

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA KRAJNČIČ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA KRAJNČIČ

**UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE
APOPTOZE PRI DISEMINIRANEM PLAZMOCITOMU**

**APOPTOSIS DETECTION BY FLOW CYTOMETRY IN
MULTIPLE MYELOMA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko naložbo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Zahvala

Najlepša hvala celotnemu osebju Specializiranega hematološkega laboratorija na Polikliniki. V prvi vrsti bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Petru Černelču in somentorici doc. dr. Heleni Podgornik za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala gre Katarini Trdina za potrpežljivost, svetovanje in veliko pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Hvala Katji in Urošu za vse nasvete in pomoč pri oblikovanju diplomske naloge. Najlepše se zahvaljujem tudi prijateljem za sproščene trenutke ob študiju ter seveda svojim staršem in bratu, ki so vedno verjeli vame in mi nudili vso podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Ljubljana, 2008

VSEBINA

<u>POVZETEK.....</u>	V
<u>SEZNAM OKRAJŠAV.....</u>	VI
<u>1 UVOD.....</u>	1
1.1 KOSTNI MOZEG IN MATIČNE KRVNE CELICE	1
1.2 LIMFOCITI B IN PLAZMATKE	1
1.2.1 RAZVOJ IN NASTANEK PLAZMATK	2
1.2.2 TARČE PRI RAZVOJU IN NAPREDOVANJU PLAZMOCITOMA	3
1.3 PLAZMOCITNE NOVOTVORBE.....	4
1.3.1 DISEMINIRANI PLAZMOCITOM	5
1.3.2 MONOKLONSKA IMUNOGLOBULINEMIJA NEOPREDELJENEGA POMENA (MINP)	9
1.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT.....	10
1.4.1 POMEN APOTOZE	10
1.4.2 KASPAZE	11
1.4.3 POTEK IN URAVNAVANJE APOTOZE.....	11
1.5 NEKROZA	14
1.6 ARZENOV TRIOKSID PRI ZDRAVLJENJU BOLNIKOV S PLAZMOCITOMOM.	14
1.6.1 ARZENOVE SPOJINE ZA ZDRAVLJENJE NOVOTVORB V PRETEKLOSTI.....	15
1.6.2 MEHANIZEM DELOVANJA ARZENOVEGA TRIOKSIDA	16
1.6.2.1 Vpliv arzena na celično signaliziranje	16
1.6.2.2 Vpliv arzena na oksidacijsko-redukcijsko ravnotežje in celični odziv na stres	17
1.6.3 NEŽELENI UČINKI ARZENOVEGA TRIOKSIDA PRI ZDRAVLJENJU BOLNIKOV S PLAZMOCITOMOM.....	18
1.7 KAMPTOTECIN IN APOTOZA.....	19
1.8 DOLOČANJE APOTOZE S PRETOČNIM CITOMETROM	19
1.8.1 OSNOVE PRETOČNE CITOMETRIJE	19
1.8.2 UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE APOTOZE	21
1.8.3 MONOKLONSKA PROTITELESA ZA OZNAČEVANJE PLAZMATK.....	22
<u>2 NAMEN DELA</u>	23
<u>3 MATERIALI IN METODE.....</u>	24

3.1	PREISKOVANCI	24
3.2	OPREMA.....	24
3.3	METODE.....	25
3.3.1	GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA	25
3.3.1.1	Priprava vzorca za gojenje celic kostnega mozga.....	25
3.3.1.2	Gojenje celic kostnega mozga ob prisotnosti arzenovega trioksida in kamptotecina	26
3.3.2	OSAMITEV MONONUKLEARNIH CELIC PREKO FIKOLA	28
3.3.3	LIZA ERITROCITOV S HIPOTONIČNO RAZTOPINO	29
3.3.4	PRIPRAVA CITOCENTRIFUG	29
3.3.5	DOLOČANJE APOPTOZE S PRETOČNIM CITOMETROM	30
3.3.5.1	Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Annexin V- FITC Kit.....	31
3.3.5.2	Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit	34
3.3.5.3	Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Vybrant® Apoptosis Assay Kit #4	37
3.3.6	VREDNOTENJE REZULTATOV	39
4	<u>REZULTATI IN RAZPRAVA</u>	<u>40</u>
4.1	ZAMEJITEV USTREZNE POPULACIJE PRI PRETOČNI CITOMETRIJI	40
4.1.1	NATIVNA POPULACIJA.....	40
4.1.2	OZNAČEVANJE S PROTITELESOM CD138-PE	41
4.1.3	LIZA ERITROCITOV S HIPOTONIČNO RAZTOPINO IN OZNAČEVANJE S PROTITELESOM CD138-PE	43
4.1.4	LOČBA MONONUKLEARNIH CELIC PREKO FIKOLA IN OZNAČEVANJE S PROTITELESOM CD138-PE	44
4.2	UPORABA KAMPTOTECINA KOT POZITIVNE KONTROLE.....	47
4.2.1	UPORABA KAMPTOTECINA PRI METODI Z ANEKSINOM.....	47
4.2.2	VPLIV ČASA GOJENJA S KAMPTOTECINOM NA OBSEG APOPTOZE PRI METODAH ANEKSIN, FAM IN KIT4	49
4.3	OCENA INDUKCIJE APOPTOZE Z ARZENOVIM TRIOKSIDOM PRI VSEH TREH METODAH.....	52
4.3.1	VPLIV ZAČETNE KONCENTRACIJE IN ČASA GOJENJA Z ARZENOVIM TRIOKSIDOM	53
4.3.2	PRIMERJAVA METOD ANEKSIN, FAM IN KIT4 ZA OCENO INDUKCIJE APOPTOZE Z ARZENOVIM TRIOKSIDOM	54
5	<u>SKLEP</u>	<u>60</u>

6	LITERATURA.....	62
7	PRILOGA.....	I
	PRILOGA 1.....	I
	PRILOGA 2.....	III

POVZETEK

Arzenov trioksid (ATO) se za zdravljenje uporablja že več kot tisoč let. V zadnjih desetletjih je doživel preporod na področju hematoloških malignih obolenj. Dokazano učinkovit je pri zdravljenju akutne promielocitne levkemije. Nedavne raziskave poročajo o učinkovitosti zdravljenja plazmocitoma z ATO. ATO se pri zdravljenju plazmocitoma uporablja kot netradicionalno citotoksično zdravilo, ki je še vedno predmet raziskav, saj njegov mehanizem delovanja ni povsem pojasnjen. Eden izmed načinov delovanja ATO je tudi sprožitev apoptoze ali programirane celične smrti.

Vpliv ATO na apoptizo smo proučevali na vzorcih kostnega mozga (KM) bolnikov z diseminiranim plazmocitomom (DP), monoklonsko imunoglobulinemijo neopredeljenega pomena (MINP), bolnikov z reaktivnimi spremembami KM in oseb z normalnim KM. Za pozitivno kontrolo smo izbrali kamptotecin (KPT), ki je induktor apoptoze. Apoptizo smo določili s tremi reagenčnimi kompleti in pretočnim citometrom. Želeli smo izbrati najboljšo metodo za določanje apoptoze inducirane z ATO. Z metodo Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter[®]) smo določili indukcijo apoptoze z ATO pri bolnikih z DP. Pozitivna kontrola s KPT je bila ustrezna. Z metodo Vybrant[®] FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Molecular Probes[®]) indukcije apoptoze z ATO nismo določili. Metoda se je izkazala kot neprimerena za določanje apoptoze na *ex vivo* kulturah KM. Neustrezna je bila tudi pozitivna kontrola s KPT. Tudi z metodo Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes[®]) indukcije apoptoze z ATO pri bolnikih z DP nismo uspeli določiti. Potrebni bi bili daljši časi inkubacije, saj je tudi pozitivna kontrola s KPT ustrezna le pri daljšem času izpostavitve celic induktorju apoptoze.

Z uporabo monoklonskega protitelesa CD138-PE smo poskusili ločiti populacijo plazmocitomskih celic od drugih celic KM. Vendar je bila vezava šibka, ker so postopek motile razpadle celice. Z ločbo preko fikola smo ločili mononuklerne celice od celičnega debrija, kar je izboljšalo vezavo protitelesa CD138-PE, a smo dobili premalo celic, da bi nadaljevali s poskusi. Protitelesa CD138-PE v nadaljnjih poskusih zato nismo več uporabljali.

SEZNAM OKRAJŠAV

Aneksin	reagenčni komplet Annexin V-FITC (Beckman Coulter®)
AIF	faktorji, ki sprožijo apoptozo (apoptosis inducing factor)
APL	akutna promielocitna levkemija
ATO	arzenov trioksid
BH	homologne domene
CD	Cluster of Differentiation- označevanje antigenov na površini posameznih celic
CR	popolna remisija
DD	domena smrti
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DP	diseminirani plazmocitom
FAM	reagenčni komplet Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Molecular Probes®)
FITC	fluorescein izotiocianat
GSH	reduciran glutation
IAP	proteini, ki inhibirajo apoptozo (inhibitor of apoptosis)
Ig	imunoglobulin
IGF-I	inzulinu podoben rastni faktor-I
IL-6	interlevkin-6
KIT4	reagenčni komplet Vybrant® Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes®)
KM	kostni mozeg
KMA	gojišče Amniomed
KMM	gojišče Marrow Max
KPT	kamptotecin
mIg	monoklonski imunoglobulin
MINP	monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena
NF-κB	jedrni faktor κB

PE	fikoeritrin
PI	propidijev jodid
PS	fosfatidilserin
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TGF- β	transformirajoči rastni faktor β
TNF	dejavnik tumorske nekroze
VEGF	žilni endotelijski rastni faktor

1 UVOD

1.1 KOSTNI MOZEG IN MATIČNE KRVNE CELICE

Vse krvne celice nastajajo pri človeku v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu. Pri odraslem človeku sta to rdeči kostni mozeg (KM) in limfatično tkivo. Pri zdravem človeku nastajajo eritrociti, granulociti, monociti in megakariociti samo v KM, kjer nastajajo tudi limfociti. V makrofagih KM in v makrofagih drugje v telesu razpadajo ostarele krvne celice.

KM je v kosteh že v petem fetalnem mesecu. Ob rojstvu je rdeči, po četrtem letu starosti pa ga začne nadomeščati rumeni, ki ga tvorijo predvsem maščobne celice. Pri zdravem odraslem človeku je rdeči KM v vretencih, rebrih, lobanji, medenici in proksimalnih epifizah stegnenic in nadlahtnic.

