

## SAĞLIKLI ÇOCUK VE ERİŞKİNLERDE DOWN SENDROMLU ÇOCUKLarda ADENozin DEAMINASE AKTİVİTESİ

Atanur ÖZBALCI

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Ana Bilim Dalı

### Ö Z E T

Bu çalışmada 20 Down sendromlu, 26 sağlıklı çocuk ve 20 sağlıklı erişkinde eritrosit ADA aktiviteleri spektrofotometrik olarak ve mikro metodla tayin edilmiştir.

Down sendromlu olguların ADA değerleri sağlıklı çocuk kontrollerden anlamlı olarak yüksek bulundu.

Bu durum genel hücre metabolizması bozukluğuna veya gen sürdozajı neticesi artmış bir enzimin biyomik etkisiyle ADA aktivitesinin de artmasına bağlandı.

### G İ R İ S

Son yıllarda Down sendromlu çocuklarda yapılan immünlolojik araştırmalarla, yeni doğan çağında IgG seviyelerinin normal yenidoğanlara nazaran çok düşük bulunduğu saptanmıştır<sup>6,8</sup>. Senelerden beri Down sendromlu çocukların tipki immün yetersizliği olan çocuklar gibi ilk günlerden itibaren ağır enfeksiyonlara yakalandıkları ve bu enfeksiyonların sık sık tekrarladığı herkesçe bilinen bir geçektir.

İlk defa 1972'de Giblett<sup>3</sup> tarafından ortaya atılan Adenozin deaminase (ADA) eksikliği ile kombine immün yetmezlik arasında ki ilişki, daha sonra Dissing<sup>2</sup> tarafından da teyit edilmiştir. 1973'de ise Jenkins<sup>4</sup> hiçbir immün yetmezliği olmayan bir vak'ada ADA eksikliğini göstermiştir. Ayrıca ADA eksikliği ve kombine immün yetmezlikle beraber iskelet sisteminde anomaliler bulunan vak'alar da bildirilmiştir.

ADA eksikliği ile beraber olan bu hastalık tablolari hümoral, sellüler veya kombine immün yetmezlik tablolarıdır.

Down sendromunda hem sellüler hem de hümoral bir immün yetmezlik saptandığına göre ADA eksikliğinin de beraber olabileceği akla gelmektedir.

Bu çalışmamızda gerek bu yönden gerekse son senelerde Down sendromlu çocukların yapılan eritrostit engim tetkikleri arasında ADA'a rastlamamamız yönünden Down sendromlu çocukların eritrosit ADA aktivitelerini araştırmayı öngördük.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### **Adenosin Deaminase (ADA) Dozajı :**

**Spektrofotometrik yöntem ile yapıldı**

### **Yöntemin Prencibi :**



Reaksiyon için gerekli bulunan ADA aktivitesi ortama ilâve edilen adenozinin inozine dönüşmesini sağlar.

### **a) Hemolizatın hazırlanması :**

Hastadan alınan 5 ml kan tüpte hazır bulunan 1 ml Sitrat - Dekstroz solusyonu (ACD solusyonu : Sitrik asid 4,4 g + sodyum sitrat 13,2 g + bidistile su 1000 ml) ile yavaşça pihtlaşma önlenecek şekilde karıştırılır. Daha sonra 1000 rpm de 15 dakika santrifüje edilir. Üst kısım atılır. Alt kısma aynı miktar soğuk serum fizyolojik ilâve edilip çalkalamadan alt üst edilir ve yine üst kısım atılır, bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanır.

Alt kısımdan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml bidistile su ve 0,25 ml toluen eklenip Vorteks karıştırıcısında 30 saniye karıştırılarak buzdolabında 24 saat bekletilir. Amaç hemolizin tam olarak gerçekleşmesini sağlamaktır. Bekleme sonunda santrifüj edilerek toluen hemolizattan ayrılr. Hemolizatın en uygun şekilde alınması için, ince uçlu bir pipetle santrifüj tüpünün ortasına inilip hemolizat çekilir. Dipteki eritrosit stromalarının alınmamasına büyük özen gösterilir. Hemolizatlar - 4°C de saklanarak en geç 48 saat içinde ADA tayinleri yapılmıştır. Kan alınımında antikoagulant olarak kullanılan ACD, hemolizatın ADA aktivitesinin + 4°C de 20 gün bozulmadan muhafazasını sağlar<sup>1</sup>.

