

Dejstvo hlorambucila na limfocite B periferne krvi bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom – ispitivanje ultrastrukture ćelija

Goran Brajušković*, Slobodan Marjanović[†], Anđelija Škaro-Milić*

Vojnomedicinska akademija, *ZPSM – Institut za patologiju, [†]Klinika za hematologiju, Beograd

Hronična limfocitna leukemija (HLL) tipa B je maligna bolest koju karakteriše progresivna akumulacija zrelih, monoklonskih ćelija CD 5+ u ranoj fazi ćelijskog ciklusa. U istraživanjima patofizioloških mehanizama nastanka bolesti, kao i u savremenim modalitetima njenog lečenja posebnu pažnju privlači moguća uloga procesa programirane ćelijske smrti – apoptoze kao prognostičkog parametra kod HLL bolesnika. Bez obzira na sva dostignuća savremene onkologije, od svog uvođenja u terapiju 1952. godine hlorambucil je ostao najčešće primenjivan antineoplastički agens u lečenju HLL. Brojna eksperimentalna istraživanja kako in vitro, tako i in vivo, pokazala su mogućnost citostatika da indukuje proces apoptoze neoplastično transformisanih ćelija. U našem radu praćen je efekat hlorambucila na limfocite B u 16 uzoraka periferne krvi bolesnika sa kliničkom dijagnozom HLL. Analiza ultrastrukture leukemijskih ćelija je pokazala da veći broj ćelija na dejstvo citostatika (hlorambucila) reaguje ili aktivisanjem ćelijske reakcije na stres ili procesom apoptoze.

K l j u č n e r e č i : leukemija, limfocitna, hronična; hlorambucil; limfociti B; apoptoza; mikroskopija, elektronska.

Uvod

Hronična limfocitna leukemija (HLL) tipa B je maligna bolest koju karakteriše progresivna akumulacija zrelih, monoklonskih ćelija CD 5+ u ranoj fazi ćelijskog ciklusa (1). Prvi antineoplastički agens primenjen u lečenju HLL bio je hlorambucil (Leukeran). Alkilacija ćelijskih struktura, pre svega molekula DNK, leži u osnovi antitumorske aktivnosti ovog leka. Bez obzira na sva dostignuća savremene onkologije, od svog uvođenja u terapiju 1952. godine hlorambucil je ostao najčešće primenjivan antineoplastički agens u lečenju HLL (1).

Apoptoza je poseban tip ćelijske smrti koji se po svojoj prirodi i biološkom značaju suštinski razlikuje od nekroze. Eksperimentalna istraživanja (kako in vitro, tako i in vivo) su pokazala da antineoplastički agensi mogu da indukuju apoptozu malignih ćelija (2).

Ovaj proces je poznat kao terapijom indukovana apoptoza. Manji broj malignih ćelija i bez dejstva antineoplastičkih agensa umire procesom spontane apoptoze.

Dosadašnja ispitivanja su, takođe, pokazala da je sposobnost antineoplastičkih agensa da indukuju proces apoptoze neoplastično transformisanih ćelija pozitivan prognostički parametar u lečenju malignosti (3).

Ispitivanja rađena na sveže izolovanim limfocitima B iz periferne krvi bolesnika sa HLL, kao i in vitro ispitivanja na primarnim ćelijskim linijama istog porekla su pokazala da antineoplastički agensi indukuju proces apoptoze leukemijskih ćelija.

Postoje brojni eksperimentni dokazi da hlorambucil, fludarabin, 2-hlorodeoksiadenozin i drugi lekovi, u in vitro uslovima, indukuju proces apoptoze ćelija HLL, i to u dozama koje su ekvivalentne onima u kliničkoj upotrebi (4–8). Cilj rada je ultrastrukturna analiza dejstva antineoplastičkog

agensa hlorambucila na limfocite B iz periferne krvi bolesnika sa HLL.

