

284544

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEOPLASTİK ve NORMAL LENFOİD HÜCRELERE
N⁶, D²-DİBÜTİRİL SIKLIK AMP ve TEOFİLİN'İN
ETKİLERİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

**GÜLSEL OMURTAY
REH. ÖĞR. ÜYESİ : Doç. Dr. AHMET KART**

Ankara

1984

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEOPLASTİK ve NORMAL LENFOİD HÜCRELERE
N⁶,O²' - DİBÜTİRİL SIKLIK AMP ve TEOFİLİN'İN
ETKİLERİ

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

GÜLSEL OMURTAY
REH.ÖĞR.ÜYESİ: Doç.Dr. AHMET KART

Ankara

1984

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ ve YÖNTEM	10
BULGULAR	15
TARTIŞMA	33
ÖZET	38
KAYNAKLAR	39

TEZDE YER ALAN ŐEKİL, GRAFİK ve TABLOLAR

- Resim 1: EB3 Burkitt lenfoma hücrelerinin suspansiyon kültürdeki görünümleri
- Resim 2: Wright boyasıyla boyanmış EB3 Burkitt lenfoma preparatından çekilmiş fotoğraf
- Grafik 1: Lenfoid hücrelerin PHA-M'e verdikleri cevap
- Grafik 2: dbcAMP'nin PHA-M ile uyarılmış normal lenfositlerin DNA sentezine etkisi
- Grafik 3: dbcAMP'nin EB3 hücrelerinin DNA sentezine etkisi
- Grafik 4: dbcAMP'nin T-tipi lösemik lenfoblastların DNA sentezine etkisi
- Grafik 5: Teofilin'in PHA-M ile uyarılmış normal lenfositlerin DNA sentezine etkisi
- Grafik 6: Teofilin'in EB3 hücrelerinin DNA sentezine etkisi
- Grafik 7: Teofilin'in T-tipi lösemik lenfoblastların DNA sentezine etkisi
- Grafik 8: dbcAMP'nin normal lenfosit, EB3 Burkitt lenfoma ve lösemik lenfoblastlarda DNA sentezine inhibisyonunun karşılaştırması
- Grafik 9. Teofilin'in normal lenfosit, EB3 Burkitt lenfoma ve lösemik lenfoblastlarda DNA sentezine inhibisyonunun karşılaştırması
- Tablo 1: Normal periferel kan lenfositlerine ait sonuçların istatistiksel dağılımı.
- Tablo 2: EB3 hücrelerine ait sonuçların istatistiksel dağılımı

Tablo 3: EB3 ve normal lenfositlerin mitojenik uyarıma cevabının istatistiksel önemlilik düzeyleri

Tablo 4: Normal lenfosit dbcAMP konsantrasyonlarının istatistiksel önemlilik düzeyleri

Tablo 5: EB3 dbcAMP konsantrasyonlarının istatistiksel önemlilik düzeyleri

Tablo 6: Normal lenfosit teofilin konsantrasyonlarının istatistiksel önemlilik düzeyleri

Ö N S Ö Z

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Pediatrik Viroloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Araştırmam sırasında desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof.Dr. Altan Günalp'e, tez yöneticim Sayın Doç.Dr. Ahmet Kart'a, başından sonuna gerek malzeme gerek fikir olarak her türlü yardımı esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Emin Kansu'ya ve Sayın Dr.Faik Sarıalioğlu'na teşekkür ederim.

G İ R İ Ő

Dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci, veya üçüncü sırayı alan kanser, uzun yıllardan beri değişik araştırmalara konu olmaktadır. Bunların büyük bir kısmını neoplastik transformasyon, kanser-virus ilişkileri, kanser hücresi biyokimyası ve hücre bölünmesi kontrolü üzerinde yapılan çalışmalar teşkil etmektedir.

Kontrolsüz bölünme yeteneği olan kanser hücreleriyle ilgili araştırmalar, neoplastik transformasyon sonucu bu hücrelerin birtakım yeni özellikler kazandığını göstermektedir. Bu özellikler arasında çekirdek ve hücre zarı değişiklikleri ile hücre içi sıklık 3',5'-Adenozin Monofosfat (cAMP) düzeyindeki azalma sayılabilir¹.

Bilindiği üzere cAMP, hücre bölünmesi kontrolünde iş gören önemli bir moleküldür. Normal bir hücrenin bölünme halinde iken cAMP düzeyi düşüktür. Bunun tersine, hücre bölünmediği zaman cAMP düzeyi yüksek olarak bildirilmiřtir².

cAMP düzeylerinin genellikle düşük olduğu, sürekli bölünen kanser hücrelerinde hücre içi cAMP konsantrasyonunu artırmak, bölünmede inhibisyon sağlayabilir. Nitekim, değişik araştırmalarda hücresel cAMP yükseltilerek hücre bölünmesinin inhibe edilebileceği gösterilmiřtir³⁻⁶.

Bu yönden araştırmamız, normal ve neoplastik tipte proliferasyon gösteren lenfoid hücreler üzerinde Dibütiril Siklik 3',5'-Adenozin Monofosfat (dbcAMP) ve teofilin'in etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Bunlardan dbcAMP bir cAMP analogudur. Teofilin ise cAMP'yi enzimatik olarak parçalayan fosfodiesteraz (PDE) enzim inhibitörüdür. Çalışmamızda bu ajanlar aracılığı ile hücrelerdeki cAMP düzeyinin yükseltilmesinin DNA sentezi ve hücre bölünmesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Bu ajanların hücreler üzerinde inhibitör etkisinin araştırılması, kontrolsüz bölünme gösteren kanser hücrelerinin temel mekanizmalarına ışık tutabilir düşüncesiyle çalışmamızı planlamış bulunmaktayız.

GENEL BİLGİLER

Yaşayan bütün hücrelerin G_1 , S, G_2 ve M olarak adlandırılan 4 ana fazdan meydana gelmiş hayat sikluslarının M fazında bölünerek çoğaldıkları bilinmektedir. Bir hücrenin yaşamını normal olarak sürdürebilmesi ve fonksiyonel olabilmesi için kontrollü bölünme göstermesi gerekmektedir.

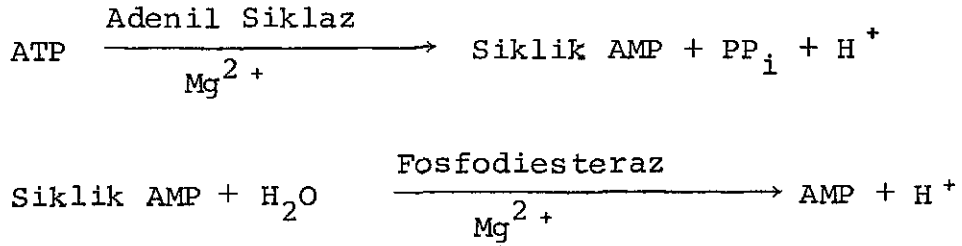
Yapılan çalışmalar normal hücrelerin organizmanın ihtiyacına göre hayat siklusunun G_1 safhasında bölünmeyi durdurarak dinlenme halinde kalabildiklerini göstermektedir⁷. Transforme hücreler ise kısmen, veya tamamıyla bu kontrollü kaybettiklerinden sürekli bir bölünme göstermekte, buna bağlı olarak tümör oluşumu ve neoplastik hastalık ortaya çıkmaktadır⁷.

Kontrollü hücre bölünmesinin çok hücreli canlı yaşamının vazgeçilmez koşullarından biri olması, bölünme kontrolü üzerine geniş araştırmalar yapılmasına neden olmaktadır. Bu araştırmaların başında siklik nükleotidlerin kullanıldığı in vitro hücre kültürü çalışmaları gelmektedir.

SİKLİK AMP'NİN HÜCRE BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİSİ:

Hücre bölünmesinde etkili olduğu düşünülen cAMP mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün hayvanlar aleminde karşımıza çıkan ilginç bir moleküldür. İlk kez 1956 da

karaciğer fosforilazı üzerine epinefrin ve glukagon hormonlarının etkisi incelenirken bulunmuştur. O tarihten itibaren yapılan çalışmalar cAMP'nin çeşitli hücrelerde rol oynadığını göstermiştir. Bunlar arasında birçok hormonun etkisinde ikinci haberci olması, genetik kontrolde ve hücre bölünmesinde iş görmesi sayılabilir⁸. Bu önemli görevleri nedeniyle hücredeki cAMP seviyesi çok duyarlı bir düzenleme gerektirmektedir. Hücre içinde cAMP seviyesi iki enzim tarafından düzenlenir. Bunlardan biri ATP den cAMP sentez eden, hücre zarına yerleşmiş olan adenil siklaz; diğeri ise hücrenin hem çözünür hemde çözünmez kısmında bulunan cAMP'yi parçalayan fosfodiesteraz (PDE) dir⁹.



cAMP'nin in vitro hücre kültürlerinde hücre bölünmesini kontrol ettiği hakkındaki ilk bulgular 1968 yıllarında yapılan iki çalışmada ortaya çıkmıştır. Bunlardan birinde, normal ve transforme baby hamster kidney (BHK) hücrelerinde teofilin ve kafein'in bölünmeyi kontrol ettiği gözlenmiştir³. Diğerinde ise HeLa hücrelerinde cAMP'nin kendisinin aynı etkiyi yaptığı bulunmuştur¹⁰.

Daha sonraları cAMP analogları, adenil siklaz aktivatörleri ve PDE inhibitörlerinin kullanıldığı birçok çalışma

yapılmıştır. dbcAMP gibi analogların cAMP'yi taklit ederek; PGE₁, kolera toksini gibi adenil siklaz aktivatörleri ile metilksantinler gibi PDE inhibitörlerinin ise, hücre içi cAMP seviyesini yükselterek etkili oldukları anlaşılmıştır¹¹.

Bu çalışmalarda birçok hücre tipinde bölünme inhibisyonu sağlanmıştır. Bunlar arasında fare L hücreleri^{4,10,12,13}, transforme fare 3T3 hücreleri^{5,14}, fare lenfoid hücreleri¹⁵, insan diploid fibroblastları¹⁶, insan karaciğer hücreleri¹⁷, insan lenfositleri¹⁸ ve çeşitli insan kanser hücre kültürleri sayılabilir^{19,20}.

Hücre içi cAMP seviyesi ile DNA sentezi hızı arasındaki ilişkiyi gösterir çalışmalarda ise, bu ikisi arasında ters orantı olduğu ortaya çıkmıştır²¹.

Bütün bu araştırmalar, uygulanan yöntemlerin farklılığına rağmen hücre içi cAMP seviyesindeki artışın hücre üremesini kontrol ettiğini desteklemektedir²¹.

