------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 18، العدد 1، ص51-63، 2007 ------

دراسة خواص وفعالية أنزيم السايتدين دي امنيز في مصل وكريات الدم الحمر بالطريقة اللونية

زهراء محمد علي حمودات

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2006/6/18 ، تاريخ القبول 2006/11/13)

الملخص

تم تطوير طريقة لونية لتقدير فعالية أنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر بالاعتماد على قياس كمية الامونيا الناتجة من تحول السايتدين الى اليوردين. وتم تثبيت الظروف المثلى لعمل الأنزيم، اذ بينت النتائج أن أعلى فعالية للسايتدين دي امنيز عند استخدام تركيزي (100) و(200) ملي مولار للمحلول المنظم صوديوم فوسفيت للمصل ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي، وعند دالة حامضية (7.5) ودرجة حرارة (35ºC) وفترة تحضين (45) و (30) دقيقة للمصل ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي، وتركيز (2) ملي مولار من مادة الأساس السايتدين وكمية الأنزيم التي تتواجد في (75) و (50) مايكروليتر من المصل ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي.

وأظهرت النتائج أن وجود بعض الأحماض الامينية مثل الكلوتاميك والهستدين في محلول التفاعل أدت إلى تحفيز الأنزيم في حين أن بعض الأملاح المعدنية مثل $CuCl_2$ و KCl و $CoCl_2$ و $MgCl_2$ أدت إلى تثبيطه.

Study of Properties and Activity of Cytidine Deaminase in Serum and Erythrocytes by a Colorimetric Method

Zahraa M. Hammodat

Department of Chemistry

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

A colorimetric method was developed for determination cytidine deaminase activity in serum and erythrocyte haemolysate. This method based on estimation the amount of ammonia produced from conversion of cytidine into uridine. The optimum conditions of the enzyme using this method were obtained.

The result showed that maximum activity of cytidine deaminase by the method above in serum and erythrocyte haemolysate was obtained using (100 mM) and (200 mM) of buffer solution sodium phosphate for serum and erythrocyte respectively at pH (7.5) and (2mM) cytidine as a substrate and (75μL) serum and (50 μL) erythrocyte haemolysate as a source of enzyme for (45 min) and (30 min) serum and erythrocytes haemoly sate at (35 ºC).

Moreover, the results of the study also predicted that presence of some amino acids such as histidine, glutamic in the reaction solution activate the enzyme activity, while some metal salts such as $MgCl_2$, $CoCl_2$, KCl and $CuCl_2$ inhibited the activity.

المقدمة

إن أنزيم السايتدين دي امنيز (Cytidine amino hydrolase, EC3.5.4.5) يحفز الإزالة الامينية للسايتدين اوديوكسي سايتدين إلى اليوردين اوديوكسي يوردين على التوالي (Alta'ee and Ewadh, 2003; Laliberte and Momparler, 1994) ومن خلال الدراسات المختلفة حول هذا الأنزيم وجد بانه يختلف باختلاف مصدر الأنزيم من ناحية التخصص نحو مادة الأساس، والوزن الجزيئي، وفي الثباتية تجاه الحرارة (Katsuragi et al., 1989; Yu et al., 1976a, b; Kream and Chargaff, 1952).

كما لوحظ بعض الاختلافات الأخرى في الخواص الحركية ، فمن ناحية التخصص نحو مادة ألأساس وجد أن الأنزيم له القدرة على إزالة مجموعة الأمين ليس من السايتدين فحسب بل إن هذا الأنزيم يحفز الإزالة الامينية لنيوكليوسيدات السايتوسين المتشابهة المستخدمة في الأدوية المعالجة لابيضاض الدم، مثل ارابينوس سايتوسين(arabinose cytosine) و5-ازاد-´2-يوكسي سايتدين -5-aza-2'-deoxycytidine) و '2-'2-ثنائي فلورديوكسي سايتدين (2'-2'-difluro deoxy cytidine) (Eliopoulos et al., 1998; Laliberte and Momparler, 1994) يتكون انزيم السايتدين دي امينيز من 146 حامض أميني ووزن جزيئي 16185 دالتون وله مرافق أنزيمي هو ايون الخارصين (Zn^{++}) (Carlow et al., 1995) ويعد أنزيم السايتدين دي أمنيز من الأنزيمات الواسعة الانتشار في الأحياء المجهرية (Vita et al., 1985)، كما تم التعرف على فعالية الأنزيم في مختلف أنسجة اللبائن (Eliopoulos et al., 1998) كما تبين أن فعالية الأنزيم تزداد عدة مرات أثناء زيادة تكوين كريات الدم الحمر، وفي العديد من الخلايا السرطانية للإنسان والمرض اللمفاوي(Alta'ee and Ewadh, 2003; Eda et al., 1998 .

وتستخدم الطرق الطيفية لتقدير فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز بالاعتماد على قياس النقصان بالامتصاصية للسايتدين أو الزيادة بالامتصاصية لليوردين المتكون (Katsuragi et al., 1989; Yu et al., 1976a, b; Sakai et al., 1971 ; حمودات, 2001) .

$$\text{Cytidine} \xrightarrow[H_2O]{\text{Cytidine deaminase}} \text{Uridine} + NH_3$$

ويهدف البحث على تحوير طريقة القياس لفعالية السايتدين دي أمنيز في مصل الدم ومتحال كريات الدم الحمر بالاعتماد على كمية الامونيا المتحررة من التفاعل باستخدام طريقة الباحث Katsuragi وجماعته (1986) اللونية لتقدير كمية الامونيا والتي ممكن ان تستخدم في التعبير عن فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز.

