

Akut Myeloid Lösemili Hastalarda Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

LIPID PEROXIDATION IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Simten DAĞDAŞ*, Sibel DİNÇER*, Süleyman DİNÇER*, Gülsüm ÖZET*, Meltem AYLI*

* Dr.,Ankara Numune Hastanesi, Hematoloji Kliniği, ANKARA

Özet

Akut myeloid löseminin (AML) tanısında ve hastalığın aktivitesinin belirlenmesinde plazma malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarının rolünü değerlendirmek amacıyla 25 AML, 14 remisyon ve 15 sağlıklı kontrol olgusunda plazma MDA konsantrasyonları tayin edildi. AML olgularında plazma MDA düzeylerinin, remisyon ve sağlıklı kontrol olgularına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Ancak remisyon olgularıyla sağlıklı kontrol olguları arasında plazma MDA düzeyleri açısından belirgin bir fark olmadığı görüldü. Bu nedenle remisyon olarak kabul edilen olguların büyük bir çoğunluğunda minimal rezidüel hastalık olabileceği düşünülürse MDA düzeylerinin akut lösemili hastalarda minimal rezidüel hastalığın tespitinde kullanılamayacağı aşikardır.

Sonuç olarak AML'li olgularda plazma lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığı ve plazma MDA konsantrasyonlarındaki artışların hastalığın aktivitesini gösterebileceği, ancak minimal rezidüel hastalığın tespitinde kullanılamayacağı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut myeloid lösemi, Malondialdehit, Lipid peroksidasyonu

T Klin Tıp Bilimleri 1998, 18:114-118

Summary

The plasma MDA levels were measured in 25 patients with AML, 14 AML patients with remissions and 15 healthy donors, to investigate its role in diagnosis and activation of AML. The plasma MDA levels of patients were found to be significantly higher than remission and control group. But we couldn't find any significant difference between patients with remission and control group. It is accepted that AML patients have minimal residual diseases (MRD) in remission period. Since we couldn't find any difference between remission and control group, plasma MDA levels couldn't be used to show MRD.

As a result, elevation of plasma MDA level might show the AML activation, but plasma MDA measurement couldn't be used to investigate the minimal residual disease.

Key Words: Acute Myeloid Leukemia, Malondialdehit, Lipid Peroxidation

T Klin J Med Sci 1998, 18:114-118

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, birçok hastalığın ve bu arada malignitelerin etiopatogenezinde serbest oksijen radikallerinin önemli rolleri olabileceği konusu üzerinde yoğun bir şekilde durulmaktadır. Biyolojik hasarla karakterize serbest radikal reaksiyonları arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid

peroksidasyonunu başlatarak zincirleme reaksiyonların başlamasına sebep olur. Bu reaksiyonlar sırasında çeşitli toksik ara ürünler ortaya çıkar. Malonaldehit MDA ve diğer aldehitler lipid peroksidasyonunun son ürünlerini oluştururlar (1).

Mikio Miyake ve arkadaşları elektronspin resonance (ESR) spektrometri ile tümör hücreleri tarafından hidroksil radikallerinin yapıldığını göstermişlerdir (2). Bu bulgudan yola çıkarak lösemi hücreleri tarafından yapılan serbest radikaller kontrol mekanizmalarını aşacak kadar artabilir. Serbest radikal reaksiyonların en önemlisi olan lipid peroksidasyon düzeylerini ölçerek akut lösemilerde, hastalığın aktif döneminde yüksek

Geliş Tarihi: 14.12.1996

Yazışma Adresi: Dr.Simten DAGDAŞ
Ankara Numune Hastanesi,
Hematoloji Kliniği, ANKARA

düzeyler, tam remisyon döneminde ise düşük düzeyler tespit edebileceğimizi düşündük. Bu da minimal rezidüel hastalığın tespitinde aracı olabildi.

Bu çalışmada akut myeloid lösemili (AML) hastalarda plazma MDA konsantrasyonlarının ölçümü yapılarak, bu hastalarda lipid peroksidasyon düzeyleri değerlendirildi ve lipid peroksidasyon ölçümlerinin hastalığın aktivitesini göstermedeki muhtemel rolü araştırıldı.

Hastalar ve Yöntem

Kasım 1995-Mart 1996 tarihleri arasında Hematoloji kliniğine baş vuran 25 AML, 14 remisyon AML ve 15 sağlıklı kontrol olgusu bu çalışmaya kabul edildi. AML'li 25 hastanın 18'i yeni tanı konmuş, 3'ü refrakter ve 4'ü relaps AML olgusuydu.