Neoplastik hastalıklar arasında, kaynak aldığı hücre tipleri yönünden çok değişik fenotipik, enzimatik ve immünojenik özellikler gösteren lenfoproliferatif hastalıklar son yıllarda immünoloji, viroloji, genetik ve immünopatolojideki gelişmeler sonucu büyük bir ilerleme kaydetmiştir. Bu hastalıklar arasında akut ve kronik tipte lenfositik lösemiler, Hodgkin hastalığı, Burkitt lenfoması ve Hodgkin dışı lenfomalar sayılabilir.

Yurdumuzda, görülme sıklığı açısından önemli bir yeri olan bu tip lenfoproliferatif neoplastik hastalıklar özellikle çocuklarda tedaviye iyi cevap vermeleri yönünden ilgi çekmektedir²².

LENFOMALAR:

Lenf dokusunun primer neoplastik hastalığıdır²³. Hodgkin ve Hodgkin-dışı lenfomalar olarak 2 büyük gruba ayrılır.

Hodgkin Hastalığı: İlk kez 1832 de Sir Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmış olan Hodgkin hastalığı hemen tüm ülkelerde en sık rastlanan lenfoma tiplerinden biridir. 15-34 yaşları arasında ve 50 yaşın üstünde görülme sıklığı yüksektir. Etiyolojisi kesin bilinmemekle beraber, hastalığın toplum içinde enfeksiyöz bir yayılım göstermesi, hasta yakınlarında yakalanma riskinin artması, ayrıca vakaların zaman ve yere bağlı kümeleşme göstermesi viral etiyolojiyi düşündürmektedir. Bunun yanında sürekli antijenik uyarım, immün denetimin iyi çalışmaması gibi bazı immunolojik faktörlerinde hastalığa neden olabileceği akla gelmektedir. Hastalığın histolojik tiplendirmesi Rye sınıflandırmasına göre yapılmaktadır. Buna göre; lenfositten zengin, nodüler skleroz, karma hücreli ve lenfositten yoksun olarak 4 gruba ayrılır. Hemen her yaş grubunda en sık karşılaşılan karma hücreli tipdir²⁴.

Hodgkin-Dışı Lenfomalar: Klinik ve histolojik bulguları birbirinden farklı hastalıkları içeren heterojen bir gruptur. Hodgkin hastalığına göre daha ileri yaş gruplarında

yüksek görülme sıklığına sahiptir. Hodgkin hastalığı gibi Hodgkin dışı lenfomaların da etiyolojisi kesin bilinmemektedir²⁴. Ancak, onkojenik viruslar ve immünolojik bozukluklara dikkati çeken birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda Epstein-Barr Virus (EBV)-Burkitt lenfoma²⁵⁻²⁸ ve Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus (HTLV)-bazı T hücre neoplazmaları ilişkisi ortaya konmuş, latent onkojenik virusların herhangi bir sebeple aktive olabileceği fikri üzerinde durulmuştur^{29,30}. Otoimmün bozuklukların; Wiskott-Aldrich, Ataxia telangiectasia gibi konjenital immün eksiklik sendromlarının; organ nakli nedeniyle immün sistemin baskılanmasının lenfoma olasılığını artırdığı yine çeşitli araştırmalarda sözkonusu edilmiştir³¹⁻³³. Hodgkin-dışı lenfomaların histolojik tiplendirmesi tartışmalıdır. En az 6 değişik sınıflandırma olmasına rağmen en yaygın olarak kullanılanlar; lenfomaları histolojik görüntüye göre ayıran Rappaport sınıflandırması ile, orijin hücrenin fonksiyonuna göre T- veya B- hücreli olarak ayıran Lukes-Collins sınıflandırmasıdır²⁴. Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinde kullanılan Rappaport sınıflandırmasına göre Hodgkin-dışı lenfomalar İyi diferansiye, lenfositik, Kötü diferansiye, lenfositik, Histiyositik, Histiyolenfositik ve İndiferansiye (Burkitt Lenfoma) olarak 5 alt gruba ayrılmaktadır²³.

LÖSEMİLER:

Başlıca akut ve kronik olarak 2 büyük gruba ayrılan lösemiler beyaz kan hücrelerinin anormal bir çoğalma ve olgunlaşma göstererek kanda artmasıyla karakterizedir³⁴. Akut

lenfoblastik lösemi, akut myeloblastik lösemi, kronik lenfositik lösemi, kronik myelositik lösemi gibi çeşitli tipleri vardır. Çocuklarda en yaygın olarak görülen lösemi tipi özellikle 4 yaşında artış gösteren akut lenfoblastik lösemidir. Yaşın ilerlemesiyle akut non-lenfoblastik lösemi yaygınlaşır. Lösemi etiolojisinde çevresel, viral ve genetik faktörler üzerinde durulmaktadır²⁴. Kimyasal ajanların ve radyasyonun lösemiye neden olduğu hakkında bulgular vardır. Hayvan deneyleri ve vakaların kümeleşmesi viral faktörleri, ikizlerle yapılan çalışmalar ve bazı genetik hastalıklarla lösemi ilişkisi genetik faktörleri etiyojik ajan olarak düşündürmektedir²⁴.

Çeşitli biyolojik problemlerin incelenmesinde hücre kültürlerinin kullanılması son 30 senede büyük ilerlemeler kaydetmiştir. Özellikle hücre bölünmesi kontrolünde iş gören faktörlerin çalışılmasında hücre kültürlerinin uygun deneysel sistemler olması birçok hücre tipinin in vitro kültür halinde yaşatılmasına neden olmuştur. Sağlıklı insan akyuvarlarının periferik dolaşımında bölünmeyen hücreler olması, bu tip hücrelerin in vitro kültürü yapılırken karşılaşılan en önemli problemi teşkil etmiştir. Ancak, 1960 yıllarında fitohemaglutinin ilavesiyle hücrelerde bölünme yaratılması normal ve lösemik beyaz kan hücrelerinin PHA ile uyarılarak in vitro kültür halinde yaşatılmasını mümkün kılmıştır³⁵. Diğer normal ve neoplastik hücre tiplerine göre bu hücrelerin uzun zamanlı kültürlerinin elde edilmesi güç olmakla birlikte, daha sonra yapılan çalışmalarla Burkitt

lenfoma, diffüz histiyositik lenfoma, akut lenfoblastik lösemi gibi çeşitli lenfoid hücre kültürleri oluşturulabilmiştir³⁶.

Çalışmamızda, bu çabaların bir ürünü olan EB3 Burkitt lenfoma hücre kültürü temel alınarak DNA sentezi ve bölünme inhibisyonu incelenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücrelerin Kaynağı:

a- EB3 Burkitt Lenfoma hücreleri Flow Laboratuvar'ından sağlandı (Flow Lab. Limited, Scotland).

b- T-tipi lenfoblastlar Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Onkoloji Bölümüne başvuran akut lenfoblastik lösemili bir hastanın periferel kanından sağlandı (İ.E, Protokol No: 1470486, Erkek).

c- Kontrol olarak kullanılan hücreler ise sağlıklı hastane personelinin periferel kanından sağlandı.

Kültür Metodları:

EB3 Burkitt Lenfoma Hücre Kültürünün Özellikleri ve Devam Ettirilmesi:

B-tipi lenfoblastlardan oluşmuş olan EB3 hücre kültürünün, suspansiyon halinde üremesi sağlanmıştır. Hücrelerin suspansiyon kültürden canlı olarak çekilmiş fotoğrafları Resim 1'de verilmektedir. Resim 2'de ise Wright boyasıyla bazofilik boyanan EB3 hücreleri görülmektedir.

Laboratuvarımızda EB3 hücreleri; içinde %15 fetal dana serumu (Gibco, Middlesex, England), 100 Ü/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Gibco, Middlesex, England) bulunan

RPMI 1640 besi ortamında (Sigma, St.Louis, U.S.A.) yaşatıldı. Kültür kabı olarak plastik doku kültürü kapları (Corning Tissue Culture Flasks, New York, U.S.A.) ve Kimax doku kültürü şişeleri kullanıldı. Hücreler 37°C ısıya sahip %95 hava, %5 CO₂ li etüvde üretildi. Hücrelerin birbirine yapışarak kümeleşmelerini önlemek için kültür kapları arasına çalkalandı.

İki, ya da üç gün aralıklarla hücreler beslendi. Bu işlem sırasında suspansiyon kültürler 15 ml lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Dibe çöken hücrelerin üzerindeki eski ortam atılarak bir miktar taze ortamla hücreler yeniden suspansiyon haline getirildi ve kültür kabına kondu. Üzerine yeterli miktarda taze besi ortamı ilave edildi.

Üreyerek çok yoğun hale gelen kültürler, besleme sırasındaki işlemlere benzer şekilde çöktürülüp başka kültür kaplarına aktarıldı. Böylece hücrelerin pasajları sağlanarak gerektiği miktarlarda üretildi.

Periferal Kandan Lenfositlerin Elde Edilmesi:

Lösemili hasta ve sağlıklı kişilerin periferal kanından lenfositlerin izolasyonu için Boyum metodu uygulandı³⁷. Bu metoda göre; prezervatifsiz heparin (Kabi Company, Stockholm, Sweden) ile alınan kan (20 Ü heparin / ml kan) 1 hacim kan: 2 hacim serumuz RPMI besi ortamı olacak şekilde sulandırıldı. Eldeki kan miktarına göre santrifüj tüpüne konmuş olan Ficoll-Hypaque (Sigma, St.Louis, U.S.A.)

üzerine ince uçlu bir pastör pipeti ile dikkatlice yayıldı. 1350 rpm de 30-35 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra tüpdeki Ficoll-Hypaque üzerinde tutulan lenfositler yine ince uçlu bir pastör pipeti ile yavaşça çekilerek temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine serum-suz RPMI konarak 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrar edilerek hücrelerin iyice yıkanması sağlandı. Çalışmanın başından sonuna kadar steril şartların korunmasına dikkat edildi. Bu şekilde elde edilen hücrelerin canlılığına tripan mavisi (trypan blue) ile bakılarak, % 70-80 ve daha üzerinde canlılığa sahip olan hücreler radyoaktif çalışmaya alındı³⁸.

