

Kanserli Vak'alarda Plazma 3', 5' -Siklik Guanozin Mono fosfat (c GMP) Seviyelerinin İncelenmesi

Abdulkakı AGBAŐ
M.Munip YEĐİN
idris AKKUŞ
Ebubekir BAKAN
Nuri Bakan

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum

THE DETERMINATION OF THE LEVELS OF
PLASMA 3', 5' CYCLIC G UANOSINE
MONOPHOSPHATE (cGMP) IN CANCER PATIENTS

GeliŐ Tarihi: 17 Mart 1985

ÖZET

Çeşitli kanser hastalarından (n = 31) elde edilen plazmada radioimmunoassay metodu ile 3', 5'Siklik Guanozin Mono fosfat (cGMP) seviyeleri incelendi

Hasta grupta elde edilen plazma cGMP değerlerinin (14,09 ± 1,63 pmol/ml), kontrol grubuna göre (n = 20) (6,41 ± 3,50 pmol/ml) istatistikî açıdan önemli olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, kanserde siklik nükleolid seviyelerinin önemli ölçüde deđiŐtiđi kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: cGMP, kanser, siklik nükleolid, radioimmunoassay

T. Kİ. Tıp Bil. Arast. Dergisi C.3.S.2, 1985,159 -164

SİMMARY

In plasma obtained from patients with various cancers, cGMP levels were assayed by radioimmunoassay method.

It was found that there were a statistically significant high levels of cGMP in patient group (14,09 ± 1,63 pmol/ml) compared with control group (6,41 ± 3,50 pmol/ml).

Accordingly, we concluded that in cancer, cyclic nucleotide levels varied significantly.

Key words: cGMP, cancer, cyclic nucleotide, radioimmunoassay

T J Res Med Sel V.3, N.2, 1985, 159 - 164

Hücre içi metabolizma olaylarının düzenlenmesinde, hücrenin büyüme ve gelişmesinde siklik nükleotidlerin önemli rol oynadıkları son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuŐtur. Özellikle kanser biyokimyasına moleküler seviyede yaklaşmak amacıyla doku ve hücre kültürü çalışmalarına hız verilmiş durumdadır. Genel anlamda malign tümörlü vak'alarda ekstrasellüler sıvı 3', 5-siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonlarının ölçülmesi, hastalığın konumu ve uygulanan tedavinin ayarlanması bakımından ayrı bir öneme sahiptir. Maalesef bu maksatla yapılmış olan çalışmalar oldukça azdır (1).

Neoplastik hücrelerde, normal şartlarda hücre içi endojen bileŐikler olan siklik nükleotidlerin metabolizmalarının deđiŐebildiđini gösteren son gözlemlerden dolayı çalışmalar siklik nükleotidler, özellikle 3', 5'-siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve 3', 5-siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinde yoğunlaŐmıştır (2).

Memeli hücrelerinin genel bileŐenleri olan cAMP

ve cGMP, insan kanında, idrarda, beyin omurilik sıvısında, semende, tükürükte, sütte, pankreatik ve safra salgılarında mevcuttur (3, 4). Siklik nükleotiklerin ekstrasellüler sıvıya karıŐmalarına dair mekanizma tam manâsıyla açıklığa kavuŐturulamamış olmakla beraber bu moleküllerin çok düşük konsantrasyonlarda başta plazma ve idrar olmak üzere diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiŐtir. Vücutta hemen her dokunun hücrelerinde yaygın olarak bulunan siklik nükleotidlerin bazı önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir (5, 6).

Malign tümörler, muhtemelen organizmadaki cGMP seviyelerini genelde etkileyebilecek organik maddeler salgılar; bu işi ya cGMP'in diğer dokulardaki üretimini etkilemek ya da ekstrasellüler sıvıdaki metabolizmasını deđiŐtirmek suretiyle yapıyor (2).

Tümörlerde düşük cAMP ve yüksek cGMP konsantrasyonlarının, malign hücre büyümesinin göstergeleri olduğu na dair bir genelleme yapılmamasına rağ-

men yine de bazı tümörler için bu ifade kullanılabilir (7,8).