المواد وطرائق العمل

1. تحضير مصل الدم:

تم جمع الدم الوريدي في أنابيب نظيفة وجافة وخالية من موانع التخثر وفصل مصل الدم، وحفظ في درجة حرارة (-20ºC) في المجمدة لحين إجراء القياسات، وأهملت النماذج الحاوية على الدم المتحال في جميع الفحوصات وخصوصاً قياس فعالية الأنزيمات.

2. فصل كريات الدم الحمر:

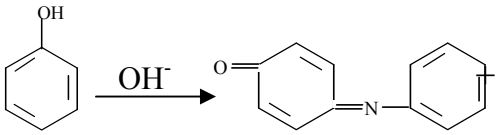
استخدم دم غير متخثر بحجم (4-5) مليلتر لفصل كريات الدم الحمر بإتباع طريقة Bealter وجماعته (1977)، ثم حضر منها متحال كريات الدم الحمر بإتباع طريقة Price و Stevens (1989).

3. قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز:

تم قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز في مصل الدم ومتحال كريات الدم الحمر استناداً إلى طريقة (Katsuragi وجماعته، 1986) اللونية والمعتمدة على تحديد كمية الامونيا الناتجة وعند طول موجي (560) نانوميتر باستخدام كاشف بيرثوليت Berthelot (phenol-hypochlorite) (Tietz, 1986) ، إذ أن مبدأ التفاعل هو:

تحال المادة الأساس السايتدين مائياً من قبل أنزيم السايتدين دي أمنيز إلى اليوريدين والامونيا، والامونيا الناتجة تتفاعل مع كاشف بيرثولت (الفينول وهايبوكلورايت) في وسط قاعدي وكما مبين بالمعادلة أدناه:

1) Cytidine $\xrightarrow[H_2O]{\text{Cytidine deaminase}}$ Uridine + NH_3

2) $NH_3^+ + 5NaOCl + 2$  $+ 5NaCl + 5H_2O$

Phenol Indophenol

ازرق اللون

(λ_m 590 nm)

وتم التعبير عن الفعالية النوعية لأنزيم السايتدين دي أمنيز بالمايكرومول من السايتدين المزال منه الامين/دقيقة/ملغم بروتين وبالرجوع إلى المنحني القياسي لكبريتات الامونيوم.

4. قياس البروتين الكلي:

تم قياس البروتين الكلي بطريقة بايوريت (Crandall,1983).

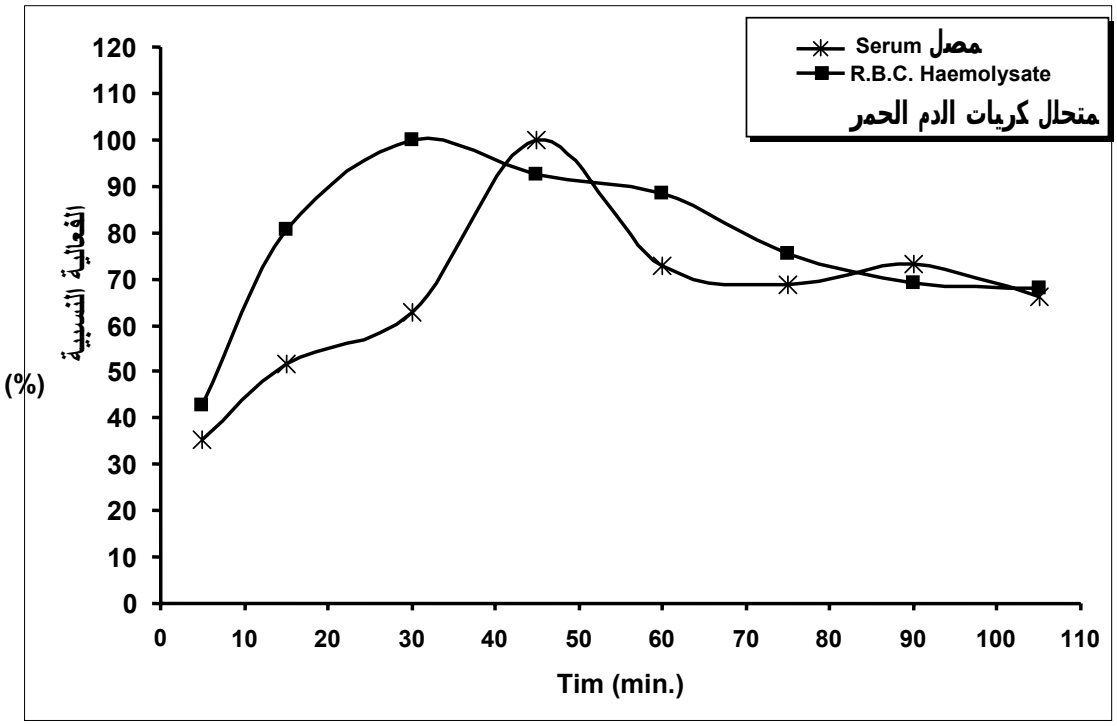
النتائج والمناقشة

التجارب التمهيدية لقياس فعالية الأنزيم:

أظهرت النتائج الأولية تحت الظروف التمهيدية وجود فعالية للأنزيم في مصل ومتحال كريات الدم الحمر، وكانت الفعالية النوعية التي أمكن التعبير عنها بالمايكرومول من السايتدين المزال الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين في مصل الدم ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي هي (0.65 ± 3.5) و(0.75 ± 6.8)، ولغرض التوصل إلى الظروف المثلى لقياس فعالية الأنزيم في المصل ومتحال كريات الدم الحمر أجريت عدد من التجارب المتتابعة لتحديد هذه الظروف.