Osnovna matična celica je pluripotentna. Z delitvijo se obnavlja, po drugi strani pa zori v multipotentne matične celice. Poznamo dve vrsti multipotentnih matičnih celic, mieloične in limfatične. Multipotentna matična celica zori v usmerjene matične celice rdeče vrste, nevtrofilno-monocitne, eozinofilne in bazofilne vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz teh se po več zaporednih delitvah in z zorenjem razvijejo zrele krvne celice, ki se izplavijo v kri. Iz multipotentne matične celice limfatične vrste se razvijejo med posebnim procesom zorenja, ki poteka v limfatičnem tkivu, limfociti vrste B in T ter plazmatke. Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano in omogoča stalno in enakomerno nadomeščanje propadlih krvnih celic (1).

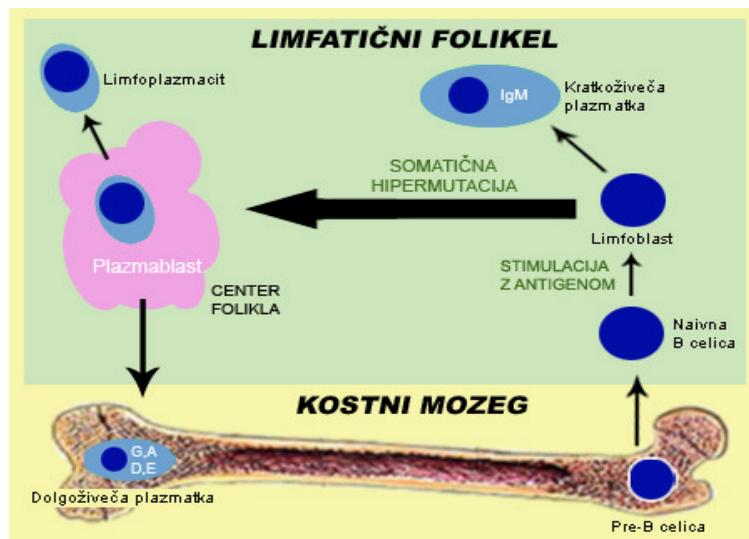
1.2 LIMFOCITI B IN PLAZMATKE

Celice B (B od »bone marrow« ali »bursa Fabricii«) nastajajo iz hematopoetskih matičnih celic v KM. Receptor za antigen na celicah B je na membrano vezano protitelo. Ko »naivne« celice B prvič srečajo antigen, se začnejo hitro razmnoževati. Njihove potomke zorijo v mirujoče spominske celice B in efektorske celice B, ki jih imenujemo plazmatke. Plazmatke izločajo v kri in limfo velike količine protiteles. Protitelesa so beljakovine (glikoproteini), sestavljeni iz dveh dolgih, težkih verig in dveh krajsih, lahkih verig. Glede na osnovne biokemijske in funkcijске lastnosti razvrščamo protitelesa v pet razredov. Poznamo protitelesa IgA, IgG, IgM, IgE in IgD. Protitelesa IgA izločajo pretežno

plazmatke v sluznicah. IgA ob vezavi s tujkom ne sprožijo vnetja, ampak omogočijo odstranitev tujka iz telesa. IgG in IgM se izločajo pretežno v kri in sprožijo ob vezavi na tujek vnetno reakcijo, ki ga uniči in pospeši njegovo odstranitev iz telesa. IgE ščitijo pred paraziti in sodelujejo pri vnetnih reakcijah. IgD se nahajajo v krvi, njihove vloge pa še ne poznajo (2, 3).

1.2.1 Razvoj in nastanek plazmatk

V fizioloških pogojih nezreli limfociti B zorijo v KM po preureditvi genov za težke in lahke verige imunoglobulinov. Po ekspresiji funkcionalnega Ig na površini in zorenju, celica kot zrel limfocit B potuje do sekundarnega limfatičnega folikla, v katerem stimulacija z antigenom povzroči delitev in zorenje do plazmablastov. Limfoblasti zorijo do plazmatk, ki ponavadi proizvajajo IgM. Z antigenom vzpodbujene celice B lahko prav tako vstopijo v centre foliklov limfnih vozlov, kjer pride do aktivne hipermutacije preurejenih sekvenc Ig genov. Ta proces ima za posledico selekcijo določenega klena, ki izraža Ig z veliko afiniteto. Plazmablasti folikelnega centra preusmerijo izločanje Ig iz IgM v IgG, IgA, IgD ali IgE, nato pa potujejo v KM, kjer se preobrazijo v dolgoživeče plazmatke.



Slika 1: Razvoj normalnih plazmatk (4).

Pri plazmocitomu imajo maligne celice lastnosti normalnih dolgoživečih plazmatk, vključno z izražanjem receptorja za CD138, visokim izražanjem CD38 in drugih heterogenih imunofenotipskih označevalcev. Plazmocitomske celice imajo veliko somatskih hipermutacij spremenjenih Ig genov, vendar ni dokazano, da ta proces poteka

pri plazmocitomu. Neoplastični klon pri plazmocitomu najverjetneje izvira iz B celic podvrženih selekciji antigenov in Ig podobnemu dozorevanju, kar kaže na to, da klon izhaja iz B celic, ki so zapustile zarodno središče (4).

1.2.2 Tarče pri razvoju in napredovanju plazmocitoma

Patofiziologija plazmocitoma je zapletena. Vključuje veliko poti, interakcij med citokini, adhezijo molekul, angiogenezo in mehanizme rezistence.

Pri plazmocitomu se maligne plazmatke nahajajo večinoma v KM. Preko celične adhezije in izločanja citokinov pride do medsebojne interakcije malignih plazmatk s stromalnimi celicami. Aktivacija osteoklastov in drugih stromalnih celic povzroča razrast plazmocitomskih celic. Citokini vplivajo na delitev in večanje klena plazmocitomskih celic. Citokine izločajo stromalne celice KM po adheziji plazmatk nanje. Stromalne celice KM izločajo naslednje citokine: interleukin-6 (IL-6), tumorje nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), inzulinu podoben rastni faktor-I (IGF-I), transformirajoči rastni faktor β (TGF- β) in žilni endotelijski rastni faktor (VEGF). IL-1 β aktivira osteoklaste in poveča izločanje IL-6. IL-6 je najpomembnejši citokin patogeneze plazmocitoma. Spodbuja razmnoževanje, inhibira apoptozo in omogoča rast ter preživetje plazmatk. Serumske koncentracije IL-6 se skladajo s serumskimi koncentracijami C-reaktivnega proteina, ki je pomemben napovedni dejavnik pri plazmocitomu. TNF- α prav tako poveča izločanje IL-6 s stimulacijo od jedrnega faktorja kB (NF- κ B) odvisnega IL-6 izločanja in zvečanjem koncentracije adhezijskih molekul v plazmocitomskih in stromalnih celicah KM. IGF-I povzroči delitev, migracijo plazmocitomskih celic in njihovo odpornost na zdravljenje. TGF- β stimulira izločanje IL-6 iz stromalnih celic KM. Drugi pomembni citokini KM, ki vplivajo na preživetje in rast plazmatk so: granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (G-CSF), interferon α (INF- α), interleukin-10 (IL-10), interleukin-3 (IL-3) in drugi.

Mehanizem angiogeneze pri plazmocitomu ni natančno raziskan. Pri angiogenezi imata pomembno vlogo fibroblastni rastni faktor (bFGF) in VEGF. VEGF se nahaja v aspiratu KM bolnikov s plazmocitomom, izločajo ga tako plazmocitomske celice kot tudi stromalne celice KM. Stimulira angiogenezo, delitev plazmocitomskih celic in izločanje citokinov v mikrookolju KM.

Plazmocitomske celice so rezistentne na kemoterapijo. Mehanizmi kemorezistence so lahko posledica povečanega izražanja proteinov odgovornih za preživetje plazmatk (IL-6) in/ali proteinov, ki inhibirajo apoptozo (NF-κβ, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) ter zmanjšanega odziva na inhibitorne proteine (TNF-β) (5, 6).

1.3 PLAZMOCITNE NOVOTVORBE

Plazmocitne novotvorbe nastanejo kot posledica nekontrolirane razrasti limfocitov vrste B, ki so skoraj dosegli zrelost plazmatke in proizvajajo monoklonski Ig (mIg) ali pa le del molekule. Posledica monoklonske maligne proliferacije plazmatk sta plazmocitom in plazmacelična levkemija, posledica proliferacije plazmatk in limfocitov pa Waldenströmova makroglobulinemija in bolezen težkih verig. Monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena (MINP) je posledica premaligne delitve plazmatk. Med bolezni plazmatk uvrščamo še bolezni zaradi odlaganja Ig v tkiva, kot so primarna amiloidoza, bolezni odlaganja luhkih in težkih verig Ig (1).

Preglednica I: Plazmocitne novotvorbe (1).

Diseminirani plazmocitom
◆ nesekrecijski plazmocitom
◆ indolentni plazmocitom
◆ tleči plazmocitom
◆ plazmacelična levkemija
Omejeni plazmocitom
◆ solitarni plazmocitom kosti
◆ solitarni plazmocitom mehkih tkiv
Bolezen z odlaganjem monoklonskega imunoglobulina
◆ primarna amiloidoza
◆ bolezen odlaganja luhkih in težkih verig imunoglobulinov
Osteosklerotični plazmocitom (POEMS)
Bolezen težkih verig
◆ bolezen težkih verig γ
◆ bolezen težkih verig μ
◆ bolezen težkih verig α

1.3.1 Diseminirani plazmocitom

Definicija bolezni

Plazmocitom je maligna novotvorba. Nastane iz limfocitov vrste B, ki so skoraj dosegli zrelost plazmatke. Najbolj pogosta oblika je diseminirani plazmocitom (DP). Zanj je značilno otočkasto ali diseminirano razraščanje plazmocitomskih celic v KM. DP je klonska bolezen. Iz ene maligno spremenjene celice nastane klon plazmocitomskih celic, ki proizvajajo Ig določenega razreda ali del njegove molekule. Imenujemo ga monoklonski Ig (mIg). Glede na razred mIg ločimo več vrst DP: IgG, IgA, IgD in IgE. Najpogostejsa sta IgG in IgA. IgG ima 60-70% bolnikov, IgA pa 20% bolnikov obolelih za DP. IgD in IgE tip plazmocitoma sta redka.

Če klon plazmocitomskih celic izloča pretežno lahke verige lambda (λ) ali kapa (κ), ki se zaradi majhne molekulske mase izločajo skozi ledvice, govorimo o Bence-Jonesovi vrsti DP. V redkih primerih plazmocitomske celice ne izločajo mIg (nesekrecijski DP). DP prizadene predvsem rdeči KM ploščatih kosti vretenc, reber, glave, medenice, stegnenic, ključnic in lopatic (1, 7, 8).

