m ve V_{max} değerlerini tespit ettik.

Çalışmamızda 136IU/mg protein içeren karaciğer homojenatı kullandık. ADA aktivitesini 154,5IU/L olarak tespit ettik. V_{max} değeri spesifik aktivite olarak 8,32 IU/mg protein, $K_m=0,06mM$ olarak bulduk.

Birçok bitki yüzyıllar boyunca geleneksel tedavide kullanılmıştır. Bunların koruyucu ve tedavi edici özelliklerinin de belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış olup bu bitkilerden elde edilen ekstraktlardan ideal bitki ajanları oluşturulmaya çalışılmış. Buda hastalık tedavisinde önemli olacağı düşüncesini yaymıştır.

Bazı anahtar enzimlerin hastalıkların metabolizmasında etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Biz bu çalışmamızda ADA üzerinde araştırma yapmayı planladık. Bu enzimin inhibisyonun özellikle kanser tedavisinde de önemli rol oynadığını gösteren pekçok çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız *Taxus baccata* bitkisindeki taksol doğal antikanser bileşik olarak bilinmektedir. Meme,ovaryum, ile akciğer kanser tedavisi ile mesane, boyun, baş, gastrointestinal sistem gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde de ümit verici görülmektedir(Arbuck, S.G; Blaylock, B.A, 1995).

Yine çalışmamızda kullandığımız *Persea americana* bitkisi A, B, E vitaminleri ile lif içeriği bakımından kalbi korumada, kanser hücrelerinin büyümesinin engellenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda göstermiştir.*Taxus baccata* ve *Persea americana* ekstraktlarının ile onların içerdiği bileşenlerinin varolabilecek etkilerini incelemek bu tür bitkilerin ve sahip oldukları inhibisyon potansiyeli ile

ADA eksikliği ile karakterize olan bileşikler için immun yetmezlik durumunda anlamamıza yardımcı olması açısından bu çalışmayı yaptık.

Yapmış olduğumuz çalışmamızın deneysel sonuçlarına baktığımızda ekstraksız şartlarda elde edilen V_{max} değerinin spesifik aktivite olarak 8,32 IU/mg protein, K_m değerinin ise 0,06mM olduğu tespit edilmiştir.

%10-30dk bekletilmiş *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen V_{max} hız değerinin 6,62IU/mg protein, %10-120dk bekletilmiş *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen V_{max} hız değerinin 2,11IU/mg protein, %50-30dk *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen hız değerinin V_{max} 5,31IU/mg protein, %50-120dk *Taxus baccata* ekstraktlı V_{max} hız değerinin 7,20IU/mg protein olduğu tespit edilmiştir. %50-30dk ile %10-120dk bekletilmiş *Taxus baccata* ekstraktı ADA enzimini Nonkompetitif tarzda inhibe etmektedir. Bu inhibisyon türüyle de substrata yapısal benzerlik göstermez, aynı bölgeye bağlanmaz. Ürün oluşumu sonlanır. %10-30dk ile %50-120dk *Taxus baccata* ekstraktlı şartlarda kinetik değerler konsantrasyon ve zamana bağlı olarak *Taxus baccata* ekstraktı içindeki aktif bileşenlerin ADA enzimini inhibe etmediğini göstermektedir.

%10-30dk *Persea americana* ekstraktlı hız değerinin V_{max} 8,44IU/mg protein, %10-120dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin V_{max} 1,67IU/mg protein, %50-30dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin V_{max} 0,86IU/mg protein, %50-120dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin V_{max} 4,80IU/mg protein olduğu görülmektedir. %50-120dk ile %10-120dk bekletilmiş *Persea americana* ekstraktı ADA enzimini Nonkompetitif tarzda inhibe etmektedir. Bu inhibisyon türüyle de substrata yapısal benzerlik göstermez, aynı bölgeye bağlanmaz. Ürün oluşumu sonlanır. %10-30dk ile %50-30dk *Persea americana* ekstraktlı şartlarda kinetik değerler konsantrasyon ve zamana bağlı olarak *Persea americana* ekstraktı içindeki aktif bileşenlerin ADA enzimini inhibe etmediğini göstermektedir.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarında da görüldüğü gibi *Persea americana* ve *Taxus baccata* bileşenlerinin dokularda konsantrasyon ve zamana bağlı olarak inhibisyon etki gösterdikleri yada göstermedikleri görülmüştür. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak gösterdikleri inhibisyon etkisi ADA enzimini güçlü bir şekilde inhibe ederek tıbbi tedavinin bu şekilde güçlendirilebileceğini düşündürmektedir.



