



Áhrif efnatoghemla í bráða og langvinnu hvítblæði

Getur lyfið Plerixafor haft áhrif á útþroskun hvítblæðisfruma?

Snædís Birna Björnsdóttir

Ritgerð til diplómaprófs
Háskóli Íslands
Læknadeild
Námsbraut í Lífeindafræði
Heilbrigðisvísindasvið



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Áhrif efnatoghemla í bráða og langvinnu hvítblæði
Getur lyfið Plerixafor haft áhrif á útþroskun hvítblæðisfruma?

Snædís Birna Björnsdóttir

Ritgerð til diplómaprófs á meistarastigi í Lífeindafræði

Umsjónarkennari: Martha Ásdís Hjálmarsdóttir

Leiðbeinendur: Sigrún Edda Reykdal og Íris Pétursdóttir

Læknadeild

Námsbraut í Lífeindafræði

Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands

Júní 2013

Ritgerð þessi er til diplómaprófs á meistarastigi í Lífeindafræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi réttshafa.

© Snædís Birna Björnsdóttir 2013

Prentun: Samskipti

Reykjavík, Ísland 2013

Ágrip

Hvítblæði er illkynja sjúkdómur í blóðmyndandi frumum líkamans sem einkennist af offjölgun hvítra blóðkorna í beinmerg af mismunandi þroskastigi eftir tegund hvítblæðis. Illkynja frumur hvítblæðis eru ýmist af mergfrumu eða eitilfrumu uppruna og getur krabbameinið annað hvort verið brátt eða langvinnt. Meðferðarúrreðum er ábótavant einkum fyrir fullorðna einstaklinga með bráða hvítblæði þar sem aðeins 30 – 50% sjúklinga lækna.

Efnatogviðtakinn CXCR4 og bindill hans CXCL12 gegna mikilvægu hlutverki í nýmyndun og viðhaldi blóðfruma. Við bindingu CXCR4 við CXCL12 færast óþroskaðar frumur í nærumhverfi beinmergsins þar sem þær fá að vaxa í friði. Í sjúkdómsástandi eins og hvítblæði gefur þessi binding illkynja frumum vernd frá frumudrepani krabbameinslyfjum. Plerixafor er fyrsta lyfið sem hindrar bindingu CXCL12 við CXCR4 sem samþykkt var á markaðnum. Í fyrstu var lyfið notað í meðferð gegn HIV en í dag er lyfið aðallega notað fyrir stofnfrumuskipti en það ýtir stofnfrumum úr beinmergnum og út í blóðrásina þar sem þeim er safnað saman. Nýjustu notkunarmöguleikar lyfsins eru að losa hvítblæðisfrumur úr nærumhverfi beinmergsins út í blóðrásina þar sem krabbameinslyf ná til þeirra og drepa.

Markmið þessarar rannsóknar var að skoða hvaða áhrif efnatoghemillinn Plerixafor hefur á hvítblæðisfrumur með því að skoða samspil lyfsins við önnur krabbameinslyf og athuga hvort lyfið hafi áhrif á útþroskun hvítblæðisfrumanna.

Fyrir rannsóknina var hannað frumuræktunarmódel út frá lyfjanæmisprófi þar sem styrkir krabbameinslyfjanna Cytarabine og Idarubicin voru ákveðnir. Stýrður frumudauði var mældur með flúorlitunum Annexin V FITC og Propidium iodide (PI) í frumufláðisjá. Til að rannsaka útþroskun fruma var sett upp kólóníurækt auk þess sem litað var með mótefnalitum fyrir sameindum sem einkenna þroskaðar frumur.

Niðurstöður rannsóknarinnar sýna fram á hæfni Plerixafor til að auka stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma. Einnig eru vísbendingar um möguleg áhrif Plerixafor á aukna útþroskun AML fruma með kólóníuræktun. Svipgerð hvítblæðisfruma breytist lítið nema þá CD 184 (CXCR4) sem breytist eftir því hvort frurnar voru ræktaðar með eða án Plerixafor en lyfið bindst CD 184. Plerixafor virkar betur á illkynja frumur í bráða hvítblæði heldur en illkynja frumur í langvinnu hvítblæði.

Frekari rannsóknir þarf að gera til að sannreyna þessar niðurstöður en þær gefa vísbendingu um að í náninni framtíð verði hægt að gefa sjúklingum með bráða hvítblæði Plerixafor samhliða hefðbundinni krabbameinslyfjameðferð.

Þakkir

Til að byrja með vil ég minnast Heklu Sigmundsdóttur sem var ein af hugmyndasmiðum þessa verkefnis og bauð mér þátttöku í því.

Sigrúnu Reykdal er ég óendanlega þakklát fyrir að taka við leiðbeinandastólnum þrátt fyrir miklar annir og deila með mér visku sinni, hjálpssemi og þolinmæði.

Íris Pétursdóttir fær mínar bestu þakkir fyrir alla aðstoðina og málefnalegar umræður í gegnum verkefnið.

Elísabet Kristbergsdóttir, lífeindaræðingur, fær þakkir fyrir kennslu á uppsetningu og skoðun kólóníurækta.

Guðmundur Rúnarsson, blóðmeinasérfræðingur, fær þakkir fyrir aðstoð við öflun á sýnum og uppsetningu á niðurstöðum úr frumflæðisjá.

Unnusta mínum, Heiðari Hrafni Halldórssyni er ég þakklát fyrir að vera alltaf til staðar fyrir mig og styðja mig og hvetja áfram á erfiðum sem og gleði stundum.

Fjölskyldu minni vil ég þakka allan stuðning og hvatningu í gegnum árin, ég væri ekki hér án ykkar.

Kristrún Sigurjónsdóttir samnemandi og vinkona fær góðar þakkir fyrir alla samvinnuna og aðrar gleðistundir í gegnum námið.

Styrkur fékkst frá Vísindasjóði Landspítala fyrir vinnslu þessa verkefnis 2010.

Verkefnið var unnið á rannsóknarstofu í blóðmeinafræði á Landspítala Háskólasjúkrahúsi við Hringbraut.

Efnisyfirlit

Ágrip	3
Þakkir.....	5
Efnisyfirlit	6
Myndaskrá	8
Töfluskrá.....	8
1 Inngangur.....	11
1.1 Hvítblæði.....	11
1.1.1 Bráða hvítblæði.....	11
1.1.1.1 Bráða mergfrumuhvítblæði (AML)	12
1.1.1.2 Bráða eitulfrumuhvítblæði (ALL)	13
1.1.2 Langvinnt hvítblæði	14
1.1.2.1 Langvinnt mergfrumuhvítblæði (CML)	14
1.1.2.2 Langvinnt eitulfrumuhvítblæði (CLL).....	15
1.1.3 Faraldsfræði hvítblæðis á Íslandi.....	16
1.2 Efnatoginn CXCR4	16
1.3 Krabbameinslyf.....	17
1.3.1 Cytarabine	17
1.3.2 Idarubicin	18
1.3.3 Plerixafor.....	18
1.4 Frumflæðisjá.....	19
1.4.1 Undirbúningur sýna	19
1.4.2 Mæling sýna	19
1.5 Kólóníuræktun	21
2 Markmið.....	22
3 Efni og aðferðir	23
3.1 Einangrun hvítblæðisfruma.....	23
3.2 Frumuræktun	23
3.3 Þynning lyfja	24
3.4 Kólóníuræktanir	24
3.5 Mótefnalitun og mæling í frumflæðisjá	24
3.6 Mæling á stýrðum frumudauða.....	25
3.7 Frysting fruma.....	26

3.8	Leyfi	27
3.9	Úrvinnsla gagna.....	27
4	Niðurstöður	28
4.1	Lyfjanæmispróf	28
4.2	Áhrif Plerixafor á lifun og stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma	30
4.3	Áhrif Plerixafor á tjáningu hvítblæðisfruma.....	32
4.4	Niðurstöður kólóníuræktana	34
5	Umræða.....	36
5.1	Lyfjanæmispróf	36
5.2	Áhrif Plerixafor á lifun og stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma	36
5.3	Áhrif Plerixafor á tjáningu yfirborðssameinda hvítblæðisfruma	38
5.4	Áhrif Plerixfor á útproskun hvítblæðisfruma	38
6	Ályktanir	40
	Heimildaskrá.....	41
	Fylgiskjöl.....	44

Myndaskrá

Mynd 1 Uppsetning mælieiningar í FACSCalibur.....	20
Mynd 2 Blóð/beinmergslaun skilin niður með ficolli.....	23
Mynd 3 Talningarreitir Neubauer glers.....	23
Mynd 4 Túlkun niðurstaðna úr mælingum á stýrðum frumudauða.....	26
Mynd 5 Lyfjanæmispróf af sjúklingi 1.....	29
Mynd 6 Mat á lifun og stýrðum frumudauða hjá viðmiðunarhóp.....	30
Mynd 7 Mat á lifun og stýrðum frumudauða á illkynja frumum hvítblæðissjúklinga.....	31

Töfluskrá

Tafla 1 Flúormerkt einstofna mótefni gegn yfirborðssameindum einkjarna fruma.....	25
Tafla 2 Þátttakendur rannsóknarinnar, sjúkdómsgreining og kyn.....	28
Tafla 3 Tjáning yfirborðssameinda CLL sjúklinga fyrir og eftir ræktun í 72 klst með og án lyfja.....	32
Tafla 4 Tjáning yfirborðssameinda AML sjúklinga fyrir og eftir ræktun í 72 klst með og án lyfja.....	33
Tafla 5 Kólóníuræktun viðmiðunarsýna án vaxtarþáttarins EPO.....	34
Tafla 6 Kólóníuræktun viðmiðunarsýna með vaxtarþættinum EPO.....	34
Tafla 7 Kólóníuræktun sjúklinga án vaxtarþáttarins EPO.....	35
Tafla 8 Kólóníuræktun sjúklinga með vaxtarþættinum EPO.....	35

Listi yfir skammstafanir

ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AML	Acute myeloid leukemia
APC	Allophycocyanin
BFU-E	Burst-forming unit - Erythroid
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony-forming unit
CFU-E	Colony-forming unit - Erythroid
CFU-GEMM	Colony-forming unit - Granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte
CFU-GM	Colony-forming unit - Granulocyte/Macrophage
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CML	Chronic myeloid leukemia
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPO	Erythropoietin
FAB	French-American-British
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scattered
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPCR	G-protein-coupled cell surface receptors
HIV	Human immunodeficiency virus
HLDA9	The 9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus type 1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein

PVSG	Polycythemia Vera Study Group
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDF-1	Stromal-derived-factor-1
SSC	Side scattered
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
WHO	World Health Organization

1 Inngangur

1.1 Hvítblæði

Hvítblæði er illkynja sjúkdómur í blóðmyndandi frumum líkamans sem einkennist af offjölgun hvítra blóðkorna í beinmerg af mismunandi þroskastigi eftir tegund hvítblæðis. Þessar illkynja frumur geta fundist í blóði sjúklinga og einnig safnast fyrir í milta, lifur og eitlum (Harmening, 2009).

Hvítblæði er skilgreint út frá frumutegundum í tvo meginflokka, það er mergfrumuhvítblæði og eitifrumuhvítblæði. Hvorum flokki er skipt niður í bráða eða langvinnt hvítblæði út frá þroska frumanna sem gerir þá fjóra aðal flokka: bráða mergfrumuhvítblæði (AML), langvinnt mergfrumuhvítblæði (CML), bráða eitifrumuhvítblæði (ALL) og langvinnt eitifrumuhvítblæði (CLL) (Harmening, 2009).

1.1.1 Bráða hvítblæði

Bráða hvítblæði einkennist af óþroskuðum frumum eða blöstum. Eins og nafnið gefur til kynna er sjúkdómsmyndunin bráð. Ef sjúkdómurinn er látinn óáreittur getur hann dregið sjúkling til dauða innan sex mánaða. Mergbilun er mun algengari í byrjun bráða hvítblæðis heldur en í langvinnu hvítblæði og veldur oft blóðleysi og fækkun á blóðflögum. Magn hvítra blóðkorna í blóði í bráða hvítblæði getur verið mismunandi, gildin geta verið hækkuð, eðlileg eða jafnvel lækkuð. Sé um hækkun að ræða fylgir því oftast aukning á blöstum í blóði (Harmening, 2009).

Sjúklingar með bráða hvítblæði sýna fljótt einkenni sjúkdómsins en algengustu einkennin eru þróttleysi, afbrigðilegar blæðingar, hiti og sýkingar. Þessi einkenni eru afleiðingar beinmergsbilunar. Rannsóknir á blóðhag og blóðstroki geta gefið mikilvægar vísbendingar um bráða hvítblæði og þarf þá að taka beinmergssýni til frekari rannsókna (Harmening, 2009).

Alþjóðaheilbrigðismálastofnunin (WHO) ásamt fjölda sérfræðinga hóf vinnu við nýja flokkun blóðsjúkdóma árið 1995. Flokkun WHO leggur meiri áherslu á erfðabreytileika en fyrri flokkanir höfðu gert. Við greiningu erfðagalla eru notaðar ýmsar sameindaerfðafræðilegar rannsóknir eins og fluorescent in situ hybridization (FISH) og polymerase chain reaction (PCR). Samkvæmt skilgreiningu WHO eiga blastar í beinmerg að vera $\geq 20\%$ en í FAB flokkunarkerfinu er miðað við 30% (Vardiman o.fl., 2002). Þegar greining á bráða hvítblæði er staðfest þarf að greina frumugerð blastanna til að flokka hvítblæðið sem AML eða ALL. Blastar eru skoðaðir í smásjá og reynt að sjá hvort um ræðir en til að staðfesta greininguna eru gerðar vefjalitanir auk þess að lita frumurnar með sértækum mótefnalitum og mæla í frumufldisjá (Sachdeva o.fl., 2006).

Meðferð gegn bráða hvítblæði er ein flóknasta krabbameinsmeðferðin. Meðferðin miðar að því að uppræta hvítblæðisfrumurnar, koma aftur af stað eðlilegri blóðmyndun og koma í veg fyrir endurkomu sjúkdóms. Meðferðin skiptist í þrjú stig sem eru innleiðslumeðferð (induction), framhaldsmeðferð (consolidation) og viðhaldsmeðferð (Kolitz, 2006). Innleiðslumeðferðin er margþætt fjöllyfjameðferð og markmiðið er að ná fram fullkomnu sjúkdómshléi, uppræta hvítblæðisfrumurnar í mergnum en hversu vel það gengur gefur góða vísbendingu um lækningu á sjúkdómnum. Þessi fyrsta meðferð er mjög erfið og tekur um einn mánuð (Nagayama o.fl., 2006). Ef sjúklingurinn kemst í sjúkdómshlé tekur við framhaldsmeðferð en hún fer eftir því hvaða tegund hvítblæðis er um að ræða og á þessi meðferð að fjarlægja þær krabbameinsfrumur sem eftir eru í líkamanum. Tímalengd meðferðar fer einkum eftir því

hvort um er að ræða mergfrumu- eða eitilfrumuhvítblæði. Viðhaldsmeðferð er fyrst og fremst beitt í eitilfrumuhvítblæði og tekur hún allt að tvö ár (Ribera o.fl., 2007). Lyf sem notuð eru við meðferðina drepa frumur í skiptingu yfirleitt með því að hindra nýmyndun DNA eða RNA. Miklar aukaverkanir fylgja meðferðinni eins og sýkingar, líffæraskemmdir og blæðingar (Harmening, 2009). Meðferðum hefur farið mikið fram síðustu 20 ár en enn er skortur á góðum meðferðarúrræðum. Einungis um 1/3 fullorðinna læknastráta eru betri hjá börnum og ungu fólki með bráða eitilfrumuhvítblæði þar sem allt að 80% geta læknastráta með háskammta lyfjameðferðum (Zhu o.fl., 2010). Markmiðið er að hanna einstaklingsbundnar meðferðir sem ekki fylgja jafn miklar aukaverkanir (Harmening, 2009).

