

ISPITIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DIZMUTAZE, KATALAZE I GLUTATION PEROKSIDAZE U PLAZMI I LIZATIMA LIMFOCITA OBOLELIH OD HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE

Milan Zarić¹, Marina Mitrović¹, Ivana Nikolić¹, Suzana Popović², Predrag Đurđević³, Dejan Baskić², Ivanka Zelen¹

¹Katedra biohemije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

²Katedra mikrobiologije i imunologije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

³Katedra interne medicine, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN PLASMA AND LYSATES OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS

Milan Zarić¹, Marina Mitrović¹, Ivana Nikolić¹, Suzana Popović², Predrag Djurdjević³, Dejan Baskić², Ivanka Zelen¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia

²Katedra Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia

³Katedra Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Hronična limfocitna leukemija karakteriše se akumulacijom funkcionalno nezrelih limfocita usled inhibicije apoptoze. Oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi velikog broja oboljenja i u samoj kancerogenezi. Cilj našeg istraživanja je ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u plazmi i lizatima limfocita pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije. U studiju je bio uključen 51 bolesnik oboleo od hronične limfocitne leukemije. Oni su klasifikovani na osnovu stadijuma bolesti po Rai-u na dve grupe ispitanika, tako što su grupu A činili oboleli koji su se nalazili u nultom i prvom stadijumu bolesti, a grupu B pacijenti u drugom, trećem i četvrtom stadijumu bolesti. Grupi C je činila kontrolna grupa od 32 zdrava ispitanika. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je aktivnost katalaze statistički znatno povišena u plazmi bolesnika grupe B, dok aktivnost superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze nije statistički znatno izmenjena u odnosu na kontrolnu grupu. U lizatima limfocita postoji pad aktivnosti enzima prve linije odbrane, superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze. Pad aktivnosti antioksidativnih enzima u lizatima limfocita najizraženiji je kod obolelih u kasnom stadijumu bolesti, a nešto manje je izražen u grupi sa neprogresivnom bolešću.

Cljučne reči: leukemija limfocitna hronična B-ćelije, katalaza, superoksid dizmutaza, glutation peroksidaza, plazma.

UVOD

Hronična limfocitna leukemija (chronic lymphocytic leukemia – CLL) je maligna bolest hematopoeznog tkiva koja nastaje proliferacijom i akumulacijom malih, naizgled zrelih, imunološki nekompetentnih, dugoživećih limfocita u kostnoj srži, limfnim nodusima, slezini i drugim organima (1).

Slobodni radikali kiseonika su intermedijerni proizvodi nepotpune redukcije kiseonika u ćeliji. Njihova

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia is characterized by the progressive accumulation of immature lymphocytes due to inhibited apoptosis. Oxidative stress has a significant role in the pathogenesis of diseases as well as in cancerogenesis itself. The aim of this research was to determine the activity of antioxidative enzymes in blood plasma and in lymphocyte lysates of chronic lymphocytic leukemia patients. Fifty-one patients were divided into two groups according to Rai classification. Group A consisted of patients in stage 0 and stage I and group B consisted of stage II, III and IV patients. Group C consisted of 32 healthy individuals. Enzyme activities of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in lymphocyte lysates of group B patients showed statistically significant decrease. Enzyme activity of catalase in group B patients' blood plasma showed statistically significant increase. Enzyme activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase of group B patients' blood plasma showed no statistically significant changes.

Key words: leukemia, lymphocytic, chronic, b-cell, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, plasma.

produkcija je u fiziološkim uslovima kontrolisana, a sama ćelija poseduje enzimske i neenzimske sisteme odbrane od slobodnih radikala. Glavni antioksidativni enzimi kojima ćelija neutrališe slobodne radikale kiseonika jesu superoksid dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT). U uslovima nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala njihova količina može da prevaziđe antioksidativni kapacitet ćelije i tada nastaje oksidativni stres. Danas se smatra da oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi velikog broja oboljenja, kao i u samoj kancerogenezi (2).

Stoga je cilj našeg istraživanja bio da se odrede aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima u plazmi i

lizatima limfocita pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje predstavlja komparativnu kliničko-eksperimentalnu studiju tokom koje su upoređivani testirani parametri ispitanicima eksperimentalne i kontrolne grupe. U studiju je bio uključen 51 obolelo od hronične limfocitne leukemije kojima je dijagnoza utvrđena na osnovu kliničkih, laboratorijskih i imunofenotipskih parametara. Ispitanici eksperimentalne grupe podeljeni su u dve osnovne grupe:

A) – grupa obolelih od CLL sa neprogresivnim tokom bolesti, odnosno ispitanici koji se nalaze u nultom (3) i prvom (3) stadijumu bolesti po Raiju (4,5); dalje u tekstu označeno kao *rani stadijum*. Grupu je sačinjavalo 30 bolesnika, i to 16 muškarca i 14 žena prosečne starosti 68,7 godina (od 54 do 82 godine).

