

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ŽUGEC

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA ŽUGEC

PRIMERJAVA DVEH METOD KVANTITATIVNE VERIŽNE REAKCIJE
S POLIMERAZO DOLOČANJA RAVNI IZRAŽANJA GENA *BCR-ABL1* PRI BOLNIKIH S KRONIČNO MIELOIČNO LEVKEMIJO

COMPARISON OF TWO QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN
REACTION METHODS FOR DETERMINING THE EXPRESSION
LEVEL OF *BCR-ABL1* GENE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID
LEUKEMIA

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Irene Preložnik Zupan, spec. int., in somentorstvom doc. dr. Tadeja Pajiča, spec. med. biokem., spec. lab. med. genetike.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki ste mi s strokovnimi nasveti in s spodbudnimi besedami pomagali pri izdelavi magistrske naloge. Najprej bi se zahvalila somentorju doc. dr. Tadeju Pajiču, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biok. in spec. lab. med. genetike, ki me je prijazno sprejel pod svoje okrilje in mi omogočil izdelavo magistrske naloge, in mentorici doc. dr. Ireni Preložnik Zupan, dr. med., za sodelovanje in usmerjanje pri pisanju.

Zahvaljujem se tudi celotnemu kolektivu Specializiranega hematološkega laboratorija, da so me sprejeli medse, posebna zahvala pa gre Leonidi Kovačič, Špeli Žula in Martini Fink za uvajanje v delo in za pomoč pri njem.

Na tem mestu se seveda zahvaljujem tudi očetu in mami, ki sta mi študij omogočila, sestri in babici pa seveda moji boljši polovici Romanu za podporo tekom celotnega študija. Hvala vsem, ker ste me spodbujali in mi stali ob strani vse od začetka študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Irene Preložnik Zupan, dr. med., in somentorja doc. dr. Tadeja Pajiča, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biok. in spec. lab. med. genetike.

Ljubljana, oktober 2017

Maja Žugec

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Član komisije: asist. dr. Marija Nika Lovšin

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	VII
ABSTRACT	IX
KLJUČNE BESEDE	XI
KEY WORDS	XI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XII
1. UVOD	1
1.1. KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA	1
1.1.1. Philadelphia kromosom in njegovi produkti	1
1.1.2. Klinična slika pri kronični mieloični levkemiji.....	3
1.1.3. Diagnoza kronične mieloične levkemije	4
1.1.4. Diferencialna diagnoza kronične mieloične levkemije	5
1.1.5. Obdobje bolezni in prognoza.....	5
1.1.6. Zdravljenje kronične mieloične levkemije	6
1.1.7. Neželeni učinki zdravljenja kronične mieloične levkemije z inhibitorji tirozin kinaze.....	9
1.1.8. Odziv na zdravljenje kronične mieloične levkemije	9
1.1.9. Spremljanje odziva na zdravljenje – monitoring	10
1.2. KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU Z REVERZNO TRANSKRIPTAZO (RT-qPCR)	11
1.2.1. Kvantifikacija izražanja genov	13
1.2.2. RT-qPCR za določitev izražanja fuzijskega gena BCR-ABL1	14
1.2.3. Primerjava dveh metod RT-qPCR za merjenje BCR-ABL1 pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo.....	16
2. NAMEN IN CILJI.....	18
3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE.....	20

3.1.	PREISKOVANCI	20
3.2.	MATERIALI IN OPREMA.....	20
3.2.1.	Reagenti	20
3.2.2.	Oprema in materiali	21
3.2.3.	Statistična obdelava podatkov	22
3.3.	IZOLACIJA RNA.....	24
3.3.1.	Vzorec za analizo.....	24
3.3.2.	Izolacija RNA	24
3.3.3.	Določitev koncentracije in čistosti izolirane RNA	24
3.4.	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU Z REVERZNO TRANSKRIPTAZO – RT-qPCR	25
3.4.1.	Sinteza komplementarne DNA	25
3.4.2.	Priprava oligonukleotidnih začetnikov	26
3.4.3.	Priprava reakcijske mešanice za reakcijo qPCR	27
3.4.4.	Določanje natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB (ponovljivost v seriji in med serijami meritev)	28
3.4.5.	Določanje meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB	30
3.4.6.	Določanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR- ABL1/ABL1	31
3.4.7.	Primerjava metod RT-qPCR za določanje ravni izražanja gena BCR-ABL1 v levkocitih periferne krvi	33
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	Modifikacija metode določitve ravni izražanja gena BCR-ABL1	34
4.1.1.	Točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB	34
4.1.2.	Natančnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB (ponovljivost v seriji in med serijami meritev).....	37
4.1.3.	Analizna občutljivost	37

4.1.4. Ugotavljanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1 v visokem območju	38
4.1.5. Obseg poročanja rezultatov (reportable range)	42
4.1.6. Primerjava metod RT-qPCR za določanje ravni izražanja gena BCR-ABL1 v levkocitih periferne krvi	42
5. RAZPRAVA	48
6. SKLEP	51
7. LITERATURA	52
8. PRILOGE	56

Slika 1: Recipročna translokacija t(9;22)(q34;q11) in nastanek Philadelphia kromosoma; prirejeno po [4].	1
Slika 2: BCR gen in prelomne točke; prirejeno po [6].	2
Slika 3: ABL gen in prelomne točke; prirejeno po [6].	2
Slika 4: Struktura mRNA pri različnih fuzijskih prepisih BCR-ABL1; prirejeno po [6].	3
Slika 5: Pomik v levo in mieloblast; prirejeno po [9].	3
Slika 6: Kemijska struktura imatiniba, nilotiniba in dasatiniba [20].....	7
Slika 7: Algoritem zdravljenja kronične mieloične levkemije; prirejeno po [20].....	8
Slika 8: Definicije odgovora na prvo zdravljenje kronične mieloične levkemije z inhibitorji tirozin kinaze [19].....	10
Slika 9: Princip detekcije qPCR s Taqman sondami in Taq polimerazo; prirejeno po [29]. R – reporter, Q – quencher).....	12
Slika 10: Primerjava RT-qPCR v enem in v dveh korakih; prirejeno po [26]. RT – reverzna transkriptaza. DNA Pol – DNA polimeraza	13
Slika 11: Primerjava linearnosti RT-qPCR metode za določanje BCR-ABL1 ob uporabi različnih referenčnih genov; prirejeno po [32].	15

Slika 12: Postopek analize za določanje zlitega gena BCR-ABL1 pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo; pritejeno po [32]. ..	16
Slika 13: Shema določitve meje zaznave; pritejeno po [26,32]	30
Slika 14: Shema redčenja kontrolnega materiala	31
Slika 15: Prikaz korelacije za metodo RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2	36
Slika 16: Prikaz korelacije za metodo RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2	36
Slika 17: Graf linearne regresije -log10 razmerja BCR-ABL1/GUSB testne metode in -log10 razmerja referenčne metode BCR-ABL1/ABL1	45
Slika 18: Graf Bland-Altman.....	46
Tabela I: Laboratorijski rezultati pri kronični mieloični levkemiji; povzeto po [1].....	4
Tabela II: Kriteriji za razvrstitev kronične mieloične levkemije v posamezno obdobje; pritejeno po [11, 13].	5
Tabela III: Klasifikacijski sistemi in izračun relativnega tveganja; pritejeno po [11,15,16,17].	6
Tabela IV: Primerjava RT-qPCR v enem in v dveh korakih; povzeto po [26].	13
Tabela V: Minimalno število kopij ABL1 in GUSB referenčnih genov za globok molekularni odziv; povzeto po [35].....	16
Tabela VI: Imena in sekvene oligonukleotidnih začetnikov in sond [Eurofins Genomics]	21
Tabela VII: Koncentracije standardnih raztopin plazmidov.....	21
Tabela VIII: Priprava reakcijske mešanice za sintezo cDNA	26
Tabela IX: PCR pogoji za sintezo cDNA	26
Tabela X: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena BCR-ABL1 (pri referenčnem genu GUSB)	27

Tabela XI: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja referenčnega gena GUSB	27
Tabela XII: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena BCR-ABL1 (pri referenčnem genu ABL1)	28
Tabela XIII: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja referenčnega gena ABL1.....	28
Tabela XIV: Shema pipetiranja pri določanju ponovljivosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate.....	29
Tabela XV: Pogoji pomnoževanja za BCR-ABL1 na aparatu PCR ViiA 7	29
Tabela XVI: Shema pipetiranja za določitev meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate.....	31
Tabela XVII: Shema pipetiranja za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate.....	32
Tabela XVIII: Shema pipetiranja vzorcev bolnikov za RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate	33
Tabela XIX: Ocena biasa, nenatančnosti in celokupne napake metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2.....	34
Tabela XX: Ocena biasa, nenatančnosti in celokupne napake metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2.....	34
Tabela XXI: Rezultati določitve fuzijskega prepisa BCR-ABL1 pri bolnikih s KML	43
Tabela XXII: Podatki za izračun točnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2.....	56
Tabela XXIII: Podatki za izračun točnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2.....	57
Tabela XXIV: Podatki za določitev natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za ponovljivost v seriji meritev	57

Tabela XXV: Podatki za določitev natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za ponovljivost med serijami meritev	58
Tabela XXVI: Podatki za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1	59
Tabela XXVII: Podatki za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB ...	60
Graf 1: Linearna regresija za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2	35
Graf 2: Linearna regresija za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2	35
Graf 3: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2	39
Graf 4: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2	39
Graf 5: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e13a2	40
Graf 6: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e14a2	40
Graf 7: Primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2	41
Graf 8: Primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2	41

POVZETEK

Kronična mieloična levkemija je maligna bolezen krvotvorne matične celice, ki jo uvrščamo med mieloproliferativne novotvorbe. Opredeljuje jo kromosom Philadelphia (translokacija med kromosomoma 9 in 22) in zliti gen *BCR-ABL1*. Le-ta in njegov produkt protein BCR-ABL1 nam omogočata spremljanje učinkovitosti zdravljenja bolnikov.

Obratno prepisovanje RNA in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem čas (RT-qPCR) je najpomembnejša metoda za določitev BCR-ABL1 produkta. Izrazimo ga z razmerjem med številom kopij cDNA segmenta BCR-ABL1 in številom kopij cDNA segmenta referenčnega gena, običajno gena *ABL1*, določenih z RT-qPCR.

Namen našega dela je bil vpeljati kvantitativno metodo določanja ravni izražanja gena *BCR-ABL1*, z uporabo novega referenčnega gena *GUSB*. To metodo smo primerjali z obstoječo, kjer uporabljamo referenčni gen *ABL1*.

Naši hipotezi sta bili, da je metoda BCR-ABL1 RT-qPCR z uporabo referenčnega gena *GUSB* linearja v območju izražanja molekularnega produkta nad 10% na mednarodnem merilu, v območju izražanja molekularnega produkta pod 10% na mednarodnem merilu pa je primerljiva z obstoječo metodo, kjer kot referenčni gen uporabljamo gen *ABL1*.

Metodi smo določili natančnost, ter mejo zaznave. Koeficient variacije pri določanju razmerja BCR-ABL1/GUSB v seriji meritev za prepisa e13a2 in e14a2 je bil največ 17,547%, med serijami meritev pa največ 29,742%. Natančnost metode je primerljiva s podatki iz literature (koeficient variacije pod 30%). Meja zaznave je ena levkemična BCR-ABL1 pozitivna celica med 100.000 BCR-ABL1 negativnimi celicami.

Rezultati linearnosti nove in obstoječe metode so pokazali naslednje: nova metoda je linearja v celotnem območju merjenja (od 10^0 do 10^{-6}), determinacijski koeficient ustrezza priporočilom iz literature in znaša nad 0,98, obstoječa metoda pa tem kriterijem ne zadošča v celotnem merilnem območju. Pearsonov korelacijski koeficient med novo in obstoječo metodo je bil 0,9736, kar kaže na to, da sta metodi primerljivi v območju izražanja molekularnega produkta pod 10% na mednarodnem merilu. Obstojec in novo metodo smo primerjali z Bland-Altman analizo, korelacijo in linearno regresijo, kar nam je omogočilo pridobitev preliminarne konverzijске faktorja, ki znaša 0,4835. Preverili smo ujemanje podatkov po pretvorbi rezultatov obeh metod na mednarodno merilo, ki je bilo sprejemljivo.

Menimo, da je nova metoda BCR-ABL1/GUSB RT-qPCR linearna tudi v območju izražanja molekularnega produkta nad 10% na mednarodnem merilu, in da je primerljiva z obstoječo metodo BCR-ABL1/ABL1 RT-qPCR v območju izražanja molekularnega produkta pod 10% na mednarodnem merilu. Nova metoda je primerna za redno uporabo v laboratoriju pod pogojem, da zanjo pridobimo veljaven konverzijski faktor.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells, and is classified as mieloproliferative neoplasm. It is defined by Philadelphia chromosome (translocation between chromosomes 9 and 22) and fusion gene *BCR-ABL1*. *BCR-ABL1* gene and its product BCR-ABL1 protein allow us to monitor the effectiveness of treatment.

Reverse transcription of RNA and real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the most important method for detection of BCR-ABL1 product. It is expressed by the ratio of number of copies of cDNA segment of BCR-ABL1 and number of copies of cDNA segment of reference gene, normally *ABL1*, detected with RT-qPCR.

The purpose of our work was to implement a quantitative method of detection of *BCR-ABL1* level expression, using a new reference gene *GUSB*. We compared this method to already existing one, where the reference gene is *ABL1*.

Our hypotheses were, that the BCR-ABL1 RT-qPCR method using reference gene *GUSB* is linear in range above 10% of expression level of molecular product on International scale, in range under 10% of expression level of molecular product on International scale is comparable to already existing method, where the reference gene is *ABL1*.

We determined precision and limit of detection for the method. Coefficient of variation in detection of BCR-ABL1/GUSB ratio in within run precision for e13a2 and e14a2 transcripts was maximum of 17,547%, and in between run precision for e13a2 and e14a2 transcripts maximum of 29,742%. Precision of the method is comparable to literature data (coefficient of variation less than 30%). Limit of detection is one leukemic BCR-ABL1 positive cell in 100.000 BCR-ABL1 negative cells.

Results of linearity of new and existing method showed next: new method is linear in whole range of measurement (from 10^0 to 10^{-6}), the determination coefficient corresponds with the recommendations in literature and is more than 0,98, and the existing method does not correspond with these recommendations in the whole range of measurement. Pearson's coefficient of correlation between new and existing method was 0,9736, which shows, that the two methods are comparable under 10% of expression level of molecular product on International scale. We compared the existing and the new method using Bland-Altman analysis, correlation and linear regression, which allowed us to obtain preliminar conversion factor, that is 0,4835. We checked the matching of data after transformation of results obtained in both methods to International scale. The matching was acceptable.

We think, that the new method BCR-ABL1/GUSB RT-qPCR is linear in range above 10% of expression level of molecular product on International scale, and is also comparable to existign method BCR-ABL1/ABL1 RT-qPCR in range under 10% of expression level of molecular product on Internationa scale. New method is suitable for regular use in laboratory, under condition that the valid conversion factor is obtained.

KLJUČNE BESEDE

Fuzijski prepis BCR-ABL1,

kronična mieloična levkemija,

primerjava dveh metod,

nilotinib,

translokacija.

KEY WORDS

Chronic myeloid leukemia,

fusion transcript BCR-ABL1,

comparison of two methods,

nilotinib,

translocation.

SEZNAM OKRAJŠAV

KML (CML) – chronic myeloid leukemia – kronična mieloična levkemija

Ph - Philadelphia kromosom

BCR-ABL1 – fuzijski onkogen, ki nastane pri recipročni translokaciji med daljšima ročicama kromosomov 9 in 22, tudi protein

BCR– breakpoint cluster region protein

ABL1 – Abelsonov virusni onkogen mišje levkemije

M-bcr – major breakpoint cluster region – velika prelomna regija

m-bcr – minor breakpoint cluster region – manjša prelomna regija

μ-bcr – micro breakpoint cluster region – mikroprelomna regija

e13a2 – fuzijski prepis velikosti 210kDa

e14a2 – fuzijski prepis velikosti 210kDa

ALL– akutna limfocitna levkemija

FISH– fluorescentna in situ hibridizacija

mRNA – messenger RNA – sporočilna ribonukleinska kislina

RT-qPCR- kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času z reverzno transkriptazo

INF-α– interferon alfa

TKI – inhibitor tirozin kinaze

aloPKMC – alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic

HLA – human leukocyte antigen – humani levkocitni antigen

KMC – krvotvorna matična celica

TK – tirozin-kinaza

ATP – adenozin trifosfat

PHO – popoln hematološki odgovor

MolO– molekularni odgovor

IS – International scale – mednarodno merilo

MMR – glavni molekularni odgovor

MR – molekularni odgovor

RNA – ribonukleinska kislina

DNA – deoksiribonukleinska kislina

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina

Taq polimeraza – polimeraza, pridobljena iz organizma *Thermus aquaticus*

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

RT – reverzna transkriptaza

GUSB – glukuronidaza beta

LOD – limit of detection – meja zaznave

LOQ – limit of quantification – meja kvantifikacije

Cq – cikel kvantifikacije

KV (CV) – koeficient variacije

R² – determinacijski koeficient

TEa – celokupna analitična napaka

CNa95 – 95% interval zaupanja za celokupno analitično napako

KCNa% – koeficient variacije v odstotkih celokupne analitične napake

CI – confidence interval – interval zaupanja

KF – konverzijski faktor

1. UVOD

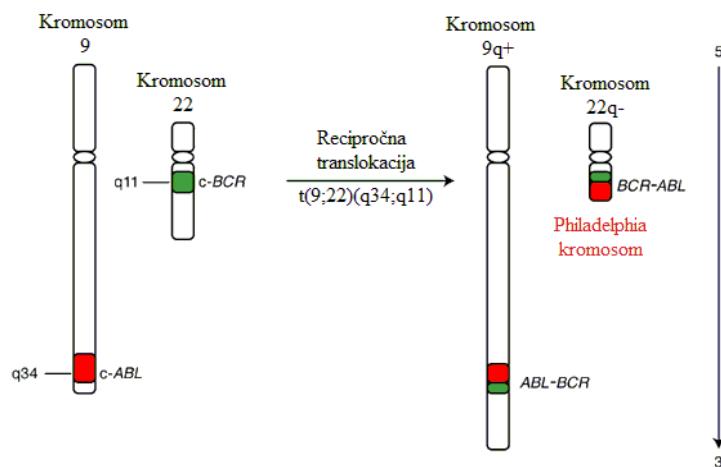
1.1. KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

Kronična mieloična levkemija (KML) je maligna klonska novotvorba krvotvorne matične celice in jo uvrščamo med mieloproliferativne bolezni. Na leto odkrijejo 1-2 bolnika/100.000 prebivalcev, v Sloveniji pa je incidenca nekoliko nižja, približno 0,75 bolnika/100.000 prebivalcev (t.j. 12-20 bolnikov na leto) in predstavlja 15-20% vseh levkemij. Povprečna starost ob postavitvi diagnoze je med 50 in 60 let, pri otrocih pa se pojavlja zelo redko. KML se pogosteje pojavlja pri moških [1,2].

Vzroka za nastanek bolezni ne poznamo, edini znani dejavnik tveganja za pojav KML je obsevanje z ionizirajočimi žarki. Do sedaj še ni znana povezava med nastankom KML in družinsko nagnjenostjo, vplivi okolja, raso ali ekonomskimi razmerami [1].

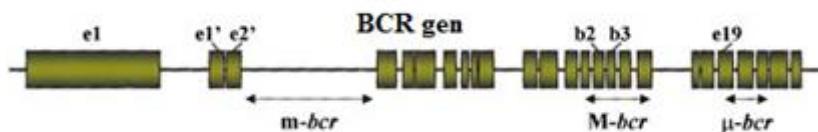
1.1.1. Philadelphia kromosom in njegovi produkti

Nowell in Hungerford sta leta 1960 v levkocitih bolnikov s KML opazila nenormalen krajši kromosom 22, ki so ga poimenovali Philadelphia kromosom (Ph kromosom). Ph kromosom se ni pojavljal v normalnih levkocitih, zato so ga povezali s pojavom raka. Tako je Ph kromosom prva dokumentirana kromosomska abnormalnost, ki je povezana z nastankom raka, ni pa bilo jasno, ali je Ph kromosom vzrok za KML ali njena posledica [3]. Kasneje je Rowley kromosomska abnormalnost Ph kromosom opisala kot posledico recipročne translokacije med daljšima ročicama kromosomov 9 in 22 [$t(9;22)(q34;q11)$], ki je prikazana na sliki 1. Zaradi omenjene translokacije nastane na Ph kromosому fuzijski gen *BCR-ABL* [4].



