

Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activity in Acute Leukemias

Mehmet Berköz, MSc.

Department of Biochemistry,
Mersin University Pharmacy Faculty,
mehmet_berkoz@yahoo.com

Serap Yalın, PhD.

Department of Biochemistry,
Mersin University Pharmacy Faculty,
syalin01@hotmail.com

Volkan Güneş Güler, MSc.

Department of Biochemistry,
Mersin University Pharmacy Faculty,
volkanguler@gmail.com

Atilla Yalçın, MD.

Department of Internal Medicine
Mersin University Medical Faculty,
atilla.yalcin@yahoo.com

Özet

Amaç: Çalışmamızın amacı akut lösemide serbest radikal-antioksidan dengesinin olası değişikliklerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya 21 akut lösemi hastası ve 22 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Akut lösemi hastalarının 10'u Akut Myeloid Lösemi, 8'i Akut Lenfositik Lösemi ve 3'ü Myelodisplastik Sendrom tanısı aldı. Toplanan kan örneklerinde serum antioksidan özelliği için katalaz aktivitesi ve serbest radikal düzeyleri için serum malondialdehit, (MDA) seviyesi ölçüldü. Gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular: MDA seviyesinin akut lösemili hastalarda arttığı ancak katalaz aktivitesinin anlamlı ölçüde azaldığı belirlendi.

Sonuç: Bulgularımız, akut lösemilerde tümör hücrelerinin oluşturduğu serbest radikallerin lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve artmış lipid peroksidasyonunun antioksidan sistemi zayıflatıldığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: **Lösemi; Serbest Radikaller; Malondialdehit; Katalaz.**

Abstract

Purpose: The aim of our study is the investigation of possible changes in free radical-antioxidant balance in acute leukemias.

Material and Methods: In this study, we have investigated 21 acute leukemia patients and 22 healthy volunteers for the control group. Among the acute leukemia patients; 10 of them as AML (Acute Myeloid Leukemia), 8 of them as ALL (Acute Lymphocytic Leukemia), and 3 of them have been diagnosed as MDS (myelodysplastic syndrome). Catalase activity for the antioxidant property and MDA (malondialdehyde) concentration for the free radical level of all collected blood samples were analyzed. Data obtained for each group were analyzed statistically using SPSS-10 software and groups were compared employing Mann-Whitney U Test.

Results: The MDA levels in acute leukemia patients have been found to be increased, but the catalase levels found to be significantly decreased compared to controls.

Conclusion: Our findings indicate that acute leukemia has increased the free radical and decreased antioxidant levels and as a result free radical-antioxidant balance has been impaired.

Key Words: **Leukemia; Free Radicals; Malondialdehyde; Catalase.**

Submitted : November 21, 2006
Revised : December 22, 2006
Accepted : March 15, 2007

Corresponding Author:

Serap Yalın, PhD.
Department of Biochemistry,
Mersin University Pharmacy Faculty,
Mersin, Turkey

Telephone : +90- 324 341 28 15-2631
E-mail : syalin01@hotmail.com

Giriş

Serbest oksijen radikalleri pek çok hastalığın patogenezinin sorumlu olan ve ortaklanmamış bir elektron içeren reaktif moleküllerdir. Bu radikaller organizmanın normal homeostaz sürecinde meydana gelebildiği gibi çeşitli dış etkenler ile de oluşabilir. Bu moleküllerin yarı ömürleri çok kısa olup normal fizyolojik şartlarda intrasellüler ve ekstrasellüler savunma mekanizmaları ile kontrol altında tutulur. Serbest oksijen radikallerinin artması membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına (lipid peroksidasyonuna) neden olabilmekte birlikte protein, karbohidrat ve nükleik asitleri deoksidasyona uğratarak oksidatif strese yol açmakta ve çeşitli patolojilere neden olabilmektedir. Membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun en önemli göstergelerinden birisidir (1).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin hedef dokularda yapacaklarını önleyen, geciktiren veya meydana gelen hasarın tamirinde görev alan maddelerdir. Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx), non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E, vitamin C, vitamin A (α -karoten), selenyum, transferrin ve laktoferrindir. Antioksidanlar sıklıkla intrasellüler bazen de ekstrasellüler olabilirler (1-3).

