ADENOZİN DEAMİNAZ ENZİMİNİN KİNETİK DAVRANIŞI ÜZERİNE ZERDEÇAL (CURCUMA LONGA) EKSTRESİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zahide Esra DURAK
Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyokimya, Maltepe-Ankara
zaesrad@hotmail.com

(Geliş/Received: 27.08.2013; Kabul/Accepted: 07.11.2013)

ÖZET

Bu çalışmada, kanser metabolizmasının kilit enzimlerinden biri olan adenozin deaminaz (ADA) sığır karaciğerinden izole edilerek kısmen saflaştırılmış, kinetik özellikleri incelenmiş ve enzimin kinetik davranışı üzerine zerdeçal ekstresinin etkileri araştırılmıştır. ADA enziminin inhibitörsüz şartlarda çizilen Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerinde V max değeri absorbans olarak 0,8 (spesifik aktivite olarak 40 mIU/g protein), Km değeri 100 mM olarak tespit edilmiştir. Zerdeçal ekstresinin iki farklı konsantrasyonunda çizilen Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafiklerinde ise her iki durum için Km değeri 100 mM olarak, V max değerleri ise % 10 zerdeçal konsantrasyonunda 0,5 (25 mIU/g protein), % 20 zerdeçal konsantrasyonunda ise 0,3 (15 mIU/g protein) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar zerdeçal bileşenlerinin ADA enzimini non-kompetetif türde inhibe ettiğini göstermektedir. ADA enziminin zerdeçal tarafından bu şekilde inhibisyonu, zerdeçalın anti kanser özelliklerine katkı sağlayan mekanizmalardan biri olabilir.

Anahtar Kelimeler: Adenozin Deaminaz, Zerdeçal (Curcuma Longa), Kanser, İnhibisyon, Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Kinetik,

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF AQUOEUS TURMERIC (CURCUMA LONGA) EXTRACT ON KINETIC BEHAVIOR OF ADENOSINE DEAMINASE ENZYME

ABSTRACT

In this study, adenosine deaminase enzyme which plays an important role in cancer metabolism was isolated and partly purificated from cattle liver, and its kinetic properties were established with and without turmeric extract. V max and Km values of ADA enzyme were found to be 0.80 absorbance unit (as specific activity 40 mIU/g protein) and 100 mM respectively by using Michaelis Menten and Lineweaver Burk graphs drawn in the studies without inhibitor. In the Michaelis Menten and Lineweaver Burk graphs drawn with two different concentrations of Curcuma Longa extract, Km value was found to be 100 mM at both concentrations. V max value was found to be 0.5 (25 mIU/g protein) at the 10 % turmeric concentration,but it was 0.3 (15 mIU/g protein) at 20 % turmeric concentration. These results show that turmeric constituents inhibit ADA enzyme non competetively. This kind of inhibition of ADA enzyme by turmeric extract might be one of the mechanisms contributed to anti cancer potency of curcuma longa.

Key Words: Adenosine Deaminase, Turmeric (Curcuma Longa), Cancer, Inhibition, Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Kinetic

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Kanser dünyadaki bütün insanlar için en büyük sağlık problemidir. Kemoterapi ve radyasyon terapisinin yan etkileri açıkça ortadadır. Bu terapiler bazı kanser türleri için başarılı sonuç vermemektedir. Bu yüzden bilim adamları uzun süredir doğal tedavi yöntemleri aramaktadır. Kırsal kesimlerde bazı kanser türlerinin

