

NORMAL ve KANSERLİ OLGU'LARDA LÖKOSİT İÇİ 3', 5'- SIKLIK ADENOZİN MONOFOSFAT (cAMP) SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Dr. İdris AKKUŞ (x)
Dr. Y. Nuri ŞAHİN (xx)
Dr. Ferhat TÜRKMEN (xxx)
Dr. Ebubekir BAKAN (xxxx)

ÖZET :

Bu çalışmada 27-56 yaşları arasında toplam 25 sağlam şahıs ile 30-72 yaşları arasında 37 kanserli hastada lökosit içi cAMP seviyeleri tayin edildi. Her iki gruba ait lökosit içi cAMP değerleri arasında önemli bir fark bulunmadığı anlaşıldı.

Bulgularımız literatür değerleri ile tartışıldı.

GİRİŞ

Son yıllarda hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda birçok hormon için ikinci bir haberci olan 3', 5'- siklikadenozin monofosfat (cAMP)'ın normal hücrelerin çoğalmalarını kontrol ettiği, neoplastik hücrelerde ise hücre içi cAMP miktarının azalması sonucu bu etkiyi gösteremediği anlaşılmıştır(1,2,3). Nitekim çoğalmakta olan normal veya transforme hücre ortamına cAMP, di bütiril cAMP veya teofilin ilave edildiğinde hücre çoğalmasının yavaşladığı veya tamamen durduğu ve bozulmuş morfolojilerinin normale döndüğü tesbit edilmiştir(4,5).

Wood ve arkadaşlar (6) insan neoplazmalarında plazma ve idrar cAMP seviyesinde önemli bir değişiklik olmadığını, Gennari ve arkadaşları (7) ise kanserli hasta grubunda idrar cAMP seviyesinin normal şahıslarınkinden önemli derecede düşük, plazma seviyelerinin ise pek farklı olmadığını tesbit etmişlerdir. Tarafımızdan yapılan başka bir çalışmada (8) da kanserli hastalara aid plazma cAMP seviyesinin normallere göre daha düşük olduğu ancak bu düşüklüğün kesin teşhisi koyduracak seviyede olmadığı tesbit edilmişti.

x : Biyokimya Uzmanı
xx : Yrd. Doç. Dr. Biyokimya Anabilim Dalı
xxx : İç Hastalıkları Uzmanı
xxxx : Doç. Dr. Biyokimya Uzmanı

Kanserli dokularda hücre içi cAMP seviyesinin normal dokulara göre çok düşük olması (2,3,4,5) bu madenin erken teşhis için kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, yukarıda da görüldüğü gibi plazma ve idrar cAMP seviyesi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları birbirlerine pek uymamaktadır. Biz de bu noktadan hareketle ve kan numunelerinin doku numunelerinden daha kolay alınabildiğini de düşünerek hem kanserde (özellikle epitel orijinli kanserlerde) lökosit içi cAMP seviyesindeki değişimleri tayin etmek, hem de bu tayinin erken teşhise faydalı olup olamayacağını tesbit etmek istedik.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 30-72 yaşları arasında (ortalama 46.5) klinik muayene ve laboratuvar bulguları ile kanser teşhisi konmuş 24 erkek ve 13 kadın toplam 37 hastanın, kontrol grubu olarak 27-56 yaşları arasında (ortalama 44), 18 erkek 7 kadın, toplam 25 sağlam şahsın venöz kanında lökosit içi cAMP tayini yapıldı. Kanserli hasta grubunun 9'unda akciğer, 4'ünde prostat, 3'ünde özafagus, 5'inde mide, 3'ünde kolon, 4'ünde karaciğer, 2'sinde rektum, 2'sinde tiroid, 2'sinde uterus ve 3'ünde meme kanseri mevcuttu.

Hasta grubunda çeşitli laboratuvar çalışmaları ile teşhis konulduktan sonra herhangi bir tedaviye başlamadan önce kan numuneleri alındı. Hasta ve sağlam şahıslardan saat 8-9 saatleri arasında heparinize tüplere 5 ml. venöz kan alındı. Daha sonra lökositlerin izolasyonu Fallon ve arkadaşları (9), Yeh ve ark. (10) Kelpner ve ark. (11)'nin metodlarından modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yapıldı.

Plastik bir enjektöre alınan 5 ml. heparinize kan üzerine 2,5 ml. % 6'lık dekstran (dekstran/kan=1/2) ilave edilip yavaşça bir kaç defa alt üst edildikten sonra enjektör dik bir konumda bir supora yerleştirilerek oda ısısında eritrositlerin çökmesi için yaklaşık 90 dakika kadar beklendi.

