



Wpływ stresu oksydacyjnego na przebieg kliniczny ostrych białaczek mieloblastycznych

Dariusz Jawniak¹, Renata Jawniak², Magdalena Małek¹, Magdalena Górską¹

¹Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin, ²Klinika Patologii Noworodków, Niemowląt i Kardiologii AM, ul. Chodźki 2, 20-093 Lublin

Rep Pract Oncol Radiother 2004;9:157-60, original paper

Received March 31st, 2004; received in a revised form June 1st, 2004; accepted July 7th, 2004

Streszczenie

Celem pracy było stwierdzenie wpływu potencjału oksydacyjnego, a także aktywności przeciwutleniaczy na przebieg kliniczny ostrych białaczek mieloblastycznych i odpowiedź na chemioterapię.

Materiał i metoda: Grupę badaną stanowiło 12 chorych (7 kobiet i 5 mężczyzn) na ostrą białaczkę mieloblastyczną leczonych w Klinice Hematoonkologii AM w Lublinie. Stężenie MDA w osoczu krwi oznaczono metodą fluorymetryczną, natomiast aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationu (GPx) we krwi pełnej oznaczono metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynników Randox.

Wyniki: Czas przeżycia w grupie chorych z małą aktywnością GPx (<5.0U/ml) był statystycznie istotnie dłuższy niż w grupie z dużą aktywnością GPx (15.71 ± 9.8 vs 5.8 ± 3.68 miesiąca).

U chorych z hepatosplenomegalią stwierdzono statystycznie znikomą aktywność SOD 52.0 vs 95.12U/ml w grupie bez hepatosplenomegalii.

Wniosek: Nowy stan równowagi poszczególnych mechanizmów obronnych układu oksydoredukcyjnego, wynikający z obecności ostrej proliferacji może modulować przebieg kliniczny ostrych białaczek i warunkować efektywność chemioterapii.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, ostre białaczki mieloblastyczne, GPx, SOD, MDA.

The role of oxydative stress in the course of acute myeloblastic leukaemias

Summary

The aim of the study was to evaluate the influence of oxidative potential and activity of antioxidants on the course and chemotherapy response in acute nonlymphoblastic leukaemias.

Material and methods: Twelve adult patients (7 women, 5 men) with acute nonlymphoblastic leukaemia treated at the Department of Hematooncology University Medical School in Lublin, were studied. Plasma concentration of malondialdehyde (MDA) was determined using fluorimetric assay. Activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were assessed in the whole blood using colorimetric assay with Randox reagents.

Results: The overall survival in the group of patients with a low activity of GPx (< 5.0 U/ml) was significantly longer than that in patients with a high activity of GPx (15.71 ± 9.8 vs 5.8 ± 3.68 month). Patients with hepatosplenomegaly were characterized by a significantly lower activity of SOD (52.0 U/ml) compared to patients without hepatosplenomegaly (95.12 U/ml).

Conclusion: The state of the new balance between different defence mechanisms of an oxidation-reduction system, resulting from the presence of acute proliferation, may modulate the course of acute leukaemias and influence the response to chemotherapy.

Key words: oxidative stress, acute nonlymphoblastic leukemia, GPx, SOD, MDA.

