

Received: 2004.03.09

Accepted: 2004.05.06

Published: 2004.05.24

Proces apoptozy w patogenezie przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej

Apoptosis in pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukemia

Monika Podhorecka

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Przewlekła białaczka limfatyczna B komórkowa (B-PBL), charakteryzująca się klonalną ekspansją limfocytów B CD5+, jest najczęstszym typem białaczki osób dorosłych w krajach zachodnich. W patogenezie B-PBL najważniejszą rolę odgrywa zahamowanie procesu apoptozy komórek białaczkowych, w które zaangażowanych jest wiele czynników zarówno wewnętrznych, jak i przekazywanych ze środowiska zewnętrznego. W opornych na apoptozę komórkach B-PBL stwierdzono wysoką ekspresję działającego antyapoptotycznie białka BCL-2. W regulację procesu apoptozy komórek nowotworowych B-PBL wydają się być zaangażowane również czynnik NF- κ B, hamujący apoptozę oraz kinaza fosfadytyloinozytolu 3 (PI-3K) i kinaza białkowa C (PKC), których zablokowanie prowadzi do indukcji apoptozy komórek B-PBL. Komórki białaczkowe B-PBL wykazują konstytutywnie wysoki poziom inhibitora kinaz cyklinozależnych p27kip1, który koreluje z zahamowaniem apoptozy w warunkach *in vitro* oraz wykazuje związek z klinicznym przebiegiem choroby. W komórkach białaczkowych wykazano ekspresję cząsteczek należących do rodziny TNF – BAFF i APRIL oraz ich ligandów. Autologiczne oddziaływanie między tymi cząsteczkami chroni prawdopodobnie komórki białaczkowe przed apoptozą. Oprócz nieprawidłowości apoptozy spowodowanych zmianami w samym jej mechanizmie, w komórkach B-PBL stwierdzono antyapoptotyczne działanie czynników zewnętrznych, do których należą cytokiny. Wiele cytokin wykazuje antyapoptotyczne działanie na komórki białaczkowe, m.in. IL-4, IL-2, IFN- γ , TNF, a niektóre, takie jak IL-5 i IL-10 działanie proapoptotyczne. Pomimo znaczącej roli zaburzeń apoptozy w patogenezie B-PBL, kompleksowa ocena tego procesu wymaga jeszcze szczegółowych badań. Jest to tym bardziej istotne, że głównym kierunkiem rozwoju w terapii B-PBL jest próba modulacji zaburzonego procesu śmierci nowotworowych limfocytów B.

Słowa kluczowe:

B-PBL • apoptoza • limfocyty B • regulatory apoptozy

Summary

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), a clonal expansion of B CD5+ cells, is the most frequent type of adult leukemia in western countries. Accumulation of neoplastic B-cells is caused not by their higher proliferation rate, but by their prolonged life-span due to dysregulation of apoptosis. Many proteins act as inducers or inhibitors in controlling apoptosis. A high level of antiapoptotic BCL-2 protein is detected in B cells of B-CLL. Other factors, such as NF- κ B, PI-3K and PKC, are also involved in the inhibition of malignant cell apoptosis. A high level of p27kip1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase that correlates with the degree of *in vitro* apoptosis, is found in B-CLL cells. The autologous interaction between BAFF, APRIL, and their ligands may also be involved in apoptosis inhibition in B-CLL. Some external factors e.g. cytokines, may suppress apoptosis of malignant cells. IL-4, IL-2, IFN- γ , and TNF are proven inhibitors, while IL-5 and IL-10 are inducers of apoptosis of these cells. Even though there are reports characterizing some mechanisms of B-CLL cell apoptosis, relatively less is still known about the complex regulation of this process. This requires more precise research, as new anti-leukemic drugs influence the regulation of apoptosis of neoplastic B lymphocytes.

Key words:

B-CLL • apoptosis • B cells • apoptosis regulators

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5589.pdf
Word count:	2514
Tables:	–
Figures:	1
References:	75
Source of support:	Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych jako projekt badawczy 2 P05B 12026.
Adres Autora:	dr n. med. Monika Podhorecka, Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin, e-mail: mpodhor@asklepios.am.lublin.pl

WSTĘP

Przewlekła białaczka limfatyczna B komórkowa (B-PBL) jest najczęstszym typem białaczki w krajach zachodnich. Występuje głównie wśród osób starszych, średnia wieku w chwili rozpoznania wynosi około 65 lat [10,16]. B-PBL jest klonalną ekspansją nowotworowych limfocytów B, charakteryzującą się pod względem klinicznym postępującą limfocytosą krwi obwodowej, naciekaniem szpiku kostnego, splenomegalią i limfadenopatią, a także dysfunkcją układu immunologicznego, wyrażającą się niedoborami odporności oraz zespołami autoimmunologicznymi, pojawiającymi się w zaawansowanym okresie choroby [11, 60,69]. Rozpoznanie B-PBL opiera się na stwierdzeniu utrzymującej się klonalnej limfocytozy krwi obwodowej powyżej $5 \times 10^9/l$, której nie da się wytłumaczyć innymi stanami chorobowymi oraz infiltracją szpiku kostnego komórkami limfoidalnymi (30% wszystkich komórek jedonajdrzastych) [27,28]. Choroba charakteryzuje się niejednorodnym przebiegiem i różnorodnością objawów klinicznych. Około 1/3 pacjentów nie wymaga stosowania leczenia i wykazuje długi okres przeżycia. U 1/3 chorych, po początkowej łagodnej fazie choroby, pojawiają się objawy progresji. Pozostałą grupę stanowią pacjenci z agresywną postacią choroby, wymagający szybkiego leczenia [26].

