

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

**LÖSEMİLİ HASTALARIN KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE ADENOSİN
DEAMİNAZ VE 5' NÜKLEOTİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

DOKTORA TEZİ

Seyhan GÜMÜŞLÜ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Orhan CANBOLAT

ANKARA

ARALIK 2007

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

**LÖSEMİLİ HASTALARIN KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE ADENOSİN
DEAMİNAZ VE 5' NÜKLEOTİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

DOKTORA TEZİ

Seyhan GÜMÜŞLÜ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Orhan CANBOLAT

ANKARA
ARALIK 2007

Gazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı Soyadı : SEYHAN GÜMÜRLÜ
Anabilim dalı : BİYOKİMYA
Sınav Tarihi : 24.12.2007
Tez konusu : Lösemili hastalarda Kemik iliğinde SNT ve
ADA enzim Aktivitelerinin Tayini

KARAR

: BAŞARILI

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : +
Reddine :

Oybirliği / Oyçokluğu ile karar verilmiştir.

GEREKÇE

Prof. Dr. Hatice Pasaoglu

JÜRİ BAŞKANI

ÜYE
Prof. Dr. Kadrihan Sengünç

ÜYE
Prof. Dr. Mustafa Karafide

ÜYE
Prof. Dr. Özgür Çelbiçat

ÜYE
Prof. Dr. Giner KARASU

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Pürin Nükleotidlerin Metabolizması:.....	5
2.2. Pirimidin Nükleotidlerin Metabolizması :	12
2.3. Lösemi ve Kemik İliği Hakkında Genel Bilgi:.....	14
2.4. Adenozin Deaminaz Hakkında (ADA) (Adenozin amino-hidrolaz E.C: 3.5.4.4) Genel Bilgiler:	16
2.5. Lösemili Hastalarda ADA Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi :	18
2.6. 5'Nükleotidaz Hakkında Genel Bilgiler (EC 3.1.3.5) (Ribonukleotid Fosfohidrolaz) (5' NT):	19
2.7. 5' NT ' nin Klinik Önemi :	21
2.8. Kanser – ADA VE 5' NT İlişkisi:	22
2.9. Kanser- Kemoterapi İlişkisi:	24
3. MATERYAL METOD:.....	30
3.1. Materyal:	30
3.1.1.Seçilen Hasta Grupları:.....	30
3.1.2.Seçilen Hasta Grubunun Kullandığı İlaçlar:	31
3.2. Kullanılan Cihazlar:	31
3.3. Kullanılan Metodlar:	32
3.3.1. Lökositleri Ayrılması:.....	32
3.3.1.1. Deneyin Yapılışı:.....	32
3.3.1.2.Lökositlerin Homojenizasyonu:	33
3.3.2. Protein Tayini:.....	33

3.3.2.1.Reaktifler:.....	34
3.3.2.2.Deneyin Yapılışı:.....	34
3.3.3. ADA Aktivitesinin Tayini:.....	36
3.3.3.1.Metodun Prensibi:.....	36
3.3.2.2.Reaktifler:.....	37
3.3.3.3.Deneyin Yapılışı:.....	38
3.3.4. 5' Nükleotidaz Aktivitesinin Tayini:.....	40
3.3.4.1. Metodun Prensibi:.....	40
3.3.4.2. Reaktifler:.....	40
3.3.4.3. Deneyin yapılışı:	41
4. BULGULAR :	42
4.1. Akut Lösemili Hastaların Tedavi Öncesi (TÖ) ve Tedavi Sonrası (TS) Kemik İliğinde ADA ve 5'NT Aktiviteleri:.....	42
4.2. Ölen Akut Myelositer Lösemi'li (AML) Hastalar'ın Kemik İliğinde 5' NT ve ADA Enzimlerinin Aktiviteleri:	44
4.3. Ölen Akut Lenfositler Lösemili 'li (ALL) Hastanın 5' NT ve ADA Enzimleri aktiviteleri:	45
4.4. Remisyona Giren AML'li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri:	45
4.5. Remisyona Giren ALL' li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri: ...	46
4.6. Akut Lösemili Hastaların Kemik İliği Enzim Aktivitelerinin Tedavi Öncesi ve Sonrası Korelasyon İlişkisi:	48
5. TARTIŞMA :	49

6. ÖZET	55
7. SUMMARY	56
8. KAYNAKLAR:.....	57
9. ÖZGEÇMİŞ.....	65

Şekiller, Resimler, Grafikler

Şekil 1. Pürin bazlarının de-novo sentez yolu:.....	6
Şekil 2. Pürin halkasındaki azot ve karbon atomlarının kaynağı:	7
Şekil 3. AMP ve GMP oluşumu:.....	8
Şekil 4. Nükleozid difosfat ve trifosfatların oluşumu:.....	9
Şekil 5. Deoksiribonükleotidlerin sentezi:.....	9
Şekil 6. Pürin Nükleotidleri Yıkımı:.....	11
Şekil 7. Pirimidin nükleotidleri biyosentezi:	12
Şekil 8. Pirimidin Nükleotidleri Yıkımı:	13
Şekil 9. Pürin metabolizmasında rol alan enzimler ve ilaçların hedefleri:	27
Şekil 10. Pirimidin metabolizmasında rol alan enzimler ve ilaçların hedefleri:	28
Grafik 1. Protein Standart Grafiği:.....	35
Grafik 2. Pi Standart Grafiği:	41

Tablolar

Tablo 1. 5' Nücleotidazların Sınıflandırılması:	19
Tablo 2. 5' Nücleotidazların Bazı Ayırıcı Özellikleri:.....	20
Tablo 3. Akut lösemili hastaların tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) kemik iliğinde ADA ve 5' NT aktiviteleri:.....	43
Tablo 4. Ölen akut myelositer lösemi'li (AML) hastaların kemik iliğinde 5' NTve ADA enzimlerinin aktiviteleri:.....	44
Tablo 5. Ölen akut lenfositler lösemili 'li (All) hastanın 5'NT ve ADA Enzimleri aktiviteleri:.....	45
Tablo 6. Remisyona Giren AML'li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri:	46
Tablo 7. Remisyona giren ALL' li hastaların kemik iliğinde remisyon öncesi ve sonrası ADA ve 5' NT enzimleri aktiviteleri:	47
Tablo 8. Akut lösemili hastaların kemik iliği enzim aktivitelerinin tedavi öncesi ve sonrası korelasyon ilişkisi:	48

1. GİRİŞ VE AMAÇ :

Lenfoid dokuların hücre topluluğu sabit retikülüm hücreleri, makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleridir. Periferik kanın şekilli elemanları arasında % 15- 40 oranında lenfositler bulunur. Lenfositler yavaşta olsa hareket edebilen, çeşitli enzimler (lipolitik, proteolitik gibi) içeren hücrelerdir. Kemik iliği ve timusta bulunan lenfositler kısa ömürlü (13 gün), Torasik kanal, lenf düğümü ve periferik kandaki lenfositler daha uzun ömürlüdür.

Lenfositlerin ana hücrelerinin yapım yeri doğumdan sonra kemik iliğidir. Kemik iliğinden çıkan bu hücreler timusa girer ve T lenfosit farklılaşmasını göstererek, kan dolaşımına tekrar geçerler. Aynı şekilde B lenfosit öncülleride lenfoid dokuda farklılaşarak B lenfositleri olarak kan dolaşımına geçerler. Kan dolaşımındaki lenfositlerin % 25-30'u B lenfositler, kalanları T lenfositleridir. T lenfositlerin yüzey yapıları B lenfositlerden farklıdır.

T lenfositleri, antijenlere karşı hücrel bağışıklıkta, B lenfositler ise humoral cevapta rol oynamaktadırlar. B lenfositleri, antijenik uyarım sonucu antikor sentez eden plazma hücresine farklılaşarak antikor salgılayan hücreye dönüşür. T lenfositler ise antijenik uyarım sonucu lenfokinler salgılayarak hücrel immun cevapta rol alırlar.

Purin nükleotidlerin sentezinde temel iki yol vardır. Birincisi yapısal moleküllerin kullanıldığı de-novo sentez yolu, ikincisi bazların tekrar kullanıldığı daha az enerjiye ihtiyaç duyan salvage yoldur. De-novo sentez özellikle karaciğer ve plesantada aktiftir. Non-hepatik dokularda daha çok karaciğer kaynaklı pürinler kullanılır. PRPP nükleotid sentezindeki anahtar bileşiktir. Hem de-novo sentezde hemde salvage yolda kullanılır. De novo sentezin birinci ve düzenleyici basamağı PRPP ve glutaminden 5- fosforibozilaminin oluştuğu amidofosforibozil transferaz enzimin katalizlediği reaksiyondur. Sentez sonucunda oluşan bileşik IMP' dir. IMP' den AMP ve GMP sentezlenir. Salvage yol, extra hepatik dokularda önemlidir. Adenin nükleotidlerin yıkımında 5' nükleotidaz enzimi anahtar rol oynar. Sonuçta bu yolda adenosin üzerinden inozin, guanosin ve ksantosin oluşur. Yıkım yolunda adenosin, adenosin deaminaz enzimi ile inozine döner. Bir sonraki reaksiyonda riboz 1- fosfatların ayrılması ile hipoksantin, guanin ve ksantin oluşur. Oluşan ksantin, ksantin oksidaz ile ürik asit ve hidrojen peroksida yıkılır.

Purin metabolik yol enzim anormalliklerinin immün sistem defektleriyle ve lenfoproliferative sistem bozukluklarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerden özellikle ADA, 5'NT ve PNP lenfosit proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır.¹

Adenozin deaminazın spesifik substratı olan adenozin, immun sistemin düzenlenmesinde önemli rol almaktadır. Adenozinin üç metabolik yolu vardır: Deaminasyon, fosforilasyon ve homosistein ile konjugasyon. Adenozin, adenozin deaminazın (E.C.3.5.4.6.) katalizlediği deaminasyon reaksiyonu ile inozine dönüşür. Adenozin kinaz (E.C.2.7.1.20.) ile adenozin fosfatlanarak adenozin monofosfat oluşur. Ardından da, AMP den ADP ve ATP veya adenilat siklaz ile cAMP oluşabilir. Adenozinin homosistein ile konjugasyonu ile S-Adenozin homosistein meydana gelebilir. S-Adenozin homosistein RNA ve protein sentezi sırasında metilasyon reaksiyonlarını inhibe eder.²

Yapılan çalışmalarda özellikle T ve B cell hücrelerinin maturasyonu açısından ADA' nın önemli rolü olduğu gösterilmiştir.²

Adenozin konsantrasyonunda artışın lenfosit proliferasyonunu neden inhibe ettiğinin mekanizması henüz tam olarak belli değilse de , ADA eksikliğinde artan adenozinin 5' AMP'ye fosforilenmesi ve ardından da ADP, AMP, ATP ve dATP' nin oluşması sonucunda pürin ve pirimidin nükleotidlerinin de novo sentezinin inhibe edilmesi olası bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. ATP, ADP ve AMP de novo sentezin en önemli basamağı olan PRPP sentazın güçlü inhibitörleridir. Ayrıca pürin ve pirimidin bazlarının sentezinin azalması DNA kırıklarına ve apoptosise neden olmaktadır. Onarılmamış DNA kırıkları poly-ADP ribose polimerazı indüklemekte hücre apoptosise gitmektedir.³

ADA inhibisyonuna bağlı olarak DNA sentezinde kullanılacak olan deoksiribonükleotidlerin sentezinin inhibe olması ADA toksisitesini açıklayan bir diğer önemli mekanizmadır. ADA inhibe olduğunda substratları adenozin ve deoksiadenozin hücrede birikir. Daha önce de bahsedildiği gibi adenozin ve deoksiadenozin adenozin kinazında substratıdır. Artan adenozin ve deoksiadenozin adenozin kinaz ile fosfatlanarak adenozin monofosfat oluşur. Ardından da AMP'den ADP ve ATP oluşabilir. Artan ATP düzeyleri, deoxyriboz sentezi için gerekli ribonükleotid redüktazı da inhibe eder. Ribonükleotid redüktaz üridindifosfatdan (UDP), 2'-deoksiribonükleoziddifosfat oluşumunu katalizler. Deoksiüridindifosfat sentezinin azalması timin sentezini azaltır. Bunun sonucu olarak da DNA sentezi ve onarımı azalır. Ribonükleotid redüktazın inhibe olması ile T ve B cell gen düzenlenmesi zarar görür. Sonuç olarak ADA yetmezliği olan hastalarda T ve B cell maturasyonu sınırlı kalmaktadır.³

Lenfosit proliferasyonunda de-novo ve salvage yolun önemini açıklayan çalışmalara bakılacak olursa; Lenfosit proliferasyonunda de-novo sentezin, salvage sentezden daha önemli olduğunun göstergesi de-novo sentezin inhibitörleri 6 mercaptopurin ve azoserine kullanıldığında lenfosit transformasyonunun inhibe olmasıdır.

Salvage yolun hereditör olarak çalışmadığı Lesh- Nyan sendromlu hastalarda normal lenfosit proliferasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir.^{3, 5}

ADA inhibisyonu sonucu adenozin konsantrasyonunu artışı ile cAMP düzeyleride artış gösterebilir. cAMP hücrel immün cevapta önemli rol oynamaktadır. İntracellüler cAMP düzeyinin artışı ile hücrel sitotoksite inhibe olmaktadır. cAMP düzeyinin artışı sonucu supresör hücre aktiviteleri de artar.⁴

5' NT enzimi , ADA ile aynı yolda görev yapar. 5'NT, AMP ve GMP gibi 5'nükleotidlerin defosforilasyonundan sorumludur. 5'NT enzim defektinin immün sistemi etkilemesinin mekanizması yukarıda bahsedildiği gibi özellikle artan dATP seviyelerinin deoxyriboz sentezi için gerekli ribonükleotid redüktazı da inhibe etmesidir. Her iki enzimin inhibisyonundada klinik tablo immün sistem yetmezliğiyle ilişkilidir. Pek çok çalışmada 5' NT aktivitesi B lenfositlerde T ' den yüksek bulunmuştur. 5' NT, özellikle B lenfositlerin markeri olarak kabul edilir.⁵

Lösemi kemik iliğinin yaygın olarak kanser hücreleri ile dolması ile karakterizedir. Lösemiler hücre tipine ve lösemik hücrelerin olgunluk durumuna göre sınıflandırılabilir. Akut lösemiler immatür hücrelerin kemik iliğini doldurması ve tedavisiz hastalarda hızlı ve ölümcül seyir ile karakterizedir. Kronik lösemilerde daha yavaş bir gidiş görülür..

ADA ve 5'NT bazı literatürlerde pürin yıkım yolu enzimi kabul edilirken bazı araştırmacılar tarafından purin salvage yol enzimi olarak değerlendirilmektedir.^{14, 15} Enzimlerin özellikle T Lenfosit ve B Lenfosit hücre proliferasyonun da görev alması özellikle lösemi açısından önem taşımaktadır. Enzimlerin davranış biçimleri üzerinde literatürde fikir birliği bulunmamaktadır. Hastalığın tipi ve gelişimine göre adı geçen enzimlerin farklı hastalıklarda farklı regülasyona sahip olduğu görülmektedir.^{5,6,29,30} Bu farklılığın hücre tipi veya hastalığın orjinine göre değişmesi enzim metabolizmaları açısından önem taşımaktadır. Lösemili hastalarda enzim aktivitelerine ait çalışmaların literatür bilgisinin sınırlı olması ve lösemili hastaların kemik iliğinde her iki enzim aktivitesini değerlendiren çalışmanın yapılmamış olması çalışmamızı anlamlı kılmaktadır. Çalışmamızda pürin metabolizmasında görev alan ADA ve hem pürin hemde pirimidin metabolizmasında yer alan 5' NT aktiviteleri değişik lösemili hastaların kemik iliğinde tayin edilmiştir. Klinikte lösemi teşhisi alan ve tıbbi tedavisine başlanmamış ve dolayısıyla ilaç kullanmamış hastaların kemik iliğinde başlangıç enzim aktiviteleri ve ilaç tedavisi sonrası remisyona girdikten sonraki enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir.

