

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA VIDMAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA VIDMAR

**VREDNOTENJE PROSTAGLANDINSKEGA RECEPTORJA
EP4 KOT POTENCIALNE TARČE ZA ZDRAVLJENJE
KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE**

**EVALUATION OF PROSTAGLANDIN EP4 RECEPTOR AS A
POTENTIAL TARGET FOR THE TREATMENT OF
CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

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 strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi Tijani Markovič, mag. farm., za usmerjanje in praktične nasvete pri opravljanju raziskovalnega dela. Hvala za potrpežljivost pri učenju, za spodbudo in čas, ki si mi ga namenila tekom izdelave magistrske naloge. Zahvaljujem se doc. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biok., za zbrane klinične podatke bolnikov, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi. Za dostopnost in prijaznost se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo. Hvala tudi asist. dr. Tjaši Vižin, mag. farm. za posnetke celic s konfokalnim mikroskopom.

Nenazadnje pa se za vso spodbudo in potrpežljivost tekom študija zahvaljujem tudi svojim domačim.

IZJAVA

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

Maša Vidmar

Ljubljana, september 2015

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Tomaž Vovk

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
KAZALO ENAČB	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1. Levkemija	1
1.2. Kronična limfocitna levkemija	1
1.2.1. Diagnoza	1
1.2.2. Prognoza bolezni	3
1.2.3. Terapija	5
1.2.4. Fludarabin	7
1.2.5. Monoklonsko protitelo rituksimab	7
1.2.6. Monoklonsko protitelo ofatumumab	8
1.2.7. Monoklonsko protitelo alemtuzumab	8
1.2.8. Rezistenca na zdravljenje KLL	8
1.3. Mikro-okolje levkemičnih celic	9
1.4. B-celični receptor (BCR)	10
1.5. Receptor EP4	11
1.6. Jedrni transkripcijski dejavnik kappa B (NF-κB)	12
1.7. Ciklični adenozin monofosfat (cAMP)	13
1.8. Odzivni elementi za cAMP (CREB)	13
1.9. Agonisti in antagonisti receptorja EP4	14
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. Materiali	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Kompleti za analize	16
3.1.3. Pufri in raztopine	17
3.1.4. Protitelesa in fluorescenčna barvila	17
3.1.5. Gojišča in sestava	18
3.1.6. Laboratorijska oprema	19

3.2. Metode dela s celicami.....	20
3.2.1. Celične kulture	21
3.2.2. Odmrzovanje celic.....	21
3.2.3. Štetje celic	22
3.3. Izolacija celic B iz polne krvi.....	22
3.4. Test presnovne aktivnosti celic.....	24
3.4.1. Postopek določanja živosti celic po tretiranju s spojinami in monoklonskimi protitelesi.....	25
3.5. Pretočna citometrija.....	26
3.5.1. Analiza ekspresije receptorja EP4.....	26
3.5.2. Analiza celičnega označevalca CD19 in CD20 s pretočnim citometrom.....	27
3.5.3. Analiza citokinov s pretočnim citometrom	28
3.6. Konfokalna mikroskopija	29
3.7. KLL biobanka.....	31
3.7.1. Celice.....	31
3.7.2. DNA – »peleta« izolacije celic B.....	32
3.7.3. DNA	32
3.7.4. RNA.....	32
3.7.5. Proteini	32
3.8. Statistična obdelava podatkov.....	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
4.1. Celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4	35
4.2. S postopkom RosetteSep izoliramo celice KLL	36
4.3. Agonist receptorja EP4 deluje citotoksično na primarne celice KLL	37
4.3.1. Citotoksični učinki agonista receptorja EP4 so koncentracijsko odvisni	38
4.3.2. Citotoksični učinki agonista receptorja EP4 so časovno odvisni	39
4.4. Agonist receptorja EP4 deluje selektivno na maligne limfocite B	40
4.5. Ekspresija receptorja EP4 je višja na celicah KLL kot na celicah LCL.....	42
4.6. PgE1-OH je bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE ₂	44
4.7. PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice LCL	45
4.8. Inter-individualna variabilnost v odzivu na PgE1-OH.....	48
4.8.1. Ekspresija receptorja EP4 na celicah KLL in citotoksično delovanje PgE1-OH ne korelirajo..	48
4.8.2. Delovanje agonista PgE1-OH je neodvisno od stadija KLL	49
4.8.3. Delovanje agonista receptorja EP4 je neodvisno od kromosomskih nepravilnosti.....	50
4.8.4. Agonist receptorja EP4 deluje citotoksično tudi na celice KLL pri bolnikih s slabo prognozo.....	50
4.9. PgE1-OH je bolj citotoksičen v primerjavi s fludarabinom	52

4.10. PgE1-OH in fludarabin delujeta sinergistično.....	53
4.11. PgE1-OH in terapevtska monoklonska protitelesa delujejo sinergistično na celicah KLL nekaterih bolnikov	54
4.11.1. Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH.....	54
4.11.2. Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH	55
4.11.3. Sinergistični učinek alemtuzumaba in PgE1-OH	56
4.12. Priprava KLL biobanke	57
5. SKLEPI	60
6. LITERATURA	62
7. PRILOGE.....	i
Priloga 1: Vpliv agonista receptorja EP4 na živost celic KLL po 24h in 48h.....	i
Priloga 2: Korelacija med povprečno intenziteto fluorescence (MFI) in EC50 vrednostjo na celicah KLL.....	xiii
Priloga 3: Kombinacijski indeks	xiii
Priloga 4: Sinergistični učinek fludarabina in PgE1-OH po 24h.	xiv
Priloga 5: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in rituksimab.....	xiv
Priloga 6: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in ofatumumab.....	xv
Priloga 7: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in alemtuzumab.	xv
Priloga 8: Biobanka.....	xvi

KAZALO SLIK

Slika 1: Razmaz periferne krvi bolnika s kronično limfocitno levkemijo.	2
Slika 2: Kaplan-Meierjev diagram preživetja bolnikov s KLL ob prisotnosti določene kromosomske nepravilnosti.	4
Slika 3: Mikro-okolje levkemičnih B-KLL celic in BCR receptor.....	10
Slika 4: Shematski prikaz klasične in neklasične poti aktivacije receptorja EP4.	11
Slika 5: Agonist receptorja EP4 in rituksimab inhibirata NF- κ B signalno pot in tako povzročita apoptozo celic.....	13
Slika 6: Strukturna primerjava med endogenim ligandom PGE ₂ (levo) in selektivnim agonistom receptorja EP4, PgE1-OH (desno).....	14
Slika 7: Premreženje eritrocitov s tetramernim kompleksom protiteles in neželenimi celicami.	23
Slika 8: Shema postopka izolacije limfocitov B.	24
Slika 9: Pretvorba nefluorescenčnega barvila resazurin v fluorescenčno barvilo resorufin.	25
Slika 10: Razvojne stopnje limfocita B in izražanje celičnega površinskega antigena CD19 in CD20.	28
Slika 11: Shema konfokalnega mikroskopa.....	30
Slika 12: Izražanje receptorja EP4 na celicah KLL.....	35
Slika 13: Izražanje receptorja EP4 na celicah LCL.	35
Slika 14: S postopkom RosetteSep izoliramo CD19+ limfocite.....	37
Slika 15: Vpliv agonista receptorja EP4 na živost celic KLL je koncentracijsko odvisen.	39

Slika 16: Citotoksični učinki agonista receptorja EP4, PgE1-OH, so časovno odvisni.....	40
Slika 17: Selektivno delovanje PgE1-OH na levkemične celice KLL.....	42
Slika 18: Celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4.....	43
Slika 19: Ekspresija receptorja EP4 je značilno višja na celicah KLL kot na celicah LCL.	43
Slika 20: PgE1-OH je bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE ₂	44
Slika 21: PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice LCL.	46
Slika 22: Aktivacija receptorja EP4 poviša izločanje IL-6, ta pa inducira sproščanje PGE ₂ iz makrofagov.....	47
Slika 23: Delovanje agonista PgE1-OH je neodvisno od stadija bolezni.	49
Slika 24: Delovanje agonista receptorja EP4 je neodvisno od kromosomskih sprememb.	50
Slika 25: Agonist receptorja EP4 je bolj citotoksičen v primerjavi s fludarabinom po 24h.....	52
Slika 26: Sinergistično delovanje PgE1-OH in fludarabina.	53
Slika 27: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in rituksimabom.....	55
Slika 28: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in ofatumumabom.	56
Slika 29: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in alemtuzumabom.	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev po Binetu.....	3
Preglednica 2: Najpogostejše kromosomske nepravilnosti.....	5
Preglednica 3: Kemikalije.....	16
Preglednica 4: Kompleti za analize.....	16
Preglednica 5: Pufri in raztopine.....	17
Preglednica 6: Protitelesa in fluorescenčna barvila.	17
Preglednica 7: Gojišča in sestava.....	18
Preglednica 8: Laboratorijska oprema.	19
Preglednica 9: EC50 vrednosti po 24h in po 48h inkubacije celic KLL s PgE1-OH.	38
Preglednica 10: Kromosomska nepravilnost del17p in EC50 vrednosti izbranih vzorcev.	51
Preglednica 11: Kromosomska nepravilnost del11q in EC50 vrednosti izbranih vzorcev.	51
Preglednica 12: Biobanka	58

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba za računanje koncentracije celic s hemocitometrom	22
---	----

POVZETEK

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejše hematološko maligno obolenje pri odraslih. Za zdravljenje KLL so na voljo številna zdravila, vendar je bolezen zelo heterogena in še zmeraj neozdravljiva, popolne remisije bolezni pa ne dosežemo niti pri polovici bolnikov.

Predhodne študije so razkrile citotoksično delovanje agonista receptorja EP4 na maligne limfocite B. V magistrski nalogi smo zato želeli ovrednotiti, ali bi lahko receptor EP4 predstavljal potencialno tarčo pri zdravljenju KLL.

Primarne celice KLL smo izolirali iz polne krvi 51 bolnikov z diagnozo KLL, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi. Najprej smo s pretočno citometrijo pokazali, da je ekspresija receptorja EP4 višja na celicah KLL kot na kontrolnih celicah (transformirane limfoblastoidne celice zdravih darovalcev; LCL).

Citotoksične učinke agonista receptorja EP4, PgE1-OH, ki so bili koncentracijsko in časovno odvisni, smo potrdili na vseh malignih limfocitih B pridobljenih od 51 bolnikov. Selektivnost PgE1-OH smo vrednotili s primerjavo EC50 vrednosti na malignih celicah KLL in na celicah LCL. Povprečne EC50 vrednosti po 24h inkubaciji s PgE1-OH so bile 41,9 μ M za celice LCL in 17,3 μ M za celice KLL, s tem pa smo dokazali, da PgE1-OH deluje značilno bolj citotoksično na celice KLL kot na celice LCL. Nadalje smo dokazali, da so citotoksični učinki PgE1-OH posredovani preko receptorja EP4. Po 24h tretiranju z 10 μ M selektivnim agonistom PgE1-OH se je živost celic znižala na 33 %, po tretiranju z 10 μ M endogenim ligandom PGE₂, ki deluje na vse štiri tipe prostaglandinskih E2 receptorjev (EP1-4), pa je bila živost celic 88 %.

Na dolgotrajno preživetje celic KLL *in vivo* vplivajo konstitutivna aktivacija B celičnega receptorja (BCR) in jedrnega transkripcijskega dejavnika kappa B (NF- κ B) ter povišan nivo citokinov v mikrookolju malignih limfocitov B. Imunomodulatorne učinke PgE1-OH smo vrednotili preko določanja citokinov v mediju celic LCL. Celice LCL smo tretirali s PgE1-OH ter stimulirali z ionomicinom/PMA, ki posnema biokemične učinke vezave antigena na BCR receptor. Dodatek PgE1-OH je značilno znižal izločanje IL-2, IL-10, TNF- α in IFN- γ v primerjavi z netretiranimi celicami LCL.

Pri vrednotenju odziva celic KLL na agonist receptorja EP4 smo opazili inter-individualno variabilnost. Učinke agonista receptorja EP4 pridobljene iz *in vitro* preizkusov smo vrednotili glede na klinične podatke bolnikov, ki smo jih pridobili v sodelovanju z oddelkom za Hematologijo, UKCL. Ugotovili smo, da je delovanje agonista receptorja EP4 na celice KLL

neodvisno od stadija bolezni (A, B, C) ali prognostičnih markerjev (trisomija 12, del13q, del11q, del17p).

Za zdravljenje KLL je pomembna kemoimunoterapija, ki pogosto kombinira purinski analog fludarabin s terapevtskimi monoklonskimi protitelesi. V magistrski nalogi smo vrednotili učinke fludarabina in monoklonskih protiteles proti celičnima označevalcema CD20 in CD52. Ugotovili smo, da je PgE1-OH bolj citotoksičen po 24h v primerjavi s fludarabinom, ter da v kombinaciji delujeta sinergistično, kar smo potrdili s pomočjo programa CompuSyn. Pri vrednotenju kombinacije PgE1-OH in rituksimaba na celicah KLL smo s pomočjo programa CompuSyn pokazali, da gre za sinergistični učinek, kombinaciji PgE1-OH in ofatumumab oziroma PgE1-OH in alemtuzumab pa delujeta sinergistično le v območju 1 μ M koncentracije, pri 10 μ M koncentraciji pa prevladajo citotoksični učinki PgE1-OH.

V okviru magistrske naloge smo potrdili, da predstavlja receptor EP4 potencialno farmakološko tarčo za zdravljenje KLL.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the most common haematological malignancy in adults. There are many drugs available for the treatment of CLL, however the disease is very heterogeneous and still incurable. The complete remission of the disease is achieved in less than half of the patients.

The previous studies revealed cytotoxic effects of EP4 receptor agonist on malignant lymphocytes B. The aim of this Master thesis was to evaluate the EP4 receptor as a potential target for the treatment of CLL.

Primary CLL cells were isolated from the whole blood obtained after informed consent from 51 patients diagnosed with CLL. First, we revealed that the expression of EP4 receptor determined by flow cytometry was higher on CLL cells compared to control cells (transformed lymphoblastoid cells of healthy donors; LCLs).

The EP4 receptor agonist PgE1-OH induced a concentration and time dependent cytotoxicity in all CLL cells obtained from 51 patients. The selectivity of PgE1-OH was evaluated by comparing EC50 values on malignant CLL and LCL cells obtained from healthy individuals. The average EC50 values for PgE1-OH after 24h were 41,9 μ M for LCLs and 17,3 μ M for CLL cells, indicating that PgE1-OH was significantly more cytotoxic to malignant B cells compared to LCLs. The cytotoxic effects were confirmed to be mediated via EP4 receptor as evident from the stronger cytotoxic effects at 10 μ M concentration caused by selective EP4 receptor agonist PgE1-OH (viability 33 %) compared to endogenous ligand PgE2 (viability 88 %), which binds to all four types of prostaglandin E2 receptors (EP1-4).

The long-term survival of CLL cells *in vivo* depends on the constitutive activation of the B cell receptor (BCR) and the transcription factor kappa B (NF- κ B) and increased levels of cytokines in the microenvironment of malignant B cells. We have investigated the immunomodulatory properties of PgE1-OH via determination of cytokines in the culture medium of human LCLs upon ionomycin/PMA activation, mimicking BCR activation. PgE1-OH significantly decreased the levels of IL-2, IL-10, TNF- α and IFN- γ compared to untreated LCLs.

The treatment of CLL includes chemoimmunotherapy, which often combines purine analog fludarabine and therapeutic monoclonal antibodies. We evaluated the effects of fludarabine and the monoclonal antibodies that bind to the surface markers CD20 and CD52. PgE1-OH was significantly more cytotoxic than fludarabine after 24h and together they acted synergistically as confirmed by the program CompuSyn. We also confirmed the synergistic effect of EP4 receptor agonist and rituximab. However, the PgE1-OH in combination with

ofatumumab or alamtuzumab acted synergistically only in 1 μ M concentrations, whereas at 10 μ M concentrations of PgE1-OH its cytotoxic effects prevailed.

In conclusion, the results obtained in this Master thesis confirmed that the EP4 receptor presents a potential pharmacological target for the treatment of CLL.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADCC	s protitelesi posredovana citotoksičnost (<i>angl. antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
BCR	B-celični receptor
BSA	goveji serumski albumin (<i>angl. bovine serum albumine</i>)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CAP	ciklofosamid, doksorubicin, prednizolon
CD	celični označevalec (<i>angl. cluster of differentiation</i>)
CDC	s komplementom posredovana citotoksičnost (<i>angl. complement dependent cytotoxicity</i>)
CHOP	ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon
COP	ciklofosamid, vinkristin, prednizolon
CpG-ODN	imunostimulativni sintetični oligodeoksinukleotid
CREB	odzivni element za cAMP (<i>angl. cAMP response element binding protein</i>)
CT	računalniška tomografija
DC	dendritične celice
DMSO	dimetilsulfoksid
EBV	Eppstein-Barr virus
EC50	srednja efektivna koncentracija
EP4	prostaglandinski receptor E tipa 4
EPRAP	EP4 vezavni protein
FBS	fetalni goveji serum (<i>angl. fetal bovine serum</i>)
FC	fludarabin, ciklofosamid
FCR	fludarabin, ciklofosamid, rituksimab
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija (<i>angl. fluorescence in situ hybridisation</i>)
FITC	fluorescein izotiocianat

GWA	asociacijske študije na celotnem genomu (<i>angl. genome-wide association studies</i>)
Hb	hemoglobin
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IgV_H	gen variabilnega področja za težko verigo imunoglobulinov
IL	interlevkin
KLL	kronična limfocitna levkemija (<i>angl. chronic lymphocytic leukemia</i>)
KM	kostni mozeg
LCL	limfoblastoidne celične linije
MDR	protein z rezistenco na več učinkovin (<i>angl. multi-drug resistance protein</i>)
MEK	mitogen aktivirana proteinska kinaza
MFI	povprečna intenziteta fluorescence (<i>angl. median fluorescence intensity</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
NF-κB	jedrni dejavnik kappa B (<i>angl. nuclear factor kappa B</i>)
NK celice	naravne celice ubijalke
PBS	fosfatni pufer
PE	fluorescentno barvilo fikoeritrin (<i>angl. phycoerythrin</i>)
PET	pozitronska emisijska tomografija
PgE₁-OH	prostaglandin E ₁ alkohol
PGE₂	prostaglandin E ₂
PKA	protein kinaza A
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
PR	popolna remisija
Ptger4	gen, ki kodira receptor EP4
SDS	natrijev dodecil sulfat (<i>angl. sodium dodecyl sulfate</i>)

SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (<i>angl. single nucleotide polymorphism</i>)
TK	timidinska kinaza
TNF	dejavnik tumorske nekroze (<i>angl. tumor necrosis factor</i>)
TREG	regulatorne celice T
UKCL	Univerzitetni Klinični Center Ljubljana
X-ray	radiografija

1. UVOD

1.1. Levkemija

Levkemije so maligne bolezni krvotvornih organov. Za levkemije je značilna klonska proliferacija nenormalnih krvnih celic, ki so nefunkcionalne in se kopičijo v kostnem mozgu, krvi ali v sekundarnih limfatičnih organih. Glede na vrsto celic jih delimo na granulocitne (mieloične) in limfocitne (limfatične) levkemije, glede na klinično sliko, hitrost, invazivnost in način zdravljenja pa na akutne in kronične mieloične ter limfatične levkemije (1, 2).

1.2. Kronična limfocitna levkemija

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je rakava krvna bolezen, ki nastane iz limfocitov B (3). Predstavlja 11 % vseh rakavih krvnih bolezni in 25 % vseh levkemij in je najpogostejša med vsemi levkemijami (4, 5). V Združenih državah Amerike in v Evropi je pojavnost bolezni višja kot na Daljnem vzhodu (6). Incidenca bolezni je na zahodu med 1 do 5,5/100.000 prebivalcev. Zbolevalo predvsem starejši ljudje, mediana diagnoze bolezni se giblje med 67 in 72 leti. Skoraj dvakrat pogosteje zbolijo osebe moškega kot pa ženskega spola (1,7 : 1). KLL je zelo heterogena bolezen, njen klinični potek pa je zelo spremenljiv (4, 7). Pri sorodnikih bolnikov, ki so zboleli za KLL, je možnost, da bodo zboleli za KLL večja. Če je v družini prisotna bolezen pri dveh ali več družinskih članih, je možnost za pojav bolezni od 5 do 10 % (6).

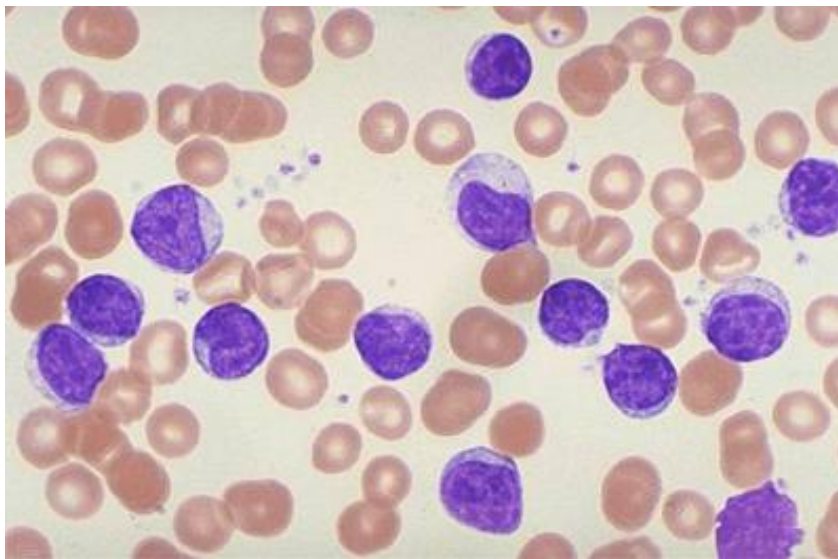
Zanimivo je, da med okoljskimi dejavniki, kot so ionizirajoče sevanje in kemikalije (benzen in različna topila) ter boleznijo ni dokazane nikakršne povezave (8). Levkemična transformacija celic se začne s posebnimi genskimi spremembami, ki vplivajo na proces apoptoze klonalnih celic B (7). KLL je še vedno neozdravljiva bolezen (2, 4).

1.2.1. Diagnoza

V zgodnji fazi bolezni simptomi KLL največkrat niso prisotni. Bolezen se velikokrat odkrije med rutinskim krvnim pregledom, ki kaže močno povečanje limfocitov B. Pri nekaterih bolnikih je pogosto prisotna utrujenost, povečana telesna temperatura, hujšanje, zmanjšanje apetita in nočno potenje. Včasih so prisotne tudi bakterijske in virusne okužbe (4, 9).

Izbor diagnostičnega testa za postavitev diagnoze KLL je odvisen od več dejavnikov. Pomembno vlogo ima bolnikova starost in njegovo zdravstveno stanje, znaki in simptomi, ki jih ima preiskovanec in dosednji rezultati diagnostičnih testov (10).

Najbolj uporabljeni diagnostični testi so krvni testi. Za potrditev bolezni KLL mora biti vsaj tri mesece v periferni krvi več kot 5×10^9 /L limfocitov B. Za bolezen je značilna klonskost limfocitov B, ki jo potrjujejo s pretočno citometrijo. Pri postavitvi diagnoze pa si lahko pomagamo tudi z razmazom periferne krvi, kjer pod mikroskopom vidimo male zrele limfocite, ki imajo zelo gosto jedro. V jedru nukleoli niso prisotni, celice B pa imajo zelo ozek rob citoplazme (Slika 1).



Slika 1: Razmaz periferne krvi bolnika s kronično limfocitno levkemijo.

V razmazu periferne krvi vidimo zrele limfocite, ki imajo zelo gosto jedro in ozek rob citoplazme. Povzeto po (11).

Punkcija in biopsija kostnega mozga pri večini pacientov za postavitev diagnoze nista potrebni, se ju pa velikokrat izvaja pred uvedbo terapije. Za nekatere paciente so preiskave kostnega mozga pomembne predvsem pri določanju prognoze (4, 9).

Pri diagnostiki KLL je pomembno določanje imunofenotipa oziroma celičnih imunoloških označevalcev. Za celice KLL je značilno izražanje antigena CD5 in površinskih antigenov CD19, CD20 in CD23, ki se jih določa s pretočno citometrijo iz vzorca polne krvi. Značilno je tudi šibko izražanje CD22/CD79b, površinskega Ig in odsotnost FMC7 (CD20 epitop) (12, 13).

V sklopu diagnostike, predvsem za napovedovanje kliničnega poteka bolezni, pa se vedno pogosteje izvajajo tudi preiskave molekularne genetike, kot je citogenetika, med katere spada metoda fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) (4). Za KLL ni značilna ena sama specifična kromosomska sprememba, s pomočjo katere bi potrdili diagnozo KLL, so pa pri različnih pacientih prisotne različne kromosomske nepravilnosti (14). Najpogostejše spremembe so delecija dolgega kraka kromosoma 13 (del13q14.1), delecija dolgega kraka kromosoma 11 (del11q22-23), trisomija kromosoma 12 in delecija kratkega kromosoma 17 (del17p13) (4).

Slikovne tehnike kot so radiografija (X-ray), računalniška tomografija (CT) in pozitronska emisijska tomografija (PET) se pri diagnostiki KLL uporabljajo redko (10). Uporablja se jih lahko pred samim zdravljenjem, da z njimi natančno določimo prizadetost organov, saj je KLL bolezen, ki zajame celotno telo (10, 15).

1.2.2. Prognoza bolezni

Obstajata dve splošno sprejeti metodi, (1) Rai in (2) Binet, s katerima lahko opredeljujemo razširjenost bolezni pri obravnavanem bolniku. Metodi temeljita na kliničnem pregledu in osnovnih laboratorijskih kazalcih. Razvrstitev po Raiju je bila osnovana leta 1975, dve leti kasneje pa tudi razvrstitev po Binetu (16). Razvrstitvi obsegata tri skupine glede na klinične značilnosti in posledično pričakovano dobo preživetja. V Sloveniji, na oddelku za Hematologijo, UKCL uporabljajo razvrstitev po Binetu (Preglednica 1).

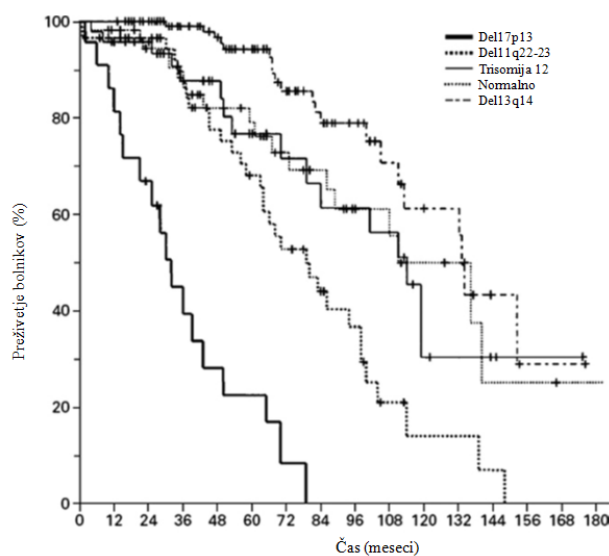
Preglednica 1: Razvrstitev po Binetu. Povzeto po (4).

Razvrstitev po Binetu zajema tri stadije glede na stopnjo ogroženosti bolnika.

Stadij	Klinične značilnosti	Mediana preživetja
A	Odsotni anemija in trombocitopenija, < 3 področja s povečanimi bezgavkami	12 let
B	Odsotni anemija in trombocitopenija, > 3 področja s povečanimi bezgavkami	5 let
C	Anemija (Hb < 100 g/L) in/ali trombocitopenija (< 100 x 10 ⁹ /L)	2 leti

Preiskovanci so razvrščeni v posamezne stadije glede na prisotnost/odsotnost anemije in trombocitopenije neodvisno od prvotnega vzroka, ki je lahko posledica infiltracije kostnega mozga, avtoimunskega obolenja ali hipersplenizma (17). KLL je zelo heterogena skupina bolezni, vendar z razvrstitvijo po Raiju ali po Binetu ni mogoče identificirati posameznikov, pri katerih bo bolezen zelo hitro napredovala in tistih, pri katerih je potek bolezni indolenten (18, 19).