NOWOTWOROWE LIMFOCYTY B-PBL

Limfocyty nowotworowe w typowych przypadkach B-PBL są małymi komórkami z wyraźnie widocznym, wąskim rąbkim cytoplazmy [6, 20]. Pod względem fenotypu immunologicznego jest to populacja limfocytów B wykazujących ekspresję typowych dla tych komórek markerów, takich jak CD19, CD20, CD21, CD24 z koekspresją charakterystycznego dla limfocytów T markera CD5 oraz słabą ekspresją immunoglobulin powierzchniowych sIg (najczęściej IgM, często wspólnie z IgD) [12]. Białaczkowe limfocyty B w większości przypadków wykazują również ekspresję CD23 [11,33]. Antygen CD22 stwierdzany w cytoplazmie komórek białaczkowych nie wykazuje (lub w niewielkim stopniu) ekspresji na ich powierzchni [4, 33]. W odróżnieniu od komórek nowotworowych białaczki prolimfatycznej, które wiążą przeciwciała FMC7, taka reaktywność komórek B-PBL jest raczej rzadka [11]. Komórki białaczkowe charakteryzują się heterogennością w zakresie ekspresji antygeny CD38, który według najnowszych badań wykazuje wyraźną odwrotną korelację ze stopniem mutacji genów regionu zmiennego łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobulin (odpowiednio IgVH i IgVL) w tych komórkach. Poziom ekspresji CD38 wydaje się mieć istotne znaczenie prognostyczne w przebiegu

B-PBL. Pacjenci z niezmutowanym IgV i ekspresją CD38 na ponad 30% komórek rokują gorzej w porównaniu z chorymi z mutacją i obniżonym odsetkiem CD 38 [21].

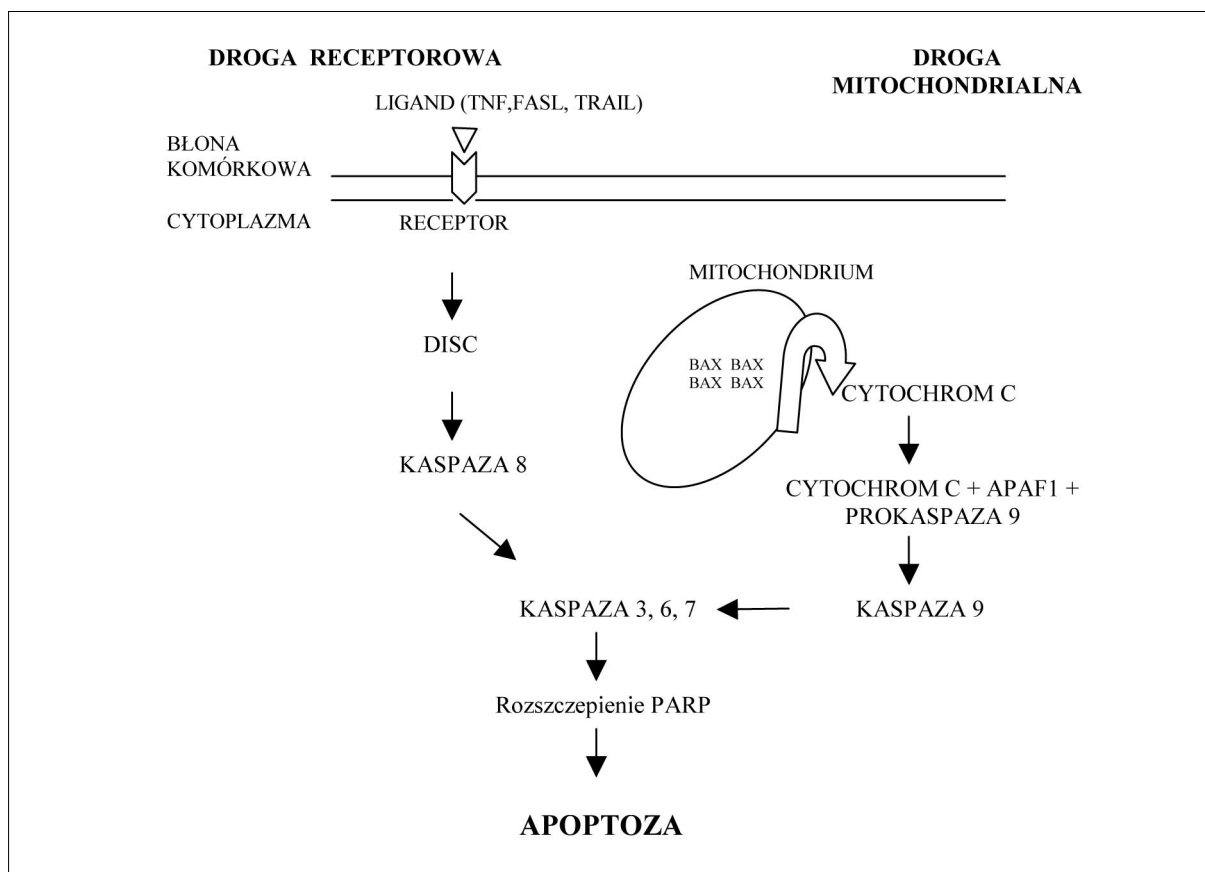
Charakterystyczną cechą przeważającej większości (>99%) białaczkowych limfocytów B jest zablokowanie na etapie G0/G1 cyklu komórkowego oraz bardzo mała aktywność podziałowa [74]. Powszechnie akceptowany jest fakt, że za akumulację komórek nowotworowych B-PBL nie jest odpowiedzialna ich wzmożona proliferacja, ale wydłużony czas przeżycia, związany z zaburzeniami procesu apoptozy [9, 59]. Jednak limfocyty B-PBL wykazujące oporność na apoptozę w warunkach *in vivo*, ulegają jej spontanicznie w warunkach *in vitro* [17]. Sugeruje to obecność złożonych mechanizmów zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych, które mają wpływ na przeżycie białaczkowych limfocytów B.