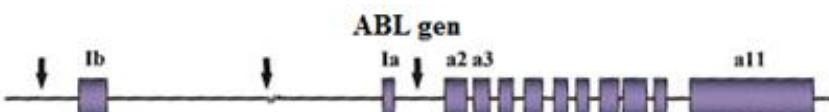
Slika 1: Recipročna translokacija $t(9;22)(q34;q11)$ in nastanek Philadelphia kromosoma; pritejeno po [4].

Pri translokaciji se *BCR* gen prelomi v področju 22q11, najpogosteje na eni od treh prelomnih regij. Prva prelomna regija je večja prelomna regija (major breakpoint cluster region, M-bcr), ki obsega eksone 12 do 16 (prvotno označeni od b1-b5). Zaradi alternativnega izrezovanja eksonov, pri katerem se odstranijo ABL eksoni Ib, Ia in 1, nastaneta fuzijska prepisa e13a2 ali e14a2, iz katerih v procesu translacije nastane 210kDa velik protein p210^{BCR-ABL1}. Druga prelomna regija je manjša prelomna regija (minor breakpoint cluster region, m-bcr), kjer se prelom zgoditi znotraj introna 1, in katere produkt je fuzijski prepis e1a2 in posledično 190kDa velik protein p190^{BCR-ABL1}, ki se sicer pogosteje pojavlja pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo (ALL), redko pa ga opazimo pri bolnikih s KML. Tretja prelomna regija je mikroprelomna regija (micro breakpoint cluster region, μ-bcr), ki obsega eksone 19 do 21, in katere produkt je 230kDa velik protein p230^{BCR-ABL1}, ki ga povezujemo s kronično nevtrofilno levkemijo, pojavlja pa se tudi v nekaj primerih KML [4, 5]. Vse tri prelomne regije na *BCR* genu so prikazane na sliki 2.



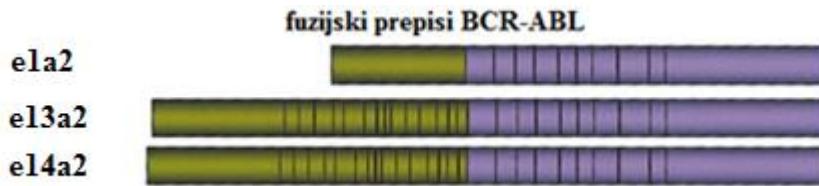
Slika 2: *BCR* gen in prelomne točke; povezano po [6].

Prelom znotraj *ABL* gena v področju 9q34 se lahko zgoditi kjerkoli na 5' koncu gena, in sicer pred prvim alternativnim eksonom Ib, naprej od drugega alternativnega eksona Ia, najpogosteje pa pride do preloma med obema alternativnima kromosomoma [6]. Prelomne točke znotraj *ABL* gena so s puščicami prikazane na sliki 3.



Slika 3: *ABL* gen in prelomne točke; povezano po [6].

Pri translokaciji kot produkt Philadelphia kromosoma nastane molekula mRNA, v kateri so BCR sekvene pripete na ABL ekson a2. V himernem proteinu BCR-ABL1 je del, ki ga prispeva ABL, dokaj konstanten in verjetno prispeva k transformaciji celic, medtem ko je del, ki ga prispeva BCR, lahko različno velik. Različna dolžina BCR sekvenec pa verjetno vpliva na fenotip bolezni [6]. Na sliki 4 so prikazane strukture mRNA, ki se najpogosteje pojavljajo pri KML in so posledica translokacije t(9;22)(q34;q11).

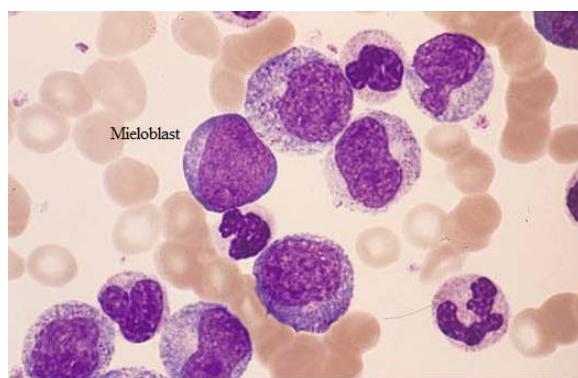


Slika 4: Struktura mRNA pri različnih fuzijskih prepisih BCR-ABL1; pritejeno po [6].

BCR-ABL1 protein, ki je produkt fuzijskega gena, ima zaradi prisotnosti tirozin kinazne domene na ABL delu proteina kontinuirano tirozin kinazno aktivnost, ki vzdržuje aktivirano pot celične delitve [3]. BCR-ABL1 verjetno vpliva na od citokinov odvisne mehanizme celične signalizacije, s čimer prispeva k nenormalnemu preživetju in proliferaciji celic kljub odsotnosti fizioloških stimulusov [4,7].

1.1.2. Klinična slika pri kronični mieloični levkemiji

Bolezen naravno poteka 3-5 let in gre skozi tri različna obdobja: skozi kronično obdobje, v katerem odkrijemo večino bolnikov, skozi pospešeno obdobje in skozi blastno preobrazbo [1]. Bolnike s KML pogosto odkrijemo naključno ob pregledu krvne slike. 20-50% bolnikov je ob diagnozi popolnoma asimptomatskih. Pri pregledu periferne krvne slike zasledimo levkocitozo, kjer prevladujejo mielociti in zreli nevtrofilni granulociti, prisotne pa so tudi druge stopnje dozorevanja levkocitov vse do mieloblasta [8]. Slika 5 prikazuje pomik v levo v granulocitni celični vrsti, prisoten pa je tudi mieloblast, ki se nahaja na sredini slike.



Slika 5: Pomik v levo in mieloblast; pritejeno po [9].

Prisotne so lahko tudi eozinofilija, bazofilija, trombocitoza in anemija. Posamezni granulociti so lahko hipersegmentirani, vendar pa se ta sprememba pojavi šele v napredovali bolezni [9]. Simptomi se pojavijo navadno ob napredovanju bolezni in so povezani z oslabljenim imunskim sistemom. Pojavi se nočno znojenje, popoldanske vročine, hujšanje, tiščanje v trebuhi, anemija, motnje vida, glavobol, zaradi motenj v delovanju trombocitov pa bolniki lahko pogosteje tudi krvavijo [1,10]. Vranica se lahko poveča do te mere, da jo bolniki sami zatipljejo, medtem ko jetra navadno niso povečana oziroma so zmerno

povečana [8]. Bolezen iz kroničnega obdobja napreduje v pospešeno obdobje oziroma v napredovalo obliko bolezni, ki jo definira prisotnost 15-19% blastov v periferni krvi ali v kostnem mozgu. Prisotnih pa mora biti tudi vsaj 20% bazofilnih granulocitov v krvi in trombocitopenija, ki ni posledica zdravljenja [8]. Pospešeno obdobje napreduje naprej v blastno preobrazbo, to je stanje enako akutni levkemiji, pri kateri je prisotnih najmanj 30% blastov v periferni krvi ali v kostnem mozgu. Če se KML preobrazi v akutno mieloblastno levkemijo, bolezen traja največ šest mesecev, če pa se preobrazi v akutno limfoblastno levkemijo, pa deset mesecev. Bolniki po blastni preobrazbi najpogosteje umrejo zaradi okužbe ali krvavitev [1].

1.1.3. Diagnoza kronične mieloične levkemije

Če bolezen odkrijemo v kroničnem obdobju, pri kliničnem pregledu ni nobenih posebnosti. Odkrijemo lahko le rahlo povečano vranico. Za potrditev diagnoze je potrebno narediti naslednje laboratorijske preiskave: celotna krvna slika, punkcija in biopsija kostnega mozga za citološki in histološki pregled, dokaz prisotnosti Philadelphia kromosoma (Ph) oziroma njegovega produkta in zliti gen *BCR-ABL1* [1,11]. V tabeli I so zbrani laboratorijski rezultati, ki kažejo na KML.

Tabela I: Laboratorijski rezultati pri kronični mieloični levkemiji; povzeto po [1]

	Rezultat	Opombe
št. levkocitov v periferni krvi	50-200x10 ⁹ /L	zreli nevtrofilci, pomik v levo, manj kot 20% mieloblastov in promielocitov v periferni krvi, eozinofilija, bazofilija
anemija	normocitna, normokromna	zmanjšana eritropoeza
št. trombocitov	lahko povečano	funkcija ni normalna
kostni mozeg	velika gostota celic, maloštevilni eritroblasti, v blastni preobrazbi več kot 20% levkemičnih blastnih celic, ni Auerjevih paličic	razrast celic granulocitne vrste, granulociti:eritroblasti = 10:1 – 50:1

S citogenetsko preiskavo kostnega mozga (kariogram) Ph kromosom dokažemo pri 90 – 95% bolnikov s KML, pri ostalih 10 – 5% pa lahko Ph kromosom dokažemo s fluorescentno in situ hibridizacijo (FISH) ali pa z dokazovanjem prepisa BCR-ABL1 (mRNA) z metodo obratnega prepisovanja in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) [8,12].

1.1.4. Diferencialna diagnoza kronične mieloične levkemije

Povečano število levkocitov lahko v krvi detektiramo tudi pri zdravih ljudeh in pri hudih kadilcih. Povišanje ni tako visoko kot pri KML, prav tako ni prisotnih nezrelih oblik granulocitov in Ph kromosoma. Diferencialna diagnoza je pomembna za ločitev bolezni in stanj, pri katerih sta klinična in laboratorijska slika podobni kot pri KML. Med te bolezni in stanja spadajo okužbe, obsežnejše krvavitve, kronična eozinofilna levkemija, kronična nevtrofilna levkemija, ostale mieloproliferativne bolezni in akutna levkemija. Pri akutni levkemiji vranica ni tako povečana, v periferni krvi pa ne zasledimo pomika v levo, eozinofilije in bazofilije. Za diferencialno diagnostiko so najpomembnejše citogenetične in molekularno genetične preiskave celic kostnega mozga [1].

1.1.5. Obdobje bolezni in prognoza

Ob diagnozi KML je potrebna opredelitev, v katerem obdobju bolezen je. Glede na laboratorijske rezultate se bolezen uvrsti v eno od treh obdobij: kronično obdobje, pospešeno obdobje ali blastna preobrazba [11]. V tabeli II so povzeti kriteriji za posamezno obdobje.

Tabela II: Kriteriji za razvrstitev kronične mieloične levkemije v posamezno obdobje; prirejeno po [11, 13].

Kronično obdobje	Pospešeno obdobje	Blastna preobrazba
noben od kriterijev za pospešeno obdobje ali blastno preobrazbo	10-19% blastov v krvi ali v kostnem mozgu. >20% bazofilcev v krvi in/ali kostnem mozgu. Trombocitopenija $<100 \times 10^9/L$, ki ni povezana z zdravljenjem. Trombocitoza $>1000 \times 10^9/L$, neodzivna na zdravljenje.	$\geq 20\%$ blastov v krvi ali v kostnem mozgu. Ekstramedularna proliferacija levkemičnih blastnih celic.

Obdobje, v katerem odkrijemo bolezen in jo začnemo zdraviti, je pomembno, saj imajo bolniki, ki jih odkrijemo v kroničnem obdobju pomembno daljše preživetje kot bolniki, pri katerih z zdravljenjem začnemo v napredovalem (pospešenem) obdobju. Preživetje je povezano s hematološkim, citogenetskim in molekularnim odgovorom ter stopnjo odgovora na zdravljenje. Boljši ko je odgovor, ki ga dosežemo v določenem obdobju, daljše je preživetje brez bolezni [11]. Umrljivost bolnikov, ki jih odkrijemo in zdravimo v kroničnem obdobju bolezni, je relativno nizka (5 – 10% v prvem letu po postavitvi diagnoze), v obdobju od tretjega do petega leta pa se poviša na 23 – 28% [14]. Bolnike lahko glede na prognostični sistem razvrstimo v rizične skupine, ki so definirane s karakteristikami, značilnimi za

bolezen [15]. Leta 1984 je bila predstavljena Sokalova klasifikacija, ki temelji na razvrščanju bolnikov na podlagi standardne kemoterapije z uporabo busulfana in hidroksiuree. 14 let kasneje je v uporabo prišla Hasfordova klasifikacija, katere osnova je zdravljenje z interferonom. Pred kratkim (leta 2011) pa je EUTOS (European Treatment and Outcome Study) predstavil še tretjo klasifikacijo, ki temelji na uporabi prve generacije zaviralcev tirozin kinaze, in sicer imatiniba [11,15]. V tabeli III so povzete karakteristike za posamezno klasifikacijo in izračun relativnega tveganja.

Tabela III: Klasifikacijski sistemi in izračun relativnega tveganja; povezano po [11,15,16,17].

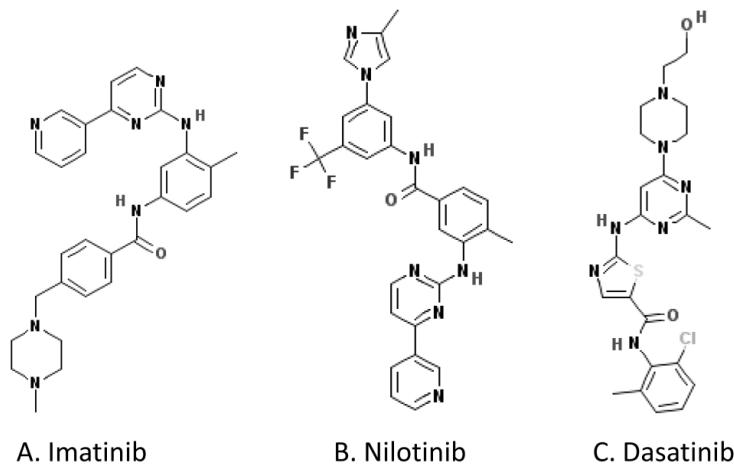
	Sokal (1984)	Hasford (1998)	EUTOS (2011)
Prevladajoče zdravljenje	Standardna kemoterapija	Interferon- α	Imatinib
Faktorji	Starost Velikost vranice Število trombocitov Odstotek blastov	Starost Velikost vranice Število trombocitov Odstotek blastov Odstotek bazofilcev Odstotek eozinofilcev	Velikost vranice Število bazofilcev
Izračun ocene tveganja	$0,116 \times (\text{starost}-43,4) + 0,0345 \times (\text{velikost vranice} - 7,51\text{cm}) + 0,188 \times [(\text{št. trombocitov}/700)^2 - 0,563] + 0,0887 \times (\% \text{ blastov} - 2,10)$	$0,666 \text{ pri starosti } <50 \text{ let} + 0,042 \times \text{velikost vranice} + 1,0956 \text{ pri št. trombocitov } \geq 1500 \times 10^9/\text{L} + 0,0584 \times \% \text{ blastov} + 0,20399 \text{ pri } >3\% \text{ bazofilcev} + 0,0413 \times \% \text{ eozinofilcev}$	$7 \times \text{št. bazofilcev} + 4 \times \text{velikost vranice}$
Rizična skupina	Visoko tveganje: $>1,2$ Srednje tveganje: $0,8 - 1,2$ Nizko tveganje: $<0,8$	Visoko tveganje: > 1480 Srednje tveganje: > 780 $\text{in } \leq 1480$ Nizko tveganje: ≤ 780	Visoko tveganje: > 87 Nizko tveganje: ≤ 87

1.1.6. Zdravljenje kronične mieloične levkemije

Začetki zdravljenja KML segajo daleč nazaj v leto 1865, ko je začel Thomas Fowler uporabljati arzenik z namenom izboljšanja kakovosti življenja bolnikov s KML. V začetku 19. stoletja se je zdravljenje usmerilo v obsevanje vranice, kasneje pa so v uporabo prišli še

benzen, uretan in levkofereza. Leta 1953 je David Galton prvič uporabil busulfan, alkilirajoče sredstvo, za katero se je kmalu pokazalo, da je mutagen, zato ga je zamenjala hidroksiurea, ki zmanjša sintezo deoksiribonukleotidov preko inhibicije ribonukleotidne reduktaze. Sredi 80. let prejšnjega stoletja je v uporabo prišel interferon alfa (INF- α), ki je bil v primerjavi z busulfanom in hidroksiureo učinkovitejši, izboljšano je bilo tudi preživetje bolnikov. V začetku 21. stoletja je v uporabo prišel imatinib, predstavnik prve generacije zaviralcev tirozin kinaze, ki je nadomestil IFN- α pri zdravljenju bolnikov v kroničnem obdobju bolezni. Imatinib se je ohranil kot prva izbira za zdravljenje KML, temu pa je sledil razvoj zdravil druge generacije zaviralcev tirozin kinaze (TKI) [18].

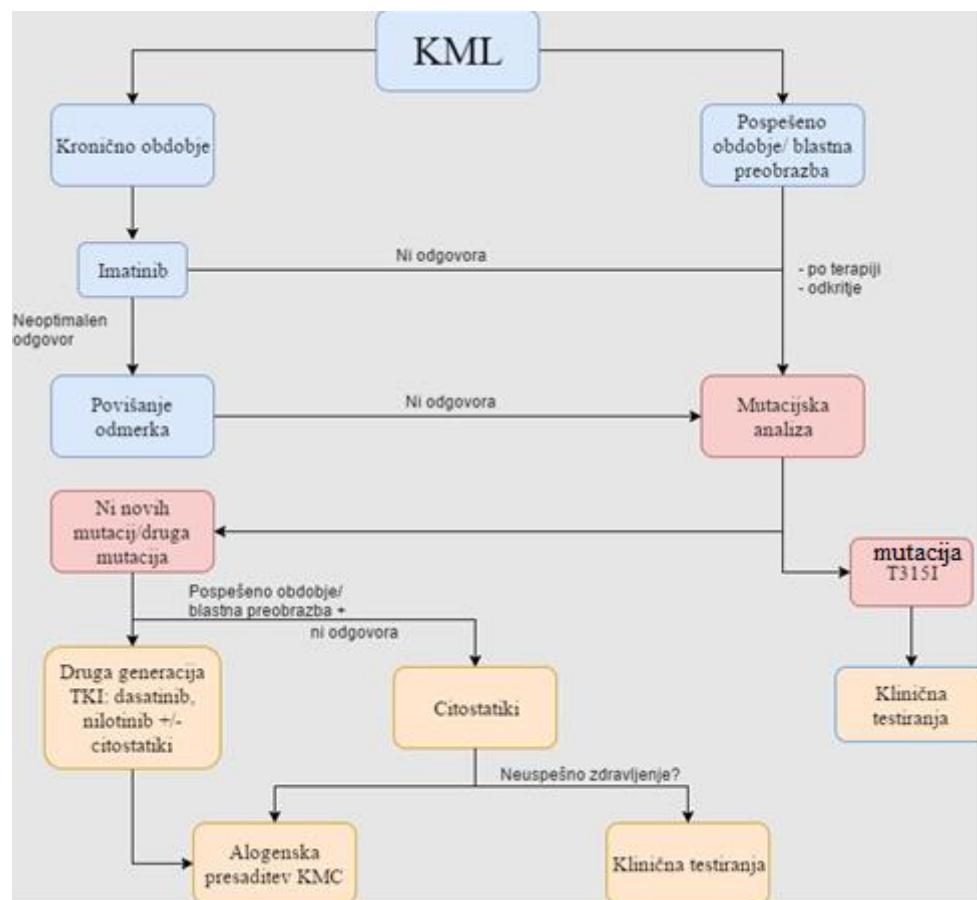
Pri bolnikih, ki jih odkrijemo v kroničnem in napredovalnem obdobju bolezni, se po evropskih priporočilih iz leta 2013 uporablja eden od treh TKI: imatinib 400mg/dan, nilotinib 300mg/12 ur ali dasatinib 100mg/dan. Uporabljajo se lahko standardni odmerki ali pa tudi višji, uporaba nižjih odmerkov pa ni priporočljiva, saj lahko pride do razvoja odpornosti na zdravilo [11,19]. V primeru, da bolnik ne prenaša predlaganih zdravil ali pa je razvil toleranco nanje, se lahko uporabi bosutinib 500mg/dan ali pa ponatinib 45mg/dan [19]. Na sliki 6 so prikazane kemijske strukture TKI prve in druge generacije.



Slika 6: Kemijska struktura imatiniba, nilotiniba in dasatiniba [20].