Wstęp

Zaburzenie równowagi między nasileniem procesów oksydacyjnych, wiodących do powstania reaktywnych form tlenu i przeciwdziałającemu ich aktywności systemowi antyoksydacyjnemu komórki, z przewagą reakcji utleniania, prowadzi do stresu oksydacyjnego. Obecność bardzo aktywnych związków o dużym potencjale utleniającym prowadzi do szeregu niekorzystnych reakcji chemicznych, w wyniku których dochodzi do uszkodzenia aparatu genetycznego komórki, białek strukturalnych oraz enzymatycznych. Znane są doniesienia o większej aktywności wolnych rodników tlenowych w procesach nowotworowych dotyczących skóry, pęcherza moczowego, żołądka, jelita grubego i kości. U podłoża niektórych z wymienionych nowotworów leżą przewlekłe zmiany zapalne z karcynogennym działaniem wolnych rodników tlenowych, tworzonych w mechanizmie obronnym przez granulocyty obojętnochłonne. Jednocześnie obserwowane jest zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za inaktywację wolnych rodników tlenowych np. dysmutazy nadtlenkowej (SOD), katalazy, peroksydazy glutationowej (GPx). Znane z literatury mechanizmy nowotworzenia, u podłoża których leży stres oksydacyjny to mutacje strukturalne DNA, mutacje genów cyklu komórkowego oraz dysfunkcja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania informacji [1]. W wyniku reakcji reaktywnych form tlenu z kwasami nukleinowymi dochodzi do pęknięcia nici kwasu dezoksyrybonukleinowego oraz modyfikacji sekwencji zasad. Uszkodzony przez wolne rodniki DNA jest silnie immunogeny. Pęknięcia DNA są odpowiedzialne za zahamowanie replikacji i mogą być przyczyną śmierci komórki lub mutacji. Inna hipoteza dotycząca uszkodzenia kwasów nukleinowych przez reaktywne formy tlenu opiera się na stymulacji aktywności endonukleaz, co prowadzi do fragmentacji nici DNA [2]. Punktową mutację genu p-53- najbardziej znanego przedstawiciela genów supresji nowotworów, spowodowaną wolnymi rodnikami zawartymi w karcynogenach dymu tytoniowego, opisano u chorych na raka płuca [3]. Podobne zmiany w genomie opisano w odniesieniu do nowotworów skóry i jelita grubego w przypadku narażenia na wolne rodniki indukowane promieniami ultrafioletowymi [4]. Z drugiej jednak strony postuluje się także prokarcynogenną rolę nadmiernej aktywnej obrony antyoksydacyjnej, która może przeciwdziałać, indukowanemu przez wolne rodniki, mechanizmowi apoptozy komórek stransformowanych nowotworowo [5]. Wydaje się więc, że zachwianie równowagi oksydacyjnej może powodować powstawanie nowotworów, ale też i wpływać na skuteczność leczenia przeciwnowotworowego.

Do oceny stopnia nasilenia reakcji wolnorodnikowych można wykorzystać określenie stężenia we krwi obwodowej malonyldialdehydu (MDA), który jest produktem peroksydacji lipidów. Natomiast nasilenie reakcji antyoksydacyjnych oddaje aktywność enzymów antyoksydacyjnych

we krwi obwodowej, takich jak dysmutaza nadtlenkowa (SOD) czy peroksydaza glutationu (GPx).

Cel pracy

Celem pracy było badanie związku między poszczególnymi składowymi równowagi oksydoredukcyjnej organizmu i klinicznym przebiegiem ostrej białaczki mieloblastycznej oraz odpowiedzią na chemioterapię indukującą remisję.

Materiał i metoda

Grupę badaną stanowiło 12 chorych (7 kobiet i 5 mężczyzn) na ostrą białaczkę mieloblastyczną, leczonych w Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku AM w Lublinie. Rozpoznanie ustalono na podstawie badań morfologicznych, cytochemicznych i immunofenotypowych komórek blastycznych. W grupie badanej znalazło się 2 chorych na białaczkę mieloblastyczną z dojrzewaniem wg FAB (MLA M2) - co stanowi 16.6% badanej grupy, 3 chorych na białaczkę promielocytową (MLA M3) - 25%, 6 chorych na białaczkę mielomonocytową (MLA M4) - 50% i 1 chory na białaczkę monocytową (MLA M5) - 8.3%. Średnia wieku wynosiła 49.6 ± 15.2 lat (min-max: 27-74). Stężenie hemoglobiny wahało się od 6.0 do 11.2 g/dl (śr. 9.06 ± 1.53 g/dl). Liczba erytrocytów wynosiła od 1.9 do 3.48 T/l (śr. 2.72 ± 0.59 T/l), natomiast liczba leukocytów od 1.1 do 171.0 G/l (śr. 23.85 ± 47.98 G/l). Z kolei liczba płytek krwi wahała się od 4.0 do 122.0 G/l (śr. 40.41 ± 37.08 G/l). U 8/12 chorych (66.66%) uzyskano całkowitą remisję hematologiczną po jednym kursie standardowej chemioterapii indukującej. Jako grupę porównawczą posłużyli chorzy w okresie regeneracji szpiku po chemioterapii. Stężenie malonyldialdehydu (MDA) w osoczu krwi oznaczono metodą fluorymetryczną w oparciu o reakcję Yagi's. Wyniki wyrażono w nmol/ml. Oznaczenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej (SOD) wykonano we krwi pełnej metodą kolorymetryczną przy pomocy zestawu Ransod firmy Randox. Wyniki wyrażono w U/ml. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) wykonano we krwi pełnej przy pomocy zestawu Ransel firmy Randox. Zastosowano metodę wg Paglia i Valentine. Wyniki wyrażono w U/ml.

