

Ekspresija Bcl-2 familije proteina u limfocitima B periferne krvi bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom

Goran Brajušković*, Slobodanka Vukosavić[‡], Jovan Dimitrijević*, Snežana Cerović*, Slavica Knežević Ušaj*, Slobodan Marjanović[†], Stanka Romac[‡], Anđelija Škaro Milić*

Vojnomedicinska akademija, *ZPSM – Institut za patologiju, [†]Klinika za hematologiju, Univerzitet u Beogradu, [‡]Biološki fakultet, Beograd

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je maligna bolest koju karakteriše progresivna akumulacija zrelih, monoklonskih, CD 5+ B ćelija u ranoj fazi (G₀/G₁) ćelijskog ciklusa. Smatra se da je akumulacija neoplastički transformisanih limfocita B (HLL ćelija) primarno posledica poremećaja, odnosno blokade procesa apoptoze ovih ćelija. Apoptoza je poseban oblik ćelijske smrti regulisan brojnim ekstracelularnim i intracelularnim mehanizmima. Proteini Bcl-2 familije su poznati modulatori ovog procesa. Neki od ovih proteina (kao što su Bcl-2 i Bcl-X1) imaju antiapoptozni, dok drugi (kao što su Bad ili Bax) proapoptozni efekat. U našem radu analizovano je 20 uzoraka periferne krvi bolesnika sa HLL i 20 uzoraka periferne krvi zdravih osoba koji su činili kontrolnu grupu. Kvantitativna analiza ekspresije proteina Bcl-2 familije (Bcl-2, Bax, Bad i Bcl-X1) obavljena je Western blotting metodom. Nivoi ekspresije Bcl-2 ($p=3,68 \times 10^{-10}$), Bax ($p=0,019$) i Bad ($p=0,073$) proteina bili su statistički značajno viši u svim analizovanim uzorcima periferne krvi bolesnika u odnosu na kontrolne uzorke. Nivo ekspresije Bcl-X1 proteina ($p=0,75$) nije bio statistički značajno povišen u uzorcima periferne krvi bolesnika u odnosu na kontrolne uzorke. Rezultati ovog rada pokazuju da visok nivo ekspresije Bcl-2 proteina, koju prati i povišen nivo ekspresije Bax i Bad proteina predstavlja markantnu karakteristiku HLL ćelija. Istovremeno, rezultati ovog rada pokazuju da variranje u ekspresiji samo jednog proteina Bcl-2 familije u uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL ne mogu predstavljati prognostičke parametre u lečenju ove bolesti.

K l j u č n e r e č i : leukemija, limfocitna, hronična; apoptoza; proteini, protoonkogeni, c-Bcl-2.

Uvod

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je maligna bolest koju karakteriše progresivna akumulacija zrelih, monoklonskih, CD 5+ B ćelija u ranoj fazi (G₀/G₁) ćelijskog ciklusa (1). U istraživanjima patofizioloških mehanizama nastanka bolesti, kao i novih terapijskih pristupa u lečenju HLL posebnu pažnju privlači moguća uloga programirane ćelijske smrti po tipu apoptoze. Smatra se da je akumulacija neoplastički transformisanih limfocita B (HLL ćelija) primarno posledica poremećaja, odnosno blokade procesa apoptoze ovih ćelija (2, 3).

Apoptoza je aktivan i genski regulisan proces ćelijskog umiranja. Rezultati brojnih eksperimentalnih istraživanja su po-

kazali da je ovaj proces regulisan značajnim brojem intracelularnih regulatora (modulatora) apoptoze (4). Najizučavaniji regulator sa inhibitorynim efektom na proces apoptoze je Bcl-2 protein (Bcl-2 – od eng. *B cell lymphoma 2*). Brojna istraživanja su pokazala da je Bcl-2 protein samo jedan član familije proteina, čiji drugi članovi takođe predstavljaju modulatore apoptoze. Neki od njih imaju stimulatorni, a drugi inhibitoryni efekat na proces apoptoze (5). Kako Bcl-2 familija proteina ima kritičnu regulatornu ulogu u procesu apoptoze, poremećaji u njihovoj ekspresiji su jedan od osnovnih molekularnih mehanizama blokade procesa apoptoze HLL ćelija (6, 7).