1.العلاقة بين فترة التحضين وفعالية الأنزيم:

تمت دراسة العلاقة بين فترة التحضين (زمن التفاعل) وفعالية الأنزيم عن طريق اختبار فترات التحضين ابتداءً من (5-105) دقيقة، لتحديد الفترة الزمنية المثلى لإتمام التفاعل الأنزيمي بين مادة الأساس السايتدين والأنزيم، إذ يتضح من الشكل (1) وجود زيادة في فعالية الأنزيم بزيادة فترة التحضين بصورة خطية إلى (45) و (30) دقيقة لكل من المصل ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي، وهذا يتفق مع نتائج الباحثين (Katsuragi et al., 1989; Ipata and Cerignani, 1978)، حيث أن التناسب الخطي لفعالية الأنزيم مع فترة التحضين دليل على أن الإزالة الامينية من السايتدين هي إزالة أنزيمية.



الشكل 1: العلاقة بين الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز وفترات التحضين المختلفة في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

2. العلاقة بين المحتوى البروتيني وفعالية الأنزيم:

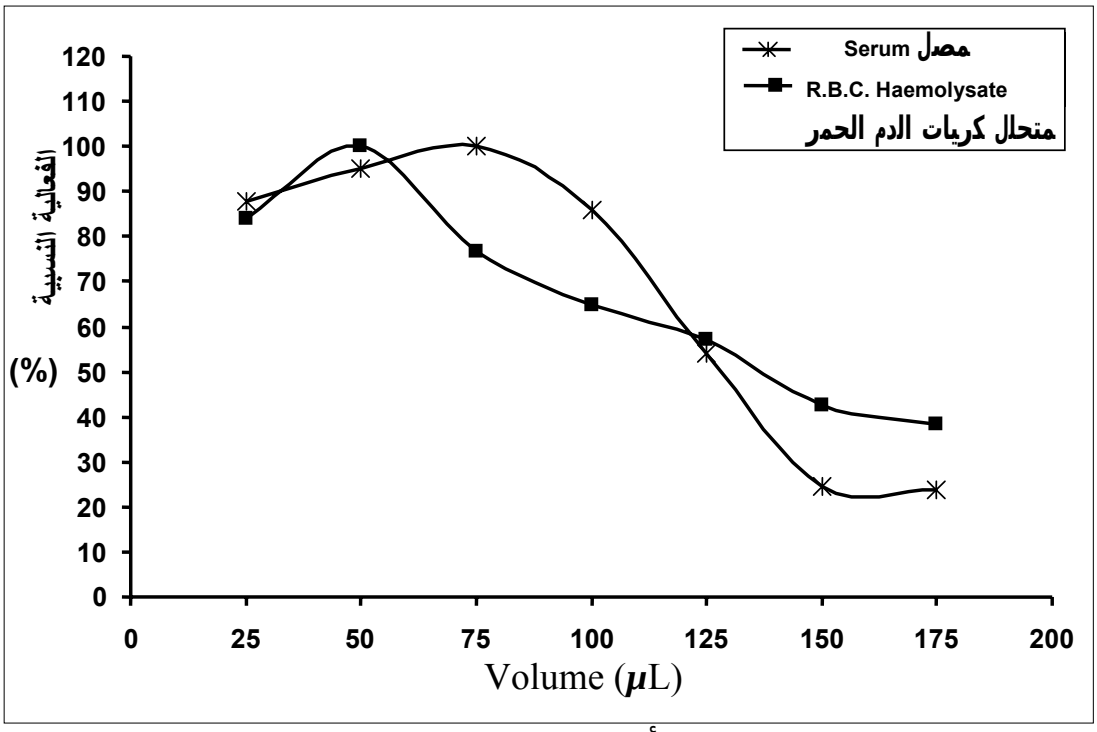
تم قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز بكميات مختلفة من المصل ومتحال كريات الدم الحمر (25-175) مايكروليتر، ويوضح الشكل (2) ان سرعة التفاعل تزداد بزيادة كمية الأنزيم (البروتين) للوصول إلى أقصى قيمة (50 μL) (2.3 mg) بروتين بالنسبة لمتحال كريات الدم الحمر و (6.5 mg) (75 μL) بروتين للمصل، وتعطي النتائج دليلاً اخراً على أن الإزالة الأنزيمية للسايتدين هي نتيجة الأنزيم (البروتين) الموجود في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

اذ ان التناسب الخطي لفعالية الأنزيم مع المحتوى البروتيني للأنزيم دليل على ان الإزالة الامينية من السايتدين هي ازالة أنزيمية.