Serbest radikal ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucunda oksidatif stresin artabileceği, DNA dizisinde kırıklar oluşturarak kansere ve diğer pek çok hastalığa neden olabileceği bilinmektedir (3-5). Özellikle parkinson (6), Alzheimer (7), katarakt (8), psöriazis (9), romatoid artrit (10), ateroskleroz (11), osteoporoz (12) ve Duchenne Kas Distrofisinde (13) oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir.

Akut lösemilerde de gerek myeloid gerekse lenfoid seri kökenli tümör hücrelerinin aşırı miktarda serbest radikal (özellikle de hidroksil radikali) ürettiği bilinmektedir (14). Yapılan bazı çalışmalarda akut lösemili bireylerin oluşan bu hasara karşı antioksidan sistemlerini yeteri kadar ortaya koydukları, ancak bazı bireylerde ise antioksidan sistemin yeteri kadar devreye girmediği görülmüştür. Antioksidan savunma sisteminin devreye girdiği akut lösemili bireylerde de bazı antioksidanların ön plana çıktığı bazılarının ise önemli bir fonksiyon göstermediği bildirilmiştir. Akut lösemili bireylerde GSH-Px ve SOD gibi antioksidanların

düzeylerini tespit etmeye yönelik çalışmalar mevcut olsa da katalaz ile ilgili çalışmalar sınırlıdır (14).

Bu çalışmada akut lösemili hastalarda MDA konsantrasyonu ve katalaz aktivitesi ölçülerek oksidatif dengenin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Şubat 2005- Ekim 2005 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran ve akut lösemi teşhisi konulmuş 21 hasta ve 22 sağlıklı gönüllü bu çalışmaya kabul edilmiştir. Hastaların hepsine ilk kez tanı konulmuş ve hiçbir anti-lösemik tedavi uygulanmamıştır. Akut Myeloid Lösemi (AML) teşhisi konulmuş 10 hastadan 7'si, Akut Lenfositik Lösemi (ALL) teşhisi konulmuş 8 hastadan 3'ü erkek ve Myelodisplastik Sendrom (MDS) teşhisi konulmuş 3 hastadan 2'si erkekti. Kontrol grubunda bulunan 22 sağlıklı gönüllünün 11'i erkekti.

Çalışmaya başlanmadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden etik kurul onayı alınmıştır. Hem hasta grubuna hem de kontrol grubuna çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilip onamları alınmıştır. Karaciğer ve böbrek disfonksiyonu, kontrolsüz diyabeti, kronik kalp hastalığı, akut ve kronik hepatiti olanlarla daha önce en az bir kez miyokard enfarktüsü geçirmiş olanlar çalışmaya alınmamıştır. Çalışmaya alınan tüm gönüllülerin açlık kan şekeri, ürik asit, albumin, total protein, direkt ve total bilirubin, total lipid, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri incelenmiş ve değerleri normal sınırlar içinde olmayanlar çalışmaya alınmamıştır.

Rutin biyokimyasal tetkikler 10 mL'lik kuru tüpe alınan venöz kanlarda yapıldı. Serum MDA ve katalaz seviyeleri ise 5 mL'lik EDTA'lı tüpe alınan venöz kan örneklerinde tayin edildi. Kanlar vakit kaybedilmeden 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analiz yapılabilecek şekilde -20 °C'de saklandı.

Serum MDA seviyeleri Yagi ve arkadaşlarının geliştirdiği Tiyobarbitürik Asit (TBA) reaksiyonu ile $\mu\text{mol/L}$ cinsinden ölçüldü (15, 16). 50 μL plazma alınıp üzerine 100 μL % 8,1'lik SDS (sodyum dodesil sülfat), 750 μL % 20'lik asetik asit (pH=3.5), 750 μL % 0.8'lik TBA ve 350 μL distile su eklendi. 95 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 500 μL distile su ve 2,5 mL n-bütanol piridin karışımı eklendi. Tüpün kapağı kapatılıp beyazlaşınca kadar vorteksledi. Daha sonra 4000 rpm'de 15 dakika

santrifüjlere süpernatant alındı ve spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları okundu. Kalibrasyon eğrisi ise stok 1,1,3,3- tetraetoksipropan çözeltisinden günlük standart hazırlanarak çizildi.