1.1.1.1 Bráða mergfrumuhvítblæði (AML)

Samkvæmt Krabbameinsfélagi Bandaríkjanna (American cancer society) er bráða mergfrumuhvítblæði (AML) algengast í fullorðnum eintaklingum og er óalgengt að sjúkdómurinn greinist í fólki undir fertugu. Meðalaldur AML sjúklunga er 67 ár og virðist vera aðeins algengari hjá körlum heldur en konum. Áhætta karla að fá sjúkdóminn er 1:232 en hjá konum er áhætta 1:278 (American cancer society, 2013b).

Blastar í AML sýnum eru stórir eða um 15-20 μm í þvermál með hóflegu umfrymi sem er oft kornótt. Litningarnir í kjarnanum láta ásjón hans vera fínkornótt og stundum sjást fleiri en eitt kjarnakorn. Það sem er helst einkennandi fyrir blasta í AML eru Auer stafir en þeir eru til staðar í umfryminu í 60-70% tilfella (Harmening, 2009).

FAB flokkunin skiptir AML í eftirfarandi hópa:

- M0 einkennist af mjög frumstæðum blöstum en þessi flokkur samsvarar 5% allra tilfella af AML
- M1 þar sem meira en 90% blastar af myeloid frumum. Er til staðar í 15% tilfella
- M2 blastar færri en 90% myeloid fruma og fleiri en 10% þroskaðri forstíg, er til staðar í 25% tilfella sem gerir þetta algengasta undirflokkinn
- M3 samanstendur af aukningu á promyelocytum. Þessi flokkur á sér undirflokkinn M3m sem samanstendur af promyelocytum með microgranúlum. Samtals er þessi flokkur 10% tilfella af AML
- M4 er myelomonocytic leukemia og inniheldur undirflokkinn M4Eo sem einkennist af myelo- og monoblöstum með beinmergs eosinophilii. Þessi flokkur er um 20% tilfella
- M5 einkennist af monoblöstum, þessi flokkur á við í 10% tilfella
- M6 einkennist af forstígum rauðra blóðkorna og mergmisþroskun, á við í um 5% tilfella
- M7 einkennist af megakaryoblöstum og mergfibrosu en þessi flokkur á við í 5% tilfella (Harmening, 2009).

Erfitt er að spá fyrir um líffræðilega hegðun AML einungis með flokkun eftir gerð frumanna en þar kemur flokkunarkerfi WHO vel að notum. Þetta flokkunarkerfi byggir á sameindafræðilegum og

erfðafræðilegum eiginleikum krabbameinsfrumanna en FAB flokkunin fær þó að halda í flokknum óskilgreint AML. WHO flokkunarkerfið samanstendur af fimm megin flokkum:

1. AML með ákveðnum litningabreytingum; t(8;21) (q22;q22) (AML1/ETO); inv(16) (p13q22); t(15;17)(q22;q12)(PML/RARalpha); 11q23 (MLL)
2. AML með misþroska í fleiri en einni frumulínu
3. AML með mergmisþroskun tengt undanfarandi meðferð
4. AML ekki flokkað annars staðar
5. Bráða hvítblæði af óljósum uppruna. Til dæmis geta frumur tjáð bæði sameindir sem einkenna AML og ALL (Biphenotypic leukemia) (Jaffe, 2001).

AML er mjög misleitur sjúkdómur og það sem skiptir mestu upp á val á meðferð eru erfðafræðilegir og sameindafræðilegir þættir auk þess sem þeir gefa til kynna batahorfur sjúklings. Allt að 50 - 60% yngra fólks, sem ekki hefur slæma áhættuþætti, læknað og mergskipti getur læknað um 50% sjúklinga en árangur meðferðar eldra fólks en ennþá mjög lélegur í dag (Harmening, 2009).

1.1.1.2 Bráða eitifrumuhvítblæði (ALL)

Bráða eitifrumuhvítblæði (ALL) er algengara í börnum en fullorðnum og er áhættan á ALL mest fyrir börn undir fimm ára aldri. Áhættan minnkar svo eftir 5 ára aldur en eftir fimmtugt fer áhættan hækkandi og rétt er að geta þess að 1/3 ALL sjúklinga eru fullorðnir. Áhættan á því að heilbrigður einstaklingur fái ALL er 1:800 og er áhættan heldur meiri hjá körlum en konum, eins er áhættan meiri hjá hvítum kynstofni en hjá svörtum. Lífslíkur barna með ALL eru mun betri en hjá fullorðnum en ástæðan fyrir því er m.a. að börn þola betur líkamlega erfiðar meðferðir (American cancer society, 2013a). Munurinn felst einnig í ólíkri frumuerfðafræði og svipgerð blastanna. Frumugerðin L1 er algengust í börnum en L2 frumugerðin er algengust í fullorðnum auk þess að Philadelphiulitningurinn er algengari hjá fullorðnum með B frumu ALL en honum fylgja slæmar batahorfur (Morton o.fl., 2007).

Stærð blasta í ALL er mismunandi og eru þeir minni en blastar í AML. Þeir hafa lítið umfrymi sem er oftast í kringum stóra kjarna en stundum er það kornótt. FAB flokkun skiptir ALL í þrjá undirflokk: L1 sem eru litlir einsleitir blastar, L2 misstórir blastar með óreglulega kjarna og L3 er kallað Burkitts tegund með einkennandi vacuolum. Lögum og gerð blasta (FAB flokkun) í ALL skiptir ekki jafn miklu máli og í AML. Hér vegur mest hvort illkynja frumurnar séu B eða T frumur og hvort niðurstöður úr frumuerfðarannsóknum gefa til kynna góðar eða slæmar líkur á bata, því er stuðst við flokkun WHO á ALL (Harmening, 2009).

Eitifrumuhvítblæði (ALL og CLL) er einstofna fjölgun (klón) af eitifrumum sem hafa „frosið“ einhverstaðar á þroskunarleiðinni. Þessar illkynja frumur sýna ýmsa ónæmisfræðilegar svipgerðir t.d. tjáning á terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) og annað hvort B eða T frumu mótefnavaka (Harmening, 2009).

Meðferð barna með ALL er ein árangursmesta krabbameinsmeðferð sem völ er á en 80 - 90% læknað. Ekki er það sama að segja um fullorðna ALL sjúklinga en einungis 30 - 40% þeirra eru á lífi fimm árum eftir greiningu (Toft o.fl., 2013). Erlendis hefur verið sýnt fram á að þessi munur felst

aðallega í mun á meðferðinni, en börn fá hærri lyfjaskammta og mikla umönnun á sérhæfðum sjúkrahúsum. Prófað hefur verið að setja fullorðið fólk í meðferðina sem ætluð er börnum og við það voru batahorfur betri. Að þessu sögðu er ljóst að huga ætti að meðferð með sjúkdóminn í huga en ekki eingöngu aldur sjúklings (Harmening, 2009).

1.1.2 Langvinnt hvítblæði

Margir mismunandi sjúkdómar tilheyra langvinnu hvítblæði en allir eiga þeir sameiginlegt að hvítu blóðkornin verða illkynja og geta valdið beinmergsbilun. Eins og með bráða hvítblæði er langvinnu hvítblæði skipt í tvo megin flokka út frá frumgerð þ.e. langvinnt eitifrumuhvítblæði (CLL) og langvinnt mergfrumuhvítblæði (CML). Algengast er að CLL leggist eingöngu á eldra fólk en CML getur komið upp hjá yngra fólk en er þó algengara í eldra fólk. CLL er fjórum sinnum algengara en CML (Jónasson o.fl., 2012).

Meðferð við CLL hefst ekki fyrr en sjúklingur fer að verða var við einkenni á borð við þyngdartap, slappleika, röskun á líffærastarfsemi vegna aukningar hvítra blóðkorna í blóði eða eitlastækkana. Gefin eru krabbameinslyf ásamt mótefnalyfi sem bindst CD20 sameindum á yfirborði eitifruma í CLL. Miklar framfarir hafa verið í meðferð CML og hafa ný lyf gjörbreytt meðferð sjúkdómsins. Nýju lyfin umbreyta afurð Philadelphiulitningsins en afurð hans hvetur til stöðugar skiptingar og fjölgunar frumanna. Með gjöf á þessu lyfi er hægt að halda sjúkdómnum niðri en engin lækning hlýst af. Ungt fólk fer í mergskipti ef fyrrgreindar meðferðir ganga ekki en það á líka við fólk þar sem langvinnur sjúkdómur hefur umbreytt í bráða hvítblæði (Jónasson o.fl., 2012).

Horfur sjúklinga með langvinnt hvítblæði hafa batnað með árunum þó að fólk sé sjaldan læknað af sjúkdómnum. Fólk getur lifað með sjúkdómnum í fjölda ára með lyfjum sem halda sjúkdómnum niðri (Jónasson o.fl., 2012).

1.1.2.1 Langvinnt mergfrumuhvítblæði (CML)

Langvinnt mergfrumuhvítblæði (CML) er langvinn mergfrumufjölgun sem einkennist af aukningu af granúlócýtum í blóði þar á meðal óproskuðum neutrophilum, eosinophilum og basophilum. Einnig er marktæk offjölgun á granúlócýtum í beinmergnum. Þetta er klónal stofnfrumusjúkdómur það sem einkennir þessar klónal frumur oft á tíðum er Philadelphiulitningurinn. CML er fyrsti sjúkdómurinn í mönnum þar sem hægt var að rekja sjúkdómsmyndunina til óeðlilegs litnings eða Philadelphiulitningsins sem er til staðar í 90 - 95% tilfella (Zagaria o.fl., 2006). Þó þetta litningsafbrigði sé einkennandi fyrir CML þá er það ekki nóg til greiningar því afbrigðið finnst einnig í 5% barna og 20% fullorðna með ALL auk 2% sjúklinga með AML (Costa o.fl., 2006).

Í Bandaríkjunum eru tilfelli af CML um 10% af öllum hvítblæðistilfellum. Líkurnar á því að heilbrigður einstaklingur veikist af CML eru 1:625 og eru líkurnar meiri hjá körlum en konum einnig meiri hjá hvítum en svörtum. Meðalaldur sjúklinga við greiningu er 65 ár og er þetta sjúkdómur sem sést sjaldan í börnum. Miklar framfarir hafa orðið í meðferðum gegn CML og eru mun fleiri sem lifa 5 ár frá greiningu en áður (American cancer society, 2013c).

1.1.2.2 **Langvinnt eitilfrumuhvítblæði (CLL)**

Langvinnt eitilfrumuhvítblæði (CLL) er um 1/3 af öllum hvítblæðum og er algengast í mjög fullorðnum einstaklingum en meðalaldur við greiningu er 72 ár. Mjög sjaldgæft er að sjúkdómurinn greinist í fólki undir fertugu og afar sjaldgæft að börn greinist með sjúkdóminn (American cancer society, 2013d).

CLL tilheyrir flokki sjúkdóma sem einkennast af fjölgun eitilfruma (lymphoproliferative disorders). Illkynja frumur CLL eru oftast B frumur en það kemur fyrir að T frumur séu illkynja. Sjúkdómurinn er greindur í blóð og mergsýnum þar sem eitilfrumur eru óeðlilegar að lögun, þær geta verið litlar eða stórar og eru litningarnir klumpaðir í kjarnanum. Algengt er að svokallaðar klessufrumur séu í sýnum CLL sjúklinga en það eru frjálssir frumukjarnar. Algengast er að blóð og beinmergur CLL sjúklinga einkennist af litlum en þroskuðum B frumum sem eru langlífir og ónæmisfræðilega óvirkar. Þessar frumur eru klónar sem geta ekki farið í gegnum stýrðan frumudauða (apoptosis) sem hamlar myndun eðlilegra fruma í beinmergnum. Þessi eiginleiki frumanna skiptir miklu máli uppá lyfjameðferðir (Harmening, 2009).

Til eru margar flokkanir og klínískar skilgreiningar á CLL en yfirleitt er gengið út frá skilgreiningu The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia um að B frumur í blóði skulu að lágmarki vera 5000 frumur/ μ L ásamt 30% fjölgun á þroskuðum eitilfrumum í beinmergnum (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1989).

Ónæmiskerfi sjúklinga með CLL getur verið brenglað en oft er tjáning immunoglobulína (Ig) bæld sem veldur hypogammaglobulínemíu sem gerir sjúklinga viðkvæma fyrir sýkingum en þær eru algengar dánarorsakir CLL sjúklinga. Sjúklingar með CLL geta einnig þróað með sér sjálfsónæmissjúkdóma og eru thrombocytopenic purpura og sérstakt sjálfsónæmisblóðleysi algengastir. Önnur einkenni sjúkdómsins er íferð illkynja fruma í eitla og milta. Þegar beinmergurinn verður pakkaður af illkynja klónum þá fylgir því oft blóðleysi, blóðflögufæð og fækkun á neutrophilum (Harmening, 2009).

Ekki er búið að finna neina sérstaka orsök á sjúkdómsmyndun CLL. Hugsanlegt er þó að retróveiran human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tengist sjúkdómsmynduninni (Que o.fl., 1993). B-CLL frumur úr sumum sjúklingum virðast hafa orðið illkynja sökum breytinga á mótefnavaka sem svarar HTLV-1 sýkingum, þetta bendir til þess að HTLV-1 veiran hafi eitthvað með hvítblæðismyndun að gera (Mann o.fl., 1987). Litningagallar geta leitt af sér CLL en af þeim göllum er þrístæða á litningi 12 algengust. Þessi þrístæða myndast ýmist vegna úrfellingu eða yfirfærslu á litningi 13q14 (Kalachikov o.fl., 1997).

Meðferð við CLL hefst oft ekki fyrr en sjúkdómurinn fer að ágerast með tilheyrandi einkennum, mergbilun, blóðleysi, miltisstækkun og fleira. Yfirleitt byrja CLL sjúklingar á lyfjameðferð og er geislameðferð oft bætt við. Það kemur fyrir að sjúklingar með mikla miltisstækkun þurfa að láta fjarlægja miltað. Sjúklingum er í sumum tilfellum gefið immunoglobulín til varnar sýkingum. Meðallifun sjúklinga sem greinast með CLL er fjögur til fimm ár en helmingur sjúklinganna lifa lengur en fimm ár og 30% sjúklinga lifa í 10 ár eða lengur (Harmening, 2009).

1.1.3 Faraldsfræði hvítblæðis á Íslandi

Á Íslandi greinast um 1400 manns með krabbamein á ári hverju en það er fjórföld aukning frá því að skráning hófst árið 1956. Ástæða þess er fjölgun Íslendinga og þá sérstaklega eldri aldurshópa en einnig er aukin áhætta með breyttum lífstíl. Samkvæmt tölum frá Krabbameinsskrá voru að meðaltali sjö karlar og fimm konur sem greindust með bráða hvítblæði á árunum 2006 til 2010. Þetta samsvarar 1% af öllum krabbameinum sem greindust á þessu tímabili og var meðalaldur við greiningu 49 ára hjá konum en 48 ára hjá körlum. Langvinnt hvítblæði greindist að meðaltali hjá 11 körlum og 5 konum á árunum 2006 til 2010. Meðalaldur karla við greiningu var 64 ár og hjá konum 69 ár. Þetta krabbamein samsvarar 1,5% af öllum krabbameinum sem greindust á þessu tímabili hjá körlum en u.þ.b. 1% krabbameina hjá konum. Nýgengi langvinnis hvítblæðis á þessu árabili var hjá körlum 4,9 af 100.000 en hjá konum 1,9 af 100.000 (Jónasson o.fl., 2012).

