

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ADENOSİN DEAMİNAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ
ÜZERİNE FLAVONOIDLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçil ŞENGÖREN

Tez Danışmanı

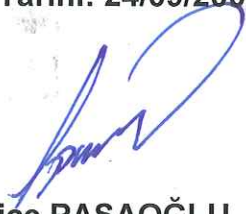
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

ANKARA
Eylül 2009

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

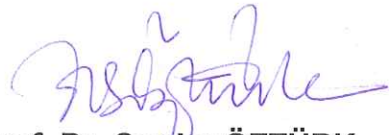
Tez Savunma Tarihi: 24/09/2009



**Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi**



**Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	IV
Tablolar	VI
Semboller,Kısaltmalar	VII

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adenozin deaminaz (ADA) hakkında genel bilgiler	3
2.1.1 Adenozin Deaminaz Adenozin Deaminaz enzimin adlandırılması	3
2.1.2 ADA'nın Yapısı	3
2.1.3 Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar	4
2.1.4 Adenozin deaminaz İzoenzimleri	5
2.1.5 Adenozin Deaminazın lokalizasyonu	7
2.2 Adenozin Deaminazın substratları hakkında bilgi (Adenozin ve 2'-deoksiadenozin)	9
2.2.1 dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu	10
2.3 Pürin Nükleotidlerin Metabolizması	11
2.3.1 Sentezi	12
2.3.2 IMP'nin AMP ve GMP' ye çevrimi	15
2.3.3 Kurtarma yolları (Salvage Pathways)	16
2.3.4 Pürin nükleotidlerin yıkımı (katabolizma)	18
2.4 Flavonoidler hakkında genel bilgi	20
2.5 Flavonoidlerin yapı özellikleri ve sınıflandırılması	21
2.5.1 Flavonoid Sınıfları	24

2.5.1.1 Flavonlar	24
2.5.1.2 Flavonoller	25
2.5.1.3 Flavanonlar	27
2.6 Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri	29
2.7 Flavonoidlerin Antioksidatif Etkileri	31
2.8 Flavonoidlerin Antikarsinojenik Etkileri	32
3. MATERYAL METOT	34
3.1 Materyal	34
3.2 Kullanılan Metot	34
3.2.1 ADA Aktivitesinin Tayini	34
3.2.2 Reaktifler	35
3.2.3 Deneyin Yapılışı	36
3.2.4 Hesaplama	37
3.3 Değişen Adenozin konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	37
3.4 Değişik flavonoidlerin ADA aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması	37
3.5 Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri	38
3.6 pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri	38
3.7 Kullanılan Cihazlar	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	54
6. ÖZET	59
7. SUMMARY	60
8. KAYNAKLAR	61
9. ÖZGEÇMİŞ	72
10. TEŞEKKÜR	73

Şekiller, Grafikler

Şekil 1. ADA'nın katalizlediği tepkimeler	5
Şekil 2. DNA sentezinin dATP ile inhibisyonu	11
Şekil 3 . Riboz-fosfat ve ATP'den de novo pürin biyosentezi yolu	14
Şekil 4 . IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi	15
Şekil 5 . Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi	16
Şekil6. Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu	17
Şekil 7. Hipokasantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu	18
Şekil 8. Ürik asitin pürin bazları olan hipoksantin, Ksantin ve guanin yoluyla pürin nükleozidlerinden oluşması	19
Şekil 9. Flavonların çekirdek iskeleti	25
Şekil 10 : Quercetin'in yapısı	26
Şekil 11: Naringen'in yapısı	28
Şekil 12: Caffeic acid'in yapısı	29
Grafik 1. Adenozin substratına karşılık ADA aktivitesi MM grafiği	40
Grafik 2: Değişik konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	41
Grafik 3: Değişik konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri	42
Grafik 4: 6 µM'lık Quercetin'in değişen adenozin substratına karşılık MM grafiği	43
Grafik 5: Değişik konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	43
Grafik 6: Değişik konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri	44
Grafik 7: 6 µM'lık Caffeic acid'in değişen adenozin substratına karşılık MM grafiği	45

Grafik 8: Değişik konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi	46
Grafik 9: Değişik konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri	47
Grafik 10: 7 µM'lık Naringenin'in değişen adenozin substratına karşılık MM grafiği	48
Grafik 11: Değişen Adenozin konsantrasyonlarına karşılık Adenozin Deaminaz enziminin, Quercetin'in, Caffeic acid'in ve Naringenin'in karşılaştırmalı MM grafiği	48
Grafik 12: Değişen Flavonoid konsantrasyonlarına karşılık Quercetin'in, Caffeic acid'in ve Naringenin'in % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	49
Grafik 13: Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri	49
Grafik 14: pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi	50
Grafik 15: Adenozin substratına karşılık ADA aktivitesi MM grafiği	50
Grafik 16: Quercetin'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi	51
Grafik 17: Caffeic acid'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi	51
Grafik 18: Naringenin'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi	52

Tablolar

Tablo 1: İnsan dokularında ve vücut sıvılarında ADA bağlayan protein aktivitesi	6
Tablo 2: İnsan dokularında adenoazin deaminaz aktivite düzeyleri	8
Tablo 3 : Flavonoidlerin hetero halkadaki $-C_3-$ yapısına göre sınıflandırılması	23
Tablo 4 : Doğal Hidroksiflavonoller	27
Tablo 5 : Giusti metodu kullanılarak ADA aktivitesinin tayini	36
Tablo 6: Değişen Adenoazin konsantrasyonuna bağlı olarak ADA aktivitesi	40
Tablo 7: Farklı konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri	41
Tablo 8: Değişen Adenoazin konsantrasyonuna bağlı olarak 6 μ M'lık Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisi	42
Tablo 9: Farklı konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri	44
Tablo 10: Değişen Adenoazin konsantrasyonuna bağlı olarak 6 μ M'lık Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisi	45
Tablo 11: Farklı konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri	46
Tablo 12: Değişen Adenoazin konsantrasyonuna bağlı olarak 7 μ M'lık Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisi	47

Semboller , Kısaltmalar

ABP: ADA bağlayıcı protein

ADA: Adenozin Deaminaz

ADP :Adenozin difosfat

AMP: Adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

dATP:Deoksiadenozin trifosfat

Ade: Adenozin

DNA: Deoksiribonükleik asit

DMSO : Dimetil sulfooksit

FAD: Flavin – adenin dinükleotid

GMP: Guanozin monofosfat

IMP: İnozin monofosfat

MM :Michaelis-Menten

NDP: Nükleozid difosfat

PRPP: Fosforibozil pirofosfat

PNP: Purin nukleozit fosforilaz

RNA: Ribonükleik asit

SAH: S-adenozil homosistein

SAM: S-adenozil metiyonin

mM: Milimolar

nm: Nanometre

μmol: Mikromol

IU: İnternasyonal Ünite

(A)_N: Numunenin absorbansı

(A)_K : Körün absorbansı

(A)_S : Standartın absorbansı

(A)_{SK} :Standart körünün absorbansı

K_m: Michaelis sabiti

V_m : Maksimum hız

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde çeşitli hastalıkların teşhisi, tiplendirilmesi ve tedavilerinde başvurulanan parametrelerin başında enzimler gelmektedir. Klinik açıdan önem arzeden enzimlerden biri olan Adenozin deaminaz (ADA) aktivitesi üzerine değişik tip flavonoidlerin olası etkilerinin fizyokimyasal ve kinetik açıdan araştırılması çalışmamızın temelini oluşturmaktadır.

Adenozin deaminaz (ADA) [Adenozin aminohidrolaz; EC 3.5.4.4] pürin katabolizmasında görev alan anahtar enzimlerden biridir. Enzim adenozin ve deoksi adenozinden tek yönlü (irreversible) olarak amonyağın ayrılıp sırasıyla inozin ve deoksi inozin oluşması reaksiyonlarını katalizlemektedir.^{1,131,90}

Ayrıca adenozinden ürik aside kadar olan reaksiyonda ara ürün olarak açığa çıkan hipoksantin salvage ara yola substrat olarak girdiği için ADA aynı zamanda pürin salvage ara yolu enzimi olarak da kabul edilmektedir.^{7,8,9,10,11,12} Hücrelerde genetik bilgi DNA molekülleri aracılığıyla taşınır. DNA ise pürin ve pirimidin nükleotidlerinden yapılmış polimerik bir makro moleküldür ve DNA da bulunan genetik bilgi aracılığıyla RNA sentezi ve dolayısıyla bütün hücre proteinlerinin biyosentezi gerçekleştirilir. Bilindiği gibi kanser hücrelerinde DNA turn-overi ve buna bağlı olarak da nükleotidlerin salvage ara yolu normal hücreye göre çok hızlıdır. Bu olay kanser hücresinin ihtiyaç duyduğu pürin nükleotidlerinin artışı ile birlikte seyretmektedir. Kanserli hücrelerde metabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler kanser hücresinin enzimatik profilini yansıtmaları açısından önemlidir.^{89,88} Ayrıca ADA aktivitesinin immün sistem hastalıkları, hepatit, pankreatit, hemolitik anemi gibi değişik

hastalıklarda arttığı veya azaldığına ait bir çok çalışma mevcuttur.^{87,77,141,56,53,144}

Bu yoldan hareketle biz enzim aktivitelerinin tayinin yanısıra enzimlerin kinetik özelliklerinin tespitinin metabolizma hakkında daha sağlıklı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bazı efektörlerin invitro olarak enzimin kinetik özelliklerinde ne gibi değişiklikler meydana getireceğinin araştırılmasının biyokimyasal açıdan çok faydalı olacağına da inanmaktayız. Bu maksatla ticari olarak satılan farklı tipte flavonoidlerin ADA aktivitesi üzerine kinetik davranışını incelemeyi hedefledik. Bu düşünceden yola çıkılarak kanserli hastaların doku veya serumlarından ADA saflaştırılarak enzimin kinetik özelliklerinin araştırılmasının hastalıkların biyokimyasal yönünün, moleküler düzeyde anlaşılmasına katkıda bulunacağına inanıyoruz. Bu tür bir çalışmanın bu amaca yönelik diğer çalışmalara da ışık tutacağını düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adenozin deaminaz (ADA) hakkında genel bilgiler

2.1.1 Adenozin Deaminazın enzimin adlandırılması

Adenozin deaminaz (ADA; EC 3.5.4.4, Adenozin aminohidrolaz) pürin katabolizmasında adenozin ve deoksiadenozinden amonyağın ayrılması ile inozin ve deoksiinozin oluşumunu katalizler.^{1,2,3,4,5,6} Pürin yıkım yolunda, inozin ve deoksiinozinin oluşumundan sonraki basamakta hipoksantin oluşur. Hipoksantin salvage yolun en önemli substratlarındadır. Bu nedenle ADA aynı zamanda salvage yolunda enzimi kabul edilmektedir.^{7,8,9,10,11,12}

Adenozin deaminaz hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzim olup, hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve fosfo anhidrit bağını da içeren diğer bazı bağların hidrolitik olarak koparılmasını katalizleyen enzimlerdir.^{13,14}

Enzim ilk olarak 1939 yılında Conway ve Cooke tarafından tam kan ve serumda bulunmuştur.¹⁵ Konstitutif bir enzim olan ADA ile substratı arasında geçici bir kovalent bağ bulunmaktadır.^{16,17}

2.1.2 ADA'nın Yapısı

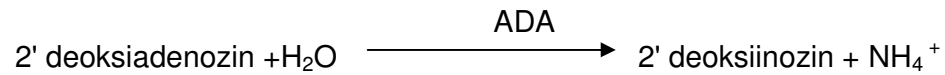
ADA, merkezde sekiz β zinciri ve periferde sekiz α heliks içeren paralel bir $\alpha\beta$ kompleksi içerir. Molekül ağırlığı 35.000 dalton olan monomerik bir proteindir. Bu protein 1088 nükleotid tarafından şifrelenilmektedir. Protein zinciri başlangıçtaki metiyonin hariç 362 aminosit içerir. N- terminal uçtaki aminoasit alanindir. C- terminal uçtaki aminoasit ise lösindir.¹⁸

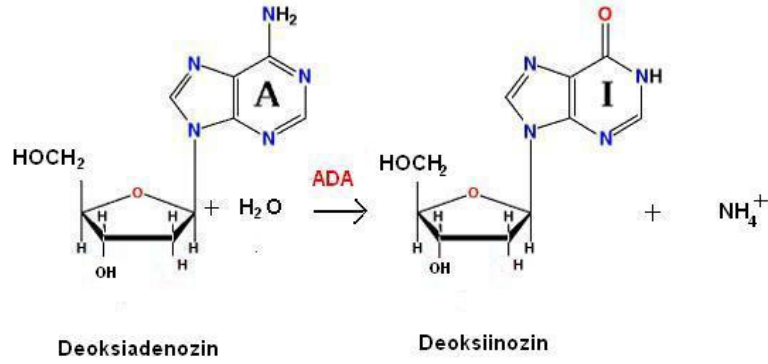
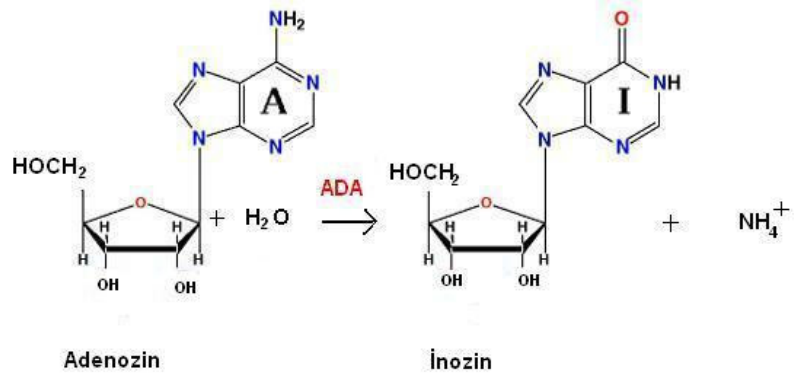
Daha önce ADA'nın bir kofaktöre ihtiyacı olmadığı vurgulanmışken yapıda Zn'nin varlığı şaşırtıcı bulunmuştur. ADA'nın atomik absorpsiyon spektroskopisine göre her enzim molekülü 0.9 ± 0.1 Zn atomu bağlar. Aktif merkezdeki Zn iyonu, His¹⁵, His¹⁷ ve His²¹⁴'ün N atomlarına, Asp²⁹⁵'in O atomuna ve HDRP (hidroksipurin ribonükleozid)'in O atomuna koordine bağlarla bağlanmıştır.¹⁹

2.1.3 Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar

Adenozin deaminaz (ADA), pürin yıkım yolunda adenozin ve 2'- deoksiadenozinin sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüşümünü katalize eden bir enzim olduğundan adenozinin hücre içi konsantrasyonun kontrol edilmesinde önemlidir. ADA'nın katalizlediği bu reaksiyon geriye dönüşümsüz olduğu için, bu enzim reaksiyonu adenozinin yıkılmasında kontrol basamağını oluşturur. Adenozin ve deoksiadenozin moleküllerinin yüksek konsantrasyonları hücre için toksik olduğundan bu nükleozidlerin hücre içi seviyelerinin düzenlenmesinde önemlidir.^{20,21}

Tepkime aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.