Kao koimunoprecipitat Bcl-2 proteina, prvo otkriveni proapoptozni homolog bio je Bax protein (Bax od eng. *Bcl-2*

associated X) (8). Korsmayer i sar. su dokazali da Bcl-2 i Bax proteini, zahvaljujući homologim domenima, mogu formirati homodimere i heterodimere. Antiapoptozno dejstvo Bcl-2 proteina zasniva se na mogućnosti da veže Bax protein (u formi heterodimera) i tako onemogućiti stvaranje proapoptoznih homodimera Bax/Bax. Tokom indukcije procesa apoptoze homodimeri Bax proteina formiraju kanale na membranama mitohondrija. Putem ovih kanala mitohondrije napuštaju molekuli citohroma C, jednog od ključnih aktivatora izvršne faze procesa apoptoze. Zbog izuzetnog značaja odnos Bcl-2 i Bax dimera se smatra vrstom autonomnog „ćelijskog reostata“ koji opredeljuje vrstu ćelijske reakcije na apoptozni stimulus (9).

Pojedini autori smatraju da značajnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze sisarskih ćelija ima i Bcl-X gen. Alternativnom obradom primarnog transkripta ovog gena moguće je dobiti 2 različita molekula iRNK, odnosno dva Bcl-X proteina: Bcl-XL i Bcl-Xs. Bcl-XL protein je strukturno i funkcionalno sličan Bcl-2 proteinu. Suprotno njemu, Bcl-Xs stimulatorno utiče na proces apoptoze (10, 11).

Bad protein (Bad – od eng. *Bcl-2 antagonist of cell death*) je još jedan član Bcl-2 familije sa značajnom ulogom u kompleksnim mehanizmima regulacije procesa apoptoze. Eksperimentna istraživanja su pokazala da Bad protein, svojim velikim afinitetom vezivanja za antiapoptozne članove Bcl-2 familije proteina (Bcl-2 i Bcl-XL npr.), favorizuje stimulatorno dejstvo Bax proteina na indukciju procesa apoptoze (10, 11).

Cilj ovog rada bio je da se kvantitativno odrede nivoi ekspresije četiri člana Bcl-2 familije: Bcl-2, Bax, Bcl-XL i Bad proteina u limfocitima B iz periferne krvi bolesnika sa HLL.

Metode

U radu je analizovano 20 uzoraka periferne krvi bolesnika sa HLL. Četvoro bolesnika bilo je sa nelečenom HLL–B kliničkog stadijuma, dok je kod ostalih, terapijom hlorambucilom i purinskim analogima, postignuto stanje stabilne bolesti ili parcijalna remisija, ili je nakon toga sprovedena i terapija održavanja. Kao kontrolna grupa korišćeni su uzorci periferne krvi 20 zdravih osoba.

Kvantitativna analiza ekspresije Bcl-2, Bax, Bcl-XL i Bad proteina obavljena je *Western blotting* analizom ukupnih proteina iz mononukleusnih ćelija iz uzoraka periferne krvi bolesnika i zdravih osoba.

Izolacija nedenaturisanih ukupnih proteina iz mononukleusnih ćelija iz periferne krvi vršena je u NP 40 puferu (0,25% NP 40, 142,5 mmol KCL, 5 mmol MgCl, 10 mmol HEPES pH 7,2, 1 mmol EGTA, *protease inhibitor cocktail tablets complete* TN, Boehringer Mannheim). Nakon izolacije koncentracija proteina određivana je kolorimetrijskom metodom korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kompleta BCA (PIERCE). Koncentracija ukupnih proteina preračunavana je na osnovu standardne krive, konstruisane na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancija uzoraka poznate koncentracije (uzorci bovinih serumskih albumina rastuće koncentracije).