Wyniki

Stężenie malonyldialdehydu (MDA) we krwi chorych wahało się w granicach 1.16-5.28 nmol/ml; średnio 3.36 ± 1.29 . Stężenie to we krwi u chorych z aktywną chorobą było istotnie statystycznie większe w porównaniu ze stężeniem u chorych poddanych chemioterapii indukującej remisję (3.36 nmol/ml ± 1.29 vs. 2.6 nmol/ml ± 0.82 ; $p=0.02$). Ponadto stężenie tego związku pozostawało większe u chorych, u których nie osiągnięto remisji hematologicznej po leczeniu indukującym w porównaniu do cho-

rych z całkowitą remisją hematologiczną po chemioterapii ($2.90 \text{ nmol/ml} \pm 0.86$ vs. $2.46 \text{ nmol/ml} \pm 0.82$). Nie stwierdzono jednak istotności statystycznej. Stwierdzono znaczące różnice stężenia tego związku u chorych z różnymi podtypami ostrych białaczek mieloblastycznych. Największe jego stężenie obserwowano w podtypie MLA M5 (4.75 nmol/ml), natomiast najmniejsze w podtypie MLA M4 (3.09 nmol/ml). Nie obserwowano natomiast korelacji między stężeniem tego związku we krwi i aktywnością białaczki czy zaawansowaniem zmian narządowych.

Odmienne zachowywała się aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Zanotowano ujemną korelację między liczbą krwinek białych we krwi chorych a aktywnością tego enzymu we krwi ($R \text{ Spearman} = -0.65$; $p = 0.02$). U chorych z powiększeniem wątroby i śledziony w przebiegu ostrej białaczki także stwierdzono statystycznie znamiennej mniejszą aktywność SOD 52.0 vs. 95.12 U/ml w grupie bez hepatosplenomegalii. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic aktywności tego enzymu w zależności od odsetka komórek blastycznych w szpiku czy stopnia powiększenia węzłów chłonnych. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oceniana w okresie aktywnej choroby nowotworowej, przed chemioterapią była większa niż w okresie regeneracji szpiku ($84.6 \pm 33.5 \text{ U/ml}$ vs. $75.33 \pm 19.43 \text{ U/ml}$), nie była to jednak różnica istotna statystycznie.

Na podstawie przeprowadzonych badań, zaobserwowano zależność czasu całkowitego przeżycia, a także czasu przeżycia wolnego od objawów choroby od aktywności peroksydazy glutationu we krwi chorych. Stwierdzono zatem statystycznie istotny dłuższy całkowity czas przeżycia w grupie chorych ze stężeniem GPx poniżej 5.0 U/ml , który wynosił 15.71 ± 9.8 miesięcy. W grupie chorych ze stężeniem GPx powyżej 5.0 U/ml czas przeżycia wynosił 5.8 ± 3.68 miesięcy. Podobną zależność odnotowano w stosunku do ocenianego czasu przeżycia wolnego od choroby. W grupie chorych z małą ($< 5.0 \text{ U/ml}$) aktywnością GPx aż w 80% przypadków uzyskano remisję całkowitą po pierwszym kursie chemioterapii, natomiast w grupie z większą aktywnością GPx ten odsetek wyniósł tylko 57.