Bu süre sonunda, lökosit ve trombositçe zengin ve bir miktar da eritrosit ihtiva eden süpernatant faz, plastik bir tüpe alınarak 3-4 ml. kadar EDTA'lı fizyolojik tuzlu su ile muamele edilip, 160 xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Trombositçe zengin süpernatant faz dekante edilerek nispeten eritrositlerle kontamine olmuştuk ilk lökosit paketi elde edilmiş oldu. Bu eritrositleri de ortamdan uzaklaştırmak için ozmotik şok uygulaması yapıldı. Ozmotik şoktan sonra nispeten saf lökosit paketi 4ml. kadar fizyolojik tuzlu su ile toplam üç kez yıkandı. Son yıkamadan sonra 2 ml. fizyolojik tuzlu su eklenerek lökosit paketi süspansiyon haline getirildi. Bu şekilde hazırlanan süspansiyon genellikle $2-8 \times 10^6$ lökosit/ml. ihtiva etmektedir. Hazırlanan bu süspansiyondan 0.2 ml kadar alındı ve üzerine eşit hacimde soğuk % 10'luk TCA ilave edildi. Santrifügasyondan sonra süpernatant faz alınarak New England Nuclear firmasından alınan ticari kit ($^{125}\text{I-cAMP}$)

prosedürüne göre cAMP miktarı radioimmünoassay metoduyla tayin edildi. Her bir şahıs için cAMP tayini üçer defa tekrar edilerek sonuçların doğruluğu sağlandı. Sonuçlar pikomol/10⁶ hücre cinsinden hesaplandı.

BULGULAR

Bulgular "istatistiki olarak kantitatif ortalamaların incelenmesi metodu" ile değerlendirildi. Sonuçlar tablo-1'de verilmiştir.

Tablo-1: Normal ve kanserli şahısların lökosit içi cAMP seviyeleri.

Parametre	Grup	n	X	±SD	Değişim aralığı (alt ve üst sınırları)	t	p
Lökosit içi cAMP seviyesi (pmol/10 ⁶ lökosit)	Normal	25	12.58	6.48	7.34-26.7	0.48	>0.5
	Kanserli	37	7.15	6.86	0.52-22.5		

Tablo-1'den görüldüğü gibi normal ve kanserli şahıslara aid lökosit içi cAMP seviyeleri arasında yapılan "t" testinde istatistiki yönden önemli bir fark bulunamamıştır.

Ayrıca tablo-1'de sonuçların değişim aralığı da verilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda, sağlam şahıslara aid lökosit içi cAMP seviyesi 12.58 ± 6.48 pmol/10⁶ lökosit, kanserli hastalarinki 7.13 ± 6.86 pmol/10⁶ lökosit olarak tesbit edildi. Tablo-1'den görüldüğü gibi her iki gruba ait lökosit içi cAMP değerleri arasında istatistiki manada önemli bir fark tespit edilememiştir.

Yine tablo-1'den görüldüğü gibi her iki grubun değişim aralığı (alt ve üst sınırları) birbirinden tam ayrılamamıştır. Ayrıca, standart sapmalar da oldukça büyüktür. Dolayısı ile bazı kanserli olgularda lökosit içi cAMP seviyesi çok düşük olduğu halde, diğer bazı olgularınki normal sınırlarda kalmıştır. Bu yüzden lökosit içi cAMP seviyesinin her çeşit kanser olgusunda teşhis için kullanılamayacağı anlaşılmaktadır. O halde kanser olgularını kendi aralarında gruplandırarak çalışmanın bazı kanser tiplerinde teşhise faydalı olacağı kanaatindeyiz. Ancak, biz çeşitli kanser tiplerinden istatistiğe girebilecek kadar olgu bulamadığımızdan böyle bir gruplandırma yapmadık.

Öte yandan, literatürde bizim çalışmamıza benzer bir çalışmaya da rastlayamadık. Ancak, Gillian ve Peterz (12) daha az sayıdaki (beş kişi) olgu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kronik granülostitik lösemide lökosit içi cAMP seviyesinin

normal lökositlerinkinden 5 kat daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Buna benzer bir çalışmada Peracchi ve arkadaşları (13) tarafından yapılmıştır. Lökosit içi cAMP metabolizması ile ilgili bu kadar az çalışmaya rağmen, kanserde cAMP ve diğer nükleotidlerin metabolizmaları hususunda gerek in vitro ve gerekse in vivo çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Nitekim DuRubertis ve arkadaşları (14) insan kolon adenokarsinomasında kanserli dokuya ait doku içi cAMP seviyesinin komşu normal dokudakinden çok daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

Cho-Chung ve Berghoffer(15) sıçan meme tümörlerinin ve sıçan hepatomasının cAMP'ın bir türevi olan dibütiril cAMP ile tedavi sonucu büyümelerinin durduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, lenfosarkoma, sıçan meme tümörleri ve insan epidermoid kanserlerinin de cAMP ve dibütiril türevi ile tedavileri sonucu büyümelerinin yavaşladığı gösterilmiştir (16).