Busulfan, ki je bil v preteklosti dolgo časa v uporabi, se ne uporablja več, hidroksiurea pa se lahko uporabi samo za kratek čas, dokler ne potrdimo diagnoze in ne uvedemo TKI [19]. Alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC) je še vedno edini način zdravljenja, ki omogoča popolno ozdravitev, pomembna pa je pri bolnikih, ki se slabo odzivajo na zdravljenje s TKI, in pri otrocih s HLA identičnim sorodnim darovalcem KMC [1,19]. Če bolnika odkrijemo v napredovalnem obdobju bolezni ali v obdobju blastne

preobrazbe, poteka zdravljenje tako, da bolnik prejme enega od treh TKI v povečanem odmerku, in sicer imatinib 400mg/12 ur, nilotinib 400mg/12 ur ali dasatinib 70mg/12 ur ali 140mg/dan. V primeru, da bolniki v pospešenem obdobju ne dosežejo optimalnega odgovora na zdravljenje s TKI, je potrebno iskati darovalca KMC za aloPKMC. Bolnikom, ki jih odkrijemo v obdobju blastne preobrazbe, takoj po zadovoljivem odzivu na imatinib priključimo še standardno kemoterapijo za mieloblastno ali limfoblastno preobrazbo KML, čemur sledi aloPKMC [11,19]. AloPKMC je najučinkovitejša pri mlajših bolnikih, pri starejših pa se lahko opravi le v primeru, da najdemo ustreznega darovalca [21]. V primeru, da je bolnik iz kroničnega obdobja napredoval v pospešeno obdobje ali v obdobje blastne preobrazbe, pa je potrebno preveriti mutacijski status in ugotoviti, ali se je pojavila nova mutacija, zaradi katere je uporabljen TKI neučinkovit [19,22]. Slika 7 prikazuje algoritem zdravljenja KML.



Slika 7: Algoritem zdravljenja kronične mieloične levkemije; pritejeno po [20].

Imatinib, TKI prve generacije, deluje tako, da se umesti v aktivno mesto na tirozin kinaznem (TK) delu BCR-ABL1 proteina in s tem prepreči vstop ATP in posledično zavre fosforilacijo

in aktivacijo signalnih poti, ki so pomembne za delitev in proliferacijo celice. Rezultat vezave imatiniba na aktivno mesto TK je povečana apoptoza Ph+ celic pri KML [18].

1.1.7. Neželeni učinki zdravljenja kronične mieloične levkemije z inhibitorji tirozin kinaze

Pri zdravljenju KML s TKI se lahko pri bolnikih pojavijo različni neželeni učinki, ki lahko vplivajo na izbiro najustreznejšega zdravila. Neželene učinske lahko razvrstimo na dva načina. V prvem primeru jih razvrstimo glede na neželeni učinek, in sicer v tri skupine:

- glavni neželeni učinki se najpogosteje pojavijo že v prvi fazi zdravljenja in so obvladljivi, vendar pa je v primeru, da se pojavijo, potrebno znižati odmerek in začasno prekiniti z zdravljenjem. Prekinitev zdravljenja z zdravilom, ki povzroča glavne neželene učinke, je pri 10% bolnikov dokončna (potrebna je zamenjava zdravila);
- manjši neželeni učinki se lahko pojavijo že zelo zgodaj po uvedbi zdravljenja in lahko vztrajajo ves čas zdravljenja (postanejo kronični). V veliki večini so obvladljivi in vzdržljivi, vendar pa negativno vplivajo na kakovost življenja in so vzrok compliance in posledično tudi neuspeha zdravljenja;
- pozni neželeni učinki vplivajo na srčno-žilni sistem, na respiratorni sistem, na jetra, na trebušno slinavko, na imunski odziv in na metabolizem (glukoze, kalcija in lipidov) [23].

Druga razdelitev neželenih učinkov pri zdravljenju KML je na hematološke in na nehematološke neželene učinke. Med hematološke neželene učinke spadajo nevtropenija (št. nevtrofilcev $<1 \times 10^9/L$), trombocitopenija (št. trombocitov $<50 \times 10^9/L$) in anemija. Med nehematološke neželene učinke pa spadajo slabost, driske, zadrževanje vode (edemi, ascites), druge prebavne težave, mišični krči, izpuščaji, srbenje kože, utrujenost, zvišan bilirubin,...[19].

1.1.8. Odziv na zdravljenje kronične mieloične levkemije

Odziv na zdravljenje je najpomembnejši prognostični dejavnik bolezni. Do leta 2013 je bila definicija odgovora na zdravljenje omejena na zdravljenje z imatinibom, sedaj pa je odziv na zdravljenje opredeljen kot želena stopnja odgovora, ne glede na uporabljen TKI v prvi liniji zdravljenja in v drugi liniji zdravljenja, če je zdravljenje z imatinibom neuspešno [19,23]. Odziv na zdravljenje je lahko "ustrezen", "neuspešno", lahko pa ga opredelimo kot "opozorilo". Optimalni odgovor je povezan s preživetjem, ki ga lahko primerjamo z zdravo populacijo. Sprememba terapije v tem primeru ni potrebna. Neuspešno zdravljenje pa

pomeni, da trenutno zdravljenje ni ustrezno in lahko vodi v napredovanje bolezni in celo v smrt bolnika, zaradi česar je potrebno terapijo zamenjati. Opozorila so področje med ustreznim in neuspešnim odgovorom in pomenijo, da odziv ni optimalen. Zato je potrebno bolnika spremljati pogosteje, da lahko v primeru napredovanja bolezni pravi čas zamenjamo terapijo [23]. Na sliki 8 so zbrani kriteriji za posamezen odgovor na prvo zdravljenje KML s TKI.

ČAS	USTREZEN ODGOVOR	OPOZORILA	NEUSPEH
Ob diagnozi	-	Visoko rel. tveganje ali Klonske kromosomske nepravilnosti v Ph+ celicah	-
Po 3 mesecih	BCR-ABL1 ≤ 10% in/ali Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% in/ali Ph+ 36-95%	Ni PHO in/ali Ph+ >95%
Po 6 mesecih	BCR-ABL1 < 1% in/ali Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% in/ali Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 >10% In/ali Ph+ >35%
Po 12 mesecih	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	BCR-ABL1 > 0,1-1%	BCR-ABL1 >1% In/ali Ph+ > 0%
Potem in kadarkoli	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	Dodatne kromosomske nepravilnosti v Ph- celicah (-7, or 7q-)	Izguba PHO Izguba PCitO Potrjena izguba glavnega MolO Mutacije (npr: T315I) Klonske kromosomske nepravilnosti v Ph+ celicah

PHO=popolni hematološki odgovor, PCitO= popolni citogenetski odgovor, Glavni MolO=glavni molekularni odgovor

Slika 8: Definicije odgovora na prvo zdravljenje kronične mieloične levkemije z inhibitorji tirozin kinaze [19].

Raziskave, povezane z odzivom na zdravljenje, potekajo tudi v smeri raziskovanja zgodnjega odziva na zdravljenje, in sicer z merjenjem padca produkta BCR-ABL1 od diagnoze do treh mesecev od uvedbe TKI. Molekularni odgovor, ki ga določimo s količino produkta BCR-ABL1 na mednarodnem merilu IS (BCR-ABL1^{IS}), v določeni časovni točki (t.j. tri mesece po postavitvi diagnoze) je pomemben prognostični dejavnik. Bolniki, ki v prvih treh mesecih zdravljenja dosežejo raven prepisa <10% BCR-ABL1^{IS}, imajo verjetnost preživetja petih let višjo od 90% [13].

1.1.9. Spremljanje odziva na zdravljenje - monitoring

Odziv na zdravljenje oz. uspešnost zdravljenja spremljamo na treh nivojih:

- hematološki odgovor – prisotnost kliničnih znakov bolezni (pregled celotne krvne slike),
- citogenetski odgovor – prisotnost malignih celic s Ph kromosomom (citogenetska preiskava in FISH),

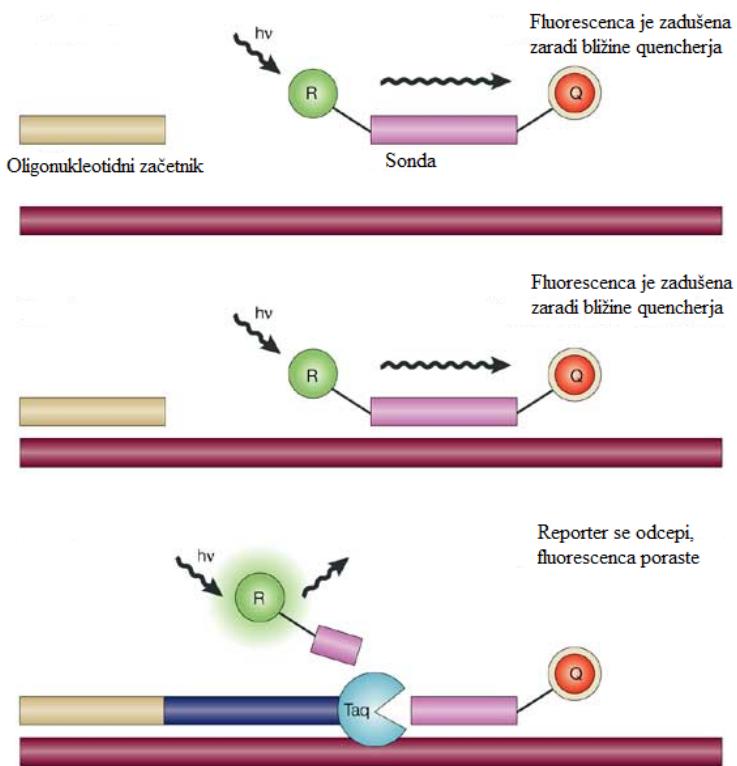
- molekularni odgovor –nivo izražanja zlitega gena *BCR-ABL1* (RT-qPCR) [5].

Odziv na zdravljenje ocenjujemo v treh, šestih in dvanajstih mesecih po uvedbi zdravljenja s TKI in je uspešno, kadar dosežemo popoln hematološki odgovor – PHO, ki je definiran kot odsotnost kliničnih znakov in sprememb v krvni sliki, ko s citogenetsko preiskavo v kostnem mozgu ne določimo več prisotnosti Ph+ celic, kar imenujemo popolni citogenetski odgovor, in ko dosežemo glavni molekularni odgovor – glavni MolO, kar pomeni, da se je število kopij gena BCR-ABL1 zmanjšalo za več kot 1000-krat od začetne standardne vrednosti [19]. RT-qPCR je najpomembnejša preiskava za spremljanje uspešnosti zdravljenja bolnikov s KML. Rezultati so izraženi kot odstotek razmerja števila kopij BCR-ABL1 in števila kopij referenčnega gena na mednarodnem desetiškem logaritemskem merilu (International scale – IS), kjer 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% in 0,001% ustreza zmanjšanju za 1, 2, 3, 4, 4,5 in 5 logaritmov pod začetno standardno vrednost, ki je bila določena v raziskavi IRIS. Začetna standardna vrednost predstavlja 100% [19,24,25]. Glavni MolO (tudi MMR) predstavlja zmanjšanje števila kopij prepisa BCR-ABL1 za 3 desetiške logaritme pod začetno vrednost ($MR^{3.0}$). Preverjanje molekularnega odgovora se izvaja na buffy-coatu, ki ga pridobimo iz najmanj 10mL periferne krvi. Merjenje odgovora na zdravljenje izvajamo vsake tri mesece, dokler ne dosežemo MMR ($MR^{3.0}$ ali bolje), potem pa vsake 3-6 mesecev [23].

1.2. KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU Z REVERZNO TRANSKRIPTAZO (RT-qPCR)

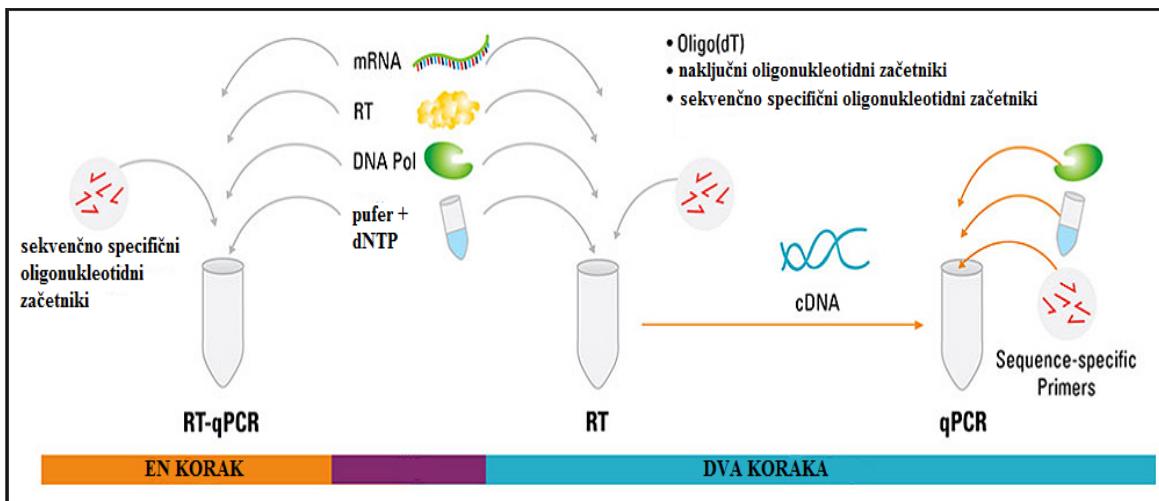
Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času z reverzno transkriptazo (RT-qPCR) je preiskava, ki jo uporabimo, kadar kot izhodni material za molekularno testiranje uporabimo RNA. Najprej se RNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza prepiše v komplementarno DNA (cDNA), ki jo potem uporabimo kot matrico za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). RT-qPCR je metoda, ki jo lahko uporabimo na različnih področjih, med drugim tudi za preverjanje izražanja genov, za validacijo RNA, za detekcijo patogenov, za gensko testiranje in pri raziskovanju bolezni [26]. Glavna razlika med klasičnim PCR in RT-qPCR je ta, da pri klasičnem PCR nastali produkt določamo po končani reakciji, pri RT-qPCR pa nastajanje produkta merimo v realnem času. Metoda RT-qPCR temelji na uporabi fluorescentnega barvila (fluorofora), ki ga dodamo v reakcijsko mešanico, jakost fluorescence pa se meri v vsakem ciklu reakcije. Fluorofor (reporter) je pripet na 5' konec oligonukleotidne sonde oz. probe, na 3' konec pa je pripet dušilec fluorescence (quencher). Za pomnoževanje se najpogosteje uporablja TaqMan sistem, ki

vsebuje Taq polimerazo z 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo, zaradi katere pride do hidrolize sonde in s tem do odcepitve reporterja in quencherja, zaradi česar jakost fluorescence poraste [27,28]. Na sliki 9 je prikazan mehanizem delovanja Taq sonde in Taq polimeraze.



Slika 9: Princip detekcije qPCR s Taqman sondami in Taq polimerazo; pritejeno po [29]. R – reporter, Q – kvencer

Uporaba sond omogoča večjo občutljivost in tudi izvajanje več reakcij hkrati (multiplex reakcije), če uporabimo več sond, ki imajo različne fluorofore [27]. RT-qPCR se lahko izvede v enem koraku ali pa v dveh, razlika pa je v tem, ali obratno prepisovanje RNA v cDNA izvedemo v isti mikrocentrifugirki in pufru kot pomnoževanje ali pa ta dva dela reakcije ločimo [26]. Na sliki 10 je shematsko prikazana razlika med RT-qPCR, izvedenem v enem koraku, in RT-qPCR, izvedenem v dveh korakih.



Slika 10: Primerjava RT-qPCR v enim in v dveh korakih; pritejeno po [26]. RT – reverzna transkriptaza. DNA Pol – DNA polimeraza

Uporaba posamezne izvedbe RT-qPCR ima svoje prednosti in slabosti, ki so opisane v tabeli IV.

Tabela IV: Primerjava RT-qPCR v enim in v dveh korakih; povzeto po [26].

	Prednosti	Slabosti
1 korak	<ul style="list-style-type: none"> - manj razlik med eksperimenti (uporaba 1 mikrocentrifugirke) - manjša možnost kontaminacije (manj korakov pipetiranja) - hitra, visoko ponovljiva metoda 	<ul style="list-style-type: none"> - ločena optimizacija obeh reakcij je nemogoča - manjša občutljivost kot pri metodi z 2 korakoma - detekcija manjšega števila tarčnih zaporedij
2 koraka	<ul style="list-style-type: none"> - pripravljeno cDNA lahko shranimo in uporabimo v več reakcijah - tarčne in referenčne gene lahko pomnožimo v enaki cDNA - optimiziramo lahko vse korake obeh reakcij - uporaba različnih začetnikov je mogoča 	<ul style="list-style-type: none"> - večja možnost kontaminacije zaradi uporabe več mikrocentrifugirk in večjega števila korakov pipetiranja - več optimizacije - dolgotrajna metoda

1.2.1. Kvantifikacija izražanja genov

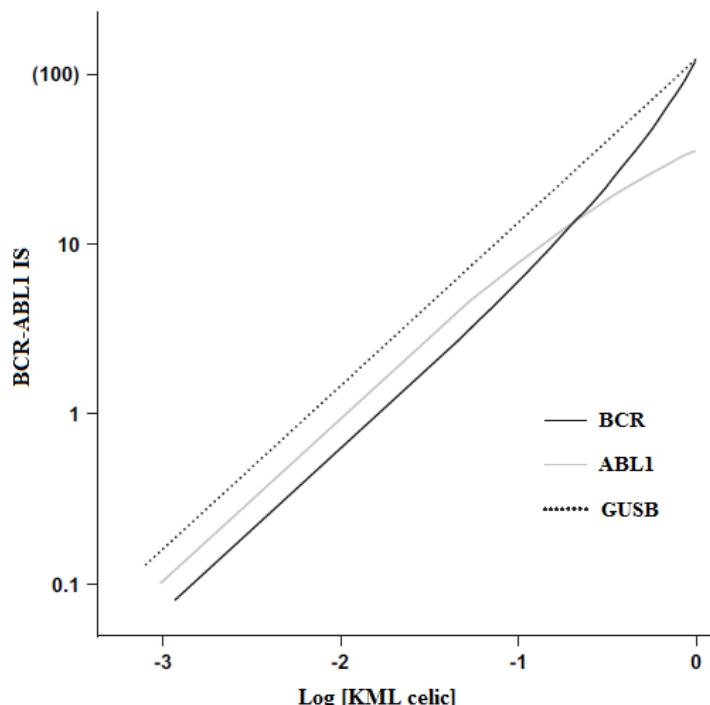
Izražanje genov lahko pri RT-qPCR kvantificiramo na dva načina: absolutno in relativno. V nadaljevanju je opisana absolutna kvantifikacija, ki smo jo uporabili pri našem delu. Absolutna kvantifikacija pomeni določitev absolutnega števila kopij na osnovi standardne

krivulje. Prednost standardnih krivulj je, da so visoko ponovljive, z njihovo pomočjo pa pridobimo visoko specifične, občutljive in ponovljive podatke. Za zanesljivost rezultata je potrebna natančna validacija metode. Pomembna je predvsem koncentracija standardov, ki mora biti vedno enaka. Razpon standardne krivulje je odvisen od uporabljenih standardov, razpon pa je lahko $<10^1$ do $>10^9$ molekul. Kot standardi se lahko uporabljajo različne molekule: rekombinantna plazmidna DNA, ki smo jo uporabili v naših analizah, genomska DNA, PCR produkt in komercialno sintetizirani oligonukleotidi [28,30]. Za kvantifikacijo uporabimo standarde v območju pričakovanih koncentracij v vzorcu. Po končani analizi se izršie graf odvisnosti Cq od log začetnega števila kopij, ki je premica in iz katerega odčitamo število kopij posameznih vzorcev na osnovi njihovih Cq. Cq predstavlja cikel, pri katerem vzorec doseže fluorescenčni prag. Največji problem pri absolutni kvantifikaciji je ta, da standarde uporabimo samo za qPCR del reakcije, za RT pa ne, zaradi česar bi lahko prišlo do variacije med standardom in vzorcem z neznanim številom prepisov gena. Temu se izognemo tako, da pred vpeljavo metode določimo natančnost (znotraj analizna variacija) in ponovljivost (med analizna variacija) [28].