Lösemik hücrelerde siklik nükleotid metabolizmasında meydana gelen karmaşık durumun izahı güçtür; çünkü siklik nükleotid sistemi ile hücre proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki mevcut ilişki **şimdiki halde** bir fikir olarak ortaya atılmıştır. Yapılacak olan daha spesifik ileri çalışmalarla insan lösemisi patogenezinin daha iyi bir şekilde anlaşılması sağlanabilir (2).

Bu çalışmanın amaçları kısaca şöyle özetlenebilir:

1. Çeşitli kanser hastalarının plazma cGMP konsantrasyonlarını ölçmek suretiyle kontrol grubu değerleri ile önemli bir fark teşkil edip etmediğini tespit etmek,

2. Plazma cGMP seviyeleri ile yaş arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemek.

MATERYAL ve METOT)

Çalışmamızda, yaş ortalaması 53,2 ± 11,8 olan klinik muayene ve laboratuvar bulguları ile kanser teşhisi konulmuş 11 erkek, 20 kadın toplam 31 hastanın, kontrol grubu olarak yaş ortalaması 34,85 ± 6,10 olan klinik hiç bir şikâyeti ve bulgusu olmayan 16 erkek, 4 kadın toplam 20 sağlam şahsın venöz kanlarında plazma cGMP tayini yapıldı.

Kontrol grubu Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinin personeli ve araştırma görevlilerinden teşkil edildi.

Kanserli vak'aları, Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinin, SSYB Numur.; Hastanesinin ve SSK Hastanesinin çeşitli servislerinde yatmakta olan ve klinikte kanser teşhisi konulmuş ve henüz bir tedavi görmemiş hastalar oluşturdu.

Kullanılan Reaktifler:

1. % 10'luk Triklora setikasit (TCA) Çözeltisi: 100 gr TCA tartılarak bir miktar redistiye suda çözüldü ve son hacim yine redistiye su ile litreye tamamlandı.

2. Su ile Doymuş Eter: Hacimce 1:1 oranında hazırlanan su-eter karışımı bir kaç dakika kuvvetle çalkalandı ve fazların ayrılması için bir süre beklendi. Üstte teşekkül eden faz su ile doymuş eter fazıdır. Çalışmamızda bu faz alınarak kullanıldı.

3. "I-eGMP Radioimmunoassay Kit'i: Çalışmamızda New England Nuclear firmasının hazırladığı kit'i (Cat. No. Nex-133) kullandık.

Numunelerin Deneye Hazır Hale Getirilmesi:

Yaklaşık 3 ml venöz kan, heparinle ıslatılmış enjektörle alınarak soğutmalı santrifüjde 4°C'da 2000-

3000 devirde 10 dakika süreyle santrifürlenerek plazmanın ayrılması sağlandı. Ayrılan bu plazma bir başka tüpe alınarak bundan sonra aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.

1. Plazma hacmine eşit hacimde % 10'luk TCA soğutulmuş olarak tüplere ilâve edildi ve vorteksle iyice karıştırıldı. 4°C'da 2500 x g'de 15 dakika süreyle santrifüje edildi, ayrılan supernatant bir başka tüpe alındı.

2. Supernatant 5 ml su ile doymuş eter ile muamele edildi. İyice çalkalanan bu karışım bir müddet kendi haline bırakıldı. Üst kısımda teşekkül eden eter fazı aspirasyonla uzaklaştırıldı. Geriye kalan kısım ikinci defa 5 ml su ile doymuş eter ile iyice karıştırıldı ve yine aynı işlemler tekrarlandı. Bu ekstraksiyon işlemi toplam beş defa tekrarlandı.

3. Tüpte kalan kalıntı, plastik evaporasyon tüplerine aktarıldı ve 70-80 C'da ayarlı su banyosuna yerleştirilerek evaporasyon cihazı yardımıyla buharlaştırıldı.