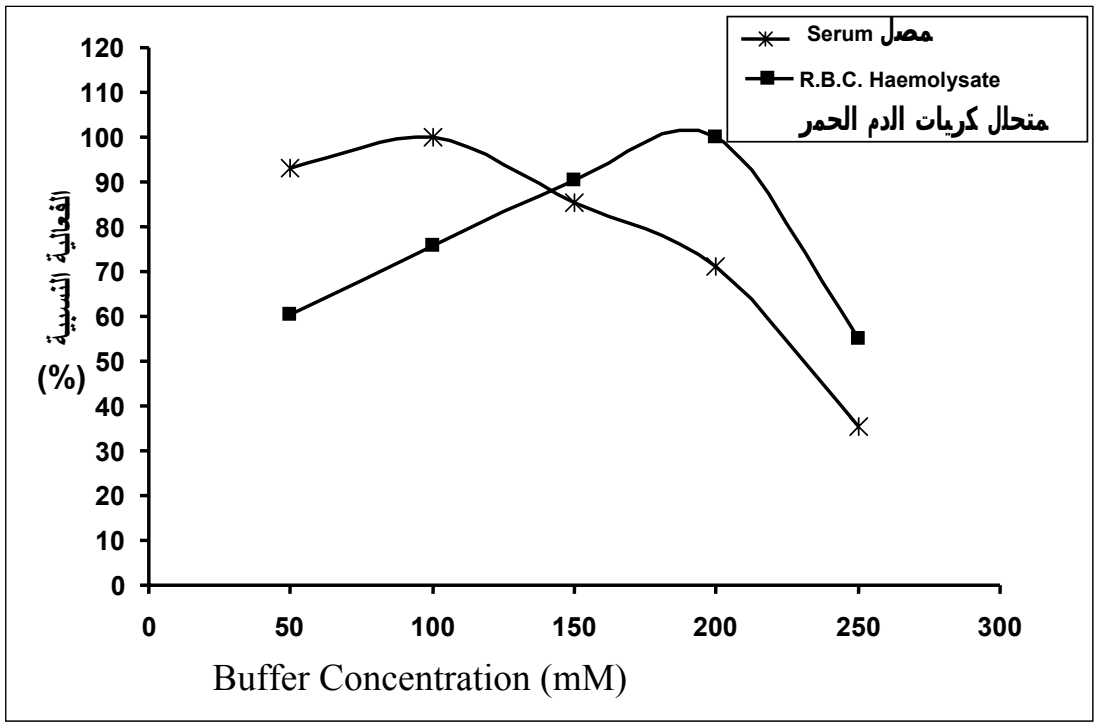
3. تاثير تركيز المحلول المنظم على فعالية الأنزيم:

تمتاز المحاليل المنظمة بمقاومتها لأي تغير في تركيز ايونات الهيدروجين عند اضافة كميات قليلة من حامض أو قاعدة إلى المحلول (Tietz, 1986)، اذ تم استخدام المحلول المنظم الفوسفيت (Sodium phosphate) وباس هيدروجيني (7.4).

يتضح من الشكل (3) ان أعلى فعالية للأنزيم في المصل تم الحصول عليها عند تركيز (100) ملي مولار في حين ان التركيز الامثل للمحلول المنظم لأنزيم متحال كريات الدم الحمر (200) ملي مولار، وهذا يتفق مع (Katsuragi et al., 1989; Vita et al., 1985; Beck et la., 1972) لذا استخدم هذين التركيزين لجميع التجارب اللاحقة.



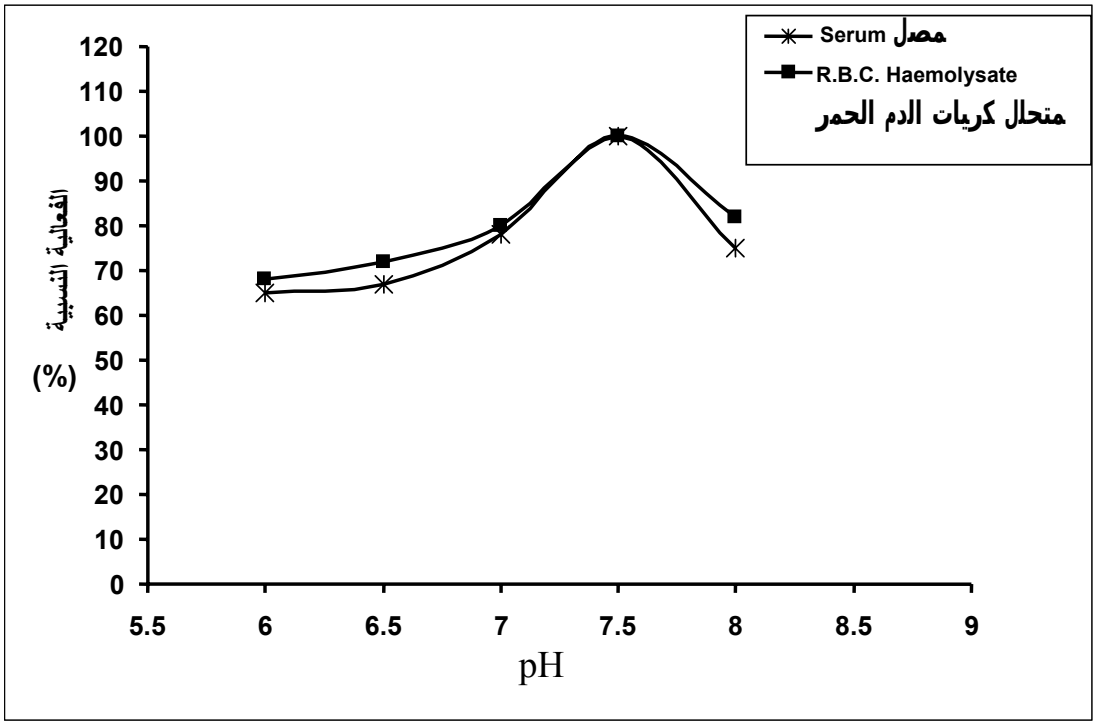
الشكل 2: العلاقة بين الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز وتاثير الحجوم المختلفة من مستخاص الانزيم (البروتين).



الشكل 3: تاثير تركيز المحلول المنظم الفوسفيت (Sodium phosphate) على الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحلل كريات الدم الحمر.

4. تأثير الدالة الحامضية (pH) على فعالية الأنزيم:

ان لكل أنزيم رقماً هيدروجينياً يبدي الأنزيم أقصى فعالية عنده ويسمى الرقم الهيدروجيني الامثل، وعند استخدام رقم هيدروجيني عالي او واطئ جداً يؤدي إلى تشويه طبيعة الأنزيم (Denaturation) وفقدان فعاليته (Tietz, 1986) ويبدو واضحاً من الشكل (4) ان الدالة الحامضية المثلى للأنزيم في المصل ومتحال كريات الدم الحمر هي (7.5) في المحلول المنظم، وهذا يتفق مع نتائج الباحثين (Vita et al., 1985)، لذا استخدمت هذه الدالة الحامضية في جميع التجارب اللاحقة.