5-SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda sığır karaciğeri kısmen saflaştırıldıktan sonra ADA aktivitesini 154,5IU/L olarak tespit ettik. V_{max} değerini spesifik aktivite olarak 8,32 IU/mg protein, $K_m=0,06mM$ olarak bulduk.

Taxus baccata ve *Persea americana* ekstraktlarının ve bileşenlerinin ADA enzim aktivitesi üzerinde olası etkilerini inceleyerek sahip oldukları inhibisyon türünü belirledik.

%10-30dk *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen hız değerini spesifik aktivite olarak 6,62IU/mg protein, %10-120dk *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 2,11IU/mg protein, %50-30dk *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 5,31IU/mg protein, %50-120dk *Taxus baccata* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 7,20IU/mg protein olduğu tespit edilmiştir. Bu kinetik değerler konsantrasyon ve zamana bağlı olarak %50-30dk ile %10-120dk *Taxus baccata* ekstraktı içindeki aktif bileşenlerin ADA enzimini Nonkompetitif tarzda inhibe ettiğini göstermektedir. %10-30dk ile %50-120dk *Taxus baccata* ekstraktlı şartlarda ADA enzimini inhibe etmediğini göstermektedir.

%10-30dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin spesifik aktivite olarak 8,44IU/mg protein, %10-120dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 1,67IU/mg protein, %50-30dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 0,86IU/mg protein, %50-120dk *Persea americana* ekstraktlı elde edilen hız değerinin 4,80IU/mg protein olduğu görülmektedir. Bu kinetik değerler %50-120dk ile %10-120dk *Persea americana* ekstraktı içindeki aktif bileşenlerin ADA enzimini Nonkompetitif tarzda inhibe ettiğini göstermektedir. %50-30dk ile %10-30dk *Persea americana* ekstraktlı şartlarda ADA enzimini inhibe etmediğini göstermektedir

Bu çalışma sonuçlarında da görüldüğü gibi *Persea americana* ve *Taxus baccata* bileşenlerinin dokularda konsantrasyon ve zamana bağlı olarak inhibisyon etki gösterdikleri yada göstermedikleri görülmüştür. *Persea americana* ve *Taxus baccata* bileşenlerinin ve etki mekanizmalarının daha anlaşılabilir olması için daha çok çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bizim bu yapmış olduğumuz çalışmalarda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı inancındayız. Bizim sonucumuza göre konsantrasyon ve zamana bağlı olarak gösterdikleri inhibisyon etkisi ADA enzimini güçlü bir şekilde inhibe ederek tıbbi tedavinin bu şekilde güçlendirilebileceğini düşündürmektedir.



ÖZET

Sığır Karaciğerindeki Adenozin Deaminaz Enzim Kinetiği Üzerine *Taxus Baccata*(Porsuk Ağacı) ve *Persea Americana*(Avokado) Yapraklarından Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışmada sığır karaciğerinden kısmen saflaştırılan adenozin deaminaz enziminin fizikokimyasal ve kinetik özellikleri üzerine *Taxus baccata* ve *Persea americana* ekstraktlarının etkileri araştırılmıştır.

ADA enziminin inhibitörsüz şartlarda çizilen Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerinde V_{max} değeri 8,32 IU/mg protein, K_m değeri 0,06 mM olarak tespit edilmiştir.

Taxus baccata ekstresinin iki farklı konsantrasyonunda çizilen Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerinde %10-30dk bekletilmiş *Taxus baccata* konsantrasyonunda V_{max} değeri 6,62 IU/mg protei , K_m 0,07, %10-120dk bekletilmiş *Taxus baccata* konsantrasyonunda V_{max} değeri 2,11IU/mg protein , K_m 0,07, %50-30dk bekletilmiş *Taxus baccata* konsantrasyonunda V_{max} değeri 5,31 IU/mg protein , K_m 0,06, %50-120dk bekletilmiş *Taxus baccata* konsantrasyonunda V_{max} değeri 7,20 IU/mg protein , K_m 0,08 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar %10-120dk ile %50-30dk bekletilmiş *Taxus* bileşenlerinin ADA enzimini Nonkompetitif türde inhibe ettiğini göstermektedir.