Radyoaktif [³H] Timidin İnkorporasyonu ([³H] thymidine incorporation) Metodu³⁹:

a- Kültür İşlemi: Canlılığı tripan mavisiyle kontrol edilen hücreler hemositometre ile sayılarak ml de 1×10^6 hücre olacak şekilde Flow hücre kültürü tüplerine (Flow Lab. Limited, Scotland) dağıtıldı. Kültürlerde inkübasyon ortamı olarak % 15 fotal dana serumu, 100 Ü/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2 mM L-Glutamin (Gibco, Middlesex, England) ve % 2 oranında Hepes tamponu (Gibco, Middlesex, England) içeren RPMI 1640 kullanıldı. Kültürler etüvde 48 saat bekletildikten sonra 0.1 ml [³H] timidin (25 Ci/mmol, Amersham, England) 1 µCi/ml olacak şekilde tüplere ilave edildi. Kültürün 64. saatinde ise deney durdurularak son işlem olan yıkamaya geçildi. Tüm hücre tipleri için yukarıda açıklanan yol aynı şekilde uygulandı.

b- Yıkama İşlemi: Her bir kültür tüpündeki 1 ml hücre suspansiyonundan 2 kez 0.1 ml çekilerek Whatman filtre kağıdından hazırlanmış (Whatman No. 3, Philadelphia, U.S.A.) 2.4 cm çapındaki disklerle emdirildi. Böylece her bir tüpden 2 cpm değeri elde edildi. Diskler oda ısısında kurutulularak i çinde soğuk timidin (Sigma, St.Louis, U.S.A.) bulunan %10 luk Trikloroasetik Asit (TCA)'e atıldı ve 1 saat buzdolabında (+4°C) bekletildi. Sonra sırasıyla %5'lik TCA (15 dakika), 1:1 oranındaki aseton-%99.9 luk absölü alkol karışımı (30 dakika), ve saf asetonla (15 dakika) diskler ikişer kez yıkandı. İyice kurutulularak bir pensle sayım şişelerine yerleştirildi. Deneyde sayım sıvısı, 1 lt toluene, 0.360 gr POPOP, 5.075 gr PPO olacak şekilde hazırlandı.

Şişeler Ankara Doğumevi LKB 1210 Ultra beta sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Sonuçlar dakikada sayım (cpm) olarak ifade edildi.

Yukarıda açıklanan [³H] timidin metodu EB3 ve normal periferel kan lenfositleri için 4 kez tekrar edildi. EB3 deneylerinde her bir konsantrasyon iki tüp denendi, ancak hücrelerin azlığı nedeniyle kontrol deneylerinde tek tüp kullanıldı. T-tipi lenfoblastik lösemi vakası ise iki tüp olarak 1 kez çalışıldı.

dbcAMP, Teofilin ve Fitohemaglutinin'in Hazırlanması:

Kültürlere etkisi denen kimyasal ajanlardan dbcAMP (Calbiochem, California U.S.A.) serumsuz besi ortamı içinde çözüldü ve 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mM lık konsantrasyonları hazırlandı⁴⁰. Kullanılincaya kadar dondurularak -20°C de saklandı.

Teofilin ise (Calbiochem, California U.S.A.) distile su içinde çözüldü. 10^{-5} , 10^{-4} ve 10^{-3} M konsantrasyonları hazırlanarak kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ de saklandı⁴¹.

Her iki kimyasal ajan Millipore (0.45 μm) filtrasyonu ile steril edildi ve kültürün başında 0.1 ml olarak hücrelere uygulandı.

Deneyde mitojen olarak kullanılan liyofilize Fitohemaglutinin - M (PHA-M) (Difco, Michigan U.S.A.) önce steril RPMI ile 5 ml'ye sulandırıldı. Sonra bundan 1 ml alınıp üzerine 24 ml steril RPMI konarak 1/25 lik dilüsyon sağlandı. Böylece hazırlanan PHA-M dondurularak -20°C de saklandı ve deney sırasında kültürlerle diğer kimyasal ajanlarla aynı zamanda 0.1 ml olarak ilave edildi.

İstatistiksel Değerlendirme:

Çalışmamızda veri sayısının özellikle normal lenfositlerde az olması ve bazı uç değerler içermesi nedeniyle, parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis varyans analizi ile Mann-Whitney U testi kullanıldı⁴².

B U L G U L A R

Çalışmamızda, B-tipi Burkitt lenfoma hücreleri, T-tipi lösemik lenfoblastlar ve normal periferel kan lenfositlerinin bölünmesine dbcAMP ile teofilin'in etkileri incelendi. Ancak, periferel lenfositlerin normalde bölünmeyen, spontan DNA sentezi çok düşük hücreler olması bir mitojen kullanmamızı gerektirdi⁴³. Bu nedenle normal lenfositlere mitojen verilerek, uyarılmış DNA sentezine dbcAMP ve teofilin etkisi incelendi. Ayrıca B ve T-tipi neoplastik lenfoblastlar üzerine de mitojen konularak bu hücrelerin verdikleri cevaplar araştırılmıştır.

A- Mitojenik Uyarıma Normal ve Neoplastik Lenfoid Hücrelerin Cevabı:

Çalışmamızda mitojen olarak PHA-M kullanıldı ve elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

Normal Hücrelerin Mitojenik Uyarıma Cevabı:

Sağlıklı kişilerin periferel kanından izole edilen lenfositler 4 µg/ml'lik PHA-M dozu ile optimal şartlarda uyarıldı . Bu hücrelerin mitojene verdiği cevap, 4 ayrı deneyde elde edilen verilerin aritmetik ortalamasına göre çizilmiş olan Grafik 1 de görülmektedir. Bu hücrelerin spontan sayımı ile PHA-M muamelesinden sonra bulunan sayım arasındaki en az 20 kat fark, normal lenfositlerin gerçekten

mitojen uyarımına cevap verdiklerini, DNA sentezi yapmaya başladıklarını gösterdi.

Neoplastik Hücrelerin Mitojenik Uyarıma Cevabı:

Gerek EB3 Burkitt lenfoma hücreleri, gerekse T-tipi lösemik lenfoblastlar PHA-M uyarımına cevap vermedi. Spontan sayımları ortalama 34024.5 cpm gibi çok yüksek olan EB3 hücreleri mitojen uyarımı ile ortalama 34938.3 cpm verdi. Bu sonuç anlamlı bir uyarım olarak kabul edilmedi. T-tipi lösemik lenfoblastlarda ise mitojenin belirgin bir etkisi gözlenmedi. Tam tersine daha düşük bir ortalama sayım bulundu (Grafik 1).

Bu sonuçlar normal lenfositlerin PHA-M ile uyarılabilirliğini, neoplastik hücrelerin ise etkilenmediğini gösterdi. Zaten çalışmamızda başta da değindiğimiz gibi, mitojen kullanma nedenimiz normal lenfositlerde uyarım yaratmak ve daha sonra kullanacağımız kimyasal ajanların gerçekten inhibisyon yapıp yapmadığını görmektir. Beklenen sonuç elde edildiği için, çalışmanın geri kalan kısmında, neoplastik hücrelerde uyarım yapılmadan, normal hücrelerde ise mitojenik uyarım yapılarak dbcAMP ve teofilin etkisi incelendi.

B- Normal ve Neoplastik Lenfoid Hücrelere dbcAMP'nin Etkisi

Normal Hücrelere dbcAMP'nin Etkisi:

Normal periferik kan lenfositlerine 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 milimolar (mM) olmak üzere 6 farklı dbcAMP konsantrasyonu denendi. Elde edilen sonuçlar ortalama cpm değerleri

olarak Grafik 2'de özetlendi. Grafikte de görüldüğü gibi artan dbcAMP konsantrasyonları ile hücrelerde giderek sifıra yaklaşan bir sayım elde edildi.

Neoplastik Hücrelerde dbcAMP'nin Etkisi:

Normal lenfositlere uygulanan dbcAMP konsantrasyonları aynen neoplastik hücrelere uygulandı. EB3 hücreleri ve T-tipi lösemik lenfoblastlar normal hücrelere benzer şekilde dbcAMP ile inhibe edildiler. Elde edilen sonuçlar ortalama sayım değerleri olarak Grafik 3 ve 4'de gösterilmektedir.

C-Normal ve Neoplastik Lenfoid Hücrelere Teofilin'in

Etkisi:

Normal Hücrelere Teofilin'in Etkisi:

Periferik kan lenfositlerine 10^{-5} , 10^{-4} ve 10^{-3} Molar (M) olmak üzere 3 farklı teofilin konsantrasyonu denendi (Grafik 5). dbcAMP kadar kuvvetli olmamakla birlikte teofilin'in normal hücreler üzerinde etkili olduğu görüldü. Mitojen uyarımı ile ortalama 4952.5 cpm veren normal lenfositler, teofilin dozunun artmasıyla azalan cpm değerleri verdiler.

Neoplastik Hücrelere Teofilin Etkisi:

Neoplastik hücrelere 10^{-5} , 10^{-4} ve 10^{-3} M'lık teofilin konsantrasyonlarının uygulanması ile hücre tipine göre farklılık gösteren sonuçlar elde edildi. B-tipi Burkitt lenfoma hücreleri bu teofilin konsantrasyonlarından hiç etkilenmedi (Grafik 6). Spontan sayıma çok yakın, hatta 10^{-5} M

lık konsantrasyonda ondan daha yüksek ortalama cpm elde edildi. T-tipi lösemik lenfoblastlar ise çalışmamızda kullandığımız hücreler içinde en fazla teofilin inhibisyonu gösteren grup oldu. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen ortalama cpm değerlerinde muhtemelen deneysel şartlardan gelen farklılıklar olabileceği düşünüldü ve teofilin'in T-tipi lenfoblastlar üzerinde de etkili olduğu gözlemlendi (Grafik 7).

Grafik 8'de EB3, lösemik lenfoblast ve normal lenfositlere dbcAMP'nin etkisi, Grafik 9'da ise aynı hücrelere teofilin'in etkisi % inhibisyon olarak karşılaştırıldı. % inhibisyon, ortalama cpm değerlerine göre, EB3 ve lösemik lenfoblastlarda farklı ajan konsantrasyonlarındaki cpm değerlerinin, spontan sayım değerine bölünmesiyle hesaplandı. Normal lenfositlerde ise spontan sayım yerine mitojenik uyarımla elde edilen sayım kullanıldı. Buna göre dbcAMP için hücreler karşılaştırıldığında artan dbcAMP konsantrasyonlarının hepsinde benzer şekilde DNA sentezini inhibe ettiği bulundu. Bütün hücreler 0.5 mM lık dozda en az, 5 mM lık dozda ise en yüksek % inhibisyon değerini verdiler (Grafik 8). Teofilin ile ise EB3 hücrelerinde DNA sentezinin hiç inhibe olmadığı, normal lenfositlerde orta derecede etkilendiği, T-tipi lösemik lenfoblastlarda ise en fazla inhibisyonu gösterdiği bulundu (Grafik 9).

