

MULTİPL MYELOMALI HASTALARDA LİPİD PEROKSİDASYONU (ÖN ÇALIŞMA)

Zahit BOLAMAN¹, Süleyman DEMİR², Mehmet H. KÖSEOĞLU², Yaşar ENLİ²,
Gürhan KADIKÖYLÜ¹, Diler ASLAN²

ÖZET

Amaç: Multipl myelomlu hastalarda lipid peroksidasyonunun aktivitesini belirlemek için ön çalışma olarak serum malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Yöntem: On iki multipl myelomlu hasta ve onbeş sağlıklı kontrol grubunda açlık venöz kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri analiz edilene dek -20 C° de donduruldu. Tüm örnekler oda sıcaklığında ısıtıldı. MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitirik asitle oluşturduğu renk şiddeti 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile yapıldı.

Bulgular: Multipl myelomlu hastalarda serum MDA düzeyleri ortalama 1.51±0.16 nmol/ml, kontrol grubunda ise 0.97±0.11nmol/ml (p:0.0321) olarak bulundu. MDA düzeyi ile yaş, cins, paraprotein ve hafif zincir tipi, hemoglobün düzeyi arasında ilişki yoktu (p>0.05).

Sonuç: Serum MDA düzeyi multipl myelomlu hastalarda kontrol grubuna göre yüksek saptandı (p<0.05). Elde edilen sonuçlar ön değerlendirme niteliğinde olup multipl myelomlu hastalarda artmış oksidatif stresi işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler:Multipl myelom, malondialdehit, oksidatif stress.

Lipid Peroxidation In Patients With Multipl Myeloma

SUMMARY

Aim of study: We investigated the malondialdehyde (MDA) levels as a parameter of lipid peroxidation in patients with multiple myeloma as a preliminary report.

Material and method: Fasting venous blood samples were drawn in 12 patients with multiple myeloma and 15 healthy persons. Serum was separated and frozen at -20 C°. All samples were thawed at room temperature and MDA levels were measured by the method in which MDA reacted with thiobarbituric acid and produced a colored complex. This colored complex was read by optic scale at 532 wavelength.

Results: MDA levels were 1.51±0.16 nmol/ml in patients with multiple myeloma and 0.97± 0.11 nmol/ml in the control group (P<0.05). We didn't observe a significant relationship between the concentration of MDA and age, sex, paraprotein level, light chain type and hemoglobin levels (p>0.05).

Conclusion: Plasma MDA levels were found to be higher in multiple myeloma in comparison to control group (p<0.05). These results are a preliminary report and the higher plasma MDA levels could be an indicator of increased oxidative stress in multiple myeloma.

Key Words: Multiple myeloma, malondialdehyde, oxidative stress.

Multipl myeloma plazma hücrelerinin kemik iliğinde kontrolsüz çoğalması sonucu iskelet sisteminde litik kemik lezyonları, osteopeni veya osteoporoz, böbrek fonksiyonlarında bozulma, enfeksiyonlara eğilim, hiperviskozite, anemi ya da trombositopeni bulguları ile karakterize malign seyirli bir hastalıktır. Laboratuvar belirtilerinde sedimentasyon yüksekliği, gamaglobulin düzeyinde artma, serum veya idrar elektroforezinde monoklonal band varlığı esastır. Patogenez tam olarak bilinmemektedir.¹⁻²

Serbest radikaller aerobik hücre metabolizması sırasında doğal olarak oluşmaktadır. İskemi-reperfüzyon zedelenmesi, bazı inflamatuvar ve malign hastalıklarda yapımı artmaktadır³. Normal metabolizma seyrinde oluşan oksijen metabolitleri süperoksit anyon radikali (O⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksi radikalleridir (OH). Hidroksi radikallerinin hücre membranındaki yağ asitlerine

saldırısı sonucu oluşan reaksiyon lipid peroksidasyonu olarak bilinir.⁴ Lipid peroksidasyonu membranların geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne yol açabilen olayları başlatır.⁵ Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi antioksidan enzimler reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile oluşabilecek hücre ve moleküler hasara karşı koruyucu rol oynar.⁶⁻⁸ Malign hastalıklardan lösemi ve lenfomalar yanında oral, troid, karaciğer, meme kanserli ve multipl myelomlu hastalarda reaktif oksijen radikalleri karsinogenez ile ilişkisi açısından araştırılmıştır.^{6,9-15} Lipid peroksidasyonunu kantitatif olarak değerlendirmek için kullanılan yöntemlerden bir tanesi lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinin tiyobarbitirik asit testi ile ölçümüne dayanmaktadır.¹⁶

Bu çalışmada multipl myelomlu hastalarda lipid peroksidasyonunu hakkında ön değerlendirme yapmak amacıyla serum örneklerinde MDA düzeyi

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, AYDIN

² Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, DENİZLİ

kantitatif olarak ölçüldü.