**b) Deneyin yapılışı :**

	Blank	Deney
Tris - HCL 1 M, EDTA 5mM, pH : 8	100 µl	100 µl
Hemolizat 1/20	20 »	20 »
H <sub>2</sub> O	880 »	860 »
Adenozin 4 mM	—	20 µl

İyice karıştırılır, 37°C'de 10 dakika bekletilir.

İlâvesiyle reaksiyon başlatılır. Perkin - Coleman 55 Digital spektrofotometresinde 265 nm dalga boyunda optik dansite okunur. Her vak'a için ayrı bir blank hazırlanır<sup>1</sup>. 265 nm deki optik dansite azalması adenozinin azalmasını verir. Bu azalmanın saptanması için deney koşullarımızda optimum ve yeterli zaman aralığı olarak 10 dakika seçilmiştir. Enzim aktivitesi ortalamı 40 dakika etkinliğini sürdürmektedir<sup>7</sup>.

**c) Hemoglobin tayini :**

Kolorimetrik cyanmethemoglobin metoduyla yapıldı. Ferrisiyanürün hemoglobindeki demiri okside ederek methemoglobine dönüştürmesi esasına dayanır.

5 ml renk reaktifi, 0,02 ml 1/20 hemolizat karıştırılarak oda derecesinde 5 dakika bekletilir. 540 nm dalga boyunda bidistile suya karşı optik dansite okunur.

**d) ADA Aktivitesi hesabı :**

ADA aktivitesi düşük olması nedeniyle 265 nm de çok hassas olarak yapılması gerekmektedir. Adenozin ile inozinin 1 mM ekstinksyon katsayıları arasındaki fark 8,1 dir. Bu katsayı hesap formülünde ( $\epsilon$ ) değeri olarak kullanılmaktadır. Aşağıdaki formülde E değeri, enzim aktivitesini internasyonal ünite/g hemoglobin olarak göstermektedir.

$$E : \frac{10 (OD_D - OD_B) \times V_{Hb} \times S}{F_{Hb} \times (V_{Fe} - V_{Hb}) \times OD_{540} \times \epsilon \times V_H} \text{ IU/g.Hb}$$

OD<sub>D</sub> : Deneyin optik dansite değişimi (10 dakikalık)

OD<sub>B</sub> : Blank'in dansite değişimi (10 dakikalık)

V<sub>Hb</sub> : 10 ml ferrosiyanür reaktifine ilâve edilen hemolizat hacmi (0.04 ml)

F<sub>Hb</sub> : Hemoglobin çevirmefaktörü (36.77)

$V_F$  : Ferrosiyanür reaktifinin hacmi (10 ml)

$\epsilon$  : Eksitinksiyon katsayısı (8.1)

$V_H$  : 1 ml reaksiyon karışımına eklenen hemolizat hacmi (0.02 ml)

S : Kayıt cihazının tam skalası (1).

## BULGULAR

Çalışmamızın olgularını ;

- 1 — 0 - 2 yaş arası normal çocuklar,
- 2 — 2 - 14 yaş arası normal çocuklar,
- 3 — 0 - 14 yaş arası normal çocuklar (1. ve 2. grup),
- 4 — Normal erişkinler.
- 5 — Down sendromlu çocuklar olmak üzere 5 grupta toplayarak inceledik.

1 — 0 - 2 yaş normal çocuk grubumuzda 9 olgu olup, bunların yaş ortalaması 1 yaşıdır. ADA aktivite dağılımı 0.912 - 1.181 IU/g Hb arasında, ortalama değer 1.034 IU/g Hb ve standart sapma  $\pm$  0.080 IU/g Hb (1.034  $\pm$  0.080 IU/g Hb) (Tablo 1).

Tablo 1. 0-2 yaş normal çocuk grubu

Sıra No.	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Adenozin Deaminaz Aktivitesi IU/g Hb
1	Z.C	4/12	K	1.003
2	F.K	8/12	K	1.056
3	S.T	9/12	K	0.956
4	M.Y	11/12	E	0.912
5	H.E	1	K	1.181
6	M.A	1	E	1.003
7	D.S	1 3/12	K	1.029
8	M.D	1 6/12	E	1.056
9	N.T	2	K	1.114
<b>Dağılım :</b>				<b>0.912-1.181</b>
<b>Ortalama :</b>				<b>1.034</b>
<b><math>\pm</math> SD :</b>				<b>0.080</b>

2. 2 - 14 yaş normal çocuk grubumuzda 17 olgu olup, bunların yaş ortalaması 7.6/12 yaşıdır. ADA aktiviteleri dağılımı 0.872 - 1.337 IU/g Hb arasında, ortalama değer 1.034 IU/g Hb ve standart sapma  $\pm$  0.106 IU/g Hb dir. (1.034  $\pm$  0.106 IU/g Hb) (Tablo 2).

