

*Arkadiusz Macheta, Katarzyna Radko, Agnieszka Szymczyk, Piotr Klimek, Sylwia Chocholska, Monika Podhorecka

Ocena spontanicznej apoptozy komórek nowotworowych w odniesieniu do czynników prognostycznych przewlekłej białaczki limfocytowej

Assessment of spontaneous apoptosis of neoplastic cells in relation to prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia

Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Lublin
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Anna Dmoszyńska

Streszczenie

Wstęp. Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszym typem białaczki u dorosłych z charakterystyczną akumulacją niedojrzałych funkcjonalnie klonalnych limfocytów B, wykazujących zaburzenia apoptozy.

Cel pracy. Głównym celem badań jest ocena spontanicznej apoptozy komórek białaczkowych otrzymanych z krwi obwodowej pacjentów z CLL i określenie zależności między otrzymanymi wynikami a czynnikami rokowniczymi choroby.

Materiał i metody. Technika cytometrii przepływowej w grupie 22 pacjentów określono odsetek nowotworowych komórek ulegających spontanicznej apoptozie poprzez ocenę ekspresji aktywnej kaspazy-3. Mierzony był także poziom ekspresji białek BAX i BCL-2. Zmiany cytogenetyczne określono metodą FISH. Do poszukiwania zależności między parametrami apoptozy i czynnikami rokowniczymi zastosowane zostały testy statystyczne.

Wyniki. Istnieje korelacja między parametrami spontanicznej apoptozy a limfocytozą we krwi obwodowej pacjentów.

Wnioski. Wzrost limfocytozy koreluje ze spadkiem intensywności apoptozy spontanicznej.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa, apoptoza spontaniczna, czynniki prognostyczne

Summary

Introduction. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of adult leukemias which is characterized by the accumulation of growth arrested clonal B lymphocytes with disorders of apoptosis.

Aim. The main objective of this study is to assess the spontaneous apoptosis of leukemia cells obtained from peripheral blood of CLL patients and to determine the relationship between the results and disease prognostic factors.

Material and methods. In this study, the rate of spontaneous cell death of leukemic cells from 22 patients was examined by active caspase-3 expression using flow cytometry. The levels of BAX and BCL-2 protein expression was also measured. Cytogenetic changes were analyzed by FISH method. To explore the relationship between the parameters of apoptosis and prognostic factors statistical tests were applied.

Results. We detected a significant correlation between parameters of apoptosis and number of lymphocytes in peripheral blood.

Conclusions. The increase of lymphocytosis correlates with decreased intensity of spontaneous apoptosis.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, spontaneous apoptosis, prognostic factors

WSTĘP

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest chorobą układu chłonnego, charakteryzującą się akumulacją dojrzałych, aczkolwiek niekompetentnych lim-

focytów o immunofenotypie CD5+/CD19+/CD23+ z wyraźnie niskim potencjałem apoptotycznym (1, 2). Nowotwór ten występuje głównie u ludzi dorosłych, z częstością zachorowań wzrastającą wraz z

wiekem (3). Etiologia choroby nie została dotąd w pełni wyjaśniona, mimo wielu badań prowadzonych w tym kierunku (4). Przyczyn oporności na obumieranie doszukuje się m.in. w zaburzeniach ekspresji białek rodziny BCL-2. Uwagę zwraca również fakt, że nowotworowe limfocyty w środowisku *in vitro*, odmiennie niż *in vivo*, wykazują charakterystyczną zdolność spontanicznej apoptozy (5).

CEL PRACY

Celem pracy jest ocena spontanicznej apoptozy nowotworowych limfocytów u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową oraz analiza zależności uzyskanych wyników do czynników prognostycznych o uznanym znaczeniu klinicznym w tej chorobie.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w grupie 22 pacjentów z nowo zdiagnozowaną PBL. Wyizolowane z próbek krwi obwodowej w gradiencie stężeń komórki jednójadźrzaste poddano 24-godzinnej hodowli w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Zarówno komórki świeżo wyizolowane z krwi (0 h), jak i po hodowli (24 h) inkubowano według protokołu producenta z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanym przeciwko badanym strukturalom (CD19, CD5, CD23, CD38, ZAP-70, BAX, BCL-2 i kaspaza-3). Analizę i akwizycję danych przeprowadzono z użyciem czterokolorowego cytometru przepływowego FACSCalibur, zliczając 10 tysięcy komórek w każdej próbce. Ustalano bramkę limfocytarną i dalsze badania prowadzono w populacji komórek o immunofenotypie CD19+/CD5+/CD23+. Oceny spontanicznej apoptozy dokonano na podstawie wartości odsetka limfocytów PBL wykazujących ekspresję aktywnej kaspazy-3 po hodowli (w 24 h) oraz stosunku wartości ekspresji białek BCL-2 i BAX (wyrażonych jako MFI – średnia wartość fluorescencji) zaraz po pobraniu materiału (0 h), jak również po dobowej inkubacji komórek (24 h).