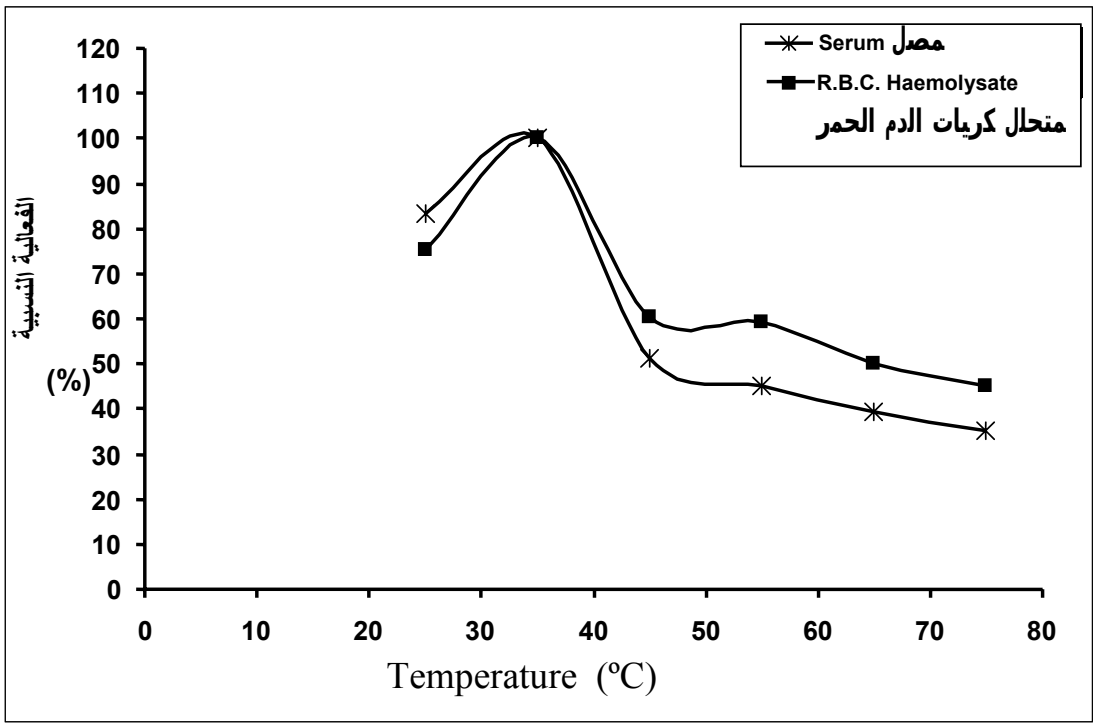


الشكل 4 : تأثير الدالة الحامضية على الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

5. تأثير درجة الحرارة على فعالية الأنزيم:

تعد درجة الحرارة عاملاً مهماً بالتفاعل الأنزيمي من حيث نشاطه ويتناسب طردياً مع درجة الحرارة، اذ أن هذه الظاهرة تنطبق على عدد كبير من الأنزيمات وفي درجة حرارة (0-50ºC)، وحالة استخدام درجة الحرارة القصوى يؤدي إلى تفكك الأواصر الضعيفة المحافظة على الشكل الثلاثي للبروتين وبالتالي يترتب على ذلك تشويه طبيعة الأنزيم وفقدان فعاليته (Tietz, 1986).

إذ يتضح وكما مبين بالشكل (5) ان الارتفاع التدريجي لدرجات الحرارة يعمل على رفع نشاط الأنزيم للوصول إلى درجة حرارة (35 ºC) بعدها تنخفض فعالية الأنزيم، لذا استخدمت هذه الدرجة الحرارية في جميع التجارب اللاحقة ويتفق مع ما أشار إليه الباحثين Katsuragi وأخرون (1989) و Vita وخرون (1985).



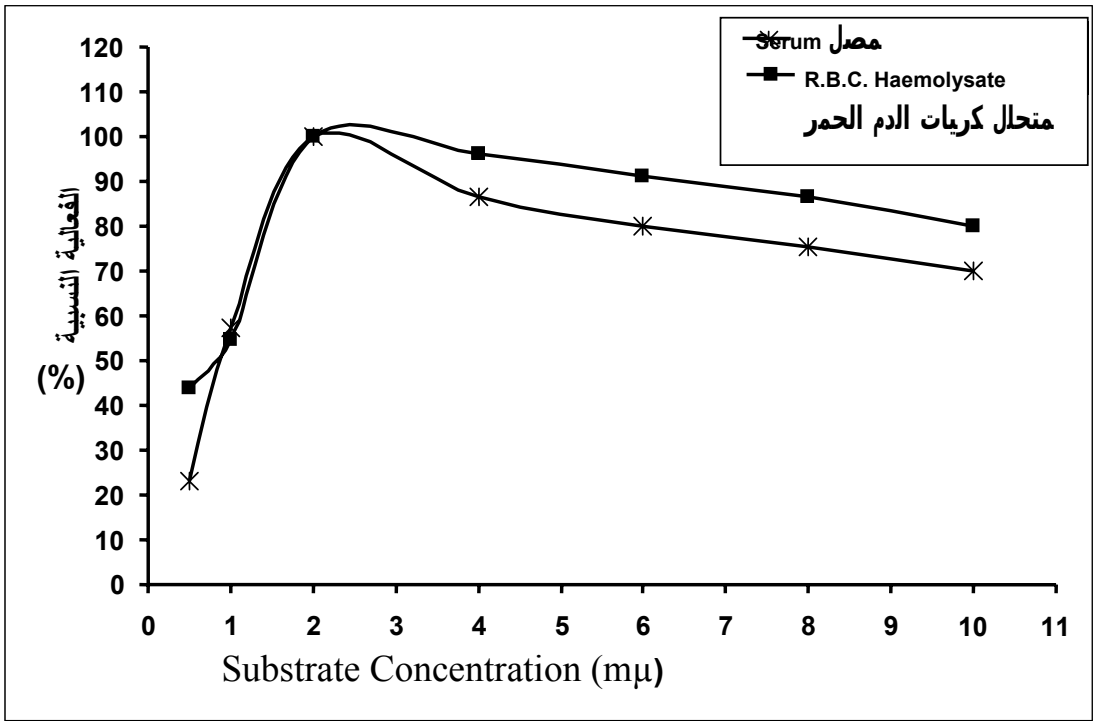
الشكل 5 : تأثير درجة الحرارة على الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