Prevalenca

DP je bolezen starejših ljudi. Najpogosteje zbolevajo bolniki med 60. in 70. letom. 47% bolnikov je starejših od 70 let, 75% je starih nad 60 let. Moški zbolevajo nekoliko bolj pogosto kot ženske. Za DP zbolijo letno 3 do 4 bolniki na sto tisoč prebivalcev. Po podatkih Registra raka za Slovenijo letno za DP zboli okoli 80 bolnikov, prevalenca te bolezni v Sloveniji pa je okoli 230 bolnikov (7, 9, 10).

Etiologija bolezni

Vzroka za nastanek plazmocitoma ne poznamo. K nastanku bolezni prispevajo: starost, rasa, dolgotrajno izpostavljanje kemikalijam in sevanju, nekateri virusi ter druge bolezni plazmatk (8).

Klinična slika

Klinična slika je posledica:

- ◆ osteoporoze ali osteolize kosti z ali brez hiperkalciemije (plazmocitomske celice izločajo citokin, ki spodbudi osteoklaste k večji dejavnosti)
- ◆ odpovedi KM (anemija)
- ◆ pomanjkljive imunske odzivnosti (pogoste okužbe, predvsem pljučnica)
- ◆ okvare ledvične funkcije (zaradi lahkih verig, ki se iz seča resorbirajo v epitelijskih celicah ledvičnih kanalov in jih okvarijo; zaradi povečane koncentracije kalcija ter sečne kisline; zaradi odlaganja amiloida v glomerulih)
- ◆ kopičenja mIg (amilidoza, krioglobulinemija in sindrom povečane viskoznosti krvi, ki povzroča motnje v krvnem obtoku in v hemostazi).

Prvi znak bolezni je lahko ledvična odpoved (akutna ali kronična). Nekateri bolniki so brez simptomov. Pri takih bolnikih bolezen ugotovimo slučajno, zaradi drugih preiskav (močno pospešena sedimentacija) (1, 7).

Po Durie-Salmonu razdelimo DP v 3 klinične faze bolezni (faza I, II in III). Razvrščanje bolnikov v faze je odvisno od: koncentracije mIg, števila kostnih sprememb, koncentracije hemoglobina in serumske koncentracije kalcija. Nov, preprostejši in cenejši način razvrščanja je ISS (International Staging System). Temelji na določanju koncentracije β_2 -mikroglobulina in albumina (8).

Diagnoza

Običajno potrdimo diagnozo DP, če ugotovijo mIg v serumu ali urinu in/ali osteolize ter povečano število plazmocitomskih celic v KM. Za potrditev diagnoze plazmocitoma je potreben vsaj en velik in en mali znak ali trije mali znaki, vendar obvezno prva dva (preglednica II).

Preglednica II: Diagnostična merila za diseminirani plazmocitom (1).

Veliki znaki	Mali znaki
<ul style="list-style-type: none"> ◆ 30% plazmocitomskih celic v KM ◆ plazmocitomski infiltrat potrjen z biopsijo tkiva ◆ mIg: <ul style="list-style-type: none"> - serum; IgG > 35g/L IgA > 20g/L - urin; > 1g/24h Bence-Jones beljakovine 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 10-30% plazmocitomskih celic v KM ◆ mIg je prisoten, a v manjši koncentraciji ◆ osteolitične spremembe kosti ◆ zmanjšana koncentracija normalnih Ig (< 50% normalne): <ul style="list-style-type: none"> - IgG < 6 g/L - IgA < 1g/L - IgM < 0,5 g/L

V krvni sliki je lahko normocitna ali normokromna anemija, nevtropenia, trombocitopenija in izjemoma majhen delež plazmocitomskih celic.

mIg se pojavi pri 99% bolnikov z DP. mIg v serumu ali urinu ugotovimo z elektroforezo. Koncentracija normalnih Ig je pri večini bolnikov z DP zmanjšana za več kot 50%. Količino v urinu izločenih luhkih verig določimo neposredno s 24-urnim zbiranjem urina ali posredno, z izračunom količnika med koncentracijama mIg in kreatinina v naključnem vzorcu urina. Vedno bolj se uveljavlja določanje prostih luhkih verig v serumu in izračun količnika kappa/lambda.

Čeprav citološki pregled punktata KM zadošča za potrditev diagnoze, priporočajo, da se napravi biopsija, ki pokaže stopnjo infiltracije in je izhodišče za kasnejšo oceno uspešnosti zdravljenja. Pri DP je v KM več kot 30% plazmocitomskih celic. Od zrelih plazmatk se plazmocitomske celice ločijo po tem, da ima njihovo jedro rahlo kromatinsko zgradbo, jedrca so običajno večja in svetlejša, citoplazma je sivkastomodra in svetlejša, v nekaterih celicah so različni vložki (Russelova telesca). Pri 10% bolnikov se kopičijo pretežno nezreli plazmoblasti. Potez bolezni je pri njih neugoden. Če delež plazmatk v KM ne presega 20%, upoštevamo predvsem morfološke značilnosti celic, da ločimo plazmocitom od reaktivne plazmocitoze.

Spremembe skeleta ocenujemo na rentgenogramih glave, hrbtenice, medenice in gornje tretjine stegnenic. Pri večini ugotovimo difuzno osteoporozo vsega skeleta. Za natančnejšo oceno sprememb v skeletu in mehkih tkivih je potrebno napraviti računalniško tomografijo ali magnetno resonanco. Pozitronska emisijska tomografija omogoča prikaz skeletne in ekstramedularne razširjenosti plazmocitoma. Določitvi koncentracij β_2 -mikroglobulina in albuminov sta pomembni za oceno napovedi izida bolezni. Večja koncentracija β_2 -mikroglobulina in manjša koncentracija serumskega albumina pomenita slabši izid bolezni.

Napovedni pomen imajo tudi citogenetske spremembe. Strukturne in številčne kromosomske nepravilnosti najdemo pri 30 do 40% bolnikov ob ugotovitvi DP, 60 do 70% pa pri napredovanju bolezni. Monosomijo ali delno delecijo kromosoma 13 (13q14) ugotovimo pri 15 do 40% bolnikov. Kromosomska motnja napoveduje neugoden potek bolezni, prav tako delecija gena *p53* na kromosому 17 (17p13) (1, 7).

Preglednica III: Preiskave ob ugotovitvi DP (7).

Klinični pregled

Celotna krvna slika

Koncentracija kreatinina in kalcija v serumu

Elektroforeza in imunofiksacija beljakovin v serumu

Kvantitativna določitev imunoglobulinov z nefelometrijo

Elektroforeza in imunofiksacija beljakovin v urinu

Proste lahke verige v serumu

Punkcija in biopsija KM (citogenetika, patohistologija, citomorfologija)

Računalniška tomografija, magnetnoresonančno slikanje, pozitronska emisijska tomografija

β_2 -mikroglobulin, albumini (C-reaktivni protein, laktat dehidrogenaza)

Progonza

DP je neozdravljiva bolezen. Potez je različen. Nekateri bolniki umrejo v nekaj tednih, kjub zdravljenju. Pri drugih je potek počasen in živijo več kot 10 let. Prognoza je odvisna od razvojne stopnje, ledvičnega delovanja, uspešnosti zdravljenja in naravnega poteka bolezni. Bolnik običajno umre zaradi okužbe ali ledvične odpovedi (1, 7).

Zdravljenje

Cilj zdravljenja je podaljšati preživetje in izboljšati kakovost življenja. To dosežemo s kombinacijo specifičnega proti plazmocitomu usmerjenega zdravljenja (kemoterapija) in podpornega zdravljenja.

V sklopu specifičnega proti plazmocitomu usmerjenega zdravljenja razlikujemo začetno zdravljenje in zdravljenje neodzivnosti (refraktarnost) ali ponovitve bolezni (relapsa). Razlikujemo dve vrsti začetnega zdravljenja: standardno zdravljenje in zdravljenje z velikimi odmerki citostatikov. Bolnike, starejše od 65 let zdravimo na standardni način s citostatiki (melfalan in ciklofosfamid), včasih tudi s kombinacijo citostatikov in glukokortikoidov (prednizolon). Glukokortikoidi zmanjšajo resorpcijo kosti, saj blokirajo aktivacijo osteoklastov. Pri bolnikih z ledvično odpovedjo zdravijo s kombinacijo vinkristin, doksorubicin in deksametazon (VAD). Bolnikom do 65. leta starosti se priporoča zdravljenje z velikimi odmerki citostatikov in avtologna presaditev krvnih matičnih celic. Relaps bolezni zdravijo s talidomidom, lenalidomidom v kombinaciji z deksametazonom. Inhibitor proteosomov bortezomib je učinkovito novo zdravilo posebno pri bolnikih z napredovalim ledvičnim popuščanjem.

Podporno zdravljenje z bisfosfonati je namenjeno preprečevanju skeletnih sprememb in zdravljenju hiperkalciemije (7, 9).

1.3.2 Monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena (MINP)

Ugotovimo jo pri skoraj 1% zdravih oseb starejših od 50 let in 3% pri starejših od 70 let. Nimajo težav, kot tudi ne znakov bolezni in sprememb v skeletu. Pri bolnikih z MINP je monoklonski IgG prisoten pri 75%, IgM pri 15% in IgA pri 10% bolnikov. V serumu je koncentracija monoklonskega IgG do 35 g/L ali IgA do 20 g/L. Izločanje lahkih verig z urinom je < 1g/24 ur. Koncentracija normalnih Ig v serumu ni zmanjšana. V KM je manj kot 10% plazmatk. V večini od njih potrdimo mIg, nekatere plazmatke pa so normalne.

Pri približno četrtni bolnikov MINP po 20 letih preide v DP, primarno amiloidozo, makroglobulinemijo ali drugo imunoproliferativno bolezen, ne glede na vrsto Ig (1).

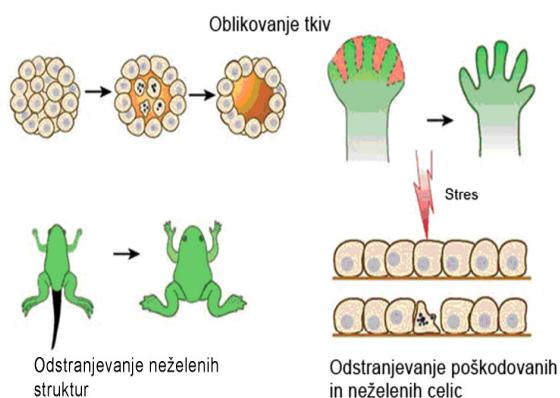
1.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT

Kerr je leta 1972 prvi opisal apoptozo. Sinonim za apoptozo je programirana celična smrt, saj je smrt posledica uravnavane aktivacije zapisane v genomu. Celica obsojena na smrt s pomočjo sosednjih celic in/ali humoralnih faktorjev uravnava program celične smrti. Apoptoza pogosto označimo kot samomor celice. V procesu apoptoze pride do morfoloških sprememb celice, ki so: skrčenje celice, kondenzacija kromatina, fragmentacija jedra, mehurčki na membrani, tvorba apoptotskih teles in spremembe na površini celične membrane, ki omogočajo fagocitozo celice (11, 12).