Serum katalaz seviyesi ise Aebi ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem ile U/mL cinsinden ölçüldü (17). pH=7'deki fosfat tamponuna optik dansite 0,50 olana kadar azar azar hidrojen peroksit eklendi. Daha sonra 2,99 mL fosfat tamponunun üzerine 10 µL numune eklenerek 240 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Bir dakika sonra absorbans tekrar ölçüldü ve aradaki farktan enzim aktivitesi bulundu.

Her bir grup için elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS-10 programı ile analiz edildi ve dağılımın normal dağılıma uymamasından dolayı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Bulgular

Yaş ortalamaları AML hastalarında kadınlarda 40 ± 18, erkeklerde 42 ± 8; ALL hastalarında kadınlarda 36 ± 13, erkeklerde 33 ± 11 ve MDS hastalarında kadınlarda 35 ± 0, erkeklerde 45 ± 2 olarak bulundu. Kontrol grubunda ise erkeklerin yaş ortalaması 35 ± 15, kadınların yaş ortalaması 36 ± 15 idi. Kontrol, AML, ALL ve MDS vakalarında kadın ve erkeklerin yaşları bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

MDA düzeyleri kontrol grubunda 0,98 ± 0,40 µmol/L iken, akut lösemili hastalarda 1,80 ± 0,69 µmol/L, ALL hastalarında 1,41 ± 0,52 µmol/L, AML hastalarında 1,88 ± 0,74 µmol/L ve MDS hastalarında ise 1,64 ± 0,20 µmol/L olarak bulundu. Serum katalaz seviyeleri kontrol grubunda 280,18 ± 98,06 U/ mL iken, akut lösemili hastalarda 170 ± 45,05 U/mL, ALL hastalarında 154,48 ± 35,97 U/mL, AML hastalarında 188,22 ± 54,21 U/mL ve MDS hastalarında ise 150,56 ± 36,32 U/mL olarak tespit edildi. Genel olarak akut lösemi olgularında ve tüm alt gruplarında serum MDA konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın (p < 0,05), serum katalaz düzeylerinde ise anlamlı bir azalmanın olduğu (p < 0,05) saptandı (Tablo I).

Tartışma

Sunulan çalışmanın bulguları akut lösemili hastalarda lipid peroksidasyonun arttığını ve antioksidan etkinliğin azaldığını göstermektedir. Özellikle de karaciğer kanseri, tiroid ve meme kanseri gibi solid doku kanserleriyle lösemi, lenfoma ve multipl myeloma gibi hematolojik malignitelerde artmış lipid peroksidasyonu bulgusu bildirilmiştir (4,14). Akut lösemilerde serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun arttığı uzun zamandır bilinse de bu hastalarda antioksidan savunmanın yeterli olup olmayacağı konusundaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır (4, 5).

Tablo I. Akut lösemi ve kontrol gruplarında MDA ve katalaz düzeyleri

	Kontrol (n = 22)	Akut Lösemi (n = 21)	ALL (n = 8)	AML (n = 10)	MDS (n = 3)
MDA (µmol/L)					
Ortalama ±SS	0,98 ± 0,40	1,80 ± 0,69 ^a	1,41 ± 0,52 ^a	1,88 ± 0,74 ^a	1,64 ± 0,20 ^a
Minimum-maksimum değer	0,44-1,42	1,05-2,63	0,86-2,03	1,06-2,69	1,61-1,66
Ortanca	1,02	2,03	1,68	2,24	1,64
Katalaz (U/ mL)					
Ortalama ±SS	280,18 ± 98,06	170 ± 45,05 ^a	154,48 ± 35,97 ^a	188,22 ± 54,21 ^a	150,56 ± 36,32 ^a
Minimum-maksimum değer	178,22-396,51	122,36-219,63	115,24-194,38	126,96-324,67	114,22-186,87
Ortanca	204,74	146,35	128,49	154,79	150,59

SS. Standart sapma olarak verilmiştir.