tedavisinde, çeşitli bitkilerin kullanıldığı ve olumlu sonuçların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bunun ardından bu konuda öncelikle bitkisel kaynaklı bileşikler değerlendirilmiştir. Aslında bitkilerin kanseri tedavi etmesi görüşünün uzun bir tarihi geçmişi vardır [1]. Zerdeçalın kanser önleyici ve tedavi edici özelliğinden dolayı yüzyıllar boyu geleneksel tedavide kullanılmıştır [2]. Bu bitkiden elde edilen ekstraklar kanserli hücrelerin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyebilmektedir [3,4,5]. Zerdeçal, güvenilirliğinin yanı sıra koruyucu ve tedavi edici özelliğiyle kanser tedavisinde ideal bitkisel ajanlardan biri olmuştur [6,7]. Zerdeçalla ilgili olarak yapılan çok sayıdaki çalışmaya rağmen zerdeçalin anti kanser mekanizması üzerinde aydınlatıcı bilgiye ihtiyaç vardır. Ana aktif bileşen olan diferulolmetanın yanı sıra, zerdeçalda antikanser mekanizmasına katkı sağladığı düşünülen başka bileşenlerin olduğu bilinmektedir. Temel aktif maddenin kurkumin olduğu düşünülmesine rağmen, kurkumin tek başına zerdeçal kadar etkili olamamaktadır [8]. Bu bakımdan zerdeçalın diğer bileşenlerinin de toplam biyolojik aktivite için önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak, etki mekanizması ve bunda rol oynayan yapısal bileşenler tam olarak ortaya konulmadığı için, konunun değişik açılardan araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda ele alınması gereken bir konu zerdeçal bileşenlerinin kanser metabolizmasında etkili olduğu bilinen bazı anahtar enzimler üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Bu enzimlerden biri adenozin deaminazdır. Adenozin deaminaz, hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzimdir. Hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve fosfo anhidrit bağını da içeren diğer bazı bağların hidrolotik olarak yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir.

Adenozin deaminaz, spesifik olarak adenozin ve bazı diğer nükleozit analoglarını substrat olarak kullanır. Hayvan dokularında yaygın olarak bulunur. En yüksek aktivite intestinal mukoza ve dalakta bulunur. Buna karşılık iskelet kasında, deride ve kemikte daha az miktarda olmak üzere aktivite vardır. Enzim büyük ölçüde hücrenin stoplazmik fraksiyonunda bulunmasına karşılık, kısmen nükleusta da mevcuttur [9].

Substrat spesifikliği, elde edildiği kaynaklara göre değişiklik gösterir. Aynı şekilde farklı organ ve dokulardan elde edilen enzim farklı optimal pH, elektroforotik mobilite ve substrat spesifikliği gösterir. Buna karşılık aynı organizmanın farklı dokularında aynı enzim mevcuttur [10]. Serumdaki ADA aktivitesinin malin tümörlerde, viral hepatitte ve sirozda arttığı görülmüştür. Özellikle günümüzde serum ADA aktivitesi, akciğer kanseriyle akciğer tüberkülozunun ayırıcı teşhisinde kullanılmaktadır. Akciğer kanserinde serumdaki ADA aktivitesi anlamlı derecede değişiklik göstermemesine rağmen, tüberkülozda anlamlı derecede yükselme görülmektedir [11,12].

1.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri (Chemical Structure and Species)

Adenozin deaminaz, sekiz β zinciri ve periferde sekiz α heliks içeren paralel bir αβ kompleksi içerir. Bu protein 1088 nükleotid tarafından şifrelendirilmektedir.Protein zinciri başlangıçtaki metiyonin hariç 362 aminosit içerir. N- terminal uçtaki aminoasit alanin, C- terminal uçtaki aminoasit ise lösindir [13].

ADA'nın atomik absorbsiyon spektroskopisine göre her enzim molekülü başına 0,9 ± 0,1 Zn atomu bağlar. Aktif merkezdeki Zn iyonu, His15 , His17 ve His214 ' ün N atomlarına, Asp295 ' in O atomuna ve hidroksipürin ribonükleozid ' in (HDRP) O atomuna koordine bağlarla bağlanmıştır [14].

1.2. Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar (Reactions of Adenosine Deaminase)

ADA, adenozin ve 2'- deoksiadenozini sırası ile inozin ve 2'-deoksiinozine yıkım yolunu katalize etmektedir. 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 düzenlenmesi açısından önemlidir [15,16].

$$\text{Adenozin (2' deoksiadenozin)} + H_2O \xrightarrow{\text{ADA}} \text{İnozin (2' deoksiinozin)} + NH_4^+$$

Konu ile ilgili olarak, zerdeçaldan elde edilen sulu ekstrenin kanser metabolizmasındaki anahtar enzimlerden biri olan ADA üzerine etkilerinin belirlenmesi ve varsa inhibisyonun tipi ve kinetik parametrelerinin ortaya konulması mekanizmanın aydınlatılması açısından yararlı olacaktır.

2. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHOD)

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = (OD_N - OD_{Kör})x20$$

Yapılan çalışmalarda adenozin enzimi sığır karaciğerden izole edilerek kısmen saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Zerdeçal ekstresinin adenozin enziminin kinetik davranışına karşı etkisi araştırıldı. Buz içerisinde muhafaza edilen sığır karaciğerden 5 g alınarak 10 ml serum fizyolojik (% 8,75 lik NaCl çözeltisi) içerisinde 3500 devirde 10 dakika homojenize edildi. Santrifüj sonucu dibe çöken kısım atıldı ve üst kısımdaki enzimleri barındıran kısım çalışmaların devamı için 9 ml olarak ayrıldı. Bu kısımdan yağları uzaklaştırmak

için homojenizatörde 15 ml koloroform-9 ml etanol karışımı ile muamele edildi ve 3500 devir/dakika hızda santrifüj edildi. Oluşan iki fazdan alttaki kısım kloroform fazı, üstteki kısım ise etanol-su fazı olarak ayrıldı. Proteinler etanol-su fazına geçerken, yağlar kloroform fazına geçerek uzaklaştırılmış oldu.

Adenozin enzim aktivitesi Giusseppe Giusti'nin tarif ettiği metodla yapılmıştır [19].

Enzim Aktivitesi (ADA Aktivitesi) =

$$\frac{[(\text{ODnumune} - \text{ODnumune körü})]}{[(\text{ODstandart} - \text{ODstandart körü})]} \text{ x } 50 \quad (1)$$

formülüne göre önce internasyonel ünite olarak (IU:µmol/min), sonra her bir numunenin protein miktarına (mg/mL) bölünerek spesifik aktivite cinsinden (IU/mg protein) verilmiştir.

2.1. Protein Miktarı Tayini (Determination of Protein Amount)

2.1.1. Lowry Yöntemi (Lowry Method):

Karaciğer dokusu homojenatının santrifüjünden sonra elde edilen süpernatanda, protein konsantrasyonlarının tayininde Lowry protein ölçüm yöntemi kullanıldı[18]. Spektrofotometrik bir ölçüm yöntemi olan bu deneyin prensibi; fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asitin, Cu^{+2} – protein kompleksi ile reaksiyonu sonrasında mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu tepkimenin gerçekleşmesinde, proteinlerin triptofan ve tirozin içeren bakiyeleri etkilidir. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı = optik dansitesi (OD), spektrofotometrede, 700 nm dalga boyunda ölçülür. Elde edilen sonuç, protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır [18].

2.2. Adenozin Deaminaz (ADA) Aktivitesi Ölçüm Metodu (Adenosine deaminase (ADA) Activity Assay Method)

ADA aktivite tayini Giussepp Giusti'nin tarif ettiği metoda göre yapılmıştır [19].

$$\text{Adenozin} + H_2O \xrightarrow{\text{ADA}} \text{Inozin} + NH_3$$

$$NH_3 + OCl^- + 2\ \text{Fenol} \xrightarrow{(OH^-)/Na_2[Fe(CN)_5NO]} \text{Indofenol}$$

Reaksiyonu gereği, ADA aktivitesinin ölçümü için substrat olarak adenozin (deoksiadenozin) kullanılır. ADA adenozinden 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 indofenol konsantrasyonu ile (absorbansıyla) doğru orantılıdır.

Sığır Karaciğer doku örneklerinde Adenozin aktivitesi ölçümü için; numune tüplerine 1ml adenozin çözeltisi ve 0,05ml supernatan, numune körü tüplerine de 1ml adenozin çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak 37˚C'de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numune tüplerine 3mL FNP çözeltisi ve 3ml alkali HOCl çözeltisi, numune körü tüplerine de 3ml FNP çözeltisi, 0,05ml homojenat ve 3ml alkali HOCl çözeltisi eklendi. Tüpler karıştırılıp 37˚C' de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numune ve körlerin absorbansı 628 nm'de distile suya karşı okundu. Absorbansın 1,00'in üstüne çıktığı durumlarda örnekler distile su ile 2-5 kat seyreltilerek deney tekrarlandı. 75 µM'lık $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi de aynı işleme tabii tutularak standart çözelti olarak değerlendirildi.

ADA aktivitesi formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = \frac{(A)N-(A)K}{(A)s-(A)SK} \text{ x } 50 \quad (2)$$

$(A)_N$: Numune Absorbansı
$(A)_K$: Numune Körü Absorbansı
$(A)_S$: Standart Absorbansı
$(A)_{SK}$:Standart Körünün Absorbansı
Sonuçlar Spesifik Aktivite (IU/mg Prot) cinsinden verilmiştir.