W celu określenia nieprawidłowości cytogenetycznych komórek PBL zastosowano technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Wykorzystane zostały sondy wyznaczające regiony zmian cytogenetycznych charakterystyczne dla PBL, tj.: 17p13.1, 11q22.3, 13q13.3+13q34 oraz 12p11.1-q11.1. W wykonanych preparatach, przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, ocenie podlegało 200 jąder komórkowych.

Następnie z wykorzystaniem metod statystycznych i programu Statistica 7.0 poszukiwano współzależności pomiędzy wartościami oznaczonych białek czy ich stosunków a niektórymi czynnikami o uznanym znaczeniu rokowniczym w PBL, tj. stadium zaawansowania klinicznego według Raia, stężeniem dehydrogenazy mleczanowej i β₂-mikroglobuliny, limfocytozą, ekspresją CD38 i ZAP-70 oraz charakterystycznymi zmianami cytogenetycznymi. Do określenia siły korelacji wykorzystano współczynnik rang Spearmana. Analizę po-

równawczą dwóch prób zmiennych niezależnych wykonano przy pomocy testu U Manna-Whitneya.

WYNIKI

Ocena procesu apoptozy spontanicznej

W przypadku odsetka komórek z ekspresją aktywnej kaspazy-3, który w komórkach wyizolowanych ze świeżo uzyskanego materiału jest bliski zeru, po 24-godzinnej inkubacji dowiedziono wyraźnie istotny wzrost odsetka limfocytów CD19+/CD5+/CD23+ wykazujących aktywność tego enzymu, determinującego nieodwracalnie wprowadzenie komórki na szlak śmierci zaprogramowanej. **Badania wykazały istotne statystycznie obniżenie w populacji białaczkowych limfocytów wartości stosunku białek BCL-2/BAX (MFI) po dobowej hodowli, w porównaniu z wartością ww. stosunku oznaczonego w świeżych próbkach krwi obwodowej pacjentów.** Mediana tego stosunku obniżyła się po 24-godzinnej hodowli ponad dwukrotnie, co jest prawdopodobnie efektem w szczególności obniżenia ekspresji białka o działaniu antyapoptotycznym BCL-2.

Ocena korelacji między wyznacznikami apoptozy spontanicznej a wybranymi czynnikami rokowniczymi PBL

W celu określenia wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi zmiennymi przeprowadzono analizę korelacji wymierników apoptozy białaczkowych limfocytów CD19+/CD5+ z czynnikami rokowniczymi w PBL:

- stadium według Rai,
- stężeniem B₂-mikroglobuliny,
- stężeniem dehydrogenazy mleczanowej,
- wartością limfocytozy.

Do opisu siły korelacji dwóch cech wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana. Za istotne statystycznie przyjmowano wyniki, w przypadku których prawdopodobieństwo popełnienia błędu wynosi mniej niż 5%, a więc wtedy, gdy istotność wynosi $p < 0,05$.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała występowanie istotnej, odwrotnej zależności między odsetkiem komórek z ekspresją kaspazy-3 w 24. godzinie hodowli a limfocytozą. Świadczy o tym oznaczony współczynnik korelacji r-Spearmana, który wyniósł -0,595709, przy współczynniku prawdopodobieństwa $p < 0,05$ (tab. 1, ryc. 1).

