

Kronik Lösemilerde Eritrosit İçi Süperoksit Dismutaz Aktiviteleri

Dr. İ. Çetin Öztürk¹, Dr. Engin M. Gözükara¹, Dr. V. Akın Uysal²

Kronik lösemili hastalarda henüz tedaviye başlanmadan, eritrosit içi süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri Podczasy-Wei'nin tanımladığı INT redüksiyon metodu kullanılarak ölçüldü. KLL ve KML olarak her iki tip lösemide de SOD aktiviteleri ortalamalar yönünden kontrolden daha yüksek olmasına rağmen, sadece KLL grubunda anlamlı yükseklik vardı (p<0.05). Bu bulgulara göre kronik lösemilerde pluripotent stem cell dediğimiz kemik iliği ana hücrelerinde, SOD'a ait gen ekspresyonunun peroksidatif hasara karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak artırıldığı düşünülebilir. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1997;4(1):33-36]

Anahtar Kelimeler : Süperoksit dismutaz, kronik lösemi, pluripotent stem cell

Erythrocyte superoxide dismutase activities in chronic leukemias

Superoxide dismutase (SOD) enzyme activities were measured in erythrocytes of untreated patients with chronic leukemia by using Podczasy-Wei's INT reduction method. In both types of chronic leukemia, SOD activities were higher than control with respect to averages but there was a meaningful elevation only in CLL type (p<0.05). For these reasons, it can be thought that the gene expressions belonging to SOD were increased in leukemic bone marrow pluripotent stem cells as a part of defense mechanism against to peroxidative damage. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1997;4(1):33-36]

Key Words : Superoxide dismutase, chronic leukemia, pluripotent stem cells

Canlı organizmalar üstünde potansiyel toksik etkisi bulunan, oksijen türevi serbest radikaller ve bu radikallerin en önemlilerinden olan süperoksit radikal anyonunun (O_2^-) eksojen ve endojen olarak birçok biyolojik reaksiyon esnasında üretildiği saptanmıştır (1,2). Az miktarda süperoksit radikali, hemoglobinin normal otooksidasyonu esnasında da üretilir ve fizyolojik şartlarda eritrositlerde bol bulunan bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) tarafından etkisiz hale getirilir (3). Süperoksit radikali aşırı reaktif oluşu nedeniyle direkt toksik etkisi yanında çeşitli organik bileşiklerle etkileşimi sonucu hidrojen peroksit

(H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve aşırı reaktif hidroksil radikali (OH^\cdot) gibi toksik etkisi bulunan diğer oksijen türevi oksidan ajanlara dönüşerek, dolaylı yoldan da toksik etki gösterebilir (4,5). Eğer eritrositler büyük miktarda oksidan ajanlara maruz kalırsa ya da eritrositlerde bu ajanlara karşı mevcut bulunan savunma mekanizmaları yetersiz kalırsa, eritrosit içi hemoglobinin oksidasyonu ile methemoglobin (MetHb) oluşur ya da eritrosit membranı gibi hücrenin diğer yapıları ile oksidan etkileşim sonucu hayatı tehdit eden çeşitli irreversible hasarlar meydana gelir (6).

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji - Onkoloji Bilim Dalı, Ankara

Süperoksit radikal anyonunun moleküler oksijene ve daha az toksik olan hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen SOD enzimi oksijeni metabolize eden hücrelerde geniş oranda dağılır ve canlı hücreleri bu radikal toksik etkilerinden korur (7). Ökaryotik hücrelerde 2 tip SOD bulunur. Bunlardan biri bakır ve çinko içeren, syanide dirençli olan ve hücre sitozolünde bulunan CuZn-SOD, diğeri ise mangan içeren, syanide duyarlı olan ve hücre mitokondrisinde bulunan Mn-SOD'dur (8-11). Eritrositler sadece, 21'nci kromozomda bulunan bir gen tarafından kodlanan CuZn-SOD enzimini içerir (12,13).

İnsanlarda, çeşitli malign tümör hücrelerinde, total SOD ve Mn-SOD aktivitesinin azaldığı, buna karşın insan lösemi hücrelerinde Mn-SOD aktivitesinin normalden düşük olduğu halde, total SOD aktivitesinin yükseldiği rapor edilmiştir (7,9,14,15). Diğer yandan lösemik hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin azalmış ya da artmış olduğuna dair yayınlar mevcuttur (6,16,17).

Biz bu çalışmada, henüz tedavi almamış kronik lösemili hastalarda, lösemi tipi ile eritrosit içi SOD aktivitesi arası bir bağıntı olup olmadığını saptamak için, eritrosit içi SOD aktivitesini araştırdık.

