

APOPTOZA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI BOLESNIKA OBOLELIH OD B-HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE

Predrag Đurđević^{1,2}, Ivanka Zelen¹, Dejan Baskić¹, Suzana Popović¹,
Aleksandar Đukić^{1,2}, Violeta Irić-Ćupić^{1,2}, Nebojša Arsenijević¹

¹Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, ²Interna klinika KC Kragujevac

APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS

Predrag Djurdjevic^{1,2}, Ivanka Zelen¹, Dejan Baskic¹, Suzana Popovic¹,
Aleksandar Djukic^{1,2}, Violeta Iric-Cupic^{1,2}, Nebojša Arsenijević¹

¹Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia, ²Clinic of Internal Medicine, CC Kragujevac

SAŽETAK

Uvod: B-hronična limfocitna leukemija je progresivna maligna bolest koju karakteriše nakupljanje morfološki zrelih, ali imunološki nekompetentnih limfocita u kostnoj srži, limfnim žlezdama, slezini i drugim organima.

Cilj: Cilj istraživanja bio je određivanje spontane i indukovane apoptoze maligno izmenjenih limfocita in vitro.

Materijali i metode: Limfociti periferne krvi svih ispitanika dobijani su korišćenjem gustinskog gradijenta (Lymphoprep) i metodom izdvajanja monocita iz populacije mononukleara lepljenjem za plastiku u plastičnim Petri šoljama. Spontana apoptoza limfocita određivana je neposredno posle izdvajanja limfocita (0. sat), kao i posle inkubacije u trajanju od 24 sata i to primenom fluorescentne mikroskopije uz korišćenje boje etidijumbromid - akridinoranž. Indukovana apoptoza limfocita određivana je in vitro primenom metode MTT-a i to posle inkubacije u trajanju od 24 sata u prisustvu različitih koncentracija cikloheksimida, hlorambucila i deksametazona.

Rezultati: Istraživanje je pokazalo da je spontana apoptoza limfocita veća kod bolesnika obolelih od B-hronične limfocitne leukemije nego u kontrolnoj grupi i to kako neposredno po izolaciji limfocita, tako i posle inkubacije limfocita u trajanju od 24 sata. Indukovana apoptoza limfocita najveća je u grupi obolelih od B-hronične limfocitne leukemije B i C stadijuma bolesti, manja u grupi obolelih od hronične limfocitne leukemije A stadijuma bolesti klasifikovane po Binet-u, a najmanja u kontrolnoj grupi.

Zaključak: Limfociti bolesnika obolelih od B-HLL-a su podložniji spontanoj i indukovanoj apoptozi nego limfociti zdravih ispitanika in vitro. Progresija bolesti praćena je povećanjem procenta apoptotičnih limfocita posle inkubacije od 24 sata u prisustvu različitih koncentracija cikloheksimida, hlorambucila i deksametazona.

Cljučne reči: hronična limfocitna leukemija, apoptoza

ABSTRACT

Introduction: B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a progressive malignant disease characterized by proliferation and accumulation of the immune incompetent lymphocyte clones within the bone marrow, lymph nodes, spleen as well as within other organs. Aim: The aim of this research was to determine spontaneous and induced apoptosis of the malignant peripheral blood lymphocytes.

Materials and methods: The peripheral blood lymphocytes were isolated from patients and healthy volunteers by using the density gradient (Lymphoprep) and method for extracting monocytes from the mononuclear cells with fixation to the surface of the plastic Petri dishes. Spontaneous lymphocyte apoptosis was determined immediately after lymphocyte isolation as well as after 24 - hour incubation by using the fluorescent microscopy and acridine orange/ethidium bromide double staining. Induced apoptosis was determined after 24 hours of incubation in the presence of different concentrations of cycloheximide, chlorambucil and dexamethazone by using the MTT assay.

Results: Spontaneous lymphocyte apoptosis is higher in B-chronic lymphocytic leukemia patients than in the control group right after the isolation of lymphocytes as well as after 24 - hour cultivation in vitro. Induced apoptosis of the peripheral blood lymphocytes is highest in the patients with advanced disease, lower in the patients with earlier stage of B-CLL and lowest in the healthy individuals.

Conclusions: In vitro B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes are more susceptible to spontaneous and induced apoptosis than the control group lymphocytes. Induced apoptosis of the peripheral blood lymphocytes increases with the progression of the disease.

Key words: B-cell chronic lymphocytic leukemia, apoptosis

UVOD

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je maligna bolest hematopoeznog tkiva koja nastaje proliferacijom i akumulacijom klonalnih malih, naizgled zrelih, imunološki nekompetentnih limfocita u kostnoj srži, limfnim nodusima, slezini i drugim organima. HLL je u više od 95% porekla B limfocita, dok je T-HLL veoma retka forma bolesti i javlja se u 2-5% slučajeva (1). To je najčešći oblik leukemije u zapadnoj civilizaciji i čini negde oko 25-30% svih leukemija. Obično se bolest javlja između 60. i 80. godine života. I pored velikog napretka u razumevanju genetike i biologije same bolesti, kao i novih terapijskih modaliteta, B-HLL je još uvek neizlečiva bolest (2, 3). Klinički tok je veoma heterogen i nepredvidiv varirajući između veoma agresivne bolesti sa prosečnim preživljavanjem manjim od dve godine i, na drugoj strani, sporoprogredirajuće bolesti koja traje i više od 20 godina (4).

Etiopatogeneza bolesti još uvek nije rasvetljena. U B-HLL postoji progresivna akumulacija leukemijskih ćelija koja ne nastaje samo zbog povećane proliferacije, nego zbog produženog života limfocita. Smatra se da je produžen životni vek limfocita posledica iregularne apoptoze za koju je najodgovornija povećana ekspresija pojedinih protoonkogenih. U više od 85% limfocita nađene su visoke koncentracije bcl-2 proteina koji je produkt bcl-2 gena i to bez rearanžmana gena. Ova pojava bi, eventualno, mogla da se objasni postojanjem nekih drugih mehanizama pored rearanžmana gena, kao što su hipometilacija DNK (5), koja povećava nivo bcl-2 proteina u B-HLL limfocitima. Bcl-2 protein ima antiapoptotičnu ulogu i mogao bi da bude važan u patogenezi B-HLL-a, ali nije i jedini koji se dovodi u vezu sa nastankom B-HLL-a. Naime, protoonkogeni bcl-1, bcl-3 i bcl-6 takođe se često okrivljuju da imaju ulogu u patogenezi B-HLL-a. Kod pojedinih bolesnika postoji translokacija 11:14 kojom se dovode u neposredni kontakt protoonkogen bcl-1 i gen za teški lanac imunoglobulina, dok se u oko 10% bolesnika sreće translokacija 14:19, kojom je bcl-3 protoonkogen u neposrednom kontaktu sa genom za teške lance imunoglobulina (6). Osim toga, uloga alteracije tumor supresorskih gena u patogenezi B-HLL-a još uvek nije potpuno rasvetljena. Kakva je uloga inaktivacije tumor supresorskih gena p53 i ataksia-teleangiektazija gena u patogenezi B-HLL-a još se pouzdano ne zna, ali je poznato da su ove genetske alteracije važni prognostički faktori - bolesnici sa ovim alteracijama poseduju progresivniji tok bolesti i veću rezistenciju na primenjenu terapiju (7, 8, 9).