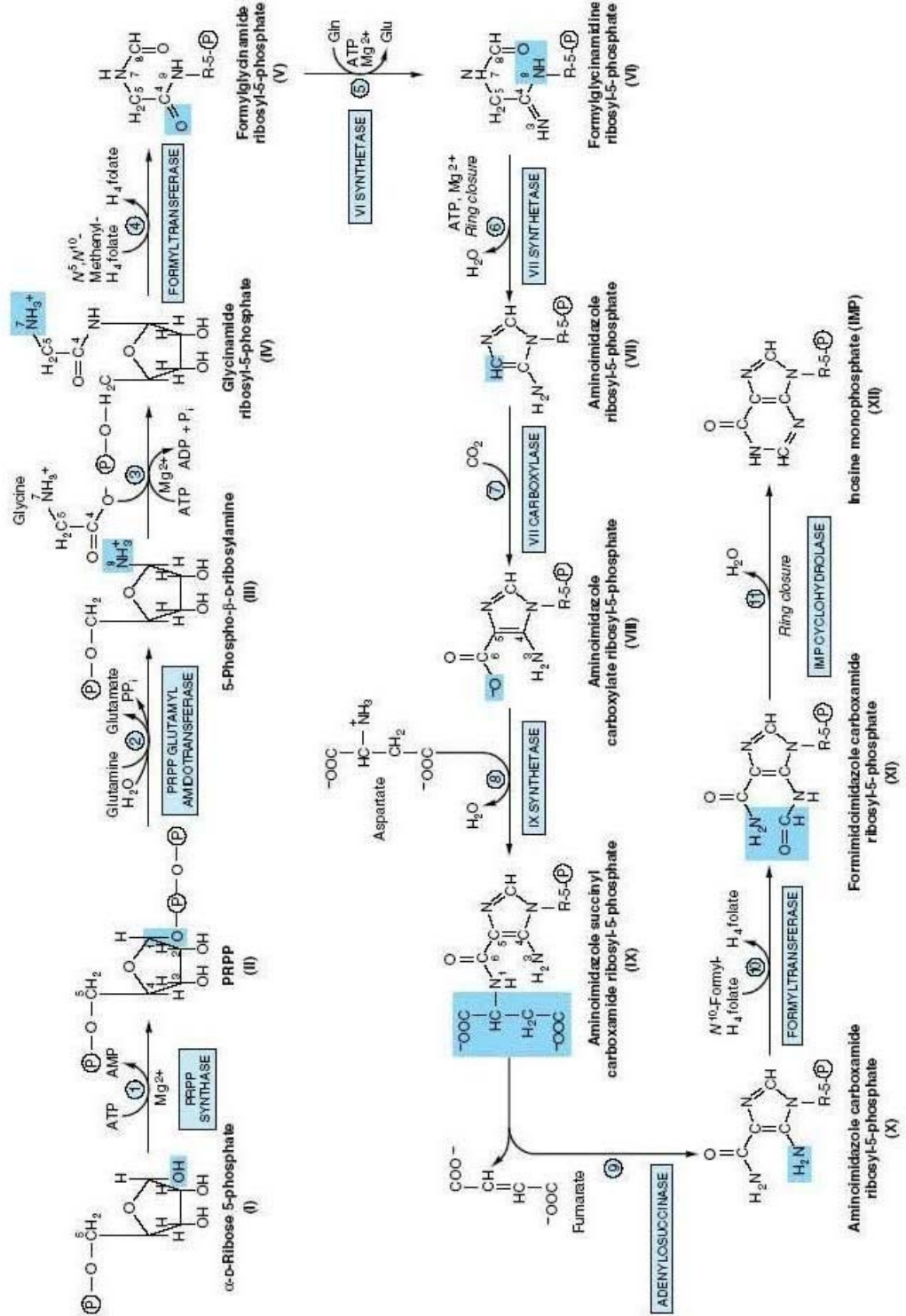
Literatürde özellikle lösemili hastaların kemik iliğinde 5' NT ve ADA enzim aktivitelerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda hastaların tedavi öncesi ve remisyon sonrası enzim aktiviteleri tayin edilerek, ADA ve 5' NT enzimlerinin değişik lösemi türlerindeki metabolik davranış biçimi anlaşılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların lösemili hastalarda pürin ve pirimidin metabolizmasının dolayısıyla adı geçen hasta grubunda nükleik asit bilgisine ait bilgilerin daha iyi anlaşılması, elde edilen bilgilerin hastalığın tanısında kullanılması ayrıca hastalığın remisyonunun takibinde ve ilacın etkinliğinin değerlendirilmesinde literatüre katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Özellikle çalışmamızda adı geçen enzim aktivitelerinin kemik iliğinde tayin edilmiş olması elde edilecek enzim değerleri ve enzim aktivitelerindeki değişimlerin sonuçlarımızı daha anlamlı kılacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Pürin Nükleotidlerin Metabolizması:

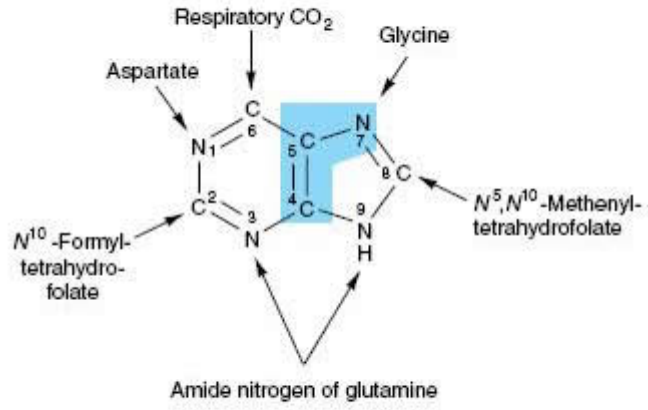
Pürinlerin de-novo sentezi Riboz-5 Fosfat'la başlar. Sentez yolunun 1. basamağında, ATP girişi ile 5- Fosforibozil 1 – pirofosfat meydana gelir. Bu reaksiyon PRPP sentetaz enzimi tarafından katalize edilir. Sentezin 2. basamağında 1. karbona bağlı pirofosfat grubu glutaminin amid grubuyla yer değiştirir. Böylece 5'-Fosforibozil- 1.amin (Fosforibozilamin) oluşur. Bu reaksiyonu Amidofosforibozil transferaz katalizler. Bu ilk iki reaksiyon de novo sentez yolunda hız kısıtlayıcı basamaklardır. 3. reaksiyonda glisin, 4. reaksiyonda N⁵N¹⁰-meteniltetrahidrofolat, 5. reaksiyonda ise tekrar glutamin kullanılır. Daha sonra halka kapanır ve imidazol halkası oluşur. 7. reaksiyonda CO₂, 8. reaksiyonda aspartat kullanılır. 9. reaksiyonda fumarik asit ayrılır. 10. reaksiyonda N₁₀ formiltetrahidrofolat girişi olur. 11. reaksiyonda ikinci halka kapanır ve inozin monofosfat oluşur.⁶

Pürinlerin de novo sentez yolu Şekil 1’de gösterilmiştir.⁶



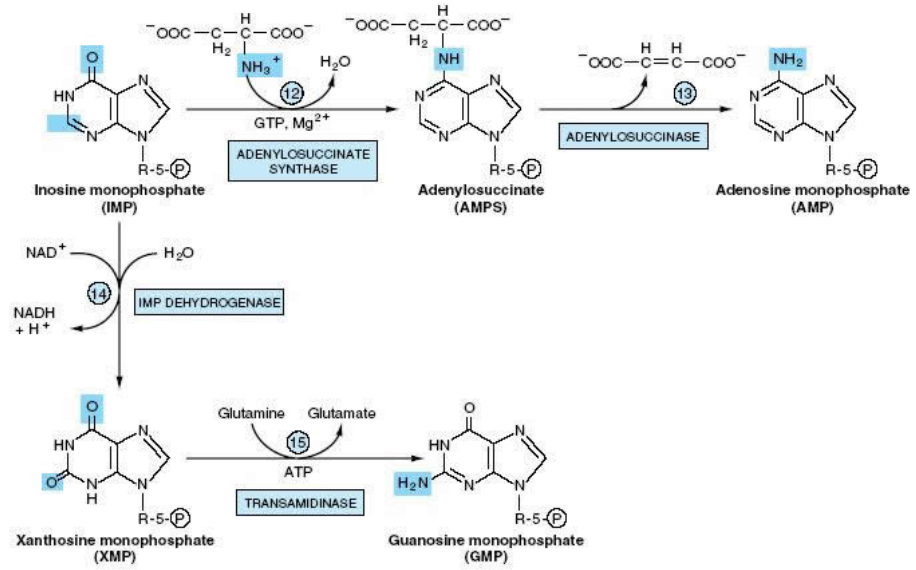
Şekil 1 - Pürin bazlarının de novo sentez yolu

Pürin halkasındaki azot ve karbon atomlarının kaynağı
şekil 2 ' de gösterilmiştir.⁶



Şekil 2 - Pürin halkasındaki azot ve karbon atomlarının kaynağı

Meydana gelen nükleotid daha sonra DNA ve RNA yapısında bulunan Adenin ve Guanin nükleotidlere çevrilir. IMP'den aminasyon, oksidasyon-aminasyon reaksiyonları ile AMP ve GMP meydana gelmektedir. (Şekil 3)⁶



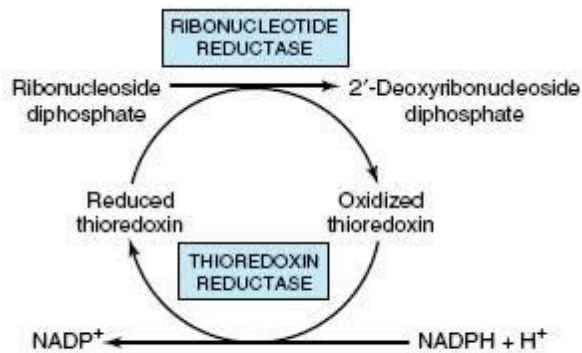
Şekil 3 - AMP ve GMP oluşumu

AMP ve GMP daha sonra ATP' nin yardımı ile di ve trifosfatlara dönüşür.(Şekil4)⁶



Şekil 4: Nükleozid difosfat ve trifosfatların oluşumu

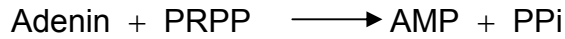
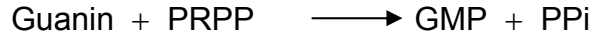
Memelilerde ribonükleotid difosfatlardan, ribonükleotid redüktase'ın katalizlediği reaksiyon ile deoksiribonükleotidler sentezlenir. Tüm dokularda ribonükleotid redüktaz mevcuttur. Aktif hale sadece DNA sentezi yapılacakken geçer .Bu enzim ribozun hidroksil grubundan oksijen alır. (Şekil 5)⁶



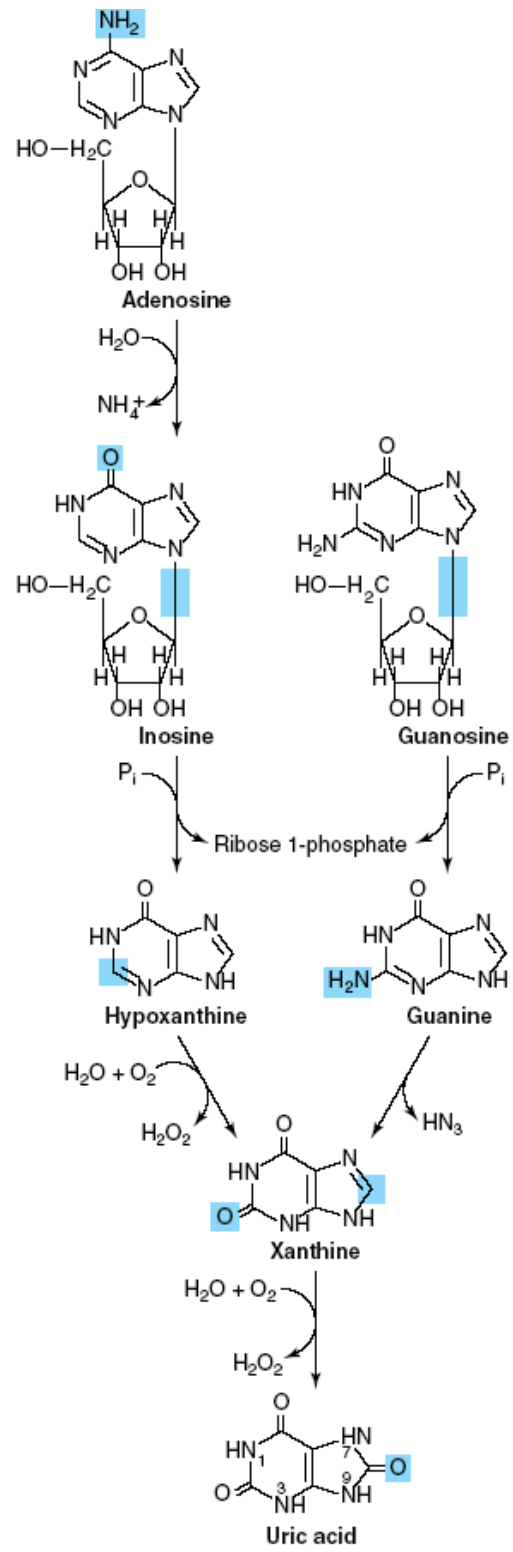
Şekil 5 - Deoksiribonükleotidlerin sentezi

İnsanlarda de novo sentez yolunun aktivitesi dokular arası farklılık göstermektedir. Eritrosit ve polimorf nükleer lökositlerde 5-fosforibozilamin sentezi yapılamaz ve ekzojen pürinlere bağımlıdır. Bu hücrelere karaciğer kaynak görevi yapar. Periferik lenfositlerde bir miktar de-novo sentez yolu mevcuttur. Pürin nükleotid sentezi için diğer bir yol ise salvage yoldur. Bu ara yolda kullanılan en önemli bileşikler, pürin yıkım yolundan elde edilen hipoksantin ve guanin bazlarıdır. Bu bazlar hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enziminin salvage ara yolu purin bazlarının korunumunda ve pürin nükleotidlerin yeniden sentezinde önemli bir yeri vardır.⁸

Enerji kullanımı az, kısa ve çabuk bir yoldur.



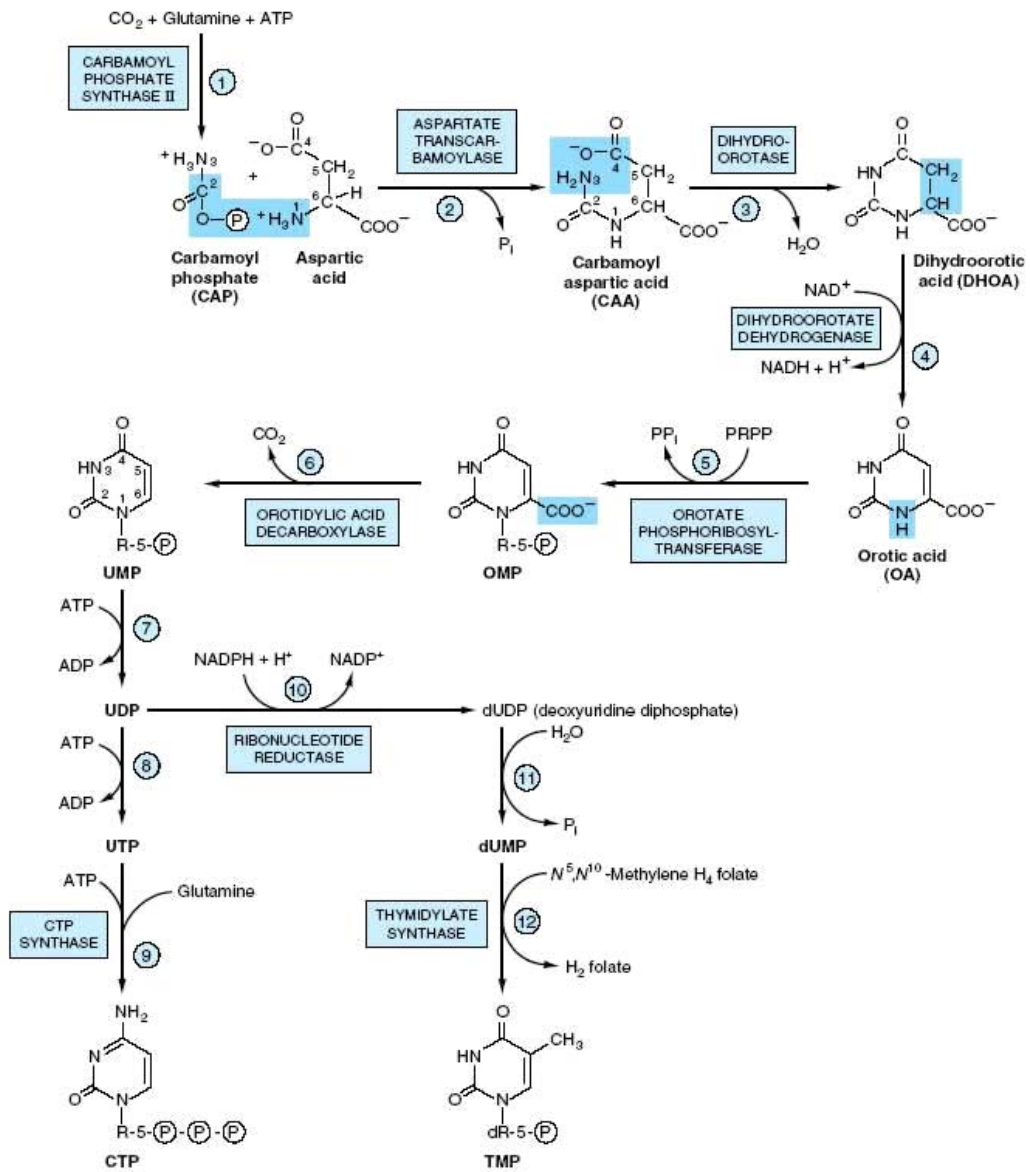
Pürin nükleotidleri yıkımı ise 5' nükleotidaz enzimi ile başlar. Sonuçta adenozin, inozin, guanozin oluşur. Adenozin, adenozin deaminaz enzimi ile inozine döner. Bir sonraki reaksiyonda riboz 1-fosfatların ayrılması ile hipoksantin ve guanin oluşur. Hipoksantinden ksantin oluşumunu ksantin oksidaz katalizlerken, guaninden ksantin oluşumunu aminohidrolaz enzimi katalizler. Bir sonraki basamakta oluşan ksantin, ksantin oksidaz ile ürik asit ve hidrojen peroksida yıkılır. (Şekil 6)



Şekil 6 - Pürin Nükleotidleri Yıkımı

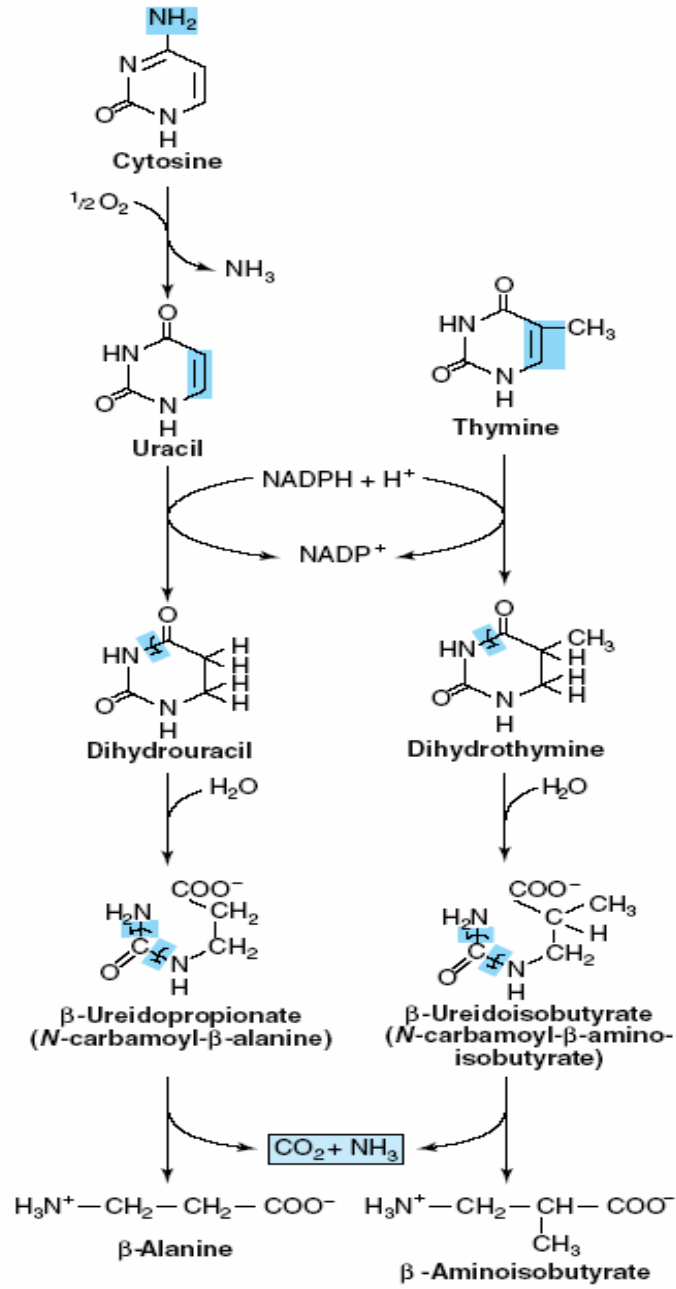
2.2. Pirimidin Nükleotidlerin Metabolizması :

Pirimidin nükleotidlerin biyosentezinde kullanılan öncül maddeler CO_2 , glutamin ve ATP' dir. Pürin sentez yolundan farklı olarak burada önce pirimidin halkası meydana gelir. Daha sonra riboz 5- fosfat eklenerek nükleotidler oluşur. (Şekil 7)⁶.