Şekil 1: ADA'nın katalizlediği tepkimeler

2.1.4 Adenosin deaminaz İzoenzimleri

ADA' nın iki izoformu mevcuttur. Düşük molekül ağırlıklı olan ADA1 timus, eritrosit ve kalpte bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı ADA2 karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda mevcuttur.²² ADA' nın bu iki izoformunun molekül ağırlıkları değişik literatürlerde farklı olarak verilmiştir. İki molekül ADA1, glikoprotein yapısındaki bir proteinle birleşerek ADA2 formunu meydana getirdiği gösterilmiştir.^{23,24}

Enzimin küçük formunun büyük forma dönüşmesinin konversiyon faktörü veya dönüşüm faktörü adı verilen ADA bağlayıcı bir proteinle gerçekleşir. ADA bağlayıcı protein (ABP), insan serumunda serbest moleküler formda dimerik olarak bulunmaktadır. En fazla miktarda böbrekte en az miktarda ise eritrosit ve trombosit'te bulunan ABP, bir integral membran protein olup membranın iç ve dış yüzüyle bağlantılıdır.²⁵

Tablo 1: İnsan dokularında ve vücut sıvılarında ADA bağlayan protein aktivitesi²⁵

Örnek	Spesifik aktivite mIU ADA bağlayan protein / mg
Böbrek korteksi	810
Böbrek medullası	280
Karaciğer	4.4
Akciğer	7.2
Dalak	3.2
Fibroblastlar	87
Eritrositler	<0.01
Trombositler	<0.01
Plazma	1.1
Serum	1.3
Tükürük	15

2.1.5 Adenozin Deaminazın lokalizasyonu

Adenozin deaminaz, insan vücudunda yaygın olarak bulunan bir enzim olup hücrenin sitoplazmasında ve bazı hücrelerin çekirdeğinde yer almaktadır.^{26,27}

Çeşitli insan ve hayvan dokularının hemen hepsinde bulunan ADA'nın aktivitesinin ölçümlerinde lenfoid dokularda diğer dokulara göre daha fazla aktivite olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca monosit ve makrofajların olgunlaşmasında rol aldığı için ADA hücre aracılı bağışıklığın bir komponenti olarak düşünülür. ADA'nın esas fizyolojik aktivitesi lenfoid çoğalma ve farklılaşma ile ilgilidir.²⁸ ADA düzeyi lenfositlerde eritrositlere göre 10 kat daha yüksektir. T lenfositlerinde B lenfositlerine göre daha yüksek oranlarda bulunurken, daha az farklılaşmış T hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle, ADA hücrel immünitinin bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir.^{29,30,31,32,33,34,35,36}

İnsanda lenfoid olmayan dokular arasında özellikle duodenal epitelyal hücre villuslarında, daha az olarakta gastrointestinal sistemin diğer bölümlerinde, santral sinir sisteminin tüm hücre tiplerinde, kas, akciğer, pankreas, ve böbrek gibi organlarda çeşitli miktarlarda ADA aktivitesi bulunur.³⁷ Adenozin deaminazın insan dokularındaki aktivitelere ilişkin bilgiler Tablo 2 ' de gösterilmiştir.^{38,39}

Tablo 2: İnsan dokularında adenzin deaminaz aktivite düzeyleri

Doku	Spesifik aktivite Ü/mg protein	% Toplam aktivite		
		Büyük	Orta	Küçük
Dalak	128	10	2.0	86
Duodenum	127	9	0.7	89
Mide	89	2	0.3	96
Jejenum	63			
Pankreas	27			
Beyin	27			
Adrenal Bez	21			
Lenf Nodu	23			
Appendiks	20	8	2	87
Testis	13			
Kalp kası	11			
Karaciğer	9	59	12	24
Beyincik	9			
Omurilik	9			
İskelet kası	8			
Akciğer	7	74		
Böbrek	6	86		
Trioid	4			

2.2 Adenozin Deaminazın substratları hakkında bilgi (Adenozin ve 2'-deoksiadenozin)

Adenozin ve 2'-deoksiadenozin pürin yıkım yolunun ara metabolitidir. Pürin yıkım yolunda AMP ve dAMP 'nin 5'-nükleotidaz enzimi ile defosforile olması ile adenozin ve 2'-deoksiadenozin meydana gelmektedir.⁴⁰

Adenozin deaminaz için doğal bir substrat olan adenozin, aynı zamanda hücrenin normal fonksiyonunu görmesi için gerekli olan metilasyon reaksiyonu sonucunda elde edilmektedir. Bu reaksiyonda, S-adenozil metiyonin (SAM), S-adenozil metiyonin metil transferaz enzimi ile S-adenozil homosisteine (SAH) ve SAH hidrolaz ile homosistein ve adenozine dönüşmektedir.^{40,41,42}

ADA eksikliği ile ortamda artan adenozin SAH'ın yığılmasına neden olmaktadır. SAH'ın yığılması SAM ile SAH'ın yarışmaya girmesine ve buna bağlı olarak metilasyon reaksiyonunun durmasına neden olmaktadır. ADA eksikliği ile ortamda artan diğer bir substrat olan 2'-deoksiadenozin ise SAH hidrolazın inaktivatörü olup SAH hidrolazı doğrudan inhibe etmektedir. Homosistein, homosistein metil transferaz ile metil grubunu transfer ederek metiyonini oluşturmaktadır. Kobalamin (B₁₂), homosisteinin metiyonine dönüşümü için bir faktör olmaktadır. Kobalamin eksikliği ile ortamda SAH konsantrasyonu artmakta ve böylece metilasyon reaksiyonu durmaktadır.

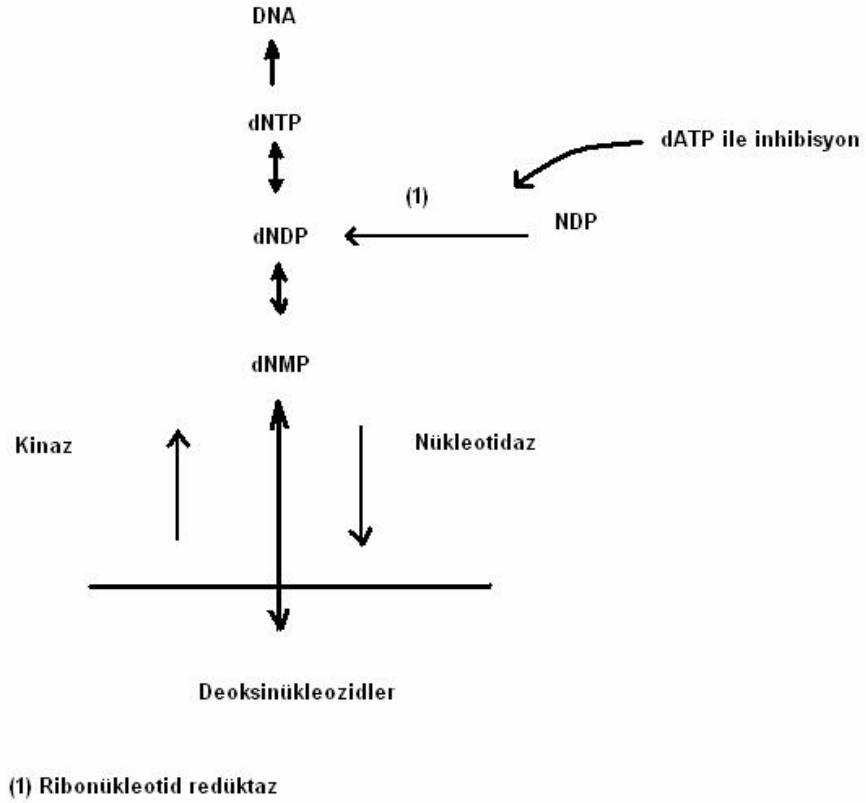
Adenozin hücre içine girdiği zaman üç alternatif metabolizma ile karşı karşıya gelmektedir. Bunlardan birincisi SAH hidrolaz ile S-adenozil homosistein oluşumu, ikincisi adenozin kinaz ile adenilik asite (AMP→ATP) fosforilasyonu ve üçüncüsü de ADA ile inozine deaminasyonudur. Bu üç alternatif yollardan enzim substrat ilgisi en fazla olan birinci reaksiyon olup bunu ikinci ve üçüncü reaksiyonlar

izlemektedir. Bunun için adenosin konsantrasyonu düşük olduğunda adenosinin büyük kısmı ATP' ye fosforillenirken, adenosinin yüksek konsantrasyonunda inozine deaminasyonu görülmektedir. Substrat olarak 2'-deoksiadenozin kullanıldığında iki alternatif metabolizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi ADA ile deoksiinozin oluşturmak üzere deaminasyonu, ikincisi deoksiadenozin kinaz ile deoksiadenilik asite fosforilasyonudur. 2'-deoksiinozin oluşurken yüksek konsantrasyonunda dAMP meydana gelmektedir.^{40,43,44}

2.2.1 dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu

Adenosin metabolizmasının bir ürünü olan deoksiadenozin trifosfat (dATP), DNA sentezi için gerekli olan normal bir ön maddedir. Bununla beraber yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkiler göstermektedir. ADA eksikliğinin bir sonucu olarak ortamda dATP konsantrasyonu artmaktadır. dATP hücrenin büyümesi için gerekli olan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmektedir. Bunun sonucu olarak DNA yapımı inhibe olmakta ve DNA iplik kırılmaları artmaktadır. Bu iplik kırılmaları hücrenin normal görevini yapmasına engel olmakta ve sonuçta ölüm olayı gerçekleştirmektedir.^{45,46}

Şekil 2' de görüldüğü gibi üretim nükleozid difosfat (NDP) basamağında olmaktadır. Sonuç olarak dNDP ya hızla DNA' ya dönüşmekte ya da deoksinükleozidlere yıkılmaktadır. Lenfositlerde ve diğer memeli hücrelerinde deoksinükleotid havuz büyüklüğü az olup, DNA sentezi için çok kısa bir süre yeterli olmaktadır. dATP, ribonükleotid redüktazı inhibe ettiği için dNDP yeterli sentezlenememektedir.⁴⁷



Şekil 2: DNA sentezinin dATP ile inhibisyonu

2.3 Pürin Nükleotidlerin Metabolizması

Pürinler, heterosiklik bileşikler olup hem karbon hem de karbon dışı (hetero) atomlar içeren halkalı yapılardır. Kükürt ve oksijen içeren heterosiklik maddeler, hem biyolojik hem tedavi yönünden önem taşımalarına karşın, bugüne kadar biyolojide en sık rastlanan hetero atom azottur. Pürinlerin başlıca türevleri nükleozidler ve nükleotidler olup bunların her ikisi de, azot hetero atomuna bir β -N- glikozid bağı ile bağlanmış siklik şeker (çoğunlukla bir pentoz) içerir. Nükleozidler buna ek

olarak, şekerin hidroksil grupları ile esterlenmiş bir veya daha fazla sayıda fosfat grubu içerirler.

Yandan bakıldığı zaman, pürinler esas olarak düzlemsel moleküllerdir. Bunların halkaları sıkıştırıldığında pürin bazları çift iplikli DNA veya DNA-RNA melez sarmalının iç kısmında, görece gevşek şekilde, üst üste yerleşir ve sonuçta, sarmalın karalı hali ortadan kalkar.⁴⁸

2.3.1 Sentezi

Pürin nükleotid biyosentezine katılan ve önem sırasına göre dizilen üç olay (1) amfibolik ara maddelerden sentez (de novo sentez), (2) pürinlerin fosforibozilasyonu ve (3) pürin nükleozidlerinin fosforilasyonudur.

Pürinlerin de-novo sentezi (Şekil 3), Riboz-5 Fosfat'la başlar. Sentez yolunun 1. basamağında, ATP girişi ile 5- Fosforibozil-1 – pirofosfat (PRPP) meydana gelir. Bu madde de novo pürin biyosentez yolunda ilk oluşan ara madde olmasının yanı sıra, pürin kurtarma yolunda, NAD⁺ ve NADP⁺ biyosentezinde yer alan bir ara maddedir. Bu reaksiyon PRPP sentetaz enzimi tarafından katalize edilir.

Sentezin 2. basamağında 1. karbona bağlı pirofosfat grubu glutaminin amid grubuyla yer değiştirir. Böylece 5'-Fosfo-β-D-ribozilamin (Fosforibozilamin) oluşur. Bu reaksiyonu PRPP glutamil amidotransferaz katalizler. Bu ilk iki reaksiyon de novo sentez yolunda hız kısıtlayıcı basamaklardır.

3. reaksiyonda 5'-Fosfo-β-D-ribozilamin glisin ile kondansasyonu, glisanamid ribozil-5-fosfat oluşturur. Bu tepkimede glisin, daha sonra IMP'nin 4 ve 5 nolu karbonları ile 7 nolu azotu olacak atomları sağlar.

4. Reaksiyonda IMP'nin 8 nolu karbonu, glisinamid ribozil-5-fosfat formiltransferaz tarafından katalizlenen bir tepkime ile formilglisinamid ribozil-5-fosfat oluşturan N⁵N¹⁰-meteniltetrahidrofolatın formil grubundan gelir.

5. reaksiyonda ise tekrar glutamin kullanılır. Glutaminin amid azotunun aktarılması ile formilglisinamidin ribozil-5-fosfat oluşur. Formilglisinamidin ribozil-5-fosfat sentaz tarafından katalizlenen bu tepkime IMP'ye 3 nolu azot olacak atomu ekler. Daha sonra halka kapanır ve imidazol halkası oluşur(6.reaksiyon).

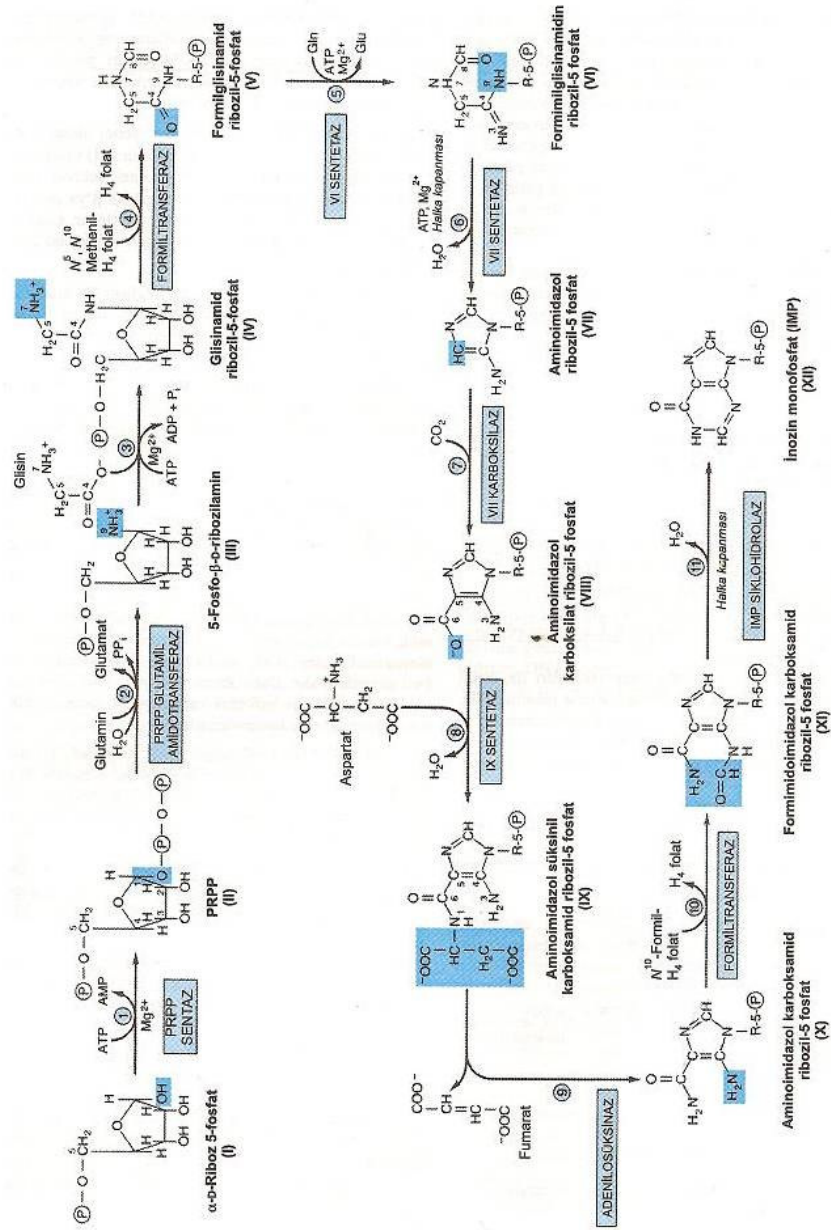
7. reaksiyonda CO₂ 'in eklenmesi, IMP'nin 6 nolu karbonunu sağlar. Aminoimidazol ribozil-5-fosfat karboksilaz tarafından katalizlenen bu tepkime, ne ATP ne de biotin gerektirir ve aminoimidazol karboksilat ribozil-5-fosfat oluşturur.

8. reaksiyonda Süksinil karboksamid . ribozil-5-fosfat sentaz tarafından katalizlenen aspartatın kondansasyonu, aminoimidazol süksinil karboksamid ribozil-5- fosfat oluşturur.

9. reaksiyonda fumarik asit ayrılır. IMP'nin 1 nolu azot olacak atomu ekler.

10. reaksiyonda N₁₀ formiltetrahidrofolat girişi olur.

11. reaksiyonda IMP siklohidrolaz tarafından katalizlenen formimidoimidazol karboksamid ribozil-5-fosfatın halkasının kapanması ile, ilk pürin nükleotidi olan inozin monofosfat (IMP)oluşur.⁴⁸

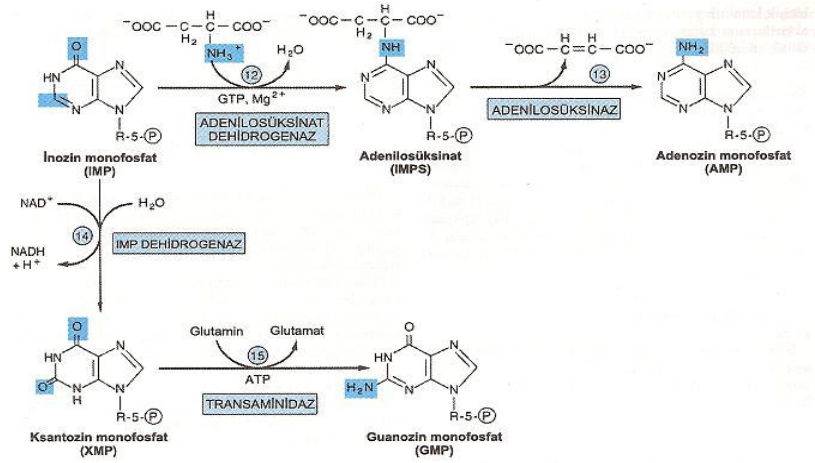


Şekil 3: Riboz-fosfat ve ATP'den de novo pürin biyosentezi yolu⁴⁸

2.3.2 IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrimi

IMP sentezinden sonra yol dallanır ve iki kısa tepkime dizisi, AMP ve GMP oluşumuna yol açar. IMP'ye aspartat eklenmesi adenilosüksinat oluşturur. Bu tepkime GTP'ye ihtiyaç vardır. Adenozin 5'-monofosfat (AMP) oluşturmak üzere fumaratın serbest bırakılması adenilosüksinaz tarafından katalizlenir.