Zerdeçal ekstresiyle muamele sonrasında ADA aktivitesi değişimi;

1.Çalışma;
İlk çalışmadaki amaç kullanılacak ekstre miktarını belirlemektir.

Tablo 1. Ekstre miktarının ADA enzimi aktivitesi üzerine etkisi (The effect of turmeric extract amount on ADA activity)

	1	2	3	4
Süpernatan	1mL	1mL	1mL	1mL
Ekstre	-	0,2 mL	0,1mL	0,02mL
Su	0,2 mL	-	0,1mL	0,18mL

Karaciğer 30 min zerdeçal ekstresiyle inkübe edildi ve ADA aktivitesi tayin edildi.

2.Çalışma;
Tablo 2. Deney Yapılış Protokolü (Experiment Construction Protocol)

	1	2
Süpernatan	1mL	1mL
Su	0,2 mL	-
Ekstre	-	0,2 mL

Karaciğer 30 min zerdeçal ekstresiyle inkübe edildi. Değişik adenozin konsantrasyonlarında ADA aktivitesi tayin edildi.

Hesaplanan aktivite değerleri substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe çizilerek Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu. Daha sonra sonuçları kesinleştirmek için (1/Aktivite) 'ye karşı (1/Konsantrasyon) grafiği olan Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Her iki grafikten maximum hız (Vmax) ve Km (substratın enzime ilgisi) değerleri belirlendi [17].

3.BULGULAR VE TARTIŞMA (FINDINGS AND DISCUSSION)

Deneysel çalışmamızda elde edilen absorbans sonuçları protein değerleri için aşağıdaki formül kullanılarak g/mL olarak hesaplanmıştır.

Protein miktarı = $(A)_N$ - $(A)_K$ x 20
Bu çalışmada ADA aktivite değerleri absorbans olarak verilmiştir. Absorbans değerleri 50 ($faktör_1$) ile çarpıldığında IU/L olarak aktivite değerleri elde edilmektedir. Elde edilen bu değerler protein değerine (1000g/L) bölündüğünde ise spesifik aktivite (IU/g protein) değerleri elde edilmektedir.

V_{max} enzimin en yüksek hızda çalıştığı hızdır. K_m enzimin substrata ilgisini göstermekte olup, hızın hangi substrat konsantrasyonunda yarıya geldiğini ifade etmektedir. Enzim substratına ilgiliyse K_m değeri düşük olur, ilgisi azsa K_m değeri yüksek olacaktır [15].

3.1. Michaelis-Menten Grafikleri (Michaelis-Menten Graphs)

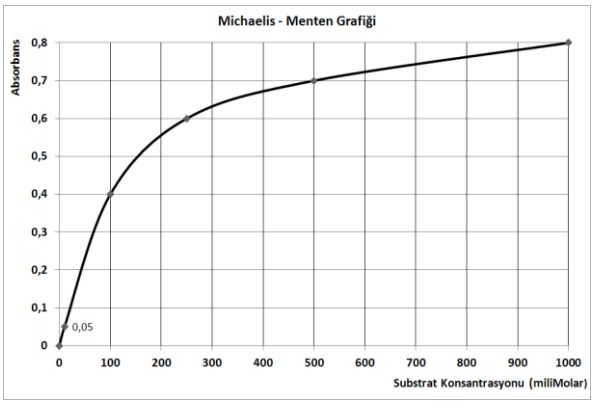
Zerdeçal ekstraktının ADA üzerine etkisi ile ilgili olarak elde edilen deneysel sonuçlar tablo 3 te verilmiştir.

I: ADA İnhibitörü Zerdeçal
S: Adenozin çözeltisi
I_1: % 10 zerdeçal katkısı
I_2: % 20 zerdeçal katkısı

Tablo 3. Substrat konsantrasyonun ADA üzerine etkileri (Michaelis Menten grafik değerleri) (Effect of substrat concentration on ADA enzyme)

[S]	ΔOD (I yok)	ΔOD_2 (I_1)	ΔOD_3 (I_2)
50 Mm	0,8	0,5	0,3
5 mM	0,8	0,5	0,3
1 mM	0,8	0,5	0,3
0,5 mM	0,7	0,4	0,2
0,25 mM	0,6	0,3	0,15
0,1mM	0,4	0,2	0,1
0,01mM	0,05	0,03	0,02

Grafik 0,01mM ile 1mM arasında çizilmiştir.