Persea americana ekstresinin iki farklı konsantrasyonunda çizilen Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerinde %10-30dk bekletilmiş *Persea americana* konsantrasyonunda V_{max} değeri 8,44 IU/mg protein , K_m 0,06, %10-120dk bekletilmiş *Persea americana* konsantrasyonunda V_{max} değeri 1,67IU/mg protein, K_m 0,06, %50-30dk bekletilmiş *Persea americana* konsantrasyonunda V_{max} değeri 0,86 IU/mg protein, K_m 0,07, %50-120dk bekletilmiş *Persea americana* konsantrasyonunda V_{max} değeri 4,80IU/ mg protein, K_m 0,06 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar %10-120dk ile %50-120dk bekletilmiş *Persea* bileşenlerinin ADA enzimini Nonkompetitif türde inhibe ettiğini göstermektedir. ADA enziminin *Taxus baccata* ve *Persea americana* tarafından bu şekilde inhibisyonu, antikanser özelliklerine katkı sağlayan mekanizmalardan biri olabilir.

Anahtar Sözcükler: Adenozin Deaminaz, Avokado(*Persea americana*), İnhibisyon, Lineweaver-Burk, Michaelis-Menten, Porsuk(*Taxus baccata*)

SUMMARY

Investigation of the Effects of Metanolic Extracts from *Taxus Baccata* And *Persea Americana* Leaves on Kinetic Behaviours of Adenosine Deaminase Enzyme from Bovine Liver

In this study, effects of *Taxus baccata* and *Persea americana* extracts on kinetic behaviours of adenosine deaminase enzyme isolated from bovine liver were investigated.

V_{max} value of the enzyme was calculated to be 8,32 IU/mg protein, and K_m value as 0,06 mM by using Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk graphs.

In the inhibition studies, it has been observed that kinetic behaviour of the enzyme exhibits variations depending on the inhibition periods and concentrations. In this regard, the enzyme is inhibited by the *taxus baccata* extract noncompetitively at the conditions of 50 % concentration for 30 min, and of 10 % concentration for 120 min. However, no inhibition was observed at the conditions of 10 % concentration for 120 min, and of 50 % concentration for 30 min.

Similarly, it has been observed that *persea americana* extract can inhibit the enzyme noncompetitively at the conditions of 50 % concentration for 120 min and 10 % concentration for 120 min. However, no inhibition was observed at the other conditions.

Although present results demonstrate that ADA enzyme can be inhibited by *Taxus baccata* and *Persea americana* extracts under some experimental conditions, it is yet not clear whether these results are of importance with regard to the therapeutic potentials of these herbs in the cancer therapy. Subject needs further researches.

Key Words: Adenosine Deaminase, Avocado (*Persea americana*), Badger (*Taxus baccata*), Inhibition, Lineweaver-Burk, Michaelis-Menten

KAYNAKLAR

- AKEDO,H.,NISHIHARA,H.,SHINKAI,K.,KOMATZU,K (1970). Adenosine deaminases of two different molecular size in human tissues.*Biochim.Biophys.Acta.***212**:189-91
- ARAN,J.M.,CANELA,E.I.,FRANCO,R (1990).Preperative prufication adenosine deaminase from human erythrocytes by affinity choromatography.*J.Chromatography.***532**:75-85
- ANDRIAN,G.S.,HUTTON,G.S (1983). Adenosine deaminase Messenger RNAs in lymphoblast cell lines derired from leukemic patients and patients with hereditary adenosine deaaminase deficiency.*The J.Clin.Invest.***71**:1649-60
- AGGARWAL, B.B (2008) .The past, present and future of multi-targeted cancer treatment Naturally Food for thought.*Cancer Lett.***269**(2): 187-188
- ADAMS,A.,HARKNESS,R.A (1976).Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues.*Clin.Exp.Immunol.***26**:647-49
- ARBUCK, S.G., BLAYLOCK, B.A.(1995).Taxol: Clinical Results and Current Issues in Development in Taxol: *Science and Applications*, Suffness, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 379-415
- BRADY,T.G.,O'DONOVAN,C.I (1965). Astudy of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species.*Comp.Biochem.Physiol.***14**:101-20
- BONTEMPS, F., BERGHE,V.D.G (1989).Mechanism of adenosine triphosphate catabolism induced by deoxyadenosine and by nucleoside analogues in adenosine deaminase-inhibited human.*Cancer Res.***49**:4983-89
- BALÍS,M.E (1985) .Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.***45**:142-49
- BRAÍ BI, ODETOLA AA, AGOMO PU(2007). Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of Persea americana leaf extracts. *J Med Food.***10**(2);356-60
- CARSON, D.A.,KAYE J.,SEEMİLLER J.E (1978). Differential sensitive of human leukemic Tcell lines and Bcell lines to growth inhibition by deoxyadenosine.*The.J.Immun.***121**(5):1726-31