Metode

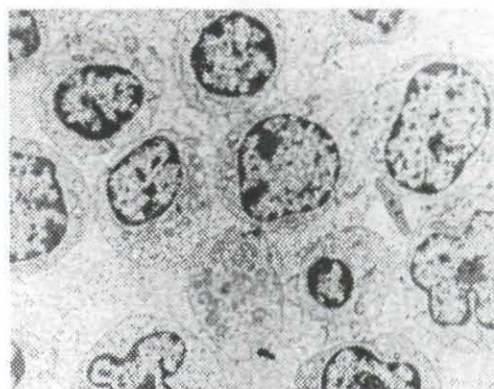
Analizovani su uzorci periferne krvi 16 bolesnika sa HLL koji su lečeni na Klinici za hematologiju VMA. Četvoro bolesnika sa prethodno nelečenom HLL činilo je prvu grupu analizovanih bolesnika, dok je kod ostalih bolesnika nakon inicijalne terapijom postignute parcijalne remisije sprovedena terapija održavanja. Uzorci periferne krvi bolesnika sa prethodno nelečenom HLL, uzimani pre primene citostatske terapije, činili su kontrolnu grupu u našoj studiji. Efekat hlorambucila na ultrastrukturnom nivou praćen je kako na uzorcima periferne krvi bolesnika sa prethodno nelečenom HLL, dobijenih trećeg dana od početka primanja hemioterapije, tako i na uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL u stanju parcijalne remisije sa terapijom održavanja.

Uzorci cele periferne krvi bolesnika sa 1 ml Na-citrata (kao antikoagulansom) su centrifugovani 15 minuta na 1000 obrtaja/min. Supernatant je odlivan, a u epruvetu je dodavan 1 ml 4%-og rastvora glutaraldehida. Sloj leukocita je nakon 15 minuta prebacivan u bočicu sa istim fiksativom (9). Uzorak je sečen u kapi fiksativa na sitne komade promera 1mm² i zatim je prebačen u isti fiksativ (4%-ni rastvor glutaraldehida u 0,1M Na-kakodilatnom puferu, pH 7,3) gde je držan dva sata na temperaturi od 4°C. Posle dve do tri brze promene u kakodilatnom puferu materijal je postfiksiran u 1%-om rastvoru O₄ u 0,1M Na-kakodilatnom puferu na 4°C u trajanju od dva časa. Nakon dve brze promene u Na-kakodilatnom puferu uzorci su preko noći ostavljani u 4%-om rastvoru uranil acetata, da bi se uvećao kontrast materijala. Isečki su potom sprovedeni kroz seriju alkohola (25%, 50%, 70%, 80%, 90% i 100%), pa su 2 puta po 10 minuta držani u propilenoksidu radi dehidracije i „prosvetljavanja“. Materijal je prožiman smolom na sobnoj temperaturi kroz tri različite mešavine propilenoksida i smole Epon (3:1, 1:1, 1:3). Uzorci su na taj način dovedeni do čiste smole Epon u kojoj su držani preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon kalupljenja, u plastične kapsule, izvršena je polimerizacija smole na temperaturi od 60°C u toku tri dana (10). Kalupi su sečeni dijamantskim nožem na LKB-ovom ultramikrotomu III. Isečki su sečeni do debljine od 30 do 50 nm i stavljeni na bakarne mrežice, presvučene parafilmom. Dobijeni isečki su pozitivno „bojeni“ 20 minuta u 5%-om vodenom rastvoru uranil acetata, potom ispirani redestilovanom vodom i sušeni na vazduhu. Osušeni preseći su tretirani Reinoldovim rastvorom olovo citrata u trajanju od 10 minuta, a zatim su ispirani i ponovo sušeni (10). Osušeni preseći analizovani su na Philipsovom elektronskom mikroskopu TEM 208 S.