Şekil 7 - Pirimidin nükleotidleri biyosentezi

Pirimidin nükleotidleri yıkımı, özellikle karaciğerde meydana gelir. Son ürünleri suda çözünürler. (Şekil 8)⁶



Şekil 8 : Pirimidin Nükleotidleri Yıkımı

2.3. Lösemi ve Kemik İliği Hakkında Genel Bilgi

Kemik iliği kandan sonra en geniş ve en büyük yapıdır. Doğumdan itibaren hemotopoiesis kemik iliğinde gerçekleşir. Kemik iliği iki komponentten oluşur; Hemotopoetik hücre kompartmanı ve stromal komponent. Stromal komponent hemotopoetik hücrelerin proliferasyonunun gerçekleştiği komponenttir.

Normal kemik iliğinde %15-25 kadar kırmızı seri hücreleri veya eritroblastlar, % 50- 70 kadar granülositler veya miyeloid elemanlar, % 10- 15 kadar beyaz seri elemanları (lenfosit , plazmosit, monosit ve retikulum hücreleri) bulunur. Ayrıca % 1-2 kadar hemositoblast ve megakaryositler de vardır.

Granülositler ve monositler bakterileri fagositoz yoluyla yok ederler. Hümorale ve hücresele bağışıklığı sağlayan lökositler, yani lenfoid hücreler kemik iliğinde, timusda ve lenf düğümlerinde oluşurlar. Lenfositler antijenle karşılaşınca ribonükleik asit ve antikor yapımına başlarlar. Lenfositler immünolojik açıdan 2 tipe ayrılmaktadır. T hücreleri ve B hücreleri . T hücreleri hücresele bağışıklık ve B hücreleride hümorale bağışıklıkla rol alırlar.

B-hücreleri immunoglobulin sentezi ve sekresyonu için özelleşmiş hücrelerdir.

T- hücreleri hücresele immunitiyi düzenlerler. T hücreler timusda maturasyonlarını tamamladıkları için bu adı alırlar. T lenfositler kendi içlerinde helper ve cytotoxic lenfosit olarak da iki gruba ayrılırlar. T lenfositlerin antijen reseptörleri yapısal olarak antiodilerle ilişkili olmasına rağmen yabancı antijenleri fark eder. Trombositler, kemik iliğinin dev hücrelerinden olan meakaryositlerden oluşur. Megakaryosit olgunlaşınca sitoplazması parçalanır ve trombositler meydana gelir.^{76, 77}

Lösemi kemik iliğinin yaygın olarak kanser hücreleri ile dolması ile karakterizedir. Lösemiler hücre tipine ve lösemik hücrelerin olgunluk durumuna göre sınıflandırılabilir. Akut lösemiler immatür hücrelerin kemik iliğini doldurması ve tedavisiz hastalarda hızlı ve ölümcül seyir ile karakterizedir. Kronik lösemilerde daha yavaş bir gidiş görülür.⁷⁶

Akut lösemiler genç, olgunlaşmamış , blastik hücrelerin aşırı çoğalması ile karakterizedir. Hiç farklılaşmamış stem cell , myeoblast, lenfoblast özelliklerini gösteren hücreler kan ve kemik iliğini

yaygın olarak doldurması ile karakterizedir. Genellikle klinik seyri akut olur.⁷⁶

Akut lenfoblastik lösemi, daha çok küçük çocuklarda ve gençlerde görülür. All' nin laboratuvar bulgularına bakıldığında, tipik kan tablosu; anemi, trombositopeni ve blastik hücrelerin kanda bulunmasıdır. Lökosit sayısı azalmış, normal veya artmıştır. Kemik iliği hipersellülerdir. Kemik iliği hücrelerinin % 70-99' unu lenfoblastlar oluşturur. Normal hücreler çok azalmıştır. Kemik iliği, lenf bezleri, dalak, karaciğer, böbrekler ' de lenfoblastlarla dolmuştur.^{76,77}

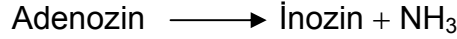
Akut myeloblastik lösemi, her yaşta görülmekle beraber erişkinlerde daha sık görülür. Hastalık akut başlar. Karakteristik klinik bulgular yoktur. AML' nin laboratuvar bulguları ALL' ye benzer.^{76,77}

Kronik lenfositer lösemi kanın lenfosit seri hücrelerinin anormal proliferasyonu ile karakterizedir. Çoğalan hücreler olgun küçük lenfositlerdir. Bu hastalık lösemiler içerisinde en kronik olanıdır. Bu lösemi türü ileri yaş hastalığıdır. Erkeklerde kadınlara göre iki misli fazla görülür. Bu hastalıkta kalıtsal geçiş dikkati çekmiştir. Laboratuvar bulguları, orta derecede anemi görülür. Lökosit sayısı 20.000- 200,000 arasındadır. Lökosit formülünün % 70- 99 ' unu olgun lenfositler oluşturur. Trombosit sayısı azalır.^{76,77}

Kronik myeloid lösemi kanın granülositer elemanlarının ve bunların genç şekillerinin proliferasyonu ile karakterizedir. Proliferasyona genç, yaşlı her evredeki hücreler katılır. Klinik seyri kronik olur. Bu hastalıkta nötrofil serinin proliferasyonu ön plandadır.^{76, 77}

2.4. Adenozin Deaminaz Hakkında (ADA) (Adenozin amino-hidrolaz E.C: 3.5.4.4) Genel Bilgiler:

Adenozin deaminaz, pürin katabolizmasında adenozin ve deoksiadenozinden amonyağın ayrılması ile inozin ve deoksiinozin oluşumunu katalizler.^{9,10,11,12,13,57}



Şekil 7. Adenozin deaminazın katalizlediği reaksiyonlar

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.^{14, 15, 16, 17, 18, 19}

ADA, ilk defa Convey ve Cook tarafından 1939 yılında tanımlanmıştır. İskelet kası, deri ve kemikte aktivitesi düşükken, dalak ve intestinal mukozada aktivitesi yüksektir.²⁰

ADA' nın iki izoformu mevcuttur. Düşük molekül ağırlıklı olan ADA₁ timus, eritrosit ve kalpte bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı ADA₂ karaciğer, böbrek ve barsaklarda mevcuttur.¹⁴

Serum ADA aktivitesinin ana kaynağı ADA₂' dir. 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.^{14, 18, 21}

ADA₂ aktivitesi özellikle Akut miyelositer lösemi (AML) ve kronik myelositer lösemnin blastik krizindeki (KML- BK) gibi nonlenfoid kökenli lösemilerde yüksek bulunurken eritrolösemi ve lenfoblastik lösemilerde tespit edilememiştir. ADA₁ ise lenfoid ve nonlenfoid hücrelerde tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ADA₂' nin nonlenfoid lösemileri lenfoid kökenli lösemilerden ayırmakta kullanılabileceği düşünülmektedir. Lösemiler dışında ADA₁ ve ADA₂ bazı hastalıklarda da artış göstermiştir. ADA₁ hemolitik anemi, pankreatit, paratiroid adenomları ve kardiyovasküler hastalıklarda artış gösterirken, ADA₂ hepatit, kolon ve akciğer hastalıklarında artmaktadır.¹⁸

ADA, lenfositler için büyük önem taşımaktadır. Periferik lenfositlerde de-novo sentez yolu çok aktif olmadığı için salvage yol önem taşımaktadır. Lenfositlerde ADA pürin yıkım yolu ile salvage yola

subtrat sağlamaktadır. Ayrıca T lenfositlerde hücre matürasyonu ve mitogenezde etkilidir.^{51,19, 53}

Adenozin ve deoksiadenozin ADA dışında bazı enzimlerinde substratıdır. Adenozin kinaz (E.C.2.7.1.20.) ile adenozin fosfatlanarak adenozin monofosfat oluşur. Ardından da, AMP den ADP ve ATP veya adenilat siklaz ile cAMP oluşabilir. Adenozinin homosistein ile konjugasyonu ile S-Adenozin homosistein meydana gelebilir. Bu reaksiyonu S-Adenozil homosistein hidrolaz katalizler. S-Adenozin homosistein artışı RNA ve protein sentezi sırasında RNA metilasyonunu inhibe eder. ADA 'nın Km değeri adenozinle karşılaştırıldığında deoksiadenozin için daha küçük olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, ADA' nın esas substratı deoksiadenozin'dir.^{2,22}

ADA inhibe edildiğinde veya enzim eksikliğinde, substratları olan adenozin ve deoksiadenozin hücrede birikir. Bu iki nükleozitin birikimi hücrelerde toksik etkiler yaratır.^{22, 23, 10, 42, 25}

ADA inhibe edildiğinde ortaya çıkan toksik etkinin sebepleri;

1. Fazla miktarda adenozin, deoksiadenozin ve dATP teşekkül eder. Ribonükleotid redüktaz allosterik olarak dATP ile inhibe olur. Bu durumda deoksinükleotidlerin seviyesi azalır. DNA sentezi için gerekli deoksiribonükleotidlerin miktarının azalması, DNA sentezini bozar.

2. Adenozinin artışı, S-Adenozil homosistein hidrolaz ile S-adenozin homosistein (SAH) oluşumunu artırır. SAH miktarının artışı ile DNA sentezi içinde gerekli olan metilasyon reaksiyonları inhibe olur. DNA sentezi için gerekli olan metilasyon reaksiyonlarının bozulması hücreye zarar verir.

ADA' nın inhibisyonu sonucu dATP ve SAH miktarının artışı hücre için toksiktir. Bu nedenle ADA inhibitörlerinin malign hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla ADA inhibitörleri deneysel olarak kullanılmaya başlanılmış ve alınan olumlu sonuçlardan dolayı klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Deoksiformisin ADA' nın kuvvetli inhibitörüdür ve lösemi tedavisinde kullanılmaktadır.^{10,30, 35, 41, 42, 62, 59}

2.5. Lösemili Hastalarda ADA Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi :

ADA aktivitesi lenfositlerde eritrositlere göre 10 kat daha fazladır. Ayrıca T –Lenfositlerde, B-Lenfositlere göre daha fazladır. ADA eksikliği insanlar için önemli immunolojik eksiklik meydana getirmektedir. Bu immunolojik yetmezliğin metabolik temelinde ADA substratları olan adenozin ve deoksiadenozinin miktarlarının artışına karşı lenfositlerin hassasiyetidir. ADA eksikliğinde, artan adenozin , deoksiadenozine ve buna bağlı olarak artan dATP artışı lenfositler için toksik etki yapmakta ve hücre ölümünü indüklemektedir. Artan adenozin, T lenfositlerde adenozone reseptörlerini aktive etmekte ve kontrolsüz T hücre gelişimi ve fonksiyonu meydana gelmektedir.⁵⁷

ADA lösemili hastaların tedavisinde kemoterapi hedefi olarak seçilmesinin dışında, lösemilerin sub tiplerinin ayrılmasında ve remisyonun takibinde immünolojik markerlarla beraber kullanılan bir biyokimyasal marker haline gelmiştir.^{42, 23, 19}

Yapılan çalışmalar da ADA aktivitesi ALL, AML ve KML blastik krizde artmış olarak bulunmuştur.^{9,15,17, 35, 36, 23, 47}

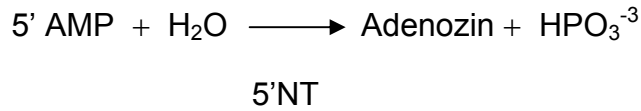
Kolon kanserli dokularda ADA enzim aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Artmış ADA aktivitesi , nukleotid yıkımını neden olur, artan hipoksantin hipoksantin guanin phosphoribosiy transferaz enziminin substratıdır. Bu enzim nukleotid sentezine salvage yolun anahtar enzimidir. Böylece kanserli dokularda nukleotid sentezi, normal dokulardan daha fazla olmaktadır. Kolon kanserinde ADA enzimi bir salvage yol enzimi gibi değerlendirilmektedir.²⁹

Yukarıdaki çalışmanın aksine, oral ve laryngeal kanserli hastaların tükrüklerinde yapılan bir çalışmada; oral kanserli hastaların tükrüklerinde ADA preoperatif dönemde azalmış, postoperatif dönemde yaklaşık 4 katı artmıştır. Laryngeal kanserli hastaların tükrüklerinde aynı şekilde ADA preoperatif dönemde azalmış, postoperatif dönemde yaklaşık 2 katı artmıştır. Ancak her iki grupta da kontrol grubunun değerlerine ulaşamamıştır.³⁸

Literatürde görüldüğü gibi ADA enzimi doku veya hücre tipine ve hücrenin nukleotid ihtiyacına göre yıkım veya salvage yol enzimi gibi davranmaktadır. Bu davranış biçimi Weber' in kanser hücresinin metabolizmasını kendi ihtiyacına göre regüle etmesi açıklamalarıyla uyum içerisindedir.⁴⁴

2.6. 5'Nükleotidaz Hakkında Genel Bilgiler (EC 3.1.3.5) (Ribonukleotid Fosfohidrolaz) (5' NT)

5' NT ilk defa 1934 yılında Reis tarafından kas homojenatlarından izole edildi. Enzim 5' AMP' den inorganik fosfat oluşumunu sağlamaktadır. 5' NT' nin katalizlediği reaksiyon sonucu bir nükleozid ve inorganik fosfat açığa çıkar. ^{58, 57}



1954 yılında Reis ve arkadaşları kas homojenatlarında bulunan 5'NT' yi tanımlamışlardır. İnsan serumunda 5' NT'nin belirlenmesi pek çok hastalığın tanısında önemli yer teşkil etmiştir. ⁵⁸

Pürin salvage yolu ve pürin yıkım yolu enzimi kabul edilen 5' NT , riboz ve deoksiriboz halkalarından 5'- Monofosfatların defosforilasyonunu katalizleyen fosfatazdır. Purin yıkım yolunda hız sınırlayıcı basamaktır. ⁵⁷

5' NT hücre içi nükleotid regülasyonunda görev almaktadır. Yıkım yolunda pürin bazları ürik aside yıkılırken aynı zamanda salvage yol için substrat sağlamaktadır. 5' NT 5'AMP' yi adenozine yıkmakta, ADA' da daha sonra adenozini, inozin ve deoksiinozine çevirmektedir. Oluşan hipoksantin hem salvage yolun substratıdır hemde yıkım yolu ürünüdür. ¹²

Aynı şekilde 5' NT' de hücrenin metabolik ihtiyacına göre yıkım veya salvage yol enzimi gibi davranabilmektedir.