1.2 Efnatoginn CXCR4

Efnatogkerfið í manningum samanstendur af 50 efnatogum og 20 efnatogviðtökum. Efnatogviðtaki 4 (CXCR4), einnig þekktur sem fusin og CD 184, er G-próteinparaður viðtaki (GPCR) sem spannar frumuhimnuna sjö sinnum. Efnatogbindill 12 (CXCL12), einnig þekktur sem stromal-derived-factor-1 (SDF-1), er 8 kDa efnatogpeptíð sem er seytt af uppistöðuvef beinmergsins (Debnath o.fl., 2013). CXCL12 bindst við CXCR4 á svæðum sem staðsett eru utan frumuhimnunnar (N-terminus og þrjár utanfrumu lykkjur). Við þá bindingu virkjast innanfrumu lykkjurnar og C-terminus veldur rofi á G próteininu, við það verða til boðefnin IP3 og DAG sem valda hreyfingu á kalsíum í umfryminu en við það virkjast ýmsar keðjuverkandi boðleiðir (Burger, 2010).

CXCR4 var fyrst uppgötvaður sem einn af hjálparviðtökunum í ferlinu þegar alnæmisveiran (HIV) innlimast í frumur. Án þess að fara nákvæmlega út í hvernig HIV kemst inn í frumur þá er vert að segja frá því að með því að bindast yfirborðsviðtakanum CD4 og hjálparviðtaka, sem er ýmist CXCR4 eða CCR5, fara af stað ferli sem endar með samruna veirunnar við frumuhimnuna. Sýnt hefur verið fram á að hjá sjúklingum smituðum af HIV sem tjá CXCR4 verður mikil fækkun á T frumum sem tjá CD4 og sjúkdómsmyndun er hraðari (Debnath o.fl., 2013).

Sýnt hefur verið fram á að efnatogviðtakinn CXCR4 og bindill hans CXCL12 hafa þýðingarmikið hlutverk í nýmyndun og viðhaldi blóðfruma og ónæmiskerfisins. Einnig hefur verið sýnt fram á hlutverk þeirra í hreyfingu illkynja fruma í meinvörp og hvítblæðisfruma úr mergnum og út í blóðið (Fiegl o.fl., 2009). Stærsti þáttur í ratvísi blóðmyndandi stofnfruma við beinmergin er binding CXCL12 við CXCR4. Við þessa bindingu færast frumurnar í nærumhverfi beinmergsins þar sem þær eru geymdar og fá að vaxa í friði. Þetta gerist einnig hjá illkynja þekjufrumum sem tjá CXCR4 og er því þáttur í myndun meinvarpa (Lefrancois o.fl., 2011).

Nærumhverfi fruma í beinmerg skiptir ekki bara miklu máli fyrir eðlilega útþroskun fruma heldur getur þetta nærumhverfi varið illkynja frumur frá stýrðum frumudauða af völdum krabbameinslyfja og gerir frumurnar þannig ónæmar fyrir krabbameinslyfjum. Með því að gefa sjúklingum með CLL lyfið Plerixafor, sem bindst CXCR4 og hamlar þar með bindingu þess við CXCL12, hætta CLL frumurnar að loða við nærumhverfið og færast út í blóðrásina þar sem frumudrepandi lyf ná til þeirra (Burger, 2010). Þetta lyf hentar ekki vel fyrir HIV sjúklinga þar sem ætlunin er að hamlar CXCR4 viðtakann en ekki að

færa frumurnar úr beinmergnum auk þess sem það hefur sýnt sig að fjölgun verði á hvítum blóðkornum (Debnath o.fl., 2013).

Fyrstir til að sýna fram á hlutverk CXCR4 í hvítblæði voru Möhle og félagar en það var árið 1998. Þeir sýndu fram á að CD34 jákvæðir blastar AML sjúklinga tjáðu CXCR4 en jákvæð fylgni var milli flutninga fruma sökum CXCL12 og þéttleika CXCR4 á yfirborði frumanna (Möhle o.fl., 1998). Í kjölfarið á þessari grein var CXCR4 mikið rannsakaður og var það árið 2004 sem Rombouts og félagar sýndu fram á að fylgni væri milli mikillar tjáningar CXCR4 á hvítblæðisfrumum og aukinnar hættu á endurkomu sjúkdóms (Rombouts o.fl., 2004). Sú rannsókn beindist þó einkum að AML sjúklingum með stökkbreytingu í Fms-like tyrosine kinase-3 (Flt3) / internal tandem duplication (ITD) genum þannig að árið 2007 gerðu Konoplev og félagar rannsókn á batahorfum AML sjúklinga sem tjá CXCR4 án þess að hafa Flt3/ITD stökkbreytinguna. Niðurstöður þeirrar rannsóknar staðfestu það sem Rombouts og félagar höfðu sýnt fram á, að tjáningu á CXCR4 fylgdu verri batahorfur ekki bara hjá sjúklingum með Flt3/ITD stökkbreytinguna (Konoplev o.fl., 2007).

Mælingar á CXCR4 hafa einnig hagnýt gildi í greiningu frumugerða í CLL en hægt er að greina á milli CLL fruma úr beinmerg og CLL fruma úr blóði. CLL frumur í skiptingu sem eru staðsettar í beinmerg eða eitlum tjá lítið af CXCR4 miðað við CLL frumur í blóði sem eru ekki í skiptingu (Bennett o.fl., 2007). Burger og félagar sýndu fram á að CXCR4 stjórnar hreyfingu CLL fruma yfir æðapæl og yfir eða undir aðrar frumur beinmergsins sem seyta CXCL12 (Burger o.fl., 1999).

Eftir því sem CXCR4 er meira rannsakaður, því meira kemur í ljós um þennan mikilvæga viðtaka. Fiegl og félagar sýndu fram á með rannsókn sinni að súrefnisþurrð (hypoxia) hefur áhrif á tjáningu CXCR4, þ.e. tjáningin eykst og hreyfa frumur sig meira í átt að CXCL12 og viðloðun hvítblæðisfruma við nærumhverfið eykst þar með (Fiegl o.fl., 2009).

1.3 Krabbameinslyf

Flókið er að hanna krabbameinslyf þar sem erfitt er að fá lyf til drepa krabbameinsfrumur án þess að heilbrigðar frumur séu drepar með. Ástæðan fyrir þessu er að sameindir sem krabbameinsfrumur tjá er alltaf að finna í heilbrigðum frumum líka. Munurinn á illkynja og heilbrigðum frumum er að illkynja frumur hafa oft virkjað vaxtarboð sem hjálpar til við æxlisvöxt auk þess sem hæfni fruma að framkvæma stýrðan frumudauða er minnkuð. Þar sem að munurinn liggur í ójafnvægi á stjórnun frumufjölgunar og frumudauða eru krabbameinslyf hönnuð til að hafa áhrif á þessa þætti. Lyf sem ýta undir stýrðan frumudauða eru mjög algeng en þau geta virkað á mismunandi hátt. Algengast er að þessi lyf hafi áhrif á erfðaefni frumunnar með því að hindra umritun erfðaefnisins eða eyðileggja það þannig að fruman deyr. Önnur lyf geta virkað á próteinferla frumunnar, viðtaka eða píplur innan frumunnar (Perry, 2008).

1.3.1 Cytarabine

Cytarabine (1-β-D-arabinofuranosylcytosine, Ara-C) er lyf sem notað er í meðferðir gegn hvítblæði, sérstaklega bráða hvítblæði. Þetta efni er pyrimídín sem hindrar frumufjölgun með því að hindra DNA nýmyndun (Kim o.fl., 2012). Cytarabine er svokallaður antimetaboliti en það er efni sem hindra önnur efni (oft myndefni) í efnaskiptaferlum líkamans sem getur leitt til frumudauða. Cytarabine er líking af

cýtidín þar sem sykursameindinni hefur verið umbreytt úr ríbósa í arabínósa. Þegar Cytarabine kemur inn í frumuna er því breytt í þrífosfat og keppir það við cýtidín um innlimun í DNA. Eftir innlimun í DNA hindrar arabínósinn snúning sameinda innan DNA þannig að eftirmyndun stöðvast. Lyfið hamlar einnig DNA pólýmerasann með sömu afleiðingunum, kemur í veg fyrir eftirmyndun og lagfæringar á DNA (National cancer institute, e. d.-a).

1.3.2 Idarubicin

Idarubicin (4-demethoxydaunarubicin) tilheyrir anthracyclín lyfjum og er notað til meðferðar á hvítblæði, þá aðallega AML. Lyfið hamlar DNA eftirmyndun, RNA umritun og próteinmyndun með því að fara í DNA og trufla virkni tóþóísómerasa II. Idarubicin er fitusæknara en önnur anthracyclín og á því auðveldara með að komast inn fyrir frumuhimnuna (National cancer institute, e. d.-b).

Idarubicin var fyrst kynnt undir lok níunda áratugsins og í framhaldi af því voru gerðar margar samanburðarrannsóknir á því og daunarubicin sem leiddu í ljós að Idarubicin væri öflugara og kæmi til með að leysa daunarubicin af hólmi (Berman o.fl., 1991). Árið 1998 stóð AML samvinnuhópurinn að stórri kerfisbundinni samstarfsrannsókn þar sem anthracyclín lyf voru borin saman. Niðurstöður rannsóknarinnar sýndu fram á að Idarubicin gaf af sér lengra sjúkdómshlé og bætti lifun sjúklinga meira en daunarubicin sem var meira notað hér áður fyrir (Wheatley, 1998).

1.3.3 Plerixafor

Plerixafor er fyrsta lyfið sem hindrar bindingu bindilsins CXCL12 við CXCR4 viðtakann sem Bandaríska matvæla og lyfjaeftirlitið (Food and Drug Administration) samþykkti (Debnath o.fl., 2013). Fyrst var lyfið notað gegn retróveirum (HIV) þar sem CXCR4 var fyrst bendlaður við HIV. Við langtíma notkun þess fóru blóðmyndandi stofnfrumur að leita út úr nærumhverfi sínu í beinmergnum (Hendrix o.fl., 2004). Með þær upplýsingar að vopni var farið að nota lyfið ásamt vaxtarþættinum granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), til að færa blóðmyndandi stofnfrumur úr beinmerg út í blóðrásina þar sem þeim er safnað með notkun frumuskilju og gefnar til baka eftir háskammta krabbameinslyfjameðferð. Þetta er þó aðeins gert hjá sjúklingum með eitilfrumukrabbamein og mergæxli (Debnath o.fl., 2013). Nýjustu hugmyndir um notkunarmöguleika lyfsins er eins og áður var greint frá að losa illkynja hvítblæðisfrumur úr nærumhverfi beinmergsins þar sem krabbameinslyf ná til þeirra (Burger o.fl., 2009).

Rannsókn sem Liesveld og félagar gerðu árið 2007 gaf þær niðurstöður að Plerixafor hefði ekki haft bein áhrif á AML blasta né stýrðan frumudauða þeirra í ræktunum. Jafnframt sýndu niðurstöðurnar að lyfið hefði áhrif á hindrun á útvexti hvítblæðisfrumanna í kólóníumyndandi einingar í methylcellulósaræktunum (Liesveld o.fl., 2007). Úy og félagar gerðu einnig rannsókn á Plerixafor, en þeir gáfu AML sjúklingum Plerixafor ásamt öðrum krabbameinslyfjum, þar á meðal Cytarabine. Niðurstöðurnar leiddu í ljós að það varð tvöfalt meiri tilfærsla af frumum úr beinmergnum út í blóðrásina án þess að valda töluverði aukningu á myndun hvíttra blóðkorna. Þetta staðfestir það sem áður var haldið fram að Plerixafor trufla bindingu CXCL12 við CXCR4 (Úy o.fl., 2012). Við rannsóknir á frumulínum hefur verið sýnt fram á að Plerixafor getur hamlað frumuvexti og stuðlað að útproskun hvítblæðisfrumulíunnar U937 (Tavor o.fl., 2008). Einnig hefur verið sýnt fram á að hvítblæðisfrumur

bæla eðlilega blóðmyndun í mergnum með því að draga úr tjáningu á CXCL12 á eðlilegum mergfrumum (Colmone o.fl., 2008).

Rannsóknir eru í fullum gangi núna að finna út áhrif þess að blanda Plerixafor inn í lyfjameðferðir hvítblæðissjúklinga, bæði í nýjum tilfellum og hjá þeim sem hafa fengið bakslag. Helsti ávinningurinn sem er vænst af þessum rannsóknum er að draga úr endurkomu sjúkdóms (Peled o.fl., 2013).

1.4 Frumuflæðisjá

Tæknin á bak við frumuflæðisjár byggir á því að hægt sé að mæla svipgerðir fruma með vökvastreymi í gegnum tækið. Greining með frumuflæðisjá skiptist í fjóra megin þætti: undirbúningur sýna, mæling sýna í frumuflæðisjá, greining upplýsinga og túlkun niðurstaðna (Harmening, 2009).

1.4.1 Undirbúningur sýna

Mælingar með frumuflæðisjá snúast um að mæla svipgerð fruma en það er gert með því að lita fyrir sameindum á yfirborði fruma, ýmsum innanfrumulitunum og mælingar á hversu flóknar innanfrumusameindir eru (t.d. kjarninn). Ýmist er litað beint með flúorlitum eða með flúormerknum mótefnum. Dæmi um flúorlit sem notaður er í þessari rannsókn er propidium iodide (PI) sem litað er með í mælingum á stýrðum frumudauða (Harmening, 2009), sjá nánar kafla 3.6.

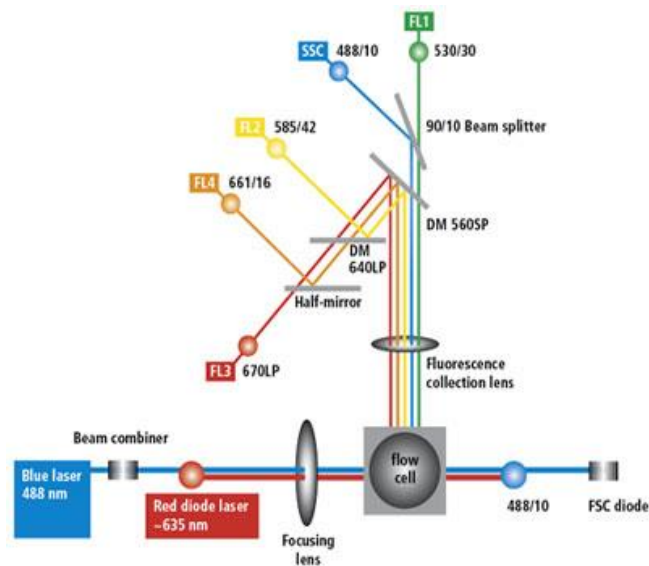
Litun með flúormerknum mótefnum er mjög nákvæm þar sem aðeins þær frumur sem tjá mótefnavakann sem mótefnaliturinn beinist að litast. Þessi aðferð getur litað bæði innan- og utanfrumusameindir. Mótefnin sem eru notuð eru ýmist fjölstofnamótefni sem einangruð eru úr mótsermi eða einstofnamótefni sem eru framleidd úr ódauðlegum B frumu klónum. Einstofna mótefni eru frekar notuð þar sem þau gefa meiri nákvæmni. Þegar sýni eru lituð með mótefnalitum er oftast litað með fleiri en einum mótefnalit. Til að engin skekkja komi upp eru mismunandi mótefni merkt með mismunandi flúorlitum en þannig er hægt að greina á milli mótefnalita og jafnframt greina frumugerðina. Það sem ræður því hvaða flúorlit mótefni eru merkt með er hvort mótefnavakar séu í hárrí eða lágri þéttni á frumunni. Dæmi um þetta er að mótefnavakar sem eru í lágri þéttni eru litaðir með björtum flúorlit eins og phycoerythrin (PE) og mótefnavakar í hárrí þéttni eru litaðir með flúorlit í venjulegum styrk eins og fluorescein isothiocyanate (FITC) eða peridinin-chlorophyll-protein (PerCP) (Harmening, 2009).