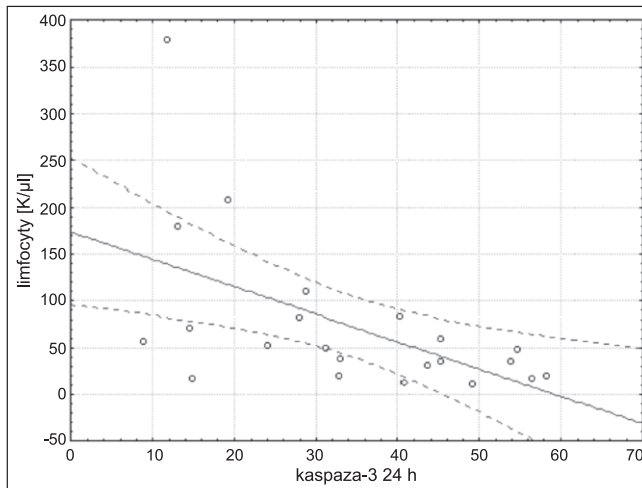
Analiza korelacji wykazała istnienie istotnej korelacji między stosunkiem ekspresji białek BCL-2/BAX w 0. godzinie hodowli a liczbą limfocytów we krwi obwodowej u pacjentów chorych na PBL (ryc. 2). Nie wykazano korelacji między stosunkiem BCL-2/BAX 0 h z innymi czynnikami rokowniczymi (tab. 1, ryc. 3).

Nie stwierdzono natomiast występowania żadnych korelacji między poziomem białek BCL-2/BAX w 24. godzinie hodowli białaczkowych limfocytów CD19+/CD5+ a czynnikami prognostycznymi uznanymi w PBL.

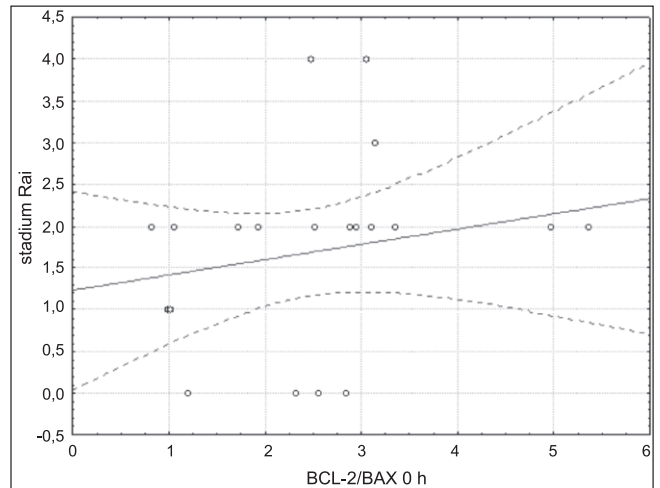
Tabela 1. Korelacja odsetka komórek z ekspresją aktywnej kaspazy-3 oraz stosunku ekspresji białek BCL-2/BAX z czynnikami rokowniczymi.

Porównywane parametry	N-ważnych	R-Spearmana	Poziom p
Kaspaza-3 24 h i β_2 -mikroglobulina	21	-0,232543	NS
Kaspaza-3 24 h i limfocytoza	22	-0,595709	0,003441
Kaspaza-3 24 h i LDH	21	-0,181877	NS
Kaspaza-3 24 h i stadium wg Rai	22	-0,135433	NS
BCL-2/BAX 0 h i β_2 -mikroglobulina	21	0,175496	NS
BCL-2/BAX 0 h i limfocytoza	22	0,449153	0,035996
BCL-2/BAX 0 h i LDH	21	0,284693	NS
BCL-2/BAX 0 h i stadium wg Rai	22	0,382235	NS*
BCL-2/BAX 24 h i β_2 -mikroglobulina	21	-0,134503	NS
BCL-2/BAX 24 h i limfocytoza	22	0,092064	NS
BCL-2/BAX 24 h i LDH	21	-0,040936	NS
BCL-2/BAX 24 h i stadium wg Rai	22	0,029829	NS