Čeprav citogenetske nepravilnosti niso specifične za postavitev diagnoze KLL, pa nekatere dobro korelirajo s kliničnimi značilnostmi. Preiskovanci z del13q14, ki imajo osamljeno kromosomsko nepravilnost, imajo ugodnejši potek bolezni, kot če bi imeli povsem normalen kariotip. Pri petini preiskovancev najdemo trisomijo kromosoma 12, ki je večinoma povezana z atipično morfologijo in imunofenotipom, samo preživetje pa se ne razlikuje od tistih bolnikov, ki imajo KLL brez ugotovljenih citogenetskih nepravilnosti (Slika 2).



Slika 2: Kaplan-Meierjev diagram preživetja bolnikov s KLL ob prisotnosti določene kromosomske nepravilnosti.

Neugoden potek bolezni predstavljata del11q22-23 in del17p13, nekoliko boljšo prognozo imajo preiskovanci s trisomijo 12, preiskovanci z del13q14 pa imajo celo ugodnejši potek bolezni, kot če bi imeli normalen kariotip.

Del11q22-23 je povezana z izgubo gena za ATM (*angl. ataxia-telangiectasia mutated*) in pomeni neugoden in hitrejši potek bolezni KLL. Del17p13 pa je povezana z delecijo p53 in je daleč najbolj neugodna citogenetska nepravilnost. Oba gena za ATM in p53 nadzirata apoptozo in v primeru, da sta odsotna, prispevata k rezistenci na zdravljenje. Neugoden

potek bolezni lahko določimo tudi pri bolnikih, ki imajo prisotno več kot eno citogenetsko nepravilnost (4, 20, 21).

Preglednica 2: Najpogostejše kromosomske nepravilnosti.

Pri okoli 90 % bolnikov preiskava FISH pokaže spremenjen kariotip, preko njega pa lahko napovemo klinični potek bolezni.

Kromosomske nepravilnosti	Pojavnost	Proгноza
Del17p13	7 %	Najslabša
Del11q22-23	18 %	Slaba
Trisomija 12	16 %	Zmerna
Del13q14	55 %	Dobra

Pri napovedovanju kliničnega poteka bolezni se vedno pogosteje določa tudi prisotnost celičnih označevalcev ZAP-70 in CD38 ter mutacijski status gena variabilnega področja za težko verigo imunoglobulinov (IgV_H) (4). V primeru mutiranega gena za IgV_H je klinični potek bolezni ugodnejši kot v primeru nemutiranega. Analiza gena IgV_H temelji na DNA sekvenciranju, ki je tehnično zahtevno in ni dostopno vsem laboratorijem. Imunološka označevalca ZAP-70 in CD38, ki se nahajata na površini levkemičnih celic, pa se dokazujeta s pretočno citometrijo. Celice KLL, ki izražajo ZAP-70 in/ali CD38, korelirajo z ekspresijo nemutiranega gena za IgV_H in napovedujejo neugoden potek bolezni (22, 23, 24).

Pri napovedi preživetja bolnikov z diagnozo KLL imajo pomembno napovedno vrednost tudi serumski označevalci CD23, β_2 -mikroglobulin in timidinska kinaza (TK). Višje serumske vrednosti teh označevalcev napovedujejo manj ugoden potek bolezni (25).

1.2.3. Terapija

KLL je zelo heterogena oblika bolezni. Diagnoza se pogosto postavi v začetku bolezni, ko zdravljenje še ni potrebno. Bolniki, ki so razvrščeni po Binetu v stadij A, običajno ne prejema nikakršne terapije, se jih pa redno spremlja v hematološki ambulanti. Zdravljenje se uvede pri bolnikih, ki imajo prisotne simptome bolezni oziroma pri tistih, ki imajo aktivno bolezen. Zdravi se bolnike v stadiju C po Binetu, v stadiju B pa je vpeljava terapije odvisna od aktivnosti bolezni (4).

Na voljo so številna zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje KLL. Predvsem pri starejših bolnikih, ki imajo poleg KLL prisotne tudi nekatere kronične zaplete, se običajno uporablja monoterapija. Večinoma pa je zaželeno kombinirano citostatično zdravljenje z nukleozidnimi analogi in alkilirajočimi citostatiki, saj je bolj učinkovito (4).

V terapiji so učinkoviti nukleozidni analogi, med njimi predvsem purinski analog fludarabin (26). Njegova učinkovitost je odvisna od tega, ali se ga uporablja kot samostojno zdravilo pri zdravljenju KLL ali pa v kombinaciji z drugimi zdravili. Kot monoterapija je učinkovit pri okoli 80 % bolnikov, popolno remisijo (PR) bolezni pa dosežemo pri manj kot 10 % bolnikov. PR je stanje brez telesnih in laboratorijskih dokazljivih znakov bolezni in ga lahko potrdimo pri bolnikih, pri katerih po treh mesecih po zaključku terapije ne zaznamo več klonskosti celic in preostalih bolezenskih znakov. V kolikor fludarabin kombiniramo s ciklofosfamidom, ki je alkilirajoči citostatik, se učinkovitost poveča za 5 %, PR bolezni pa dosežemo pri več kot 20 % bolnikov.

Pogoste standardne sheme kombiniranega citostatičnega zdravljenja pri bolnikih s KLL so poleg FC (fludarabin, ciklofosfamid) še CHOP (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon), CAP (ciklofosfamid, doksorubicin, prednizolon) in COP (ciklofosfamid, vinkristin, prednizolon) (4).

Vse pomembnejša je kemoimunoterapija, kombinirano zdravljenje z monoklonskimi protitelesi in citostatiki. Take vrste terapija je FCR terapija, pri kateri se kombinira nukleozidni analog fludarabin, alkilirajoči citostatik ciklofosfamid in monoklonsko protitelo rituksimab (4, 27). Taka terapija je še učinkovitejša, saj dosežemo odgovor na zdravljenje pri 92,8 % bolnikov, delež PR bolezni pa je 44,5 % (28).

Pri zdravljenju KLL se uporabljajo tudi druga monoklonska protitelesa, kot na primer ofatumumab in alemtuzumab (29). Vpeljava alemtuzumaba v različnih shemah zdravljenja naj bi koristila predvsem bolnikom s slabo prognozo, torej bolnikom z delecijo 17p (4). Bolniki, ki imajo prisotno delecijo gena p53, se slabo odzivajo na konvencionalno terapijo (Poglavje 1.2.4). V kolikor je prisotna delecija gena p53, nukleozidni analogi ne morejo inducirati procesa apoptoze preko gena p53 (30). Terapije, ki v takih primerih nadomeščajo standardne terapije vsebujejo monoklonska protitelesa in visoke odmerke kortikosteroidov (31).

Kljub vsem zdravilom, ki so danes na trgu, pa PR bolezni ne dosežemo niti pri 50 % bolnikov. Razumevanje patofiziologije KLL je v zadnjih letih močno napredovalo. Preko številnih raziskav je postalo jasno, da ima pomembno vlogo v razvoju KLL tudi mikro-okolje in da je stimulacija KLL celic povezana s stimulacijo B-celičnega receptorja (BCR). Pojasnitev nekaterih molekularnih in znotrajceličnih signalih poti je odprla številne možnosti raziskovalcem pri razvoju novih zdravilnih učinkovin (31).

1.2.4. Fludarabin

Fludarabin je purinski analog, ki se lahko uporablja v monoterapiji, danes pa vse pogosteje v kombiniranem zdravljenju oziroma v kemoimunoterapiji. Pri fiziološkem pH je negativno nabit in ne more vstopiti v celice. Fludarabin je predzdravilo, ki se mora defosforilirati, da lahko vstopi v celice, tam pa se s pomočjo encimov ponovno fosforilira do trifosfata. V celici inhibira DNA polimerazo in na ta način zavira sintezo DNA. Inhibira tudi encime ribonukleotid reduktazo, DNA primazo in DNA ligazo. Vgradi se v DNA vijačnico in na ta način prepreči njeno podaljševanje. Fludarabin zavira sintezo DNA in povzroči apoptozo celic (26, 32).

1.2.5. Monoklonsko protitelo rituksimab

Rituksimab je himerno anti-CD20 monoklonsko protitelo, ki ga je odobrila EMA že leta 1998. Tarča rituksimaba je celični označevalec CD20, ki je prisoten na normalnih in maligno spremenjenih celicah B, gen za membranski protein CD20 pa se nahaja na kromosomu 11q12-q13.1 (33, 34). Mišji del protitelesa so variabilne regije, humani del pa obsega γ -1 in κ konstantna regija. Ko se protitelo veže na celični označevalec, sproži prenos pro-apoptotičnega signala preko več mehanizmov. Poleg indukcije apoptoze, rituksimab deluje tudi tako, da sproži mehanizme s protitelesi posredovane citotoksičnosti (ADCC) in s kompleментом posredovane citotoksičnosti (CDC) (35). Rituksimab deluje tudi preko NF- κ B signalne poti, saj zmanjšuje fosforilacijo zaviralnih proteinov I κ B, zmanjša aktivnost encima I κ B kinaze (IKK) in posledično zmanjšuje aktivnost vezave NF- κ B na molekulo DNA (36). Deluje tudi preko signalne poti CREB, več o njej pa v poglavju 1.8.

1.2.6. Monoklonsko protitelo ofatumumab

Ofatumumab je monoklonsko protitelo, ki se veže na transmembranski protein in celični označevalec CD20. Je protitelo druge generacije in je za razliko od rituksimaba popolnoma humano. V kliničnih študijah, ki so bile izvedene *in vitro*, so dokazali, da ima ofatumumab večjo učinkovitost pri zdravljenju KLL kot rituksimab. To razlagajo z dejstvom, da je pri vezavi ofatumumaba na CD20 udeleženih več aminokislin (37, 38). Ofatumumab deluje tako, da sproži mehanizme celične smrti posredovane z mehanizmi ADCC in CDC, ter preko NF- κ B signalne poti. Pri zdravljenju KLL se ga predpisuje v primeru rezistence pacienta na fludarabin in monoklonsko protitelo alemtuzumab (39).

1.2.7. Monoklonsko protitelo alemtuzumab

Alemtuzumab je rekombinantno, popolnoma humanizirano monoklonsko protitelo, ki se veže na celični označevalec CD52 (40). Celični označevalec CD52 je površinski antigen, ki ga izražajo zreli limfociti T in B in je sklopljen z glikozil-fosfatidilinozitolom (41). Gen za membranski protein CD52 se nahaja na kromosomu 1p36.11 (42). Monoklonsko protitelo deluje tako, da ob vezavi na CD52 sproži mehanizem ADCC (41). Uporablja se ga predvsem pri zdravljenju KLL, ki je neodzivno na terapijo s fludarabinom in pri bolnikih z ugotovljenimi kromosomskimi spremembami, kot so del11q in del17p (26).

1.2.8. Rezistenca na zdravljenje KLL

Pri bolnikih, ki imajo prisotno delecijo gena ATM ali delecijo gena p53, je potek bolezni najmanj ugoden. Razlog za to je, da odsotnost gena ATM in/ali gena p53 prispeva k rezistenci na standardne zdravilne učinkovine, ki se jih uporablja pri zdravljenju KLL, saj ne morejo inducirati procesa apoptoze. Večina teh bolnikov je odpornih na fludarabin, vendar kljub temu ostaja kar pomemben delež bolnikov, ki so prav tako odporni na fludarabin, pa nimajo prisotne nobene znane citogenetske nepravilnosti. Zato raziskovalci sklepajo, da na rezistenco vplivajo tudi poškodbe drugih genov, ki so udeleženi v mehanizme odzivanja na spremembe DNA (43). V takih primerih je potrebno vpeljati terapijo z zdravili, ki delujejo neodvisno od teh mehanizmov.

Oviro pri uspešnem zdravljenju pa predstavljajo tudi proteini z rezistenco na več učinkovin (*angl. multi-drug resistance protein* – MDR), to so membranske efluks črpalke za številne zdravilne učinkovine. Težavo lahko odpravimo, če uporabimo zdravila, ki zaobidejo

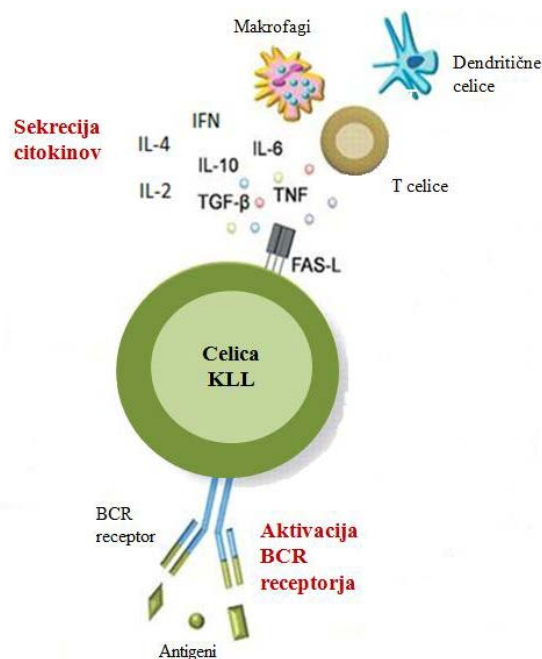
mehanizem odpornosti, oziroma v kolikor uporabimo zdravila, ki ne delujejo kot substrati teh proteinov, črpalk (44).

V današnjem času je rezistenca na terapijo vedno večji problem. Levkemične tumorske celice konstitutivno aktivirajo jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B in na ta način postanejo neodzivne na apoptozo in na terapijo. Zaradi tega se izvajajo številne raziskave, s katerimi bi lahko ugotovili vzroke rezistence in izoblikovali nove možnosti terapije.

1.3. Mikro-okolje levkemičnih celic

Mikro-okolje tumorja igra pomembno vlogo pri razvoju KLL in tudi pri razvoju terapije. Podatki kažejo, da se maligne celice B lahko uprejo apoptozi zaradi sposobnosti prilagajanja mikro-okolju in preko sinteze ter izločanja različnih preživetvenih dejavnikov/citokinov (45). Pri zdravih, funkcijsko in strukturno nespremenjenih celicah B, proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo limfocitov neposredno uravnava citokini in rastni dejavniki. V zadnjih dveh desetletjih je bila vloga citokinov in kemokinov v patogenezi in napredovanju KLL predmet številnih raziskav (46). Pri KLL so dokazali povišan nivo predvsem pro-vnetnih citokinov. V serumu nezdravljenih bolnikov so izmerili več kot 14-kratno povišanje INF- γ , povišane koncentracije interleukina 6 (IL-6), IL-10, IL-8 in TNF- α (47, 48). Ne glede na to, ali citokine proizvajajo celice KLL ali druge celice (regulatorne celice T – TREG, dendritične celice – DC), citokini neposredno in/ali posredno vplivajo na preživetje celic KLL (46). Pri KLL pa ni značilno samo povečano izločanje citokinov v B-KLL celicah, temveč tudi povečana aktivacija BCR receptorja (Slika 3) (49).

Najbolj izrazit prikaz vpliva mikro-okolja na celice KLL je spontana apoptoza celic KLL, ki jih gojimo *ex vivo* (50). *In vivo* so celice B pacientov s KLL zaustavljene v G₀ fazi celičnega cikla, njihovo preživetje je izboljšano in konstitutivno izražajo visoke nivoje anti-apoptotičnega onkoproteina Bcl-2 (51). V nasprotju s tem pa so celice KLL *in vitro* podvržene apoptozi in imajo znižano ekspresijo proteina Bcl-2 (52). Kljub temu, da so celice KLL *in vivo* razvojno zaustavljene, pa v prisotnosti IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α ali IFN- γ *in vitro* proliferirajo. Levkemične celice KLL lahko izločajo različne citokine, ki regulirajo proces apoptoze, saj delujejo kot preživetveni signali (Slika 3). V mehanizme preživetja celic B so vključeni IL-4, IFN- γ , IL-10 in TNF- α , saj naj bi delovali kot avtokrini rastni dejavniki na celice KLL (53 - 55).



Slika 3: Mikro-okolje levkemičnih B-KLL celic in BCR receptor.

Levkemične celice KLL in druge celice (TREG, DC) proizvajajo in izločajo številne citokine (primer: IL-2, IL-4, IL-10, TNF), ki posredno in/ali neposredno vplivajo na preživetje celic KLL. Velik pomen ima tudi BCR receptor, ki ima pri KLL povečano stimulacijo, signaliziranje preko njega, pa je prav tako povišano (46, 57).

1.4. B-celični receptor (BCR)

Limfociti B imajo na svoji površini B-celični receptor (BCR), ki je sestavljena molekula imunoglobulina M (IgM). BCR receptor ima kratek intracelularni rep, zato ne more prenesti signalov neposredno do jedra celice. Z invariantnim imunoglobulinom α in β (Ig- α in Ig- β), BCR receptor tvori kompleks, ki vsebuje tudi protein ITAM (*angl. Immunoreceptor tyrosine activating motif*) in na ta način lahko sproži kaskado reakcij kot odgovor na vezavo antigena. Do kaskade reakcij, ki vodijo v aktivacijo imunskih odgovorov organizma, lahko pride samo pri vezavi antigena na zrele limfocite B. Pri vezavi antigena na nezrele limfocite B pa se sproži proces apoptoze. Stimulacija BCR receptorja povzroči, da se tirozin, ki je prisoten tudi na proteinih CD19, CD22 in CD79a/b fosforilira, vodi pa tudi v fosforilacijo fosfolipaz in kinaz (56).

V razvoju KLL ima poleg mikro-okolja pomembno vlogo tudi BCR receptor. Stimulacija BCR receptorja in torej signaliziranje preko njega je pri bolezni povišano (Slika 3) (57).

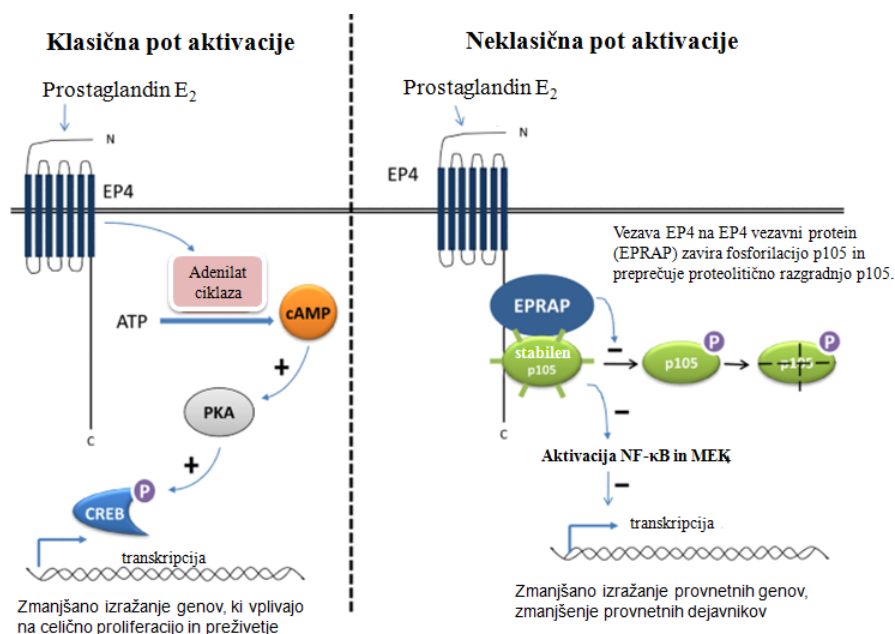
Če se na BCR receptor, ki se nahaja na nezrelih limfocitih B, veže telesu lasten antigen se sproži proces apoptoze. Poleg tega pa aktivacija receptorja zviša tudi ekspresijo gena

Ptger4, ki kodira receptor EP4. Receptor EP4 je torej mediator apoptoze in obojetna tarča za zdravljenje KLL, za katero je značilno povečano preživetje limfocitov B (58).

1.5. Receptor EP4

Med vsemi prostaglandini se v telesu v največjih količinah sintetizira PGE_2 in ima veliko različnih bioloških učinkov (59). Njegovo delovanje je pogojeno z vezavo na receptor. Znani so štiri podtipi E_2 receptorjev, EP1, EP2, EP3, EP4, in vsi so transmembranski proteini, ki so sestavljeni iz sedmih transmembranskih domen in sklopljeni z G-proteini (58, 60).

Številne študije se potrdile vpletenost receptorja EP4 v rakavih boleznih, njegova aktivacija pa sproži tudi apoptozo v limfoblastih B (61). Gen *Ptger4*, ki se nahaja na kromosomu 5 (5p13.1), kodira receptor EP4 in vsebuje tri eksone, vendar je prvi ekson nekodiran.



Slika 4: Shematski prikaz klasične in neklasične poti aktivacije receptorja EP4. Povzeto po (62).

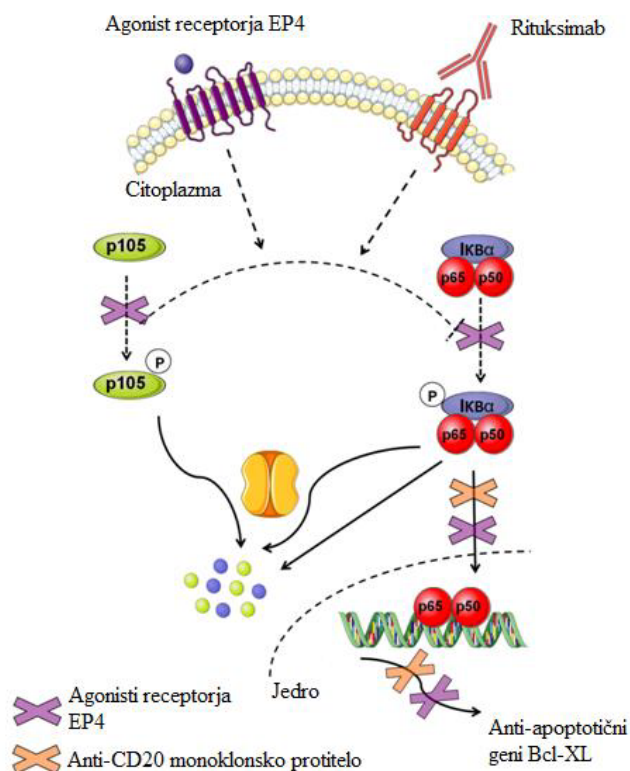
Pri klasični poti aktivacije vezava PGE_2 na receptor EP4 poveča intracelularni cAMP preko aktivacije adenilat ciklaze. cAMP aktivira protein-kinazo A (PKA), ki fosforilira od cAMP-odzivni-vezavni protein (CREB). Le ta se veže na določeno DNA sekvenco in poveča transkripcijo genov. **Pri neklasični poti aktivacije** pa se EP4 vezavni protein (EPRAP) veže neposredno na citoplazemski del receptorja EP4. EPRAP je povezan s p105. Kompleks EPRAP-p105 zavira aktivacijo jedrnega transkripcijskega dejavnika (NF- κ B) in mitogen aktivirano proteinsko kinazo (MEK). Kompleks zavira aktivacijo NF- κ B in MEK zato, ker preprečuje fosforilacijo p105 in njegovo razgradnjo, na ta način pa zmanjša vnetno izražanje genov (62).

Aktivacija receptorja EP4, ki je sklopljen z G_{as} -proteinom, zviša koncentracijo cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) v celicah preko stimulacije adenilat ciklaze. Opisana je klasična pot aktivacije receptorja EP4, poznana pa je tudi neklasična pot, ki je neodvisna od cAMP in v limfocitih B deluje supresivno na jedrni transkripcijski dejavnik (NF- κ B) (Slika 4) (62).

1.6. Jedrni transkripcijski dejavnik kappa B (NF- κ B)

NF- κ B je sekvenčno specifičen transkripcijski dejavnik, za katerega je znano da sodeluje v vnetnih in prirojenih imunskih odzivih. Raziskave kažejo, da je transkripcijski dejavnik vpleten tudi v razvoj tumorjev (63). NF- κ B je proteinski kompleks, pri katerem je poznanih pet različnih članov družine teh proteinov in sicer p52/p100 (NF- κ B2), p50/p105 (NF- κ B1), c-Rel, p65 (RelA) in RelB. Vsi ti proteini delujejo kot dimerni transkripcijski dejavniki in vplivajo na izražanje genov (64). Proteini družine NF- κ B, dimeri, se v citoplazmi nahajajo v neaktivni obliki, saj so vezani z zaviralnimi proteini I κ B. NF- κ B se aktivira, ko se preko različnih mehanizmov domena NF- κ B sprosti od inhibitorja I κ B. Ko pride do sprostitve, se NF- κ B lahko premakne v jedro, se veže na promotorske elemente proteinov Bcl-xL in Bcl-2, ki sta anti-apoptotična proteina, in uravnava njuno izražanje. V jedru se lahko veže tudi na promotorske elemente tumor nekrotizirajočega dejavnika α (TNF- α).

V normalnih, funkcijsko nespremenjenih celicah je aktivacija NF- κ B prehodna in inducibilna. V malignih celicah pa pride do spremembe in postane NF- κ B konstitutivno aktiviran (65, 66). Zaradi konstitutivne aktivacije je preživetje celic daljše, maligna obolenja napredujejo, pojavlja pa se tudi rezistenca rakavih celic na kemoterapevtike. Z agonisti receptorja EP4 in z anti-CD20 monoklonskimi protitelesi lahko vplivamo na NF- κ B transkripcijsko signalno pot, s tem spoznanjem pa so se odprle tudi nove možnosti zdravljenja KLL (67).



Slika 5: Agonist receptorja EP4 in rituksimab inhibirata NF-κB signalno pot in tako povzročita apoptozo celic.

V citoplazmi so dimeri NF-κB vezani z inhibitornimi proteini IκB. Agonisti receptorja EP4 in anti-CD20 monoklonska protitelesa preprečijo fosforilacijo proteinov IκB in posledično njihovo razgradnjo, kar preprečuje transport NF-κB v jedro celice (64, 67).

1.7. Ciklični adenozin monofosfat (cAMP)

Ciklični adenozin monofosfat (cAMP) je signalna molekula, katerega znotrajcelično koncentracijo uravnava dva encima - adenilat ciklaza in ciklični nukleotid fosfodiesteraza. cAMP nastane, ko encim adenilat ciklaza pretvori ATP v cAMP in deluje na več molekul, najbolj poznano in raziskano delovanje cAMP pa je aktivacija proteina kinaze A (PKA) (68). cAMP signalna pot je postala zanimiva tudi na področju zdravljenja KLL, saj z zvišanjem intracelularnega cAMP lahko vplivamo na apoptozo celic (69).

1.8. Odzivni elementi za cAMP (CREB)

CREB (*angl. cAMP response element binding protein*) je transkripcijski dejavnik, katerega delovanje je uravnava preko fosforilacije s protein kinazo A. Fosforilirani CREB dimer se na molekulo DNA veže na odzivne elemente za cAMP (*angl. cAMP response element binding* - CREB), združitev dveh proteinov CREB pa olajša beljakovinski strukturni motiv levčinske zadrge. Ugotovljeno je bilo, da je za učinkovito dimerizacijo in transkripcijo

potrebno proteine fosforilirati na več mestih, to pa daje slutiti, da je regulacija CREB uravnavana preko več različnih kinaz (70).