4. Plastik tüplerin dibinde kalan ve siklik nükleotidlerce zengin olan kalıntının ağız parafilmle kapatılarak çalışma gününe kadar -20 C'da derin dondurucuda muhafaza edildi.

cGMP Radioimmunoassay Tayini:

Siklik nükleotidlerce zengin kalıntının bulunduğu plastik tüplere 1 ml sodyum asetat tamponu (ph 6,2; 0,05 M) ilâve edilerek iyice karıştırıldı. Elde edilen çözeltiden 0,1 ml almak suretiyle cGMP'a göre hazırlanmış RIA deney protokolüne dahil edildi. Standart numuneler yardımıyla oluşturulan grafikten direkt cGMP konsantrasyonları tayin edildi.

BULGULAR

Bulgular "istatistiki olarak kantitatif ortalamaların incelenmesi metodu" ile değerlendirildi (9,10,11,12). Vakaların istatistiki açıdan önem arz eden bulguları Tablo - I'de özetlendi.

Tablo - I'den de görüldüğü gibi normal ve kanserli şahıslar arasında yapılan "t" testinde istatistiki yönden önemli farklar bulundu. Sonuçlar ayrıca Şekil - I' - de değişim aralıklarıyla gösterildi.

Normal ve kanserli şahısların plazma cGMP seviyeleri ile yaşları arasında korelasyonlar arandı ve değerler Tablo - H'de gösterildi. Netice itibarıyla gerek hasta pup gerekse kontrol grubunun, plazma cGMP konsantrasyonları ile yaş arasında istatistiki olarak önemli bir ilgi teşkil etmediği görüldü.

TARTIŞMA

Organizma sıvılarında siklik nükleotid konsantrasyonlarını kantitatif olarak tayin etmek için geliştirilmiş herhangi bir kolorimetrik ve spektrofotometrik

Tablo - I

Normal ve Kanserli Şahısların Plazma cGMP Değerleri

Parametre	Grup	Vak'a sayısı	X	SD	t	önemlilik derecesi
Plazma cGMP (pmol/ml)	Normal	20	6,41	3,50	2,89	p < 0.01
	Kanserli	31	14,09	11,53	4,97	

Tablo - II

Normal ve Kanserli Şahısların Yaşları ve Plazma cGMP Seviyeleri Arasındaki Korelasyonlar

Parametreler	Grup	Vak'a sayısı	x	y	r	t	Önemlilik derecesi
Yaş (x)	Normal	20	34,85	6,41	-3,7x10 ⁻¹	0,016	p > 0,5
Plazma cGMP (y)	Kanserli	31	53,20	14,09	9,1x10 ⁻³	0,049	p > 0,5

metod yoktur. Ayrıca söz konusu olan moleküller, biyolojik sıvılarda çok az miktarlarda bulduklarından oldukça hassas bir şekilde tayin edilmeleri zorunlu olmaktadır.

cGMP'in kantitatif tayini için başlıca şu hassas metodlar geliştirilmiştir:

1. Enzimatik radyoizotopik yer değiştirme metodu (13)

2. Kompetitif (yarışmalı) protein bağlama (CPB) metodu (14,15)

3. Radioimmunoassay metodu (RIA) (16,17,18)

Bunların içerisinde uygulama bakımından en kolayı, en süratli netice vereni ve en hassası RIA tekniği olduğundan biz de çalışmamızda bu tekniği kullandık.

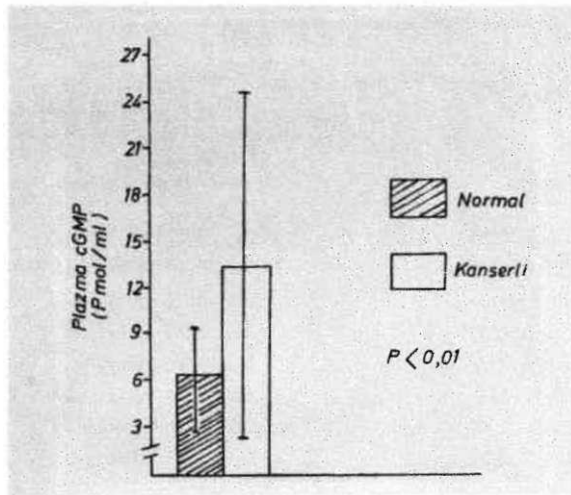
Araştırmamızda yaş ortalaması $34,85 \pm 6,10$ olan 20 sağlam şahsın venöz kanında plazma cGMP tayini yapıldı. Elde edilen veriler kanserli hasta grubu için kontrol grubu değerleri olarak kullanıldı.

