

Clinica medicală nr. I din Tirgu Mureş (cond.: prof. dr. P. Dóczy, doctor-docent,
medic emerit, membru al Academiei de ştiinţe medicale)

STUDII ENZIMOLOGICE ÎN LEUCEMII.

I. Activitatea fosfatazei alcaline în serul bolnavilor leucemici

E. Kifor

Dintre simptomele biochimice, ce apar cu regularitate în leucemia granulocitară cronică (LGC), lipsei activităţii fosfatazei alcaline leucocitare (FAL) i s-a acordat o atenţie deosebită, fapt ce se reflectă şi în numărul mare de ipoteze formulate pentru explicarea acestui fenomen (5, 5 a, 25, 32, 39, 47).

Studiul problemei s-a reluat pe baza constatărilor că FAL aparţine enzimelor de provenienţă granulară (6, 18, 20, 56), a căror activitate prezintă valori crescute în plasma bolnavilor de LGC (1, 22, 38, 41, 48, 7). S-a presupus că

aceste schimbări care afectează distribuția componentilor granulari leucocitari în mediul intra- și extracelular, nu menajează nici FAL.

Material și metodă

Activitatea fosfatazei alcaline (FA) s-a studiat din serul sanguin provenit de la 27 bolnavi de LGC, de la 30 de donatori de sînge și bolnavi selecționați (prin excluderea celor suferinzi de boli de ficat, de reumatism și de cancer) și de la 14 bolnavi cu leucemie limfocitară cronică (LLC). Activitatea FA s-a determinat prin metoda Bodansky modificată. Cantitatea și ritmul eliberării fosfatului anorganic din substrat s-a urmărit în funcție de concentrația serului în amestecul de reacție (0,2; 0,4; 0,8; 1,6ml ser în 10 ml substrat tamponat) și de timpul de reacție (16', 32', 64'). Substratul, beta glicerofosfatul, s-a utilizat în concentrație de 30 mM/l.

Rezultate

Raportul dintre cantitatea de fosfat anorganic eliberat și timpul de reacție: x/t (x —cantitatea produsului de reacție, t —timpul de reacție) prezintă valori constante la lotul martor și la bolnavii de LLC (tabelul nr. 1). Din această

Tabelul nr. 1

Cantitatea de fosfat anorganic eliberat în funcție de timpul de reacție (x/t , x —cantitatea produsului de reacție, t —timpul de reacție) în ser sanguin provenit de la martori, bolnavi de LLC și LGC

	Numărul cazurilor	Timpul de reacție	Mediile valorilor x/t			
			Cantitatea serului sanguin în amestecul de reacție			
			0,2 ml	0,4 ml	0,8 ml	1,6 ml
Lotul de martori	20	16'	0,34	0,72	1,42	2,80
		32'	0,36	0,76	1,41	2,88
		64'	0,35	0,74	1,41	2,83
Lotul de LLC	14	16'	0,54	1,14	2,21	3,60
		32'	0,55	1,08	2,20	3,72
		64'	0,55	1,13	2,07	3,63
Lotul de LGC	27	16'	1,12	1,62	2,69	3,65
		32'	0,89	1,40	2,35	3,38
		64'	0,63	1,17	2,06	3,07

relație rezultă că reacția enzimatică este de ordinul „0”. Cantitatea produsului de reacție reflectă în acest caz cantitatea enzimei din serul martorilor și al bolnavilor de LLC. La lotul bolnavilor de LGC raportul x/t nu prezintă valori constante (tabelul nr. 1), acestea schimbîndu-se în funcție de timpul de reacție. Din acest motiv în LGC utilizarea metodelor curente la aprecierea sau compararea cantității enzimei pe baza activității sale nu este posibilă.

Cantitatea produsului de reacție este funcția lineară a cantității serului sanguin din amestecul de reacție (fig. nr. 1). În LLC se remarcă o abatere mai mică de la această relație, constatată la lotul de martori, regresia lineară fiind totuși acceptabilă și în acest caz.

