

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA ŠTOLFA

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TJAŠA ŠTOLFA

**PREUČEVANJE IMUNOMODULATORNE VLOGE
AGONISTA PROSTAGLANDINSKEGA RECEPTORJA EP4**

**INVESTIGATION OF IMMUNOMODULATORY ROLE OF
PROSTAGLANDINE EP4 RECEPTOR AGONIST**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici **prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm.** za priložnost za delo v celičnem laboratoriju in za vse strokovne nasvete pri pisanju magistrske naloge.

Asist. Tijani Markovič, mag. farm. se zahvaljujem za usmerjanje in praktične nasvete pri delu v laboratoriju ter za čas, motivacijo in spodbudo pri pisanju magistrske naloge. Hvala tudi za meritev in analizo podatkov na pretočnem citometru.

Kolegici **Katarini Nemec**, predhodnici **Maši Vidmar** in vsem s **Katedre za klinično biokemijo** hvala, ker so bili vedno pripravljeni priskočiti na pomoč in z dobro voljo polepšali čas v laboratoriju.

Hvala tudi družini in prijateljem za neomajno spodbudo in potrpežljivost.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Tjaša Štolfa

Ljubljana, oktober 2017

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	V
KAZALO ENAČB	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1 Rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov	1
1.2 Levkemija	1
1.3 Kronična limfocitna levkemija	2
Diagnoza	2
Prognoza	3
Zdravljenje	4
Druge oblike zdravljenja KLL	6
Možni zapleti KLL	6
Odzivnost na zdravljenje	6
1.4 B-celični receptor (BCR)	7
1.5 Prostaglandinski receptor E tip 4 (EP4)	7
1.6 Jedrni dejavnik kappa B (NF- κ B)	9
1.7 Ciklični adenzin monofosfat (cAMP)	11
1.8 Imunomodulacija pri KLL	12
1.9 Potencialne spojine v terapiji KLL	13
Prostaglandin E2 (PGE2)	13
Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH)	14
Alprostadiol	14

Rivenprost	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali	17
3.1.1 Kemikalije	17
3.1.2 Kompleti za analize	17
3.1.3 Pufri in raztopine	17
3.1.4 Gojišča	18
3.1.5 Laboratorijska in programska oprema	18
3.2 Metode dela s celičnimi kulturami	20
3.2.1 Celične kulture	20
3.2.2 Odmrzovanje celičnih kultur	21
3.2.3 Štetje celic	22
3.3 Izolacija celic KLL iz polne krvi	22
3.4 Določanje presnovne aktivnosti celic	23
3.4.1 Reagent PrestoBlue	23
3.4.2 MTS test	24
3.5 Določanje citotoksičnosti različnih spojin	24
Določanje citotoksičnosti različnih spojin na celicah KLL	24
Določanje citotoksičnosti različnih spojin na celicah LCL	25
3.6 Določanje vpletenosti adenilat ciklaze v signalne poti receptorja EP4	25
3.7 Pretočna citometrija	25
3.7.1 Analiza citokinov	26
3.8 Biobanka	27
3.8.1 Ostanek celic (peleta) po izolaciji limfocitov B	27
3.8.2 DNA	28
3.8.3 RNA	28

3.8.4 Celice.....	28
3.9 Statistična obdelava podatkov	28
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1 Citotoksičnost agonista receptorja EP4 je koncentracijsko in časovno odvisna.....	29
4.2 PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice KLL	32
4.2.1 Aktivacija celic KLL poveča njihovo metabolno aktivnost in sproščanje citokinov.....	33
4.2.2 PgE1-OH modulira izločanje TNF- α in IL-2 v celicah KLL.....	35
4.3 PgE1-OH v celicah KLL posreduje citotoksične učinke tudi preko cAMP	39
4.4 PgE1-OH deluje selektivno na celice KLL.....	42
4.5 Iskanje novih modulatorjev apoptoze v KLL	44
5. SKLEPI.....	47
6. LITERATURA	49
7. PRILOGE	i

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema možnih signalnih poti, ki jih aktivira vezava nativnega liganda PGE2 na receptor EP4 (12).....	9
Slika 2: Mikro-okolje celic KLL (22).....	13
Slika 3: Strukturna primerjava PGE2 (30), PgE1-OH (31), alprostadila (32) in rivenprosta (33).	14
Slika 4: Premreženje eritrocitov in neželenih celic s tetramernimi kompleksi protiteles. Povzeto po (42).....	22
Slika 5: Postopek izolacije limfocitov B iz polne krvi z RosetteSep. Povzeto po (42).	23
Slika 6: Shema inkubacije celic pri pripravi vzorcev za analizo citokinov.	26
Slika 7: Koncentracijska odvisnost citotoksičnih učinkov PgE1-OH.	30
Slika 8: Časovna odvisnost citotoksičnih učinkov PgE1-OH.....	31
Slika 9: Inter-individualna raznolikost celic KLL v odzivu na PgE1-OH.....	32
Slika 10: Vpliv različnih stimulansov na povečanje presnovne aktivnosti celic KLL.	34

Slika 11: 5 μ M PgE1-OH zmanjša izločanje TNF- α iz stimuliranih celic KLL.....	36
Slika 12: Vpliv SQ 22536 na modulacijo delovanja PgE1-OH po 24 h inkubaciji.....	40
Slika 13: Vpliv aktivatorja adenilat ciklaze na presnovno aktivnost celic KLL.....	41
Slika 14: Mehanizem delovanja agonista receptorja EP4. Povzeto po (68).	42
Slika 15: Selektivna citotoksičnost PgE1-OH za celice KLL v primerjavi s celicami PBMC in LCL.	43
Slika 16: Relativna presnovna aktivnost celic KLL po 24 h inkubaciji s PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom.....	45
Slika 17: Relativna presnovna aktivnost celic LCL po 24 h inkubaciji s PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom.....	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Ocena razširjenosti KLL po Rai klasifikaciji.	4
Preglednica II: Ocena razširjenosti KLL po Binet klasifikaciji.....	4
Preglednica III: Seznam kemikalij, ki smo jih uporabili.....	17
Preglednica IV: Seznam kompletov za analize, ki smo jih uporabili.	17
Preglednica V: Seznam pufrov in raztopin, ki smo jih uporabili.....	17
Preglednica VI: Seznam gojišč, ki smo jih uporabili.....	18
Preglednica VII: Seznam laboratorijske in programske opreme, ki smo jo uporabili.....	18
Preglednica VIII: Povprečne EC ₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji celic KLL s PgE1-OH.	31
Preglednica IX: Relativna presnovna aktivnost celic KLL po inkubaciji s stimulansi	34
Preglednica X: Sproščanje TNF- α , IL-2 in IL-6 iz stimuliranih celic KLL	35
Preglednica XI: Zmanjšano izločanje IL-2 iz celic KLL po inkubaciji s PgE1-OH.	38
Preglednica XII: EC ₅₀ vrednosti po inkubaciji celic KLL, PBMC in LCL s PgE1-OH....	44

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba za izračun koncentracije celic s hemocitometrom.	22
---	----

POVZETEK

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša vrsta levkemije in predstavlja približno četrtno novih primerov levkemij. V terapiji se uporablja širok nabor učinkovin, kot so alkilirajoči citostatiki, monoklonska protitelesa in tarčna zdravila, a je KLL še vedno neozdravljiva bolezen. Raziskave so usmerjene v iskanje novih imunomodulatornih učinkovin.

PgE1-OH je agonist prostaglandinskega receptorja EP4, ki je v predhodnih študijah izkazal močan citotoksični učinek na celice KLL, izolirane iz krvi bolnikov s KLL. Tekom magistrskega dela smo celice 75-ih bolnikov s KLL inkubirali s PgE1-OH in določili EC₅₀ vrednosti ter z njimi potrdili njegovo časovno in koncentracijsko odvisno citotoksično delovanje. Opazili smo inter-individualno raznolikost celic KLL v odzivu na PgE1-OH, kar je v skladu z dejstvom, da je KLL izrazito heterogena bolezen.

Preživetje celic KLL je odvisno od citokinov, ki jih sproščajo celice v njihovem mikro-okolju. Imunomodulatorne učinke PgE1-OH smo vrednotili preko vpliva na sproščanje citokinov iz aktiviranih celic KLL. Inkubacija celic KLL s stimulansi je povečala njihovo presnovno aktivnost. Ugotovili smo, da PgE1-OH zmanjša izločanje TNF- α in IL-2 iz aktiviranih celic KLL, kar bi lahko bilo posledica inhibicije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. Aktivacija receptorja EP4 vodi v aktivacijo adenilat ciklaze (AC), zato smo preverili še vpletenost te signalne poti v citotoksično delovanje PgE1-OH. Inhibicija AC je zmanjšala citotoksični učinek 5 μ M PgE1-OH na celicah določenih bolnikov s KLL. Aktivacija AC pa je zmanjšala presnovno aktivnost celic KLL.

In vitro smo potrdili selektivno citotoksično delovanje PgE1-OH na celice KLL v primerjavi s celicami zdravih darovalcev (PBMC in LCL).

Med iskanjem novih imunomodulatornih spojin s selektivnim citotoksičnim delovanjem na celice KLL smo testirali spojine, ki se že uporabljajo v terapiji drugih obolenj oziroma so bile ocenjene v kliničnih študijah. Izmed izbranih spojin je PgE1-OH izkazal najmočnejši citotoksični učinek na celice KLL.

Agonista receptorja EP4, PgE1-OH, smo tako ovrednotili kot imunomodulatorno spojino, ki v mikromolarnih koncentracijah deluje selektivno citotoksično na celice KLL.

Ključne besede: kronična limfocitna levkemija (KLL), prostaglandinski receptor tipa 4 (EP4), PgE1-OH, imunomodulacija, jedrni dejavnik kappa B (NF- κ B)

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of leukemia and represents approximately one quarter of new cases. A wide range of drugs is used in therapy, like alkylating cytostatics, monoclonal antibodies and targeted therapy; however, CLL still remains incurable disease. Research is focused on search of new immunomodulatory drugs.

PgE1-OH is prostaglandin EP4 receptor agonist, which was shown to have potent cytotoxic effect on CLL cells isolated from blood of CLL patients. We determined EC₅₀ values for PgE1-OH on CLL cells obtained from 75 patients and confirmed time and concentration dependent cytotoxic activity. We observed inter-individual variability of CLL cells in response to PgE1-OH, which is in agreement with the fact, that the CLL is tremendously heterogenous disease.

Viability of CLL cells depends on cytokines that are released from cells in their microenvironment. Immunomodulatory properties of PgE1-OH were determined by studying its effect on the release of cytokines from activated CLL cells. Stimulation of CLL cells increased their metabolic activity. PgE1-OH decreased the release of TNF- α and IL-2 from activated CLL cells, which may be due to the inhibition of transcription factor NF- κ B. Activation of EP4 receptor leads to activation of adenilat cyclase (AC); therefore, we checked also the involvement of that signal pathway in cytotoxic activity of PgE1-OH. Inhibition of AC has decreased cytotoxic effect of 5 μ M PgE1-OH on cells of several CLL patients. Activation of AC has decreased the metabolic activity of CLL cells.

We have shown that PgE1-OH acted selectively on CLL cells in comparison with cells of healthy donors (PBMC and LCL) *in vitro*.

In a search for novel immunomodulatory compounds with selective cytotoxic activity on CLL cells, we screened compounds, which are already used in therapy of other diseases or were evaluated in clinical trials. Among chosen compounds, PgE1-OH showed the most potent cytotoxic effect on CLL cells.

EP4 receptor agonist, PgE1-OH, was thus evaluated as immunomodulatory compound, with selective cytotoxic effect on CLL cells in micromolar concentrations.

Key words: chronic lymphocytic leukemia (CLL), prostaglandin receptor type 4 (EP4), PgE1-OH, immunomodulation, nuclear factor kappa B (NF- κ B)

SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilat ciklaza
Akt	serin/treonin kinaza
ALL	akutna limfoblastna levkemija
AML	akutna mieloblastna levkemija
AMPK	z adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza
ang.	angleški izraz
AP-1	aktivacijski protein 1 (<i>ang. activator protein 1</i>)
ATM	ataksija-telangiektazija mutiran gen (<i>ang. ataxia-telangiectasia mutated</i>)
ATP	adenozin trifosfat
BCR	B-celični receptor
BTK	Brutonova tirozinska kinaza
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CAP	ciklofosfamid, doksorubicin, prednizolon
CD	celični označevalec (<i>ang. cluster of differentiation</i>)
CHOP	ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon
COP	ciklofosfamid, vinkristin, prednizolon
COX	Ciklooksigenaza
CRE	odzivni element za cAMP (<i>ang. cAMP response element</i>)
CREB	vezavni protein CRE (<i>ang. cAMP response element binding protein</i>)
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC ₅₀	srednja efektivna koncentracija
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor (<i>ang. epidermal growth factor receptor</i>)
eNOS	endotelijaska NO sintaza
EP4	prostaglandinski receptor E tip 4
EPRAP	z receptorjem EP4 povezan protein (<i>ang. EP4 receptor-associated protein</i>)
ERK	kinaza uravnavana z zunajceličnim signalom (<i>ang. extracellular-signal-regulated kinase</i>)
FBS	fetalni goveji serum (<i>ang. fetal bovine serum</i>)
FC	fludarabin, ciklofosfamid
FCR	fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab
GPCR	s proteinom G sklopljen receptor (<i>ang. G protein coupled receptor</i>)
GRK	z G proteinom sklopljena receptorska kinaza

IgM	imunoglobulin M
IgV _H	gen variabilnega področja za težko verigo imunoglobulinov
IκB	inhibitor NF-κB
IKK	IκB kinaza
IL	Interlevkin
KLL	kronična limfocitna levkemija (<i>ang. chronic lymphocytic leukemia</i>)
KML	kronična mieloična levkemija
LAF	laminarni pretok zraka (<i>ang. laminar air flow</i>)
LCL	limfoblastoidne celične linije (<i>ang. lymphoblastoid cell lines</i>)
MEK	mitogen aktivirana proteinska kinaza
MHC	histokompatibilnostni kompleks
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NF-κB	jedrni dejavnik kappa B (<i>ang. nuclear factor kappa B</i>)
obr.	Obratov
PBMC	periferne krvne mononuklearne celice (<i>ang. peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	fosfatni pufer s soljo (<i>ang. phosphate buffered saline</i>)
PDE	fosfodiesteraza
PgE1-OH	prostaglandin E1 alkohol
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PKA	protein kinaza A
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
<i>Ptger4</i>	gen, ki kodira receptor EP4
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RPMI	vrsta medija (<i>ang. Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
SQ 22536	inhibitor adenilat ciklaze
Src	tirozinska kinaza
T	temperatura
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze α (<i>ang. tumor necrosis factor α</i>)

1. UVOD

1.1 Rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov

Rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov prizadenejo produkcijo in funkcijo krvnih celic. Večinoma se začnejo v kostnem mozgu, kjer hematopoetske matične celice zorijo in se razvijajo v tri vrste krvnih celic: rdeče krvne celice, bele krvne celice in trombocite. Pri večini krvnih rakov je normalen proces razvoja krvnih celic prekinjen z neprekinjeno rastjo malignih krvnih celic. Le-te se kopičijo v kostnem mozgu in ovirajo njegovo zmožnost produkcije normalnih krvnih celic, posledično pa so preprečene nekatere normalne funkcije krvnih celic, npr. zaščita pred okužbami, preprečevanje krvavitev (1).

Poznamo tri glavne vrste krvnih rakov: a) **levkemijo**, ki jo povzroči nastanek malignih belih krvnih celic, ki se kopičijo v kostnem mozgu b) **limfom**, ki ga povzroči nastanek malignih limfocitov, ki se kopičijo v limfnih vozlih in sčasoma privedejo do okrnjenega odstranjevanja odvečne tekočine iz našega telesa in procesa nastajanja imunskih celic ter c) **mielom**, ki ga povzroči nastanek malignih plazmatk in vodi v motnje normalne produkcije protiteles ter tako ošibi telesni imunski odziv, kar poveča občutljivost za infekcije (1).

1.2 Levkemija

Levkemije so maligne bolezni krvi in krvotvornih organov. Povzroči jih produkcija visokega števila nenormalnih belih krvnih celic, ki niso zmožne obrambe pred infekcijo. Levkemija je lahko akutna ali kronična. Kronična levkemija, v nasprotju z akutno, napreduje bolj počasi in običajno ne zahteva takojšnjega zdravljenja. Glede na izvor malignih celic se levkemije delijo na limfocitne, kjer gre za nenormalno celično rast predhodnika limfocita, in mieloične, kjer gre za nenormalno rast predhodnika rdeče krvne celice, bele krvne celice ali trombocita (1).

Glavne 4 vrste levkemije so: **a)** akutna limfoblastna levkemija (ALL), **b)** akutna mieloblastna levkemija (AML), **c)** kronična limfocitna levkemija (KLL) in **d)** kronična mieloična levkemija (KML) (1).

Levkemija se lahko pojavi v kateremkoli starostnem obdobju. ALL je najpogostejša oblika otroške levkemije, KML ter predvesem AML in KLL pa so pogostejše pri odraslih (1).

1.3 Kronična limfocitna levkemija

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša vrsta levkemije in predstavlja približno četrtno novih primerov levkemij (2). Njena incidenca je 4,7/100.000 prebivalcev/leto (3).

KLL je neozdravljiva bolezen. Nastane z rakavo klonsko rastjo v celično vrsto B usmerjene limfatične celice (4). Maligni limfociti B izgledajo podobni normalnim celicam, a ne dozori do konca in se tako ne morejo uspešno boriti proti infekcijam. Njihovo preživetje je podaljšano, zato se začnejo kopičiti v kostnem mozgu. Čez čas se maligni limfociti B iz kostnega mozga razširijo po telesu in se kopičijo v limfnih vozlih, jetrih in vranici, kjer onemogočajo normalno funkcijo le-teh (2).

KLL se redko pojavi pri mlajših od 40 let, izredno redko pa pri otrocih (2). Mediana starosti ob pojavu je med 67 in 72 leti, pogosteje pa prizadene moške (razmerje moški:ženske je 1,7:1). S splošnim staranjem populacije se prevalenca in mortaliteta KLL še povečujeta, zaradi bolj pogostih krvnih testiranj pa narašča tudi delež mlajših bolnikov z zgodnejšimi oblikami bolezni (5).

Dejanski vzrok KLL še ni znan. Ena od hipotez o nastanku KLL predpostavlja, da obstaja antigen, ki aktivira limfocite B, ti pa se po aktivaciji ne prenehajo deliti. V večini primerov KLL pride do spremembe na vsaj enem paru kromosomov. V glavnem gre za pridobljene in ne prirojene mutacije. Največkrat gre za delecijo na dolgem kraku kromosoma 13 (50 %), sledijo delecija na dolgem kraku kromosoma 11 (20 %) in delecija na kratkem kraku kromosoma 17 ter trisomija kromosoma 12 (2; 4). S hitrejšim potekom bolezni in rezistenco na zdravljenje sta povezani zlasti delecija 11q13, ki vodi v izgubo ATM (ataksija-telangiektazija mutirani gen), in delecija 17p13, ki vodi v izgubo gena za p53. Oba sta regulatorja apoptoze celic (5).

Znani dejavniki tveganja za KLL so: izpostavljenost določenim kemikalijam (agent orange, pesticidi), družinska anamneza (oboleli starši, sorojenci ali otroci), spol (moški) ter rasa (bolj pogosta je v Evropi in Severni Ameriki kot v Aziji, razlika pa je ohranjena tudi pri priseljencih) (2).

Diagnoza

Ob postavitvi diagnoze večina bolnikov še nima simptomov KLL. Bolezen se običajno odkrije slučajno tekom drugih preiskav. Tipični simptomi (t.i. simptomi B) vključujejo:

utrujenost, izgubo teže, povišano telesno temperaturo, nočno potenje, povečane limfne vozle, bolečino ali občutek polnosti v trebuhu, ki se pojavi zaradi povečane vranice in/ali jeter. Pri napredovanju bolezni se pojavijo še anemija, katere znaki so šibkost in pomanjkanje zraka, levkopenija, ki vodi v ponavljajoče infekcije in trombocitopenija, ki vodi v krvavitve (2).

Diagnoza KLL temelji na krvnih testih in določitvi imunofenotipa celic. Za diagnozo KLL mora biti koncentracija limfocitov B v periferni krvi vsaj tri zaporedne mesece večja od 5×10^9 celic/L. V razmazu periferne krvi bolnikov s KLL prevladujejo majhni zreli limfociti z ozkim robom citoplazme in gostim jedrom brez nukleolov. S pretočno citometrijo celicam določimo klonskost. Celice KLL imajo na svoji površini praviloma T-celični označevalec CD5 in B-celične površinske označevalce CD19, CD20 in CD23. Delež površinskih imunoglobulinov CD20 in CD79b je značilno manjši kot pri normalnih zrelih limfocitih B. Z metodami molekularne genetike določamo kromosomske nepravilnosti (4).

V okviru kliničnih raziskav se določa tudi mutiranost gena za težko verigo imunoglobulina (IgV_H), prisotnost označevalcev ZAP-70 in CD38 na površini celic ter serumske označevalce CD23, timidinsko kinazo in β_2 -mikroglobulin. Punkcija in biopsija kostnega mozga se uporabljata za oceno bolezenskega bremena, na katero sklepajo iz razpršene ali enakomerne infiltracije kostnega mozga, in opredelitev pridruženih dejavnikov citopenije, kot so imunska trombocitopenija in hemolitična anemija (4).

Prognoza

Ugotovili so, da se KLL klinično izraža v dveh oblikah: zelo počasi napredujoči in hitro napredujoči. Celice teh dveh oblik se razlikujejo v pojavnosti dveh prognostičnih markerjev: proteinov ZAP-70 in CD38. Manjša pojavnost napoveduje počasnejše napredovanje bolezni. **Dobro prognozo** napovedujejo še nodularni/intersticijski oz. enakomerni vzorec razširjenosti celic KLL v kostnem mozgu, delecija dela kromosoma 13 in mutiran IgV_H. **Slabo prognozo** napovedujejo difuzni oz. razpršeni vzorec razširjenosti celic KLL v kostnem mozgu, višja starost, moški spol, delecija na kromosomu 11 ali 17, visoka koncentracija β_2 -mikroglobulina v krvi, čas podvojitve števila limfocitov krajši od 6 mesecev, velik delež promielocitov v krvi in nespremenjen IgV_H (2).

Za ocenitev razširjenosti KLL obstajata dva različna sistema klasifikacije: **Rai**, ki se pogosteje uporablja v ZDA, in **Binet**, ki se pogosteje uporablja v Evropi (2).

Rai klasifikacija, ki jo prikazuje Preglednica I, temelji na več kriterijih in deli tveganje na nizko (razred 0), srednje (razreda I in II) in visoko (razreda III in IV).

Preglednica I: Ocena razširjenosti KLL po Rai klasifikaciji.

	Limfocitoza	Anemija	Trombocitopenija	Povečanje limfnih vozlov, vranice, jeter
Rai stopnja 0	✓	/	/	/
Rai stopnja I	✓	/	/	Limfni vozli
Rai stopnja II	✓	/	/	Vranica , z/brez limfnih vozlov in jeter
Rai stopnja III	✓	✓	/	z/brez
Rai stopnja IV	✓	z/brez	✓	z/brez

Binetova klasifikacija, ki jo prikazuje Preglednica II, temelji na številu prizadetih skupin limfoidnih tkiv v področju glave in vratu, dimelj, pazduh, vranice in jeter ter na pojavu anemije in trombocitopenije.

Preglednica II: Ocena razširjenosti KLL po Binet klasifikaciji.

	Limfni vozli	Anemija, trombocitopenija
Binet razred A	Manj kot 3 področja povečana	Ni
Binet razred B	3 ali več področij	Ni
Binet razred C	/	Ena ali obe

Zdravljenje

Zdravljenje je odvisno od razširjenosti bolezni. Ob odsotnosti težav se bolnika redno spremlja v hematološki ambulanti in pri izbranem družinskem zdravniku (6). Pri približno 1/3 bolnikov je bolezen ob odkritju v napreduvali fazi (Binet razred C) in sledi takojšnje zdravljenje, pri 1/3 bolnikov bolezen počasi napreduje in sčasoma privede do potrebe po zdravljenju, pri 1/3 bolnikov pa bolezen tako počasi napreduje, da umrejo zaradi pridruženih komorbidnosti, preden je zdravljenje KLL sploh potrebno (7). V terapiji KLL se največ uporabljajo kemoterapija, monoklonska protitelesa in tarčna terapija (2).

a) Kemoterapija je najbolj uporabljana terapija za razširjene rake, kot je KLL. Ni pa primerna za bolnike s slabim splošnim zdravjem. Odmerja se v ciklih, tako da vsakemu obdobju zdravljenja sledi vmesno obdobje, v katerem se odmrle normalne celice obnovijo. Cikli ponavadi trajajo od 3 do 4 tedne. Pri zdravljenju KLL se uporabljajo:

- purinski analogi: **fludarabin**, pentostatin, kladribin;

- alkilirajoči agensi: klorambucil, **ciklofosfamid**, bendamustin;
- kortikosteroidi (dodatek): prednizon, metilprednizolon, deksametazon;
- druge učinkovine: doksorubicin, metotreksat, oksaliplatin, vinkristin, etoposid, citarabin.