D- İstatistik Değerlendirme:

İstatistiksel İfadelerin Kısaltmaları:

- \bar{X} : Aritmetik ortalama
S : Standart sapma
 $S_{\bar{X}}$: Standart hata
U : Mann-Whitney U testi istatistiği
KW : Kruskal-Wallis varyans analizi istatistiği
P : Önemlilik düzeyi
n : Veri Sayısı

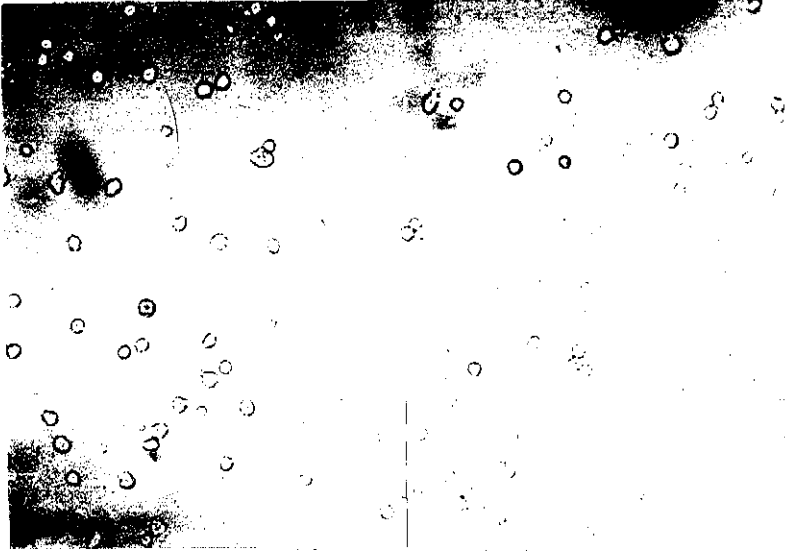
İstatistiksel değerlendirme, EB3 Burkitt lenfoma hücreleri ve normal periferik kan lenfositleri için yapıldı. T-tipi lenfoblastik lösemi vakası, tek bir örnek olması nedeniyle değerlendirmeye alınmadı. Her iki hücre grubunda 8 veri kullanılarak gruplar arasında homojenlik sağlandı.

İncelenen hücrelere ait sonuçların istatistiksel dağılımı Tablo 1 ve 2'de verildi. Tablo 3'de ise hücrelerin mitojenik uyarıma verdikleri cevabın istatistiksel değerlendirilmesi gösterildi.

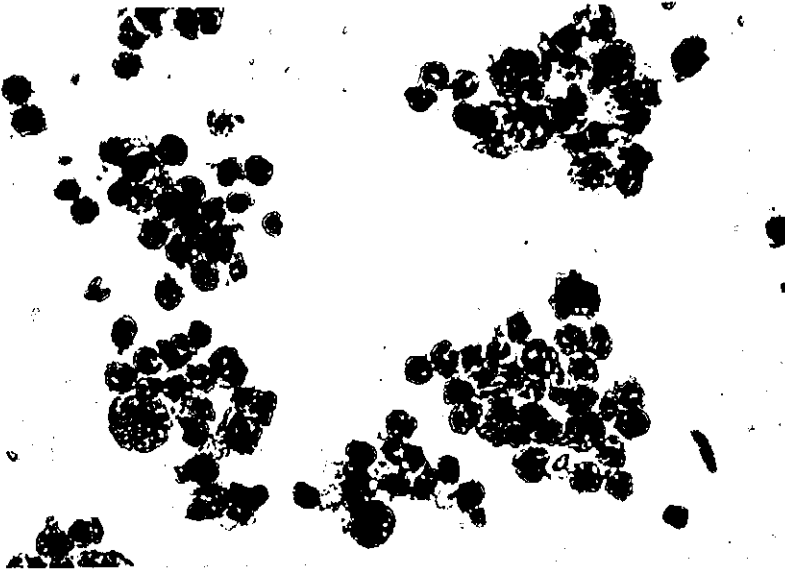
Deneyde kullanılan ajanların farklı konsantrasyonları incelenirken, önce normal lenfositlere ait dbcAMP sonuçlarının tümü hücre + PHA-M sonucu ile birlikte ele alınarak Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı (KW: 3390, $p < 0.01$). Bu test anlamlı çıktığı için U testi ile ikişerli karşılaştırmalar yapıldı (Tablo 4). Normal lenfosit teo-

filin değerlerinin tümüne varyans analizi yapıldığında KW: 25.68, $p < 0.01$ bulundu. Bu gruba ait U testi sonuçları Tablo 5'de verildi.

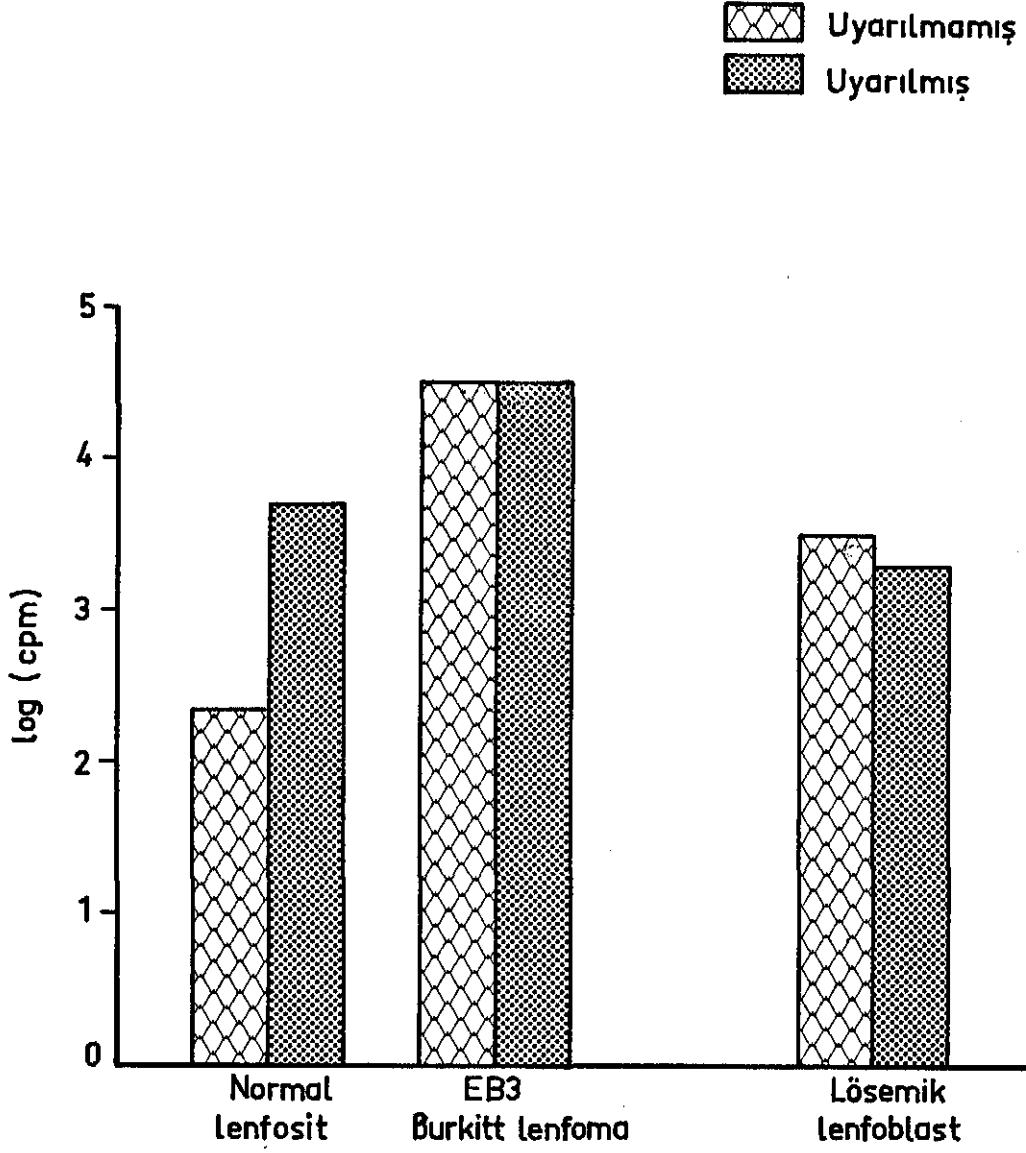
Kruskal-Wallis testi benzer şekilde EB3 hücrelerine de uygulandı, dbcAMP için KW: 53.50, $p < 0.01$ olarak bulundu. Tablo 6'da bu grubun U testi sonuçları gösterildi. Teofilin değerleri analiz edildiğinde ise istatistiksel önemlilik bulunamadığı için (KW: 18.21, $p > 0.001$) ikili karşılaştırma yapılmadı.



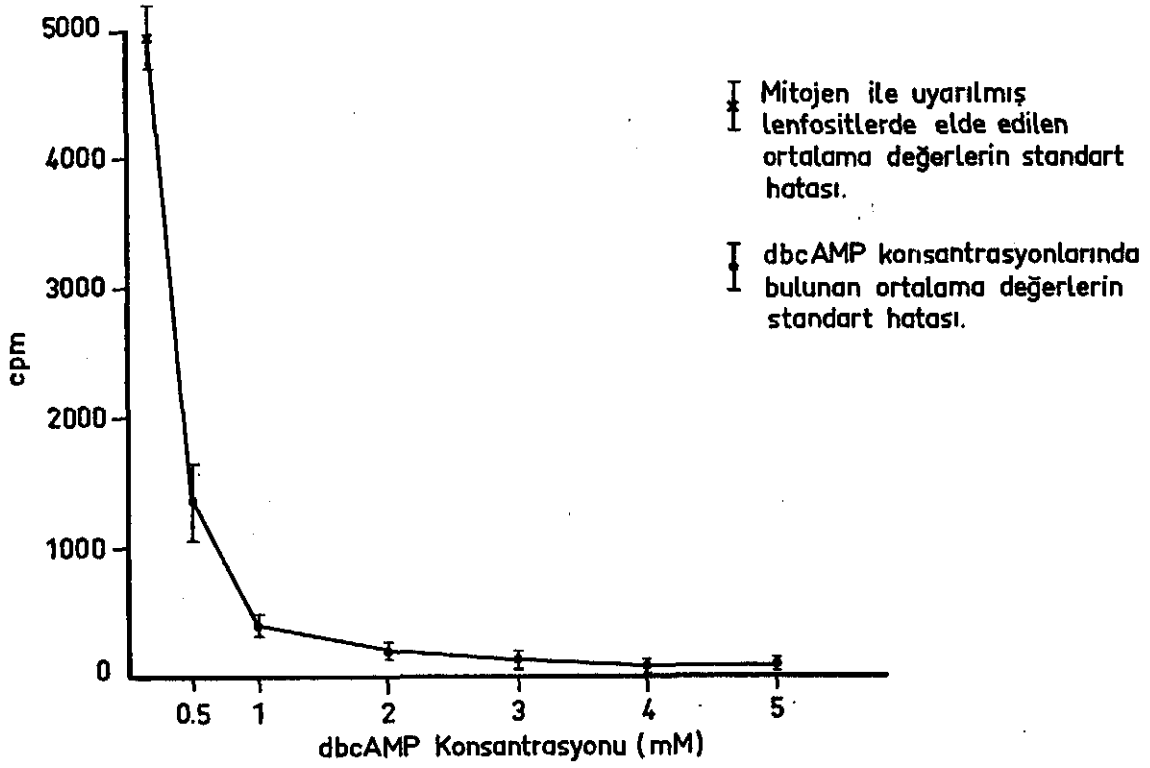
Resim 1: EB3 Burkitt lenfoma hücrelerinin suspansiyon kültürdeki görünüşleri [Leitz (100 x)]