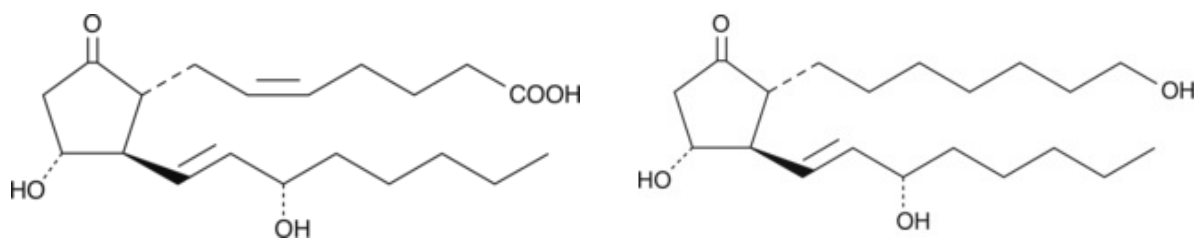
cAMP in CREB signalni poti sta močno vpleteni v regulacijo številnih bioloških funkcij, kot so od rastnih dejavnikov odvisna celična proliferacija in preživetje, homeostaza glukoze, spermatogeneza, cirkadialni ritmi, in druge. Preko signalne poti CREB deluje tudi monoklonsko protitelo rituksimab (71).

1.9. Agonisti in antagonisti receptorja EP4

Prostaglandini delujejo skoraj v vseh celicah in tkivih, njihovi učinki pa so zelo raznoliki. V telesu se v največjih količinah sintetizira PGE_2 , ki je endogeni ligand za 4 podtipe receptorja za PGE_2 : EP1, EP2, EP3 in EP4 (58, 59).

Razviti so bili selektivni agonisti in antagonisti vseh štirih podtipov receptorjev za prostaglandin E_2 , njihov potencial pa je bil prepoznan pri regulaciji številnih bolezenskih procesov (72). Spekter delovanja agonistov in antagonistov je izjemno obsežen in kompleksen, saj se njihovi učinki razlikujejo glede na vrsto celic oziroma tkiv.

Mnoge študije so potrdile vpletenost receptorja EP4 v rakavih boleznih, aktivacija receptorja EP4 pa vodi v apoptozo v limfocitih B. Receptor EP4 aktivirajo endogeni ligand (PGE_2) in selektivni (PgE1-OH) agonisti receptorja EP4 (Slika 6).



Slika 6: Strukturna primerjava med endogenim ligandom PGE_2 (levo) in selektivnim agonistom receptorja EP4, PgE1-OH (desno). Povzeto po (73).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo ovrednotiti prostaglandinski receptor EP4 kot potencialno tarčo v terapiji kronične limfocitne levkemije (KLL).

Celice KLL bomo izolirali iz polne krvi bolnikov z diagnozo KLL, ki bodo privolili v sodelovanje v raziskavi, odobreno s strani Komisija RS za medicinsko etiko (KME), št. 93/12/10. S konfokalno mikroskopijo in pretočno citometrijo bomo najprej preverili prisotnost receptorja EP4 na izbranih celicah. Proti-rakavo učinkovitost agonista receptorja EP4 na malignih celicah KLL bomo preverjali z vrednotenjem živosti celic s testom metabolne aktivnosti PrestoBlue po tretiranju s selektivnim agonistom PgE1-OH.

Z namenom vrednotenja selektivnega delovanja PgE1-OH bomo s programom GraphPad Prism določili vrednosti EC50 in jih primerjali z vrednostmi določenimi na limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL), pridobljenih iz krvi zdravih darovalcev. Nadalje bomo s pretočno citometrijo določili ekspresijo receptorja EP4 na celicah KLL in preverili ali je izražanje receptorja EP4 na maligno spremenjenih limfocitih B višje od izražanja receptorja EP4 na zdravih limfocitih B.

Glede na to, da je vpliv mikro-okolja v razvoju KLL zelo velik, bomo preverili, ali agonist receptorja EP4 modulira izločanje citokinov v celicah KLL. Preverili pa bomo tudi vpliv kariotipa in stadija bolezni KLL na proti-rakavo učinkovitost agonista receptorja EP4.

Terapevtsko uporabnost agonista receptorja EP4 bomo vrednotili s preverjanjem sinergističnega delovanja PgE1-OH in standardne terapevtske učinkovine fludarabina, ter monoklonskih protiteles (rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab). Sinergistične učinke bomo vrednotili s programom CompuSyn.

Za namene nadaljnjih raziskav in potrditvenih študij pa bomo pripravili tudi KLL biobanko, ki bo vsebovala ustrezno shranjene DNA, RNA, proteine in celice bolnikov z diagnozo KLL.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Kemikalije

Preglednica 3: Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
Etilni alkohol 96 %	ECP, d.o.o., Trzin, Slovenija
Raztopina tripanskega modrila	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Triton-X 10 %	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
ProLong [®] Gold antifade reagent	Invitrogen, ZDA
Trizol [®] reagent	Life technologies, ZDA
Nonident P40	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
SDS	Promega, Madison, WI, ZDA
Ficoll-Paque [™] reagent	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
Obogatitvena mešanica RosetteSep [®] humanih celic B	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
PgE ₁ -OH	Cayman Chemical, MI, ZDA
PgE ₂	Cayman Chemical, MI, ZDA
Fludarabin fosfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
PrestoBlue [™] cell viability reagent	Invitrogen, ZDA

3.1.2. Kompleti za analize

Preglednica 4: Kompleti za analize.

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 5: Pufri in raztopine.

Pufri in raztopine	Sestava
10 x PBS (pH 7,4)	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
Sestavine smo natehtali in jih raztopili v vodi, uravnali pH in avtoklavirali.	
1 x PBS	10 x PBS redčimo 1 : 10 z ultračisto vodo in avtoklaviramo
4 % raztopina formaldehida	40 mL 10 % formaldehida 60 mL ultračista H ₂ O
3 % raztopina BSA v PBS	100 mL PBS 3 g BSA
0,2 % raztopina Tritona	100 µL Tritona X-100 50 mL PBS
Pufer RIPA	1 % Nonidet P40 0,5 % natrijev deoksiholat 0,1 % SDS 0,004 % NaN ₃ ultračista H ₂ O

3.1.4. Protitelesa in fluorescenčna barvila

Preglednica 6: Protitelesa in fluorescenčna barvila.

Protitelo / Fluorescenčno barvilo	Proizvajalec
Barvilo Hoechts 33342 (c = 100 µM)	Molecular probes [™] , Invitrogen

Poliklonsko kunčje primarno protitelo proti C- terminalnemu delu humanega receptorja EP4; 1mg/mL	Cayman chemical, MI, ZDA
Poliklonsko kunčje primarno protitelo proti N- terminalnemu delu humanega receptorja EP4; 1 mg/mL	Biotech, Abington, VB
Monoklonsko sekundarno kozje protitelo proti Fc regiji kunčjega IgG, konjugirano z barvilom Alexa Fluor®488; 2 mg/mL	Molecular probes, Eugene Oregon, ZDA
Monoklonsko mišje protitelo proti humanemu označevalcu CD19, konjugiramno z barvilom PE	BD Pharmingen™, ZDA
Monoklonsko mišje protitelo proti humanemu označevalcu CD20, konjugirano z barvilom FITC	BD Pharmingen™, ZDA

3.1.5. Gojišča in sestava

Preglednica 7: Gojišča in sestava.

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	25 mL RPMI medij (KLL) 20 mL FBS 5 mL DMSO

3.1.6. Laboratorijska oprema

Preglednica 8: Laboratorijska oprema.

Aparatura/Material	Proizvajalec
Avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
BD Plastipak™ brizgalke	Becton Dickinson, S.A, Španija
BD Microlacne™ 3 igle	Becton Dickinson, S.A, Španija
Cell-Quest®software za obdelavo podatkov na FACS	Becton Dickinson, New Jersey, ZDA
Centrifuge	Eppendorf centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija Tehtnica CENTRIC 322 A, Železniki, Slovenija Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, Slovenija
Centrifugirke (15 in 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
Flow tubes	Invitrogen, ZDA
Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Fluorescenčni mikroskop	Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Hemocitometer	Brand Neubauer, Nemčija
Hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
Inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, 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 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Plastične sterilne mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96	TPP, Trasadingen, Švica

vdolbinami)	
Plastične sterilne črne mikrotitrne ploščice (96 vdolbin)	Nunc TM Delta Surface, Nemčija
Posode T-flask za gojenje celičnih kultur	TPP, Trasadingen, Švica
Mikrotitrski čitalec (Safire ^{2TM} Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
Multikanalne pipete (100, 300 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete (do 10, 200 in 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)
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, 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
Vodna kopel	Mikro+polo, Maribor, Slovenija Mettler, Schwabach, Nemčija
Vortex (Vortex GENIE 2)	Scientific industries, Orlando, Florida, ZDA
Zamrzovalnik - 80°C	Forma scientific, Midland, ON, Kanada

3.2. Metode dela s celicami

Delo s celičnimi kulturami zahteva aseptično okolje, ki ga zagotavljamo s posebnim prilagojenim laboratorijem s komoro z laminarnim pretokom zraka (LAF komora). Nameščen je HEPA (angl. *high efficiency particle*) filter, ki odstranjuje kontaminante iz zraka. Pred uporabo površino komore razkužimo s 70 % etanolom. Z njim moramo razkužiti tudi vso opremo in material, ki ga bomo potrebovali pri delu v LAF komori. Pred samim delom moramo komoro vsaj za 20 minut obsevati še z UV-svetlobo, da zagotovimo popolno sterilnost. Pri eksperimentalnem delu uporabljamo zaščitno haljo, obutev, ki je namenjena nošenju le v celičnem laboratoriju in zaščitne rokavice, ki jih pred in po samem delu vedno razkužimo s 70 % etanolom (74, 75).

3.2.1. Celične kulture

LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE

Humane limfoblastoidne celične linije (LCL) so bile pridobljene na Univerzi v Tel Avivu, v nacionalnem izraelskem genetskem laboratoriju. Pridobljene so bile iz krvi zdravih odraslih prostovoljcev. Iz polne krvi zdravih darovalcev so izolirali limfocite in jih transformirali z Epstein-Barr virusom (EBV) (76). Pri eksperimentalnem delu smo uporabili celice desetih zdravih prostovoljcev.

Celice smo gojili v mediju RPMI z dodatki v inkubatorju, ki zagotavlja ustrezne pogoje za njihovo rast. Celice LCL smo subkultivirali in vzdrževali optimalno koncentracijo ($1-2 \times 10^6$ celic/mL).

CELICE KLL

Študija ima dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko, št. 93/12/10. V raziskavo smo vključili bolnike, ki so imeli potrjeno diagnozo kronične limfocitne levkemije. Med ambulantnim pregledom na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana (UKCL) smo bolnike seznanili z možnostjo sodelovanja v raziskavi in jih povabili, da se vanjo prostovoljno vključijo. Pred vključitvijo so bili seznanjeni o cilju klinične raziskave, vsebini raziskave, o naših pričakovanjih, tveganjih, o zaupnosti podatkov in o kontaktnih osebah, kamor so se lahko obrnili, če so imeli dodatna vprašanja v zvezi s sodelovanjem v raziskavi. Ko je bolnik podpisal pristanek na sodelovanje, so mu v laboratoriju dodatno odvzeli majhen vzorec krvi (~ 5 mL). Iz polne krvi bolnikov smo nato izolirali celice KLL po metodi, ki opisana v podpoglavju 3.3.2.

3.2.2. Odmrzovanje celic

Celične kulture LCL n KLL smo shranjevali v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kriovialah. Celice LCL smo hitro, celice KLL pa počasi odmrznili in jih z 1 mL pipeto počasi prenesli v na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ segret ustrezen medij. Sledilo je centrifugiranje pri 1200 rpm, 5 minut, nato pa smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v svežem mediju. Za eksperimentalno delo smo uporabili tiste celične kulture, pri katerih odstotek mrtvih ni presegel 10 %.

3.2.3. Štetje celic

Celice smo šteli pod invertnim mikroskopom s pomočjo hemocitometra in tripanskega modrila. Tripansko modrilo obarva mrtve in poškodovane celice modro, žive celice pa imajo intaktno membrano in zato ne vsebujejo tripana ter svetijo belo (77, 78).

Odpipetirali smo 10 µL celične suspenzije in ji dodali enako količino tripanskega modrila. Zmes smo dobro premešali s pipetiranjem in jo 10 µL prenesli na hemocitometer. Žive in mrtve celice smo prešteli v štirih vidnih poljih in po formuli izračunali število živih celic.

Enačba 1: Enačba za računanje 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 živih / mrtvih celic v posameznem polju hemocitometra

DF – faktor redčenja

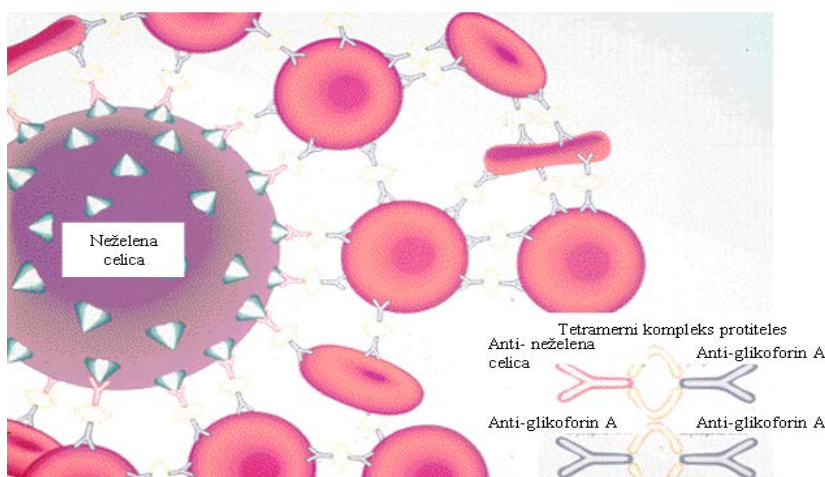
3.3. Izolacija celic B iz polne krvi

Celice B lahko izoliramo iz polne krvi z uporabo dveh različnih tehnik – z uporabo metode, ki temelji na negativni selekciji ali z uporabo metode, ki temelji na pozitivni selekciji.

V magistrski nalogi smo celice B izolirali z uporabo negativne selekcijske metode. Razlog za to je, da smo celice izolirali iz svežih vzorcev in, da sam postopek izolacije celic funkcijsko ne spremeni. Pri uporabi pozitivne selekcijske metode se namreč uporabljajo magnetne kroglice, ki so konjugirane neposredno na protitelesa, specifična za B celično determinanto CD19 in ob vezavi na celice B jih lahko funkcijsko spremenijo. Prav tako se pozitivna selekcijska metoda uporablja predvsem pri delu s predhodno zamrznjenimi celicami, mi pa smo celice B izolirali iz svežih vzorcev (79).

Celice B smo torej izolirali s postopkom RosetteSep, ki temelji na negativni selekcijski metodi. Za izolacijo celic B smo uporabili reagent - obogatitveno mešanico RosetteSep[®] humanih celic B, ki vsebuje kombinacijo mišjih in podganjih monoklonskih protiteles. Monoklonska protitelesa so vezana na bispecifičen tetramerni kompleks protiteles, ki se vežejo direktno na površinske celične antigene na humanih hematopoetskih celicah (CD2,

CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) in na glikoforin A, ki se nahaja na eritrocitih (Slika 7) (79, 80).



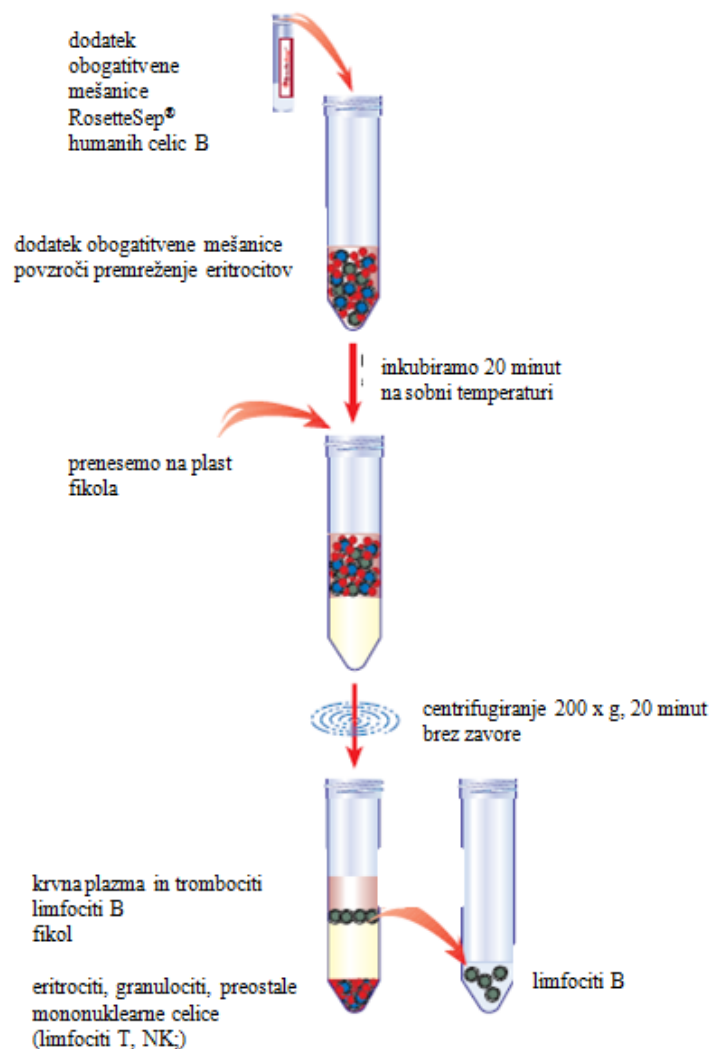
Slika 7: Premreženje eritrocitov s tetramernim kompleksom protiteles in neželenimi celicami. Povzeto po (81).

Celice B smo izolirali iz polne krvi pacienta. Pred samo izolacijo smo morali zagotoviti, da so bili vsi reagenti, centrifuga in vzorci ogreti na sobno temperaturo ($\sim 22^{\circ}\text{C}$). Prvi korak postopka izolacije celic B je dodatek obogatitvene mešanice RosetteSep[®] humanih celic B ($50\ \mu\text{L}/\text{mL}$) vzorcu polne krvi ($\sim 5\ \text{mL}$) in 20 minutna inkubacija na sobni temperaturi. Po 20 minutah smo vzorec redčili z enakim volumenom raztopine PBS + 2 % FBS in nežno premešali. Razredčen vzorec smo prenesli v epruveto s fikolom ($\sim 5\ \text{mL}$). Vzorec smo prenesli počasi in previdno, saj mora ostati meja med fikolom in krvjo ostro ločena.

Sledilo je 20 minutno centrifugiranje pri $200 \times g$ pri sobni temperaturi, brez zavore. Zaradi večje specifične gostote so se eritrociti, granulociti, limfociti T in celice NK posedli na dno epruvete, pod plast fikola. Celice B so se nahajale nad plastjo fikola. Debelina plasti celic B je odvisna od količine celic v vzorcu. V supernatantu, nad plastjo celic B, so se nahajali trombociti, PBS, krvna plazma in maščobe (Slika 8).

Po centrifugiranju smo s pipeto previdno odstranili zgornjo plast do približno 1 cm nad plastjo celic B. Plast celic B smo previdno krožno pobrali in celice prenesli v novo epruveto s svežim gojiščem ($\sim 13\ \text{mL}$). Pri tem smo pazili, da smo prenesli čim več celic B in čim manj fikola, ki je toksičen za celice.

Sledilo je centrifugiranje pri 1700 rpm, 7 minut. Po centrifugiranju smo celice prenesli v sveže gojišče, jih prešteli s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa in hemocitometra in jih čez noč inkubirali na 37 °C, 5 % CO₂.

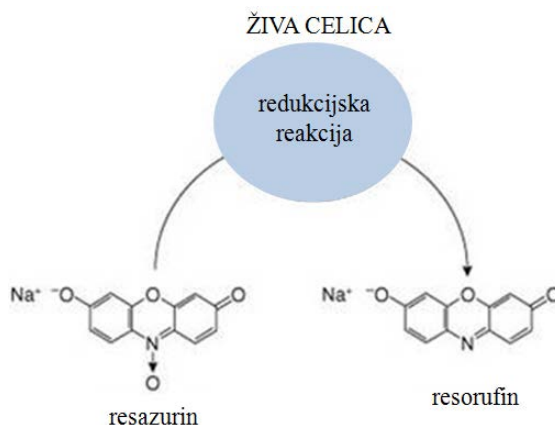


Slika 8: Shema postopka izolacije limfocitov B. Povzeto po (80).

3.4. Test presnovne aktivnosti celic

Za test presnovne aktivnosti celic smo uporabili reagent PrestoBlue, ki vsebuje modro barvilo resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi) in se uporablja kot indikator celične živosti. Ekscitacijska valovna dolžina reagenta je 540 nm, emisijska valovna dolžina pa 590 nm. V oksidiranem stanju resazurin ne fluorescira, mitohondrijski encimi v celicah pa prenesejo elektrone iz NADPH + H⁺ na resazurin in ga reducirajo v resorufin. Žive celice torej pretvarjajo resazurin v resorufin, ki fluorescira, fluorescenco pa merimo

na mikrotitrskem čitalcu. Jakost fluorescence je sorazmerna s številom presnovno aktivnih živih celic (82, 83).



Slika 9: Pretvorba nefluorescenčnega barvila resazurin v fluorescenčno barvilo resorufin. Povzeto po (83).

Rezultat testa PrestoBlue je jakost fluorescence, vendar nam ta še ne pove kakšen odstotek celic je živih. Živost celic smo določili tako, da smo odstotek živih celic normirali glede na kontrolo topila (DMSO).

3.4.1. Postopek določanja živosti celic po tretiranju s spojinami in monoklonskimi protitelesi

Pripravili smo presežek suspenzije celic B s koncentracijo $4,0 \times 10^5$ celic/mL, dobro premešali in napipetirali na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami. Vsako vdolbinico smo tretirali z različno koncentracijo spojin (1, 5, 10, 25, 50, 100 μ M). V eksperimentalnem delu smo uporabili tri različne spojine - selektivni agonist receptorja EP4, PgE1-OH, endogeni ligand PGE₂ in spojino, ki se uporablja v standardni terapiji KLL, fludarabin. Celice smo tretirali tudi z različnimi koncentracijami monoklonskih protiteles- rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab (1, 10 ter 100 μ g/mL) in različnimi koncentracijami PgE1-OH (1 in 10 μ M). Uporabili pa smo tudi kombinacijo fludarabina (1, 5 in 10 μ M) in PgE1-OH (1, 5 in 10 μ M).

V vsaki mikrotitrski ploščici smo pustili dve vdolbinici netretirani, saj predstavljata kontrolo in kontrolo topila (DMSO). Iz vsake vdolbinice smo prenesli po 100 μ L alikvota v triplikatu na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami. Alikvote smo prenašali z multikanalno pipeto v črno mikrotitrsko ploščico, saj smo merili fluorescenco. V prvi stolpec smo prenesli netretirane celice, ki so predstavljale kontrolo, v drugi stolpec

netretirane celice z 0,2 % DMSO, v ostale stolpce pa celice tretirane s spojinami ali s spojino in monoklonskimi protitelesi v naraščajočih koncentracijah. Vedno smo zraven dodali tudi sam medij RPMI, saj predstavlja slepo kontrolo. Tako pripravljene mikrotitrne ploščice smo inkubirali v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂), nato pa po 21h in 45h dodali v vsako vdolbinico 10 µL reagenta PrestoBlue. Po treh urah inkubacije reagenta PrestoBlue s celičnimi alikvoti smo merili fluorescenco nastalega resorufina pri 590 nm. Vrednosti EC₅₀ smo izračunali s programom GraphPad Prism.

3.5. Pretočna citometrija

Pretočna citometrija (*angl. flow cytometry* ali tudi *Fluorescence-Activated Cell Sorting – FACS*) je tehnika s katero merimo in analiziramo fizikalne in biokemične lastnosti posameznih celic (84). Celice pri analizi s pretočnim citometrom potujejo skozi laserski snop svetlobe in pri tem oddajajo svetlobne signale, ki so odvisni od strukturnih značilnosti celic. Najpomembnejše pri tej tehniki je, da so vzorci v obliki suspenzije, saj je le na ta način možno hidrodinamsko fokusiranje, ki omogoča analizo vsake celice posebej (85). Svetlobni žarek, ki zadane celico, se lomi ali odbije, lahko pa se tudi absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Spremembe beleži sistem fotodetektorjev (86). Pretočni citometer nam omogoča določanje več parametrov hkrati (85, 86).

V našem eksperimentalnem delu smo ga uporabili za določanje ekspresije receptorja EP4, analizo celičnega označevalca CD19 in CD20 in za analizo citokinov.

3.5.1. Analiza ekspresije receptorja EP4

Postopek priprave celične suspenzije za analizo ekspresije receptorja EP4 s pretočnim citometrom:

- Pripravili smo celično suspenzijo celic z $0,5 \times 10^6$ celic;
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm in odstranili supernatant;
- fiksirali smo celice s 500 µL 4% raztopine formaldehida (10 minut);
- centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali z 1 mL PBS;
- permeabilizirali smo celice s 500 µL 0,5 % raztopino Tritona X-100 v PBS (10 minut);

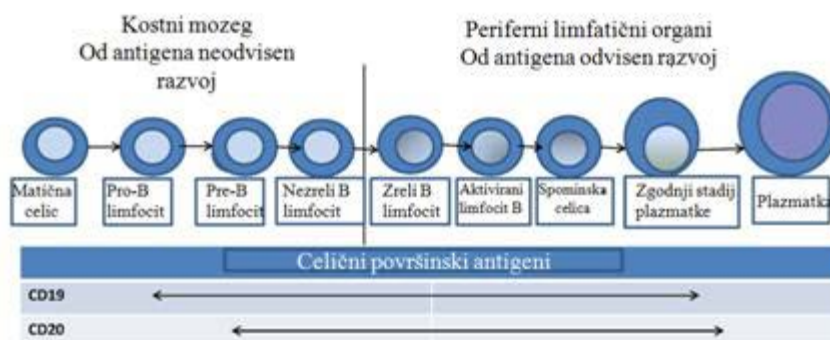
- centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali z 250 μ L PBS;
- celice smo inkubirali z 250 μ L 3% raztopine BSA v PBS (30 minut);
- centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali z 250 μ L PBS;
- inkubirali smo s 125 μ L raztopine primarnih protiteles proti receptorju EP4 (1:200 v 3 % raztopini BSA v PBS, 60 minut*);
- centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali z 1 mL PBS;
- inkubirali smo z 250 μ L raztopine sekundarnih protiteles (1:5000 v 3 % raztopini BSA v PBS, 60 minut**);
- centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali s PBS;
- celice smo resuspendirali v 250 μ L svežega PBS;
- analizirali smo s pretočnim citometrom.

* V kontrolo nismo dali primarnih protiteles.

** Inkubirali smo v temnem prostoru.

3.5.2. Analiza celičnega označevalca CD19 in CD20 s pretočnim citometrom

Celična površinska antigena CD19 in CD20 sta izražena na limfocitih B v večini razvojnih stopnjah (Slika 10). CD20 je protein, ki se formira na razvojni stopnji pre-B limfocitov in je prisoten do zgodnjega stadija plazmatk (87). Hkrati s CD20 se običajno na celicah B izraža tudi antigen CD19. Antigen CD19 je specifičen za limfocite B in je prisoten na celicah B v vseh stopnjah razvoja, razen na plazmatkah (88, 89).



Slika 10: Razvojne stopnje limfocita B in izražanje celičnega površinskega antigena CD19 in CD20. Povzeto po (90).