Za *Western blotting* analizu korišćeno je 50-200 µg nedenaturisanih ukupnih proteina koji su razdvajani SDS-

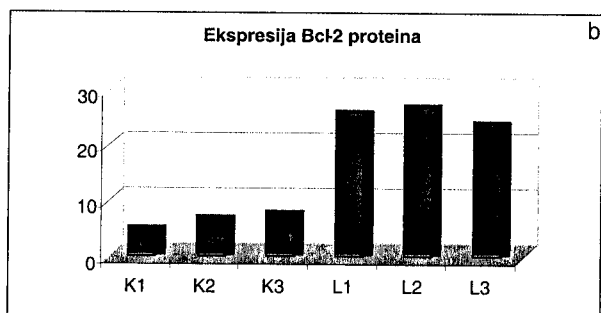
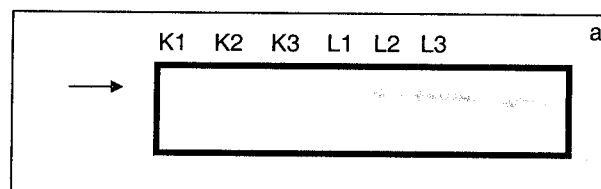
PAGE elektroforezom (BioRad). Transfer proteina sa gela na nitroceluloznu membranu (promer pora 0,45µm, BioRad) obavljen je u aparatu za tzv. polusubi transfer (BioRad). Uspešnost transfera proveravana je bojenjem membrana u rastvoru Ponchou–S u trajanju od dva minuta. Pre inkubacije sa antitelima *blottovi* su inkubirane u rastvoru za blokiranje nespecifičnog vezivanja (5% rastvor obranog mleka u 1×TBS-u u prisustvu deterdženta 0,1% TWIN 20) u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa primarnim antitelima obavljena je preko noći na 4°C sa monoklonskim antitelom za Bcl-2 (1:500 razblaženje, DAKO), poliklonskim antitelom za Bax (1:1 000 razblaženje, DAKO), monoklonskim antitelom za Bad (1:200 razblaženje, Santa Cruz Biotechnology), i poliklonskim antitelom za Bcl-XL (1:1000 razblaženje, Santa Cruz Biotechnology), a kao interna kontrola korišćeno je monoklonsko antitelo za β-aktin (1:5 000, razblaženje Sigma). Nakon inkubacije sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (antimišji i antizečji imunoglobulini, razblaženje 1:1 000, AMERSHAM) izvršena je detekcija signala pomoću hemioluminescentnog agensa luminola (Super Signal West Chemiluminesce Kit, PIRCE) (12).

Autoradiografski signali ukupnih proteina, detektovani na osetljivom rendgen filmu (BS, KODAK), skenirani su pomoću HP-4C Scanjet skenera i trake su kvantifikovane korišćenjem softverskog paketa Image Quant (Molecular Dynamics, USA). Podaci dobijeni denzitometrijskom analizom dalje su analizovani statističkom metodom - analize varijansi (ANOVA) i Studentovim t-testom.

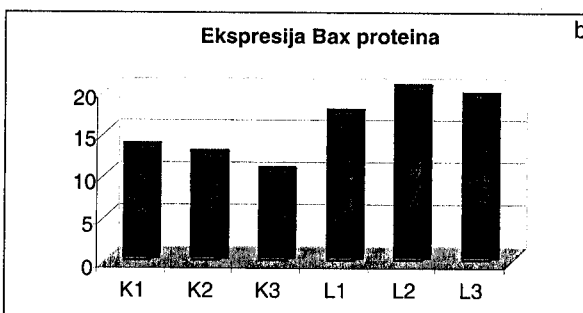
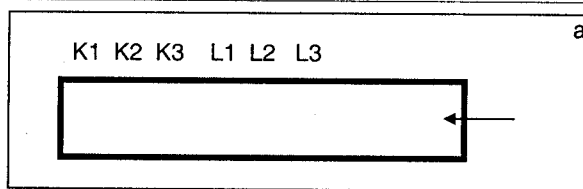
Kod bolesnika sa nelečenom HLL *Western blotting* analiza Bcl-2 i Bax proteina rađena je u uzorcima ukupnih proteina izolovanih iz mononukleusnih ćelija periferne krvi dobijenih pre i 3. dana od početka primene citostatskog lečenja.