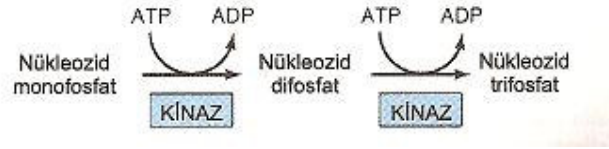
IMP'nin, IMP dehidrojenaz tarafından katalizlenen bir tepkime NAD⁺ tarafından oksidasyonu ksantozin monofosfat (XMP) oluşturur. XMP'nin 6-okso grubunun glutaminin amid azotu tarafından transamidasyonu, 5.tepkimeye benzer.⁴⁸



Şekil 4 : IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi⁴⁸

AMP ve GMP mononükleotidleri, nükleozid monofosfat kinaz tarafından katalizlenen ATP'den fosforil aktarılması yoluyla nükleozid difosfatlarına (ADP ve GDP) çevrilir. GDP, daha sonra, bir diğer ATP tüketilerek nükleozid difosfat kinaz tarafından GTP'ye çevrilir.

(Şekil 5) ADP'nin ATP'ye çevrimi,birincil olarak oksidatif fosforilasyon ikincil olarak glikoliz ve sitrik asit döngüsü tepkimeleri ile başarılır.



Şekil 5 : Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi⁴⁸

2.3.3 Kurtarma yolları (Salvage Pathways)

Pürin, pürin ribonükleozidleri ve pürin deoksiribonükleozidlerinin mononükleotidlere çevrimi de novo senteze oranla daha az enerji gereksinen ve kurtarma tepkimeleri olarak bilinen olayları kapsar. Miktar olarak daha önemli olan bir mekanizma, serbest bir pürinin (Pu), PRPP tarafından, pürin 5'-mononükleotid (Pu-RP) oluşturmak üzere fosforibozilasyonunu kapsar:



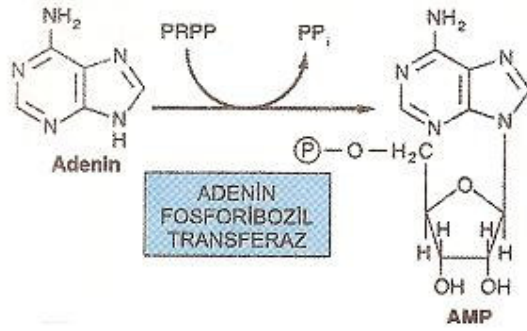
Pürinlerin, PRPP'ye bağımlı fosforibozilasyonu, adenin fosforiboziltransferaz (adenini AMP'ye çevirir Şekil 6) ve hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (hipokasntin veya guanini IMP veya GMP'ye çevirir Şekil 7) tarafından katalizlenir.

İkinci bir kurtarma mekanizması, bir pürin ribonükleozidin (PuR) ATP tarafından direkt fosforilasyonunu kapsar:

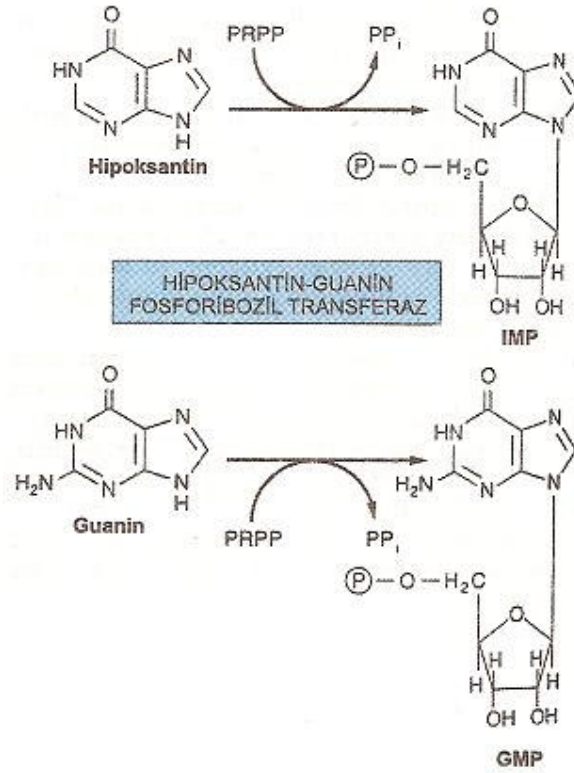


Adenozin kinaz, adenozinin AMP'ye veya deoksiadenozinin dAMP'ye fosforilasyonunu katalizler. Deoksisitidin kinaz, deoksitidin, deoksiadenozin ve 2'-deoksiguanozinin sırasıyla, dCMP, dAMP ve dGMP'ye fosforilasyonunu katalizler.

Pürin nükleotid biyosentezinin ana yeri olan memeli karaciğeri, kendi biyosentezlerini yapamayan dokular tarafından kurtarılmak ve kullanılmak üzere pürin ve bunların nükleozidlerini sağlar.⁴⁸



Şekil 6: Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu⁴⁸

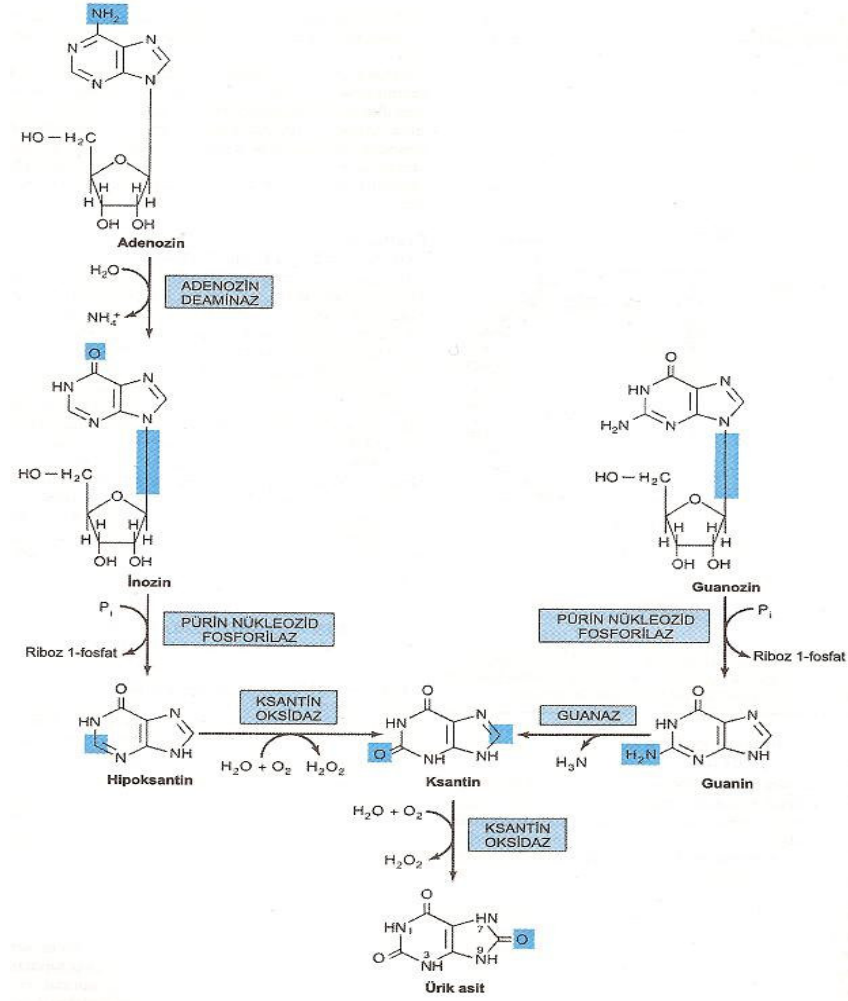


Şekil 7: Hipokasantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu⁴⁸

2.3.4 Pürin nükleotidlerin yıkımı (katabolizma)

Adenozin deaminaz enzimi, pürin yıkım yolunun anahtar enzimi olup adenozin ve 2'-adenozini sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüştürmektedir.(Şekil 8) Pürin yıkım yolunda pürin nükleotidleri, 5'-nükleotidaz enziminin etkisiyle fosfat gruplarını kaybederek adenozin monofosfata (AMP) dönüşmektedirler. Elde edilen AMP ya 5'-nükleotidaz ile adenozine ya da AMP deaminaz ile deamine edilerek inozin monofosfata (IMP) dönüşmektedirler. Daha sonra adenozin, adenozin deaminaz ile inozine, IMP ise 5'-nükleotidaz tarafından inozine çevrilmektedir.

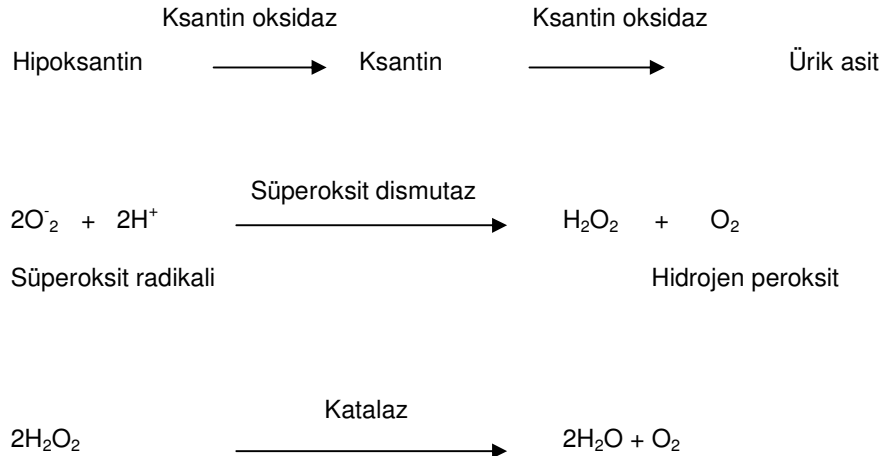
Bundan sonraki basamak diğer pürin bazı olan guanozinle ortak yürür ve bu reaksiyonları purin nukleozit fosforilaz (PNP) enzimi katalizler.



Şekil 8 : Ürik asitin pürin bazları olan hipoksantin, Ksantin ve guanin yoluyla pürin nükleozidlerinden oluşması⁴⁸

İnsanda pürin yıkım yolunun son aşaması, ksantin oksidaz ile gerçekleşmektedir. Ksantin oksidaz hipoksantini önce ksantini ve daha sonra ksantini ürik asite oksitlenmektedir. Ksantin oksidazın

yapısında (Mo), non-hem Fe ve flavin – adenin dinükleotid (FAD) bulunmaktadır. Reaksiyon için moleküler oksijen gerekli olup reaksiyon sonunda süper oksit dismutaz ve katalaz enzimleri tarafından ortadan kaldırılmaktadır.^{49,50,51,52}



2.4 Flavonoidler hakkında genel bilgi

Flavonoidler bitki kaynaklı bileşikler olup doğada yaygın olarak bulunurlar. Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliğini ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi artırmış oldu. Bu nedenle flavonoidlere karşı ilgi 1940'lı yıllardan itibaren hızlanmaya başladı. 1970'li yıllarda flavonoidlerle yapılan çalışmaların boyutu daha da genişledi. Bu araştırmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.⁶⁰

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi bir dizi özelliklere sahiptir. Bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki ederler.^{54,55}

Geleneksel tıpta, son yirmi yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antimitojenik, antiülserojen, antiviral, hepatoprotektif ve hipolidemik etkiye sahip oldukları açıklanmıştır. Quercetin ve kaempferolun in vitro ve in vivo şartlarda antimitojenik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları da belirtilmiştir.⁵⁹

2.5 Flavonoidlerin yapı özellikleri ve sınıflandırılması

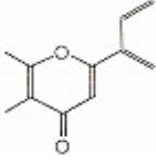
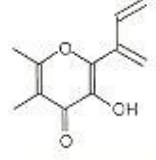
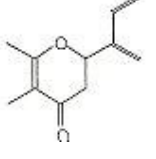
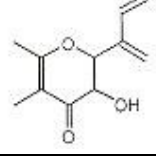
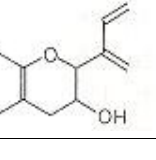
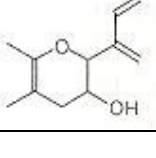
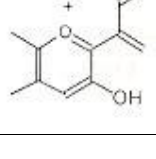
Flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Günümüze kadar bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmektedir. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6 - C_3 - C_6$) yapısı teşkil eder. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması nedeniyle, flavonoidler alt sınıflara ayrılırlar.

Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır.

Fenil gruplarının propan zincirine 1,2- pozisyonlarında bağlanmasıyla 1,2-difenilpropan iskeleti oluşur. 1,2-difenilpropan iskeletinde, propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C-3) oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile siklikleşmesi sonucu oluşan hetero halkalı trisiklik yapıya izoflavan denir.

$C_6 - C_3 - C_6$ (difenilpropan) iskeleti içeren doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoidler olmak üzere, üç ana grupta toplanırlar. Bu grupların her biri de çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoid yapılarında C_3 - sisteminin oluşturduğu heterosiklik halka, değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilirler. Hetero halkanın yükseltgenme derecesi flavonoidlerin alt sınıflarını belirleyen bir göstergedir. C_3 - sisteminin yükseltgenme derecesine bağlı olarak, bilinen flavonoid sınıfları ve bitkilerde yaygın olan örnekleri tablo 3' te verilmiştir.⁶⁰

Tablo 3 : Flavonoidlerin hetero halkadaki /- C₃ -/ yapısına göre sınıflandırılması⁶⁰

Flavonoid sınıfları	/- C ₃ -/ Yapısı	Örnekler	A ve B halka hidroksillerinin pozisyonları
FLAVONLAR		Apigenin Luteolin	5,7,4' 5,7,3',4'
FLAVONOLLER		Quercetin Myricetin	5,7,3' 5,7,3',4'
FLAVONONLAR		Naringenin	5,7,4'
FLAVANONOLLER		Fussin	7,3',4'
FLAVAN-3-OLLER (Katekinler)		Katekin	5,7,3',4'
FLAVAN-3,4-DİOLLER		Leucocyanidin	5,7,3',4'
ANTOSİYANİDİNLER		Cyanidin	5,7,3',4',5'

2.5.1 Flavonoid Sınıfları

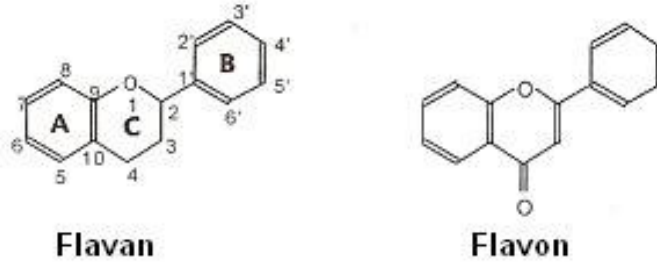
Tüm monomerik flavonoidler iki aromatik halkanın üç karbon atomlu zincir /-C3-/ üzerinden birleşmesiyle oluşan C₁₅ iskeleti içerirler. Difenilpropan yapısındaki propan zincirinin çeşitli yollarla değişikliğe uğramasından farklı flavonoid sınıfları ve alt sınıfları oluşur.

Üç karbonlu zincirin oksijen üzerinden aril halkası ile siklikleşmesinden trisiklik sistem oluşur. Altı üyeli heterosiklik halkanın oluşmasıyla flavonoid ve izoflavonoidler, beş üyeli halkanın oluşmasıyla ise auronoidler meydana gelir. İzoflavonoid iskeletinin oksijen üzerinden yeniden siklikleşmesi, tetrasiklik bir sistem olan pterokarpanoidleri oluşturur. Böyle trisiklik veya tetrasiklik sisteme sahip olmayan, aromatik halkalar arasında asiklik sistem içeren ise kalkonoidler denir.⁶⁰

2.5.1.1 Flavonlar

Flavonlar, flavonoidlerin bitki aleminde yaygın olarak rastlanan bir sınıfıdır. Flavonların çekirdek iskeleti şekil 9 da verilmiştir. Bu bileşiklerin hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dehidro türevleridir. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Günümüzde bitkilerden 300'ün üstünde flavon aglikon izole edilmiştir.

Flavonların basit üyeleri, aromatik halkalarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleridir. Yapılarında yalnız oksijen fonksiyonu (hidroksi ve/veya metoksil grupları) içermelerinden dolayı, bu grup bileşiklere oksijenli veya O-substitue flavonlar da denir. Flavonların O-substitue türevleri doğada yaygındır. Flavonlar yapılarında bulunan, O-substituentlerin (hidroksi ve/veya metoksil gruplarının) sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler.⁶⁰



Şekil 9 : Flavonların çekirdek iskeleti⁶⁰

2.5.1.2 Flavonoller

Flavonoller, C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfıdır. Bunlar C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzo-γ-piran çekirdeği içerirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır.