Rezultati

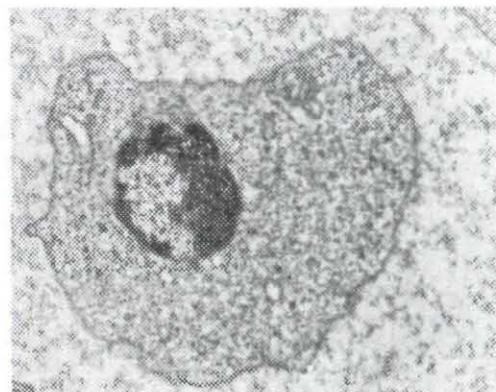
Ultrastrukturno ispitivanje uzoraka periferne krvi bolesnika sa prethodno nelečenom HLL, pre citostatskog tretmana, ukazivalo je na predominantno prisustvo zrelih limfocita B

(ćelija HLL). Retko su prisutni pojedinačni limfociti T. Nukleusi ćelija HLL su umereno nepravilnog oblika sa većom količinom periferno lociranog heterohromatina. U većem broju nukleusa prisutni su, marginalno lokalizovani, nukleolusi. Retko je uočeno i prisustvo dva nukleolusa. Manji broj leukemijskih ćelija poseduje svetle i sferične nukleuse. Citoplazma ovih ćelija siromašna je organelama i najčešće u vidu uskog pojasa okružuje krupne nukleuse. U njoj se nalazi manji broj mitohondrija i nekoliko cisterni hrapavog (granuliranog) endoplazmatskog retikuluma (hER)(slika 1).



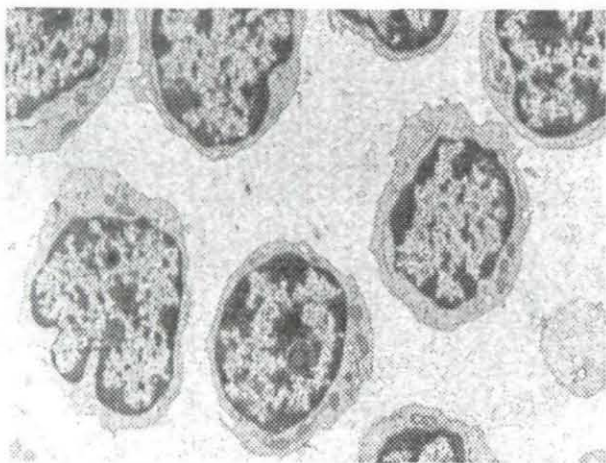
Sl. 1 – Zreli limfociti B iz periferne krvi bolesnika sa HLL (→ apoptozna ćelija) (10 000 ×)

U ovim uzorcima periferne krvi bolesnika bilo je teško uočiti ćelije u početnim fazama procesa spontane apoptoze. Glavna ultrastrukturna karakteristika ćelija u početnoj fazi procesa apoptoze je formiranje periferno lokalizovanih masa heterohromatina. Istovremeno, ćelije HLL takođe karakteriše proces periferne kondenzacije heterohromatina. Na ultrastrukturnom nivou uočava se veći broj ćelija smanjenog volumena sa izrazitom perifernom kondenzacijom hromatina (slika 1). Ćelije koje se nalaze u kasnim fazama procesa spontane apoptoze karakteriše izrazita kondenzacija i citoplazme i nukleusa. Ovi kondenzacioni procesi za posledicu imaju smanjenje ćelijskog volumena. Nukleusi postaju sferični sa potpuno kondenzovanim hromatinom (slika 2). Formiranje apoptoznih tela, u analizovanim uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL, nije detektovano.



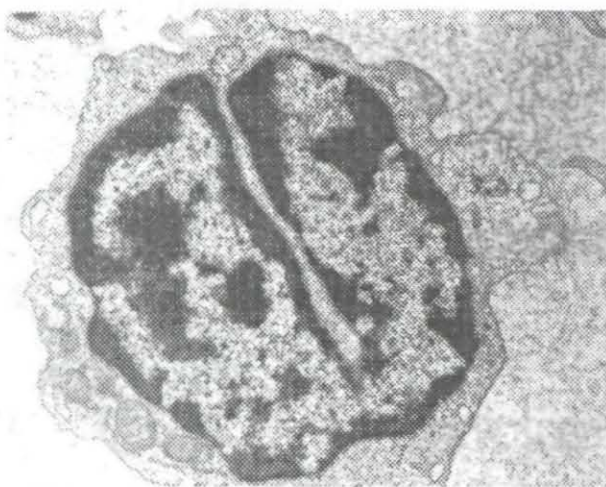
Sl. 2 – Ćelija HLL u procesu spontane apoptoze (50 000 ×)

Leukemijske ćelije u ostalim uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL karakterišu nukleusi nepravilnog oblika sa povećanom količinom heterohromatina, u odnosu na leukemijske ćelije u kontrolnim uzorcima - pre tretmana hlorambucilom (slika 3).