La lotul bolnavilor de LGC nu poate fi admisă existența corelației lineare între concentrația serului în amestecul de reacție și cantitatea produsului de reacție (fig. nr. 1). Cantitatea produsului de reacție este în corelație lineară cu rădăcina pătrată a cantității de ser existent în amestecul de reacție (fig.

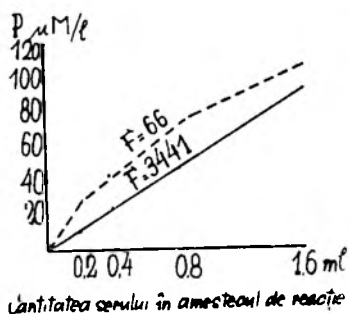


Fig. nr. 1: Relația dintre cantitatea serului sanguin din amestecul de reacție și cantitatea produsului de reacție (P. anorg. $\mu\text{M/l}$) la martori (—) și la bolnavi de LGC (---).
Timpul de reacție 32'

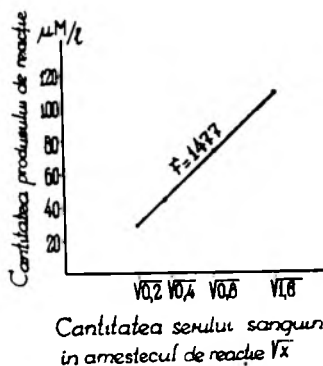


Fig. nr. 2: Corelația dintre rădăcina pătrată a cantității serului sanguin (\sqrt{x}) din amestecul de reacție și cantitatea produsului de reacție. (P. anorg. $\mu\text{M/l}$) la bolnavii de LGC.
Timpul de reacție 32'

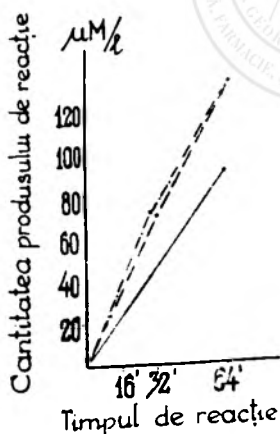


Fig. nr. 3: Cantitatea de fosfat anorganic eliberat în funcție de timpul de reacție. Martori (—), bolnavi de LLC (---), bolnavi de LGC (---). Cantitatea serului în amestecul de reacție 0.8 ml

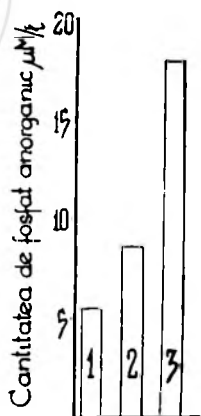


Fig. nr. 4: Cantitatea de fosfat anorganic eliberat de fosfataza alcalină d.n ser sanguin provenit de la martori (1), bolnavi de LLC (2) și bolnavi de LGC (3). Cantitatea serului în amestecul de reacție 0.2 ml, timpul de reacție 16'

nr. 2). Această particularitate a activității FA în serul bolnavilor de LGC, indică, conform legii Schütz, prezența inhibitorilor în ser.

Cantitatea de fosfat anorganic, eliberată în funcție de timpul de reacție, indică relații similare. Cantitatea produsului de reacție este funcția lineară a timpului de reacție la lotul martor și în LLC. S-a constatat în schimb diminuarea activității enzimei în cursul incubării la bolnavii de LGC (fig. nr. 3).