1.2.2. RT-qPCR za določitev izražanja fuzijskega gena *BCR-ABL1*

RT-qPCR se pri bolnikih s KML uporablja za merjenje odziva na zdravljenje, saj omogoča določanje števila kopij prepisa fuzijskega gena *BCR-ABL1*, ki je pomemben za razvoj bolezni. Ker je rezultat izražen kot odstotek razmerja števila kopij *BCR-ABL1* in števila kopij referenčnega gena na mednarodnem desetiškem logaritemskem merilu, je potrebno pri RT-qPCR poleg merjenja števila kopij *BCR-ABL1* hkrati meriti tudi število kopij referenčnega gena. Idealen referenčni gen naj bi se enakomerno izražal v različnih vrstah celic, neodvisno od proliferacije. Izražanje naj bi bilo neobčutljivo na uporabo zdravil in enako med celotno populacijo, nivo izražanja pa naj bi bil podoben nivoju izražanja *BCR-ABL1* [31]. Gen, ki bi izpolnjeval vse te zahteve, žal ne obstaja oz. ga še ne poznamo, zato se moramo zadovoljiti z geni, ki jih imamo na voljo, pri tem pa se moramo zavedati njihovih pomanjkljivosti [32]. Priporočilo je, da se kot referenčni gen uporablja eden od treh genov: *ABL1*, *BCR* ali *GUSB*. Ti trije geni so pogosto uporabljeni, variacija nivoja izražanja znotraj populacije je majhna [33]. Najpogosteje se kot referenčni gen uporablja *ABL1*, vendar pa metoda pri visoki stopnji izražanja (pri velikem številu kopij prepisa) *BCR-ABL1* postane nelinearna, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Podobno se zgodi tudi pri uporabi *BCR* kot referenčnega gena. Pri uporabi *GUSB* kot referenčni gen pa je metoda linearna tudi pri visokem številu kopij prepisa *BCR-ABL1* [32]. Odziv na zdravljenje sicer

merimo po treh mesecih od začetka uvedbe TKI. Za uspešno zdravljenje velja, da je vrednost BCR-ABL1 pod ali enako 10% IS, to pa je že območje, na katerem je linearna tudi metoda, pri kateri se kot referenčni gen uporablja *ABL1* [31]. Za uspešno spremeljanje odziva na zdravljenje je potrebno uporabljati metodo, ki omogoča zanesljivo identifikacijo bolnikov, ki se na zdravljenje ne odzivajo [34]. Na sliki 11 je prikazana primerjava linearnosti metode ob uporabi *ABL1*, *BCR* in *GUSB* genov kot referenčnih genov pri RT-qPCR za določanje izražanja *BCR-ABL1*.



Slika 11: Primerjava linearnosti RT-qPCR metode za določanje BCR-ABL1 ob uporabi različnih referenčnih genov;
prirejeno po [32].

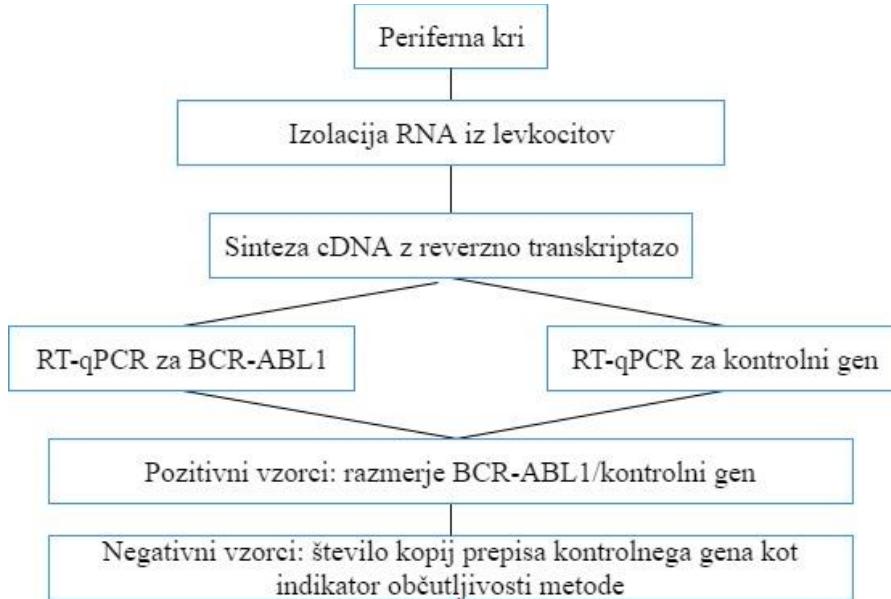
Ne glede na to, kateri referenčni gen uporabljamo, moramo biti pozorni na to, da pri določitvi dobimo primerne rezultate, ki so povezani z najmanjšim številom kopij prepisa referenčnega gena. Pri uporabi referenčnega gena *ABL1* moramo določiti najmanj 10.000 kopij prepisa, kar je ekvivalentno 24.000 kopijam prepisa pri uporabi *GUSB*. Število kopij prepisa referenčnega gena moramo meriti v enakem volumnu cDNA, kot merimo BCR-ABL1 [35]. V tabeli V so napisane zahteve glede minimalnega števila kopij posameznega referenčnega gena pri globokem molekularnem odzivu.

Tabela V: Minimalno število kopij *ABL1* in *GUSB* referenčnih genov za globok molekularni odziv; povzeto po [35].

	MR⁴	MR^{4,5}	MR⁵
Minimalno št. kopij prepisa referenčnega gena	10.000 <i>ABL1</i> 24.000 <i>GUSB</i>	32.000 <i>ABL1</i> 77.000 <i>GUSB</i>	100.000 <i>ABL1</i> 240.000 <i>GUSB</i>
BCR-ABL1 IS	≤0,01%	≤0,0032%	≤0,001%

1.2.3. Primerjava dveh metod RT-qPCR za merjenje BCR-ABL1 pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo

Ko želimo primerjati dve metodi, od katerih je ena že validirana in uspešno vpeljana v rutino, je potrebno validirati tudi drugo metodo. Izdelati moramo natančen načrt validacije, ki zajema vse postopke, ki so vključeni v pridobitev končnega rezultata [33]. Za analizo zlitega gena *BCR-ABL1* moramo iz periferne krvi izolirati levkocite, iz njih pa RNA, ki jo z reverzno transkriptazo prepišemo v cDNA. cDNA potem uporabimo v RT-qPCR za določitev števila kopij zlitega gena *BCR-ABL1*. Vsi ti koraki pomembno vplivajo na končni rezultat, zato jih je potrebno skrbno načrtovati in validirati [32]. Na sliki 12 so prikazani koraki analize fuzijskega prepisa BCR-ABL1.

**Slika 12: Postopek analize za določanje zlitega gena *BCR-ABL1* pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo; prirejeno po [32].**

Referenčni gen izberemo na podlagi že izvedenih studij in priporočil. *GUSB* naj bi bil kljub ne tako pogosti uporabi kot *ABL1* najprimernejši referenčni gen za določanje BCR-ABL1 pri bolnikih s KML [35].

Za izbran nov referenčni gen je potrebno uporabiti primerne standarde. V primeru, ko kot referenčni gen uporabimo *GUSB*, se za standarde priporoča ERM-AD623 plazmid, ki ga uporabimo direktno za kalibracijo metode [36]. Optimizirati moramo tudi količino vzorca, ki jo vnesemo v reakcijo, da dobimo najbolj optimalne rezultate. Količina vzorca mora biti taka, da je še vedno v linearinem dinamičnem območju metode [37]. Za primerjavo dveh metod je potrebno poznati oz. določiti tudi celokupno analizno napako (accuracy oz. natančnost metode), ki jo določimo tako, da izmerimo serijo kontrolnih vzorcev z različnimi koncentracijami in izračunamo koeficient variacije. Preciznost (precision) izmerimo z večkratnim merjenjem kontrolnih vzorcev z različnimi koncentracijami. Analizno občutljivost merimo s pomočjo meje zaznave (LOD – limit of detection) in meje kvantifikacije (LOQ – limit of quantification). LOD je najnižja vrednost analita v vzorcu, ki jo je z določeno zanesljivostjo mogoče razlikovati od vrednosti, ko je analit odsoten (t.j. od slepe vrednosti) [38]. Podatek o LOD dobimo tako, da upoštevamo zadnji pozitiven rezultat pri merjenju razredčenih kontrolnih vzorcev. LOQ pa sta najnižja in najvišja količina analita, ki jo lahko kvantitativno določimo s sprejemljivo celokupno napako [33]. Ko uspešno določimo vse parametre za novo metodo, lahko izvedemo primerjavo. Analiziramo iste vzorce, ki vsebujejo isto količino cDNA, nato pa podatke statistično primerjamo.

2. NAMEN IN CILJI

Določanje ravni izražanja fuzijskega gena *BCR-ABL1*z obratnim prepisovanjem in s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (RT-qPCR) je najpomembnejša preiskava za spremeljanje uspešnosti zdravljenja in ocene napovedi poteka bolezni kronične mieloične levkemije(KML) [1,3,4,19]. Raven izražanja gena *BCR-ABL1* predstavlja razmerje med številom kopij prepisa *BCR-ABL1* in številom kopij prepisa referenčnega gena (najpogosteje *ABL1*, *GUSB* ali *BCR*), določenega z RT-qPCR. Razmerje izrazimo kot delež oz. odstotek (%) na mednarodnem desetiškem logaritemskem merilu (International Scale, IS), kjer 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,0032 % in 0,001 % ustreza zmanjšanju za 1, 2, 3, 4, 4.5 in 5 logaritmov pod začetno standardno vrednost, ki so jo določili v raziskavi IRIS [24,25]. Odziv na zdravljenje ocenimo tri, šest in dvanaest mesecev od začetka zdravljenja z inhibitorjem tirozin kinaze (TKI). Menimo, da je zdravljenje KML s TKI uspešno, ko ni več kliničnih znakov in sprememb v krvni sliki (popolni hematološki odziv, PHO), ko s citogenetsko preiskavo v kostnem mozgu ne ugotovimo več celic Ph+ v (popolni citogenetski odziv) in ko se raven izražanja gena *BCR-ABL1* zmanjša za več kot 1000-krat od začetne standardne vrednosti, kar opredelimo kot glavni molekularni odgovor (glavni MolO). Nato učinek zdravljenja s TKI spremljamo s standardiziranim RT-qPCR na tri mesece iz vzorca periferne krvi vse do doseženega stabilnega glavnega MolO, nato pa na tri do šest mesecev [19,23]. V primeru rezistence na zdravljenje s TKI, poslabšanja (nepojasnena anemija, levkopenija in trombocitopenija) oz. napredovanja bolezni pa opravimo še dodatne preiskave, ki pripomorejo k razjasnitvi vzrokov takšnega stanja bolezni. Zadnje raziskave kažejo na to, da je lahko stopnja začetnega upada ravni izražanja gena *BCR-ABL1* po treh mesecih od uvedbe zdravljenja s TKI pomemben napovedni kazalec doseganja kasnejših optimalnih odzivov zdravljenja. Za ugotavljanje začetnega upada ravni izražanja gena *BCR-ABL1* uporabljam standardizirani RT-qPCR, kjer kot referenčni gen uporabljam *ABL1*, čeprav bi z uporabo referenčnega gena *GUSB* lahko zanesljiveje spremljali upad izražanja gena *BCR-ABL1* [39].

Hipoteze za delo so:

- Metoda RT-qPCR za določanje fuzijskega proteina BCR-ABL1 z uporabo referenčnega gena *GUSB* je linear na območju nad 10% IS.

- Metodi merjenja BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB dajeta pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo, ki imajo vrednost IS (%) BCR-ABL1/ABL1 manj kot 10%, primerljive rezultate.

Namen dela je:

- Uspešno modificirati obstoječo metodo za določanje fuzijskega prepisa BCR-ABL1 in določiti ustrezne pogoje reakcije. Do najbolj optimalnih pogojev bomo poskušali priti s poskušanjem.
- Določiti ponovljivost in linearost metode, ki ustreza priporočilom. Rezultate bomo pridobili z večkratnim izvajanjem analize in s statistično obdelavo podatkov.
- Določiti mejo zaznave modificirane metode, ki jo bomo določili s pomočjo različnih redčitev kontrolnega materiala.

Z uspešno modificirano metodo, pri kateri bi uporabili referenčni gen GUSB, bi lahko z večjo zanesljivostjo ugotavljali odziv na zdravljenje, saj je metoda linearna tudi pri višjih koncentracijah fuzijskega prepisa BCR-ABL1. Prav tako bi lahko uspešneje ločili med bolniki, ki se uspešno odzivajo na terapijo, in tistimi, ki so na terapijo neodzivni.

3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE

3.1.PREISKOVANCI

Pri delu smo uporabili vzorce 34 preiskovancev z diagnozo kronična mieloična levkemija. 20 bolnikov je bilo moškega spola, 14 pa ženskega. Povprečna starost preiskovancev moškega spola je bila 60 let (razpon 33 – 83 let), povprečna starost preiskovancev ženskega spola pa je bila 63 let (razpon 26 – 82 let). Vzorce smo izbrali tako, da je bila vrednost IS (%) za prepis BCR-ABL1/ABL1 manj kot 10%.

3.2.MATERIALI IN OPREMA

3.2.1. Reagenti

- sterilna RNaz in DNaz prosta voda,
- TaqManUniversal PCR mastermix II, kataloška številka 4440038 (AppliedBiosystems, ZDA),
- specifični oligonukleotidni začetniki in sonde (Eurofins Genomics, Nemčija)
- standardne raztopine plazmidov (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgija),
- kontrolni material Proficiency Panel for the BCR/ABL t(9;22) Translocation Assay (Invivoscribe, ZDA)
- reagenčni komplet SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, ZDA),
 - 10x SuperScript EnzymeMix,
 - 5x VILO™ ReactionMix.
- Trizol (Invitrogen, ZDA),
- kloroform,
- 100% in 75% etanol.

V tabeli VI so zapisana imena oligonukleotidnih začetnikov in sond skupaj s sekvenco, v tabeli VII pa so zapisana imena standardov in njihove koncentracije.

Tabela VI: Imena in sekvene oligonukleotidnih začetnikov in sond [Eurofins Genomics]

Številka	Ime oligonukleotidnega začetnika, sonde	Sekvenca ($5' \rightarrow 3'$)
1	ENP541	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA (25)
2	ENPr1142	CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA (26)
3	ENF501	TCCGCTGACCACATCAATAAGGA (21)
4	ENR561	CACTCAGACCCCTGAGGCTCAA (21)
5	ENF1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT (26)
6	ENR1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA (22)
7	ENF 1003	TGGAGATAACACTCTAACGCATAACTAAAGGT (31)
8	ENR 1061	CCATTGGTTGGGCTTCACACCATT (28)
9	ENP 1043	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA (21)

Tabela VII: Koncentracije standardnih raztopin plazmidov

Ime standarda	Koncentracija plazmida (število kopij/ μ L)
ERM®-AD623a	$1,08 \times 10^6$
ERM®-AD623b	$1,08 \times 10^5$
ERM®-AD623c	$1,03 \times 10^4$
ERM®-AD623d	$1,02 \times 10^3$
ERM®-AD623e	$1,04 \times 10^2$
ERM®-AD623f	10,0

Koncentracija plazmida v tabeli se nanaša na število kopij dvooverižnega standarda v raztopini, zato je potrebno pri analizi vzorcev enoverižne cDNA vrednosti pomnožiti z dva.

3.2.2. Oprema in materiali

- sterilne epruvete in mikrocentrifugirke (1,5 mL in 0,2 mL),
- nosilci za epruvete,
- mikrotitrske ploščice (AppliedBiosystems, ZDA),
- sterilna folija,

- sterilne pipete in nastavki za pipete,
- sterilne pincete,
- centrifuga HeraeusBiofuge Pico in Heraeus Biofuge 22 R HeraeusLabofuge 400,
- aparat ABI PRISM Viia7 Real-Time PCR System,
- aparature za PCR GeneAmp PCR System 9700, Veriti,
- orbitalni mešalniki (vorteksi),
- laminarne komore,
- hladilni blok,
- spektrofotometer UV/VIS Spectrofotometer Lambda Bio 20,
- digestorij DIG 12,
- termoblok TDB 120.

3.2.3. Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB smo uporabili programa Excel 2016 in MedCalc (verzija 17.8.6.). Najprej smo vse podatke vnesli v program Excel, v katerem smo izračunali razmerja BCR-ABL1/GUSB in srednje vrednosti (s pomočjo funkcije AVERAGE) razmerij, desetiški logaritem razmerij, standardno deviacijo (SD) logaritma razmerij po formuli STDEV, ki jo omogoča program Excel in bias. Standardni odklon (SD) okoli dobljene srednje vrednosti (povprečja) je nenatančnost oz. slučajna napaka (Random Error, RE), bias (odstopanje) pa je razlika med dobljeno srednjo vrednostjo zmanjšanja logaritma in pričakovanega zmanjšanja logaritma in predstavlja sistemsko napako (SE) analiznega postopka in predstavlja odmik (pozitiven ali negativen) rezultata od prave vrednosti. Po formuli $B = \frac{|SE|}{|RE|}$ smo izračunali faktor B, ki smo ga uporabili pri empiričnem izračunu faktorja F, ki smo ga potrebovali za izračun celokupne analitične napake (TEa). Faktor F smo izračunali po formuli

$$F = 1,96 - 1,029 * B + 1,219 * B^2 - 0,5936 * B^3 + 0,09046 * B^4.$$

Celokupno analitično napako (TEa) smo izračunali po formuli $TEa = bias \pm F * SD$.

KCNa%, koeficient variacije v odstotkih celokupne analitične napake smo izračunali z delitvijo celokupne analitične napake s pričakovano vrednostjo

$(KCNa\% = \left(\frac{TEa}{pričakovana\ vrednost} \right) * 100\%)$. Z uporabo programa Excel 2016 smo izračunali še CNa95, to je 95% interval zaupanja za celokupno analitično napako. CNa95 smo izračunali po formuli $CNa95 = 0,95 * TEa$. CNa95 kaže na to, kakšna spremembra v

logaritmu se lahko pričakuje glede na analitično variacijo. S pomočjo izračunanih podatkov smo v programu Excel 2016 izvedli še linearno regresijo, s pomočjo katere smo dobili tudi Pearsonov koeficient, ki meri moč linearne povezanosti med pričakovanimi in dobljenimi rezultati. Glede na dobljeno vrednost Pearsonovega koeficiente se določi, kakšna je moč linearne povezanosti med podatki, in sicer:

- 0,00 – 0,19 → zelo šibka linearna povezanost,
- 0,20 – 0,39 → šibka linearna povezanost,
- 0,40 – 0,59 → srednje močna linearna povezanost,
- 0,60 – 0,79 → močna linearna povezanost,
- 0,80 – 1,00 → zelo močna linearna povezanost [40].

Pri določanju natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB smo za vsak parameter v programu Excel 2016 določili srednjo vrednost (s pomočjo funkcije AVERAGE) in standardni odklon (SD) (s pomočjo funkcije STDEV) in iz teh podatkov po formuli

$$KV\% = \frac{SD}{srednja\ vrednost} * 100\% \text{ izračunali koeficiente variacije.}$$

Enak pristop in formule smo uporabili tudi pri statistični obdelavi podatkov, ki smo jih pridobili pri eksperimentu za ugotavljanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1 v visokem območju. S pomočjo programa Excel 2016 smo izračunane podatke uporabili za izris grafov.

Pri določanju analizne občutljivosti oziroma meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB smo za izračun deleža pozitivnih rezultatov pri redčitvi 10^{-6} za prepis e13a2 in za prepis e14a2 uporabili program Excel 2016. Delež pozitivnih rezultatov smo izračunali po formuli $\%poz.\ rezultatov = \frac{\text{št.pozitivnih rezultatorv}}{\text{št.vseh meritev}} * 100\%$.

Za statistično obdelavo podatkov za primerjavo metod RT-qPCR za določanje ravni izražanja gena *BCR-ABL1* v levkocitih periferne krvi smo najprej uporabili program Excel 2016, v katerem smo izračunali razmerja BCR-ABL1/GUSB % in BCR-ABL1/ABL1 %, $-\log_{10}(BCR-ABL1/GUSB)$ in $-\log_{10}(BCR-ABL1/ABL1)$. V programu MedCalc smo s pomočjo podatkov pridobili Pearsonov korelacijski koeficient in izvedli linearno regresijo, ki nam je omogočila vizualno primerjavo testne metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in referenčne metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1.

V programu MedCalc smo izvedli tudi Bland-Altmanovo analizo, s pomočjo dobljenih podatkov pa smo izračunali tudi konverzijski faktor (KF), in sicer po formuli

$KF = 10^{mean\ bias}$. Mean bias je srednja vrednost razlik med obema metodama RT-qPCR. Konverzijski faktor omogoča podajanje rezultatov na mednarodnem merilu (IS).

3.3.IZOLACIJA RNA

3.3.1. Vzorec za analizo

Vzorec za analizo predstavljajo celice (levkociti), ki so bile predhodno shranjene v Trizolu, zato pri delu nismo izvedli koraka same izolacije levkocitov in krvi oz. kostnega mozga.