MATERYAL METOD

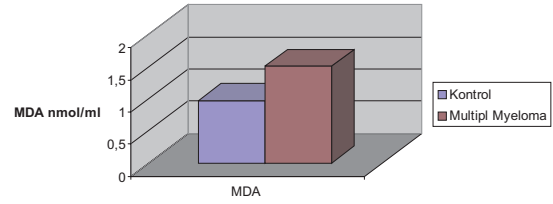
Hasta grubu 9 kadın ve 3 erkekten oluşmuştu. Yaş ortalaması 60 ± 9 (oran:47-78) yıl olarak bulundu. Hastaların 7'si IgG, 4'ü IgA, 1'i ise nonsekretuar myeloma tanısı ile takip ediliyordu. Nonsekretuar myeloma tanılı hasta hariç hastaların tümünde serum ve/veya idrar elektroforezinde monoklonal band saptandı. Üç hasta evvelce VAD kemoterapisi (Vincristine, Doxorubicine, Dexamethasone) almıştı. İşlem anında hastaların tümü melphalan $9 \text{ mg/m}^2 \times 4$ gün ve Prednisone $100 \text{ mg} \times 5$ gün süreyle dört hafta ara ile kullanılmaktaydı. Hastaların hepsinde hastalık aktifti (kemik iliğinde plazma hücresi $> \%30$, ve nonsekretuar multipl myelomlu hasta hariç serum elektroforezde monoklonal band varlığı ve serumda $\text{IgG} > 3.5 \text{ gr/dl}$, $\text{IgA} > 2 \text{ gr/dl}$ ve 24 saatlik idrarda kappa veya lambda hafif zincir $> 1 \text{ gr}$). İnceleme anında hastaların tümü evre II idi ve kemoterapi aldıktan sonra 3 haftalık süre geçmişti. Kontrol grubu ise sağlıklı 11 kadın ve 4 erkekten oluşturuldu. Yaş ortalaması 53.3 ± 12 (dağılım:42-63) yıl idi. Her iki grupta da antioksidan ilaç kullanılmı mevcut değildi ve diabetes mellitus veya kolitis ülseroza gibi akut inflamatuvar bir hastalığa ait bulgu yoktu. Her iki grup araştırılmaya alınmadan önce bilgilendirildi ve onayları alındı.

On iki multipl myelomalı hasta ve 15 sağlıklı kişinin bir gece açlıktan sonra alınan venöz kan örnekleri hızla santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve analiz yapılana dek -20°C 'de donduruldu. MDA ölçümü MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm 'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının metodunun modifiye şekli uygulanarak yapıldı¹⁶. 0.5 ml plazma üzerine $\% 8.1$ sodyum dodesil sülfat 0.2 ml , pH'sı 3.5 olan $\% 20$ asetik asit 1.5 ml ve $\% 0.8$ tiobarbitürik asit solüsyonu 1.5 ml eklenerek 95°C 'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm 'de ölçüldü. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden numunedeki MDA miktarı hesaplandı ve nmol/ml olarak ifade edildi. Elde edilen veriler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Multipl myelomlu hastalarda MDA düzeyleri ortalama $1.51 \pm 0.16 \text{ nmol/ml}$; kontrol grubunda ise, $0.97 \pm 0.11 \text{ nmol/ml}$ olarak saptandı (Şekil 1). Bu iki grup arasında, MDA düzeyleri açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p:0.0321$). Paraprotein tipi, yaş, cins, hafif zincir tipi hemoglobin miktarı ile MDA düzeyi arasında ilişki mevcut değildi ($p>0.05$). Multipl myelomlu hastalarda MDA düzeylerindeki bu anlamlı artış oksidatif stres varlığını işaret eden lipid

peroksidasyonundaki artmanın önemli bir göstergesi olarak değerlendirildi.



Şekil 1. Kontrol ve multipl myelomlu hastalarda plazma MDA düzeyleri

TARTIŞMA

Serbest radikallerin aracılık ettiği hücre hasarında lipid peroksidasyonu önemli bir mekanizmadır. Böylelikle hücre membranında direkt hasar oluşabilir ve reaktif karbon ürünleri oluştuğu yerden daha uzak alanlara yayılarak bu bölgelerde doku hasarına sebep olabilir.¹⁷ Serbest radikallerin meydana getirdiği reaksiyonlar organizmada antioksidan adı verilen moleküller aracılığı ile sürekli olarak etkisizleştirilme sürecindedir.⁶ Tümör gelişimi ile serbest radikaller arasında bir ilişki olup reaktif oksijen radikallerinin karsinogenezisin farklı basamaklarında önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu maddeler özellikle organizmada antioksidan sistem bozulmuş ise lipid peroksidasyonunu başlatarak membran ileti sistemine hasar verebilir. Genlerin büyüme ve diferensiasyonunu değiştirerek mutagenез ve karsinogenezde etkin olabilir. Tüm bu olaylar hidroksiradikallerin pürin ve pirimidin bazlarına etkisiyle nükleus seviyesinde lipid peroksidasyonu ile de hücre membranı düzeyinde gerçekleşmektedir.^{18,19}