Datorită deosebirilor existente între cele trei grupe de bolnavi, privind efectul cantității de ser sanguin și al timpului de reacție asupra cantității produsului de reacție, rezultatele sînt comparabile numai în anumite condiții. Concluziile privind cantitatea enzimei din serul aparținînd grupelor studiate sînt dependente de concentrația serului în amestecul de reacție, respectiv de timpul de reacție. Concentrația crește la serului (0,8—1,6 ml în 10 ml substrat) și timpul de reacție prelungit (64) datorită inhibitorilor, estompează deosebirile, care devin evidente numai în cazul utilizării serului mult diluat (0,2 ml în 10 ml substrat) pe un timp de reacție scurt (16'). În asemenea condiții activitatea enzimei prezintă valori maxime la lotul bolnavilor de LGC, indicînd existența cantităților crescute de FA în serul acestor bolnavi (fig. nr. 4).

Discuții

Interpretarea particularităților FAL în LGC a fost influențată și de metodele utilizate. S-a constatat lipsa activității în cazul folosirii metodelor citochimice-citoenzimologice și diminuarea acesteia prin utilizarea metodelor enzimo-logice (36). Prin electroforeză s-a relevat schimbarea mobilității electroforetice a variantelor moleculare de FAL (46, 34, 53), iar recent s-au pus în evidență deosebiri în distribuția FAL în organele granulocitelor leucemice (42). Explicația în cazul FA, rezidă în aplicarea cunoștințelor, recent dobîndite în domeniul biologiei moleculare și a citogeneticii. S-a presupus că lipsa activității FAL, respectiv modificarea mobilității electroforetice, ar indica apariția unei populații noi de neutrofile care, ca expresie a unor schimbări produse în starea genelor structurale sau de reglare (5, 6, 21, 39, 47), nu mai conține FAL, sau vehiculează noi variante moleculare de FA (32, 39). Existența unor analogii și coincidențe într-adevăr sugestive, dependența aparentă a activității FAL de numărul cromosomilor 21 (55, 56), explică formularea ipotezelor de acest gen.

Spre deosebire de aceste ipoteze am pornit de la constatarea că, FAL aparține componentelor granulari ai granulocitelor neutrofile (18, 20, 57), în consecință procesele care afectează granulele, interesează totodată și FAL. S-a presupus că particularitățile activității FAL exprimă anomalia granulelor leucocitare în LGC, părere susținută de următoarele observații:

— Deficiența enzimelor hidrolitice, care aparțin formațiunilor de tipul lizozomilor, este un fenomen general în cazul celulelor tumorale.

— Lipsa FA din granulocitele leucemice este independentă de specie, sau de apariția spontană ori producerea experimentală a leucemiei (50). FAL dispare și în alte afecțiuni însoțite de anomalii lizozomiale (anemia Marchiaffava-Micheli, colagenoze) (33, 35), precum și din celule tumorale de origine mezodermală (37).

— În cazul celulelor care în mod normal nu conțin FA ca „marker” granular, anomalia acestor granule — în leucemii — este indicată de deficiența unui alt „marker” (lipsa plasminogenului din granulocitele bolnavilor de leucemie granulocitară cronică cu eozinofile, 8).

— Diminuarea cantității lizozomilor din granulocitele leucemice s-a pus în evidență și cu ajutorul microscopului electronic (34). Scăderea numărului de granulații PAS pozitive (lizozomi și granulații de glicogen) s-au a granulelor conținînd Zn (52), exprimă de asemenea diminuarea numărului de granule azurofile și specifice.

— În LGC sînt compromise tocmai acele funcții granulocitare care sînt dependente de aceste granule. Modificarea adezivității, diminuarea capacității de migrare și de fagocitare (40) explică lipsa acestor leucocite din exudate, secreții (2) Cantitatea scăzută a granulelor în granulocitele leucemice (LGC) motivează lipsa reacțiilor febrile sau reacțiile inflamatorii mai atenuate.

— Activitatea enzimelor de proveniență lizozomială: a proteazelor neutre (43, 13, 17) și acide, a ribonucleazei (1, 2, 54), deoxiribonucleazei (48), arilsulfatazei (22), fosfatazei acide (4), lizozimului (41) etc. este crescută în plasmă. Enzimele cu greutate moleculară mai redusă apar în cantități mărite și în urina bolnavilor de LGC (54, 22).