Sl. 3 – Ćelije HLL iz uzorka periferne krvi bolesnika 3. dana terapije (15 750 ×)

Istovremeno, u odnosu na uzorke periferne krvi bolesnika pre terapije, detektovan je povećan broj nukleusa izrazito nepravilnog oblika koji je posledica brojnih invaginacija nukleusnog ovoja i formiranih nukleusnih pseudoinkluzija (slika 4).



Sl. 4 – Nukleus ćelije HLL iz uzorka periferne krvi bolesnika 3. dana terapije sa dubokom invaginacijom nukleusnog ovoja (40 000 ×)

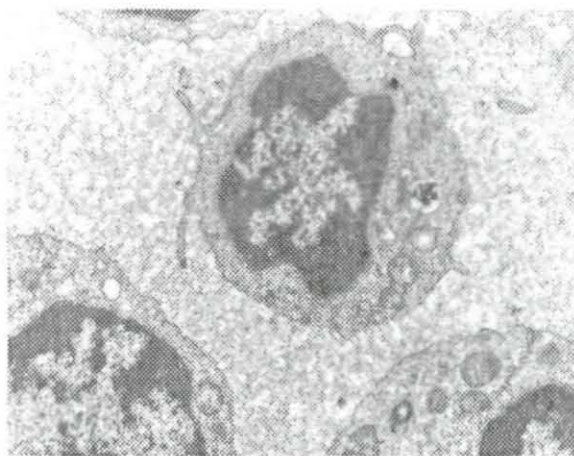
U većem broju nukleusa uočava se i pojava hipertrofiranih nukleolusa i dilatacija perinukleusnog prostora (slike 3. i 4). Citoplazmu ćelija HLL karakteriše veći broj sintetskih organela, naročito pojava Goldžijevog aparata i sekundarnih lizosoma (slika 5). Goldžijev aparat nije uočen u ćelijama HLL iz kontrolnih uzoraka. Takođe, u odnosu na uzorke periferne krvi bolesnika sa HLL pre primene hlorambucila, detektovan je i veći broj ćelija HLL sa morfolo-

škim karakteristikama početnih faza procesa apoptoze, tj. smanjenim ćelijskim volumenom i kondenzacijom hromatina (slika 6).

U određenom broju leukemijskih ćelija detektovano je i prisustvo bliskog kontakta mitohondrija sa cisternom hER (MER). Kako tokom procesa apoptoze citoplazmatske organele ostaju intaktne, uočene su i apoptozne ćelije sa očuvanim kompleksima mitohondrija i cisterni hER-a (slika 7a). Morfološki, ćelije koje umiru terapijom indukovanim procesom apoptoze ne razlikuju se od ćelija koje umiru procesom spontane apoptoze.