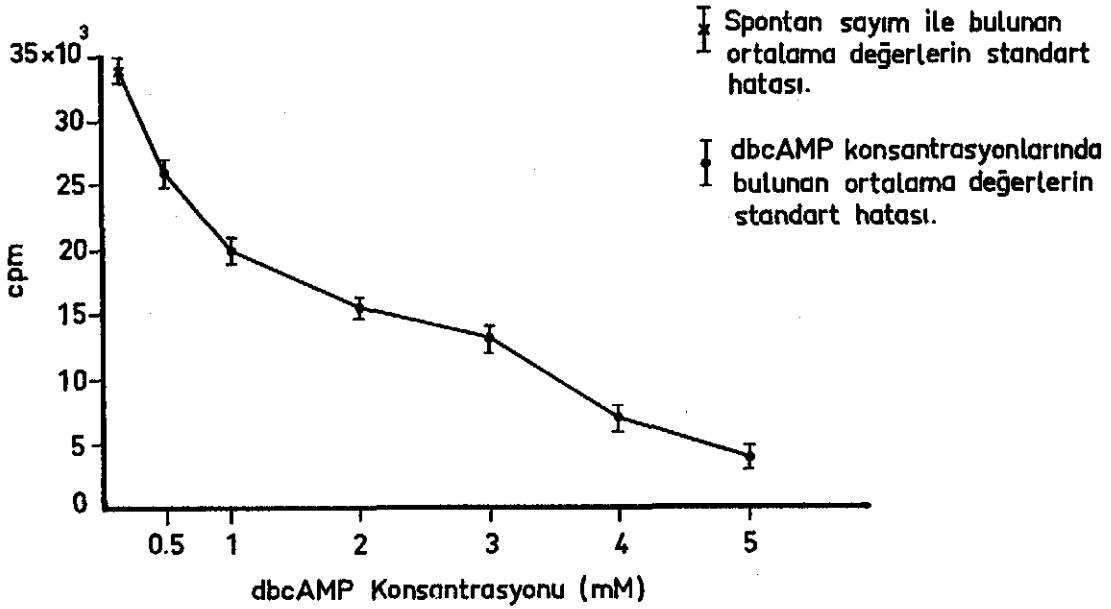
Resim 2: Wright boyasıyla boyanmış EB3 Burkitt lenfoma preparatından çekilmiş fotoğraf [(Leitz (250 x)]



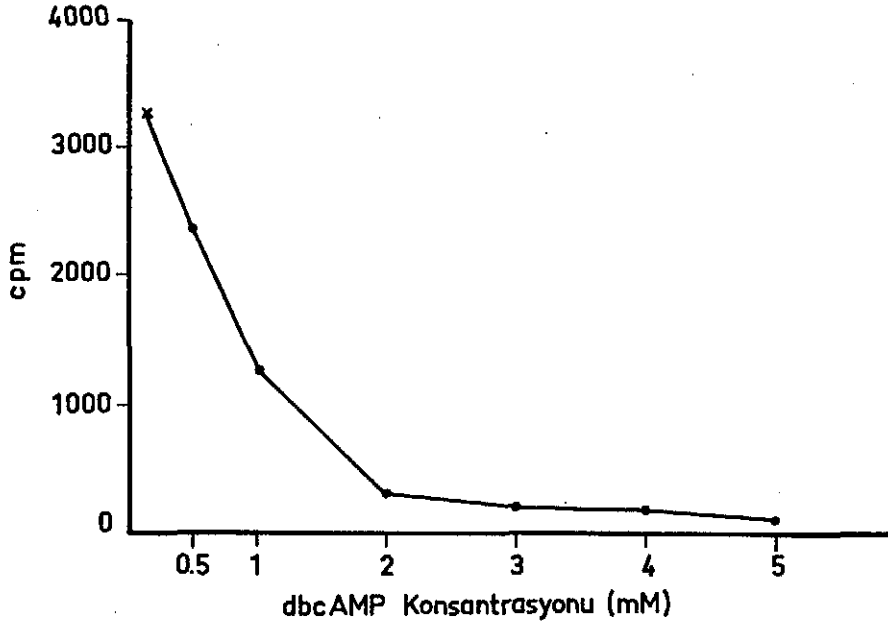
GRAFİK 1: Lenfoid hücrelerin PHA - M'e (4 µg/ml) verdikleri cevap



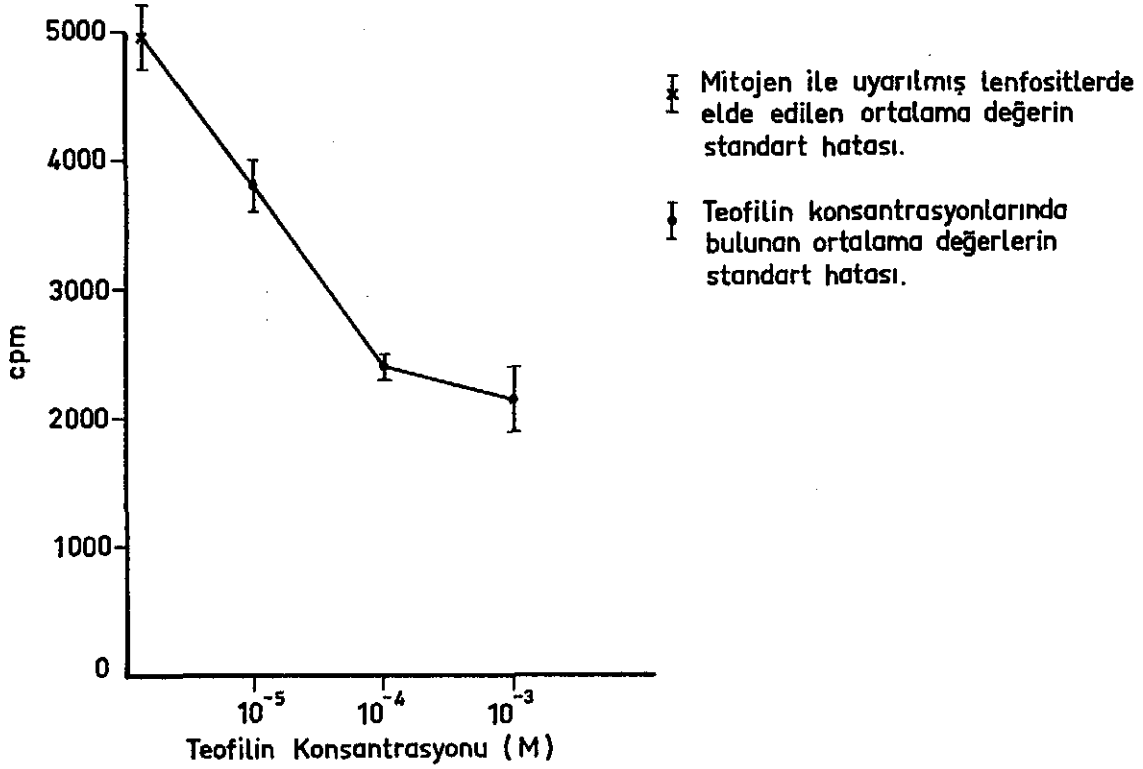
GRAFİK 2 : dbcAMP'nin PHA-M (4 µg/ml) ile uyarılmış normal lenfositlerin DNA sentezine etkisi



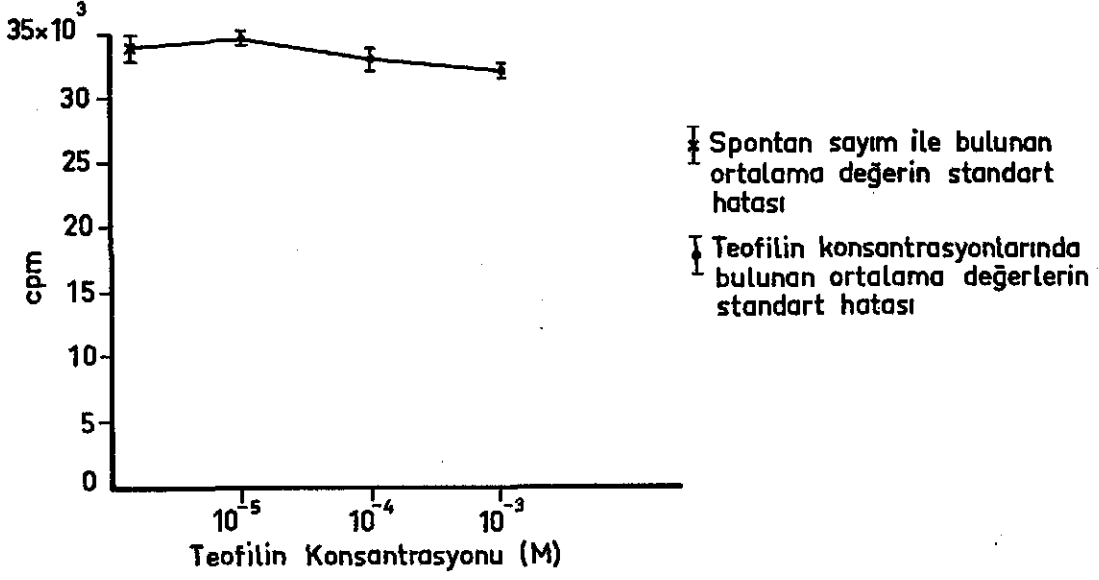
GRAFİK 3 : dbcAMP'nin EB3 hücrelerinin DNA sentezine etkisi



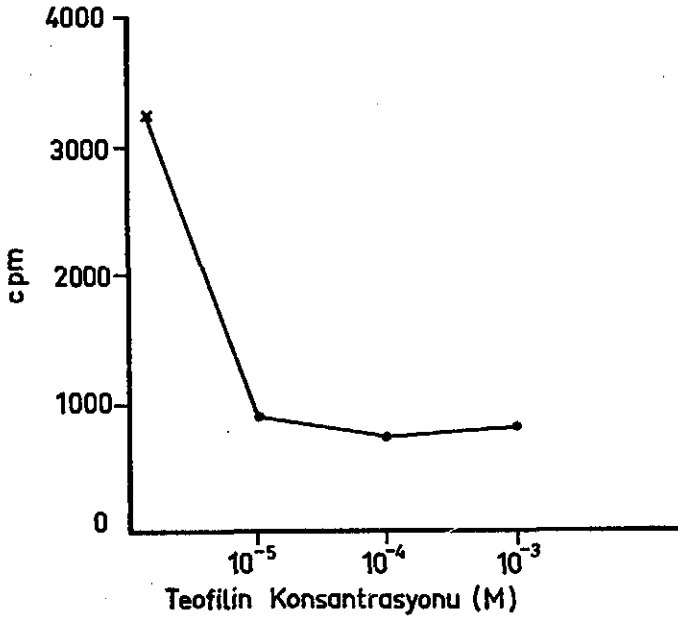
GRAFİK 4 : dbcAMP'nin T-tipi lösemik lenfoblastların DNA sentezine etkisi