6 . العلاقة بين فعالية الأنزيم وتركيز مادة الأساس:

عندما يكون تركيز الأنزيم في خليط التفاعل ثابتاً فان الزيادة في تركيز مادة الأساس تسبب في البداية ارتفاعاً سريعاً في معدل سرعة التفاعل ثم تقل تدريجياً إلى أن تصبح السرعة ثابتة مهما زاد تركيز مادة الأساس ويطلق على السرعة عند أعلى تركيز للمادة الأساس بالسرعة القصوى (Maximum Velocity) ويرمز لها بـ (Vmax) ولمعرفة العلاقة بين فعالية الأنزيم وتركيز مادة الأساس السايتدين، تم قياس فعالية الأنزيم بوجود تراكيز مختلفة من المادة الأساس (0.5-10) ملي مولار وبكمية ثابتة من الأنزيم (المصل او متحال كريات الدم الحمر).

ويتضح من الشكل (6) ان زيادة تركيز مادة الأساس تعمل على زيادة فعالية الأنزيم حتى تصل إلى قيمة (2) ملي مولار في المصل ومتحال كريات الدم الحمر حيث تكون سرعة التفاعل ثابتة تقريباً لا تتغير بزيادة التركيز.

وبهذا يمكن تحديد تركيز مادة الأساس اللازمة لحصول السرعة القصوى، وباستخدام رسم لاينويفر- برك والموضح في الشكل (7)، وجد ان قيمة السرعة القصوى (Vmax) لأنزيم السايتدين دي أمنيز تساوي (6.221 μM/min./mg) وقيمة ثابت ميكليس منتن (km) تساوي (1.85×10^{-3}M) للمصل، في حين أن السرعة القصوى لأنزيم السايتدين دي أمنيز تساوي (12.823 μM/min./mg) وثابت ميكيلس منتن (0.66×10^{-3}M) لمتحال كريات الدم الحمر. وهذا يتفق مع ماوجده الباحثون في الادبيات (Katsuragi et al., 1989; Vita et al., 1985; Ipata and Cercignani, 1978; Yu et al., 1976a, b; Ipata et al., 1978).



الشكل 6 : تأثير تركيز المادة الأساس على الفعالية النسبية لأنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

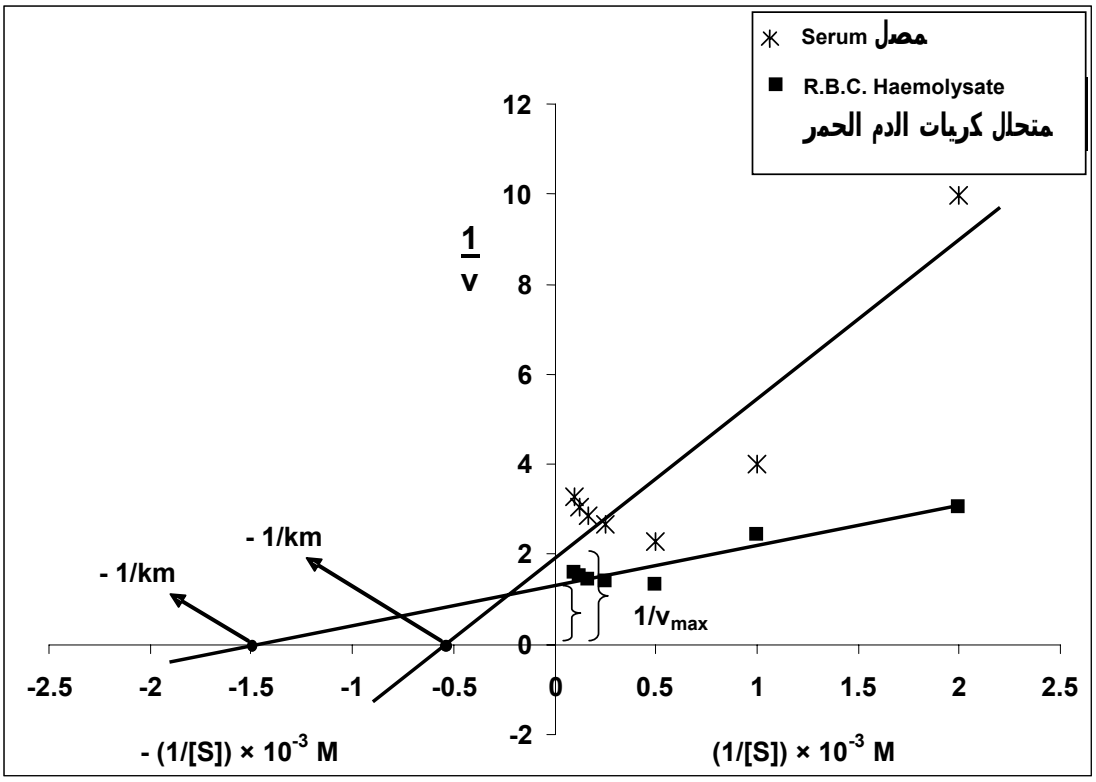
7. الظروف المثلى لقياس فعالية الأنزيم:

يوضح الجدول (1) الظروف المثلى التي تم التوصل إليها خلال هذه الدراسة لقياس فعالية أنزيم السايتدين دي امنيز من مصل ومتحال كريات الدم الحمر اللونية.