- CENTELLES, J.J., FRANCO R, BOZAL, J (1987). Distribution of adenosine deaminase in some rat tissues. Inhibition by ethanol and dimethyl sulfoxide. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**(1):95-98
- CARSON, D.A., KAYE J., SEEGMILLER J.E (1977). Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleosidase phosphorilase deficiency. Possible role of nucleoside kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**(12):5677-8
- CENTELLES, J.J., FRANCO, R., BOZAL, J (1988). Purification and partial characterization of brain adenosine deaminase: Inhibition by purin compounds and by drugs. *J. Neuroscience Res.* **19**:258-67
- CROOM, E.M (1995). Taxol for Taxol and Taxoids" in *Taxol: Science and Applications*, Suffness, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 37-70
- CRAGG, G.M., SCHEPARTZ, S.A., SUFNESS, M., GREVER, M.R (1993). The Taxol Supply Crisis. New NCI Policies for Handling the Large-Scale Production of Novel Natural Product Anticancer and Anti-HIV Agents. *J. Nat. Prod.*, **56**(10):1657-68
- COLÍN, M., GUENARD, D., GUERITTE-VOEGELEIN, F., POTIER, P. (1988). Preparation of Taxol Derivatives as Antitumor Agents. *Eur. Pat. Appl. EP 253738 A1*,
- CHRISTEN, A.A., GIBSON, D.M., BLAND, J. (1991). Production of Taxol or Taxol-like Compounds in Cell Culture US Patent, No. 5, 019, 504.
- DREXLER, H.G., GAEDICKE G., MINOWADA, J. (1987). Biochemical enzyme analysis in acute leukemia. *J. Clin. Pathol.* **38**:117-27
- DANISHEFSKY, S.J., MASTERS, J.J., YOUNG, W.B., LINK, J.T., SNYDER, L.B., MAGEE, T.V., JUNG, D.K., ISAACS, R.C.A., BORNMANN, W.G., ALAIMO, C.A., COBURN, C.A., DI GRANDI, M.J. (1996). Total Synthesis of Baccatin III and Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **118**; 2843-59
- DABAS D, SHEGOG RM, ZIEGLER GR, LAMBERT JD (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Curr Pharm Des.* **19**(34):6133-40.
- DABAS D, ELÍAS RJ, LAMBERT JD, ZIEGLER GR (2011). A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. *J Food Sci.* **76**(9):C1335-41. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02415.