Rezultati

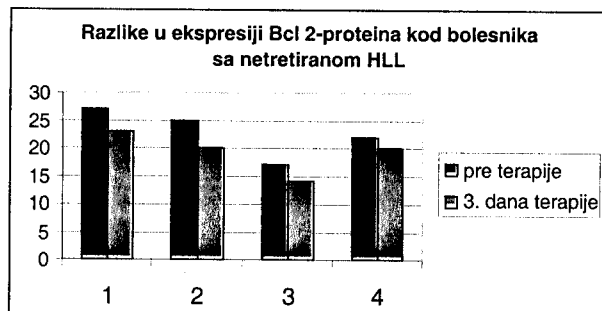
U svim uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL korišćenjem *Western blotting* analize utvrđen je povišen nivo ekspresije Bcl-2 proteina u odnosu na nivo ekspresije u mononukleusnim ćelijama periferne krvi zdravih osoba (sl. 1). Razlike u ekspresiji Bcl-2 proteina između kontrolne grupe i grupe analizovanih bolesnika bila je statistički značajna sa vrednošću $p=3,68 \times 10^{-10}$ (ANOVA, $F=98,63$, $F_{crit}=4,24$). Primenom Studentovog t testa potvrđena je statistička značajnost razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina između kontrolne grupe i grupe analizovanih bolesnika ($p=5,8 \times 10^{-6}$). Prosečno, nivo ekspresije Bcl-2 proteina bio je trostruko povišen kod bolesnika sa HLL u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi analizovanih bolesnika sa HLL razlike u ekspresiji Bcl-2 proteina nisu bile statistički značajne ($p>0,05$). Kod bolesnika sa nelečenom HLL, u uzorcima mononukleusnih ćelija periferne krvi dobijenih pre i trećeg dana terapije, nije registrovana statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina. I pored toga kod bolesnika sa nelečenom HLL trećeg dana terapije registrovan je smanjen nivo ekspresije Bcl-2 proteina (sl. 2).



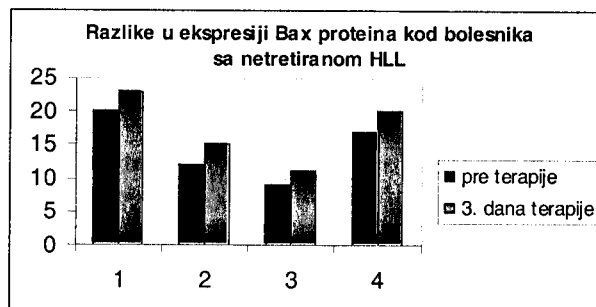
Sl. 1 – Western blot analiza Bcl-2 proteina u kontrolnim uzorcima (K1-K3) i uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL (L1-L3) (strelica pokazuje Bcl-2 protein) (a); histogram razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod zdravih osoba (K1-K3) i bolesnika sa HLL (L1-L3) (b).



Sl. 3 – Western blot analiza Bax proteina u kontrolnim uzorcima (K1-K3) i uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL (L1-L3) (strelica pokazuje Bax protein) (a); histogram razlika u ekspresiji Bax proteina kod zdravih osoba (K1-K3) i bolesnika sa HLL (L1-L3) (b).



Sl. 2 – Histogram razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod bolesnika sa netretiranom HLL, pre i trećeg dana citostatskog tretmana.