Tablo 2. 2 - 14 yaş normal çocuk grubu

Sıra No.	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Adenozin Deaminasyon Aktivitesi IU/g Hb
1	D.C	2.6/12	K	1.029
2	Y.Ç	3	E	1.003
3	R.Y	3	K	1.056
4	A.D	3.6/12	K	0.956
5	B.K	5	E	1.003
6	H.T	5	E	0.956
7	B.T	6	E	1.114
8	O.B	7	K	1.070
9	Ö.O	7	E	1.114
10	S.U	7	K	1.337
11	M.A	8	E	0.956
12	S.K	9	K	0.872
13	H.E	11	E	0.891
14	E.Y	12	E	1.003
15	A.K	12	E	1.115
16	E.K	13	E	1.056
17	K.B	14	E	1.056
Dağılım :				0.872-1.337
Ortalama :				1.034
$\pm$ SD :				0.106

Bu iki grubun istatistik karşılaştırılmasında  $t : 0.0022$  ve  $p > 0.05$  olup, anamli bir fark bulunamadı (Tablo 6).

3. 0 - 14 yaş normal çocuk grubumuz 1 ve 2. grupların toplamı olan 26 olgudan oluşmakta olup bunların yaş ortalamaları 5 yaşıdır. ADA aktiviteleri dağılımı 0.872 - 1.337 IU/g Hb arasında, ortalama değer 1.034 IU/g Hb ve standart sapma  $\pm$  0.096 IU/g Hb dir (1.034  $\pm$  0.096 IU/g Hb) (Tablo 3).

Table 3. 0 - 14 yaş normal çocuk grubu

Sıra No.	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Adenosin Deaminaz Aktivitesi IU/g Hb
1	Z.C.	4/12	K	1.003
2	H.K	8/12	K	1.056
3	S.T	9/12	K	0.956
4	M.Y	11/12	E	0.912
5	H.E	1	K	1.181
6	M.A	1	E	1.003
7	D.S	1 3/12	K	1.029
8	M.D	1 6/12	E	1.056
9	N.T	2	K	1.114
10	D.Ç	2 6/12	K	1.029
11	Y.Ç	3	E	1.003
12	R.Y	3	K	1.056
13	A.D	3 6/12	K	0.956
14	B.K	5	E	1.003
15	H.T	5	E	0.956
16	B.T	6	E	1.114
17	O.B	7	K	1.070
18	Ö.O	7	E	1.114
19	S.U	7	K	1.337
20	M.A	8	E	0.956
21	S.K	9	K	0.872
22	H.E	11	E	0.891
23	E.Y	12	E	1.003
24	O.K	12	E	1.115
25	E.K	13	E	1.056
26	T.B	14	E	1.056
Dağılım :				0.872-1.336
Ortalama :				1.334
$\pm SD$ :				0.096

4. Normal erişkin grubumuzu 20 olgu oluşturmaktadır, bunların yaş ortalamaları 27 yaşıdır. ADA aktiviteleri dağılımı 0.912 - 1.337 IU/g Hb arasında, ortalama değer 1.170 IU/g Hb ve standart sapma  $\pm 0.135$  IU/g Hb dir. ( $1.170 \pm 0.135$  IU/g Hb) (Table 4).

Tablo 4. Normal erişkin grubu

Sıra No.	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Adenosin Deaminaz Aktivitesi IU/g Hb
1	N.M	21	K	0.912
2	S.Ö	22	E	1.337
3	M.E	22	K	1.232
4	N.Y	22	E	1.003
5	K.A	23	E	1.003
6	H.B	23	E	1.337
7	H.D	23	E	1.295
8	Ü.K	23	E	1.239
9	H.K	24	E	1.274
10	I.K	24	E	1.070
11	G.Ö	26	K	1.337
12	G.Ö	27	K	1.114
13	Ç.Ö	29	E	1.255
14	O.I	29	E	1.337
15	A.Ö	29	E	1.163
16	N.S	30	E	1.056
17	N.K	30	E	1.181
18	A.G	30	E	1.115
19	Z.F	42	K	1.029
20	M.H	48	K	1.079
Dağılım :				0.912 - 1.337
Ortalama :				1.170
$\pm$ SD :				0.135

Bu grubun 0 - 14 yaş normal çocuk grubu ile yaptığımız istatistik karşılaştırmasında anlamlı bir artış saptandı.

t : 3.976 ve p < 0.0001 (Tablo 6).