B) – grupa obolelih od CLL koji se trenutno leče nekim od modaliteta antineoplastične hemioterapije, a nalaze se u drugom (6), trećem (7) i četvrtom (8) stadijumu bolesti (označeno kao *kasni stadijum*). Grupu je sačinjavao 21 bolesnik (13 muškaraca i 8 žena) prosečne starosti 64,6 godina (od 51 do 78 godina).

C) – kontrolnu grupu je sačinjavalo 32 zdrava ispitanika odgovarajuće polne i starosne strukture (17 muškaraca i 15 žena prosečne starosti 65,3 godine, od 49 do 80 godina).

U istraživanje nisu bili uključeni ispitanici koji:

1) imaju pozitivne biohumoralne markere zapaljenskog sindroma (povišene vrednosti sedimentacije eritrocita, fibrinogena i C-reaktivnog proteina);

2) koji boluju od bolesti ili stanja koje bi mogle da utiču na vrednosti ispitivanih parametara (kardiovaskularne bolesti, metabolički poremećaji, neurološke bolesti i dr);

3) imaju pozitivnu anamnezu o korišćenju medikamentata (kortikosteroidi, ciklosporin A i dr.) koji mogu da utiču na vrednosti ispitivanih parametara i

4) pušači, osobe koje često zloupotrebljavaju alkohol, kao i osobe koje su imale neuobičajene fizičke aktivnosti dan pre određivanja testiranih parametara.

Ispitanicima svih ispitivanih grupa venepunkcijom je uzimano 10 mL heparinizovane (50 ij/mL) periferne krvi i posle centrifugiranja izdvajana je plazma koja je podeljena u odgovarajuće alikvote. Odmah po izdvajanju, plazma je zamrzavana i uzorci su čuvani na -80°C do izvođenja studije.

Takođe, ispitanicima svih ispitivanih grupa iz periferne venske krvi izolovani su limfociti. Limfociti su zatim oprani tri puta u medijumu RPMI 1640 (Sigma, Nemačka), napravljena je suspenzija ćelija poznatog broja

ćelija/mL u dejonizovanoj vodi i ti uzorci su čuvani zaleđeni. Limfociti su lizirani neposredno pre određivanja enzimske aktivnosti postupkom odmrzavanja i zamrzavanja na -20°C , koji je ponavljan tri puta.

Izolacija ćelija

Ćelije korišćene u ovom radu izolovane su iz periferne krvi bolesnika obolelih od hronične limfocitne leukemije i zdravih ispitanika na osnovu različitih gustinskih svojstava i sposobnosti adhezije monocita na staklo ili plastiku.

Izdvajanje mononuklearnih ćelija

Mononuklearni leukociti dobijani su iz venske krvi, prema široko korišćenoj metodi Bojma (*Boyum*) (9, 10). Uzimano je 10mL krvi u heparinizovane plastične brizgalice (50 ij. heparina po 1mL krvi). Krv je prenetu u epruvete (12mL) i centrifugirana 10 minuta brzinom 400xg na sobnoj temperaturi (*Yanetzci T23*). Plazma i sloj leukocita, iznad staloženih eritrocita, Pasterovom pipetom preneti su na limfoprep (*Lymphoprep, Nicomed Pharma AS, Oslo, Norway*) i centrifugirani 20 minuta brzinom 800xg na sobnoj temperaturi.

Pasterovom pipetom pokupljeni mononuklearni leukociti (izdvojeni u sloju na granici plazme i limfoprepa), suspendovani su u medijumu *Haemacel* (*Haemacel, Jugoremedija, Zrenjanin*), kome je dodato 200ij./mL penicilina (*Jugocillin, Galenika, Zemun*) i 200mg/mL streptomocina (*Streptomycin, Galenika, Zemun*). Ćelije su prane tri puta po pet minuta centrifugiranjem u istom medijumu brzinom 400xg na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je resuspendovan u medijumu i u suspenziji je određivana njihova vijabilnost i kontaminacija polimorfonuklearnim leukocitima.

Izdvajanje limfocita

Monociti su izolovani iz mononuklearne suspenzije, dobijene na već opisani način, zahvaljujući sposobnosti monocit/makrofaga da adheriraju na staklo ili plastiku po metodi Kenedija i Rejnoldsa (*Kennedy & Reynolds*) (11). Suspenzija mononuklearnih leukocita centrifugirana je 10 minuta brzinom 400xg na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je resuspendovan u 5mL medijuma *RPMI 1640*, kome je dodato 200ij./mL penicilina, 200mg/mL streptomocina i 0,05mL/mL fetalnog telećeg seruma (*Heat-inactivated Foetal Bovine Serum - FBS, Sigma, Nemačka*), a zatim Pasterovom pipetom prenet u Petrijevu šolju (78,5cm² *Petri dishes, Miles Laboratories, Neperville*), prethodno obloženu FBS-om, a potom je sve inkubirano 1 sat na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Po završenoj inkubaciji, sadržaj Petri šolje (neadherisale ćelije-limfociti) je odliven i u suspenziji limfocita je određivan

njihov broj i vijabilnost, kao i kontaminacija monocit/makrofagnim ćelijama.