APOPTOZA

Apoptoza jest procesem fizjologicznym odgrywającym istotną rolę zarówno w rozwoju embrionalnym, jak i w zachowaniu równowagi tkankowej dorosłego organizmu. Oprócz martwicy, czyli śmierci komórki spowodowanej niszczącymi czynnikami patologicznymi, apoptoza jest podstawowym zjawiskiem warunkującym los komórek. Równowaga pomiędzy apoptozą a proliferacją komórkową zapewnia utrzymanie odpowiedniej liczby komórek w rozwijającym się organizmie oraz zachowanie ich prawidłowych proporcji w dojrzałych tkankach [3, 49,55]. W mechanizmie apoptozy dochodzi do odnowy i regeneracji tkanek, inwolucji narządów, eliminowania uszkodzonych komórek. Apoptoza odgrywa szczególną rolę w procesie negatywnej selekcji limfocytów T dojrzewających w grasicy oraz w odpowiedzi typu komórkowego, co leży u podstaw prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego [58,67].

DROGI INDUKCJI APOPTOZY

Sygnal apoptozy odbierany przez swoiste struktury komórkowe może być emitowany przez inne komórki, a także przez czynniki zewnątrzpochothane (m.in. leki cytostatyczne). Indukcja apoptozy prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych enzymów zwanych kaspazami, które z kolei indukują kaskadę reakcji łańcuchowych prowadzących do śmierci komórki [65]. Ze względu na podstawową rolę kaspaz proces apoptozy określany jest również jako zależna od kaspaz śmierć komórki. Należy jednak podkreślić, że opisano również możliwość indukcji apoptozy niezależnie od kaspaz, w której istotną rolę odgrywa tzw. czynnik mitochondrialny AIF (apoptosis inducing factor) [13].



Ryc.1. Drogi indukcji apoptozy: receptorowa (zewnętrzna) i mitochondrialna (wewnętrzna); objaśnienia w tekście

Istnieją dwie drogi aktywacji kaspaz w procesie apoptozy: tzw. droga receptorowa (zewnętrzna) oraz droga mitochondrialna (wewnętrzna) (ryc. 1). W mechanizmie zewnętrznej do aktywacji kaspaz i apoptozy dochodzi po połączeniu receptora na powierzchni komórki z odpowiednim ligandem. Najlepiej poznano receptory z rodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF), które mogą przyłączyć takie ligandy jak TNF, FasL czy TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Opisane połączenie prowadzi do powstania kompleksu DISC (death-induced signaling complex), a następnie aktywacji kaspazy 8, najbardziej charakterystycznej dla drogi receptorowej [62,65]. Droga receptorowa regulowana jest przez onkogeny, m.in. proapoptotyczne *p53*, *p21*, *p38* [30,62,73].

W mitochondrialnym mechanizmie indukcji apoptozy aktywacja kaspaz jest uruchamiana przez zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej. Proces ten regulowany jest przez białka rodziny BCL-2, do której należą antagoniści śmierci komórki (m.in. BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BAG-1) oraz agoniści (m.in. bax, bcl-xs, bad, bak) [19]. W odpowiedzi na sygnał apoptotyczny białka BAX ulegają translokacji do wewnętrznej błony mitochondrium, co prowadzi do zmiany potencjału błony mitochondrialnej, jej permabilizacji i uwolnienia do cytoplazmy cytochromu C. Cytochrom C łącząc się z białkiem APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) oraz z proenzymem kaspazy 9 tworzy kompleks aktywujący

kaspazę 9 [7]. W wyniku indukcji apoptozy zarówno na drodze mitochondrialnej, jak i receptorowej dochodzi do aktywacji tzw. kaspaz efektorowych – kaspazy 3 oraz 6 i 7 [65]. To z kolei prowadzi do rozszczepienia białka jądrowego PARP (Poly [ADP-Ribose] Polymeraze) i fragmentacji DNA i w rezultacie powoduje śmierć komórki [42,63,64].

