

LÖSEMİ HÜCRELERİNDE DİFERANSİYASYON YAPAN METİL PREDNİZOLON TEDAVİSİNİN ULTRASTRÜKTÜREL BULGULARI

Esra Tan* Gönül Hiçsönmez** Meral Tekelioğlu* Nilüfer Karadeniz**

İnsanda kan hücreleri ve onların ana hücreleri ultrastrüktürel olarak defalarca çalışılmış, hatta normal kan elemanlarıyla beraber lösemi hücrelerinin de ultrastrüktürel yapısını gösteren Low ve Freeman tarafından 1958'de bir atlas hazırlanmıştır (3,4,16). Schumacher de akut lösemilerde hücreleri elektron mikroskopik olarak kalitatif ve kantitatif yönden incelemiştir (20). Ancak antilösemik tedavi sonrası ultrastrüktürel değişiklikleri gösteren çalışmalar çok azdır.

Lösemi tedavisinde şimdiye kadar genellikle sitostatikler kullanılmıştır ancak son yıllarda Dr. Hiçsönmez ve arkadaşları metil prednizolonun myeloid lösemik hücreyi normal matür granülosite diferansiye ettirdiğini göstermişlerdir (13). Bu nedenle çalışmamızda metil prednizolon tedavisiyle diferansiye olan myeloid lösemi hücrelerinin ultrastrüktürel bulgularını göstermek istedik.

MATERYAL VE METOD

12 yaşında akut nonlenfositer lösemi (ANLL) (M₂) tanısı almış bir kız hastada, tedaviden önce ve bolus tarzında birinci hafta 30 mg./kg./gün (iv), ikinci hafta 20 mg./kg./gün (iv) metil prednizolon verildikten sonra aldığımız kemik iliği aspirasyon materyallerini transmisyon elektron mikroskobu aracılığıyla ultrastrüktürel olarak inceledik.

* A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı.

** H.Ü. Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı

Alınan kemik iliği + 4°C'de 0.2 M (pH : 7.4) fosfat tampon içindeki % 3 gluteraldehitte 15 dk. tesbit edildi. Daha sonra 10 dk. santrifüj yapılarak elde edilen çökelti 0.1 M fosfat tamponla yıkandı. Oda ısısında 90 dk. % 1 OsO₄'le ikinci tesbit yapıldı. Doku blok halinde uranil asetatla boyandı, dereceli etanoillerde dehidrate edildi ve araldit CY 212 materyaline gömüldü.

LKB ultramikrotomuyla alınan 0.6 µm'lik ince kesitler, uranil asetat ve kurşun sitratla boyanıp Zeiss EM 9S elektron mikroskobu altında çekilen mikrograflarla değerlendirildi.