- DİNG H, CHİN YW, KİNGHORN AD, D'Ambrosio SM.(2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol.***17**(5);386-94.
- EZEJİOFOR AN, OKORİE A, ORİSAKWE OE.(2013). Hypoglycaemic and tissue-protective effects of the aqueous extract of persea americana seeds on alloxan-induced albino rats. *Malays J Med Sci.***20**(5);31-9.
- EİSENHAUER, E.A., VERMORKEN, J.B.(1998). *The Taxoids Drugs***55**(1);5-30
- ENGEL N, OPPERMAN C, FALODUN A, KRAGL UJ (2011). Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines.*Ethnopharmacol* 2;**137**(2):1003-10. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.023. Epub 2011 Jul 18.
- GROSSHANS,J.,WOLFENDEN,R (1993). Transition-state discrimination by adenosine deaminase from aspergillus oryzae.*Biochim.Biophys.Acta.***1161**:28-32
- GUİSTİ,G (1974). Enzymes activities. Methods of enzymatic analysis.Ed.Bergmeyer U.H.,Verlag Chemia Gmblt Weinheim,Bergest 21092-98
- GOFDON,M.,GRAGG,DAVİD, j (2005). Newman Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal Of Ethnopharmacology.* **22**:72-79
- GUPTA.S.,(2007). Prostate cancer chemoprevention :Current status and future prospects *Toxicol Appl.Pharmacol.***224**(3):369-376
- GUERİTTE-VOEGELEİN, F., SENİLH, V., DAVİD, B., GUENARD, D., POTİER, P (1986). Chemical Studies of 10-Deacetylbaaccatin III. Hemisynthesis of Taxol Derivatives *Tetrahedron*, **42**; 4451-60
- GİBSON, D.M., KETCHUM, R.E.B., HİRASUNA, T.J., SHULER, M.L. (1995).Potential of Plant Cell Culture for Taxane Production in Taxol: Science and Applications, Suffness, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 71-96
- GREVER, M.R.,COLEMAN, M.S.,BALCERZAK, S.P (1983). Adenosine deaminase and terminal deoxynucleotidyl transferase:Biochemical markers in the management of chronic myelogenous leukemia.*Cancer Res.***43**:1442-45
- Genetik markörler ve Analiz Metotları. Bitki Biyoteknolojisi II –Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoglu (eds.) Selcuk Üniversitesi Basımevi, Konya ZENTMYER, G. A., 1994.

- GONDWE M, KAMADYAAPA DR, TUFTS MA, CHUTURGOON AA, OJEWOLE JA, (2008). Effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) ["Avocado"] ethanolic leaf extract on blood glucose and kidney function in streptozotocin-induced diabetic rats and on kidney cell lines of the proximal (LLCPK1) and distal tubules (MDBK). *Musabayane CT. Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **30**(1):25-35. doi: 10.1358/mf.2008.30.1.1147769.
- HOPKINSON, D.A., COOK, P.J.J., HARRIS, H (1969). Further data on the adenosine deaminase polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann. Hum. Genet Lond.* **32**:361-67
- HOUCH, R.F., BASS, B.L (1994). Purification of the *Xenopus laevis* double-stranded RNA adenosine deaminase. *The j. Biol Chem.* **269**(13):9933-39
- HO, A.D., GENESHAGURU, K (1988). Enzymes of purine metabolism in lymphoid neoplasms. Clinical relevance for treatment with enzyme inhibitors. *Klin Wochenscher.* **66**:467-74
- HOLTON, R.A., SOMOZA, C, KIM, H., LIANG, F., BIEDIGER, J., BOATMAN, P.D., SHINDO, M., SMITH, C.C, KIM, S., NADIZADEH, H., SUZUKI Y., TAO, C, VU, P., TANG, S., ZHANG, P., MURTHI, K.K., GENTILE, L.N., LIU, J.H (1994). First Total Synthesis of Taxol. Functionalization of the B Ring *J. Am. Chem. Soc.* **116**; 1597-8
- HOLTON, R.A., KIM, H., SOMOZA, C, LIANG, F., BIEDDIGER, J., BOATMAN, P.D., SHINDO, M., SMITH, C.C, KIM, S., NADIZADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C, VU, P., TANG, S., ZHANG, P., MURTHI, K.K., GENTILE, L.N., LIU, J.H (1994). First Total Synthesis of Taxol. 2. Completion of the C and D Ring. *J. Am. Chem. Soc.* **116**; 1599-1600
- HORWITZ, S.B (1992). Mechanism of Action of Taxol *Trends Pharmacol. Sci.* **13**(4);134-6,
- HOLTON, R.A., BIEDIGER, R.J., BOATMAN, P.D (1995). Semisynthesis of Taxol and Taxotere" in *Taxol: Science and Applications*, Suffness, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 97- 122.
- HEZARI, M., CROTEAU, R (1997). Taxol Biosynthesis: *An Update Planta Med.* **63**;291-5. *Ankara Ecz. Fak. Derg* 28 (2) 99-116, 1999 115
- HODGSON, R.W., (1947) A Novel Repeated Element with Z-DNA Forming Potential is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**; 6465-6469