Búið er að koma upp almennu kerfi sem skilgreinir mótefni út frá hvarfgirni (reactivity) mótefnavaka. Þessi flokkun nefnist „Cluster of differentiation“ en gengur almennt undir skammstöfuninni CD hópar. Þessir CD hópar eru númeraðir og mótefni innan hvers hóps bindst við sama mótefnið. Búið er að finna og skilgreina 363 CD hópa samkvæmt nýjustu tölum sem voru samþykktar á The 9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA9) sem er ráð sem sérhæfir sig í að finna nýja CD hópa og skilgreina þá (Human cell differentiation molecules, e. d.).

1.4.2 Mæling sýna

Frumuflæðisjár samanstanda af þremur aðalþáttum sem eru straumtækni, linsur og rafstraumur. Straumtæknin byggir á þrýstilofti og vökva (saline sheath) sem flytur sýnið inn í tækið, flytur það um tækið og endar að lokum í úrgangsdalli. Flæðið er stillt þannig að þegar sýnið er í mælieiningu

tækisins er aðeins ein fruma í einu sem fer í gegnum leysigeislana. Þegar frumur fara í gegnum leysigeislana eru hinar ýmsu svipgerðir frumunnar mældar samtímis. Það sem er mælt í mælieiningu tækisins eru geislar sem eru framdreifðir (forward scattered (FSC)), geislar sem dreifast á hlið (side scattered (SSC)) og svo allt að sex flúorlitir. Skynjarar nema síðan ákveðna flúorliti og eru nemarnir í nýjum tækjum nefndir eftir litnum sem þeir nema t.d. FITC nemi, PE nemi osfrv. FSC og SSC mælingar byggja á útliti og lögum frumunnar. Eftir því sem frumur eru stærri því meira merki kemur frá FSC og eftir því sem fruman er flóknari inni sér (t.d. kjarni) því stærra SSC merki kemur í mælingunni. Hægt er að velja hvort frumflæðisjain mæli allar agnir eða stilla þröskuldinn þannig að hann takmarki mælingar á frumubrotum og öðru rusli. Með því að stilla þröskuldinn er verið að breyta FSC þannig það mælir bara frumur og agnir sem eru hærri en þröskuldurinn (Harmening, 2009).



Mynd 1 Uppsetning mælieiningar í FACSCalibur.

Blái og rauði leysirarnir hæfa frumurnar í flow cell, þaðan fer ljósið frá frumunni í gegnum síur og spegla og endar í viðeigandi nemum sem nema ljós við ákveðna bylgjulengd.

FACSCalibur frá Becton Dickinson var fyrsta frumflæðisjain til að vera með tvíþættan leysir en það veitir meiri sveigjanleika og næmni fyrir greiningu á marglita sýnum (sjá mynd 1). Leysirarnir tveir eru aðskildir og samanstanda af bláum jónuðum argon leysir (488 nm) og rauðum díóðu leysir (635 nm). Með því að hafa þá aðskilda fæst meiri næmni og meiri sveigjanleiki við notkun ýmissa flúorlita. Eftir að fruma hefur orðið fyrir geislun ferðast ljósið sem hún sendir frá sér í gegnum linsukerfi tækisins en þar fer ljósið sem fruman gefur frá sér í gegnum linsusíur (filters) sem eru staðsettar á ákveðnum stöðum auk spegla. Speglarnir og síurnar dreifa, endurspegla, frásoga eða hamla ákveðnar bylgjulengdir. Þegar búið er að sía út ákveðnar bylgjulengdir ljóssins er geislinn sendur á nema sem mæla ákveðnar bylgjulengdir ljóss. Algengast er að nemarnir mæli grænt ljós á bylgjulengdinni 515 – 545 nm (FITC nemi), appelsínugult ljós á bylgjulengdinni 564 – 606 nm (PE nemi), rautt ljós á bylgjulengdinni yfir 670 nm (PerCP nemi) og aðra rauða geisla á bylgjulengdinni 653 – 669 nm (APC nemi) (Harmening, 2009).

Ljónemarnir breyta ljósinu í rafboð sem kallast slag, því sterkara sem ljósið er því stærra slag verður. Í FACSCalibur fer slagið í gegnum magnara áður en því er breytt yfir á tölvutækt form, þar sem niðurstöðurnar birtast á logaritmískum eða línulegum skala. Logaritmískur skali leyfir veikum og

sterkum merkjum að birtast á sama skala. Hægt er að auka næmni nemanna með því að auka rafspennu þeirra, þetta er gert þegar litur gefur frá sér veikt merki þá er hægt að auka rafspennuna til að gera litinn skýrari. Þetta virkar einnig öfugt, ef að litur gefur frá sér mjög sterkt merki og lendir jafnvel útaf skalanum þá er hægt að minnka rafspennu á nemanum.

Þegar tæki hefur mælt sýnin flytjast niðurstöðurnar í tölvu þar sem hægt er að vinna úr þeim í ákveðnum forritum. Sett eru upp gröf og hægt að afmarka frumur sem skoða á nánar t.d. illkynja frumur. Með því að skoða bara ákveðinn frumuhóp í gröfum með tilliti til litunar er hægt að greina nákvæmlega gerð og eiginleika fruma (Harmening, 2009).

1.5 Kólóníuræktun

Fyrir um það bil 50 árum birtust fyrstu greinarnar um kólóníuvöxt fruma (Bradley o.fl., 1966; Pluznik o.fl., 1965) en þessi uppgötvun varð til framfara í rannsóknum, greiningum og meðferðum í blóðmeinafræði.

Hægt er að greina mismunandi frumugerðir út frá kólóníuvexti. Þær forverafrumur sem geta myndað kólóníur eru kallaðar kólóníumyndandi einingar (CFU) en einnig er nánar tilgreint um tegund frumunnar t.d. er forveri granúlocýta og makrófaga skammstöfuð CFU-GM, forveri rauðrablóðkorna CFU-E og kólóníur með blönduðum frumuvexti eru kallaðar CFU-GEMM (Nissen-Druey o.fl., 2005).

Kólóníuræktanir hafa meðal annars verið notaðar við stofnfrumumeðferðir til mats stærð og gæðum stofnfrumugræðlings til viðbótar við CD34 mælingar. Einnig er hægt að nota kólóníuræktanir til sjúkdómsgreiningar en þá er óeðlilegur kólóníuvöxtur skoðaður og hægt að meta sjúkdómsgreiningu út frá því (Nissen-Druey o.fl., 2005).

2 Markmið

Markmið rannsóknarinnar eru:

1. Rannsaka áhrif efnatoghemilsins Plerixafor í samspili við krabbameinslyf á hvítblæðisfrumur úr blóði sjúklinga með bráða og langvinnt hvítblæði. Meta áhrif á lifun, stýrðan frumudauða og svipgerð hvítblæðisfruma í frumuræktunum.
2. Rannsaka áhrif hefðbundinna krabbameinslyfja, Cytarabine og Idarubicin og meta þannig næmi illkynja fruma fyrir krabbameinslyfjum.
3. Rannsaka hvort lyfið Plerixafor hafi áhrif á útþroskun hvítblæðisfruma í frumuræktun með frumflæðisgreiningu og kólóníuræktun.

3 Efni og aðferðir

3.1 Einangrun hvítblæðisfruma

Einkjarna frumur voru einangraðar úr blóðsýnum úr EDTA sýnaglösom sem fengin voru frá sjúklingum sem sjá má í töflu 1, eftir upplýst samþykki þeirra sem sjá má í fylgiskjali.

Við einangrun einkjarna frumanna var unnið með þéttistigulsaðferð. Í þeirri aðferð er notast við Ficoll Histopaque (Sigma) sem inniheldur súkrósa fjölliður og natríum diatrizoic. Þessi lausn hefur háan eðlismassa sem veldur því að blóð og beinmergur flýtur ofan á lausninni. Blóð var þynnt til helminga með DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) án CaCl₂ og MgCL₂ (Gibco®) til að hindra að storkukerfi fari í gang.

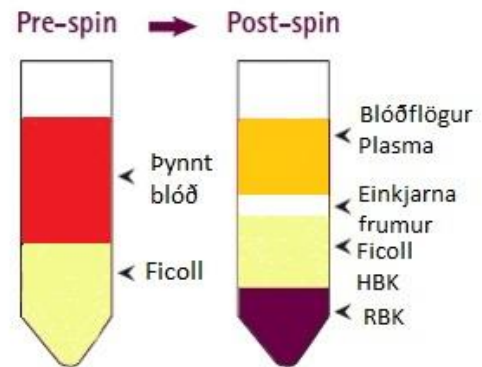
Blóðlausnin var sett varlega ofan á 13 mL ficoll lagið og var sýnið svo spunnið niður í skilvindu í 30 mín við 1100 rpm. Að því loknu var einkjarna frumulagið fljótandi ofan á ficollinu (mynd 2). Frumulagið var tekið með pípettu ofan af ficolllausninni og sett í nýtt glas þar sem komið var að þvottaskrefi með DPBS sem innihélt CaCl₂ og MgCL₂ (Gibco®) en þessar sameindir koma í veg fyrir viðloðun frumanna. Frumulausnin var sett í skilvindu í 10 mín á 1100 rpm. Þvottaskrefið var endurtekið tvisvar. Fyrir síðasta þvottaskrefið var talningarskref þar sem frumunar voru blandaðar með nákvæmu magni (á bilinu 10mL – 25 mL eftir magni botnfalls) af DPBS með CaCl₂ og MgCL₂. Af þeirri lausn voru 50µL teknir og sett í nýtt glas þar sem 50µL af 0,4% Trypan blue lausn (StemCell Technologies inc.) var blandað saman við. Lausnin var síðan sett á Neubauer blóðfrumutalningargler og í 40x stækkun í smásjá var talið í tveimur talningarsvæðum (sjá á mynd 3). Eftir talninguna var sett inn í reikniformúlu 1 til að vita heildarfjölda einangraðra fruma í sýninu.

Formúla 1. Talning x þynning x rúmmál vökva x 10⁴.

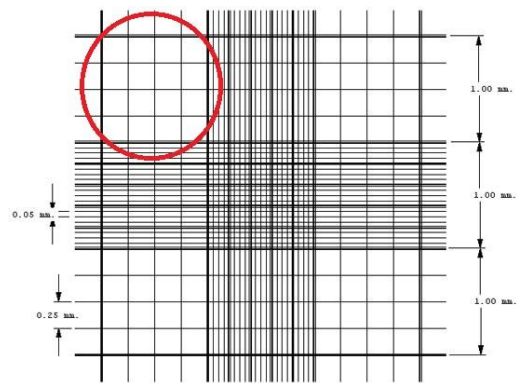
3.2 Frumuræktun

Þegar búið var að reikna út fjölda fruma úr einangruninni voru frumurnar leystar upp í Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®) æti sem inniheldur glutamine ásamt viðbættu 10% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco®) og 5 mL af sýklalyfjablöndunni Penicillin-Streptomycin (Sigma). Við blöndun fruma við ætið var frumuþéttin stillt á 10 x 10⁶ frumur á mL.

Frumurnar voru ræktaðar í 24 brunna ræktunarbakka (Nunc). Í hvern brunn var settur 100 µL af frumulausninni og 900 µL RPMI en það samsvarar 1 x 10⁶ fruma í hverjum brunni ræktunarbakkans.



Mynd 2 Blóð/beinmergslausn skilin niður með ficollí.



Mynd 3 Talningarreitir Neubauer glers.

Mismunandi styrkir lyfja voru notaðir í ræktunina og sjá má í kafla 3.3 hvernig lyfin voru þynnt og magn lyfja í hverjum brunni. Frumuræktunin fór fram í frumuræktunarskáp við 37°C og 5% CO₂.

Vaxtarþáttunum Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) og Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Stemcell technologies) var bætt út í ræktanir en þeir hafa jákvæð áhrif á skiptingu, virkjun og viðhaldi frumanna. Með því að nota þessa vaxtarþætti er umhverfi frumanna í ræktinni líkara nærumhverfi þeirra í beinmerg og blóði.

3.3 Þynning lyfja

Cytarabine var blandað í Apóteki Landspítalans, 10 mg Cytarabine í 0,1 mL RNase fríu vatni. Þetta var þynnt í 4 mL RPMI æti og síðan voru 500 µL af þeirri lausn teknir og sett í 50 mL RPMI. Af þessari þynntu lausn voru teknir 8 µL og settir í ákveðna brunna til að rækta frumurnar með 200 ng styrk.

Idarubicin var blandað í Apóteki Landspítalans, 5 mg í 5 mL. Þetta var þynnt í 4 mL RPMI æti og síðan voru 500 µL af þeirri lausn teknir og sett í 50 mL RPMI. Af þessari þynntu lausn voru teknir 2 µL og settir í ákveðna brunna til að rækta frumurnar með 50 ng styrk.

Plerixafor var frá MedKoo Biosciences í Bandaríkjunum. Lyfið var 1 g í duffformi og var það leyst upp í 5 mL af sterílu vatni (stofnlausn). Af þessari stofnlausn voru teknir 100 µL og settir í 2 mL af sterílu vatni. Af þessari blöndu voru teknir 79 µL og sett í viðeigandi brunna ræktunarinnar, styrkur lyfsins var því 1 µmól í hverjum brunni.

3.4 Kólóníuræktanir

Einkjarna frumur voru einangraðar og taldar eins og greint var frá í kafla 3.1. Því næst var sett ákveðið magn af Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Stemcell technologies) æti sem inniheldur 2% FBS, á frumurnar og blandað vel til að fá rétta þynningu eða 1×10^5 frumur á 100 µL. Af þessari frumulausn voru teknir 200 µL og sett í 2 mL af methylcellulose æti (Stemcell technology), lausnin blönduð og látin bíða í 5 mínútur. Tvær tegundir af methylcellulose æti voru notaðar sem eru MethoCult™ H4534 Classic án erythropoietin (EPO) og MethoCult™ H4434 Classic sem er með EPO. Með vaxtarþættinum EPO vaxa rauðkorna kólóníur en ekki í ætinu án EPO, frumur voru ræktaðar við báðar aðstæður. Að loknu 5 mínúta biðskrefinu var 1,1 mL af frumu-methylcellulosa blöndunni sett á tvær 35 mm petriskálar og í þriðju skálina var sett 3 mL af sterílu eimuðu vatni. Lok var sett á skálarnar með ætinu en vatnsskálín var opin. Skálunum þremur var komið fyrir í einni 100 mm petriskál og var henni einnig lokað. Frumurnar voru í rækt í 14 daga við 37°C og 5% CO₂.

Eftir 14 daga í ræktun voru kólóníuræktanirnar skoðaðar í 40x stækkun í ljóssmásjá. Talinn var hver frumuræktunardiskur á sérstökum talningardiski. Taldar voru allar kólóníur en þeim er skipt upp í fjóra flokka: rauðkorna kólóníurnar CFU-E (8 – 200 rauðkornablastar) og BFU-E (fleiri en 200 rauðkornablastar), hvítkorna kólóníur CFU-GM (40 og fleiri blastar) og svo er einn sjaldgæfur flokkur CFU-GEMM sem er blanda af rauð- og hvítkornablöstum (eru yfirleitt mjög stórar).

3.5 Mótefnalitun og mæling í frumuflæðisjá

Fyrir ræktun og eftir 72 klst í rækt voru sameindir sem eru einkennandi fyrir hvítblæðisfrumurnar skoðaðar en markmiðið var að athuga hvort tjáning sameindanna myndi breytast við ræktun með krabbameinslyfjum og Plerixafor.

Tafla 1 Flúormerkt einstofna mótefni gegn yfirborðssameindum einkjarna fruma.