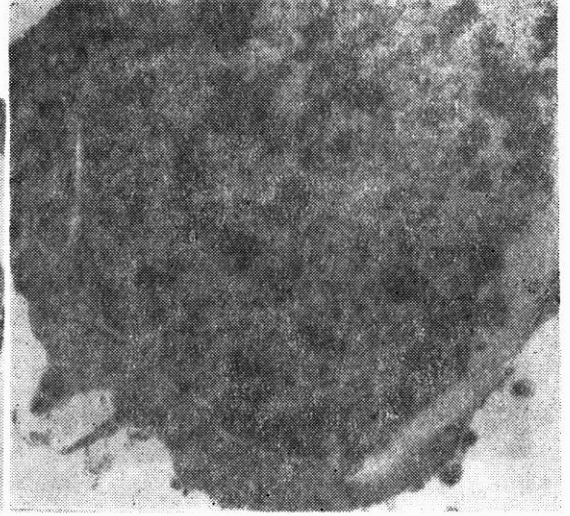
SONUÇLAR

Tedavi öncesi çekilen elektron mikrograflarda, blastik hücrede nükleus büyük, oval ve ökromatindi. Bazı hücrelerde özellikle nükleolemma altında ve buradan ortaya doğru yayılan ince yollar şeklinde koyu kromatin alanlar izlendi. Nükleolemma izlenebilir şekilde ve düzensizdi. Perinükleolar aralık bazı yerlerde artifisiyel olmakla beraber, genişlemişti. Nükleolus belirgin değildi. Sitoplazma açık renk ve karyayğdı manzarasındaydı. Sitoplazmada çok sayıda uzun veya yuvarlak şekilde kesilmiş genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu (GER) sarnıçları, serbest ribozomlar ve vakuoller görüldü. Yuvarlak veya mekik şeklinde az sayıda granüller vardı. Mitokondriyonlar çok sayıda, küçük, yuvarlak veya oval şekildedeydi. Oksidatif fosforilasyondaki artış nedeniyle organel aktif durumdaydı ve kristalarda kıvrılmalar vardı (Resim 1). Sitoplazmada nükleusu çevreleyen fibriller demetler görüldü (Resim 2). Mikrograflarda, bol azurofil granülleriyle promyelosit olduğu düşünülen hücreler de tesbit edildi.

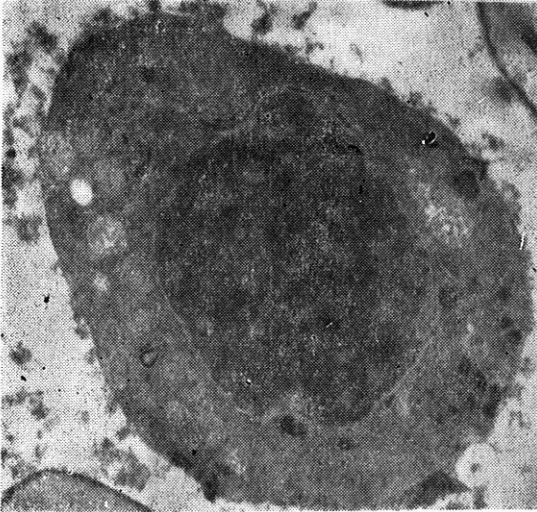
Tedavi sonrası incelenen kemik iliği örneklerinde, lösemi hücrelerinde hücre membranında villuslar ve monoblast kadar olmasa da parmaksı uzantılar vardı (Resim 4,7). Nükleustaki ökromatin heterokromatin oranı, heterokromatin lehine dönmüştü. Nükleus daha küçüktü, bazı hücrelerde nükleusta segmentasyon izlendi. Bazı hücrelerde nükleolemma belirgin değildi veya erimişti. Bu yüzden nükleolar materyalin bir kısmı sitoplazmada görülüyordu (Resim 3,4). Nükleolar ke-



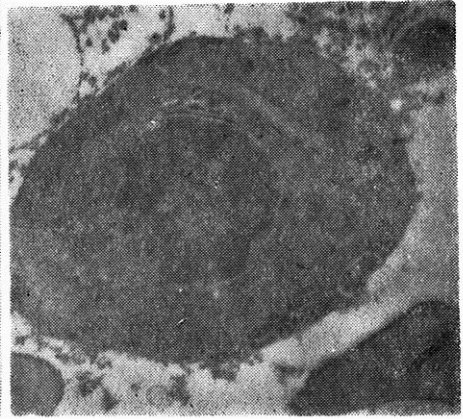
Resim 1 : Ökromatin nükleusu, aktif durumdaki bol mitokndriyonları ve genişlemiş yuvarlak ER sarnıcı kesitleriyle bir myeloblast görülmektedir X 6000.



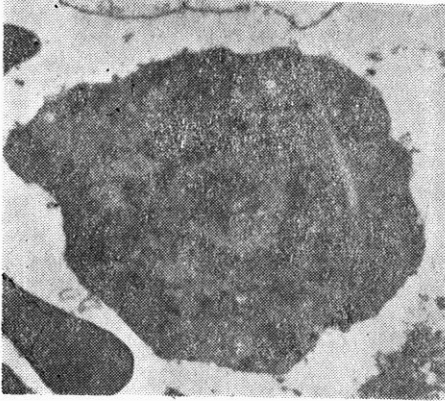
Resim 2 : Nükleusu saran fibriller yapı görülmekte X 11500.