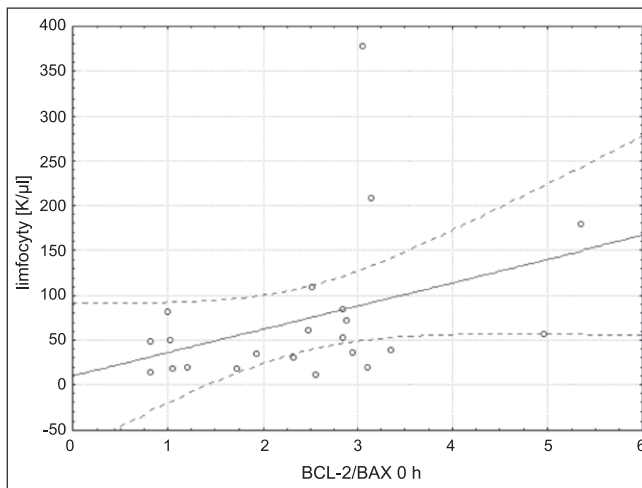
*współczynnik r-Spearmana nie był istotny statystycznie w żadnym przypadku oprócz limfocytozy, chociaż w odniesieniu do stadiów klinicznych według Raia znajdował się na granicy istotności



Ryc. 1. Wykres rozrzutu: ekspresja kaspazy-3 24 h vs. limfocytoza (0,95 Prz. Ufn.).



Ryc. 3. Wykres rozrzutu: stosunek BCL-2/BAX 0 h vs. stadium Rai (0,95 Prz. Ufn.).



Ryc. 2. Wykres rozrzutu: stosunek BCL-2/BAX 0 h vs. limfocytoza (0,95 Prz. Ufn.).

Ocena zależności między wyznacznikami apoptozy spontanicznej a niezależnymi grupami chorych

Ocena porównawcza dwóch niezależnych prób polegała na wykorzystaniu nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya, w celu określenia różnic poszczególnych cech pomiędzy dwoma populacja-

mi. Z wartościami współczynników BCL-2/BAX 0 h i BCL-2 BAX 24 h oraz procentowymi wartościami ekspresji aktywnej kaspazy-3 24 h, na komórkach nowotworowych CD19+/CD5+, porównywano dwie niezależne populacje chorych na PBL, tj.:

- ZAP-70+ i ZAP-70-,
- CD38+ i CD38-,
- wczesne stadium: 1 (0-1 wg Rai) i zaawansowane stadium 2 (2-4 wg Rai),
- zmiany cytogenetyczne o rokowaniu standardowym: delecja 13q, trisomia 12 (jeżeli nie towarzyszą im zmiany o gorszym rokowaniu) lub kariotyp prawidłowy i niekorzystnym: delecja 17p lub 11q.

Obliczenia za pomocą testu U Manna-Whitneya nie wykazały istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami chorych na PBL, bowiem współczynnik prawdopodobieństwa p w żadnym z przypadków nie osiągnął wartości poniżej 0,05 (tab. 2).

DYSKUSJA

Zaburzenia apoptozy limfocytów są powszechnie opisywane w literaturze medycznej jako jeden z głównych determinantów patogenezy przewlekłej białaczki limfocytowej i wielu badaczy stwierdza, że do długowieczności złośliwych komórek B przyczyniają

Tabela 2. Wyniki analizy zależności parametrów apoptozy białaczkowych limfocytów z niezależnymi od siebie grupami pacjentów.

	Porównywane wartości	N-ważnych	Współczynnik p
BCL-2/BAX 0 h	Stadium 1/stadium 2	22	NS
	ZAP-70+/ZAP-70-	21	NS
	CD38+/CD38-	21	NS
	Rokowanie standardowe/niekorzystne	22	NS
BCL-2/BAX 24 h	Stadium 1/stadium 2	22	NS
	ZAP-70+/ZAP-70-	21	NS
	CD38+/CD38-	21	NS
	Rokowanie standardowe /niekorzystne	22	NS
Kaspaza-3 24 h	Stadium 1/stadium 2	22	NS
	ZAP-70+/ZAP-70-	21	NS
	CD38+/CD38-	21	NS
	Rokowanie standardowe/niekorzystne	22	NS