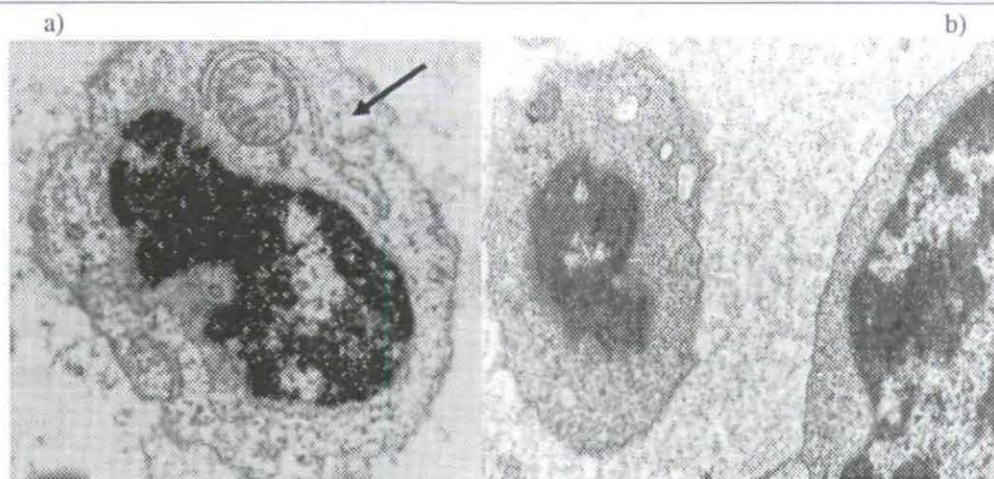


Sl. 5 – Segment ćelije HLL iz uzorka periferne krvi bolesnika sa terapijom održavanja (← Goldžijev kompleks) (100 000 ×)



Sl. 6 – Ćelija HLL smanjenog volumena sa nukleusom u kome je izražen proces kondenzacije hromatina (40 000 ×)

To su ćelije smanjenog volumena sa potpuno kondenzovanim hiperhromatskim nukleusima (slika 7b). Pri tom ne postoje morfološki uočljive razlike u terapijom indukovanim procesu apoptoze, zavisno od jačine citostatskog tretmana (inicijalna terapija ili terapija održavanja). Bez obzira na vrstu stimulusa, proces apoptoze pokazuje stereotip morfoloških promena.



Sl. 7. – Čelije HLL u terapijom indukovanom procesu apoptoze

- a) Apoptozna ćelija u kojoj je detektovano prisustvo MER-a (→ MER)(72 500 ×)
 b) Apoptozna ćelija smanjenog volumena (50 000 ×)

Diskusija

Elektronskomikroskopska analiza uzoraka periferne krvi bolesnika sa kliničkom dijagnozom HLL tipa B je pokazala da dominantnu ćeliju leukocitnog sloja (*buffy coat*) predstavlja limfocit B. Uočene morfološke karakteristike ćelija odgovaraju ultrastrukturnoj slici zrelih oblika mononukleara, odnosno zrelih limfocita B (11, 12). Ovakav elektronskomikroskopski nalaz je u skladu sa kliničkim karakteristikama HLL, tj. progresivnom akumulacijom zrelih limfocita B.

Ultrastrukturnom analizom uzoraka periferne krvi bolesnika sa prethodno nelečenom HLL trećeg dana citostatske terapije i bolesnika koji se nalaze u stanju parcijalne remisije (uz terapiju održavanja) praćen je efekat hlorambucila na leukemijske ćelije.

Upoređivanjem uzoraka periferne krvi bolesnika pre i nakon trećeg dana citostatskog tretmana uočene su morfološke razlike koje mogu biti posledica dejstva hlorambucila. Leukemijske ćelije, koje ne umiru procesom apoptoze, trećeg dana terapije poseduju nukleuse izrazito nepravilnog oblika. Ove promene u obliku nukleusa obezbeđuju povećanje kontaktne površine, a time i veći promet informacija između citoplazme i nukleusa. Kontakt se pospešuje i pojavom uskih i dubokih invaginacija nukleusnog ovoja.

Ova razmena signala je dodatno olakšana i uvećanjem nukleusno–citoplazmatske kontaktne površine formiranjem nukleusnih pseudoinkluzija. Pojava pseudoinkluzija nije detektovana u limfocitima B iz uzoraka periferne krvi bolesnika sa HLL pre primanja citostatske terapije. Pojava nukleusnih pseudoinkluzija je godinama poznata reakcija ćelija na dejstvo različitih vrsta lekova (13). Posledicu pojačane razmene signala između nukleusa i citoplazme predstavljaju i vidljive dilatacije perinukleusnih prostora. Nukleuse leukemijskih ćelija karakteriše i prisustvo, najčešće periferno lociranih, prominentnih nukleolu-

sa sa većim brojem vidljivih fibrilskih centara. Hipertrofi-sani nukleolusi predstavljaju morfološku odliku intenzivne sinteze rRNK (14).