Sağlam şahıslara ait ortalama plazma cGMP değeri $6,41 \pm 3,50$ pmol/ml olarak bulundu. Bu sonuç Tablo - I'de verilen literatür değerleri ile karşılaştırıldı.

Tablo - II'den de görüleceği gibi kontrol grubu için bulduğumuz değer, mevcut literatür bulguları ile uyum içerisinde. Literatürdeki farklılıkların büyük ölçüde metodolojiden kaynaklandığını tahmin ediyoruz; meselâ, Latner ve ark. (15) ekstraksiyon için iyon değiştirme kolonlarını kullanmışlardır. Lin (21), aynı işlem için Dowex 50WX8 kolonunu denemiş, Cailla ve ark. (18) hazır ticari kit kullanmayı lüzumlu tüm reaksiyon bileşenlerini kendileri hazırlamışlardır. Ayrıca Bruynzeel ve ark. (22), antikoagülan ajan olarak kullanılan EDTA'nın cGMP deneyini interfere ettiğini tesbit etmişler, Ogawa ve ark. (19), çalışmalarında antikoagülan madde olarak 0,5 M EDTA kullanmışlardır. Bütün bunlar, Tablo - II'de verilen literatür değerleri arasındaki farklılıkları izah etmektedir.

Sağlam şahıslarda plazma cGMP seviyelerinin yaş, cinsiyet, bölge ve hayat şartlarına göre değiştiğine dair birbirini destekleyen yayına rastlayamadık. Latner ve ark. (15), plazma cGMP seviyeleri ile yaş arasında bir ilgi bulamadıklarını belirtirlerken Tsuchiya ve ark. (20), plazma cGMP seviyeleri ile yaş arasında çok zayıf bir korelasyonun ($p < 0.02$; $r = 0.296$) var olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Zimmer ve ark. (24), yaş ile ekstrasellüler sıvı cGMP seviyeleri arasında bir ilişkinin bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Biz de kontrol grubu olarak seçtiğimiz sağlam şahısların plazma cGMP konsantrasyonları ile yaş



Şekil -1. Plazma cGMP (pmol/ml) seviyeleri

arasında yaptığımız korelasyon analizleri neticesinde istatistiki bir ilgi bulamadık ($p > 0.5$). Aynı analizi kanserli hasta grubunda yaptığımızda yine önemli bir ilgi tesbit edemedik ($p > 0.5$).

Araştırmamızda yaş ortalaması $53,2 \pm 11,8$ olan yeni teşhis edilmiş ve herhangi bir tedavi görmemiş 31 kanserli vak'anın venöz kanından elde edilen plazmada cGMP tayini yapıldı. Kanserli hastalara ait değerler kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Tablo - I), bu fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0.01$).

Chawla ve ark. (23)'nün 34 kişilik muhtelif kanser vak'alarında tespit ettikleri plazma cGMP konsantrasyonları, kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur ($13,7 \pm 8,8$ pmol/ml). Bu ise bizim çalışmamızda bulduğumuz değere ($14,09 \pm 11,3$ pmol/ml) uygunluk göstermektedir.

Gennari ve ark. (4)'nün 26 kanserli hastada plazma siklik nükleotid seviyelerinin incelenmesiyle ilgili yaptıkları bir çalışmada kanserli vak'aların bir çoğunda plazma cGMP konsantrasyonlarında önemli artışlar kaydedilmiştir.