Hiçbir hastaya son 1 ay içinde antilösemik tedavi yapılmamıştı ve hiç birinde enfeksiyonu düşündürülen bulgular mevcut değildi. Hastaların ve kontrol olgularının hepsinde karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, açlık kan şekeri, ürik asit, albumin, total protein, total lipid, kolesterol ve trigliserit düzeyleri normaldi. Bu laboratuvar bulgularında anormallik tespit edilen hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

25 AML olgusunun 18'ine ve 14 Remisyon olgusunun 12'sine flow cytometry ile immün fenotiplendirme yapılmış ve geri kalan 9 hasta klinik, kemik iliği aspirasyon incelemesi ve sitokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. İmmün fenotiplendirme yapılan hastaların FAB sınıflandırmasına göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hasta ve sağlıklı kontrol olgularından EDTA'lı tüplere 5cc kan alındı ve 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmaların tümü yarım saat içinde -20°C'de derin dondurucuya konarak muhafaza edildi. Tüm plazmalar top-

Tablo 1. İmmün fenotiplendirme yapılan AML ve remisyon AML olgularının FAB sınıflamasına göre dağılımı

	AML (n=18)	Remisyon AML (n=12)
M ₁	4	2
M ₂	5	8
M ₃	2	1
M ₄	5	1
M ₅	2	--
M ₆	--	--
M ₇	--	--

landıktan sonra Thiobarbitürik asid (TBA) reaksiyonu aracılığıyla plazma MDA konsantrasyonları tayin edildi (nmol MDA/ml plazma). Plazma MDA düzeylerini ölçmek için 500 mikrolitre plazma alınıp 1 ml thiobarbitürik asid, triklorik asit ve hidroklorik asit ile karıştırıldı. 5 dakika santrifüj edilip süpernatant cam tüplere alındı ve 10 mikrolitre bromohidroksi toluen eklendi. 15 dakika kaynatılan tüpler çeşme suyu ile soğutuldu ve absorbanlar 532 nm'de okundu.

Ayrıca hasta ve kontrol grubunu oluşturan olgulardan tam kan, sedimentasyon, LDH, formül ve rutin biyokimya tetkikleri için kan alındı.

İstatistiksel analizler için Scheffe testi, tek yönlü varyans analizi ve korelasyon analizi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve ± 2 standart sapma olarak verilmiştir.

Bulgular

AML grubunu oluşturan 15 kadın, 10 erkek olmak üzere 25 hastanın yaş ortalaması 38.68 ± 6.86 , remisyon olgularını oluşturan 9'u kadın, 5'i erkek 14 hastanın yaş ortalaması 36.50 ± 6.48 olarak saptandı. Kontrol grubundaki 15 olgunun 8'i kadın, 7'si erkek olup yaş ortalaması 34.53 ± 2.02 idi.

Tablo 2. Ortalama plazma MDA konsantrasyonlarının AML, remisyon ve kontrol olgularına göre dağılımı

	AML (n=25)	Remisyon (n=14)	Kontrol (n=15)
Plazma MDA konsantrasyonları ortalaması	2.55 \pm 3.72	1.23 \pm 1.44	0.55 \pm 0.46
	p<0.05		p>0.05
	p<0.05		

AML'li hastalarda yaş ortalaması kadın hastalarda 37.5 ± 16.0 ve erkek hastalarda 40.5 ± 7.8 idi. Erkek ve kadın hastaların yaş ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ortalama periferik lökosit sayısı bakımından da erkek ve kadın hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla 34.21 ± 56.03 , 47.52 ± 77.67).

Ortalama plazma MDA konsantrasyonlarının AML, remisyon ve sağlıklı kontrol olgularına göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. AML grubunda elde edilen plazma MDA değerleri remisyon grubuna ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p < 0.05$). Buna karşılık remisyon ve sağlıklı kontrol grupları arasında plazma MDA konsantrasyon açısından anlamlı bir fark tespit edilemedi.

AML'li hastalarda plazma MDA konsantrasyonları ölçümünde en düşük değer 0.40 ng/ml ve en yüksek değer 6.97 ng/ml olarak saptanmış olup 1.00 ng/ml'nin altında MDA konsantrasyonu sadece 4 hastada (%16) mevcuttu. Bu grupta 12 hastanın (%48) MDA değeri ise 2.00 ng/ml'nin üzerindeydi. Remisyon olgularında yalnız bir hastada plazma MDA değeri 3.49 ng/ml olarak saptanmış olup, bu hasta 43 yaşında bir bayan hastaydı, 5 ay önce AML (M_1) tanısı konmuştu ve bir aydır remisyondaydı. Bu hastanın sonraki 2 aylık takibinde remisyon hali devam etmekteydi. Remisyondaki diğer 13 olguda plazma MDA değerleri 0.52 ve 1.61 ng/ml arasında değişmişti. Sağlıklı kontrol olgularının tümünde plazma MDA konsantrasyonları 1.00 ng/ml'nin altındaydı ($0.19-0.94$ ng/ml).