Mótefni	Litur	Isotýpa	Klón	Framleiðandi	Einkennir
mlgG1	FITC	mlgG1	X40	BD	Ósértæka bindingu
mlgG1	PE	mlgG2	X41	BD	Ósértæka bindingu
mlgG1	APC	mlgG3	X42	BD	Ósértæka bindingu
mlgG1	PerCP	mlgG4	X43	BD	Ósértæka bindingu
CD 117	PE	mlgG1	104D2	BD	Blasta
CD 34	APC	mlgG1	8G12	BD	Blasta
CD 45	PerCP	mlgG1	2D1	BD	Hvít blóðkorn
CD 13	PE	mlgG1	WM15	BD	Granúlócýta & mónócýta
CD 184	PE	mlgG2a	12G5	BD	Hvít blóðkorn
CD 14	FITC	mlgG2a	M5E2	BioLegend	Granúlócýta
CD 33	APC	mlgG1	P67.6	BD	Granúlócýta & mónócýta
CD 133	PE	mlgG2	AC133	Macs	Blasta
CD 11b	APC	mlgG2a	D12	BD	Hvít blóðkorn
CD 11c	PE	mlgG2b	S-HCL-3	BD	Hvít blóðkorn
CD 5	APC	mlgG1	UCHT2	BD	T frumur & B frumur
CD 19	PerCP	mlgG1	4G7	BD	B frumur
CD 10	FITC	mlgG1	H110a	BD	B frumur
CD 20	PE	mlgG1	L27	BD	B frumur
Kappa	FITC	mlgG1	TB28-2	BD	B frumur
Lambda	PE	mlgG1	1-155-2	BD	B frumur
CD 22	FITC	mlgG2b	S-HCL-1	BD	B frumur
CD 23	PE	mlgG1	EBVCS-5	BD	B frumur

Frumur voru teknar úr rækt og settar í glas og spunnin niður í skilvindu við 1100 rpm í 10 mínútur. Eftir skilvinduna var ætið tekið ofan af og 1 mL DPBS var bætt út á frumurnar og vortexað. Næst voru 100 µL af frumulausninni sett í sex glös og 1 µL af flúormerktum einstofna mótefnum úr töflu 1 sett í viðeigandi glös. Meðan mótefnalitirnir voru að bindast viðtökum í sýninu voru þau sett í ísskáp í 30 mínútur. Að þeim tíma loknum var komið að þvottaskrefi þar sem 500 µL af DPBS var bætt út í og skilið niður í 10 mín við 1100 rpm. Flotið var tekið ofan af og 400 µL DPBS bætt við. Að þessu loknu var sýnið tilbúið til mælingar í frumufælðisjá en notast var við FACSCalibur™ frá Becton Dickinson (San Jose, California, Bandaríkin) í þessari rannsókn.

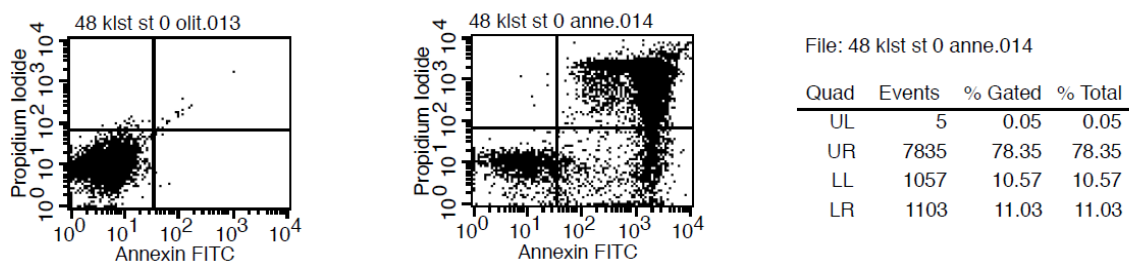
Við uppsetningu niðurstaðna úr frumufælðisjóni var valið að skoða bara tjáningu illkynja frumanna. Hlið voru síðan útbúin útfrá neikvæðu viðmiðunarsýnunum sem virkar alveg eins og hliðið sem er sett á ólituðu frumurnar í prófinu á stýrða frumudauðanum en nánari útskýringar á túlkun niðurstaðanna má sjá á mynd 4.

3.6 Mæling á stýrðum frumudauða

Til að mæla stýrðan frumudauða (apoptosis) var litað með Annexin V FITC og Propidium iodide (PI). Annexin V FITC er prótein sem bindst við fosfólípíð, en frumur í stýrðum frumudauða hafa göt á frumuhimnunni sem veitir litnum aðgang að fosfólípíðlagi frumunnar. Liturinn PI litar ekki lifandi frumur

með heilar frumuhimnur en frumur með skemmdar frumuhimnur eða dauðar eru gegndræpar fyrir PI og litast. Út frá þessum upplýsingum var hægt að meta hvort frumur væru lifandi eða dauðar. Ef frumur voru Annexin V FITC neikvæðar og PI neikvæðar voru þær metnar lifandi, frumur á frumstigum apoptósu voru Annexin V FITC jákvæðar en PI neikvæðar og frumur sem voru langt komnar í apoptósu eða dauðar lituðust Annexin V FITC jákvæðar og PI jákvæðar (BD Biosciences, 2008).

Frumur voru teknar úr rækt, sýnin sett í glös og spunnin niður í skilvindu. Ætið var svo tekið ofan af og 1 mL DPBS var bætt út á frumurnar og vortexað. 100µL af frumulausninni voru sett í tvö ný glös þar sem í annað glasið fór 5 µL af Annexin V FITC og 5 µL af PI, í hinu glasinu voru ólitaðar frumur. Þessi blanda var vortexuð og látin standa við stofuhita í myrkri í 15 mínútur. Að 15 mínúturnum loknum var 400 µL af þynntum Binding Buffer bætt út í öll glösin. Mæling sýnanna var gerð innan klukkutíma í frumufælðisjá. Túlkun niðurstaðna úr frumufælðisjá má sjá á mynd 4.



Mynd 4 Túlkun niðurstaðna úr mælingum á stýrðum frumudauða.

Niðurstöður mælinga úr frumufælðisjóni voru settar upp í dot plot. Hlið var sett á frumurnar í ólitaða sýninu (mynd lengst til vinstri) því þær frumur eru neikvæðar fyrir litunum og þjóna hlutverki sem viðmiðunarsýni. Sama hliðið var límt á dot plotið af lituðu frumunum (miðju mynd). Að þessu loknu er hægt að túlka frumurnar sem lifandi lendi þær í neðra horninu vinstra megin, í stýrðum frumudauða lendi þær í neðra horninu hægra megin (Annexin V FITC pos og PI neg) og dauðar lendi þær í efra horninu hægra megin (Annexin V FITC pos og PI pos). Taflan hægra megin við myndirnar sýnir hversu mörg prósent fruma lenda í hverju horni.

3.7 Frysting fruma

Geyma þurfti frumur tveggja sjúklinga rannsóknarinnar þar sem seinkun var á lyfinu Plerixafor og voru frumurnar því frystar í fljótandi köfnunarefni.

Frumur voru einangraðar og taldar eins og áður var sagt frá (sjá kafla 3.1). Eftir talningu var ákveðið hversu margar frumur skyldu vera í hverju frystiglassi, hjá sjúklingi 1 voru fryst 15 glös sem hvert innihélt $24,6 \times 10^6$ frumur og hjá sjúklingi 7 voru fryst 13 glös sem innihéldu $13,86 \times 10^6$ frumur. Frumurnar voru leystar upp í blöndu af dimethyl sulfoxide (DMSO) og FBS, lausnin var blönduð í hlutföllunum 1:4. Lausnin var látin drjúpa á frumurnar í dropatali og blandað vel. Fryst var í sérstökum frystiglösnum (Nunc) og innihélt hvert glas 1,8 mL af frumublöndu. Eftir að blandan var komin í glösin voru þau sett í 10 mínútur á ís og svo í Nalgene frystibox, sem innihélt 250 mL af 100% isopropyl alkoholi og sett í -70°C frystiskáp yfir nótt. Daginn eftir var sýnunum komið fyrir í fljótandi köfnunarefni við -196°C .

Þegar frumurnar voru þýddar voru frystiglösinn með frumunum sett í hitabað við 37°C . Frumurnar voru síðan fluttar úr frystiglösunum yfir í stærri glös þar sem 9 mL af RPMI æti var bætt út í, í dropatali. Þetta var síðan sett í skilvindu í 5 mínútur á 1500 rpm. Að því loknu var flotið tekið ofan af og 20 mL af æti bætt út á frumurnar. Frumurnar voru svo taldar eins og áður var sagt frá (sjá kafla 3.1).

Við ræktun fruma úr frystingu þurfti ræktunin að innihalda 10x fleiri frumur en venjulega vegna hugsanlegra affalla sem urðu vegna frystingarinnar. Það er 10×10^6 frumur voru ræktaðar í hverjum brunni og í kólóníuræktun voru 1×10^6 frumur í rækt.

3.8 Leyfi

Leyfi fyrir rannsókninni voru fengin frá siðanefnd Landspítalans, yfirlækni blóðlækningadeildar, yfirlækni rannsóknarkjarna í blóðmeinafræði og framkvæmdarstjóra lækninga. Tilkynning var send til Persónuverndar og fékk hún númerið S6112/2013.

3.9 Úrvinnsla gagna

Niðurstöður mælinga úr frumufælðisjá voru unnar í Cell Quest Pro sem er frá sama framleiðanda og frumufælðisjain, BD Bioscience (San Jose, California, Bandaríkin).

Stuðst var við lýsandi tölfræði við samanburð á ræktunarniðurstöðum og marktækni var reiknuð út með þöruðu T prófi þar sem P gildi minni en 0,05 voru talin marktæk. Tölfræðiútreikningar voru unnir í Microsoft Excel 2010.

4 Niðurstöður

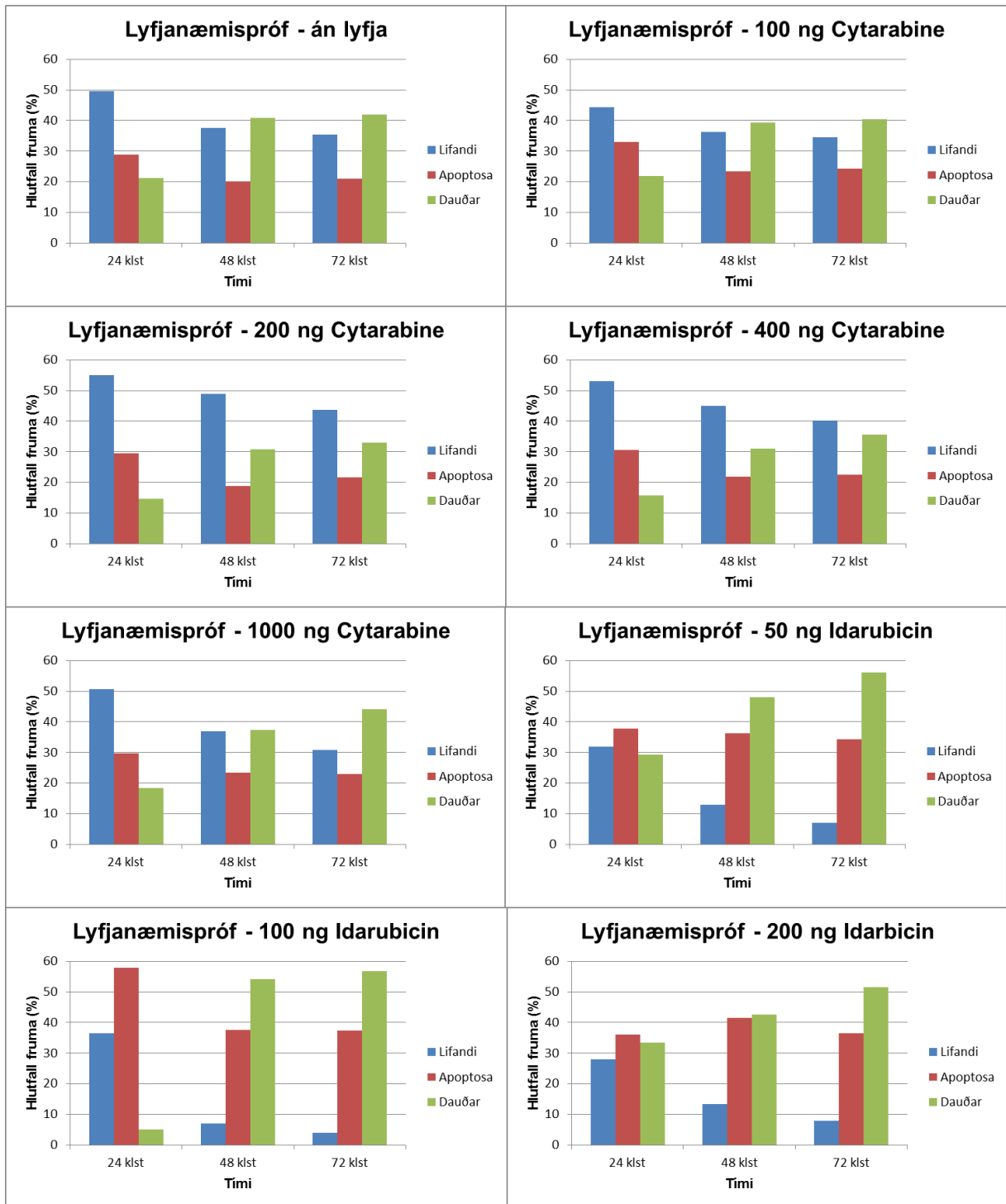
Alls fengust sjö sjúklingar til að taka þátt í rannsókninni, fimm greindir með AML og tveir greindir með CLL, þrjár konur á móti fjórum körlum. Sjúklingarnir voru númeraðir í tilviljanakenndri röð. Lista yfir þátttakendur má sjá í töflu 2.

Tafla 2 Þátttakendur rannsóknarinnar, sjúkdómsgreining og kyn.

Sjúklingur	Greining	Kyn
1	AML	kvk
2	AML	kvk
3	AML	kvk
4	AML	kk
5	AML	kk
6	CLL	kk
7	CLL	kk

4.1 Lyfjanæmispróf

Rannsóknin hófst á lyfjanæmisprófi á sjúklingi 1. Í lyfjanæmisprófinu voru einkjarnafrumur ræktaðar án vaxtarþátta en með krabbameinslyfjunum Cytarabine og Idarubicin í mismunandi styrkleika en markmiðið var að finna hentugan styrkleika lyfsins án þess að drepa allar frumur. Stýrður frumudauði var metinn með flúorlitunum Annexin V FITC og PI. Niðurstöður lyfjanæmisprófsins má sjá á mynd 5.

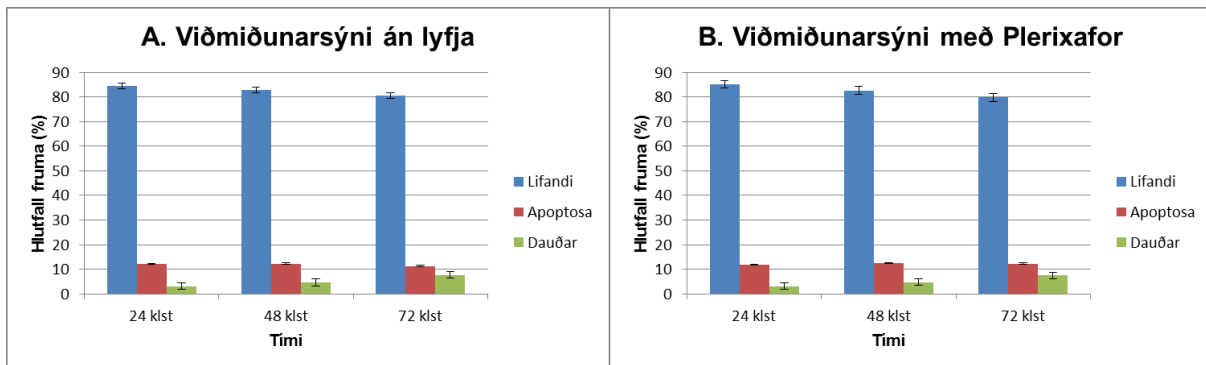


Mynd 5 Lyfjanæmispróf af sjúklingi 1.