Dyskusja

Według wielu autorów stężenie MDA u pacjentów z chorobą nowotworową ulega zwiększeniu. Zarówno u dzieci Yazdanpanah i wsp. [6] jak i w populacji ludzi dorosłych de Cavanagh i wsp. [7]. Oltra i wsp. [8] stwierdzili podwyższone stężenie aldehydu u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową, natomiast Guven i wsp. podobne wyniki uzyskali w grupie chorych na chorobę Hodgkina [9]. W materiale własnym stężenie MDA także było znamienne większe w grupie chorych z aktywną proliferacją przed wdrożeniem leczenia niż w porównywalnej grupie chorych po leczeniu indukującym remisję. Badania powyższe zdają się potwierdzać teorię o zwiększonej produkcji reaktywnych

form tlenu u chorych na choroby nowotworowe, a co się z tym wiąże reakcję wolnych rodników z kwasami nukleinowymi i większym narażeniem na mutację. Nieliczne doniesienia wskazują na wpływ chemioterapii na zwiększenie produktów utleniania lipidów. Według Devi i wsp. [10] u chorych na ostrą białaczkę nie poddanych chemioterapii nie stwierdzono zwiększonego stężenia malonyldialdehydu w porównaniu z grupą kontrolną. W materiale własnym stwierdzono ponadto statystycznie istotne różnice pomiędzy poszczególnymi typami białaczki wg klasyfikacji FAB. Jednak ze względu na niewielką liczebność badanej grupy stwierdzone najwyższe stężenie MDA w MLA M5 i najniższe w MLA M4 należy potraktować jako wstępne.

W badaniach Devi i wsp. stwierdzono istotny wzrost aktywności SOD wostrej białaczelimfoblastycznej i mieloblastycznej, natomiast nieco mniejszy wzrost u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową [10]. Z kolei badania Gonzalesa i wsp. wykazały najwyższą aktywność SOD u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową, niższą u chorych na chorobę Hodgkina i ostre białaczki [11]. W materiale własnym aktywność tego enzymu była znamiennej większa u chorych przed wdrożeniem chemioterapii i ulegała zmniejszeniu w czasie regeneracji szpiku po leczeniu, bez dysproporcji między grupą chorych z remisją całkowitą i bez uzyskanej remisji. Zaobserwowano natomiast związek między aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej a liczbą krwinek białych we krwi oraz wielkością wątroby i śledziony w czasie ustalania rozpoznania u badanych chorych. Małą aktywność SOD obserwowano w grupie chorych z większą leukocytozą i hepatosplenomegalia, aktywność ta była także mniejsza w porównaniu do aktywności tego enzymu u chorych po zakończeniu chemioterapii. Można więc przypuszczać o roli dysmutazy ponadtlenkowej w ograniczaniu proliferacji komórek białaczkowych i infiltracji narządów pozaszpikowych. Obserwowaną przez wielu autorów podwyższoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w przebiegu chorób nowotworowych, zdaje się potwierdzać również fakt większej zachorowalności na ostre białaczki chorych z trisomią 21 chromosomu, na którym zlokalizowany jest gen kodujący SOD, co powoduje zwiększenie o połowę aktywności SOD [12, 13].

Ocena aktywności peroksydazy glutationu wykazała statystycznie istotne wydłużenie czasu przeżycia w grupie chorych ze stężeniem GPx poniżej 5.0 U/ml w stosunku do chorych z wyższą aktywnością GPx (odpowiednio wynosił 15.71 ± 9.8 miesięcy vs 5.8 ± 3.68 miesięcy). W badanej przez nas grupie chorych stwierdzono podobną zależność pomiędzy aktywnością GPx a czasem przeżycia wolnym od choroby. W grupie chorych z małą ($< 5.0 \text{ U/ml}$) aktywnością GPx aż w 80% przypadków uzyskano remisję całkowitą po pierwszym kursie chemioterapii, natomiast w grupie z większą aktywnością GPx ten odsetek wyniósł tylko 57. Można więc mówić o prognostycznej roli tego enzymu u chorych na ostre białaczki mieloblastyczne. Zbyt duża aktywność GPx może skutecznie osłabić potencjał

oksydacyjny wyzwalany przez leki przeciwnowotworowe i w tym mechanizmie zmniejszać wrażliwość na chemioterapię.