Citoplazma leukemijskih ćelija koje ne umiru procesom apoptoze, takođe, pokazuje morfološke znake intenzivne sintetske aktivnosti. U odnosu na citoplazmu leukemijskih ćelija u uzorcima periferne krvi bolesnika pre primene citostatskog tretmana, prisutan je povećan broj sintetskih organela naročito poliribosoma i cisterni hER-a.

U određenom broju ćelija detektovano je i prisustvo kontakta mitohondrije i cisterne hER-a. Formiranje MER-a je posledica pojačanih energetskih potreba ćelija u uslovima intenzivne metaboličke aktivnosti, naročito sinteze proteina (15). Leukemijske ćelije karakteriše i pojava Goldžijevih kompleksa, čije prisustvo nije detektovano u kontrolnoj grupi analizovanih uzoraka. Morfološki znaci metaboličke aktivnosti, koji se detektuju kod leukemijskih ćelija, predstavljaju njihovu reakciju na dejstvo antineoplastičkog agensa. U uslovima njegovog dejstva ćelije se nalaze u stanju stresa. Jedna od ćelijskih reakcija na takve uslove je selektivna aktivacija proteina toplotnog stresa (*heat shock protein - hsp*) - hsp 90 i hsp 70.

Aktivisani hsp proteini utiču na intenziviranje procesa proteinske sinteze i uvećanje metaboličke aktivnosti same ćelije (16, 17). Opisani ultrastrukturni nalaz intenzivne metaboličke aktivnosti, kod leukemijskih ćelija koje ne umiru procesom apoptoze, najviše odgovara morfološkoj slici ćelija kod kojih je aktivirana ćelijska reakcija na stres.

Posebno je analizovan efekat hlorambucila na indukciju procesa apoptoze, odnosno morfološke odlike terapijom indukovanih procesa ćelijskog umiranja. Analiza ovih uzoraka je pokazala da bitnih morfoloških razlika između leukemijskih ćelija koje umiru procesom spontane i procesom terapijom indukovane apoptoze nema. Rezultati naše ultrastrukturne analize terapijom indukovanih procesa apoptoze

idu u prilog tvrdnji da je jednom pokrenut mehanizam procesa apoptoze dalje nezavistan od vrste i jačine stimulusa kojim je indukovano.

Tokom programirane ćelijske smrti - apoptoze, citoplazmatske organele uglavnom ostaju intaktne. Međutim, kondenzacioni procesi imaju određen efekat i na mitohondrije. Kondenzacija mitohondrija detektovana je kod ćelija HLL koje umiru terapijom indukovanim procesom apoptoze u analizovanim uzorcima periferne krvi obolelih. Podaci o ultrastrukturnim promenama mitohondrija apoptoziranih ćelija postaju naročito značajni nakon objavljivanja rezultata eksperimentnog rada Genina i saradnika 2000. godine (18). Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da su upravo mitohondrije glavni cilj u ćeliji u 2 hlora-deoksiadenozinom indukovanom procesu apoptoze ćelija HLL (18). Smanjenje volumena mitohondrija i kondenzacija njenog matriksa detektovana je i u drugim vrstama ćelija koje umiru procesom apoptoze.

Pojedini autori ovu pojavu nazivaju mitohondrijska piknoza i smatraju je ranim događajem tokom procesa apoptoze (19). Bez obzira na vrstu stimulusa, mitohondrija je ključna organela u procesu ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Kontrolisano oslobađanje citohroma C iz mitohondrija u citosol je neophodan uslov za otpočinjanje egzekutorne faze procesa apoptoze (20). Upravo zbog toga Koemer i saradnici mitohondriju nazivaju celularnim regulatorom života i smrti (21). Do danas nije poznato da li uočena kondenzacija mitohondrija utiče na proces oslobađanja citohroma C iz mitohondrija u citosol (19).

Zaključak

Analiza ultrastrukture leukemijskih ćelija pokazala je da veći broj ćelija na dejstvo citostatika (hlora-bucila) reaguje aktivisanjem ćelijske reakcije na stres ili indukcijom procesa apoptoze.