5. Down sendromlu çocuk grubumuzu 20 olgu oluşturmaktakta olup bunların yaş ortalamaları 4 yaşıdır. ADA aktiviteleri dağılımı 0.956 - 1.327 IU/g Hb arasında, ortalama değer 1.382 IU/g Hb ve standart sapma  $\pm$  0.415 IU/g Hb dir. (1.382  $\pm$  0.415 IU/g Hb) (Tablo 5).

Bu grubun 0 - 14 yaş çocuk grubu ile yaptığımız istatistik karşılaştırmasında anlamlı bir artış saptandı. t : 3.672 ve p < 0.001 bulundu (Tablo 6).

Tablo 5. Down sendromlu çocuklar

Sıra No.	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Adenosin Deaminaz Aktivitesi IU/h Hb
1	M.B	3/12	E	1.825
2	T.D	3/12	E	2.168
3	Ü.C	3 5/12	E	1.239
4	B.Ç	10/12	K	1.181
5	Ş.U	1 3/12	K	2.327
6	L.B	1 6/12	K	1.393
7	A.Y	1 9/12	E	1.672
8	C.K	2	E	1.255
9	G.B	2	E	1.232
10	D.K	4	K	0.956
11	S.E	4	E	2.129
12	T.N	4	K	1.125
13	I.K	5	E	1.056
14	Z.Ö	5	E	1.003
15	Z.A	6	E	1.181
16	E.Y	7	K	1.115
17	B.B	8	K	1.114
18	O.T	9	E	1.114
19	F.T	10	K	1.454
20	Y.Ş	10	K	1.114
Dağılım :				0.956 - 2.327
Ortalama :				1.382
$\pm SD$ :				0.415

Tablo 6. Grupların İstatistik Değerlendirilmesi

	0 - 2 Yaş Çocuk Grubu	0 - 14 Yaş Çocuk Grubu
2 - 14 Yaş Çocuk Grubu	t : 0.0022 p > 0.05	—
Normal Erişkin	—	t : 3.976 p < 0.0001
Down sendromlu çocuklar	—	t : 3.672 p < 0.001

## İRDELEME

*Beutler*'in erişkinler için bildirdiği normal Adenozin deaminase değerleri  $1.11 \pm 0.23$  IU/g Hb olup, bizim çalışmamızda bulduğumuz normal erişkin değerlerine  $1.17 \pm 0.13$  IU/g Hb'e uymaktadır.

Down sendromlu olguların ADA aktivitelerini normal çocuk kontrollerimiz ile karşılaştırdığımızda istatistik yönünden anlamlı derecede farklılık tesbit ettik. Down sendromlu vakalarımızdaki bu ADA aktivitesi artışı bizim immünolojik yönünden beklediğimiz neticelere aykırı ise de yaynlarda rastladığımız bu olgulardaki eritrosit enzimlerinin artışlarına uygunluk göstermektedir.

1973 de *Schwarzmeier* ve ark<sup>9</sup>. Down sendromunda eritrosit enzimlerinde piruvat kinaz, glikoz - 6 - fosfat dehidrogenaz, 6 - fosfoglukodehidrogenazda aşıkar aktivite artıları olduğunu tesbit ettiler.

Bu araştırmacılar enzimlerdeki aktivite artılarını :

1. Down sendromundaki kromozomal düzensizliğin, yani trisominin gen - doz - effekt şeklinde direkt etkisine,
2. Genç eritrosit popülasyonunun varlığına,
3. Down sendromunda genel olarak mevcut olan geriliğin hematopoetik sistemde de bulunması ve sağlam çocuklarda ilk ayda eritrositlerde relativ olarak yüksek bulunan enzim aktivitesinin Down sendromlu çocuklarda daha uzun süre yüksek kalabilmesine bağlamaya çalışılmışlardır.