Lifun og stýrður frumudauði voru mæld á þremur tímapunktum, eftir 24, 48 og 72 klukkustundir í rækt. Út frá þessum myndum var styrkleiki krabbameinslyfjanna í rannsókninni ákveðinn. Leitast var eftir að hafa lifandi frumur um 50% en með því að halda svo mörgum frumum lifandi gerir það kleift að hægt er að sjá mun á frumudauða með viðbættu Plerixafori.

4.2 Áhrif Plerixafor á lifun og stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma

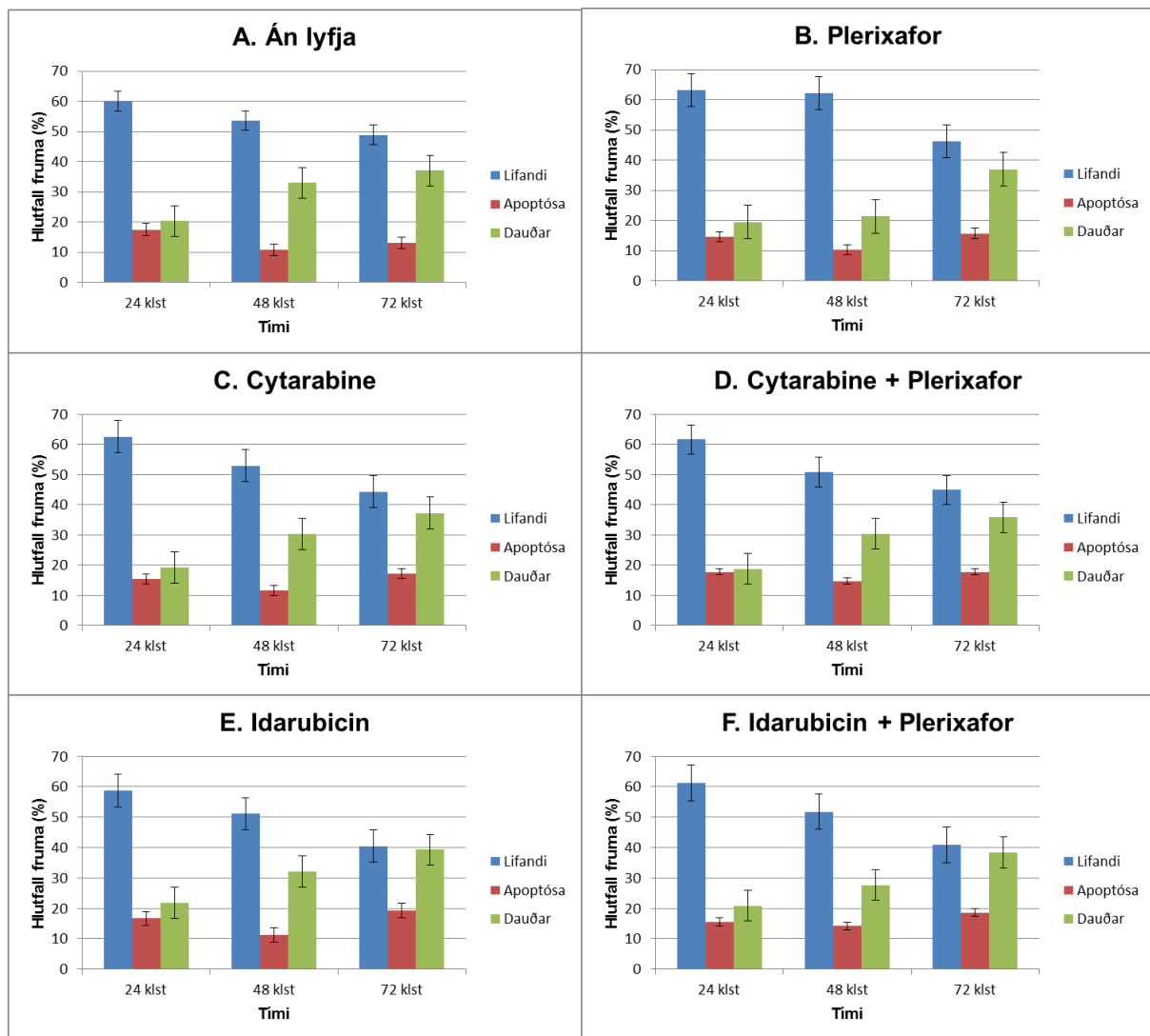
Einkjarna frumur sjö hvítblæðissjúklinga og fjögurra heilbrigðra einstaklinga (viðmiðunarsýni) voru einangraðar með þéttnistigulsaðferð. Frumurnar voru ræktaðar við mismunandi skilyrði þ.e. án lyfja, með Plerixafor eingöngu, með krabbameinslyfjum eingöngu og með bæði krabbameinslyfjum og Plerixafor. Stýrður frumudauði var metinn eftir 24, 48 og 72 klukkustundir í rækt með því að lita frumur með Annexin V FITC og PI og mælt í frumuflæðisjá. Niðurstöðurnar má sjá á myndum 6 og 7.



Mynd 6 Mat á lifun og stýrðum frumudauða hjá viðmiðunarhóp.

Myndin sýnir niðurstöður heilbrigðs viðmiðunarhóps við ræktun án lyfja og ræktun með Plerixafor. Myndin sýnir meðaltal og staðalskekkju (standard error of mean). Á mynd A eru niðurstöður ræktunar án lyfja og á mynd B eru niðurstöður ræktunar með Plerixafor eingöngu.

Frumudauði, lifun og stýrður frumudauði helst nokkurnveginn jafn á milli tímavinda. Með því að bera saman mynd 6A og 6B er ekki munur á lifun eða dauða frumanna. Reiknað var parað T próf og reyndist ekki vera marktækur munur á aðstæðunum samkvæmt því.



Mynd 7 Mat á lifun og stýrðum frumudauða á illkynja frumum hvítblæðissjúklinga.

Myndin sýnir niðurstöður hvítblæðissjúklinga á frumudauða, lifun og stýrðum frumudauða við ræktun án lyfja, með Plerixafor, með 200 ng Cytarabine, með 200 ng Cytarabine og Plerixafor, með 50 ng Idarubicin, með 50 ng Idarubicin og Plerixafor. Myndin sýnir meðaltal og staðalskekkju. Notast var við niðurstöður sex sjúklinga en einum sjúklingi var sleppt þar sem einungis náði að rækta þær frumur í 72 klst en ekki 24 né 48 klst.

Marktækur munur var reiknaður út með þöruðu T prófi og var marktækur munur á stýrðum frumudauða hjá frumum ræktuðum með Plerixafor eingöngu og frumum ræktuðum með 200 ng Cytarabine ($P = 0,037$) þ.e. marktækt fleiri frumur voru í stýrðum frumudauða með Plerixafor eingöngu. Einnig var marktækur munur á stýrðum frumudauða hjá frumum ræktuðum með Plerixafor eingöngu og frumum ræktuðum með 200 ng Cytarabine + Plerixafor þ.e. marktækt fleiri frumur voru í stýrðum frumudauða í rækt með Cytarabine og Plerixafor ($P = 0,049$). Marktækur munur á dauðum frumum var hjá frumum ræktuðum með 200 ng Cytarabine og 50 ng Idarubicin þ.e. marktækt fleiri dauðar frumur í rækt með Idarubicin ($P = 0,011$), 200 ng Cytarabine + Plerixafor og frumum ræktuðum með 50 ng Idarubicin þar sem marktækt fleiri frumur voru dauðar í rækt með Idarubicin ($P = 0,037$). Eini marktæki munurinn á lifandi frumum var á milli fruma ræktuðum með 200 ng Cytarabine og 50 ng Idarubicin þ.e. marktækt fleiri frumur voru lifandi eftir ræktun með Cytarabine heldur en Idarubicin ($P = 0,041$).

4.3 Áhrif Plerixafor á tjáningu hvítblæðisfruma

Einkjarna frumur sem voru einangraðar úr blóði þátttakanda voru litaðar með mótefnum gegn yfirborðssameindum sem eru einkennandi fyrir AML frumur eða CLL frumur. Tjáning sameindanna var mæld í frumuf læðisjá. Niðurstöðurnar voru túlkaðar og settar upp í töflu 3 og 4. Þegar tjáning breytist frá upphafspunkti ræktunar (0 punkti) er hún táknuð með rauðu letri.

Tafla 3 Tjáning yfirborðssameinda CLL sjúklinga fyrir og eftir ræktun í 72 klst með og án lyfja.

Taflan sýnir tjáningu yfirborðssameinda sem eru einkennandi fyrir CLL hvítblæðisfrumur. 0 p táknar tjáningu fyrir ræktun og ÷ stendur fyrir ræktun án lyfja. Niðurstöðurnar eru táknaðar sem pos sé tjáning til staðar en neg sé engin tjáning. Ef breyting er á tjáningunni frá 0 punkti er hún táknuð með rauðu letri.

CLL	Sjúklingur 7				Sjúklingur 6							
	Mótefni	0 p	÷	Pler	Cyt+ Ple	0 p	÷	Pler	Cyt	Cyt+ Ple	Ida	Ida+ Ple
CD 13	x	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg
CD 34	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	Pos	pos	pos
CD 184	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	Pos	neg	neg
CD11b	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	Neg	neg	neg
CD 11c	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg
CD 19	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos
CD 5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos
CD 22	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg
CD 23	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg
CD 20	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos
CD 10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg
Lambda	pos	pos	pos	pos	pos	x	x	pos	pos	Pos	pos	pos
Kappa	neg	neg	neg	neg	neg	x	x	neg	neg	Neg	neg	neg

Á töflu 3 sjást breytingar á tjáningu fruma (táknað með rauðu letri) en allar breytingarnar eru frá því að frumur tjá sameindir yfir í enga tjáningu. Athyglisvert er að skoða breytinguna í tjáningunni á CD 184 sem helst í hendur við ræktun með og án Plerixafor. Aðrar sameindir sem áhugavert var að fylgjast með voru CD 11b og CD 11c sem tákna aukna útþroskun fruma.

Tafla 4 Tjáning yfirborðssameinda AML sjúklinga fyrir og eftir ræktun í 72 klst með og án lyfja.

Taflan sýnir tjáningu yfirborðssameinda sem eru einkennandi fyrir AML hvítblæðisfrumur. 0 p táknar tjáningu fyrir ræktun og ÷ stendur fyrir ræktun án lyfja. Niðurstöðurnar eru táknaðar sem pos sé tjáning til staðar en neg sé engin tjáning. Ef breyting er á tjáningunni frá 0 punkti er hún táknuð með rauðu letri.

AML	Sjúklingur 1							Sjúklingur 2						
Mótefni	0p*	÷	Ple	Cyta	Cyt+ Ple	Ida		0 p	÷	Ple	Cyta	Cyt+ Ple	Ida	Ida+ Ple
CD 117	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg
CD 34	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg
CD 184	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Neg	pos	neg	pos	neg
CD 14	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos
CD 33	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos
CD 13	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	pos	Pos	pos	pos	pos	pos
CD 133	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg
CD 11b	X	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	neg
CD 11c	X	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	neg
AML	Sjúklingur 3							Sjúklingur 4						
Mótefni	0 p	÷	Ple	Cyta	Cyt+ Ple	Ida	Ida+ Ple	0 p	÷	Ple	Cyta	Cyt+ Ple	Ida	Ida+ Ple
CD 117	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg
CD 34	neg	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos
CD 184	pos	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Neg	pos	neg	pos	neg
CD 14	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg
CD 33	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	neg
CD 13	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg
CD 133	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	neg	neg
CD 11b	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	Pos	Pos	pos	Pos	pos	pos	pos	neg
CD 11c	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	neg	Neg	neg	neg	neg	neg
AML	Sjúklingur 5													
Mótefni	0 p	÷	Ple	Cyta	Cyt+ Ple	Ida	Ida+ Ple							
CD 117	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg							
CD 34	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos							
CD 184	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg							
CD 14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg							
CD 13	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos							
CD 133	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg							
CD 11b	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg							
CD 11c	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg							

*Ekki eiginlegur 0 punktur, sjá kafla 5.3.

Á töflu 4 sést með rauðu letri hvernig tjáning sumra sameinda breytist eftir ræktun við mismunandi aðstæður í 72 klukkutíma. Áhugaverðast í þessu samhengi er að skoða tjáninguna á CD 184. Einnig benda sameindirnar CD 11b og CD 11c til aukinnar útþroskunar fruma séu þær jákvæðar en í töflunni sést ekki breyting á CD 11b og CD 11c úr neikvæðu í jákvæða tjáningu. Flest allar breytingar á

tjáningu sem sjást í töflunni er að rekja til frumudauða en þá hætta frumur að tjá einkennandi sameindir.

4.4 Niðurstöður kólóníuræktana

Kólóníuræktun var gerð á einkjarna frumum fimm hvítblæðissjúklinga og tveggja heilbrigðra einstaklinga. Kólóníuræktunin var gerð á tveimur skálum við sex aðstæður með og án lyfja auk þess að tvö mismunandi æti voru notuð, annarsvegar án vaxtarþáttarins EPO og hinsvegar með EPO. Vöxtur kólónía var skoðaður í smásjá eftir 14 daga í rækt, þá voru kólóníur taldar og flokkaðar í tvo hópa, BFU-E og CFU-GM. Niðurstöður talningarinnar fyrir heilbrigðu viðmiðunarsýnin má sjá í töflum 5 og 6 en niðurstöður talningarinnar fyrir sjúklingana má sjá í töflum 7 og 8.

Tafla 5 Kólóníuræktun viðmiðunarsýna án vaxtarþáttarins EPO.

Taflan sýnir meðaltal talinna kólónía úr rækt án lyfja og með Plerixafor. Ræktað var án vaxtarþáttarins EPO. Niðurstöðunum er skipt upp í rauðkorna kólóníur (BFU-E) og hvítkorna kólóníur (CFU-GM). M stendur fyrir meðaltal viðmiðunarsýnanna, S fyrir staðalfrávik þeirra og SEM staðalskekkjuna.

Án EPO	Styrkur 0		Plerixafor	
	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM
Kontról 1	0	17	0	4,5
Kontról 2	1	38,5	0	11
M	0,5	27,75	0	7,75
S	0,707107	15,2028	0	4,596194
SEM	0,5	10,75	0	3,25

Tafla 6 Kólóníuræktun viðmiðunarsýna með vaxtarþættinum EPO.

Taflan sýnir meðaltal talinna kólónía úr rækt án lyfja og með Plerixafor. Ræktað var með vaxtarþættinum EPO. Niðurstöðunum er skipt upp í rauðkorna kólóníur (BFU-E) og hvítkorna kólóníur (CFU-GM). M stendur fyrir meðaltal viðmiðunarsýnanna, S fyrir staðalfrávik þeirra og SEM staðalskekkjuna.

Með EPO	Styrkur 0		Plerixafor	
	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM
Kontról 1	85	18	0	0,5
Kontról 2	109	28,5*	1	37,5
M	97	23,25	0,5	19
S	16,97056	7,424621	0,707107	26,16295
SEM	12	5,25	0,5	18,5

*3 CFU-GEMM kólóníur sáust hjá viðmiðunarsýni 2.

Tafla 7 Kólóniuræktun sjúklinga án vaxtarþáttarins EPO.

Taflan sýnir meðaltal talinna kólónía úr ræktinni án lyfja, með Plerixafor, með 100 ng Cytarabine, með 100 ng Cytarabine + Plerixafor, með 50 ng Idarubicin, með 50 ng Idarubicin + Plerixafor. Ræktað var án vaxtarþáttarins EPO. Niðurstöðunum er skipt upp í rauðkorna kólóniur (BFU-E) og hvítkorna kólóniur (CFU-GM). S stendur fyrir sjúklingur og í kjölfarið fylgir númer þeirra og greining. M stendur fyrir meðaltal sjúklinganna, S fyrir staðalfrávik þeirra og SEM staðalskekkjuna.