Apoptoza, drukčije nazvana i programirana ćelijska smrt, suštinski predstavlja kontrolisanu razgradnju

ćelija. Postoji puno načina za umiranje, ali se, u osnovi, sve smrti mogu podvesti pod dva osnovna tipa: nekroza i apoptoza. Apoptoza je fiziološki proces kojim se umiruća ćelija odvajava od susednih ćelija gubeći specijalizovane membranske strukture kao što su mikrovili i dezmozomi. Baš na tim mestima nastaje pupljenje ćelijske membrane sa formiranjem vezikula. Istovremeno postoje inverzija intaktne membrane, izlaganje fosfatidil-serina na spoljašnjoj strani citoplazmatske membrane, ireverzibilna kondenzacija citosola i organela, kondenzacija hromatina, fragmentacija nukleusa i degradacija DNK (10, 11, 12). Iako drastične, ove promene odigravaju se na nivou ćelije, a ne na nivou tkiva, te ne dolazi do oslobađanja potencijalno štetnog intracelularnog sadržaja pa monocit/makrofagne ćelije mogu da prepoznaju ovako izmenjene ćelije, da ih fagocituju i na bezbedan način uklone. U procesu apoptoze mogu učestvovati brojni signalni putevi. U osnovi, bez obzira na početni stimulus, postoje dva mehanizma indukcije apoptoze: pozitivna indukcija nakon vezivanja liganda za membranske aporeceptore i negativna indukcija zbog prestanka supresije (13). Oba puta aktiviraju cistein proteaze (kaspaze) odgovorne za kontrolisanu razgradnju ćelije.

Poznato je da većina neoplastičnih B-HLL limfocita pokazuje duži život in vivo. Iako se tačan mehanizam ove pojave ne zna, kao mogući faktori rasta okrivljuju se interleukin-4 (14, 15), interleukin-6 (16), interleukin-8 (16) and interferons α and γ (17, 18) ali se ni uloga oksidativnog stresa ne odbacuje (19).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su: da se odredi spontana apoptoza limfocita periferne krvi bolesnika obolelih od B-HLL-a, neposredno po izolaciji ćelija i posle inkubacije u trajanju od 24 sata, da se odredi apoptoza limfocita indukovana različitim koncentracijama cikloheksimida, hlorambucila i deksametazona i da se ispita povezanost apoptoze i stadijuma bolesti.

BOLESNICI I METODE

Ispitivana populacija

Istraživanje predstavlja komparativnu kliničko-eksperimentalnu studiju koju je odobrio Etički komitet KC Kragujevac. Poštujući načela Helsinške deklaracije, pre uključanja u studiju, svaki ispitanik je dao pisani pristanak. U studiju je bilo uključeno ukupno 50 bolesnika obolelih od B-hronične limfocitne leukemije kojima je dijagnoza utvrđena na osnovu kliničkih, laboratorijskih i imunofenotipskih parametara definisanih po preporukama National Cancer Institute

(NCI) - Working Group (20). Bolesnici su razvrstani u stadijume A, B i C u skladu sa Binet-ovom klasifikacijom (21). Ispitanici eksperimentalne grupe su bili podeljeni u dve osnovne grupe:

A. Trideset bolesnika obolelih od B-HLL-a koji su se nalazili u A stadijumu bolesti klasifikovane po Binet-u (16 muškarca i 14 žena prosečne starosti 68,7 godina).

B. Dvadeset bolesnika obolelih od B-HLL-a koji su se nalazili u stadijumima B i C bolesti klasifikovane po Binet-u (12 muškaraca i 8 žena prosečne starosti 64,6 godina).

Većina bolesnika obolelih od B-HLL-a bili su novodijagnostikovani bolesnici, a oni kojima je dijagnoza ranije postavljena nisu primali nikakvu antileukemijsku terapiju najmanje 6 meseci pre ulaska u studiju.

Kontrolnu grupu sačinjavalo je 30 zdravih ispitanika slične polne i starosne strukture (16 muškaraca i 14 žena prosečne starosti 65,3 godine).

U istraživanje nisu bili uključeni ispitanici koji su imali pozitivan biohumoralni sindrom zapaljenja (povišene vrednosti sedimentacije eritrocita, fibrinogena i C-reaktivnog proteina), oni koji boluju od bolesti ili stanja koji bi mogli da utiču na rezultate istraživanja, (kardiovaskularne bolesti, metabolički poremećaji, neurološke bolesti i dr), kao i oni koji imaju pozitivnu anamnezu o korišćenju medikamenata (ciklosporin A, kortikosteroidi idr.) koji mogu da menjaju vrednosti ispitivanih parametara.

Metode

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

Izdvajanje mononuklearnih ćelija

Mononuklearni leukociti dobijani su iz venske krvi, prema široko korišćenoj metodi Boyum-a (22, 23). Uzimano je 10 ml krvi u heparinizovane plastične brizgalice (50 ij. heparina po 1ml krvi). Krv je prenetu u epruvete (12ml) i centrifugirana 10 minuta brzinom 400 g 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 800 g na sobnoj temperaturi.

Paster-ovom pipetom pokupljeni mononuklearni leukociti (izdvojeni u sloju na granici plazme i limfoprepa), suspendovani su u medijumu Haemacel-u (Haemacel, Jugoremedija, Zrenjanin), kome je dodato

200 ij./ml penicilina (Jugocillin, Galenika, Zemun) i 200 mg/ml streptomocina (Streptomycin, Galenika, Zemun). Ćelije su prane tri puta po 5 minuta centrifugiranjem u istom medijumu brzinom 400 g na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je suspendovan u medijumu i u suspenziji je određivana njihova vijabilnost i kontaminacija polimorfonuklearnim leukocitima.

Izdvajanje limfocita

Monociti su izolovani iz mononuklearne ćelijske suspenzije, dobijene na već opisani način, zahvaljujući sposobnosti monocit/makrofaga da atheriraju na staklo ili plastiku po metodi Kennedy i Reynolds-a (24). Suspenzija mononuklearnih leukocita centrifugirana je 10 minuta brzinom 400 g na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je resuspendovan u 5ml medijuma RPMI 1640 (Sigma, Germany), kome je dodato 200 ij./ml penicilina, 200 mg/ml streptomocina i 0.05ml/ml fetalnog telećeg seruma (Heat-inactivated Foetal Bovine Serum - FBS, Sigma, Germany), a zatim Pasterovom pipetom prenet u Petri-jevu šolju (78.5cm² Petri dishes, Miles Laboratories, Naperville), prethodno obloženu FBS-om. Inkubacija je trajala 1 sat na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Po završenoj inkubaciji sadržaj Petri šolje (neadherisale ćelije-limfociti) je odmliven i u suspenziji limfocita je određivan njihov broj i vijabilnost, kao i kontaminacija monocit / makrofnim ćelijama.