Kemoterapevtske učinkovine napadajo hitro deleče celice. Neželeni učinki se pojavijo zaradi učinka na celice kostnega mozga, sluznice ust in črevesja ter lasnih foliklov. Pri bolnikih z visokim številom levkemičnih celic lahko pride do sindroma lize tumorja. Smrt celic povzroči sprostitvev njihove vsebine v krvni obtok, kar preobremeni ledvice in povzroči kopičenje določenih mineralov v krvi, posledično pa pride do motenj srca in živčnega sistema (2).

Pogosto se uporabljajo kombinacije kemoterapevtskih učinkovin npr. **FCR** (fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab), **FC** (fludarabin, ciklofosfamid), **CHOP** (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon), **CAP** (ciklofosfamid, doksorubicin, prednizolon), **COP** (ciklofosfamid, vinkristin, prednizolon) (4).

Fludarabin je vodotopen fluoriran nukleotidni analog antivirusnega zdravila vidarabine, 9- β -D-arabinofuranoziladenina. Nahaja se v obliki fosfata, ki se v telesu hitro defosforilira in vstopa v celice, kjer se fosforilira do aktivnega trifosfata. Ta zavre sintezo DNA preko zaviranja encimov ribonukleotidne reduktaze, DNA polimeraze α/δ in ϵ , DNA primaze in DNA ligaze. Pride lahko tudi do delne zavore RNA polimeraze II in posledičnega zmanjšanja sinteze beljakovin. Mehanizem delovanja še ni dokončno pojasnjen. Predvideva se, da je za zaustavitev celične rasti odgovorno predvsem zaviranje sinteze DNA. V *in vitro* študijah je izpostavitvev celic KLL fludarabinu vodila v obsežno fragmentacijo DNA in apoptozo celic (8).

Fludarabin se uporablja v terapiji KLL pri bolnikih z napredovalo boleznijo, ki imajo zadostno rezervo kostnega mozga. Priporočeni odmerek je 25 mg fludarabinfosfata/m² telesne površine, 5 zaporednih dni, ki jim sledi 28 dni premora (8).

b) Monoklonska protitelesa za zdravljenje KLL so usmerjena proti dvema tarčama. Protitelo proti proteinu **CD20** na površini limfocitov B (rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab) se lahko uporablja v kombinaciji s kemoterapijo ali samostojno. Protitelo proti antigenu **CD52** na površini celic KLL in številnih limfocitov T (alemtuzumab) se ponavadi uporabi, če se KLL ne odziva več na kemoterapijo, ter pri KLL z delecijo na kromosomu 17, ki se pogosto ne odziva na standardno zdravljenje (2).

c) **Tarčna terapija KLL:** Razvoj učinkovin je usmerjen proti novim tarčam, ki so v celicah KLL bolj izražene. **Ibrutinib** zavira Brutonovo tirozinsko kinazo (BTK) in tako blokira signalno pot B-celičnega antigeneskega receptorja (BCR), kar vodi do preprečitve signaliziranja za preživetje in delitev levkemičnih celic. **Idelalizib** zavira kinazni protein fosfatidilinozitol 3-kinazo (PI3K), ki je pri rakavih boleznih limfocitov B zaradi povečane signalizacije preko BCR bolj aktivna in sodeluje pri prenosu signalov za proliferacijo, preživetje, zastoj malignih celic v limfnih tkivih in kostnem mozgu. Posledično pride do apoptoze in zaviranja proliferacije. **Venetoklaks** cilja antiapoptotični protein Bcl-2, ki je v malignih celicah prisoten v višjih koncentracijah in jim omogoča daljše preživetje s preprečevanjem apoptoze. Gre za zdravilo siroto, namenjeno zdravljenju KLL pri bolnikih z delecijo na kromosomu 17, ki so bili že neodzivni na eno zdravljenje (2).

Druge oblike zdravljenja KLL

Pri mlajših bolnikih, ki se na zdravljenje dobro odzivajo, se eksperimentalno opravljajo presaditve krvotvornih matičnih celic (7). Pri bolnikih, kjer otečeni notranji organi (npr. vranica) pritiskajo na druge organe in kemoterapija ni dovolj učinkovita, se uporablja radioterapija (2).

Možni zapleti KLL

Občasno pride do preklopa KLL v drugo obliko levkemije ali limfoma. Richterjev sindrom, prekop v difuzni velikocelični B limfom, se pojavi pri približno 5 % bolnikov s KLL. Manj pogosto pride do preklopa v prolimfocitno levkemijo, zelo redko pa do preklopa v ALL ali AML (2).

Odzivnost na zdravljenje

Z zdravljenjem lahko dosežemo popolno ali delno remisijo. O **popolni remisiji** govorimo takrat, ko je diferencialna krvna slika 3 mesece po zdravljenju normalna in s pretočno citometrijo ne zaznamo klonskosti celic. Če je klonskost celic še prisotna, govorimo o **delni remisiji**. Pri nekaterih bolnikih zdravljenje ni učinkovito ali pa pride do napredovanja bolezni prej kot pol leta po zaključku zdravljenja. Gre za **refraktarno KLL** oziroma za na zdravljenje neodzivno obliko KLL. Pri nekaterih bolnikih, ki dosežejo popolno ali delno remisijo, pride do ponovitve oziroma **relapsa** bolezni po 6 mesecih ali več let po zaključku zdravljenja (4).

1.4 B-celični receptor (BCR)

Klinični potek KLL je povezan z mutacijskim statusom gena za težko verigo imunoglobulina (IgV_H), kar nakazuje na vpletenost BCR v patogenezi KLL (9). V klinično agresivnejših KLL je ekspresija tarčnih genov aktivacije BCR večja. Podobno kot pri antigenskem signaliziranju preko BCR in kanonski poti aktivacije jedrnega dejavnika kappa B (NF- κ B) tudi tu pride do fosforilacije inhibitorja NF- κ B ($I\kappa B\alpha$) (10). Preko teh poti BCR posreduje signale za proliferacijo in zaviranje apoptoze zrelih, pa tudi malignih limfocitov B. Večina B celičnih limfomov je odvisnih od teh z BCR posredovanih signalov za preživetje. Geni, vpleteni v zaviranje teh signalnih poti, pa predstavljajo potencialne terapevtske tarče (11).

Z BCR sprožena aktivacija zrelih limfocitov B vodi v transkripcijsko reprogramiranje. Povečano je izražanje t.i. takojšnjih-zgodnjih genov, ki pripravijo celico na hiter odgovor s proliferacijo. Pozni-zgodnji geni so znani kot regulatorji negativne povratne zveze signaliziranja rastnega faktorja. Najbolj izražen pozni-zgodnji gen je ***Ptger4*, ki kodira prostaglandinski receptor E tip 4**. Njegova odsotnost z vzdrževanjem visokih ravni signalnih komponent proksimalne kaskade BCR podaljša trajanje signalizacije preko BCR. Nasprotno pa izražanje *Ptger4* negativno regulira z BCR posredovano ekspresijo genov in B celično proliferacijo. Največji vpliv ima na ekspresijo genov, ki kodirajo molekule NF- κ B poti, ribosomske proteine, iniciatorje translacije, ATP-producirajoče molekule, komponente histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) in imunoproteasoma, večina katerih je poznana kot nujnih za učinkovito aktivacijo limfocitov B (11).

1.5 Prostaglandinski receptor E tip 4 (EP4)

Receptor EP4 je eden izmed 4 predstavnikov družine E-prostaglandinskih receptorjev. Gre za z G proteinom sklopljene receptorje (GPCR), sestavljene iz 7 transmembranskih domen in citoplazemskega C terminalnega dela. Povezuje jih < 30 % homologija aminokislinskega zaporedja. Sklopljeni so z različnimi G proteini in posledično aktivirajo različne znotrajcelične signalne poti. Njihov nativni ligand je prostaglandin E2 (PGE2) (12).

E-prostaglandinski receptorji se nahajajo v različnih tkivih. Receptor EP1 prevladuje pri glodalcih, EP2 je pri ljudeh najmanj zastopan in ga najdemo v dihalnih poteh, jajčnikih, kostnem mozgu in olfaktornem epiteliju, EP3 se nahaja v maščobnih tkivih, trebušni slinavki, ledvicah in veni cavi, EP4 pa v gastrointestinalnem traktu, maternici,

hematopoetskih tkivih in koži (12). Vsi 4 receptorji so prisotni na plazemski membrani, receptorja EP3 in EP4 pa sta prisotna tudi na jedrni membrani (13).

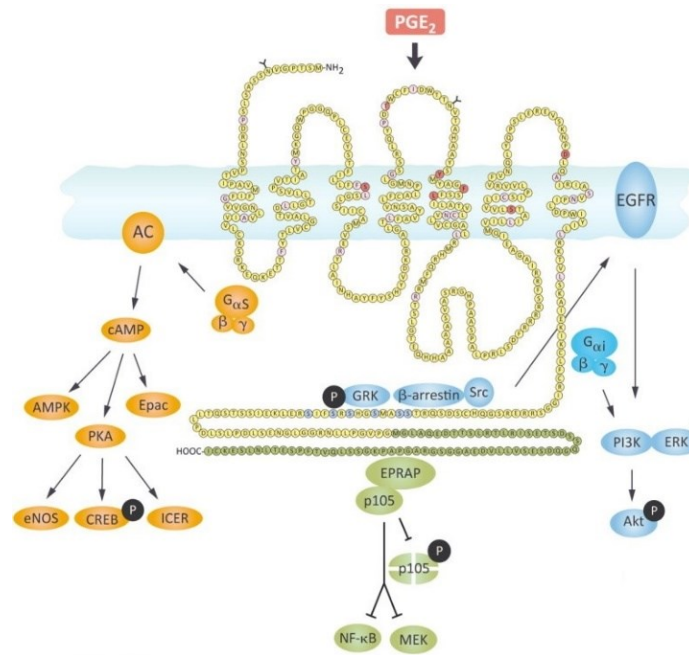
V predkliničnih študijah so ugotovili, da aktivacija receptorja EP4 v nekaterih celicah vodi v angiogenezo, proliferacijo, metastaziranje in zapoznelo apoptozo tumorskih celic, antagonisti receptorja EP4 pa zavrejo progresijo pljučnega raka in melanoma. Ekspresija receptorja EP4 je povečana pri nekaterih vrstah raka (rak kolona, karcinom materničnega vratu). Nasprotno pa receptor EP4 vodi v apoptozo nezrelih limfocitov B in deluje kot tumor supresor (12).

Aktivacija receptorja EP4 s PGE2 lahko sproži različne signalne poti (Slika 1):

a) **preko adenilat ciklaze (AC):** PGE2 preko stimulatornega proteina G α s aktivira AC, kar vodi v zvišanje ravni znotrajceličnega cAMP in aktivacijo več signalnih poti npr. protein kinaze A (PKA), ki povzroči angiogenezo, proteina Epac, ki je udeležen v celični proliferaciji, diferenciaciji, migraciji in vnetnem odzivu, in z adenozin monofosfatom aktivirane protein kinaze (AMPK), ki aktivira inducibilno ciklooksigenazo v podocitih;

b) **preko PI3K/ERK:** PGE2 lahko aktivira PI3K/ERK signalno pot na dva načina: preko G α i in preko receptorja za epidermalni rastni faktor (EGFR). Fosforilacija C-terminalnega dela EP4 receptorja omogoči vezavo β -arestina-1, ki aktivira c-Src, kar sproži transaktivacijo EGFR in posledično signalizacijo preko fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI3K) in Akt. Ta pot je verjetno vključena v migracijo in metastaziranje kolorektalnega karcinoma;

c) **preko EPRAP:** ta se veže na dolg citoplazemski rep receptorja EP4 v človeških makrofagih in stabilizira p105 podenoto NF- κ B, kar prepreči njegovo aktivacijo in aktivacijo mitogen aktivirane proteinske kinaze (MEK) in kinaze uravnavane z zunajceličnim signalom 1/2 (ERK) ter posledično zavira transkripcijo provnetnih citokinov (12).



Slika 1: Shema možnih signalnih poti, ki jih aktivira vezava nativnega liganda PGE₂ na receptor EP4 (12).

Na sliki je 488 AK dolgo zaporedje človeškega receptorja EP4. Na njej so označena mesta, ki so ohranjena v vseh EP receptorjih (rožnato), vezavna mesta za nativni ligand PGE₂ (rdeče), mesta odgovorna za desenzibilizacijo (modro) in za interakcijo z EPRAP (zeleno). Vezava agonistov inducira od G_{αs} odvisno aktivacijo AC. Nastaja cAMP, ki lahko aktivira Epac, AMPK ali PKA (slednja lahko aktivira eNOS, CREB ali ICER). Končni izid je relaksacija žil, angiogeneza in zaščita pred ishemično poškodbo možganov. Vezava z G proteinom sklopljene receptorske kinaze (GRK) na serinski ostanek na C terminalnem delu receptorja povzroči desenzibilizacijo receptorja. Ker so ostanki fosforilirani, privlačijo β-arrestin, ki sproži internalizacijo receptorja, in c-Src, ki vodi do transaktivacije EGFR in nadaljnjo aktivacijo PI3K/ERK/Akt poti. Ta pot je lahko alternativno aktivirana tudi z vezavo toksina davice na inhibitorni protein G_{αi}. Podaljšani C terminalni del receptorja EP4 omogoča interakcijo z EPRAP, ki stabilizira p105 poudenoto in prepreči aktivacijo NF-κB in MEK/ERK1/2 ter zavira transkripcijo proinflammatoryh citokinov v aktiviranih makrofagih (12).

1.6 Jedrni dejavnik kappa B (NF-κB)

Družina transkripcijskih dejavnikov NF-κB ima bistveno vlogo pri vnetju, prirojeni imunosti, iniciaciji in progresiji raka. Poznamo 5 predstavnikov družine: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50) in NF-κB2 (p52). Proteini tvorijo homo- in heterodimere. Dimeri proteinov so v mirujočih celicah vezani na inhibitorne molekule IκB (14).

Poznani sta dve glavni poti aktivacije NF-κB: kanonska in nekanonska pot. Preko obeh poti pride do aktivacije kompleksa kinaze IκB (IKK), ki fosforilira inhibitorno molekulo IκBα in povzroči njeno odcepitev z NF-κB. Sledi premik aktivirane NF-κB v jedro, kjer se veže na sorodno zaporedje DNA v promotorjih tarčnih genov (14). Aktivacija NF-κB je regulirana s povratno zanko. NF-κB poveča ekspresijo lastnih inhibitorjev npr. IκBα, ki z vezavo na NF-κB povzročijo njegovo inaktivacijo in premik v citosol (14).

Vloga NF- κ B pri raku je dvorezna. Po eni strani je aktivacija NF- κ B del prirojenega imunskega odziva, kjer z vplivom na proliferacijo in apoptozo vodi v visoko aktivnost proti rakavim celicam usmerjenih citotoksičnih imunskih celic. Po drugi strani pa je pri številnih oblikah raka NF- κ B konstitutivno aktivna. Imunski odziv ponavadi ne uspe odstraniti vseh rakavih celic, zato pride do preklopa v stanje ravnotežja, ki traja dokler se maligne celice ne začnejo širiti naprej (14). V večini tumorskih celic rezistenca na DNA delujoče učinkovine korelira z aktivacijo NF- κ B in izgubo funkcije p53. Supresija NF- κ B bi tako lahko izboljšala zdravljenje KLL z mutacijo p53 (15).

Aktivacija NF- κ B ponavadi vodi v povečano izražanje antiapoptotičnih genov, kar omogoči preživetje celic kljub fiziološkemu stresu, ki je sprožil vnetni odziv. Nadalje NF- κ B inducira izražanje citokinov, ki regulirajo imunski odziv (TNF- α , IL-1, IL-6 in IL-8), kakor tudi adhezijskih molekul, ki povzročijo vključitev levkocitov v mesta vnetja (14).

Povečana aktivacija NF- κ B pri raku je lahko posledica mutacij v genih za NF- κ B in/ali onkogenov, ki aktivirajo NF- κ B signalno pot. Lahko pa tudi povečanega sproščanja citokinov iz mikro-okolja tumorja. Konstitutivna aktivacija NF- κ B je ponavadi dosežena z neprestanim sproščanjem citokinov iz makrofagov v tumorskem mikro-okolju. Povečana aktivacija NF- κ B v rakavih celicah poveča preživetje preko povišane ekspresije antiapoptotičnih genov (14).

Modulacija poti NF- κ B je eden od možnih mehanizmov nastanka rezistence na zdravljenje. Aktivacija NF- κ B je povečana pri številnih vrstah raka, pri katerih pripomore k bolj agresivni rasti tumorja kakor tudi odpornosti na kemoterapijo ali ionizirajoče sevanje med zdravljenjem raka. Pojav rezistence NF- κ B je povezan s povečano ekspresijo Bcl-xL, Bcl-2, IAP-1 in IAP-2 in proliferativnih genov npr. ciklina D1 in COX-2. Inhibicija NF- κ B poti vodi v apoptozo, inducirano s kolapsom mitohondrijske membrane in aktivacijo kaspaze 9 (15).

Preživetje levkemij in limfomov temelji na konstitutivni aktivaciji NF- κ B. Receptor EP4 inducira s kaspazami posredovano apoptozo v maligno spremenjenih limfocitih B. Selektivni ligand receptorja EP4, PGE1-OH, vodi v znižano aktivacijo NF- κ B in posledično zmanjšano izražanje antiapoptotičnega gena Bcl-xL v celicah Ramos, kar se izrazi v povečani občutljivosti celic za citotoksičnost bortezomiba in doksorubicina (15).

1.7 Ciklični adenzin monofosfat (cAMP)

cAMP je sekundarni prenašalec v celici. Njegova koncentracija v celici je uravnavana s hitrostjo nastajanja preko adenilat ciklaze (AC) in hitrostjo razpada preko cikličnih nukleotidnih fosfodiesteraz (PDE). Pri KLL sta koncentracija cAMP in aktivnost AC in protein kinaze A (PKA) nižji kot v perifernih krvnih mononuklearnih celicah (PBMC) (16).

Ugotovili so, da cAMP inducira apoptozo v malignih limfocitih B (17). Aktivacija AC in posledično povišanje cAMP tako predstavljata potencialni mehanizem indukcije apoptoze v celicah KLL. Do apoptoze lahko pride po ekstrinzični ali intrinzični poti. Obe poti privedeta do aktivacije iniciatorske kaspaze (ekstrinzično 8, intrinzično 9), ki nadalje aktivira izvršilne kaspaze, vključno s kaspazo 3. cAMP inducira apoptozo celic KLL preko intrinzične z mitohondrijem posredovane poti (16).

Koncentracijo cAMP bi lahko v celicah KLL povečali na več različnih načinov. Analogi cAMP *in vitro* povečajo apoptozo celic KLL tretiranih z glukokortikoidi in klorambucilom, a zaradi svoje neselektivnosti ne morejo biti uporabljeni *in vivo*. Enako velja za agoniste Gas sklopljenih receptorjev npr. PGE2 in za aktivatorje AC. V terapiji bi se lahko uporabljali tudi antagonisti Gai sklopljenih receptorjev (16). Aktivnost teh receptorjev je povečana pri bolnikih s KLL z mutacijo v genu, ki kodira G3b podenoto G proteinov, in je povezana s pogostejšim relapsom bolezni (18). Med Gai sklopljenimi receptorji, ki so bolj aktivni pri KLL, so številni kemokinski receptorji. Le-ti vodijo v povečano preživetje in migracijo celic KLL in so pomembni za njihove interakcije z mikro-okoljem (16).

Druga možnost povečanja koncentracije cAMP je preprečevanje njegove razgradnje s PDE. Neselektivni inhibitor PDE teofilin *in vitro* inducira apoptozo in zmanjša ekspresijo Bcl-2 in p53 na celicah KLL, *in vivo* pa lahko poveča učinek klorambucila, vendar zaradi neselektivnosti povzroča številne neželene učinke. V normalnih limfocitih B in v celicah KLL je najbolj izražena izoforma PDE4B. Zanj specifični inhibitorji, npr. rolipram, inducirajo apoptozo preko s PKA posredovane mitohondrijsko odvisne poti, tako da znižajo ekspresijo Bcl-2 in Bcl-xL, povišajo ekspresijo Bax in BAD ter aktivirajo kaspazi 3 in 9. Pride tudi do trajne fosforilacije CREB in aktivacije protein fosfataze 2, ki defosforilira proapoptotični protein BAD, kar vodi v njegovo translokacijo v mitohondrij in sprostitvev citokroma c. Pri celicah KLL je povečana ekspresija PDE7B. Njena inhibicija

vodi v povišan cAMP in indukcijo mitohondrijske depolarizacije in sprostitve citokroma c. Sočasna inhibicija PDE4 in PDE7B bi bila na celicah KLL še bolj učinkovita (14).

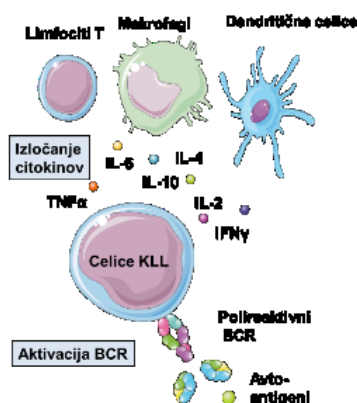
Aktivacija receptorja EP4 preko aktivacije AC povzroči povišanje cAMP (12). Agonist receptorja EP4, PgE1-OH, tako predstavlja potencialno učinkovino v terapiji KLL.

1.8 Imunomodulacija pri KLL

Celice KLL preko manipulacije z mikro-okoljem in sproščanja citokinov preživetja zavirajo pojav apoptoze, lahko pa vplivajo tudi na rezistenco na zdravljenje KLL (19). Citokini so majhni proteini, ki imajo velik vpliv na interakcije in komunikacijo med celicami. Delijo se na provnetne citokine npr. IL-1 β in TNF- α , ki spodbujajo vnetne procese in nastajajo v glavnem v aktiviranih makrofagih, protivnetne citokine npr. IL-4, IL-10, IL-11 in IL-13, ki nadzirajo delovanje drugih citokinov, in citokine, ki lahko posredujejo obe funkciji npr. IFN α , IL-6 in TGF β (20).

Domneva se, da so pri KLL prisotni avto-antigeni, ki konstitutivno aktivirajo BCR (2). To vodi do fosforilacije inhibitorja NF- κ B (I κ B α) (10), kar vodi v signaliziranje za proliferacijo in zaviranje apoptoze, ki je nujno za preživetje večine B celičnih limfomov (11).

Na proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B imajo vpliv številni topni mediatorji. V *in vitro* študiji so rekombinantni človeški citokini IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α in IFN α povečali proliferacijo nekaterih celic KLL. Rezultati so pokazali vpliv klonske heterogenosti populacij celic KLL in nakazali, da IL-2 in TNF- α delujeta kot rastna faktorja nekaterih celic KLL (21). Kot prikazuje Slika 2, na limfocite B *in vivo* vplivajo citokini, ki jih izločajo celice v njihovem mikro-okolju npr. makrofagi, limfociti T in dendritične celice, kar lahko vodi v konstitutivno aktivacijo NF- κ B ter v povečano nastajanje antiapoptotičnih proteinov (14).



Slika 2: Mikro-okolje celic KLL (22).

Slika prikazuje mikro-okolje celic KLL. Limfociti T, makrofagi in dendritične celice izločajo citokine, ki vplivajo na preživetje celic KLL. Aktivacija BCR vodi do proliferacije B celic. Pri KLL je lahko BCR receptor stalno aktiviran, kar vodi v neprestano proliferacijo.