كانت الفعالية النوعية للسايتدين دي امنيز تحت الظروف المثلى في المصل ومتحال كريات الدم الحمر هي (0.34 ± 8.75) و (0.85 ± 13.61) مايكرومول/دقيقة/ملغم على التوالي، وتمثل زيادة قدرها (5.25) و (6.81) مايكرومول/دقيقة/ملغم للمصل ومتحال كريات الدم الحمر على التوالي مقارنة مع الظروف التمهيدية للقياس.

الجدول 1 : مكونات مزيج التفاعل المثالية لقياس فعالية أنزيم السايتدين دي امنيز من مصل ومتحال كريات الدم الحمر للإنسان بالطريقة اللونية.

مصدر الأنزيم	تركيز المحلول المنظم (mM)	الأس الهيدروجيني (pH)	سايتدين (mM)	الأنزيم (ML)	درجة الحرارة (°C)	فترة التحضين (min)
مصل serum	100	7.5	2	75	35	45
متحال كريات الدم الحمر R.B.C. Haemolysate	200	7.5	2	50	35	30



الشكل 7: رسم لاينويفر- برك لتوضيح قيمة ثابت ميكليس-منتن للمادة الأساس السايتدين وقيمة السرعة القصوى لأنزيم السايتدين دي امنيز في المصل ومتحلل كريات الدم الحمر.

8. تأثير الأملاح المعدنية على فعالية الأنزيم:

نظراً لأهمية معرفة العوامل المساعدة وتأثيرها على فعالية الأنزيم مثل المعادن واحتياج الأنزيم إليها، تم استخدام الظروف المثلى لتفاعل الأنزيم التي تم تحديدها سابقاً، وأضيفت إليها الأملاح المعدنية وبالتركيزين (0.1 و 1) ملي مولار ويوضح الجدول (2) تأثير الأملاح المعدنية على فعالية الأنزيم ويتضح من النتائج ان كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) له تاثير تثبيطي واضح على فعالية الأنزيم في المصل ومتحلل كريات الدم الحمر وكذلك بالنسبة لكلوريد الكوبلت $CoCl_2$ وكلوريد البوتاسيوم KCl وكلوريد النحاس وفي كلا التركيزين (0.1 و 1) ملي مولار وهذا يتفق مع نتائج الباحثين Yu وأخرون (1976a, b)، Katsuragi وأخرون (1986) و يونس (1995)، ويعزى سبب تثبيط فعالية أنزيم السايتدين دي امنيز وبعض الأنزيمات الأخرى بسبب تفاعل هذه الأملاح المعدنية مع مجموعة الثايول (-SH) الموجودة في الأنزيم مما يؤدي إلى تثبيطه (Boyer, 1959).

الجدول 2: تأثير الأملاح المعدنية على فعالية الأنزيم السايتدين دي أمنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

الملح المعدني	*الفعالية النسبية للأنزيم في متحال كريات الدم الحمر %		*الفعالية النسبية للأنزيم في المصل (%)	
	0.1 m.M	1 m.M	0.1 m.M	1 m.M
السيطرة	100	100	100	100
$MgCl_2$	65.91	72.7	66.77	75.21
$CoCl_2$	78.92	89.46	42.36	60.10
KCl	70.8	74.61	82.22	91.25
$CuCl_2$	70.46	73.57	44.61	60.32

* اعتمدت الفعالية النسبية (لثلاث مكررات) للأنزيم بدون اضافة الملح المعدني على انها عينة السيطرة (الضابط) واعتبرت الفعالية 100% ومن ثم احتسبت فعالية الأنزيم المضاف اليه الملح المعدني نسبة إلى عينة السيطرة.

9. تأثير الأحماض الامينية على فعالية الأنزيم:

تم أيضا دراسة تأثير الأحماض الامينية على فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر، اذ تم قياس فعالية الأنزيم تحت الظروف المثلى وبإضافة تراكيز مختلفة (1و10) ملي مولار من الأحماض الامينية.

إذ يتضح من الجدول (3) ان حامض الكلوتاميك والهستدين كان له تأثير تحفيزي واضح على فعالية الأنزيم في المصل ومتحال كريات الدم الحمر وفي كلا التركيزين. وهذا يتفق مع ما أشار إليه Boyer (1959)، Yu وآخرون (1976, a, b) و Katsuragi وآخرون (1986) في ان الحامض الاميني الكلوتاميك والهستدين يسبب زيادة في فعالية الأنزيم، ان زيادة فعالية الانزيم بوجود بعض الاحماض الامينية لا زالت غامضة ويعتقد ان لها علاقة بالتنظيم الخلوي حيث ان تنشيط الانزيم بهذه المركبات هي صفة عامة لانزيم السايتوسين دي امنيز ويعتقد ان الحامض الاميني يرتبط مع الموقع المنظم (Regularity) للانزيم وبذلك يعمل على زيادة تحلل معقد الانزيم-المادة الاساس (Yu et al., 1976a).

الجدول3: تأثير تراكيز مختلفة من بعض الأحماض الامينية على فعالية الأنزيم السايتدين دي أمنيز في المصل ومتحال كريات الدم الحمر.