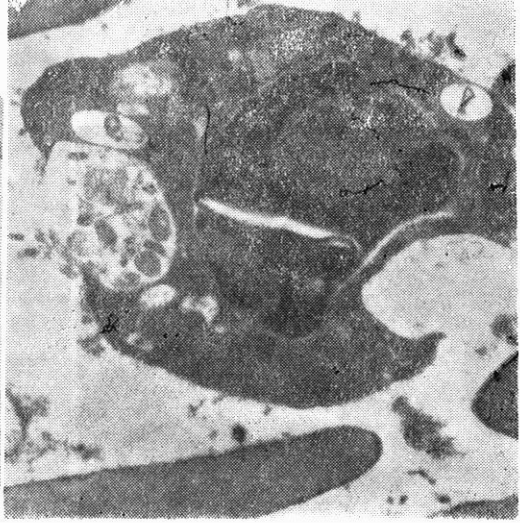
Resim 3 : Tedavi sonrasında nükleus heterokromatin, nükleolemmada meydana gelen eriyip kırılma neticesinde nüklear materyal sitoplazmaya dağılmıştır. Sitoplazmada elektron yoğun granüller, bol serbest ribozomlar ve dejenere mitokondriyonlar görülüyor X 9500.



Resim 4 : Hücre pseudopot şeklinde uzantı vermiştir. Nükleus heterokromatin, nükleolemma net olarak izlenemiyor. Sitoplazmada ER, granüler, ribozomlar ve lameller inklüzyon izleniyor X 8000.



Resim 5 : Nükleus heterokromatin, nükleolus belirgin izleniyor. Nüklear cep, sitoplazmada fibriller yapı, fagozomlar ve serbest ribozomlar dikkat çekicidir X 6500.



Resim 6 : Sitoplazmasındaki dev fagozomuyla makrofaj benzeri özellik gösteren bir hücre X 9500.



Resim 7 : Hücrenin villus benzeri uzantıları, segmente heterokromatin çekirdek, vakvoller ve fagozomlar görülüyor X 9500.

seler izlendi (Resim 5). Nükleolus seçiliyordu ama çok belirgin değildi. Sitoplazma organelleri azalmıştı ve artmış serbest ribozomlar arasında yapıları net olarak seçilemiyordu (Resim 3,4,5,6,7). Mitokondriyonlar azalmış, şişerek dejenerasyona uğramıştı (Resim 3). Değişik büyüklükte ve elektron yoğunlukta granüller (Resim 3,4,5), vakuoller (Resim 3,6,7) ve büyük fagozomlar (Resim 5,6,7) vardı. Resim 4'de lameller inklüzyon ve resim 5'te fibriller demetler görüldü.

TARTIŞMA

Myeloblastta sitoplazma ve nükleus açık renktir. Ökromatin özellik immatüritenin bir göstergesidir. Matürasyon arttıkça nükleus küçülür ve heterokromatinleşir (16,20). Tedavi sonrası mikrograflarda ilacın etkisiyle matürasyonun arttığı, heterokromatin yapı ve hatta segmentasyonla gösterilmiştir. Lösemide, normal myeloblastta olmayan nükleer kese veya yarıklar görülebilir. Nükleer kesenin artışı, poliribozomlardaki artışa bağlanmıştır. Burns'e göre nükleer kese malign hücrelerde çoktur. Bunlarda büyüme hızı artmıştır, hücrede protein sentezi çok fazladır (20). Bu çalışmada tedavi sonrası da hücrelerde nükleer kese ve serbest ribozomlar artmış olarak gösterilmiştir. Buradaki artışın amacı ilacın etkisiyle hızla diferansiyasyona uğrayan hücrede spesifik granüllerin yapımı için gerekli protein sentezi olabilir. Nükleolus lösemi hücrelerinde belirgin ve bazen birden fazla olmasına karşın bizim çalışmamızda dikkat çekici nitelikte bulunmamıştır (16,20,21).