Celice v mikro-okolju celic KLL izločajo tudi PGE2. Ta preko receptorja EP4 posreduje imunomodulatorno delovanje na celice KLL. Njegova aktivacija vodi v inhibicijo signalne poti NF- κ B ter tako prepreči nastajanje antiapoptotičnih proteinov npr. Bcl-2 in pro-vnetnih citokinov (12; 15). Manjše izločanje preživetvenih citokinov in antiapoptotičnih proteinov povzroči apoptozo celic. Med citokini, katerih izražanje je regulirano s transkripcijskim dejavnikom NF- κ B, sta tudi IL-2 (23) in TNF- α (24).

Razvoj novih učinkovin gre v smeri imunomodulatornega delovanja. Na trgu so že prisotni nekateri zaviralci različnih BCR-povezanih kinaz npr. ibrutinib, idelalizib (25). Razvijajo pa se tudi nove učinkovine npr. lenalidomid, derivat talidomida, ki zavira izločanje TNF- α in poviša izločanje nekaterih citokinov – IL-6, IL-2 in IL-10 (19).

1.9 Potencialne spojine v terapiji KLL

Prostaglandin E2 (PGE2)

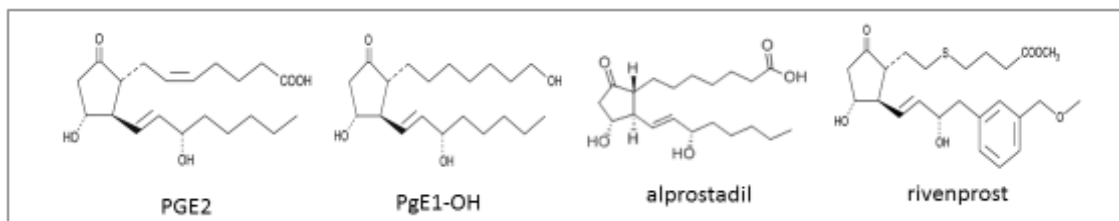
PGE2 je endogeni ligand štirih receptorjev za prostaglandine: EP1, EP2, EP3 in EP4 (12). Je tudi eden najbolj pogostih metabolitov arahidonske kisline, ki nastaja pri kaskadi encimsko nadzorovanih reakcij ciklooksigenaz (COX) in specifičnih prostaglandin sintaz (26). Vključen je v številne biološke procese npr. bolečino, povišano telesno temperaturo, regulacijo tonusa žil, ledvično funkcijo, integriteto mukoze, vnetje, angiogenezo in rast tumorjev. Njegovo delovanje je tako široko zaradi delovanja na štiri različne E-prostaglandinske receptorje (12). Terapevtsko se uporablja za sprožitev poroda (27).

Prostaglandin sintaze so različno razširjene med celicami, zato v različnih tkivih nastajajo različni prostaglandini. PGE2 nastaja v glavnem v fibroblastih, monocitih, epitelijskih in endotelijjskih celicah. Pri teh procesih sodelujejo trije encimi: inducibilna mikrosomalna PgE sintaza-1, mikrosomalna PgE sintaza-2 in citosolna PgE sintaza (12).

PGE2, ki nastaja med procesom vnetja, vpliva na diferenciacijo in efektorske funkcije dendritičnih celic in celic T pomagalk (26).

Vezava različnih ligandov in naravnega PGE2 na receptor EP4 sproži različne od **liganda odvisne signalne poti**. Ta pojav je značilen za spojine, ki delujejo na z G proteinom sklopljene receptorje (28). Različni ligandi stabilizirajo različno konformacijo receptorja,

kar vodi v različno učinkovitost in končni učinek na celicah oz. organih (29). PGE2 *in vitro* aktivira Gas 10-krat bolj kot Gai, medtem ko so nekateri agonisti (PgE1-OH, L-902688) bolj usmerjeni k Gai in β -arestinu (12).



Slika 3: Strukturna primerjava PGE2 (30), PgE1-OH (31), alprostadila (32) in rivenprosta (33).

PGE2 je naravni ligand vseh štirih receptorjev za PGE2. Alprostadil (prostaglandin E1) prav tako deluje na vse štiri receptorje za PGE2 (32). PgE1-OH in rivenprost sta selektivna agonista receptorja EP4. Vse molekule imajo osrednji ciklopentanonski fragment. Na stranski verigi imajo karboksilno kislino, ki je pri rivenprostu zaestrena, pri PgE1-OH pa zamenjana s hidroksilno skupino. PGE2 ima na ti stranski verigi eno dvojno vez več kot alprostadil in PgE1-OH, od tod tudi poimenovanje z višjo številko v imenu. Stranska lipofilna veriga je pri rivenprostu v primerjavi z drugimi ligandi spremenjena (34).

Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH)

PgE1-OH je agonist receptorja EP4 (Ki 10-1000 nM) (12). V klinični študiji so proučevali njegove bronhodilatatorne lastnosti pri astmatikih. Ti so prejeli inhalacijo enkratnega odmerka 1, 10 oz. 30 μ g PgE1-OH, 55 μ g PGE2 oziroma placebo. Koncentraciji 10 in 30 μ g PgE1-OH sta povzročili značilno a kratkoročno bronhodilatacijo, podobno kot 55 μ g PGE2. Neželeni učinki so se pojavili na tretjini preskušancev in so bili blagi in lokalni (35).

V *in vitro* študijah je PgE1-OH povzročil časovno in koncentracijsko odvisno znižanje presnovne aktivnosti na različnih B celičnih linijah (Ramos, MHH-PRE B, NALM-6 in KOPN-8), ni pa posredoval citotoksičnega učinka na T celične linije (MOLT-4, Jurkat) in mieloidne celične linije (THP-1, U937) (15). Imunoblot analiza prekurzorjev NF- κ B in inhibitornih molekul po aktivaciji s PgE1-OH je pokazala časovno odvisno znižanje koncentracije fosforiliranih oblik I κ B α in p105, medtem ko so koncentracije celega proteina povišane, kar kaže na inhibicijo poti NF- κ B. Zmanjšano je bilo tudi izražanje antiapoptotičnega proteina Bcl-xL (15).

Alprostadil

Prostaglandin E1, poznan tudi kot alprostadil, sodi v družino prostaglandinov in je široko prisoten med biološko aktivnimi substancami. Uporablja se v terapiji erektilne disfunkcije in za začasno vzdrževanje prehodnosti arterioznega voda pri novorojenčkih s prirojenimi srčnimi okvarami (27). Deluje neposredno na gladke mišice žil in povzroči dilatacijo žil,

poveča pretok krvi, izboljša mikrocirkulacijsko perfuzijo, inhibira agregacijo trombocitov in produkcijo tromboksana A₂, inhibira aterosklerozo, nastajanje maščobnih plakov in imunskih kompleksov (32). Na receptorje za prostaglandin E se veže z različno selektivnostjo. Izkazuje selektivnost za receptorja EP3 (K_i 1,1 nM) in EP4 (K_i 2,1 nM) v primerjavi z receptorjema EP1(K_i 36,10 nM) in EP2 (K_i 33 nM) (32).

Rivenprost

Rivenprost je močan in selektiven agonist receptorja EP4 (K_i 0,7 nM) (33). V 2. fazi klinične študije je bil proučevan za zdravljenje ulceroznega kolitisa (36). *In vitro* pospeši z receptorjem EP4 povezano tvorbo kosti, preprečuje izgubo kosti, povezano z osteoporozo, modulira diferenciacijo osteoblastov in stabilizira kostne vsadke (33).

2. NAMEN DELA

Namen našega dela bo preučevanje imunomodulatorne vloge agonista prostaglandinskega receptorja EP4, PgE1-OH.

Najprej bomo *in vitro* preverili citotoksični učinek PgE1-OH na celicah KLL iz polne krvi bolnikov, ki bodo privolili v sodelovanje v raziskavi št. 93/12/10. Raziskava je odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME). Z reagentom PrestoBlue bomo določili presnovno aktivnost celic KLL po inkubaciji s PgE1-OH. S programom GraphPad Prism pa bomo določili EC₅₀ vrednosti.

V nadaljevanju bomo ovrednotili imunomodulatorno delovanje PgE1-OH na celicah KLL preko delovanja na dve signalni poti, preko NF- κ B in preko AC. Vpliv PgE1-OH na modulacijo sproščanja citokinov v aktiviranih celicah KLL pred in po dodatku PgE1-OH bomo vrednotili s kompletom BD Cytometric Bead Array (CBA). Z inhibitorji in aktivatorji AC pa bomo skušali oceniti vpletenost signalne poti AC v signaliziranje po vezavi PgE1-OH na receptor EP4.

Citotoksični učinek PgE1-OH na celicah KLL bomo primerjali še z vzorci zdravih darovalcev (celice LCL in PBMC). Z reagentom PrestoBlue oziroma MTS bomo določili presnovno aktivnost celic. S programom GraphPad Prism pa bomo določili EC₅₀ vrednosti. Te bomo nato uporabili za ocenjevanje selektivnosti.

Iskali bomo tudi nove imunomodulatorne spojine s citotoksičnim učinkom na celice KLL. Njihov citotoksični učinek bomo določili še na celicah zdravih darovalcev (LCL) in rezultate uporabili za oceno selektivnosti za celice KLL. Izbrali bomo spojine, ki so strukturno podobne nativnemu ligandu receptorja EP4, PGE2, so zanj selektivne oziroma imajo izraženo močno delovanje proti rakavim celicam.

Tekom raziskovalnega dela bomo pripravili biobanko celic KLL, ki bo vsebovala primerno shranjeno DNA, RNA in celice KLL. To bo omogočilo nadaljnje raziskave in izvedbo potrditvenih študij.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Preglednica III: Seznam kemikalij, ki smo jih uporabili.

Kemikalija	Proizvajalec
Alprostadil	Cayman Chemical, MI, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Etilni alkohol 96 %	ECP, d.o.o., Trzin, Slovenija
Ficoll-Paque™ PLUS reagent	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Forskolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Ionicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Obogatitvena mešanica RosetteSep® humanih celic B	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
PrestoBlue™ cell viability reagent	Invitrogen, ZDA
Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH)	Cayman Chemical, MI, ZDA
PgE2	Cayman Chemical, MI, ZDA
Raztopina tripanskega modrila	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Rivenprost	Cayman Chemical, MI, ZDA
SQ 22536	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Toplotno deaktiviran fetalni goveji serum (HD FBS)	Gibco, ZDA
Trizol® reagent	Life technologies, ZDA

3.1.2 Kompleti za analize

Preglednica IV: Seznam kompletov za analize, ki smo jih uporabili.

Komplet	Proizvajalec
BD™ Cytometric Bead Array (CBA), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II	BD Biosciences, San Diego
Cell titer 96® Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS reagent)	Promega, Madison, WI, ZDA

3.1.3 Pufri in raztopine

Preglednica V: Seznam pufrov in raztopin, ki smo jih uporabili.

Pufri in raztopine	Sestava
---------------------------	----------------

10 × PBS (pH 7,4) Natehtali smo sestavine in jih raztopili v vodi, uravnali pH in avtoklavirali.	80 g NaCl 2 g KCl 36,3 g Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ ultračista H ₂ O, dopolnimo do 1,0 L
1 × PBS	10 × PBS redčimo 1 : 10 z ultračisto vodo in avtoklaviramo

3.1.4 Gojišča

Preglednica VI: Seznam gojišč, ki smo jih uporabili.

Gojišče	Sestava
RPMI medij (KLL)	500 ml RPMI-1640 50 ml HD FBS 5,5 ml antibiotika in antimikotika 5,5 ml L-glutamina 500 µl 50 µM 2-merkaptetanola
RPMI medij (LCL)	500 ml RPMI-1640 50 ml HD FBS 5,5 ml antibiotika in antimikotika 11 ml L-glutamina
Medij za zamrzovanje celic (KLL)	25 ml RPMI medij (KLL) 20 ml FBS 5 ml DMSO
Medij za zamrzovanje celic (LCL)	25 ml RPMI medij (LCL) 20 ml FBS 5 ml DMSO

3.1.5 Laboratorijska in programska oprema

Preglednica VII: Seznam laboratorijske in programske opreme, ki smo jo uporabili.

Aparatura/Material	Proizvajalec
Avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
BD Plastipak™ brizgalke	Becton Dickinson, S.A., Španija
BD Microlance™ 3 igle	Becton Dickinson, S.A., Španija
Cell-Quest® software za obdelavo podatkov na FACS	Becton Dickinson, New Jersey, ZDA
Centrifuga (Eppendorf centrifuge 5415 R)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija

Centrifugirke (15 in 50 ml)	TPP, Trasadingen, Švica
Centrifugirke za pretočno citometrijo	Invitrogen, ZDA
Hemocitometer	Brand Neumbauer, Nemčija
Hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
Inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora)	Siemens, ZDA
Krioviale	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
Mikrocentrifugirke (0,5 ml, 1,5 ml in 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Mikrotitrski čitalec (Safire 2™ Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
Multikanalne pipete (100, 300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete (do 10, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Pipete	100-1000 µl (Eppendorf) 20-200 µl (Eppendorf) 0,5-10 µl (Eppendorf) 0,1-2,5 µl (Eppendorf)
Plastične sterilne mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
Plastične sterilne črne mikrotitrne ploščice (s 96 vdolbinami)	Nuclon™ Delta Surface, Nemčija
Posode T-flask za gojenje celičnih kultur	TPP, Trasadingen, Švica
Pretočni citometer FACS Calibur	Becton Dickinson, New Jersey, ZDA
Programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
Računalniška programska oprema: Cell®	Olympus, Tokio, Japonska
Serološke pipete za enkratno uporabo (volumni: 5, 10, 25 in 50 ml)	TPP, Trasadingen, Švica
Tehtnica	Mettler Toledo
Vodna kopel	Mikro+polo, Maribor, Slovenija Memmert, Schwabach, Nemčija
Vortex (Vortex GENIE 2)	Scientific industries, Orlando, Florida, ZDA
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma scientific, Midland, ON, Kanada

3.2 Metode dela s celičnimi kulturami

Delo s celičnimi kulturami poteka v celičnem laboratoriju v aseptičnih pogojih. Celični laboratorij je ločen od preostalih prostorov s predprostorom. Opremljen je s komoro z laminarnim pretokom zraka (LAF komoro), ki zrak filtrira skozi HEPA filter (ang. High efficiency particle) ter tako prepreči vstop kontaminantov v komoro.

Pred vstopom v celični laboratorij si nadenemo haljo in obutev, namenjeno za delo v celičnem laboratoriju, oziroma ščitnike za obutev za enkratno uporabo. Umijemo si roke in nadenemo rokavice, ki jih pred začetkom in po koncu dela s celičnimi materiali ter preden damo roke v LAF komoro razkužimo s 70 % etanolom. Z njim razkužimo tudi vse površine v LAF komori ter opremo in materiale, ki jih bomo uporabili pri delu v njej. Pripravljeno komoro zapremo in prižgemo UV lučko za 20 minut. Po tem lahko prenesemo celično kulturo v LAF komoro in pričnemo z delom. Pri delu v LAF komori uporabljamo sterilno opremo in materiale (37).

3.2.1 Celične kulture

Pri raziskovalnem delu smo poskuse izvajali na celičnih linijah in primarnih celicah, pridobljenih od bolnikov s kronično limfocitno levkemijo (KLL) in zdravih darovalcev (PBMC).

Celice KLL

So primarni limfociti B, izolirani iz vzorcev krvi bolnikov s potrjeno diagnozo KLL, ki jih je asist. Tijana Markovič, mag. farm. v okviru klinične študije št. 93/12/10 (z dovoljenjem Komisije RS za medicinsko etiko) zbirala od maja 2012 do februarja 2016. V tem obdobju je bil odvzet 201 vzorec krvi. Bolniki so bili povabljeni k sodelovanju v študiji med pregledom na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana. Pred podpisom pristanka na sodelovanje so bili podrobno seznanjeni s cilji in potekom raziskave. Sledil je dodaten odvzem majhnega volumna krvi (~ 5 ml). Celice KLL smo nato izolirali po postopku, opisanemu v podpoglavju 3.3. Celice KLL sva v obdobju od oktobra 2015 do februarja 2016 izolirali skupaj s Katarino Nemeč, ki je celice ravno tako uporabljala za svojo magistrsko nalogo (38). Vzorce smo zaradi varstva osebnih podatkov označili z internimi oznakami.

Periferne krvne mononuklearne celice (PBMC)

Periferne krvne mononuklearne celice (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) so celice z enim okroglim nezažetim jedrom, ki ne vsebuje granul. Mednje tako spadajo

limfociti (T, B in celice ubijalke; 70-90 %) in monociti (10-30 %), v zelo nizkem deležu pa so lahko prisotni tudi makrofagi in plazmatke (39).

PBMC so primarna celična kultura, celice se zato ne delijo v neskončnost in niso nesmrtno. Dobro oponašajo pogoje *in vivo*.

Celice PBMC smo pridobili iz polne krvi zdravih darovalcev, ki smo jo redčili s sterilnim fosfatnim pufrom s soljo (PBS). Izolirali smo jih s centrifugiranjem preko gostotnega gradientnega medija (Ficoll-PaqueTM PLUS). Po centrifugiranju ($200 \times g$, 20 minut, brez zavore, sobna T) je prišlo do ločitve na več plasti glede na gostoto (na vrhu plast plazme, pod njo plast PBMC, nato plast fikola, na dnu pa plast eritrocitov in granulocitov) (Slika 5).

Limfoblastoidne celične linije (*LCL, ang. lymphoblastoid cell lines*)

Celice so limfociti B, ki so jih izolirali iz periferne krvi zdravih darovalcev in jih transformirali z Epstein-Barr virusom. Pridobljene celične linije imajo ohranjeno večino lastnosti limfocitov B (tudi npr. tvorbo protiteles) in so nesmrtno (40).

3.2.2 Odmrzovanje celičnih kultur

Celice LCL:

Krioviale s celicami LCL, ki so bile shranjene v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo na vodni kopeli hitro odtalili in celice prenesli k na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ segretemu mediju v falkonki (10 ml), premešali in centrifugirali (1200 obr./min, 5 min, sobna T). Odstranili smo supernatant in peleto resuspendirali v mediju. Celice smo prešteli in po potrebi redčili, da smo vzdrževali optimalno koncentracijo: 1-2 mio celic/ml. Gojili smo jih v inkubatorju s stalno temperaturo, vlago in količino CO_2 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 % vlažnost, 5 % CO_2). Celicam smo enkrat tedensko zamenjali ves medij, trikrat tedensko pa smo preverjali koncentracijo celic in jih po potrebi redčili. Ko so celice dosegle ustrezno živost in število, smo jih uporabili za eksperimentalno delo, višek pa shranjevali v biobanko celic LCL.

Celice KLL:

Nekatere celice KLL smo odmrznili za izvedbo dodatnih potrditvenih poskusov. Postopek odmrzovanja je enak kot pri celicah LCL, le da se jih odmrzuje relativno počasi, najprej na ledu, potem pa na sobni T.

3.2.3 Štetje celic

Za določitev optimalnega redčenja celičnih kultur ter ocenjevanje živosti celic smo celicam dodali tripansko modrilo. To barvilo vstopa v celice s poškodovano membrano (npr. mrtve celice), ne more pa vstopati v žive celice, zato nam omogoča določitev koncentracije živih celic v celični kulturi (41).

Odvzeli smo 10 µl celične suspenzije, dodali 10 µl barvila tripan modro, dobro premešali in nanесли 10 µl suspenzije v komorico hemocitometra. Prešteli smo žive (bele) celice v 4 vidnih poljih pod invertnim svetlobnim mikroskopom.

Koncentracijo živih celic v celični kulturi smo izračunali po naslednji formuli:

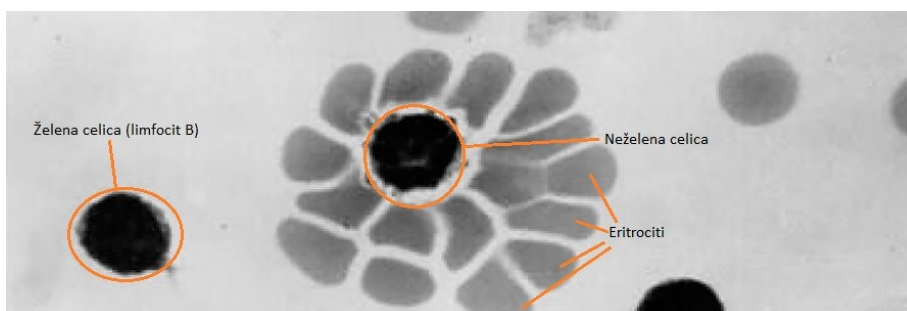
Enačba 1: Enačba za izračun koncentracije celic s hemocitometrom.

$$\text{Število celic/ml} = \frac{A + B + C + D}{4} \times \text{DF} \times 10^4$$

A, B, C, D - število celic (živih oz. mrtvih) v posameznem polju hemocitometra; DF - faktor redčenja
Za inkubacijo celic s spojinami smo uporabili celične kulture z vsaj 90 % živostjo.

3.3 Izolacija celic KLL iz polne krvi

Limfocite B smo izolirali iz polne krvi bolnikov s potrjeno diagnozo KLL po protokolu RosetteSep. Gre za izolacijo limfocitov B po principu negativne selekcije, tako da z navzkrižnim premreženjem in centrifugiranjem preko gradientnega medija odstranimo vse druge celice (42). Obogatitvena mešanica RosetteSep vsebuje kombinacijo monoklonskih protiteles, ki so vezana v bispecifične tetramerne komplekse protiteles. Ti se vežejo na membranske antigene neželenih celic in jih premrežijo s številnimi eritrociti. Tvorijo se imunorozete, ki se zaradi večje gostote posedajo skupaj s prostimi eritrociti (Slika 4) (43).



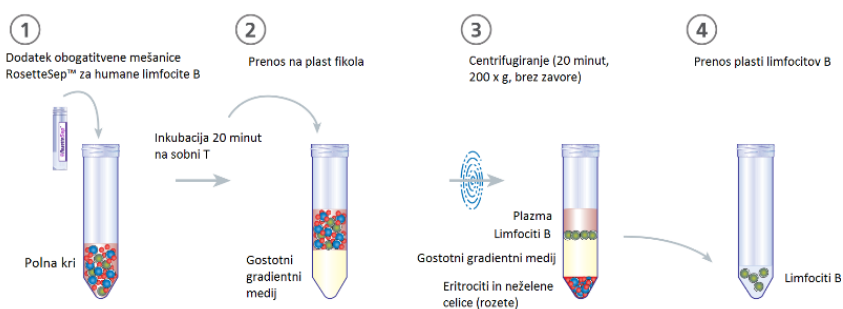
Slika 4: Premreženje eritrocitov in neželenih celic s tetramernimi kompleksi protiteles. Povzeto po (42).

Pred začetkom dela smo vse reagente segreti na sobno temperaturo (~ 22 °C). Vzorcju polne krvi smo najprej dodali obogatitveno mešanico RosetteSep (75 µl/~5 ml krvi) in ga inkubirali 20 minut na sobni temperaturi. Potem smo vzorec redčili z enakim volumnom 2

% raztopine fetalnega govejega seruma (FBS) v PBS, premešali in previdno prenesli na 4 ml fikola v drugi centrifugirki, ne da bi prišlo do mešanja plasti.

Sledilo je 20 minutno centrifugiranje ($200 \times g$, sobna T, brez zavore). Med centrifugiranjem je prišlo do ločitve na več plasti glede na specifično gostoto. Eritrociti, premreženi granulociti, limfociti T in celice naravne ubijalke se zaradi gostote, večje od fikola, posedejo na dno, pod plast fikola. Limfociti B so se nahajali tik nad plastjo fikola. Vrhno plast pa so sestavljali plazma, trombociti, FBS in PBS.

Po centrifugiranju smo najprej odstranili plast plazme do ~ 1 cm nad plastjo limfocitov B, nato pa plast limfocitov s krožnimi gibi s pipeto pobrali in prenesli v novo centrifugirko. Dopolnili smo jo s KLL medijem in centrifugirali (1700 obr./min, 7 minut, sobna T). Supernatant smo zavrgli, celice pa prenesli v sveže gojišče v posodi za gojenje celic. Celice smo še prešteli in po potrebi redčili ($c < 2$ mio/ml) ter inkubirali (37°C , 100 % vlažnost, 5 % CO_2) (Slika 5).



Slika 5: Postopek izolacije limfocitov B iz polne krvi z RosetteSep. Povzeto po (42).

3.4 Določanje presnovne aktivnosti celic

Živost celic po inkubaciji s spojinami smo določali s testi presnovne aktivnosti.