Compoziții granulelor (proteaze neutre, mucopolizaharide, condroitinsulfat, lipoproteine, substanțe de tipul heparinei, proteine bazice), eliminați în exces din granulocitele leucemice și din alte elemente celulare, susțin diateza hemoragică frecvent observată în LGC (43, 28).

În plasma sanguină a bolnavilor de LGC este crescută atât cantitatea componentilor lizozomiali care nu au activitate enzimatică cît și cea a factorilor care sînt considerați ca „markeri” ai degranulării. Hiperhistaminemia (24), cantitatea crescută a substanțelor de tip heparină (29), nivelul mai ridicat al α_1 și α_2 glicoproteinelor, prezența frecventă în plasmă a proteinei C reactive (14, 26), cantitatea crescută a inhibitorilor enzimelor lizozomiale (28, 29) și o serie de modificări consecutive, ca lipemia și colesterolemia scăzută (10), tensiunea arterială diminuată (21), pot fi interpretate ca expresie a eliminării cantităților crescute de granule în mediul extracelular.

Activitatea crescută a fosfatazei alcaline în serul bolnavilor de LGC și particularitățile cineticii enzimatice, atribuite de noi existenței cantităților crescute de inhibitori în serul bolnavilor de LGC, sînt fenomene ce se includ în contextul schimbărilor activității enzimelor de proveniență granulară.

Dependența activității FA în mediul extracelular de numărul granulocitelor neutrofile, de activitatea FAL și de gradul degranulării este dovedită de o serie de observații experimentale și clinice (9, 30), justificînd valorile mai crescute ale activității enzimei în serul bolnavilor de LGC și LLC.

Interacțiunile dintre diferiții componenți granulari condiționează activarea, activitatea și inactivarea lor. Diminuarea activității FA în condițiile proteolizei crescute, indusă de plasmină (31) sau de factorul Hageman (27) sugerează explicații suplimentare pentru existența raportului invers proporțional dintre activitatea FAL și cea a protezelor neutre lizozomiale (faza cronică și criza blastică a LGC, policitemia vera etc).

În afară de schimbările cantitative, condiționate de distribuirea componenților amintiți prin degranulare sau de interacțiunile dintre componenții granulelor și modificările calitative ale enzimei, particularitățile distribuției în structurile subcelulare pot fi explicate prin anomalia procesului de biosinteză, stocare și eliminare a granulelor.

Modificarea conformației moleculare, mai variabilă în cazul enzimelor lizozomiale în general, precum și în cazul fosfatazei alcaline, poate afecta nu numai proprietățile biocatalitice, dar și cele fizico-chimice ale moleculelor, influențînd și mobilitatea electroforetică. Din acest motiv, schimbarea mobilității electroforetice sau a altor proprietăți ale moleculelor enzimatice de proveniență granulară nu poate fi un criteriu pe baza căruia se poate afirma existența mutației sau a altor dereglări de ordin genetic. Mobilitatea electroforetică a sialoglicoproteinelor (fosfataza alcalină, proteaze etc.) poate fi modificată atât de factorii genetici, cît și de factorii extragenetici, de condițiile existente în cursul biosintezei, stocării și degranulării (44, 49, 51, 15, 16, 19). Posibilitatea că schimbarea mobilității electroforetice, observată în LGC, este o manifestare consecutivă a anomaliilor granulelor azurofile și specifice este sugerată de schimbările multiple, dependente de faza bolii, de tratamentul aplicat (46) și nu în ultimul rînd de observațiile care indică

schimbări similare și în cazul altor enzime lizozomiale (ribonucleaza, peptidaza) în LGC (3).