Limfociti B se razvijejo iz matične celice. Celični označevalec CD19 je prisoten na celicah B v vseh razvojnih stopnjah, razen na plazmatkah, celični označevalec CD20 pa se formira na razvojni stopnji pre-B limfocitov. V KM nezreli limfociti že sintetizirajo lahke verige κ ali λ in izražajo obliko BCR receptorja. V KM dozoriijo celice B do nezrelih limfocitov, nato pa se izplavljajo v krvni obtok, kjer dokončno dozoriijo in se v perifernih limfatičnih organih srečajo z antigeni (90).

Postopek priprave celične suspenzije za analizo celičnega označevalca CD19 in CD20 s pretočnim citometrom:

- Pripravili smo celično suspenzijo z $0,5 \times 10^6$ celic in odpipetirali v FACS centrifugirke (1x CD19, 1x CD20 in 1x neoznačene);
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm in odstranili supernatant;
- celice smo homogenizirali v 100 μ L svežem PBS;
- v CD19 označene FACS centrifugirke smo dodali 5 μ L monoklonskega mišjega protitelesa proti humanemu označevalcu CD19, ki je konjugirano z barvilom PE;
- v CD20 označene FACS centrifugirke smo dodali 5 μ L monoklonskega mišjega protitelesa proti humanemu označevalcu CD20, ki je konjugirano z barvilom FITC;
- inkubirali smo 15 minut v temnem prostoru in nato analizirali s pretočnim citometrom.

3.5.3. Analiza citokinov s pretočnim citometrom

Pripravili smo celično kulturo s koncentracijo 1×10^6 celic/ mL v svežem mediju. Celice LCL in celice KLL smo pre-tretirali z 10 μ M PgE1-OH, po 1 uri pa stimulirali z 0,5 μ M ionomicinom in 3,33 ng/mL PMA (forbol 12-miristat 13-acetat) in jih inkubirali za 24h. Kot kontrolo smo uporabili netretirane celice stimulirane z ionomicinom/PMA. Najprej smo alikvot celic uporabili za meritev živosti celic. Pri celicah LCL smo živost celic preverjali z MTS testom, pri celicah KLL pa s testom PrestoBlue.

MTS je tetrazolijeva sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol), ki se uporablja kot indikator celične živosti. V prisotnosti mitohondijske reduktaze se tetrazolijeva sol reducira v formazan, ki absorbira svetlobo pri 492 nm. Absorbanco nastalega formazana merimo kolorimetrično, količina nastalega formazana pa je sorazmerna količini metabolno aktivnih celic (91). Test PrestoBlue, ki smo ga uporabili za določanje živosti pri celicah KLL je natančno opisan v poglavju 3.4. Za analizo citokinov s pretočnim citometrom smo potrebovali > 80 % živost celic.

Po 24h smo posamezne alikvote pre-tretiranih celic centrifugirali pri 1200 rpm, 5 minut, na 4 °C, odpipetirali supernatant in ga shranili na – 80 °C. Meritve citokinov, ki so jih izločile celice LCL in celice KLL, smo izvedli s pretočnim citometrom s kompletom za analizo BDTM CBA (Cytometric Bead Array), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II.

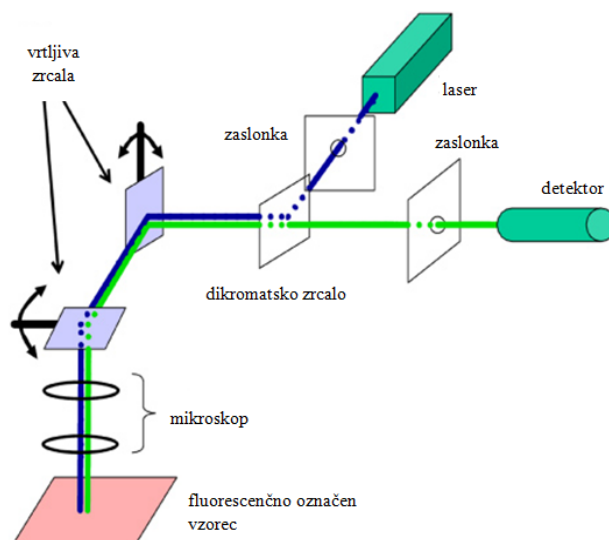
Postopek priprave celične suspenzije za analizo citokinov:

- Pripravili smo mešanico šestih različnih kroglic (reagenti), katere so prevlečene s specifičnimi protitelesi za posamezne vrste citokinov – IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ in v vsako FACS centrifugirko odpipetirali predpisan volumen pripravljene mešanice;
- dodali smo enak volumen vzorca in detekcijskega reagenta Human Th1/Th2 – II PE;
- inkubirali smo 3 ure v temnem prostoru, na sobni temperaturi;
- v vsako FACS centrifugirko smo dodali 1 mL spiralnega pufra in centrifugirali 5 minut pri 300 x g;
- previdno smo sprali in odstranili supernatant;
- dodali smo 300 μ L svežega spiralnega pufra in z njim resuspendirali pelet;
- analizirali smo s pretočnim citometrom.

3.6. Konfokalna mikroskopija

Fluorescenčni mikroskop je osnova konfokalne mikroskopije, vendar v primerjavi z njim dobimo mnogo boljšo sliko. Za vzbujanje fluorescence v vzorcu, kot vir svetlobe, uporabljamo laser. Posebnost konfokalnega mikroskopa je, da z laserjem ne osvetljujemo celotnega preparata hkrati, vendar ga pregledujemo po točkah v določeni optični ravnini. To nam omogočata dve zaslonki, ki imata zelo majhni odprtini. Nameščeni sta v gorišču za

lečo objektiva, konfokalno (Slika 11). Ena zaslonka je nameščena za izvorom svetlobe, za laserjem, druga pa pred detektorjem. Prva tako omogoča, da preparat osvetljujemo le v eni točki, druga pa preprečuje, da bi v detektor vstopala fluorescentna svetloba, ki izhaja iz območij preparata zunaj gorišča (92).



Slika 11: Shema konfokalnega mikroskopa. Povzeto po (93)

Osnova konfokalne mikroskopije je fluorescenčni mikroskop, zato morajo biti vzorci fluorescentno označeni. Vsebuje dve zaslonki, ki se nahajata v gorišču za lečo objektiva – za laserjem in pred detektorjem.

Postopek priprave celic za mikroskopijo:

- Za en preparat smo potrebovali 2 mL celične suspenzije s koncentracijo 1×10^6 /mL, delali smo v duplikatu (kontrola in tretirane celice);
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm, odstranili supernatant in resuspendirali v 3 mL PBS;
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm, odstranili supernatant, dodali 4 % raztopino formaldehida v PBS, vzorce prenesli v mikrotitrsko ploščico s 6 vdolbinami; na dno vsake vdolbinice smo položili krovna stekelca, na stekelca pa kanili našo suspenzijo celic v formaldehidu;
- inkubirali smo v inkubatorju 10 minut;
- odstranili smo formaldehid, spirali s PBS (3 x 1 mL);
- permeabilizirali smo z 0,5 % raztopino Tritona X-100 v PBS (10 minut);
- odstranili smo Triton in spirali s PBS;

- inkubirali smo s 3 % raztopino BSA v PBS (30 minut);
- spirali smo s PBS;
- inkubirali smo s primarnimi protitelesi proti receptorju EP4 (1:100 v 3% BSA v PBS) 60 minut*;
- odstranili smo raztopino protiteles in spirali s PBS;
- inkubirali smo s sekundarnimi protitelesi (1: 5000 v 3 % BSA v PBS) in z barvilom Hoechts (10 µg/mL) 60 minut**;
- odstranili smo raztopino protiteles in spirali s PBS;
- pustili smo, da so se stekelca na dnu mikrotitrne ploščice delno osušila in nato krovna stekelca prenesli na objektna stekelca.; na objektna stekelca smo kanili kapljico Prolong Gold antifade reagenta in pokrili s krovnim stekelcem s fiksiranimi celicami.

* V kontrolo nismo dali primarnih protiteles.

** Inkubirali smo v temnem prostoru.

3.7. KLL biobanka

Za namene nadaljnjih raziskav in potrditvenih študij, smo v okviru magistrske naloge pripravili biobanko, ki vsebuje ustrezno shranjene DNA, RNA, proteine in celice bolnikov z diagnozo KLL.

3.7.1. Celice

Za čim boljšo ohranitev živosti celic je bistvenega pomena hitrost zamrzovanja. Različne celice zahtevajo različne hitrosti ohlajanja, na splošno pa velja pravilo -1 °C / minuto. Cilj pri zamrzovanju celic je, da dosežemo čim bolj enoten in kontroliran sistem ohlajanja (94).

Pripravili smo suspenzijo celic s 15×10^6 celic. Celice smo centrifugirali pri 1200 rpm, 5 minut in jim odstranili medij. Dodali smo jim 1 mL medija za zamrzovanje, jih shranili v krioviale in za 10 minut postavili na led. Po 10. minutah smo krioviale zavili v papirnate brisačke in jih shranili v zamrzovalniku na -80 °C. Na ta način smo omogočili, da smo celice ohlajali postopoma - glede na pravilo -1 °C / minuto.

3.7.2. DNA – »peleta« izolacije celic B

Pri postopku izolacije celic B, so se nam eritrociti, granulociti, limfociti T in celice NK posedle na dno epruvete, pod plast fikola. Po izolaciji celic B smo previdno odstranili fikol in v 1,5 mL epice shranili po 1 mL vzorca eritrocitov, granulocitov, limfocitov T in celic NK. Vzorce smo shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.7.3. DNA

Pripravili smo suspenzijo celic s 5×10^6 celic. Celice smo centrifugirali pri 1200 rpm, 5 minut, jim odstranili medij in nastalo usedlino (»peleta«) shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.7.4. RNA

Za izolacijo visokokakovostne celotne RNA se uporablja reagent trizol, ki je raztopina fenola in gvanidin-izotiocianata (95). Pripravili smo suspenzijo celic s 3×10^6 celic. Celice smo centrifugirali pri 1200 rpm, 5 minut in jih shranili v 500 µL trizola v zamrzovalniku na -80 °C.

3.7.5. Proteini

Pripravili smo suspenzijo celic s 5×10^6 celic in jih centrifugirali pri 1200 rpm, 5 minut. Nato smo odstranili supernatant, spirali celice in jim dodali ledeni PBS. Celice smo centrifugirali še enkrat pri 3000 rpm, 5 minut, odstranili supernatant in dodali 100 µL pufra RIPA. Nato smo tako pripravljene vzorce shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.8. Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism, uporabili smo neparni t-test, test ANOVA in post-hoc test Tukey. Statistično značilno: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Sinergizem monoklonskih protiteles in PgE1-OH smo ovrednotili s prosto dostopnim programom CompuSyn.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

KLL je najpogostejša maligna krvna bolezen v razvitem svetu. Njen klinični potek je zelo spremenljiv, rezistenca na terapijo pa predstavlja vedno večji problem. Maligno spremenjene celice konstitutivno aktivirajo jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B in na ta način postanejo neodzivne na apoptozo in terapijo. Ugotovili so, da agonisti receptorja EP4 inducirajo apoptozo v malignih limfocitih B in modulirajo NF- κ B transkripcijsko signalno pot (96).

V magistrski nalogi smo želeli preveriti, ali je receptor EP4 potencialna tarča za zdravljenje KLL. S tem namenom smo pridobili maligne limfocite B iz polne krvi bolnikov, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi št. 93/12/10, ki jo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko (KME).

V raziskavo je privolilo 77 bolnikov, od tega 48 moških in 29 žensk, s potrjeno diagnozo KLL. Starost preiskovancev se je gibala od 42 do 91 let, povprečje je bilo 68,5. Dobljeni demografski podatki potrjujejo, da so bile naše raziskave izvedene na reprezentativni populaciji bolnikov. Povprečna starost preiskovancev je bila 68 let, mediana bolezni pa se giblje med 67 in 72 leti. Razmerje med preiskovanimi moškimi in ženskami je bilo 1,65 : 1, v literaturi pa podajajo razmerje 1,7 : 1 (4, 7).

Zanimalo nas je, ali bi bil agonist receptorja EP4 lahko učinkovit v terapiji KLL. V ta namen smo preverjali, ali agonist receptorja EP4 deluje citotoksično na maligno spremenjene celice B.

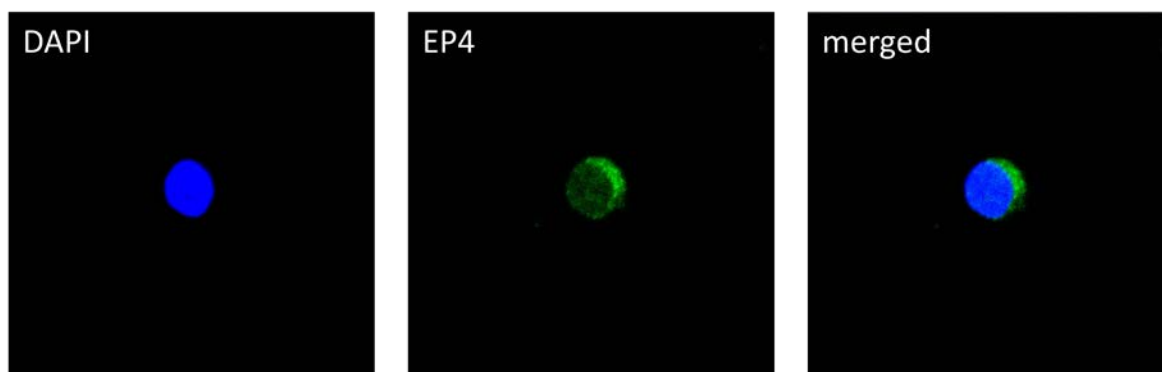
Želeli smo preveriti, ali agonist receptorja EP4 deluje selektivno na maligne limfocite B in se tako lahko izognemo številnim neželenim učinkom, ki jih povzročajo neselektivne učinkovine z delovanjem na normalne, hitro deleče se celice. Maligni limfociti B se lahko izognejo programirani celični smrti zaradi sposobnosti manipuliranja z mikro-okoljem (45), zaradi česar smo želeli ovrednotiti imunomodulatorne učinke selektivnega agonista receptorja EP4. Učinke agonista receptorja EP4 smo vrednotili tudi glede na klinične podatke bolnikov, ki smo jih pridobili v sodelovanju z oddelkom za Hematologijo, UKCL.

V magistrski nalogi smo v nadaljevanju učinkovitost selektivnega agonista receptorja EP4 primerjali s standardno terapevtsko učinkovino fludarabin. Zanimalo nas je, ali je biološki odziv maligno spremenjenih celic večji, če jih izpostavimo in istočasno tretiramo z

agonistom receptorja EP4 in fludarabinom. Terapevtsko uporabnost agonista receptorja EP4 pa smo vrednotili tudi s preverjanjem sinergističnega delovanja PgE1-OH in terapevtskih monoklonskih protiteles (rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab). Sinergistični učinek PgE1-OH in fludarabina ali monoklonskih protiteles, bi lahko omogočil nov terapevtski pristop pri zdravljenju KLL.

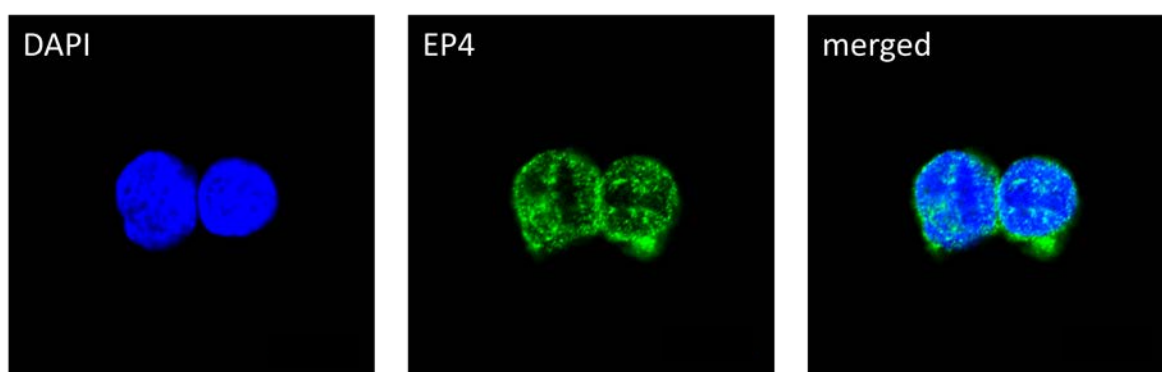
4.1. Celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4

Z namenom ovrednotenja receptorja EP4 kot potencialne tarče za zdravljenje KLL smo najprej preverili, ali celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4. V ta namen smo celice posneli s konfokalnim mikroskopom.



Slika 12: Izražanje receptorja EP4 na celicah KLL.

Pripravili smo 1×10^6 /mL celic KLL. Celice smo fiksirali na stekelca in jih permeabilizirali. Receptor EP4 (zeleno) smo označili s primarnimi (poliklonsko kunčje anti-EP4) in sekundarnimi (monoklonsko sekundarno kozje protitelo proti Fc regiji kunčjega IgG) fluorescenčno označenimi protitelesi. Jedra celic smo obarvali z barvilom Hoechts (modro). Celice smo snemali pod 60-kratno povečavo.



Slika 13: Izražanje receptorja EP4 na celicah LCL.

Pripravili smo 1×10^6 /mL celic LCL. Celice smo fiksirali na stekelca in jih permeabilizirali. Receptor EP4 (zeleno) smo označili s primarnimi (poliklonsko kunčje anti-EP4) in sekundarnimi (monoklonsko sekundarno kozje protitelo proti Fc regiji kunčjega IgG) fluorescenčno označenimi protitelesi. Jedra celic smo obarvali z barvilom Hoechts (modro). Celice smo snemali pod 60-kratno povečavo.

Iz Slike 12 in Slike 13 vidimo, da celice KLL in celice LCL izražajo prostaglandinski receptor EP4.

Dobljen rezultat je v skladu s predhodnimi študijami, ki so že potrdile prisotnost receptorja EP4 na limfocitih B (58, 67, 96, 98). Naša raziskava pa je potrdila prisotnost receptorja EP4 tudi na primarnih celicah KLL. Ekspresija receptorja EP4 je visoka v krvotvornih

organih, koži, gastrointestinalnem traktu in tudi v maternici (98). Receptor EP4 pa je izražen na zunanji in jedrni membrani celice (97).

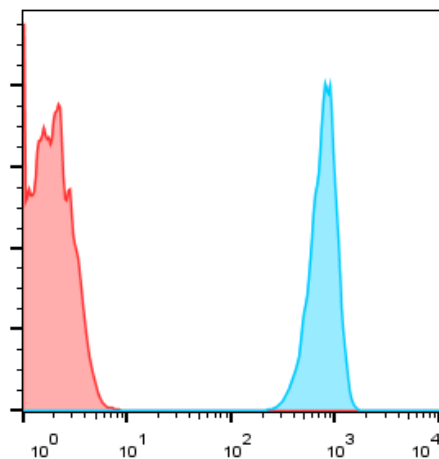
4.2. S postopkom RosetteSep izoliramo celice KLL

Z namenom, da ovrednotimo receptor EP4 kot potencialno tarčo za zdravljenje KLL, smo želeli iz polne krvi bolnikov izolirati celice KLL, ki so maligno spremenjeni limfociti B. Za izolacijo malignih limfocitov B smo izbrali postopek RosetteSep, ki temelji na negativni selekcijski metodi. Postopek omogoča, da iz polne krvi bolnikov izoliramo le limfocite B, ne pa tudi trombocitov, eritrocitov, granulocitov in drugih perifernih mononuklearnih celic (limfociti T, celice NK).

Levkemične celice KLL smo lahko izolirali pri 51 bolnikih. Limfociti B predstavljajo 5 – 10 % perifernih mononuklearnih celic, zaradi česar jih iz 5 mL krvi zdravih darovalcev s postopkom RosetteSep ne moremo izolirati (99). Prav tako pa jih nismo uspeli izolirati pri določenih bolnikih, saj pri postopku izolacije limfocitov B iz polne krvi nad plastjo fikola nismo zaznali celic B. Ti bolniki so bili lahko v remisiji po predhodni terapiji, zaradi česar je bilo njihovo število limfocitov B znižano. Določeni bolniki so imeli diagnozo KLL postavljeno v zgodnjem razvoju bolezni, ko limfociti B še niso kritično povišani in tudi zdravljenje še ni potrebno.

Uspešnost postopka izolacije celic B smo vrednotili z analizo celičnega označevalca CD19 s pretočnim citometrom. CD19 je specifičen za limfocite B in je izražen v večini razvojnih stopenj limfocitov B (88, 89).

Iz histograma (Slika 14) vidimo, da smo s postopkom RosetteSep izolirali le populacijo limfocitov B, torej maligne celice KLL. Celice smo zato lahko nadalje uporabili za vrednotenje receptorja EP4, kot potencialne tarče za zdravljenje KLL.



Slika 14: S postopkom RosetteSep izoliramo CD19+ limfocite.

Pripravili smo celično suspenzijo z $0,5 \times 10^6$ celic KLL. Celice smo označili s fluorescenčno označenimi protitelesi proti celičnemu površinskemu označevalcu CD19 (BD Biosciences). Z rdečo barvo je na histogramu označena kontrolna populacija celic, z modro barvo pa populacija celic, ki je označena z monoklonskimi protitelesi proti celičnemu označevalcu CD19.

4.3. Agonist receptorja EP4 deluje citotoksično na primarne celice KLL

Ko smo dokazali ekspresijo receptorja EP4 na primarnih celicah KLL in potrdili, da lahko s postopkom RosetteSep izoliramo čisto populacijo limfocitov B, smo želeli preveriti protitumorno učinkovitost agonista receptorja EP4. S tem namenom smo preverjali, ali agonist receptorja EP4 deluje citotoksično na primarne celice KLL.

Citotoksičnost PgE1-OH smo vrednotili na celicah B izoliranih iz polne krvi 51 bolnikov z diagnozo KLL. Celice KLL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami agonista receptorja EP4 za 24h in 48h ter vrednotili živost celic s testom metabolne aktivnosti PrestoBlue.

Ugotovili smo, da je agonist receptorja EP4 deloval citotoksično na vse maligne celice, pridobljene od 51 bolnikov (Preglednica 9).

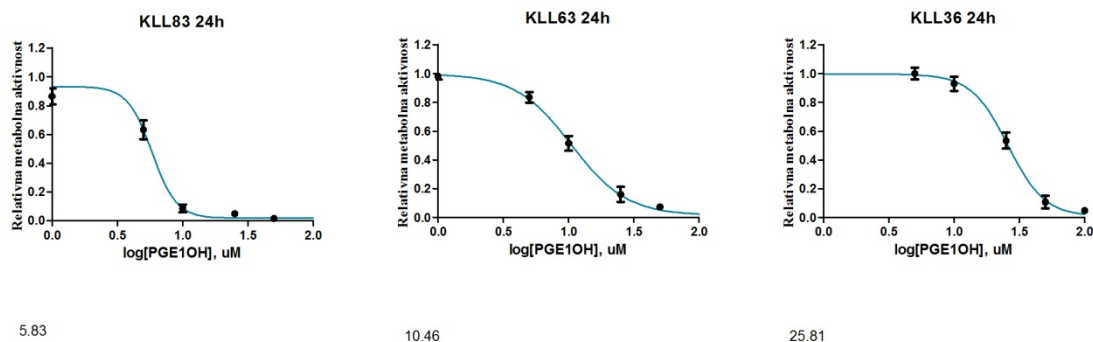
Določili smo vrednosti EC50, pri katerih se pod vplivom agonista receptorja EP4 živost celic zmanjša za polovico. Vrednosti EC50 so bile v mikromolarnem območju; povprečna EC50 vrednost celic KLL 51 bolnikov je bila 17,34 μM po 24h in 8,50 μM po 48h.

Preglednica 9: EC50 vrednosti po 24h in po 48h inkubacije celic KLL s PgE1-OH.

Celice KLL	EC50 po 24h (μM)	EC50 po 48h (μM)	Celice KLL	EC50 po 24h (μM)	EC50 po 48h (μM)
36	25,81	10,28	77	53,88	27,22
37	12,45	6,20	78	8,22	5,95
38	25,73	11,33	80	9,47	7,56
39	10,91	4,52	81	12,43	8,12
41	14,79	4,88	82	8,58	5,92
44	5,86	1,04	83	5,83	5,47
47	5,51	0,16	84	10,90	1,76
48	30,07	1,21	85	6,29	5,08
50	18,28	0,72	87	29,57	11,86
51	46,19	12,18	88	7,81	2,93
52	47,62	24,44	93	32,67	10,38
53	51,44	33,04	94	7,80	6,03
54	55,07	44,80	95	7,40	5,72
58	3,76	1,38	96	8,02	5,75
61	9,59	6,49	97	7,94	6,24
63	10,64	8,45	98	10,23	5,68
64	7,41	4,63	99	26,53	11,40
65	19,67	11,87	100	8,69	5,06
66	7,68	3,60	101	7,83	2,21
68	15,91	10,05	103	6,48	6,00
69	12,64	6,00	104	14,33	7,27
71	13,99	8,10	105	45,25	15,19
72	9,58	3,13	107	11,70	7,67
73	9,61	5,77	108	12,04	7,56
74	34,59	12,43	109	8,43	6,22
76	11,16	6,82	Povprečje	17,34	8,50

4.3.1. Citotoksični učinki agonista receptorja EP4 so koncentracijsko odvisni

Selektivni agonist receptorja EP4, PgE1-OH, je zmanjšal preživetje malignih limfocitov B. Iz Slike 15 vidimo, da je PgE1-OH zmanjšal preživetje celic KLL koncentracijsko odvisno. Višja koncentracija PgE1-OH je imela večje citotoksične učinke.



Slika 15: Vpliv agonista receptorja EP4 na živost celic KLL je koncentracijsko odvisen.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) za 24h. Po 24h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Poskus je bil izveden v triplikatu.

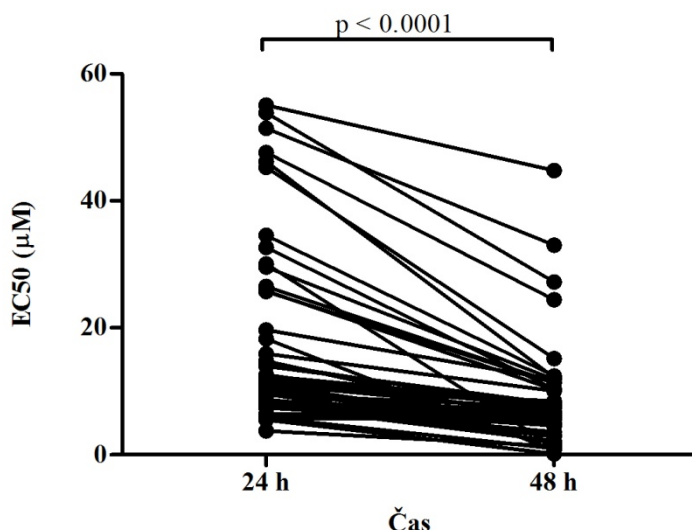
Celice KLL posameznih bolnikov so bile različno občutljive na tretiranje s PgE1-OH. Na celicah bolnika KLL83 je že koncentracija 5,83 μ M PgE1-OH znižala živost na polovico, na celicah bolnika KLL36 pa je bil enak učinek dosežen pri koncentraciji 25,81 μ M PgE1-OH. Grafi za ostalih 48 bolnikov z diagnozo KLL so prikazani v Prilogi 1.

Spoznanje, da so učinki PgE1-OH koncentracijsko odvisni, je pomembno tudi s stališča terapije, saj lahko omogoča predvidevanje terapevtskega odmerka.

4.3.2. Citotoksični učinki agonista receptorja EP4 so časovno odvisni

Pri daljšem času tretiranja se je citotoksični učinek agonista receptorja EP4 povečal. Ugotovili smo, da so EC50 vrednosti po 24h inkubaciji značilno višje od 48h inkubacije. EC50 vrednosti posameznih bolnikov pri 24h in pri 48h so zbrane v Preglednici 9.