3.4.1 Reagent PrestoBlue

Reagent PrestoBlue vsebuje barvilo resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi), ki s fiziološkimi pufri tvori temno modro raztopino. Resazurin prehaja celično membrano, v mitohondrijih živih celic sprejme elektrone iz NADH ter se reducira v barvilo resorufin, ki je rožnate barve in fluorescira. Količina nastalega resorufina je premo sorazmerna številu presnovno aktivnih živih celic, kar lahko kvantitativno določimo z merjenjem fluorescence z mikrotitrskim čitalcem (ekscitacija 560 nm, emisija 590 nm) (44).

V črnih mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami smo pripravili 3 paralelke kontrol, tretiranih celic in medija (100 µl/vdolbino). Živost celic KLL in PBMC smo določali 24 h in 48 h po izpostavitvi. 3 h pred meritvijo smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl reagenta PrestoBlue. Inkubirali smo v temi 3 ure (37 °C, 5 % CO₂), potem pa z mikrotitrskim čitalcem pomerili fluorescenco. Živost celic smo določili z normiranjem na kontrolo topila (DMSO).

3.4.2 MTS test

MTS reagent sodi med negativno nabite tetrazolijeve spojine in je zmes (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazola v obliki soli in fenazin etosulfata, ki deluje kot prejemnik elektronov. Z redukcijo MTS nastane topen formazanski produkt, ki absorbira svetlobo pri 492 nm. Količina nastalega formazana je premo sorazmerna količini presnovno aktivnih živih celic (44).

Na mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami smo pripravili 3 paralelke kontrol, tretiranih celic in medija (100 µl/vdolbinico). Živost celic LCL smo preverjali 24 h in 72 h po izpostavitvi. 3 h pred meritvijo smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl reagenta MTS. Inkubirali smo 3 ure (37 °C, 5 % CO₂), potem pa z mikrotitrskim čitalcem pomerili absorbanco pri 492 nm. Živost celic smo določili z normiranjem glede na kontrolo topila (DMSO).

3.5 Določanje citotoksičnosti različnih spojin

Celice smo z namenom določanja citotoksičnosti tretirali z več različnimi spojinami: selektivnima agonistoma receptorja EP4 (PGE1-OH in rivenprost), purinskim analogom, ki se uporablja v terapiji KLL (fludarabin) in prostaglandinom E1 (alprostadil). Citotoksičnost smo določali na celicah KLL, LCL in PBMC.

Določanje citotoksičnosti različnih spojin na celicah KLL

Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo 4×10^5 celic/ml, dobro premešali in prenesli na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami. Celice v vsaki vdolbinici smo tretirali z naraščajočo koncentracijo spojin (1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM; koncentracija med inkubacijo je bila odvisna od spojine). Ena vdolbinica je ostala netretirana (kontrola), v eni vdolbinici pa smo imeli kontrolo topila (DMSO).

Po inkubaciji smo celice v vsaki vdolbinici dobro premešali in z multikanalno pipeto z reverznim pipetiranjem prenesli po 3×100 µl na 2 črni mikrotitrski ploščici s 96

vdolbinicami (24 h in 48 h). Od leve proti desni smo nanašali: netretirane celice (kontrola), netretirane celice z dodatkom DMSO (kontrola topila), tretirane celice v naraščajočih koncentracijah ter medij.

Živost celic po 24 h oziroma 48 h inkubacije (37 °C, 5 % CO₂) smo določili z reagentom PrestoBlue, kot je opisano v poglavju 3.4.1.

Določanje citotoksičnosti različnih spojin na celicah LCL

Postopek inkubacije celic LCL s PgE1-OH je bil v splošnem enak kot pri celicah KLL. Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo 3×10^5 celic/ml. Za merjenje presnovne aktivnosti celic smo uporabili v našem laboratoriju že uveljavljene teste MTS (15; 45; 46).

Celice smo tretirali tudi z alprostadilom, fludarabinom in rivenprostom v treh koncentracijah: 10 µM, 50 µM in 100 µM.

3.6 Določanje vpletenosti adenilat ciklaze v signalne poti receptorja EP4

Vpletenost adenilat ciklaze (AC) v signalne poti, ki jih aktivira receptor EP4, smo preverjali z izpostavitvijo celic KLL inhibitorju (SQ 22536) in aktivatorju (forskolin) AC. Najprej smo določili koncentracijo, pri kateri je bil opazen učinek SQ 22536 in forskolina na AC, potem pa jo uporabljali za nadaljnje delo. Pripravili smo suspenzijo celic KLL s koncentracijo 4×10^5 celic/ml, dobro premešali in prenesli na mikrotitrsko ploščico. Celice v dveh vdolbinicah ploščice smo tretirali s SQ 22536 (5 oziroma 10 µM) in inkubirali 1 uro. Po inkubaciji smo v dve vdolbinici (tretirano in netretirano) dodali PgE1-OH (5 oz. 10 µM), tretirali s forskolinom (150 in 200 µM), kontroli topila pa smo dodali DMSO. Celice v vsaki vdolbinici smo dobro premešali in z multikanalno pipeto prenesli 3 paralelke po 100 µl na dve črni mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami (za 24 h oziroma 48 h inkubacijo). Živost celic po 24 h oziroma 48 h inkubacije (37 °C, 5 % CO₂) smo določili z reagentom PrestoBlue, kot je opisano v poglavju 3.4.1.

3.7 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je tehnika, ki nam omogoča meritev fizikalnih in biokemijskih lastnosti posamezne celice, medtem ko celica v suspenziji potuje skozi merilno napravo. Uporablja se lahko za imunofenotipizacijo krvnih celic, analizo apoptoze in detekcijo citokinov. Sodobni pretočni citometri lahko merijo do 14 parametrov hkrati. Osnovni pogoj je, da so celice v suspenziji, saj le tako lahko pride do hidrodinamskega fokusiranja, kar nam omogoči analizo vsake celice posebej (47).

Pri prehodu celic skozi pretočno celico svetloba iz vira svetlobe zadene delce, nakar pride do odboja oziroma absorbcije svetlobe. Siplanje svetlobe je odvisno od velikosti, granularnosti in fluorescenčnih lastnosti celic. Fluorescenčna emisija je odvisna od količine vezane sonde (barvila ali monoklonskega protitelesa) na celici ali celični komponenti (47).

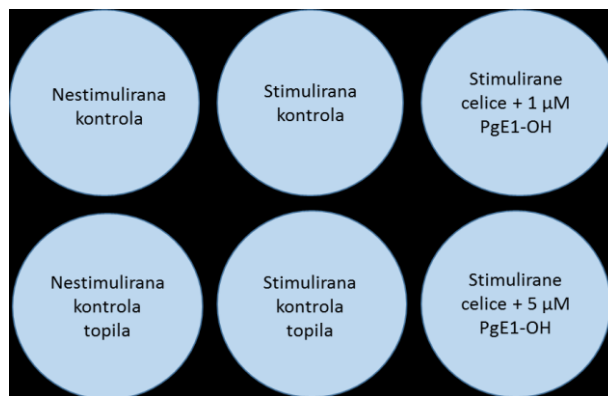
Metodo pretočne citometrije smo uporabili za analizo citokinov.

3.7.1 Analiza citokinov

Določali smo vpliv agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na proizvodnjo citokinov v celicah KLL in LCL. Ker celice v mirovanju izločajo malo citokinov, smo jih morali aktivirati z dodatkom stimulansov.

Priprava vzorcev za analizo citokinov:

Pripravili smo celično suspenzijo celic KLL oziroma LCL s koncentracijo 1×10^6 celic/ml. Po 0,5 ml suspenzije smo prenesli na ploščico za inkubacijo. Vzorce smo tretirali z $1 \mu\text{M}$ in $5 \mu\text{M}$ PgE1-OH ter inkubirali 1 h. Po 1 h smo vzorce in aktivirani kontroli celic in topila tretirali s stimulansi, kontroli topila (stimulirano in nestimulirano) pa smo tretirali z DMSO (Slika 6). Celice smo inkubirali 24 h.



Slika 6: Shema inkubacije celic pri pripravi vzorcev za analizo citokinov.

V prvi fazi smo uporabili različne stimulanse: anti IgM ($10 \mu\text{g/ml}$), lipopolisaharid ($1 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$) in ionomicin ($0.5 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{M}$, $1.5 \mu\text{M}$) in forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (3.33 ng/ml , 6.66 ng/ml in 10 ng/ml) ter določili najbolj ustreznega za nadaljnje delo. Za proučevanje imunomodulatornih lastnosti PgE1-OH smo uporabili $1.0 \mu\text{M}$ ionomicin in 6.66 ng/ml PMA.

Celicam smo za namene analize določili živost, kot je opisano v poglavju 3.4. Kot kontrolo smo uporabili aktivirano netretirano kontrolo. Za analizo citokinov s pretočnim citometrom je potrebna vsaj 80 % živost celic.

24 h po izpostavitvi stimulansom smo vzorce prenesli v epice in centrifugirali (1200 obr./min, 5 minut, 4 °C). Supernatant smo previdno prenesli v nove epice in jih shranili v zamrzovalnik (-80 °C).

Analiza citokinov:

Analizo sproščenih citokinov iz celic KLL in LCC smo izvedli s pretočnim citometrom. Pri tem smo uporabili komplet za analizo BD™ CBA (Cytometric Bead Array), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II.

Postopek analize:

- v temnem prostoru smo pripravili reagent za analizo, tako da smo zmešali enake količine protiteles, specifičnih za posamezne citokine: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α in IFN γ ;
- v vsako centrifugirko za pretočno citometrijo smo odpipetirali 10 μ l mešanice reagenta;
- dodali smo enak volumen vzorca in detekcijskega reagenta Human Th1/Th2 – II PE;
- inkubirali smo 3 h na sobni temperaturi, v temnem prostoru;
- v vsako centrifugirko za pretočno citometrijo smo dodali 200 μ l spiralnega pufra;
- centrifugirali smo (300 \times g, 5 minut) in odstranili supernatant;
- peleto smo resuspendirali z 200 μ l svežega spiralnega pufra;
- analizirali smo s pretočnim citometrom.

3.8 Biobanka

Tekom magistrskega dela smo višek celic KLL, LCL in PBMC, ki ga nismo potrebovali za analize, shranjevali v celično biobanko v zamrzovalnik (-80 °C). Te celice so nam na voljo za nadaljnje raziskave ter izvedbo potrditvenih študij.

3.8.1 Ostanek celic (peleta) po izolaciji limfocitov B

Pri postopku izolacije limfocitov B so se med centrifugiranjem eritrociti, granulociti, limfociti T in celice NK posedli na dno, pod plast fikola. Po izolaciji limfocitov B smo

previdno odstranili preostanek zgornje plasti in plast fikola, potem pa prenesli po 1 ml vzorca v 1,5 ml epice ter jih shranili v zamrzovalnik (-80 °C).

3.8.2 DNA

Celice KLL smo shranili tudi za namene izolacije DNA (večinoma $2 \times$ po 5 milijonov celic). Preračunan volumen suspenzije celic smo centrifugirali (1200 obr./min, 5 min). Odstranili smo jim medij ter jim dodali svež medij (500 μ l/ 5 mio celic) ter suspenzijo prenesli v epice. Sledilo je še eno centrifugiranje (1200 obr./min, 5 min). Celicam smo odvzeli medij in jih shranili v zamrzovalnik (-80 °C).

3.8.3 RNA

Preračunan volumen suspenzije celic KLL smo centrifugirali (1200 obr./min, 5min). Celicam smo odvzeli medij in jim dodali svež medij (300 μ l/ 3 mio celic) ter suspenzijo prenesli v epice ter ponovno centrifugirali (1200 obr./min, 5 min). Odstranili smo medij in dodali 500 μ l Trizola, premešali z vortexom ter shranili v zamrzovalnik (-80 °C).

3.8.4 Celice

Žive celice lahko za namene nadaljnjih analiz zamrznemo na zelo nizke temperature (-80 °C). Pri tem moramo mediju dodati krioprotektant, ki mora dobro prehajati v celico in ne sme biti preveč toksičen za celice. Največkrat se uporablja glicerol ali DMSO. Krioprotektant prepreči tvorbo ledu v celici in tako omogoči večje preživetje celic med zamrzovanjem (48).

Suspenzijo celic smo centrifugirali (1200 obr./min, 5 minut). Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v ustreznem mediju za zamrzovanje celic (1 ml/ 15 milijonov celic). Po 1 ml suspenzije smo prenesli v krioviale, jih za nekaj minut postavili na led, potem pa smo jih prenesli v FrostieBoy oziroma smo jih zavili v papirnate brisačke in dali v kartonsko škatlo ter jih shranili v zamrzovalnik (-80 °C), kjer so se celice postopoma ohlajale za 1 °C/minuto. Ko so krioviale zamrznile, smo jih prenesli iz opreme za zamrzovanje v škatle za shranjevanje.

3.9 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali s programoma Excel in GraphPad Prism. Statistično značilni so bili rezultati s $p < 0,05$. Izvedli smo parni t-test in test Kuskal-Wallis.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša vrsta levkemije v zahodnih državah. Mediana starosti ob pojavu je med 67 in 72 leti, pogostejša pa je pri moških. Kljub širokemu naboru različnih učinkovin za zdravljenje KLL je le-ta še zmeraj neozdravljiva bolezen (5).

Apoptoza in proliferacija limfocitov B sta regulirani z B-celičnim receptorjem (BCR). Ta se po vezavi antigena premreži in sproži različne signalne poti, ki prispevajo k proliferaciji zrelih limfocitov B ter k apoptozi nezrelih limfocitov B. Izstopa gen *Ptger4*, katerega izražanje je po aktivaciji BCR najbolj povečano tako v zrelih kot tudi v nezrelih limfocitih B (11). Gen *Ptger4* kodira prostaglandinski receptor E tip 4 (receptor EP4), enega od štirih vrst receptorjev za prostaglandin E2 (PGE2) (12).

Aktivacija receptorja EP4 posreduje citotoksične učinke na zrele in nezrele limfocite B preko inhibicije signalne poti jedrnega dejavnika kappa B (NF- κ B). Preživetje maligno spremenjenih celic bolnikov z levkemijo ali limfomom temelji na konstitutivni aktivaciji NF- κ B. Inhibicija te signalne poti pa vodi v apoptozo celic (15). Receptor EP4 tako predstavlja potencialno tarčo v terapiji B celičnih levkemij in limfomov.

4.1 Citotoksičnost agonista receptorja EP4 je koncentracijsko in časovno odvisna

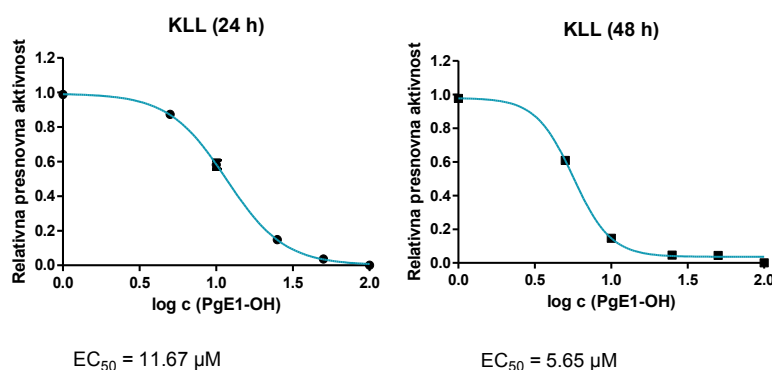
Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH) je močan agonist receptorja EP4. Uporabljen je bil *in vivo* v dvojno slepi študiji, v kateri so vrednotili njegove bronhodilatatorske lastnosti pri astmatikih. Bolniki so ga dobro prenašali, povzročil je le blage lokalne neželene učinke (35). V predhodni študiji so ugotovili, da aktivacija receptorja EP4 povzroči selektivno citotoksičnost za maligno spremenjene limfocite B. Agonist receptorja EP4, PgE1-OH, je vodil v časovno in koncentracijsko odvisno znižanje presnovne aktivnosti vseh preizkusnih B celičnih linij (15) ter celic KLL (49).

Pri iskanju novih modulatorjev apoptoze v celicah KLL smo najprej preverjali citotoksičnost agonista receptorja EP4, PgE1-OH. S tem namenom smo tekom študije št. 93/12/10 izolirali celice iz primarnih vzorcev bolnikov s KLL. Celice KLL smo izpostavili naraščajočim koncentracijam PgE1-OH za 24 h in 48 h in določili EC₅₀ vrednosti. Le-te smo določili na 126 vzorcih celic KLL. Nekateri bolniki so tekom študije ponovno darovali kri. Ker prihaja pri rakavih celicah do neprestanih novih mutacij, smo na teh vzorcih prav

tako določili EC_{50} vrednosti po inkubaciji s PgE1-OH. Celoten seznam določenih EC_{50} vrednosti se nahaja v Prilogi 1.

Povprečna starost in mediana starosti bolnikov, ki smo jim določili EC_{50} vrednosti, sta bili ob odvzemu vzorcev krvi 69 let. Med bolniki je bilo več moških kot žensk (razmerje moški:ženske je 1,34:1). Glede na podatke iz strokovne literature je populacija bolnikov, ki so bili vključeni v študijo, primerljiva z dejansko populacijo bolnikov s KLL, kjer je mediana starosti bolnikov ob pojavu bolezni med 67 in 72 leti, med obolelimi pa je več moških (razmerje moški:ženske je 1,7:1) (5).

Z EC_{50} vrednostmi, ki smo jih določili po inkubaciji s PgE1-OH, smo potrdili, da ima PgE1-OH **koncentracijsko odvisno citotoksično delovanje** (Slika 7). Na sliki sta grafa, ki prikazujeta relativno presnovno aktivnost celic KLL iz vzorca reprezentativnega bolnika po 24 h in 48 h inkubaciji z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH. Ostali grafi so v Prilogi 2.

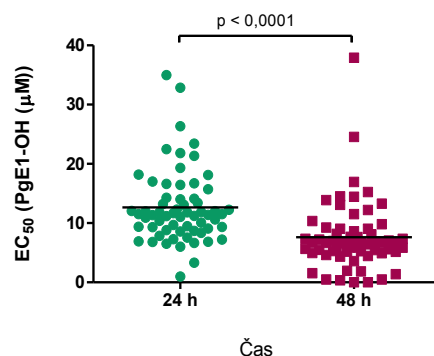


Slika 7: Koncentracijsko odvisnost citotoksičnih učinkov PgE1-OH.

PgE1-OH je po inkubaciji celic KLL (4×10^5 celic/ml) izkazoval koncentracijsko odvisno citotoksičnost. Na sliki sta grafa, ki prikazujeta relativno presnovno aktivnost celic KLL iz vzorca krvi reprezentativnega bolnika po 24 h in 48 h inkubaciji z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M in 50 μ M). Presnovno aktivnost celic smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelkah.

Analiza EC_{50} vrednosti po inkubaciji s PgE1-OH je pokazala, da je citotoksični učinek PgE1-OH tudi **časovno odvisen**. Kot prikazuje Slika 8, se EC_{50} vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji celic 63 bolnikov, ki smo jih določili tekom magistrskega dela, značilno razlikujejo ($p < 0,0001$). Povprečna EC_{50} po 24 h inkubaciji je 12,31 μ M, medtem ko je EC_{50} po 48 h inkubaciji 7,67 μ M (Preglednica VIII). Citotoksični učinek PgE1-OH je po 48 h inkubaciji višji kot po 24 h inkubaciji, kar lahko kaže na to, da ga celice KLL pri

daljši inkubaciji ne presnavljajo in s tem ne zavirajo njegovega učinka. Lahko pa pride tudi do zamika učinka zaradi aktivacije več različnih signalnih poti.



Slika 8: Časovna odvisnost citotoksičnih učinkov PgE1-OH.

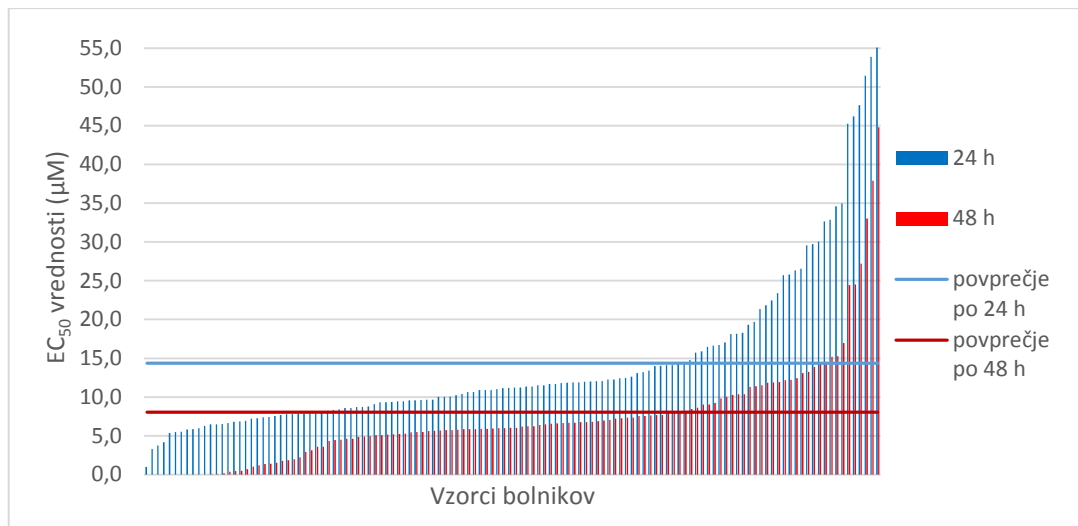
EC₅₀ vrednosti 63 bolnikov, ki smo jih določili po 24 h in 48 h inkubaciji celic KLL (4×10^5 celic/ml) z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM), se značilno razlikujejo ($p < 0,0001$). Presnovno aktivnost celic po inkubaciji smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Podatki so bili statistično obdelani s parnim t-testom.

EC₅₀ vrednosti smo primerjali tudi s predhodnimi raziskavami in potrdili primerljivost rezultatov. Preglednica VIII prikazuje primerjavo povprečja in median EC₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji s PgE1-OH.

Preglednica VIII: Povprečne EC₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji celic KLL s PgE1-OH.

Čas	1. del študije (49)		2. del študije		Združeni podatki	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Št. vzorcev	51	51	75	64	126	115
Povprečna EC ₅₀	17,34 µM	8,51 µM	12,31 µM	7,67 µM	14,35 µM	8,04 µM
Mediana EC ₅₀	10,91 µM	6,20 µM	11,24 µM	6,67 µM	11,21 µM	6,49 µM

Analiza podatkov kaže na **veliko inter-individualno raznolikost** celic KLL v odzivu na PgE1-OH. Slika 9 prikazuje EC₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji s PgE1-OH, prikazane v naraščajočem vrstnem redu. Celice bolnikov s KLL so bile različno občutljive na PgE1-OH. Med seboj smo primerjali povprečje zgornjih in spodnjih 10 % EC₅₀ vrednosti. Po 24 h inkubaciji je bilo razmerje med povprečjem zgornjih in spodnjih 10 % EC₅₀ vrednosti 7,99 (40,30 µM v primerjavi s 5,04 µM). Po 48 h inkubaciji je bilo razmerje med povprečjem zgornjih in spodnjih 10 % EC₅₀ vrednosti večje kot po 24 h inkubaciji, in sicer 32,18 (32,52 µM v primerjavi z 0,73 µM).



Slika 9: Inter-individualna raznolikost celic KLL v odzivu na PgE1-OH.

EC₅₀ vrednosti, ki smo jih dobili po 24 h in 48 h inkubaciji celic KLL (4×10^5 celic/ml) z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM). Presnovno aktivnost celic po inkubaciji smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Modra barva stolpcev predstavlja EC₅₀ vrednosti določene na 126 vzorcih po 24 h inkubaciji s PgE1-OH. Rdeča barva stolpcev pa predstavlja EC₅₀ vrednosti določene na 115 vzorcih po 48 h inkubaciji s PgE1-OH. Modra in rdeča črta na grafu predstavljata povprečje EC₅₀ vrednosti.

4.2 PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice KLL

Tumorsko mikro-okolje in različni citokini imajo pomembno vlogo v razvoju KLL. Maligne B celice se upirajo apoptozi preko manipulacije celic v svojem mikro-okolju, npr. makrofagov, endotelijskih in imunskih celic, ter preko lastne produkcije in sekrecije citokinov preživetja (19). Makrofagi v mikro-okolju celic KLL izločajo citokine, kot so IL-1, IL-6, IL-8 in TNF- α , kar lahko vodi v konstitutivno aktivacijo jedrnega dejavnika kappa B (NF- κ B) ter v povečano nastajanje antiapoptotičnih proteinov (14), npr. Bcl-2 (50). Limfociti T v mikro-okolju celic KLL sintetizirajo IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF in IFN γ (51). Nekateri citokini so povezani s progresijo KLL. Vrednosti TNF- α so namreč zlasti visoke pri poznejših stadijih KLL (52).

