



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕУКЕМИЈА: АПОПТОЗА МАЛИГНО ИЗМЕЊЕНИХ ЛИМФОЦИТА И ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

### Предмет, садржај и циљ истраживања

#### Сажетак:

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је прогресивна малигна болест које настаје пролиферацијом и акумулацијом клона имунски некомпетентних лимфоцита (који се углавном налазе у G0 фази ћелијског циклуса) у костној сржи, лимфним жлездама, слезини и другим органима, док само мали проценат ћелија у периферној крви показује пролиферативну активност. Сматра се да је узрок акумулације леукемијских ћелија њихов продужен живот. Поремећај експресије протоонкогена bcl-2 у малигно измењеним лимфоцитима условљава инхибицију апоптозе и омогућује њихов дуг живот. Апоптоза или програмирана ћелијска смрт је високо регулисана разградња ћелија коју карактеришу бројне морфолошке и функционалне промене. Апоптозу могу покренути бројни стимулуси који узрокују активирање ефекторских каспаза (каспазе 3, 6 и 7) чиме се ултимативно извршава програм апоптозе.

Један од механизма који су укључени у процес трансформације и опстанка малигно измењених лимфоцита свакако је и дејство високореактивних слободних радикала. Оксидативни стрес је ситуација у којој је равнотежа између прооксиданаса и антиоксиданаса у ћелији померена на страну прооксиданаса. Створени слободни радикали реагују са незасићеним масним киселинама липида, аминокиселинским ланцима протеина или остацима база и шећера нуклеотида и нуклеинских киселина. Оксидација ових биолошки важних молекула може имати учешћа у настанку бројних патолошких стања, па и малигну болести. И поред бројних доказа о улози оксидативног стреса у индукцији апоптозе и значају који има у настанку хроничне лимфоцитне леукемије, остају неразјашњена многа питања. Још увек није у потпуности идентификован ендегени антиоксидативни капацитет код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије у различитим стадијумима болести.

Сигнални путеви програмиране ћелијске смрти укључују и повећање интрацелуларне концентрације калцијума, активацију протеин киназе C, протеин киназе A, тирозин киназе и продукцију реактивних кисеоничних радикала (ROS). Антиапоптотични Bcl-2 протеин регулише ефлукс калцијума кроз мембрану ендоплазматског ретикулума и повећава капацитет митохондрија за Ca<sup>2+</sup>. Такође, ћелије у којима је bcl-2 прекомерно експримиран имају већи антиоксидативни капацитет. Досадашњи *in vitro* експерименти су показали да Nakwonit и Kogbazol имају дозно зависно цитотоксично дејство на ХЛЛ лимфоците (највеће концентрације изазивају апоптозу код 70% популације), док су контролни мононуклеарни леукоцити значајно



мање осетљиви (значајан проценат апоптотичних ћелија добија се тек при примени изузетно високих доза ових супстанци).

### Циљеви истраживања:

Сврха планираног истраживања је да се утврди:

- да ли постоје разлике у динамици спонтане и индуковане апоптозе лимфоцита оболелих од ХЛЛ и здравих испитаника.
- да се упореде серумске концентрације, као и концентрације у лизатима лимфоцита, слободних радикала (азотмооксида, супероксид радикала, водоник пероксида, малонилдиалдехида) као параметара оксидативног стреса у испитиваним групама.
- Упоредити концентрације слободних радикала (азотмооксида, супероксид радикала, водоник пероксида, малонилдиалдехида) у супернатантима култура лимфоцита оболелих од ХЛЛ и здравих испитаника.
- Утврдити серумске концентрације цитокина у испитиваним групама и корелирати са динамиком апоптозе.
- Утврдити концентрације релевантних цитокина у супернатантима култура лимфоцита у испитиваним групама и корелирати са апоптозом.
- Одређивање антиоксидативног капацитета код оболелих од ХЛЛ што подразумева: одређивање активности ензима прве линије одбране од дејства слободних радикала (супероксид димутаза, глутатион пероксидаза и каталаза), одређивање активности ензима битних у метаболизму глутатиона (глутатион редуктаза и глутатион-S-трансфераза) и одређивање садржаја глутатиона у плазми и лимфоцитима и корелација са апоптозом
- Одређивање повезаности степена клиничког стадијума болести и антиоксидативног капацитета код оболелих од ХЛЛ
- Одређивање повезаности утицаја терапије која се примењује код оболелих од ХЛЛ и антиоксидативног капацитета
- да се утврде механизми дејства Наквонита (Nakwonit) и Корбазола (Korbazol)
  - да ли је апоптоза изазвана овим супстанцама зависна од каспаза и ако јесте, који је пут активације каскаде каспаза ангажован
  - да ли дејство испитиваних супстанци укључује сигналне путеве независне од каспаза
  - да ли ангажовани сигнални путеви укључују промену интрацелуларне концентрације  $Ca^{2+}$
  - да ли испитиване супстанце остварују своје цитотоксично дејство преко повећања продукције азот моноксида и слободних радикала

### Руководилац пројекта:

доц. др Предраг Ђурђевић

### Главни истраживач:

доц. др Предраг Ђурђевић

### Ангажовани истраживачи:

асс. др Иванка Зелен

Сузана Поповић, истраживач- сарадник