Kot je razvidno iz Preglednice 9 se EC50 vrednosti po 24h tretiranju nahajajo v razponu od 3,76 μ M do 55,07 μ M (povprečje 17,34 μ M), EC50 vrednosti po 48h tretiranju pa od 0,16 μ M do 44,80 μ M (povprečje 8,50 μ M). V razmiku 24h se citotoksični učinek PgE1-OH na celice KLL poveča v povprečju za 2-krat. Pri nekaterih bolnikih je citotoksični učinek po dodatnih 24 urah močnejše izražen kot pri drugih (Slika 16).



Slika 16: Citotoksični učinki agonista receptorja EP4, PgE1-OH, so časovno odvisni.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) za 24h in 48h. Po 24h in 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. EC50 vrednost smo izračunali s programom GraphPad Prism.

Ugotovitev, da so učinki agonista receptorja EP4 časovno odvisni, je lahko zelo pomembna z vidika terapije. Dlje časa bodo tarčne celice izpostavljene zdravilni učinkovini, večji bo učinek.

4.4. Agonist receptorja EP4 deluje selektivno na maligne limfocite B

Nadalje smo želeli ugotoviti, ali agonist receptorja EP4 deluje selektivno na maligne limfocite B. Neselektivne zdravilne učinkovine delujejo tudi na normalne, predvsem hitro deleče se celice (matične celice, epitelijske celice), kar ima za posledico številne neželene učinke. Zato je tudi pri zdravljenju KLL cilj, da bi odkrili zdravilne učinkovine, ki delujejo selektivno samo na maligne celice B.

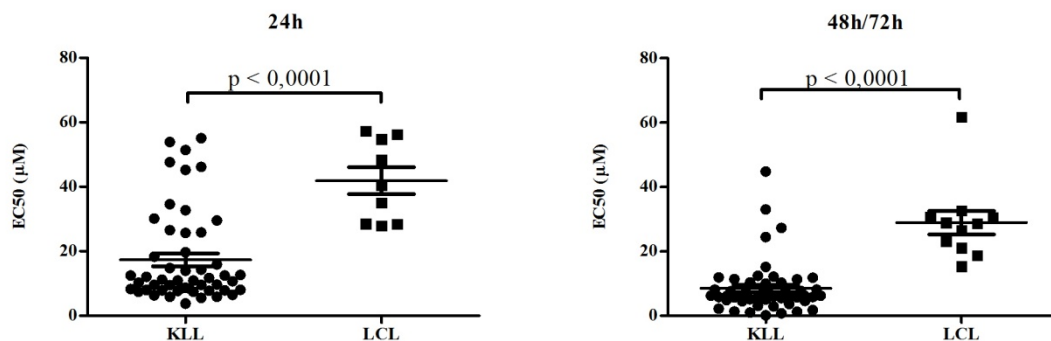
V predhodni študiji je bilo že dokazano, da aktivacija receptorja EP4 s PgE1-OH povzroča selektivno citotoksičnost maligno transformiranih celic B, med drugimi celic RAMOS in NALM-6, glede na ostale imunske maligne celice (celice T in monocite), ter na B celice LCL, pridobljene iz zdravih darovalcev. Selektivni agonist receptorja EP4, PgE1-OH, je v testiranih koncentracijah vplival na viabilnost malignih limfocitov B, ni pa imel vpliva na viabilnost celic LCL (58).

Z namenom vrednotenja selektivnega delovanja PgE1-OH na celice KLL smo primerjali EC50 vrednosti na malignih celicah KLL in celicah LCL, pridobljenih iz zdravih darovalcev. Pri zdravih odraslih, se v krvi nahaja 5-10 % limfocitov B, zaradi česar bi za izolacijo teh celic potrebovali velike količine krvi in reagentov. Limfocitov B brez zunanjih stimulansov, ki lahko spremenijo njihov fenotip, ne moremo gojiti daljše obdobje (99). Celice LCL so limfociti B, izolirani iz polne krvi zdravih odraslih darovalcev, ter transformirani z EBV virusom. Celice obdržijo večino fenotipskih lastnosti limfocitov B, izražajo površinska označevalca CD19, CD20 in so sposobne tvoriti protitelesa, ter tako predstavljajo dober *in vitro* model limfocitov B. Celice LCL predstavljajo neomejen vir celic istega donorja (58).

Selektivnost delovanja agonista PgE1-OH smo vrednotili s primerjavo vrednosti EC50 na celicah KLL in celicah LCL po 24h in po 48h/72h. Vrednosti EC50 celic LCL smo pridobili iz predhodne študije (100), čas tretiranja 72h pa je bil izbran na osnovi študij, ki so preučevale inter-individualne variabilnosti v odzivu na spojine. Ugotovili so, da so inter-individualne razlike po 72h tretiranju celic LCL najbolj izražene (73, 76).

Kot je razvidno iz Slike 17 so bile že po 24h opazne značilne razlike v EC50 vrednostih med celicami KLL in celicami LCL. Po 48h tretiranju celic KLL in 72h tretiranju celic LCL so te razlike še vedno prisotne. Povprečna EC50 vrednost agonista receptorja EP4, PgE1-OH, na levkemičnih celicah KLL je po 24h in po 48h v primerjavi z vrednostjo EC50 na celicah LCL nižja. To pomeni, da za isti učinek na celicah KLL potrebujemo nižje koncentracije učinkovine, kot na celicah LCL.

Iz pridobljenih podatkov lahko torej z veliko verjetnostjo ($p < 0,0001$) sklepamo na selektivno delovanje agonista PgE1-OH na levkemične celice KLL v primerjavi s celicami LCL (Slika 17). V odzivu na tretiranje s PgE1-OH so med posameznimi celicami LCL in KLL prisotne inter-individualne razlike.



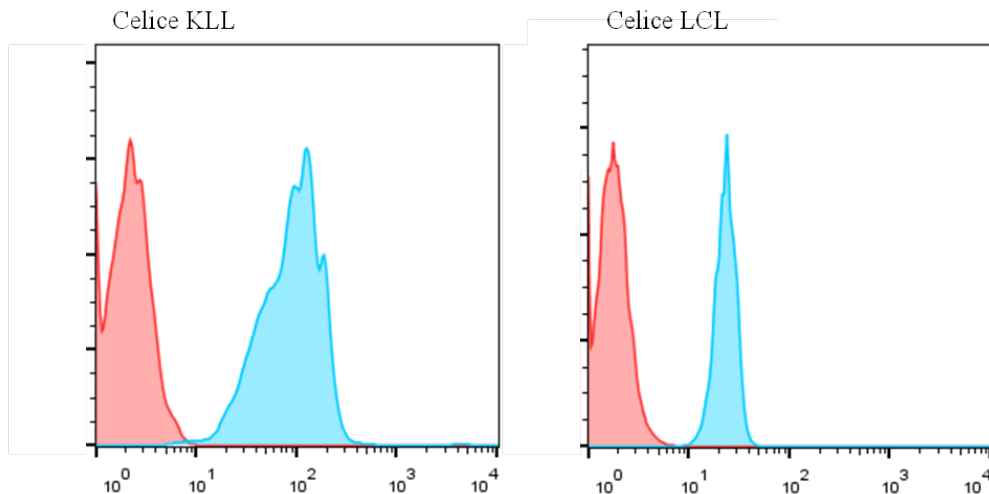
Slika 17: Selektivno delovanje PgE1-OH na levkemične celice KLL.

Celice KLL in LCL smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) 24h in 48h/72h. Po 24h in 48h/72h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. EC50 vrednost celic smo izračunali s programom GraphPad Prism.

Selektivno delovanje na celice KLL bi lahko bilo pogojeno s signalno potjo NF-κB. V normalnih, funkcijsko nespremenjenih celicah je aktivacija NF-κB prehodna, v malignih celicah pa pride do spremembe in postane NF-κB konstitutivno aktivirana (65, 66). Agonist PgE1-OH deluje tako, da modulira NF-κB transkripcijsko signalno pot, to pa bi lahko bil razlog selektivnega delovanja na maligne limfocite B (96).

4.5. Ekspresija receptorja EP4 je višja na celicah KLL kot na celicah LCL

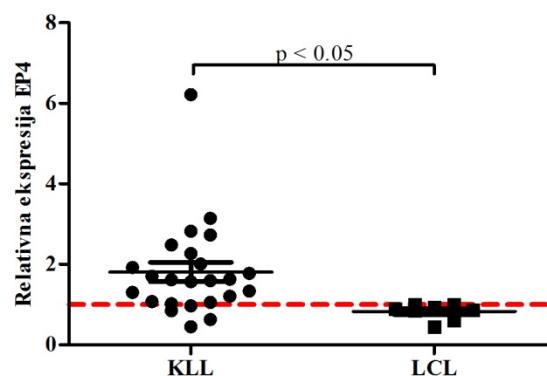
Ugotovili smo, da celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4, ter da agonist PgE1-OH deluje selektivno na celice KLL. V naslednjem koraku smo želeli preveriti, kakšen je nivo ekspresije receptorja EP4 na maligno spremenjenih celicah KLL v primerjavi s celicami LCL zdravih darovalcev. Zanimalo nas je, ali imajo maligne celice KLL višjo ekspresijo receptorja EP4 in ali je ta povezana s selektivnim delovanjem PgE1-OH. S tem bi še dodatno ovrednotili pomen receptorja EP4, kot potencialne tarče za zdravljenje KLL. To smo preverjali s pretočno citometrijo po postopku, ki je opisan v poglavju 3.5.1. Intenziteto receptorja EP4 smo podali kot mediano intenzitete fluorescence (MFI; *angl. Median fluorescence intensity*).



Slika 18: Celice KLL in celice LCL izražajo receptor EP4.

Pripravili smo celično suspenzijo z $0,5 \times 10^6$ celic KLL in celic LCL. Kontrolno populacijo celic smo označili samo s sekundarnimi protitelesi (monoklonska sekundarna kozja protitelesa proti Fc regiji kunčjega IgG; na sliki rdeče), preiskovano populacijo pa s primarnimi in sekundarnimi protitelesi (poliklonska kunčja anti-EP4 in monoklonska kozja protitelesa proti Fc regiji kunčjega IgG; na sliki modro).

S primerjavo MFI celic KLL in celic LCL smo ugotovili, da je povprečna ekspresija receptorja EP4 na celicah KLL več kot 2-krat višja od povprečne ekspresije receptorja EP4 na celicah LCL (Slika 19). Iz tega bi lahko sklepali, da je receptor EP4 potencialna dobra tarča za zdravljenje KLL. Na Sliki 19 vidimo tudi bolj heterogeno izražanje receptorja EP4 na celicah KLL različnih bolnikov kot na celicah LCL zdravih darovalcev.



Slika 19: Ekspresija receptorja EP4 je značilno višja na celicah KLL kot na celicah LCL.

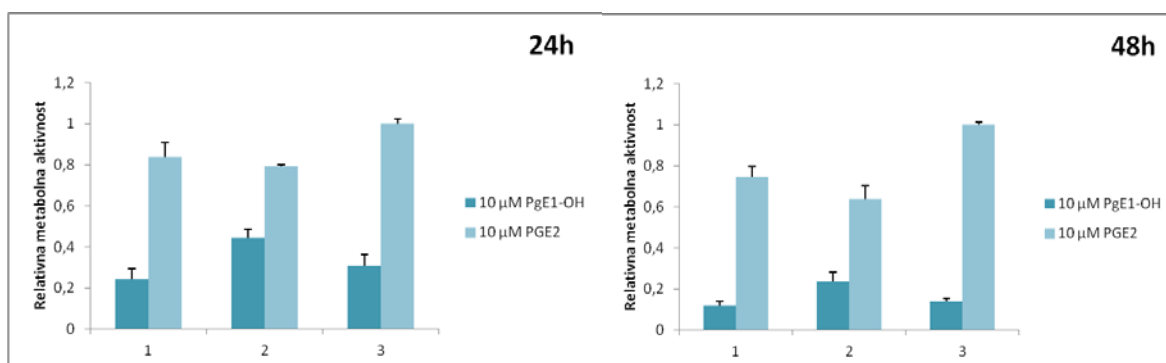
Pripravili smo $0,5 \times 10^6$ /mL celic KLL in jih označili s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Kontrolno populacijo celic smo označili samo s sekundarnimi protitelesi. Analizo smo izvedli s pretočnim citometrom. Intenziteto receptorja EP4 smo ovrednotili kot mediano intenzitete fluorescence MFI in vedno normalizirali na celično linijo LCL3, ki smo jo zmeraj vključili v analizo. Podatke za ekspresijo receptorja na celicah LCL smo vzeli iz predhodnih raziskav (100).

4.6. PgE1-OH je bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE₂

V našem telesu nastaja prostaglandin PGE₂, ki deluje kot endogeni ligand na prostaglandinske receptorje EP1, EP2, EP3 in EP4 (101). Na podlagi dosedanjih raziskav smo postavili hipotezo, da je selektivni agonist receptorja EP4, PgE1-OH, bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE₂. Hipotezo smo preverjali tako, da smo celice KLL tretirali z naraščajočimi koncentracijami agonista PgE1-OH in PGE₂, jih inkubirali za 24h in 48h in nato določili živost celic KLL (Slika 20).

Ugotovili smo da je selektivni agonist PgE1-OH pri 10 μ M koncentraciji bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE₂. Po 24h je bil vpliv PGE₂ na živost celic minimalen, medtem ko se je živost celic po tretiranju s PgE1-OH znižala na približno 40 %. Po dodatnih 24h se je ta razlika še povečala (Slika 20). EC₅₀ vrednosti po 24h inkubaciji celic KLL s PgE1-OH so se nahajale v razponu od 3,76 μ M do 55,07 μ M, medtem ko EC₅₀ vrednosti po inkubaciji celic z endogenim ligandom PGE₂ v območju od 96,54 μ M do 135,10 μ M. To je v skladu z dosedanjimi raziskavami, ki so pokazale, da so citotoksični učinki PGE₂ posredovani preko receptorja EP4 (58, 67).

Citotoksični učinki posredovani preko receptorja EP4 so povezani z aktivacijo adenilat ciklaze in posledičnim povišanjem cAMP. Ugotovili so, da analogi cAMP in druge spojine, ki posnemajo povišanje cAMP, delujejo citotoksično na limfocite B (59, 102). Naše predhodne raziskave pa so pokazale tudi, da aktivacija receptorja EP4 inhibira NF- κ B signalno pot v limfocitih B.



Slika 20: PgE1-OH je bolj citotoksičen od endogenega liganda PGE₂.

Celice KLL smo inkubirali z 10 μ M PgE1-OH in PGE₂ za 24h in 48h. Po 24h in 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic KLL. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Poskus je bil izveden v triplikatu.

4.7. PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice LCL

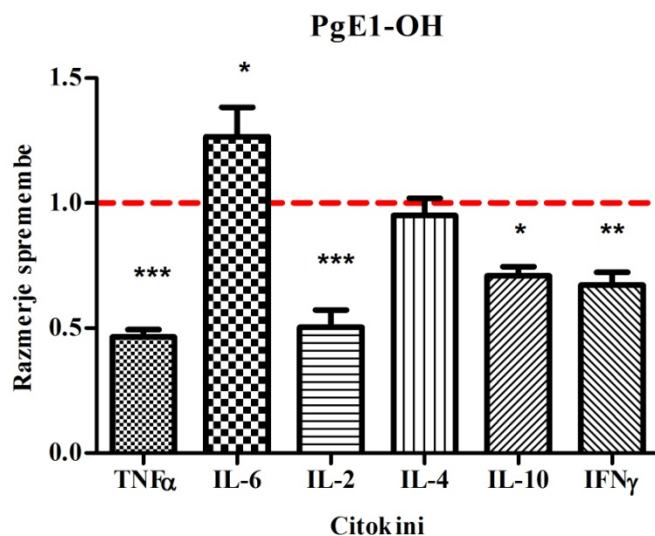
Mikro-okolje ima izredno pomembno vlogo v razvoju KLL. Študije so pokazale, da imajo maligne celice B sposobnost manipuliranja z mikro-okoljem in preko njega vplivajo na svoje preživetje. V številnih raziskavah so potrdili, da je pri KLL povišan nivo citokinov, ter da citokini posredno in/ali neposredno vplivajo na preživetje celic KLL (45, 46). Med najpomembnejšimi citokini so TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 in IL-10 (47, 48, 53, 54, 55).

Zanimalo nas je, ali agonist receptorja EP4 modulira izločanje citokinov v celicah KLL. V ta namen smo uporabili celice LCL, ki že predstavljajo dober *in vitro* model za testiranje imunomodulatornega delovanja spojin (47).

Imunomodulatorne učinke PgE1-OH smo vrednotili preko določanja citokinov v celicah LCL. Ker celice v mirovanju izločajo malo citokinov, je potrebno celice ustrezno aktivirati. Celice LCL smo pre-tretirali s PgE1-OH za 1h, nato pa stimulirali z ionomicin/PMA. Aktivacija celic z ionomicin/PMA posnema biokemične učinke vezave antigena na površinski imunoglobinski receptor, BCR receptor. Povečana aktivacijo BCR receptorja pa je dokazana tudi pri celicah KLL (101).

Po tretiranju celic z 10 μ M PgE1-OH in stimulaciji s 3,333 ng/mL PMA in 0,5 μ M ionomicinom za 24h, smo s testom MTS preverili, da je bila > 80 % živost celic LCL desetih darovalcev. S kompletom BDTM Cytometric Bead Array (CBA), Human Th1/Th2 Cytokine Kit II smo ocenili nivo provnetnih (TNF- α in IL-6) in imunoregulatornih (IL-2, IL-4, IL-10 in IFN- γ) citokinov.

Ugotovili smo, da agonist receptorja EP4, PgE1-OH, modulira produkcijo citokinov. Po tretiranju celic s PgE1-OH smo opazili značilno znižanje izločanja provnetnega citokina TNF- α in imunoregulatornih citokinov IL-2, ter IL-10 in IFN- γ , ter povišanje provnetnega citokina IL-6 (Slika 21).



Slika 21: PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice LCL.

Celice LCL so bile predhodno tretirane z 10 μ M PgE1-OH, nato pa po 1h aktivirane s PMA (3,333 ng/mL) in ionomicinom (0,5 μ M). Sproščene citokine celic LCL (viabilnost > 80 %) smo ocenjevali po 24h v celičnem mediju. Vrednosti so izražene kot razmerje spremembe relativno glede na kontrolo. Podatki so izraženi kot srednja vrednost $\pm$ SEM dveh neodvisnih poskusov, izvedenih na desetih različnih celičnih linijah LCL. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 glede na kontrolo.

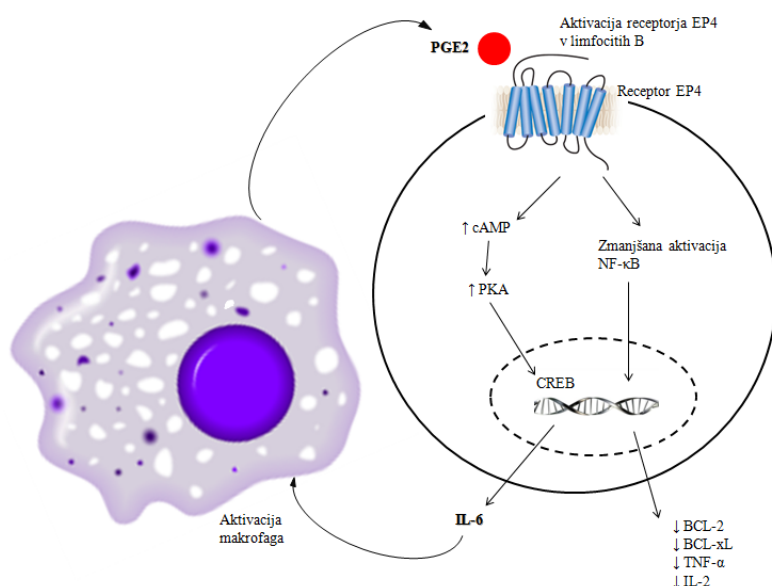
Po tretiranju celic s PgE1-OH se je nivo TNF- α in IL-2 znižal za približno 50 %, nivo IL-10 in IFN- γ pa za 30 %. Produkcija provnetnega citokina IL-6 se je povečala za 20 %, spremembe v produkcije IL-4 pa nismo zaznali. Citokin IL-4 se je med stimulacijo ionomicin/PMA tudi najmanj povišal, kar je lahko vzrok, zakaj nismo zaznali spremembe v njegovi produkciji po tretiranju s PgE1-OH.

Znižan nivo TNF- α je lahko posledica aktivacije receptorja EP4, saj deluje supresivno na jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B. Posledično se NF- κ B v jedru celice ne more vezati na promotorske elemente TNF- α in je izražanje tega citokina nižje (62, 65, 66).

Imunoregulatorni citokin IL-2 je pomemben dejavnik preživetja, saj močno vpliva na povišanje anti-apoptotičnih proteinov Bcl-xL in Mcl-1, na ta način pa lahko prispeva k napredovanju bolezni. Zato je znižanje produkcije IL-2 pri KLL dobro izhodišče za terapijo (103).

Povišanje provnetnega citokina IL-6 po aktivaciji receptorja EP4 je skladno z dosedanjimi raziskavami (48, 104, 105). Te so pokazale, da istočasna stimulacija receptorja EP4 in BCR receptorja v celicah povzroči indukcijo izražanja gena za IL-6. V uravnavanje

transkripcije gena za IL-6 je udeleženih več transkripcijskih dejavnikov, med njimi tudi NF- κ B in CREB. V jedru celice se aktiviran transkripcijski dejavnik NF- κ B lahko veže na promotorske elemente gena za IL-6 in na ta način poviša njegovo izražanje (106). V predhodnih študijah pa so ugotovili, da aktivacija receptorja EP4 poveča BCR sproženo izločanje citokina IL-6 preko cAMP/PKA/CREB signalne poti (Slika 22) (107). PgE1-OH se veže na receptor EP4, vezava pa povzroči povečanje intracelularnega cAMP preko aktivacije encima adenilat ciklaze. cAMP aktivira PKA, ta pa fosforilira CREB, ki se veže na določeno DNA zaporedje in modulira izražanje genov (npr.: IL-6), ki so vpleteni v proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo (62).



Slika 22: Aktivacija receptorja EP4 poviša izločanje IL-6, ta pa inducira sproščanje PGE₂ iz makrofagov.

Citokin IL-6, ki ga izločajo celice B, aktivira makrofage, ti pa začnejo izločati povečano količino PGE₂. PGE₂ se lahko veže na receptor EP4 in ga ponovno aktivira. Aktivacija receptorja EP4 lahko vpliva na še večje izločanje IL-6. Poleg tega agonist receptorja EP4 znižuje aktivacijo NF- κ B in posledično zmanjšano izražanje anti-apoptotičnih proteinov Bcl-2 in Bcl-xL, ter zmanjšano izločanje pro-vnetnega citokina TNF- α . Povzeto po (46, 103).

Študije izvedene na celicah mišje celične linije B limfoma, WEHI 231, so pokazale, da povečana raven IL-6 vpliva tudi na aktivacijo makrofagov, ki povečano izločajo PGE₂. PGE₂ je endogeni ligand, ki se veže na prostaglandinske receptorje, med njimi tudi na receptor EP4, njegova aktivacija pa inducira celično smrt malignih limfocitov B. Aktivacija receptorja EP4 z necitotoksičnimi koncentracijami PGE₂ pa bi lahko posledično vplivala na še večje izločanje IL-6 (46, 105).

Povišano izločanje IL-6 bi lahko pri bolnikih z diagnozo KLL opredelili kot pozitivno tudi pri terapiji. Povečan nivo IL-6 bi lahko vplival na aktivacijo makrofagov, ti pa bi posledično izločali večje količine PGE₂, ki se veže na receptor EP4 in inducira apoptozo v malignih limfocitih B (Slika 22).

4.8. Inter-individualna variabilnost v odzivu na PgE1-OH

Ugotovili smo, da je PgE1-OH izkazoval potencialno proti-rakavo učinkovitost, saj je deloval citotoksično na celice KLL vseh preiskovanih bolnikov, odziv pa je bil koncentracijsko in časovno odvisen. V odzivu celic KLL na PgE1-OH pa je bila prisotna inter-individualna variabilnost (Slika 15, Slika 16).

Vzrok za različen odziv na PgE1-OH bi lahko bila prisotnost mutacije v genu za receptor EP4, *Ptger4*. Asociacijske študije na celotnem genomu (*angl. genome-wide association studies* – GWA) so razkrile dva pomembna polimorfizma gena *Ptger4*, ki kodira receptor EP4 - rs4495224 in rs7720838. Polimorfizem posameznih nukleotidov (*angl. single nucleotide polymorphism* – SNP) rs4495224 je bil prepoznan kot del vezavnega mesta za NF- κ B, ter kaže na to, da bi lahko vplival na ekspresijo gena *Ptger4*. Rs7720838 pa je bil prepoznan kot del vezavnega mesta za CREB in c-Myc (106).

Za bolezen KLL so značilne nekatere kromosomske nepravilnosti, ki so pomembne tudi pri načrtovanju zdravljenja (4). Del11q22-23 in del17p13 sta povezani z izgubo gena ATM in p53, ki nadzirata apoptozo in v primeru odsotnosti prispevata k rezistenci na zdravljenje. Zato bi lahko tudi kromosomske nepravilnosti vplivale na različne odzive na PgE1-OH. Različen odziv na PgE1-OH bi lahko bil pogojen tudi z ekspresijo receptorja EP4.

4.8.1. Ekspresija receptorja EP4 na celicah KLL in citotoksično delovanje PgE1-OH ne korelirajo

Na celicah KLL smo s pretočno citometrijo ovrednotili količino receptorja EP4 in ugotovili, da je ta med celicami KLL različnih bolnikov različna. V odzivu na PgE1-OH je bila prisotna inter-individualna variabilnost. Zanimalo nas je, ali obstaja korelacija med količino receptorja EP4 na celicah KLL in izmerjeno EC50 vrednostjo.

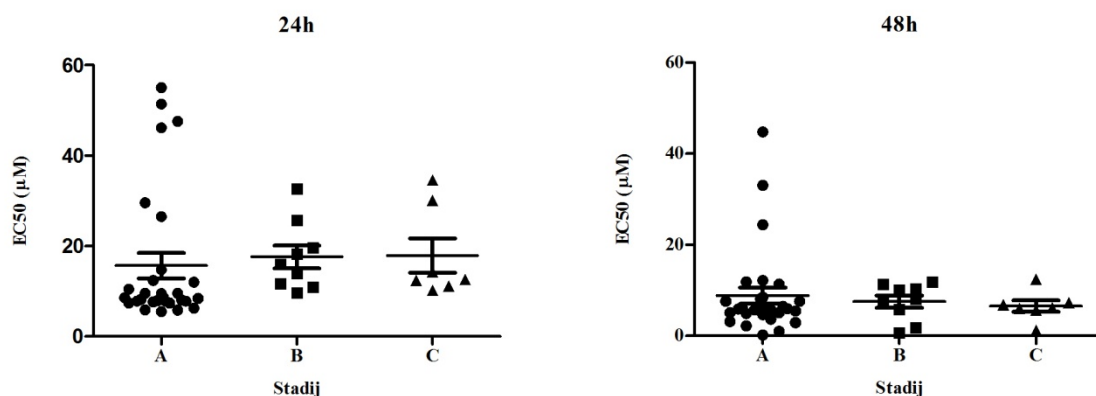
Ugotovili smo, da med ekspresijo receptorja EP4 in citotoksičnimi učinki PgE1-OH ni povezave ($R^2 = 0,075$) (Priloga 2). V nadaljevanju bi bilo smiselno preveriti tudi ekspresijo receptorja EP4 na nivoju mRNA in tako potrditi odsotnost korelacij. Na korelacijo med

MFI in EC50 vrednostjo pa imajo lahko vpliv tudi različni polimorfizmi v genu *Ptger4*, ki kodira receptor EP4. Zato bi bilo smiselno raziskati in opredeliti tudi polimorfizme receptorja EP4.