LITERATURA

1. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; 91(7): 2387-96.
2. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.
3. Hickman AJ. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11(2): 121-39.
4. Begleiter A, Lee K, Israels LG, Mowat MR, Johnston JB. Chlorambucil induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy. *Leukemia* 1994; 8(Suppl 1): S103-6.
5. Shenkerman G, Klaper R, Ness-Abramof R, Vishlitzky V, Zemer R, Ellis M, et al. Induction of apoptosis by chlorodeoxyadenosine and dexamethasone in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997; 28(1-2): 153-7.
6. Castejon R, Vargas JA, Briz M, Berrocal E, Romero Y, Gea-Banacloche JC, et al. Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997; 11(8): 1253-7.
7. Tosi P, Zinzani PL, Pellacani A, Ottavian E, Magagnoli M, Tura S. Loxoribine affects fludarabine activity on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1997; 26(3-4): 343-8.
8. Morabito F, Stelitano C, Callea I, Dattola A, Console G, Pucci G, et al. In vitro drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1998; 102(2): 528-31.
9. Mills AE, Emms M, Licata SG. A simple technique for preparation of bone marrow or peripheral blood buffy coat cells for electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 1990; 14(2): 173-6.
10. Seveus L, Johannessen JV. Embedding, Sectioning and Staining. In: Johannessen JV, editor. *Electron Microscopy in Human Medicine*. Vol 1. New York: McGraw-Hill International Book Company; 1978. p. 116-84.
11. Olah I, Rohlich P, Toro I. Cell types. In: Olah I, editor. *Ultrastructure of Lymphoid Organs: an Electron-Microscopic Atlas*. Budapest: Akademiai Kiado; 1975. p. 11-71.
12. Johannessen JV. Leukemias. In: Johannessen JV, editor. *Electron Microscopy in Human Medicine*. New York: McGraw-Hill International Book Company; 1980. p. 279-353.
13. Ghadially FN. Nucleus. In: Ghadially FN, editor. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. London: Butterworths; 1988. p. 1-181.
14. Škaro-Milić A, Spasić P. A contribution to the study of the cell nucleus in human breast tumors. *Vojnosanit Pregl* 1983; 40(3): 190-3. (in Serbian)
15. Ghadially FN. Mitochondria. In: Ghadially FN, editor. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. London: Butterworths; 1988. p. 191-328.
16. Morimoto RI. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* 1991; 3(8): 295-301.
17. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* 1992; 267(31): 21987-90.
18. Genini D, Adachi S, Chao Q, Rose DW, Carrera CJ, Cottam HB, et al. Deoxyadenosine analogs induce pro-

- grammed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* 2000; 96(10): 3537-43.
19. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10(9): 369-77.
20. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12(11): 1551-70.
21. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-igon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-42.

Rad je primljen 27. V 2002. god.

Abstract

Brajušković G, Marjanović S, Škaro-Milić A. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(2): 175-180.

CHLORAMBUCIL EFFECT ON B LYMPHOCITES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – CELL ULTRASTRUCTURE INVESTIGATION

B type Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) is a malignant disease characterized by the progressive accumulation of morphologically mature, but immunologically dysfunctional CD 5+ lymphocytes in the blood, bone marrow and lymphatic organs in the early phase of the cell cycle. B-CLL is an example of human malignancy caused by alternations in the pathways of programmed cell death - apoptosis. Recent investigations showed a probable role of apoptosis as a prognostic parameter in B-CLL patients. Since the introduction of chlorambucil in the therapy in 1952, besides all the achievements in modern oncology, chlorambucil remained the most common antineoplastic agent in the treatment of CLL. Numerous experimental studies, both *in vitro* and *in vivo*, showed the capability of antineoplastic agents to induce the process of apoptosis of neoplastically transformed cells. In this study the effect of chlorambucil on B lymphocytes was monitored in 16 samples of peripheral blood taken from B-CLL diagnosed patients. According to the investigations performed in this study by ultrastructure analysis of B-CLL cells, it was concluded that chlorambucil either induced apoptosis in B-CLL cells, or activated cell response to the stress.

Key words: leukemia, lymphocytic, chronic; chlorambucil; B-lymphocytes; apoptosis; microscopy, electron.