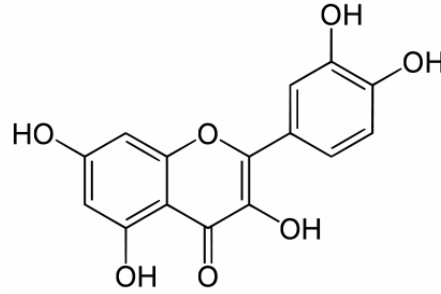
Flavonoller, kristalsi veya amorf özellikli olup, flavonlar gibi açık sarı veya sarı renklidirler. Bu bileşikler genellikle oksijenli ortamda, flavonlara göre daha dayanıksızdır.

Flavonolun farklı pozisyonlarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleri bitki aleminde daha yaygındır. Günümüze kadar bitkilerden 400'ün üstünde flavonol aglikon izole edilmiştir.

Flavonoller de, flavonlar gibi, yapılarında bulunan hidroksil ve/veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. Flavonol çekirdeğinde hidroksil grubu bulunduğu için, böyle bir sınıflandırmada, C-3 pozisyonundaki hidroksil grubu dikkate alınmaz. Bitkilerden elde edilen ve farklı pozisyonlarda hidroksil taşıyan flavonollerden bazıları tablo 4' te verilmiştir.^{61,62}

Flavonoller kendi aralarında Mono- O-substitue flavonoller , Di- O-substitue flavonoller, Tri- O-substitue flavonoller, Tetra- O-substitue flavonoller, Penta- O-substitue flavonoller olmak üzere alt gruplarına ayrılırlar.

Tetrahidroksiflavanollerin doğada en fazla yaygın olan üyelerinden biri de quercetindir. (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavanol). Quercetin'in farklı pozisyonlarda mono- ve dimetoksi türleri genellikle *Asteraceae* familyasının türlerinde yaygındır.⁶⁰



Şekil 10 : Quercetin'in yapısı

Tablo 4 : Doğal Hidroksiflavanoller

Adları	Hidroksil gruplarının pozisyonları									Elde edilme kaynakları
	C-5	C-6	C-7	C-8	C'-2	C'-3	C'-4	C'-5	C'-6	
5,7-diOH flavonol (Galangin)	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-	<i>Achyrocline flaccida</i>
5,6,7,3',4'-pentaOH flavonol (Quercegetin)	OH	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-	<i>Eriocaulon L.</i>
5,7,3',4',5'-pentaOH flavonol (Myricetin)	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-	<i>Hamamelidaceae</i>

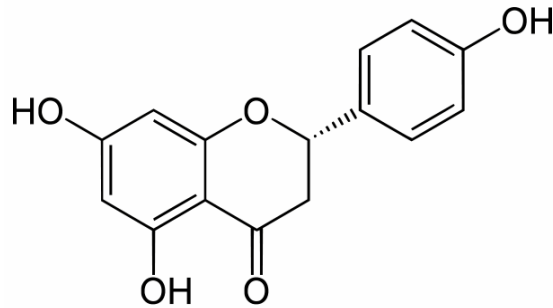
2.5.1.3 Flavanonlar

Flavanonların çekirdek yapısını dayanıksız dihidro-γ-piron halkası oluşturur. Bu nedenle flavanonlar baz veya asit etkisiyle kolayca parçalanarak uygun halkonlara dönüşürler. Flavanon yapısında bir asimetrik karbon atomu (C-2) bulunur. Flavanonlar genellikle halkonlarla birlikte bulunurlar ve çoğunlukla glikozillenmiş türevleri halinde rastlanırlar. Bu güne kadar 50'den fazla flavanon bitkilerden izole edilerek teşhis edilmiştir.⁶⁰

Flavanonların farklı pozisyonlarda oksijenlenmiş türevleri bitkilerden izole edilmiştir. Flavanonların basit üyeleri, aromatik halkaları farklı pozisyonlarda oksijenlenmiş (hidroksillenmiş ve/veya metoksillenmiş) bileşiklerdir. Oksijenlenmiş flavanonların en basit yapılı türevi, A halkası monohidroksi grubu içeren, 7-hidroksiflavanon *Ceratiola*

ericoides türünden izole edilmiştir.⁶⁵ Dihidroksiflavanonlardan 5,7-dihidroksiflavanon (pinocembirin) *Populus nigra*⁶⁶ ve 7,4'-dihidroksiflavanonona (liquiritigenin, *G. Uralensis*⁷⁰, *Pterocarpus macrocarpus*⁷¹ ve başka bitki türlerinde rastlanır. *Bauhinia manca* bitkisinden liquiritigenin ile birlikte, 7-ve 4'-metil eterleri de izole edilmiştir.⁷²

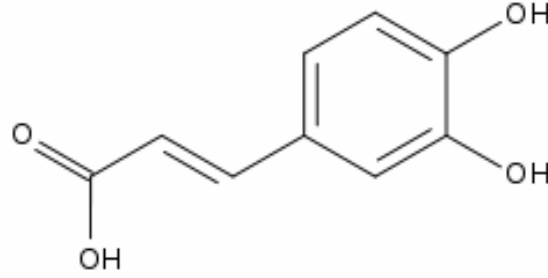
5,7,4'-Trihidroksiflavanon (naringenin) flavanonların çok yaygın olan üyelerindendir. Bu bileşik *Asteraceae* familyasının *Artemisia campestris*⁷³, *Grossheimia macrophylla*, , *Madia sativa*⁷⁵, *Viguireia* türlerinden⁷⁶; *Fabaceae* familyasının *Glycyrrhiza glabra*⁷⁸, *Pterocarpus marsupium*⁷⁹ *Vigna angularis*⁸⁰; *Rosaceae* familyasının *Cerasus tianschanika*⁸¹, *Rrunus cerasoides*⁸² *P. persica*⁸³; *Rutaceae* familyasının *Citrus callus cultures*⁸⁴ ve başka familyalara ait türlerden de izole edilmiştir. Naringenin mono- ve dimetoksilenmiş türevleri bitki aleminde yaygındır. 7,4'-dihidroksi-5-metoksiflavanon *Asteraceae* familyasının *Achyroline alata*, *A. flaccida*⁸⁵, 5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavanon *Cistus incanus*, *C. laurifolius* (*Cistaceae*)⁸⁶, *Encelia canescens*, *E. lasiniata*, türlerinden elde edilmiştir.



Şekil 11: Naringenin'in yapısı

Caffeic acid doğada çeşitli bitkilerde bulunan yapısal olarak sinamik asite benzeyen fakat sinamik asitten farklı olarak iki hidroksil grubu bulunduran, karsinogenik bir inhibitör olan fenolik bir

bileşiktir. Kuvvetli bir antioksidandır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir.



Şekil 12: Caffeic acid'in yapısı

2.6 Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri

Bazı flavonoidlerin biyolojik aktivite göstermesinden dolayı, flavonoidlere karşı ilgi 1940'lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Bu ilginin başlıca nedenlerinden biri, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P-vitamin aktivitesi göstermesi olmuştur.

Flavonoidlerin ilk olarak belirlenen biyolojik özelliği kılcal damar duvarlarına olumlu etkileridir.⁹¹ Bu bileşiklerin kılcal damar sistemine olumlu etkisi, genellikle kan sızdırmanın önlenmesinde, kırılabilirlik ve geçirgenliğin ortadan kalkmasında kendini göstermiştir.⁹²

Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi de açıklanmıştır. Örneğin; *Hedusarum L.* türünün toplam flavonodilerinin eritropoezi teşvik ettiği ve kanda lökositlerin miktarının arttırdığı açıklanmıştır.⁹³ 3-Metilflavonoidlerin kanın formülü elementlerine (bu

elementler kan hücrelerinin agregasyon ve sedimantasyonunu önlerler) etki gösterdikleri de belirtilmiştir.⁹⁴

Flavonoidler kan damarlarına etkileri ile birlikte, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da bilinirler. Başka bir araştırma sonuçlarına göre quercetin, rutin ve flavonoller zayıf (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme, nabızı normalleştirme özelliğine sahiptirler.⁹²

Flavonoidlerin en önemli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna olumlu etkileridir. Flavonoidlerin safra salgılanmasını hızlandırdıkları, karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etki ettikleri açıklanmıştır^{95,96}. Flavonoidlerin detoksikasyon etkisinin nedenlerinden birinin, idrar kovucu özellikleri olduğu gösterilmiştir.⁹⁸

Flavonoidlerin pratik kullanım amacı ile incelenmeleri 1970'li yıllarda daha da hızlanmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Bu tür bileşiklerin antioksidan özelliğe^{59,99}, antimikrobiyal¹⁰⁰, antiülserojenik, antiviral, hepatoprotectiv, hipolidemik^{101,102} ve iltihaba karşı etkiye sahip oldukları açıklanmıştır.^{103,104} Bunlardan başka flavonoidlerden quercetin ve kaempferolun antimitojenik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları in vitro ve in vivo şartlarda belirlenmiştir.^{105,106,107,108}

2.7 Flavonoidlerin Antioksidan Etkileri

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin nonenzimatik, serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu önleyen bileşiklerdir.

Son zamanlarda besin kimyası ve koruyucu tıbbin bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni, sentetik antioksidanların (butilhidroksianizol ve butilhidroksitoluen gibi) kanserojen olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etki göstermezler. Doğal antioksidanlar gıda sanayinde besinlerin bozunmasını önlemek, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını, besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir. Flavonoidlerin antioksidatif özelliklerinden dolayı onlara karşı ilgi gittikçe artmaktadır.^{115,116,117}

Son zamanlarda yürütülen bu amaca yönelik araştırmalar, bazı flavonoidlerin süper oksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını; lipid peroksit radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur.^{59,109,110,111,112,113}

Model sistem olarak unilamellar lipozomlar içeren fosfolipid bilayerlerde serbest radikal oluşturucu olarak, suda çözünen azo bileşik kullanarak, katekinlerin antioksidatif aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla çay katekinleri (-)-epikatekin, (-)-epikatekingallat ve bitki kaynaklı besinlerde yaygın olan flavonoid olarak quercetin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu bileşiklerin sulu ortamda oksijen radikallerinin etkisiyle başlatılan membran lipidlerinin peroksidasyonunu α -tokoferole göre daha aktif olarak önleyen lipofilik antioksidanlar olduğunu göstermiştir.¹¹⁸

Polugonum hidropiper bitkisinden elde edilen sulfatlanmış flavonoidlerin, (quercetin 3-sulfat, rhamnetin 3,7-disulfat ve tamarixetin 3-O- β -glukozit-7-sulfatın), lipidlerin peroksitletlenmesine ve süper oksit anyonlarının oluşumuna etkilerini araştıran araştırmacılar bu bileşiklerin her birinin, doğal antioksidan α -tokoferole göre, daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini açıklamışlardır.¹²⁰

Flavonoid radikallerinin indirgenme potansiyelleri alkil peroksil ve süperoksit radikallerinin indirgeme potansiyellerine göre daha düşüktür. Bu yüzden flavonoidler bu oksit türlerini deaktive eder ve reaksiyonlarının verebileceği zararlı sonuçları önlerler.^{121,122}

Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil gruplarının pozisyonları ile antioksidatif aktivite arasındaki ilişki araştırılmıştır. Quercetin'in de morin, kaempferol ve luteolin gibi etkili antioksidan olduğu gösterilmiştir.¹²³

2.8 Flavonoidlerin Antikarsinojenik Etkileri

Kanser oluşumunda beslenmenin çok önemli bir faktör olduğu anlaşılmaya başlandı; besinlerle alınan sebze ve meyvelerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği ile ilgili çalışmalar artış göstermiştir. Bu koruyucu etkinin, besinlerde bulunan antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen polifenolik bileşiklerin antioksidan etki veya farklı bir mekanizma ile antikanserojen etki gösterdikleri ileri sürülmektedir. Özellikle, içilen şarap ve çayın in vitro ve in vivo koşullarda antioksidatif etki gösterdiği açıklanmıştır.^{126, 127, 128,129,130,132}

Flavonoidlerden quercetinin, karakteristik bir karsinojen bileşik olan, polinükleer aromatik hidrokarbon benz[α]pirenin (BP) mutajenik aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir.^{133,114}

3. MATERYAL METOT

3.1 Materyal

Çalışmamızda aşağıdaki kimyasal maddeler kullanılmıştır.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck
Adenozin	Sigma
Fenol	Riedel
Sodyum nitroprussid	Sigma
NaOCL	Birka
NaOH	Sigma
Adenozin deaminaz	Sigma
DMSO	Sigma
Quercetin	Sigma
Caffeic acid	Sigma
Naringenin	Sigma

3.2 Kullanılan Metot

3.2.1 ADA Aktivitesinin Tayini

ADA aktivitesi tayini ile ilgili birçok metot mevcuttur. Bunlar spektrofotometrik, radyoizotop işaretleme tekniği ve HPLC ile olmak üzere üç başlık altında toplanmaktadır. Biz burada kinetik çalışmaya uygun olması sebebiyle spektrofotometrik metodu tercih ettik. Spektrofotometrik metot iki şekilde yapılmaktadır. Birincisi 265 nm de adenozin absorpsiyonuyla ilgili olan diğeri ise 628 nm de amonyak-inozin kompleksinin belirlendiği metottur. Çalışmamızda kullandığımız metot

628 nm de amonyak-inozin kompleksinin belirlendiği metot olup ilk defa Giuseppe Giusti tarafından tarif edilmiştir²⁶. Giusti yönteminde ADA aktivitesinin ölçümü için substrat olarak adenzin (deoksiadenozin) kullanılır. ADA adenzinden inozin (deoksiinozin) oluşumunu katalizler. Bu sırada açığa çıkan amonyak, sodyum hipoklorit ve fenol/nitroprussid ile birlikte alkali çözeltide koyu mavi indofenol şeklini alır. Sodyum nitroprussid katalizör olarak görev yapar. Bu reaksiyon gereği amonyak konsantrasyonu indofenolün konsantrasyonu ile (absorbansıyla) doğru orantılıdır.

3.2.2 Reaktifler

Fosfat Tamponu (50 mM; pH: 6,5) : 4,73 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 5,62 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ bir miktar Distile suda çözündükten sonra 1 L' ye tamamlanır.

Tamponlanmış Adenzin Çözeltisi (Substrat 21 mM) : Yaklaşık 15 ml fosfat tamponu bulunduran 25 ml'lik bir erlen ya da behere 140 mg Adenzin konur, ısıtılarak karıştırmak suretiyle iyice çözündükten sonra, yine tampon çözelti ile 25 ml'ye tamamlanır.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stok çözeltisi (15 mM) : 1.982 gr Amonyum sülfat, distile su ile çözülerek hacim 1 L' ye tamamlanır.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ standart çözeltisi (75 mM ; 0.15 μval , NH_3/ml) : 0.5 ml stok Amonyum sülfat çözeltisi fosfat tamponuyla 100 ml' ye ayarlanır.

Fenol- Nitroprussid çözeltisi (106 mM Fenol, 0.17 mM Na nitroprussid) :10 gr. Fenol ve 50 mg Na-nitroprussiyat 500 ml distile suda çözülür ve hacim 1 L' ye tamamlanır.

Alkali hipoklorit çözeltisi (11 mM NaOCl , 125 mM NaOH) : Bir miktar distile su bulunan 1 L'lik bir balon jojeye 125 ml, 1 N NaOH çözeltisi ile 16.4 ml NaOCl (% 5 w/v) konur ve karıştırıldıktan sonra 1 L'ye tamamlanır.

Adenozin Deaminaz enzimi (1000 U, Sigma A1155) : Fosfat tamponunda 50 kat seyreltilerek çalışmamızda kullanılmıştır.

3.2.3 Deneyin Yapılışı

Çalışmamızdaki bütün deneyler Giusti metodu kullanılarak aşağıdaki şemaya göre yapılmıştır.

Tablo 5 : Giusti metodu kullanılarak ADA aktivitesinin tayini

Reaktifler (mL)	Numune K�r�	Numune	Standart K�r�	Standart
Fosfat Tamponu	***	***	1.00	***
Adenozin	1.00	1.00	***	***
Numune	***	0.05	***	***
Standart	***	***	***	1.00
Distile Su	***	***	0.05	0.05
Tüplerin ağızı parafilmle kapatılıp, karıştırılır ve 37 �C de 60 dakika su banyosunda inkübe edilir.				
Fenol nitroprussid �z�ltisi	3.0	3.0	3.0	3.0
Numune	0.05	***	***	***
Alkali hipoklorit �z�ltisi	3.0	3.0	3.0	3.0

Tüpler karıştırılıp 37  C su banyosunda 30 dakika inkübe edilir ve 628 nm de distile suya karşı Numune ve k rler'in absorbansları okundu. Absorbans'ın 1.00 ' in üstüne çıktığı durumlarda örnekler distile su ile 2-5 kez seyreltilerek deney tekrarlandı.