3.3.2. Izolacija RNA

Vzorce smo odtalili na sobni temperaturi in jih inkubirali 10 minut pri 37°C. Med inkubacijo smo večkrat vorteksirali, kar je omogočilo celotno disociacijo nukleoproteinskega kompleksa. Po inkubaciji smo vzorcu dodali 0,2 mL kloroforma in ga premešali z vorteksiranjem. Sledilo je centrifugiranje (15800 x g, 15 min, +4°C). Po centrifugiranju smo prenesli zgornjo vodno fazo, ki je vsebovala RNA, v novo mikrocentrifugirko. V preneseno vodno fazo smo dodali 0,2 mL kloroforma in jo rahlo vorteksirali (do mlečne barve). Sledilo je ponovno centrifugiranje (12000 x g, 10 min, +4°C). Ponovno smo odstranili zgornjo vodno fazo z RNA in jo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Vodni fazi z RNA smo dodali 0,5 mL ledenega 100% etanola in jo vorteksirali. Vzorce smo inkubirali čez noč pri -20°C. Po inkubaciji smo centrifugirali (12000 x g, 10 min, +4°C) in odstranili supernatant. Pelet smo sprali z 1,0 mL 75% etanola in najprej vorteksirali, nato centrifugirali (7500 x g, 5 min, +4°C). Ponovno smo odstranili supernatant, RNA pa posušili v termobloku pri 37°C, 2 – 5 minut. V tem koraku je bilo pomembno to, da je etanol popolnoma izhlapel, pri tem pa smo morali paziti, da pelet RNA ni postal preveč bel. Po sušenju smo RNA takoj raztopili v 30 µL vode z večkratnim pipetiranjem navzgor in navzdol. Vzorce smo ohladili v hladilnem bloku. Tako pripravljeni vzorci so bili primerni za preverjanje koncentracije RNA s spektrofotometrom UV/VIS Spectrophotometer Lambda Bio 20 in za nadaljnje analize.

3.3.3. Določitev koncentracije in čistosti izolirane RNA

Koncentracijo in čistost nukleinskih kislin lahko določamo z različnimi metodami, in sicer z merjenjem absorbance, agarozno gelsko elektroforezo, s fluorescenčno metodo in kalorimetrično. Najpogostejsa in obenem najbolj enostavna metoda določitve koncentracije in čistosti nukleinskih kislin je spektrofotometrična metoda določitve absorbance pri 260nm

in 280nm. Koncentracijo nukleinskih kislin določimo z uporabo Beer-Lambert-ovega zakona, ki predpostavlja linearno spremembo v odvisnosti absorbance s koncentracijo.

Pri določitvi čistosti in koncentracije nukleinskih kislin s spektrofotometrično metodo je potrebno merjenje absorbance v območju od 230nm do 320nm. S tem pridobimo podatke o možni prisotnosti nečistoč oz. inhibitorjev. Pri A220 – A240nm merimo vsebnost inhibitorjev (organskih spojin), pri A260nm merimo vsebnost nukleinskih kislin (RNA in DNA), pri A280nm merimo vsebnost proteinov, pri A320nm pa merimo vpliv ozadja oz. motnost raztopine. Nukleinske kisline ne absorbirajo svetlobe pri valovni dolžini 320nm, zato lahko absorbanco pri tej valovni dolžini odštejemo od A260 in A280 in tako dobimo ustrezeno razmerje A260/A280.

RNA ima absorpcijski maksimum pri 260nm in ta vrednost absorbance ni odvisna od pH raztopine. Za oceno čistosti RNA uporabimo razmerje absorbanc pri A260nm in A280nm. Čista RNA ima vrednost razmerja A260/A280 $((A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320}))$ 2,0. Večinoma se za čisto RNA uporablja razmerje absorbanc v razponu od 1,8 do 2,0.

V programu smo izbrali primerno metodo. V okno 'Samples' smo vnesli število vzorcev, v okence 'Sample ID' pa identifikacijske podatke vzorcev. Na merilno celico (TrayCell) smo odpipetirali 3 μL slepega vzorca (sterilna, RNaz in DNaz prosta voda) in pritisnili 'Avtozero'. Potem smo na merilno celico v zaporedju, ki smo ga določili pri vnosu podatkov o vzorcih, odpipetirali 3 μL posameznega vzorca in pritisnili start. Med posameznimi vzorci smo merilno celico očistili z vatirano palčko. Po končanih meritvah so se v oknu 'Results' izpisali podatki vseh meritev za posamezne vzorce. V oknu 'Output' smo kliknili na ukaz 'Preview' in izpisalo se je poročilo, ki smo ga natisnili. Po končanem delu smo merilno celico očistili z vatirano palčko, zaprli računalniški program in ugasnili instrument in računalnik.

3.4. KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU Z REVERZNO TRANSKRIPTAZO – RT-qPCR

3.4.1. Sinteza komplementarne DNA

Količina RNA, ki smo jo uporabili za sintezo cDNA, je bila 2 μg . Iz spektrofotometričnih podatkov o koncentraciji RNA smo določili volumen RNA, ki smo ga potrebovali za sintezo cDNA. Pripravili smo si 0,2 mL mikrocentrifugirke, ki smo jih označili z zaporedno številko cDNA sinteze. Sledila je priprava reakcijske mešanice z reagenčnim kompletom SuperScript[®] VILOTM cDNA Synthesis Kit po shemi, ki je predstavljena v tabeli VIII.

Tabela VIII: Priprava reakcijske mešanice za sintezo cDNA

Reagent	V (μL)
5x <i>VILOTMReactionMix</i>	4
10x <i>SuperScriptEnzymeMix</i>	2
<i>RNaz in DNaz prosta voda</i>	5
Σ	11

V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali primerno količino reagentov in vode in s kratkim centrifugiranjem (spin down) premešali. V označene mikrocentrifugirke smo odpipetirali potreben volumen RNA in z vodo dopolnili do volumna 9 μL . V mikrocentrifugirke smo dodali še 11 μL reakcijske mešanice in na kratko centrifugirali (spin down). Tako pripravljene mikrocentrifugirke z RNA in reakcijsko mešanico smo prenesli v PCR aparat (GeneAmp PCR System 9700, Veriti) in izvedli sintezo cDNA pri pogojih, ki so opisani v tabeli IX.

Tabela IX: PCR pogoji za sintezo cDNA

Korak	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Čas (minute)
1	25	10
2	42	90
3	85	5
4	4	∞

Po končani sintezi cDNA smo mikrocentrifugirke na kratko centrifugirali (spin down). V nadaljnje reakcije RT-qPCR smo dodali 10% volumna pripravljene cDNA sinteze. Do nadaljnjih analiz smo pripravljeno cDNA shranili v zamrzovalniku pri -20°C .

3.4.2. Priprava oligonukleotidnih začetnikov

Oligonukleotidni začetniki in sonde so bile ob prihodu v laboratorij v liofilizirani obliki, zato je bilo potrebno iz njih pripraviti najprej koncentrirane raztopine, iz koncentriranih raztopin pa delovne raztopine. Liofilizirane oligonukleotidne začetnike in sonde smo po navodilih proizvajalca raztopili z vodo do končne koncentracije 100 pmol/ μL (koncentrirane raztopine). Iz koncentrirane raztopine oligonukleotidnih začetnikov in sond s koncentracijo 100 pmol/ μL smo pripravili delovne raztopine oligonukleotidnih začetnikov, ki so imele

koncentracijo 7,5 pmol/ μ L in delovne raztopine sond, ki so imele koncentracijo 5 pmol/ μ L. Za pripravo delovnih raztopin oligonukleotidnih začetnikov in sond smo uporabili RNaz in DNaz prosto vodo.

Koncentrirane raztopine oligonukleotidnih začetnikov in sond smo shranili v zamrzovalniku na -20°C, ter iz njih po potrebi pripravljali delovne raztopine. Epruvete, v katerih so bile pripravljene delovne raztopine sond, smo zavili v folijo, da smo jih zaščitili pred svetlobo. Epruvete s pripravljenimi delovnimi raztopinami oligonukleotidnih začetnikov in sond smo do uporabe shranili v zamrzovalnik na -20°C.

3.4.3. Priprava reakcijske mešanice za reakcijo qPCR

Pri obratnem prepisovanju in kvantitativni verižni reakciji s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) smo določali raven izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1* in raven izražanja prepisov referenčnih genov *ABL1* in *GUSB*. Za vsako vrsto prepisa smo morali pripraviti svojo reakcijsko mešanico. V tabelah X, XI, XII in XIII so podani volumni raztopin, ki smo jih odpipetirali v 1,5 mL epruveto. Po priporočilih proizvajalca so imeli oligonukleotidni začetniki v končni reakcijski mešanici koncentracijo 300 nM, sonde pa 200 nM.

Tabela X: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1* (pri referenčnem genu *GUSB*)

Reagent	V (μ l)
TaqMan (Univ. rek. meš)	14,4
Oligonukleotidni začetnik ENF 501 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENR 561 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENP 541 (200 nM)	1
Voda	5,6
Σ	23

Tabela XI: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja referenčnega gena *GUSB*

Reagent	V (μ l)
TaqMan (Univ. rek. meš)	14,4
Oligonukleotidni začetnik ENF 1102 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENR 1162 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENPr1142 (200 nM)	1
Voda	5,6
Σ	23

Tabela XII: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1* (pri referenčnem genu *ABL1*)

Reagent	V (µl)
TaqMan (Univ. rek. meš)	12,5
Oligonukleotidni začetnik ENF 501 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENR 561 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENP 541 (200 nM)	1
Voda	4,5
Σ	20

Tabela XIII: Priprava ene reakcijske mešanice za določitev ravni izražanja referenčnega gena *ABL1*

Reagent(µl) / število reakcij	V (µl)
TaqMan (Univ. rek. meš)	12,5
Oligonukleotidni začetnik ENF 1003 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENR 1061 (300 nM)	1
Oligonukleotidni začetnik ENP 1043 (200 nM)	1
Voda	4,5
Σ	20

V 1,5 mL epruveto smo po vrsti odpipetirali vse potrebne reagente, nato pa na kratko centrifugirali (spin down). Tako pripravljene reakcijske mešanice smo takoj uporabili za RT-qPCR.

3.4.4. Določanje natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB (ponovljivost v seriji in med serijami meritev)

Ponovljivost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB smo preverili z določanjem ponovljivosti v seriji in med serijami meritev za kontrolne materiale in standarde. Za ponovljivost v seriji smo iz kontrolnega materiala Proficiency Panel for the BCR/ABL t(9;22) Translocation Assay (Invivoscribe) pripravili po eno cDNA sintezo za prepis e13a2 (redčitev 10^{-2} in 10^{-4}) in za prepis e14a2 (redčitev 10^{-2} in 10^{-4}). Iz vsake sintetizirane cDNA smo naredili eno določitev BCR-ABL1, pri čemer smo vsako cDNA odpipetirali trikrat za določitev BCR-ABL1 in trikrat za določitev GUSB (shema pipetiranja je opisana v tabeli XIV).

Tabela XIV: Shema pipetiranja pri določanju ponovljivosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a	a	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}		a	a	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	
B	b	b	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}		b	b	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	
C	c	c	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}		c	c	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	
D	d	d	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}		d	d	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	
E	e	e					NTC	NTC				
F	f	f										
G												
H	NTC	NTC				MM						MM

V modro označena polja smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1*, v zeleno označena polja pa smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja referenčnega gena *GUSB*. V kolone 1, 2 in 7, 8 smo odpipetirali raztopine standardov (označeno z a – f). V polja, ki so označena z enako barvo kot polja, v katera smo odpipetirali raztopine standardov, smo odpipetirali cDNA za prepis e13a2, v polja, ki so označena s temnejšo barvo, pa cDNA za prepis e14a2.

2 μ L cDNA, pripravljene iz kontrolnega materiala, smo odpipetirali k 23 μ L vnaprej pripravljene reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili po protokolu, ki je opisan v poglavju Priprava reakcijske mešanice za reakcijo PCR. Po končanem pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico prelepili s sterilno prozorno folijo, jo zavili v srebrno folijo, da smo jo zaščitili pred svetlobo, in jo v centrifugi z rotorjem za mikrotitrsko ploščico (Heraeus Labofuge 400) centrifugirali 2 minuti pri 2200 rpm. Po končanem centrifugiraju smo mikrotitrsko ploščico odvili iz srebrne folije in jo prenesli v aparat PCR Viia7. Po navodilih proizvajalca za kvantitativni PCR smo nastavili program in pogoje reakcije, ki so zapisani v tabeli XV.

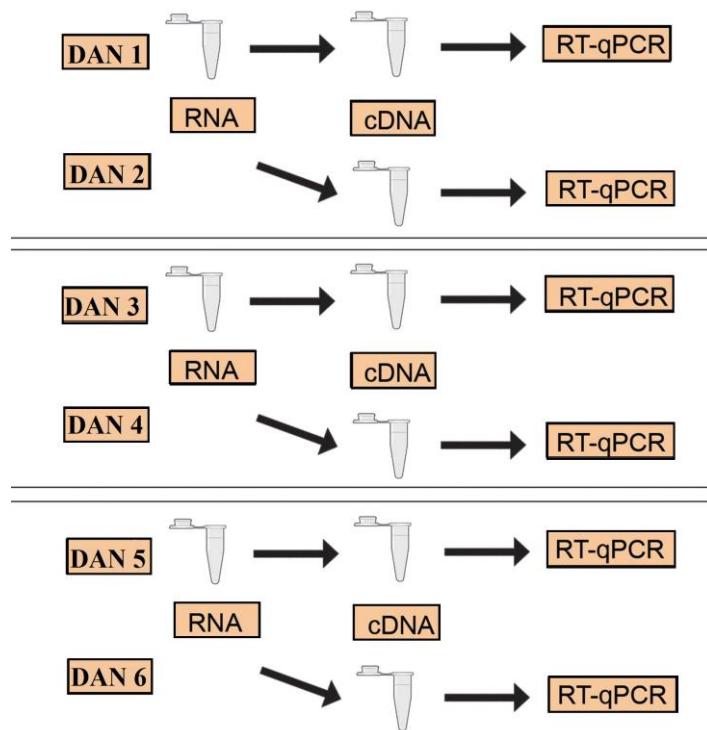
Tabela XV: Pogoji pomnoževanja za BCR-ABL1 na aparatu PCR Viia 7

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Čas	Število ciklov
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sekund	50
60	1 minuta	

Ponovljivost med serijami meritev smo izvedli na podoben način, le da smo iz kontrolnega materiala pripravili po tri cDNA sinteze za vsak prepis. Za vsako od treh cDNA sintez smo naredili eno določitev BCR-ABL1. Pipetiranje je bilo enako kot pri preverjanju ponovljivosti v seriji.

3.4.5. Določanje meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB

Mejo zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB smo določili s kontrolnim materialom Proficiency Panel for the BCR/ABL t(9;22) Translocation Assay proizvajalca Invivoscribe, in sicer po shemi Novartis BCR-ABL1 Secondary WHO Reference Panel Study, ki so jo v letu 2014 izvedli v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana (slika 14).



Slika 13: Shema določitve meje zaznave; prizeleno po [26,32]

Kontrolni material je bil v redčitvah od 10^{-1} do 10^{-6} . Šest dni zapored smo vsak dan iz vseh šestih redčitev kontrolne RNA po protokolu za pripravo cDNA pripravili cDNA ločeno za oba prepisa (e13a2 in e14a2). Iz pripravljenih cDNA smo potem izvedli RT-qPCR za določitev izražanja fuzijskega gena BCR-ABL1. Shema pipetiranja je prikazana v tabeli XVI.

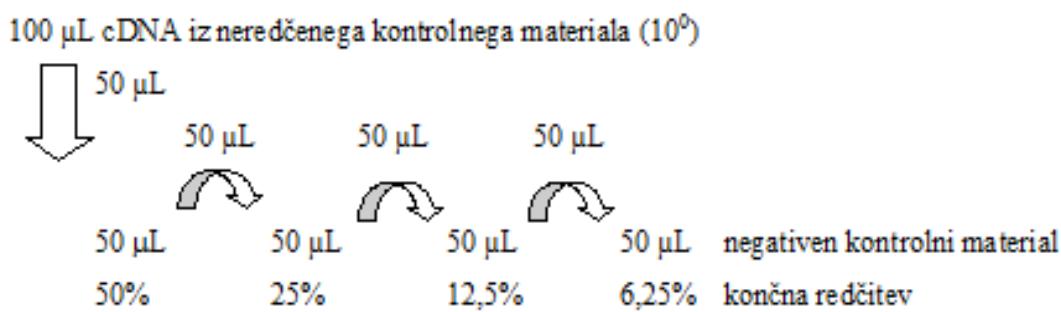
Tabela XVI: Shema pipetiranja za določitev meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a	a	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}		a	a	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	
B	b	b	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}		b	b	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	
C	c	c	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}		c	c	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	
D	d	d	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}		d	d	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	
E	e	e	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}		NTC	NTC	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	
F	f	f	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}				10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	
G												
H	NTC	NTC				MM						MM

V modro označena polja smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1*, v zeleno označena polja pa smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja referenčnega gena *GUSB*. V kolone 1, 2 in 7, 8 smo odpipetirali raztopine standardov (označeno z a – f), v ostala polja pa smo v triplikatu odpipetirali cDNA kontrolnega materiala.

3.4.6. Določanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1

Iz neredčenega (10^0) kontrolnega materiala smo si pripravili pool petih cDNA sintez, iz negativnega kontrolnega materiala pa pool enajstih cDNA sintez za vsak prepis (e13a2 in e14a2). Končni volumen cDNA iz neredčenega kontrolnega materiala je bil $100 \mu\text{L}$, končni volumen cDNA iz negativnega kontrolnega materiala pa $220 \mu\text{L}$. V nadaljevanju smo za oba prepisa pripravili kontrolni material v naslednjih redčitvah: 100%, 50%, 25%, 12,5% in 6,25%. Redčitve smo pripravili po naslednji shemi:



Slika 14: Shema redčenja kontrolnega materiala

V vnaprej pripravljene in označene 0,2 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 50 µL cDNA iz negativnega kontrolnega materiala. V prvo centrifugirko smo odpipetirali 50 µL cDNA iz neredčenega kontrolnega materiala in premešali s pipetiranjem (redčitev 50%). Potem smo 50 µL 50% mešanice kvantitativno prenesli v naslednjo mikrocentrifugirko in korak kvantitativnega prenašanja in mešanja ponavljali toliko časa, da smo prišli do redčitve 6,25%. Iz vsake redčitve smo naredili tri določitve *BCR-ABL1*, pri čemer smo vsako cDNA odpipetirali trikrat za določitev *BCR-ABL1* in trikrat za *GUSB*. Shema pipetiranja je opisana v tabeli XVII.

Tabela XVII: Shema pipetiranja za določitev linearnosti metode RT-qPCR *BCR-ABL1/GUSB*; 96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a	a	100	100	100	12,5	a	a	100	100	100	12,5
B	b	b	50	50	50	12,5	b	b	50	50	50	12,5
C	c	c	25	25	25	12,5	c	c	25	25	25	12,5
D	d	d	12,5	12,5	12,5	6,25	d	d	12,5	12,5	12,5	6,25
E	e	e	6,25	6,25	6,25	6,25	NTC	NTC	6,25	6,25	6,25	6,25
F	f	f	100	100	100	6,25			100	100	100	6,25
G			50	50	50				50	50	50	
H	NTC	NTC	25	25	25	MM			25	25	25	MM

V modro označena polja smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1*, v zeleno označena polja pa smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja referenčnega gena *GUSB*. V kolone 1, 2 in 7, 8 smo odpipetirali raztopine standardov (označeno z a – f). V polja, ki so označena z enako barvo kot polja, v katera smo odpipetirali raztopine standardov, smo odpipetirali cDNA za prepis e13a2, v polja, ki so označena s temnejšo barvo, pa cDNA za prepis e14a2.

Poleg preverjanja linearnosti modificirane metode za določitev izražanja gena *BCR-ABL1* smo izvedli tudi eno določitev izražanja gena *BCR-ABL1* po obstoječi metodi, da smo lahko primerjali linearnost obeh metod. Postopek izvedbe je bil enak. Edina razlika je bila ta, da smo pri obstoječi metodi cDNA po sintezi redčili z vodo (20 µL cDNA + 30 µL vode).

3.4.7. Primerjava metod RT-qPCR za določanje ravni izražanja gena *BCR-ABL1v* levkocitih periferne krvi

Iz RNA 34 bolnikov s KML, ki jim je bila z obstoječo metodo določena vrednost IS za prepis BCR-ABL1/ABL1 manj kot 10% (meritve so izvedli zaposleni v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana), smo po protokolu za pripravo cDNA pripravili cDNA, ki smo jo uporabili za določanje izražanja fuzijskega prepisa BCR-ABL1 z modificirano metodo in z uporabo referenčnega gena *GUSB*. K 23 µL reakcijske mešanice smo po shemi, ki je prikazana v tabeli XVIII, odpipetirali 2 µL pripravljeni cDNA bolnikov in izvedli RT-qPCR.