Śmierć komórki w mechanizmie apoptozy charakteryzuje pojawienie się określonych zmian, których ocena leży u podstaw licznych metod laboratoryjnych pozwalających na analizę tego procesu [23]. W jego pierwszym etapie następuje spadek potencjału błonowego mitochondriów, następnie błona komórkowa traci swoją prawidłową strukturę, czego wyrazem jest translokacja fosfatydyloseryny z jej warstwy wewnętrznej do warstwy zewnętrznej [70]. W kolejnych etapach następuje kondensacja cytoplazmy i jądra komórkowego, a następnie fragmentacja jądrowego DNA. W końcowym stadium apoptozy umierające komórki zostają podzielone w tzw. ciała apoptotyczne, które są usuwane przez fagocyty bez typowej reakcji zapalnej w otaczających tkankach [70].

APOPTOZA A B-PBL

B-PBL należy do grupy chorób rozrostowych, w patogenezie których istotną rolę odgrywa zaburzenie procesu apoptozy. Oporne na apoptozę limfocyty B stanowiące klon komórek nowotworowych ulegają postępującej akumula-

cji we krwi obwodowej, szpiku i narządach limfatycznych. Zahamowanie apoptozy komórek B-PBL wydaje się złożonym, ciągle jeszcze nie do końca poznanym zjawiskiem, w które zaangażowanych jest wiele czynników, zarówno wewnętrznych, spowodowanych nieprawidłowościami w samym mechanizmie apoptozy komórek B, jak również przekazywanych ze środowiska zewnętrznego.

Od dawna wiadomo o występowaniu wysokiej ekspresji białka BCL-2 w komórkach nowotworowych B-PBL. Wzmocniona ekspresja BCL-2 nie łączy się jednak z rearanżacją genu *bcl-2* spowodowaną translokacją t(14,18), która jest charakterystyczna dla chłoniaków grudkowych [73]. Ponadto nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją BCL-2 a opornością na chemioterapię i gorszym rokowaniem [40]. Mechanizm zwiększonej ekspresji BCL-2 w B-PBL pozostaje niejasny. Pewną rolę może odgrywać tu działanie czynników zewnętrznych np. cytokin [10]. O wejściu na drogę śmierci komórki wydaje się decydować stosunek BCL-2/BAX [35]. Białko BCL-2 tworząc heterodimery z BAX chroni komórkę przed apoptozą, natomiast homodimery BAX działają proapoptotycznie. Wskaźnik BCL-2/BAX wydaje się mieć większe znaczenie prognostyczne w B-PBL niż poziom ekspresji BCL-2. Niski wskaźnik BCL-2/BAX stwierdzono w grupie pacjentów z łagodnym przebiegiem choroby i dobrą odpowiedzią na zastosowane leczenie, natomiast u chorych z wysokim wskaźnikiem BCL-2/BAX wykazano zwiększoną oporność komórek białaczkowych na apoptozę *in vitro* [45]. Translokacja BAX z cytosolu do mitochondrium oraz zmiany w konformacji BAX i BAK stanowią początkowy etap mitochondrialnej drogi indukcji apoptozy, która pełni prawdopodobnie istotną rolę w procesie śmierci komórek spowodowanym lekami [5].

Kolejną cząsteczką istotną w mechanizmie apoptozy, budzącą zainteresowanie w B-PBL i stanowiącą przedmiot kontrowersji jest CD95 (Fas/Apo-1). Komórki białaczkowe wykazują niewielką lub nie wykazują w ogóle ekspresji Fas. Ekspresja Fas może się pojawić w komórkach zaktwowanych, ale nawet wtedy są one w większości odporne na reakcję z FasL (Fas ligand) i apoptozę [51]. Być może mechanizm ten umożliwia komórkom białaczkowym uniknięcie kontroli ze strony limfocytów T [31]. Pomimo że reakcja Fas/FasL prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli w apoptozie białaczkowych limfocytów B, w komórkach tych stwierdza się obecność aktywnej kaspazy 8 charakterystycznej dla receptorowej drogi indukcji apoptozy [36].

Najnowsze badania wskazują na ważną rolę, jaką w patogenezie B-PBL odgrywają kolejne cząsteczki należące do rodziny TNF – BAFF (B-cell activation factor), zwany również BLyS (B-lymphocyte stimulator) oraz APRIL (a proliferation inducing ligand), a także ich receptory BCMA (B-cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand-interactor) oraz BAFF-R (BAFF receptor) [38,48]. Ekspresję BAFF stwierdzono na powierzchni monocytów, makrofażów i komórek dendrytycznych, a jego rola polega na regulacji dojrzewania i proliferacji limfocytów B [47]. APRIL, który w zasadzie nie występuje w prawidłowych tkankach, wykazuje wysoką ekspresję na komórkach nowotworowych pobudzając ich wzrost zarówno

w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [32]. W komórkach białaczkowych B-PBL stwierdzono obecność mRNA dla BAFF-R i TACI, a także obecność mRNA i białka BAFF oraz APRIL, które w przeciwieństwie do prawidłowych limfocytów B wykazywało ekspresję na powierzchni komórek. Ponadto w surowicy chorych na B-PBL stwierdzono rozpuszczalną postać BAFF. Dodanie rozpuszczalnego BAFF lub APRIL do hodowli komórkowych chroniło limfocyty białaczkowe przed spontaniczną i indukowaną lekami apoptozą. Badania te wskazują, że komórki białaczkowe B-PBL mogą unikać apoptozy w mechanizmie autologicznego oddziaływania pomiędzy BAFF i APRIL a ich receptorami [38,48].