3.2.4 Hesaplama

Deneylerin sonucunda Adenozin Deaminaz Aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = \{(A)_{N-} - (A)_{K-} / (A)_{S-} - (A)_{SK-}\} \times 50$$

3.3 Değişen Adenozin konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

Adenozin substratıyla Michaelis-Menten kinetiğini incelemek için önceden tamponda çözülerek bir stok substrat (21 mM adenozin) çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyonu 0,5,10,15,20,25,50,100,200,400,600,800 ve 1000 µM olacak şekilde çözeltilerle Tablo 5'e göre deney yapılarak uygun çalışma konsantrasyon aralığı tayin edildi. Bu çalışmanın sonucunda 0,20,30,40,50,100,200,400,600,800 ve 1000µM'lık aralığın en uygun aralık olduğu belirlendi.

Daha sonra substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktiviteleri hesaplanarak Michaelis-Menten grafiği çizildi ve Adenozin için Vm ve Km değerleri belirlendi.

3.4 Değişik flavonoidlerin ADA aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması

Bu araştırma için Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin aşağıda belirtildiği şekilde inhibisyon deneyleri yapıldı. Tüm bileşikler dimetilsulfooksit (DMSO) çözeltisinin uygun dilüsyonları ayarlanarak yaklaşık 100 kat seyreltikten sonra, flavonoidler bu çözeltilerle hazırlandı. Bu konsantrasyonda DMSO' nun ADA aktivitesi üzerine etkisi olmadığı denenerak tespit edildi.

Çalışmamızın bu kısmında ise 10 mM'lık stok Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin çözeltileri hazırlanarak en uygun inhibisyon

konsantrasyon aralığını bulmak için 5, 10, 25, 50 ve 100 μM 'lık Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin çözeltileri sabit adenosin konsantrasyonunda (400 μM) çalışıldı. En uygun aralığın 1,2,3,4,5,6,8 ve 10 μM 'lık aralık olduğu belirlendi.

Bu çalışma ile ADA için IC_{50} konsantrasyonları Quercetin ve Caffeic acid için 6 μM ve Naringenin için ise 7 μM 'lık konsantrasyon grafikten belirlenerek diğer çalışmalar için (%inhibisyon) denendi.

3.5 Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri

Bu deneyi yapmak için 37,50 ve 65°C sıcaklıklar için su banyoları hazırlandı. 4°C için buzdolabı, 10°C laboratuvar penceresinin dış kısmı ve 25°C için de laboratuvar ortamı kullanıldı. Her bir sıcaklık için Numune, N.körü, standart ve standart körü hazırlanarak ADA aktivitesi tayini için verilen metoda uygun olarak hem 30 dakikalık ön inkübasyon süresi ve hem de 60 ve 3' ar dakikalık inkübasyon süreleri bu ortamlarda gerçekleştirildi. Bu deneye ait sonuçlar "bulgular" kısmında verilecektir.

3.6 pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri

Bu bölüm için pH değerleri 4, 6, 6.5, 7.4, 8 ve 10 olarak seçildi.

pH 4 tamponu $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{Na-Asetat}$ çözeltilerinden,
pH 6,6.5,7.4 tamponları $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'dan,
pH 8 TRIS/HCl çözeltilerinden,
pH 10 ise Glisin/NaOH çözeltilerinden hazırlandı.

Yine burada da her bir pH için adenosin substratı bu tampon sistemlerinde çözülerek hazırlandı, ayrıca standart körüne de

ilgili tamponlar konmak suretiyle daha önce verilen (Tablo 5) ADA tayin metotuna göre deney yapıldı. Bu deneye ait değerlerde" bulgular" kısmında tablo halinde verilecektir.

3.7 Kullanılan Cihazlar

pH metre (Jenway)

Hassas Terazı (Schimadzu, Libror,AEG 220)

Vorteks (Heidolf Reox 2000)

Spektrofotometre (Schimadzu,UV 1601)

Su banyosu

Otomatik pipetler

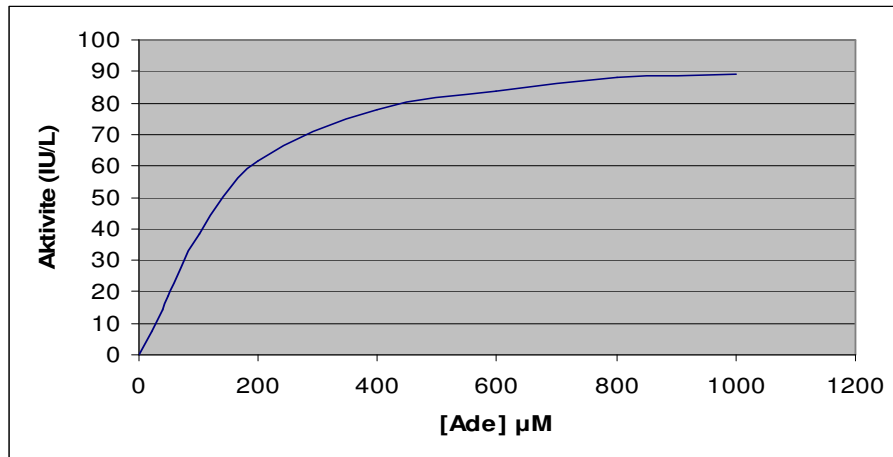
Plastik ve cam malzemeler

4. BULGULAR

2.1 mM'lık stok adenzin çözeltisinden 0, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 μM konsantrasyonlarında adenzin çözeltisi hazırlanarak Michaelis-Menten (MM) grafiğı çizilmiştir. Bu grafikten yararlanarak ADA için K_m ve V_m değeri belirlenmiştir. Bu çalışmaya ait grafik aşağıda görölmektedir. (Gr. 1)

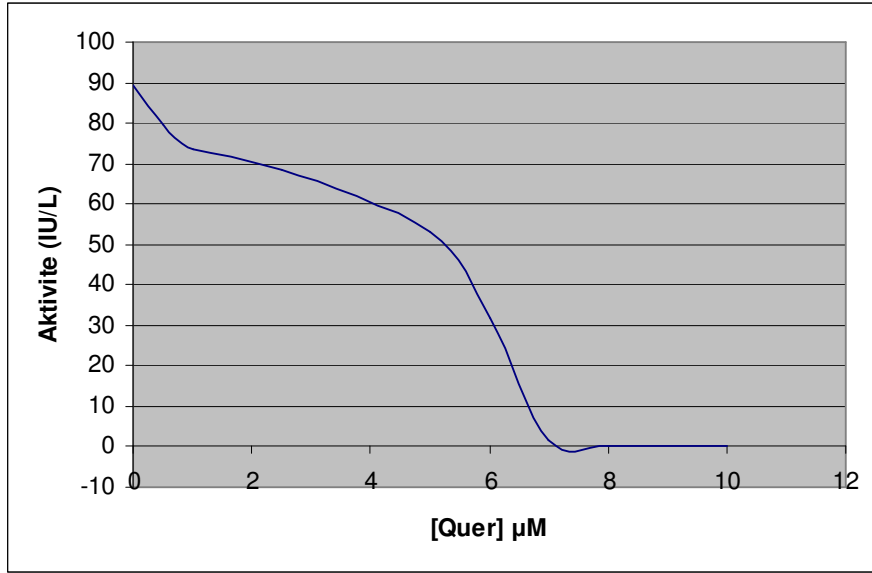
Tablo 6: Değışen Adenzin konsantrasyonuna bağılı olarak ADA aktivitesi

[Ade] μM	Aktivite (IU/L)
0	0
20	7,4
40	20,2
50	30,8
100	43,4
200	61,5
400	77,6
600	83,6
800	88,1
1000	89,4



Grafik 1: Adenzin substratına karşılık ADA aktivitesi MM grafiğı

Daha sonra ADA aktivitesi üzerine olası inhibitör/aktivatör özelliğini belirlemek için 10 mM'lık stok Quercetin çözeltisinden 1,2,3,4,5,6,8 ve 10 μ M'lık çözeltiler hazırlanarak sabit adenozin konsantrasyonunda çalışıldı. (Gr. 3).

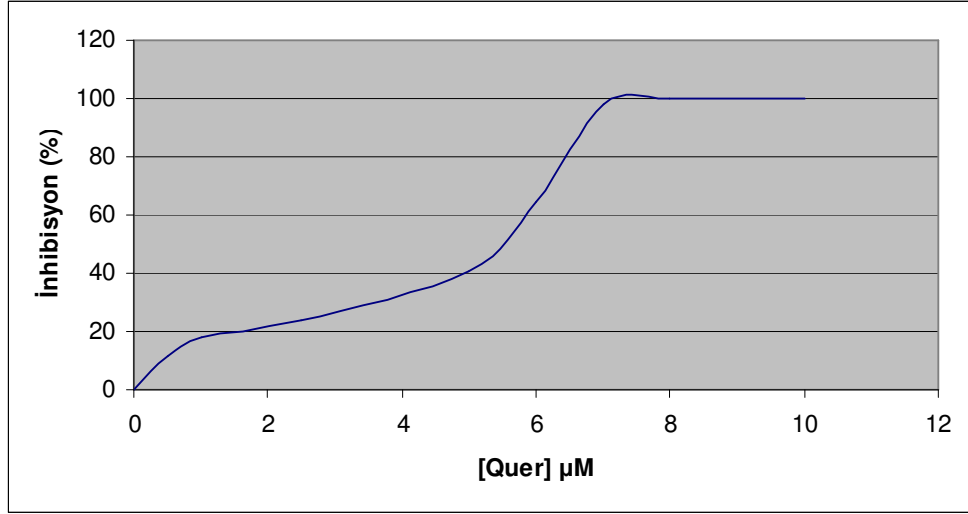


Grafik 2: Değişik konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

Grafik 3'te ise değişik konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri görülmektedir.

Tablo 7: Farklı konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri

[Quer] μ M	İnhibisyon (%)
0.0	0.0
0,5	11,3
1.0	18.0
2,5	23,7
5.0	40,6
6.0	64,5
7.0	98,3
8.0	100.0
10.0	100.0

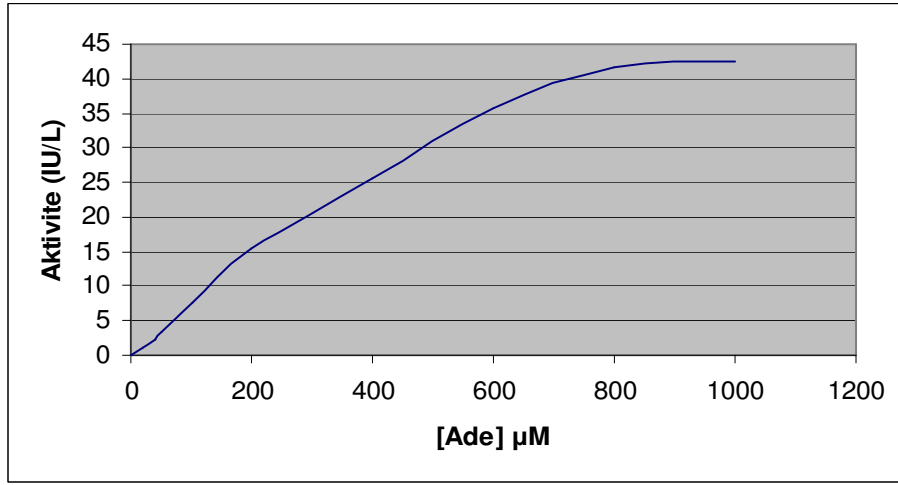


Grafik 3: Değişik konsantrasyonlardaki Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu için 6 µM'lık Quercetin konsantrasyonu denendi.

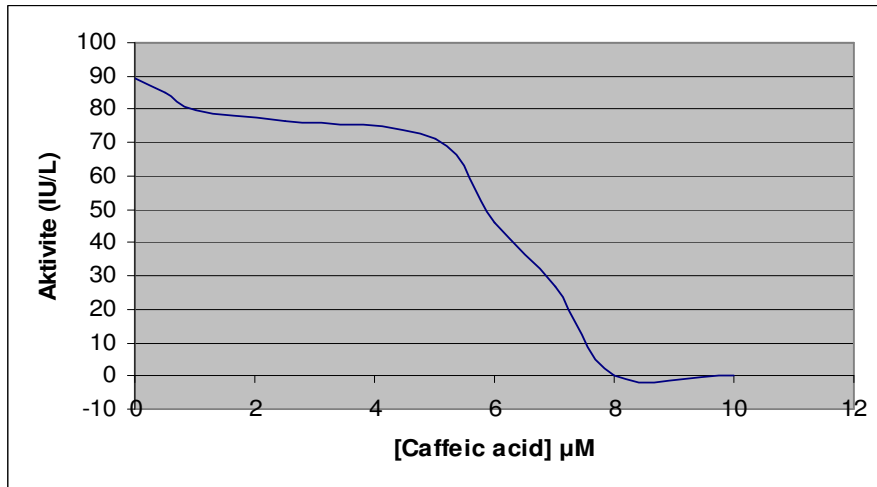
Tablo 8: Değişen Adenozin konsantrasyonuna bağlı olarak 6 µM'lık Quercetin'in ADA aktivitesi üzerine etkisi

[Ade]µM	Aktivite (IU/L)
0	0
20	1,1
40	2,3
50	3,4
100	7,6
200	15,4
400	25,6
600	35,6
800	41,5
1000	42,6



Grafik 4: 6 μM 'lık Quercetin'in değişen adenosin substratına karşılık MM grafiği

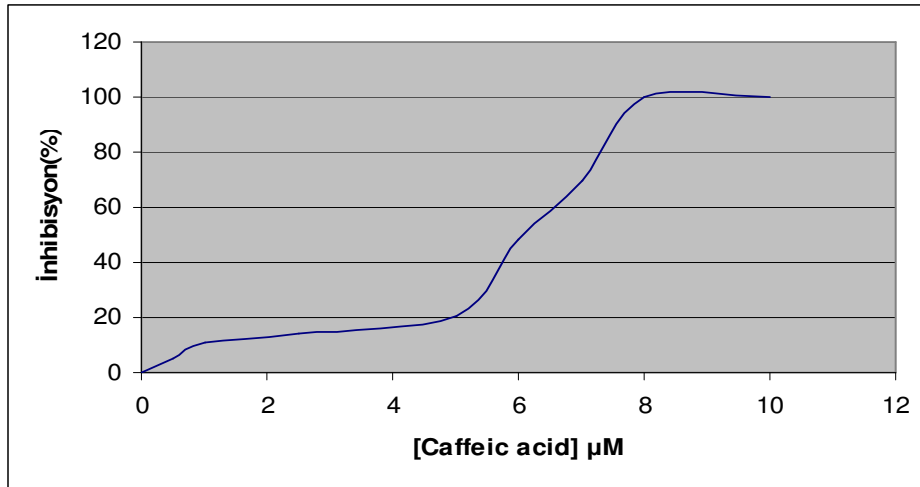
Çalışmamızın bu kısmında ise ADA aktivitesi üzerine olası inhibitör/aktivatör özelliğini belirlemek amacıyla 10 mM'lık stok Caffeic acid çözeltisinden 1,2,3,4,5,6,8 ve 10 μM 'lık çözeltiler hazırlanarak sabit adenosin konsantrasyonunda çalışıldı. Bu çalışmaya ait grafik aşağıda görölmektedir.



Grafik 5: Değişik konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

Tablo 9: Farklı konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri

[Caffeic A] μ M	İnhibisyon (%)
0	0
0,5	5
1	10,8
2,5	14,3
5	20,7
6	48,4
7	69,8
8	99,9
10	100

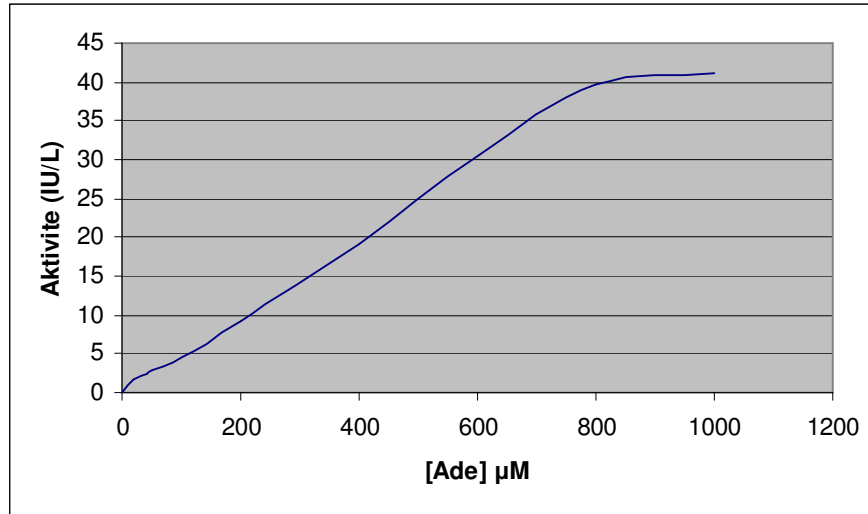


Grafik 6: Değişik konsantrasyonlardaki Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri

Çalışmanın diğer basamağında ADA inhibisyonu için 6 μ M'lık Caffeic acid konsantrasyonu denendi.