Metoda za određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze

Aktivnost superoksid dizmutaze (E.C. 1.15.1.1) određivana je spektrofotometrijski korišćenjem *RANSOD* (*Randox*) kita (12). Reakcija se zasniva na prevođenju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorida (INT) u formazan pod dejstvom superoksid anjon radikala (O_2^*). Superoksid anjon radikal nastaje u reakciji prevođenja ksantina u mokraćnu kiselinu pod dejstvom ksantin oksidaze. Aktivnost superoksid dizmutaze meri se spektrofotometrijski, na 505nm, kao stepen inhibicije reakcije prevođenja INT u formazan. Jedinica aktivnosti superoksid dizmutaze definisana je kao količina enzima koja uzrokuje inhibiciju ove reakcije za 50% u odgovarajućim uslovima. Aktivnost superoksid dizmutaze izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama (U/mL) ili kao aktivnost enzima izražena na broj ćelija ($U/20 \times 10^6$ Ly).

Metoda za određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost seleno-zavisne glutation peroksidaze (E.C. 1.11.1.9) određivana je spektrofotometrijski korišćenjem *RANSEL* (*Randox*) kita. Ova spektrofotometrijska metoda zasniva se na metodi Palje i Valentina (Paglia & Valentine, 1974) (13). Peroksidaza prevodi kumen-hidroperoksid u odgovarajući alkohol, pri čemu se specifični doner vodonika, redukovani glutation, GSH prevodi u glutation disulfid, GSSG. U spregnutoj reakciji, koju katališe glutation reduktaza, glutation disulfid se u prisustvu $NADPH^+$ kao kofaktora prevodi u redukovani glutation. Oksidacija $NADPH$ u $NADP^+$ se prati spektrofotometrijski, kao smanjenje apsorbanije na 340nm i predstavlja meru aktivnosti glutation peroksidaze.

Jedinica aktivnosti glutation peroksidaze definisana je kao količina enzima koja uzrokuje oksidaciju 1 nmol/L $NADPH$ u minutu u prisustvu supstrata. Aktivnost glutation peroksidaze izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama (U/mL), ili kao aktivnost enzima izražena na broj ćelija ($U/1 \times 10^6$ Ly).

Metoda za određivanje aktivnosti katalaze

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (E.C. 1.11.1.6) korišćena je metoda Got-a (Goth, 1991) (14). Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) bazira se na reakciji prevođenja dva molekula vodonik-peroksida u vodu i molekularni kiseonik pod uticajem katalaze:



Katalaza razlaže vodonik-peroksid kao supstrat. Polazeći od pretpostavke da je aktivnost katalaze proporcionalna količini utrošenog vodonik-peroksida u jedinici vremena (min), razlika u sadržaju vodonik-peroksida u reakcionoj mešavini pre dodavanja enzima i posle toga predstavlja meru enzimske (katalazne) aktivnosti. Koncentracija vodonik-peroksida određuje se spektrofotometrijski u prisustvu amonijum molibdata. Vodonik-peroksid sa amonijum molibdatom gradi žuto obojeno, stabilno, kompleksno jedinjenje čija se apsorbanca određuje na talasnoj dužini od 405 nm. Količina utrošenog vodonik-peroksida data je kao razlika u koncentraciji vodonik-peroksida u reakcionoj mešavini pre dodavanja enzima i posle toga. Jedinica katalazne aktivnosti definisana je kao količina enzima koja katališe $1 \text{ } \mu\text{mol}$ supstrata za minut pod standardnim uslovima. Aktivnost katalaze izražena je kao aktivnost enzima izražena brojem jedinica (U/mL) ili kao aktivnost enzima izražena na broj ćelija ($U/1 \times 10^6$ Ly).

Statistička analiza

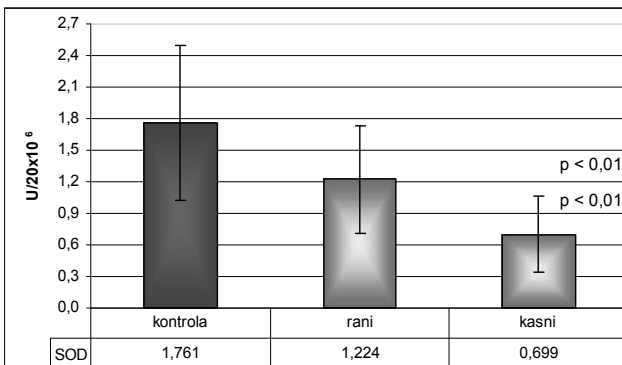
Prilikom testiranja hipoteze primenjivani su testovi za numerička obeležja posmatranja i analizu učestalosti (frekvencija) kategorijalnih varijabli. Pre testiranja numeričkih varijabli proveravan je tip distribucije. Normalnost raspodele podataka ispitivana je Kolmogorov-Smirnov testom. Kod normalne raspodele podataka primenjivan je Studentov t-test i analiza varijanse (*ANOVA*), a u neparametrijskoj statistici (raspodela podataka nije normalna) *Mann Whitney U*-test. U svim slučajevima testiranja hipoteze, verovatnoća nulte hipoteze bila je $p \geq 0,05$.