się zakłócenia równowagi między cząsteczkami warunkującymi przeżywalność a cząsteczkami, które determinują obumieranie komórek. Od dawna wiadomo o podwyższonym poziomie ekspresji białka BCL-2 i że o wejściu na szlak śmierci komórki prawdopodobnie współodpowiedzialny jest stosunek antyapoptotycznego białka BCL-2 i drugiego, o przeciwnym charakterze białka BAX (5). Mechanizmy genetyczne i molekularne zaangażowane w rozwój choroby nie są szczegółowo poznane, ale obserwacje sugerują jednoznacznie modyfikację sygnałów przeżycia zaprogramowanej ścieżki prowadzącej do śmierci komórki oraz stymulację proliferacji komórek, co może być zasadniczym patomechanizmem rozwoju przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej (6). Prowadzi się także od wielu lat badania w zakresie czynników prognostycznych oraz predykcyjnych w PBL, obecnie nie ulega wątpliwości ich ważna rola w optymalizacji postępowania terapeutycznego w tym schorzeniu oraz prognozowaniu przebiegu klinicznego chorych. Istotne jest zarówno prognozowanie odpowiedzi na standardową terapię, jak też wyodrębnienie tych pacjentów, u których istniałaby potrzeba wcześniejszego rozpoczęcia leczenia lub też intensyfikacji prowadzonej terapii przeciwnowotworowej (2, 7).

Badania własne obrazujące proces apoptozy komórek CD19+/CD5+/CD23+ dotyczyły aktywacji kaspazy-3 po dobowej hodowli komórek krwi obwodowej. Uzyskane wyniki poddano analizie korelacji z wybranymi czynnikami prognostycznymi. Wykazano obecność odwrotnej współzależności istotnej statystycznie między odsetkiem białaczkowych komórek z ekspresją kaspazy-3 a limfocytozą krwi obwodowej chorych w grupie badanej, natomiast nie stwierdzono korelacji z pozostałymi czynnikami o wartości rokowniczej ani różnic w niezależnych grupach pacjentów. Wyniki badań Dempsey i wsp. (8), w której odsetki limfocytów pacjentów z PBL z ekspresją aktywnej kaspazy-3 porównywano z odset-

kami limfocytów z obecnością tego enzymu u osób z grupy kontrolnej, miały na celu ustalenie różnic w stopniu zachodzenia apoptozy. Dodatkowo pacjenci z PBL zostali pogrupowani w zależności od stadium klinicznego według Bineta – nie wykazano w tym przypadku istotnej różnicy w odsetku komórek z ekspresją aktywnej kaspazy-3 w korelacji ze stadium. Natomiast przy porównaniu próbek osób chorych i zdrowych stwierdzono bardzo wyraźną zależność, gdzie chorzy wykazali niższą ekspresję enzymu w porównaniu z osobnikami zdrowymi. Wyniki badań Goolsby i wsp. (9), prowadzone w grupie chorych na PBL i zdrowych ludzi, polegające na pomiarze m.in. odsetka limfocytów z ekspresją aktywnej kaspazy-3, wykazały, że odsetki te były znacznie podwyższone w komórkach BAX+ w porównaniu z komórkami BAX- lub słabo dodatnimi. W próbkach chorych zaobserwowano po 24-godzinnej inkubacji *in vitro* wzrost intensywności fluorescencji na poziomie od 18- do 51-krotności w porównaniu do próbek analizowanych zaraz po pobraniu materiału.

Wyniki badań własnych dotyczących oznaczeń białek BAX i BCL-2 wykazały istotną różnicę wartości stosunku BCL-2/BAX (MFI) na początku hodowli oraz po dobie inkubacji – mediana tegoż stosunku uległa obniżeniu po 24 h ponad dwukrotnie, co jest prawdopodobnie efektem głównie spadku ekspresji białka BCL-2. Wyniki analizy zależności czynników prognostycznych i stosunku ekspresji analizowanych białek wykazały istnienie korelacji stosunku tych białek z liczbą limfocytów we krwi obwodowej pacjentów. Korelacja BCL-2/BAX ze stadiami zaawansowania klinicznego znalazła się na granicy istotności statystycznej, jednak przekroczyła poziom prawdopodobieństwa 0,05. Nie wykazano zależności z pozostałymi czynnikami prognostycznymi ani różnic między niezależnymi od siebie populacjami chorych, czego dość prawdopodobnym powodem jest zbyt mała grupa pacjentów uwzględnionych w badaniach do niniejszej pracy.