İlk defa Murad ve ark. (4), tümör varlığında ekstrasellüler sıvı siklik nükleotid seviyelerinin etkilenebileceğini gösterdiler. Bu araştırmacılar, Morris hepatoma 3724A taşıyan sıçanlarda üriner cGMP itrahının tümör boyutu ile ilgili olduğunu ve irradyasyon, kemoterapi veya cerrahi müdahale ile paralel olarak azaldığını tespit etmişlerdir.

Chawla ve ark. (23) ve Peracchi ve ark. (2), tümör nekrozunun kanserde genel bir bulgu olması fikrinden hareket ederek, plazmadaki cGMP yükselmesinin muhtemelen kanser hücrelerinden dışarıya sızma hızının artmasına bağlı olması gerektiğini ifade etmişlerdir (2, 23). Bu durumun aşağıdaki olaylarla ilgili olduğu düşünülebilir:

1. Guanilat siklaz enzimi tarafından cGMP üretiminin artması
2. cGMP-fosfodiesteraz enzimi tarafından cGMP yıkımının azalması
3. Hücre membranının intrasellüler cGMP'a geçirgenliğinin artması
4. Yukarıda ifade edilen üç faktörün bir kombinasyonundan kaynaklanabilir.

Beş tip kanserde (akciğer, kolon, akut myelositik lösemi, meme, Hodgkin's) artmış plazma cGMP bulgusu, bu siklik nükleotidin malign hücre proliferasyonunda rolü olduğunu düşündürmektedir.

İnsan idrarındaki cGMP'ın hemen hemen tamamı, glomerüler filtrasyon vasıtasıyla plazmadan kaynaklandığından dolayı (25, 26, 27), idrar cGMP seviyelerindeki artış, plazma cGMP konsantrasyonlarının yüksek olduğu kanaatini uyandırıyor.

Ekstrasellüler sıvı cGMP seviyesi ve tümör büyük-

lüğü arasındaki ilişkinin diagnostik ve terapötik araştırmalarda önemli bir belirti olabileceği Murad ve ark. (28) tarafından bildirilmiştir.

Turner ve ark. (29), kanserleşmiş dokularda cGMP seviyelerinin yükseldiğini ve bu hastaların idrarlarında cGMP itrahının arttığını bulmuşlardır.

Wood ve ark. (30), 74 kişilik kanserli hasta grubunda plazma ve idrar cGMP seviyelerini tayin etmişler ve cAMP'de önemli bir fark bulunmamasına rağmen, hem idrar hem de plazma cGMP seviyelerinde önemli artışların olduğunu müşahade etmişlerdir.

Bizim sonuçlarımız da onlarınkine uymaktadır; ancak, söz konusu çalışmada sağlam şahısların plazma cGMP seviyeleri hem bizim bulgularımız hem de Tablo - I'de verilen literatür değerlerine göre düşük verilmiştir ($x = 2,7$ pmol/ml). Bu uyumsuzluk, muhtemelen araştırmacıların uyguladıkları metod farkından kaynaklanmış olabilir. Zira onlar, hiç bir deproteinizasyon ve ekstraksiyon işlemi yapmaksızın direkt olarak plazmadan siklik nükleotid tayini için RIA çalışmışlardır. Oysa ki plazmada bulunan proteinler ve lipid türündeki moleküller, reaksiyonları interfere ederek neticelerin hatalı çıkmasına sebep olabilmektedirler.

Başka bir araştırmada primer hepatomalı hastalarda ekstrasellüler sıvı cGMP seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği ve malign hastalığın diaznoz ve takibinde bu değerlerin önemli olabileceği ifade edilmiştir (30). Hepatomalı hastalarda gözlenen yüksek cGMP itrahının (2, 4) tümörle ilgili olmaktan ziyade bozulmuş karaciğer metabolizması ile ilgili olması daha mantıklı gözüküyor. Hastalığın seyri ve uygulanan tedaviye verilen cevabı takibetmek açısından plazma ve idrar cGMP seviyelerinin ayarlanması önemli olabilir (2,4).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan anlaşılacağı