Şekil 1. İnhibitörsüz numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples without inhibitor)

Grafikten V_{max} değeri okundu. Bu değer ½ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık gelen K_m değeri okundu. Dolayısıyla V_{max}= 0,8, $V_{max}/2$ = 0,4 olmak üzere Şekil 1 den V_{max} değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri K_m= 100mM olarak kaydedilmektedir.

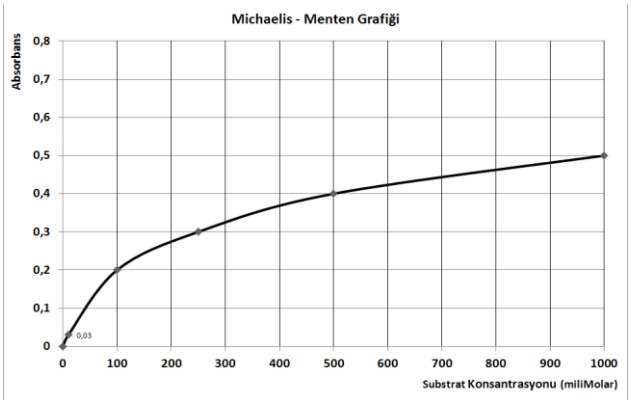
Michaelis-Menten eşitliği de kullanılabilir. Burada V; reaksiyon hızını, S; substrat konsantrasyonunu göstermektedir. Formül kullanılarak hesaplandığında da Km değeri 100 mM olarak bulunmaktadır.

$$V = V_{max} \times \frac{S}{Km+S} \qquad (3)$$

Örnek olarak; $V = 0,8 \times \frac{50}{(100+50)} = 0,26$

(3) eşitliğinden [S]= 50 mM konsantrasyonda, grafikten okunan V_{max}= 0,8 ve Km=100 mM değerlerinde V= 0,26 olarak hesaplanır.

İkinci olarak %10 zerdeçal katkılı numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 2 deki grafik oluşturuldu.



Şekil 2. Zerdeçal inhibitörlü numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with curcuma 10 %)

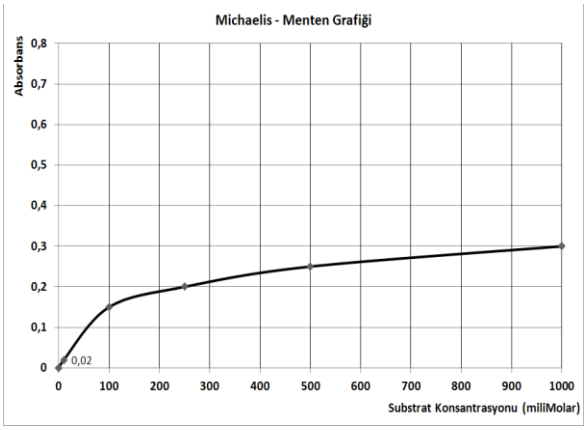
Grafikten V_{max} değeri okundu. Bu değer ½ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık gelen Km değeri okundu. Dolayısıyla V_{max} = 0,5, $V_{max}/2$ = 0,25 olmak üzere Şekil 1 den V_{max} değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri K_m= 100 mM olarak okunmuştur. Hesapla aşağıdaki şekilde yapıldığında Km değeri 100 mM olarak bulunmaktadır.

Denklem (3) eşitliğinden;

$$V= 0,5 \text{ x } \frac{50}{(100+50)} = 0,16$$

Örnek olarak; eşitlikten [S]= 50 mM konsantrasyonda, grafikten okunan V_{max}= 0,5 ve Km=100 mM değerlerinde V= 0,16 olarak hesaplanır.

Son olarak %20 zerdeçal katkılı numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 3 deki grafik oluşturuldu.



Şekil 3. %20 Zerdeçal inhibitörlü numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with curcuma 20%)

Grafikten Vmax değeri okundu. Bu değer ½ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık gelen Km değeri okundu. Vmax = 0,3; Vmax/ 2 = 0,15 ve Km= 100 mM (Vmax değerine karşılık gelen konsantrasyon) olarak okunmuştur. Bunun yanı sıra Michaelis-Menten hız eşitliğinde yerine konularak da değerler hesaplanabilir.