W procesie hamowania apoptozy ważną rolę przypisuje się czynnikowi jądrowemu NF- κ B, który działa m.in. poprzez indukcję transkrypcji wielu genów antyapoptotycznych (m.in. z rodziny *bcl-2*) i białek z rodziny IAP (inhibitors of apoptosis proteins) [37]. W komórkach białaczkowych B-PBL stwierdzono konstytutywną oraz spowodowaną pobudzeniem receptorów z rodziny TNF aktywność czynnika NF- κ B [29]. Wzrost aktywności NF- κ B w komórkach białaczkowych obserwowano również po stymulacji cytokinami działającymi anty-apoptotycznie IL-4 i IL-13 [75].

W regulację procesu śmierci komórek nowotworowych B-PBL zaangażowane są również kinaza fosfotyloinozylu 3 (PI-3K) i kinaza białkowa C (PKC) oraz regulowane przez nie szlaki przekazywania sygnału [2]. Komórki B-PBL wykazują konstytutywnie obecność zaktwowanej PI-3K oraz aktywowanej przez nią kinazy białkowej Akt. Zahamowanie aktywności PI-3K przez odpowiednie inhibitory prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych, co potwierdza ważną rolę PI-3K w regulacji apoptozy B-PBL [2, 56]. Antyapoptotyczne działanie PI-3K, a także Akt polega na hamowaniu aktywności białka BAD oraz kaspazy 9 [14,24]. W komórkach białaczkowych stwierdzono aktywność PKC, a inhibitory i stymulatory PKC wykazują odpowiednio działanie stymulujące i hamujące apoptozę tych komórek [1, 2].

W komórkach eukariotycznych poszczególne fazy cyklu komórkowego regulowane są poprzez kinazy cykliczne zależne (CDK-cyclin-dependent kinase) i ich inhibitory CKI (inhibitors of cyclin-dependent kinase). W komórkach zahamowanych w fazie G0/G1 cyklu komórkowego stwierdzany jest wysoki poziom należącego do CKI białka p27kip1 [50]. Komórki białaczkowe B-PBL wykazują konstytutywnie wysoki poziom p27kip1, który koreluje z zahamowaniem apoptozy w warunkach *in vitro*. Ekspresja p27kip1 w B-PBL wykazuje ponadto związek z klinicznym przebiegiem choroby – znacząco niższy poziom ekspresji tego białka stwierdzono w grupie chorych z łagodnym przebiegiem choroby w porównaniu z pacjentami wykazującymi progresję białaczki. [71]. Sygnały zewnętrzne komórkowe przekazywane m.in. za pośrednictwem cytokin (IL-4, IFN- γ , TGF- β) stymulują wzrost ekspresji p27kip1 w komórkach B-PBL [50].

Ekspresję zmutowanego białka p53, prowadzącą do zahamowania apoptozy stwierdzono w 10–15% przypadków B-PBL, co wiązało się z gorszą odpowiedzią na terapię oraz krótszym czasem przeżycia. [18]. Mutacje genu *p53*

stwierdzane były częściej (około 40%) w przypadkach zespołu Richtera – transformacji B-PBL w chłoniaka immunoblastycznego [73]. Oprócz mutacji genu sugerowane jest istnienie mechanizmów odpowiedzialnych za dysfunkcję *p53* na poziomie białkowym. Opisywana w komórkach B-PBL wzmożona ekspresja białka MDM-2 będącego inhibitorem *p53*, może prowadzić do jego inaktywacji [61]. Istnieją badania wskazujące, iż zmiany w obrębie genu ATM, który koduje kinazę aktywującą *p53*, mają również ścisły związek z zaburzeniem jego funkcji [53]. Mutacje genu ATM lub inaktywację jego produktu stwierdzono u 30–40% pacjentów z B-PBL [53,61].

Kaspazy, których aktywacja jest istotnym etapem procesu apoptozy, stanowią kolejny przedmiot zainteresowania w ocenie tego procesu w komórkach białaczkowych B-PBL. Spontaniczna, a także indukowana lekami apoptoza komórek białaczkowych, wiąże się z aktywacją efektorowych kaspaz 3 i 7. Stwierdzono również aktywację kaspazy 8, natomiast brak aktywacji kaspazy 2, która podobnie jak kaspaza 8 jest charakterystyczna dla receptorowej drogi indukcji apoptozy [39,66]. W nowotworowych limfocytach B stwierdzono wzmożoną ekspresję tzw. inhibitorów apoptozy (ang. IAP), hamujących aktywację kaspaz [41]. Mechanizm ten może być odpowiedzialny za obserwowaną u chorych na B-PBL oporność na chemioterapię [72].