Aktivacija receptorja EP4 prepreči aktivacijo NF- κ B (15). V predhodni študiji so ocenili imunomodulatorno vlogo agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na limfoblastoidnih celicah (celicah LCL) (49), pridobljenih iz krvi zdravih darovalcev. Celice LCL predstavljajo dober *in vitro* model testiranja imunomodulatornih spojin. V mirovanju izločajo malo citokinov, zato so jih aktivirali s kombinacijo 0,5 µM ionomicina in 3,33 ng/ml forbol 12-miristat 13-acetata (PMA), kar je povzročilo značilno povišanje izločanja IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α in IFN γ v vseh testiranih celicah LCL (53). Po predhodni inkubaciji aktiviranih celic LCL s PgE1-OH so opazili značilno znižano izločanje provnetnega

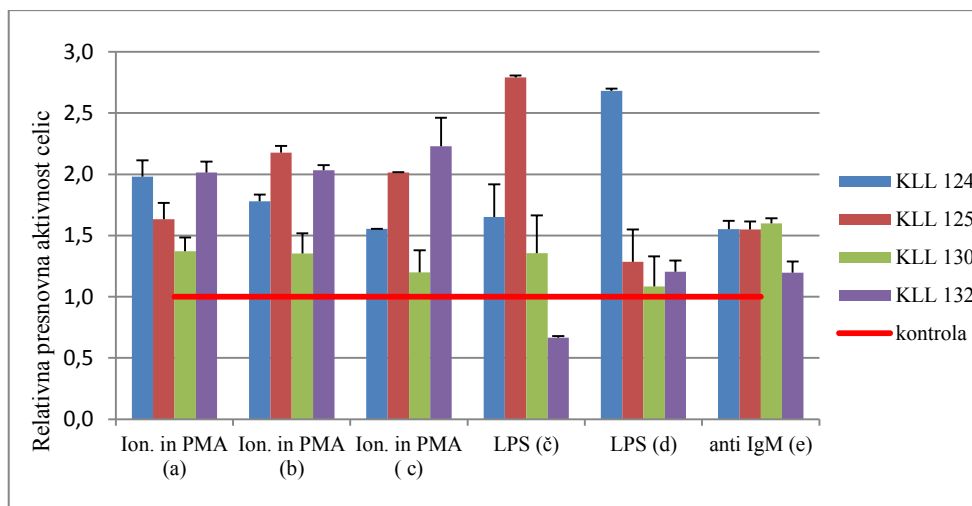
citokina TNF- α in imunoregulatornih citokinov IL-2, IL-10 in IFN- γ ter povišano izločanje provnetnega citokina IL-6 (49). Slednji lahko aktivira pozitivno povratno zanko, ki vodi v povečano koncentracijo PGE2 v mikro-okolju limfocitov B, kar povzroči apoptozo malignih celic B (45, 49).

4.2.1 Aktivacija celic KLL poveča njihovo metabolno aktivnost in sproščanje citokinov

Zanimalo nas je, ali PGE1-OH vpliva tudi na sproščanje citokinov iz celic KLL. Ker celice *in vitro* izločajo malo citokinov, smo jih najprej aktivirali. Izvedli smo preliminarno študijo na vzorcih 4 bolnikov, v kateri smo primerjali različne stimulanse limfocitov B, in sicer: **ionomicin in PMA** v treh kombinacijah (a) 0,5 μ M in 3,33 ng/ml, (b) 1,0 μ M in 6,66 ng/ml ter (c) 1,5 μ M in 10 ng/ml, **lipopolisaharid (LPS)** v dveh koncentracijah (č) 1 μ g/ml in (d) 0,1 μ g/ml ter **anti IgM** v koncentraciji (e) 10 μ g/ml.

Izbrani stimulanse celice aktivirajo na različne načine. Ionomycin in PMA stimulirata aktivacijo celic KLL s posnemanjem biokemijskega učinka vezave antigena na B-celični receptor (BCR) (54). Ionomycin povzroči dvig znotrajceličnega kalcija, medtem ko PMA inducira aktivacijo protein kinaze A (PKA) (55). LPS je polisaharid bakterijske celične stene, ki v limfocitih B sproži TLR4 signaliziranje (56). Anti IgM pa se veže na BCR na površini limfocitov B (57).

Pri metodi merjenja sproščanja citokinov vedno določamo tudi presnovno aktivnost celic. Analiza rezultatov preliminarne študije na vzorcih štirih bolnikov je pokazala, da je bila **presnovna aktivnost celic** po 24 h izpostavitvi testiranim stimulansom povečana, glede na nestimulirano kontrolo pri vseh štirih vzorcih, z izjemo enega vzorca pri nižji koncentraciji LPS (Slika 10). Opazili smo tudi inter-individualno raznolikost v občutljivosti celic KLL na različne testirane stimulanse.



Slika 10: Vpliv različnih stimulansov na povečanje presovne aktivnosti celic KLL.

Celice KLL (1×10^6 celic/ml) smo tretirali z različnimi stimulansi: ionomicinom in PMA v treh kombinacijah: (a) $0,5 \mu\text{M}$ in $3,33 \text{ ng/ml}$, (b) $1,0 \mu\text{M}$ in $6,66 \text{ ng/ml}$ in (c) $1,5 \mu\text{M}$ in 10 ng/ml , LPS v dveh koncentracijah (č) $1 \mu\text{g/ml}$ in (d) $0,1 \mu\text{g/ml}$ ter anti IgM v koncentraciji (e) $10 \mu\text{g/ml}$ ter jih inkubirali 24 h. Vrednosti so normalizirane na nestimulirano kontrolo.

Kot prikazuje Preglednica IX, je relativno presovno aktivnost celic KLL najbolj povečala kombinacija ionomicina in PMA v srednji koncentraciji (b), najmanj pa anti IgM (e).

Preglednica IX: Relativna presovna aktivnost celic KLL po inkubaciji s stimulansi

	Ionomicin in PMA (a)	Ionomicin in PMA (b)	Ionomicin in PMA (c)	LPS (č)	LPS (d)	anti IgM (e)
Razpon	1,37 - 2,02	1,35 - 2,18	1,20 - 2,23	0,67 - 2,79	1,20 - 2,68	1,20 - 1,60
Povprečje	1,75	1,83	1,75	1,62	1,56	1,47

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da aktivacija celic s stimulansi poveča njihovo presovno aktivnost. To nam omogoča njihovo gojenje *in vitro* in tako večjo dostopnost za nadaljnje raziskave. Celice KLL se namreč *in vitro* ne delijo, za izvedbo raziskav tako potrebujemo sveže izolirane celice KLL ali pa odmrznjene celice iz biobanke. Dejstvo, da se presovna aktivnost celic po inkubaciji z navedenimi stimulansi poveča, nam tako odpira nove možnosti za nadaljnje raziskave.

Nadalje smo preverili, ali dodatek stimulansov poveča **izločanje provnetnih citokinov** iz celic KLL. Zato smo v preliminarni študiji na štirih vzorcih na pretočnem citometru s kompletom BDTM Cytometric Bead Array (CBA), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II pomerili sproščanje citokinov v medij. Merili smo sproščanje provnetnih citokinov TNF- α in IL-6 in imunoregulatornih citokinov IL-2, IL-4, IL-10 in IFN- γ .

Iz analiziranih podatkov preliminarne študije je razvidno, da izbrani stimulansi na celicah KLL vplivajo le na izločanje IL-2, IL-6 in TNF- α , ne vplivajo pa na izločanje IL-4, IL-10 in IFN γ . Tudi tu se je pokazala inter-individualna raznolikost celic KLL, saj so celice po stimulaciji izločale različne količine citokinov. Preglednica X prikazuje izločanje TNF- α , IL-2 in IL-6 iz aktiviranih celic KLL glede na nestimulirano kontrolo. Anti IgM pri nobenem od 4 vzorcev ni značilno vplival na izločanje izbranih citokinov. LPS je imel največji vpliv na sproščanje IL-6, ki ga je v obeh izbranih koncentracijah povečal v 3 od 4 vzorcev. Ionomycin in PMA sta v vseh koncentracijah značilno povečala izločanje IL-2 v dveh od štirih vzorcev in izločanje TNF- α v vseh štirih vzorcih.

Preglednica X: Sproščanje TNF- α , IL-2 in IL-6 iz stimuliranih celic KLL

	Ionomycin in PMA (a)	Ionomycin in PMA (b)	Ionomycin in PMA (c)	LPS (č)	LPS (d)	anti IgM (e)
TNF- α	9,3 – 646,8 pg/ml	16,0 – 1742,5 pg/ml	12,5 – 1533,9 pg/ml	3,3 – 3,8 pg/ml	3,5 – 3,7 pg/ml	/
IL-2	4,1 – 25,2 pg/ml	4,0 – 143,9 pg/ml	4,0 – 78,2 pg/ml	/	/	/
IL-6	/	/	/	4,4 – 22,9 pg/ml	3,8 – 9,0 pg/ml	/

Med uporabljenimi stimulansi je kombinacija 1,0 μ M ionomicina in 6,66 ng/ml PMA najbolj povišala sproščanje TNF- α in IL-2 iz celic KLL, zato smo jo uporabili za vrednotenje imunomodulatornega delovanja PgE1-OH.

4.2.2 PgE1-OH modulira izločanje TNF- α in IL-2 v celicah KLL

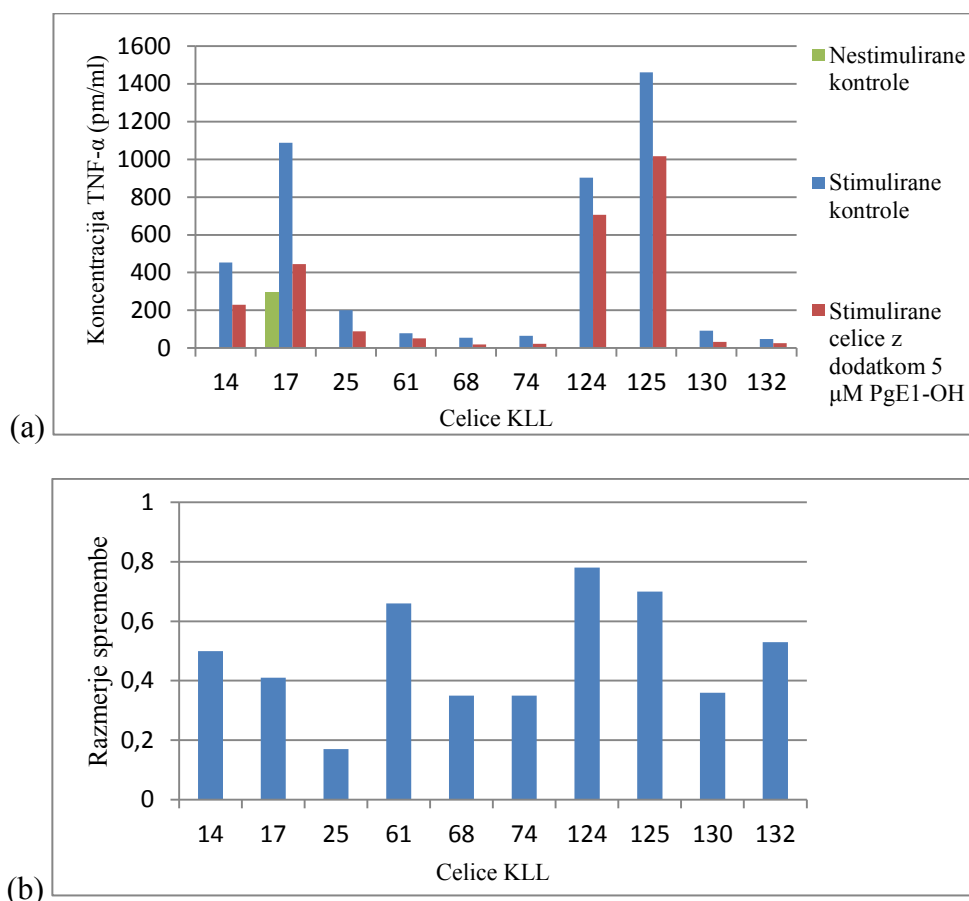
Da bi preverili vpliv PgE1-OH na izločanje citokinov iz celic KLL, smo celice 10 naključno izbranih bolnikov s KLL predhodno inkubirali s PgE1-OH in jih nato stimulirali z 1 μ M ionomicinom in 6,66 ng/ml PMA. Za vrednotenje imunomodulatornega delovanja PgE1-OH smo izbrali koncentraciji 1 μ M in 5 μ M (viabilnost > 80 %). Nato pa smo na pretočnem citometru s kompletom BDTM Cytometric Bead Array (CBA), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II pomerili sproščanje citokinov v medij.

5 μ M PgE1-OH je značilno znižal izločanje TNF- α iz celic KLL

Najprej smo preverili, ali nestimulirane celice KLL v katerem izmed 10 vzorcev *in vitro* izločajo TNF- α . Meritve koncentracije TNF- α smo izvedli po 24 h inkubaciji v mediju. Analiza rezultatov je pokazala, da so bile vrednosti TNF- α *in vitro* v 9 od 10 vzorcev pod

mejo detekcije (2,8 pg/ml), v enem vzorcu (KLL 17) pa smo izmerili koncentracijo 292,1 pg/ml.

Zanimalo nas je, ali PgE1-OH vpliva na sproščanje TNF- α iz celic KLL. Da bi čim boljše posnemali pogoje *in vivo*, smo celice aktivirali z 1 μ M ionomicinom in 6,66 ng/ml PMA. Izločanje TNF- α se je glede na nestimulirano kontrolo povečalo v vseh 10 vzorcih. Opazili smo inter-individualne razlike v izločanju TNF- α iz stimuliranih celic KLL (19,1-1015,8 pg/ml). Izpostavitvev 5 μ M PgE1-OH je pri vseh 10 vzorcih celic KLL povzročila zmanjšanje izločanja TNF- α iz celic, stimuliranih z ionomicinom in PMA. Slika 11(a) prikazuje koncentracije TNF- α , sproščenega iz nestimuliranih celic KLL in iz stimuliranih celic KLL pred in po dodatku 5 μ M PgE1-OH. Slika 11(b) pa prikazuje deleže izločenega TNF- α iz stimuliranih celic 10 bolnikov s KLL po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH glede na stimulirano kontrolo. Izločanje TNF- α iz stimuliranih celic je bilo po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH od 35 do 78 % glede na stimulirano kontrolo.



Slika 11: 5 μ M PgE1-OH zmanjša izločanje TNF- α iz stimuliranih celic KLL.

Slika prikazuje zmanjšanje izločanja TNF- α iz stimuliranih celic KLL 10 bolnikov (1×10^6 celic/ml) po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH. Celice KLL smo predhodno tretirali s 5 μ M PgE1-OH, po 1 h pa smo jih stimulirali z 1,0 μ M ionomicinom in 6,66 ng/ml PMA in inkubirali 24 h. Na sliki (a) je z zeleno barvo

prikazana koncentracija TNF- α v nestimulirani kontroli, z modro barvo je prikazana koncentracija TNF- α v stimulirani kontroli, z rdečo barvo pa koncentracija TNF- α po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH. Vrednosti na sliki (b) so izražene kot razmerje spremembe relativno glede na stimulirano kontrolo.

TNF- α je citokin, ki posreduje pleiotropne biološke učinke. Pri bolnikih s KLL nastaja v malignih limfocitih B in deluje kot avtokrini in parakrini rastni faktor ter tako poveča njihovo proliferacijo in preživetje (58). Pri bolnikih s KLL so prisotne višje serumske koncentracije TNF- α (59), ki lahko izvirajo iz kлона malignih limfocitov B (58-60) ali pa iz limfocitov T v njihovem mikro-okolju (59). V študiji, v kateri so izmerili koncentracijo TNF- α v serumu 150 bolnikov, so bile povprečne vrednosti značilno višje kot pri zdravi populaciji. Višja koncentracija TNF- α v serumu je bila povezana z višjo ekspresijo prognostičnih markerjev in krajšim preživetjem bolnikov. TNF- α tako lahko služi kot prognostični faktor pri bolnikih s KLL, inhibicija TNF- α pa ima terapevtski potencial (58). Opisan je bil primer bolnika z luskavico v plakih in sočasno KLL, pri katerem v 3-letnem obdobju zdravljenja luskavice z dvema zaviralcema TNF- α (etanerceptom in infliksimabom) ni prišlo do sprememb v številu limfocitov, kar lahko potrjuje hipotezo o vpletenosti TNF- α v progresijo KLL (61). Med novimi imunomodulatornimi učinkovinami, ki jih preizkušajo za zdravljenje KLL, je tudi lenalidomid, ki zavira produkcijo TNF- α (19). Zmanjšanje izločanja TNF- α iz limfocitov B po inkubaciji s PgE1-OH je lahko posledica inhibicije jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B (15) in predstavlja dobro izhodišče za terapijo.

5 μ M PgE1-OH je znižal izločanje IL-2 iz aktiviranih celic KLL

Zanimalo nas je, ali PgE1-OH vpliva na sproščanje IL-2 iz stimuliranih celic KLL. Celice KLL smo aktivirali z 1 μ M ionomicinom in 6,66 ng/ml PMA, kar je vodilo v povečano izločanje IL-2 iz stimuliranih celic KLL 2 od 10 bolnikov. Kot prikazuje Preglednica XI, je prišlo po inkubaciji s PgE1-OH do zmanjšanja izločanja IL-2 iz stimuliranih celic KLL teh dveh bolnikov, in sicer po inkubaciji z 1 μ M PgE1-OH na povprečno 55 %, po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH pa na povprečno 29 % glede na stimulirano kontrolo.

Preglednica XI: Zmanjšano izločanje IL-2 iz celic KLL po inkubaciji s PgE1-OH.

Koncentracija IL-2 v stimulirani kontroli (pg/ml)		Konc. IL-2 po dodatku 1 μ M PgE1-OH (pg/ml)		Konc. IL-2 po dodatku 5 μ M PgE1-OH (pg/ml)	
Absolutno	Relativno	Absolutno	Relativno	Absolutno	Relativno
137,2	100 %	87,8	64 %	63,4	46 %
28,1	100 %	13,2	47 %	3,3	12 %
Povprečje deležev	100 %	55 %		29 %	

Ti rezultati so v skladu s predhodnimi raziskavami, kjer je PgE1-OH povzročil zmanjšanje izločanja IL-2 iz stimuliranih celic LCL (49). Izražanje IL-2 je uravnava tudi s transkripcijskim dejavnikom NF- κ B (23), le-ta pa je po inkubaciji s PgE1-OH inhibiran, kar je lahko vzrok za znižano izločanje IL-2 po inkubaciji s PgE1-OH (15).

IL-2 je citokin, ki posreduje antiapoptotični učinek na celice KLL (62). Deluje tudi kot rastni faktor nekaterih celic KLL (21). Njegove znotrajcelične koncentracije so značilno višje pri limfocitih T bolnikov s KLL kot pri limfocitih T zdravih darovalcev (51). Zmanjšanje izločanja IL-2 iz limfocitov B po izpostavitvi PgE1-OH je pozitivno s stališča imunomodulacije mikro-okolja KLL.

PgE1-OH ni vplival na izločanje IL-6 v celicah KLL

IL-6 je dejavnik, ki nadzira rast in diferenciacijo limfocitov B (63), vpliva pa tudi na njihovo preživetje in zorenje (64). Serumska koncentracija IL-6 je pri bolnikih s KLL povišana, povezana pa je s kliničnim stanjem in preživetjem (65). Bolniki z nižjimi plazemskimi koncentracijami IL-6 imajo daljše preživetje kot bolniki z višjimi plazemskimi koncentracijami IL-6. Pacienti z napredovalo boleznijo (Rai III ali IV) pa imajo značilno višje plazemske nivoje IL-6 kot zdravi darovalci (63). Zanimalo nas je, ali PgE1-OH vpliva na izločanje IL-6 iz stimuliranih celic KLL.

Celice KLL smo stimulirali z 1 μ M ionomicinom in 6,66 ng/ml PMA. Koncentracijo IL-6 smo lahko določili na 5 od 10 stimuliranih vzorcev, pri katerih je bila koncentracija IL-6 nad mejo zaznave (3,0 pg/ml). PgE1-OH v teh 5 vzorcih celic KLL ni povzročil značilnega vpliva na sproščanje IL-6. Po inkubaciji z 1 μ M PgE1-OH je bilo izločanje IL-6 iz stimuliranih celic 91 %, po inkubaciji s 5 μ M PgE1-OH pa 89 % v primerjavi s stimulirano kontrolo.

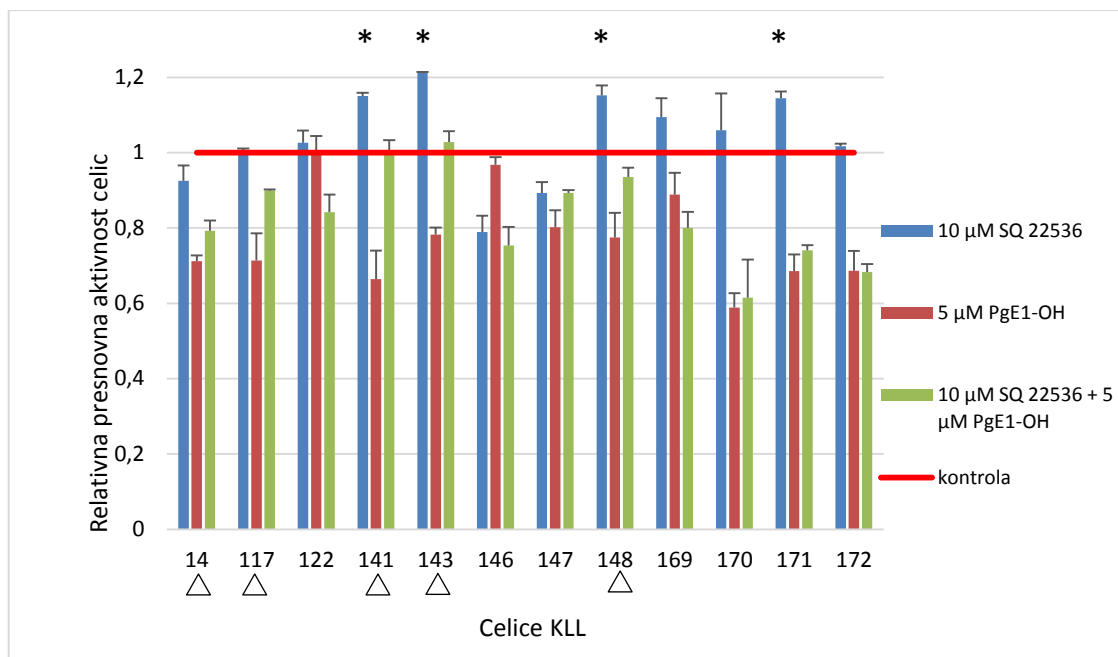
4.3 PgE1-OH v celicah KLL posreduje citotoksične učinke tudi preko cAMP

Aktivacija receptorja EP4 na celicah KLL aktivira adenilat ciklazo (AC) in poveča koncentracijo znotrajceličnega cAMP, ta pa sproži signalne poti, ki vodijo v ustavitev rasti in apoptozo celic KLL. V celicah KLL je v primerjavi s celicami PBMC manj cAMP, protein kinaza A (PKA) pa je manj aktivna, kar kaže na spremembe v nastajanju oziroma razgradnji cAMP pri KLL (16). Domneva se, da je zmanjšana koncentracija cAMP pri KLL tudi posledica povišane razgradnje preko fosfodiesteraz (PDE) (14). Zanimalo nas je, ali so citotoksični učinki PgE1-OH v celicah KLL posredovani preko aktivacije AC.

Da bi ovrednotili vpletenost AC v citotoksično delovanje PgE1-OH, smo celice KLL dvanajstih naključno izbranih bolnikov pred-tretirali z inhibitorjem AC, SQ 22536, po 1 h pa tretirali s PgE1-OH in inkubirali 24 h oz. 48 h ter jim določili presnovno aktivnost.

Slika 12 prikazuje relativno presnovno aktivnost celic KLL dvanajstih bolnikov po 24 h inkubaciji z 10 μM SQ 22536, 5 μM PgE1-OH oziroma s kombinacijo obeh. V odzivu celic KLL na spojine smo opazili inter-individualne razlike, kar je v skladu z dejstvom, da je KLL izrazito heterogena bolezen.