Değişik subcellular yerleşimde 7 insan 5'- nükleotidaz klonlanmıştır. (Tablo1) ⁶⁹

Tablo1: 5' Nükleotidazların Sınıflandırılması

Revised protein nomenclature	Full name and gene symbol	UniGene cluster no.	Aliases	Refs.
eN	Ecto-5'-nucleotidase, <i>NT5E</i>	Hs.153952	Ecto-5'-NT; low K_m 5'-NT; eNT; CD73	1
cN-IA	Cytosolic 5'-nucleotidase IA, <i>NT5C1A</i>	Hs.307006	AMP-specific 5'-NT; cN-I	2, 3
cN-IB	Cytosolic 5'-nucleotidase IB, <i>NT5C1B</i>	Hs.120319	cN-IA homolog; AIRP	4
cN-II	Cytosolic 5'-nucleotidase II, <i>NT5C2</i>	Hs.138593	High K_m 5'-NT; purine 5'-NT; GMP,IMP-specific 5'-NT	5
cN-III	Cytosolic 5'-nucleotidase III, <i>NT5C3</i>	Hs.55189	PN-I; P5'N-1; UMPH	6
cdN	Cytosolic 5'(3')-deoxynucleotidase, <i>NT5C</i>	Hs.67201	dNT-1; PN-II	7, 8
mdN	Mitochondrial 5'(3')- deoxynucleotidase, <i>NT5M</i>	Hs.16614	dNT-2	9

Bütün 5'-Nükleotidazlar substrat spesifiktir. Ecto- 5' NT haricinde tüm üyeler aktivite için mg bağımlıdır. 5' Nükleotidazların bazı ayırtıcı özellikleri aşağıdaki tabloda özetlemiştir. (Tablo 2) ⁶⁹

Tablo 2: 5' Nükleotidazların Bazı Ayırıcı Özellikleri

Enzyme	Protein structure (monomer kDa ^c)	Substrate affinity (K_m)	Effect of ATP
eN	Dimer (63)	μM	–
cN-IA ^b	Tetramer (41)	μM -mM ^e	+ (ADP + +) ^d
cN-II	Tetramer (65)	sub mM	++
cN-III	Monomer (33)	sub mM	none
cdN	Dimer (23)	mM	none
mdN	Dimer (26)	sub mM	none

Ecto-5' NT(eN) , 70 KDa' lık iki subunittden meydana gelmektedir. Pek çok hücre yüzeyine glikosyl phosphatidyl inositol bağ ile bağlıdır. İnsan 5' nükleotidazı kodlayan gen 6. Kromozom üzerine lokalizedir. 5' NT'nin aktivitesi ağırlıklı olarak memeli hücrelerinde plazma membranındadır. AMP majör fizyolojik substratıdır.⁶⁹

Ecto 5' NT hücre membranını geçemeyen nükleotid monofosfatları, nükleozit monofosfatlara çevirerek hücre içerisine girmelerini sağlamaktadır. Böylece hücre yüzeyindeki adenozin reseptörleri aracılığı ile adenozin membranı geçebilmektedir.²¹

Sitozolik 5'- Nucleotidaz, cN-IA AMP spesifik 5' nükleotidazlar olarakda adlandırılırlar. Milimolar konsantrasyonlarda AMP' ye spesifik aktivitesi vardır. Detaylı kinetik çalışmalarda deoxypirimidin monofosfatlara karşı da yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. cN-IA' nın deoxynucleosid monofosfatlara yüksek affinitesi deoxyribonükleotid havuzunun düzenlenilmesinde rol oynamaktadır.⁷⁰

Sitozolik 5'- Nucleotidaz cN-II, 6 hidroksipurine-spesifik nükleotidazdır. IMP ile en aktiftir. ATP ve GTP havuzlarını düzenler. Fizyolojik koşullar altında cN-II purin nükleotidlerden inosin ve guanosine fosfor transferini de sağlar.^{57, 60} (Fosfotransferaz Aktivitesi) : ATP' nin ve fosfatın belli fizyolojik konsantrasyonlarda olduğu durumlarda cN- II bir fosfotransferaz gibi davranabilmektedir. IMP ve GMP cN-II için en iyi fosfat alıcısıdır. cN-II inosin ve guanosin analoglarını fosforlayan tek hücrel enzim olarak bilinmektedir. Bu reaksiyon anti-viral ve anti- kanser nükleozid analoglarının aktivasyonundan sorumludur.⁶⁴

Fosfotransferaz aktivitesinden dolayı cN-II sadece katabolik değil ayı zamanda anabolik fonksiyonlara da sahiptir. Fizyolojik konsantrasyonlarda fosfat ve ATP olduğu durumda nükleosid alıcısı varsa fosfat enzimin aktif bölgesine bağlanır. Mikromolar

konsantrasyonlar da ATP (4.5 nM) ve fosfat (5 mM) varlığında fosfotransferaz gibi davranmaktadır.

Sitozolik 5'- Nucleotidase III-cN-III, Eritrosit maturasyonunda rol oynar. Purine nükleotidleri ile inaktiftir. Pirimidine deoksiribinükleotidleri ile CMP' yi en iyi substrat olarak kabul eder. Bu enzimin fosfotransferaz aktivitesi cN-II' en daha az efektifdir.^{70, 71}

Sitozolik 5' (3')- Deoxynukleotidase-cdN, cN-III' ün aksine sadece pirimidin spesifik değildir. dIMP ile de efektif olarak çalışır. dGMP ve dAMP zayıf substratlarıdır. dCMP ile inaktiftir.⁷²

Mitokondrial 5' (3') – Deoxynucleotidase- mdN, sitozolik 5' (3')- Deoxynukleotidase-cdN ile çok benzer yapıdadır. (% 52 aminoasid aynıdır.) Çok dar substrat spesifitesi vardır. dUMP ve dTMP' yi tercih eder.^{72, 73, 74, 75}

5' NT aktivitesi çeşitli anyon ve katyonlardan etkilenmektedir. 5' NT florür, Arsenat, Borat gibi anyonlarla nikel, kobalt, bakır gibi katyonlarla inhibe olur.⁵⁶

Plazma membranındaki 5' NT üzerindeki metal iyonları inhibisyonu geri dönüşümlü olurken, sitozolik 5' NT üzerine olan inhibisyon irreversibledir. Enzim aktivitelerini aktive eden metal iyonları da mevcuttur. Mg⁺² ve Mn⁺² sitozolik 5' NT için aktivatörler olarak gözlenmiştir. Membrandaki 5' NT 'nin ise yapısında Mg⁺² ve Mn⁺² olduğu için aktivatör etkileri yoktur. İnorganik fosfatla yapılan kinetik çalışmalarda sitozolik 5' NT inhibe olurken, Ecto 5' NT etkilenmemiştir.⁶⁰

2.7. 5' NT ' nin Klinik Önemi :

Perifer kanda 5' NT aktiviteleri pek çok immunolojik yetmezlik ve lenfoproliferative hastalıklarda düşük bulunmuştur.⁵⁷

5' NT hücre içi nükleotid seviyelerinin ayarlanmasında rol oynarlar. Lösemili hastaların T ve B lenfoblastlarında ADA inhibitörleri kullanıldığında T hücrelerde dATP ve dGTP miktarı artmakta ve T lenfositler meydana gelen toksisiteden fazla etkilenmemektedir.⁶²

Hovi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da 5' NT seviyelerinin daha düşük olduğu T lenfoblastlarda dATP ve dGTP birikiminin hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.³

5' NT Lenfosit maturasyonunda da rol alan enzimlerden bir tanesidir. T hücrelerin timus içerisinde iken 5' NT aktiviteleri düşükken matür T hücrelerde yüksek bulunması, T hücre maturasyonunda bir marker olabileceğini düşündürmektedir.¹⁵

Perifer kanda maturasyon defektleri görülen hastalıklar olan lösemi ve lenfomalarda 5' NT' nin düzeyleri düşük bulunmuştur. Ecto-5' NT düzeyleri total lökosit sayısı arttığında artmakta ve blast hücreleri arttığında ise azalmaktadır.⁴⁶

Ecto5' NT , e-Ns ve c-N-II 5' Nucleotidazlar sağlıklı bireylerin T ve B lenfositlerinde aynı oranlarda bulunmamışlardır. B hücrelerde en yüksek aktivite ecto-5' NT ve c-N-II'de iken, T lenfositlerde daha az aktiviteye sahip bulunmuştur. Lösemi hastalarında T ve B lenfositlerde 5' NT' nin üç izoformunda düşük bulunmuştur. En fazla düşüş ecto-5' NT aktivitesinde görülmüştür.²⁶

Multiple Sklerosis hastalarında ADA ve 5' NT aktivitelerine bakılan çalışmada, tam kanda kontrol grubuna göre azalmış ADA ve 5' NT değerleri bulunmuştur. 5' NT ' nin azalmasının salvage yolun azalması, nükleotidlerin azalması ve bundan dolayı purine metabolizması ve DNA, RNA sentezinin ve tamir mekanizmalarının bozulması sonucu olduğu düşünülmektedir.

Kolon kanserli dokularda 5' NT enzim aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Artmış 5'NT aktivitesi, nükleotid yıkımını neden olur, artan hipoksantin, hipoksantin guanin phosphoribosyl transferaz. anahtar enzimidir. Kolon kanserli hastalarda 5' NT salvage yol enzimi gibi davranır. Böylece kanserli dokularda nükleotid sentezi, normal dokulardan daha fazla olmaktadır.²⁹

Oral ve laryngeal kanserli hastaların tükrüklerinde bakılan bir çalışmada ise oral kanserli hastaların tükrüklerinde 5' NT preoperatif dönemde azalmış, postoperatif dönemde yaklaşık 4 katı artmıştır. Laryngeal kanserli hastaların tükrüklerinde aynı şekilde 5' NT preoperatif dönemde azalmış, postoperatif dönemde yaklaşık 2 katı artmıştır.³⁸

2.8. Kanser – ADA VE 5' NT İlişkisi

Daha öncede bahsedildiği gibi adenosin hücrelerde yaşamsal rol oynar. Adenozin konsantrasyonunun değişimi önemli fizyolojik olayları kontrol altında tutmaktadır. Adenozin konsantrasyonunu sitozolik 5' NT, ecto5' NT, adenozin kinaz (AK) ve adenozin deaminaz (ADA) enzimleri kontrol altında tutmaktadır.^{27, 28}

ADA, purin metabolizmasının, DNA turn-overın ve dolayısıyla kanser prosesinin anahtar enzimidir. Literatüre bakıldığında çalışılan doku ve hücreye göre ADA aktiviteleri artmış, azalmış veya değişmemiş olarak bulunmuştur.^{29,30,31,33}

5'NT ise pürin ve pirimidin metabolizmasındaki diğer anahtar enzimidir. ADA' da olduğu gibi çalışmalarda dokuya göre 5' NT aktivitelerinde de farklılıklar tespit edilmiştir.^{29,33}

Sufrin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serumda yapılan çalışmaların sonuçları yorumlanırken; ADA aktivitesindeki artış, primer kanserli dokulardan veya metastatik dokulardan seruma enzim sızıntısı olduğu yönünde açıklanmaktadır.³⁸

ADA aktivitesinin baskılandığının gözlemlendiği Dasmahapatra ve arkadaşlarının yaptığı baş ve boyun kanserleri çalışmalarında ise elde edilen sonuçlar lenfosit ADA aktivitesinin bastırılmış hücresel immunitenin göstergesi olduğu şeklinde yorumlanmıştır.³⁶

Saraçoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oral kanserli hastaların tükrüklerinde kontrol ve larngéal kanserli hastalara göre daha düşük ADA değerleri elde edilmiştir. ADA aktivitesinin düşüklüğünün nedeni kanserli hücrelerdeki ADA ve DNA metabolizmasının hızına karşı bir mekanizma oluşturulduğu, azalan ADA aktivitesi dATP ve dAMP konsantrasyonlarını yükselttiği, dolayısıyla dATP / dAMP oranının düştüğü ve sonuçta enerji üretiminin azalarak kanser hücrelerinin çoğalmasını sınırlı kaldığı şeklinde yorumlanmıştır..³⁸

Lal ve arkadaşlarının yaptığı ve serum ADA seviyelerinin yüksek bulunduğu çalışmada ise, yüksek ADA aktivitesinin kanserin evresi ile ilgili olduğu gösterilmiştir.^{38, 39} Ayrıca materyal alınma şekli ve kullanılan methot da sonuçları etkilemektedir.⁴⁰

Kanser hücrelerinin enzim metabolizmalarında görülen büyük farklılıklar doku farklılıkları ve kanserin özelliğine bağlı olan spesifik mekanizmalarından kaynaklanabileceği de düşünülmektedir. Bu farklılıklar karsinogenezin tek başına sonucu olabileceği gibi hastanın alkol kullanımı, sigara gibi alışkanlıkları ile de değişiklik gösterebilir.³³

Mide ve larngéal kanserli dokularda 5' NT aktivitesi ile yapılan çalışmalarda da ADA' da olduğu gibi farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılıkların da yukarıda olduğu gibi doku farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.^{41,33}

2.9. Kanser- Kemoterapi İlişkisi:

Kemoterapide hedef, kanserde görülen hızlı büyüme ve çoğalmanın önlenmesi ve kanser hücrelerinin etkisiz hale getirilmesidir. Kanser tedavilerindeki temel sınıflandırmalardan bir tanesi olan anti-metabolit teoriye göre; DNA' nın yapı taşları olan ve pirimidin nükleotidlerinin sentez yolu değişik basamaklarda engellenerek malign hücrelerdeki DNA sentezinin engellenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla purin ve pirimidin nükleotidleri sentezinde yer alan, bazı anahtar enzimler hedef olarak seçilir.^{43,44}

Kemoterapinin tarihçesine baktığımızda, Woods ve Fildes, 1940 yılında sülfanamidlerin bakterilerde paraamino benzoikasitin kullanımını engellediğini ve etkilerini bu şekilde gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Böylece kemoterapide antimetabolit teori ortaya atılmıştır.^{45,48}

1948' de 2,6- diamino pürinin Lactobacillus casei' de adeninin kullanıldığı enzimatik reaksiyonu spesifik olarak engellemesi ile büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur.⁴⁵

Aynı yıllarda Hitching, 2,4-diaminopirimidinlerin L caseide folik asit kullanımını inhibe ettiğini bulmuştur.⁴⁹

1950' lerde Hitching bütün hücrelerin nükleik asitlere ihtiyaç duyduğunu ve hızla bölünen hücrelerde nükleik asit antagonistlerinin kullanılarak büyümenin durdurulabileceğini ileri sürmüştür.⁴⁵

Sloan Kattering Enstitüsünde 1951 yılına kadar 100' ün üzerinde yapılan çalışmalarda L.caseilerde 6-MP ve 6-TG ' nin pürin kullanımını engellediği tespit edilmiştir.⁴⁵ 6-MP daha sonra çocukluk çağı akut lösemilerinde kullanılmaya başlanılmıştır.^{45, 50}

Günümüzde ise 6-MP ile birlikte pek çok ilaç lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Pürin ve pirimidin bazlarının de novo sentez yolunun bu şekilde inhibe edilebileceği deneysel olarak tespit edilip inhibitör maddeler tedavide kullanılmaya başlanırken 1955 yılında Kornberg ve arkadaşlarının guanin fosforiboziltransferaz enzimini (HGPRT) bulurken, Greenberg ve Buchanan hipoksantinden inozin monofosfat (IMP) sentezini sağlayan salvage yolu ortaya çıkarmıştır.⁴⁵

Purin ve pirimidin metabolizması kanser hücrelerinde denge halinde değildir.

Genel anlamıyla bakıldığında kanser hücresinde; De novo ve salvage yolda görev yapan anahtar enzimlerin aktivitesi artarken,

katabolik yolda anahtar enzimlerin aktiviteleri tümör büyüme hızı ile paralel olarak azalmaktadır.^{53, 43} Bu durum kanser hücresinin genel davranış biçimi olarak kabul edilmektedir.

Anahtar enzimler genellikle aktiviteleri düşük olan yıkım ve sentez yollarını tek yönlü kontrol eden enzimlerdir. Bu enzimlerin aktiviteleri multiregülasyon mekanizmaları ile düzenlenmektedir.⁴⁴ Pürin metabolizmasında görev yapan, amidofosforibozil transferaz ve PRPP sentetaz enzimleri purin nükleotidlerinin sentezinde hız kısıtlayıcı basamaklardır.^{44,56} Pirimidin metabolizması açısından bakıldığında ise, aspartat transkarbomilaz, CTP sentetaz, CDP ve UDP redüktaz anahtar role sahiptir.

Kanser kemoterapisinde kullanılacak ilaçlar anahtar enzimleri hedef olarak seçer. Bu enzimleri inhibe eden çeşitli substrat analogları klinik ve deneysel olarak test edilmektedir. Lösemili hasta gruplarında uygulanan tedavi programlarında kullanılan bazı ilaçların etki mekanizmaları aşağıda kısaca belirtilmiştir.

Metotraksat (Ametopterin) : Timidilat sentezi için gerekli FH₄ 'ün oluşumunu sağlayan dihidrofolat redüktaz enziminin kompetitif inhibitörüdür. Ayrıca metotreksatın metabolitleri olan poliglutamil türevleri timidilat sentezi unkompetitif olarak inhibe ederler. Bu şekilde de timidilat sentezi inhibe olur.⁵⁹

6-Merkaptopürin (6- MP) , 6- Tiyoguanin (6-TG): Pürin analogu olan bu maddeler IMP oluşumunu inhibe ederek nükleotid sentezini inhibe ederler. Tiyoguanin 6- MP' den daha etkili ancak daha toksiktir.⁵³

5- Fluro urasil : Organizmada 5- Fluodeoksi üridilata (FdUMP) çevrilir. FdUMP ise dUMP' nin analogudur ve dUMP → dTMP sentezini katalizleyen Timidilat Sentazi inhibe ederek Timidilat sentezini inhibe eder.^{61,63}

Allopurinol : Hipoksantin analogu olan bu madde Ksantin oksidaz (XO) enzimini inhibe ettiği için hiperürisemi tedavisinde kullanılmaktadır. Ksantin oksidazı inhibe ettiği için kanser tedavisinde de kullanılmaktadır.