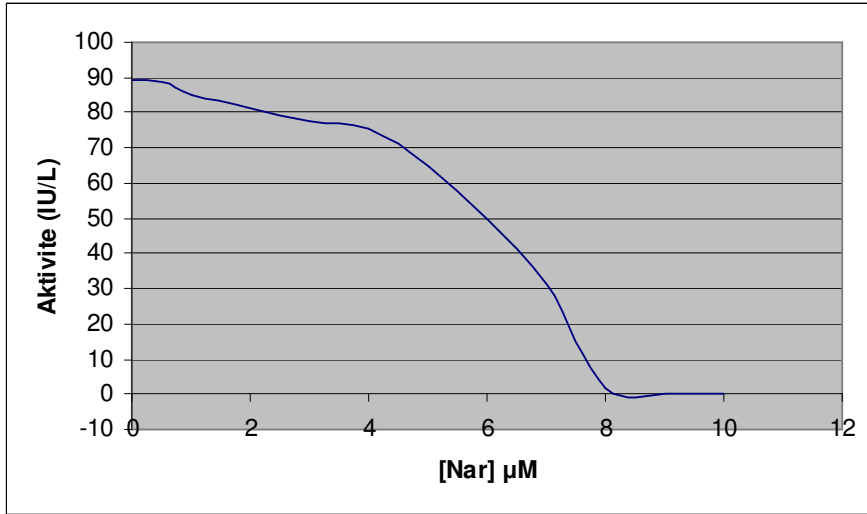
Tablo 10: Değişen Adenozin konsantrasyonuna bağlı olarak 6 μ M'lık Caffeic acid'in ADA aktivitesi üzerine etkisi

[Ade] μ M	Aktivite(IU/L)
0	0
20	1,7
40	2,3
50	3
100	4,6
200	9,2
400	19
600	30,4
800	39,7
1000	41,2



Grafik 7: 6 μ M'lık Caffeic acid'in değişen adenozin substratına karşılık MM grafiği

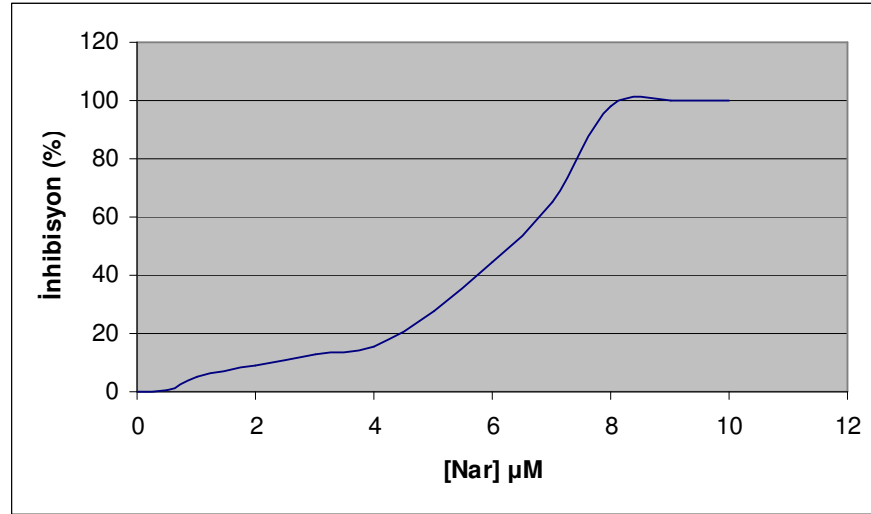
Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine olası inhibitör/aktivatör özelliğini belirlemek için de 10 mM'lık stok Caffeic acid çözeltisinden 1,2,3,4,5,6,8 ve 10 μ M'lık çözeltiler hazırlanarak sabit adenozin konsantrasyonunda çalışıldı. Bu çalışmaya ait grafik aşağıda görülmektedir.(Gr. 8)



Grafik 8: Değişik konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

Tablo 11: Farklı konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değerleri

[Nar]µM	İnhibisyon (%)
0	0
0,5	0,6
1	4,9
2,5	9
5	27,6
6	44,6
7	65
8	97,9
10	100

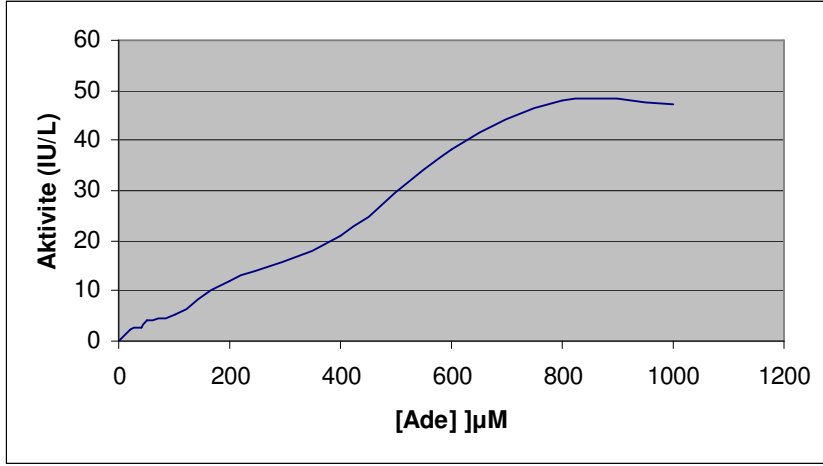


Grafik 9: Değişik konsantrasyonlardaki Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisinin (%) inhibisyon değeri

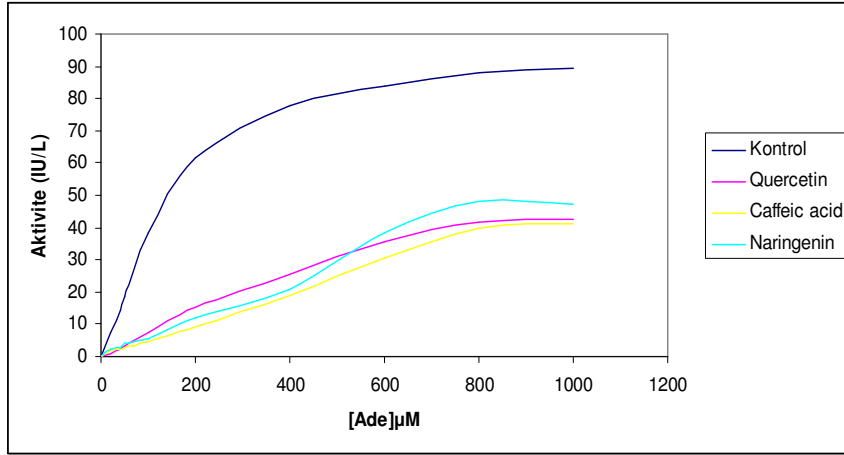
Bu çalışmadan ADA inhibisyonu için 7 μM 'lık Naringenin konsantrasyonu denendi.

Tablo 12: Değişen Adenozin konsantrasyonuna bağlı olarak 7 μM 'lık Naringenin'in ADA aktivitesi üzerine etkisi

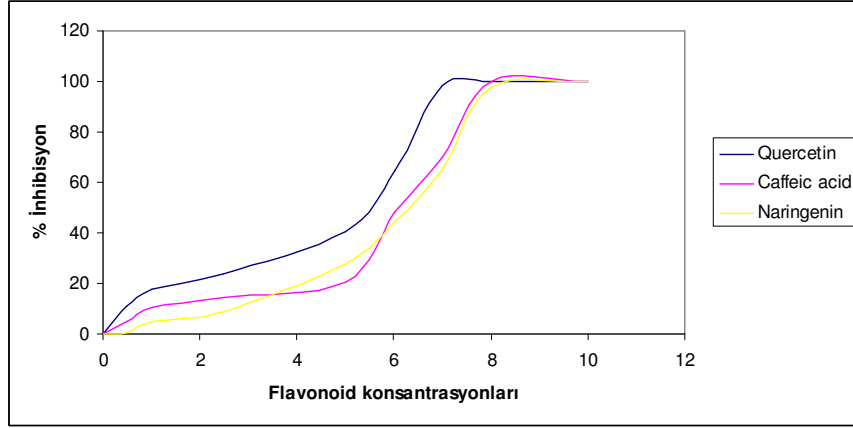
[Ade] μM	Aktivite (IU/L)
0	0
20	2,3
40	2,6
50	4,3
100	5,4
200	12
400	21
600	38,3
800	48,1
1000	47,4



Grafik 10: 7 μM'lık Naringenin'in değişen adenozin substratına karşılık MM grafiği

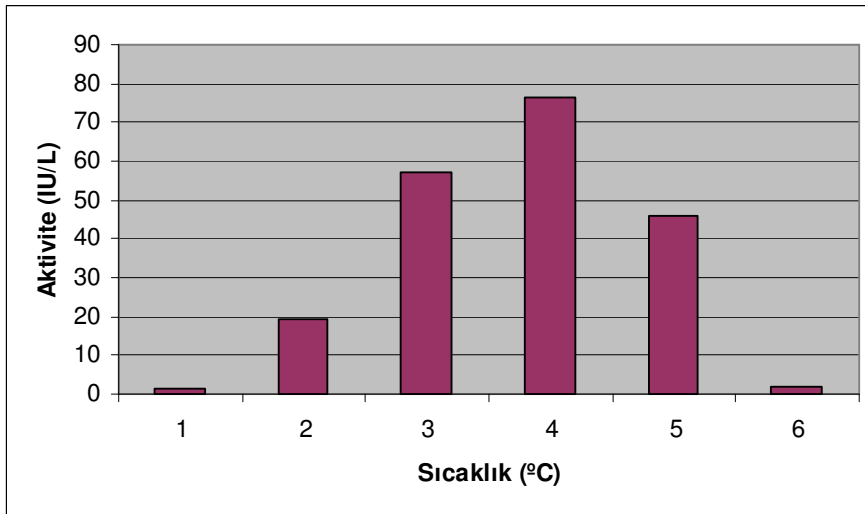


Grafik 11 : Değişen Adenozin konsantrasyonlarına karşılık Adenozin Deaminaz enziminin, Quercetin'in, Caffeic acid'in ve Naringenin'in karşılaştırmalı MM grafiği

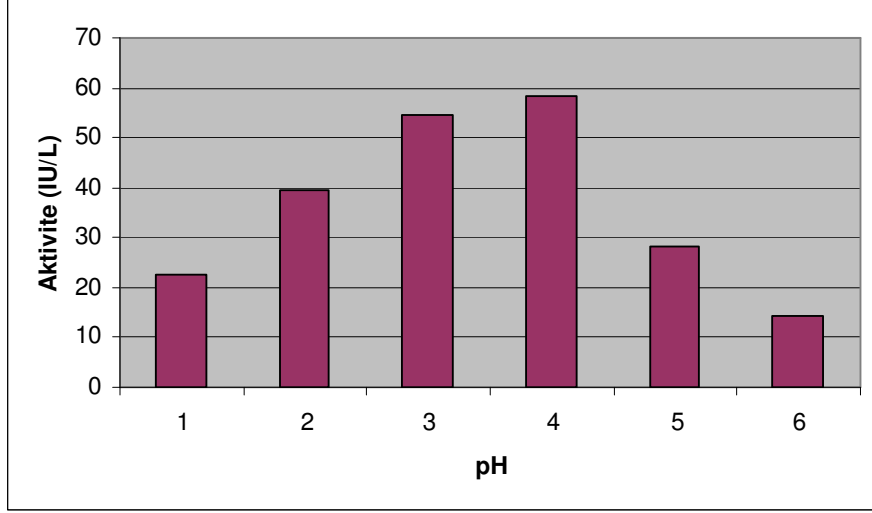


Grafik 12 : Değişen Flavonoid konsantrasyonlarına (µM) karşılık Quercetin'in, Caffeic acid'in ve Naringenin'in % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı grafiği

Çalışmamızın bir diğer bölümünde de sıcaklık ve pH'ın ADA aktivitesi üzerine etkisini araştırdık. Grafik 11' de 1 numaralı sütun 4 °C ' yi, 2 numaralı sütun 10 °C' yi, 3 numaralı sütun 25 °C'yi, 4 numaralı sütun 37 °C' yi , 5 numaralı sütun 50°C' yi, 6 numaralı sütun 65 °C' yi göstermektedir. Adenozin deaminaz için optimal sıcaklık 35-50 °C olarak belirlendi.

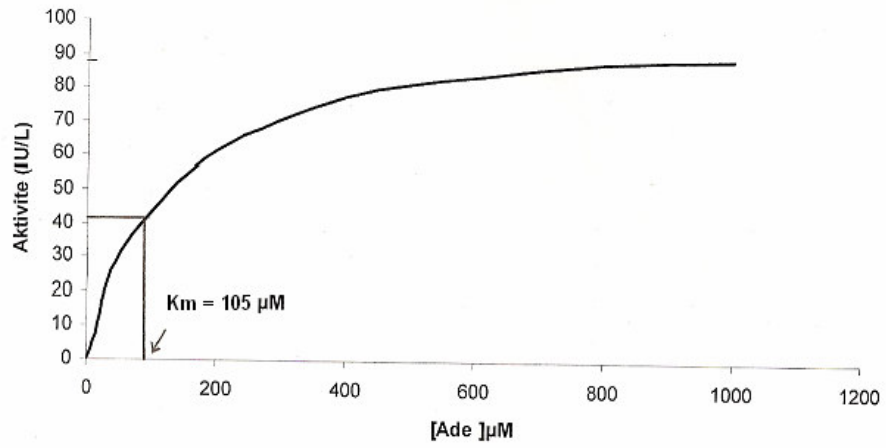


Grafik 13: Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri

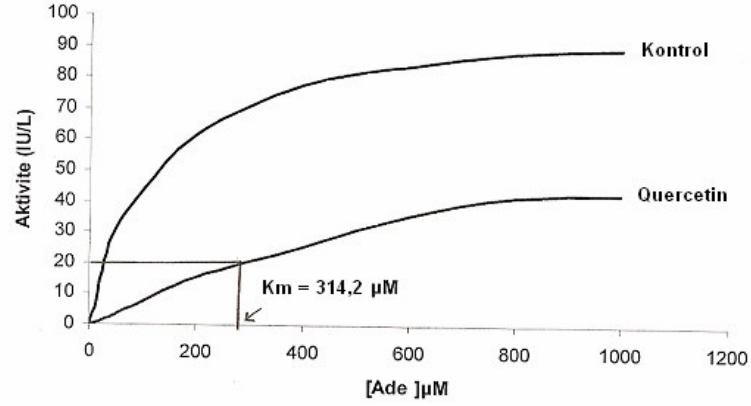


Grafik 14: pH değışikliğinin ADA aktivitesine tesiri

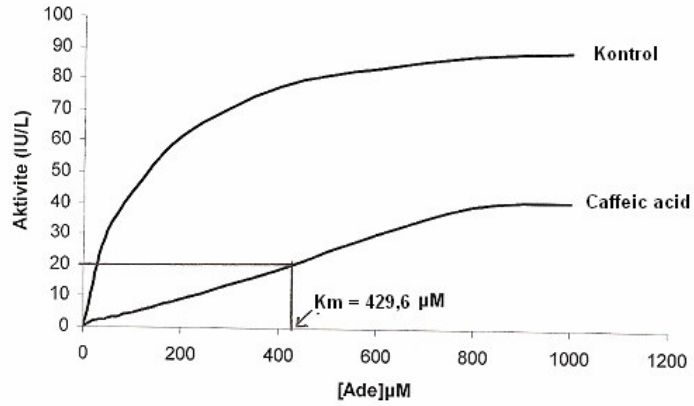
Grafik 12’ de 1 numaralı sütun pH 4 ‘ü, 2 numaralı sütun pH 6 ‘yı, 3 numaralı sütun pH 6,5 ‘i, 4 numaralı sütun pH 7,4 ‘ü, 5 numaralı sütun pH 8 ‘i, 6 numaralı sütun pH 10 ‘u göstermektedir. Adenozin deaminaz için optimal pH 6.0 - 7.4 olarak saptandı.



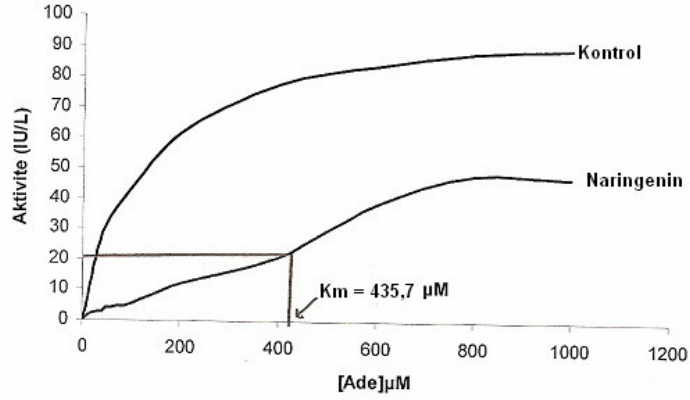
Grafik 15: Adenozin substratına karşılık ADA aktivitesi MM grafiğı



Grafik 16: Quercetin'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi



Grafik 17: Caffeic acid'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi



Grafik 18: Naringenin'in Adenozin deaminaz aktivitesi üzerine etkisinin MM grafiği ile değerlendirilmesi

ADA aktivitesi ile ilgili olarak çizilen Michaelis-Menten grafiğinden adenozin substratı için pH=6.5 ve 37°C'de $K_m = 105 \mu M$ olarak bulundu.