Obniżenie aktywności peroksydazy glutationu u chorych na chorobę nowotworową w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowali także inni autorzy [14], zgodnie z hipotezą według której nadprodukcja reaktywnych form tlenu w komórkach zmienionych nowotworowo hamuje transkrypcję genów enzymów antyoksydacyjnych, co zwiększa ich wrażliwość na działanie wolnych rodników i w konsekwencji prowadzi do apoptozy. Z drugiej jednak strony istnieją badania potwierdzające zwiększoną aktywność GPx u chorych na chorobę nowotworową [15] lub brak zmian aktywności tego enzymu u pacjentów chorych na różne typy białaczek [10]. Dłuższy czas przeżycia, a także większy odsetek uzyskania całkowitej remisji w grupie chorych z niższą aktywnością GPx potwierdzać może teoria, zgodnie z którą obniżona aktywność enzymów antyoksydacyjnych, odpowiedzialna za słabszą obronę zmienionej nowotworowo komórki przed produktami peroksydacji lipidów, zwiększa skuteczność terapeutyczną leków cytostatycznych indukujących apoptozę [16].

Wnioski

Elementy układu oksydoredukcyjnego w warunkach ostrej białaczki mieloblastycznej wykazują zwiększoną aktywność zmierzającą do przeciwdziałania skutkom zarówno proliferacji jak i chemioterapii.

Nowy stan równowagi poszczególnych mechanizmów obronnych może modulować przebieg kliniczny ostrych białaczek i warunkować efektywność chemioterapii.

Piśmiennictwo

1. Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 1994;344: 8623.
2. Von Sonntag C. The chemical basis of radiation biology. Taylor and Francis, London, 1987.
3. Takahasi T, Naum M, Chiba I. P 53 a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-4.
4. Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka M, Honda M, et al. Impaired antioxidant defence system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *J Surg Res* 2002;102:144-9.
5. Briehl MM, Baker AF, Siemankowski LM, Morreale J. Modulation of antioxidant defenses during apoptosis. *Oncol Res* 1997;9:281-5.
6. Yazdanpanah M, Luo X, Lau R, Greenberg M, Fisher LJ, Lehotay DC. Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free Radical Biol Med* 1997;23:870-8.
7. de Cavanagh EM, Honegger AE, Hofer E, Bordenave RH, Bullorsky EO, Chasseing NA, et al. Fraga Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients. *Cancer* 2002;94:3247-51.
8. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-OXO-DG in chronic lymphocytic leukemia; *Free Radical Biol Med* 2001; 30:1286-92.
9. Guven M, Oztruk B, Sayal A, Ozet A. Lipid Peroxidation and Antioxidant System in the Blood of Patients with Hodgkin's Disease. *Clin Biochem* 2000;33:209-12.
10. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* 2000;293:53-62.
11. Gonzales R, Auclair C, Vosin E, Gautero H, Dhermy D, Bovin P. Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignant Diseases. *Cancer Res* 1984;44:4137-9.
12. Buseiglio J, Yanker BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995;378:776-9.
13. De La Torre R, Casado A, Lopez- Fernandez E, Carrasocosa D, Ramirez V, Saez J. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia* 1996;52:871-3.
14. Balcerska A, Stachowicz-Stencel T, Łysiak-Szydtowska W. Dynamika przebiegu choroby nowotworowej a stan bariery antyoksydacyjnej ustroju. *Wiad Lek* 2000;53:128-33.
15. Szczypka M, Gajewska J, Laskowska-Klita T, Perek D. Obrona przeciwutleniająca u dzieci z chorobą nowotworową. Cz II. Enzymy przeciwutleniające oraz peroksydacja lipidów krwinkach czerwonych. *Ped Pol* 1995;11:911-4.
16. Black SM, Wolf CR. The role of glutathione dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol Ther* 1991;51:139-54.