Tabela XVIII: Shema pipetiranja vzorcev bolnikov za RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB; 96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a	a	v1	v1	v1	v9	a	a	v1	v1	v1	v9
B	b	b	v2	v2	v2	v9	b	b	v2	v2	v2	v9
C	c	c	v3	v3	v3	v9	c	c	v3	v3	v3	v9
D	d	d	v4	v4	v4	v10	d	d	v4	v4	v4	v10
E	e	e	v5	v5	v5	v10	NTC	NTC	v5	v5	v5	v10
F	f	f	v6	v6	v6	v10			v6	v6	v6	v10
G			v7	v7	v7				v7	v7	v7	
H	NTC	NTC	v8	v8	v8	MM			v8	v8	v8	MM

V modro označena polja smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja prepisov fuzijskega gena *BCR-ABL1*, v zeleno označena polja pa smo odpipetirali reakcijsko mešanico za določitev ravni izražanja referenčnega gena *GUSB*. V kolone 1, 2 in 7, 8 smo odpipetirali raztopine standardov (označeno z a – f), v ostala polja pa smo v triplikatu odpipetirali cDNA vzorcev (v tabeli označeno z v1 – v10).

4. REZULTATI

4.1. Modifikacija metode določitve ravni izražanja gena *BCR-ABL1*

4.1.1. Točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB

Točnost metode smo določili s pomočjo podatkov, ki smo jih pridobili po postopku, ki je opisan v poglavju Določanje meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB. Potrebne podatke smo izračunali s pomočjo programov Excel 2016 in MedCalc (opisano v poglavju Statistična obdelava podatkov). Izračunani podatki so v tabeli XIX za prepis e13a2, ter v tabeli XX za prepis e14a2. Podatki, ki smo jih uporabili za izračun so zapisani v tabeli XXIII za prepis e13a2, ter v tabeli XXIV za prepis e14a2.

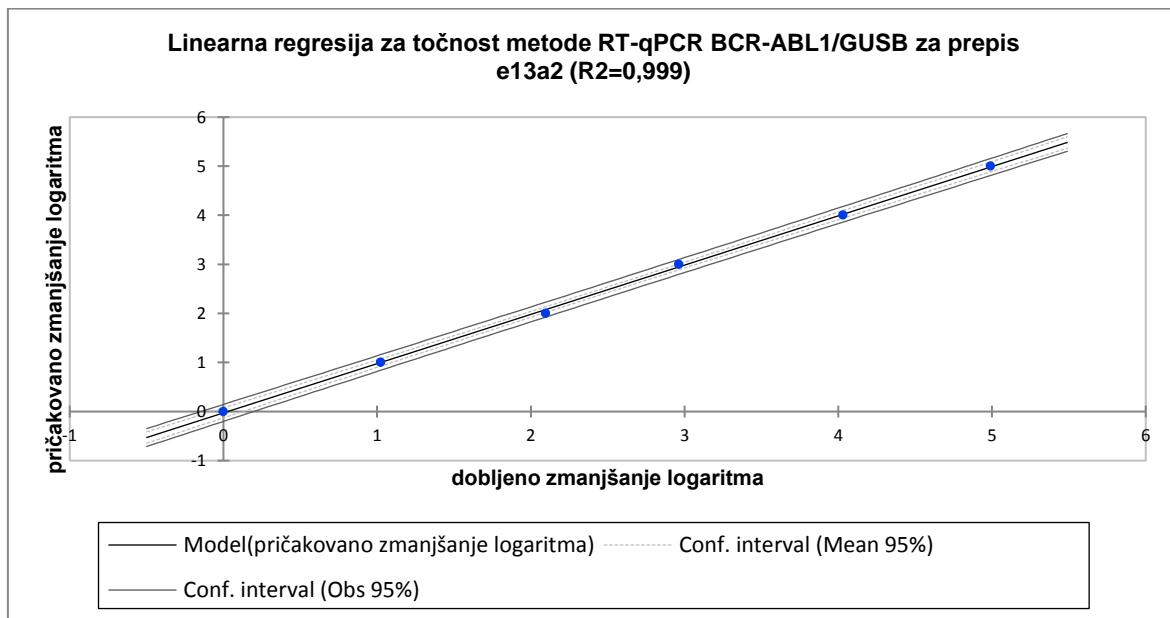
Tabela XIX: Ocena biasa, nenatančnosti in celokupne napake metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2

Pričakovano zmanjšanje logaritma	Dobljeno zmanjšanje logaritma	Bias	Standardni odklon	TEa	CNa95	KCNa%
0	0,000	0,000	0,028	0,054	0,051	/
1	1,024	-0,024	0,081	0,118	0,112	11,791
2	2,096	-0,096	0,165	0,179	0,170	8,938
3	2,963	0,037	0,186	0,372	0,353	12,392
4	4,031	-0,031	0,239	0,410	0,390	10,261
5	4,991	0,009	0,142	0,280	0,266	5,593

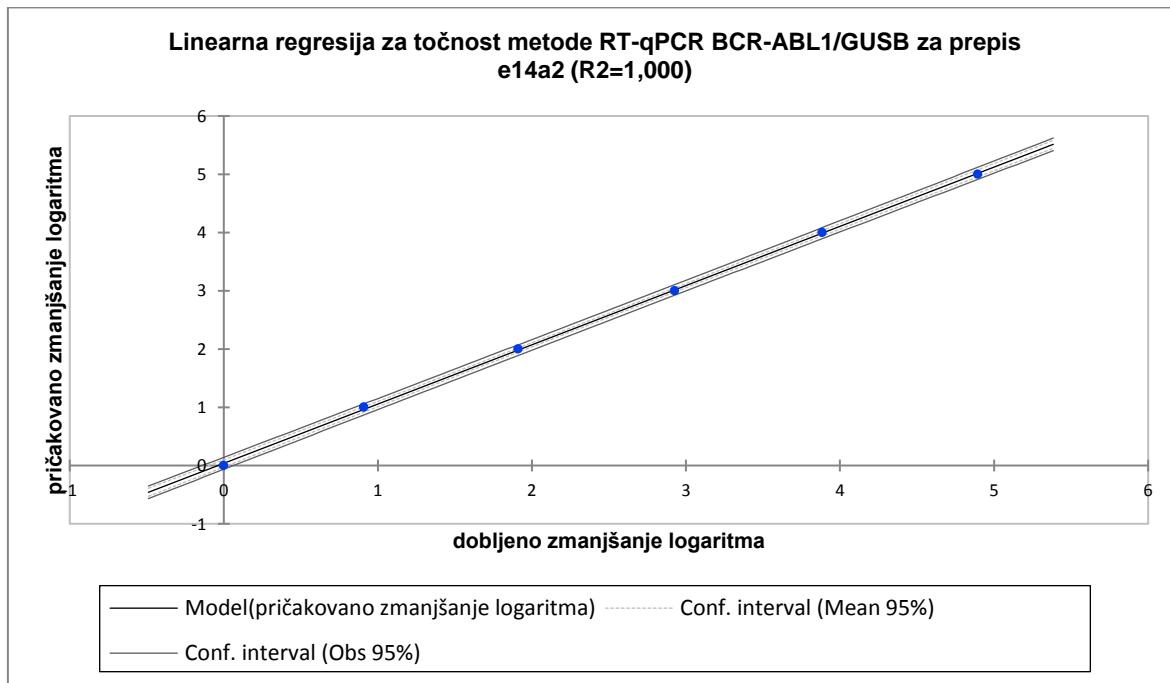
Tabela XX: Ocena biasa, nenatančnosti in celokupne napake metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

Pričakovano zmanjšanje logaritma	Dobljeno zmanjšanje logaritma	Bias	Standardni odklon	TEa	CNa95	KCNa%
0	0,000	0,000	0,046	0,091	0,087	/
1	0,910	0,090	0,088	0,235	0,223	23,487
2	1,912	0,088	0,088	0,234	0,222	11,677
3	2,926	0,074	0,106	0,250	0,238	8,334
4	3,884	0,116	0,098	0,277	0,263	6,913
5	4,895	0,105	0,085	0,244	0,232	4,885

S pomočjo izračunanih podatkov smo izvedli linearno regresijo. Rezultati linearne regresije za prepis e13a2 so prikazani na grafu 1, za prepis e14a2 pa na grafu 2.

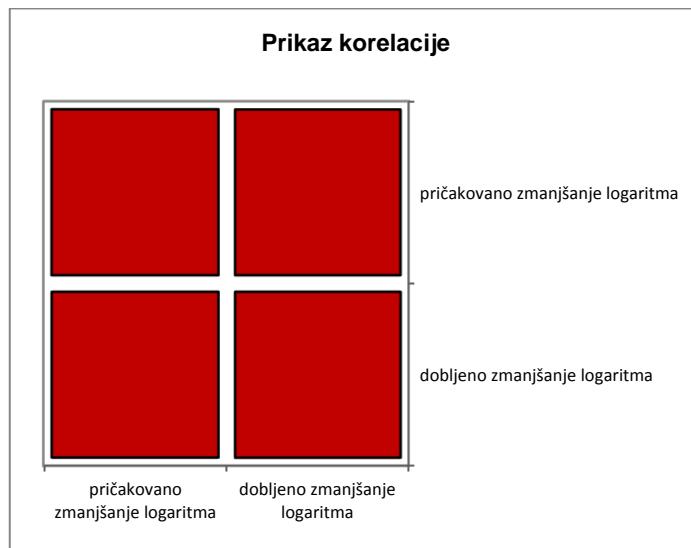


Graf 1: Linearna regresija za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2



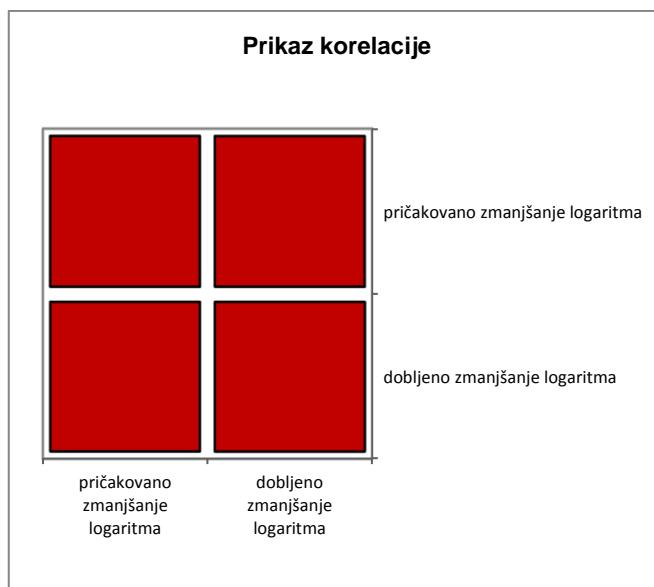
Graf 2: Linearna regresija za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

Graf Pearsonove korelacije uporablja modre in rdeče barve (hladno-vroče) za prikaz korelacije med posameznimi parametri. Modra barva predstavlja korelacijo med parametri, ki je blizu -1, rdeča barva pa predstavlja korelacijo med parametri, ki je blizu 1. Pearsonov koeficient korelacije za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2 je **0,997**. Korelacija med pričakovanim in dobljenim zmanjšanjem logaritma je prikazana na sliki 15.



Slika 15: Prikaz korelacijske matrice za metodo RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2

Pearsonov koeficient korelacije za točnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2 je **1,000**. Korelacija med pričakovanim in dobljenim zmanjšanjem logaritma je prikazana na sliki 16.



Slika 16: Prikaz korelacijske matrice za metodo RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

4.1.2. Natančnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB (ponovljivost v seriji in med serijami meritev)

Natančnost metode smo naredili po postopku opisanem v poglavju Določanje natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB (ponovljivost v seriji in med serijami meritev). Pridobili smo sledeče rezultate:

- cikel kvantifikacije Cq za reakcijo določitve števila kopij cDNA segmenta *BCR-ABL1*,
- cikel kvantifikacije Cq za določitev števila kopij cDNA segmenta referenčnega gena *GUSB*.

Iz standardne krivulje smo na osnovi podatkov Cq za BCR-ABL1 in GUSB določili število kopij BCR-ABL1 in število kopij GUSB v vzorcu. Izračunali smo razmerje BCR-ABL1/GUSB in iz tega določili srednjo vrednost (povprečje), standardni odklon in koeficient variacije, kot je opisano v poglavju Statistična obdelava podatkov. Podatki, ki smo jih uporabili za izračun ponovljivosti v seriji meritev so zapisani v tabeli XXV, za izračun ponovljivosti med serijami meritev pa v tabeli XXVI.

Koeficient variacije ponovljivosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB **v seriji meritev** za kontrolni material **e13a2** redčitve **10^{-2}** je znašal **5,567%**, za kontrolni material **e13a2** redčitve **10^{-4}** pa **17,647%**. Koeficient variacije za kontrolni material **e14a2** redčitve **10^{-2}** je znašal **16,270%**, za kontrolni material **e14a2** redčitve **10^{-4}** pa **2,000%**.

Koeficient variacije ponovljivosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB **med serijami meritev** za kontrolni material **e13a2** redčitve **10^{-2}** je znašal **15,521%**, za kontrolni material **e13a2** redčitve **10^{-4}** pa **29,742%**. Koeficient variacije za kontrolni material **e14a2** redčitve **10^{-2}** je znašal **16,115%**, za kontrolni material **e14a2** redčitve **10^{-4}** pa **9,979%**.

4.1.3. Analizna občutljivost

Meja zaznavnosti (limit of detection, LOD) je najnižja količina (koncentracija) merjenca (analita) v vzorcu, ki jo je z določeno mejo zaupanja mogoče razlikovati od ozadja (negativnega vzorca). Meja zaupanja, ki smo jo vzeli je 95% in nakazuje, da je vsaj 95% časa določena koncentracija različna od negativnega vzorca. Dobili smo jo v eksperimentu za določitev linearnosti metode, in je meja, ki nakazuje na konzistentno pozitiven rezultat. Eksperiment smo izvedli po postopku, ki je opisan v poglavju Določanje meje zaznavnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB. Ko smo izvedli vse določitve vseh šestih dni, smo rezultate pregledali in kot mejo zaznavnosti modificirane metode za določitev fuzijskega prepisa BCR-ABL1 določili redčitev 10^{-5} . Pri tej redčitvi smo v vseh določitvah uspešno

pozitivno določili BCR-ABL1, pri redčitvi 10^{-6} pa smo v vseh določitvah sicer uspešno določili zadostne količine prepisa referenčnega gena *GUSB*, vendar pa nismo uspeli vedno pozitivno določiti prepisa BCR-ABL1. Delež pozitivnih rezultatov pri redčitvi 10^{-6} za prepis e13a2 je bil 89%, za prepis e14a2 pa 83%.

Meja kvantifikacije (limit of quantification, LOQ) je najnižja in najvišja koncentracija merjenca (analita), ki jo lahko kvantitativno določimo s sprejeto analitično celokupno napako. V našem primeru je spodnja meja kvantifikacije 10^{-5} .

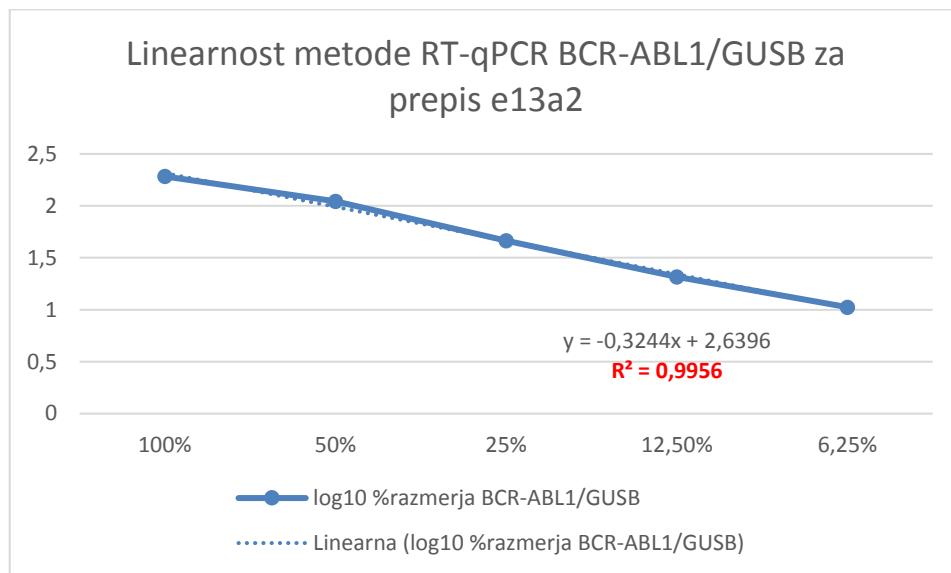
4.1.4. Ugotavljanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1 v visokem območju

Z linearnostjo metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB smo želeli preveriti, ali je naša metoda linearna v območju nad 10% IS. Eksperiment smo izvedli po postopku, ki je opisan v poglavju Določanje linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1. S statistično analizo smo dobili naslednje rezultate:

- cikel kvantifikacije Cq za reakcijo določitve števila kopij cDNA segmenta *BCR-ABL1*,
- cikel kvantifikacije Cq za določitev števila kopij cDNA segmenta referenčnega gena *GUSB*,
- cikel kvantifikacije Cq za določitev števila kopij cDNA segmenta referenčnega gena *ABL1*.

Iz standardne krivulje smo na osnovi podatkov Cq za BCR-ABL1, GUSB in ABL1 določili število kopij BCR-ABL1, število kopij GUSB in število kopij ABL1 v vzorcu. Izračunali smo razmerje BCR-ABL1/GUSB in razmerje BCR-ABL1/ABL1 in iz tega določili srednje vrednosti (povprečja), standardne odklone in koeficiente variacije, kot je opisano v poglavju Statistična obdelava podatkov. Podatki, ki smo jih uporabili za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 so zapisani v tabeli XXVII, za linearnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB pa v tabeli XXVIII. Podatke smo nato uporabili za izris grafov, ki prikazujejo linearnost metod RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB in BCR-ABL1/ABL1 v območju nad 10% IS.

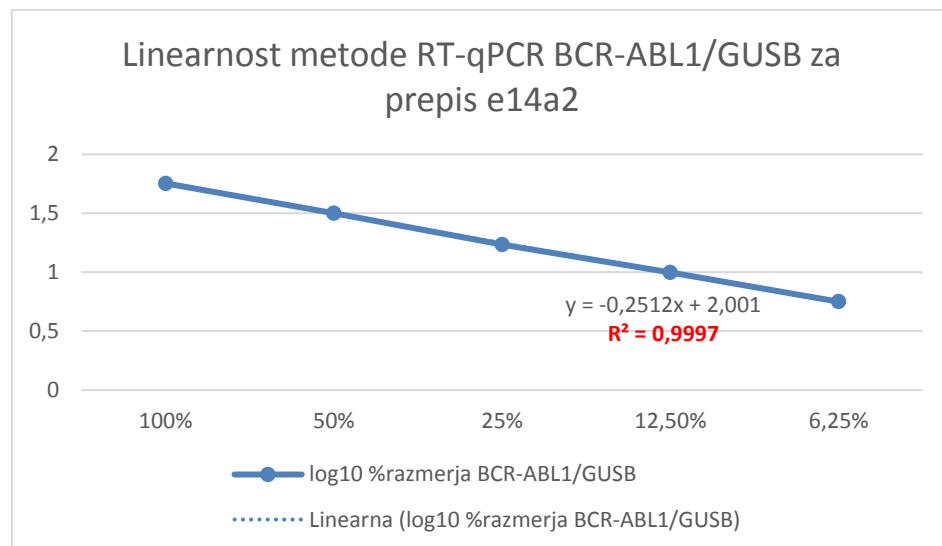
Graf 3 prikazuje linearnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2.



Graf 3: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log₁₀ % razmerja BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2.

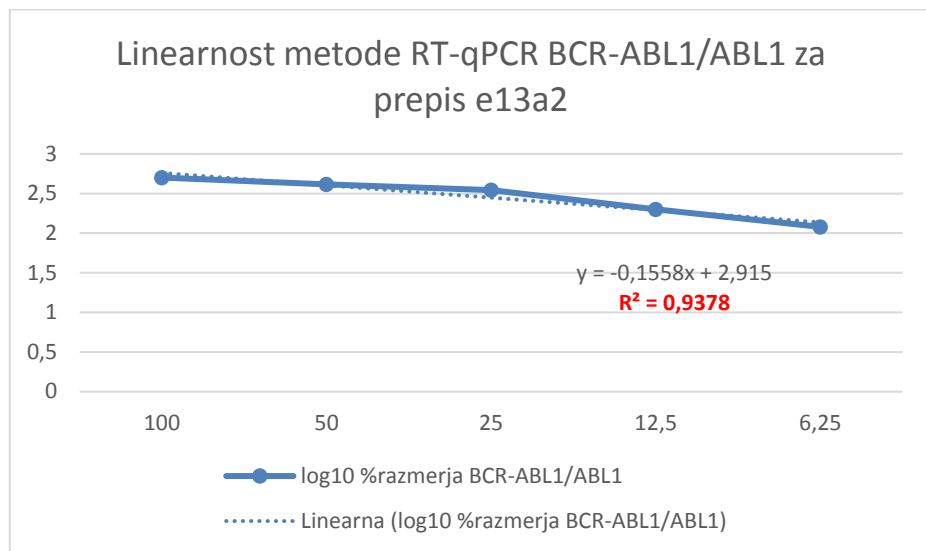
Graf 4 prikazuje linearnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2.