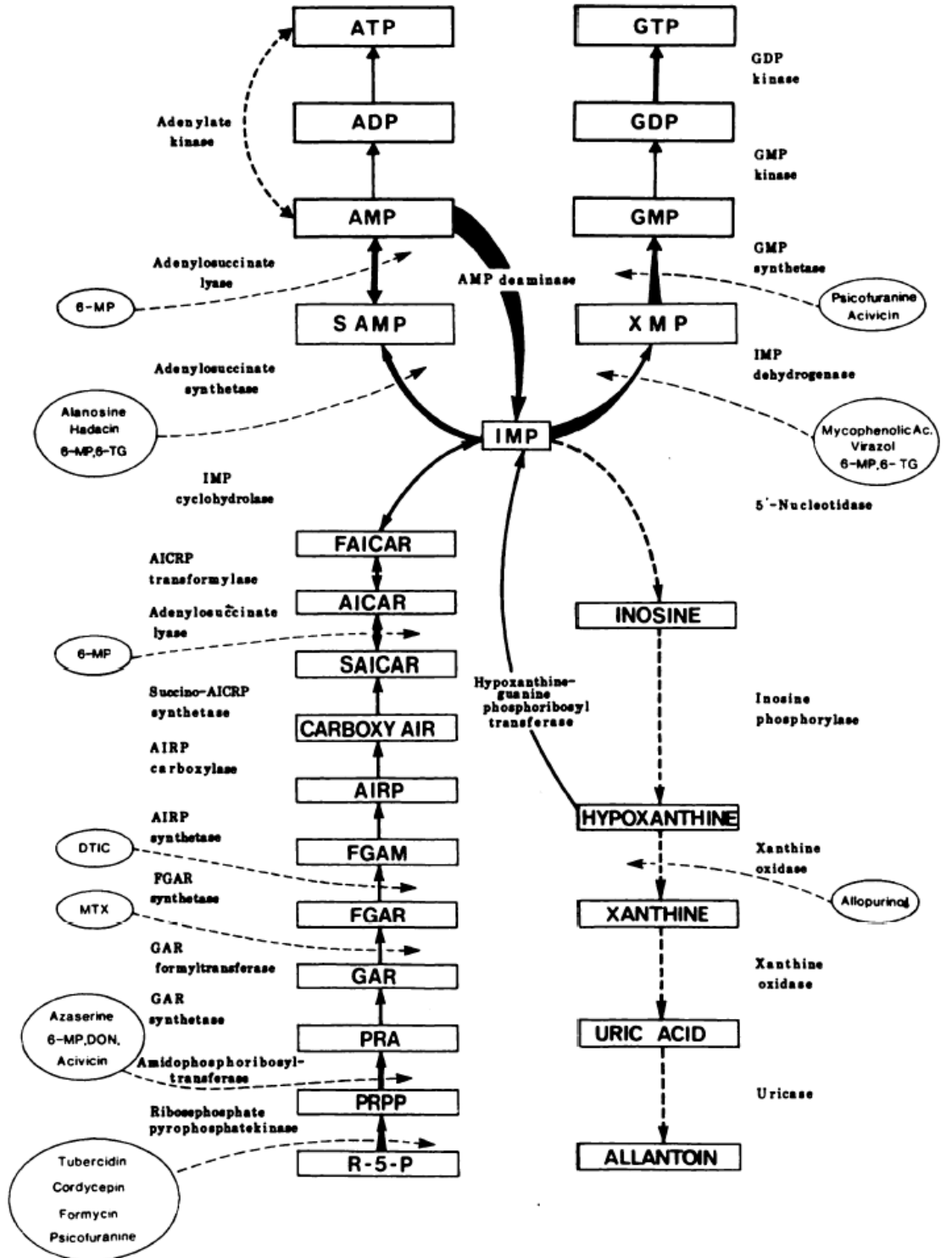
Tiazofurin : IMP dehidrogenaz enziminin inhibitörüdür. GTP ve dGTP konsantrasyonlarını baskılar ancak bu esnada HGPRRT aktivitesinin baskılanması gerektiği için yukarıda belirtildiği gibi genellikle Allopurinol ile birlikte kullanılır.⁶⁴

Hidroksiüre: CDP ve UDP redüktaz enzimlerini inhibe etmektedir.⁴³

Sitozin Arabinozid (Ara-C): Hidroksi üre gibi CDP ve UDP redüktazı inhibe etmektedir.⁴³

Asivisin : Glutamine amidotransferazların hızla büyüyen tümör hücrelerinde aktiviteleri artmaktadır. Asivisin glutamin antagonistidir. Formylglycinamidine ribonükleotide sentetaz, 5-phosphoribosil 1- pirofosfat amidotransferaz, CTP sentetaz , GMP sentaz ve CPS gibi glutamine amidotransferazları irrevesible olarak inhibe etmektedir.⁶⁸ Asivisin uygulanması lösemi, melanom ve çeşitli kanser türlerinde tümör büyümesini durdurmaktadır. Asivisin vermeye devam edildiğinde tümörü küçülttüğü ve kas kütlesini yenilediği görülmüştür. Ancak asivisinin gastrointestinal ve nörolojik yan etkileri bulunmaktadır.^{65, 66, 67,68}

Pürin metabolizmasında rol alan enzimler ile pirimidin biyosentezinde rol alan enzimler ve bu yola etki eden ilaçlar sırasıyla şekil 9 ve 10 da gösterilmiştir.



Şekil 9 :Pürin metabolizmasında rol alan enzimler ve ilaçların hedefleri ⁴⁴

Genel bilgilerden anlaşılaçağı üzere pürin ve pirimidin nükleotidlerin metabolizmasının anlaşılması DNA ve RNA metabolizması hakkındaki bilgilerimizin gelişmesine katkı sağlayacaktır. Özellikle DNA ve RNA' nın yapı taşları olan nükleotid metabolizmasındaki değışiklikler, bu metabolizmanın anahtar enzimleriyle ilişkilendirmek kanser hücrelerini metabolizmasını anlamak açısından değ er taşımaktadır. Kanser hücresinde artmış nükleotid ihtiyacından dolayı genel davranış biçimi olarak bu metabolizmanın de-novo sentaz ve salvage yollarını aktive olurken, yıkım yolunu baskılanmaya çalışılmaktadır. Bu değ işimin kanserin karakteristik bir davranış biçimi olup olmadığını anlamak klinikte teş his ve takip açısından önem taşıyabilir. Ayrıca hastalığın tedavisi esnasında hastanın remisyona girip girmediğini anlamanın bir yoluda pürin – pirimidin metabolizmasını takip etmekle olabilir. Nükleotid metabolizmasının başta kanser hastalığı olmak üzere viral ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde birer aracı olarak seçilmeside bu metabolizma hakkındaki bilgilerimizi geliştirmemiz gerektiğini olduğunu gözler önüne sermektedir. Pürin ve pirimidin metabolizmasını daha iyi anlamak bizlere özellikle hastalığın teş hisi, takibi, remisyon durumu ve tedavisine yönelik değ erli bilgiler sağlayacaktır

3. MATERYAL METOD:

3.1. Materyal:

Çalışmamızda ; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalına başvuru yapmış ve ilk tanısını adigeçen bilim dalında almış almış 13 hastadan tedavi öncesi ve sonrası alınan kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Bu hastaların kemik iliği mononükleer lökosit hücreleri çalışmamıza materyal olarak seçilmiştir.

3.1.1. Seçilen Hasta Grupları:

Çalışmamıza aldığımız AML ve ALL' li 13 hastanın yaşları ortalaması 43.4 ± 15.4 'dür. Akut miyeloblastik lösemi (AML)' li hasta grubuna dahil 10 hastanın 4 tanesi remisyone giremeyerek tedavi esnasında ölmüştür. Remisyona giremeyerek ölen 4 AML' li hastanın yaşları 36 ve 45 arasındadır. Yaşları ortalaması 43.5 ± 9.3 'dür. Remisyona giren AML' li 4 hastanın yaşları 34 ve 58 arasında değişmekte olup yaşları ortalaması 43 ± 11.2 'dir . İki AML' li hasta ise takipden çıkmıştır. 3 ALL' li hastadan bir tanesi remisyona girmeden ölmüştür. 2 tanesi remisyona girmiştir. Bu hastaların yaş ortalaması 30 ± 12.7 'dir.

3.1.2. Seçilen Hasta Grubunu Kullandığı İlaçlar:

Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları ABD/ Erişkin Hematoloji Bilim Dalında kullanılan Kemoterapik ilaçlar :

Flag- IDA Protokolü:

İdarubusin

Fludarabin

Sitozin Arabinozid

G- CSF

Hyper- CVAD Protokolü (Siklus 1, 3, 5, 7)

Uromitexan

Vinkristin

Doxorubicin

Deksametakson

Hyper- CVAD Protokolü (Siklus 2, 4, 6, 8)

Arabinozid- C

Metilprednisolon

Yüksek Doz ARA- c Protokolü:

Arabinozid- C

3.2. Kullanılan Cihazlar:

pH metre

Hassas Terazı

Homojenizatör

Karıştırıcı

Vorteks

Spektrofotometre

Su banyosu

Otomatik Transpipetler

Santrifüj

Plastik ve cam malzemeler

3.3. Kullanılan Metodlar:

3.3.1. Lökositleri Ayrılması :

Lökositlerin ayrılması için kullanılan method Boyum tarafından tarif edilen gradient santrifügasyon prensibine dayanmaktadır. Bu metod da farklı yoğunluktaki hücreler bir gradient çözeltisi üzerine tabakalandırılıp santrifüjlenerek ayrılmaktadır. Bu amaçla sücrozun epiklorhidrin polimeri olan Ficoll ile sodium diatrizole ' dan hazırlanmış olan steril Histopaque çözeltisi ($d = 1.077$) kullanılmıştır.⁵¹

3.3.1.1. Deneyin Yapılışı:

Çalışma grubu olarak kullanılan kemik iliği örnekleri heparinli tüplere alındı. Tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra 2000 g ' de 5 dakika santrifüj edilip üstte kalan plazmalar atıldı.

Dipte kalan sediment üzerine 5 ml PBS eklendi ve tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.

12 ml' lik plastik tüplere 3 ml histopaque konulup , sediment ve PBS karışımı histopaque üzerine tabakalandırıldı.

Bu tüpler açılır başlıklı santrifüjde dengelenerek 1000 g ' de 15 dakika santrifüj edildi.

Eritrosit ve granülositler daha yoğun olduklarından Ficoll ile agrege olup tüpün dibine çöktü. Çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu mononükleer hücreler Ficoll' ün üzerinde bir tabaka oluşturdu.

Bu tabakalar pastör pipet ile toplanıp, başka bir tüpe aktarılıp üzerine 5 ml PBS eklenip birkaç kez alt üst edildi. 1500 g' de 1 dak. santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Son santrifüj işlemi 3 kez tekrarlandı.

İşlem, tüplere 1'er ml PBS eklenip karıştırıldıktan sonra lam üzerine yayılıp boyanarak mikroskopik eritrosit olup olmadığı kontrol edildikten sonra bitirildi.

Eritrosit kontaminasyonu varsa hipotonik şokla eritrositler uzaklaştırılıp, lökositler bir kez daha yıkandı. Hipotonik şokla uzaklaştırma işleminde eritrositler kolayca hemoliz olurken daha dayanıklı olan lökositler bu işlemde etkilenmezler.

Mikroskopik olarak eritrosit kontaminasyonu olan tüplere 4' er ml buz soğukluğunda tridistile su ilave edildi. Yaklaşık 45 saniye tüpler hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı. 1 dak. Sonra üzerlerine 4' er ml , 1.89 g / dL konsantrasyonundaki NaCl çözeltisi eklenip ortam izotonik yapıldı. 1500 g de 5 dak. Santrifüj edilen tüpler yavaşça eğilip süpernatant döküldü. Dipteki kısım tekrar mikroskopik olarak kontrol edilerek PBS ile iki kez daha yıkandı. Son yıkamadan sonra 1' er ml PBS eklenerek, karıştırıldı.

Bu işlem sonucunda lökosit süspansiyonu elde edilmiş oldu.

3.3.1.2. Lökositlerin Homojenizasyonu:

ADA ve 5' NT enzimleri sitoplazmik enzimler olduklarından hücrelerin parçalanması ve enzimlerin serbest hale getirilmesi gereklidir.

Bu amaçla daha önce dondurduğumuz lökosit süspansiyonlarının bulunduğu tüpler çeşme suyu altında çözüldü daha sonra aynı süspansiyon hücrelerin parçalanması amacıyla homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenize edilen materyal 3000 devirde 10 dak. santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. Analizler için ayrılan süpernatant kullanılmıştır.

3.3.2. Protein Tayini:

Protein tayini için Lowry tarafından tarif edilen method kullanılmıştır.⁵²

Miktar tayini standart eğri üzerinden hesaplanarak elde edilmiştir.

Protein standartı olarak BSA (Sigma) kullanıldı. 0.02- 0.2 mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafik çizildi ve eğimden numunelerdeki protein miktarı hesaplanmıştır.

Metodun Prensipleri: Alkali ortamda proteinler Cu^{2+} ile Cu^{++} -protein kompleksi oluşturması ve bu kompleksin fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini) redükleyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

3.3.2.1. Reaktifler:

A reaktifi:0.5g.CuSO₄.5H₂O ve 1.0g.Na₃-Sitrat bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 100ml'ye tamamlanır.

B reaktifi:20g.Na₂CO₃ ve 4.0g.NaOH bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra litreye tamamlanır.

C reaktifi:50ml B çözeltisi + 1.0ml A çözeltisi karışımı.

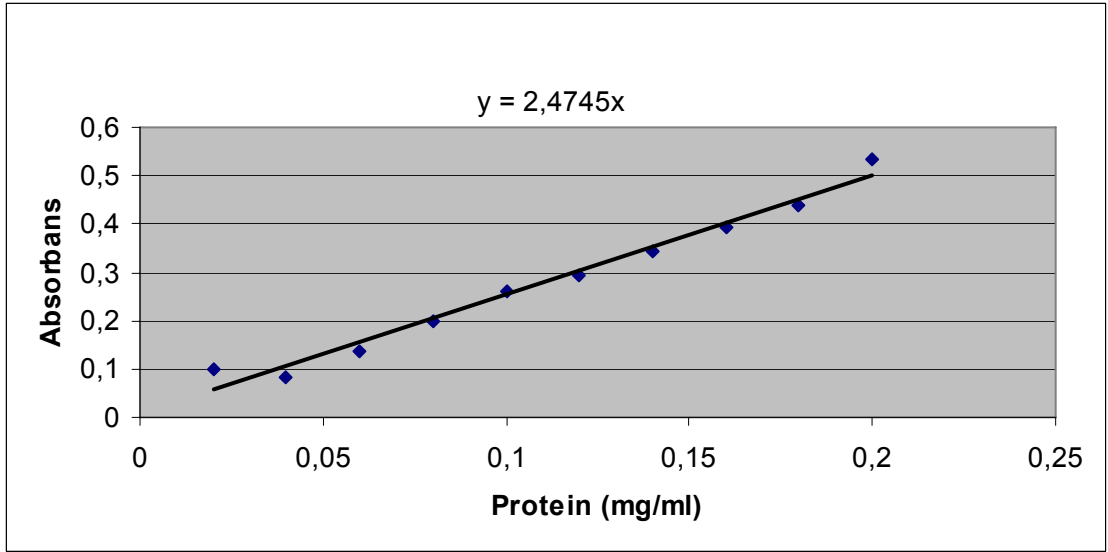
D reaktifi(Folin-Ciocalteau Çözeltisi):önceden hazırlanan reaktif deiyonize suyla eşit oranda dilue edilerek kullanılır.

3.3.2.2. Deneyin yapılışı:

Protein Tayini için aşağıdaki deney şeması kullanılmıştır.

	KÖR	NUMUNE
NUMUNE (µl)	–	10
SU (µl)	500	490
C Reaktifi (ml)	2.5	2.5
KARIŞTIRILIR , 5-10 dak. Beklenir.		
D Reaktifi (ml)	0.25	0.25

Ağzı kapalı olarak, karıştırılır, 30 dak. 25 ° C beklenir ve köre karşı 600 nm'de numune okunur.



Grafik 1: Protein Standart Grafiği

Hesaplama

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

$$\text{Protein (mg/ml)} := (\Delta\text{Absorbans} \times 0.404) \times \text{dilüsyon faktörü}$$

3.3.3. ADA Aktivitesinin Tayini:

3.3.3.1. Metodun Prensibi:

ADA aktivitesinin tayini için literatürde değişik metodlar mevcuttur. Biz çalışmamızda uygunluğu ve tekrar edilebilirliği açısından Guisti tarafından tarif edilen metodu kullandık.²⁰

Literatürde kullanılan diğer metodların prensipleri aşağıda verilmiştir:

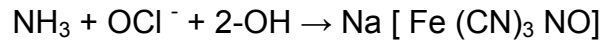
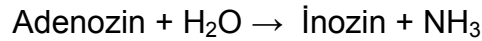
1. Adenozinin C¹⁴ ve H³ gibi radyoaktif maddelerle işaretlenip, işaretli adenozinin ADA etkisiyle inozine dönüşümünün radyokimyasal olarak ölçülmesi,^{11,53}

2. ADA' nın katalizlediği reaksiyonda adenozinin inozine değişmesi esnasında meydana gelen optik dansitedeki azalışın spektrofotometrik olarak takip edilmesi,^{54,55}

3. ADA' nın katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan NH₃ miktarının ölçülmesi,

ADA aktivitesi tayini için kullandığımız metodun prensibi;

ADA adenozinden inozin oluşumunu katalize eder. Bu sırada amonyak açığa çıkar. Açığa çıkan amonyak, sodyum hipoklorid ve alkali ortamda fenol çözeltisiyle mavi renkli indofenol bileşiğine çevrilir. Bu reaksiyonda sodyum nitropurissiyat katalizör olarak görev yapar. Amonyak konsantrasyonu oluşan indofenol ile orantılıdır.



3.3.3.2. Reaktifler:

1. 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 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ distile su ile çözüldü ve hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

2. Adenozin çözeltisi (21 mN Adenozin, 50mM Fosfat Tamponu pH = 6.5)

25 ml' lik balon jojeye 140 mg adenozin konulup üzerine 15 ml. Fosfat tamponu ilave edildikten sonra sıcak su banyosuna yerleştirilir. Arasına karıştırılarak tamamen çözülünceye kadar sıcak su banyosunda bekletilir. Ardından musluk suyu altında soğutulur, pH' sı 6.5 ' a ayarlanır ve fosfat tamponu ile 25 ml' ye tamamlanır.

3. Amonyum sülfat stok çözeltisi (15 mM) : 1.982 g anhidr amonyum sülfat, distile su ile çözülerek hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

4. Amonyum sülfat standart çözeltisi : 0.5 ml. Amonyum sülfat standart çözeltisinden alınıp fosfat tamponuyla 100 ml' ye ayarlanır.

5. Fenol- Nitroprussiyat çözeltisi (106 mM Fenol, 0.17 mM Na nitroprussiyat) 10 gr. Fenol ve 50 mg Na nitroprussiyat 500 ml distile suda çözülür ve hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

6. Alkali hipoklorit çözeltisi (11 mM NaOCL, 125 mM NaOH)

125 ml 1 N NaOH ve 16.4 ml %5 hipoklorit çözeltisi karıştırılıp hacmi 1000 ml' ye tamamlanır. (Kullanılan hipoklorit çözeltisi yaklaşık % 5 w/v NaOCL ihtiva etmektedir. Buradaki klor miktarı tayin edilerek % 5 klor bulunduran çözelti hazırlanmış ve bu çözelti kullanılmıştır.)