Án EPO	Án lyfja		Plerixafor		Cyta		Cyta+Pler		Ida		Ida+Pler	
	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM
S 1 AML	1,5	3,5	0	2,5	0	0,5	0	1	0	2,5	0	0,5
S 2 AML	0,5	14	0	1	0	0	0,5	0,5	0	9,5	0	4
S 4 AML	5,5	0	3	2,5	3	2,5	2,5	2,5	1	1,5	4	2,5
S 6 CLL	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
S 7 CLL	5	6,5	2	3	2	0,5	11	2	2	6,5	2	0,5
M	2,5	4,8	1	1,8	1,1	0,7	2,8	1,2	0,6	4	1,2	1,5
S	2,57	5,82	1,41	1,25	1,34	1,04	4,7	1,04	0,89	3,91	1,79	1,7
SEM	1,15	2,60	0,63	0,56	0,6	0,46	2,10	0,46	0,4	1,75	0,8	0,76

Tafla 8 Kólóniuræktun sjúklinga með vaxtarþættinum EPO.

Taflan sýnir meðaltal talinna kólónía úr ræktinni án lyfja, með Plerixafor, með 100 ng Cytarabine, með 100 ng Cytarabine + Plerixafor, með 50 ng Idarubicin, með 50 ng Idarubicin + Plerixafor. Ræktað var með vaxtarþættinum EPO. Niðurstöðunum er skipt upp í rauðkorna kólóniur (BFU-E) og hvítkorna kólóniur (CFU-GM). S stendur fyrir sjúklingur og í kjölfarið fylgir númer þeirra og greining. M stendur fyrir meðaltal sjúklinganna, S fyrir staðalfrávik þeirra og SEM staðalskekkjuna.

Með EPO	Án lyfja		Plerixafor		Cyta		Cyta+Pler		Ida		Ida+Pler	
	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM
S 1 AML	4,5	3,5	15	10	1,5	1	0,5	3,5	0	3,5	1	2,5
S 2 AML	4	34,5	0	3	0	0	0	0,5	3,5	20	0	4,5
S 4 AML	3	0	2	1	1	3	2,5	1,5	1	2	3,5	1,5
S 6 CLL	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
S 7 CLL	40,5	11	1,5	0	0,5	0	3	2,5	20	16,5	6,5	3,5
M	10,4	9,8	3,7	3	0,8	0,8	1,4	1,6	4,9	8,4	2,2	2,4
S	16,92	14,5	6,38	4,06	0,57	1,3	1,29	1,43	8,56	9,16	2,8	1,75
SEM	7,57	6,49	2,85	1,82	0,26	0,58	0,58	0,64	3,83	4,1	1,25	0,78

5 Umræða

Hvítblæði er alvarlegur sjúkdómur og mikil þörf er á bættum meðferðarúrræðum. Þar sem erfitt hefur verið að finna hina eina réttu meðferð gegn hvítblæði þar sem meingerð sjúkdómsins er svo flókin, þá er nauðsynlegt að kafa niður í hinar minnstu sameindir fruma í leit að lækningu. Í þessari rannsókn var einblínt á viðtakann CXCR4 þar sem samspil hans við önnur hefðbundin krabbameinslyf voru skoðuð og áhrif hans á útþroskun fruma, in vitro. Til að meta þessi áhrif voru settar upp tvennskonar frumuræktir, annarsvegar hefðbundin rækt með RPMI æti að viðbættum vaxtarþáttunum G-CSF og GM-CSF til að líkja eftir umhverfi líkamans. Í þessari rækt var lifun fruma með og án lyfja metin. Einnig var sett upp svokölluð kólóníurækt þar sem útþroskun fruma var metin með þeim fjölda kólónía sem frumurnar gátu myndað.

5.1 Lyfjanæmispróf

Í upphafi rannsóknarinnar var byrjað á að gera lyfjanæmispróf á sjúklingi 1. Í lyfjanæmisprófi felst að einkjarna frumur sjúklingsins voru einangraðar úr blóði og ræktaðar með mismunandi styrk krabbameinslyfjanna Cytarabine og Idarubicin þar sem lifun og stýrður frumudauði var metinn. Niðurstöðurnar á mynd 5 sýna ekki mikinn mun á milli styrkja Cytarabines en ákveðið var að nota 200 ng sem gaf lifandi frumur uppá 50%. Með því að drepa ekki fleiri frumur en 50% var hægt að meta áhrif Plerixafor á frumudauðann. Valið var að nota 50 ng styrk af Idarubicin út frá þessum niðurstöðum. Hjá þessum sjúklingi kom fram mun meiri lyfjasvörun við Idarubicin heldur en Cytarabine. Gallinn við lyfjanæmisprófið var að vaxtarþættir voru ekki notaðir eins og var í frumuræktunarmódelinu sem notað var til að meta áhrif Plerixafor og krabbameinslyfja, lifunin varð því heldur meiri í aðaltilrauninni en búist var við. Lyfjanæmisprófið var einungis gert á einum sjúklingi en hefði þurft að gera á fleirum til að útiloka einstaklingsmun. Einnig urðu breytingar á túlkun niðurstaðna úr prófum á stýrðum frumudauða og við það jókst lifunin og varð meira en búist var við.

Niðurstöður lyfjanæmisprófsins gáfu góða vísbendingu á að hægt sé að skoða virkni fleiri krabbameinslyfja á þennan hátt. Rannsóknir hafa áður verið gerðar á lyfjanæmi Cytarabine og Idarubicin þegar lyfin voru ný á markaði en frumuræktunum hefur farið fram síðan þá þannig að möguleiki væri á að endurskoða þessar rannsóknir með bættum aðferðum (Curtis o.fl., 1995; Nara o.fl., 1986).

5.2 Áhrif Plerixafor á lifun og stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma

Þegar styrkir krabbameinslyfja höfðu verið valdir út frá niðurstöðum lyfjanæmisprófsins voru sett upp frumuræktunarmódel með vaxtarþáttum til að meta áhrif Plerixafor á lifun og stýrðan frumudauða. Illkynja frumur voru ræktaðar án lyfja til að meta afföll sem urðu vegna breyttra aðstæðna fruma, með Plerixafor til að meta áhrifin af Plerixafor einu og sér, með krabbameinslyfinu Cytarabine og annarsvegar með bæði Cytarabine og Plerixafor til að meta muninn á stýrðum frumudauða með krabbameinslyfi eingöngu og með krabbameinslyfi og Plerixafor. Sama á við með krabbameinslyfið Idarubicin en ræktað var með því eingöngu og að viðbættu Plerixafor og borið saman. Viðmiðunarsýni

úr heilbrigðum einstaklingum var ræktað án lyfja og með Plerixafor eingöngu. Niðurstöðurnar má sjá í myndum 6 og 7.

Með því að bera saman viðmiðunarsýnin við sjúklingasýnin sést að heilbrigðu frumurnar þola aðstæðurnar í frumuræktunarmólelinu mun betur en frumur sjúklinganna. Þetta skýrist af því að hvítblæðisfrumurnar virðast vera viðkvæmari fyrir aðstæðum utan líkamans en þær heilbrigðu þola meira álag. Hjá viðmiðunarsýnunum er ekki marktækur munur á lifun og stýrðum frumudauða á milli ræktana án lyfja og ræktunnar með Plerixafor. Eitt af því sem gæti skýrt þetta er að hjá heilbrigðu fólki er CXCR4 viðtakinn tjáður af stofnfrumum og forverafrumum en þær frumur er ekki algengt að finna í blóði heilbrigðra. Mótefnalitun var ekki gerð á viðmiðunarsýnum þar sem flestar sameindirnar sem litað var fyrir eru ekki tjáðar af heilbrigðum frumum. Hinsvegar hefði verið fróðlegt að skoða tjáningu CD 184 til að aðstoða við túlkunina og sjá hvort Plerixafor hafi verið að bindast viðtaka sínum.

Með því að bera saman innbyrðis niðurstöður hvítblæðissjúklinga sést að ekki er marktækur munur milli sömu lyfja með eða án Plerixafor (Idarubicin á móti Idarubicin+Plerixafor og Cytarabine á móti Cytarabine+Plerixafor). Á tölum einstaka sjúklinga sést að aðeins er aukning á frumum í stýrðum frumudauða og dauðum frumum með viðbættu Plerixafor og þá aðallega eftir 72 klst í rækt. Út frá þeim upplýsingum er spurning hvort rækta hefði átt frumurnar í lengri tíma en 72 klst til að sjá marktækan mun.

Marktækur munur fékkst á milli fruma í stýrðum frumudauða ræktuðum með Cytarabine eingöngu og Plerixafor eingöngu þar sem fleiri frumur voru í stýrðum frumudauða eftir að hafa verið ræktaðar með Plerixafor. Þetta sýnir fram á hæfni Plerixafor til að ýta frumum í stýrðan frumudauða og að sú hæfni sé í líkingu við þekkt krabbameinslyf. Marktækur munur fékkst einnig á stýrðum frumudauða í ræktun með Plerixafor eingöngu og Cytarabine með Plerixafor, þar sem meiri frumudauði var í ræktinni með báðum lyfjum. Þetta sýnir fram á það að með því að gefa Plerixafor með krabbameinslyfjum er illkynja frumum frekar ýtt út í stýrðan frumudauða heldur en ef krabbameinslyf væri notað eitt og sér.

Liesveld og félagar gerðu svipaða rannsókn árið 2007 en þau gátu ekki sýnt fram á að Plerixafor hefði ekki bein áhrif á lifun eða stýrðan frumudauða AML blasta (Liesveld o.fl., 2007).

Marktækur munur á frumudauða fékkst hjá frumum ræktuðum með 200 ng Cytarabine og 50 ng Idarubicin þar sem að frumudauði var marktækt meiri í rækt með Idarubicin. Samhliða því voru frumur marktækt meira lifandi í ræktinni með Cytarabine miðað við ræktina með Idarubicini. Þessar niðurstöður sýna fram á mun milli krabbameinslyfjanna en þekkt er að Idarubicin sé öflugara í að drepa frumur og það þurfi ekki nærri því jafn mikinn styrk af því og öðrum frumudrepanði lyfjum (Wheatley, 1998). Þessar niðurstöður renna líka stoðum undir það að hærri styrkur af Cytarabine hefði verið ákjósanlegri fyrir frumuræktina. Þessi virkni Idarubicins var líka öflugri en ræktin með 200 ng Cytarabine með Plerixafor þar sem marktækt fleiri frumur voru dauðar í rækt með Idarubicin.

Ef bornar eru saman illkynja frumur AML og CLL sjúklinga og lifun þeirra í rækt kemur í ljós að frumur CLL sjúklinganna deyja strax á fyrsta sólahring meira (40%) en frumur AML sjúklinga (2 – 19%). Undantekning er þó á frumum AML sjúklings númer 4, á fyrsta sólahring deyja 54% frumanna en þrátt fyrir það eru fleiri frumur dauðar eftir 72 klst hjá CLL sjúklingum heldur en öllum AML

sjúklingunum. Skýringin á þessu er að mun erfiðara er að rækta CLL frumur og þurfa þær frumur fleiri vaxtarhvetjandi þætti sniðna að þeim en vaxtarþættirnir sem notaðir voru í þessari rannsókn eru sniðnir að myeloid frumum.

Þessi rannsókn var gerð in vitro og bendir til að Plerixafor geti aukið stýrðan frumudauða krabbameinsfruma. Þetta eru svipaðar niðurstöður og Tavor og félagar birtu árið 2004 en í rannsókn þeirra var notast við ónæmisbældar mýs með mennskum AML frumum. Með því að bæta CXCL12 við frumur sem tjá CXCR4 jókst lifun frumanna. Þegar Plerixafor var bætt í rannsóknarmódelið hindraði það CXCR4 viðtakann og lifun AML frumanna sem tjá viðtakann minnkaði (Tavor o.fl., 2004). Uy og félagar gerðu in vivo rannsókn á áhrifum Plerixafor í AML sjúklingum, niðurstöðurnar sýndu fram á að tilfærsla AML blasta í blóðrás jókst um tvöfalt í sjúklingunum. Rannsóknin sýndi fram á að raunhæfur kostur er að sameina Plerixafor við önnur krabbameinslyf í lyfjameðferðum AML sjúklinga (Uy o.fl., 2012).

5.3 Áhrif Plerixafor á tjáningu yfirborðssameinda hvítblæðisfruma

Tjáning yfirborðssameinda hjá hvítblæðisfrumum var mæld með því að lita þær með mótefnalitum og mæla í frumuf læðisjá. Tjáningin er einstaklingsbundin en markmiðið með tilraununum var að skoða hvort tjáning hjá frumunum myndi breytast í rækt með krabbameinslyfjum og/eða Plerixafor. Niðurstöðurnar má sjá í töflum 3 og 4.

Í töflu 3 sjáum við tjáningu yfirborðssameinda hjá CLL sjúklingum í rannsókninni, breytileiki sést hjá einstaklingum en hann má mestmegnis rekja til mikils frumudauða. Sama er hægt að segja með niðurstöður AML sjúklinganna í töflu 4. Það helsta sem má lesa út úr þessum töflum er að þegar ræktað er með Plerixafor sést að lyfið er að bindast viðtaka sínum þar sem engin tjáning á CD 184 mælist en það skýrist af því að viðtakinn er bundinn Plerixafor. Ætlunin var að sjá mun á sameindunum CD 11b og CD 11c en út frá þeim sameindum er hægt að meta þroska frumanna, en samkvæmt niðurstöðum á tjáningu CD11b og CD11c varð ekki útþroskun á hvítblæðisfrumunum en lengri tíma í ræktun hefði þurft til að sjá mögulegar breytingar.

Athuga skal að 0 punktur sjúklings 1 er mældur eftir 24 klukkustunda rækt án lyfja, en fyrir frýstingu. Ógerlegt var að fá nýtt sýni fyrir þessa mælingu.

5.4 Áhrif Plerixfor á útþroskun hvítblæðisfruma

Sýnt hefur verið fram á víðtæk áhrif Plerixafor þar á meðal áhrifum þess á útþroskun fruma (Tavor o.fl., 2008). Til að kanna þessi áhrif voru settar upp kólóníuræktanir en niðurstöður úr þeim má sjá í töflum í kafla 4.4. Ef bornar eru saman töflurnar sem sýna niðurstöður án EPO og hinsvegar með EPO, sést hvað þessi vaxtarþáttur skiptir miklu máli. Þekkt er að rauðkornaþyrpingar (BFU-E) eiga mjög erfitt með að myndast án návistar EPO og jafnvel að það sé ekki hægt og samsvarar það niðurstöðum úr ræktun viðmiðunarsýna en hjá sumum sjúklingum ná þó nokkrar BFU-E að myndast. Þetta stafar líklegast af því að sjúklingafrumurnar eru óeðlilegar og framandi. Einnig er athyglisvert að sjá að hvítkornaþyrpingar (CFU-GM) virðast einnig aukast í návist EPO en áður hefur verið sýnt fram á samverkandi áhrif þarna á milli (Zheng, 2002).

Ef áhrif Plerixafor eru skoðuð í töflunum virðist vera að Plerixafor hafi frekar letjandi áhrif á útþroskun hvítblæðisfrumanna heldur en að auka hana. Kólóníur sem uxu í viðmiðunarsýnum með Plerixafor voru mun minni en kólóníur ræktaðar án lyfja. Ef AML sjúklingar og CLL sjúklingar eru skoðaðir í sitthvoru lagi sést að annað er uppi á teningnum. Hjá AML sjúklingum virðist Plerixafor gefa meiri tilhneigingu í átt að útþroskun þó ekki mikill munur sé á tölunum. Hinsvegar hjá CLL sjúklingum virðist Plerixafor hafa letjandi áhrif á útþroskun hvítblæðisfrumanna. Í viðmiðunarsýnunum af heilbrigðu fólki í töflum 5 og 6, sjást þessi letjandi áhrif Plerixafor mjög augljóslega. Tavor og félagar gerðu rannsókn árið 2008 þar sem þeir ræktuðu AML frumulínuna U937 og mennskar AML frumur með Plerixafor. Þeir fengu þær niðurstöður að frumur ræktaðar í 9 daga með með Plerixafor sýndu marktækan mun á útþroskun bæði í smásjá og með móteflalitun miðað við frumur ræktaðar án Plerixafor (Tavor o.fl., 2008). Liesveld og félagar fengu þá niðurstöðu í sínum rannsóknum að Plerixafor hefði letjandi áhrif á útþroskun AML fruma (Liesveld o.fl., 2007). Ástæðan fyrir þessum mun á rannsóknunum liggur mögulega í skammtastærð Plerixafor en minni skammtur var notaður í þessari rannsókn (1µmól/ml) og rannsókn Liesveld heldur en í rannsókn Tavor (10µg/ml).