^a. Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak değişmiş (p < 0,05) değerler

Drabko ve arkadaşları 56 malign hastalıklı çocukta yaptığı çalışmada serum MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla yükseldiğini, tedavi sonrasında ise düştüğünü tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada malign hastalıkların total antioksidan seviyesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu ancak GSH-Px seviyesinin kanser olgularında yüksek olduğu bulunmuştur (14). Bakan ve arkadaşları, kronik lösemili olgularda serum GSH-Px ve Cu-Zn SOD seviyesini kontrol grubundan düşük, NO (nitrik oksit) ve MDA seviyesini ise kontrol grubundan yüksek bulmuş ancak glutatyon redüktaz seviyesinde anlamlı bir fark bulamamıştır (18). Emerit ve arkadaşları süperoksit radikallerinin antioksidan sistemi inhibe ettiğini ve bunun da hastalığın prognozunda önemli olduğunu vurgulamıştır (19). Singh ve arkadaşları akut lösemi tanısı almış olgularda serum MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını tespit etmiştir (20). Abou-Seif ve arkadaşları yeni tanı almış ALL hastalarının MDA seviyelerinin normalden yüksek olduğu ve tedavi sonrasında düştüğünü tespit etmiştir (21). Yine aynı şekilde Dağdaş ve arkadaşları AML'li hastalarda serum MDA seviyesinin kontrol grubuna nazaran arttığını bildirmişlerdir (22). Akut lösemiler dışındaki hematolojik malignitelerde de buna benzer sonuçlar elde edilmiştir (14,23). Bolaman ve arkadaşları multipl myelomalı hastalarda serum MDA seviyesinin arttığını bildirmişlerdir (23). Bu çalışmaların sonuçları akut lösemi hastalarında serum MDA seviyesinin arttığı ve antioksidan enzimlerinin azaldığını göstermesine karşın artan serbest radikal ve lipid peroksidasyonunun antioksidan sisteminin devreye girmesi ile normal sınırlara çekebileceği de savunulmaktadır (14, 24).

Akut lösemi vakalarında organizmanın antioksidan sisteminin devreye sokup sokamayacağı halen tam olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda serum SOD seviyesi normalin üzerinde bulunurken, bazı çalışmalar ise oluşan oksidatif stresin antioksidan sistemi baskılayabileceği ve SOD seviyesinin normale göre düşebileceği yönündedir (19). Akut lösemilerde serum SOD seviyesi oldukça

çalışılmasına rağmen antioksidan sistemin önemli bir bileşeni olan katalaz ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (24).

Sunulan çalışmada serbest oksijen radikali ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesinde anlamlı bir artış, antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan katalaz seviyesinde ise anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu veriler bize hücre harabiyeti sonrası oluşan lipid peroksidasyonundaki artışın antioksidan savunma sistemini tahrip edebileceğini veya bozulan antioksidan sistemin lipid peroksidasyonunu indükleyip serum MDA seviyesini arttırabileceğini düşündürmektedir.

MDA seviyesindeki artış bulgusu akut lösemi ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi göz önüne sermektedir. Akut lösemili hastalarda serum katalaz seviyesindeki azalma da bozulmuş savunma sistemini işaret etmektedir. Ancak MDA ölçümü için oldukça yaygın olarak kullanılan TBA testinin spesifitesi düşüktür (15, 25, 26).

Yüksek bilirubin seviyesi, enfeksiyon ve bir takım sitotoksik ajanlar (doksorubisin, vinkristin) serum MDA seviyesini yükseltebileceğinden, sunulan çalışmadaki tüm hastaların yeni tanı konmuş ve hiç tedavi görmemiş olmasına dikkat edildi. Kontrol grubunda bulunan sağlıklı bireylerde de kronik bir hastalığın bulunmamasına ve son üç ay içerisinde hiçbir enfeksiyon geçirmemiş olmasına dikkat edildi.