1.4.1 Pomen apoptoze

Apoptoza ima pomembno vlogo v embrionalnem razvoju, homeostazi tkiv, sprožijo pa jo tudi bolezenska stanja (13).

Sodeluje pri razvoju telesnih votlin, oblikovanju prstov, odstranjuje neželene strukture embriogeneze in celice poškodovane zaradi genetskih napak, staranja, bolezni ali izpostavljenosti drugim škodljivim dejavnikom (slika 2). Pomembna je tudi za uravnavanje imunskega sistema. Odstrani vse okužene in neustrezne limfocite T, preden ti vstopijo iz timusa v kri (11, 12).



Slika 2: Pomen apoptoze pri različnih procesih (11).

Motnje in okvare apoptoze vodijo v bolezenska stanja. Premalo ali preveč apoptoze je vpleteno v več kot polovico vseh bolezni. Izguba telesnih celic zaradi prekomernih apoptotskih procesov je povezana s kapjo, oslabitvijo in zatojem delovanja srca, nevrološkimi motnjami, nevrodegeneracijo (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen) ter s

sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS). Nezmožnost odstranitve okvarjenih in mutiranih celic zaradi napak v (ne)poteku apoptotskih procesov pa je značilnost avtoimunih in malignih obolenj (14).

1.4.2 Kaspaze

Kaspaze so cisteinske proteinaze. V celici se sintetizirajo kot neaktivni proencimi. Odgovorne so za aktivacijo celičnih proteaz in endonukleaz. Do aktivacije kaspaz pride v zgodnji fazi apoptoze. Aktivira jih autoproteolitična cepitev ali cepitev drugih kaspaz. Kaspaze prepoznavajo specifična tetrapeptidna zaporedja proteinov in cepijo peptidno vez na C-terminalni strani aspartatnega ostanka znotraj tetrapeptidnih zaporedij. Pri tem ima velik pomen za specifičnost proteolize aminokislinski ostanek na prvem mestu v tetrapeptidnem zaporedju. Aktivirane kaspaze cepijo celične molekule potrebne za normalne celične funkcije. Cepijo strukturne proteine citoskeleta in proteine jedra (encime, ki popravljajo DNK), lahko pa aktivirajo tudi druge encime na primer deoksiribonukleaze, ki cepijo DNK v jedru. Pri sesalcih je poznanih 14 različnih kaspaz, od tega jih je sedem vpletenih v proces apoptoze. Kaspaze delimo na sprožitvene in izvrševalne (12, 15, 16, 17).

1.4.3 Potek in uravnavanje apoptoze

Apoptizo celice sprožijo različni mehanizmi. Občutljivost celice na signale, ki sprožijo apoptizo je različna. Odvisna je od izražanja proapoptotičnih in antiapoptotičnih proteinov, od signala samega in od faze celičnega cikla.

Glavni signali, ki sprožijo apoptizo so:

- ◆ virusne okužbe
- ◆ celični stres
- ◆ poškodba DNK

V nekaterih primerih apoptizo sprožijo zunanji signali. Ligandi, ki sprožijo smrt se vežejo na površino celičnih receptorjev imenovanih receptorji smrti. Znotrajcelični signali, ki sprožijo apoptizo so povezani z mitohondrijem in jih povzroča celični stres (radiacija,

kemikalije, virusne okužbe). Celični stres je lahko tudi posledica izgube rastnih faktorjev ali oksidativnega stresa zaradi prostih radikalov (12).

Proces apoptoze se torej vrši preko dveh glavnih poti, ki vodita v aktivacijo kaspaz. Prva pot poteka preko receptorjev smrti, druga vključuje mitohondrij (slika 3). Pot receptorjev smrti začne vezava članov družine dejavnika tumorske nekroze (TNF). Fas ligand (FasL), TNF- α in TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) se vežejo na receptor smrti na celični membrani. Receptorji za te ligande so Fas, TNFR1 (TNF receptor 1) in DR4/DR5. Sestavljeni so iz zunajcelične s cisteinom bogate domene in homologne citoplazemske domene smrti (DD). Vezava ligandov na receptorje smrti poveže adaptorni protein FADD (Fas associated death domain) in/ali TRADD (TNFR-1-associated death domain) s kaspazo-8 v kompleks, ki sproži proteolitično aktivacijo kaspaze-8. Kaspaza-8 aktivira izvrševalne kaspaze-3 in -7 (18).

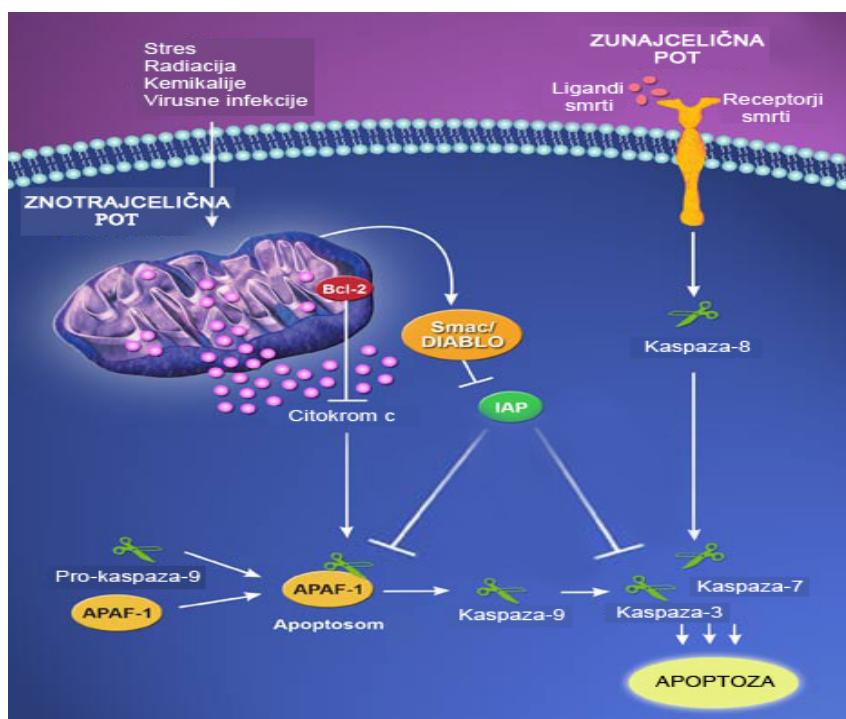
Mitohondrijsko pot uravnavajo člani družine Bcl-2, ki jo sestavljajo proapoptotski in antiapoptotski proteini. Vsi vsebujejo vsaj eno od štirih ohranjenih Bcl-2 homolognih domen (BH). Bcl-2 proteine razdelimo v 3 razrede:

- ◆ antiapoptotski proteini, ki imajo ohranjene vse štiri domene BH (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1)
- ◆ proapoptotski proteini, ki vsebujejo tri domene BH1-BH3 (Bak in Bax)
- ◆ proapoptotski proteini Bcl-2 z eno domeno BH3 (Bid, Bik, Bad)

Pri ljudeh so našli 23 predstavnikov te družine proteinov. Občutljivost celice na apoptotske signale je odvisna od ravnotežja med proapoptotskimi in antiapoptotskimi Bcl-2 proteini. Proapoptotski proteini se običajno nahajajo v citosolu in delujejo kot senzorji celičnih poškodb in stresa. Ko zazanajo stres, se prenesejo na površino mitohondrija. Interakcija pro- in antiapoptotičnih proteinov, ki so na zunanjih strani mitohondrija, moti normalno funkcijo antiapoptotičnih proteinov, zato nastanejo pore v mitohondriju. Sprosti se citokrom C in ostali proapoptotični proteini iz citosola. Citokrom C se veže z adaptorno molekulo Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) in pro-kaspazo-9 v makromolekularni kompleks imenovan apoptosom. Sledi aktivacija kaspaze-9, ki cepi kaspazo-3 in aktivira druge izvrševalne kaspaze (15, 19).

Iz mitohondrija se sprostijo tudi druge molekule kot so endonukleaza G, AIF (apoptosis inducing factor) in Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases). Smac/Diablo inhibira delovanje IAP (inhibitors of apoptotic proteins). IAP se vežejo na aktivirane kaspaze (kaspaza-3, kaspaza-7, kaspaza-9) in jih inaktivirajo. AIF deluje v jedru celice, kjer kondenzira kromatin (20, 21).

Po aktivaciji sprožitvenih kaspaz-8 in/ali -9, sledi aktivacija izvrševalnih kaspaz, ki so odgovorne za morfološke spremembe apoptotske celice. Kaspaza-3 je osrednja izvrševalna kaspaza. Substrati izvrševalnih kaspaz so proteini, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju, proteini citoskeleta, jedrnega matriksa, zaviralci endonukleaz in drugi. Izvrševalne kaspaze delujejo na dva načina. Posredno aktivirajo druge kaspaze in neposredno cepijo tarčne proteine, ki so odgovorni za morfološke spremembe.



Slika 3: Znotrajcelična in zunajcelična pot apoptoze

Najbolje raziskani tarčni beljakovini kaspaze-3 sta encim PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) in DFF (DNA fragmentation factor). Encim PARP, sodeluje v celici pri obnovi molekule DNK. Cepitev DFF aktivira nukleazo, ki razgradi DNK. Aktivacija endonukleaz cepi DNK med nukleosomi. Nastanejo nukleosomalni in oligonukleosomalni DNK fragmenti, ki jih lahko detektiramo z gelsko elektroforezo (14, 20).

Pri procesu apoptoze pride tudi do: mobilizacije znotrajceličnega Ca^{2+} , aktivacije transglutaminaz, ki navzkrižno povežejo citoplazemske proteine, izgube mikrotubulov, izgube asimetrije fosfolipidov na celični membrani, ki izpostavi fosfatidilserin (PS) iz notranje na zunanj stran celične membrane (18).

Apoptoza je uravnavana tudi na nivoju transkripcije. Tumor supresorski gen *p53* kodira beljakovino p53, ki se veže na DNK. Če je dedni material poškodovan, p53 ustavi celični cikel in omogoči popravilo napak. V primeru, da napak ni mogoče popraviti, sproži apoptozo. Odgovor p53 na poškodbo DNK ni popolnoma znan. Prva možna razlaga omenja, da omogoči sintezo beljakovine Bcl-2 družine, ki izzovejo poškodbo mitohondrija. p53 je torej posredno vključena pri znotrajceličnem nastajanju reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Druga razlaga omenja aktivacijo ali celo *de novo* sintezo receptorjev na površini celice (22).