Tablo - III

Kontrol Grubu Plazma cGMP Değerlerinin Mevcut Literatür Değerleri ile Karşılaştırılması

Referans	Plazma cGMP Değerleri (pmol/ml)
Ogawa(19)	$4,20 \pm 0,20$ pmol/ml
Tsuchiya (20)	$4,30 \pm 0,20$ pmol/ml
Lin(21)	$9,40 \pm 0,58$ pmol/ml
Latner (15)	$9,70 \pm 2,20$ pmol/ml
Steiner (16)	$1,80 / 6,00$ pmol/ml
Cailla(18)	$8,32 \pm 3,60$ pmol/ml
Chawla (23)	$5,50 \pm 1,00$ pmol/ml
Bruynzeel (22)	$3,00 / 4,00$ pmol/ml
BİZİM BULGUMUZ	$6,41 \pm 3,50$ pmol/ml

gibi bir çok kanserli vak'alarda hücre içi ve doku cGMP seviyesi artmaktadır. Doku cGMP muhtevası arttığında ekstrasellüler sıvıya sızma olacağından (20, 31), plazma ve idrar cGMP seviyelerinde bir artış beklenir ki bizim bulgularımız da bu düşünceyi destekler mahiyettedir.

Fizyolojik hadiselerde görülen bozuklukların daha iyi bir şekilde anlaşılması bakımından cGMP seviyelerinin bilinmesi önem arzeder. Fakat bazı vak'alarda gerek cAMP ve gerekse cGMP'daki değişmelerin klinik bulgularda aydınlatıcı role sahip oldukları bilinmekle beraber diğer bazı durumlarda onlardan yalnız birisindeki değişimin maksada kâfi geldiği kanaati mevcuttur. Ancak, ekseri araştırmacı-

lar, cAMP ve cGMP'm mutlak değerlerinden ziyade bu iki siklik nükleotidin birbirlerine olan relatif oranlarının daha önemli olabileceğini savunmaktadırlar (15).

Netice itibariyle hem bizim çalışmamızın sonuçlarından, hem de yukarıdan beri bahsedilen literatür bulgularından anlaşılacağı üzere kanserde siklik nükleotid metabolizmasının bir hayli değişikliğe uğradığına inanmak gerekiyor. Sebep ne olursa olsun, bu anormalliklerin etraflıca açıklığa kavuşturulması kanser etiyojisine moleküler seviyede yaklaşmakla mümkün olacak gibi gözükmektedir. Bunun için daha ileri seviyede ve seri araştırma çalışmalarının yapılması icabeder.