Sonuç olarak bulgularımız, akut lösemilerde tümör hücrelerinin oluşturduğu serbest radikallerin lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve artmış lipid peroksidasyonunun antioksidan sistemi zayıflattığını düşündürmektedir. Bu nedenle tüm akut lösemi hastalarında antioksidan sistemin korunması ve güçlendirilmesi ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

- 1.1.Halliwell B. *Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 1147-1150.
- 2.Evans MD, Cooke MS. *Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bioessays* 2004; 26: 533-542.
- 3.Halliwell B, Aruoma OI. *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett* 1991; 281: 9-19.
- 4.Holmes GE, Bernstein C, Bernstein H. *Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: A review. Mutation Res* 1992; 275: 305-315.
- 5.Halliwell B. *Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J.* 2007; 401: 1-11.
- 6.Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Fernandez-Calle P, et al. *Serum lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett* 1992; 136:137-140.
- 7.Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, et al. *Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. Free Radic Biol Med* 2002; 33:1372-1379.
- 8.Micelli-Ferrari T, Vendemiale G, Grattagliano I, et al. *Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of myopic and senile cataract. Br J Ophthalmol* 1996; 80: 840-843.
- 9.Yildirim M, Inaloz HS, Baysal V, Delibas N. *The role of oxidants and antioxidants in psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17:34-36.
- 10.Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Oztürk HS, Yorgancıoğlu R, Durak I. *Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol* 2000; 19:275-277.
- 11.Siems W, Quast S, Carluccio F, et al. *Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. Clin Nephrol* 2002; 58 Suppl 1:S12-19.
- 12.Yalın S, Bagis S, Polat G, et al. *Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:689-692.
- 13.Haycock JW, MacNeil S, Jones P, Harris JB, Mantle D. *Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. Neuroreport* 1996; 8:357-361.
- 14.Drabko K, Kowalczyk J. *Imbalance between pro-oxidative and anti-oxidative processes in children with neoplastic disease. Med Wieku Rozwoj* 2004; 8: 217-223.
- 15.Yagi K. *Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Methods Mol Biol.* 1998;108:101-106.
- 16.Yagi, K. *Simple procedure for specific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. Methods Mol. Biol.* 1998;108: 107-110.
- 17.Aebi H. *Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London Academic Press.* 1974, 673-677.
- 18.Bakan N, Taysi S, Yılmaz O, et al. *Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. Clin Chim Acta* 2003; 338:143-149.
- 19.Emerit I, Garban F, Vassy J, Levy A, Filipe P, Freitas J. *Superoxide-mediated clastogenesis and anticlastogenic effects of exogenous superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:12799-12804.
- 20.Singh V, Ghalaut PS, Kharb S, Singh GP. *Plasma concentrations of lipid peroxidation products in children with acute leukaemia. Indian J Med Sci* 2001; 55:215-217.
- 21.Abou-Seif MA, Rabia A, Nasr M. *Antioxidant status, erythrocyte membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. Clin Chem Lab Med* 2000; 38:737-742.
- 22.Dagdas S, Dincer S, Dincer S, Ozet G, Ayli M. *Akut myeloid lösemili hastalarda lipid peroksidasyon düzeyleri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1998; 18:114-118.

23. Bolaman Z, Demir S, Koseoglu MH, Enli Y, Kadikoylu G, Aslan D. *Multipl myelomalı hastalarda lipid peroksidasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001; 1:13-15.

24. Nagy K, Zs -Nagy I. *The effects of idebenone on the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in liver and brain homogenates, as well as in brain synaptosomal and mitochondrial fractions. Arch Gerontol Geriatr* 1990; 11:285-291.

25. Wu T, Rifai N, Roberts LJ, Willett WC, Rimm EB. *Stability of measurements of biomarkers of oxidative stress in blood over 36 hours. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1399-1402.

26. Mollace V, Iannone M, Muscoli C, et al. *The protective effect of M40401, a superoxide dismutase mimetic, on post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils. BMC Pharmacol* 2003; 16: 3-8.