MATERYAL VE METOD

Bu araştırma, Ağustos 1995 - Ekim 1995 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji - Onkoloji servisine kronik lösemi tanısı ile yatırılan toplam 12 hastada yapılmıştır. KML'li 6 hastadan 3'ü erkek, 3'ü kadın olup yaşları 30-67 arasındadır (yaş ort. \pm S.D = 47.50 \pm 14.56). KLL'li 6 hastadan 4'ü erkek, 2'si kadın olup yaşları 42-56 arasındadır (yaş ort. \pm S.D = 49.83 \pm 5.24). Hastaların tanısı periferik yayma, kemik iliği aspirasyon materyalinin mikroskopik tetkiki, histoşimik boyamalar v.b tetkikler ile konmuştur.

Kontrol grubu ise anamnez, klinik muayene ve yapılan laboratuvar tetkikleri sonucu sağlıklı olduğuna karar verilen kan grubu donörleri ve sağlıklı hastane personelinden seçilmiştir. Kontrol grubundaki 20 kişiden 9'u erkek, 11'i kadın olup yaşları 19 - 50 arasındadır (Bu gruptaki yaş ort. \pm S.D = 35.80 \pm 9.00).

Polipropilen tüpler içine 500'er mikrolitre heparinize tam kan konarak 1000 g'de 10 dakika

süre ile santrifüj edilerek, plazma ve buffy coat tabakası aspire edilip atıldı. Kalan eritrositler 5 ml Phosphate Buffer Saline (PBS) solüsyonu ile her yıkamadan sonra 1000 g'de 10 dk. santrifüj edilip süpernatant atılmak suretiyle yıkandı. Yıkama santrifüj edilen eritrositler soğuk redistile su ile 2 ml'ye tamamlandıktan sonra karıştırılıp +4°C'de 15 dk bekletilerek hipotonik lizise uğrattıldı. Daha sonra elde edilen lizat, pH=7.0'de 0.01 M fosfat buffer ile 25 kez dilüe edilerek (dilüsyon faktörü=100) SOD aktivitesi tayin edildi. SOD enzim analizi için süperoksit kaynağı olarak xanthine/xanthine oxidase sistemi ve Podczasy-Wei tarafından tanımlanan INT redüksiyon yöntemi (18), istatistik analizler için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

Her iki kronik lösemi tipinde de, eritrosit içi SOD aktiviteleri ortalamalar yönünden kontrolden yüksek olmasına rağmen, sadece kronik lenfositik lösemi (KLL) tipinde istatistiki olarak anlamlı yükseklik mevcuttu ($p < 0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarında SOD aktiviteleri

	Hasta sayısı	SOD akt.(U/g Hb)
KML	6	1435.64 \pm 277.03 ^a
KLL	6	2565.03 \pm 680.69 ^b
Kontrol	20	1253.98 \pm 379.60

a : Ortalama + S.D

b : İstatistiki yönden önemli fark ($p < 0.05$)

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan lösemilerinde eritrosit SOD aktivitesi ile ilgili tespit edebildiğimiz ilk çalışma 1983'te Pavri (6) tarafından gerçekleştirildi. Bu çalışmada Akut Myeloblastik Lösemi (AML) ve Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)'li hastalarda eritrosit içi SOD aktiviteleri düşük bulunurken, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'li ve Kronik Myeloid Lösemi (KML)'li hastalarda normal sınırlar içinde bulunmuştur. 1984'te Saito (17) tarafından yapılan çalışmada ise AML'li hastalarda eritrosit içi SOD aktivitesi azalmış bulundu. Yine 1984'te Gonzales ve ark. (19) tarafından yapılan diğer bir çalışmada AML ve KLL'li hastalarda eritrosit içi SOD aktiviteleri artmış olarak bulundu. Bizim bulduğumuz sonuçlar KLL açısından Gonzales ve

ark. tarafından bulunan sonuçlara benzemekle beraber, KML'de istatistik olarak anlamlı yükseklik saptayamamış olmamız nedeniyle Pavri tarafından bulunan sonuç ile uyumludur.

Ayrıca hayvan ve insanlarda çeşitli malign tümör hücrelerinde total SOD aktivitesinin bağıl olarak düşük ve Mn SOD aktivitesinin azalmış olduğu ya da hiç bulunmadığı, buna karşılık insan lösemi hücrelerinde Mn SOD aktivitesi yine düşük bulunurken, aksine total SOD aktivitesinin normalden yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (7,9,14,15)