Graf 4: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log₁₀ % razmerja BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2.

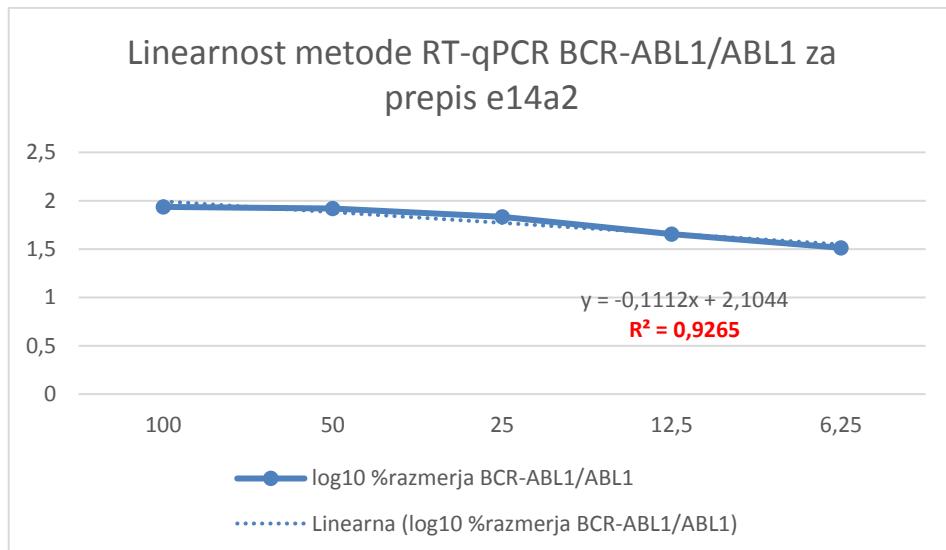
Graf 5 prikazuje linearnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e13a2.



Graf 5: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e13a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log₁₀ % razmerja BCR-ABL1/ABL1 za prepis e13a2.

Graf 6 prikazuje linearnost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e14a2.

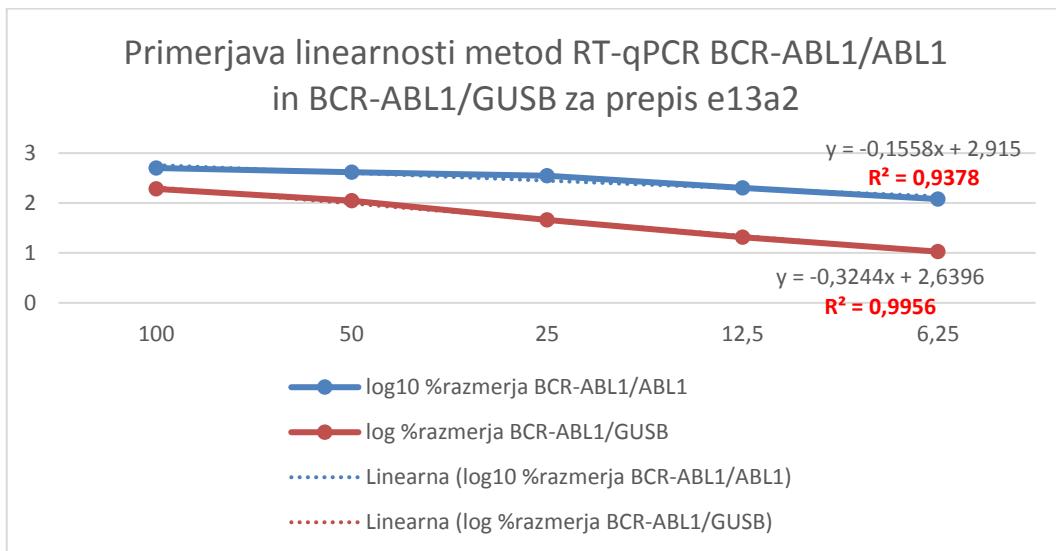


Graf 6: Linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 za prepis e14a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log₁₀ % razmerja BCR-ABL1/ABL1 za prepis e14a2.

Na grafu 7 je prikazana primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2. Z modro barvo je prikazana linearnost metode za določanje

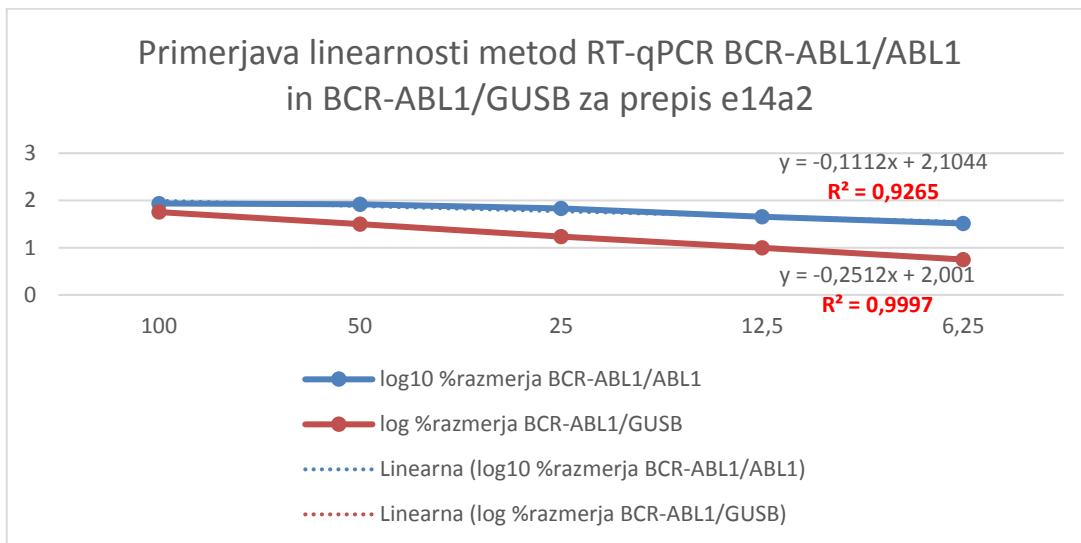
razmerja BCR-ABL1/ABL1, z rdečo barvo pa je prikazana linearnost metode za določanje razmerja BCR-ABL1/GUSB.



Graf 7: Primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log10 % razmerja BCR-ABL1/referenčni gen za prepis e13a2.

Na grafu 8 je prikazana primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2. Z modro barvo je prikazana linearnost metode za določanje razmerja BCR-ABL1/ABL1, z rdečo barvo pa je prikazana linearnost metode za določanje razmerja BCR-ABL1/GUSB.



Graf 8: Primerjava linearnosti metod RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 in BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

Na x osi je prikazana stopnja redčitve, na y osi pa log10 % razmerja BCR-ABL1/referenčni gen za prepis e14a2.

4.1.5. Obseg poročanja rezultatov (reportable range)

Rezultati, ki smo jih pridobili za 95% interval zaupanja za celokupno analitično napako (CNa95) v eksperimentu za določanje točnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB so: CNa95 v razponu med **0,051** in **0,390** za prepis e13a2, ter med **0,087** in **0,263** za prepis e14a2. Na podlagi teh rezultatov smo določili obseg poročanja rezultatov od **10⁰** do **10⁻⁵**.

4.1.6. Primerjava metod RT-qPCR za določanje ravni izražanja gena BCR-ABL1 v levkocitih periferne krvi

V tabeli XXI so prikazani rezultati, ki smo jih dobili pri meritvah fuzijskega prepisa BCR-ABL1 z modificirano (testno) in obstoječo (referenčno) metodo pri 34 bolnikih s KML. Iz rezultatov smo izračunali nekatere vrednosti in s statističnimi metodami izračunali Pearsonov korelacijski koeficient med rezultati testne in referenčne metode določanja ravni izražanja gena BCR-ABL1 z RT-qPCR metodo. Iz rezultatov obeh metod RT-qPCR smo napravili linearno regresijo in dobili enačbo linearne regresijske premice. Rezultat linearne regresije smo prikazali grafično. Iz grafa razlik, ki smo ga pridobili v analizi Bland-Altman, smo s primerjavo testne in referenčne metode RT-qPCR določanja ravni izražanja gena BCR-ABL1 izračunali konverzijski faktor. Določili smo tudi skladnost obeh metod RT-qPCR določanja ravni izražanja gena BCR-ABL1.

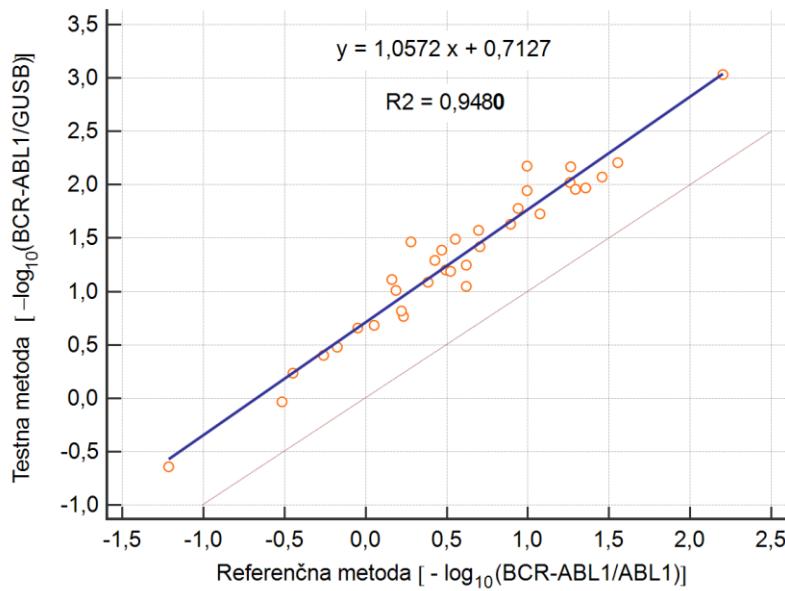
Tabela XXI: Rezultati določitve fuzijskega prepisa BCR-ABL1 pri bolnikih s KML

ID	BCR-ABL1/ABL1 %	BCR-ABL1/GUSB %	-log10 [BCR-ABL1/ABL1 %]	-log [BCR-ABL1/GUSB %]	BCR-ABL1/ABL1 (% IS)	-log10 [BCR-ABL1/ABL1 %IS]	BCR-ABL1/GUSB (%IS)	-log10 [BCR-ABL1/GUSB %IS]	Absolutna vrednost razmerja -log10 referenčne/-log10 testne metode
Z3997	0,2402	0,0569	0,6194	1,2452	0,090	1,0477	0,0275	1,5608	0,6713
Z4012	0,5818	0,1708	0,2352	0,7674	0,217	0,6635	0,0826	1,0830	0,6127
Z4056	0,2397	0,0889	0,6204	1,0511	0,089	1,0487	0,0430	1,3667	0,7673
Z4340	0,1968	0,0380	0,7060	1,4206	0,073	1,1343	0,0184	1,7362	0,6533
Z4341	0,3190	0,0628	0,4962	1,2023	0,119	0,9245	0,0303	1,5179	0,6090
Z4370	0,5979	0,1525	0,2234	0,8166	0,223	0,6517	0,0737	1,1322	0,5756
Z4445	2,7882	0,5858	-0,4453	0,2323	1,040	-0,0170	0,2832	0,5479	0,0311
Z4495	0,0062	0,0009	2,2044	3,0315	0,002	2,6326	0,0004	3,3471	0,7865
Z4496	0,1011	0,0113	0,9954	1,9469	0,038	1,4237	0,0055	2,2625	0,6292
Z4513	0,2788	0,0325	0,5547	1,4884	0,104	0,9830	0,0157	1,8040	0,5449
Z4529	0,1008	0,0067	0,9965	2,1759	0,038	1,4248	0,0032	2,4915	0,5719
Z4532	0,3378	0,0410	0,4713	1,3875	0,126	0,8996	0,0198	1,7031	0,5282
Z4542	0,0349	0,0084	1,4578	2,0757	0,013	1,8861	0,0041	2,3913	0,7887
Z4546	0,5255	0,0343	0,2795	1,4642	0,196	0,7077	0,0166	1,7798	0,3977
Z4574	0,6488	0,0981	0,1879	1,0082	0,242	0,6162	0,0474	1,3238	0,4655
Z4589	1,1126	0,2207	-0,0463	0,6562	0,415	0,3820	0,1067	0,9718	0,3930
Z4593	3,2654	1,0833	-0,5139	-0,0347	1,218	-0,0856	0,5238	0,2809	0,3049
Z4638	1,8177	0,3957	-0,2595	0,4027	0,678	0,1688	0,1913	0,7183	0,2350
Z4681	0,4102	0,0822	0,3870	1,0849	0,153	0,8153	0,0398	1,4005	0,5821
Z4696	0,0544	0,0068	1,2642	2,1688	0,020	1,6925	0,0033	2,4844	0,6813
Z4697	0,3753	0,0512	0,4256	1,2906	0,140	0,8539	0,0248	1,6062	0,5316
Z4699	0,6890	0,0770	0,1618	1,1133	0,257	0,5901	0,0372	1,4289	0,4130
Z4710	0,0550	0,0095	1,2600	2,0232	0,021	1,6882	0,0046	2,3388	0,7218
Z4731	0,0440	0,0108	1,3569	1,9678	0,016	1,7852	0,0052	2,2834	0,7818
Z4733	0,0509	0,0111	1,2930	1,9543	0,019	1,7212	0,0054	2,2699	0,7583
Z4757	0,1147	0,0167	0,9403	1,7765	0,043	1,3686	0,0081	2,0921	0,6542

Z4770	0,0845	0,0188	1,0734	1,7254	0,032	1,5017	0,0091	2,0410	0,7358
Z4897	0,2016	0,0268	0,6955	1,5722	0,075	1,1238	0,0129	1,8878	0,5953
Z4913	0,1273	0,0233	0,8950	1,6336	0,048	1,3233	0,0112	1,9492	0,6789
Z4937	0,8847	0,2067	0,0532	0,6846	0,330	0,4815	0,0999	1,0002	0,4814
Z4944	0,3003	0,0644	0,5225	1,1910	0,112	0,9508	0,0311	1,5067	0,6311
z4973	1,4987	0,3329	-0,1757	0,4777	0,559	0,2526	0,1610	0,7933	0,3184
z4979	0,0279	0,0062	1,5547	2,2076	0,010	1,9830	0,0030	2,5232	0,7859
z4987	16,3539	4,3603	-1,2136	-0,6395	6,100	-0,7853	2,1082	-0,3239	2,4245

Iz podatkov v tabeli smo naredili korelacijo med obema metodama, Pearsonov korelacijski koeficient je znašal **0,9736** ($P<0,0001$).

Slika 17 prikazuje graf linearne regresije $-\log_{10}$ razmerja BCR-ABL1/GUSB testne metode in $-\log_{10}$ razmerja BCR-ABL1/ABL1 referenčne (primerjalne) metode RT-qPCR, na kateri opazimo konstantno razliko (bias) med premico linearne regresije in premico enakosti ($y=x$).



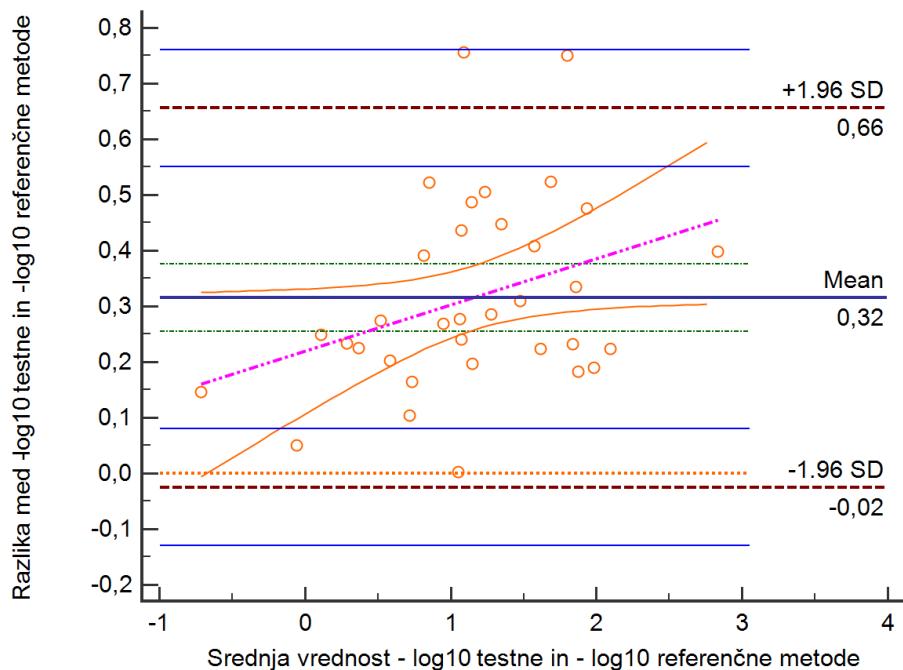
Slika 17: Graf linearne regresije $-\log_{10}$ razmerja BCR-ABL1/GUSB testne metode in $-\log_{10}$ razmerja referenčne metode BCR-ABL1/ABL1

Modra premica je premica linearne regresije, črtkana premica je premica enakosti $y=x$.

Za določitev preliminarnega konverzijskega faktorja testne metode BCR-ABL1/GUSB RT-qPCR smo izbrali vzorce RNA bolnikov, ki so imeli rezultat BCR-ABL1/ABL1 IS (določen z referenčno metodo BCR-ABL1/ABL1 IS RT-qPCR) v razponu od 0,001% do 10 % mednarodnega merila (IS) ($N=34$; podatki so zapisani v tabeli XXI: Rezultati določitve fuzijskega prepisa BCR-ABL1 pri bolnikih s KML). Preliminarni konverzijski faktor (KF) testne metode BCR-ABL1/GUSB RT-qPCR smo dobili s primerjavo z referenčno metodo BCR-ABL1/ABL1 IS RT-qPCR v analizi grafa Bland-Altman razlik (Slika XX. Graf Bland-Altman). Rezultate referenčne metode izražene v odstotkih BCR-ABL1/ABL1, ki smo jih določili v vzorcih RNA (cDNA) bolnikov s KML, smo s pomočjo validiranega konverzijskega faktorja ($KF=0,373$) pretvorili na mednarodno merilo (IS). Na istih vzorcih RNA (cDNA) smo izvedli še meritve s testno metodo BCR-ABL1/GUSB RT-qPCR. Nato smo izvedli logaritemsko transformacijo rezultatov (\log_{10}) obeh metod; testne BCR-

ABL1/GUSB izražene v odstotkih in referenčne BCR-ABL1/ABL1 IS izražene v odstotkih na mednarodnem merilu. V graf smo na os y nanesli razliko med obema rezultatoma posameznega vzorca, na os x pa srednjo vrednost (mean) med rezultatom testne in referenčne metode RT-qPCR (Slika 18: Graf Bland-Altman). Konverzijski faktor smo izračunali z anti logaritmiranjem (anti log10) dobljene srednje vrednosti razlik (mean bias) med obema metodama RT-qPCR.

Analiza Bland-Altman grafa razlik je pokazala, da je srednja vrednost razlik (mean bias) enaka **-0,3156** (95% CI od 0,2551 do 0,3762), meji, kjer se ujema 95 % rezultatov pa sta od **-0,02470** (95% CI od -0,1293 do 0,07987) do **0,6560** (95% CI od 0,5514 do 0,7605). Izračunali smo konverzijski faktor, ki znaša **0,4835**. Izračunali smo ga z anti logaritmiranjem (anti log10) srednje vrednosti razlik, ki je bila -0,3156.



Slika 18: Graf Bland-Altman

Legenda:

- modra polna črta – črta, ki prikazuje srednjo vrednost (mean) razlik med rezultati - log10 razmerja BCR-ABL1/GUSB (%) testne metode in -log10 razmerja BCR-ABL1/ABL1 (% IS) referenčne (primerjalne) metode,
- svetlo rjava črtkana črta – črta enakosti med metodama,

- zeleni črtkani črti – predstavlja 95% interval zaupanja za srednjo vrednost razlik. Če črta enakosti ni v tem intervalu, potem najverjetneje obstaja značilna sistematična razlika med metodama.
- Temnorjavi črtkani črti – srednja vrednost razlik $\pm 1.96 \times$ standardna deviacija razlik,
- roza črtkana črta – regresijska premica razlik,
- svetlo rjava polna krivulja – predstavlja 95% interval zaupanja regresijske premice razlik.