Apoptoza limfocita

Posle izdvajanja limfocita periferne krvi određivana je njihova spontana i indukovana apoptoza.

Spontana apoptoza

Spontana apoptoza limfocita određivana je *ex vivo* tj. odmah po njihovoj izolaciji (tzv. 0. sat) i posle kultivacije *in vitro*, u trajanju od 24 sata, u medijumu RPMI 1640 (Sigma, Germany), kome je dodato 200 ij./ml penicilina, 200 mg/ml streptomocina i 0.05 ml/ml fetalnog telećeg seruma (Heat-inactivated Foetal Bovine Serum-FBS, Sigma, Germany), na temperaturi 37°C i uz prisustvo 5% CO₂. Za određivanje spontane apoptoze korišćena je modifikovana metoda Baskića i saradnika (25), uz dvostruko bojenje limfocita akridin-oranž/etidijum bromidom uz primenu fluorescentne mikroskopije. Naime, akridin-oranž preuzimaju i žive i nežive ćelije, uz emitovanje zelene fluorescencije, dok etidijum-bromid preuzimaju samo mrtve ćelije uz emitovanje crvene fluorescencije. Uzimano je po 1 µl boje (100 µg/ml akridin-oranž i 100 µg/ml etidijum bromida u destilovanoj vodi) i 9 µl suspenzije limfocita gustine 0,5x10⁶/ml. Suspenzija je odmah posmatrana na fluorescentnom mikroskopu (Polywar, Reinhard

Jung) na uveličanju 400x i u svakom uzorku ćelija prebrojavano je bar po 300 ćelija.

Indukovana apoptoza

Indukovana apoptoza limfocita periferne krvi određivana je *in vitro*, posle kultivacije u trajanju od 24 sata na temperaturi 37°C i uz prisustvo 5% CO₂, u medijumu RPMI 1640 (Sigma, Germany), kome je dodato 200 ij/ml penicilina, 200 mg/ml streptomcina i 0.05 ml/ml fetalnog telećeg seruma (Heat-inactivated Foetal Bovine Serum-FBS, Sigma, Germany) uz dodatak različitih koncentracija cikloheksimida (Cycloheximide, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), hlorambucila (Chlorambucil, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) i deksametazona (Dexamethasone, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Indukovana apoptoza određivana je metodom Janjića i saradnika (26), uz korišćenje 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium bromida - MTT test citotoksičnosti.

MTT test citotoksičnosti

Test se izvodi u mikrotitar pločama (MTP) sa ravnim dnom. Svaki uzorak, bilo ispitivane, bilo kontrolne grupe, je rađen u triplicatu.

Test se izvodi u finalnoj zapremini od 200 µl. Neophodno je napraviti suspenziju limfocita tako da njihova koncentracija bude 4x10⁶/ml jer se u svaki bunarčić dodaje po 100 µl ćelija i 100 µl različitih koncentracija cikloheksimida (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml), hlorambucila (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml i 1,56 µg/ml) i deksametazona (10⁻⁶M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M). Zbog efekta razblaženja postignuta je finalna koncentracija ćelija u svakom bunarčetu od 2 x 10⁶/ml. Po završetku inkubacije lagano se odlije medijum iz svakog bunarčeta i odmah sipa po 100 µl radnog rastvora MTT-a. Inače, štok MTT je koncentracije 5 mg/ml PBS-a, čuva se na + 4°C, uvijen u foliju, dok se za izvođenje testa koristi radni rastvor koji se dobija iz štoka MTT-a i to razblaživanjem u odnosu 1:10 u RPMI/10%FCS. Neophodno je radni rastvor zagrejati na temperaturu 37°C. Inkubacija traje 4 sata na temperaturi 37°C i uz prisustvo 5% CO₂.

Po završetku inkubacije odlije se sav MTT i doda 150 µl čistog DMSO. Reakciona smeša stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi uz mešanje na šejkeru (low speed).

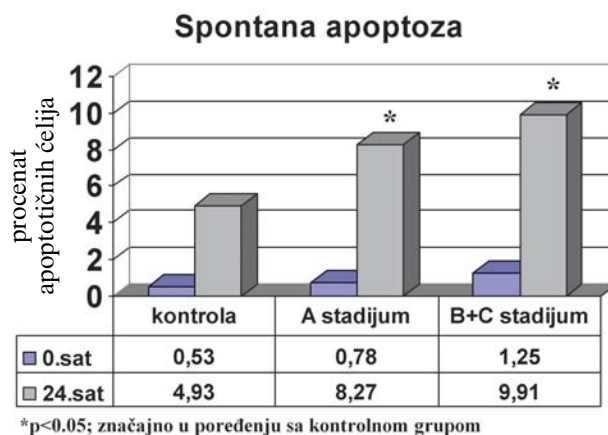
Optička gustina (OD) se čita na sobnoj temperaturi na 550 nm (Multiplate Reader 230S, Organon) uz primenu opsteg pravila: što više živih ćelija jača boja i veća OD i obrnuto.

Statistička analiza

Statistička obrada rezultata izvršena je pomoću komercijalnog programskog paketa SPSS (verzija 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Normalnost raspodele podataka evaluirana je Kolmogorov-Smirnov-im testom, Student-ovim t-testom, a zatim je retestirana Hi-kvadrat testom. Studentov t-test je korišćen za parametre sa normalnom distribucijom podataka, a Mann-Whitney U-test i Kruskal-Wallis-ov test korišćeni su za komparaciju između dve ili više grupa neparametrijskih podataka. P - vrednosti <0.05 su smatrane statistički značajnim.

REZULTATI

Istraživanje je pokazalo da je spontana apoptoza limfocita neposredno posle izolacije (0.sat) veća u grupi bolesnika obolelih od B-HLL-a nego u kontrolnoj grupi (A stadijum vs kontrolna grupa, 0.79 ± 0.74% vs 0.53 ± 0.18%, B+C stadijumi vs kontrolna grupa, 1.25 ± 0.71% vs 0.53 ± 0.18%), mada statističkom analizom nije detektovana i značajna razlika (p=0.198) u procentu apoptotičnih ćelija među testiranim grupama (slika 1.). Očigledno je i da je procenat apoptotičnih limfocita odmah po njihovoj



Slika 1. Spontana ex vivo i in vitro apoptoza limfocita periferne krvi.

Istraživanje je pokazalo da je spontana apoptoza izolovanih limfocita odmah po njihovoj izolaciji (0. sat) veća u grupi bolesnika obolelih od B-HLL-a nego u kontrolnoj grupi, ali bez statističke značajnosti. Međutim, posle kultivacije u trajanju od 24 sata registrovano je statistički značajno povećanje procenta apoptotičnih ćelija u grupi obolelih od B-HLL-a svih stadijuma bolesti u poređenju sa kontrolnom grupom. Procenat apoptotičnih limfocita korelira sa progresijom bolesti - sa napredovanjem bolesti uvećava se procenat apoptotičnih limfocita, ali bez statističke signifikantnosti.