3.3.3.3. Deneyin Yapılışı :

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

Reaktifleri	Standart Körü	Standart	Numune Körü	Numune
Fosfat Tamponu	1.0	—	—	—
Tamponlanmış Adenozin Çözeltisi	—	—	1.0	1.0
Amonyum Sülfat Standart Çözeltisi	—	1.0	—	—
Numune	—	—	—	0.05
Distile Su	0.05	0.05	—	—

Tüpler karıştırılıp ağızları parafilmle kapatılır, 37 °C su banyosunda 60 dakika inkübe edilir.

Reaktifler	Standart Körü	Standart	Numune Körü	Numune
Fenol nitroprussiyat çözeltisi	3.0	3.0	3.0	3.0
Numune	—	—	0.05	—
Alkali hipoklorit çözeltisi	3.0	3.0	3.0	3.0

Tüpler karıştırılıp 37 °C su banyosunda 60 dakika inkübe edilir ve 628 nm.de distile suya karşı okunur.

Bütün çözeltiler 0-4 °C'de saklanmalıdır. 3 ve 5 nolu reaktifler kahverengi şişede saklanmalıdır. 5 nolu reaktifin rengi yeşil veya kahverengiye dönerse yeniden hazırlanılmalıdır. Absorbans 1.00 ' in üstüne çıkarsa distile su ile 2-5 kez seyreltilerek deney tekrarlanmalıdır.

Hesaplama:

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

Spesifik aktivite ü/ mg protein olarak verilmiştir.

Bekleme sırasında meydana gelebilecek hatalar olabileceğinden bütün aktivite çalışmaları, hücreler çalışmaya hazırlandıktan sonra hemen yapılmıştır.

3.3.4. 5' Nükleotidaz Aktivitesinin Tayini

3.3.4.1. Metodun Prensibi

5' NT aktivitesi tayini Kyaw A. ve arkadaşlarının tarif ettiği inorganik fosfat tayini metoduna göre yapıldı.

Bu metoda göre, asidik ortamda 5' AMP' den hidroliz olan inorganik fosfor, amonyum molibdat ile fosfo amonyum molibdat kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrik olarak 375 nm' de okunarak, standart KH_2PO_4 grafiğinden, ayrılan inorganik fosfor miktarı belirlenmiştir.⁶⁹

3.3.4.2. Reaktifler:

1. Amonyum molibdat solusyonu (2.5 g %): 2.5 g Amonyum molibdat (NH_4)₆Mo₇O₂₄.4 H₂O 30 ml 10 N H₂SO₄ içerisinde çözülür. 100 ml su ile dilue edilir.

2. Tritron X-100 solusyonu : Tritron X-100 su ile çözülür, final volum 100 ml 'ye tamamlanır.

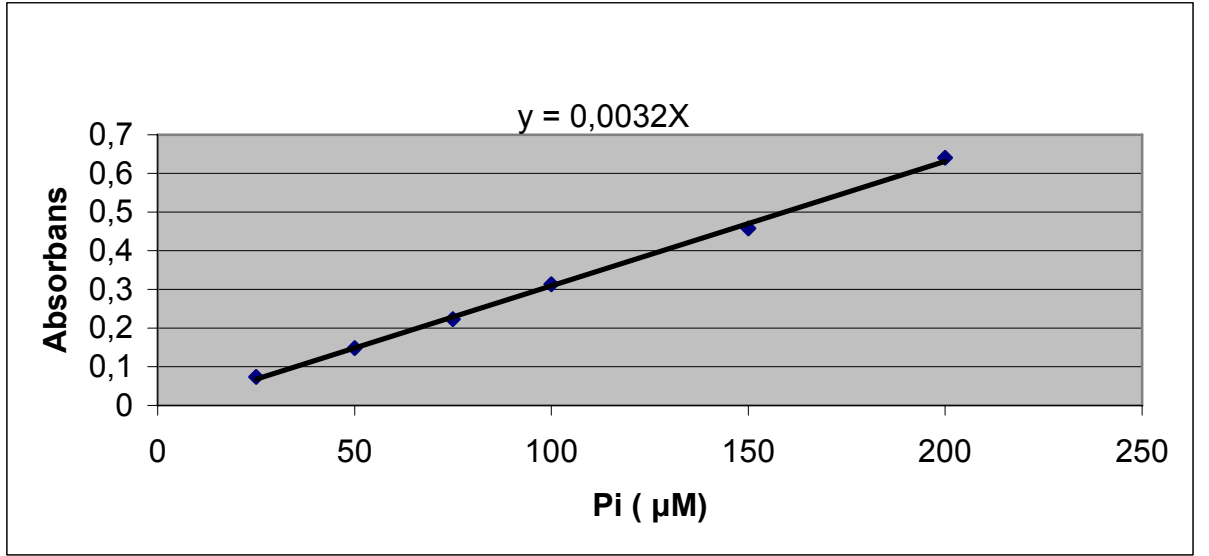
3. Fosfat standart solüsyon: Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) su ile çözülür, final volüm 100 ml' ye tamamlanır.

4. 5' AMP

5. 50 mM, pH : 7.45 Tris- HCL tampon, 10 mM MgSO₄ , 60mM NaCl, 5mM KCl ve 6mM NaN₃

3.3.4.3. Deneyin yapılışı:

0.5 ml numune üzerine 1.5 ml Triton x-100, 1.5 ml amonyum molibdat eklenir , karıştırılır. 10 dakika beklendikten sonra 375 nm ' de köre karşı okunur.



Grafik 2: Pi Standart Grafiği

Δ Absorbans

$$\text{Aktivite}(\ddot{U}/l) = \frac{\Delta \text{Absorbans}}{\text{Eğim}} \times \text{Xdilüsyonfaktörü}$$

Aktivite ($\ddot{U}/l$): Δ Absorbansx 31.25 x dilüsyon faktörü' den hesaplanır.

Spesifik aktivite $\ddot{u}/$ mg protein olarak verilmiştir.

BULGULAR :

4.1. Akut Lösemili Hastaların Tedavi Öncesi (TÖ) ve Tedavi Sonrası (TS) Kemik İliğinde ADA ve 5'NT Aktiviteleri

Akut miyeloblastik lösemi (AML)' li hasta grubuna dahil 10 hastanın ve akut lenfositik lösemi (ALL) ' li hasta grubuna dahil 3 hastanın tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) kemik iliği mononükleer hücrelerinde deney sonucu elde edilen ADA ve 5' NT enzim aktivitelerine ait değerler Tablo. 3' de verilmiştir.

Akut miyeloblastik lösemi (AML)' li hasta grubuna dahil 10 hastanın 4 tanesi remisyona giremeyerek tedavi esnasında ölmüştür. İki AML' li hasta ise takipden çıkmıştır. Bu grupta toplam 4 hasta remisyona girebilmiştir. 3 ALL' li hastadan bir tanesi remisyona girmeden ölmüştür. 2 tanesi remisyona girmiştir.

Tedavi öncesi 5' NT enzim aktivitelerine bakıldığında en düşük değer spesifik aktivite cinsinden 0.29, en yüksek değer 45.04' dir. Elde edilen sonuçlara göre hastaların 5' NT değerleri arasında ciddi farklılıklar olduğu gözlenmektedir. Grubun $X \pm SD$ değerleri ise 1.98 ± 1.51 ' dir. Bu grupta tedavi sonrası enzim aktiviteleri en düşük 0.92, en yüksek 5.70 bulunmuştur. $X \pm SD$ değerleri ise 3.31 ± 2.39 ' dur

Tedavi öncesi ADA enzim aktivitelerine bakıldığında en düşük değer spesifik aktivite cinsinden 5.6, en yüksek değer 221.8' dir. Sonuçlar 5' NT' de olduğu gibi ciddi farklılıklar göstermektedir. Grubun $X \pm SD$ değerleri 78.94 ± 60.79 olarak bulunmuştur. Bu grupta tedavi sonrası enzim aktiviteleri en düşük 6.53, en yüksek 13.9' dur. $X \pm SD$ değerlerine bakıldığında 10.22 ± 3.68 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlardan anlaşılabacağı üzere her iki enzimin aktivite değerleri hastadan hastaya çok ciddi farklılıklar göstermektedir.

Tablo 3. Akut lösemili hastaların tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) kemik iliğinde ADA ve 5' NT aktiviteleri

	HASTA ADI		Tedavi Öncesi Enzim Aktiviteleri		Tedavi Sonrası Enzim Aktiviteleri	
			5'NT (SA)	ADA(SA)	5'NT (SA)	ADA (SA)
1	N.M.	AML	45.04	221.8	H.T.Ç.	H.T.Ç.
2	S.G.	AML	1.63	9.7	A.Y.	A.Y
3	A.B..	AML	0.7	47.9	0.92	6.53
4	N.İ.Y.	AML	5.37	57.6	A.T.Y.	A.T.Y.
5	R.Ç.	ALL	A.Y.	156.3	A.T.Y.	A.T.Y.
6	S.Ç.	AML	1.81	134	H.T.Ç.	H.T.Ç.
7	N.Y.	ALL	1.94	130	Ex	Ex
8	R.Y.	AML	A.Y.	5.6	Ex	Ex
9	F.Y.	AML	A.Y.	67.8	A.T.Y.	A.T.Y.
10	G.A..	AML	0.29	172	Ex	Ex
11	A.Ü.	ALL	A.Y.	0.28	5.70	13.9
12	Ş.Y.	AML	A.Y.	A.Y.	Ex	Ex
13	L.A.	AML	2.12	8.55	Ex	Ex

$\bar{X} \pm SD: 1.98 \pm 1.51$ $\bar{X} \pm SD: 78.94 \pm 60.79$ $\bar{X} \pm SD: 3.31 \pm 2.39$ $\bar{X} \pm SD: 10.22 \pm 3.68$

S.A.: Spesifik Aktivite : ü / mg.protein

A.Y.: Aktivite Yok

H.T.Ç.: Hasta Takipten Çıktı

A.T.Y.:Aktivite Tayini Yapılamadı

4.2. Ölen Akut Myelositer Lösemi'li (AML) Hastalar' ın Kemik İliğinde 5' NT ve ADA Enzimlerinin Aktiviteleri

Çalışmamızda remisyona giremeyerek ölen 4 AML' li hastanın başlangıçdaki 5' NT değerleri spesifik aktivite cinsinden en düşük 0.29, en yüksek 2.12 olarak bulunmuştur. $X \pm SD$ değerleri ise 1.20 ± 0.92 ' dir. Aynı hastaların başlangıçdaki ADA enzim değerleri spesifik aktivite cinsinden en düşük 5.6 ve en yüksek 172 ' dir. $X \pm SD$ değerleri ise 70.8 ± 1.48 olarak bulundu. Ölen akut myelositer lösemi'li (AML) hastaların kemik iliğinde 5' NT ve ADA enzimlerinin aktiviteleri tablo 4 de verilmiştir.

Tablo 4. Ölen akut myelositer lösemi'li (AML) hastaların kemik iliğinde 5' NT ve ADA enzimlerinin aktiviteleri

HASTA ADI			5'NT (SA)	ADA (SA)
R.Y.	AML	EX	A.Y.	5.6
G.A..	AML	EX	0.29	172
Ş.Y.	AML	EX	A.Y.	A.Y.
L.A.	AML	EX	2.12	8.55

$\bar{X} \pm SD: 1.20 \pm 0.92$ $X \pm SD: 70.8 \pm 1.48$

S.A.: Spesifik Aktivite :ü / mg.protein

A.Y.: Aktivite Yok

4.3. Ölen Akut Lenfositör Lösemili 'li (All) Hastanın 5'NT ve ADA Enzimleri aktiviteleri:

Ölen Akut Lenfositör Lösemili 'li (All) Hastanın 5' NT ve ADA Enzimleri aktiviteleri sırasıyla spesifik aktivite cinsinden 1.94 ve 130 olarak tespit edilmiştir. Ölen Akut Lenfositör Lösemili 'li (All) hastanın 5' NT ve ADA enzimleri aktiviteleri Tablo: 5 de verilmiştir.

Tablo 5. Ölen Akut Lenfositör Lösemili 'li (All) hastanın 5' NT ve ADA enzimleri aktiviteleri

HASTA ADI			5'NT (SA)	ADA (SA)
N.Y.	ALL	EX	1.94	130

S.A.: Spesifik Aktivite : ü / mg.protein

4.4. Remisyona Giren AML'li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi Ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri

Remisyona giren 4 AML' li hastanın remisyon öncesi ADA enzim aktivitesi spesifik aktivite cinsinden en düşük 9.7 ve en yüksek 67.8 olarak bulunmuştur. $X \pm SD$ değerleri ise 57.77 ± 8.12 ' dir. Bu hastaların remisyon öncesi ADA değerleri birbirinden farklılıklar göstermektedir Remisyon sonrası bir hastanın ADA enzim aktivitesi 6.53 olarak bulundu. Remisyona giren 4 AML' li hastanın remisyon öncesi 5' NT enzim aktiviteleri spesifik aktivite cinsinden en düşük 0.7 ve en yüksek 5.37 ' dir. $X \pm SD$ değerleri 3.50 ± 1.87 olarak bulunmuştur. Remisyon sonrası 5' NT aktivitesi bir hastada 0.92 olarak tespit edilmiştir. Remisyona giren AML'li hastaların kemik iliğinde remisyon öncesi ve sonrası ADA ve 5' NT enzimleri aktiviteleri tablo 6 da verilmiştir.

Tablo 6. Remisyona Giren AML'li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi Ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri

HASTA ADI	ADA (SA) Remisyon Öncesi	ADA (SA) Remisyon sonrası	5'NT (SA) Remisyon öncesi	5'NT (SA) Remisyon Sonrası
S.G.	9.7	A.Y.	1.63	A.Y.
A.B.	47.9	6.53	0.7	0.92
N.İ.Y.	57.6	A.T.Y.	5.37	A.T.Y.
F.Y.	67.8	A.T.Y.	A.Y.	A.T.Y.

$X \pm SD: 57.77 \pm 8.12$

$X \pm SD: 3.50 \pm 1.87$

S.A.: Spesifik Aktivite : ü/ mg.protein

A.Y.: Aktivite Yok

A.T.Y.:Aktivite Tayini Yapılamadı

4.5. Remisyona Giren ALL' li Hastaların Kemik İliğinde Remisyon Öncesi Ve Sonrası ADA ve 5' NT Enzimleri Aktiviteleri

Remisyona giren ALL' li hastaların kemik iliğinde remisyon öncesi ADA enzim aktivitesi spesifik aktivite cinsinden 0.28 ve 156.3 olarak bulunmuştur. $X \pm SD$ değerleri ise 78.29 ± 78.00 ' dir. Remisyon sonrası ADA aktivitesi ise bir hastada 13.9 olarak tespit edilmiştir. Bu hasta grubunda hastaların enzim değerleri ciddi farklılıklar göstermektedir . Aynı hasta grubunda 5' NT enzim aktiviteleri remisyon öncesi bulunamazken , remisyon sonrası bir hastada 5.70 olarak tespit edilmiştir. Remisyona giren ALL' li hastaların kemik iliğinde remisyon öncesi ve sonrası ADA ve 5' NT enzimleri aktiviteleri tablo 7 de verilmiştir.

Tablo 7. Remisyona giren ALL' li hastaların kemik iliğinde remisyon öncesi ve sonrası ADA ve 5' NT enzimleri aktiviteleri

HASTA ADI	ADA (SA) Remisyon öncesi	ADA (SA) Remisyon sonrası	5'NT (SA) Remisyon öncesi	5'NT (SA) Remisyon sonrası
R.Ç.	156.3	A.T.Y.	A.Y.	A.T.Y.
A.Ü.	0.28	13.9	A.Y.	5.70

$\bar{X} \pm SD: 78.29 \pm 78.00$

S.A.: Spesifik Aktivite : ü/ mg.protein

A.Y.: Aktivite Yok

A.T.Y.:Aktivite Tayini Yapılamadı

4.6. Akut Lösemili Hastaların Kemik İliği Enzim Aktivitelerinin Tedavi Öncesi Ve Sonrası Korelasyon İlişkisi

ADA ve 5' NT arasında tedavi öncesi pozitif korelasyon varken bu ilişki tedavi sonrası negatif korelasyona dönmüştür. Akut lösemili hastaların kemik iliği enzim aktivitelerinin tedavi öncesi ve sonrası korelasyon ilişkisi tablo 8' da verilmiştir.

Tablo 8: Akut lösemili hastaların kemik iliği enzim aktivitelerinin tedavi öncesi ve sonrası korelasyon ilişkisi

N=7	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI
ADA-5' NT	$r = 0.9795$	$r = - 1.00$

5. TARTIŞMA :

Kanser hücrelerinin biyokimyasal mekanizmaları normal hücreyle karşılaştırıldığında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların sebebi kanser hücrelerinin genetik programının değişimiyle ilişkilidir. Özellikle yeniden proglanmaya bağlı olarak ortaya çıkan genetik değişikliklerin yansımaları gen ekspresyonunun değişimi ve buna bağlı olarak proteinlerin miktar ve aktivitelerindeki değişiklikler olarak gözlemleniyoruz. Bu konuda ortaya çıkan değişiklikler Weber' in "Kanser hücrelerindeki önemli metabolik yolların yeniden regülasyonu" olarak açıkladığı görüşleriyle uyumludur. Kanser hücrelerindeki metabolik yolların değişimine örnek olarak özellikle pürin ve pirimidin metabolizmasındaki değişikliklerin incelenmesi bizlere konunun anlaşılması hakkında bilgi vermektedir. Kanser hücrelerindeki metabolik değişiklikler genellikle anahtar enzim aktivitelerindeki yeniden düzenlenmeyle açıklanmaktadır. Anahtar enzimler yapım ve yıkım yollarını kontrol eden ve metabolizmanın düzenlenmesini değişik mekanizmalarla kontrol eden proteinlerdir.⁵³

Kanser hücrelerinde pürin ve pirimidin metabolizmasına bakıldığında ise; her iki metabolik yolun de-novo veya salvage yollarının anahtar enzimlerinin aktiviteleri artarken yıkım yolunun enzim aktivitelerinin baskılanmaya çalışıldığı gözlenmektedir. Bu değişiklik genel anlamıyla kanser hücrelerinin ihtiyacı olan nükleotid havuzunu korumaya yöneliktir. Bu korumanın amacı ise kanser hücrelerinin ihtiyacı olan nükleotid havuzunun ve dolayısıyla nükleik asit sentezinin regülasyonu ile ilişkilidir.