Pri preverjanju ujemanja rezultatov med obema metodama BCR-ABL1/referenčni gen RT-qPCR smo dobili, da je:

- **70,6 % (24/34)** rezultatov vzorcev bolnikov v razponu dvakratnika, to je med 0,5 in 2,0.
- **94,1 % (32/34)** rezultatov vzorcev bolnikov je v razponu trikratnika, to je med 0,33 in 3,0.
- **97,1 % (33/34)** rezultatov vzorcev bolnikov je v razponu petkratnika, to je med 0,2 in 5,0.

5. RAZPRAVA

Metoda RT-qPCR za določanje zlitega gena *BCR-ABL1* pri bolnikih s KML je najpomembnejša metoda za določitev molekularnega odziva na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaze in spremljanje uspešnosti zdravljenja. Zgodnja ocena uspešnosti zdravljenja bolnikov s KML po treh mesecih zdravljenja z zaviralci tirozin kinaze je po zadnjih raziskavah pomemben prognostičen dejavnik tveganja za napredovanje bolezni. V zadnjih raziskavah se kot najprimernejši referenčni gen omenja *GUSB* in ne *ABL1*, ki je sicer najpogosteje uporabljen referenčni gen pri določanju zlitega gena *BCR-ABL1*. Gen *GUSB* predstavlja prednost v tem, da omogoča linearnost metode tudi pri visokem številu kopij prepisa *BCR-ABL1*, in tudi zanesljivejše spremeljanje upada izražanja gena *BCR-ABL1* [32]. Naš cilj je bil v uporabo vpeljati metodo RT-qPCR, pri kateri bi v levkocitih periferne krvi za določanje prepisa *BCR-ABL1* uporabljali referenčni gen *GUSB*. Dela smo se lotili tako, da smo z referenčnimi in kontrolnimi materiali preverili točnost metode, pri kateri smo dobili rezultate za celokupno analitično napako, in sicer 95% interval zaupanja za celokupno analitično napako je med 0,051 in 0,390 za prepis e13a2, ter med 0,087 in 0,263 za prepis e14a2. Tak rezultat nakazuje na to, da je sprememba do skoraj 0,4 log₁₀ vrednosti lahko posledica analitičnih variacij. Ta rezultat je skladen s trditvijo, da mora biti sprememba enaka ali večja od polovice log₁₀, da jo lahko pripisemo biološki variaciji [33]. Pri grafu linearne regresije je vidno, da so podatki linearni (R^2 je 0,999 za prepis e13a2, ter 1,000 za prepis e14a2, kar kaže na popolno ujemanje podatkov z linearno premico). Na zelo močno linearno povezanost podatkov kaže tudi Pearsonov determinacijski koeficient, ki je sicer lahko v razponu od -1 do 1. V našem primeru je Pearsonov koeficient za obe vrsti prepisa v območju zelo močne linearne povezanosti podatkov (0,997 za prepis e13a2, ter 1,000 za prepis e14a2).

Da bi uspešno modificirali metodo RT-qPCR *BCR-ABL1/GUSB*, smo si pri preverjanju natančnosti in linearnosti metode določili mejo za koeficient variacije (KV%) največ 30%, kar je pogosta meja tudi v literaturi. Pri določanju natančnosti metode s ponovljivostjo »v seriji« in »med serijami« meritev, ter pri določanju linearnosti metode smo dobili pričakovane rezultate, ki so bili v skladu s podatki iz literature (KV% je pod 30%).

Pri določanju meje zaznavnosti metode RT-qPCR *BCR-ABL1/GUSB* smo izvedli več ponovitev meritev, da bi pridobili zanesljiv rezultat. Po natančnem pregledu smo za mejo zaznavnosti določili redčitev 10^{-5} , kar je v določeni meri izpolnilo naša pričakovanja, saj

smo želeli, da bi bila meja zaznavnosti med 10^{-4} in 10^{-6} . Meja zaznave 10^{-5} pomeni, da lahko z metodo uspešno in zanesljivo določimo eno levkemično BCR-ABL1 pozitivno celico med 100.000 BCR-ABL1 negativnimi celicami.

Meja kvantifikacije (limit of quantification, LOQ) je najnižja in najvišja koncentracija merjenca (analita), ki jo lahko kvantitativno določimo s sprejeto analitično celokupno napako oz. z 95% intervalom zaupanja za celokupno analitično napako, ki mora biti $<0,5 \log_{10}$. Ker dobljeni rezultati ustrezajo zahtevanim kriterijem, smo za spodnjo mejo meje kvantifikacije postavili redčitev 10^{-5} .

Pri preverjanju linearnosti metode smo po statistični obdelavi podatkov le-te izrisali v obliki grafov, in sicer za prepisa e13a2 in e14a2. Priporočila proizvajalca in literature so, da mora biti za zadostno natančnost metode determinacijski koeficient (stopnja prileganja točk na premico) najmanj 0,98. Primerjali smo linearost metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1 z linearostjo metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB. Rezultati so pokazali, da je metoda RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB linearna v celotnem območju merjenja (R^2 za prepis e13a2 je 0,9956, za prepis e14a2 pa 0,9997), kar smo tudi pričakovali, saj v literaturi navajajo, da je metoda RT-qPCR za merjenje BCR-ABL1, pri kateri kot referenčni gen uporabimo *GUSB*, linearna tudi pri visokih koncentracijah prepisa BCR-ABL1 [32]. Za razliko od metode BCR-ABL1/GUSB smo pri metodi BCR-ABL1/ABL1 dobili rezultate, ki nakazujejo nelinearnost (R^2 za prepis e13a2 je 0,9378, za prepis e14a2 pa 0,9265). Nelinearnost obstoječe metode pri višjih koncentracijah prepisa BCR-ABL1 je znana, zato je dobljeni rezultat pričakovan [32].

Obseg poročanja rezultatov je razpon vrednosti, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost metode, ki določajo, da so napake zaradi nelinearnosti, nenatančnosti in drugih virov znotraj določenih mej. Obseg poročanja rezultatov je torej razpon, v katerem je celokupna analitična napaka znotraj sprejemljivih mej [38]. V našem primeru je 95% interval zaupanja za celokupno analitično napako (CNa95%) v razponu med 0,051 in 0,390 za prepis e13a2 in med 0,087 in 0,263 za prepis e14a2, kar je znotraj zahtevanih mej za našo metodo ($<0,5 \log_{10}$). Na podlagi teh rezultatov smo določili, da je obseg poročanja rezultatov v območju od 10^0 do 10^{-5} za oba prepisa.

Na podlagi dobljenih rezultatov bi bilo bolj smiselno uporabiti metodo RT-qPCR, pri kateri uporabimo referenčni gen *GUSB*, saj bi tako lahko zanesljiveje spremljali odziv na zdravljenje s TKI pri bolnikih s KML. Da bi lahko to metodo uporabili v praksi za spremljanje odziva na zdravljenje, je potrebno določiti konverzijski faktor, s katerim bi

dobljene rezultate podajali na mednarodnem merilu (IS). Za določitev preliminarnega korelacijskega koeficiente smo morali najprej izvesti korelacijo med testno metodo in referenčno metodo in linearno regresijo -log10 razmerja BCR-ABL1/GUSB metode in -log10 razmerja BCR-ABL1/ABL1. Pri korelaciji smo pridobili Pearsonov korelacijski koeficient, ki znaša 0,9736, kar kaže na močno linearno povezanost obeh metod. Rezultat linearne regresije (slika 17) kaže, da je razlika (bias) med premico linearne regresije in premico enakosti konstantna. Dobljen rezultat nam je omogočil, da smo iz podatkov izračunali konverzijski faktor po formuli, ki je zapisana v poglavju Statistična obdelava podatkov. Po pridobitvi koverzijskega faktorja (**0,4835**), smo le-tega uporabili za pretvorbo rezultatov testne metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB na mednarodno merilo, nato pa smo preverili še ujemanje rezultatov testne in referenčne metode.

Ujemanje rezultatov med obema metodama BCR-ABL1/referenčni gen RT-qPCR je sprejemljivo, če sta dosežena dva izmed treh pogojev [41]:

- 50 % rezultatov vzorcev bolnikov je v razponu dvakratnika, to je, ko je razmerje med rezultatom referenčne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/ABL1 IS) in testne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/GUSB IS) med 0,5 in 2,0.
- 75 % rezultatov vzorcev bolnikov je v razponu trikratnika, to je, ko je razmerje med rezultatom referenčne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/ABL1 IS) in testne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/GUSB IS) med 0,33 in 3,0.
- 90 % rezultatov vzorcev bolnikov je v razponu petkratnika, to je, ko je razmerje med rezultatom referenčne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/ABL1 IS) in testne metode (absolutna vrednost -log10 BCR-ABL1/GUSB IS) med 0,2 in 5,0.

V našem primeru so rezultati pokazali, da je ujemanje rezultatov po pretvorbi na mednarodno merilo sprejemljivo, saj smo z metodo izpolnili vse tri pogoje (70,6% rezultatov v razponu dvakratnika, 94,1% rezultatov v razponu trikratnika, 97,1% rezultatov v razponu petkratnika).

Vpeljana analizna metoda je na podlagi dobljenih rezultatov natančna, točna in primerljiva z referenčno metodo določanja, ki se v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana uporablja za spremeljanje uspeha zdravljenja bolnikov s KML. Nova metoda nam omogoča nove možnosti raziskav in ocene zgodnjega uspeha zdravljenja, kar lahko pripomore k natančnejši napovedi nadaljnjega poteka bolezni. Pred dejansko uporabo v praksi pa je potrebno revalidirati dobljen konverzijski faktor.

6. SKLEP

Pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo je potrebno redno spremeljanje učinkovitosti zdravljenja na molekularnem nivoju. V nalogi smo primerjali dve metodi določanja molekularnega produkta značilnega za KML in prišli do naslednjih sklepov:

- Metoda RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB je linearna v območju nad 10% IS, kar smo dokazali z določanjem linearnosti metode in z dobljenim determinacijskim koeficientom, ki je ustrezal priporočilom proizvajalcev.
- Koeficient variacije pri določanju natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB s pomočjo ponovljivosti v seriji in med serijami meritev in pri določanju linearnosti metode je bil manjši od postavljenih 30%, kar pomeni, da smo metodo uspešno modificirali in da so pridobljeni rezultati dovolj natančni.
- Primerjava obstoječe (referenčne) metode in modificirane (testne) metode je omogočila pridobitev konverzijskega faktorja (0,4835), ki smo ga uporabili za pretvorbo rezultatov na mednarodno merilo.
- Ujemanje rezultatov med obema metodama RT-qPCR za določanje prepisa BCR-ABL1 je bilo sprejemljivo, saj smo izpolnili vse postavljene pogoje.
- Pred uporabo RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB v praksi, je potrebno dobljen konverzijski faktor revalidirati.

7. LITERATURA

- [1] Andoljšek D: Interna medicina, 12. poglavje: Bolezni krvi in krvotvornih organov, 4. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2011: 1312-15
- [2] Preložnik-Zupan I, Pajič T et al.: Epidemiološki podatki bolnikov s kronično mieloično levkemijo v Sloveniji (2002-2007). Zdravstveni vestnik 2008; 77: I-51-5
- [3] Koretzky G. A: The legacy of the Philadelphia chromosome. The Journal of Clinical Investigation 2007; 117: 2030-32
- [4] Smith D. L, Burthem J, Whetton D. A: Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. Expert reviews in molecular medicine 2003; 5: 1-18
- [5] Pajič T, Preložnik Zupan I, Grat M, Černelč P: Genetske preiskave pri spremljanju uspeha zdravljenja bolnikov s kronično mieloično levkemijo. Jesenovčevi dnevi 2015
- [6] Deninger W. N. M, Goldman J. M, Melo V. J: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56
- [7] Pendergast A. M et al.: BCR-ABL1-Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein. Cell 1993;75; 175-185
- [8] Bokal U, Južnič-Šetina T: Kronična mieloična levkemija. Onkologija 2012; 16: 10-13
- [9] Löffler H, Rastetter J, Haferlach T: Atlas of Clinical Hematology, 4. poglavje: Blood and Bone Marrow, 6. izdaja, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2005: 144-156
- [10] Kronična mieloična levkemija, Vodnik za bolnike, Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijami 2010: 4-59
- [11] Preložnik-Zupan I, Pajič T: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. Zdravniški Vestnik 2008; 77: I-5-10
- [12] Shtivelman E, Lifshitz B, Gale P. R, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature 1985; 315: 550-54
- [13] Arber A. D, Orazi A, Hasserjian R et. al.: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127: 2391-2405
- [14] Sokal E. J et al.: Prognostic Discrimination in "Good-Risk" Chronic Granulocytic Leukemia. Blood 1984; 63: 789-99
- [15] Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J: Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia. Journal of Hematology & Oncology 2013; 6:54

- [16] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia. V.3.2014. Dosegljivo na: <http://williams.medicine.wisc.edu/cml.pdf>, februar 2017
- [17] Faber E: Prognostic Scoring Systems in CML – Improvement Impossible? J Leuk 2015; S1:001
- [18] Mughal I. T et al.: Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. Haematologica 2016; 101: 541-55
- [19] Pajič T, Marc J, Preložnik-Zupan I: Konična mieločna levkemija. Farmacevtski vestnik 2013; 64: 343-53
- [20] Zaharieva M. M, Amudov G, Konstantinov S. M, Guenova M. L: Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia. Leukemia 2013; InTech. Dosegljivo na: <http://www.intechopen.com/books/leukemia/modern-therapy-of-chronic-myeloid-leukemia>, februar 2017
- [21] Preložnik-Zupan I, Černelč P, Pretnar J, Mastnak-Mlakar D, Enova D: Konična mieločna levkemija, Vodnik za bolnike. Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijo 2012. Dosegljivo na: <http://www.limfom-levkemija.org>, februar 2017
- [22] Jabbour J. E et al.: Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2014; 55: 1451-62
- [23] Baccarani M, Deininger W. M, Rosti G et al.: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood 2013; 122: 872-84
- [24] Drucker B. J, Guilhot F, O'Brien S. G et. al.: Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic-phase shows sustained responses and high overall survival. N Eng J Med 2006; 355: 2404-17
- [25] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A et al.: Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors - recommendations for ‘harmonizing’ current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood 2006; 108: 28-37
- [26] Basic Principles of RT-qPCR, ThermoFisher Scientific. Dosegljivo na: <https://www.thermofisher.com>, februar 2017
- [27] Loftis D. A, Reeves K. W: Principles of Real-Time PCR. Veterinary PCR Diagnostics 2012; 3-17
- [28] Pfaffl W. M: A-Z of quantitative PCR, 3. poglavje: Quantification strategies in real-time PCR. La Jolla, Kalifornija, ZDA 2004; 87-112

- [29] Koch H. W: Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004; 3: 749-61
- [30] White H, Deprez L, Corbisier P et al.: A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2015; 29: 369-76
- [31] Bonecker S, Magnago M, Kaeda J, Solza C, Renault Z. I: Is the BCR-ABL/GUSB transcript level at diagnosis an early predictive marker for chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib? *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; 37: 142-43
- [32] Cross C. P. N: Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best practice & Research Clinical Haematology* 2009; 22: 355-65
- [33] Jennings J. L, Smith A. F, Halling C. K, Persons L. D: Design and Analytic Validation of BCR-ABL1 Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Monitoring Minimal Residual Disease. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 33-40
- [34] Sunhyun A, Young A. L, Wee G. L et. al.: Comparison of an international scale method and a log reduction method for monitoring of early molecular response in chronic myeloid leukemia patients. *Blood Res* 2016; 51: 58-68
- [35] Wang Y. L, Lee Won J et al.: Molecular Monitoring of Chronic Myelogenous Leukemia: Identification of the Most Suitable Internal Control Gene for Real-Time Quantification of BCR-ABL Transcripts. *JMD* 2006; 8: 231-239
- [36] Cross C. P. N et al.: Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Lekukemia* 2015; 29: 999-1003
- [37] Cross C. P. N et al.: Development and evaluation of a secondary reference panel for BCR-ABL1 quantification in the International Scale. *Leukemia* 2016; 30: 1844-52
- [38] Prezelj M: Priporočila za overjanje (verifikacijo) meritnega postopka in instrumenta v kliničnem laboratoriju. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino. 2017; 12: 5-38
- [39] Hanfstein B, Muller M. C, Hehlmann R et. al.: Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012; 26: 2096-2102
- [40] <http://www.biochemia-medica.com/content/what-we-need-know-when-calculating-coefficient-correlation>, avgust 2017
- [41] Branford S, Fletcher L, Cross N. C. P, Muller M. C, Hochhaus A, Kim D. W et al.: Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international

reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. Blood 2008; 112: 3330-38

8. PRILOGE

Tabela XXII: Podatki za izračun točnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e13a2

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/GUSB	% povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB	Standardni odklon \log_{10} razmerja BCR-ABL1/GUSB	\log_{10} % povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB
e13a2 10^0	1,87910	187,910	0,028	2,274
e13a2 10^{-1}	0,17799	17,799	0,081	1,250
e13a2 10^{-2}	0,01506	1,506	0,165	0,178
e13a2 10^{-3}	0,00205	0,205	0,186	-0,689
e13a2 10^{-4}	0,00018	0,018	0,239	-1,757
e13a2 10^{-5}	0,00002	0,002	0,142	-2,717

Tabela XXIII: Podatki za izračun točnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za prepis e14a2

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/GUSB	% povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB	Standardni odklon \log_{10} razmerja BCR-ABL1/GUSB	\log_{10} % povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB
e14a2 10^0	0,53639	53,639	0,046	1,729
e14a2 10^{-1}	0,06595	6,595	0,088	0,819
e14a2 10^{-2}	0,00657	0,657	0,088	-0,182
e14a2 10^{-3}	0,00064	0,064	0,106	-1,196
e14a2 10^{-4}	0,00007	0,007	0,098	-2,155
e14a2 10^{-5}	0,00001	0,001	0,085	-3,165

Tabela XXIV: Podatki za določitev natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za ponovljivost v seriji meritev

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/GUSB	% povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB	Standardni odklon razmerja BCR-ABL1/GUSB	Koeficient variacije razmerja BCR-ABL1/GUSB v %
e13a2 10^{-2}	1,473	147,300	0,0821	5,567
e13a2 10^{-4}	0,017	1,700	0,0034	17,647
e14a2 10^{-2}	1,045	104,500	0,1702	16,270
e14a2 10^{-4}	0,010	1,000	0,0002	2,000

Tabela XXV: Podatki za določitev natančnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB za ponovljivost med serijami meritev

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/GUSB	% povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB	Standardni odklon razmerja BCR-ABL1/GUSB	Koeficient variacije razmerja BCR-ABL1/GUSB v %
e13a2 10-2	1,436	143,600	0,223	15,521
e13a2 10-4	0,018	1,800	0,005	29,742
e14a2 10-2	1,146	114,600	0,185	16,115
e14a2 10-4	0,009	0,900	0,001	9,979

Tabela XXVI: Podatki za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/ABL1

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/ABL1	% povprečja razmerja BCR-ABL1/ABL1	Standardni odklon log10 razmerja BCR-ABL1/ABL1	log10 % povprečja razmerja BCR-ABL1/ABL1
e13a2 100%	5,020	502,000	0,026	2,701
e13a2 50%	4,109	410,900	0,015	2,614
e13a2 25%	3,503	350,300	0,007	2,544
e13a2 12,5%	1,997	199,700	0,005	2,300
e13a2 6,25%	1,200	120,000	0,004	2,079
e14a2 100%	0,862	86,200	0,024	1,936
e14a2 50%	0,830	83,000	0,009	1,919
e14a2 25%	0,681	68,100	0,018	1,833
e14a2 12,5%	0,450	45,000	0,008	1,653
e14a2 6,25%	0,326	32,600	0,018	1,513

Tabela XXVII: Podatki za določitev linearnosti metode RT-qPCR BCR-ABL1/GUSB

	Povprečje razmerja BCR-ABL1/GUSB	% povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB	Standardni odklon log10 razmerja BCR-ABL1/GUSB	log10 % povprečja razmerja BCR-ABL1/GUSB
e13a2 100%	1,917	191,700	0,018	2,283
e13a2 50%	1,106	110,600	0,045	2,044
e13a2 25%	0,461	46,100	0,042	1,664
e13a2 12,5%	0,209	20,900	0,038	1,319
e13a2 6,25%	0,103	10,300	0,027	1,015
e14a2 100%	0,556	55,600	0,022	1,745
e14a2 50%	0,317	31,700	0,019	1,501
e14a2 25%	0,172	17,200	0,028	1,325
e14a2 12,5%	0,099	9,900	0,043	0,997
e14a2 6,25%	0,056	5,600	0,017	0,750