1.5 NEKROZA

Nekrozo imenujemo tudi patološka celična smrt ali »umor celice«. Nastopi ob ekstremnih spremembah razmer v okolju, kot so hipoksija, hipertermija, spremembe pH vrednosti in mehanske poškodbe. Med nekrozo pride do poškodbe celične membrane in do vdiranja vode in ionov v celico. Celični organeli in celotna celica nabreknejo, kar povzroči lizo celice. Vsebina celice s proteolitičnimi encimi se sprosti v zunajcelični prostor, to pa privede do poškodb sosednjih celic in vnetnega odgovora (23).

1.6 ARZENOV TRIOKSID PRI ZDRAVLJENJU BOLNIKOV S PLAZMOCITOMOM

Arzen uporablajo za zdravljenje že več kot tisoč let. V raziskavah so dokazali učinkovitost arzenovega trioksidu (ATO) pri zdravljenju neodzivnosti (refraktarnosti) ali ponovitve bolezni (relapsa) pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo (APL). Kitajski raziskovalci so uporabljali ATO za zdravljenje APL kot samostojno učinkovino in v kombinaciji z drugimi citostatiki. Pri novo ugotovljenih bolnikih so popolno remisijo (CR) dosegli pri 70-90% bolnikov, pri ponovitvi bolezni pa od 65% pa do več kot 90%. Predklinične in zgodnje klinične raziskave, kjer uporabljajo ATO za zdravljenje hematoloških malignih obolenj, potekajo poleg APL še pri akutni mieloični levkemiji, kronični B-celični limfatični levkemiji, plazmocitomu in omejenih tumorjih. *In vitro*

poskusi na plazmocitomskih celičnih linijah so se izkazali za uspešne, nekoliko manj uspešni pa so *in vivo* poskusi z ATO pri zdravljenju refraktarnega in plazmocitoma v relapsu. V kliničnih raziskavah faze I in II z ATO, pri bolnikih z refraktarnim ali plazmocitomom v relapsu, so opazili zmanjšanje koncentracije mIg. ATO se pri zdravljenju plazmocitoma uporablja kot netradicionalno citotoksično sredstvo, ki je še vedno predmet raziskav, saj njegov mehanizem delovanja ni povsem pojasnjen (6, 24, 25, 26).

1.6.1 Arzenove spojine za zdravljenje novotvorb v preteklosti

Arzen se v naravi nahaja v obliki strupenih, kemično neobstojnih sulfidov ali oksidov ter kot natrijev, kalijev in kalcijev arzenat. Najpogosteje je vezan v svetlo rumeni sulfidni kompleksi. Poznamo organske in anorganske spojine arzena. Anorganske oblike arzena so rumene, rdeče in bele barve. Rumen (arzenov trisulfid, As_2S_3 , arzenikon, avripigment) in rdeč (arzenov disulfid, As_2S_2 ali realgar) sta toksična in kemijsko nestabilna. Bel (arzenov trioksid, As_2O_3) je stranski produkt v proizvodnji žganja realgarja. Organske spojine arzena so sestavljene iz arzenovega atoma v tri ali petvalentni oblici, ki je kovalentno vezan na ogljikov atom.

Spojine arzena v medicini uporabljajo že več kot 2400 let. Theophrastus je prvi poimenoval arzen »arsenikon« ali zlato obarvana snov (lat. Aurum pigmentum). Skozi stoletja je postal znan pod imenom avripigment ozioroma rumeni arzenik. V tradicionalni Kitajski medicini so ATO uporabljali za zdravljenje psoriaze, sifilisa in revme. V 18. stoletju je dr. Thomas Fowler pripravil *per os* raztopino, imenovano Fowlerjeva raztopina. Vsebovala je As_2O_3 in kalijev bikarbonat. Raztopino so več kot sto let uporabljali za zdravljenje malignih in nemalignih bolezni. Z njo so zdravili levkemije, Hodgkinovo bolezen, perniciozno anemijo, pemfigus in psoriazo. Zaradi pogostih kroničnih zastrupitev z arzenom so zdravljenje s Fowlerjevo raztopino počasi opustili. Leta 1910 je Nobelov nagrajenec Paul Erlich odkril salvarzan in z njim razširil uporabo organskih derivatov arzena. Salvarzan so pred odkritjem penicilina uporabljali za zdravljenje sifilisa in tripanosomije (27, 28).

Spojine arzena so do uvedbe radioterapije in citotoksične kemoterapije veliko uporabljali pri zdravljenju kronične mieloične levkemije in drugih levkemij. Zaradi kronične

toksičnosti, se je zdravljenje z njimi v 20. stoletju pričelo opuščati, ostale pa so v tradicionalni medicini na območju osrednje in južne Azije. Septembra leta 2000 je FDA potrdila As_2O_3 (TrisenoxTM) kot zdravilo za refraktarno APL in APL v relapsu (24, 27, 29).

1.6.2 Mehanizem delovanja arzenovega trioksida

ATO vpliva na znotrajcelične signalne transduksijske poti in povzroča spremembe celičnih funkcij. Sproži apoptozo, inhibira rast, angiogenezo in stimulira diferenciacijo. Te učinke so opazovali na celičnih linijah, živalskih modelih in v kliničnih raziskavah. Širok mehanizem delovanja zahteva nove raziskave. Nova spoznanja so ključnega pomena za potencialno sinergistično delovanje ATO z drugimi učinkovinami. Liu in sod. so dokazali sinergistično delovanje TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) in ATO pri sproženju apoptoze rezistentnih plazmocitomskih celic. Park in sodelavci so pokazali, da se z ATO zaustavita že sproženi G1 in G2M fazi v plazmocitomskih celičnih linijah, zaradi sočasne indukcije od cisteina odvisnega kinaznega inhibitorja p21. Imunski mehanizem delovanja ATO so dokazali v plazmocitomskih celicah, z limfokinom aktiviranih celicah (LAK) in v drugih imunskih celicah. Hayashi in sod. so ugotovili, da ATO zmanjša vezavo plazmocitomskih celic na stromalne celice KM, zavira IL-6 in izločanje VEGF ter blokira delitev plazmocitomskih celic (26, 27).

Pri zdravljenju plazmocitoma se ATO uporablja v kombinaciji z askorbinsko kislino, melfalanom, deksametazonom in interferonom α . Omenjena sinergistična delovanja so še v fazi kliničnega raziskovanja. Težava kombinirane terapije je sistemska toksičnost (hepatotoksičnost, nevropatije, citopenije) (6, 30).

Biološke učinke ATO povzroči njegova reakcija s cisteinskimi ostanki na celičnih proteinih. Proteini z visoko vsebnostjo cisteina in tiolnih skupin so kandidati za interakcijo z ATO. CR je odvisna od prejetega odmerka. Do CR pride pri fiziološko sprejemljivih koncentracijah (2-5 μM) (25).

1.6.2.1 Vpliv arzena na celično signaliziranje

Proteinske kinaze so v procesu apoptoze vpletene v prenos apoptotskih in antiapoptotskih signalov kot tudi v izvršitev samouničevalnega procesa. Arzen sproži zunanjo pot apoptoze preko MAP (mitogen activated protein) kinaz, še posebej z JNK (c-Jun NH₂ terminal

kinase) spremljano indukcijo Fas liganda ali Fas ekspresijo. Rekrutiranje domene smrti (te vsebujejo proteine, kot so FADD in TRADD) aktivira kaspazo-8. Aktivacija kaspaze-8 in kaspaze-9 vodi do aktivacije izvrševalnih kaspaz (kaspaza-3 in kaspaza-7). JNK so pomembne za fosforilacijo transkripcijskih faktorjev, ki povečajo izražanje zgodnjih genov. Arzen stimulira aktivnost JNK z inhibicijo JNK fosfataze, katere naloga je vzdrževanje nizke bazalne aktivnosti JNK v nestimuliranih celicah. JNK je prav tako potrebna za aktivacijo proapoptotskega proteina Bid, ki se prenese iz citosola na mitohondrijsko membrano in povzroči sproščanje citokroma C (19, 25, 31).

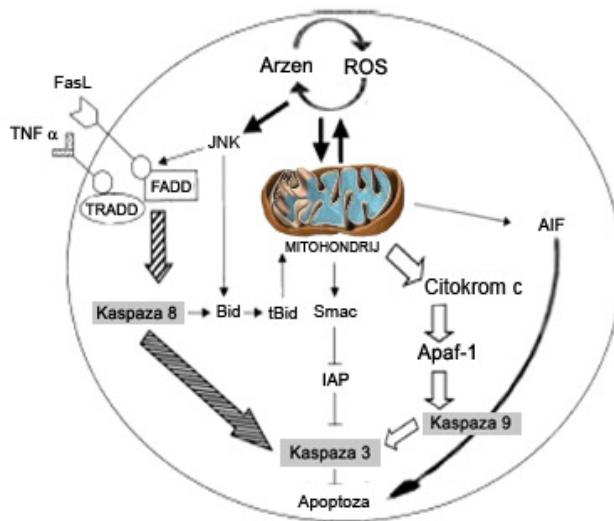
Tirozin fosfataze so molekularne tarče za arzen. So encimi, ki igrajo pomembno vlogo v celičnem metabolizmu. Mnoge vsebujejo tiole in so prav zaradi tega potencialne tarče za arzen.

Arzen blokira vnetni transduksijski signal. Inhibira IKK (IkB kinase) potrebne za aktivacijo provnetnega transkripcijskega faktorja NF κ B. NF κ B transkripcijska aktivnost je pomembna v patogenezi hematoloških malignih bolezni, predvsem pri plazmocitomu, zaradi regulacije ekspresije IL-6 in ekspresije adhezijskih molekul. Posledica inhibicije z IKK sprožene fosforilacije in razgradnje IkB je nenehna vezava inhibitorja na NF κ B, preprečevanje prenosa NF κ B v jedro in povišana regulacija IL-6 in drugih genov. pride do zmanjšanja koncentracije IL-6, manjše rasti klona plazmocitomskih celic in manjše odpornosti na apoptozo (6, 25).