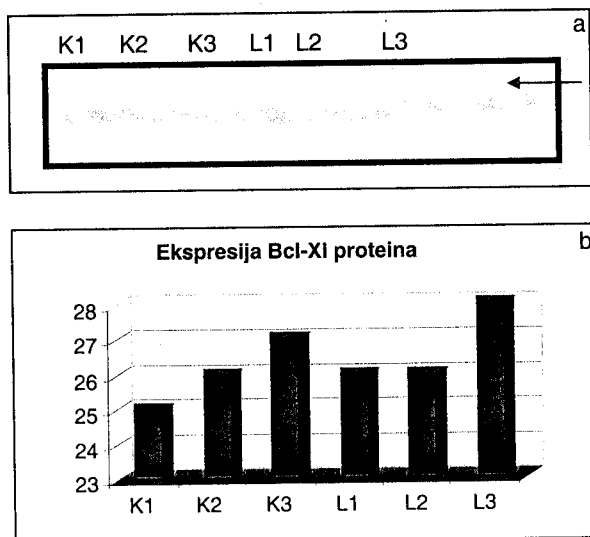
Sl. 4 – Histogram razlika u ekspresiji Bax proteina kod bolesnika sa netretiranom HLL, pre i trećeg dana citostatskog tretmana.

Povišen nivo ekspresije Bcl-2 proteina, u uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL, prati i povećanje ekspresije drugih analizovanih proteina ove familije. Povišen nivo ekspresije Bax proteina otkriven je u većini (17/20) uzoraka periferne krvi bolesnika sa HLL u odnosu na njegovu ekspresiju u kontrolnim uzorcima uzetim od zdravih osoba (sl. 3). Statistička analiza dobijenih rezultata metodom – analize varijansi (ANOVA), pokazala je da je ova razlika statistički značajna sa $p=0,019$ ($F=6,28$, $F_{crit}=4,24$). Primenom Studentovog t-testa potvrđena je statistička značajnost razlika u ekspresiji Bax proteina ($p=0,000911$). Razlike u nivoima ekspresije Bax proteina u okviru grupe analizovanih bolesnika nisu bile statistički značajne. Kod bolesnika sa netretiranom HLL trećeg dana terapije registrovan je povišen nivo ekspresije ovog proteina u odnosu na uzorke mononukleusnih ćelija iz periferne krvi dobijenih pre otpočinjanja citostatskog tretmana (sl. 4).

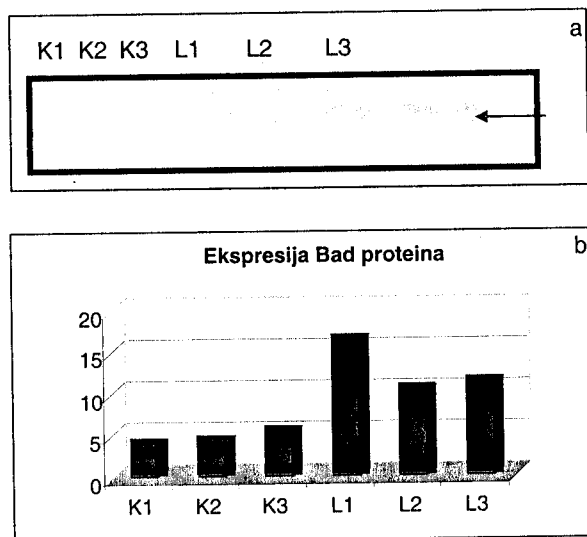
Nivo ekspresije antiapoptoznog člana Bcl-2 familije, Bcl-XL proteina u mononukleusnim ćelijama periferne krvi

bolesnika bio je sličan ekspresiji ovog proteina u mononukleusnim ćelijama periferne krvi zdravih osoba (sl. 5). Korišćenjem metode analize varijansi ANOVA ($p=0,75$, $F=0,114$, $F_{crit}=7,7$) i Studentovog t-testa ($p=0,378$) pokazano je da razlike u ekspresiji ovog proteina između kontrolne grupe zdravih osoba i bolesnika sa HLL nisu statistički značajne.

Poslednji analizovani protein Bcl-2 familije bio je proapoptozni Bad protein (sl. 6). U analizovanoj grupi uzoraka ukupnih proteina mononukleusnih ćelija iz periferne krvi bolesnika sa HLL ustanovljen je četverostruko povišen nivo ekspresije ovog proteina, sa statističkom značajnošću (ANOVA, $p=0,073$, $F=25,2$, $F_{crit}=7,7$), u odnosu na kontrolne uzorke. Statistička značajnost razlika potvrđena je i Studentovim t-testom ($p=0,0187$). Istovremeno, razlike u ekspresiji Bad proteina u okviru grupe bolesnika nisu bile statistički značajne ($p>0,05$).