REZULTATI

Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u lizatima limfocita

Određivanjem aktivnosti superoksid dizmutaze u lizatima limfocita pokazano je da je najviša aktivnost superoksid dizmutaze zabeležena kod ispitanika kontrolne grupe ($1,761 \pm 0,741 U/20 \times 10^6$ Ly), dok su kod obolelih od hronične limfocitne leukemije te vrednosti statistički znatno niže.

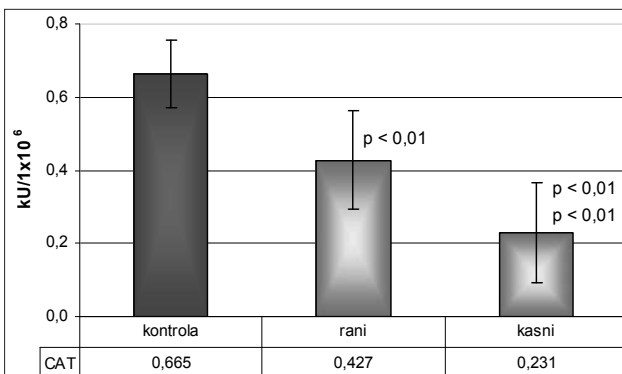
Aktivnost superoksid dizmutaze u grupi ispitanika koji su u ranom stadijumu CLL je $1,224 \pm 0,511 U/20 \times 10^6$ Ly, a u grupi ispitanika koji su u kasnom stadijumu CLL je $0,699 \pm 0,363 U/20 \times 10^6$ Ly. Statistički značajne razlike u vrednosti posmatranog parametra zabeležene su između kontrolne grupe i grupe ispitanika koji su u kasnom stadijumu hronične limfocitne leukemije ($p < 0,01$), kao i između grupe ispitanika koji su u ranom stadijumu bolesti u odnosu na kasni stadijum ($p < 0,01$) (slika 1).



Slika 1. Aktivnost superoksid dizmutaze u lizatima limfocita
Tokom istraživanja zabeležena je najviša aktivnost superoksid dizmutaze kod ispitanika kontrolne grupe, dok su u grupi obolelih od CLL te vrednosti znatno niže. Kontrola vs kasni stadijum ($1,761 \pm 0,741$ U/20 x 10⁶ Ly vs $0,699 \pm 0,363$ U/20 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$). Rani vs kasni stadijum ($1,224 \pm 0,511$ U/20 x 10⁶ Ly vs $0,699 \pm 0,363$ U/20 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$) na osnovu Kruskal–Wallis analize. Kao mera centralne tendencije određivana je i medijana: za kontrolnu grupu $Me = 1,569$, rani stadijum $Me = 1,260$ i kasni stadijum $Me = 0,620$

Određivanje aktivnosti katalaze u lizatima limfocita

Tokom ispitivanja antioksidativnog kapaciteta kod obolelih od hronične limfocitne leukemije, određivana je i aktivnost katalaze. Aktivnost katalaze u lizatima limfocita je najveća u kontrolnoj grupi u odnosu na grupe obolelih od hronične limfocitne leukemije sa statistički značajnim međugrupnim razlikama (kontrola vs rani stadijum, $0,665 \pm 0,092$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,427 \pm 0,135$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$; kontrola vs kasni stadijum, $0,665 \pm 0,092$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,231 \pm 0,137$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$; rani stadijum vs kasni stadijum, $0,427 \pm 0,135$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,231 \pm 0,137$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$) (slika 2).

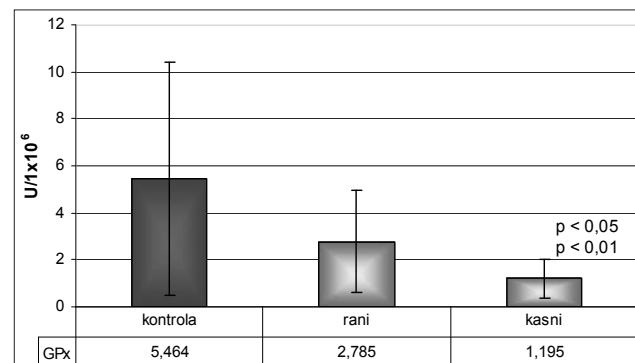


Slika 2. – Aktivnost katalaze u lizatima limfocita

Tokom istraživanja zabeležena je najviša aktivnost katalaze kod ispitanika kontrolne grupe, dok su u grupi obolelih od CLL te vrednosti znatno niže. Kontrola vs rani stadijum, $0,665 \pm 0,092$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,427 \pm 0,135$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$; kontrola vs kasni stadijum, $0,665 \pm 0,092$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,231 \pm 0,137$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$; rani stadijum vs kasni stadijum, $0,427 \pm 0,135$ U/1 x 10⁶ Ly vs $0,231 \pm 0,137$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$, na osnovu POST HOC TEST analize

Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze u lizatima limfocita

Zajedno sa superoksid dizmutazom i katalazom, glutacion peroksidaza je označena kao enzim prve linije antioksidativne odbrane. Aktivnost glutacion peroksidaze u lizatima limfocita najviša je kod ispitanika kontrolne grupe ($5,464 \pm 4,953$ U/1 x 10⁶ Ly), sa nastavljajem trenda koji je pokazan pri određivanju aktivnosti superoksid dizmutaze i katalaze, te je i ovde aktivnost peroksidaze statistički znatno niža u grupama obolelih od hronične limfocitne leukemije (slika 3).