- HURTADO-FERNÁNDEZ E, CARRASCO-PANCORBO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. (2011)Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*).*J Agric Food Chem.***23**;59(6):2255-67. doi: 10.1021/jf104276a. Epub 2011 Feb 18.
- JACKSON, R.C.,H.P.WEBER,G (1978.)Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumors.*Br.J.Cancer.***37**:701-713
- KOSIŃSKA A, KARAMAĆ M, ESTRELLA I, HERNÁNDEZ T, BARTOLOMÉ B, DYKES GA (2012).Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties.*J Agric Food Chem.***9**;60(18):4613-9. doi: 10.1021/jf300090p. Epub 2012 Apr 24.
- KUNNUMAKKARA, A.B.,ANAND, P., AGGARWAL, B.B (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion,angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.***267**(1);199-225
- LAL,H MA, P.F.,FISHER,J.R (1987) Serum enzymes in head and neck cancer *J.Laryngol.Otol.***101**:1062-65
- LOWRY, OH.,ROSENBROUGH,NJ.,FARR, AL.,RANDAL, RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent.*J.Biol.Chem.***193**;265-75
- LACROIX, H., LÍGEZA, C (1998). Docetaxel (Taxotere) An Update" Exp. Opin. Invest. *Drugs*, **7**(2); 273-81
- LU QY, ARTEAGA JR, ZHANG Q, HUERTA S, GO VL, HEBER D(2005). Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *J Nutr Biochem.***16**(1);23-30.
- MA,P.F.,FISHER,J.R (1969).Two different hepaticadenosine deaminases in the chicken.*Biochim.Bioohys.Acta.***159**:153-59
- MA, P.F.,FISHER,J.R (1968). Multiple adenosine deaminases in the frog (*Rana Catesbeiana*) *Comp.Biochem.Physiol.***27**:105-12
- MA, P.F.,FISHER,J.R (1968). Multiple adenosine deaminases in amphibia and their possible phylogenetic significance. *Comp.Biochem.Physiol.***27**:687-94
- MA, P.F.,FISHER,J.R (1969). Comparative studies of mammalian adenosine deaminases-some distinctive properties in higher mammals.*Comp.Biochem.Physiol.***31**:771-81

- MAGUIRE, M.H., SIM, M.K (1971). Studies on adenosine deaminase (2. specificity and mechanism of action of bovine placental adenosine deaminase). *Eur. J. Biochem.* **23**:22-29
- MITCHELL, B.S., KELLY, W.N (1980). Purinogenic immune deficiency disease. Clinical features and molecular mechanisms. *Ann. Int. Med.* **92**:286-31
- MORISAKI, T., FUJII, H., MIVA, S. (1985). Adenosine deaminase in leukemia: Clinical value of plasma ADA activity and characterization of leukemic cell ADA. *Am. J. Hemato.* **119**:37-45
- NAIR, V., BUENGER, G.S., SELLS, T.B (1991). Inhibition of mammalian adenosine deaminase by novel functionalized 2'3'-dideoxyadenosine. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1078**:121-23
- NICOLAOU, K.C., YANG, Z., LIU, J.J., UENO, H., NANTERMET, P.G., GUY, R.K., CLAIBORNE, C.F., RENAUD, J., COULADOUROS, E.A., PAULVANNAN, K., SORENSEN, E.J. (1994). Total Synthesis of Taxol. *Nature*, **367**:630-4
- NICOLAOU, K.C., DAI, W., GUY, R.K (1994) Chemistry and Biology of Taxol" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **106**(1); 15-44
- NAKASONE, H.Y., & PAUL, R.E (1998). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theor Appl Genet* **94**:279-286.
- PLUNKET, W (1985). Inhibition of adenosine deaminase to increase the antitumor activity of adenine nucleoside analogues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **451**:151-59
- PHELAN, J., MCEVOY, F., ROONEY, S., BRADY, T.G (1970). Structural study on adenosine deaminase from calf intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **200**:370-77
- PHILIPS, A.V., ROBBINS, D.J., COLEMAN, M.S (1987). Immunoaffinity purification and fluorescence studies of human adenosine deaminase. *Biochemistry.* **26**(10):2893-2903
- POPLACK, D.G., BLATT, J., REAMAN, G (1981). Purine pathway enzymes abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **41**:4821-32