Dla nowotworowych komórek B-PBL opornych na apoptozę *in vivo* charakterystyczna jest ich zdolność do spontanicznej apoptozy w warunkach *in vitro* [17]. Sugeruje to istnienie *in vivo* czynników zewnętrznych mających wpływ na wydłużanie życia limfocytów białaczkowych. Do czynników tych należą cytokiny [68]. IL-4 wykazuje działanie hamujące spontaniczną i indukowaną hydrokortyzonem apoptozę komórek białaczkowych przez zwiększenie ekspresji białka BCL-2 [22,52]. Podobne działanie hamujące apoptozę i wpływające na wydłużenie czasu życia komórek B-PBL wywiera w warunkach *in vi-*

tro INF- γ . Mechanizm działania INF- γ jako inhibitora apoptozy nie jest do końca wyjaśniony, przypuszcza się, że hamuje on obniżanie stężenia BCL-2 w komórkach. Takie działanie INF- γ może mieć znaczenie także w warunkach *in vivo*, u chorych na B-PBL wykazano podwyższony poziom tej cytokiny w surowicy krwi [8]. Zdolność hamowania apoptozy ma również IL-2 [34]. Działanie antyapoptotyczne, prawdopodobnie w mechanizmie regulacji ekspresji BCL-2, przypisuje się także IL-6 [34], a surowiczy poziom tej cytokiny zmniejsza się u pacjentów, u których stwierdzono remisję choroby [57]. W komórkach nowotworowych B-PBL oraz w surowicy chorych stwierdzono obecność IL-8, która również działa hamująco na apoptozę komórek białaczkowych w mechanizmie zależnym od regulacji ekspresji BCL-2 [25,46]. Zdolność hamowania apoptozy komórek białaczkowych wykazują również IL-13 [16] i TNF- α [68]. IL-5 natomiast wykazuje działanie indukujące apoptozę [43,44]. Zdolność indukowania apoptozy w mechanizmie obniżenia ekspresji BCL-2 przypisuje się również IL-10, jakkolwiek najnowsze badania wskazują na proapoptotyczne działanie tej cytokiny na komórki białaczkowe jedynie u chorych we wczesnych stadiach B-PBL, natomiast brak tego typu działania w zaawansowanych stadiach choroby [15].

PODSUMOWANIE

Pomimo znaczącej roli zaburzeń apoptozy w patogenezie B-PBL, kompleksowa ocena tego procesu wymaga jeszcze dokładnych badań. Nowoczesne metody oceny apoptozy na poszczególnych jej etapach stwarzają na tym polu nowe możliwości. Dokładna analiza mechanizmów rządzących śmiercią komórki może się przyczynić nie tylko do lepszego poznania biologii B-PBL, ale również do skutecznego doboru metod leczenia. Jest to tym bardziej istotne, że głównym kierunkiem rozwoju w terapii B-PBL jest próba modulacji zaburzonego mechanizmu apoptozy nowotworowych limfocytów B.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Barragan M., Bellosillo B., Campas C., Colomer D., Pons G., Gil J.: Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 2002; 99: 2969-2976
- [2] Barragan M., Campas C., Belosillo B., Gil J.: Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 2003; 44: 1865-1870
- [3] Bartkowiak D., Hogner S., Heinrich B., Nothdurft W., Rottinger M.: Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. *Cytometry*, 1999; 37: 191-196
- [4] Batat A., Shen B.: Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia. A study of 242 cases. *Cancer*, 1992; 70: 3435-3445
- [5] Bellosillo B., Villamor N., Lopez-Guillermo A., Marce S., Bosch F., Campo E., Montserrat E., Colomer D.: Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002; 100: 1810-1816
- [6] Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnic H.-R., Sultan C.: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J. Clin. Pathol.*, 1989; 42: 567-584
- [7] Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., Forte M.: A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.*, 2001; 26: 112-117
- [8] Buschle M., Campana D., Carding S.R., Richard C., Hoffbrand A.V., Bremer M.K.: Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 1993; 177: 213-218
- [9] Calligaris-Cappio F.: B-CLL: At the crossroads between proliferation and apoptosis. B Cell lymphoproliferative disorders II meeting, 2-5.06.2001, Amsterdam, Abstract Book, 29
- [10] Calligaris-Cappio F.: New insight into the biology of B-chronic lymphocytic leukaemia. 41st ASH Annual Meeting, New Orleans, 4-7 Dec, 1999
- [11] Calligaris-Cappio F., Hamblin T.J.: B-cell chronic Lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 399-408
- [12] Calligaris-Cappio F., Janossy R.: Surface markers in chronic lymphocytic leukemia of B cell type. *Semin. Haematol.*, 1985; 22: 1-12
- [13] Cande C., Cecconi F., Dessen P., Kroemer G.: Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 4727-4734
- [14] Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Frnake T.F., Stanbridge E., Frish S., Reed J.C.: Regulation of cell death protease caspase -9 by phosphorylation. *Science*, 1998; 282: 1318-1322
- [15] Castejon R., Vargas J.A., Romero Y., Briz M., Munoz M.R., Durantez A.: Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry*, 1999; 38: 224-230