4.8.2. Delovanje agonista PgE1-OH je neodvisno od stadija KLL

Obstajata dve metodi, s katerima lahko opredeljujemo razširjenost bolezni (Rai in Binet) (4). Na oddelku za Hematologijo, UKCL uporabljajo razvrstitev po Binetu, ki zajema tri stadije (A, B, C) glede na stopnjo ogroženosti bolnika.

Zanimalo nas je, ali je delovanje agonista receptorja EP4 odvisno od razširjenosti bolezni KLL. S tem namenom smo primerjali vrednosti EC50 z opredeljenim stadijem bolnika. Vrednosti EC50 smo določili na celicah KLL, ki so bile pridobljene v največjem številu od bolnikov v stadiju A (Slika 23), kar pomeni da so imeli odsotno anemijo, trombocitopenijo in, da so imeli < 3 področja s povečanimi bezgavkami. Mediana preživetja za stadij A je več kot 10 let, zato tudi prevladujejo bolniki s tem stadijem (4). Stadiju A, sledi stadij B, kjer je stopnja ogroženosti bolnika nekoliko višja, najmanj preiskovancev pa je bilo opredeljenih s stadijem C, kjer je stopnja ogroženosti največja. Za te bolnike je značilna anemija in/ali huda trombocitopenija, mediana preživetja pa je zgolj 2 leti.



Slika 23: Delovanje agonista PgE1-OH je neodvisno od stadija bolezni.

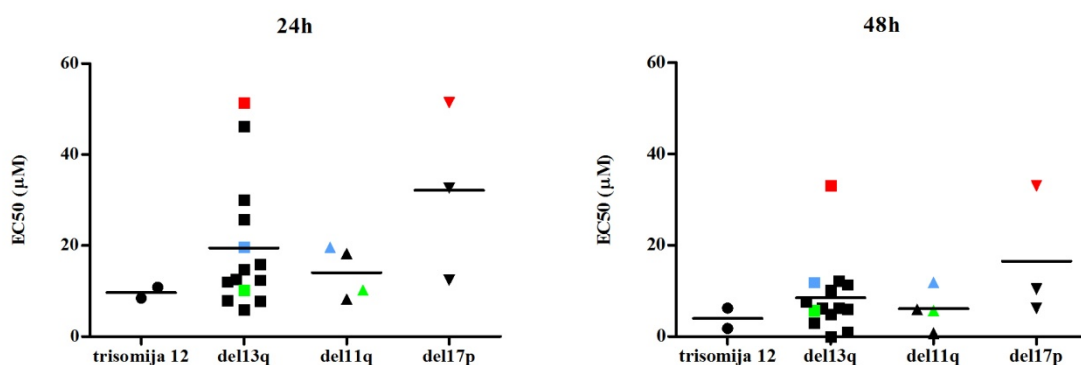
Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) za 24h. Po 24h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. EC50 vrednost smo izračunali s programom GraphPad Prism.

Bolniki imajo v različnih stadijih različne klinične značilnosti, vendar pa to ni vplivalo na citotoksično delovanje agonista PgE1-OH (Slika 23). Razvrstitev po Binetu niti ne

identificira posameznikov, pri katerih bo bolezen hitro napredovala, niti tistih, pri katerih je prisotna citogenetska nepravilnost s slabo prognozo (18, 19). To bi lahko bil tudi razlog, da delovanje agonista PgE1-OH ni odvisno od posameznega stadija bolezni.

4.8.3. Delovanje agonista receptorja EP4 je neodvisno od kromosomskih nepravilnosti

Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike v delovanju PgE1-OH v odvisnosti od najpogostejših kromosomskih nepravilnosti (del17p13, del11q22-23, trisomija 12 in del13q14). Najpogostejša kromosomska nepravilnost je del13q14 (55 %), sledijo pa ji del11q22-23 (18 %), trisomija 12 (16 %) in del 17p13 (7 %) (4). Tudi pri naših preiskovancih je bila najbolj zastopana kromosomska nepravilnost del13q14 (14 preiskovancev), ostalih pa je bilo manj. Zbrali smo izračunane EC50 vrednosti bolnikov, ki imajo prisotno vsaj eno izmed kromosomskih nepravilnosti in jih predstavili na Sliki 24. Ugotovili smo, da delovanje PgE1-OH ni odvisno od kromosomskih nepravilnosti.



Slika 24: Delovanje agonista receptorja EP4 je neodvisno od kromosomskih sprememb.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) za 24h. Po 24h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. EC50 vrednost smo izračunali s programom GraphPad Prism. Kariotipske spremembe so bile določene s postopkom FISH na Oddelku za hematologijo, UKCL. Trije bolniki so imeli določeno prisotnost dveh kariotipskih sprememb hkrati (na grafu so označeni z modro, rdečo in zeleno).

4.8.4. Agonist receptorja EP4 deluje citotoksično tudi na celice KLL pri bolnikih s slabo prognozo

Deleciji na kromosomu 17 in 11 sta povezani z izgubo genov za p53 in ATM, ki nadzirata apoptozo, zato imajo bolniki s tema kromosomskima nepravilnostma neugoden potek bolezni (4, 20, 21). Zanimala nas je proti-rakava učinkovitost agonista receptorja EP4,

PgE1-OH, na celicah KLL bolnikov s slabo prognozo, glede na celice LCL in glede na celice KLL vseh bolnikov. Podatki o bolnikih s slabo prognozo so zbrani v Preglednici 10 in Preglednici 11.

Preglednica 10: Kromosomska nepravilnost del17p in EC50 vrednosti izbranih vzorcev.

Kromosomska nepravilnost del17p ima neugoden potek bolezni. Učinek PgE1-OH smo preverili tako, da smo celice KLL z del17p tretirali s PgE1-OH 24h in 48h in izračunali vrednosti EC50.

del17p	EC50 (24h)	EC50 (48h)
KLL37	12,45	6,20
KLL53	51,44	33,04
KLL93	32,67	10,38
Povprečje vseh KLL	17,34	8,50
Kontrola LCL	41,87	28,90

Preglednica 11: Kromosomska nepravilnost del11q in EC50 vrednosti izbranih vzorcev.

Kromosomska nepravilnost del11q ima neugoden potek bolezni. Učinek PgE1-OH smo preverili tako, da smo celice KLL z del11q tretirali s PgE1-OH 24h in 48h in izračunali vrednosti EC50.

del11q	EC50 (24h)	EC50 (48h)
KLL50	18,28	0,72
KLL65	19,67	11,87
KLL78	8,22	5,95
KLL98	10,23	5,68
Povprečje vseh KLL	17,34	8,50
Kontrola LCL	41,87	28,90

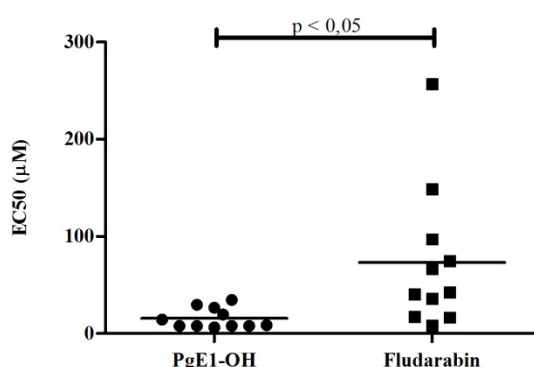
Kljub temu, da je v raziskavi sodelovalo malo bolnikov s tema kromosomskima nepravilnostma, je razvidno, da del17p in del11q ne vplivata na učinkovitost selektivnega agonista receptorja EP4. PgE1-OH deluje citotoksično tudi na celice s kromosomskima nepravilnostma, ki napovedujeta slabo prognozo. Ponovno pa je vidna visoka inter-individualna razlika med celicami KLL posameznih preiskovancev.

Ta rezultat je pomemben tudi iz vidika terapije, saj odsotnost gena ATM in/ali gena p53 pogosto prispeva k rezistenci na standardne zdravilne učinkovine, ki se jih uporablja pri zdravljenju KLL (43).

4.9. PgE1-OH je bolj citotoksičen v primerjavi s fludarabinom

V nadaljevanju nas je zanimala proti-rakava učinkovitost PgE1-OH na celicah KLL v primerjavi s standardno terapevtsko učinkovino fludarabin. Slednji je purinski analog, ki v celici inhibira DNA polimerazo in na ta način zavira sintezo DNA. Inhibira tudi encime ribonukleotid reduktazo, DNA primazo in DNA ligazo (26, 32).

Celice KLL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami agonista PgE1-OH in fludarabina, jih inkubirali za 24h in 48h in nato določili živost. S programom GraphPad Prism smo izračunali vrednosti EC50 in jih primerjali med seboj.



Slika 25: Agonist receptorja EP4 je bolj citotoksičen v primerjavi s fludarabinom po 24h.

Celice KLL (4×10^5 celic/mL) smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH in fludarabina (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) za 24h in 48h. Po 24h in 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. EC50 vrednost celic smo izračunali s programom GraphPad Prism.

Ugotovili smo, da je po 24h PgE1-OH bolj citotoksičen od fludarabina, ki predstavlja standardno terapijo pri KLL (Slika 25). Citotoksični učinki PgE1-OH, ki smo jih vrednotili z vrednostmi EC50, so bili značilno višji od fludarabina ($p < 0,05$). Po 48h so bili citotoksični učinki PgE1-OH še zmeraj višji od fludarabina, vendar značilne razlike nismo več zaznali.

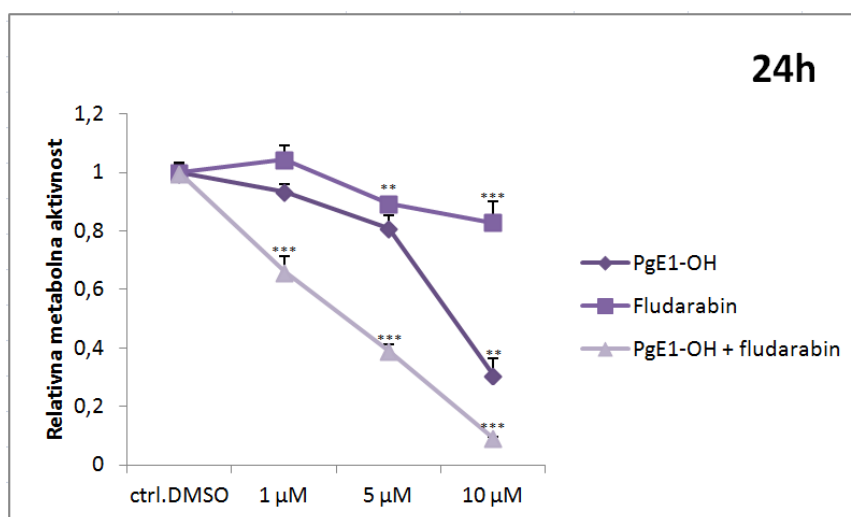
Večjo učinkovitost PgE1-OH na celicah KLL bi lahko razložili preko različnega mehanizma delovanja. Signalna pot NF- κ B je v malignih limfocitih B konstitutivno aktivirana, agonist receptorja EP4 pa deluje inhibitorno na komponente te signalne poti (96). Ugotovili pa smo tudi, da lahko PgE1-OH deluje imunomodulatorno, zato bi lahko bila v mehanizmu njegovega delovanja vključena tudi inhibicija preživetvenih citokinov (TNF- α , IL-2, IFN- γ).

Standardna terapija ni uspešna pri bolnikih, ki imajo prisotno delecijo gena ATM ali delecijo gena p53. Odsotnost teh genov vpliva na rezistenco na fludarabin, saj učinkovina ne more inducirati procesa apoptoze (43). Indukcija apoptoze preko aktivacije receptorja EP4 bi tako lahko predstavljala nov pristop v zdravljenju KLL.

4.10. PgE1-OH in fludarabin delujeta sinergistično

Zanimalo nas je, ali purinski analog fludarabin deluje sinergistično z agonistom receptorja EP4 *in vitro*. Zdravljenje s kombinacijo več učinkovin je zaželeno, saj je običajno bolj učinkovito, poleg tega pa bi s takšnim pristopom lahko pripomogli k zmanjšanju neželenih učinkov in pojava rezistence.

V ta namen smo celice KLL istočasno tretirali samo s PgE1-OH ali fludarabinom, ter z obema hkrati. Po 24h in 48h smo določili živost celic KLL.



Slika 26: Sinergistično delovanje PgE1-OH in fludarabina.

Celice KLL (4×10^5 celic/mL) smo tretirali s PgE1-OH in fludarabinom (1 µM, 5 µM, 10 µM). Po 24h inkubaciji smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Prikazan je reprezentativni KLL.

Iz Slike 26 je razvidno, da PgE1-OH, fludarabin in njuna kombinacija deluje citotoksično na celice KLL, ter da je PgE1-OH bolj citotoksičen kot fludarabin. Ko smo celice KLL tretirali z obema učinkovinama hkrati, se je preživetje celic še dodatno zmanjšalo. Po 24h tretiranju celic KLL s 5 µM PgE1-OH se preživetje celic zmanjša za 19 %, s 5 µM fludarabinom za 11 %, pri kombinaciji PgE1-OH in fludarabina pa kar za 61 %.

Vpliv sinergizma fludarabina in PgE1-OH smo ovrednotili s programom CompuSyn. Program deluje na podlagi Chou-Talalay metode, preko katere izračunamo kombinacijski indeks (KI) (Priloga 3).

Obdelava podatkov s programom CompuSyn je potrdila sinergistično delovanje fludarabina s PgE1-OH, saj je bil KI nižji od 1 (Priloga 4). Tudi pri vrednotenju sinergističnih učinkov pa smo opazili inter-individualno variabilnost v odzivu na PgE1-OH, fludarabin in njuno kombinacijo. Vpliv sinergizma je bil namreč na celicah KLL nekaterih bolnikov močnejše izražen kot pri drugih.

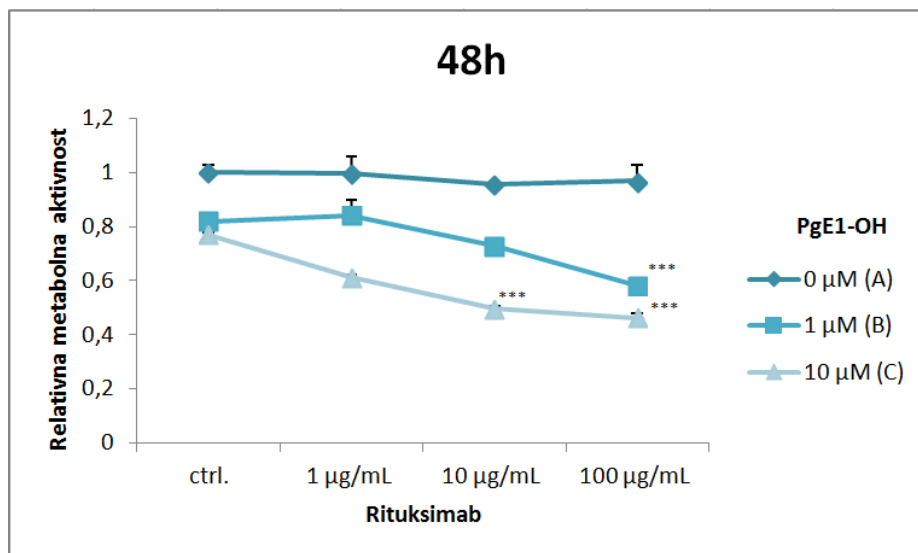
4.11. PgE1-OH in terapevtska monoklonska protitelesa delujejo sinergistično na celicah KLL nekaterih bolnikov

Pri zdravljenju KLL je vse pomembnejša kemoimunoterapija, kjer kombiniramo citostatik in monoklonsko protitelo (4). Zanimalo nas je, ali kombinacija monoklonskega protitelesa in agonista receptorja EP4 vpliva na preživetje celic KLL in ali je njuno delovanje sinergistično. Potrditev potencialnega sinergističnega delovanja bi lahko prispevala k napredovanju zdravljenja KLL, saj bi s takšnim pristopom lahko zmanjšali število neželenih učinkov in povečali učinkovitost terapije (36, 58).

V eksperimentalnem delu smo uporabili tri različna monoklonska protitelesa. Dve monoklonski protitelesi, rituksimab in ofatumumab, sta usmerjeni proti celičnemu označevalcu CD20, tretje monoklonsko protitelo, alemtuzumab, pa proti celičnemu označevalcu CD52. Celice KLL smo tretirali z izbranimi koncentracijami PgE1-OH (1, 10 μ M) in monoklonskega protitelesa (1, 10, 100 μ M), jih inkubirali za 24h in 48h ter s testom PrestoBlue pomerili živost celic.

4.11.1. Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH

Predstavili smo reprezentativne rezultate na celicah KLL nezdravljenega bolnika brez kromosomskih nepravilnosti (Slika 27). PgE1-OH je posredoval koncentracijsko odvisne citotoksične učinke, medtem ko sam rituksimab *in vitro* (v odsotnosti seruma in efektorskih celic) ni deloval citotoksično (A). Kombinacija PgE1-OH in rituksimaba je povečala citotoksične učinke na celicah KLL (B, C). Terapevtska koncentracija rituksimaba (10 μ g/mL) je značilno povišala citotoksične učinke PgE1-OH na celice KLL.



Slika 27: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in rituksimabom.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 μ M, 10 μ M) in rituksimabom (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) za 48h. Po 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo.

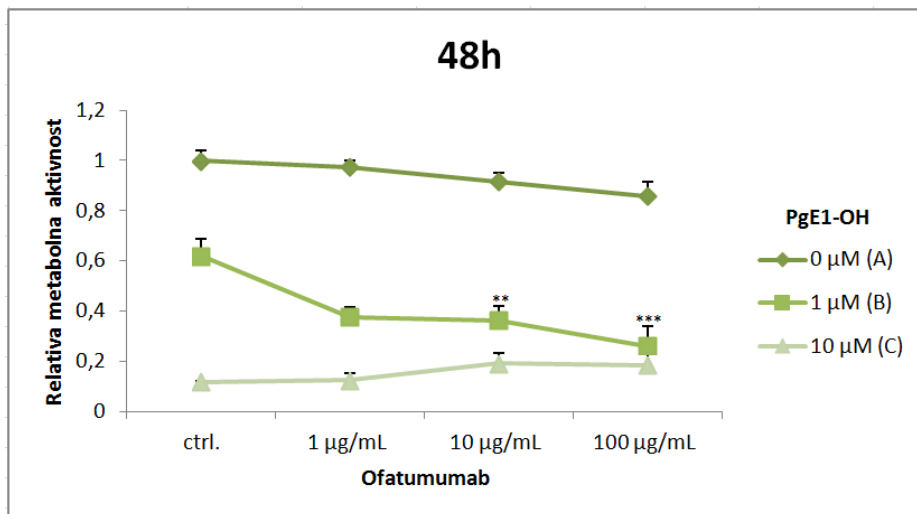
S programom CompuSyn smo ovrednotili vpliv sinergizma (Priloga 5). Sinergistični učinek PgE1-OH in rituksimaba smo ovrednotili na celicah KLL več bolnikov ter ga v večini primerov potrdili. Prisotne so bile inter-individualne razlike v odzivu celic KLL različnih bolnikov. Rituksimab *in vivo* deluje preko treh različnih mehanizmov; inducira apoptozo preko NF- κ B signalne poti ter deluje citotoksično preko mehanizmov ADCC in CDC (35). V našem eksperimentu celic KLL nismo inkubirali s serumom (CDC) ali efektorskimi celicami (ADCC), zato lahko sinergistične učinke rituksimaba pripišemo indukciji apoptoze, najverjetneje preko inhibicije NF- κ B signalne poti (36).

4.11.2. Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH

Pri vrednotenju kombinacije monoklonskega protitelesa ofatumumab in PgE1-OH na vpliv preživetja celic KLL smo predstavili reprezentativne rezultate na celicah KLL bolnice, ki je bila v preteklosti že zdravljena s kombinacijo FCR (Slika 28). Pri celicah KLL bolnice je bila določena tudi kariotipska sprememba in sicer del11q (gen ATM), za katero je značilna slaba prognoza.

Agonist receptorja EP4 je deloval citotoksično na celice KLL bolnice s slabo prognozo, medtem ko sam ofatumumab (monoklonsko protitelo proti CD20) ni deloval citotoksično *in vitro* (Slika 28) (A). Pri vrednotenju sinergističnega učinka monoklonskega protitelesa

ofatumumab in selektivnega agonista PgE1-OH na celicah KLL preiskovane bolnice smo potrdili sinergistični učinek pri nižji (1 μ M) koncentraciji PgE1-OH.



Slika 28: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in ofatumumabom.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 μ M, 10 μ M) in ofatumumabom (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) za 48h. Po 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo.

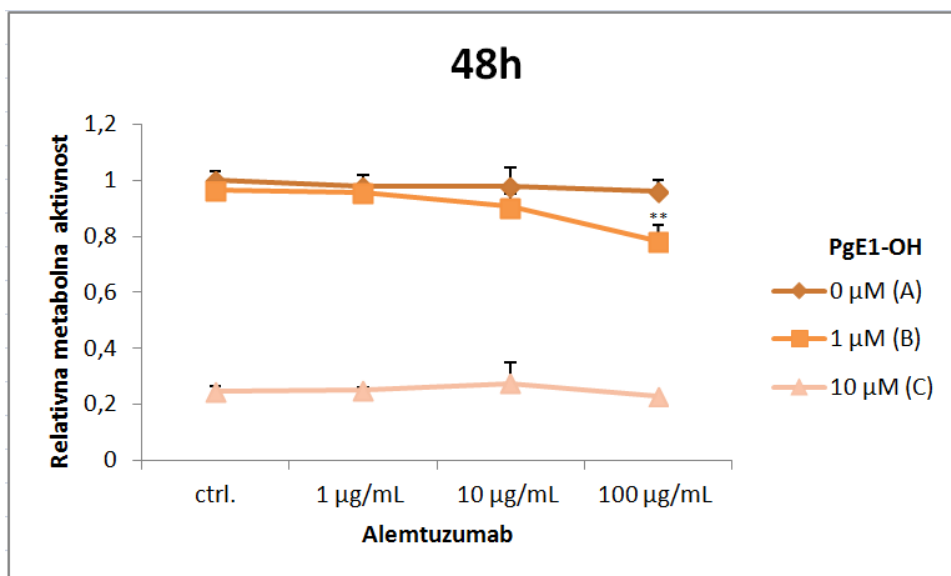
Tudi pri vrednotenju sinergističnega učinka ofatumumaba in PgE1-OH na celicah KLL drugih bolnikov smo ugotovili, da je njuna kombinacija delovala sinergistično predvsem v območju nizkih koncentracij (Priloga 6). V kliničnih študijah *in vitro* je bilo sicer dokazano, da deluje ofatumumab preko enakih mehanizmov kot rituksimab (CDC, ADCC, apoptoza), vendar ima večjo učinkovitost pri zdravljenju KLL posredovano preko komplemента (37, 38), saj je pri vezavi monoklonskega protitelesa ofatumumab na CD20 udeleženih več aminokislin (37, 38, 39).

4.11.3. Sinergistični učinek alemtuzumaba in PgE1-OH

V nasprotju z rituksimabom in ofatumumabom je alemtuzumab monoklonsko protitelo, ki se ne veže na celični označevalec CD20, temveč na CD52 (40). Tudi mehanizem njegovega delovanja je nekoliko drugačen, saj deluje večinoma preko ADCC (41).

Predstavili smo reprezentativne rezultate bolnika, ki je v preteklosti že petkrat prejel terapijo FCR, nazadnje pa tudi ibrutinin. Določeni je imel dve kariotipski spremembi, in sicer del13q in del11q. Iz Slike 29 lahko opazimo, da je PgE1-OH deloval citotoksično na celice KLL, sam alemtuzumab in kombinacija PgE1-OH in alemtuzumaba pa citotoksičnih učinkov na celice KLL izbranega bolnika ni povečala (A, B, C). Za potrditev odsotnosti

večjega citotoksičnega vpliva kombinacije PgE1-OH in alemtuzumaba smo s program CompuSyn ovrednotiti sinergizem na celicah KLL več bolnikov. Ugotovili smo, da alemtuzumab in PgE1-OH delujeta sinergistično samo v območju nizkih koncentracij, medtem ko v območju višjih koncentracij sinergistični učinek ni več prisoten (Priloga 7).



Slika 29: Metabolna aktivnost celic KLL po 48h inkubaciji s PgE1-OH in alemtuzumabom.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 µM, 10 µM) in alemtuzumabom (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) za 48h. Po 48h smo s testom PrestoBlue pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,2 % DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo.

Številne študije navajajo, da je monoklonsko protitelo alemtuzumab učinkovito pri bolnikih s KLL, ki se ne odzivajo na terapijo s fludarabinom in pri bolnikih, ki imajo ugotovljeno kromosomsko spremembo s slabo prognozo (del11q in del17p) (26).

4.12. Priprava KLL biobanke

V okviru magistrske naloge smo pridobili 5 mL polne krvi 77 bolnikov z diagnozo KLL, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi (KLL32 - KLL109). Za namene nadaljnjih raziskav in potrditvenih študij, smo pripravili biobanko, ki vsebuje ustrezno shranjene DNA, RNA, proteine in celice bolnikov z diagnozo KLL.

Količina limfocitov B, ki smo jih izolirali iz polne krvi 51 bolnikov, se je med posamezniki zelo razlikovala. Iz polne krvi bolnikov smo izolirali med 6×10^6 in 520×10^6 limfocitov B. Pri določenih bolnikih malignih limfocitov B nismo uspeli izolirati, saj pri postopku izolacije iz polne krvi limfocitov B nismo zaznali. Zaradi velikih količin malignih

limfocitov B in njihove kratke življenjske dobe *in vitro*, smo celice, ki jih v eksperimentalnem delu nismo uporabili, shranili za prihodne raziskave.

Preglednica 12: Biobanka

Shranjen material	CELICE	DNA – peleta izolacije celic B	DNA	RNA	PROTEINI
Število različnih bolnikov	43	66	21	39	27

V biobanki smo shranili od skupno 15×10^6 do 210×10^6 celic posameznega bolnika, zamrznjenih po 15×10^6 celic na kriovialo. Biobanka vsebuje tudi celice štirih bolnikov, pri katerih je prisotna kromosomska sprememba del11q ali del17p, za kateri je značilna slaba prognoza. Žal pa v pripravo biobanke nismo uspeli vključiti vseh bolnikov, pri katerih smo izolirali celice KLL. V teh primerih smo shranili le bolnikovo DNA, ki je ostala v peleti pri postopku izolacije celic B. Pri nekaterih bolnikih smo iz polne krvi bolnikov izolirali majhno število limfocitov B, ki smo jih v okviru magistrske naloge porabili v eksperimentalne namene.

Biobanko bi lahko povečali v primeru, da bi predhodno namnožili celice KLL. V Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKCL, celice KLL že nekaj časa uspešno gojijo z uporabo CpG-ODN in IL-2, IL-12 in IL-15. V primeru gojenja celic KLL, bi lahko biobanko še povečali in vanjo shranili vzorce bolnikov z majhnim številom celic KLL, z zanimivim potekom bolezni KLL, s kromosomskimi spremembami in vzorce bolnikov, ki so bili v preteklosti že zdravljeni.