Slika 3. Aktivnost glutacion peroksidaze u lizatima limfocita

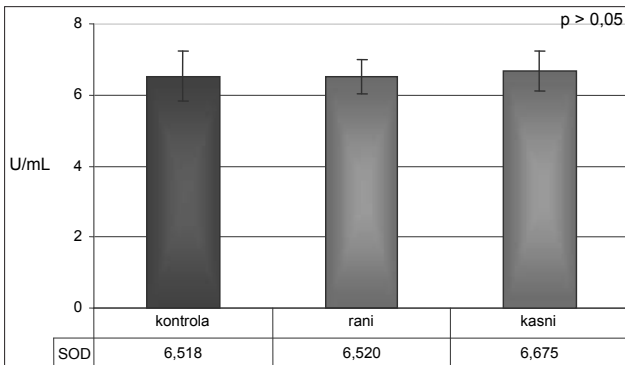
Izmerene aktivnosti glutacion peroksidaze najviše su u grupi ispitanika kontrolne grupe, nešto niže u grupi obolelih od CLL u ranom stadijumu bolesti a najniže vrednosti aktivnosti glutacion peroksidaze zabeležene su u grupi obolelih od CLL u kasnom stadijumu bolesti. Kontrola vs rani stadijum, $5,464 \pm 4,953$ U/1 x 10⁶ Ly vs $2,785 \pm 2,167$ U/1 x 10⁶ Ly, $p = 0,089$; kontrola vs kasni stadijum, $5,464 \pm 4,953$ U/1 x 10⁶ Ly vs $1,195 \pm 0,849$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,01$; rani stadijum vs kasni stadijum, $2,785 \pm 2,167$ U/1 x 10⁶ Ly vs $1,195 \pm 0,849$ U/1 x 10⁶ Ly, $p < 0,05$, na osnovu Kruskal – Wallis analize. Kao mera centralne tendencije određivana je i medijana: za kontrolnu grupu $Me = 2,000$, rani stadijum $Me = 2,400$ i kasni stadijum $Me = 0,970$

U grupi obolelih od hronične limfocitne leukemije u ranom stadijumu bolesti zabeležena je aktivnost glutacion peroksidaze $2,785 \pm 2,167$ U/1 x 10⁶ Ly, dok je u grupi obolelih u kasnom stadijumu bolesti, enzimaska aktivnost bila $1,195 \pm 0,849$ U/1 x 10⁶ Ly. Statistička analiza je pokazala da je razlika u aktivnosti glutacion peroksidaze visoko statistički značajna između ispitanika kontrolne grupe i grupe obolelih u kasnom stadijumu hronične limfocitne leukemije (kontrola vs kasni stadijum, $p < 0,01$), dok razlike između ostalih grupa očigledno postoje, ali sa različitim stepenom statističke značajnosti (rani stadijum vs kasni stadijum, $p < 0,05$ ($p = 0,021$); kontrola vs rani stadijum, $p > 0,05$ ($p = 0,089$)) (slika 3).

Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi

Tokom našeg istraživanja određivana je aktivnost superoksid dizmutaze u plazmi ispitanika kontrolne grupe

i grupama obolelih od hronične limfocitne leukemije. Zabeležen je blagi trend porasta aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi (kontrola, $6,518 \pm 0,704$ U/mL; rani stadijum, $6,520 \pm 0,490$ U/mL; kasni stadijum $6,675 \pm 0,576$ U/mL). Testiranjem razlika među grupama, nije nađena statistička značajnost $p > 0,05$ (Slika 4.).



Slika 4. Aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi

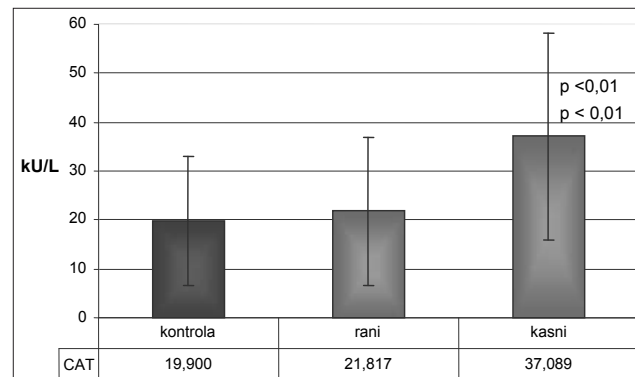
Tokom istraživanja zabeležen je blagi trend porasta aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi (kontrola, $6,518 \pm 0,704$ U/mL; rani stadijum, $6,520 \pm 0,490$ U/mL; kasni stadijum $6,675 \pm 0,576$ U/mL). Testiranjem razlika među grupama, nije nađena statistička značajnost, $p > 0,05$, na osnovu ANOVA analize

Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi

Određivanjem aktivnosti katalaze, jednog od tri enzima koji se ubrajaju u enzime prve linije antioksidativne odbrane, pored superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze, najniže vrednosti enzimske aktivnosti izmerene su ka kontrolnoj grupi ispitanika ($19,900 \pm 13,198$ kU/L). U grupi bolesnika obolelih od hronične limfocitne leukemije, koji se nalaze u ranom stadijumu bolesti, izmerene vrednosti enzimske aktivnosti su $21,817 \pm 15,195$ kU/L. Najviše vrednosti aktivnosti katalaze zabeležene su u plazmi bolesnika obolelih od hronične limfocitne leukemije koji se nalaze u kasnom stadijumu bolesti $37,089 \pm 21,135$ kU/L. Testiranjem međugrupnih razlika dobijene su sledeće vrednosti: bez statističke značajnosti, kontrola vs rani stadijum, $p > 0,05$; razlike su visoko statistički značajne između kontrolne grupe i grupe obolelih u kasnom stadijumu bolesti, $p < 0,01$ (tj. $p = 0,002$), kao i između dve grupe obolelih od hronične limfocitne leukemije (rani stadijum vs kasni stadijum, $p < 0,01$ tj. $p = 0,005$) (slika 5).

Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi

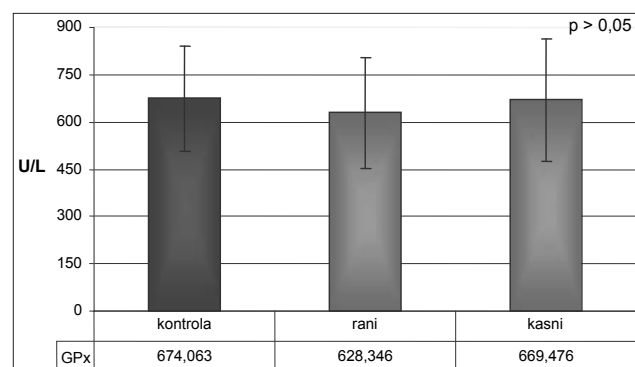
Merenjem aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi ispitanika kontrolne grupe i grupa obolelih od hronične limfocitne leukemije i njihovim međusobnim poređenjem, nađene razlike između grupa nisu statistički značajne. Izmerena aktivnost glutation peroksidaze u plazmi ispitanika kontrolne grupe je $674,063 \pm 164,968$ U/L, u



Slika 5. Aktivnosti katalaze u plazmi

Najniže vrednosti enzimske aktivnosti izmerene su u kontrolnoj grupi ispitanika ($19,900 \pm 13,198$ kU/L). U grupi bolesnika obolelih od CLL koji se nalaze u ranom stadijumu bolesti izmerene vrednosti enzimske aktivnosti su $21,817 \pm 15,195$ kU/L. Najviše vrednosti aktivnosti katalaze zabeležene su u plazmi bolesnika obolelih od CLL koji se nalaze u kasnom stadijumu bolesti $37,089 \pm 21,135$ kU/L. Testiranjem međugrupnih razlika dobijene su sledeće značajnosti: kontrola vs rani stadijum, $p = 0,964$; kontrola vs kasni stadijum, $p < 0,01$, kao i rani stadijum vs kasni stadijum, $p < 0,01$ na osnovu Kruskal–Wallis analize. Kao mera centralne tendencije određivana je i medijana: za kontrolnu grupu $Me = 19,500$, rani stadijum $Me = 16,830$ i kasni stadijum $Me = 33,770$

grupi bolesnika u ranom stadijumu bolesti izmerena enzimska aktivnost je $628,346 \pm 177,020$ U/L, a u grupi bolesnika u kasnom stadijumu bolesti enzimska aktivnost je $669,476 \pm 196,112$ U/L. Među testiranim grupama nema statistički značajne razlike u aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi $p > 0,05$ (slika 6).



Slika 6. Aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi

Izmerena aktivnost glutation peroksidaze u plazmi ispitanika kontrolne grupe je $674,063 \pm 164,968$ U/L, u grupi bolesnika u ranom stadijumu CLL izmerena enzimska aktivnost je $628,346 \pm 177,020$ U/L, a u grupi bolesnika u kasnom stadijumu CLL enzimska aktivnost je $669,476 \pm 196,112$ U/L. Među testiranim grupama nema statistički značajne razlike u aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi; $p > 0,05$ na osnovu ANOVA analize

DISKUSIJA

Jedan od mehanizama koji su uključeni u procese transformacije i kancerogeneze, kao i opstanka maligno izmenjenih limfocita svakako je i dejstvo visokoreaktivnih slobodnih radikala. Procesi apoptoze i kancerogeneze, kao dva posebna fenomena, prisno su povezani sa dejstvom slobodnih radikala. Uloga slobodnih radikala u kancerogenezi usko je povezana sa oksidativnim oštećenjem DNA (point mutacije, delecije, amplifikacije, rearanžiranje gena, aktivacija protonkogena, supresija antionkogena) i stvaranjem DNA produkta, 8-okso-2'-deoksiguanozina, koji je veoma mutagen, ali i učešćem u brojnim signalnim putevima u ćeliji kao što su aktivacija aktivacionog proteina – 1(AP-1), fosfolipaze – A (PLA 2 2), mitogen-aktivirajućih protein kinaza (MAPKs), c-JUN kinaze, transkripcionog jedarnog faktora kapa B (NF- κ B) (15).