Inhibicija AC je na celicah KLL štirih od dvanajstih bolnikov vodila v značilno povečano presnovno aktivnost glede na kontrolo (Slika 12, označeno z *). Na celicah petih od osmih bolnikov s KLL (Slika 12, označeni s Δ), na katerih je 5 μM PgE1-OH posredoval citotoksični učinek (živost < 80 %), je predhodna inkubacija celic KLL s SQ 22536 značilno zavrlo citotoksične učinke 5 μM PgE1-OH. Vloga AC pri prenosu EP4-posredovanega signala s PgE1-OH je vidna iz rezultatov inkubacije celic KLL z inhibitorjem AC SQ 22536 po 24 h. PgE1-OH je posredoval citotoksični učinek preko aktivacije AC in posledičnega povišanja cAMP, pri daljši inkubaciji (48 h) pa so prevladali drugi učinki (Priloga 3).



Slika 12: Vpliv SQ 22536 na modulacijo delovanja PgE1-OH po 24 h inkubaciji.

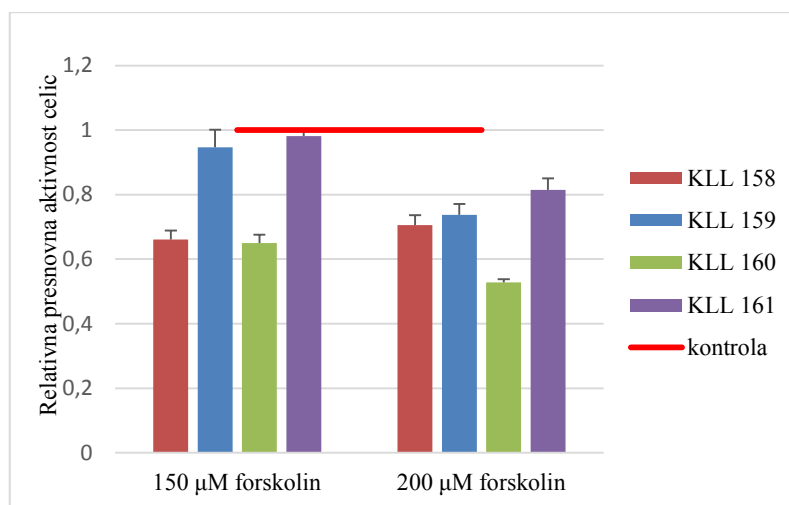
Inhibitor AC, SQ 22536, je na petih od dvanajstih vzorcev celic KLL značilno zmanjšal citotoksične učinke agonista receptorja EP4, PgE1-OH, po 24 h inkubaciji (oznaka Δ). Slika prikazuje relativno presnovno aktivnost celic KLL (4×10^5 celic/ml) po inkubaciji z $10 \mu\text{M}$ SQ 22536 in $5 \mu\text{M}$ PgE1-OH brez ali s predhodnim dodatkom $10 \mu\text{M}$ SQ 22536. Presnovno aktivnost smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelkah. Rezultati so bili statistično obdelani s testom ANOVA. * označuje značilno povišano presnovno aktivnost celic po inkubaciji s SQ 22536.

Da bi nadalje ovrednotili vpletenost adenilat ciklaze (AC) v citotoksično delovanje PgE1-OH, smo celice KLL tretirali s forskolinom, pridobljenim iz indijske rastline *Coleus forskohlii*. Forskolin je močan aktivator AC in biosinteze cAMP (66). Odgovor na forskolin je močno odvisen od aktivacije AC s heterodimernim G proteinom Gs (67).

Tekom magistrske naloge smo celice KLL štirih naključno izbranih bolnikov tretirali z naraščajočimi koncentracijami aktivatorja AC, forskolina, in opazovali spreminjanje presnovne aktivnosti celic KLL po 24 h in 48 h inkubaciji.

Analiza naših rezultatov je pokazala, da je inkubacija celic KLL s forskolinom povzročila znižanje relativne presnovne aktivnosti celic KLL. Celice KLL so bile na forskolin različno občutljive. Slika 13 prikazuje, da se je dvema vzorcema (KLL 158, 160) relativna presnovna aktivnost značilno znižala že pri $150 \mu\text{M}$ koncentraciji, in sicer za približno 35 %. Povprečna relativna presnovna aktivnost celic štirih bolnikov s KLL (KLL 158-161) je bila po inkubaciji s $150 \mu\text{M}$ forskolinom 80,9 %. Po inkubaciji celic KLL z $200 \mu\text{M}$ forskolinom pa je bila presnovna aktivnost celic 69,6 % v primerjavi z netretirano

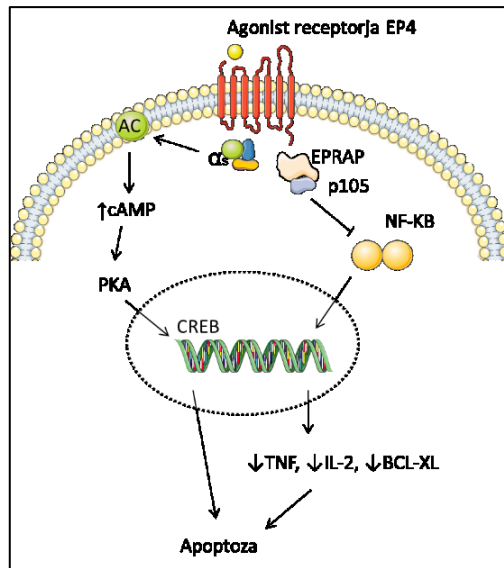
kontrolno. Pri dveh vzorcih, ki sta bila neodzivna na 150 μM forskolin, je morda prisotna povečana aktivnost PDE, ki pri nižjih koncentracijah forskolina uspejo razgraditi dodatno nastali cAMP.



Slika 13: Vpliv aktivatorja adenilat ciklaze na presovno aktivnost celic KLL.

Slika prikazuje znižanje presovne aktivnosti celic KLL (4×10^5 celic/ml) po 24 h inkubaciji s 150 in 200 μM aktivatorjem AC, forskolinom. Presovno aktivnost celic smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelakah.

Agonist receptorja EP4 lahko po vezavi na receptor EP4 na površini celic KLL sproži več različnih signalnih poti. Kot prikazuje Slika 14 lahko PgE1-OH aktivira G α s protein, ki vodi v aktivacijo AC in posledično povišanje koncentracije cAMP. Ta aktivira PKA, ki preko CREB sproži apoptozo celic. Druga pot delovanja je preko EPRA. Ta stabilizira p105 podenoto NF- κ B, kar onemogoči njegovo aktivacijo in posledično prepisovanje genov za provnetne citokine in antiapoptotični protein Bcl-xL (12, 15). Manjše izločanje preživetvenih citokinov in antiapoptotičnih proteinov vodi v apoptozo celic KLL. Med citokini, katerih izražanje je regulirano s transkripcijskim dejavnikom NF- κ B, sta tudi IL-2 (23) in TNF- α (24).



Slika 14: Mehanizem delovanja agonista receptorja EP4. Povzeto po (68).

Agonist receptorja EP4 deluje preko več signalnih poti. Preko Gas proteina aktivira AC, kar vodi v povišanje koncentracije cAMP. Ta aktivira PKA, ki preko CREB sproži apoptozo celic. Druga pot delovanja je preko EPRAP. Ta stabilizira p105 podenoto NF- κ B in tako onemogoči njegovo aktivacijo in posledično prepisovanje genov za protivnetna citokina TNF- α in IL-2 in antiapoptotični protein Bcl-xL.

Analiza naših rezultatov je potrdila vpletenost signalnih poti preko NF- κ B in AC v citotoksično delovanje PgE1-OH (Slika 14). Pri celicah bolnikov s KLL smo opazili inter-individualne razlike v vpletenosti obeh signalnih poti delovanja PgE1-OH, kar je v skladu z dejstvom, da je KLL izredno heterogena bolezen. Inhibicija AC je vodila v zmanjšanje citotoksičnega učinka PgE1-OH na celicah KLL nekaterih bolnikov. Vezava PgE1-OH na receptor EP4 pa je povzročila zmanjšanje izločanja TNF- α in IL-2 iz stimuliranih celic, iz česar smo sklepali, da je najverjetneje prišlo do zmanjšane aktivnosti transkripcijskega dejavnika za TNF- α in IL-2, NF- κ B. V predhodni študiji so namreč z imunoblot analizo prekurzorjev in inhibitornih molekul NF- κ B ugotovili, da je pot NF- κ B inhibirana po inkubaciji s PgE1-OH (15). NF- κ B je pri KLL pogosto konstitutivno aktivirana in vodi v pojav rezistence na zdravljenje (15). Receptor EP4 tako zaradi povezave s signalno potjo NF- κ B predstavlja zanimivo tarčo v terapiji KLL.

4.4 PgE1-OH deluje selektivno na celice KLL

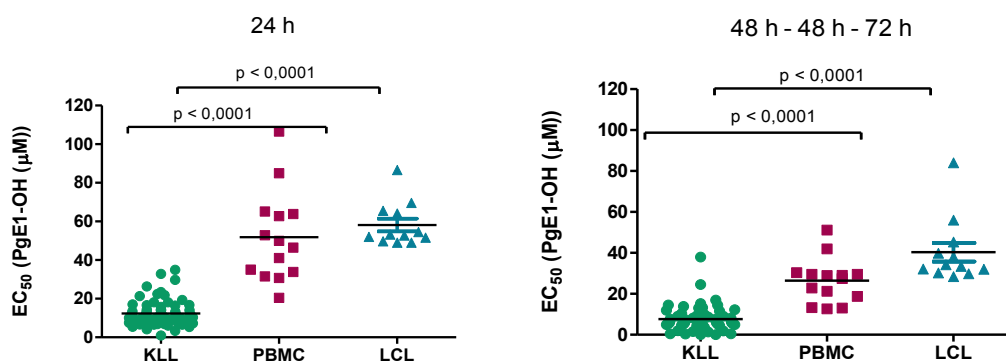
V predhodnih študijah je PgE1-OH *in vitro* izkazal selektivnost za B celične linije (Ramos, MHH-PRE B, NALM-6 in KOPN-8), saj ni posredoval citotoksičnega učinka na T celične linije (MOLT-4, Jurkat) in mieloidne celične linije (THP-1, U937) (15). Selektiven je bil tudi za celice KLL v primerjavi z limfoblastoidnimi celičnimi linijami (celicami LCL) (49). Celice LCL so limfociti B, pridobljeni iz krvi zdravih darovalcev in transformirani z

Eppstein-Barr virusom. Ohranjeno imajo večino lastnosti limfocitov B, njihova prednost pa je, da so nesmrtni (40).

Zanimalo nas je, ali PgE1-OH deluje selektivno na celice KLL v primerjavi s perifernimi krvnimi mononuklearnimi celicami (celicami PBMC). Gre za celice z okroglim nezažetim jedrom, ki ne vsebuje granul. Pridobivamo jih iz polne krvi zdravih darovalcev in *in vitro* dobro oponašajo *in vivo* pogoje (39). Potrditi smo želeli tudi selektivnost v primerjavi s celicami LCL na večjem številu celičnih linij. Celice PBMC in LCL smo zato za 24 h in 48 h oz. 72 h izpostavili naraščajočim koncentracijam PgE1-OH, nato pa določili EC_{50} vrednosti.

Ugotovili smo, da PgE1-OH tudi na celicah PBMC in LCL izkazuje časovno in koncentracijsko odvisno citotoksičnost (Priloge 6-9). Celoten seznam določenih EC_{50} vrednosti za celice PBMC se nahaja v Prilogi 4. EC_{50} vrednosti, določene na celicah LCL, smo primerjali tudi s predhodnimi raziskavami (69) in potrdili primerljivost rezultatov (Priloga 5).

Analiza EC_{50} vrednosti je pokazala, da je PgE1-OH selektivno citotoksičen na malignih celicah (KLL) v primerjavi s celicami zdravih darovalcev (LCL in PBMC), saj se EC_{50} vrednosti (Slika 15) značilno razlikujejo ($p < 0,0001$).



Slika 15: Selektivna citotoksičnost PgE1-OH za celice KLL v primerjavi s celicami PBMC in LCL.

EC_{50} vrednosti, ki smo jih dobili po 24 h ter po 48 oz. 72 h inkubaciji celic KLL, PBMC (oboje 4×10^5 celic/ml) in LCL (3×10^5 celic/ml) z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) se značilno razlikujejo ($p < 0,0001$). Presnovno aktivnost celic smo določali z reagentom PrestoBlue (KLL in PBMC) in MTS (LCL). Vrednosti so normalizirane na kontrolo topila (0,2 % DMSO).

Za statistično analizo podatkov smo uporabili Kruskal-Wallis test.

Naše podatke smo združili s podatki pridobljenimi v predhodnih raziskavah (Preglednica XII) in potrdili selektivno citotoksično delovanje za celice KLL v primerjavi s celicami PBMC in LCL na večjem številu vzorcev.

Preglednica XII: EC₅₀ vrednosti po inkubaciji celic KLL, PBMC in LCL s PgE1-OH.

	24 h	24 h	24 h	48 h	48 h	72 h
Celice	KLL	PBMC	LCL	KLL	PBMC	LCL
Št. vzorcev	126	14	22	115	14	22
Povprečna EC ₅₀	14,35 µM	51,80 µM	50,02 µM	8,04 µM	26,41 µM	34,61 µM
Mediana EC ₅₀	11,21 µM	48,21 µM	52,02 µM	6,49 µM	28,19 µM	31,39 µM

Selektivno citotoksično delovanje PgE1-OH na celice KLL v primerjavi s celicami LCL bi lahko bilo povezano z ekspresijo receptorja EP4, ki je na celicah LCL manjša v primerjavi s celicami KLL (49). Vzrok za selektivno citotoksičnost bi lahko bila tudi različna aktivnost signalne poti NF-κB, preko katere PgE1-OH posreduje svoj citotoksični učinek. Ta je pri malignih celicah pogosto konstitutivno aktivirana, kar lahko vodi v večji citotoksični učinek PgE1-OH.

Tudi pri celicah PBMC bi lahko, kot pri celicah LCL, manjši učinek PgE1-OH povezali z manjšo aktivnostjo poti NF-κB. Citotoksični učinek PgE1-OH pa bi lahko bil posredovan preko signalne poti AC. Najverjetnejši vzrok pa je v sestavi celične kulture PBMC. Mednje namreč spadajo v glavnem limfociti T (45-70 %), sledijo monociti (10-30 %), limfociti B (do 15 %) in celice ubijalke (do 15 %), v zelo nizkem deležu pa so lahko prisotne še dendritične celice (1-2 %) (39). V študiji, v kateri so preverjali citotoksične učinke PgE1-OH na različnih imunskih celicah, so ugotovili, da posreduje PgE1-OH selektiven citotoksičen učinek na limfocite B (15). Naši rezultati so v skladu s temi predhodnimi odkritji.

Selektivno delovanje PgE1-OH na celice KLL v primerjavi s celicami zdravih darovalcev (PBMC in LCL) predstavlja dobro izhodišče za tarčno terapijo KLL.

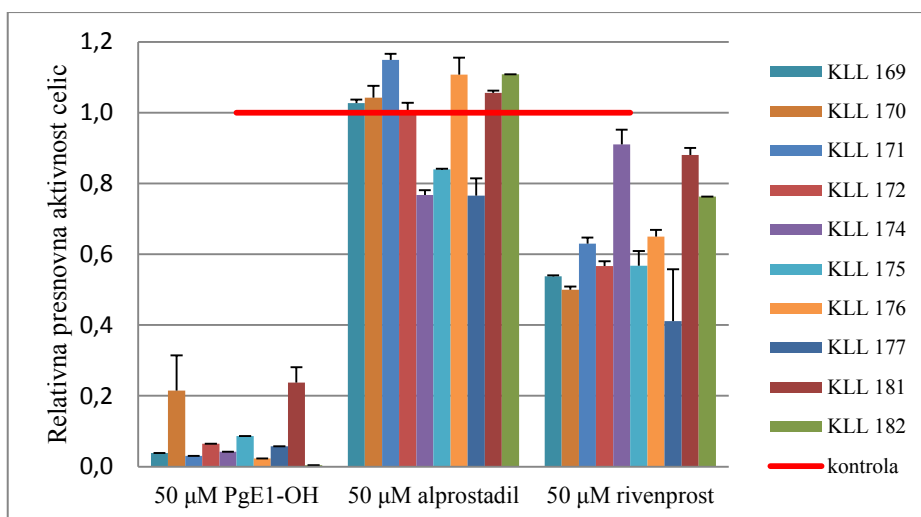
4.5 Iskanje novih modulatorjev apoptoze v KLL

KLL je še vedno neozdravljiva bolezen, zato je smiselno iskati nove potencialne učinkovine. Ena od možnosti je uporaba že odobrenih učinkovin za nove indikacije (*ang. drug repurposing*). Glavna prednost tega pristopa je prihranek na času in sredstvih (70), saj so na voljo podatki o farmakokinetiki, biorazpoložljivosti, toksičnosti in doziranju iz 1. faze kliničnih študij (71). Take učinkovine lahko delujejo na zelo različne načine. Nekatere povzročijo smrt rakavih celic, druge zavirajo različne signalne poti v malignih celicah, tretje pa delujejo preventivno in preprečijo njihov razvoj (72).

Tekom magistrskega dela smo ovrednotili citotoksični potencial dveh potencialnih citotoksičnih spojin ter PgE1-OH. Alprostadil oziroma prostaglandin E1 je strukturno podoben naravnemu ligandu receptorja EP4, PGE2. Rivenprost pa je selektiven agonist receptorja EP4. Vse testirane učinkovine so že bile uporabljene v kliničnih študijah oziroma se uporabljajo v terapiji. Citotoksičnost spojin smo določali na celicah KLL in na celicah zdravih darovalcev (celicah LCL) v 50 μ M koncentraciji.

Ugotovili smo, da ima PgE1-OH najbolj izraženo citotoksično delovanje na celicah KLL, saj je relativna presnovna aktivnost celic po 24 h inkubaciji značilno nižja v primerjavi s preostalimi spojinami. Najmanjši citotoksični učinek je izkazal alprostadil (Slika 16). Povprečna relativna presnovna aktivnost celic po 24 h inkubaciji je s PgE1-OH 8,0 %, z alprostadilom 98,7 % in z rivenprostom 64,2 %.

Pričakovali smo večjo učinkovitost rivenprosta v primerjavi s PgE1-OH, saj gre za bolj selektiven agonist receptorja EP4. Rivenprost se nahaja v obliki estra, zaradi česar bi lahko potreboval daljši čas za nastop citotoksičnega učinka. To hipotezo potrjujejo podatki po 48 h inkubaciji s 50 μ M rivenprostom, kjer je povprečna relativna presnovna aktivnost celic KLL padla na 39,6 % (Priloga 10). Smiselno bi bilo *in vitro* testirati učinkovitost spojine brez estra, saj bi bila učinkovitost rivenprosta *in vivo* odvisna od njegove presnove z jetrnimi encimi.

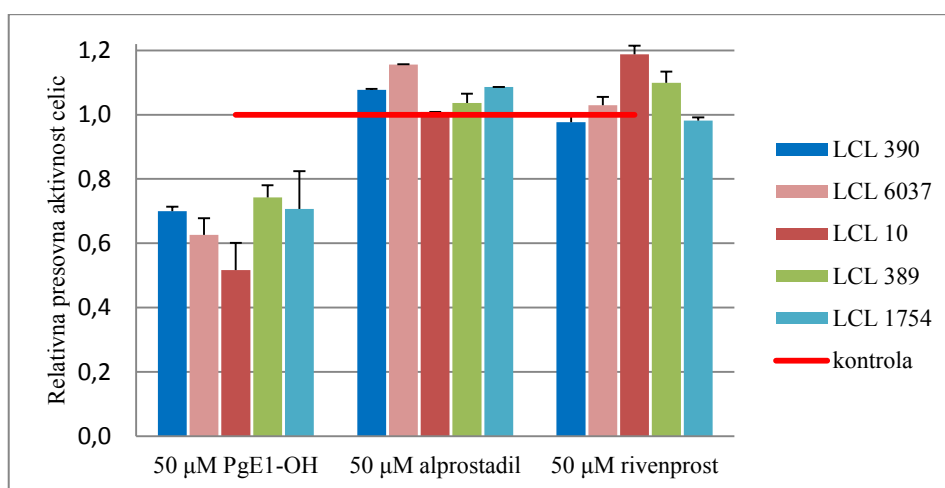


Slika 16: Relativna presnovna aktivnost celic KLL po 24 h inkubaciji s PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom.

Relativna presnovna aktivnost celic KLL 10-ih bolnikov po 24 h inkubaciji s 50 μ M PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom, ki smo jo določili z reagentom PrestoBlue. Vrednosti so normalizirane na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelkah.

Glede na veliko razliko v citotoksičnem učinku rivenprosta in PgE1-OH na celice KLL pa lahko sklepamo, da spojini kljub vezavi na isti receptor ne sprožita enakih signalnih poti. Gre za **od liganda odvisno citotoksično delovanje**. To je značilno za spojine, ki delujejo na z G proteinom sklopljene receptorje (28). Različni ligandi stabilizirajo različno konformacijo receptorja, kar vodi v sprožitev različnih signalnih poti in posledično v različno učinkovitost (29). Tako PGE2 *in vitro* z vezavo na receptor EP4 aktivira predvsem protein Gas, PgE1-OH pa je usmerjen bolj na NF-κB (12).

Citotoksičnost izbranih spojin smo preverili še na celicah LCL in ugotovili, da ima PgE1-OH nanje po 24 h in 48 h inkubaciji (Priloga 11) največji citotoksični učinek. Citotoksičnost PgE1-OH je manjša kot pri celicah KLL, kar je pričakovano glede na predhodne rezultate o selektivnosti PgE1-OH za celice KLL. Alprostadil in rivenprost nista vplivala na relativno presnovno aktivnost celic LCL (Slika 17). Povprečna relativna presnovna aktivnost celic LCL po 24 h inkubaciji je bila s PgE1-OH 65,8 %, z alprostadilom 107,3 % in z rivenprostom 105,5 %.



Slika 17: Relativna presnovna aktivnost celic LCL po 24 h inkubaciji s PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom.

Relativna presnovna aktivnost celic LCL 5 celičnih linij po 24 h inkubaciji s 50 µM PgE1-OH, alprostadilom in rivenprostom, ki smo jo določili s testom MTS. Vrednosti so normalizirane na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelkah.

Izmed izbranih spojin je PgE1-OH povzročil najmočnejši citotoksični učinek na celice KLL in LCL, pri čemer izkazuje selektivnost za celice KLL v primerjavi s celicami zdravih darovalcev (Poglavje 4.4). V nadaljnjih raziskavah pa bi bilo smiselno iskati nove imunomodulatorne učinkovine s selektivnim citotoksičnim delovanjem na celice KLL.

5. SKLEPI

Receptor EP4 predstavlja potencialno farmakološko tarčo za zdravljenje KLL, zato smo tekom magistrske naloge ovrednotili imunomodulatorno delovanje agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na celicah KLL.

Najprej smo določili citotoksični učinek PgE1-OH na celicah KLL, izoliranih iz polne krvi bolnikov, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi št. 93/12/10. Ugotovili smo, da so citotoksični učinki PgE1-OH na celicah KLL časovno in koncentracijsko odvisni. Celice KLL pa izkazujejo veliko inter-individualno raznolikost.

V nadaljevanju magistrske naloge smo preko vpletenosti dveh signalnih poti - preko NF- κ B in preko AC - vrednotili imunomodulatorne učinke PgE1-OH na celice KLL. Ugotovili smo, da PgE1-OH vodi v zmanjšano izločanje citokinov iz aktiviranih celic KLL. Izločanje provnetnega citokina TNF- α se je po inkubaciji s PgE1-OH znižalo pri vseh 10 preiskovanih aktiviranih celicah KLL. PgE1-OH pa je po 24 h inkubaciji znižal izločanje IL-2 iz celic KLL obeh vzorcev, v katerih sta ionomicin in PMA povišala izločanje le-tega. Sklepali smo, da je do tega prišlo zaradi inhibicije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. Aktivacija celic KLL z različnimi stimulatorji BCR je povečala njihovo presnovno aktivnost. Identifikacija ustreznih aktivatorjev celic KLL nam omogoča gojenje le-teh in posledično večjo dostopnost za raziskave.

Z aktivatorjem in inhibitorjem AC smo preverili še vpletenost signalne poti preko AC in posledično vpliv cAMP na citotoksične učinke PgE1-OH. Inhibicija AC je zmanjšala citotoksični učinek 5 μ M PgE1-OH na celicah nekaterih bolnikov s KLL. Aktivacija AC pa je zmanjšala presnovno aktivnost celic KLL.