Celice KLL smo zbirali z namenom dodatnih potrditvenih raziskav. V nadaljnjih raziskavah bi bilo koristno raziskati in opredeliti polimorfizme receptorja EP4. Smiselno bi bilo ovrednotiti ali polimorfizmi vplivajo na ekspresijo receptorja EP4, ali so učinki selektivnega agonista PgE1-OH odvisni od polimorfizmov receptorja EP4, in kako posamezni polimorfizmi vplivajo na terapijo. Odgovore na ta vprašanja bi lahko našli pri raziskovanju molekule DNA bolnikov z diagnozo KLL. Za dodatno preučevanje ekspresije receptorja EP4 in različnih citokinov, predvsem IL-6, bi kot vzorec izbire v bodoče lahko uporabili molekulo RNA. Pri KLL imajo zelo pomembno vlogo tudi različni proteinski kompleksi. Najpomembnejši med njimi so NF- κ B, CREB, ERK/AKT. Zato bi v

nadaljevanju klinične raziskave priporočali tudi vrednotenje in ocenjevanje proteinskih kompleksov.

5. SKLEPI

Z izhodiščem, da agonisti receptorja EP4 modulirajo NF- κ B transkripcijsko signalno pot, smo v magistrski nalogi želeli ovrednotiti prostaglandinski receptor EP4, kot potencialno tarčo za zdravljenje KLL (96). Preizkusi so bili zasnovani na zdravih (celice LCL) in na malignih celičnih linijah (KLL32-KLL109) limfocitov B.

Najprej smo preverili in potrdili prisotnost receptorja EP4 na celicah LCL in celicah KLL. Proti-rakavo učinkovitost agonista receptorja EP4 smo vrednotili s preverjanjem citotoksičnosti PgE1-OH na celicah KLL. Ugotovili smo, da agonist receptorja EP4 deluje citotoksično na maligno spremenjene celice B, ter da so njegovi učinki koncentracijsko in časovno odvisni. Selektivnost agonista receptorja EP4 na maligne limfocite B smo potrdili s primerjavo vrednosti EC50 na celicah LCL in celicah KLL, dokazali pa smo tudi, da je ekspresija receptorja EP4 na malignih limfocitih B večja kot na zdravih limfocitih B.

V nadaljevanju magistrske naloge smo vrednotili imunomodulatorne učinke selektivnega agonista receptorja EP4. Ugotovili smo, da PgE1-OH deluje imunomodulatorno na celice LCL.

V odzivu celic KLL na PgE1-OH, pri določanju ekspresije receptorja EP4, pri določanju EC50 vrednosti celic KLL različnih bolnikov z različnimi stadiji bolezni in različnimi kariotipskimi spremembami smo potrdili visoko inter-individualno variabilnost med celicami KLL posameznih preiskovancev. Hkrati smo dokazali, da kariotip in stadij bolezni KLL ne vplivata na proti-rakavo učinkovitost agonista receptorja EP4.

Preverjali smo tudi učinkovitost selektivnega agonista PgE1-OH in standardne terapevtske učinkovine fludarabina. Ugotovili smo, da je PgE1-OH bolj učinkovit v primerjavi s fludarabinom po 24h inkubaciji, če pa celice KLL sočasno tretiramo s PgE1-OH in fludarabinom, je njun učinek sinergističen. Preverili smo tudi ali je sinergistični učinek prisoten tudi pri sočasnem tretiranju celic KLL z monoklonskimi protitelesi in PgE1-OH. Ugotovili smo, da rituksimab in PgE1-OH v večini primerov deluje sinergistično na maligne limfocite B, medtem ko ofatumumab in PgE1-OH oziroma alemtuzumab in PgE1-OH delujeta sinergistično samo v območju nižjih koncentracij. Do teh ugotovitev smo prišli s programom CompuSyn.

V nadaljevanju bi bilo smiselno opraviti tudi preizkuse na vzorcih DNA, RNA in proteinih. Opredeliti bi bilo potrebno možne polimorfizme receptorja EP4 in opredeliti njihove vplive na terapijo. Ekspresijo receptorja EP4 bi lahko natančneje raziskali s preizkusi na molekuli RNA. Dodatno pa bi lahko ovrednotili in ocenili tudi najpomembnejše proteinske komplekse, kot so NF- κ B in CREB.

Menimo, da smo preko našega eksperimentalnega dela prišli do obetavnih rezultatov pri vrednotenju prostaglandinskega receptorja EP4, kot potencialne tarče za zdravljenje KLL.

6. LITERATURA

1. **Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S:** Cellular and molecular immunology, 6. izdaja, Saunders/Elsevier, Philadelphia 2010: 505.
2. **Društvo bolnikov s krvnimi boleznimi:** Akutne in kronične levkemije. <http://www.drustvo-bkb.si/o-krvnih-bolezni/akutne-in-kronicne-levkemije/?PHPSESSID=a9a000c6e66149e1dd672da174d4953e>. (15.4.2015)
3. **Zver S:** Slovensko združenje bolnikov z limfomi in levkemijo, L&L – Kronična limfocitna levkemija – zloženska. Ljubljana 2011.
4. **Zver S:** Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 465-74.
5. **Kalil N, Bruce D, Cheson D:** Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist* 1999; 4: 352-369.
6. **Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P:** Interna medicina, Bolezni krvi in krvotvornih organov. 4. izdaja. Ljubljana: Littera picta: Slovensko medicinsko društvo 2011: 1326-1328.
7. **Hallek M:** Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology* 2013; 88: 804-816.
8. **Arp EW Jr, Wolf PH, Checkoway H:** Lymphocytic leukemia and exposure to benzene and other solvents in the rubber industry. *J Occup Med* 1983; 25: 598-602.
9. **Campath®:** How is CLL diagnosed? <http://www.campath.com/UnderstandingCLL/DiagnosisOfCLL.html>. (20.4.2015)
10. **Cancer.net. Leukemia:** Chronic lymphocytic – CLL: diagnosis. <http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/diagnosis>. (23.4.2015)
11. **MedicineWorld.Org:** New biomarker for chronic lymphocytic leukemia <http://medicineworld.org/stories/lead/4-2009/new-biomarker-for-chronic-lymphocytic-leukemia.html>. (20.4.2015)
12. **Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al.:** Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 378-382.
13. **Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D:** Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51: 364-369.
14. **Rozman C, Montserrat E:** Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-1057.
15. **Mayo Clinic:** Chronic lymphocytic leukemia, Tests and diagnosis. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-lymphocytic-leukemia/basics/tests-diagnosis/con-20031195>. (23.4.2015)
16. **Nabhan C, Rosen TS:** Chronic Lymphocytic leukemia: A clinical review. *JAMA* 2014; 312: 2265-2276.

17. **Mauro FR, Foa R, Cerretti R, et al.:** Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic and prognostic features. *Blood* 2000; 95: 2788-2792.
18. **Shanafelt TD, Greyer SM, Kay NE:** Prognosis at diagnosis: integrating molecular biology insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 193: 1202-1210.
19. **Montserrat E:** Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J* 2002; 3: 7-9.
20. **Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, et al.:** Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J. Mol Med* 1999; 77: 266-281.
21. **Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al.:** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916.
22. **Crespo M, Bosch F, Villamor N, Rassenti LZ:** ZAP-70 expression as a surrogate marker for immunoglobulin variable region mutations in CLL. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
23. **Damle RN, Wasil T, Fais F, et al:** Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
24. **Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al:** ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 363: 105-111.
25. **Weirda WG, O'Brian S, Wang X, Magnac C, Porsher R, Davi F, et al.:** Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with CLL. *Blood* 2007; 109: 4679-4685.
26. **BC Cancer Agency:** Drug name: Fludarabine. http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Fludarabine_monograph_1Sept2013_formatted.pdf. (6.5.2015)
27. **Macmillan Cancer Support.** <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertreatment/Treatmenttypes/Chemotherapy/Combinationregimen/FCR.aspx>. (22.4.2015)
28. **Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A-M, Foon KA:** Immunochemotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide improves response rates and progression free survival of previously untreated patients with advanced CLL (abstract). *Blood* 2008; 112: 325.
29. **Stanglmaier M, Reis S, Hallek M:** Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2004; 83: 634-645.
30. **Rosenwald A, Chuang EY, Davis E, et al.:** Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood* 2004; 104: 1428-1434.
31. **Hillmen P:** Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 104-109.

32. **Ricci F, Tedeschi A, Morra E, Montillo M:** Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and clinical risk management* 2009; 5: 187-207.
33. **Bonavida B:** Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 2007; 26: 3629-3636.
34. **Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ:** The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8: 140-174.
35. **Rossman ED, Lundin J, Lenkei R:** Variability in B-cell antigen expression: implications for treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *The haematology journal* 2001: 300-306.
36. **Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B:** Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2005; 65 (1): 264-76.
37. **Ruuls RS, Lammerts Van Bueren J, Van de Winkel J, Parren WH:** Novel human antibody therapeutics: The age of Umabs. *Biotechnology journal* 2008; 3: 1157-1171.
38. **Grosicki S:** Ofatumumab for treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2015: 1-8.
39. **Sandhu S, Mulligan PS:** Ofatumumab and its role as immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2015; 100(4): 411-414.
40. **Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al.:** Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: Results of a large international study. *Blood* 2002; 99: 3554-3561.
41. **Nuckel H, Frey U, Roth A, Duhrsen U, Siffert W:** Alemtuzumab induces enhanced apoptosis in vitro in B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by antibody dependent cellular cytotoxicity. *European journal of Pharmacology* 2005: 217-224.
42. **GeneCards® Human gene database:** CD52 Gene. http://v4.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD52#genomic_location. (22.5.2015)
43. **Abrisqueta P, Crespo M, Bosch F:** Personalizing treatment for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2011; 4 (1): 27-35.
44. **Cheol-Hee C:** ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers of their reversal. *Cancer cell international* 2005, <http://www.cancerci.com/content/5/1/30>. (28.5.2015)
45. **Carballido E, Veliz M, Komrokji R, Pinilla-Ibarz J:** Immunomodulatory drugs and active immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control* 2012;19: 54 – 67.
46. **Rozovski U, Keating JM, Estrov Z:** Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology/Hematology* 2013; 88: 655-666.
47. **Mahadevan D, Choi J, Cooke L, Simons B, Riley C, Klinkhammer T, et al:** Gene expression and serum cytokine profiling of low stage CLL identify WNT/PCP, Flt-

- 3L/Flt-3 and CXCL9/CXCR3 as regulators of cell proliferation, survival and migration. *Human Genomics and proteomics* 2009; 453-634.
48. **Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al.:** Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001; 97: 256-263.
 49. **Burger JA, Montserrat E:** Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood* 2013; 121(9): 1501-1509.
 50. **Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, et al.:** A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis *in vitro*. *PloS ONE* 2013; 8: e60370.
 51. **Tangye SG, Raison RL:** Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5⁺ B cells and preserve expression of bcl-2. *Immunology and cell biology* 1997; 75: 127-135.
 52. **Tangye SG, Raison RL:** Leukemic CD5⁺ B cell apoptosis. Coincidence of cell death and DNA fragmentation with reduced bcl-2 expression. *Br. J Haematol.* 1992; 92: 950-953.
 53. **Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB:** The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int J Hematol* 1995; 62 (2): 99-106.
 54. **Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK:** Tumor necrosis factor as a autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988; 30: 969-971.
 55. **Shamaa LA, Hussein Ael-S, Balbaa OA, Farahat NM, Ali MA:** Modulation of IL-4 level by fludarabine and its relation to apoptosis in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Egypt J Immunol* 2008; 15(1): 181-192.
 56. **Flaherty DK:** Immunology for pharmacy. St. Louis, Mo.:Elsevier, 2012: 63-70.
 57. **Kil LP, Yuvaraj S, Langerak AW, Hendriks RW:** The role of B cell receptor stimulation in CLL pathogenesis. *Curr Pharm Des.* 2012; 18: 3335-3355.
 58. **Gobec M, et al.:** Chemo-sensitizing effects of EP4 receptor-induced inactivation of nuclear factor- κ B. *Eur J Pharmacol* 2014; 742: 81-88.
 59. **Sugimoto Y, Narumiya S:** Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282: 11613-11617.
 60. **Foord SM, Marks B, Stolz M, Bufflier E, Frase NJ, Lee MG:** The structure of prostaglandin EP4 receptor gene and related pseudogenes. *Genomics* 1996; 35: 182-188.
 61. **Sigal, E:** The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *American journal of physiology* 1991; 260: 13-28.
 62. **Cayman Chemical:** Eicosanoid receptors, the classical receptors. <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2085>. (4.5.2015)
 63. **Karin M, Cao Y, Greten RF, Li ZW:** NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 301-310.
 64. **Cell signaling technology[®]:** NF- κ B signaling pathway. <http://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-immunology-and-inflammation/nf-b-signaling-pathway/pathways-nfkb>. (5.5.2015)

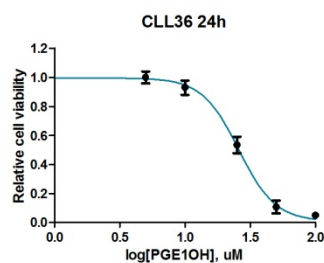
65. **Fujioka S, Sclabas GM, Schmidt ZN, Niu J, Frederick WA, Dong QG, Abbruzzese JL, Evans DB, Baker C, Chiao PJ:** Inhibition of constitutive NF- κ B activity by I κ B α M suppresses tumorigenesis. *Oncogene* 2003; 22: 1365-1370.
66. **Li Q, Verma IM:** NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725-734.
67. **Prijatelj M, Celhar T, Mlinarič-Raščan I:** Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandin and other lipid mediators* 2011; 95: 19-26.
68. **Sassone-Corsi P:** The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a011148.
69. **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(8): 937-949.
70. **Interpro, protein sequence analysis & classification:** cAMP response element binding (CREB) protein. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001630>. (7.5.2015)
71. **Mayr B, Montminy M:** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8): 599-609.
72. **Hata AN, Breyer RM:** Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2014; 103(2):147-66.
73. **Doljak R:** Sinergistično delovanje agonista receptorja EP4 in terapevtskih monoklonskih protiteles *in vitro* - magistrska naloga. Ljubljana, 2014.
74. **Invitrogen:** Vanderbilt university. <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. (10.4.2015)
75. **UMBC:** An honors university in maryland.. <http://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>. (10.4.2015)
76. **Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, et al.:** Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics*. 2010; 11: 327-340.
77. **Abcam® discover more:** Counting cells using a hemocytometer. <http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-hemocytometer>. (14.4.2015)
78. **Celeromics:** Cell counting with Neubauer chamber, Basic hemocytometer usage. <http://www.researchgate.net/publications/PublicPostFileLoader.html?id=53c6a939d4c11856478b45d2&key=89353f79-aa75-4e19-8161-d900619b728d>. (14.4.2015)
79. **Splawski BJ, Lipsky EP, Eisenstein ME, Chua SK:** Isolation of B cell populations. <https://intranet.pasteur.edu.uy/publico/bonilla/Protocolos/Protocolos%20en%20inmuno/Aislamiento%20de%20celulas%20B.pdf>. (9.3.2015)
80. **RosetteSep®HLA:** Human B cell enrichment cocktail. <http://www.stemcell.so/images/upload/pdf/527c94e612aae.pdf>. (10.5.2015)
81. **Vettese-dadey M:** Going their separate Ways: A profile of products for cell separation. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/19557/title/Going-Their-Separate-Ways--A-Profile-of-Products-for-Cell-Separation/>. (10.3.2015)

82. **Borra CR, Lotufo AM, Gaglioti MS, de Mesquita Barros F, Andrade MP:** A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res* 2009; 23 (3): 255-262.
83. **Pharmacelsus® Contract research organisation:** Resazurin Assay. www.pharmacelsus.de/resazurin_assay/. (11.3.2015)
84. **Bishop LM, Fody PE, Schoeff EL:** Clinical chemistry: principles, procedures, correlations. 5 izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 159-160.
85. **Vaje iz imunologije v laboratorijski diagnostiki.** Pretočna citometrija v hematologiji.
86. **Kotnik V, e tal.:** Imunološki priročnik. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2010: 77-81.
87. **Nadler LM, Ritz J, Hardy R, et al.:** A unique cell-surface antigen identifying lymphoid malignancies of B-cell origin. *J Clin Invest* 1981;67:134.
88. **Pescovitz MD:** Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006; 6: 859-866.
89. **BD Biosciences:** Human and Mouse CD Marker Handbook. https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf. (8.4.2015)
90. **Hamdy, M Reem:** Recent advances in the management of refractory vasculitis. Spletno mesto Intech. <http://www.intechopen.com/books/updates-in-the-diagnosis-and-treatment-of-vasculitis/recent-advances-in-the-management-of-refractory-vasculitis>. (30.4.2015)
91. **BioVision:** MTS cell proliferation colorimetric assay kit. <http://www.biovision.com/mts-cell-proliferation-colorimetric-assay-kit-8078.html>. (8.5.2015)
92. **Olympus:** Laser scanning confocal microscopy. <http://www.olympusfluoview.com/theory/confocalintro.html>. (16.5.2015)
93. **Imgarcade.** <http://imgarcade.com/1/confocal-microscope/>. (18.5.2015)
94. **Kielberg V:** Cryopreservation of mammalian cells – protocols. Kielberg Consult Aps, Nemčija. <https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/LPG/LCD/LCD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/Labware/Cryogenic%20Products/Cryoware%20Accessories/D19575~.pdf>. (27.3.2015)
95. **Life technologies™:** TRIzol® Reagent. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf. (31.3.2015)
96. **Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X:** Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *The journal of experimental medicine* 2008: 3091-3103.
97. **Dey I, Lejeune M, Chadee K:** Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol.* 2006; 149 (6): 611-623.
98. **Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y:** The prostanoid EP4 receptor and its signalling pathway. *Pharmacol Rev* 2013; 65: 1010-1052.

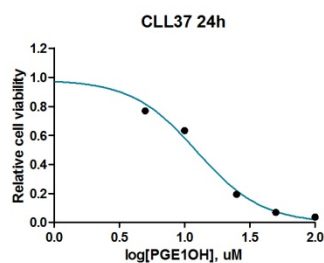
99. **B-lymphocytes surface receptors and their activation learning objectives.**
https://mlinjawi.kau.edu.sa/Files/0001735/files/18892_LECTURE%2012%20B%20lymphocytes%20surface%20receptors%20and%20activation.pdf. (2.6.2015)
100. **Wen , Y, et al.:** Chemotherapeutic-induced apoptosis: a phenotype for pharmacogenomic studies. *Pharmacogenet. Genomics* 2011; 21(8): 476-488.
101. **Markovič T, Gobec M, Gurwitz D, Mlinarič-Raščan I:** 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.
102. **Nishigaki N, et al.:** Identification of prostaglandin E receptor »EP2« cloned from mastocytoma cells EP4 subtype. *FEBS Lett* 1995; 364: 339-341.
103. **Decker T, Bogner C, Oelsner M, Peschel C, Ringshausen:** Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Annals of hematology* 2010; 89 (11): 1125-1132.
104. **Prijatelj M, Gobec M, Kranjc T, Mlinarič-Raščan:** EP4 receptor mediated effects on BCR induced IL-6 expression contribute to B cell apoptosis: članek doktorske disertacije. Ljubljana 2011.
105. **Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M:** Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2002; 95 (5): 1071-1075.
106. **Glas J, Seiderer J, et al.:** PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13,1 region predispose to crohn's disease and affect NF- κ B and XBP1 binding sites. *PLoS ONE* 7(12) : e52873.
107. **Libermann AT, Baltimore D:** Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Molecular and cellular biology* 1990: 2327-2334.

7. PRILOGE

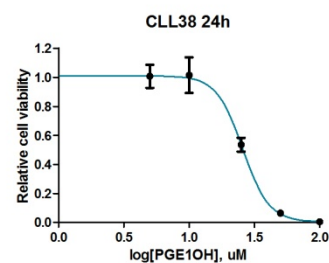
Priloga 1: Vpliv agonista receptorja EP4 na živost celic KLL po 24h in 48h