Sl. 5 – Western blot analiza Bcl-XI proteina u kontrolnim uzorcima (K1-K3) i uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL (L1-L3) (strelica pokazuje Bcl XI protein) (a), histogram razlika u ekspresiji Bcl-XI proteina kod zdravih osoba (K1-K3) i bolesnika sa HLL (L1-L3) (b).



Sl. 6 – Western blot analiza Bad proteina u kontrolnim uzorcima (K1-K3) i uzorcima periferne krvi bolesnika sa HLL (L1-L3) (strelica pokazuje Bad protein) (a), histogram razlika u ekspresiji Bad proteina kod zdravih osoba (K1-K3) i bolesnika sa HLL (L1-L2) (b).

Diskusija

Određivanje nivoa ekspresije Bcl-2 proteina predstavlja jednu od prvih savremenih molekularno-bioloških postupaka koji svoju primenu nalazi u molekularnoj patologiji, savremenoj grani medicinske dijagnostike. Poslednjih 13 godina translokacija t(14;18) i/ili povišeni nivo ekspresije Bcl-2 proteina predstavlja prognostički parametar u lečenju folikularnih limfoma (13). Pored toga, opsežne studije su poka-

zale da je povišen nivo ekspresije Bcl-2 proteina negativan prognostički parametar u lečenju malignog melanoma i kancera kolona (14).

Rezultati našeg rada pokazali su visok nivo ekspresije Bcl-2 proteina, kako u grupi bolesnika sa nelečenom HLL, tako i kod bolesnika koji se nalaze u stanju stabilne bolesti ili parcijalne remisije. Povišen nivo ekspresije Bcl-2 proteina (u odnosu na kontrolne uzorke periferne krvi zdravih osoba) registrovan je i u uzorcima periferne krvi bolesnika koji se nalaze u stanju parcijalne remisije sa terapijom održavanja. Visok nivo ekspresije ovog proteina zadržan je i kod bolesnika koji su imali dobar klinički odgovor na primenjenu inicijalnu terapiju, a koji se nalaze u stanju stabilne bolesti i bez primene terapije održavanja. Rezultati našeg rada su u korelaciji sa rezultatima istraživanja drugih autora. U grupi od 46 bolesnika sa HLL Molica i saradnici 1997. godine (15) nisu uočili postojanje korelacije visokog nivoa ekspresije Bcl-2 proteina i kliničko-bioloških parametara bolesti. Aviram i saradnici 2000. godine (16) su na osnovu ispitivanja rađenog na grupi od 54 bolesnika sa HLL pokazali identične rezultate. U sva 54 uzorka periferne krvi detektovan je visok nivo ekspresije Bcl-2 proteina bez obzira na klinički stadijum bolesti i/ili nivo postignute remisije. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da konstantna i visoka ekspresija Bcl-2 proteina sa njegovim inhibitorynim efektom na proces apoptoze omogućava progresivnu akumulaciju neoplastički transformisanih limfocita B u perifernoj krvi bolesnika sa HLL. Smanjenje nivoa Bcl-2 proteina nađeno u uzorcima periferne krvi bolesnika sa nelečenom HLL trećeg dana od početka citostatskog tretmana, verovatno je u korelaciji sa osetljivošću HLL na dejstvo antineoplastičkog agensa i terapijom indukovano procesa apoptoze HLL ćelija.