- [16] Chaouchi N., Wallon C., Coujir C., Tertian G., Rudent A., Caput D., Ferrera P., Minty A., Vasquez A., Delfraissy I.: Interleukin 15 inhibits interleukin 2 induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukaemia B cells from *in vitro* apoptosis. *Blood*, 1996; 8: 1022-1029
- [17] Collins R.J., Verschuier L.A., Harmon B.V., Prentice R.L., Pope J.H., Kerr J.F.: Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukemia cells following their culture *in vitro*. *Br. J. Haematol.*, 1989; 71: 343-350
- [18] Cordone I., Masi S., Mauro F.R., Soddu S., Morsilli O., Valentini T., Vegna M.L., Gaugliemi C., Mancini F., Giuliacci S., Sacchi A., Mandelli F., Foa R.: p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*, 1998; 91: 4342-4349
- [19] Cory S., Huang D.C., Adams J.M.: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003; 22: 8590-8607
- [20] Criel A., Verhoef G., Vlietinck R., Mecucci C., Billiet J., Michaux L., Meeus P., Louwagie A., Van Orshoven A., Van Hoof A., Boogaerts M., Van den Berghe H., De Wolf-Peeters C.: Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study of 390 cases. *Br. J. Haematol.*, 1997; 97: 383-391
- [21] Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S.L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S.M., Schulman P., Vinciguerra V.P., Rai K.R., Ferrarini M., Chiorazzi N.: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999; 94: 1840-1847
- [22] Dancescu M., Rubio-Triayillo M., Biron G.: Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukaemic B cells from death by apoptosis and up-regulates bcl-2 expression. *J. Exp. Med.*, 1992; 176: 1319-1326
- [23] Darzynkiewicz Z., Smolewski P., Bedner E.: Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clin. Lab. Med.*, 2001; 21: 857-873
- [24] Datta S., Dudek H., Tao X.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997; 91: 231-241
- [25] Di Celle P.F., Mariani S., Riera L., Stacchini A., Reato G., Foa R.: Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*, 1996; 87: 4382-4298
- [26] Dighiero G., Binet J.L.: When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343: 1799-1801
- [27] Dighiero G., Travade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J.L.: B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood*, 1991; 78: 1901-1914
- [28] Dmoszyńska A., Legieć W., Wach M.: Attempted reconstruction of the immune system using low doses of interleukin 2 in chronic lymphocytic leukemia patients treated with 2-chlorodeoxyadenosine: results of pilot study. *Leuk. Lymphoma*, 1999; 34: 335-340
- [29] Furman R.R., Asgari Z., Mascarenhas J.O., Liou H.C., Schattner E.J.: Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 2200-2206
- [30] Gartel A.L., Tyner A.L.: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 639-649
- [31] Ghia P., Caligaris-Cappio F.: The origin and nature of the chronic lymphocytic leukemia lymphocyte. *W: Chronic Lymphoid Leukemias*. Red.: Cheson B.D., Marcel Dekker, Inc. New York 2001, 63-80
- [32] Hahne M., Kataoka T., Schroter M., Hofmann K., Irmeler M., Bodmer J.L., Schneider P., Bornand T., Holler N., French L.E., Sordat B., Rimoldi D., Tschopp J.: APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 1185-1190
- [33] Hamblin T.J., Oscier D.G.: Chronic lymphocytic leukemia: the nature of the leukemic cells. *Blood Rev.*, 1997; 11: 119-128
- [34] Huang R.W., Tsuda H., Takatsuchi K.: Interleukin-2 prevents programme cell death in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Int. J. Haematol.*, 1993; 58: 83-92
- [35] Jamrozik K., Robak T.: Cytogenetyka i biologia molekularna przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej. *Acta Haematol. Pol.*, 2000; 31: 103-112
- [36] Jones D.T., Ganeshaguru K., Virchis A.E., Folarin N.I., Lowdell M.W., Mehta A.B., Prentice H.G., Hoffbrand A.V., Wickremasinghe R.G.: Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation. *Blood*, 2001; 98: 2800-2807
- [37] Karin M., Lin A.: NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 221-227
- [38] Kern C., Cornuel J.F., Billard C., Tang R., Rouillard D., Stenou V., Defrance T., Ajchenbaum-Cymbalista F., Simonin P.Y., Feldblum S., Kolb J.P.: Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*, 2004; 103: 679-688
- [39] King D., Pringle J.H., Hutchinson M., Cohen G.M.: Processing/activation of caspases, -3 and -7 and -8 but not caspase-2, in the induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 1998; 12: 1553-1560
- [40] Kitada S., Andersen J., Akar S., Zapata J.M., Takayama S., Krajewski S., Wang H.G., Zhang X., Bullrich F., Croce C.M., Rai K., Hines J., Reed J.C.: Expression of apoptosis regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. *Blood*, 1998; 91: 3379-3389
- [41] Kolb J.P., Kern C., Quiney C., Roman V., Billard C.: Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.*, 2003; 3: 261-286
- [42] Li X., Darzynkiewicz Z.: Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase measured *in situ* in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 2000; 255: 125-132
- [43] Mainou-Fowler T., Copplestone J.A., Prentice A.G.: Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *J. Clin. Pathol.*, 1995; 48: 482-487
- [44] Mainou-Fowler T., Craig V.A., Copplestone J.A., Hamon M.D., Prentice A.G.: Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. *Blood*, 1994; 84: 2297-2304
- [45] Molica S.: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *W: Chronic Lymphoid Leukemias*. Red.: Cheson B.D., Marcel Dekker, Inc. New York 2001, 231-260
- [46] Molica S., Vitelli G., Levato D., Datillo A., Gandolfo G.M.: Clinicobiological implications of increased serum levels of interleukin-8 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 1999; 84: 208-211
- [47] Moore P.A., Belvedere O., Orr A., Pieri K., LaFleur D.W., Feng P., Soppet D., Charters M., Gentz R., Parmelee D., Li Y., Galperina O., Giri J., Roschke V., Nardelli B., Carrell J., Sosnovtseva S., Greenfield W., Ruben S.M., Olsen H.S., Fikes J., Hilbert D.M.: BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 1999; 285: 260-263
- [48] Novak A.J., Bram R.J., Kay N.E., Jelinek D.F.: Abberant expression of B-lymphocyte stimulator by B-chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood*, 2002; 100: 2973-2979
- [49] Ormerod M.: The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia*, 1998; 12: 1013-1025
- [50] Orsini E., Foa R.: Cytokines and regulatory molecules in the pathogenesis and clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *W: Chronic Lymphoid Leukemias*. Red.: Cheson B.D., Marcel Dekker, Inc. New York 2001, 127-149
- [51] Panayiotidis P., Ganeshaguru K., Foroni L., Hoffbrand A.V.: Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia*, 1995; 9: 1227-1232
- [52] Panayiotidis P., Ganeshaguru K., Jabbars A.B., Hoffbrand V.: Interleukin 4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl 2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*. *Br. J. Haematol.*, 1993; 85: 439-445
- [53] Pettitt A.R., Sherrington P.D., Stewart G., Cawley J.C., Taylor M.R., Stankovic T.: p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*, 2001; 98: 814-822
- [54] Pistoia V.: Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol. Today*, 1997; 18: 343-349
- [55] Reed J.C.: Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000; 157: 1415-1430
- [56] Ringshausen I., Schneller F., Bogner C., Hipp S., Duyster J., Peschel C., Decker T.: 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: 3741-3748
- [57] Robak T., Wierzbowska A., Blasinska-Morawiec M., Korycka A., Blonski J.Z.: Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission. *Mediat. Inflamm.*, 1999; 8: 277-286
- [58] Roberts A.I., Devadas S., Zhang X., Zhang L., Keegan A., Greenelch K., Solomon J., Wei L., Das J., Sun E., Liu C., Yuan Z., Zhou J.N., Shi Y.: The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets. *Immunol. Res.*, 2003; 28: 285-293