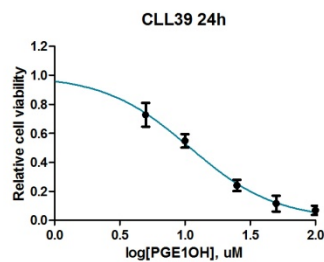
25.81



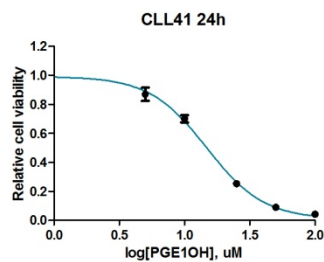
12.45



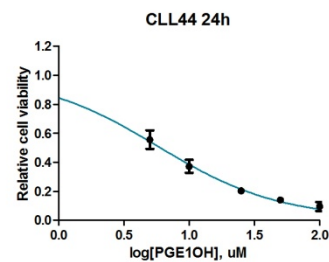
25.73



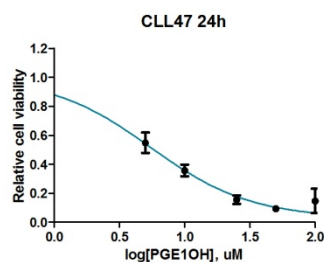
10.91



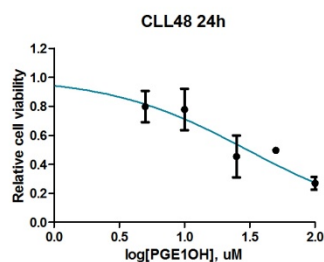
14.79



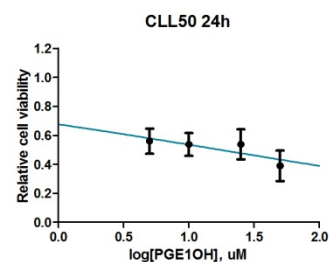
5.857



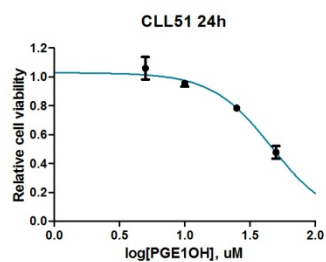
5.514



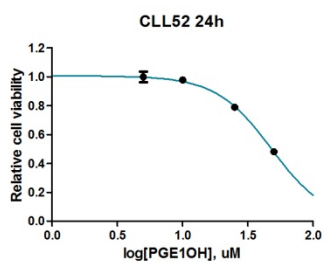
30.07



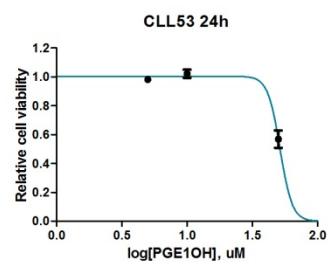
18.28



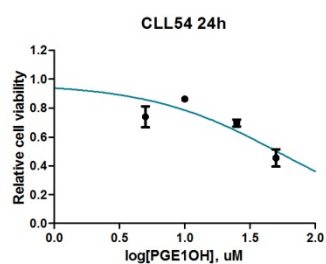
46.19



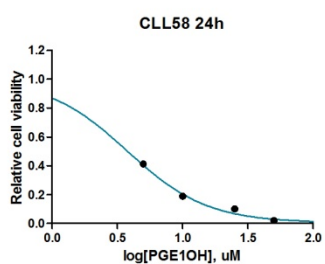
47.62



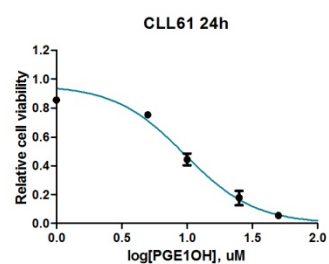
~ 51.44



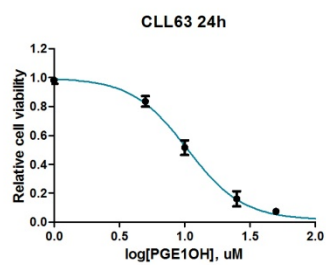
55.07



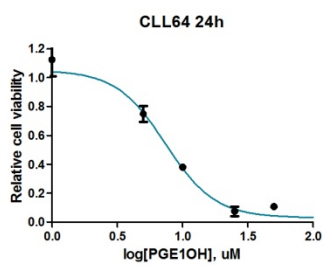
3.758



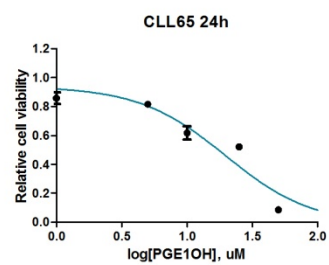
9.588



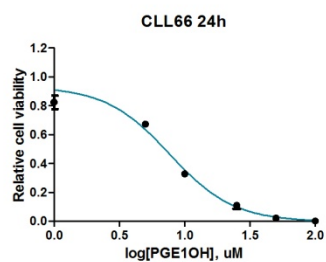
10.46



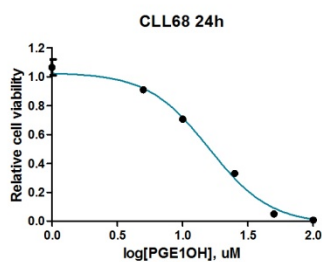
7.413



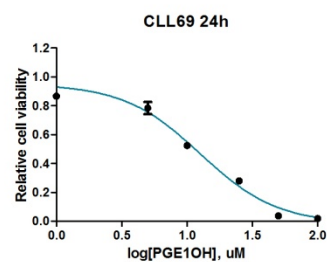
19.67



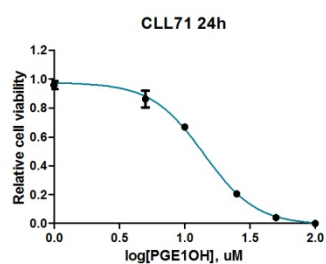
7.678



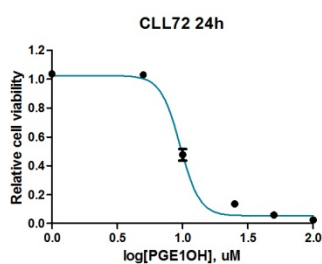
15.91



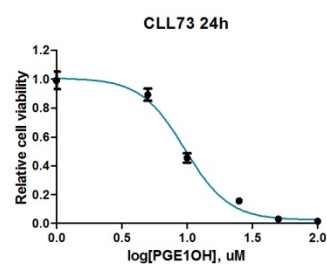
12.64



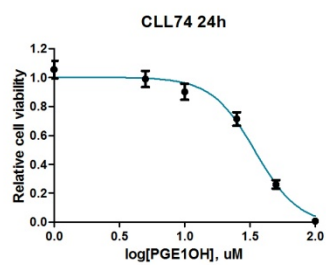
13.99



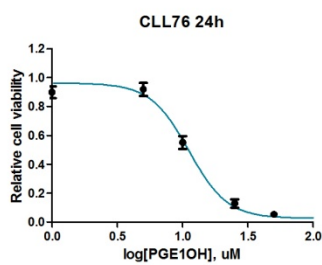
9.582



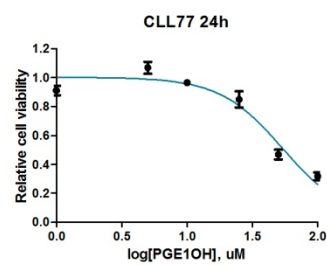
9.613



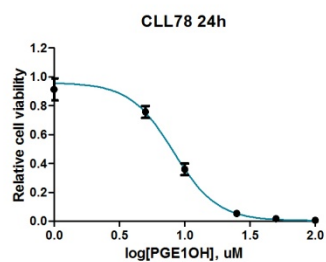
34.59



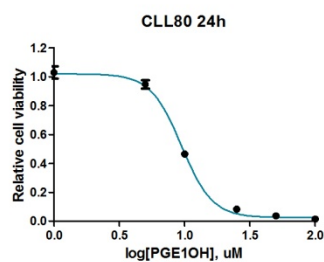
11.16



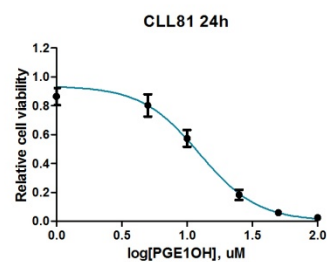
53.88



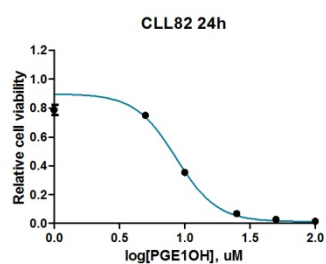
8.216



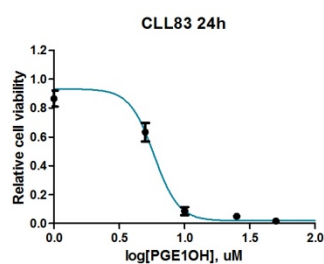
9.468



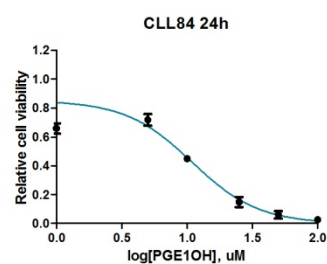
12.43



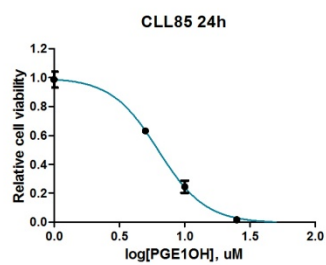
8.577



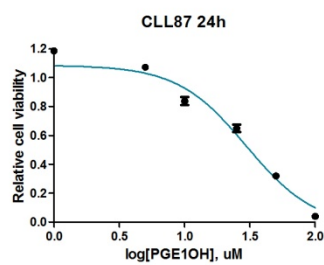
5.831



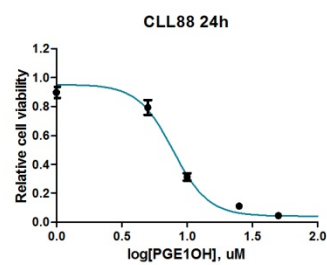
10.90



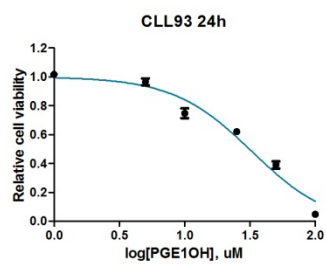
6.287



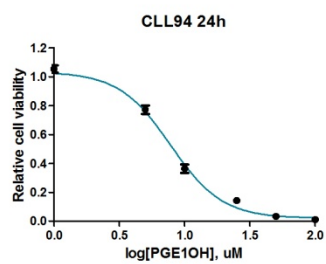
29.57



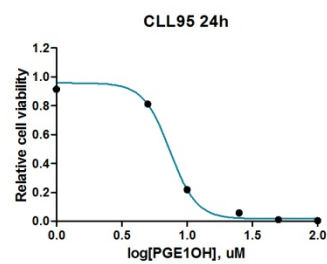
7.805



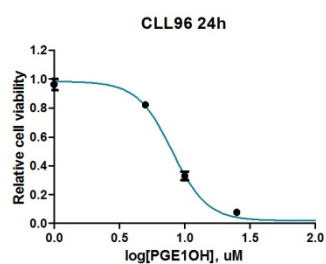
32.67



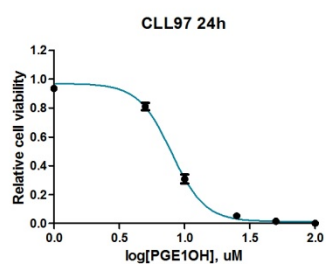
7.798



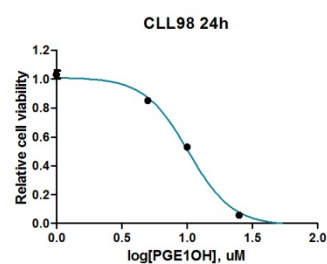
7.402



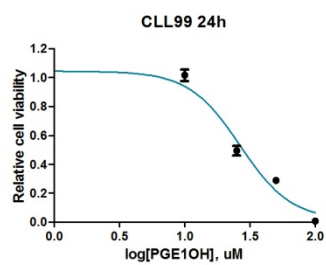
8.024



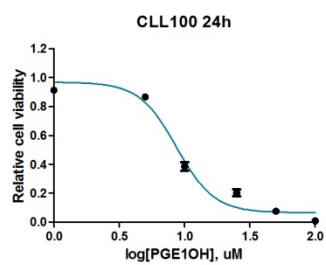
7.940



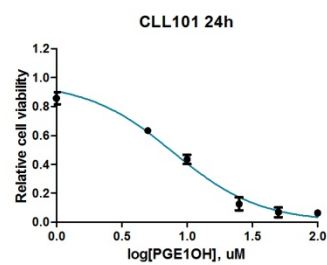
10.23



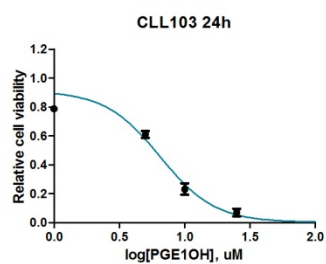
26.53



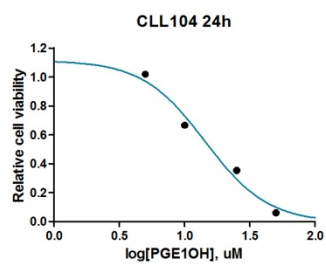
8.690



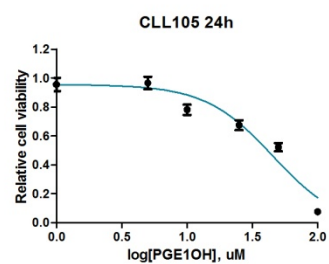
7.833



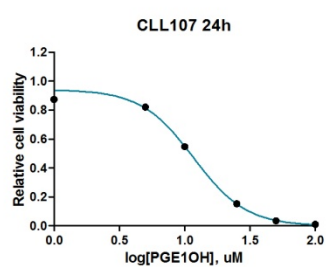
6.482



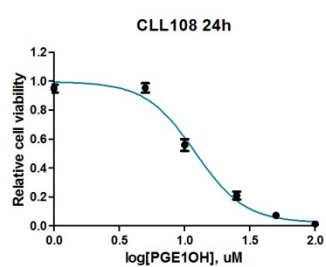
14.33



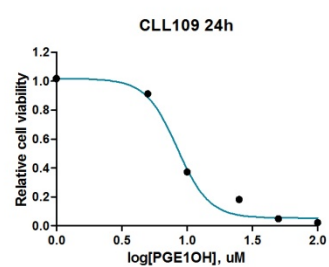
45.25



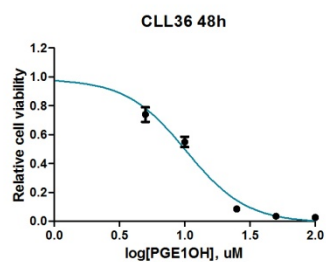
11.70



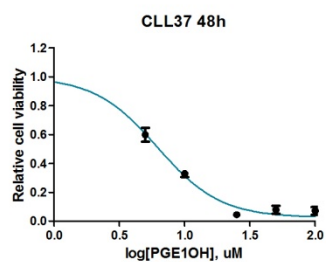
12.04



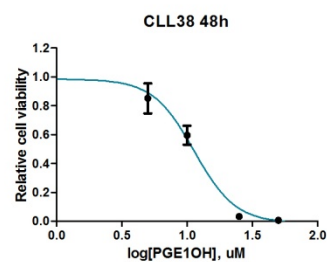
8.428



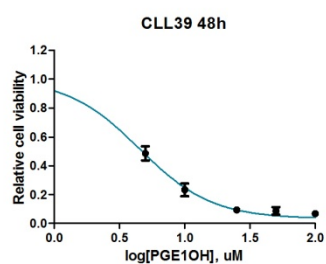
10.28



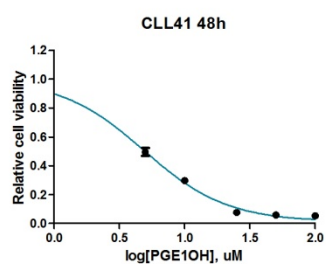
6.196



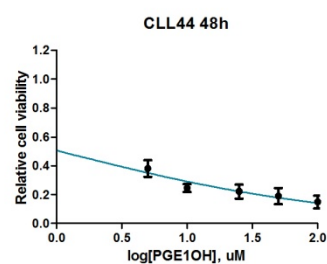
11.33



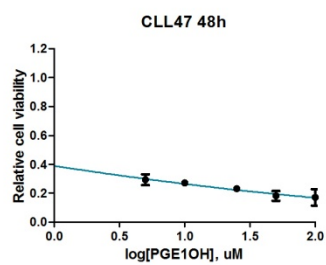
4.517



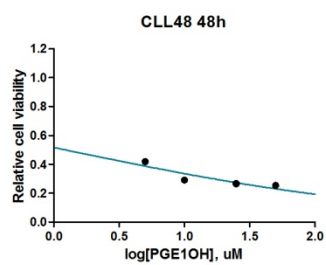
4.877



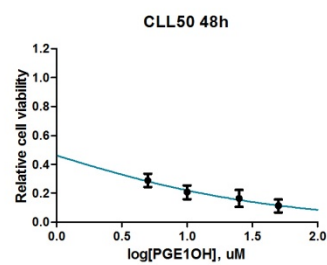
1.040



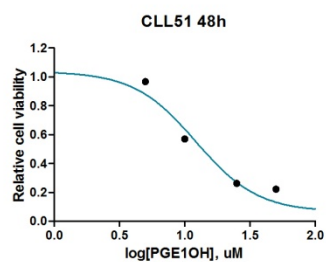
0.1567



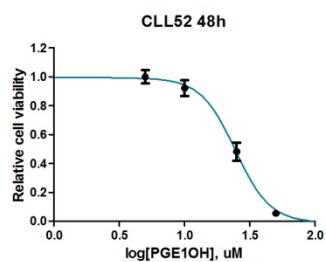
1.213



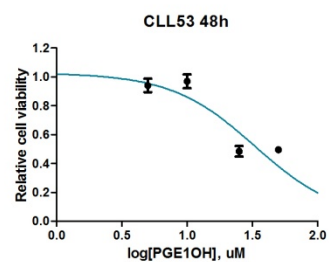
0.7192



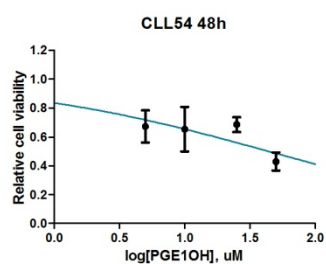
12.18



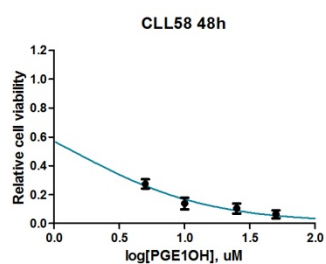
24.44



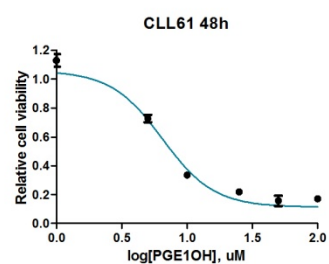
33.04



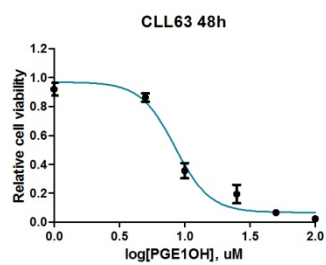
44.80



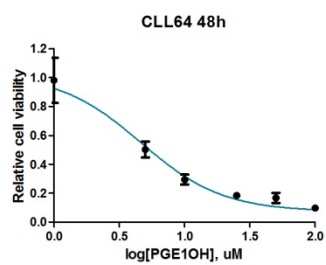
1.375



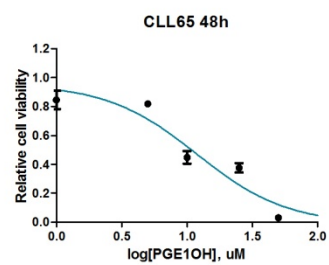
6.485



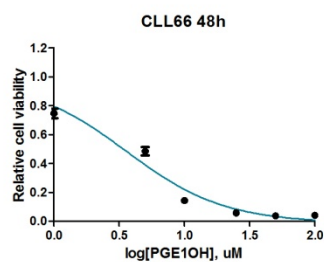
8.451



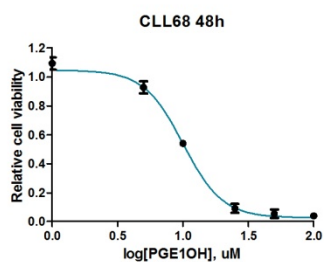
4.631



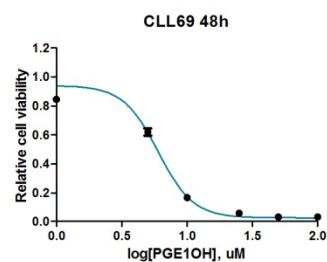
11.87



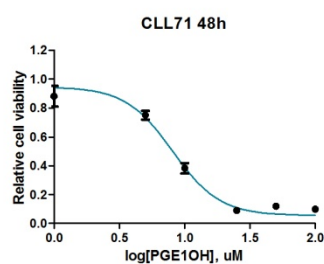
3.601



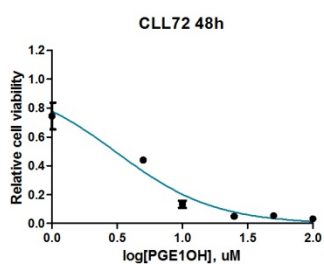
10.05



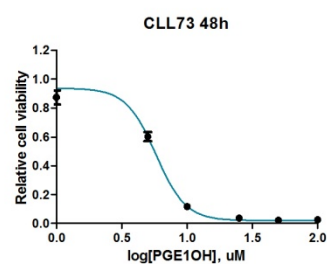
6.004



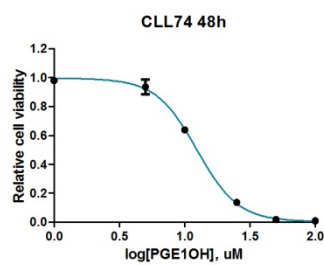
8.095



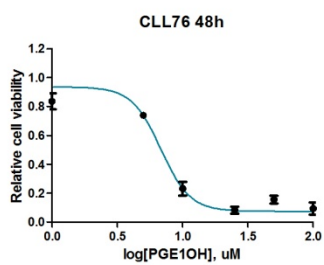
3.133



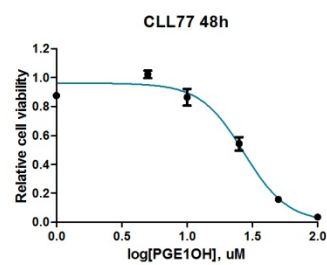
5.769



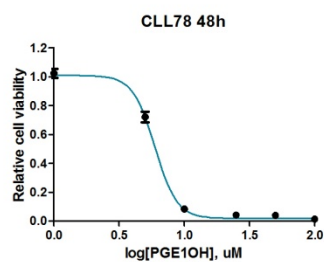
12.43



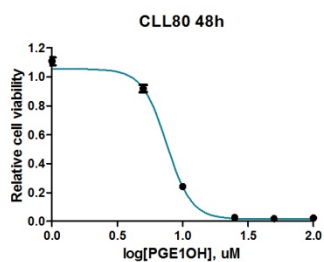
6.821



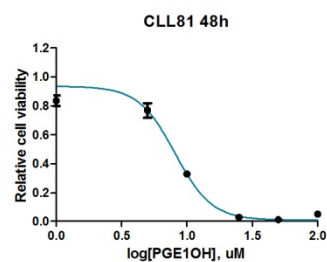
27.22



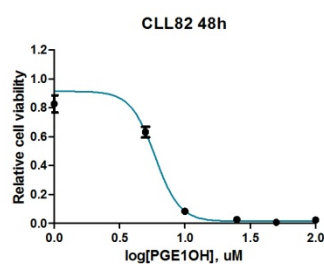
5.951



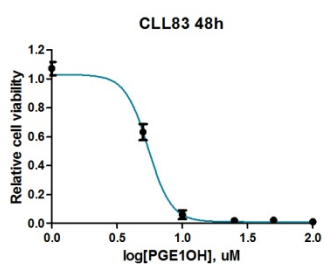
7.559



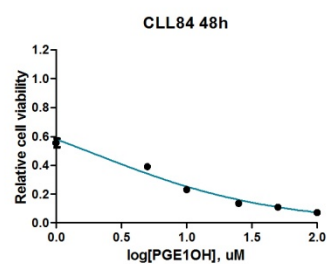
8.119



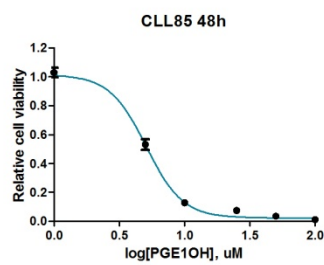
5.917



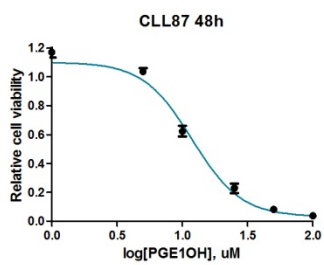
5.474



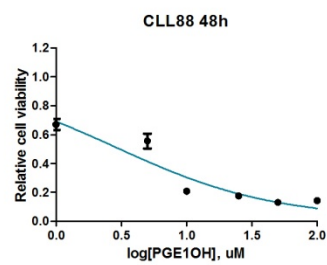
1.764



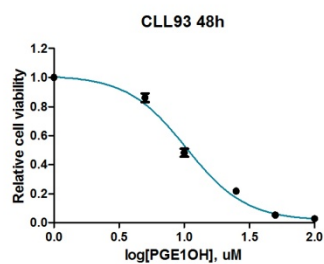
5.077



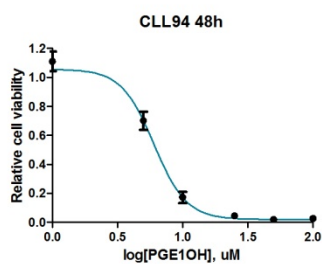
11.86



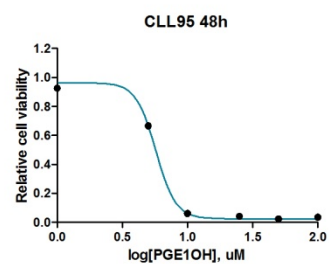
2.927



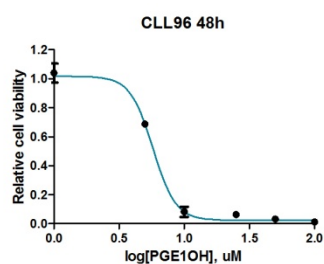
10.38



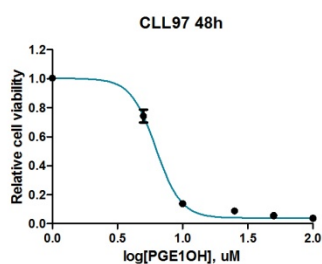
6.032



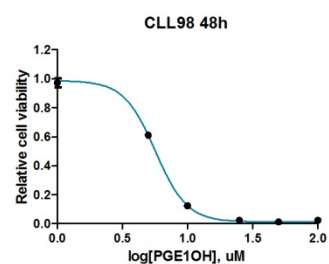
5.718



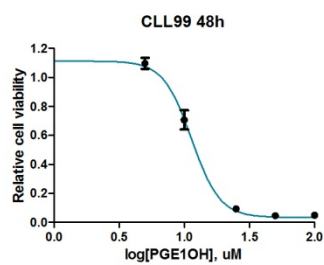
5.752



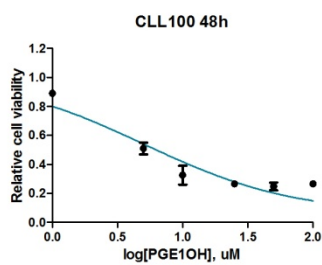
6.236



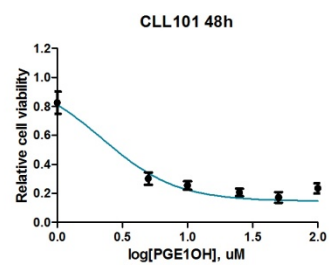
5.677



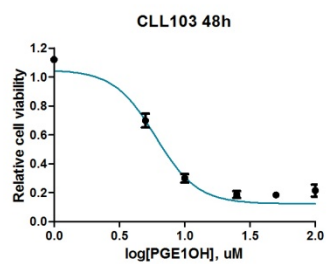
11.40



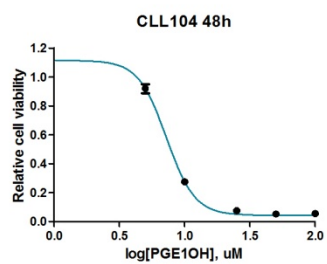
5.062



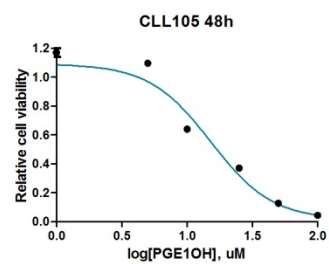
2.212



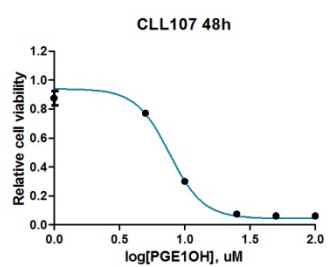
6.001



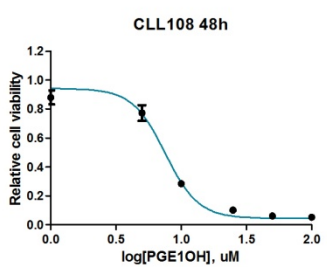
7.268



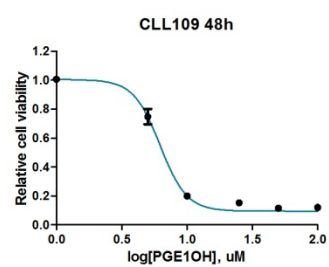
15.19



7.667

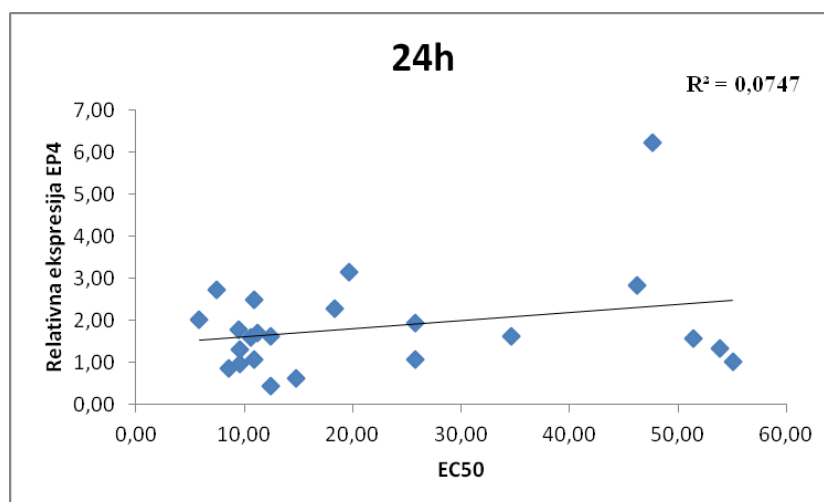


7.560



6.219

Priloga 2: Korelacija med povprečno intenziteto fluorescence (MFI) in EC50 vrednostjo na celicah KLL.



Priloga 3: Kombinacijski indeks

KOMBINACIJSKI INDEKS (KI)	Simbol	Pomen
< 0.1	+++++	Zelo močan sinergizem
0.1-0.3	++++	Močan sinergizem
0.3-0.7	+++	Sinergizem
0.7-0.85	++	Zmeren sinergizem
0.85-0.90	+	Rahel sinergizem
0.90-1.10	+/-	Skoraj aditiven
1.10-1.20	-	Rahel antagonizem
1.20-1.45	--	Zmeren antagonizem
1.45-3.3	---	Antagonizem
3.3-10	----	Močan antagonizem
>10	-----	Zelo močan antagonizem

Priloga 4: Sinergistični učinek fludarabina in PgE1-OH po 24h.

Fludarabin	PgE1-OH	KI	Sinergizem
1 μ M	1 μ M	0.308	++++
5 μ M	5 μ M	0.889	+
10 μ M	10 μ M	0.878	+

Priloga 5: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in rituksimab

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 μ M, 10 μ M) in rituksimabom (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) za 24h in 48h. S programom CompuSyn smo ovrednotili potencialni sinergizem.

PgE1-OH (μ M)	Rituksimab (μ g/mL)	KI (24h)	Sinergizem (24h)	KI (48h)	Sinergizem (48h)
1	1	1.467	---	0.908	+-
1	10	0.140	++++	0.328	+++
1	100	0.390	+++	0.074	++++
10	1	1.090	+-	1.00	+-
10	10	0.575	+++	0.339	+++
10	100	0.875	+	0.244	+++

Priloga 6: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in ofatumumab.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 μ M, 10 μ M) in ofatumumabom (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) za 24h in 48h. S programom CompuSyn smo ovrednotili potencialni sinergizem.

PgE1-OH (μ M)	Ofatumumab (μ g/mL)	KI (24h)	Sinergizem (24h)	KI (48h)	Sinergizem (48h)
1	1	0.189	++++	0.583	+++
1	10	0.397	++	0.592	+++
1	100	5.476	----	0.317	+++
10	1	0.506	+++	0.593	+++
10	10	34.792	-----	2.727	---
10	100	0.704	++	0.173	++++

Priloga 7: Kombinacijski indeks za PgE1-OH in alemtuzumab.

Celice KLL ($4,0 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s PgE1-OH (1 μ M, 10 μ M) in alemtuzumabom (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) za 24h in 48h. S programom CompuSyn smo ovrednotili potencialni sinergizem.

PgE1-OH (μ M)	Alemtuzumab (μ g/mL)	KI (24h)	Sinergizem (24h)	KI (48h)	Sinergizem (48h)
1	1	1.717	---	0.565	+++
1	10	0.177	++++	0.283	++++
1	100	6.936	----	0.442	+++
10	1	1.490	---	2.428	---
10	10	1.117	-	1.131	-
10	100	1.737	---	1.409	--

Priloga 8: **Biobanka**

Vzorec	Celice	DNA - pelet izolacije celic B	DNA	RNA	Proteini
32	4	2		4	
34	8	2	3	4	
36	1	2		3	
37	1	2		1	
38	14	2		1	
39	11	2		3	
41	2	2		1	
42		2		1	
43	1	2		1	
44	4	2		5	
45		2		1	
46		2		1	
47	1	2		2	
48		2		1	
50	1	2			
51	8	2			
52	1	2			
53		2		1	
54		2		1	
58	1	2	1		
61	2	2		1	
63	3	2	1	1	
64		2		1	
65	4	2	1	1	
66	3	2	1	2	1
68	10	2			1
69	3	2	1	1	1
71	4	2	1		1
72		2			1
73	1	2	1	2	1
74	5	2	2	2	1
75		2			
76		2			1
77	7	2	1	2	1
78		2			
79		2			
80	1	1	1	1	1

81	6	2	1		1
82	1	2		1	1
83		2		1	1
84	6	2	2	3	1
85	1	2	1		1
86		2			
87	1	2		1	1
88	3	2			1
89		2			
90	1	2		2	1
91	7	2	1	2	1
92		2			
93		2			
94	2	2	1	3	1
95	6	2	1	2	1
96	1	2	2	2	1
97	10	2	3	3	1
98	1	2	1		1
99	10	2	2	3	1
100		2		1	
101	5	2		2	
102		2			
103		2			
104		2			
105	1	2			
106		1			
107		2			1
108	1	2			
109	6	2			1