Akut lösemilerde hem myeloblast hem de promyelosit sitoplazmasında bol miktarda genişlemiş GER sarnıcı kesitleri yuvarlak veya uzun keseler şeklinde izlenir (2,16,20). Normal kemik iliğinde de bu hücrelerde yassı ve uzun kesitler şeklinde ER boldur ancak bu kadar fazla ve genişlemiş değildir (3,4). Lösemi hücrelerinde mitokondriyonlar küçük, yuvarlak veya uzun şekilde ve çok sayıdadır (2,16,20). Mitokondriyonlarda şişme, fragmantasyon, kristalarda kıvrılma vb. olabilir (2,21). Çalışmamızda lösemi hücrelerinde tedavi öncesi çok sayıda ve aktif fonksiyonda görülen mitokondriyonların tedavi sonrası şişip, kristalarının kaybolduğu görülmüştür (21). M₂ tip lösemide myeloblastlarda ve biraz daha fazla olmak üzere promyelositlerde yuvarlak, oval veya çubuk şeklinde granüller gözlenir. Granüller 0.2 - 0.6 µm. büyüklüğünde, myeloperoksidaz ve asit fosfataz pozitifdir (2,14,15,

16). Sitoplazmada bunların yanında mikrofibriller ve lameller inklüzyonlar çoktur (20,21). Fibriller demet yapıları, sitoplazmanın proksimalinde nükleusun kenarında bulunur. Büyüklüğü, kompleksitesi ve içerdiği ince laminar membranların sırası değişebilir. Bu yapının bir ER modifikasyonu olduğu düşünülmektedir. Monoblastta çok daha sık olmakla beraber myeloblastlar ve promyelositlerde de görülür (3,8, 16,20,21). Hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrasında nükleusu saran fibriller demet yapısı gösterilmiştir.

Auer cismi sitoplazmada, lizozomal yapıdaki azürofil granüllerin füzyonuyla oluşan bir inklüzyondur. ANLL'ler için spesifik bir bulgudur. Günümüzde bu inklüzyonun uzunlamasına kesitlerinde birbirine paralel membranöz lamellerden oluşan tübüler bir yapı olduğu, oluşumu ve histokimyasal özelliklerinin azürofil granüllere benzerliği bilinmektedir (1,5,22). Bu vakada tedavi öncesi ve sonrası, ışık ve elektronmikroskopik incelemelerde auer cismine rastlanmamıştır. Auer cismi bulunan vakalarda tedavi sonrası matür hücrelerde bu cismin yıkılması beklenirken, yüksek doz metil prednizolondan sonra auer cismin matür hücrelerde de var olduğu izlenmiştir. Auer cismi, hızlı matürasyon sırasında yıkılmadan kalmakta ve bir ölçüde blast hücrenin matürleştiğini görmemize yarayan bir işaret olmaktadır (13).

Akut lösemilerde kullanılan bazı kemoterapötiklerin etkileri; APL'de diferansiyasyona neden olan retinoik asidin ultrastrüktürel olarak incelenmesi ve yine APL de phorbol diesterle makrofaj benzeri hücrelere diferansiyasyon daha önce gösterilmiştir (6,18,21). Bizde bu çalışmamızda Dr. Hiçsönmez'in metil prednizolonla elde ettiği başarılı sonuçlardan yola çıkarak incelememizi yaptık (9,10,11,12,13). İlaç tedavisinden sonra nükleusun küçülüp, heterokromatinleşerek matürasyona doğru gidişi, bunun yanında hücre yüzeyinin villuslar ve pseudopot gibi uzantılarla amoboid hareketleri olduğu ve içerdiği çok sayıda fagozomlarla makrofaj benzeri özellikler gösterdiği, tesbit edilmiştir ki bu bulgular Leo Sachs ve arkadaşlarının steroidin myeloid lösemik hücrede yaptığı diferansiyasyonu gösteren invitro çalışmalarına uymaktadır (14,15,19).