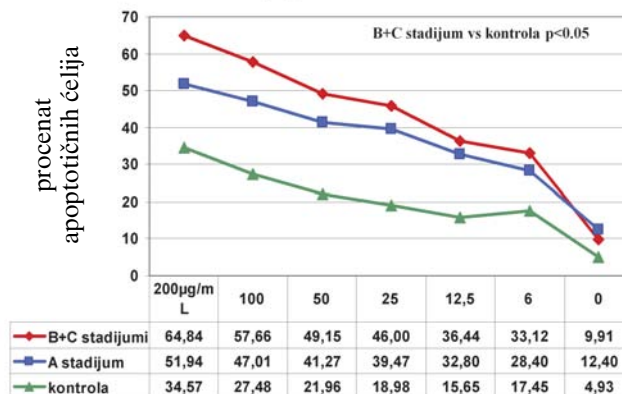
izolaciji u korelaciji sa progresijom bolesti - sa napredovanjem bolesti uvećava se broj apoptotičnih limfocita (stadijum A vs stadijumi B+C, $0.79 \pm 0.74\%$ vs $1.25 \pm 0.71\%$), ali takođe to uvećanje nije statistički značajno ($p=0.734$).

Tokom istraživanja određivan je i procenat apoptotičnih limfocita posle inkubacije u medijumu u trajanju od 24 sata (slika 1.). Rezultati istraživanja su pokazali da tokom inkubacije limfocita u medijumu u trajanju od 24 sata, limfociti obolelih od B-HLL-a pokazuju statistički značajno veći procenat apoptotičnih ćelija nego u kulturi limfocita zdravih ispitanika (stadijum A vs kontrolna grupa, $8.39 \pm 3.97\%$ vs $4.93 \pm 1.28\%$, $p<0.05$; stadijumi B+C vs kontrolna grupa, $9.31 \pm 5.28\%$ vs $4.93 \pm 1.28\%$, $p<0.05$). Procenat apoptotičnih limfocita posle 24 sata inkubacije je u skladu sa progresijom bolesti. Naime, limfociti obolelih od B-HLL-a u stadijumima B+C bolesti, posle inkubacije u trajanju od 24 sata, pokazuju veći procenat apoptotičnih ćelija u poređenju sa obolelim od B-HLL-a u stadijumu A ($9.31 \pm 5.28\%$ vs $8.39 \pm 3.97\%$). Ipak, statističkom analizom, pokazano je da ovo uvećanje procenta apoptotičnih limfocita među različitim stadijumima bolesti nije statistički značajno ($p=0.58$).

Pored spontane, određivana je i indukovana apoptoza limfocita. Kao induktori apoptoze korišćeni su cikloheksimid, hlorambucil i deksametazon. Pri primeni različitih koncentracija cikloheksimida kao induktora apoptoze, istraživanje je pokazalo da je procenat apoptotičnih ćelija najveći u grupi bolesnika sa uznapredovalom bolešću (B+C stadijumi), da je nešto manji kod bolesnika obolelih od B-HLL-a koji su u A stadijumu bolesti, dok je u kontrolnoj grupi procenat apoptotičnih ćelija najmanji. Sa opadanjem koncentracije cikloheksimida smanjuje se i procenat apoptotičnih ćelija (slika 2.). Primenom statističke analize potvrđeno je da je procenat apoptotičnih ćelija pri primeni različitih koncentracija cikloheksimida značajno veći u grupi obolelih od B-HLL-a u stadijumima B+C u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0.027$), dok te značajnosti nema pri poređenju obolelih u A stadijumu i kontrolne grupe ($p=0.116$). Takođe, nije registrovano ni postojanje statistički značajne razlike procenta apoptotičnih ćelija među ispitivanim grupama obolelih od B-HLL-a ($p=0.971$).

Gotovo identični rezultati su dobijeni pri određivanju procenta apoptotičnih ćelija inkubiranih limfocita pri različitim koncentracijama hlorambucila. Naime, procenat apoptotičnih limfocita je najveći u grupi bolesnika sa uznapredovalom bolešću (B+C stadijumi), manji u grupi bolenika u A stadijumu B-

Indukovana apoptoza - cikloheksimid

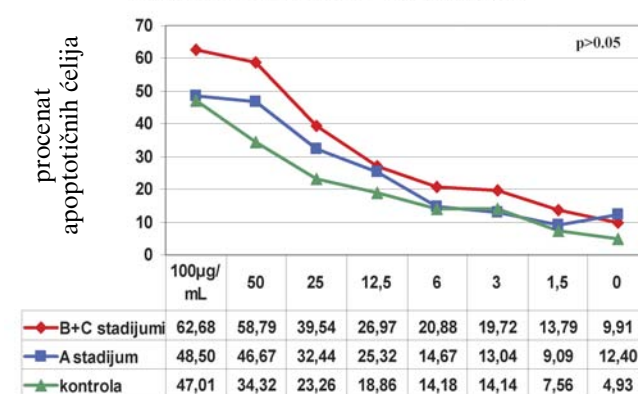


Slika 2. Indukovana apoptoza limfocita primenom cikloheksimida.

Tokom kultivacije limfocita periferne krvi u prisustvu različitih koncentracija cikloheksimida registruje se statistički značajno veći procenat apoptotičnih ćelija u grupi obolelih od B-HLL-a u stadijumima B+C u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0.027$), dok se među ostalim grupama ne beleži statistička značajnost. Sa smanjivanjem doze cikloheksimida opada i procenat apoptotičnih ćelija, pa se može reći da postoji dozna zavisnost koncentracije cikloheksimida i procenta apoptotičnih ćelija.

HLL-a, dok je najmanji u kontrolnoj grupi (slika 3.). Primenom statističke analize nije registrovano postojanje značajne razlike procenta apoptotičnih ćelija među testiranim grupama ($p=0.295$).

Indukovana apoptoza - hlorambucil

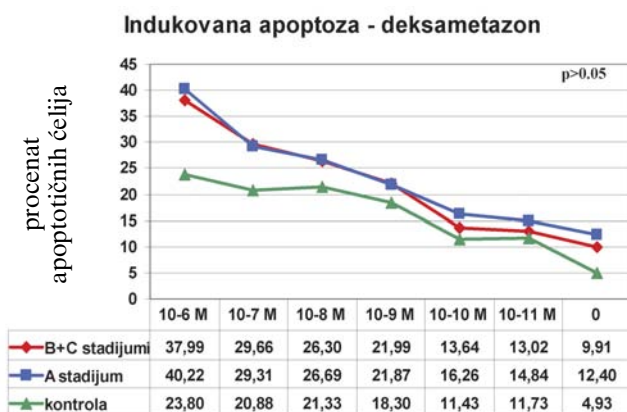


Slika 3. Indukovana apoptoza limfocita primenom hlorambucila.