Istnieją opublikowane wyniki badań wykazujące, iż stosunek BCL-2/BAX jest podwyższony w zdecydowanej większości komórek PBL i negatywnie koreluje z intensywnością apoptozy oraz przebiegiem klinicznym choroby, a także opornością na leki cytotatyczne (10, 11). Potwierdzają to badania Peppera i wsp. (12), gdzie u wszystkich chorych stwierdzono wzrost stosunku omawianych białek, sugerując przy tym, iż stosunek ten może być użytecznym wskaźnikiem prognostycznym w kwestii chemiooporności. Kitada i wsp. (13) badali proces spontanicznej apoptozy u chorych nieleczonych wcześniej. Porównywali poziom białek regulujących apoptozę, m.in. kaspazy-3 oraz BCL-2 ze stadiami klinicznymi pacjentów według Raia i innymi parametrami: klinicznymi, jak wiek, obecność zmian narządowych, oraz laboratoryjnymi, jak poziom hemoglobiny, leukocytozy czy liczby płytek. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych korelacji między ekspresją poszczególnych białek oraz stosunku BCL-2/BAX i kryteriami klinicznymi pacjentów. Wśród wyników laboratoryjnych tylko podwyższona leukocytoza charakteryzowała się istnieniem zależności z wysokim poziomem BCL-2 oraz podwyższonym stosunkiem BCL-2/BAX.

WNIOSKI

U chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową wykazano obniżenie stosunku białek BCL-2/BAX oraz wzmożoną ekspresję aktywnej kaspazy-3 w limfocytach CD19+/CD5+ po dobowej hodowli, w porównaniu ze świeżo badanymi próbkami. Dowodzi to, iż komórki białaczkowe w środowisku *in vitro* ulegają spontanicznej apoptozie, regulowanej przez białka z rodziny BCL-2.

Stwierdzono odwrotną korelację między limfocytami i poziomem ekspresji kaspazy-3 w komórkach nowotworowych, z czego wynika, że ze wzrostem liczby limfocytów krwi obwodowej pacjentów spada odsetek komórek apoptotycznych.

Wykazano zależność stosunku ekspresji białek BCL-2/BAX z liczbą limfocytów krwi obwodowej pacjentów – stosunek ten wzrasta wraz ze wzrostem limfocytozy, co sugeruje jego znaczenie prognostyczne.

Nie wykazano różnic w ekspresji kaspazy-3 oraz stosunku BCL-2/BAX w odniesieniu do niezależnych grup pacjentów podzielonych względem stadium klinicznego, rokowania na podstawie badań cytogenetycznych, ekspresji ZAP-70 oraz CD38.

PIŚMIENNICTWO

- Juszczynski P, Warzocha K: Biologia i klinika przewlekłej białaczki limfatycznej. *Onkol Pol* 2001; 4(2): 77-84.
- Wołowicz D: Czynniki rokownicze i predykcyjne w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2009; 40(2): 209-223.
- Montserrat E, Moreno C: Chronic lymphocytic leukemia: a short overview. *Annals of Oncology* 2008; 19(17): 320-325.
- Crowther-Swanepoel D, Houlston R: The molecular basis of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; 94(5): 606-609.
- Podhorecka M: Apoptosis in pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Post Hig* 2004; 58: 236-242.
- Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F: Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2008; 68: 10178-1086.
- Warzocha K: Optymalizacja strategii leczenia pierwszej linii przewlekłej białaczki limfocytowej. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2007; 3: 2.
- Dempsey NC, Leoni F, Ireland HE et al.: Differential heat shock protein localization in chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* 2010; 87(3): 467-476.
- Goolsby Ch, Paniagua M, Tallman M et al.: Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005; 63: 36-46.
- Pepper C, Hoy T, Bentley DP: Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-CLL and are correlated with *in vivo* chemoresistance. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 355-361.
- Joks M, Lewandowski K: Prognostyczne znaczenie polimorfizmów genów białek rodziny BCL-2 u chorych na PBL. *Współczesna Onkol* 2008; 12(4): 162-167.
- Pepper C, Hoy T, Bentley DP: Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with *in vitro* apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1998; 78(4): 553-554.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, et al.: Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. *Blood* 1998; 91(9): 3379-3389.

otrzymano/received: 17.07.2013
accepted/zaakceptowano: 04.09.2013

Adres/address:
*Arkadiusz Macheta
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku SPSK nr 1
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin
tel.: +48 (81) 534-02-14
e-mail: arek.macheta@gmail.com