Citotoksični učinek PgE1-OH na celicah KLL smo primerjali še s celicami zdravih darovalcev (PBMC in LCL) in ugotovili, da je PgE1-OH selektivno citotoksičen za celice KLL v primerjavi s celicami PBMC in LCL.

Iskali smo tudi nove imunomodulatorne spojine s selektivnim citotoksičnim delovanjem na celice KLL. Spojine smo izbrali glede na strukturno podobnost z endogenim ligandom (alprostadi) in selektivnost za receptor EP4 (rivenprost). Izbrane učinkovine se uporabljajo za zdravljenja drugih obolenj ali pa so bile že ocenjene v kliničnih študijah. Gre za iskanje učinkovin za zdravljenje drugih indikacij (t.i. *drug repurposing*). Izmed izbranih učinkovin je PgE1-OH izkazal močan citotoksični učinek na celice KLL, manj pa na celice LCL.

Alprostadil, ki je strukturno podoben PgE1-OH in PGE2, ni izkazal citotoksičnega učinka ne na celice KLL ne na celice LCL. Rivenprost je selektiven agonist receptorja EP4. Nahaja se v obliki predzdravila, citotoksičen učinek pa je bil prisoten šele po 48 h izpostavitvi.

Tekom raziskovalnega dela smo pripravili biobanko celic KLL, ki vsebuje primerno shranjeno DNA, RNA in celice KLL. To bo omogočilo nadaljnje raziskave in izvedbo potrditvenih študij.

Menimo, da PgE1-OH predstavlja potencialno novo učinkovino za zdravljenje KLL z imunomodulatornim delovanjem.

6. LITERATURA

1. American Society of Hematology. Blood cancers. <http://www.hematology.org/Patients/Cancers/> dostop: 17. 6. 2017.
2. American Cancer Society. What Is Chronic Lymphocytic Leukemia? <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/about/what-is-cll.html> dostop: 17. 6. 2017.
3. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html> dostop: 1. 7. 2017.
4. Zver S. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 465-474.
5. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015; 90: 446-460.
6. Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijo. Kronična limfocitna levkemija. <http://www.limfom-levkemija.org/o-bolezni-in-zdravljenju/kronicna-limfocitna-levkemija.html> dostop: 17. 6. 2017.
7. Društvo bolnikov s krvnimi boleznimi Slovenije. Akutne in kronične levkemije. <http://www.drustvo-bkb.si/o-krvnih-bolezni/akutne-in-kronicne-levkemije/> dostop: 17. 6. 2017.
8. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Fludarabin Teva, 27. 7. 2015.
9. Petlickovski A, Laurenti L, Li X et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; 105: 4820-4827.
10. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117: 563-574.
11. Murn J, Alibert O, Wu N et al. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med* 2008; 205: 3091-3103.
12. Konya V, Marsche G, Schuligoi R et al. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther* 2013; 138: 485-502.
13. Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 611-623.
14. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013; 12: 86.
15. Gobec M, Prijatelj M, Delić J et al. Chemo-sensitizing effects of EP4 receptor-induced inactivation of nuclear factor- κ B. *Eur J Pharmacol* 2014; 742: 81-88.
16. Murray F, Insel PA. Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia: a pathway-dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma. *Expert Opin. Ther. Targets* 2013; 17: 937-949.
17. Murn J, Mlinarič-Raščan I, Vaigot P et al. A Myc-regulated transcriptional network controls B-cell fate in response to BCR triggering. *BMC Genomics* 2009; 10: 323.
18. Nuckel H, Frey U, Aral N et al. The CC genotype of the C825T polymorphism of the G protein beta3 gene (GN3) is associated with a high relapse rate in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 1739-1743.
19. Carballido E, Veliz M, Komrokji R, et al. Immunomodulatory Drugs and Active Immunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Control* 2012; 19: 54-67.

20. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007; 45: 27-37.
21. Nerl C, Janssen O, Kabelitz D. B cell maturation in chronic lymphocytic leukemia. III. Effect of recombinant cytokines on leukemic B cell proliferation. *Leukemia* 1988; 2: 50-56.
22. Mikrookolje celic KLL. Vir: Markovič T. Doktorska disertacija v pripravi.
23. Hoyos B, Ballard DW. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 1989; 244: 457-460.
24. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P et al. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990; 171: 35-47.
25. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 401-413.
26. Chizzolini C, Brembilla NC. Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunol Cell Biol* 2009; 87: 510-511.
27. Mediatly register zdravil. <https://mediately.co/si/drugs> dostop: 4. 7. 2017.
28. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 205-216.
29. Kenakin T. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 296-302.
30. Cayman Chemical. Prostaglandin E2. <https://www.caymanchem.com/product/14010/image>, dostop: 27. 6. 2017.
31. Cayman Chemical. Prostaglandin E1 Alcohol. <https://www.caymanchem.com/product/13020/image>, dostop: 27. 6. 2017.
32. Chemical Book. Prostaglandin E1. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6141459.htm dostop: 27. 6. 2017.
33. Cayman Chemical. Rivenprost. <https://www.caymanchem.com/product/13618>, dostop: 27. 6. 2017.
34. Markovič T, Jakopin Ž, Sollner Dolenc M et al. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today* 2017; 22: 57-71.
35. Nizankowska E, Sheridan AQ, Maile MH et al. Bronchodilatory properties of 2-decarboxy-2-hydroxymethyl prostaglandin E1. *Prostaglandins* 1985; 29: 349-362.
36. U.S. National Institutes of Health. Therapeutic Study of ONO-4819CD for Ulcerative Colitis. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00296556>, dostop: 4. 7. 2017.
37. Invitrogen: Vanderbilt university. Cell culture basics. <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>, dostop: 30. 1. 2017.
38. Nemeč K. Preučevanja vloge prostaglandinskega receptorja EP4 pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo – magistrska naloga. Ljubljana, 2017.
39. Sanguine biosciencies. Types of immune cells present in human PBMC. <http://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>, dostop: 31. 1. 2017.
40. Morag A, Kirchheiner J, Moshe R, Gurwitz D: Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 327-340.

41. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 2011; 6: 1-5.
42. STEM CELL TECHNOLOGIES: RosetteSep: Unique Immunodensity Cell Isolation. <https://www.stemcell.com/products/brands/rosettesep.html>, dostop: 7. 2. 2017.
43. STEM CELL TECHNOLOGIES: RosetteSep™ HUMAN B CELL ENRICHMENT COCKTAIL: procedure, product information sheet. https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/28573-PIS_1_2_0.pdf, dostop: 7. 2. 2017.
44. Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, dostop: 7. 2. 2017.
45. Prijatelj M. Prostaglandinski receptor EP4 regulira delovanje limfocitov B - doktorska naloga. Ljubljana, 2011.
46. Prijatelj M, Celhar T, Mlinarič-Raščan I. Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 95: 19-26.
47. Adan A, Alizada G, Kiraz Y. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; 37: 163-176.
48. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007; 368: 39-57.
49. Vidmar M. Vrednotenje prostaglandinskega receptorja EP4 kot potencialne tarče za zdravljenje kronične limfocitne levkemije – magistrska naloga. Ljubljana, 2015.
50. Chronic Lymphocytic Leukemia — Microenvironment and B Cells. <https://www.intechopen.com/books/leukemias-updates-and-new-insights/chronic-lymphocytic-leukemia-microenvironment-and-b-cells>, dostop: 20. 7. 2017.
51. Pieczykolan M, Bojarska-Junak A, Hus I et al. Intracellular cytokine expression in T cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica Polonica* 2013; 44: 319-325.
52. Aguilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio LM et al. Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Medical Oncology* 1999; 16: 289-295.
53. Markovič T, Gobec M, Gurwitz D et al. Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicology letters* 2015; 233: 8-15.
54. Petro JB, Rahman SMJ, Ballard DW et al. Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for Activation of I κ b Kinase and Nuclear Factor κ B in Response to B Cell Receptor Engagement. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 191: 1745-1754.
55. Klaus GG, O'Garra A, Bijsterbosch MK et al. Activation and proliferation signals in mouse B cells. VIII. Induction of DNA synthesis in B cells by a combination of calcium ionophores and phorbol myristate acetate. *Eur J Immunol* 1986; 16: 92-97.
56. Pone EJ, Zhang J, Mai T et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat Commun* 2012; 3: 767-.
57. Sigma-Aldrich. Anti-Human IgM (μ -chain specific) antibody produced in goat. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i0759?lang=en®ion=SI>, dostop: 20. 7. 2017.
58. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1215-1219.
59. Bojarska-Junak A, Rolinski J, Wasik-Szczepaneko E et al. Intracellular tumor necrosis factor production by T- and B- cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2002; 87: 490-499.

60. Foa R, Massaia M, Cardona S et al. Production of tumor necrosis factor- α by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood* 1990; 76: 393-400.
61. Balato A, Lembo S, Cirillo T et al. Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy in the Management of Psoriasis and B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *Case Rep Dermatol* 2011; 3: 60–63.
62. Decker T, Bogner C, Oelsner M et al. Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann Hematol* 2010; 89: 1125-1132.
63. Lai R, O'Brien S, Maushouri T et al. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2002; 95: 1071-1075.
64. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015; 16: 448-457.
65. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001; 97: 256-263.
66. PubChem. Forskolin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/forskolin#section=Top>, dostop: 27. 6. 2017.
67. Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a Tool for Examining Adenylyl Cyclase Expression, Regulation, and G Protein Signaling. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23: 305-314.
68. Markovič T. et. al. Prostaglandin receptor EP4 is a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. Članek v pripravi.
69. Doljak R. Vrednotenje sinergističnega delovanja agonista receptorja EP4 in terapevtskih monoklonskih protiteles in vitro – magistrska naloga. Ljubljana, 2015.
70. Telleria CM. Drug Repurposing for Cancer Therapy. *J Cancer Sci* 2012; 4: ix-xi.
71. ecancermedicalsociety. The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. <http://doi.org/10.3332/ecancer.2014.442>, dostop: 22. 7. 2017.
72. Sleire L, Førde HE, Netland IA et al. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res* 2017; 124: 74-91.

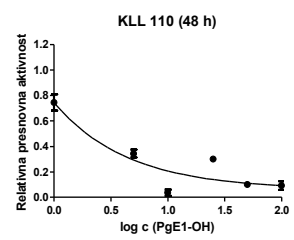
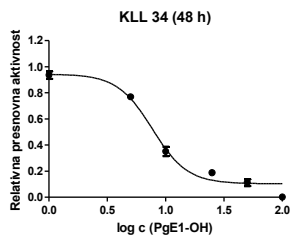
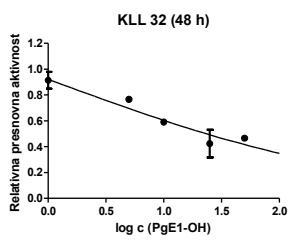
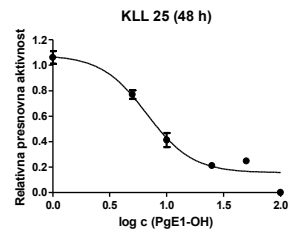
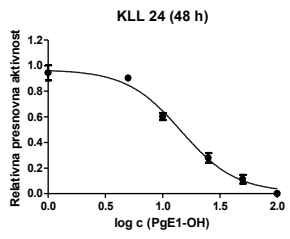
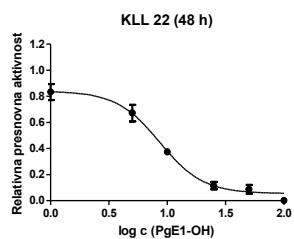
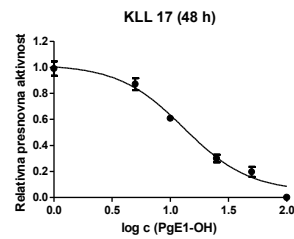
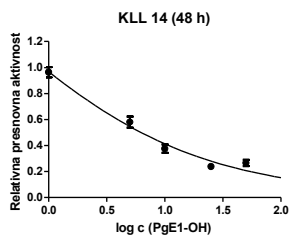
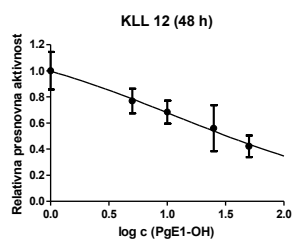
7. PRILOGE

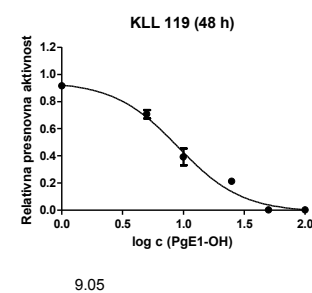
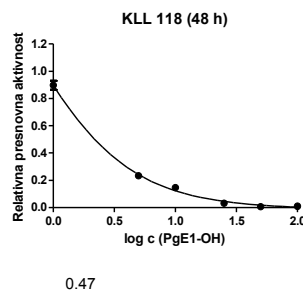
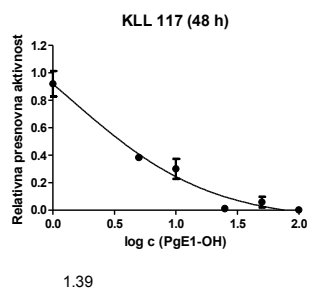
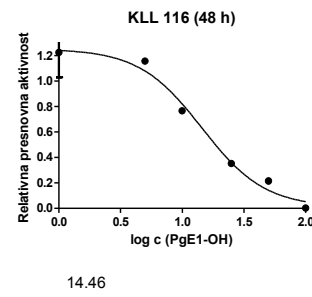
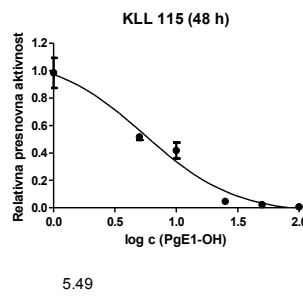
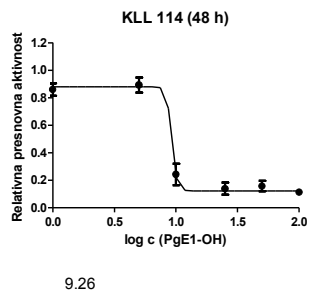
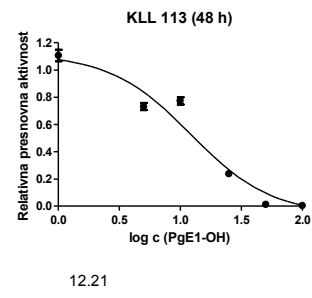
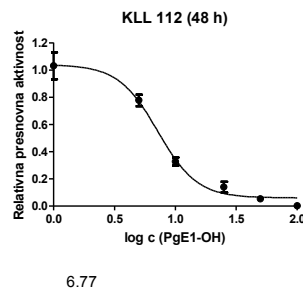
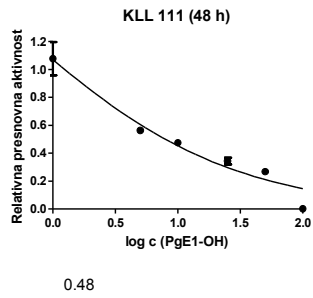
Priloga 1: EC₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji celic KLL s PgE1-OH

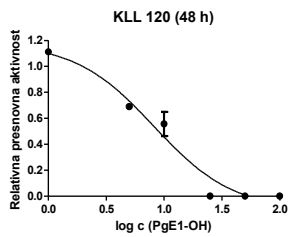
Celice KLL	EC ₅₀ po 24 h (μM)	EC ₅₀ po 48 h (μM)	Celice KLL	EC ₅₀ po 24 h (μM)	EC ₅₀ po 48 h (μM)
12	ND	11,92	143	9,39	6,62
13	29,73	ND	144	14,11	24,54
14	6,50	0,36	145	18,11	11,51
17	23,41	13,09	146	16,73	7,23
22	11,97	8,62	147	8,80	9,05
24	21,82	14,52	148	10,63	6,01
25	11,89	6,71	150	12,24	7,65
32	11,83	1,54	152	7,85	6,69
34	0,97	7,68	158	12,03	6,99
110	3,31	0,00048	159	11,36	7,35
111	11,18	0,48	160	8,58	6,40
112	11,37	6,77	161	18,17	8,10
113	34,98	12,21	163	13,43	1,96
114	9,34	9,26	166	14,03	6,89
115	11,82	5,49	167	6,52	ND
116	16,45	14,46	168	11,24	ND
117	12,05	1,39	169	9,32	5,87
118	10,09	0,47	170	5,38	ND
119	32,85	9,05	171	6,81	5,28
120	10,40	8,20	172	7,23	5,20
122	22,47	15,26	173	6,84	4,44
123	14,13	ND	174	7,55	3,57
124	9,47	10,35	175	19,31	4,92
125	15,71	7,36	176	11,23	5,86
126	11,90	ND	177	7,92	ND
127	4,16	ND	181	26,34	5,60
128	6,65	5,46	182	10,91	4,62
129	7,27	5,89	183	9,67	6,64
130	6,93	5,24	184	6,00	4,96
131	10,02	ND	186	11,51	1,85
132	13,07	4,35	187	9,65	ND
134	12,27	13,27	189	11,53	7,04
135	21,35	16,96	190	14,28	6,75
136	5,49	ND	192	11,67	5,65
137	11,04	9,82	193	8,69	0,02
138	13,22	37,9	194	8,35	6,58
139	10,05	ND	196	9,08	5,15
140	16,62	13,88	Št. vzorcev	75	64
141	17,03	5,88	Povprečje	12,31	7,67

Legenda: ND – nedoločene

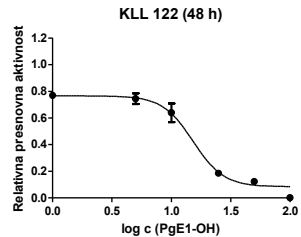
Priloga 2: Grafi vpliva agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na presnovno aktivnost celic KLL po 48 h inkubaciji (z EC_{50} vrednostmi)