Iako je procenat apoptotičnih limfocita inkubiranih u prisustvu različitih koncentracija hlorambucila veći u bolesnika obolelih od B-HLL-a, ne registruje se značajnost razlike ($p=0.295$). Sa smanjivanjem koncentracije hlorambucila smanjuje se i razlika procenta citotoksičnosti među testiranim grupama.

Smanjivanjem koncentracije hlorambucila, u kulturi limfocita se smanjuje i procenat apoptotičnih ćelija.

Tokom inkubacije limfocita ispitivanih grupa *in vitro* u prisustvu različitih koncentracija deksametazona zabeležen je veći procenat apoptotičnih ćelija kod bolesnika obolelih od B-HLL-a, bez obzira da li su u početnom ili odmaklom stadijumu, u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 4.), ali bez postojanja statistički značajne razlike



Slika 4. Indukovana apoptoza limfocita primenom deksametazona.

Istraživanje je pokazalo da ne postoji statistički značajna razlika u procentu apoptotičnih limfocita kultivisanih u prisustvu različitih koncentracija deksametazona. Sa smanjivanjem koncentracije deksametazona smanjuje se i razlika u procentu apoptotičnih ćelija među testiranim grupama.

($p=0.49$). Očigledno je da skoro i nema razlike u procentu apoptotičnih ćelija limfocita u grupi obolelih od B-HLL-a (A stadijum vs B+C stadijumi, $p=0.93$). Sa smanjivanjem koncentracije deksametazona smanjuju se i razlike u procentu apoptotičnih ćelija među testiranim grupama.

DISKUSIJA

B-HLL je bolest koju karakteriše progresivna akumulacija imunološki nezrelih limfocita koji uglavnom ne proliferišu i koji su u G_0 fazi ćelijskog ciklusa (95% ćelija). Akumulacija neoplastičnih limfocita može da nastane kao posledica ubrzane proliferacije malignih limfocita, defektne apoptoze ili usled postajanja oba procesa. Iako je poznato da maligni limfociti imaju veći proliferativni potencijal nego zdravi limfociti (27), koji čak korelira sa kliničkim stadijumom i vremenom udvostručavanja broja limfocita (28), ipak, danas u nauci prevladava mišljenje da ekspanzija malignog kлона nastaje uglavnom kao posledica poremećaja apoptoze limfocita *in vivo* (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Stoga je i

ovo istraživanje bilo usmereno ka utvrđivanju spontane i indukovane apoptoze limfocita periferne krvi.

Istraživanje je pokazalo da je spontana apoptoza izolovanih limfocita periferne krvi odmah po njihovoj izolaciji (0. sat) veća u grupi bolesnika obolelih od B-HLL-a nego u grupi zdravih ispitanika, ali bez postojanja statistički značajne razlike. Međutim, tokom inkubacije limfocita u medijumu u trajanju od 24 sata limfociti obolelih od B-HLL-a stadijuma B+C pokazuju statistički značajno veći procenat apoptotičnih ćelija nego u kulturi limfocita zdravih ispitanika. U literaturi se sreću različiti podaci o spontanoj apoptozi malignih limfocita u B-HLL-u. Tako, u studiji Beswick-a i saradnika (36), takođe nije uočena značajna razlika u spontanoj apoptozi malignih limfocita u B-HLL-u, mada je apoptoza limfocita određivana posle 18 sati inkubacije, uz korišćenje drugih metoda određivanja apoptoze - merenjem ekspresije fosfatidil-serina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane i aktivnosti kaspaze-3 u limfocitima. Na drugoj strani, Lin i saradnici su, određivanjem aktivnosti kaspaze-3, mada u mononuklearima periferne krvi, pokazali da je spontana apoptoza značajno veća u bolesnika obolelih od B-HLL-a nego u zdravih ispitanika (27). Razlike u rezultatima studija najverovatnije su posledica korišćenja različitih metoda detekcije apoptoze, kao i dužine inkubacije limfocita *in vitro*, ili pak, razlika u selekciji bolesnika obolelih od B-HLL-a. Osim toga, na procenat apoptotičnih ćelija može da utiče i broj kultivisanih B limfocita *in vitro*. Pokazalo se da se sa povećanjem broja B-HLL limfocita u kulturi, smanjuje i procenat apoptotičnih ćelija (37). Moguće objašnjenje ove pojave moglo bi biti autokrino i parakrino dejstvo antiapoptotičnih faktora koje proizvode B-HLL limfociti (IL-4, IL-6, IL-8 i dr.) ili međućelijske interakcije između samih B limfocita.

Rezultati naše studije su naizgled malo zbunjujući. Naime, polazeći od činjenice da je smanjenje apoptoze malignih limfocita *in vivo* osnovni patogenetski mehanizam u nastanku bolesti kako je, onda, povećana apoptoza neoplastičnih limfocita *in vitro*? Iako su istraživanja u ovoj oblasti veoma intenzivna, još uvek se mnogo toga ne zna. Bilo je pokušaja da se što više simuliraju *in vivo* uslovi i da se tada određuje apoptoza limfocita. Tako je kulturama limfocita dodavan autologi serum, koji je pokazao antiapoptotično dejstvo na maligne B limfocite obolelih od B-HLL-a, dok se slična pojava nije uočila na B limfocitima zdravih ispitanika (37). Preciznije, B limfociti zdravih ispitanika ne pokazuju promenu u procentu apoptotičnih ćelija dodatkom autologog seruma, dok neoplastični B-HLL limfociti, dodavanjem autologog seruma, smanjuju značajno procenat apoptotičnih

ćelija. To bi moglo da ukaže na prisustvo antiapoptotičnih faktora u serumu obolelih od B-HLL-a koji se ne nalaze u serumu zdravih ili na drukčije reagovanje malignih B limfocita na uobičajene stimulse prisutne u serumu. Veoma je interesantno i da, sa napredovanjem bolesti, raste procenat apoptotičnih ćelija *in vitro*. Slična pojava zabeležena je i kod pojedinih limfoma (38). Objašnjenje ove pojave se još uvek ne zna, ali moguće je da je povećanje stope apoptoze sa napredovanjem bolesti u korelaciji sa povećanom proliferacijom malignih B limfocita (37).