Bu çalışmada AML olgularındaki plazma MDA konsantrasyonları kadın hastalarda erkek hastalara göre anlamlı ölçüde daha yüksek olarak değerlendirildi ($p < 0.05$). Kadın hastalardaki ortalama MDA konsantrasyonu 3.29 ± 3.95 ng/ml ve erkek hastalarda 1.43 ± 1.88 ng/ml idi.

Plazma MDA değerleri ile yaş, beyaz küre sayısı, periferik blast yüzdesi ve LDH düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p > 0.05$).

AML olgularında periferik beyaz küre sayısı ile plazma LDH düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki mevcuttu. Beyaz küre sayısı yüksek olan hastalarda plazma LDH düzeyleri belirgin ölçüde daha yüksekti ($p < 0.001$).

AML ve remisyon olguları FAB sınıflandırmasına göre M_1-M_5 arasında dağılmıştı. Çalışmaya katılan hastaların hiç biri M_6 ve M_7 tipi AML'ye sahip değildi. FAB sınıflandırmasına göre hastaların alt gruplarıyla plazma MDA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p < 0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Son günlerde karsinogeneziste oksidatif mekanizmaların rolü konusu üzerinde gittikçe artan bir ilgiyle durulmakta ve bu konuyla ilgili yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bugüne kadar yapılan birçok in vitro çalışmada, tümör hücreleri tarafından serbest oksijen radikalleri yapıldığına dair güvenilir deliller elde edilmiştir (1-5). Mikio Meyake ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro çalışmada değişik farklılaşma evrelerindeki lösemi hücrelerinde serbest oksijen radikal oluşumu gösterilmiş ve lösemik hücre farklılaşması ile serbest radikal üretimi arasında ters bir ilişki olduğu, az farklılaşmış hücrelerde daha fazla oksijen radikali oluştuğu tespit edilmiştir (2).

Tümör hücreleri tarafından kontrolsüz bir şekilde oluşturulan serbest oksijen radikalleri vücuttaki savunma mekanizmalarını aşarak çeşitli lipid peroksidasyon reaksiyonlarının oluşmasına sebep olur ve peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesi sırasında yeni serbest radikal ara ürünler ortaya çıkar. Bunlar ileri derecede reaktif oldukları için çevre dokulara hasar verirler (1). Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden ve en toksik olanlarından biri MDA olduğu için serbest radikal hasarın bir göstergesi olarak kullanılır (4,7-12).

Bu deneysel çalışmalarda elde edilen bulgulardan yola çıkarak AML'li hastalarda, hastalığın aktivitesini belirlemek amacıyla plazma MDA düzeylerinin rolünü araştırmak istedik. Bu nedenle TBA testi aracılığıyla yeni tanı konmuş ve relaps AML olgularıyla, remisyon ve sağlıklı kontrol olgularındaki plazma MDA konsantrasyonlarını değerlendirdik. Yapılan istatistiksel karşılaştırmada AML'li hastalardaki plazma MDA değerleri, remisyon ve kontrol olgularından elde edilen değerlerden anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Buna göre AML olgularında lipid peroksidasyonunun artmış olduğu söylenebilir. Bu bulgu Mikio Miyake ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro çalışmayı

desteklemektedir (2). Böylece plazma MDA konsantrasyonları AML'li hastalarda hastalığın aktivitesini gösterebilir.

Abd-El-Rahman ve Brown tarafından yapılan iki ayrı çalışmada akut lenfoblastik lösemili hastalarda plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur (13,14). Brown ve arkadaşları T hücreli ALL olgularında plazma MDA konsantrasyonlarının diğer ALL olgularına göre daha yüksek olduğunu saptamışlar ve bunun nedeninin T hücreli ALL olgularında periferik lökosit sayısının daha yüksek olmasına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda plazma MDA konsantrasyonlarıyla periferik lökosit sayısı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Bizim çalışma grubumuzda periferik lökosit sayısı $100.000/mm^3$ 'ün üzerinde olan hasta sayısı yalnız 4 kişiydi. Buna karşılık Brown ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada T hücreli ALL vakalarındaki ortalama lökosit sayısının 205.000 olması bu iki çalışmadan elde edilen sonuçlar arasındaki farkı açıklayabilir.

Çalışmamızda remisyon olgularında elde edilen MDA değerleri ile sağlıklı kontrol olgularında elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu bulgu Abd-El-Rahman ve arkadaşlarının akut lenfoblastik lösemi olgularında elde ettikleri sonuçlarla uyumaktadır (14). Remisyon olarak kabul edilen olguların büyük bir çoğunluğunda minimal rezidüel hastalık olabileceği düşünülürse TBA testinin akut lösemili hastalarda minimal rezidüel hastalığın tespitinde kullanılamayacağı aşikardır.