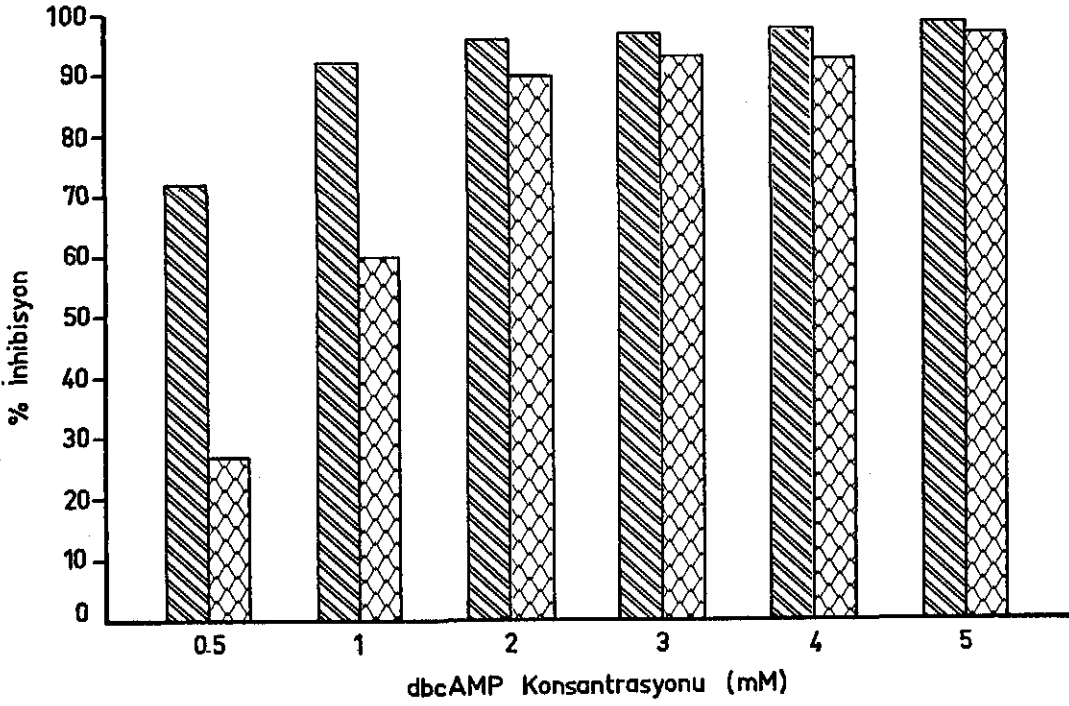
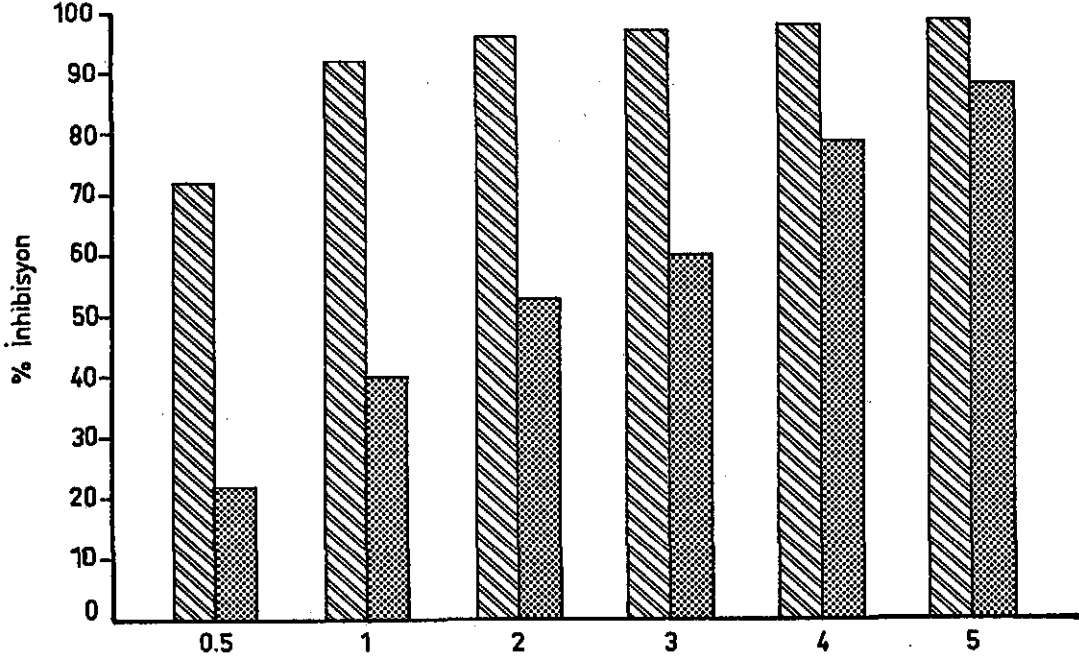
GRAFİK 5 : Teofilin'in PHA-M (4 µg/ml) ile uyarılmış normal lenfositlerin DNA sentezine etkisi



GRAFİK 6: Teofilin'in EB3 hücrelerinin DNA sentezine etkisi

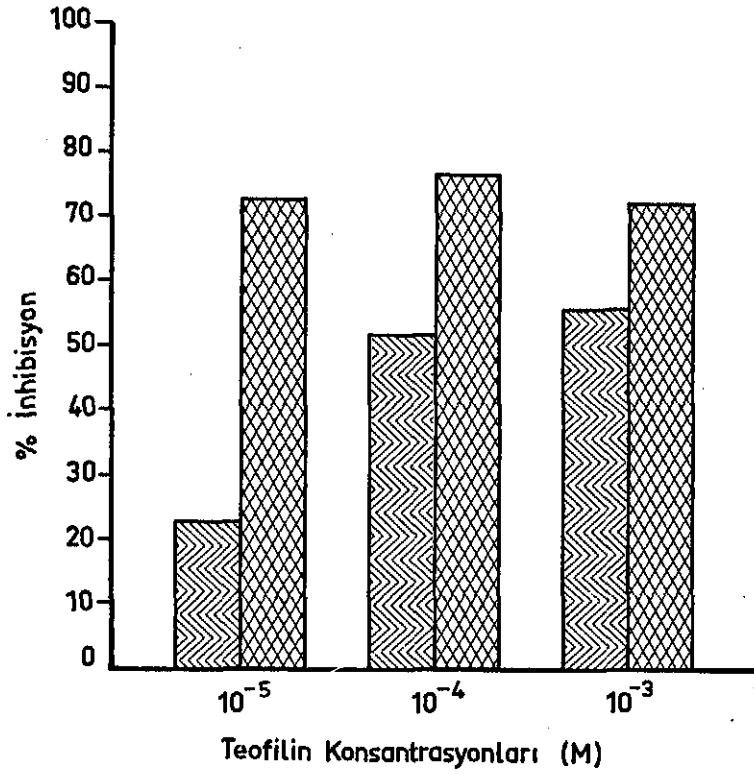
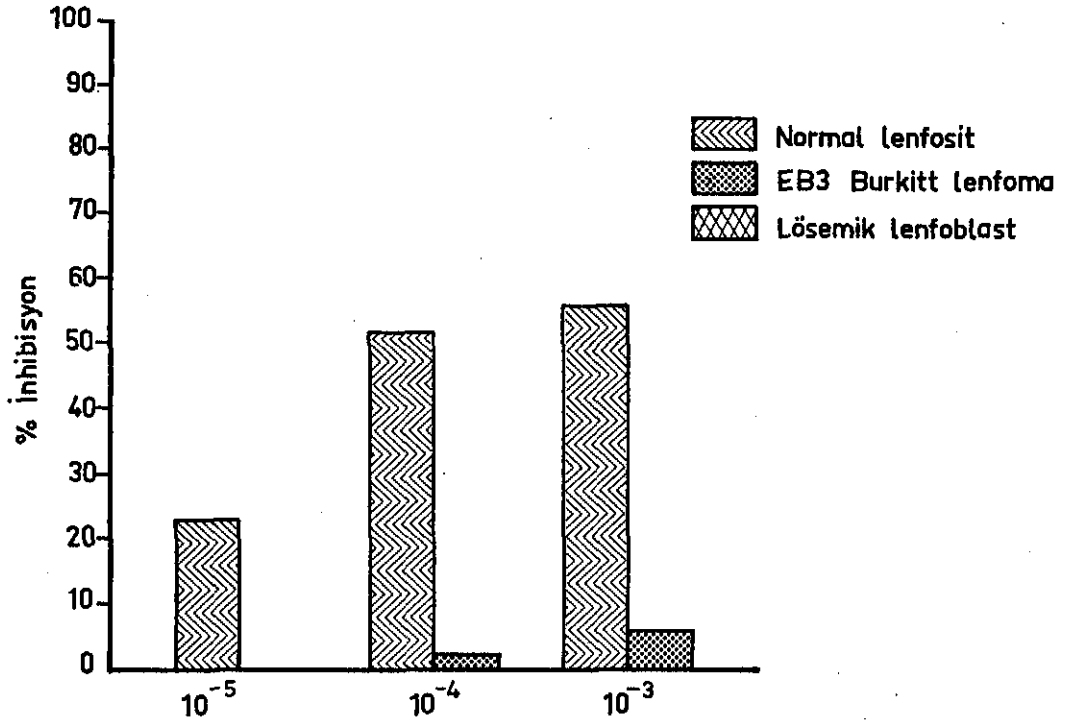


GRAFİK 7: Teofilin'in T-tipi lösemik lenfoblastların DNA sentezine etkisi.



GRAFİK 8 : dbcAMP'nin normal lenfosit, EB3 Burkitt lenfoma ve lösemik lenfoblastlarda DNA sentezine inhibisyonunun karşılaştırması.