Do danas nisu rasvetljeni svi mogući patogenetski mehanizmi koji su razlog promenjene apoptoze. Osnovna dilema istraživača je da li rezistencija na apoptozu *in vivo* nastaje kao posledica genetskih ili epigenetskih alteracija u samim B-HLL limfocitima ili je posledica spoljašnjih signala koje maligni limfociti primaju iz mikrookoline ili pak postoje obe mogućnosti. Većina B-HLL limfocita poseduje visoku ekspresiju Bcl-2 proteina koji ima antiapoptotično dejstvo. Ne zna se tačan mehanizam koji dovodi do povećane ekspresije Bcl-2, mada se za to okrivljuje više hipometilacija nego rearanžman Bcl-2 gena (39). Kontrolišući oslobađanje citohroma c iz mitohondrija, Bcl-2 uglavnom modulira unutrašnji put apoptoze. Postoje i mišljenja da Bcl-2, u izvesnim uslovima, kontroliše i osetljivost "receptora smrti" na dejstvo specifičnih liganada i tako modulira i spoljašnji put apoptoze (40). Antiapoptotičnu ulogu imaju i drugi proteini Bcl-2 familije ekprimirani na B-HLL limfocitima, kao što su Bcl-X_L, Mcl-1, BAG-1 (pojačava antiapoptotični efekat Bcl-2), dok Bax, Bak i BAD proteini imaju proapoptotičnu funkciju (27). Povećanje odnosa Bcl-2/Bax je u korelaciji sa poremećenom apoptozom B limfocita B-HLL-a (41). Povećan odnos Bcl-2/Bax pronađen je na B-HLL limfocitima prethodno lečenih bolesnika i to naročito kod onih kod kojih je nastala rezistencija na lekove, pa se smatra da je lečenje praćeno selekcijom potklonova koji imaju veliki odnos Bcl-2/Bax (42). Smanjenje odnosa Bcl-2/Bax povećava osetljivost B-HLL limfocita prema lekovima *in vivo* i *in vitro* (40). Razlog poremećenog odnosa Bcl-2/Bax nije samo povećana ekspresija Bcl-2 na B-HLL limfocitima, nego i smanjena ekspresija Bax. Naime, u B-HLL limfocitima česte su mutacije Bax gena koje vode gubitku ekspresije Bax proteina ili ekspresiji funkcionalno inaktivnog Bax proteina (40).

B-HLL limfociti imaju konstitutivno aktiviranu i fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI-3K), koja delujući na fosfatidilinozitol, stvara inozitol-lipidne produkte, neophodne za brojne intraćelijske transdukcije signala (33). Ovaj enzim aktivira serin-treonin kinazu AKT (poznatu i kao protein kinazu B), koja je veoma važna

za kontrolu ćelijskog ciklusa. Naime, pod dejstvom Akt kinaze nastaje fosforilacija Bcl-2, inhibicija kaspaze 9 (43) i aktivacija nuklearnog faktora-kapa B (44). Dejstvom IL-4 na B-HLL limfocite aktivira se PI-3K, čime započinje signalna kaskada, sa posledičnom povećanom aktivacijom PKC, što inhibira apoptozu (33). I drugi citokini (IL-2, IL-6, TNF-alfa, IL-13) ostvaruju svoje dejstvo preko PI-3K, dovodeći do inhibicije apoptoze malignih B-HLL limfocita (45, 46, 47, 48). Ovo je moguće i objašnjenje pojave da B-HLL limfociti pokazuju veći procenat apoptotičnih ćelija nego limfociti zdravih ispitanika *in vitro*, s obzirom na to da u kulturi limfocita nema dejstva ovih antiapoptotičnih citokina kao u uslovima *in vivo*.

Dodatkom autologe plazme kulturi B-HLL limfocita nastaje inhibicija spontane apoptoze (49). Najverovatniji mehanizam kojim nastaje ova pojava je direktna aktivacija Akt protein kinaze dejstvom albumina plazme (50). Druge studije dovode u pitanje efekat citokina dodate plazme na inhibiciju apoptoze. Naime, transmembranski prenos signala IL-4, IFN-alfa i IFN-gama ostvaruje se aktivacijom molekula JAK-1 (51). Dodavanjem autologe plazme nije detektovana aktivacija JAK-1 molekula čime je potvrđeno da pomenuti citokini deluju na apoptozu nekim drugim mehanizmima.

Ovi do sada pomenuti potencijalni mehanizmi inhibirane apoptoze *in vivo* sigurno nisu i jedini. Svakako da ovo polje nauke ostaje još uvek neistraženo i verovatno je da će narednih godina biti još dosta polemike o patogenezi progresivne akumulacije malignih B-HLL limfocita.

Pored spontane, određivana je i indukovana apoptoza limfocita. Kao induktori apoptoze korišćeni su cikloheksimid, hlorambucil i deksametazon. Istraživanje je pokazalo da je procenat apoptotičnih ćelija najveći u grupi bolesnika sa uznapredovalom bolešću, da je nešto manji u bolesnika obolelih od B-HLL-a koji su u početnoj fazi bolesti, dok je u kontrolnoj grupi procenat apoptotičnih ćelija najmanji pri primeni različitih koncentracija ovih induktora apoptoze. Sa opadanjem koncentracije induktora apoptoze smanjuje se i procenat apoptotičnih ćelija limfocita svih ispitivanih grupa.

Delovanjem različitih spoljašnjih stimulusa kao što su agonisti površinskih receptora, kortikosteroidi, antitumorski agensi (aktinomicin D, doksorubicin, kamfotericin idr), citotoksične supstance (cikloheksimid) i drugi agensi, može se indukovati apoptoza limfocita. O efektu cikloheksimida na apoptozu limfocita ima kontradiktornih podataka. Postoje studije koje ističu da je za indukciju apoptoze neophodna *de novo* sinteza proteina (52) i pošto je cikloheksimid inhibitor sinteze proteina time dovodi

do inhibicije spontane i lekovima indukovane apoptoze različitih ćelija (53). U drugim studijama cikloheksimid se navodi kao induktor apoptoze različitih ćelija (54, 55). Neke studije navode da efekat cikloheksimida zavisi od koncentracije. Naime, u koncentraciji manjoj od 0,05 µg/ml cikloheksimid inhibira apoptozu B limfocita, dok u koncentraciji većoj od 2,5 µg/ml cikloheksimid indukuje apoptozu B limfocita (56). Mehanizam kojim cikloheksimid indukuje apoptozu B limfocita zasniva se na aktivaciji kaspaze-3, ali to ne mora da bude i mehanizam kojim cikloheksimid indukuje apoptozu drugih ćelijskih linija (56). Rezultati ovog istraživanja su u korelaciji sa efektima koji su i drugi istraživači imali koristeći cikloheksimid kao induktora apoptoze (57, 58).

Mehanizmi kojima pojedine supstance izazivaju intenziviranu apoptozu malignih B-HLL limfocita još uvek se pouzdano ne znaju. S obzirom na to da je dugo godina hlorambucil bio jedini lek u lečenju B-HLL-a, mnoge studije su bile posvećene efektu hlorambucila na apoptozu B-HLL limfocita. Vremenom se pojavila i rezistencija na hlorambucil, tako da je bilo neophodno *in vitro* odrediti senzitivnost B-HLL limfocita i tek nakon toga, eventualno, započeti terapiju. O mehanizmima dejstva hlorambucila još vek postoje neke nepoznanice. Naime, hlorambucil *in vitro* dovodi do povećane ekspresije p53, smanjuje ekspresiju Bcl-2 proteina i povećava ekspresiju c-myc proteina (59). To, verovatno, nisu i jedini mehanizmi kojim hlorambucil indukuje apoptozu.