Slično rezultatima analize ekspresije Bcl-2 proteina povišen nivo ekspresije Bax proteina zabeležen je u većini uzoraka periferne krvi bolesnika sa HLL u odnosu na kontrolnu grupu. Da povišen nivo ekspresije Bcl-2 proteina prati i povišen nivo ekspresije Bax proteina pokazali su i Klein i saradnici 2000. godine. Preciznog objašnjenja za postojanje pozitivne korelacije u ekspresiji dva proteina sa suprotnim efektom na proces apoptoze nema. Neki autori smatraju da konstantna i visoka ekspresija Bcl-2 proteina dovodi do produžetka poluzivota Bax proteina mehanizmima posttranslacijske modulacije. Druga grupa istraživača ne isključuje i mogućnost postojanja mutacije na bax genu koji dovodi do uočljive ekspresije disfunkcionalnog proteina (17). Pepper i saradnici 1999. godine na osnovu *ex vivo* analize ekspresije Bax proteina zaključuju da povišen nivo ekspresije Bax proteina nije u korelaciji sa kliničkim parametrima bolesti (18). U grupi bolesnika sa nelečenom HLL, trećeg dana od početka citostatskog tretmana, otkriven je povišen nivo ekspresije ovog proteina. Ovi rezultati idu u prilog rezultatima drugih eksperimentalnih studija koji ukazuju da je nivo ekspresije Bax proteina u korelaciji sa osetljivošću HLL ćelija na dejstvo antineoplastičkih agensa u smislu stimulatornog efekta na terapijom indukovano proces apoptoze (19).

Pored visokog nivoa ekspresije Bax proteina, u analizovanoj grupi bolesnika sa HLL otkriven je visok nivo ekspresije i proapoptoznog Bad proteina. Proapoptozno dejstvo Bad protein ispoljava svojim visokim afinitetom za vezivanje za Bcl-2 i Bcl-Xl protein. Na taj način Bad protein blokira heterodimerizaciju Bcl-2 i Bax proteina (20). Buduća istraživanja će pokazati da li je izrazito visok nivo ekspresije proapoptoznog Bad proteina u korelaciji sa indolentnim kliničkim tokom ove bolesti.

Povišen nivo ekspresije, kako proapoptoznih, tako i antiapoptoznih proteina Bcl-2 familije u perifernoj krvi bolesnika sa HLL potvrđen je i na nivou RNK molekula korišćenjem najsavremenije molekulskobiološke tehnike – *real-time* PCR (21). Rezultati našeg rada pokazuju da variranja u ekspresiji samo jednog proteina ćelijske smrti u uzorcima periferene krvi bolesnika sa HLL ne mogu predstavljati prognostički parametar u lečenju ove bolesti.

Poslednjih godina objavljeni su rezultati brojnih eksperimentnih studija koje za temu istraživanja imaju međusobni odnos članova Bcl-2 familije, proteina na indukciju

procesa apoptoze. Nastanak patološkog klon HLL ćelija rezultat je kompleksnih mehanizama međusobne interakcije proteina Bcl-2 familije, koji rezultuje u poremećajima procesa apoptoze. Bolje upoznavanje ovih mehanizama daje i mogućnost definisanja preciznih bioloških parametara koji bi mogli imati i prognostički značaj u lečenju ove bolesti.

Zaključak

Visok nivo ekspresije Bcl-2 proteina, koju prati i povišen nivo ekspresije Bax i Bad proteina, je markantna karakteristika neoplastički transformisanih limfocita B iz periferne krvi bolesnika sa HLL. Istovremeno, ekspresija antiapoptoznog proteina Bcl-Xl, za razliku od drugih vrsta hematoloških neoplazmi, nije patološka odlika HLL ćelija. Kako su u procese regulacije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze uključeni brojni članovi Bcl-2 familije, rezultati našeg rada pokazuju da variranja u ekspresiji samo jednog proteina ćelijske smrti u uzorcima periferene krvi bolesnika sa HLL ne mogu predstavljati prognostički parametar u lečenju ove bolesti.