- PHAN, C.T., PANTASTICO, Er. B., OGATO, K and CHACHIN, K (1975). Respiration and Respiration Climacteric. In: Er. B. Pantastico (ed.) Postharvest Physiology, Handling and Utilization of Tropical and Subtropical Fruits and Vegetables. The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. Pp: 86-104.
- PAHUA-RAMOS ME, ORTÍZ-MORENO A, CHAMORRO-CEVALLOS G, HERNÁNDEZ-NAVARRO MD, GARDUÑO-SÍCILIANO L, NECOECHEA-MONDRAGÓN H, HERNÁNDEZ-ORTEGA M (2012). Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. **67(1)**;10-6. doi: 10.1007/s11130-012-0280-6.
- RATECH, H., HIRSCHORN, H (1999). Serum adenosin deaminase in normal and in patient with adenosine deaminase deficient –severe combined immunodeficiency. *Clin. Chim. Acta.* **115**:341-47
- RATECH, H., MARTÍNEZ, F., BOWER, W.T (1988). Differential expression of adenosine deaminase isoenzymes in acute leukemia. *Blood.* **72(5)**:1627-32
- ROWINSKY, E.K., The Development and Clinical Utility of the Taxane Class of Antimicrotubule Chemotherapy Agents (1997). *Annu. Rev. Med.* **48**:353-74
- ROHR, J (1997). Biosynthesis of Taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36(20)**:2190-5
- REDDY M, MOODLEY R, JONNALAGADDA SB (2012). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana* Mill.) oil--effect of extraction methods. *J Environ Sci Health B.* **47(6)**:529-37. doi: 10.1080/03601234.2012.665669. ekstraksiyon metodları
- RODRÍGUEZ-CARPENA JG, MORCUENDE D, ANDRADE MJ, KYLLI P, ESTÉVEZ (2011) M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties *J Agric Food Chem.* May 25; **59(10)**:5625-35. doi: 10.1021/jf1048832. Epub 2011 Apr 21.
- SEEMILLER, J.E (1985). Overview of possible relation of defects of purine metabolism to deficiency. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **451**:919
- SHEID, B (1985). Adenosine deaminase activity in the regenerating rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **328(1)**:259-62
- SCHIFF, P.B., FANT, J., HORWITZ (1979). S.B. Promotion of Microtubule Assembly in vitro by Taxol Nature, **277**; 665-7

- SUFFNESS, M., WALL, M.E. Discovery and Development of Taxol (1995). in Taxol: Science and Applications, Suffness, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 3-25
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D (1993). Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew Science, **260**(5105);214-7
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P., BIGNAMI, G. (1995). The Search for a Taxol- Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia* *J. Nat. Prod.*, **58**(9); 1315-24
- STROBEL, G., HESS, W.M., FORD, E., SİDHU, R.S., YANG, X (1996). Taxol from Endophytes and the Issue of Biodiversity" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* **17**(5/6); 417-23
- STROBEL, G., YANG, X., SEARS, J., KRAMER, R., SİDHU, R.S., HESS, W.M (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an Endophytic Fungus of *Taxus wallichiana* *Microbiology*, **142**(2);435-40
- TRİSTCH, G.L., NİSWANDER ,P.W (1985). Purine catabolism as a source of superoxide in macrophages. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **451**:279-91
- OJEWOLE JA, KAMADYAAPA DR, GONDWE MM, MOODLEY K, MUSABAYANE (2007). CT. Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) aqueous leaf extract in experimental animals. *Cardiovasc J Afr.* **18**(2);69-76
- UNGERER, J.P.J., OOSTHOZIEN, H.M., BİSSBORT, S.H., VERMAAK, W.J.H (1992). Serum adenosine deaminase İsoenzymse and diagnostic application. *Clin.Chem.* **38**/7:1322-26
- VAHEDİ LARİJANİ L, GHASEMİ M, ABEDİANKENARİ S, NAGHSHVAR F. (2014). Evaluating the effect of four extracts of avocado fruit on esophageal squamous carcinoma and colon adenocarcinoma cell lines in comparison with peripheral blood mononuclear cells. *Acta Med Iran.* **52**(3);201-5
- YEŞİLOGLU, T (2006). Subtrobik Meyveler, Lisans Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (yayınlanmamış) avokado
- ZİELKE, C.L., SUELTER, C.H (1971). Purine, purine nukleoside and pürine nucleotide aminohidrolases. In boyer PD(ed): *The enzymes*, Vol **4**, NY. *Academic pres*, 54-64