Poznato je da je jedan od najranijih događaja u apoptozu mobilizacija jona kalcijuma (60). Hlorambucil deluje na B-HLL limfocite tako što povećava influks jona kalcijuma u ćeliju uz istovremenu mobilizaciju jona kalcijuma iz endoplazmatskog retikuluma (60). Proapoptotični efekat CLB na apoptozu B-HLL limfocita *in vitro* može biti olakšan dodatkom teofilina u kulturu limfocita (61). Inhibirajući intracelularnu cikličnu nukleotid fosfodiesterazu, teofilin povećava intraćelijski nivo cAMP, koji, kao sekundarni glasnik, inhibira proliferaciju zrelih B i T limfocita i dovodi do njihove smrti (62). Najverovatniji sinergistički efekat teofilina ostvaruje se inhibicijom ekspresije Bcl-2 proteina i prolaznom povećanom ekspresijom c-myc proteina (61). Primena hlorambucila dovodi do aktivacije kaspaze-8 i to bez povećavanja ekspresije Fas antigena na target ćelijama (63). Ova činjenica ukazuje na to da postoji i aktivacija kaspaze-8 Fas-nezavisnim putem. Ostaje dilema da li je za pojavu apoptoze B-HLL limfocita izazvanu hlorambucilom neophodno prisustvo p53 proteina. Naime, postoje studije koje ističu da je za antiapoptozno dejstvo hlorambucila neophodno prisustvo p53 proteina koji povećava ekspresiju Bax proteina i smanjuje ekspresiju Bcl-2

proteina (64), dok ima i mišljenja da hlorambucil dovodi do apoptoze malignih B-HLL limfocita p53-nezavisnim putem (65). Odnos Bcl-2/Bax je glavni prediktivni faktor za apoptozu *ex vivo* malignih B-HLL limfocita na dejstvo hlorambucila - što je ovaj odnos veći, to je i slabiji apoptozni odgovor B-HLL limfocita na dejstvo hlorambucila (66).

U studiji je korišćen i deksametazon kao induktor apoptoze. Kortikosteroidi su sastavni deo terapije brojnih B ćelijskih neoplazmi. Ostvaruju dejstvo preko svojih citoplazmatskih receptora koji mogu da menjaju transkripciju mnogih gena. Sumarno, kortikosteroidi inhibiraju ćelijski rast i proliferaciju, ali i izazivaju apoptozu normalnih i malignih ćelija (67). Prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina inhibira apoptozu izazvanu kortikosteroidima i dovodi do rezistencije (68), mada je poznato da deksametazon može da indukuje apoptozu i potpuno nezavisno od Bcl-2 (69). Rezultati naše studije o efektu deksametazona na apoptozu limfocita su u saglasnosti sa većinom drugih studija (67, 68). Drugi istraživači uglavnom su koristili slične koncentracije deksametazona za izazivanje apoptoze. Pokazalo se da je apoptoza B-HLL limfocita izazvana deksametazonom nešto manja u poređenju sa drugim induktorima apoptoze (cikloheksimid i hlorambucil) zbog smanjenog broja kortikosteroidnih receptora u B-HLL limfocitima (2x manje) i njihovog smanjenog afiniteta (10x manje) za kortikosteroide (70). Zbog ovog smanjenja broja i afiniteta kortikosteroidnih receptora, za nastanak apoptoze potrebno je više vremena, pa se govori o zakasneloj apoptozu. Naime, pod dejstvom deksametazona, limfociti zdravih ispitanika pokazuju karakteristične morfološke promene apoptoze već posle 6 sati, dok je to suviše kratko vreme inkubacije za B-HLL limfocite tretirane istim dozama deksametazona (70). Brojne studije su saglasne da je efekat deksametazona na apoptozu B-HLL limfocita doznno zavisian (68, 70).

Ostaje nepoznanica o tačnom mehanizmu kojim kortikosteroidi izazivaju apoptozu B-HLL limfocita. Poznato je da povećavaju influks jona kalcijuma (60), što je jedan od početnih događaja u apoptozu, koji dovodi do aktivacije kalcijum-zavisnih endonukleaza. Posle vezivanja kortikosteroida za svoje receptore, dolazi do stvaranja jednog multikatalitičkog proteaznog kompleksa koji se zove proteazom, a koji je važan za aktivaciju kaspaza (71). Takođe, kortikosteroidi izazivaju apoptozu aktivacijom protein kinaze C (72) ili dovode do aktivacije kaspaze-3 putem ceramida (73). Poznato je da deksametazon ne dovodi do apoptoze aktivacijom Fas antigena (32), ali osloboda citohrom c iz mitohondrija, smanjuje membranski potencijal mitohondrija, aktivira kaspaze (naročito kaspazu-3), čime dovodi do apoptoze target

ćelija (67). Takođe, deksametazon smanjuje i ekspresiju pojedinih antiapoptotičnih gena, kao što su Bcl-2 i Bcl-XL (67).

Činjenica da neoplastični B limfociti *in vitro* lakše podležu apoptozi nego zdravi B limfociti, i, na drugoj strani, postojanje brojnih indirektnih dokaza da je apoptoza *in vivo* inhibirana, ostaje i dalje velika nepoznanica. Verovatno će buduća istraživanja rešiti bar neke dileme ovog limfocitnog paradoksa u hroničnoj limfocitnoj leukemiji.

SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU:

- B-HLL – B-hronična limfocitna leukemija
- IL-4 – interleukin 4
- IL-6 – interleukin 6
- IL-10 – interleukin 10
- TNF-alfa – tumor nekrotični faktor-alfa

LITERATURA

1. Čolović M. Hronična limfocitna leukemija. U: Čolović M, Janković G. Maligne bolesti krvi. Beograd, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1999; 195-221.
2. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Can Med Assoc J* 1966; 94: 1005.
3. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967; 29: 566-84.
4. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109: 794-99.
5. Hanada M, Delia D, Aiello A et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82: 1820-8.
6. Juliusson G, Gahrton G. Cytogenetics in CLL and related disorders. *Bailliers Clin Hematol* 1993; 6: 821-7.
7. 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.
8. Pritsch O, Troussard X, Magnac C et al. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukemia. *Br J Hematol* 1999; 107: 616-24.
9. Yuille MR. Inherited predisposition to CLL and the molecular genetics of familial CLL. *Leuk Lymphoma* 2001; 42 (Suppl 1): 3-4.
10. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-54.
11. Kramer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999; 71: 163-210.
12. Neste EV, Cardoen S, Offner F, Bontemps F. Old and new insights into the mechanism of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine. *Int J Oncol* 2005; 27: 1113-24.
13. Thornberry NA, Lazebnik Z. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
14. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemia B cells from death by apoptosis and upregulates bcl-2 expression. *J Exp Med* 1992; 176: 1319-26.
15. Panayotidis P, Ganeshaguru K, Jabbar SAB, Hoffbrand AV. Interleukin 4 inhibits apoptotic cell death and loss of bcl-2 protein in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Br J Haematol* 1993; 85: 439-45.
16. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med* 1999; 77: 282-93.
17. Panayotidis P, Ganeshaguru K, Jabbar SAB, Hoffbrand AV. Interferon protects B chronic lymphocytic leukemia cells from apoptotic cell death *in vitro*. *Br J Haematol* 1994; 86: 169-73.
18. Busckle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV. Interferon inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993; 177: 213-7.
19. Dierlamm J, Michaux L, Criel A et al. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their critical and prognostic implications. *Cancer Gen Cytogenet* 1997; 94: 27-35.
20. Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-163.
21. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
22. 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.