1977 de *Mattei* ve ark.<sup>5</sup> Trisomi 21 vakalarında eritrosit hekzokinaz, fosfofruktokinaz, 3 - fosfoglicerokinaz, piruvat kinaz, aldolaz, glutation redüktaz ve glikoz - 6 - fosfat dehidrogenaz enzim aktivitelerinde artış; gliser aldehit - 3 - fosfat dehidrogenaz, fosfogliseromutaz aktivitelerinde ise azalış saptadılar.

Bu yazarlar enzim aktivitelerindeki bu değişikliklerin :

1. 21 numaralı kromozomun trisomik oluşunun direkt neticesi yani gen surdozajının etkisi,
2. Hücre metabolizmasının genel bozukluğunun indirekt neticesi olabileceği kanısındadırlar.

Bizim kanaatimize göre, Trisomi 21 olgularındaki ADA'nın artışı bu çocukların trisomik kromozom sonucu genetik dengenin bozulması neticesi hücre metabolizmasındaki genel düzensizlige bağlı olabileceği gibi, geni 21

numaralı kromozom üzerinde bulunan başka enzimlerin direkt genetik etki ile artışı, kati olarak bilemediğimiz bazı bioşimik reaksiyonlar sonucu diğer eritrositer enzimleri ve bu arada ADA aktivitesini de arttırmış olabilir.

## SUMMARY

### THE ERYTHROCYTE ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN HEALTHY CHILDREN AND ADULTS AND CHILDREN WITH DOWN'S SYNDROME

Adenosine deaminase (ADA) is an aminohydrolase which catalyses the deamination of adenosine to inosine. The enzyme is widely distributed and many of its biochemical properties have been studied previously. Increased ADA activities were observed in patients with miliary tuberculosis, rheumatic fever, haemolytic anaemia, haemochromatosis, hepatitis, prostatic carcinoma and cirrhosis.

A genetically determined deficiency of the enzyme «red blood cell» adenosine deaminase has been reported to be associated with a syndrome of combined immuno - deficiency in several families. We couldn't find published data about ADA enzyme in Down syndrome.

In this present work red blood cell Adenosine deaminase activities were determined in Down syndrome. Spectrofotometric determination of ADA activity is based on the conversion of adenosine to inosine. 25 healthy children and 20 healthy adults were used as controls.

ADA activities were significantly higher in Down syndrome compared control values. There may be two different interpretations for increased ADA activity in Down syndrome; it may originate from a disturbed cell metabolism or may be a result of biochemical interaction of another regulatory enzyme increased by gene - surdosage.

## KAYNAKLAR

- 1 — BEUTLER, E. : *Red cell metabolism, A manual of biochemical methods*, 9, 32, 85-86. Second edition. Grune and Stratton, New York, San Francisco, London, 1975.
- 2 — DISSING, J., KNUDSEN, J. B. : *Adenosine deaminase deficiency and combined immunodeficiency syndrome*. Lancet, 2: 1316, 1972.
- 3 — GIBLETT, E. R., ANDERSON, J. E., COHEN, F., POLLARA, B., MEUWISSEN, H. J. : *Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity*, Lancet, 2: 1067, 1972.
- 4 — JENKINS, T. : *Red blood cell adenosine deaminase deficiency in a healthy «Kung» individual*. Lancet, 8: 736, 1973.
- 5 — MATTEI, F. J., VOVAN, L., AYME, S., S., FENEAU, P., GIRAUD, F. : *Etude de l'activité enzymatique intra erythrocytaire dans la trisomie 21*. Pediatrie, 32: 219 - 229, 1977.
- 6 — MILLER, M. E., MELLMAN, W. J., COHEN M.M., KOHA, G. DIETZ, W. H. : *Depressed immunoglobulin G in newborn infants with Down's syndrome* J. of. Ped. 5: 996, 1969.

**ÖZBALCI-DOWN SENDROMUNDА ADA AKTİVİTESİ**

- 7.— RONALD, C. S., CHEN, S., GIBLETT, E. R. : *Detection of the carrier state in combined immunodeficiency disease associated with adenosine deaminase deficiency.* J. of Clin. Invest. 53: 1194 - 1196, 1974.
- 8.— SAY, B., TAYŞI, K. : *Tıbbi genetik.* Hacettepe Üniversitesi Yayınları A 12, 96, Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1975.
- 9.— SCHWARZMEIER, D. J., RETT, A., MOSER, K., ANDRLE, M. : *Erythrozyten-enzyme und Substrate bei Kindern mit Down Syndrom.* Wiener Klin. Wschr. 3: 85 33-35, 1973.