الحامض الاميني	*الفعالية النسبية للأنزيم في متحال كريات الدم الحمر %		*الفعالية النسبية للأنزيم في المصل (%)	
	0.1 m.M	1 m.M	0.1 m.M	1 m.M
السيطرة	100	100	100	100
هستدين	122	165	146	180
كلوتاميك	109	123	115	130

* اعتمدت الفعالية النسبية (لثلاث مكررات) للأنزيم بدون إضافة حامض أميني على انها عينة السيطرة (الضابط) واعتبرت الفعالية 100% ومن ثم احتسبت فعالية الأنزيم المضاف إليه الحامض الاميني نسبة إلى عينة السيطرة.

ويمكن أن نستنتج انه ممكن قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمنيز في مصل الدم ومتحال كريات الدم الحمر بالطريقة اللونية وبالاعتماد على تحديد كمية الامونيا الناتجة فضلاً عن قياس فعالية الأنزيم بالطريقة الطيفية المعتاد استخدامها.

المصادرالعربية

حمودات، زهراء محمد علي احمد. 2001 .خواص وفعالية أنزيمي السايتوسين والسايتدين دي امنيز في دم الأصحاء والمرضى، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق، ص23-24.

يونس، دعاء عبد المنعم.1995، تواجد وخواص أنزيم السايتوسين دي أمنيز من بكتريا الباسلس ستلس *Bacillus subtilis*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق، 39 صفحة.

المصادر الاجنبية

Alta'ee, A.H. and Ewadh, M.J., 2003.Cytidine Deaminase Activity: A Novel Diagnostic Tool to Differentiate Between Hodgkin's and Non-Hodgkin's Lymphoma.National J.Chem.,Vol. 11, pp.484-489.

Beck, C.F., Ingraham, J.L., Neuhard, J. and Thomassen, E., 1972. Metabolism of Pyrimidines and Pyrimidine Nucleosides by *Salmonella typhimarium*, J. Bacteriol, Vol. 110, No. 1, pp.219-228.

Beulter, E., Bium, K.G., Valentine Kaplan, J.C., Loka, G.W., Ramot, B. and Vallnlinl, W.N., 1977. International Committee for Standar- Dization in Haematology. Recommended Methods for Red- Cell. Enzyme Analysis, J.Haemato, Vol. 35, pp.331-340.

Boyer, P.D., 1959. The Enzymes. Vol. I,2nd Ed., ed. Academic Press, New York, 511 p.

Carlow, D.C., Smith, A.A., Yang, C.C., Short, S.A. and Wolfenden, R., 1995. Major Contribution of Carboxymethyl Group to Transition-State Stabilization by Cytidine Deaminase: Mutation and Rescue. Biochemistry, Vol. 34, No. 13, pp.4220-4224.

Crandall, G.D., 1983. Biochemistry Laboratory. New York, Oxford University Press., Vol. 29, 83 p.

Eda, H., Ura, M., Ouchi, K.F., Tanaka, Y., Miwa, M. and Ishitsuka, H., 1998. The Antiproliferative Activity of DMDC in Modulated by Inhibition of Cytidine Deaminase. Cancer-Res., Vol. 58, pp.1165-1169.

Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Le, N.L.O., Momparler, L.F., Greenbaum, M., Letourneau, S., Cournyer, D. and Momparler, R.L., 1998. Retroviral Transfer and Long-Term Expression of Human Cytidine Deaminase CDNA in Hematopoietic Cells Following Transplantation in Mice. Gene Therapy, Vol. 5, pp.1545-1551.

Ipata, P.L. and Cercignani, G., 1978. Cytosine and Cytidine Deaminase from Yeast. In Method in Enzymology. Cited by Patricia, A.H. and Mary, E.J., Vol. LI, pp.394-401. Pub. Academic Press, Inc. USA.

Katsuragi, T., Sonoda, T., Matsumoto, K., Sakai, T. and Tonomura, K., 1989. Purification and Some Properties of Cytosine Deaminase from Backers' Yeast. Agric. Biol. Chem., Vol. 53, pp.1313-1319.

Katsuragi, T., Sakai, T., Matsumoto, K. and Tonomura, K., 1986. Cytosine Deaminase from *Escherichia coli* Production, Purification and Some Characteristics. Agric. Biol. Chem., Vol. 50, No. 7, pp.1721-1730.

Kream, J.P. and Chargaff, E., 1952. On the Cytosine Deaminase of Yeast. J. Am. Chem. Soci., Vol. 74, pp.5157-5160.

Laliberte, J. and Momparler, R.L., 1994. Human Cytidine Deaminase: Purification on Enzyme, Cloning and Expression of Its Complementary DNA. Cancer Res. 54, pp.5401-5407.

Price, N.C. and Stevens, L., 1989. Fundamentals of Enzymology. 2nd. Oxford University press, pp.201-204.

Tietz, N.W., 1986. Textbook of Clinical Chemistry. 2nd Ed., W.B. Saunder Company, London, 1271,1411 p.

Vita, A., Amici, A., Cacciamani, T., Lanciotti, M. and Magni, G., 1985. Cytidine Deaminase from *Escherichia colli* purification and Enzymatic and Molecular Properties. Biochem., Vol. 24, No. 21, pp.6020- 6024.

Yu, T.S., Sakai, T. and Omata, S., 1976. A. Kinetic Properties of Cytosine Deaminase from *Serratia marcescens*. Agric. Biol. Chem., Vol. 40, No. 3, pp.543-549.

Yu, T.S., Sakai, T. and Omata, S., 1976. B. Kinetic Properties of Cytosine Deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. Agric. Biol. Chem., Vol. 40, No. 3, pp.551-557.