Materyal ve metot kısmında anlatıldığı şekilde değişik konsantrasyonlarda Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin çözeltileri hazırlanarak önce en uygun etkinin yapıldığı konsantrasyon aralığı belirlendi. Bu aralık 1,2,3,4,5,6,8 ve 10 μM olarak saptandı. Grafik 3' te Quercetin'in miktarı arttıkça ADA aktivitesinin düştüğü gözlemlendi. ADA aktivitesini %50 inhibe eden Quercetin konsantrasyonu 6,1 μM olarak belirlendi. Grafik 6'da da Caffeic acid miktarı arttıkça ADA aktivitesinin düştüğü görüldü. ADA aktivitesini %50 inhibe eden Caffeic acid konsantrasyonu 6,06 μM olarak belirlendi. Grafik 9'da Naringenin miktarı arttıkça ADA aktivitesinin de düştüğü görüldü. ADA aktivitesini %50 inhibe eden Naringenin konsantrasyonu 6,15 μM olarak belirlendi.

Deneyimizin ikinci kısmında inhibisyon tipini belirlemek için Quercetin ve Caffeic acid'den 6 μM , Naringenin'inden ise 7 μM kullanarak değişen adenosin konsantrasyonlarında aktivite tayini yapılarak Michaelis-Menten (MM) grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak V_m ve K_m değerleri belirlendi. Quercetin için K_m değeri 314,2 μM , Caffeic acid için 429,6 μM ve Naringenin için de 435,7 μM olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, insan vücudunda yaygın olarak bulunan ve klinik açıdan önemli olan Adenozin deaminazın aktivitesi üzerine Quercetin, Naringenin ve Caffeic acid'in olası etkileri ile optimum pH ve sıcaklık aralığını araştırıldı.

Literatür bilgilerine bakıldığında, Adenozin deaminazın kinetik özellikleri üzerine yapılan bir çok çalışma mevcuttur ancak bu çalışmalardan flavonoidlerle ilgili olanları sınırlı sayıdadır. Enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsü olan K_m değeri de bu kinetik özelliklerden birisidir.

Meykens ve Williams yaptığı çalışmada, adenozin için eritrosit ADA enziminin K_m değerini 40 mM olarak bulmuştur.¹²⁴ Agarwal ve arkadaşları, bu değeri 25 mM olarak saptamışlardır.⁶³ Erel ise yaptığı bir çalışmada, serum ADA enziminin adenozin için K_m değerini 1.4 mM olarak bildirmiştir.¹⁵¹

Seegmiller'in 1985'de yaptığı çalışmada ADA enziminin 2'-deoksiadenozine afinitesinin adenozine göre daha fazla olduğunu saptamıştır.⁹⁷ Sato ve Alkawa, sığır intestinal ADA enziminin 2'-deoksiadenozin için K_m değerini 50 mM olarak bildirmiştir.⁵⁷

Durak ve arkadaşları, prostat kanserli hastalardan alınan prostat dokusunda domates suyunun ADA aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Farklı konsantrasyonlardaki domates suyunun (25 µl, 50 µl, 100 µl) ADA'yı önemli derecede inhibe ettiğini belirlemişlerdir.¹²⁵

Melzig 1995'te yaptığı bir çalışmada, endotelial hücre ADA enziminin quercetin, myricetin ve kaempferol gibi flavonollerle

önemli derecede inhibe olduğunu saptamıştır. IC₅₀ değerini 32 µmol/L olarak bulmuştur.¹¹⁹

Durak ve arkadaşları, prostat kanserli hastalardan alınan prostat dokusunda *Urtica dioica* bitkisinin sulu ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Adenozin deaminaz enzimini inhibe ettiğini saptamışlardır.¹³²

Literatür bilgileri incelendiğinde, ADA klinik açıdan önemli olduğundan çalışmalar doku, serum ve plazma üzerine yoğunlaşmıştır. Adenozin deaminaz (ADA), pürin yıkım yolunda adenozin ve 2'-deoksiadenozinin sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüşümünü katalize eden bir enzim olduğundan adenozinin hücre içi konsantrasyonun kontrol edilmesinde önemlidir.^{20,21}

ADA'nın aktivitesi baskılandığı takdirde hücrede bu durumun ciddi metabolik sonucu gözlenmektedir. ADA'nın inhibisyonu sonucundan dATP birikir ve yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkiler gösterir. dATP hücrenin büyümesi için gerekli olan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun klinik açıdan önemi ise kombine immün sistem yetmezliğinin ortaya çıkmasıdır.^{45,46}

T hücre aktivasyonunun rol oynadığı düşünülen birçok dermatolojik ve sistemik hastalıkta ADA'nın önemini göstermeye yönelik birçok çalışma vardır. Stancíková ve arkadaşları yaptığı çalışmada SLE'li hastalarda serum ADA aktivitesinin, SLE hastalık aktivitesine eşlik ettiğini ve SLE için yeni bir hastalık aktivite parametresi olarak olabileceğini göstermişlerdir.¹⁴⁵

Malign ve benign pek çok hastalıkta ADA aktivitesini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. T hücrelerinin aktif olarak yer aldığı bir

çok hastalıkta ADA düzeyleri artmaktadır. Tüberküloz, tifoid ateş, enfeksiyöz mononükleoz, karaciğer hastalıkları, sarkoidoz, malignensi, akut lösemi, brusella, ailevi akdeniz ateşi, pnömoni, romatoid artrit, konjestif kalp yetmezliği, sistemik lupus eritematozus, psoriasis, Behçet hastalığı, layşmanya ve sıtma gibi serum ADA düzeyini yüksek olarak rapor eden çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.^{139,140,64,56,143,144}

Kayır ve Uzbay, adenzin uykunun başlatılması ve sürdürülmesi, genel uyarılmışlık halinin kontrolü ve enerji ihtiyacına göre serebral kan akımının düzenlenmesi gibi fizyolojik görevlerin yanı sıra iskemi ve hipoksi gibi patolojik koşullarda hücrenin korunmasına katkı sağladığını, ayrıca anksiyete, epilepsi, depresyon, şizofreni, Parkinson ve madde bağımlılığının da aralarında bulunduğu çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığını belirtmişlerdir.⁶⁷

Elgün ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada major depresyonlu hastalarda serum ADA aktivitesinin azaldığı tespit etmişlerdir.⁷⁴

Flavonoidler difenil propan türevleri olup yüksek oranda biyokimyasal ve farmakolojik etki gösterirler. Bunların başında antioksidan özellikleri, sitotoksik etkileri, protein kinazlar, topoizomazlar gibi enzimlerin inhibisyonu üzerine etkileri gelmektedir. Flavonoidlerin farklı enzimler üzerine olan inhibitör etkileri bunların diyet veya katkı maddesi olarak kullanımında artışlarına sebep olmuştur. Flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Bazı flavonoidlerin süper oksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını, lipid peroksit radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Flavonoidlerin kullanımının bir diğ er özelliği de nontoksik terapötik etki göstermeleridir. Faydalı etkilerinin yanı sıra, hem bakterilerde hem de memelilerde yapılan deneysel çalışmalarda genotoksik ve mutajenik etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. Bu  zellik muhtemelen bir kısım flavonoidlerin bakterilerde prooksidan olarak davranmasıyla ve serbest radikal üreterek, DNA hasarına sebep olmasıyla veya topoizomeras gibi DNA ile ilişkili enzimlerin inhibisyonuna sebep olmasıyla ilişkilendirilebilir. Yukarıda bahsettiğimiz ADA ile ilgili yapılan çalışmalarda inhibitör özellik gösteren maddelerin konsantrasyonlarının mM düzeyde olduğu g r lmektedir. mM gibi yüksek konsantrasyon hücre içi toksik etki gösterebilir.

Biz  alışmamızda, Quercetin için IC_{50} değerini 6,1 μM , Caffeic acid için 6,06 μM , Naringenin için 6,15 μM olarak bulurken, bir enzimin substratına olan ilgisini gösteren K_m değerini Quercetin için 314,2 μM , Caffeic acid için 429,6 μM ve Naringenin için 435,7 μM olarak bulduk. Bu verilerden yararlanarak çalışmamızda kullandığımız bileşiklerin inhibisyon tiplerini belirledik. Grafiklerden de görüleceği üzere Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin'in ADA'yı karışık tipte inhibe ettiği g r lmektedir. Hem IC_{50} değerlerinden hem de K_i değerlerine bakıldığında en etkili inhibisyonu Quercetin'in yaptığı g r lmektedir.

Karışık tip inhibisyonda, inhibitör enzime aktif merkez dışında bir yerden bağlanır. Bir kısım enzim molekülü normal substratla birleşir ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Bir kısım enzim ise inhibitör ile birleşir ve enzim-inhibitör kompleksi oluşturur. Enzim molekülünün geriye kalan kısmı ise hem substrat hem de inhibitör ile etkileşerek enzim-substrat-inhibitör kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks, enzimin büyük bir kısmını bloke eder ve ilgili tepkimeyi yavaşlatır.

Flavonoidlerin ADA inhibisyonunu, sahip oldukları farmakolojik özellikleri sebebiyle Adenozin reseptörlerini artırarak

gerçekleřtirdiđi dűřűnűlmektedir. Bizim yaptđđımız çalıřmada, flavonoidlerin çift role sahip olmaları gűz űnűnde bulundurulursa (antimutajen/promutajen ve antioksidan/prooksidan) dűřűk konsantrasyonlarda inhibisyon etki gűstermeleri, doza bađlı zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması açısından olumlu bir etki olduđu kanısındađız.

6. ÖZET

Bu çalışmada, Adenozin deaminaz Sigma firmasından temin edildi ve fizikokimyasal ve kinetik özellikleri araştırıldı. Michaelis-Menten grafik ve eşitliği kullanılarak adenozin substratına karşılık enzimin Km değeri 105 μ M olarak bulundu. Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin gibi birkaç flavonoidin, sıcaklık ve pH'ın enzim üzerine etkisi araştırıldı. Quercetin, Caffeic acid ve Naringenin'in için inhibisyon tipinin karışık tipte olduğu saptandı. Optimal pH ve sıcaklık aralığı ise sırasıyla 6.0-7.4 ve 35 - 50 °C olarak belirlendi.

Sonuçlar, flavonoidlerin ADA aktivitesinin güçlü bir inhibitörü olabileceğini ve sahip oldukları farmakolojik özellikleri ile bu inhibisyonu gerçekleştirebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Adenozin Deaminaz, Flavonoidler, Quercetin, Caffeic acid, Naringenin, İnhibisyon

7. SUMMARY

In this study, Adenosine Deaminase purchased from sigma and its physicochemical and kinetic properties were established. K_m value of the enzyme against adenosine substrate was found to be 105 μM by using Michaelis-Menten equation and graphic. Then, the effects of several flavonoids such as Quercetin, Caffeic acid, Naringenin and some factors like temperature and pH on the enzyme kinetics were observed. It has been found that, Quercetin, Caffeic acid and Naringenin influence of mixed type inhibitors of the enzyme. The ranges for optimal pH and temperature were 6.0 - 7.4 and 35 - 50°C, respectively.

The differential inhibitory effects of flavonoids can seem structurally related. The results demonstrated that structurally selected flavonoids are strong inhibitors of ADA activity that can be correlated to their pharmacological acts.

Key Words: Adenosine deaminase, Flavonoids, Quercetin, Naringenin, Caffeic acid, Inhibition

8. KAYNAKLAR

1. Grever MR, Coleman MS, Balcerzak SP, et al. Adenosine Deaminase and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Biochemical Markers in the Management of Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Research* 1983; 43: 1442-1445.
2. Ho AD, Ganeshaguru K. Enzymes of purine metabolism in lymphoid neoplasm clinical relevance for treatment with enzyme inhibitors. *Klin Wochenscher* 1988;66: 467-474.
3. Ho AD, Dörken B. Purine Degradative Enzymes and Immunological Phenotypes in Chronic B- Lymphocytic Leukemia, Indication that Leukemic Immunocytoma is a Separate Entity. *British Journal Of Haematology* 1986; 62: 545-555.
4. Trangas T, Courtis N, Gounaris A. Patterns of Adenosine Deaminase, Ecto-5'- Nucleotidase, Poly (A) Polymerase and Surface Light Chain Expression in Chronic Lymphocytic Leukemias. *Blut* 1989; 58: 187- 193.
5. Tritsch GI, Niswander PW. Purine Catabolism as a Source of Superoxide in Macrophage. *Annals Newyork Akademy of Science* 1985;451: 279-291.
6. Vivekanandhan S, Soundararajan C C, Tripathi M, Maheshwari MC. Adenosine Deaminase and 5' Nucleotidase Activities in Peripheral Blood T Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neurochemical Research* 2005; 30: 453 –456.
7. Balis ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 45: 142- 149.
8. Dornand J, Bonnafous JC, Favero J, Ecto 5'- nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities of Lymphoid Cells. *Biochemical Medicine* 1982; 28: 144-156.

- 9.** Whisler RL, Murray JL, Roach RW, Balcerzak SP . Characterization of multiple immune defects in human malignant lymphoma. *Cancer* 1984; 53: 2628-2634.
- 10.** Poplack DG, Blatt J, Reaman G. Purine Pathway Enzymes Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research* 1981; 41: 4821-4832.
- 11.** Ratech H, Martinuik F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. *Blood* 1988; 72 : 1627-1632.
- 12.** Vives JL, Rozman C, Pujades MA. Combined Assay Adenosine Deaminase, Purine Nucleoside Phosphorylase and Lactate Dehydrogenase in the Early Clinical Evaluation of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Journal of Hematology* 1988; 27: 157-162.
- 13.** YÜREGİR, G. : Temel biyokimya 1. 3. Baskı, Çukurova Üniv. Tıp Fak. Yayınları, Adana, 1988; 152-153.
- 14.** Gözükkara, E. : Biyokimya 2. 2. Baskı, Evin Matbaası, Malatya, 1994; 665-666.
- 15.** Goldberg, DM. : Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice. *Brit Med J.* 1995 1 : 353-355
- 16.** SOLOMON, JB. : Constitutive Enzymes of the; Developing Chick Embryo: Adenosine Deaminase. *Biochem J.* 1959 75 : 278-284.
- 17.** AGARWAL, RP., SAGAR, SM., PARKS, RE. : Adenosine Deaminase from Human Erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 1975; 24: 693-701.
- 18.** Daddona, P.E., Orkin, S.H., Shewach, D.S and Kelley, W.N.: cDNA and Aminoacid Sequence of Human Adenosine Deaminase. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1985; 451:238-244.
- 19.** Wilson, D.K., Rudolph, F.B., Quirocho, F.A.: Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with Transition-State Analogue: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations. *Science.* 1991 252:1278-1284.

- 20.** Bloom GE. Leukocyte adenosine deaminase phenotypes in acute leukemia. *Cancer* 1972; 29: 1357-60.
- 21.** Koizumi H, Tomizawa K, Tanaka H, Kumakiri M, Ohkawara A. Clinical significance of serum adenosine deaminase activity in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol* 1993; 20: 394-399.
- 22.** Balis ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 45:142- 149.
- 23.** Ratech H, Martinuik F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. *Blood* 1988; 72 : 1627-1632.
- 24.** Rosi F, Carlucci E, Marinello E, Tabucchi A. Ecto-5'- Nucleotidase in B- Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:100-104.
- 25.** Schrader, WP., Stacy, AR. : Purification and Subunit Structure of Adenosine Deaminase from Human Kidney. *J Biol Chem.* 1977; 252 : 6409-6415.
- 26.** GIUSTI, G.: Adenosine Deaminase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, (2nd Ed.), Bergmeyer, HV. New York, Academic Pres, 1974; 1092-1099.
- 27.** Centelles, JJ. Franco, R. : Rapid Purification of Adenosine Deaminase from Rat Liver. *Biochem Soc. Trans.* 1987; 15: 884-885.
- 28.** Gökbulut, I. 2000. Çeşitli Göğüs Hastalıklarında Bronşial Lavaj Sıvısı ve Plazmada Ksantin Oksidaz ve Adenozin Deaminaz Aktiviteleri ile Nitrik Oksit ve Malondialdehit Seviyeleri. Yüksek Lisans Tezi, Malatya 475.
- 29.** Aoki, Y., Katoh, O., Nakanishi, Y., Kuroki, S., Yamada, H.: A Comparison Study of IFN γ , ADA, and CA 125 as Diagnostic Parameters in Tuberculous Pleuritis. *Respiratory Medicine* 1994; 88: 139-143.
- 30.** Baganha, M.F., Pego, A., Lima, M.A., Gaspar, E.V., Cordeiro, A.R: Serum and Pleural Ademosine Deaminase. *Chest* 97: 605-610, 1990.