1.6.2.2 Vpliv arzena na oksidacijsko-reduksijsko ravnotežje in celični odziv na stres

Arzen moti naravno oksidacijsko-reduksijsko ravnotežje z endogenimi oksidanti in celičnimi antioksidativnimi sistemi. Proteini z dostopnimi tiolnimi skupinami so občutljivi na oksidacijo. Z oksidacijo tiolnih skupin arzen odpre kompleks prepustnih tranzicijskih por. Kovine ali reaktivne kisikove zvrsti (ROS) povzročene s kovinami takoj sprožijo pot apoptoze v mitohondriju. Mitohondriji so vključeni v tvorbo ATP, ki zahteva velike količine kisika, kar vodi v nastajanje ROS. Med ROS spadajo vodikov peroksid, hidroksilni radikal, superoksidni anion in organski perokside, ki poškodujejo celice. Pomembno obrambno vlogo pri obrambi pred oksidativnim stresom ima GSH (reduciran glutation) redoks sistem, ki uravnava antiproliferativni in proapoptotični vpliv. Nahaja se v mitohondriju. Večje količine ROS in inhibicija GSH povzroči oksidativni stres, poškoduje

mitohondrij in sproži apoptozo. Apoptoza sprožena z ATO je povezana z izgubo mitohondrijskega membranskega potenciala ($\Delta\Psi_M$). ATO namreč poveča znotrajcelično koncentracijo vodikovega peroksida, ta pa zmanjša mitohondrijski membranski potencial. Citokrom C se iz poškodovanih mitohondrijev sprosti v citosol, veže na Apaf-1 in aktivira kaspazo-9. Poškodovani mitohondriji prav tako lahko sprostijo AIF, ki sproži apoptozo neodvisno od kspaz in Smac, ki nasprotuje antiapoptotičnemu vplivu IAP proteinov.



Slika 4: Signalna pot apoptoze, ki jo spremlja arzen ali ROS (31).

ATO blokira encim glutation transferazo in glutation peroksidzo (GPx), ki razstrupita ATO s konjugacijo GSH in prevorbo vodikovega peroksida v vodo (25, 31, 32).

1.6.3 Neželeni učinki arzenovega trioksida pri zdravljenju bolnikov s plazmocitomom

Neželeni učinki so obvladljivi in reverzibilni. Najpogosteji neželeni učinek ATO pri zdravljenju plazmocitoma je retencija tekočine in porušeno ravnotesje elektrolitov, predvsem kalija in magnezija (hipokaliemija, hipomagneziemija). Zadrževanje tekočine je lahko posledica kombiniranega zdravljenja z glukokortikoidi ali pa bolezni same. Drugi neželeni učinki so še zadrževanje tekočine, dvig telesne mase, nizek krvni tlak, nevtropenija in okužbe. Večina ATO se izloči iz telesa z urinom, nekaj pa tudi z blatom, znojem, mlekom, skozi kožo in preko pljuč. Organske spojine arzena so bolj toksične kot anorganske in se za zdravljenje ne uporabljajo (8, 33).

1.7 KAMPTOTECIN IN APOPTOZA

Kamptotecin (KPT) je citotoksičen rastlinski alkaloid izoliran iz *Camptotheca acuminata*. Je protitumorska učinkovina s širokim spektrom delovanja. Deluje kot inhibitor topoizomeraze I. KPT ovira prepis, povzroči prelome DNK verige in sproži apoptozo v celicah, ki se delijo. Dokazano je, da lahko prelomi dvojnoverižne DNK sprožijo apoptotično celično smrt, vendar molekularni mehanizem tega procesa ni znan. Genotoksična sredstva za uničenje DNK lahko aktivirajo tako receptorje smrti na membrani kot tudi endogeno, od mitohondrijev odvisno pot apoptoze. KPT sproži proces apoptoze preko vezave na kompleks topoizomeraza I-DNK v jedru. Interakcija med s KPT-stabiliziranimi kompleksi in rastočimi replikacijskimi vilicami v S-fazi celičnega cikla, povzroči prelome na dvojni vijačnici DNK, kar sproži proces apoptoze preko aktivacije kaspaz (34, 35).

1.8 DOLOČANJE APOPTOZE S PRETOČNIM CITOMETROM

1.8.1 Osnove pretočne citometrije

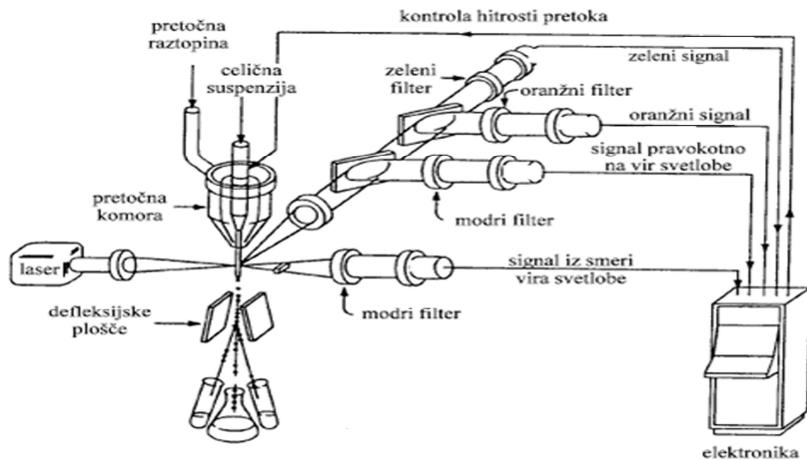
Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, le da je odčitavanje deleža obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Sodobni pretočni citometri so se razvili na osnovi dosežkov laserske in računalniške tehnologije, proizvodnje monoklonskih protiteles in kemije fluorokromov.

Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji. Celice ena za drugo potujejo skozi ozek snop svetlobe. Ko pride celica v območje svetlobnega žarka, se le ta lahko odbije ali lomi ali pa se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Svetlobo, ki jo osvetljena celica odda, analizira sistem fotosprejemnikov (36).

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so:

- ◆ vir svetlobe
- ◆ pretočna komora z optičnim sistemom ogledal, leč, filtrov
- ◆ elektronika, ki spreminja svetlobne impulze v električne, te pa v digitalne

- ◆ računalnik za zbiranje, analizo in usklajevanje podatkov ter uravnavanje delovanja aparata (3).



Slika 5: Prikaz pretočnega citometra (36).

Vir svetlobe, ki obseva celice, je navadno laserski žarek, ki je lahko argonski, kriptonski, kombiniran helij-kadmijski ali helij-neonski. Pri prehodu snopa žarkov odda posamezna celica svetlobne signale, ki so odvisni od njenih lastnosti. Svetlobni signali, ki imajo enake valovne dolžine kot obsevalna (laserska) svetloba, nastanejo zaradi sipanja svetlobe na celičnih strukturah. Svetlobni signali, ki imajo večje valovne dolžine kot obsevalna svetloba, nastanejo zaradi fluorescence. Signale zbirajo in razvrščajo fotodetektorji preko sistema leč in filtrov. Vsak fotodetektor meri specifične značilnosti svetlobnih signalov.

Dva fotodetektorja merita količino razpršene svetlobe, ki jo oddaja obsevana celica. Fotodetektor FALS (Forward Angle Light Scatter) sprejema razpršeno svetlobo iz smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je sorazmerna velikosti celice. Fotodetektor RALS (Right Angle Light Scatter) sprejema razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe pa je sorazmerna zrnatosti celice. Poleg detektorjev FALS in RALS, ima pretočni citometer še več fluorescenčnih detektorjev, ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Pretočni citometer ima navadno dva do štiri fluorescenčne fotodetektorje, od katerih vsak prejema fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in meri signal, ki ga oddaja fluorescenčno barvilo.

Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično. Točkovni histogram

je osnovni rezultat pretočne citometrije, na katerem vsaka točka predstavlja celico. Položaj točke (celice) je odvisen od izmerjenih celičnih parametrov. Skupino celic, ki jo želimo opazovati glede na njihove fluorescenčne lastnosti obkrožimo z »elektronskim svinčnikom«. Na ta način določimo preiskovano populacijo celic oz. t.i. »gating« (36).

1.8.2 Uporaba pretočne citometrije za določanje apoptoze

Raziskave celične smrti so postale pomembne v molekularni biologiji, onkologiji, imunologiji, embriologiji, endokrinologiji, hematologiji in nevrologiji. V klinični onkologiji se je uporaba pretočne citometrije že uveljavila za prepoznavanje apoptotičnih celic.

Z uporabo različnih citometrijskih metod lahko identificiramo apoptotične in nekrotične celice. Apoptotične celice prepoznamo po morfoloških in biokemijskih lastnostih. Značilnosti apoptotičnih celic, ki jih izkoriščamo pri detekciji s pretočnim citometrom, so: sprememba celične membrane in njene prepustnosti, spremembe prepustnosti mitohondrijske membrane, spremembe v velikosti, obliki in morfologiji celice, aktivacija kaspaz in cepitev DNK. Določanje posamezne spremembe ali pa njihove kombinacije nam omogoči oceno velikosti in prepoznavo apoptotičnih celic v celični populaciji, razkrije pa nam tudi molekularne poti celične smrti. Izbor ustrezne metode za določanje apoptoze s pretočno citometrijo je odvisen od: vrste celic, vrste pretočnega citometra, vrste apoptoze in učinkovine, ki apoptozo sproži. Ker prepoznavava apoptotične celice s pretočno citometrijo ponavadi temelji le na enem znaku, ki pa ni nujno marker za apoptizo v določeni situaciji, je priporočljivo potrditi celično smrt s svetlobnim ali elektronskim mikroskopom.

Prednost pretočne citometrije pred drugimi načini sledenja apoptoze (na primer fluorescenčna mikroskopija ali DNK gelska elektroforeza) je ocena večjega števila celic naenkrat v kratkem času. Dobro loči tudi nekrotične celice od celic v apoptizi. Slabost pretočne citometrije kot načina za določanje apoptoze je v tem, da z njo določimo le deleže apoptotičnih celic v trenutku preskusa. Celice začno proces apoptoze pri različnih časih, tudi dolžina trajanja se razlikuje. Z različnimi metodami lahko na isti celični populaciji določimo različne deleže celic v apoptizi (37).

1.8.3 Monoklonska protitelesa za označevanje plazmatk

Med dozorevanjem matičnih celic KM se spreminjajo antigeni na njeni površini in v citoplazmi (diferenciacijski antigeni). Antigeni so večinoma makromolekule. Če proti njim izdelamo monoklonska protitelesa, jih lahko uporabimo za prepoznavo celic. Celice med zorenjem pridobivajo nove antigene in izgubijo prejšnje.

Plazmatka izgubi večino celičnih označevalcev B limfocitov, pridobi pa CD38, CD138 in citoplazemske imunoglobuline (cIg) z lahkimi verigami lambda ali kapa. Te makromolekule lahko prikažemo z monoklonskimi protitelesi, označenimi s fluorescenčnimi barvili. Monoklonska protitelesa so razvrščena v skupine z oznako CD (Cluster of Differentiation). Z uporabo pretočne citometrije je mogoče oceniti celice obarvane z več fluorescenčnimi barvili hkrati (1, 36).