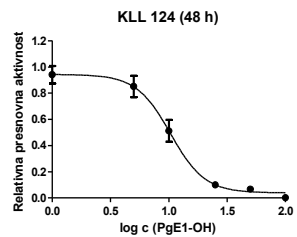




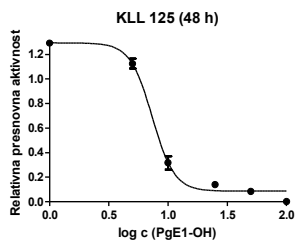
8.20



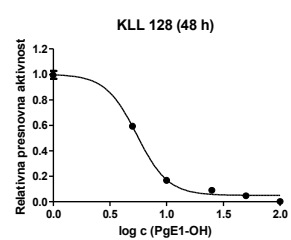
15.26



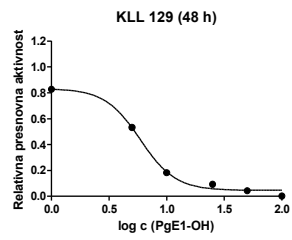
10.35



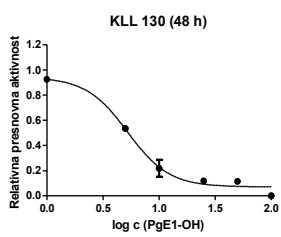
7.36



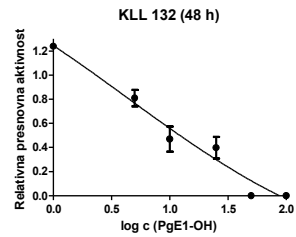
5.46



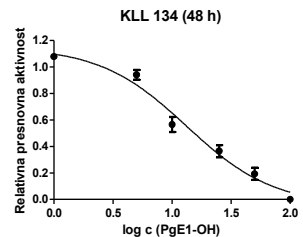
5.89



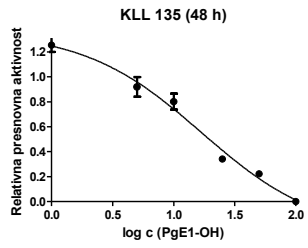
5.24



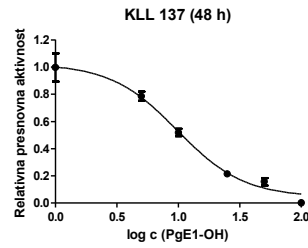
4.35



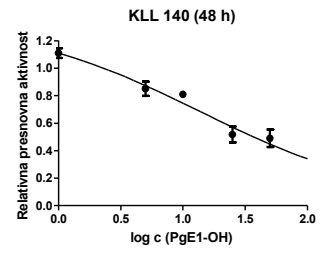
13.27



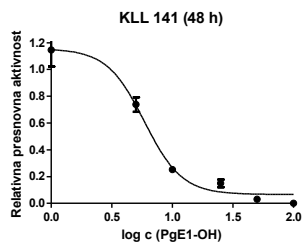
16.96



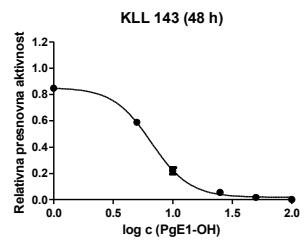
9.82



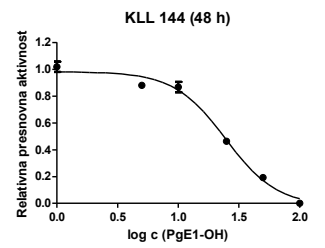
13.88



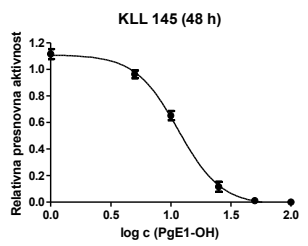
5.88



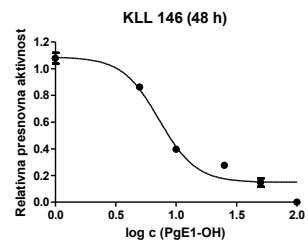
6.62



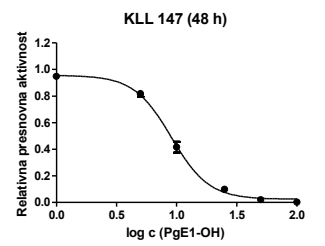
24.54



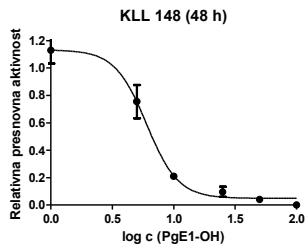
11.51



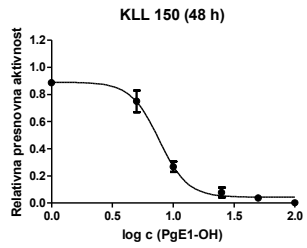
7.23



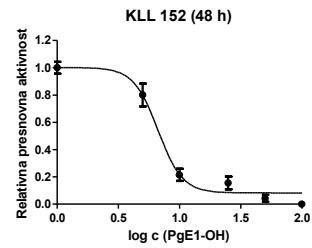
9.05



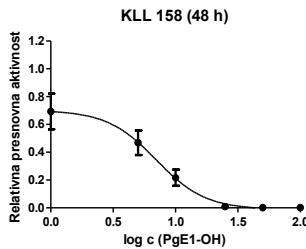
6.01



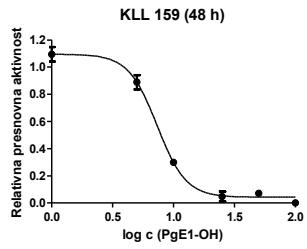
7.65



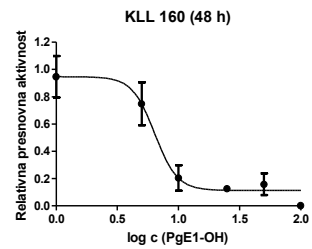
6.69



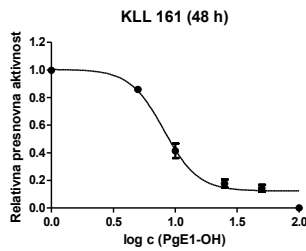
6.99



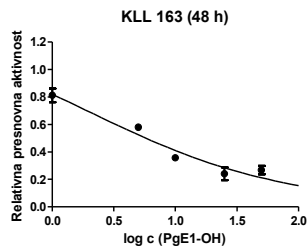
7.35



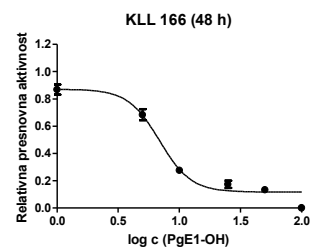
6.40



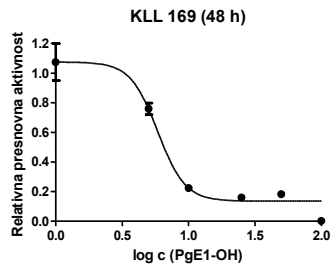
8.10



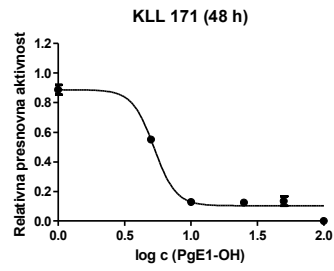
1.96



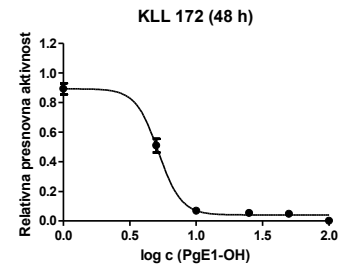
6.89



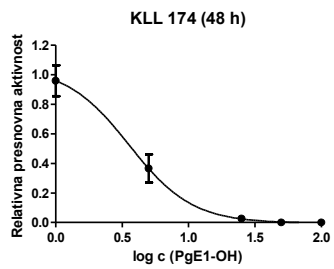
5.87



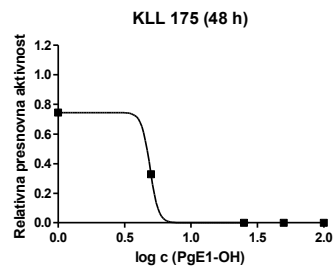
5.28



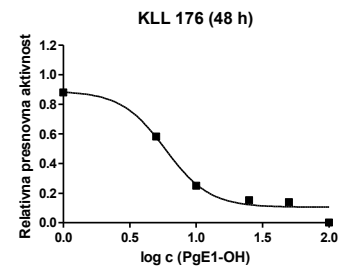
5.20



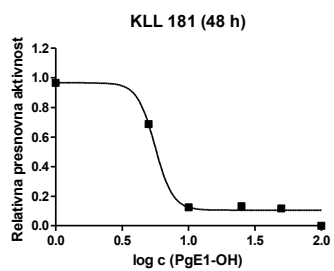
3.57



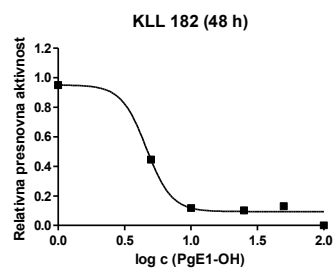
4.92



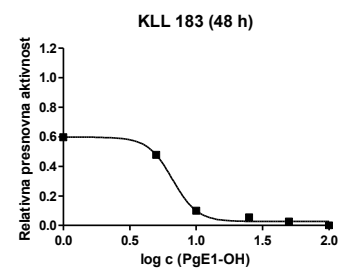
5.86



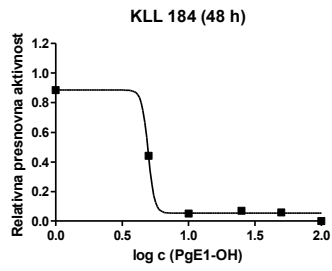
5.60



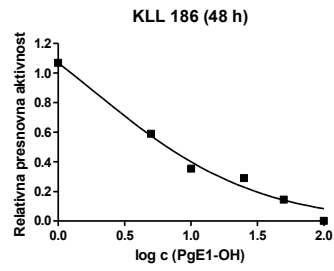
4.62



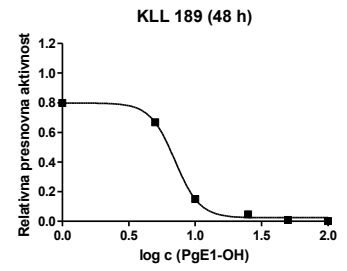
6.64



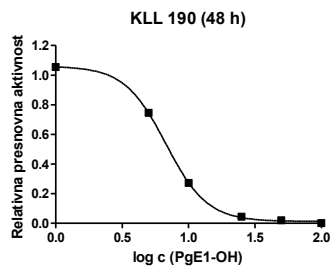
4.96



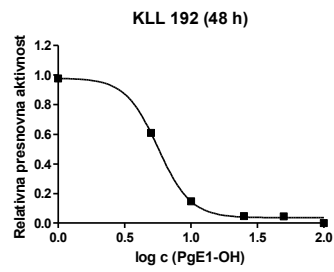
1.85



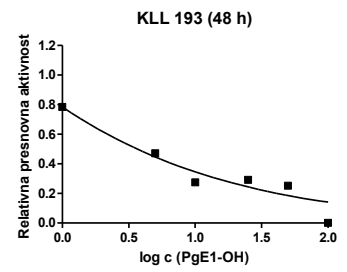
7.04



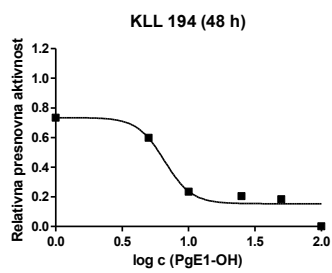
6.75



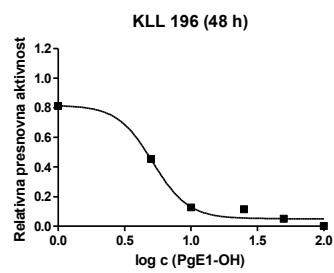
5.65



0.02

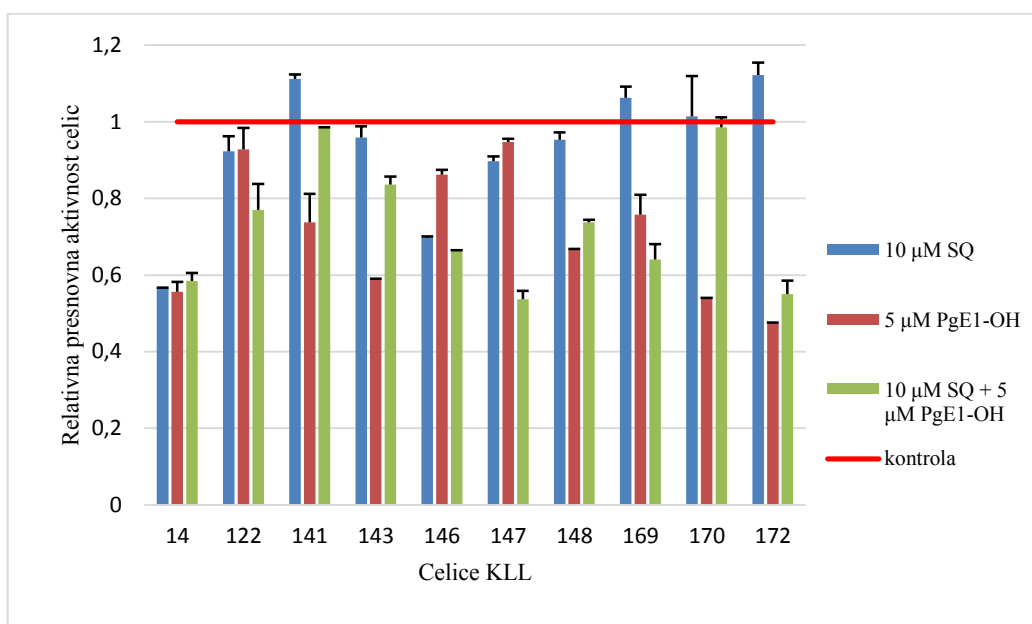


6.58



5.15

Priloga 3: Vpliv inhibitorja AC, SQ 22536, na citotoksično delovanje PgE1-OH po 48 h inkubaciji



Inhibitor AC, SQ 22536, je na 5 od 10 vzorcev celic KLL značilno zmanjšal citotoksične učinke agonista receptorja EP4, PgE1-OH po 48 h inkubaciji. Slika prikazuje relativno presnovno aktivnost celic KLL (4×10^5 celic/ml) po inkubaciji z 10 µM SQ 22536 in 5 µM PgE1-OH brez ali s predhodnim dodatkom 10 µM SQ 22536. Presnovno aktivnost celic smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelakah.

Priloga 4: EC₅₀ vrednosti po 24 h in 48 h inkubaciji celic PBMC s PgE1-OH.

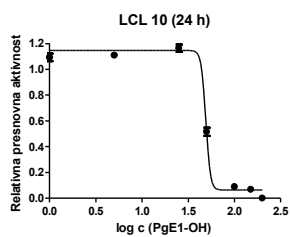
Vzorec PBMC	EC ₅₀ po 24 h (µM)	EC ₅₀ po 48 h (µM)	Vzorec PBMC	EC ₅₀ po 24 h (µM)	EC ₅₀ po 48 h (µM)
1	35,03	12,61	8	106,60	41,90
2	65,13	13,00	9	63,87	29,55
3	46,47	29,00	10	31,50	28,95
4	84,99	29,57	11	41,05	27,42
5	33,85	13,28	12	62,74	51,16
6	20,44	21,30	13	52,86	18,79
7	49,95	30,39	14	30,77	22,82
Povprečje EC₅₀ (µM)				51,80	26,41
Mediana EC₅₀ (µM)				48,21	28,19

EC₅₀ vrednosti, ki smo jih določili po 24 h in 48 h inkubaciji celic PBMC (4×10^5 celic/ml) z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM in 50 µM). Presnovno aktivnost celic smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO). Poskus smo izvedli v treh paralelakah.

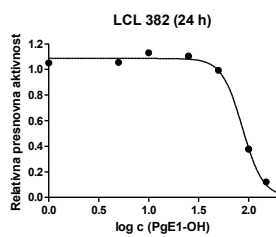
Priloga 5: Povprečne EC₅₀ vrednosti po 24 h in 72 h inkubaciji celic LCL s PgE1-OH

Čas	Rezultati		Podatki povzeti po (69)		Združeni podatki	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Št. vzorcev	12	12	10	10	22	22
Povprečna EC ₅₀	58,17 μM	40,32 μM	41,87 μM	28,90 μM	50,02 μM	34,61 μM
Mediana EC ₅₀	52,97 μM	33,88 μM	40,42 μM	27,62 μM	52,02 μM	31,39 μM

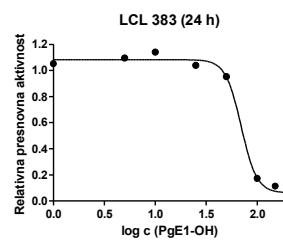
Priloga 6: Grafi vpliva agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na presnovno aktivnost celic LCL po 24 h inkubaciji (z EC_{50} vrednostmi)



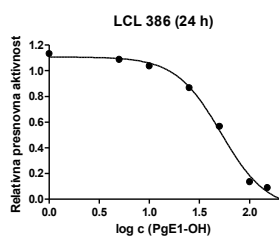
49.10



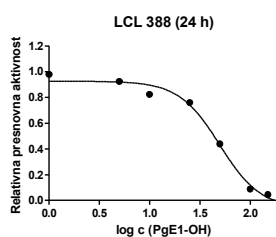
86.63



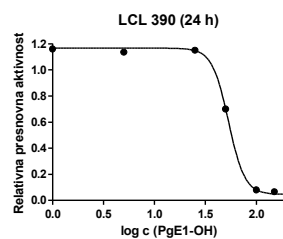
69.62



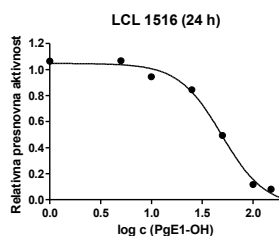
52.02



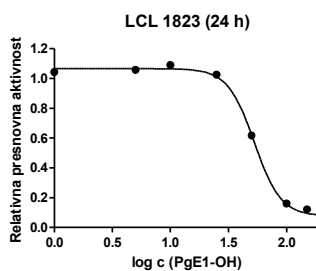
49.72



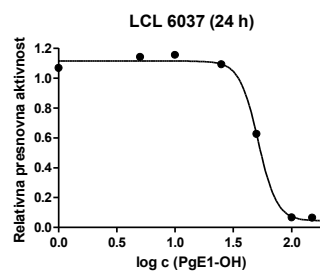
53.23



49.09

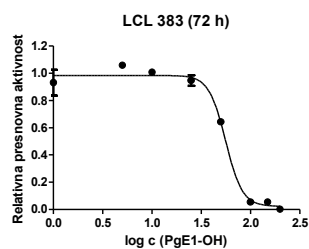


52.71

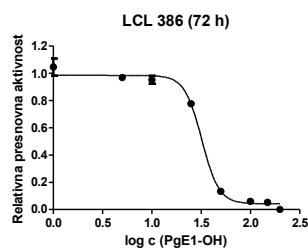


51.66

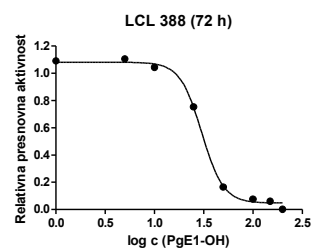
Priloga 7: Grafi vpliva agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na presnovno aktivnost celic LCL po 72 h inkubaciji (z EC_{50} vrednostmi)



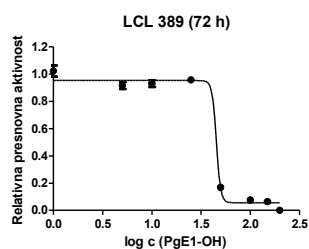
56.02



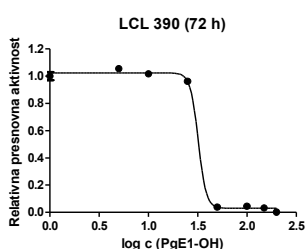
32.11



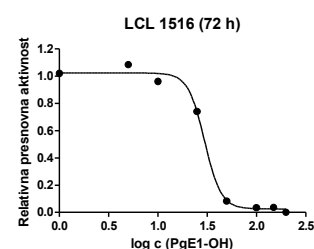
30.25



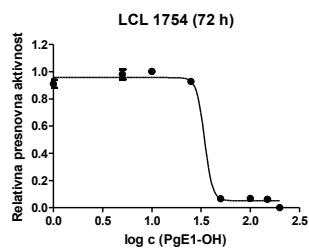
45.35



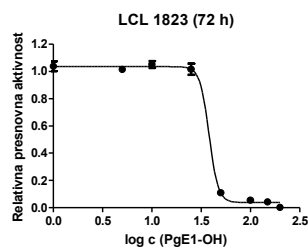
32.05



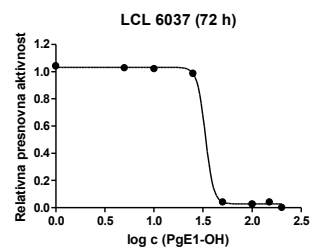
29.81



34.27

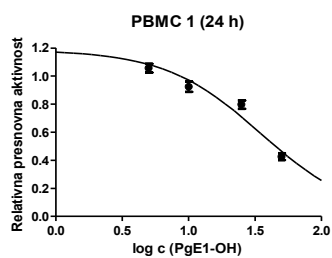


38.06

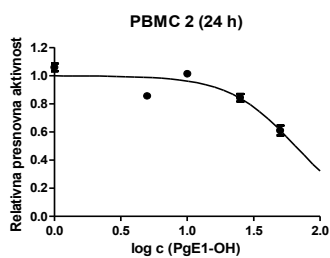


33.48

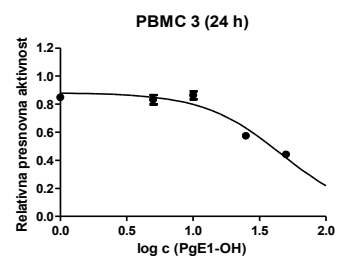
Priloga 8: Grafi vpliva agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na presnovno aktivnost celic PBMC po 24 h inkubaciji (z EC_{50} vrednostmi)



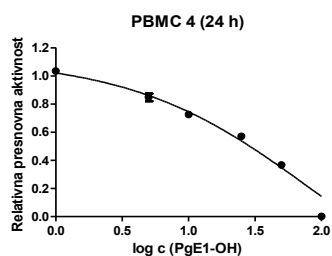
35.03



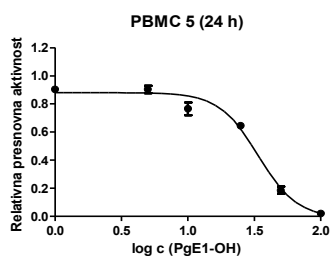
65.13



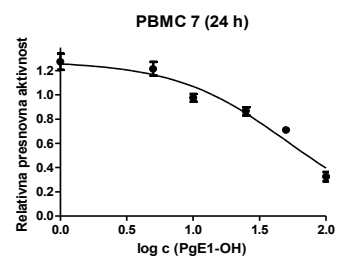
46.47



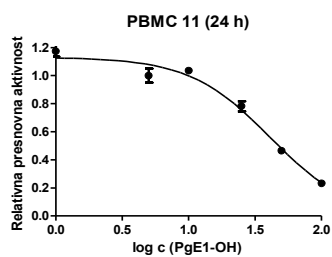
84.99



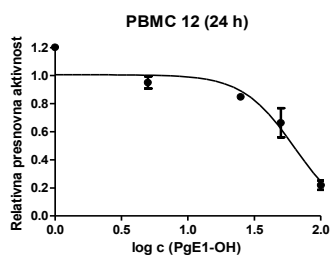
33.85



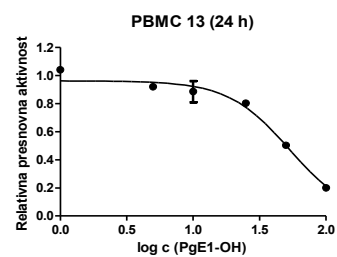
49.95



41.05

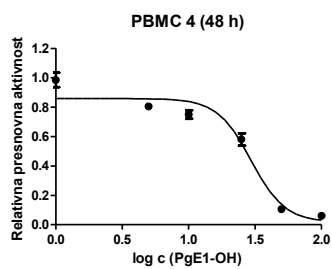


62.74

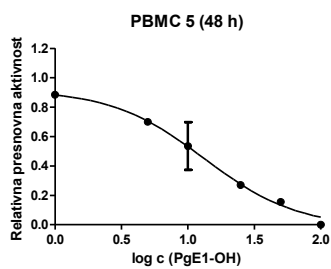


52.86

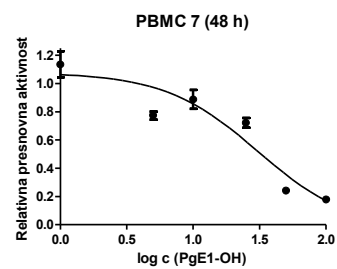
Priloga 9: Grafi vpliva agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na presnovno aktivnost celic PBMC po 48 h inkubaciji (z EC_{50} vrednostmi)



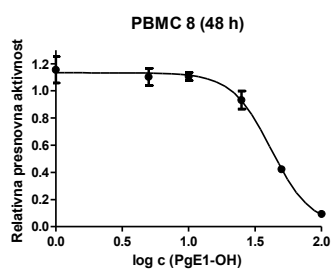
29.57



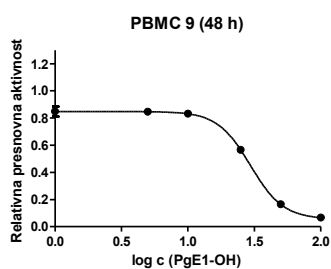
13.28



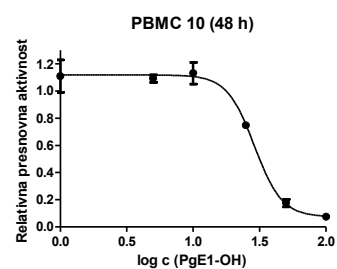
30.39



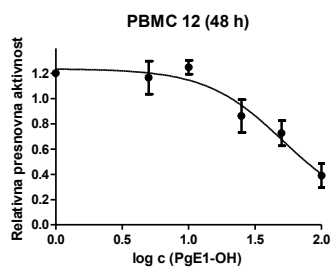
41.90



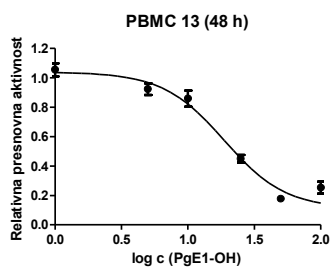
29.55



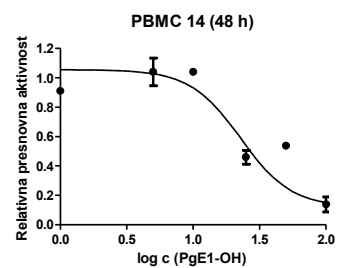
28.95



51.16

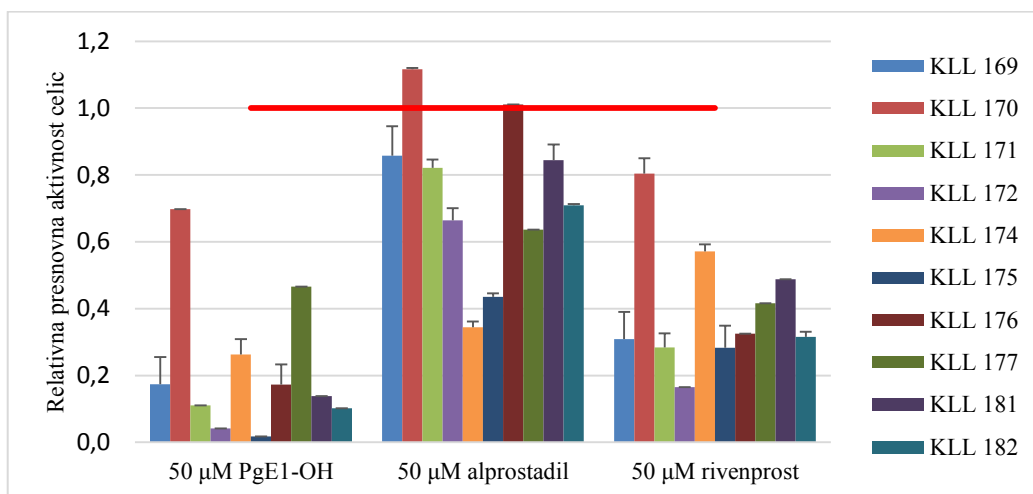


18.79



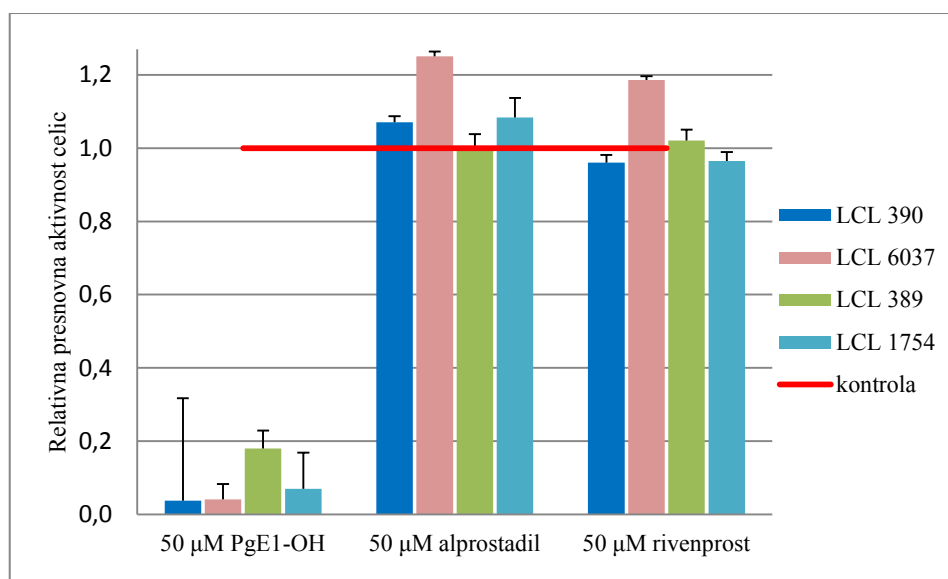
22.82

Priloga 10: Citotoksičnost PgE1-OH, alprostadila in rivenprosta na celicah KLL po 48 h inkubaciji



Celice KLL smo inkubirali 48 h s 50 µM PgE1-OH, alprostadilom oz. rivenprostom. Presnovno aktivnost celic smo določili z reagentom PrestoBlue. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO).

Priloga 11: Citotoksičnost PgE1-OH, alprostadila in rivenprosta na celicah LCL po 72 h inkubaciji



Celice LCL smo inkubirali 72 h s 50 µM PgE1-OH, alprostadilom oz. rivenprostom. Presnovno aktivnost celic smo določili z reagentom MTS. Rezultat smo normalizirali na kontrolo topila (0,2 % DMSO).