KAYNAKLAR

1. Ağbaş A: Malign Hastalıklarda Plazma 3', 5'-Siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) Seviyeleri ve Lökosit cGMP Değerleri ile Olan İlgisinin Araştırılması, İhtisas Tezi, Atatürk On. Diş Hek. Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, 1985.
2. Peracchi M, AT Maiolo, L Lombardi, FB Catena and EE Polli: Patterns of cyclic nucleotides in normal and leukaemic human leucocytes. Br. J. Cancer 41:360-370, 1980.
3. Akkuş İ: Çeşitli Kanser Vak'alarında Plazma Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP) Değerleri, İhtisas Tezi, Atatürk On. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, 1984.
4. Albarti KG, MM and CP Price (Derleyenler), Recent Advances in Clinical Biochemistry-2 Great Britain Churchill Livingstone, pp. 271-294, 1981.
5. Öztürk Y: Düz kasların siklik nükleotidlerle ilişkisi. Biyokimya Dergisi, 7(1):63-68, 1982.
6. Ratner A: Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries in vitro. Endo. 99(6):1496, 1976.
7. Marx LJ: Biochemistry of cancer cells: Focus on the cell surface. Sci. 183:1279, 1974.
8. Hunt and Martin: Cyclic nucleotide metabolism in tumorous. Aust. N.Z. J. Med. 9(5):584-599, 1979.
9. Spiegel MR: Theory and Problems of Statistics. New York, McGraw-Hill Book Co., pp. 188-191, 241-268, 1972.
10. Gülesen O: Tıbbi ve Hayati İstatistik. Ankara, Ankara Ün. Tıp Fak., pp. 121-135, 149-159, 1969.
11. Arıcı H: İstatistik Yöntemler ve Uygulama. Ankara, Cihan Matbaası, pp. 93-142, 143-145, 1975.
12. Sümbüloğlu K: Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik. Ankara, Matis Yayın. Çağ Mat., 1. Bas. pp. 93-117, 1978.
13. Brooker G, LJ Thomas and MM Appleman: The assay of cAMP and cGMP in biological materials by enzymatic radioisotopic displacement. Biochem. 7(12):4177, 1968.
14. Latner AL, arid KA Prudhoc: simplified o.m.pnetii protein-binding assay for (AMP in plasma. Clin. Chim. Acta, 48:353, 1973.
15. Latner AL, SV Patterson, and GA luim'ı: A method for measurement of low levels of cGMP in blood plasma, Clin.Chim. Acta, 81:99, 1977.
16. Steiner AL, AS Pagliara, Lit Chaw, and DM hipnis: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides, j, Biol. Chem. 247(4):1114 1120, 1972.
17. Asakaşa T, TR Russel, ami RJ Ho: Piiruficalion and succinylation of cGMP from large volume samples and radioimmunoassay of succinyl cGMP. Biochem. Biophys. Res. Commuti. 68(3) .682, 1976.
18. Cailla HL, CJ Vannier, and MA Delaagc: Guanosine 3', 5'-cyclic moriosphosphate assas ai 10*** mole level. Anal. Biochem, 70:195, 1976.
19. Ogawa K, K Mizuno: Increased plasma comxntiation of cyclic GMP in atrial fibrillation. Experientia, 39:1290-1291, 1983.
20. Tsuchiya S, K Ogawa, T Sataka: Plasma levels of cyclic nucleotides in patients with essential hypertension. Jpn. Heart. J. 21(6):804 806, 1980.
21. Lin T: Plasma cyclic nucleotide levels in hyperthyroidism. Acta. Endocr. 90:62-68, 1979.
22. Bruynzeel PLB, ML Hamelink, and W Bogaard: Interference of EDTA in determinations of cAMP and cGMP in plasma by RIA. Clin. Chem. 26(5):668-669, 1980.
23. Chawla RK, DW Nixon, M Shop, D Rodman: Plasma and urine cGMP in disseminated cancer. Ann, Int. Med. 91:862-864, 1979.
24. Zimmer R, II Cramer, I) Athen, and II Beckmann; Changes in cerebrospinal fluid cyclic nucleotides in alcohol-dependent patients suffering from delirium tremens. Biolog. Psychiatry, 17(7):837 842, 1982.
25. Trang LE, and O Lovgrcn: Cyclic nucleotides and catecholamines in rheumatoid arthritis. Stand. J. Rheum. 12:171-176, 1983.

26. Gennari C, G Francini, M Galli, and F Lore: Urinary excretion of cAMP and cGMP in malignancy. *J. Clin. Pathol.* 31:735-741, 1978.
27. William RH (Derleyen): *Textbook of Endocrinology* (5. Bas. W.B. Saunders Co., pp. 869-880, 1974.
28. Murad F: Increased urinary excretion of cGMP in rats bearing morris hepatoma 3924A. *Science*, 190:60, 1975.
29. Turner GA, RD Guthrie, and AL Latner: Urine cyclic nucleotide concentrations in cancer and other conditions; cGMP: A potential marker for cancer treatment, *J. Clin. Pathol.* 35:800-806, 1982.
30. Wood PJ, G Ross, and CL Smith: Plasma and urine cyclic nucleotide levels in malignant disease and cirrhosis of the liver. *J. Clin. Pathol.* 32:998-1002, 1979.
31. Kondo T, MD Ogawa, and M Ban: Plasma level of Norepinephrine and cyclic nucleotides following acut myocardial infarction. *Jpn. Heart. J.* 22(4):593, 1981.