- 31.** Banales, J.L., Pineda, P.R., Fitzgerald, J.M., Rubio, H., Selman, M., Salazar-Lezama, M.: Adenosine Deaminase in the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusions. *Chest*. 1991; 99:355-357.
- 32.** Fontan Bueso, J., Vereas Hernando, H., Garcia-Buela, J.P., Dominguez Juncal, L., Martin Egana, M.T., Montero Martinez, M.C. Diagnostic Value of Simultaneous Determination of Pleural Adenosine Deaminase and Pleural Lysozyme/Serum Lysozyme Ratio in Pleural Effusions. *Chest* 1998; 93(2): 303-307.
- 33.** Chiang, C-S., Chiang, C-D., Lin, J-W., Huang, P-L., Chu, J-J.: Neopterin, Soluble Interleukin-2 Receptor and Adenosine Deaminase Levels in Pleural Effusions. *Respiration* 1994; 61:150-154.
- 34.** Moriwaki, Y., Kohjiro, N., Itoh, M., Nakatsuji, Y., Okada, M., Ishihara, H., Tachibana, I., Kokubu, T.: Discrimination of Tuberculosis from Carcinomatous Pleural Effusion by Biochemical Markers: Adenosine Deaminase, Lysozyme, Fibronectin and Carcinoembryonic Antigen. *Japan J. Med.* 1989; 28;4: 478-484.
- 35.** Ocana, I., Martinez-Vasquez, J., M., Segura, R.M., Fernandez-de-Sevilla T., Capdevila, J.A.: Adenosine Deaminase in Pleural Fluids. *Chest*. 1983; 84: 51-53.
- 36.** Orphanidou, D., Gaga, M., Rasidakis, A., Dimakou, K., Toumbis, M., Latsi, P., Pandalos, J., Christacopoulou, J., Jordanoglou, J.: Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1 and Adenosine Deaminase in Tuberculous Pleural Effusion. *Respiratory Medicine* 90: 95-98, 1996.
- 37.** Dolezal T. Adenosine deaminase review of physiological roles 2001. Available from: URL: <http://www.entu.cas.cz/fyziol/seminars/ada.htm>
- 38.** VAN DER WEYDEN, MB., KELLEY, WN. : Human Adenosine Deaminase, *J Biol Chem*. 1976; 251 : 5448 – 5456.
- 39.** STARKEY, JT., MA, C., MA, PF. : A Study of Adenosine Deaminase and its Conversion Factor in Human Serum. *Adv Exp Med Biol*. 1989; 253 : 65-69.

40. Seegmiller, JE. : Overview of Possible Relation of Defects in Purine Metabolism to Immune Deficiency. Ann NY Acad. Sci. 1985; 451: 10-19
41. Ciliv, G., Emerk, K., Karan, A.: İnsan Biyokimyasına Giriş. 2. Baskı, Hacettepe Üniv. Yayınları, Ankara 1980; 266-267.
42. Kellems, RE., Yeung, CY., Ingolia, DE.: Adenosine Deaminase Deficiency and Severe Combined Immunodeficiencies. Trends Genet. 1985;1:278-283.
43. Meykens, FL., Williams, HE. : Adenosine Metabolism in Human Erythrocytes. Biochem. Biophys. Acta. 1971; 240: 170-179.1971.
44. Franco, R., Aran, JM., Colomer, D., Matutes, E., Vivescorrons, JL. : Association of Adenosine Deaminase with Erythrocyte and Platelet Plasma Membrane : An Immunological Study Using Light and Electron Microscopy. J Histochem Cytochem. 1990; 38 : 653-658.
45. KANE, BJ., KUHN, JG., ROUSH, MK.: Pentostatin: An Adenosine Deaminase Inhibitor for the Treatment of Hairy Cell Leukemia. Ann Pharmacother. 1992; 26: 939-947.
46. KORKMAZ, M., KOCABEY, Z.: Biyokimya İpuçları. Saray Tıp Kitabevi, İzmir, 1985; 34-35.
47. CARSON, DA., IIZASA, T., SETO, S., CARRERA, CJ., KUBOTA, M., WILLIS, EH., WASSON, DB., KAJANDER, O.: Metabolic Basis for Immune Dysfunction in Adenosine Deaminase Deficiency. Ann N Y Acad Sci. 1985; 451: 34-41.
48. Dikmen N, Özgüven T. Harper Biyokimya .25.Baskı. İstanbul: Nobel Kitapçılık: 2004; 375-401.
49. OTTAWAY, JH., APPS, DK.: Biochemistry. 4th Ed., Cambridge: Bailliere Tindal 1984; 57-59.
50. MATHEWS, CK., VAN HOLDE, KE.: Biochemistry. Redwood, Cummings Publishing Company. 1990; 742-778.
51. FAIRBANKS, VF., KLEE, GK: Biochemical Aspects of Hematology. In: Textbook of Clininal Chemistry, Tietz, NW., London, WB. Saunders Company, 1994, 1980-1981.

- 52.** ONAT, T.:Biyokimya. 2.Baskı, Saray Tıp Kitabevi: İzmir; 394-400. 1994.
- 53.** Ho DH, Pincus C, Carter CJ, Benjamin RS, Freireich EJ, Bodey GP. Distribution and inhibition of adenosine deaminase in tissues of man, rat, and mouse. *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 629-633
- 54.** Harborne, J. B., and Mabry, T. J. (Eds.) *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall; London: 1982.
- 55.** Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H. (Eds.) *The Flavonoids*, Chapman and Hall: London; 1975.
- 56.** Köse K, Utaş S, Yazici C, Akdaş A, Keleştimur F. Effect of propylthiouracil on adenosine deaminase activity and thyroid function in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1121-6.
- 57.** Sato, Y., Aikawa, T., Adenosine Deaminase in the Adductor Muscle of the Scallop, *Patinopecten Yesscenis*. *Comp Biochem Phsiol.* 1991; 99: 221-232.
- 58.** Erel, Ö. : Adenozin Deaminaz (ADA) Enzimin Kinetik Özellikleri, Otomatik Analizör ile Aktivite Ölçümü, Tüberküloz ve Lepra Hastalarında Serum ADA aktivitesi ve Bazı Biyokimyasal Parametreler. Uzmanlık Tezi, Elazığ,1993
- 59.** Bors W. And Saran M., Free Radical. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Res. Commun.* 1987; 289-294.
- 60.** Bilaloğlu GV,Harmandar M.,Flavonoidler.İstanbul;Aktif Yayıncılık.6-10
- 61.** Broussalis AM., Ferraro GE., Gurni A. and Coussio JD. *Biochem. Syst. Ecol.* 1998 ; 16-401.
- 62.** Marco JA., Sanz JF., Bea JF. and Barbera O. *Pharmazie.* 1990; (45) 382.
- 63.** Agarwal, RP., Sagar SM., Parks, RE.: Adenosine Deaminase Human Erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 1975; 24 : 693-701

- 64.** Ungerer JP, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJ. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. Clin Chem 1992; 38:1322-6.
- 65.** Tanrisever N., Franczek FR., Fischer NH. and Williamson GB. Phytochemistry. 1987; 26-175.
- 66.** Egger K. and Tissut M. CR. Acad. Sci. 1968; 267-1329.
- 67.** Kayır,H. Uzbay, I.T. Santral Adenozinerjik Sistem ve Klinik Önemi. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 2004; 14(3):159.167
- 68.** Stancíková M, Lukác J, Istok R, Cristalli G, Rovensky J. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol. 1998;16:583-6.
- 69.** Özgen G, Yaşa H, Bektaş A, Beyler AR, Büyükkocak S, Canpolat O. Rektum kanserinde adenozin deaminaz aktiviteleri. T Klin J Med Sci 1998; 18: 369- 71.
- 70.** Wang CL., Zhang RY.,Han YS.,Dong XG. and Liu WB. Chemical studies of coumarins from Glycyrrhiza uralensis Fisch.Yao xue Xue bao. 1991; 26-147.
- 71.** Verma KS., Jain AK., Nagar A. and Gupto SR. Macrocarposide, a New Isoflavanone C-Glucoside from Pterocarpus macrocarpus Heart Wood. Planta Med. 1986; 52-315.
- 72.** Achenbach H., Stöcker, M. and Constenla, MA. Phytochemistry. 1988; 27-1835.
- 73.** de Pascual Teresa J., Gonzales MS., Muriel MR., Arocha AD. and Bellido IS. J. Nat. Prod. 1986; 49-177.
- 74.** Elgün, S. , Keskiner, A, Kumbasar, H. Dipeptidyl Peptidase 4 and Adenosine Deaminase Activity, Decrease Depression. Psychoneuroendocrinology, 1999; 24(8):823-32
- 75.** Mericli, A.H., Damdyan, B. and Cubukcu, B. Sci. Pharm. 1986; 54-363.

- 76.** Bohm BA., Fong G., Hiebert M., Jamal A. and Crins WS. *Phytochemistry*. 1992; 31-1261.
- 77.** Alataş F, Uslu S, Moral M, ve ark. Akciğer tüberkülozunda serum adenozin deaminaz aktivitesi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2003; 51: 277-81.
- 78.** Achenbach H., Stöcker M. and Constenla MA. *Phytochemistry*. 1988; 27-1835.
- 79.** Batirov E. Kh., Yusupova SS., Sattikulov, A., Vdovin AD., Malikov VM. and Yagudaev MR. *Chem.Not. Compds*. 1987; 22-107.
- 80.** Tripathi J. and Joshi, T. *Planta Med*. 1988; 54-371.
- 81.** Abe N., Sato H. and Sakamura S. *Agric. Biol. Chem*. 1987; 51-349.
- 82.** Sapko OA., Kuaeva RM. and Ryakhovskaya TV., *Khim. Prir. Soedin*. 1988 ; (6), 873.
- 83.** Bahaguna, R.,P. and Jangwan, J.S. *Fitoterapia*. 1987; 48-140.
- 84.** Chandra S. and Sastry MS. *Indian. J. Pharm.Sci*. 1988; 50-321.
- 85.** Barthe GA., Jourdan PS., McIntosh CA. and Mansell RL. *J.Plant Physiol*. 1987; 127- 55.
- 86.** Broussalis, AM, Ferraro GE., GurniA. and Coussio, JD. *Biochem. Syst. Ecol*. 1988; 16- 401.
- 87.** Ateş Y, Ergün H, Tüzün A ve ark. Ailesel akdeniz ateşi olan hastalarda lenfosit alt grupları ve serum adenozin deaminaz düzeyleri. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2005; 4: 112-6.
- 88.** Murray JL, Perez-Soler R, Bywaters D, Hers E. Decreased Adenosine Deaminase (ADA) and 5'Nucleotidase (5'NT) Activity in Peripheral Blood T Cells in Hodgkin Disease. *American Journal of Heamatology* 1986;21:57-66
- 89.** Weber G. Ordered Biochemical Program of Gene Expression in Cancer Cells. *Biochemistry* 2001; 66: 1164- 1173
- 90.** Iwaki-Egawa S, Namiki C., Watanabe Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Hokkaido College of Pharmacy*. 2003.

- 91.** Ruzsnyak S. and Szent-Gyorgy A. *Nature*. 1936; 138-27.
- 92.** Jeney E. and Uri; J. *Die Pharmazie* 1954; 9- 553.
- 93.** Ruş AF. and Kulikov AA. *Trudi Alt. S.* 1971; 23-32.
- 94.** Robbins RC. *J.clin.pharm.* 1973; 13-401.
- 95.** Xadjay YAI.), *Farmakol. İ, toksikol.* 1972; 7-46.
- 96.** Davidovic PM. and Klosterman GF. *Arch. Dermatol. Und Syshillis.* 1954; 199-10.
- 97.** Seegmiller JE. Overview of Possible Relation of Defects in Purine Metabolism to Immune Deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 451 : 10-19
- 98.** Borkowski B., Krug H. and Wrocinski *Biol. Inst. Rosl.* 1960; 6-18.
- 99.** Larson R.A. *Phytochemistry.* 1988; 27-969.
- 100.** Pratt DE. and Hudson BJF. In *Food Antioxidants*, Hudson, B.J.F., Ed.; Elsevier. 1990; London, 171.
- 101.** Wagner H., Elbi G., Lotter, H. and Guinea, N. *Pharm. Pharnacol.* 1991; 1-15.
- 102.** Hikino H. and Kiso Y., *Economic and Nedicinal Plant Research*, Ed. By Wagner, H., Hikino, H., and Farnsworth N.R., Academic Press, London, 1988; Vol.2, Chapter 39, 698.
- 103.** Moroney NA., Alcanaz MJ., Forder RA., Carey F., Hoult JRS. J. *Pharm. Pharmacol.* 1988; 40-787.
- 104.** Vlaskouska M., Drenska D., Ovcharov, R. *Probl. Vutr, Med.* 1990; 18-3.
- 105.** Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis.* 1983; 4(10):1301-5
- 106.** Huang M.T., Wood AW, Newmark H.L., Sayer J.M., Yagi H., Jerinha D.M., Conney A.H. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis.* 1983; 4-1631.

- 107.** Verma A.K.,Johnson J.A.,Gould M.N., Tanner MA. Cancer Res. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. 1988; 48-5754.
- 108.** Deschner E. E. Ruperto, J.,Wong, G.,Newmark HL., Carcinogenesis. 1991; 7-1193
- 109.** Tsujimoto Y., Hashizuma H. and Yamazaki M., Int. J. Biochem. 1993; 25-491.
- 110.** Yuting C., Rongliana Z., Zhongjian J. and Yong, J. Free Radical. Biol. Med. 1990; 9-19.
- 111.** Zhov Y.C. and Zheng R.L., Biochem.Pharmacol. 1991; 42-1177.
- 112.** Cottele N., Bernier JL., Henichart JP. Catteav, J.P., Gaydou, E. and Wallet, J.C. 1992; 13-211.
- 113.** Hanasaki Y., Oqawa S. and Fukui S. ,Free Radical Biol. Med. 1994; 16-845.
- 114.** Nune A. Andreasyan, Hripsime L. Hairapetyan, Yelizaveta G. Sargisova, Sona S. Mardanyan. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. H. Buniatian Institute of Biochemistry 2004.
- 115.** Javanovic S.V., Steenken S., Tosic M.,Marjonovic B. and Simic M.G., J. Am. Chem. Soc. .1994;116-4846
- 116.** Fraga C.G., Martino VS., Ferrero GE. Coussio JD. and Boveris A. Bioghem. Pharmacol. 1987; 36-717.
- 117.** Negre-Salvayre A., Alomar Y.,Troly M. and Salvayre R. Biochim. Biophys. Acta. 1991; 1096-291.
- 118.** Terao J.,Piskuli M. and Yao Q. Arch. Biochem. Biophys.1994; 308-278.
- 119.** Melzig MF. Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by selected Flavonoids. Planta Med. 1996; 20-21
- 120.** YagiA., Vemura T., OkamuraN., Haraguchi T., ImotoT. and Hashimota K. Phitochemistry. 1994; 35-885.
- 121.** Wardman P., J. Phys. Chem. Ref. Data. 1989; 18- 1637.

- 122.** Javanovic SV., Jankovic I. and Josimovic LJ. Am. Chem. Soc. 1992; 114-9018
- 123.** Pratt DE. and Hudson BJ.F. In Food Antioxidants; Hudson BJ.F., Ed.; Elsevier. 1990; London, 171.
- 124.** Meyskens FL, Williams HE. Adenosine metabolism in human erythrocytes. Biochim Biophys Acta. 1971; 240(2):170-9.
- 125.** Durak I, Biri H, Avcı A, Sözen S, Devrim E. Tomato juice inhibits adenosine deaminase activity in human prostate tissue from patient with prostate cancer. Nutrition Research 23 2003; 1183-1188
- 126.** Hertog MGL., Fesrens EJM., Hollman PCH., Katan MB. and Kromhout D. Lancet. 1993; 342-1007.
- 127.** Ruch RJ., Cheng SJ. and Klaunina JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis. 1989; 10-1003.
- 128.** Namiki M., Antioxidants/antimutagens in food. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 1990; 20-273.
- 129.** Renaud S., and De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet. 1992; 339-1523.
- 130.** Frankel EN., Kanner J., German JB., Parks E. and Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet, 1993; 341-454.
- 131.** Nune A. Andreasyan, Hripsime L. Hairapetyan, Yelizaveta G. Sargisova, Sona S. Mardanyan. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. H. Buniatian Institute of Biochemistry 2004.
- 132.** Durak I, Biri H, Devrim E, Sözen S, Avcı A. Aqueous Extract of Urtica Dioica Makes Significant Inhibition on Adenosine Deaminase Activity in Prostate Tissue from Patients. Cancer Biology & Therapy 2004; 3: 9,855-857
- 133.** Ogawa S., Hirayama T., Nohara M., Tokuda M., Hirai K. and Fukui S. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene

and benzo[alpha]pyrene in Salmonella typhimurium strains. Mutat. Res. 1985; 142(3):103-7

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Seçil

Soyadı: Şengören

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 02.08.1983

Eğitimi:

2002-2006: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1997-2001: Ankara Yahya Kemal Beyatlı Süper Lisesi

1994-1997: Demeteveler Ortaokulu

1989-1994: İsmail Erez İlköğretim Okulu

Yabancı dili: İngilizce

Bilimsel etkinlikleri:

01.07.2008-31.12.2008 Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında proje asistanı

10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya;

Tez çalışmalarımdaki değerli katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan CANBOLAT'a;

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU' na;

Yüksek Lisans eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Tez çalışmam süresince manevi desteğini esirgemeyen, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam eden değerli arkadaşım Elif YÜKSEL'e;

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bugünlere ulaşmamı sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.