Particularitățile biosintezei componentilor granulari motivează apariția enzimelor hidrolitice în diferite organe celulare (fracțiunea microsomială, aparatul Golgi, lizozomi primari, fagolizozomi, granule specifice), în funcție de etapa biosintezei și a maturării celulare (49). Tulburările apărute în granulogeneză, în stocarea și eliminarea lor, vor fi reflectate și de deosebirea apărute în distribuția enzimelor în organele celulare ale granulocitelor normale și leucemice (42).

În LGC activitatea diminuată a FAL este însoțită de o activitate crescută a FA și a celorlalte enzime și componente granulari în mediul extracelular. Se poate afirma deci, că schimbările care afectează FAL exprimă anomaliile existente în biosinteze, stocarea și eliminarea granulelor. Lipsa sau diminuarea activității FAL este doar unul dintre simptomele care indică anomalia acestor organe celulare.

Pe baza datelor și a rezultatelor prezentate se pare că este justificată concepția expusă, potrivit căreia lipsa (diminuarea) activității FAL și simptomele biochimice enumerate, reflectă de fapt o anomalie a granulelor care caracterizează celulele leucemice și tumorile în general, anomalie ce provoacă o serie de schimbări în mediul intra- și extracelular și ale căror consecințe sînt în parte identice cu cele produse de o degranulare excesivă.

Sub acest aspect leucemia granulocitară cronică se include în seria afecțiunilor caracterizate prin anomalie granulară (leucemii, boala Chediak-Higashi, colagenoze etc.). Simptomele biochimice apărute în LGC sînt astfel simptomele degranulării intravasculare.

Explicarea observațiilor legate de activitatea fosfatazei alcaline în leucemia granulocitară cronică depinde de rezolvarea problemei generale, și anume de elucidarea cauzei tulburărilor apărute în starea granulelor în LGC, în leucemia granulocitară cu eozinofilie și în celulele tumorale în general.

Concluzii

1. Cantitatea produsului de reacție (fosfat anorganic) eliberat de fosfataza alcalină din serul provenit de la bolnavi cu leucemie limfocitară cronică și de la un lot de martori, este funcția lineară a cantității de ser sanguin și a timpului de reacție. Reacția enzimatică este de ordinul „O”.

2. În cazul bolnavilor de leucemie granulocitară cronică s-a constatat o abatere de la această relație, determinată de cantitatea crescută a inhibitorilor.

3. Activitatea fosfatazei alcaline prezintă valori crescute în serul bolnavilor de leucemie granulocitară cronică. Aceste constatări sînt explicate prin anomalia granulelor existentă în granulocitele neutrofile leucemice.

Sosit la redacție: 26 iunie 1970.

Bibliografie

1. ALEKSANDROWITZ J. și colab.: Acta Med. Pol. (1966), 3, 299; 2. ALEKSANDROWITZ J. și colab.: Folia. Med. Crac. (1965), 1, 3, 5; 3. ALEKSANDROWITZ J., Al II-lea Congres Naț. Med. Int. București, 1969; 4. ALLISON A. C.: Sci. Amer. (1967), 5, 62; 5. ALTER A. A. și Colab.: Blood. (1963), 2, 165; 6. ALTER A. A. și colab.: J. Clin. Inv. (1962), 41, 1341; 7. BAINTON F. și colab.: J. Cell. Biol. (1963), 39, 2, 286; 8. BACIU I. și colab.: Stud. Cerc. Med. Cluj (1958), 1, 35; 9. BARNHARDT M. I.: Blood. (1963), 21, 306; 10. BARONDESS J. A. și colab.: Am. J. Med. (1960), 7, 43; 11. BASES R. E. și colab.: Res (N. Y.) (1965), 2, 8; 12. BASES R.: New England J. Med. (1962), 266; 13. BEULHACK H. și colab.: Wien Z. inn. Med. (1968), 49, 5, 161; 14. BOCCARDI V.: Progr. Med. (1964), 1, 18; 15. BOGGS D. R.: J. Nat. Cancer Inst. (1960), 25, 1381; 16. BONTING S. L.: Nature (1960), 185, 686; 17. BUTTERWORTH P. D. și colab.: Nature (1966), 209, 805; 18. CARLI DE L. și colab.: J. Nat. Cancer Inst. (1963), 6, 1501; 19. COHN Z. A. și colab.: J. Exp. Med. (1960), 112, 983;