CD-138 je transmembranska proteoglikanska adhezijska molekula (heparan sulfat proteoglikan) imenovana Syndecan-1. Izražanje CD138 v človeških hematopoetskih celicah je omejeno na plazmatke v normalnem KM. CD138 izražajo mnoga zrela tkiva, in sicer epitelijske celice, endotelne celice, fibroblasti, keratinociti in normalni hepatociti. CD138 pozitivne so tudi maligne plazmatke in nekatere limfomske celice (limfoplazmocitoidni limfom). Serumski CD138 je napovedni deljavnik pri plazmocitomu. CD138 obložene kapljice uporablja za čiščenje (izolacijo) plazmocitomskih celic. Periferni krvni monociti ter limfociti T in B so CD138 negativni (38).

2 NAMEN DELA

Uporaba arzenovega trioksida (ATO) kot netradicionalnega sredstva za zdravljenje plazmocitoma postaja znova aktualna. Zdravljenje plazmocitoma z ATO se izvaja tudi v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, a je število bolnikov majhno. Za zdravljenje se odločajo v redkih primerih bolnikov s plazmocitomom, pri katerih je izčrpano vso razpoložljivo zdravljenje.

Mehanizem delovanja ATO še vedno ni popolnoma znan. Eden izmed mehanizmov delovanja je sprožitev apoptoze ali programirane celične smrti. Narejenih je bilo veliko raziskav na celičnih linijah, ki potrjujejo ugotovitev, da ATO sproži apoptozo. V literaturi smo zasledili uporabo ATO kot induktorja apoptoze tudi pri realnih vzorcih bolnikov s plazmocitomom (39, 40).

Ključni namen našega dela je bil najti ustrezno metodo za oceno učinkovanja ATO na plazmocitomske celice. Kot tarčni celični proces smo izbrali apoptizo.

- ❖ Vpliv ATO smo določali na *ex vivo* vzorcih aspiratov kostnega mozga (KM) bolnikov z diseminiranim plazmocitomom (DP), monoklonsko imunoglobulinemijo neopredeljenega pomena (MINP), bolnikov z reaktivnimi spremembami v KM in osebah z normalnim KM.
- ❖ Na voljo so različni načini sledenja apoptoze. Mi smo se odločili za uporabo pretočne citometrije. Izbrali smo komercialno dostopne reagenčne komplete: Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter[®]), Vybrant[®] FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Molecular Probes[®]) in Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes[®]).
- ❖ Pri bolnikih z DP smo navedene metode poskusili izboljšati:
 - Z uporabo protitelesa CD138-PE smo poskusili označiti subpopulacijo plazmocitomskih celic in samo na njih določati obseg apoptoze.
 - Z uporabo hipotonične raztopine in ločbe mononuklearnih celic preko fikola smo se želeli izogniti celičnemu debriju, kjer se nahajajo ostanki nekrotičnega tkiva in eritrocitov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V Specializirani hematološki laboratorij Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo dobili aspirate KM, ki so jih punktirali bolnikom v diagnostične namene. Punkcije so potekale iz zadnjega črevničnega trna. V raziskavi smo v obdobju od februarja do septembra 2008 uporabili vzorce 18 bolnikov, od tega 9 moških in 9 žensk. Pri vseh bolnikih smo imeli na razpolago podatke o citološki oceni KM. 9 bolnikov je imelo DP, 4 MINP, 2 bolnika sta imela reaktivne spremembe KM, pri 3 osebah pa diagnoza DP ni bila potrjena, kot tudi ne kakšna druga krvna bolezen. Zato smo te KM uvrstili pod »normalne«. V prilogi 1 so povzeti podatki o preiskovancih in o preizkusih, ki smo jih pri posameznih vzorcih izvedli.

3.2 OPREMA

- ◆ sterilne posodice za gojenje celičnih kultur 25 cm², 50 mL (Greiner Bio-One GmbH)
- ◆ 3 mL sterilne kapalke (Falcon)
- ◆ Pasteurjeve pipete 5 mL, 10 mL (TRP[®])
- ◆ epice (Eppendorf)
- ◆ pipete (Eppendorf)
- ◆ centrifuga Labofuge 400 (Heraeus)
- ◆ inkubator (Innova[®] CO-48)
- ◆ stresalnik Vortex (Tehnica)
- ◆ epruvete
- ◆ centrifuga mini spin (Eppendorf)
- ◆ vodna kopel (GFL[®])
- ◆ hematološki analizator (LH 750 Beckman Coulter[®])
- ◆ pretočni citometer (Cytomics FC 500 Beckman Coulter[®])

3.3 METODE

3.3.1 Gojenje celic kostnega mozga

REAGENTI IN PRIPRAVA REAGENTOV

- ❖ gojišče RPMI 1640 z antibiotikom (Gibco) in Na-heparinom
- ❖ raztopina Hank´s (Sigma)

Komercialno raztopino smo redčili. pH vrednost smo uravnali na 7,2 (NaHCO_3 , nasičena raztopina) in sterilno prefiltrirali (brizge, filtri $0,2 \mu\text{m}$).

- ❖ timidin 0,025 M, 6 mg/mL (Sigma)

0,025 M raztopino timidina smo pripravili tako, da smo 1g timidina raztopili v 167 mL raztopine Hank´s.

- ❖ gojišče Marrow Max (KMM) (Gibco)
- ❖ gojišče Amniomed (KMA) (BIOCHROM AG)
- ❖ 1x fosfatni pufer s soljo (1x PBS) (pH=7,4)

1x PBS smo pripravili iz 100 mL 10x PBS in 900 mL redestilirane vode. 10x PBS smo pripravili iz: NaCl , KCl , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 .

3.3.1.1 Priprava vzorca za gojenje celic kostnega mozga

Aspirat KM smo dobili v sterilni epruveti z gojiščem (5 mL RPMI 1640 z antibiotikom in 0,5 mL Na-heparina). Centrifugirke z vzorcem smo centrifugirali 10 minut pri 1600 obratih/min. S sterilno kapalko za enkratno uporabo smo previdno odstranili supernatant. Na fazni meji med zgornjo spiralno raztopino in spodnjimi eritrociti se je nahajal KM, ki smo ga s kapalko previdno potegnili. Paziti smo morali, da smo zraven zajeli čim manj krvi, saj eritrociti motijo nadaljnje postopke. KM smo resuspendirali v 8 mL raztopine Hank´s, ki smo jo predhodno segreli v vodni kopeli na 37°C in centrifugirali 10 minut pri 1600 obratih/min. S kapalko smo odstranili supernatant, nato pa vanjo potegnili KM in ga prenesli v 1 mL gojišča KMA v centrifugirki. Na stresalniku Vortex smo vse skupaj dobro premešali. 100 μL pripravljenega vzorca smo sterilno odpipetirali v 200 μL 1x PBS pufra. S hematološkim analizatorjem smo izmerili koncentracijo levkocitov v redčenem vzorcu. Dobljeno vrednost X (celic/L) smo pomnožili s faktorjem 3 in izračunali potrebeni volumen vcepka, da je bila končna koncentracija celic $1 \times 10^6/\text{mL}$.

$$V(\text{mL}) = \frac{16(\text{mL}) \cdot 10^6(\text{celic/mL}) \cdot 1000(\text{mL/L})}{X(\text{celic/L})}$$

Izračunanemu volumnu celic smo dodali toliko rastnega medija KMM, da je skupni volumen vcepka znašal 2 mL. V posodice za gojenje celičnih kultur smo sterilno odpipetirali 6,5 mL gojišča KMM in 300 μL timidina. Pripravili smo tri gojišča. Gojišča smo za nekaj minut postavili v vodno kopel segreto na 37°C, nato pa vanje sterilno prenesli predhodno pripravljen KM. V dve gojišči smo odpipetirali po 1 mL vcepka, v tretjega pa preostanek vzorca KM v gojišču KMA. Gojitvene posodice smo takoj prenesli v inkubator. Gojili smo 24 ur pri 37°C, 5% CO₂, v vlažni atmosferi.

3.3.1.2 Gojenje celic kostnega mozga ob prisotnosti arzenovega trioksida in kamptotecina

RAZTOPINE IN PRIPRAVA RAZTOPIN

- ❖ 0,1% raztopina ATO (pripravljena v lekarni UKC)
- ❖ 250 mg KPT, prašek (Biocompare®)
- ❖ DMSO (Sigma)

Priprava raztopine ATO

Iz 0,1% raztopine ATO smo pripravili 2x po 100 mL raztopine v dveh različnih koncentracijah. Iz stekleničk smo odpipetirali takšen volumen ATO, da smo dobili željene končne koncentracije v gojišču (preglednica IV).

Preglednica IV: Volumni in končne koncentracije ATO v gojišču.

Koncentracija v 100 mL raztopine ATO (mol/L)	Volumen ATO dodanega v gojišče [μL]	Končna koncentracija ATO v gojišču [μM]
$1,2 \times 10^{-4}$	100	2
	500	10
3×10^{-4}	100	5
	500	25

Priprava raztopine KPT

Pripravili smo epruvetke po 1 mL 2 mM KPT v DMSO. Shranili smo jih v zamrzovalniku pri -20°C. V gojišča smo odpipetirali volumne, katerih končne koncentracije so navedene v preglednici V.

Preglednica V: Volumni in končne koncentracije KPT v gojišču.

Volumen KPT dodanega v gojišče [μL]	Končna koncentracija KPT v gojišču [μM]
24	8
60	20
80	26,7
100	33,3
200	66,7
300	100

Postopek

Po 24 urnem gojenju celic smo s Pasteurjevo pipeto združili vsa gojišča in dobro premešali na stresalniku Vortex. S hematološkim analizatorjem smo izmerili koncentracijo levkocitov, iz katere smo izračunali volumen vzorca in gojišča, da je bila končna koncentracija levkocitov 1×10^6 celic/mL. Končni volumen gojišča z vzorcem in ATO ali KPT je znašal 6 mL. V posodice za gojenje smo s Pasteurjevo pipeto najprej odpipetirali gojišča in jih postavili za nekaj minut v vodno kopel segreto na 37°C. Na koncu smo dodali vzorec in ATO ter KPT. Za kontrolo smo pripravili še gojišče brez dodanega induktorja apoptoze, ki je služilo kot negativna kontrola. Gojišča s KPT smo uporabili za pozitivno kontrolo. Pripravljena gojišča smo prenesli v inkubator. Celice smo gojili pri 37°C, 5% CO₂, v vlažni atmosferi od 0,4 do 72 ur. Po končanem gojenju smo s hematološkim analizatorjem izmerili koncentracijo levkocitov in izračunali volumne, potrebne za pripravo vzorcev, za določanje apoptoze s pretočnim citometrom.