Çalışmamızda aktiviteleri ölçülen adenozin deaminaz (ADA) ve 5' Nükleotidaz (5' NT) enzimleri özellikle pürin nükleotid seviyelerini regüle etmeleri bakımından önem taşımaktadırlar.^{53, 78} 5' NT hem pürin hem de pirimidin metabolizması açısından düzenleyici rol oynarken , ADA daha spesifik olarak adenozinin hücre içi regülasyonu açısından önemlidir. Literatüre bakıldığında her iki enzimden özellikle ADA' nın genetik seviyede yeniden regülasyonu veya aktivitesindeki baskılanması söz konusu olduğunda hücrede bu durumun ciddi metabolik sonucu olduğu gözlenmektedir.ADA inhibisyonunu açıklayan biyokimyasal mekanizmalar içerisinde en önemlisi; ADA inhibisyonunun özellikle dATP artışına yol açması ve artan dATP seviyelerinin ise ribonükleotid redüktazın inhibisyonuna yol açmasıdır. Bu inhibisyonun klinik önemi ise kombine immün sistem yetmezliğinin ortaya çıkmasıdır. ADA enzimi pürin metabolizması açısından bakıldığında bir önemli rolde hücre içi adenozin seviyelerini ayarlamasıdır.Literatürde enzimin yıkım veya salvage yolu olabileceğine ait değişik görüşler mevcuttur.Bu konuda net bir görüş birliği mevcut değildir.Bu görüş farklılıkların sebebi değişik kanser türlerinde ADA aktivitesini artmış veya baskılanmış bulunmasıyla ilişkilidir.Genel anlamıyla yıkım enzimi olarak algılanan

ADA enzimi bazı araştırıcılar tarafından salvage yol enzimi olarak değerlendirilmektedir.^{14,15,16,17,18,19}

5' NT enzimi hem n kleozidlerin hücre içi konsantrasyonu düzenlenmesi hem de hücre içine adenosin girişini regüle etmesi metabolizma açısından çok önemlidir.^{12,21} Ayrıca son yıllarda enzimin sitozolik formunun fosfotransferaz aktivitesinin tespiti enzimi prelinik ve klinik alanda daha ilginç hale getirmektedir.⁶⁴ 5' NT' de ADA gibi nükleotidlerin hücre içi konsantrasyonlarını ayarlaması bakımından hayati önem taşır. Ayrıca, 5' NT enzim eksikliğinin hemeolitik anemiyle ilişkilendirilmesinde eritrosit içi nükleotid metabolizması açısından önem taşıdığını göstermektedir.^{64, 79}

Literatür bilgilerine bakıldığında, pürin ve pirimidin metabolizmasında rol alan ve anahtar enzim olma özelliklerini taşıyan PRPP sentetaz, aspartat transkarbomilaz , IMP dehidrogenaz, ksantin oksidaz, timidin fosforilaz enzimlerinin sentez veya yıkım yolu enzimleri olup olmadığıyla ilgili bir tartışma bulunmamaktadır.⁵³

Buna karşılık kanserle ilgili olarak yapılan çalışmalarda 5'NT ve ADA enzim aktivitelerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılık hastalığın tipi, tümörün derecesi veya enzimin izoenziminin farklı davranış biçimleriyle ilişkili olabilir. Yapılan  alışmalarda Hodgkin hastalığında ve oral kanserli hastalarda ADA aktivitesinin artarken , kolorektal tümörlerde ve laryngeal kanserlerde ise baskılandığını g r lm ştir.^{1, 27, 38}

Benzer sonuçlar 5' NT içinde geçerlidir. Kolon kanserinde 5' NT aktivitesi artarken, Hodgkin hastalığında 5' NT aktivitesi baskılanmıştır. Oral ve laryngeal kanserli hastalarda ise 5' NT enzim aktivite değerlerinde değişiklik görülmemiştir.^{1,29, 38}

Sonuçların farklılığı genellikle kanser hücresinin yeniden programlanmasıyla ilişkili olabilmektedir. Araştırıcılar bu farklılığı her iki enzimin ilgili kanser hücresindeki davranış biçiminin farklılığına bağlamaktadır. Her iki enzim daha önce bahsedildiği gibi kanserin türünün farklılığına göre salvage veya yıkım yolu enzimi gibi davranabilmektedir.

Çalışmamızda  rnek olarak seçilen kemik iliği, lösemilerin direkt hedefi olması bakımından enzimatik mekanizmalarla ilgili açıklamalarımızı daha kıymetli hale getirmektedir. Literatürde hastaların kemik iliği mononükleer hücrelerinde pürin veya pirimidin metabolik yolun enzim aktivitelerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum çalışmamızı kanser metabolizmasının anlaşılması bakımından değerli kılmaktadır. Kemik iliği çalışmamızı değerli kılan bir başka durum ise hastalığının ilk teşhisini almış ve daha önce herhangi bir

kemoterapi kullanmamış hastaların tedavi öncesi ve remisyona girdikten sonraki kemik iliği enzim aktivitelerinin tayininin yapılmasıdır. Bu durum yine incelenen konu açısından literatüre sağlanan bir başka yeniliktir. Çalışmamız kanser metabolizmasını anlamının yanısıra enzim aktiviteleri üzerine kemoterapinin genel etkisini açıklaması bakımından da faydalı bilgiler verecektir.

Çalışmamızda araştırılan 5'NT ve ADA enzimlerinin lösemili hastalardaki davranış biçimi bu hastalarda kemik iliği hücreesindeki yeni progranmayı göstermesi bakımından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda seçilen hastaların materyalinin kemik iliği olması ve hiçbir kemoterapi almamış olmaları gibi kriterler hasta sayısını sınırlandırmıştır. Bu sınırlandırma çalışmanın ileride genişletilmesi gerekliliğininde ortaya koymaktadır. Özellikle akut myeloblastik lösemili (AML) 10 hastanın 4 tanesinin tedavi esnasında remisyona giremeyerek ölmesi ve 2 AML' li hastanın tedavi dışına çıkması vaka sayısını azaltmıştır. Hastaların kemoterapi sırasında hayatlarını kaybetmeleri bu tür çalışmaların vaka sayısını sınırlandıran en önemli sebeplerden bir tanesidir. Ayrıca çalışmamızda, teşhisi ALL olan 3 hastanın 1 tanesi remisyona girmeden ölmüş ve diğer ikisi ise tedaviye cevap verip remisyona girmiştir.

Hastalar total olarak (n = 13) değerlendirildiğinde 5' NT' nin değerlerinin (SA) tedavi öncesi $X \pm SD:1.98 \pm 1.51$ olan değerlerinin tedavi sonrası $X \pm SD:3.31 \pm 2.39$ çıkması 5' NT' nin lösemilerde genel anlamıyla tedaviye cevap olarak aktivitesinin arttığı bilgisini vermektedir. Bu sonuçlara göre 5' NT aktivitesi ilaç tedavisinden etkilenmemiştir. Aksine genel anlamda 5' NT aktivitelerinin artışı kemoterapiyle karşı karşıya kalan enzimin kanserli hücrede aktif olarak bir yıkım yolu enzimi gibi davranma eğilimini vermektedir. Tedavi sonrası ise bu davranış karakterini değiştirdiği gözlenmektedir. Bu değişimin sebebi kullanılan kemoterapinin protein veya DNA seviyesindeki etkisiyle olabilir.

ADA aktivitesi ise 5' NT aktivitesinin tersine tedavi öncesine göre baskılanmıştır. ($X \pm SD:78.94 \pm 60.79$ 'a $X \pm SD:10.22 \pm 3.68$). Bu haliyle her iki enzim birbirine zıt davranış biçimi göstermektedir. Tedavi sonrasındaki bu negatif ilişki çok kuvvetli bir korelasyon göstermektedir.

Çalışmayı genel anlamıyla lösemili hasta grubu yerine AML ve ALL olarak ikiye ayırmak yorum açısından daha anlamlıdır. Özellikle iki farklı lösemi türünün davranış farklılıkları enzim aktivitelerindeki farklılıkları yorumlamak bakımından da daha uygundur.

Hastaları gruplara ayırıp elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde ise yorumlarında farklılık gösterdiği gözlenmektedir.

Remisyona giren AML' li hastaların (n = 4) 5' NT' aktivitelerinin tedavi öncesi değerlerinin $X \pm SD: 3.50 \pm 1.87$ olmasına rağmen remisyon sonrası enzim aktivitelerinin ölçülemediği görülmektedir. Bu sonuç enzim aktivitesinin ilaç tedavisi esnasında baskılanmış olması veya aktivitenin remisyon esnasında yeniden düzenlendiği fikrini akla getirmektedir. AML açısından bu ilişki genel lösemi grubu şeklinde yapılan gruplandırmanın tersi bir sonuçla karşılaşmamıza yol açmıştır. AML' li hastaların kemik iliğinde 5' NT' nin salivage yol enzimi gibi çalıştığı gözlenmektedir. Bu ilişki daha önce bahsedildiği gibi tedavi sonrası kemoterapinin enzimi baskılamasıyla da ilişkili olabilir. Bu durum bize kanser hastalarında genelleme yapma yerine spesifik olarak hücre tipine göre tanımlama yapmanın daha doğru olduğunu göstermektedir. AML' de 5' NT değerlerine benzer bulgu ADA içinde geçerlidir. $X \pm SD: 57.77 \pm 8.12$ olan tedavi öncesi değerler yine aktivitelerin tayin edilmemesiyle sonuçlanmıştır. AML ' de elde edilen bulgular her iki enzimin özellikle tedavi sonrası baskılanma eğilimi taşıdığı yönündedir. Bu sonuçlar enzim aktivitelerinin AML' li hasta gruplarında ilaç tedavisiyle baskılandığı düşüncesinin daha anlamlı olacağını düşündürmektedir.

Literatürde kemik iliği ile ilgili sonuçlar bulunamadığı için bu konuda yapılan diğer çalışmalar gözden geçirilmiştir. Sağlıklı bireylerin B cell ve T cell hücrelerinde yapılan çalışmalarda 5' NT değerleri $95.96 \text{ nmol/ h / } 10^6$, $9.25 \text{ nmol/ h / } 10^6$ tayin edilirken, diğer taraftan lösemili hastaların B ve T cell hücrelerinde 5' NT değerleri $1.13 \text{ nmol/ h / } 10^6$ ve $1.31 \text{ nmol/ h / } 10^6$ olarak tespit edilmiştir.²⁶

Sağlıklı bireylerin lenfositlerinde ADA değerleri ise 575 nmol/ h / mg olarak bulunurken, KLL' li hastalarda ADA değerleri 316 nmol/ h / mg olarak bulunmuştur.⁸⁰ Başka bir çalışmada ise kanserli kolorektal dokuda ADA değeri $614.06 \text{ nmol/ h/ g}$ doku, 5' NT değeri ise 61.61 nmol/ h/ g doku olarak bulunurken, kanserli dokuya yakın dokuda ADA değerleri 428 nmol/ h/ g doku, 5' NT değeri ise 37.29 nmol/ h/ g doku, kanserli dokuya uzak dokuda ise ADA $399.39 \text{ nmol/ h/ g}$ doku, 5' NT değeri ise 33.10 nmol/ h/ g olarak tespit edilmiştir.²⁷

Kolon dokularında yapılan başka bir çalışmada da kanserli dokularda ADA ve 5' NT değerleri sırasıyla 12.66 mIU/ mg ve 20.17 mIU/ mg olarak elde edilmiştir.²⁹

Bu bilgilerden anlaşılacağı gibi 5' NT ve ADA enzim aktivite değerleri kanserli hastalarda tümörün cinsine göre değişmektedir. Ayrıca kemoterapi sonrası remisyona giren hasta

gruplarına ait herhangi bir bulgu olamadığından sonuçlarımızı diğer bulgularla karşılaştırmamız mümkün olmamıştır

Ölen AML' li hastaların (n:4) 5' NT enzim aktivite değerleri açısından remisyona girenlerle karşılaştırıldığında, remisyona giren hastalarda $SA = X \pm SD: 3.50 \pm 1.87$ değerine karşılık AML' li ölen hastalardan ikisinde aktivite bulunmaması ve diğer ikisinde ise aktivite değerlerinin spesifik aktivite cinsinden; $SA = X \pm SD: 1.20 \pm 0.92$ bulunması enzim aktivitelerinin bireysel olarak farklılıklar gösterebileceğinin ifadesidir. Özellikle gelecek dönemlerde geniş hasta gruplarıyla yapılacak olan çalışmalarla bu farklılığın gözlenmesi bizlere hastalığın remisyon sürecine girip girmemekte 5' NT' nin bir gösterge olup olamayacağı hakkında daha detaylı bilgi verecektir.

Ölen AML'li hastaların ADA değerleri açısından bakıldığında ise enzim aktivitesinin ciddi anlamda farklılıklar gösterdiği gözlenmektedir. ADA değerlerinin SA cinsinden sırasıyla 5.6, 172 ve 8.55 gibi değerlerin yanı sıra bir hastada aktivite tayini yapılamaması bu gruptaki hastalarda ilaç tedavisinin olası baskısını veya enzimatik aktivitelerinin yeniden düzenlenmesi gibi bir değerlendirme yapmamıza imkan vermemektedir. Bireysel bazda aktivitelerin çok fazla değişkenlik göstermesi ise 5' NTde olduğu gibi ADA enzim aktivitelerinin daha geniş hasta gruplarında incelenmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

AML' de ölen hasta gruplarındaki değerler ile remisyona giren hasta gruplarının enzim aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde ölen AML' li hastaların 5' NT ve ADA değerlerinin remisyona giren grubun remisyon öncesi değerlerine göre baskılandığı gözlenmektedir. Remisyona girip girmeme açısından enzim değerlerinin farklılık göstermesi genişletilmiş çalışmalarda da gösterilirse, bu durum klinikte her iki enzimin AML' de remisyona girme kriteri olarak kullanılması yolunu açabilir.

ALL açısından değerlendirme yapıldığında ise çalışma şartlarına uyan toplam 3 hastadan bir tanesinin remisyona giremeyip ölmesi sebebiyle istatistiksel çalışma yapılamamıştır. Bu grupta remisyon öncesi 5' NT değerleri ölçülemezken remisyon sonrasında bir hastanın aktivite değerleri $SA = 5.70$ olarak bulunmuştur. ADA bakımından ise remisyon öncesi birbirinden çok farklı iki değer elde edilmiştir. (156.3-0.28) Remisyon sonrası bir hastada aktivite tayini yapılamazken diğerinde aktivitenin arttığı gözlenmektedir. ADA ve 5' NT enzim aktiviteleri bakımından ALL hastalarda söylenecek temel nokta özellikle 5' NT' nin baskılanma eğilimine karşılık ADA' nın hastaya göre çok değişkenlik gösterdiğidir. Bu değişken davranış biçiminin anlamlı bir yorumunu yapabilmek için hasta sayısını artırmak gerekmektedir.

Çalışmamız hasta sayısının sınırlılığına rağmen, seçilen örnekleme bakımından, özellikle lösemili hasta grubunda pürin-pirimidin metabolizmasının anlaşılmasına öncülük yapabilir. Klasik anlamda yıkım yolu kabul edilen buna karşılık literatürde salvage yol enzimi gibi de davrandığı gösterilen her iki enzimin nükleotid metabolizmasının regulasyonu açısından önemli rolleri vardır. Özellikle üç farklı formuyla hücreye nükleozid girişini sağlayan ve bir hücre reseptörü gibi davranan 5' NT' nin ve hücre içi adenosin seviyelerinin ayarlanmasında belirleyici rolü olan ADA' nın kanserdeki davranış biçimi biyokimyasal mekanizmalar açısından önemlidir. Her iki enzim; ister yıkım ister salvage yol enzimi gibi değerlendirilsin özellikle nükleik asit metabolizmasının indirekt etkilenmesi bakımından hayati öneme sahiptir. Bu önem kanserdeki metabolizmayı anlamaya ilişkilidir. Kanser hücresinde özellikle pürin- pirimidin metabolizmasında görev yapan anahtar enzimlerin davranış değişimlerini anlamak bizlere genetik seviyede ortaya çıkabilecek yeni düzenlemeleri anlamada katkı sağlayacaktır. Bu anlamda çalışmamızın bu alanda yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Çalışmamızda Hematoloji Bilim Dalına başvuru yapmış ve ilk tanısını almış 13 hastadan alınan kemik iliği hücrelerinde ADA ve 5' NT enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

Çalışmamıza aldığımız AML ve ALL' li 13 hastadan, AML' li hasta grubuna dahil 10 hastanın 4 tanesi remisyona giremeyerek tedavi esnasında ölmüştür. İki AML' li hasta ise takipden çıkmıştır. 3 ALL' li hastadan bir tanesi remisyona girmeden ölmüştür. 2 tanesi remisyona girmiştir. Hastaları genel anlamıyla lösemili grup olarak sınıflandırırsak; tedavi öncesi; 5' NT enzim aktiviteleri değerleri 1.98 ± 1.51 ' dir. Bu grupta tedavi sonrası enzim aktiviteleri değerleri ise 3.31 ± 2.39 ' dur. Aynı grupta tedavi öncesi ADA enzim aktiviteleri değerleri 78.94 ± 60.79 olarak bulunmuştur. Bu grupta tedavi sonrası enzim aktiviteleri değerlerine bakıldığında 10.22 ± 3.68 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar 5' NT' nin lösemilerde genel anlamıyla tedaviye cevap olarak aktivitesinin arttığını ve enzimin kanserli hücrede aktif olarak bir yıkım yolu enzimi gibi davranma eğilimini akla getirmektedir. ADA aktivitesi ise 5' NT aktivitesinin tersine tedavi öncesine göre baskılanmıştır. Bu haliyle her iki enzim birbirine zıt davranış biçimi göstermektedir.