19. COUNTINHO H. B. și colab.: J. Clin. Path. (1966), 19, 617; 20. DE DUVE C. și colab.: Adv. Enzymol. (1964), 24, 291; 21. DÓCZY P. și colab.: Rev. Med. (1969), 15, 2, 191; 22. DZIALOSZYNSKI L. M. și colab.: Clin. Chim. Acta. (1967), 15, 381; 23. ECHOLS H. și colab.: J. Mol. Biol. (1961), 3, 425; 24. GINGOLD N.: Stud. Cerc. Med. Int. (1966), 7, 163; 26. HYDE R. M.: Amer. J. Clin. Path. (1965), 44, 4, 436; 27. IATRIDIS P. G. și colab.: Thromb. Diath. Haemorrh. (1966), 3, 4, 365; 28. KIFOR E.: Contribuții la studiul activității enzimelor lizozomiale în leucemia granulocitară cronică. Teză de doctorat, Universitatea București, 1970; 29. KIFOR E.: Med. Int. (1967), 5, 575; 30. KIFOR E.: Med. Int. (1970) (sub tipar); 31. KIFOR E.: Med. Int. (1970) (sub tipar); 32. KLEIN U. E. și colab.: Klin. Wochenschr. (1966), 44, 11, 637; 33. KRUG K.: Aktuelle Leukozytenproblemen, Akad. Verlag, Berlin, Band IV, 1966; 34. LAPIS K.: Magy. Tud. Akad. V. Orvostud. Köz. (1968), 1, 6; 35. LEWIS S. M. și colab.: Brit. J. Haemat. (1965), 5, 549; 36. MEISLIN A. G.: Cancer (1959), 4, 760; 37. MONIS B.: Cancer (1960), 13, 538; 38. NASKALSKI J. și colab.: P.A.M.W. (1965), 4, 302; 39. PEGG P. J.: Lancet (1964), 1, 557; 40. PENNY R. și colab.: Brit. J. Haemat. (1966), 12, 633; 41. PERILLE P.E. și colab.: J.A.M.A. (1968), 203, 317; 42. PETERLIK M. și colab.: Wien Klin. Wschr. (1967), 79, 38, 693; 43. POPPA C.: Med. Int. (1965), 3, 345; 44. ROBINSON J. C. și colab.: Arch. Biochem. Biophys. (1964), 106, 348; 45. ROBINSON E. și colab.: Oncologia (1964), 17, 55; 46. ROBINSON J. C. și colab.: Science (1965) 3692, 58; 47. ROSEN R. B. și colab.: Blood (1965), 26, 2, 148; 48. SCHREIER K. A. și colab.: Klin. Wochenschr. (1956), 33, 1096; 49. SCHULTZE H. E. și colab.: Molecular biology of human proteins. Vol. I. Ed. Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1966; 50. SETSUDA T. și colab.: Acta Sch. Med. Univ. Kioto, (1962), 38, 248; 51. SCHAW C. R.: Sciences (1965), 149, 936; 52. SZMIGIELSZKI S. și colab.: Cancer (1964), 17, 1381; 53. SZNAJD P. și colab.: Przegł. Lek. (1967), 23, 2, 294; 54. SZNAJD D. și colab.: PAMW (1965), 4, 502; 55. TANZER J. și colab.: N.R.F. d'Hemat. (1966), 6, 317; 56. TRUBOWITZ S.: Lancet (1962), 2, 486; 57. VERCAUTEREN R. E.: Enzymologia (1965), 29, 1, 45; 58. VERGNES H.: N.R.F. d'Hemat. (1966), 6, 301.
-