Normal lenfosit EB3 Burkitt lenfoma Lösemik lenfoblast



GRAFİK 9: Teofilin'in normal lenfosit, EB3 Burkitt lenfoma ve lösemik lenfoblastlarda DNA sentezine inhibisyonunun karşılaştırması

DEĞİŞKENLER	\bar{x}	S	$S\bar{x}$	n
Hücre + ortam	228.0	83.48	29.51	8
Hücre + PHA	4952.5	748.95	264.79	8
Hücre+ PHA +0.5mM dbcAMP	1370.75	793.53	280.55	8
Hücre+ PHA +1 mM dbcAMP	414.37	181.10	64.03	8
Hücre+ PHA +2 mM dbcAMP	215.50	86.96	30.74	8
Hücre+ PHA +3 mM dbcAMP	162.50	52.36	18.51	8
Hücre+ PHA +4 mM dbcAMP	75.00	10.95	3.87	8
Hücre+ PHA +5 mM dbcAMP	63.25	12.32	4.35	8
Hücre+ PHA + 10^{-5} M teofilin	3823.38	485.12	171.51	8
Hücre+ PHA + 10^{-4} M teofilin	2397.75	347.52	122.86	8
Hücre+ PHA + 10^{-3} M teofilin	2164.12	790.61	279.52	8

TABLO 1: Normal Periferal Kan Lenfositlerine Ait Sonuçların İstatistiksel Dağılımı

DEĞİŞKENLER	\bar{x}	s	$s\bar{x}$	n
Hücre + Ortam	34024.5	614.30	217.19	8
Hücre + PHA	34938.5	2004.30	708.63	8
Hücre + 0.5 mM dbcAMP	26393.5	1994.32	705.10	8
Hücre + 1 mM dbcAMP	20554.1	3209.39	1134.70	8
Hücre + 2 mM dbcAMP	15977	1145.15	404.87	8
Hücre + 3 mM dbcAMP	13647.1	307.87	108.85	8
Hücre + 4 mM dbcAMP	7082.3	282.88	100.0	8
Hücre + 5 mM dbcAMP	4113.1	2235.72	790.45	8
Hücre + 10^{-5} M teofilin	34764.5	711.48	251.55	8
Hücre + 10^{-4} M teofilin	33403.5	1382.55	488.81	8
Hücre + 10^{-3} M teofilin	32107.2	585.58	207.0	8

TABLO 2: EB3 Hücrelerine Ait Sonuçların İstatistiksel Dağılımı.

DEĞİŞKENLER	Normal lenfosit		EB3	
	U	P	U	P
Hücre + Ortam	64	<0.05	46	>0.05
Hücre + PHA				

TABLO 3: EB3 ve Normal Lenfositlerin Mitojenik Uyarıma Cevabını İstatistiksel Önemlilik Düzeyleri

	Hücre+PHA Ortam	Hücre+ PHA + 0,5mM dbcAMP	Hücre+ PHA + 1 mM dbcAMP	Hücre+ PHA + 2 mM dbcAMP	Hücre+ PHA + 3 mM dbcAMP	Hücre+ PHA + 4 mM dbcAMP
Hücre +PHA + 0.5 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05					
Hücre+ PHA + 1 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05				
Hücre+ PHA+ 2 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 51 P <0,05			
Hücre+PHA + 3 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 62.5 P <0,05	U: 44 P >0,05		
Hücre +PHA + 4 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	
Hücre +PHA + 5 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 48.5 P >0,05

TABLO 4: Normal Lenfosit dbcAMP Konsantrasyonlarının İstatistiksel Önemlilik Düzeyleri

	Hücre + Ortam	Hücre+ 0,5mM dbcAMP	Hücre+ 1 mM dbcAMP	Hücre+ 2 mM dbcAMP	Hücre+ 3 mM dbcAP	Hücre+ 4 mM dbcAMP
Hücre+0,5 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05					
Hücre+1 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 61 P <0,05				
Hücre+2 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 61,5 P <0,05			
Hücre+3 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 63 P <0,05		
Hücre+4 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	
Hücre+5 mM dbcAMP	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05	U: 64 P <0,05

TABLO 5: EB3 dbcAMP Konsantrasyonlarının İstatistiksel
Önemlilik Düzeyleri

	Hücre + PHA + Ortam	Hücre + PHA + 10^{-5} M teofilin	Hücre + PHA + 10^{-4} M teofilin
Hücre + PHA + 10^{-5} M teofilin	U: 58 P < 0.05		U: 64 P < 0.05
Hücre + PHA + 10^{-4} M teofilin	U: 64 P < 0.05		
Hücre + PHA + 10^{-3} M teofilin	U: 64 P < 0.05	U: 64 P < 0.05	U: 40 P > 0.05

TABLO 6: Normal Lenfosit Teofilin Konsantrasyonlarının
İstatistiksel Önemlilik Düzeyleri

T A R T I Ő M A

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda siklik nükleotidlerin hücre bölünmesindeki rolü gösterilmiş olup, kanser hücrelerinde cAMP seviyesi yükseltilerek bölünme inhibisyonunun sağlanabileceği ileri sürülmüştür^{2-6,10-21}.

Bu bilgileri temel alarak planladığımız araştırmamızda, normal ve neoplastik lenfoid hücrelerdeki cAMP seviyesi artırılarak DNA sentezi açısından bölünme kontrolü yaratılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın başında normal lenfositler düşük spontan sayımları nedeniyle PHA gibi bir mitojenle muamele edilmiştir. Aynı mitojen neoplastik lenfoid hücrelere de uygulanmıştır. Bulgularımız, EB3 Burkitt lenfoma hücreleri ile T-tipi lösemik lenfoblastlarda DNA sentezinin mitojenden etkilenmediğini, normal lenfositlerin ise uyarıldığını göstermektedir.

Bilindiği gibi normal bir hücre aktiviteye sevk edilebilmesi için genellikle dıştan bir uyarıya ihtiyaç gösterir. Bu bir hormon, bir mitojen veya hormon tabiatında bir madde olabilir. Hücre zarındaki reseptörler bu uyarımı alarak hücre içine iletir ve birçok değişik kimyasal reaksiyonun başlamasına neden olurlar. Kanserli bir hücre zarında ise transformasyondan dolayı önemli değişiklikler meydana gelmektedir.

Bu değişiklikler bazı reseptörleri kapatarak hücrelerin dış uyarımlara cevap vermemesine, otonom hareket etmesine neden olur⁴⁴. İşte kanser hücrelerinde gözlenen bu değişiklikler hücrelerin mitojenik uyarımını da baskılayabilir. Nitekim, literatürde kanserli hücrelerin mitojenle uyarılamadığı veya çok az uyarılabildiği hakkında bilgiler vardır⁴⁵⁻⁵⁰. Bizim de çalışmamızda her iki neoplastik hücre tipi de fitohemaglutinin'e cevapsız kalmıştır. Halbuki PHA-M normal lenfositlerde reseptörler aracılığı ile blastik transformasyon yaratarak DNA sentezine yol açmıştır.

Özellikle EB3 hücrelerinin mitojenden etkilenmemesinin diğer bir izahı da PHA-M'nin gerçekte bir T-hücre mitojeni olarak etkisini gerçekleştirmesine bağlı olabilir⁵¹. Oysa başta da belirttiğimiz gibi EB3, B-hücre orijinli bir lenfoma kültürüdür. Bu nedenle PHA-M'ye cevap vermemesi kuvvetle düşünülebilir. Ancak, T-hücreli neoplazmada da uyarım sağlanmaması bu görüşü şüpheli kılmaktadır. Buna ek olarak, EB3 hücrelerinin spontan sayımlarının çok yüksek olması B-hücreye özgül mitojen kullanılsa bile, anlamlı bir uyarım elde edilemeyeceğini düşündürmüştür. Bu nedenlerle, elde edilen spontan bazal [³H] timidin sayımları her iki kanserli hücre tipinin kendi neoplastik özelliklerine bağlı görünmektedir.

Çalışmamızda EB3, lösemik lenfoblast ve normal lenfositlere altı farklı dbcAMP konsantrasyonu uygulanmıştır. Her üç hücre tipinde de dbcAMP'nin DNA sentezine benzer şekilde etki ettiği gözlenmiştir (Grafik 8).

Genel olarak normal ve neoplastik hücrelerde aynı metabolik yollar görev yapmaktadır. Metabolik yolların hızlarında veya ilgili enzimlerin faaliyetlerinde değişiklikler gözlenirse bile, hücrelerde metabolik yollar temel özelliklerini korumaktadır. Nitekim, deneyimizde hücrelere dışardan verdiğimiz dbcAMP'nin hücre zarını polar bir molekül olması dolayısıyla kolayca geçtiği ve sitoplazmadaki cAMP seviyesini hücrenin tipine bağlı kalmaksızın artırdığı düşünülmüştür. Bu da bütün hücrelerde konsantrasyonun yükselmesiyle şiddetlenen bir inhibisyon yaratılmıştır (Grafik 8). Bundan önceki çalışmalarda da fare türünden insana kadar, normal hücrelerden kanserli hücrelere kadar değişen farklı hücre tiplerinde dbcAMP'nin kullanılmasıyla aynı düşünceyle büyüme inhibisyonunun sağlanabileceği gösterilmiştir³⁻⁶.

Çalışmamızda kullandığımız hücre tiplerine teofilin'in etkisi araştırıldığında daha değişik sonuçlar elde edilmiştir. Teofilin, EB3 hücrelerinin DNA sentezini etkilemez iken, T-hücrelerinin DNA sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Normal lenfositlerde ise orta derecede bir DNA sentezi inhibisyonu yaptığı gözlenmektedir (Grafik 9).

Bu durum, kullandığımız hücrelerdeki PDE enzim aktivitesine ve hücre içi cAMP seviyesine bağlı olabilir. Yapılan araştırmalar neoplastik hücrelerde cAMP seviyesinin genellikle normale göre daha düşük olduğunu göstermiştir⁵²⁻⁵⁶. PDE enzim aktiviteleriyle ilgili bulguların da tartışmalı olduğu anlaşılmaktadır. Bazı araştırmalarda neoplastik hücrelerdeki PDE aktivitesinin normale göre düşük olduğu, bazılarında yüksek olduğu bildirilmiştir⁵⁷⁻⁶¹.

Çalışmamızda kullandığımız EB3 hücre kültüründeki PDE aktivitesi ve cAMP seviyesi ölçülmemiştir. Bu hücrelerde enzim aktivitesinin düşük olduğu varsayılırsa, zaten düşük olan bir aktiviteyi baskılayabilmemizin çok güç olduğu düşünülebilir. Başka bir ihtimalle PDE enziminin inhibisyonu ile beklenen etkiyi gözlememiş olmamız düşük cAMP seviyesine bağlı olarak hücrede DNA sentezinin inhibisyonu ve bölünmeyi durduracak miktarlarda cAMP bulunmadığı görüşüyle izah edilebilir.

T-tipi lösemik lenfoblastlarda ise yine PDE enzim aktivitesi ve hücre içi cAMP seviyesine göre teofilin belirli bir DNA sentezi inhibisyonu sağlıyor olabilir (Grafik 9). Bunun yanında, teofilin'in özellikle T-lenfositlere etkili olduğu örneğin; eritrosit rozet testini inhibe ettiği hakkında bilgi mevcuttur⁶². Buna göre teofilin'in T-hücrelerine özgül bir etki yaptığı sözkonusu edilebilir.