Çalışmamızı AML ve ALL' li hastaların grupları olarak ayrı ayrı yorumlarsak; AML ' de elde edilen bulgular her iki enzimin özellikle tedavi sonrası baskılanma eğilimi taşıdığı yönündedir. ALL' li hastalarda ise 5' NT' nin tedavi öncesi aktivite tayini yapılamazken buna karşılık ADA aktivitesinin hastaya göre çok değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamız hasta sayısının sınırlılığı ve hastaların bir kısmını tedavi esnasında ölmesine rağmen, seçilen örnekleme ve çalışılan enzimler açısından kanser metabolizmasına ışık tutabilir .

Anahtar Kelimeler: Kemik iliği, Adenozin Deaminaz, 5' Nükleotidaz

7. SUMMARY :

This study was conducted on leukocytes obtained from bone marrow of 13 patients examined at Haematology Department with preliminary diagnosis.

Of the 13 patients with AML and ALL diagnosis, 4 patients out of 10 AML patients died while under treatment due to lack of remission. 2 patients with AML left the treatment. One patient out of 3 patients with ALL died during treatment due to lack of remission and 2 ended up with remission.

When we group patients in one group as leukemic patients; before treatment, the minimum 5'NT enzyme activity was recorded as 1.98 ± 1.51 . The enzyme activity in this group after treatment was observed at the maximum as 3.31 ± 2.39 . ADA enzyme specific activity in this group was $X \pm SD : 78.94 \pm 60.79$. The measurements in this group after treatment was recorded with $X \pm SD : 10.22 \pm 3.68$. This results suggest a general increase in 5'NT activity in leukemia as a result of treatment and 5'NT mimics a catalytic pathway enzyme actively in leukemic cells. In contrast with 5'NT activity, ADA activity is suppressed as compared to before treatment. This suggests a contrast behaviour of these two enzymes.

When we group patients in separate two groups as ALL and AML patient groups, 5'NT and ADA activity was found to be higher before remission contrast with the single group of all leukemic patients. In patients with ALL; 5'NT activity could not be measured before treatment and ADA activity was found to be variable.

Key Words: Bone marrow, Adenozin Deaminase, 5' Nükleotidase

8. KAYNAKLAR:

1. Murray J L, 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
2. Rovensky J, Ottinger P. The Effect Of Penicillamine and Aurothiomalate on Cyclic Adenosine Monophosphate Level and on Adenosine Deaminase and Purine Nucleoside Phosphorylase Activities In Human T-Lymphocytes. Povodna Praca 1999;13:11-16
3. Hovi T, Smyth F, Allison AC, Williams SC. Role of Adenosine Deaminase in Lymphocyte Proliferation. Clin. Exp. Immunol. 1976; 23:39-403
4. Akolkar PN, Advani SH, Gothoskar BP. Cyclic AMP Metabolism in Peripheral Blood Lymphocytes From Patients With Hodgkin' s Disease. Eur. J. Cancer Clin.Oncol.1984; 20:1389-1392
5. Invernizzi RPD, Fazio C, Fenoglio G, Ippoliti LM, Zambelli, Razzano M, Ascari E. 5' Nucleotidase in Chronic B Cell Leukemias. American Journal of Heamatology 1990; 34:37-43
6. Dikmen N, Öztügen T. Murray Harper' s Biyokimya.25.Baskı. İstanbul; Nobel Kitapçılık: 2004. 386-481
7. Altan N., Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım.1. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık ; 2000
8. Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya.1.Baskı. İzmir; Saray Medikal Yayıncılık ; 1996
9. Grever MR, Coleman MS, Balcerzak SP, et al. Adenosine Deaminase and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Biochemical Markers in the Management of Chronic Myelegenous Leukemia. Cancer Research 1983; 43: 1442-1445
10. Ho AD, Ganeshaguru K. Enzymes of purine metabolism in lymphoid neoplasm clinical revelance for treatment with enzyme inhibitors. Klin Wochenscher 1988;66: 467-474

11. Ho AD, Dörken B. Purine Degredative Enymes and Immunological Phenotypes in Chronic B- Lymphocytic Leukemia, Indication that Leukemic Immunocytoma is a Seperate Entity. British Journal Of Haemotology 1986; 62: 545-555
12. Trangas T, Courtis N, Gounaris A. Patterns of Adenosine Deaminase, Ecto-5- Nucleotidase, Poly (A) Polymerase and Surface Light Chain Expression in Chronic Lymmpocytic Leukemias. Blut 1989; 58: 187-193
13. Tritsch GI, Niswander PW. Purine Catabolism as a Source of Superoxide in Macrophage. Annals Newyork Akademy of Science 1985; 451: 279-291
14. Balis ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. Annals New York Academy of Sciences 1985; 45: 142- 149
15. Dornand J, Bonnafous JC, Favero J, Ecto 5'- nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities of Lymphoid Cells. Biochemical Medicine 1982; 28: 144-156
16. Whisler RL, Murray JL, Roach RW, Balcerzak SP . Characterization of multiple immune defects in human malignant lymphoma. Cancer 1984; 53: 2628-2634
17. Poplack DG, Blatt J, Reaman G. Purine Pathway Enzymes Abnormalites in Acute Lymhoblastic Leukemia. Cancer Research 1981; 41: 4821-4832
18. Ratech H, Martinuik F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. Blood 1988; 72 : 1627-1632
19. 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 Heamatology 1988; 27: 157-162
20. Guisti, G., Bernard, S., Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press Newyork 1974; 1092-1099
21. Rosi F, Carlucci E, Marinello E, Tabucchi A. Ecto-5'- Nucleotidase in B- Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Biomed Pharmacother 2002; 56: 100-104

22. Seepmiller JE. Overview of Possible Relation of Defects in Purine Metabolism to Immune Deficiency. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 451:9-19
23. Drexler HG, Gaedicke G, Minovada J, Biochemical Enzyme Analysis in Acute Leukemia. *J.Clin. Pathol.* 1985;38: 117-127
24. Ho DA, Ganeshaguru K, Knauf WU. Clinical Response to Deoxycoformycin in Chronic Lymphoid Neoplasms and Biochemical Changes in Circulating Malignant Cels in vivo. *Blood* 1988; 72 : 1884-1890
25. O'dwyer PJ, Wagner B, Jones BL, 2' Deoxycoformycin for Lymphoid Malignancies. *Annals of Internal Medicine* 1988; 108 : 733-743
26. Rosi F, Agostinho AB, Carlucci F, Zanoni L, Porcelli B, Marinello , Galieni P, Tabucchi A. Behaviour of Human Lymphocytic Isoenzymes of 5' Nucleotidase. *Life Sciences* 1998; 62 : 2257-2266
27. Vannoni D, Pietro M, Rosi , Bernini A, Leoncini R , Tabucchi, Carlucci F, Floccari F, Santoro A, Tanzini G, Marinello E, Metabolism of Adenosine in Human Colorectal Tumour. *Nucleosides, Nucleotides ve Nucleic Acids* 2004; 23: 1455-1457
28. Borowiec A, Lechward K, Tkaz-Stachowska K, Skladanowski. Adenosine as a Metabolik Regulator of Tissue Function . Production of Adenosine by Cytoplasmic 5' Nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica* 2006; 53: 269-278
29. Durak İ, Çetin R, Devrim E , Ergüder İ. Effects of Black Grape Extract on Activities of DNA Turn-Over Enzymes in Cancerous and non- Cancerous Human Colon Tissues. *Life Sciences* 2005; 76: 2995-3000
30. Canbolat O, Durak I, Çetin R, Kavutçu M, Demirci S, Öztürk S. Activities of Adenosine Deaminase ,5' Nucleotidase, Guanase and Cytidine Deaminase Enzymes in Cancerous and non- Cancerous Human Breast Tissue. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996; 37: 189-193
31. Durak I, Beduk Y, Kavutçu M, Suzer O, Yaman O, Öztürk HS, Canbolat O, Ulutepe S. Activity of the Enzymes Participating in Purine Metabolism of Cancerous and non-cancerous Human Kidney Tissues. *Cancer Investigation* 1997; 15: 212-216

32. Plunket W. İnhibition of Adenosine Deaminase to Increase the Antitumor Activity of Adenine Nucleoside Analogues. *Annals New York Academy of Sciences* 1985; 451: 151-159
33. Durak I, Işık AU, Canbolat O, Akyol Ö, Kavutçu M, Adenosine Deaminase , 5' Nucleotidase, Xsantin Oxidase, Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Cancerous and non-Cancerous Human Larngel Tissue. *Free Radikal Biology and Medicine* 1993; 15: 681-684
34. Öztürk HS, Karaayvaz M, Kaçmaz M, Kavutcu M, Akgül H, Durak I. Activities of Enzymes Participating in Purine and Free Radical Metabolism in Cancerous and Human Colorectal Tissues. *Cancer Biochem. Biophys.*1998; 16: 157-168
35. Ho DA, Ganeshaguru K, Knauf WU. Enzyme Activities of Leukemic Cells and Biochemical Changes İnduced by Deoxycoformycin in vitro-lack of Correlation with Clinical Response. *Leukemia Research* 1989; 13:269-278
36. Dasmahapatra KS, Facs HZK, Dasmahatpara A, Suarez S. Evaluation of Adenosine Deaminase Activity in Patients with Head and Neck Cancer. *J.Surg. Res.*1986; 40: 363-373
37. Adler MJ, Hersberg R, Yu A, Helper-Supressor T-Cell Leukemia, Unusual Phenotype Controlled with Low-Dose Deoycoformycin, *American Journal of Heamatology* 1990; 36: 208- 210
38. Saraçoğlu U, Güven O, Durak I. Adenosine Deaminase and 5'-Nucleotidase Activities in Saliva from Patients with Oral and Laryngeal Cancer. *Oral Disease* 2005;11: 323-325
39. Lal H, Munjal SK, Wig U, Saini AS. Serum Enzymes in Head and Neck Cancer III. *J Laryngeal Otol* 1987; 101: 1062-1065
40. Nurkka A, Obiero J, Kayhty H, Scott J. Effects of Sample Collection and Storage Methods on Antipneumococcal Immunoglobulin A in Saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*2003; 10 : 357- 361
41. Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O, Akyol Ö, Bedük Y. Adenosine Deaminase 5' Nucleotidase Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Cancerous and non- Cancerous Human Bladder Tissues. *Free Radic Biol.*1994; 16: 825-831
42. Cabrera MF. Immunologic Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia, the *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1990; 12: 283-291

43. Weber G. Enzymology of Cancer Cells. The New England Journal of Medicine 1977; 296: 486-493
44. Weber G. Biochemical Strategy of Cancer Cells and Design of Chemotherapy. Cancer Research 1983; 43: 3466-3492
45. Elion GB. The Purine Path to Chemotherapy. Science 1989, 244: 41-47
46. Letter to the Editor, Lymphatic Ecto 5'- Nucleotidase (ecto-5' NT) levels in Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma. Clinica Chimica Acta 2006; 364: 359-360
47. Morisaki T, Fujii H, Miva S. Adenosine Deaminase in Leukemia, Clinical Value of Plasma ADA Activity and Characterization of Leukemic Cell ADA. American Journal of Hematology 1985; 19:37-45
48. Hitchings G. Chemotherapy and Comparative Biochemistry, G.H.A. Colwell Memorial Lecture. Cancer Research 1969; 29: 1895-1903
49. Carson DA, Kaye J, Seegmiller JE. Differential Sensitivity of Human Leukemic T Cell Lines and B Cell Lines to Growth Inhibition by Deoxyadenosine. The Journal of Immunology 1978; 121: 1726-1731
50. Koren G, Ferrazini G, Sulh H. Systemic Exposure to Mercaptopurine As a Prognostic Factor in Acute Lymphocytic Leukemia in Children. The New England Journal of Medicine 1990; 323: 17-21
51. Boyum A. Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968; 21 (Supp): 77
52. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J., Biol. Chem. 1951; 193: 265 – 75
53. Weber G. Ordered Biochemical Program of Gene Expression in Cancer Cells. Biochemistry 2001; 66: 1164- 1173
54. Edwards NL, Gelfand EW, Burk L. Distribution of 5' Nucleotidase in Human Lymphoid Tissue. Proc. Natl. Acad Sci. 1979; 76: 3474-3476
55. Starkey JT, Ma FP. A Study of Adenosine Deaminase and Its Conversion Factor in Human Serum. Adv Exp Med Biol. 1989; 253: 65- 69

56. Camici M, Tozzi MG, Allegrini S. Purine Salvage Enzyme Activities Normal and Neoplastik Human Tissues. *Cancer Biochem. Biophys.* 1990; 11: 201-201
57. 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
58. Sunderman FW. The Clinical Biochemistry of 5'- Nucleotidase. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1990; 20: 2-8
59. Gilli R, Lopez C, Sari JC. Thermodynamic Study of the Interaction of Methotrexate, Its Metabolites and New Antifolates with Thymidylate Synthase, Influence of Fd UMP. *Biochemical Pharmacology* 1990; 40: 2241-2246
60. Zehri M, Harb J, Bernard S, Meflah K. Purification of Bovine Liver Cytosolic 5' Nucleotidase. *European J of Biochem* 1988; 172: 93-99
61. Richard H W. Novel Therapeutic Developments Other Than EGFR and VEGF Inhibition in Colorectal Cancer. *The Oncologist* 2006; 11: 1018- 1024
62. Carson DA, Kaye J, Wasso DB. The Potential Importance of Soluble Deoxynucleotidase Activity in Mediating Deoxyadenosine Toxicity in Human Lymphoblasts. *The Journal of Immunology* 1981; 126: 348-352
63. Jackso RC, Weber G. Enzyme Pattern Directed Chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* 1976, 25: 2613-2618
64. Tricot GJ, Jayaram HN, Lapis E. Biochemical Directed Therapy of Leukemia With Tiazofurin, Selective Blocker of Inosine 5'- Phosphate Dehydrogenase Activity. *Cancer Research* 1989; 49: 3696-3701
65. Hanka LJ, Dietz A. U-42, 126, a new antimetabolite antibiotic: production, biological activity, and taxonomy of the producing microorganism. *Antimikrob. Agents Chemother.* 1973; 3: 425-431
66. Souba W W. Glutamine and Cancer. *Ann.Surg.* 1993; 218: 715- 728
67. Taylor S, Belt R J , Joseph U , Haas CD. Phase I evaluation of AT-125 single dose every three weeks. *Invest. New Drugs* 1984; 2: 311-315

68. Miles B, Thoden JB, Holden H, Rausel F. Inactivation of the Amidotransferase Activity of Carbomyl Phosphate Synthetase by Antibiotic Acivicin , The Journal of Biological Chemistry 2002; 277: 4368- 4373
69. Kyaw A, Maung UK , Toc T. Determination of inorganik Phosphate with Molybdate and Triton X- 100 without Phase I evaluation of AT-125 single dose every three weeks. Reduction . Anal Biochem. 1985; 145: 230-234
70. Pesi R, Turriani M, Allegrini S, Scolozzi C, Camici M, Ipata PPI, Tozzi MG. The Bifunctional cytosolic 5'- nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. Archives of Biochemistry and Biophysics 1994; 312: 75-80
71. Johnson MA, Fridland A. Phosphorylation of 2', 3'- dideoxyinosine by cytosolic 5'- nucleotidase of human lymphoid cell. Molecular Pharmacology 1989; 36: 291-295
72. Turriani M, Pesi R, Nardone A, Turchi G, Sgarella F, Ipata PL, Tozzi MG. Cytosolic 5' nucleotidase / nucleoside phosphotransferase : a nucleoside analog activating enzyme. Journal of Biochemical Toxicology 1994; 9: 51-57
73. Worku Y, Newby AC. Nucleoside Exchange Catalysed by the Cytoplasmic 5'- nucleotidase . Biochemical Journal 1982; 205: 503-510
74. Fridland A, Connely MC, Robbins TJ. Tiazofirin Metabolism in Human Lymphoblastoid Cells: Evidence for Phosphorylation by Adenosine Kinase and 5'- nucleotidase. Cancer Research 1986, 46 : 532- 537
75. Tozzi MG, Camici M, Pesi R, Alegrini S, Sgarella F, Ipata PL. Nucleoside Phosphotransferase Activity of Colon Carcinoma Cytosolic 5' Nucleotidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 1991, 291: 212-217
76. Berkarda B, Müftüoğlu A, Ulutın O. Kan Hastalıkları. İstanbul : Ar Basım ve Dağıtım; 1983
77. Hoffman R, , Benz E , Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, Mcglave P. Hematology Basic principles and practice. 3. Baskı , Philedelphia : Churchill Livingstone; 2000

- 78.** Weber G, Shen F, Yang H, Prajda N, Li W. Amplification of signal transduction capacity and down-regulation by drugs. *Advan. Enzyme Regul.* 1999; 12: 11-41
- 79.** Amici A, Giulio M, Human Erythrocyte Pyrimidine 5' Nucleotidase, PN-I. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002; 397: 184-190
- 80.** Carlucci F, Rosi F, Pietro, C, Marinello E. Purine Nucleotide Metabolism : Spesifik Aspects in Chronic Lymphocytic Leukemia Lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1360: 203-210

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Seyhan

Soyadı: Gümüşlü

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 26.9.1971

Eğitimi: Yüksek Lisans, A.Ü.T.F. Biyokimya Anabilim Dalı

Üniversite, O.D.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Lise, Ankara Cumhuriyet Lisesi

Ortaokul, Ankara Bahçelievler Ortaokulu

İlkokul, Ankara Mustafa Kemal İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğı Bilimsel Kuruluşlar

TEŐEKKÖR

Master ve doktora eğitimim süresince yakın desteğini gördüğüm danışmanım ve Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan CANBOLAT' a ,tez çalışmalarımıdaki değerli katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU' ya , Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr.Hatice PAŐAOđLU' na, tüm asistan ve dönem arkadaşlarıma, bu çalışma için bana fırsat tanıyan Gazi Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Münci YAğCI' ya ve desteklerinden dolayı Biyolog İrem AKAR' a ve Uzm. Dr. Arzu YEğİN' e, Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Gazi Üniversitesi Tüp Bebek merkezindeki çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. İdil ALPAS, Uzm. Bio. Esra NAS KARABAY' a , Uzm. Bio. Deniz KULAK' a ve tüm yaşamım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim aileme, teşekkür ederim.