Tüm bu bulgulara dayanarak, tümör hücrelerinde düşük Mn SOD ve CuZn SOD aktivitesi bulunmasının sebebi olarak hızlı büyüyen genç hücrelerdeki SOD sentezinin matürite eksikliği nedeniyle azalmış olmasını düşünebiliriz. Diğer yönden hücrede süperoksit radikali (O_2^-) üretiminin başlıca kompartımanları mitokondrial ve mikrozomal membranlardır. Tümör hücre mitokondrisinde Mn SOD aktivitesi azalması ve buna bağlı tümör hücre mitokondrisinde oluşan süperoksit radikallerinin dismutate edilememesi nedeniyle hücrede radikal hasarı meydana gelmektedir. İlaveten insan lösemik hücrelerinde azalmış Mn SOD aktivitesi, artmış süperoksit üretimi ve artmış CuZn SOD aktivitesi bulunması bize bu süperoksit üretim artışının CuZn SOD azalmasına bağlı olmayıp ya Mn SOD azalması ile ilgili dismutate edilememeye bağlı bir artış olduğunu ya da süperoksit radikallerinin başka bir sebebe bağlı olarak doğrudan arttığını gösterir. Buna dayanarak lösemik blastlardaki CuZn SOD aktivitesi artışının artmış süperoksit üretimini ve azalmış Mn SOD aktivitesini kompanze etmeye yönelik bir davranış olduğunu söyleyebiliriz. Fakat CuZn SOD yüksek iken süperoksit düzeyinin hala yüksek olması bize bu kompenzasyonun tam yapılmadığını düşündürmektedir. Ayrıca lösemide artmış fagositik lökositler ve buna bağlı artmış NADPH Oksidaz aktivitesi nedeniyle respiratory burst denen solunumsal patlamanın artışı ve sonuçta süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^*) ve diğer oksijen türevi serbest radikallerin artışı bize göre oldukça mantıklı bir açıklamadır.

Sonuçta lösemilerde eritrosit membran lipidleri gibi biyolojik membran lipidlerinin peroksidatif hasarı için yeterince sebep bulunmaktadır. Bu nedenle lösemik kemik iliğindeki pluripotent stem cell denen ana hücrelerden oluşan eritrositlerde,

antioksidan savunma mekanizmaları devreye girer. Biz bulduğumuz sonuçların bu durumla oldukça bağlantılı olduğunu ve kronik lösemide bu kemik iliği ana hücrelerinde SOD'a ait gen ekspresyonunun savunma mekanizmasının bir parçası olarak artırıldığını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-9.
2. Lunec J. Free radicals : Their involvement in disease processes. *Review Article. Ann Clin Biochem* 1990; 27: 173-82.
3. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An enzymic function of erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Review Article. Biochem J* 1984; 219: 1-14.
5. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978; 201: 875-80.
6. Pavri RS, Gupta AD, Baxi AJ, Advani SH. Further evidence for oxidative damage to hemoglobin and red cell membrane in leukemia. *Leuk Res* 1983; 7:729-33.
7. Oberley LW. Superoxide dismutase and cancer. In: *Superoxide Dismutase. (Oberley LW ed) CRC Press Florida* 1982; Vol: II : 127-65.
8. Parker MW, Bossa F, Barra D, Bannister WH, Bannister JW. Structural and evolutionary relationships between the eukaryotic superoxide dismutases. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine. (Rotilio G, ed) Rome: Elsevier Science Publishers BV* 1986: 237-45.
9. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res* 1979;39:1141-9.
10. Yoshimitsu K, Kobayashi Y, Usui T. Superoxide dismutase activity in leukemic blasts of children with acute leukemia. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 92-6.
11. Kurata M, Suzuki M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life - span in mammals. *Mini review. Comp Biochem Physiol* 1993; 3: 477-87.
12. Groner Y, et. al. The human Cu, Zn superoxide dismutase gene family : Architecture and expression of the chromosome 21 - encoded functional gene and its related processed pseudogenes. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine. (Rotilio G, ed) Rome.Elsevier Science Publishers BV* 1986; Vol:II : 257-65.
13. Aliakbar S, et. al. Human erythrocyte superoxide dismutase in adults, neonates and normal, hypoxaemic, anaemic and chromosomally abnormal fetuses. *Clin Biochem* 1993; 26: 109-15.

14. Yamanaka N, Ota K, Utsumi K. Changes in superoxide dismutase activities during development, aging and transformation. In: Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen (Hayaishi O, Asada K, eds) Baltimore. University Park Press 1978: 183-90.
15. Yamanaka N, Nishida , Ota K. Increase of superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. *Physiol Chem Phys* 1979; 11: 253-6.
16. Saito T, Kurasaki M, Kaji H, Saito K. Deficiency of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities in patients with malignant lymphoma and acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 1984; 24 :141-6.
17. Gonzales R, Auclair C, Voisin E. et al. Superoxide dismutase , catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1984; 44: 4137-9.
18. Podczasy JJ, Wei R. Reduction of iodinitrotetrazolium violet by superoxide radicals. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 150: 1294-301.

Yazışma adresi :

Öğr.Gör.Dr. İsmail Çetin ÖZTÜRK
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı
44100 MALATYA