ÖZET

ANLL (M₂) tanısı almış bir hastada yüksek doz metil prednizolon tedavisinden önce ve sonra alınan kemik iliği örneklerinin ultrastrüktürel incelenmesinde matürasyon indüksiyonu ve makrofaj benzeri hücreler tesbit edilmiştir.

SUMMARY

Ultrastructural variations in AML after the treatment with methylprednisolone

We described the ultrastructural changes in ANLL before and after the treatment with high dose methylprednisolone. We examined that methylprednisolone differentiated the leukemic cells to macrophage like cells and induced maturation.

KEY WORDS :

ANLL - Methylprednisolone - Ultrastructure

KAYNAKLAR

1. Ackerman A : Microscopic and histochemical studies on the auer bodies in leukemic cells. Blood, 847-883, 1950.
2. Ackerman A Grasso Knouff : Morphological and histochemical studies of the leukemic cells from a patient with atypical myeloblastic leukemia. Blood, 16 : 1253-1267, 1960.
3. Bessis M Thiery : Electron microscopy of human white blood cells and their stem cells. International Review of Cytology. 12 : 199-241, 1961.
4. Capone R, Weinreb Chapmen : Electron microscope studies on normal human myeloid elements. Blood. 23-3 : 300-320, 1964.
5. Dixon B Tapen Mukherjee James : The ultrastructural identification of auer body precursors in a case of APL. A.J.C.P. Jan. 132-137, 1984.
6. Flynn P Miller, Weisdorf, Arthur ve ark : Retinoic acid treatment of APL. Blood. 62-6 : 1211-1217, 1983.
7. Freeman J : Origin of auer bodies. Blood. 27-4 : 499-510, 1966.
8. Freeman A Journey : Ultrastructural studies on monocytic leukemia. British Journal of Hematology, 20 : 225-231, 1971.
9. Hiçsönmez G Özsoylu : High-dose methylprednisolone for ANLL. Experimental Hematology. 17 : 1051-1056, 1989.
10. Hiçsönmez G Özsoylu : High-dose methylprednisolone in children with ANLL. American Journal of Hematology. 1990 (Baskıda).
11. Hiçsönmez G Özsoylu Gürgey Zamani İrken : High-dose methylprednisolone for remission induction in children with ANLL. Eur. J. Hematol. 42 : 498-500, 1989.

12. Hiçsönmez G Özsoylu Tuncer Erer : High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of ANLL with ocular involvement. The Turkish Journal of Pediatrics 30 : 181-183, 1988.
13. Hiçsönmez G Özsoylu Tuncer Ertürk Özbek Karadeniz : Direct morphological evidence of high-dose methylprednisolone induced maturation of leukemic cells in children with ANLL. Exp. Hematology. 1990 (Baskıda).
14. Lotem J Sachs : Control of Fc and C3 receptors on myeloid leukemic cells. The Journal of Immunology, 116,2 : 580-586, 1976.
15. Lotem J Sachs : Genetic dissociation of different cellular effects of interferon on myeloid leukemic cells. Int. J. Cancer. 22 : 214-220, 1978.
16. Low Freeman : Electron Microscopic Atlas of Normal and Leukemic human blood. Mc Graw-Hill book company inc. 195-232, 1958.
17. Maureen O Catovsky Costello : Ultrastructural cytochemistry of leukemic cells. British Journal of Haematology. 45 : 201-208, 1980.
18. Rovera G Santoli Damsky : Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76,6 : 2779-2783, 1979.
19. Sachs L : The differentiation of myeloid leukemia cell. British Journal of Hematology, 40 : 509-517, 1978.
20. Schumacher H Szekely Park Rao ve ark : Acute leukemic cells. American Journal of Pathology. 73,1 : 27-44, 1973.
21. Shu-tong W Bao-wen : Ultrastructural study of leukemic cells before and after chemotherapy in acute leukemia. Chinese Medical Journal, 101 (4) : 245-248, 1988.
22. Tulliez M Gorius : Three types of auer bodies in acute leukemia Laboratory Investigations. 41 (5) : 419-425, 1979.