- ZENTMYER, G. A (1994). Part 4. Avocado Pages 71-84 In: Compendsum of tropical fruit diseases. PLOETZ , R. C., ZENTMYER, G. A ., Nishijima , W.T ., Rohrbach, K .G .& Ohr, H.D.(Eds.) APS Pres. St PAUL, MINNESOTA
- WILSON,D.K.,QUIACHO,F.A (1993) A pre-transition-state mimic of an enzyme:x-ray stucture of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water .*Biochemistry*.**32**(7):1689-1694
- WENDEN WANDER ,M.B.,KELLY,W.N (1976). Human adenosine deaminase. *The Journal Of Biol.Chem.***251**(18):5448-56
- WILSON,D.K.,RUDOLP,F.B.,QUIOCHO,F.A (1991). Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition –state analog:Understanding catalysis and immunodeficiency mutations.*Science*.**252**:1278-84
- WANI, M.C., TAYLOR, H.L., WALL, M.E., COGGON, P., MCPHAIL (1971) .A.T.Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, A Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia* . *J. Am. Chem. Soc.*, **93**(9); 2325-7
- WALL, M.E., WANI, M (1998). History and Future Prospects of Camptothecin and Taxol" in *The Alkaloids*, Cordell, G. (Ed.), Vol. **50**, Academic Press, New York, 509-36
- WHILEY, A.W (1991). *Persea americane* Miller. Pages 249-354 In: Plant resources of South East Asia 2: Edible fruits and nuts. Verheij, E. W. M & Coronel, R. E.(Eds.) Pudor,Wageningen.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Meşküre CANBOLAT

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-14.01.1968

Uyruğu : T.C

Medeni Durumu : Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu : Türkiye Halk Sağlığı Kurumu-05332640529

II- Eğitimi

Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbiyokimya Anabilim Dalı

Üniversite, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Lise, Ankara Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi

Ortaokul, Ankara Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi

İlkokul, Ankara Subayevleri Mehmet Akif İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

Çorum Halk Sağlığı Laboratuvarı-1994

Etimesgut Halk Sağlığı Laboratuvarı-1994-2003

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı 2003-2007

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2007-

IV- Bilimsel ilgi Alanları Yayınları:

Posterler:1- Biberonlarda Bisfenol A Düzeyinin LC-MS/MS Yöntemi İle Belirlenmesi

2- Özel Tıbbi Amaçlı Beslenme Ürünlerindeki E vitamin İle Selenyum Miktarlarının Belirlenmesi

3- Enteral Beslenme Ürünlerindeki Vitamin B₂ Miktarının HPLC İle Belirlenmesi

- 4-Determination of Vitamin B₆ (Pyridoxine) in Liquid Enteral Nutrition Products by Microbiological Assay Method.
- 5-Tıbbi Amaçlı Beslenme Ürünlerindeki Vitamin E Miktarının HPLC İle Belirlenmesi
- 6-Enteral Beslenme Ürünlerindeki Toplam Vitamin C Miktarının HPLC İle Belirlenmesi
- 7-Metal Ağzılıklı Cam Sürahilerde Farklı Migrasyon Uygulamaları Kullanılarak ICP-MS Yöntemi İle Ağır Metal Geçişlerinin Belirlenmesi

Yayın: 1- Enteral Beslenme Ürünlerindeki Vitamin B₂ Miktarının HPLC İle Belirlenmesi (Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi 2007;64(3):5-9

2-Quantative Determination of Total Vitamin C in Enteral Nutritional Products by Using HPLC (Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi 2012; 69(3): 143-148

V- Diğer Bilgiler Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

- 1-Uygulamalı HPLC Eğitimi
- 2-HPLC kolonları ve ileri Uygulama Teknikleri
- 3-HPLC ve HPLC de Ayırım Teknikleri
- 4-GC-MS Temel Eğitimi I-II
- 5-Beslenme ve Diyetetik Günleri II Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu
- 6-Obezite İle Mücadele Eylem Çalıştayı
- 7-Tübitak-BİDEB 2237 Tez Aşamasındaki Doktora Öğrencileri İçin Proje Eğitimi Çalıştayı
- 8-Proje Eğitimi Çalıştayı
- 9-Proje ve Risk Yönetimi Eğitimi
- 10-İleri Düzey Proje Yönetimi