LITERATURA

1. *Matutes E, Polliack A.* Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4(1): 22–47.
2. *Chiarugi V, Cinelli M, Magnelli L, Dello SP.* Apoptosis: molecular regulation of cell death and hematologic malignancies. *Mol Biotechnol* 2002; 20(3): 305–14.
3. *Kliche KO, Hoffken K.* The role of apoptosis in hematologic malignancies and modulation of apoptosis as a new therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(3-4): 226–31.
4. *Rowan S, Fisher DE.* Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997; 11(4): 457–65.
5. *Chao DT, Korsmeyer SJ.* BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.
6. *Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC.* Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; 21(21): 3459–74.
7. *Reed JC.* Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17(25): 3225–36.
8. *Yang E, Korsmeyer SJ.* Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2): 386–401.
9. *Korsmeyer SJ.* BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59(7 Suppl): 1693s–700s.
10. *McConkey DJ, Zhivotovsky B, Orrenius S.* Apoptosis – molecular mechanisms and biomedical implications. *Mol Aspects Med* 1996; 17(1): 1–110.
11. *Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91(9): 3379–89.
12. *Vukosavić S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S.* Bax and Bcl-2 interaction, in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1999; 73(6): 2460–8.
13. *Pezzella F, Mason DY.* The bcl-2 gene and 14;18 translocation in lymphoproliferative disorders. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; 32(6): 397–9.
14. *Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, Finke JH.* Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 2000; 5(1): 17–20.
15. *Molica S, Mannella A, Crispino G, Dattilo A, Levato D.* Comparative flow cytometric evaluation of bcl-2 oncoprotein in CD5+ and CD5- B-cell lymphoid chronic leukemias. *Haematologica* 1997; 82(5): 555–9.
16. *Aviram A, Rabizadeh E, Zimra Y, Yeshoron M, Marmelstein M, Shaklai M, et al.* Expression of Bcl-2 and Bax in cells isolated from B-chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease. *Eur J Haematol* 2000; 64(2): 80–4.
17. *Klein A, Miera O, Bauer O, Golfier S, Schriever F.* Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia* 2000; 14(1): 40–6.
18. *Pepper C, Thomas A, Hidalgo de Quantana J, Davies S, Hoy T, Bentley P.* Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia – the role of Bcl-2 family dysregulation. *Leuk Res* 1999; 23(11): 1007–14.

19. *Bosanquet AG, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ*, et al. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16 (6): 1035–44.
20. *Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S*, et al. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60(1): 23–32.
21. *Nagy B, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T*, et al. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 120(3): 434–41.
- Rad je primljen 31. III 2003. god.

Abstract

Brajušković G, Vukosavić S, Dimitrijević J, Cerović S, Knežević Ušaj S, Marjanović S, Romac S, Škaro Milić A. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(1): 41–46.

EXPRESSION OF Bcl-2-FAMILY PROTEINS IN PERIPHERAL BLOOD B-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH CRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplastic disease characterized by the accumulation of morphologically mature monoclonal CD 5+ B cells in the early phase (G₀/G₁) of the cell cycle. It is considered that the accumulation of neoplastically transformed lymphocytes B (CLL cells) is primarily the consequence of the disturbance, i.e., blockade of these cells' apoptosis process. Apoptosis is the specific process of programmed cell death regulated by numerous extracellular and intracellular mechanisms. The Bcl-2 proteins are well-known modulators of this process. Some of these proteins (such as Bcl-2, and Bcl-Xl) are anti-apoptotic, while others (such as Bad or Bax) are pro-apoptotic. Our study included the analysis of 20 peripheral blood specimens from 20 patients with CLL, and 20 peripheral blood specimens of healthy persons who represented the control group. Using Western blotting analysis, we quantitatively examined the protein expression of Bcl-2 family (Bcl-2, Bax, Bad, and Bcl-Xl). The level of Bcl-2 ($p=3,68 \times 10^{-10}$), Bax ($p=0,019$), and Bad ($p=0,073$) proteins expression was significantly increased in all the analyzed peripheral blood samples of patients, while the level of Bcl-Xl protein ($p=0,75$) did not significantly differ in peripheral blood samples of patients, compared to the controls. The results of this study showed that the increased level of expression of Bcl-2, Bax, and Bad protein represented the most striking feature of CLL cells. Moreover, the variations in the expression of only one protein of the Bcl-2 family could not represent the prognostic parameter in the treatment of this disease.

Key words: leukemia, lymphocytic, chronic; apoptosis; proto-oncogene proteins c-Bcl-2.