Ancak, araştırmamızda tek bir T-hücre neoplazi hastasının lenfoid hücrelerinin kullanılması ve EB3 hücrelerinin ise uzun süre in vitro şartlarda devam ettirilen transforme bir kültür olmasının sonuçlarımızın karşılaştırması yapılırken dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmayı temel almak üzere ileride yapılacak hücre içi enzim aktiviteleri ve cAMP seviyeleri ile bağlantısı-

na ilişkin yeni çalışmalar, özellikle T veya B-hücre tipi taşıyan lenfoproliferatif hastalıklarda neoplastik hücre bölünmesi kontrolü, kinetiği konularına açıklık getirebileceği gibi kanser kemoterapisine temel teşkil edebilecek bulęulara ışık tutabilir.

Ö Z E T

Çalışmamızda EB3 Burkitt lenfoma hücre kültürü ve bir T tipi lenfoblastik lösemi vakasında DNA sentezi üzerine dbcAMP ve teofilin'in etkileri araştırılmıştır. Kontrol olarak sağlıklı kişilerin periferal kanından izole edilen lenfositler kullanılmıştır.

Hücreler dbcAMP ve teofilin ile muamele edilerek radyoaktif timidin metodu ile DNA sentezlerine bakılmıştır. Ancak kontrol lenfositlerin spontan sayımları çok düşük olduğundan hücreler mitojenle uyarılarak, ajanların DNA sentezine etkisine bakılmıştır.

Bulgularımız, dbcAMP'nin tüm hücrelerde benzer şekilde DNA sentezini inhibe ettiğini göstermiştir. Teofilin'in ise EB3 hücrelerinde hiç etkili olmadığı ortaya konulmuştur.

K A Y N A K L A R

1. Davis BD et al: Animal Cell Cultures. Page 942 in: Microbiology. Harpes and Row Publishers Inc., 1980.
2. Watson JD : The control of cell proliferation. Page 547 in: Molecular Biology of the Gene. W.A. Benjamin Inc., 1976.
3. Bürk RR : Reduced adenyl cyclase activity in a polyoma virus transformed cell line. Nature 1968; 219: 1272.
4. Johnson GS, Friedman RM, Pastan I: Restoration of several morphological characteristics of normal fibroblasts in sarcoma cells treated with adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and its derivatives. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 425.
5. Sheppard JR : Restoration of contact inhibited growth to transformed cells by dibutyryl adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 1316.
6. Ghosh NK et al : Regulation of growth and morphological modulation of Hela cells in monolayer culture by dibutyryl cyclic AMP, butyrate and their analogs. J Cell Physiol 1975; 86: 663.
7. Pardee AB et al : Animal cell cycle. Ann Rev Biochem 1978; 47: 715.
8. Robinson GA, Butcher RW, Sutherland EW: Cyclic AMP. Page 1 Academic Press, 1971.

- 9- Stryer L : Hormone action. Page 841 in: Biochemistry. W.H. Freeman and Company, 1981.
- 10- Ryan WL, Heidrick ML : Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 1968; 162: 1484.
- 11- Pastan IH, Johnson GS, Anderson WB: Role of cyclic nucleotides in growth control. Ann Rev Biochem. 1975; 44: 491.
- 12- Heidrick ML, Ryan WL: Metabolism of 3',5'-cyclic AMP by strains L cells. Biochim Biophys Acta 1971; 237: 301.
- 13- Thomas DR, Philpott GW, Jaffe BM : The relationship between concentrations of prostaglandin E and rates of cell replication. Exp Cell Res 1974; 84: 40.
- 14- Grimes WJ, Schroeder JL: Dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, sugar transport, and regulatory control of cell division in normal and transformed cells. J cell Biol 1973; 56: 487.
- 15- Diamantstein T, Ulmer A : Regulation of DNA Synthesis by guanosine-5'-diphosphate , cyclic guanosine-3',5'-monophosphate, and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in mouse lymphoid cells. Exp Cell Res 1975; 93: 309.
- 16- Froehlich JE, Rachmeler M : Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on cell proliferation. J Cell Biol 1972; 55: 19.
- 17- Eker P: Inhibition of growth and DNA synthesis in cell cultures by cyclic AMP. J Cell Sci 1974; 16: 301.
- 18- Abell CW, Kamp CW, Johnson LD: Effects of phytohemagglutinin and isoproterenol on DNA synthesis in lymphocytes from normal donors and patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 1970; 30: 717.

- 19- Sandor R : Inhibition of human rhabdomyosarcoma cell growth in agar by dibutyryl cyclic AMP. J Natl Cancer Inst 1973; 51: 257.
- 20- Niles RM, Ludwig KW, Makarski JS: Differential growth inhibition in two human carcinoma cell lines by cyclic adenosine 5'-monophosphate analogs. J Natl Cancer Inst 1979; 63: 909.
- 21- Abell CW, Monahan TM: The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. J Cell Biol 1973; 59:549.
- 22- Malpas JS: Lymphomas in children. Semin Hematol 1982; 19: 301.
- 23- Küçüküsu, N : Lenfomalar. Sayfa 529 Klinik Onkoloji. Küçüküsu N, Ruacan ŞA (editörler), Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1978.
- 24- Hancock BW, Bradshaw JD: Haemopoietic and lymphoreticular malignancies. Page 133 in: Lecture Notes on Clinical Oncology. Blackwell Scientific Publications, 1981.
- 25- Klein G : The Epstein-Barr virus and neoplasia. New Engl J Med 1975; 293: 1353.
- 26- Ziegler JL et al: Epstein-Barr virus and human malignancy. Ann Inter Med 1975; 86: 323.
- 27- Ziegler JL : Burkitt's lymphoma. New Engl J Med 1981; 305: 735.
- 28- Bird AG, Britton S. : The relationship between Epstein-Barr virus and lymphoma. Semin Hematol 1982; 19: 285.
- 29- Reitz MS et al : Human T-cell leukemia / lymphoma virus: The retrovirus of adult T-cell leukemia/lymphoma. J Infect Dis 1983; 147: 399.

- 30- Blattner WA et al: Epidemiology of human T-cell leukemia/lymphoma virus. J Infect Dis 1983; 147: 406.
- 31- Oleinick A : Leukemia or lymphoma occurring subsequent to an auto-immune disease. Blood 1967; 29: 144.
- 32- Gatti RA , Good RA : Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. Cancer 1971; 28: 89.
- 33- Penn I : Occurrence of cancer in immune deficiencies. Cancer 1974; 34: 858.
- 34- Wells JY, Reis CA.: Hematologic diseases. Page 460 in: Basic and Clinical Immunology. Stites DP, Stobo JD, Fudetberg HH, Wells JV (editors). Lange Medical Publications, 1982.
- 35- Tooze J (editor): The culture of mammalian cells. Page 74 in: The Molecular Biology of Tumour Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, 1973.
- 36- Epstein AL, Kaplan HS : Feeder layer and nutritional requirements for the establishment and cloning of human malignant lymphoma cell lines. Cancer Res 1979; 39: 1748.
- 37- Boyum A : Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21: 9.
- 38- Patterson MK: Measurement of growth and viability of cells in culture. Page 141 in: Methods in Enzymology. Jakoby WB, Pastan IH (editors). Academic Press, 1979.
- 39- Stobo JD et al : Supressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection. J Clin Invest 1976; 57: 319.
- 40- Kart A : İnsan nöroblastoma hücrelerinin farklılaşması üzerine prostaglandin E₂, teofilin ve N⁶, O²'-dibutiril siklik AMP'nin etkileri. Sayfa 19 Doçentlik tezi, 1982.

- 41- The Merck Index: Page 1034 Merck and Co., Inc., 1968.
- 42- Sümbüloğlu K : Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik. Çağ Matbaası, 1978.
- 43- Berger SL: Lymphocytes as resting cells. Page 486 in: Methods in Enzymology. Jakoby WB, Pastan IH (editors). Academic Press, 1979.
- 44- VanRijssel THG : Introduction on the genesis of tumor cells. Page 9 in: Genetic Origins of Tumor Cells. Cleton FJ, Simons JWIM (editors). Martinus Nijhoff Publishers, 1980.
- 45- Bernard C, Geraldine A, Boiron M : Effects of phytohemagglutinin on blood cultures of chronic lymphocytic leukemia. Lancet 1964; I: 667.
- 46- Hersh EM, Oppenheim JJ : Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. New Engl J Med 1965; 273: 1006.
- 47- Oppenheim JJ, Whange J, and Frei E : Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemic cells. Blood 1965; 26: 121.
- 48- Papac RJ : Lymphocyte transformation in malignant lymphomas. Cancer 1970; 26: 279.
- 49- Sutherland RM, Rodger W, and McCredie JA: Phytohemagglutinin (PHA) induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. Cancer 1971; 27: 574.
- 50- Tan CTC et al : In vitro responses of peripheral blood and spleen lymphoid cells to mitogens and antigens in childhood Hodgkin's disease. Cancer Res 1978; 38: 886.
- 51- Gülmezoğlu E : Bağışıklığın Temelleri. Sayfa 377 Sevinç Matbaası, 1983.

- 52- Otten J, Johnson GS, Pastan I : Cyclic AMP levels in fibroblasts: relationship to growth rate and contact inhibition of growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 44: 1192.
- 53- Bannai S, Sheppard JR : cAMP, ATP and cell contact. *Nature* 1974; 250: 62.
- 54- Coffino P, Gray JW, Tomkins GM : Cyclic AMP, A nonessential regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 878.
- 55- Kemp RG, Hsu PY, Duquesnoy RJ : Changes in lymphoid cyclic adenosine 3',5'-monophosphate metabolism during murine leukemogenesis. *Cancer Res.* 1975; 35: 2440.
- 56- Monahan TM, et al : Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and activities of related enzymes in normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res.* 1975; 35: 2540.
- 57- Sharma RK : Studies on adrenocortical carcinoma of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase activities. *Cancer Res* 1972; 32: 1734.
- 58- Rhoads AR, Morris HP, West WL : Cyclic 3',5'-nucleotide monophosphate phosphodiesterase activity in hepatomas of different growth rates. *Cancer* 1972; 32: 1734.
- 59- D'Armiento M, Johnson GS, Pastan I.: Regulation of adenosine 3',5'-cyclic Monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentrations of cyclic adenosine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 459.
- 60- Hait WN, Weiss B : Increased cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in leukaemic lymphocytes. *Nature* 1976; 259: 321.

- 61- Verma AK, Froscio M, Murray A : Croton oil- and benzo (a) pyrene-induced changes in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 1976; 36: 81.
- 62- Limatibul S et al: Theophylline modulation of E-rosette formation: an indicator of T-cell maturation. *Clin Exp Immunol* 1978; 33: 503.