Farklı cins kanserli hastalarda oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu ile ilgili araştırmalar giderek artmaktadır. Bu araştırmalarda oral, troid, karaciğer ve meme kanserlerinde elde edilen sonuçlar benzerdir. Bu çalışmaların tümünde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi artmıştır.^{6,9-15} Hematolojik malignensilerden akut ve kronik lösemiler, lenfomalar ve multipl myelomlu hastalarda da elde edilen sonuçlar solid tümörlü hastalarda elde edilen sonuçlarla benzer niteliktedir.^{9-11,15} Multipl myelomlu hastalarda antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonu ile ilgili araştırma sayısı kısıtlıdır. Yapılan bir araştırmada MDA düzeyinde artma buna karşılık SOD ve GPx düzeylerinde azalma saptanmıştır. Hastalık evresi ve paraprotein düzeyi ile ilişki saptanmamıştır.¹⁵ Bizim araştırmamız ise bir ön çalışmanın sonuçlarını yansıtmaktadır. On iki multiplmyelomlu hastanın hepsinde lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeylerinde artma saptandı. MDA düzeylerinde saptanan bu artış multipl myelomlu hastalarda lipid peroksidasyonunun arttığını işaret

etmektedir. Bu durum hastalığın oluşumu ile ilişkili olabileceği gibi hastalık aktivitesini veya mevcut hastalığın göstergesi olabilir. Ancak lipid peroksidasyonundaki artışı gösteren MDA düzeyinin tedavide kullanılan ilaçlarla ilgisi tam olarak bilinmemektedir.^{18,20}

Sonuç olarak bu ön araştırma multipl myelomlu hastalarda oksidatif stresin bir işareti olan ve lipid peroksidasyonunu gösteren serum MDA düzeyinin arttığını desteklemektedir. Ancak bu konuda daha iyi bilgi sahibi olmak için tedavi öncesi ve sonrası, remisyonda olan ve olmayan daha fazla sayıdaki hasta guruplarında serbest oksijen radikalleri, MDA düzeyi ve antioksidan enzimlerin serum ve eritrositlerde araştırılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R. Plasma cell myeloma-new biological insight and advances in therapy. *Blood* 1989; 73:865-79.
2. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma:increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91:3-21
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford Medicine Press, 1999; 246-351.
4. Allen RG, Venkatraj VS. Oxidants and antioxidants in development and differentiation. *J Nutr* 1992; 122: 631-5.
5. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest Radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2000; 1:52-8.
6. Ray C, Batra S, Shukla NK, Doo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000 59:163-70.
7. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry in vivo. *British Medical Bulletin* 1993; 49:481-93.
8. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:515-40.
9. 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.
10. Ghalaut VS, Ghalaut PS, Singhs S. Lipid peroxidation in leukemia. *J Assoc Physician India* 1999; 47:403-5.
11. Güven M, Öztürk B, Sayal A, Özet A. Lipid peroxidation and antioxidant system in the blood of patients with Hodgkin's disease. *Clin Biochem* 2000; 33:209-12.
12. Sabitha KE, Shymaladevi CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 1999; 35:273-7.
13. Sadani GR, Nadkarni GD. Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers. *Cancer Lett* 1996; 3:231-5.
14. Iwagaki H, Hamazaki K, Matsubara N, Hiramatsu M, Orita K, Mori A. Lipid peroxidation in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* 1995; 49:313-5.
15. Zima T, Spicka I, Stipek S, Crkowska J, Platenik J, Merta M, Tesar V. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with multiple myeloma. *Neoplasma* 1996; 43:69-73.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
17. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspect Med* 1993; 14:191-7.
18. Li B, Gutierrez PL, Amstad P, Blough NV. Hydroxyl radical production by mouse epidermal cell line in the presence of quinone anti-cancer compounds. *Chem Res Toxicol* 1999; 12:1042-9.
19. Comporti M. Lipid peroxidation:Biopathological significance. *Mol Asp Med* 1993; 14:199-207.
20. Diplock AT, Rice-Evans CA, Burdon RH. Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidant in cancer prevention. *Cancer Res* 1994; 1:1952-4.

YAZIŞMA ADRESİ

Dr Zahit Bolaman
Anan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD-Hematoloji BD
9100-AYDIN/TÜRKİYE

Tel : 0.256. 212 40 78
Faks : 0.256. 212 01 46

E-posta : zahitb@yahoo.com

Geliş Tarihi : 06.04.2000
Kabul Tarihi : 12.12.2000