Denklem (3) eşitliğinden;

$$V= 0,3 \text{ x } \frac{50}{(100+50)} = 0,1$$

Eşitlikten [S]= 50 mM konsantrasyonda, grafikten okunan V_{max}= 0,3 ve Km=100 mM değerlerinde V= 0,1 olarak hesaplanır.

Michaelis Menten grafiklerinden görüldüğü gibi zerdeçal, ADA enziminin V_{max} değerini düşürmekte ancak K_m değerini değiştirmemektedir. Bu durum zerdeçalın oluşturduğu inhibisyonun Non-kompetetif tabiatlı olduğunu göstermektedir. Non-kompetetif inhibisyonda inhibitör özellikli bileşenler enzimin aktif merkezine yakın bir bölgeye bağlanarak aktif merkezin konformasyonunu değiştirmekte ve meydana gelen inhibisyon substrat konsantrasyonunun arttırılması ile ortadan kaldırılamamaktadır.

3.2. Lineweaver-Burk Grafikleri (Lineweaver-Burk Graphs)

Lineweaver-Burk eşitliğini elde etmek üzere aktivite değerleri substrat konsantrasyonuna bağlı olarak Tablo 4'te verilmiştir.

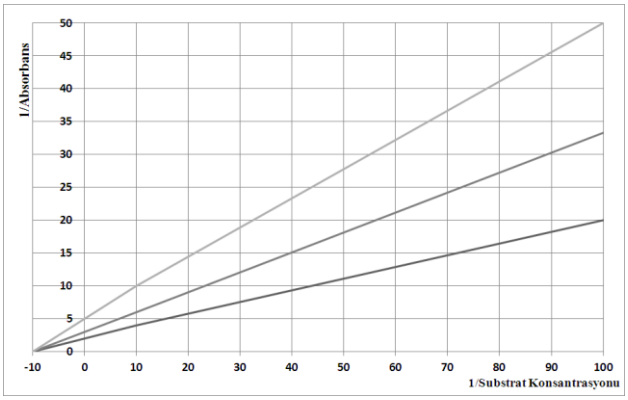
Tablo 4. Değişik zerdeçal konsantrasyonlarındaki aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi (Changing of substrate concentration depend on various concentration of turmeric activation value)

1/Substrat konsantrasyonu (1/mM)	1/Absorbans (inhibitörsüz)	1/Absorbans (I_1)	1/Absorbans (I_2)
0,02	1,25	2	3,33
0,2	1,25	2	3,33
1	1,25	2	3,33
2	1,43	2,5	5
5	1,67	3,3	6,67
10	2,5	5	10
100	20	33,3	50

Lineweaver-Burk eşitliğinde S; Substrat konsantrasyonunu, V; hızı, Vmax; Maksimum hızı göstermektedir.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vmax} x \frac{(Kmax+S)}{S} \quad (4)$$

Bu eşitliğin sabitleri inhibitörsüz ve %10 ve %20 konsantrasyonlarında zerdeçal inhibitörüyle olan durumlar için grafikler çizilmiş ve buradan hesap yapılarak Lineweaver-Burk eşitliği geliştirilmiştir.



Şekil 4. İnhibitörsüz ve inhibitörlü numuneler için Lineweaver - Burk grafikleri (Lineweaver-Burk graphs for without inhibitor and with inhibitor)

A= İnhibitörsüz
B= %10 İnhibitörlü
C=%20 İnhibitörlü

Şekil 4'teki grafikten;

y= 1/Absorbans değerleri
x = 1/ substrat değerleri olmak üzere;
y=ax+b ifadesi her bir deney için aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

İnhibitörsüz için: $y= 0,45 x + 5,5$ (5)
I_1 için: $y = 0,31 x + 2,5$ (6)
I_2 için: $y = 0,17 x + 8,3$ (7)

4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Bitkiler bazı kanser türlerinin tedavisi için etkili kaynaklardır [20-22].

Zerdeçalın bazı yaygın hastalıklar için faydalı olduğu geleneksek olarak bilinmektedir. Antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra birçok kanser türünde de önleyici etkisi olduğu ortaya çıkmıştır [22,23,24]. Son zamanlardaki bir çalışmada zerdeçalın bazı bileşiklerinin tümör gelişimini engelleyici aktivitesi olduğu görüldü.
Zerdeçaldaki esas aktif madde kurkumindir. Kurkuminin mutagenezi baskıladığı, nükleer faktör-kB yi aktive ettiği, sitokrom c salınımını indüklediği ve vasküler endotelyal büyüme faktörünü baskılayarak anti-anjiyojenik etkiler oluşturduğu bilinmektedir [25].