Enzimski antioksidativni sistem sastoji se od kaskade enzima čija aktivnost mora biti veoma dobro regulisana i visoko međusobno sinhronizovana da bi se postigao osnovni cilj, odbrana od mogućih oksidativnih oštećenja. Ovu kaskadu čini niz antioksidativnih enzima, od kojih su najvažniji tzv. enzimi prve linije odbrane: superoksid dizmutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Superoksid dizmutaza je ključni enzim, jer svojom aktivnošću uklanja superoksid anjon radikal prevodeći ga u vodonik-peroksid, koji se dalje iz sistema reaktivnih vrsta kiseonika, eliminiše aktivnošću katalaze i dejstvom peroksidaza.

Pokazano je da promene u ćelijskom statusu reaktivnih vrsta kiseonika imaju veoma važne implikacije na ćelijsku smrt putem apoptoze (16–18). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da u lizatima limfocita postoji pad aktivnosti enzima glavne linije odbrane, superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze. Pad aktivnošću antioksidativnih enzima (u prvom redu aktivnost superoksid dizmutaze) u lizatima limfocita najizraženiji je kod bolesnika koji su sa uznapredovalom bolešću, a nešto manje izražen u grupi bolesnika sa neprogresivnom bolešću. Veoma slični rezultati, u saglasnosti sa našim, na istom materijalu, dobijeni su i u istraživanju grupe španskih naučnika (Oltra i saradnici, 2001) (19). Praćenjem aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi obolelih od CLL i poređenjem sa vrednostima dobijenim za isti parametar u kontrolnoj grupi, u našem istraživanju pokazano je da ne postoje statistički značajne razlike između tih dveju grupa ispitanika. Za razliku od nas, grupa turskih istraživača (Bakan i saradnici, 2003) pokazala je da u serumu obolelih od CLL postoji statistički značajan pad aktivnosti ne samo superoksid dizmutaze nego i glutation peroksidaze (20). U zavisnosti od uslova, glavni regulator koncentracije vodonik-peroksida je enzim katalaza, dok glutation-peroksidaza i hemoglobin imaju ograničenu ulogu. Aktivnost katalaze u lizatima limfocita je najveća u kontrolnoj grupi u odnosu na grupe obolelih

od hronične limfocitne leukemije sa statistički značajnim međugrupnim razlikama (kontrola vs rani stadijum, $p < 0,01$; kontrola vs kasni stadijum, $p < 0,01$; rani stadijum vs kasni stadijum, $p < 0,01$). Ovi rezultati su u saglasnosti sa zapaženim smanjenjem aktivnosti dva enzima, superoksid dizmutaze i katalaze, što je i pokazano ranije kod obolelih od CLL (19), kod dece sa akutnom limfocitnom leukemijom (21), kod obolelih sa kolorektalnim karcinomom (22), kod pacijentkinja sa epitelijalnim ovarijalnim karcinomom (23) i drugim tumorima. I u različitim tumorskim ćelijskim linijama (24) nađen je, takođe, pad aktivnosti ova dva enzima.

Određivanjem aktivnosti katalaze u plazmi, jednog od tri enzima, koji se ubrajaju u enzime prve linije antioksidativne odbrane, zabeležili smo statistički značajan porast aktivnosti ovog enzima među ispitivanim grupama; sa progresijom bolesti aktivnost katalaze raste. Najniže vrednosti enzimske aktivnosti izmerene su ka kontrolnoj grupi ispitanika, nešto više u grupi bolesnika obolelih od hronične limfocitne leukemije koji se nalaze u ranom stadijumu bolesti, a najviše vrednosti aktivnosti katalaze zabeležene su u plazmi obolelih koji su u kasnom stadijumu bolesti.

Katalaza je enzim čija je lokalizacija u ćeliji ograničena na peroksisome i ona katalizuje razgradnju dva molekula vodonik peroksida do vode i molekuskog kiseonika. Zbog svoje prevashodno peroksidalne lokalizacije smatralo se da ne učestvuje u regulaciji ćelijskog redoks potencijala (25). Međutim, enzim može biti otpušten ekstracelularno (26) i pokazalo se da može da deluje kao potentni antioksidans.