- [59] Roliński J.: Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa – zaburzenia proliferacji czy apoptozy. *Acta Haematol. Pol.*, 1998; 29(Supl.1): 19-24
- [60] Rozman C., Montserrat E.: Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 333: 1052-1057
- [61] Rupniewska Z.M., Roliński J.: P53 and ATM genes and this role in evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol. Pol.*, 2001; 32(Supl.1): 81-85
- [62] Smolewski P., Darzynkiewicz A., Robak T.: Caspase-mediated cell death in hematological malignancies: theoretical considerations, methods of assessment and clinical implications. *Leuk. Lymphoma*, 2003; 44: 1089-1104
- [63] Smolewski P., Grabarek J., Halicka D., Darzynkiewicz Z.: Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J. Immunol. Meth.*, 2002; 26: 11-121
- [64] Smolewski P., Grabarek J., Phelps D., Darzynkiewicz Z.: Stathmo-apoptosis: arresting apoptosis by fluorochrome-labeled inhibitor of caspases. *Int. J. Oncol.*, 2001; 19: 657-663
- [65] Smolewski P., Grzybowska O.: Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych – dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta. Haematol. Pol.*, 2002; 33: 393-401
- [66] Stoetzer O.J., Pogrebniak A., Scholz M., Pelka-Fleischer R., Gullis E., Darsow M., Nussler V., Wilmanns W.: Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1999; 13: 1873-1880
- [67] Sun E.W., Shi Y.F.: Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol. Ther.*, 2001; 92: 135-145
- [68] Tangye S.G., Raison R.L.: Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2. *Immunol. Cell. Biol.*, 1997; 75: 127-135
- [69] Tinhofer J., Marschitz I., Kos M., Henn T., Egle A., Villunger A., Greil R.: Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand + tumor cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 1998; 91: 4273-4281
- [70] Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Vermes I., Reuteringspelger C.P.M., Haanen C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J. Immunol. Meth.*, 1995; 184: 39-51
- [71] Vrhovac R., Delmer A., Tang R., Marie J.P., Zittoun R., Ajchenbaum-Cymbalista F.: Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*, 1998; 91: 4694-4700
- [72] Wall N.R., Beck F.W., Al-Katib A.M., Mohammad R.M.: Treatment-induced expression of anti-apoptotic proteins in WSU-CLL, a human chronic lymphocytic leukemia cell line. *J. Drug Target.*, 2001; 9: 329-339
- [73] Wickremasinghe R.G., Hoffbrand A.V.: Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 1999; 9: 3587-3593
- [74] Wołowicz D.: Regulacja aktywności podziałowej komórek przewlekłej białaczki limfatycznej. *Acta Haematol. Pol.*, 2001, 32(Supl. 1): 46-50
- [75] Zaninoni A., Imperiali F.G., Pasquini C., Zanella A., Barcellini W.: Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 2003; 31: 185-190