Zerdeçal çeşitli kanser tedavileri için bazı klinik çalışmalarda da kullanılmıştır. Bir çalışma; zerdeçal ekstraktının yüksek metastazlı prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde belirli bir inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir [26]. Diğer çalışmalarda klonojenik analizlerde inhibitör etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Çalışmalardaki bu ilerlemeye rağmen moleküler hedefler ve zerdeçalın antikanser mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu yüzden vücuttaki hücrelerde kritik bileşenlerin fonksiyonlarındaki etkisi araştırmaya değer görülmektedir. Bu konuda adenozin deaminaz önemli görünmektedir çünkü ADA pürin metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Enzimin inhibisyonu kanser tedavisinde önemlidir. Bu yüzden zerdeçal ektraktlarının ve bileşenlerinin olası etkilerini incelemek, bu tür bitkilerin antikanser etki mekanizmaları hakkında bilgi verebilir. Bu tür inhibitör potansiyeli olan bileşikler, ADA eksikliğiyle karakterize olan immün yetmezlik durumunu da anlamamıza yardımcı olabilir [27]. Bu tür bileşenler, pürin metabolik yolunda adenozin deaminazın inhibisyonu, adenozinin inozine dönüşümü ve deoksiadenozinin deoksiinozine dönüşümünün engellenmesine sebep olurlar. Adenozin ve deoksi adenozinin hücre içinde birikmesi ribonükleotit redüktazı inhibe ederek kanserli hücrenin çoğalması için gerekli DNA sentezini baskılayabilmektedir. Bu durum hücre çoğalması ve yayılmasını engelleyebilmektedir. Deneysel çalışma sonuçlarımıza baktığımızda, ekstraktsız (inhibitörsüz) şartlarda elde edilen V_{max} değerinin optik yoğunluk olarak 0,8 (spesifik aktivite cinsinden 40 mIU/g protein) olduğu, Km değerinin ise 100 μM olduğu görülmektedir. İki farklı ekstrakt (inhibitör) konsantrasyonunda elde edilen hız değerlerinin optik yoğunluk olarak 0,5 (spesifik aktivite cinsinden 25 mIU/g protein) ve 0,3 (spesifik aktivite cinsinden 15 mIU/g protein) olduğu görülmektedir. Km değerleri ise ekstraktsız ve ekstraktlı şartlarda aynı olduğu (K_m=100 μM) görülmektedir. Bu kinetik değerler zerdeçal ekstraktı içindeki aktif bileşenlerin ADA enzimini non-kompetetif tarzda inhibe ettiğini göstermektedir. Bu inhibisyon tarzı, zerdeçal bileşenlerinin enzimin substratına yapısal olarak benzemediğini ancak enzimin aktif merkezindeki kritik bölgeler ile etkileşerek maksimim aktiviteyi düşürdüğünü ifade etmektedir.
Bu sonuçlar, zerdeçal bileşenlerinin kanserli dokularda da ADA enzimini güçlü bir şekilde inhibe ederek kanserin engellenebileceğini, kanserli dokulardaki metastazın yavaşlatılabileceğini ve tıbbi tedavinin bu şekilde güçlendirilebileceğini düşündürmektedir.

5. SEMBOLLER (SYMBOLS)

ADA : Adenozin Deaminaz
V: Hız
K_m : Michaelis sabiti
V_{max} : Maximum hız
I: İnhibitör
A: Aktivite
$(A)_N$: Örnek Absorbansı
$(A)_K$: Kör Absorbansı
$(A)_S$: Standart Absorbansı
$(A)_{SK}$: Standart Körünün Absorbansı
IU : İnternasyonel ünite

6. KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Gordon M. Cragg, David J., Newman Plants as a source of anti-cancer agents, **Journal of Ethnopharmacology,** Volume 100, Issues 1–2, 72–79, 22 August 2005.
2. Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S.; Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution, **Cancer Lett**., 267 (1), 133-164, 2008.
3. Kunnumakkara, A.B.; Anand, P.; Aggarwal, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins, **Cancer Lett**., 269 (2), 199-225, 2008.