6 Ályktanir

Í þessari rannsókn tókst að hanna frumuræktunarmódel sem virkar til skoðunar á lyfjanæmi og efnatoghemlinum Plerixafor. Rannsóknin sýnir fram á hæfni Plerixafor til að auka stýrðan frumudauða hvítblæðisfruma. Einnig sjást vísbendingar um möguleg áhrif Plerixafor á aukna útþroskun AML fruma með kólóníuræktun en mikill breytileiki er milli einstaklinga. Lyfið virðist hafa meiri áhrif á AML frumur heldur en CLL frumur sem stafar aðallega af því að CLL frumur þurfa aðrar ræktunaraðstæður og vaxtarhvetjandi þætti en voru notaðir í þessari rannsókn. Svipgerð hvítblæðisfruma breytist lítið nema þá tjáning CD 184 sem breytist eftir því hvort frumurnar voru ræktaðar með eða án Plerixafor, en lyfið bindst CD 184.

Helstu gallar rannsóknrinnar voru að rannsóknartíminn var svo stuttur að ekki náðust nógu margir þátttakendur til að fá áreiðanlegar niðurstöður. Breytingar urðu á túlkun niðurstaðna undir lok rannsóknarinnar sem olli því að allar niðurstöður breyttust og þar með niðurstöður úr lyfjanæmisprófinu og samkvæmt því hefði þurft að nota hærri styrki krabbameinslyfja. Einnig hefði hærri styrkur af Plerixafor verið æskilegur miðað við aðrar rannsóknir og frumurækt hefði átt að standa í lengri tíma til að skoða langtíma áhrif Plerixafor á frumurnar með möguleika á meiri útþroskun frumanna.

Ljóst er að ekki hægt að álykta mikið út frá svo litlu þýði en áhrif Plerixafor koma skýrt fram og að því sögðu er æskilegt að rannsaka áhrif lyfsins nánar fyrir mögulega innleiðingu þess í lyfjameðferð AML sjúklinga.

Heimildaskrá

- American cancer society. (2013a, 18. janúar). What are the key statistics about acute lymphocytic leukemia? Sótt 28. janúar, 2013, frá <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutelymphocyticinadults/detailedguide/leukemia-acute-lymphocytic-key-statistics>.
- American cancer society. (2013b, 18. janúar). What are the key statistics about acute myeloid leukemia? Sótt 1. Febrúar, 2013, frá <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-key-statistics>.
- American cancer society. (2013c, 18. janúar). What are the key statistics about chronic myeloid leukemia? Sótt 4. febrúar, 2013, frá <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chronicmyeloidcml/detailedguide/leukemia-chronic-myeloid-myelogenous-key-statistics>.
- American cancer society. (2013d, 18. janúar). What are the key statistics for chronic lymphocytic leukemia? Sótt 5. febrúar, 2013, frá <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chroniclymphocyticcll/detailedguide/leukemia-chronic-lymphocytic-key-statistics>.
- BD Biosciences. (2008). FITC Annexin V apoptosis detection kit I Sótt 6. febrúar, 2013, frá http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6693KK_5_56547.pdf.
- Bennett, F., Rawstron, A., Plummer, M., de Tute, R., Moreton, P., Jack, A. o.fl. (2007). B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*, 139(4), 600-604. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06790.x.
- Berman, E., Heller, G., Santorsa, J., McKenzie, S., Gee, T., Kempin, S. o.fl. (1991). Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*, 77(8), 1666-1674.
- Bradley, T. R. & Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med*, 44(3), 287-300.
- Burger, J. A. (2010). Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol*, 20(6), 424-430. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.09.005.
- Burger, J. A., Burger, M. & Kipps, T. J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94(11), 3658-3667.
- Burger, J. A. & Peled, A. (2009). CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia*, 23(1), 43-52. doi: 10.1038/leu.2008.299.
- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E. & Sipkins, D. A. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*, 322(5909), 1861-1865. doi: 10.1126/science.1164390.
- Costa, D., Carrio, A., Madrigal, I., Arias, A., Valera, A., Colomer, D. o.fl. (2006). Studies of complex Ph translocations in cases with chronic myelogenous leukemia and one with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 166(1), 89-93. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.08.024.
- Curtis, J. E., Minden, M. D., Minkin, S. & McCulloch, E. A. (1995). Sensitivities of AML blast stem cells to idarubicin and daunorubicin: a comparison with normal hematopoietic progenitors. *Leukemia*, 9(3), 396-404.
- Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A. & Neamati, N. (2013). Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics*, 3(1), 47-75. doi: 10.7150/thno.5376.
- Fiegl, M., Samudio, I., Clise-Dwyer, K., Burks, J. K., Mnjoyan, Z. & Andreeff, M. (2009). CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood*, 113(7), 1504-1512. doi: 10.1182/blood-2008-06-161539.
- Harmening, D. M. (2009). *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis* (Fifth ed.). Philadelphia, USA: F.A. Davis Company.
- Hendrix, C. W., Collier, A. C., Lederman, M. M., Schols, D., Pollard, R. B., Brown, S. o.fl. (2004). Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 37(2), 1253-1262.
- Human cell differentiation molecules. (e. d.). HLDA9 Workshop. Sótt 21. febrúar, 2013, frá <http://hcdm.org/HLDA9Workshop/tabid/60/Default.aspx>.
- International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. (1989). Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann Intern Med*, 110(3), 236-238.

- Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., Vardiman, J. W. (Ed.). (2001). *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, Frakkland: IARC Press.
- Jónasson, J. G. & Tryggvadóttir, L. (2012). *Krabbamein á Íslandi - Upplýsingar úr Krabbameinsskrá fyrir tímabilið 1955-2010*. Reykjavík: Krabbameinsfélagið.
- Kalachikov, S., Migliazza, A., Cayanis, E., Fracchiolla, N. S., Bonaldo, M. F., Lawton, L. o.fl. (1997). Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics*, 42(3), 369-377. doi: 10.1006/geno.1997.4747.
- Kim, J. S., Beadle, J. R., Freeman, W. R., Hostetler, K. Y., Hartmann, K., Valiaeva, N. o.fl. (2012). A novel cytarabine crystalline lipid prodrug: hexadecyloxypropyl cytarabine 3',5'-cyclic monophosphate for proliferative vitreoretinopathy. *Mol Vis*, 18, 1907-1917.
- Kolitz, J. E. (2006). Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 134(6), 555-572. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06219.x.
- Konoplev, S., Rassidakis, G. Z., Estey, E., Kantarjian, H., Liakou, C. I., Huang, X. o.fl. (2007). Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer*, 109(6), 1152-1156. doi: 10.1002/cncr.22510.
- Lefrancois, M., Lefebvre, M. R., Saint-Onge, G., Boulais, P. E., Lamothe, S., Leduc, R. o.fl. (2011). Agonists for the chemokine receptor CXCR4. *ACS Med Chem Lett*, 2(8), 597-602. doi: 10.1021/ml200084n.
- Liesveld, J. L., Bechelli, J., Rosell, K., Lu, C., Bridger, G., Phillips, G., 2nd o.fl. (2007). Effects of AMD3100 on transmigration and survival of acute myelogenous leukemia cells. *Leuk Res*, 31(11), 1553-1563. doi: 10.1016/j.leukres.2007.02.017.
- Mann, D. L., DeSantis, P., Mark, G., Pfeifer, A., Newman, M., Gibbs, N. o.fl. (1987). HTLV-II-associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science*, 236(4805), 1103-1106.
- Mohle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M. A., Brugger, W. & Kanz, L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 91(12), 4523-4530.
- Morton, L. M., Turner, J. J., Cerhan, J. R., Linet, M. S., Treseler, P. A., Clarke, C. A. o.fl. (2007). Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*, 110(2), 695-708. doi: 10.1182/blood-2006-11-051672.
- Nagayama, J., Tomizawa, D., Koh, K., Nagatoshi, Y., Hotta, N., Kishimoto, T. o.fl. (2006). Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood*, 107(12), 4663-4665. doi: 10.1182/blood-2005-11-4728.
- Nara, N., Curtis, J. E., Senn, J. S., Trichter, D. L. & McCulloch, E. A. (1986). The sensitivity to cytosine arabinoside of the blast progenitors of acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 67(3), 762-769.
- National cancer institute. (e. d.-a). Cytarabine. Sótt 15. mars, 2013, frá <http://www.cancer.gov/drugdictionary?Cdrid=39015>.
- National cancer institute. (e. d.-b). Idarubicin (Code C562). Sótt 15. mars, 2013, frá <http://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI%20Thesaurus&code=C562>.
- Nissen-Druey, C., Tichelli, A. & Meyer-Monard, S. (2005). *Human hematopoietic colonies in health and disease*. Sviss: Karger.
- Peled, A. & Tavor, S. (2013). Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Theranostics*, 3(1), 34-39. doi: 10.7150/thno.5150.
- Perry, M. C. (2008). *The Chemotherapy source book* (Fourth ed.). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pluznik, D. H. & Sachs, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 66(3), 319-324. doi: 10.1002/jcp.1030660309.
- Que, T. H., Marco, J. G., Ellis, J., Matutes, E., Babapulle, V. B., Boyle, S. o.fl. (1993). Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood*, 82(2), 571-575.
- Ribera, J. M., Ortega, J. J., Oriol, A., Bastida, P., Calvo, C., Perez-Hurtado, J. M. o.fl. (2007). Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stem-cell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial. *J Clin Oncol*, 25(1), 16-24. doi: 10.1200/jco.2006.06.8312.

- Rombouts, E. J., Pavic, B., Lowenberg, B. & Ploemacher, R. E. (2004). Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*, *104*(2), 550-557. doi: 10.1182/blood-2004-02-0566.
- Sachdeva, M. U., Ahluwalia, J., Das, R., Varma, N. & Garewal, G. (2006). Role of FAB classification of acute leukemias in era of immunophenotyping. *Indian J Pathol Microbiol*, *49*(4), 524-527.
- Tavor, S., Eisenbach, M., Jacob-Hirsch, J., Golan, T., Petit, I., Benzion, K. o.fl. (2008). The CXCR4 antagonist AMD3100 impairs survival of human AML cells and induces their differentiation. *Leukemia*, *22*(12), 2151-5158. doi: 10.1038/leu.2008.238.
- Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L. o.fl. (2004). CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*, *64*(8), 2817-2824.
- Toft, N., Birgens, H., Abrahamsson, J., Bernell, P., Griskevicius, L., Hallbook, H. o.fl. (2013). Risk group assignment differs for children and adults 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia treated by the NOPHO ALL-2008 protocol. *Eur J Haematol*. doi: 10.1111/ejh.12097.
- Uy, G. L., Rettig, M. P., Motabi, I. H., McFarland, K., Trinkaus, K. M., Hladnik, L. M. o.fl. (2012). A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, *119*(17), 3917-3924. doi: 10.1182/blood-2011-10-383406.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L. & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, *100*(7), 2292-2302. doi: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- Wheatley, K. (1998). A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. AML Collaborative Group. *Br J Haematol*, *103*(1), 100-109.
- Zagaria, A., Anelli, L., Albano, F., Vicari, L., Schiavone, E. M., Annunziata, M. o.fl. (2006). Molecular cytogenetic characterization of deletions on der(9) in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, *167*(2), 97-102. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.01.011.
- Zheng, B. (2002). Effects of erythropoietin and recombinant cytokines on colony formation and self-renewal by erythroid burst-forming units and granulocyte-macrophage progenitors from mobilized peripheral blood progenitor cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, *10*(1), 6-12.
- Zhu, X., Ma, Y. & Liu, D. (2010). Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol*, *3*, 17. doi: 10.1186/1756-8722-3-17.

Fylgiskjöl

Upplýst samþykki fyrir þátttöku í vísindarannsókninni: „Áhrif efnatoghemla (chemotaxis inhibitors) í bráða hvítblæði“

Ágæti viðtakandi

Fyrirhugað er að framkvæma ofangreinda rannsókn en hún er hluti af lokaverkefni í lífeindafræði við Háskóla Íslands. Leitað er til einstaklinga sem hafa nýlega greinst með bráða hvítblæði og eru í meðferð á Blóðlækningadeild LSH og til samanburðarhóps sem lokið hefur meðferð. Upplýsingar um mögulega þátttakendur verða fengnar hjá læknum Blóðlækningadeildar.

Ábyrgðarmaður rannsóknar: Sigrún Reykdal, læknir á Landspítala, sími: 825-5123, netfang: sigrunre@landspitali.is

Aðrir rannsakendur:

Snædís Birna Björnsdóttir, nemi í lífeindafræði
Íris Pétursdóttir, lífeindafræðingur
Guðmundur Rúnarsson, læknir
Elísabet Kristbergisdóttir, lífeindafræðingur

Inntak rannsóknar og markmið:

Sýnt hefur verið fram á að ýmis efni í blóði geta haft áhrif á svörun hvítblæðisfruma við lyfjameðferð þ.á.m. svokallaður efnatogahemill Plerixafor. Þetta hefur eingöngu verið rannsakað í músamódelum en markmið þessarar rannsóknar er að kanna lifun hvítblæðisfruma úr sjúklingum í návist Plerixafor og krabbameinslyfjanna Cytarabine og Idarubin. Sýni verða fengin hjá einstaklingum í hvítblæðismeðferð og samanburðarhópi sem hefur lokið meðferð. Leyfi fyrir rannsókninni hefur verið fengið hjá siðanefnd LSH og tilkynnt til Persónuverndar.

Hvað felst í þátttöku?

Þegar þú þarft að fara í blóðrannsókn eða mergsýnatöku verður í eitt til tvö skipti tekið aukalega 8 ml af blóði og 5-10 ml af mergsýni. Rannsóknin stendur frá febrúar og fram í apríl á þessu ári.

Þér ber engin skylda til að taka þátt í þessari vísindarannsókn. Þú getur hætt þátttöku hvenær sem er, án eftirmála og það hefur ekki áhrif á þá heilbrigðisþjónustu sem þú færð á LSH.

Áhætta og ávinningur

Ekki er um auka áhætta að ræða þar sem engin sýni verða tekin eingöngu vegna rannsóknarinnar. Enginn beinn ávinningur er fyrir þátttakendur. Vonast er til að rannsóknin geti stuðlað að nýjum meðferðarmöguleikum hjá sjúklingum með bráða hvítblæði.

Varðveisla og eyðing gagna

Gögn verða varðveitt hjá rannsóknaraðilum innan LSH. Ekki verður unnið með nein persónuleg gögn. Engin lífsýni verða varðveitt eftir rannsókn.

Mér hefur verið kynntur tilgangur þessarar vísindarannsóknar og í hverju þátttaka mín er fólgin. Ég er samþykk(ur) þátttöku.

Upplýst samþykki er í tvíriti og heldur þátttakandi eftir öðru eintakinu.

Undirskrift þáttakanda

Dagsetning

Undirskrift ábyrgðamanns rannsóknar

Dagsetning

Ef þú hefur spurningar um rétt þinn sem þáttakandi í þessari vísindarannsókn eða vilt hætta þáttöku í rannsókninni getur þú snúið þér til siðanefndar Landspítala, Fossvogi, 108 Reykjavík, Sími 543-7465, fax 5432339, tölvupóstur: sidanefnd@landspitali.is