23. 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.
24. Kennedy L, Reynolds J. Protocol for the removal of adherent macrophages. In: Lefkovits I. *Immunology methods manual*. ACADEMIC PRESS, Harcourt Brace & Company, Publishers; 1996: 2091-7.
25. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocyte: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Intern* 2006; xx: 1-9.
26. Janjic BM, Lu G, Pimenov A, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol* 2002; 168: 1832-8.
27. Lin WC, Manchouri T, Jilani I et al. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 2002; 26: 551-9.
28. del Giglio A, O'Brien S, Ford RJ et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 265-72.
29. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncology* 1998; 25: 11-8.
30. Zhang Y, Dawson MI, Mohammad R et al. Induction of apoptosis of human B-CLL and ALL cells by novel retinoid and its nonretinoid analog. *Blood* 2002; 100: 2917-25.
31. Decker T, Oelsner M, Kreitman RJ, Salvatore G, Wang Q, Pastan I. Induction of caspase-dependent programmed cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins. *Blood* 2004, 103: 2718- 26.
32. Ricciardi MR, Petricci MT, Gregorj C et al. Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 391-9.
33. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C δ . *Blood* 2002; 100: 3741-8.
34. Podhorecka M. Apoptosis in pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Postery Hig Med Dosc* 2004; 58: 236-42.
35. Faria JR, Yamamoto M, Faria RMD, Kerbauy J, Oliveira JSR. Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia - the role of P53, Bcl-2, Bax, Mcl-1 and Bag-1 proteins. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39(3): 327-33.
36. Beswick RW, Ambrose HE, Wagner SD. Nocodazole, a microtubule depolymerising agent, induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells associated with changes in bcl-2 phosphorylation and expression. *Leukemia Research* 2006; 30: 427-36.
37. Bomstein Y, Yuklea M, Radnay J et al. The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2003; 70: 290-5.
38. Donin N, Kay S, Sinai J et al. Apoptosis and cell proliferation capacity in AKR lymphoma malignancy variants. *Cancer Invest* 2000; 18: 702-14.
39. Raghoebar S, van Krieken JH, Kluin-Nelemans JC et al. Oncogene rearrangements in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1991; 77: 1560- 7.
40. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukemia. *Immunology* 2005; 114: 441-9.
41. Paper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratio in chronic lymphocytic leukemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer*, 1998; 78: 553-4.
42. Pepper C, Ali K, Thomas A et al. Retinoid-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells is mediated through caspase-3 activation and is independent of p53, the retinoic acid receptor and differentiation. *Eur J Haematol* 2002; 69: 227-35.
43. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999; 253: 210-29.
44. Romashkova JA, Makarov SS. NF- κ B is a target of Akt in antiapoptotic PDGF signaling. *Nature* 1999; 401: 86-90.
45. Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3627-32.
46. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA et al. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82-5.

47. Wright K, Kolios G, Westwick J, Ward SG. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation: evidence for an interleukin 13-driven phosphatidylinositol 3 - kinase - dependent mechanism. *J Biol Chem* 1999; 274: 17193-201.
48. Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 23013-9.
49. Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones TJ et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhance basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Br J Haematol* 2003; 114: 608-15.
50. Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ et al. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood* 2003; 101: 3174-81.
51. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995; 377: 591-4.
52. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocyte: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Intern* 2006; xx: 1-9.
53. Marcu M, Gunter HE, Jugdutt BI, Docherty J. Inhibition of apoptosis after ischaemia-reperfusion in rat myocardium by cycloheximide. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1073-82.
54. Tessitore L, Tomasi C, Greco M. Fasting-induced apoptosis in rat liver is blocked by cycloheximide. *Eur J Cell Biol* 1999; 78: 573-9.
55. Collins RJ, Harmon BV, Souvlis T, Pope JH, Kerr JF. Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer* 1991; 64: 518-22.
56. Lemaire C, Andreau K, Souvannavong V, Adam A. Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/Caspase 3. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 85-93.
57. Potter A, Kim C, Gollahon KA, Rabinovitch PS. Apoptotic human lymphocytes have diminished CD4 and CD8 receptor expression. *Cell Immunol* 1999; 193: 36-47.
58. Stein GM, Pfuller U, Schietzel M, Bussing A. Expression of interleukin-4 in apoptotic cells: stimulation of the type-2 cytokine by different toxins in human peripheral blood mononuclear and tumor cells. *Cytometry* 2000; 41: 261-70.
59. Pepper C, Ali K, Thomas A et al. Retinoid-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells is mediated through caspase-3 activation and is independent of p53, the retinoic acid receptor and differentiation. *Eur J Haematol* 2002; 69: 227-35.
60. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 1993; 82: 15-23.
61. Mentz F, Mossalayi D, Ouazz F et al. Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1996; 88: 2172-82.
62. Albert D, Kowalski J, Nodzenski E, Micek M, Wu P. The dose dependent effect of cyclic AMP on ribonucleotide reductase in mitogen stimulated mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 383-92.
63. Jones DT, Ganeshaguru K, Virchis AE, Folarin NI, Lowdell MW, Mehta AB. Caspase 8 activation independent of fas (CD95/APO-1) signalling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or γ radiation. *Blood* 2001; 98: 2800-7.
64. Johnston JB, Daeninck P, Verburg L et al. P53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997; 26: 435-9.
65. Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB. Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 187-201.
66. Thomas A, Pepper C, Hoy T, Bentley P. Bcl-2 and bax expression and chlorambucil-induced apoptosis of the T-cells and leukemic B-cell of untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Res* 2000; 24: 813-21.
67. Rose AL, Smith BE, Maloney DG. Glucocorticoid and rituximab in vitro: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. *Blood* 2002; 100: 1765-74.
68. Caron-Leslie L, Evans R, Cidlowski J. Bcl-2 inhibits glucocorticoid-induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cycloheximide-regulated apoptosis in S49 cells. *FASEB J* 1994; 8: 639-45.

69. Roué G, Lancry L, Duquesne F, Salaün V, Troussard X, Sola B. Upstream mediators of the Fas apoptotic transduction pathway are defective in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2001; 25: 967-80.
70. Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA et al. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patients with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 559-65.
71. Schuer D, Szende B. Apoptosis in acute leukemia. *Leukemia Research* 2004; 28: 661-6.
72. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell death Differ* 2002; 9: 6-19.
73. 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.