Bu çalışmada kadın hastalarda plazma MDA konsantrasyonu ortalaması erkek hastalara göre anlamlı ölçüde yüksek olarak saptandı. Bu konuyla ilgili olarak literatürde bugüne kadar yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. Östrojenlerin potent antioksidanlar olduğu bilinmektedir (1,5). Bu nedenle kadın ve erkek hastalar arasındaki bu farklılığı hormonal etkilere bağlamak mümkün değildir. Çalışmamızdaki kadın hastalarla erkek hastalar arasında yaş ortalaması, periferik lökosit sayısı ve diğer parametreler açısından da anlamlı bir fark yoktu. Bu konunun ileriki çalışmalarla değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Çalışmamızda MDA konsantrasyonlarını tayin etmek için kullanılan TBA testi, biyolojik sistem-

lerde lipid peroksidasyonu düzeylerini tespit etmek için çok yaygın olarak kullanılan bir testtir. Ancak testin spesifitesi oldukça düşüktür. Serum bilirubin düzeyleri, üremi, sitotoksik ilaçlar (Örn: dokсорubisin, vinkristin) ve enfeksiyonlar gibi çeşitli etkenler test sonuçlarının yüksek çıkmasına neden olabilir (10,14-17). Bu nedenle çalışma grubumuzu oluşturan hastaları seçerken ateş, enfeksiyon, eşlik eden diğer hastalıklar, ilaç kullanımı, bilirubin yükseliği gibi faktörler göz önünde bulundurularak bu özellikleri taşıyan hastalar çalışma grubuna dahil edilmedi. Böylece test sonuçlarının daha güvenilir olması amaçlandı. Beklemiş kanda lipid peroksidasyon ürünlerinin artacağı düşünülerek elde edilen tüm kanlar aynı süre içinde derin dondurucuya ulaştırıldı.

Plazma LDH düzeylerinin lösemilerde artmış hücre turn-over'ı sonucu yükseldiği çok uzun zamandan beri bilinen bir gerçektir. Bu çalışmada da LDH düzeyleriyle periferik lökosit sayısı arasında çok anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir ($p<0.001$). Ancak plazma MDA ve LDH düzeyleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

Sonuç olarak: AML'li hastalarda lipid peroksidasyon düzeylerinin artışıyla birlikte olan yüksek plazma MDA düzeyleri hastalığın aktivitesini göstermekte, ancak minimal rezidüel hastalığın tespitinde yararlı olmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Feher J, Csomos G. Lipid Peroxidation. In: Vereckei A, ed. Free Radical Reactions in Medicine. Berlin: Salodruck Publishing 1987; 1-57.
2. Miyake M, Fuchimoto S. Production of hydroxyl radicals by tumor cells varies with cell type as measured by electron spine resonance spectrometry. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1991; 71; 293-307.
3. Kurtel, H. Granger DN. Vulnerability of intestinal fluid to oxidant stress. Am J Physiol 1992; 263: 573-8.
4. Leroyer V, Werner L. Chemiluminescence and oxygen radical generation by walker carcinoma cells following chemotactic stimulation. Cancer Res 1987; 47: 4771-75.
5. Simic MG, Taylor KA. Introduction to peroxidation. In: Ward JF, ed. Oxygen radicals in biology and Medicine. New York: Plenum Publishing 1988: 1-9.
6. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen derived free radicals. Arch Surg 1991; 126: 104-5.

7. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelişim 1991; 3906-11.
8. Valenzuale A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidative stress. Life Sci 1990; 48: 301-9.
9. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. Br Med Bullet 1993; 49: 523-44.
10. Keizer HG, Pinedo HM. Doxorubicin (Adriamycin): A critical review of free radical - dependent mechanisms of cytotoxicity. Pharmacol Ther 1990; 47: 219-31.
11. Bulkley GB, MD. The role of oxygen free radicals in human disease process. Surgery 1983; 94: 407-11.
12. Drager HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990; 186: 421-31.
13. Brown RE, Alade SL. Lipoperoxidation and T cell Leukemia of childhood, effects of indomethacin. Cancer 1989; 64: 2090-95.
14. Rahman AE, Hammouda MA. Plasma Concentrations of lipid peroxidation products in children with acute lymphoblastic leukemia. Clin Chem 1992; 38: 594-5.
15. Ferenkel K. Carcinogen mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. Pharmacol Ther 1992; 53:127-66.
16. Johnke RM, Roven DP. Marrow antioxidant enzyme activity in tumor-bearing and non-tumor bearing mice following vincristine treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991; 20:369-72.
17. Yamaguchi S, Sakurada S. Role of intracellular SOD in protecting human leukemia and cancer cells against super oxide and radiation. Free Radic Biol Med 1994; 17:389-95.