Aktivnost glutation peroksidaze u lizatima limfocita najviša je kod ispitanika kontrolne grupe, sa nastavljanjem trenda opadanja enzimske aktivnosti koji je pokazan pri određivanju aktivnosti superoksid dizmutaze i katalaze, te je i ovde aktivnost peroksidaze niža u grupama obolelih od hronične limfocitne leukemije. Međutim, nalaz snižene aktivnost GPx u lizatima limfocita, pokazan u našem istraživanju u suprotnosti je sa ranijim istraživanjima, gde je pokazan porast aktivnost glutation peroksidaze kod CLL pacijenata (19, 27, 28). Slični rezultati dobijeni su i kod pacijentkinja sa epitelijalnim tumorima jajnika (23). Razlike u dobijenim nalazima mogu poticati od različitih eksperimentalnih uslova i metoda rada, s jedne strane, od nepoznavanja tačnog i preciznog mehanizma funkcionisanja antioksidativnih enzima u različitim stadijumima kancerogeneze, kao i od još uvek nedovoljno rasvetljenih uzročno-posledičnih odnosa između prooksidanasa/antioksidanasa i tumorskog procesa (29), s druge strane. Merenjem aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi ispitanika kontrolne grupe i grupa obolelih od hronične limfocitne leukemije, beleži se blagi trend opadanja enzimske aktivnosti kod obolelih od CLL, ali međusobnim poređenjem nađeno je da razlike između

grupa nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima. Bakan i saradnici (2003) su takođe pokazali pad serumske aktivnosti glutacione peroksidaze kod obolelih od hronične limfocitne leukemije (20). I kod drugih vrsta tumora dobijeni su slični rezultati, Arivazagan i saradnici (1997) su pokazali pad aktivnosti glutacione peroksidaze kod pacijenata sa kancerom želuca (30).

U zaključku, naše razumevanje endogenih mehanizama karcino-geneze uzrokovanih oksidativnim stresom je značajno napredovalo u poslednjoj deceniji, ali razjašnjavanje molekularnog obrasca karcinogeneze mora se dalje rasvetljavati da bi se neoplastične bolesti na pravi način lečile. Zbog toga, analiza aktivnosti antioksidativnih enzima u lizatima limfocita pacijenata sa CLL, odnosno superoksid dizmutaze, katalaze i glutacione peroksidaze, može da se primeni kao dobar prediktivni faktor za praćenje toka i ishoda bolesti.

SKRAĆENICE

- CAT – katalaza
 CLL – hronična limfocitna leukemija
 DNA – dezoksiribonukleinska kiselina
 FBS – Foetal Bovine Serum
 GPx – glutacione peroksidaze
 GSH – redukovani glutacioni
 GSSG – glutacioni disulfid
 INT – 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorid
 NADPH – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
 NADP⁺ – oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
 SOD – superoksid dizmutaza

LITERATURA

- Čolović M. Hronična limfocitna leukemija. U: Čolović M, Janković G. Maligne bolesti krvi. Beograd, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1999: 195–221.
- Mates JM, Sanches-Himenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 157–70.
- Stilgenbauer S. Genomic aberration, p53 abnormalities and IgV mutation: relation to disease evolution, resistance to therapy and clinical course of CLL. *Leuk Lymphoma* 2001; 42 (Suppl 1): 1.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219–34.
- Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR, eds. *Chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future direction.* UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series. New York: Liss, 1987; 59: 253–61.
- Mann DL, LeSane F, Boumpas D. HTLV-1 infection and chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1988; 30: 267–71.
- Goldin LR, Hillmen RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 2004; 104: 1850–4.
- Minot GP, Isaacs R. Lymphatic leukemia. Age, incidence, duration and benefit derived from irradiation. *Boston Med Surg J.* 1924; 191:1.
- Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:51–76.
- Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97: 31–50.
- Kennedy L, Reynolds J. Protocol for the removal of adherent macrophages. In: Lefkowitz I. *Immunology methods manual.* ACADEMIC PRESS, Harcourt Brace & Company, Publishers, 1996; 2091–7.
- Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci.* 1983; 34: 253–6.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158–69.
- Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143–52.
- Mates JM, Sanches-Himenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 157–70.
- Armstrong JS, Steinauer KK, Hornug B, et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 252–63.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309–12.
- Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis *Am J Med Genet.* 2001; 106: 2–70.

19. Oltra A, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez G. Antioxidant enzyme activities and the production of the MDA and 8-oxo-DG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1286–92.
20. Bakan T, Taysi S, Yilmaz O, et al. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitricoxide and malondialehyde concentration in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 143–9.
21. Senturker S, Karahalil B, Inak M, et al. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett.* 1997; 416: 286–90.
22. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 583–99.
23. Sanches M, Torres JV, Tormos C, et al. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Letters* 2006; 233: 28–35.
24. Oberly AM, Beutner G. Role of superoxide dismutase in cancer. A review. *Cancer Res.* 1979; 39: 1141-9.
25. Purdue PE, Lazarow PB. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *Journal of Cell Biology* 1996; 134: 814–22.
26. Sandstrom PA, Buttke TM. Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum free medium. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 1993; 90: 4708–12.
27. Farber CM, Kanganis DN, Liebes LF, Silber R. Antioxidant enzymes in lymphocytes from normal subjects and patients with chronic lymphocytic leukemia: increased glutathione peroxidase activity in CLL B lymphocytes. *Br J Haematol.* 1989; 72: 32–5.
28. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoy J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995; 16: 3581–3.
29. Jaruga P, Olinski P. Activity of antioxidant enzymes in cancer disease. *Hig Med Dosw.* 1994; 48(4): 443–55.
30. Arivazhagan S, Kavitha K, Nagini S. Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in gastric cancer patients. *Cell Biochem Funct.* 1997; 15: 15–8.