Netice olarak, hem bizim çalışmalarımıza hem de diğer araştırmacıların çalışmalarına göre, kanserde , başta cAMP olmak üzere siklik nükleotidlerin metabolizmalarında önemli değişiklikler olmaktadır. Dolayısı ile bu değişikliklerin hangi seviyede ve sebeplerinin neler olduğunun tam olarak tespit edilmesi ve kanserde siklik nükleotid metabolizmasındaki bozuklukların aydınlatılmasının kanserin etiyojisi, erken teşhisi, ve tedavisi hususunda önemli ilerlemeler sağlayacağı kanaatindeyiz.

SUMMARY

DETERMINATION OF INTRALEUKOCYTIC 3', 5'- CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE LEVELS (cAMP) IN NORMAL AND PATIENTS WITH CANCER

In this study, we have determined intraleucocytic 3', 5'- cyclic adenosine monophosphate levels of 25 healthy subjects aged between 27-56 years and 37 patients with cancer aged between 30-72 years. There was no significant difference between the values of the two groups. Our results were discussed with literature findings.

KAYNAKLAR :

- 1- MARTIN DW, MAYES PA, RODWELL VW ve GRANNER DK., Harper's Review of Physiological Chemistry, Beirut, Lange, Med. Publ. 1985, 507-512
- 2- EMMELOT P, Biochemical Properties of Normal and Neoplastic Cell Surfaces, a Review Eur. J. Cancer 1973, 9, 319-333

- 3- MONOHAN TM, FRITZ RR. ve ABELL CW., Levels of cAMP in Murine L5178Y lymphoblasts Grown in Different Concentrations of Serum, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 55, 642.
- 4- MATSUMOTO K, UNO I ve ISHIKAWA T., Control of Cell Division in Saccharomyces Cerevisiae Mutants Defective in Adenylate Cyclase and cAMP-dependent Protein Kinase, Exp. Cell Res., 1983, 146, 151-161,
- 5- PEERLYC CV, UONNISON GS ve PASTAN I., Adenyl Cyclase in Normal and Transformed Fibroblasts in Tissue Culture., J. Biol. Chem. 1971, 246, 5785-5789.
- 6- WOOD PJ, ROSS G ve SMITH CL., Plasma and Urine Cyclic HNucleotides Levels in Malignant Disease and Cirrhosis of the Liver., J. Clin. Pathol. 1979, 32, 998-1002.
- 7- GENNARI CG, FRANCINI G, GALLI M ve LORE F., Urinary Excretion of cAMP and cGMP in Malignancy., J. Clin. Patho., 197a, 31, 735-741.
- 8- AKKUŞ, İ. BAKAN N ve DEĞER O., Kanserli Hastalarda Plazma 3', 5'-Siklik Adenozin Monofosfat(cAMP) Seviyelerinin İncelenmesi, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi (Baskıda).
- 9- FALLON HJ, FREI E ve DAVIDSON JD. Leukocyte Preparation from Human Blood. Evaluation of Their Morphological and Metabolic State., J. Lab. Clin. Med., 1962, 59, 779.
- 10- YEH AK, TULSIANA DHP ve CERUBELLI R., Nueuraminidase Activity in HumanLeukocytes.. J. Lab. Clin. Med., 1971, 78,771.
- 11- KELMPNER MS ve GALLIN JI., Separation and Functional Characterization of Human Neutraophyl Subpopulations., Blood, 1978, 51, 659-669.
- 12- GILLIAN PS ve PETERS TS., Studies on Activities Kinetic Properties and Subcellular Localisation of Cyclic AMP Phosphodiesterase and Human Neutrophyl Leukocytes., Clin. Chim. Acta., 1980, 103, 193-198.
- 13- PERACCHI M, MAIOLO AT, LOMLARDINI L., Paterns of Cyclic Nucleotides in Normal and Leukaemic Human Leucocytes., Br. J. Cancer, 1980, 41, 360-370.
- 14- Du RUBERTIS FR, CHAYOTH R ve FIELD JB., The Contents and Metabolism of Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Cycilc Guanosine 3' 5'-Monophosphate in Adenocarninoma of the HumanColan., J. Clin. Invest., 1976., 57, 641-644.

- 15- CHO-CHUNG YS ve BERGHOFFER B., The Role of Cyclic AMP on Neoplastic Cell Growth and Regretion II. Growth Arrest and G6PD Isozyme Shift by Dibuthyryl cAMP ., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60, 528-534.
- 16- HICKIE RA, WALKER CM ve CROLL GA., Decreased Basal Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Levels in Morris Hepatoma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 49, 167-173.