4. Aggarwal, B.B.; Kumar, A.; Bharti, A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, **Anticancer Res.**, 23 (1A), 363-398, 2003.

5. Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, **Cancer Lett**., 223 (2), 181-190, 2005.

6. Aggarwal, B.B. The past, present and future of multi-targeted cancer treatment "Naturally": Food for thought. **Cancer Lett**., 269 (2), 187-188, 2008.

7. GuptaS., Prostate cancer chemoprevention: Current status and future prospects, **Toxicol Appl. Pharmacol**., 224 (3), 369-376, 2007.

8. Sandur, S.K.; Pandey, M.K.; Sung, B.; Ahn, K.S.; Murakami, A.; Sethi, G.; Limtrakul, P.; Badmaev, V.; Aggarwal, B.B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemothoxycurcumin, tetrahydrocurcumin, and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and antiproliferative responses through a ROS-independent mechanism, **Carcinogenesis**, 8 (8), 1765-1773, 2007.

9. W. K. Jordan, R. March, O. B. Houchin & E. Popp, J. **Neurochem**. 4, 170, 1959.

10. T. G. Brady & C. I. O' Donovan, **Biochem**. J. 80, 17, 1961.

11. B. Galanti & G. Giusti, **Minerva Med**. 59-II, 5867, 1968.

12. G. Giusti, **Pol. Arch. Med. Wewn**. 44, 524, 1970.

13. Goldberg, DM. : Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice, **Brit Med J.** 1 : 353-355, 1995.

14. Solomon, JB., Constitutive Enzymes of the; Devoloping Chick Embryo:Adenosine Deaminase, **Biochem J.**, 75 : 278-284, 1959.

15. Daddona, P.E., Orkın,S.H., Shewach,D.S and Kelley, W.N., cDNA and Aminoacid Squence of Human Adenosine Deaminase, **Ann.N.Y. Acad.Sci.**, 451:238-244, 1985.

16. Wilson, D.K., Rudolph, F.B., Quiocho, F.A.: Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with Transition-State Analge: Understanding Catalysis and Imunodefiency Mutations, **Science**, 252:1278-1284, 1991.

17. Sutton R, Rockett B, Swindells P., **Chemistry for the Life Sciences,** 1st ed., London, 2000.

18. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent, **J Biol Chem.**, 182: 265-275, 1951.

19. Guisti G. Adenosine Deaminase, **In: Methods of Enzymatic Analysis,** 2nd Ed. Bergmeyer ,HV. New York, Academic Pres, 1092-1099, 1974.

20. Desai, Avni G.; Qazi, Ghulam N.; Ganju, Ramesh K.; El-Tamer, Mahmoud; Singh, Jaswant; Saxena, Ajit K.; Bedi, Yashbir S.; Taneja, Subhash C.; Bhat, Hari K. Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention, **Current Drug Metabolism,** Volume 9, Number 7, 581-591(11), 2008.

21. Wu-Yang Huang[a], Yi-Zhong Cai[a] & Yanbo Zhang[b] Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention, **Nutrition and Cancer** Volume 62, Issue 1, 1-20, 2009.

22. Durak Z.E., Gürü M., Investigation of The Effects of Aquoeus Turmeric (Curcuma Longa) Extract on Kinetic Behaviour of Adenosine Deaminase Enzyme, **Journal of The Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University**, Volume 28, No 1, 209-215, 2013.

23. Aggarwal, B.B. The past, present and future of multi-targeted cancer treatment "Naturally": Food for thought, **Cancer Lett**., 269 (2), 187-188, 2008.

24. Gupta, S. Prostate cancer chemoprevention: Current status and future prospects, **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** 224 (3), 369-376, 2007.

25. Anto, R.J.; George, J.; Babu, K.V.; Rajasekharan, K.N.; Kuttan, R. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids, **Mutat. Res**., 370 (2), 127-131, 1996.

26. Rao, K.V.K.; Schwartz, SA.; Nair, HK.; Aalinkeel, R.; Mahajan, S.; Chawda, R.; Nair, MN. Plant derived products as a source of cellular growth inhibitory phytochemicals on PC-3M, DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines, **Curr. Sci**., 87: 1585- 15888, 2004.

27. Glazer R, Adenosine deaminase inhibitors: Their role in chemotherapy and immunosuppression, **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 4, 4, 227-235, 1980.