3.3.2 Osamitev mononuklearnih celic preko fikola

Mononuklearne celice smo od celic rdeče vrste ločili z gostotno gradientnim centrifugiranjem preko fikola.

REAGENTI

- ❖ fikol (Amershan Biosciences AB)
- ❖ gojišče RPMI 1640 z antibiotikom (Gibco) in Na-heparinom
- ❖ raztopina Hank´s (Sigma)
- ❖ 1x PBS (pH=7,4)
- ❖ gojišče Marrow Max (KMM) (Gibco)
- ❖ timidin 0,025 M, 6 mg/mL (Sigma)

Postopek

KM z RPMI gojiščem smo z 1x PBS razredčili do 12 mL. V drugo epruveto (Falcon) smo z iglo in brizglako vbrizgali 2 mL fikola. Počasi in ob steni epruvete smo redčen KM spuščali do fikola. Centrifugirali smo 22 min pri 2200 obratih/min. Pri centrifugiranju so eritrociti in zreli nevtrofilci zaradi večje specifične gostote sedimentirali na dno epruvete pod plast fikola. Nad plastjo fikola, ki je ostala bistra, se je nahajala plast mononuklearnih celic. Nad plastjo mononuklearnih celic je ostala krvna plazma, maščobe in PBS. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in plast mononuklearnih celic prenesli v drugo epruveto z nekaj raztopine Hank´s. Z raztopino Hank´s smo epruveto dopolnili do 14 mL. Centrifugirali smo 7 min pri 1700 obratih/min, odstranili supernatant in znova dopolnili z raztopino Hank´s do 14 mL. Ponovno smo centrifugirali 7 min pri 1700 obratih/min. Supernatant smo skoraj v celoti odstranili, pustili smo le 1 mL. Na stresalniku Vortex smo epruveto dobro premešali in s hematološkim analizatorjem izmerili številčno koncentracijo celic. Vzorec smo prenesli v gojišče s 6,5 mL KMM in 300 µL timidina. Gojili smo pri 37°C, 5% CO₂, v vlažni atmosferi 24 ur.

3.3.3 Liza eritrocitov s hipotonično raztopino

REAGENTI IN PRIPRAVA REAGENTOV

❖ hipotonična raztopina

Hipotonično raztopino smo pripravili sproti iz raztopin:

- 0,0075 M KCl (Sigma)
- fetalni telečji serum (Sigma) in destilirana voda v razmerju 1:6.

Raztopini KCl in seruma z destilirano vodo smo zmešali v razmerju 1:1. Pripravili smo 7 mL KCl, 6 mL destilirane vode in 1 mL seruma.

Postopek

Hipotonično raztopino smo dodajali vzorcem pred začetkom postopka pri izvedbi vsake posamezne metode določanja apoptoze. Volumen hipotonične raztopine smo izračunali za vsako metodo posebej (2 mL vzorca ustreza 7 mL hipotonične raztopine). Posamezne metode s postopki dela so navedene v nadaljevanju. Po dodatku hipotonične raztopine smo 25 minut inkubirali v vodni kopeli na 37°C. Po inkubiranju smo vzorce centrifugirali in odstranili supernatant. Sedimentu, kjer smo delo nadaljevali po postopku metode KIT4 in Aneksin, smo dodali 1 mL 1x PBS. Sedimentu, kjer smo delo nadaljevali z metodo FAM, pa smo dodali 1 mL gojišča KMM. Ponovno smo centrifugirali ter sedimentu, kjer smo delo nadaljevali z metodo Aneksin in KIT4 dodali 100 µL 1x PBS. Sedimentu, kjer smo delo nadaljevali z metodo FAM, pa smo dodali 100 µL gojišča KMM. Postopke posameznih metod smo nadaljevali po priloženih navodilih proizvajalca.

3.3.4 Priprava citocentrifug

Delež plazmocitomskih celic, ki smo jih določili bolnikom, smo najprej ocenili v razmazih KM. Razmaze KM so v laboratoriju pobarvali za citološko oceno. Razmaze KM smo si ogledali pod svetlobnim mikroskopom. Ocenjen odstotek plazmatk oziroma plazmocitomskih celic smo nato preverili še v preparatih, pripravljenih s pomočjo citocentrifuge, ki smo jih izdelali za vsakega bolnika posebej, da bi preverili delež plazmatk po gojenju.

REAGENTI IN PRIPRAVA REAGENTOV

- ❖ raztopina Giemsa (Fluka)

Delovno raztopino Giemse smo pripravili tako, da smo zmešali raztopino Giemse in fosfatnega pufra v razmerju 1:10 (10 mL Giemse smo dopolnili s fosfatnim pufrom do 100 mL).

- ❖ raztopina May-Grunwald (Fluka)
- ❖ fosfatni pufer

Postopek

Po končanem gojenju celic smo iz gojišča odpipetirali 300 µL vzorca. S hematološkim analizatorjem smo izmerili koncentracijo levkocitov in dobljeno vrednost uravnali na $0,5 \times 10^6$ celic/mL. Na objektna stekla (Shandon Cytoslide® microscope slides for Shandon Cytospin®), ki smo jih vpeli v »filterske kartice« (SCA-005 Filter cards, SHANDON) smo odpipetirali 200 µL celične suspenzije. Centrifugirali smo 10 minut pri 700 obratih/minuto (Cytospin 3, SHANDON). Po centrifugiranju smo preparate posušili na sobni temperaturi (2 uri). Posušene razmaze smo zložili v posodico z May-Grunwaldovo raztopino. Barvali smo 5 minut. Razmaze smo nato za 1 minuto prenesli v drugo posodico, kjer sta bila May-Grunwaldova raztopina in fosfatni pufer v razmerju 1:1. Na koncu smo razmaze še 20 minut barvali z raztopino Giemse v fosfatnem pufru, jih sprali s fosfatnim pufrom in posušili. Posušene razmaze KM smo pogledali pod svetlobnim mikroskopom pod 1000 kratno povečavo.

3.3.5 Določanje apoptoze s pretočnim citometrom

Apoptizo smo določali s pretočnim citometrom s pomočjo treh reagenčnih kompletov:

- ◆ Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter® PN IM2375)
- ◆ Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Molecular Probes®, Kataloška številka V35118)
- ◆ Vybrant® Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes®, Kataloška številka V13243).

Navedeni reagenčni kompleti so namenjeni raziskovalnemu delu in ne za diagnostiko. Postopek dela je potekal po priloženih navodilih proizvajalca. Pri bolnikih z DP smo metode modificirali z dodatkom protitelesa CD138-PE (Beckman Coulter®, IOTest®

CD138-PE REF A54190). S protitelesom CD138, označenim s fikoeritrinom (PE), smo želeli označiti plazmatke in plazmocitomske celice. Protitelo CD138-PE smo dodali pred začetkom protokola za posamezno metodo.

3.3.5.1 Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Annexin V- FITC Kit

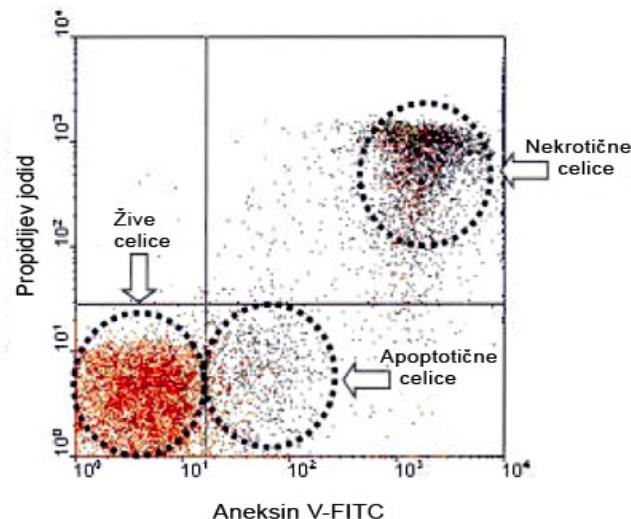
Osnovne značilnosti metode z Aneksinom

Med procesom apoptoze pride do spremembe položaja membranskih proteinov, glikoproteinov in fosfolipidov. Anionski fosfolipid fosfatidilserin (PS) se v živih celicah nahaja na notranji strani celične membrane. Nevtralni lipidi se nahajajo na zunanji strani celične membrane. V zgodnji apoptizi se PS prenese na zunanjо stran celične membrane. Aneksin V je od Ca^{2+} odvisen fosfolipidni vezni protein z visoko afiniteto do PS. Za merjenje apoptoze s pretočnim citometrom mora biti aneksin V označen s fluorokromom. Konjugati aneksina V in fluorescein izotiocianata (FITC) so specifični za detekcijo celic v zgodnji fazи apoptoze. Aneksin V-FITC prodre tudi v nekrotične celice, ki imajo poškodovano membrano in se veže na PS.

Za razlikovanje apoptotičnih in nekrotičnih celic se uporablja propidijev jodid (PI), ki vstopi v nekrotične celice, v apoptotične pa ne. Jedrno barvilo PI se v nekrotičnih celicah veže na DNK. Apoptotična celica je označena z aneksinom V preden odmirajoča celica spremeni morfologijo in njena DNK hidrolizira. Povezava aneksina V in FITC v stehiometrijskem razmerju 1:1, ne spremeni prvotnih lastnosti na fosfolipid vezanega aneksina V. Kinetika vezave je pokazala hitro povezavo aneksina V-FITC s fosfolipidno membrano, ob prisotnosti kalcijevih ionov in PS. Celice obarvane z Aneksinom V-FITC (zelena fluorescensa) in PI (rdeča fluorescensa) lahko po končani obdelavi vzorca zaznamo s pretočno citometrijo (37, 41, 42, 43).

Slika 6 prikazuje histogram razporeditve celic po označevanju celic z Aneksinom V-FITC in PI. V levem spodnjem kvadrantu so žive neapoptotične celice, ki niso obarvane s FITC in PI. Celice, ki so odmrle, se nahajajo v levem zgornjem kvadrantu. So v pozni fazи apoptoze ali pa so nekrotične. Te celice niso obarvane s FITC, so pa obarvane z PI. V desnem zgornjem kvadrantu so celice, ki so poškodovane ali pa so v pozni fazи apoptoze. Na njih so prisotni fosfatidilserinski ostanki, a ni nujno, da se nahajajo na površini celice, saj je celična membrana permeabilna. Celice so obarvane s FITC in PI. Celice desnega

spodnjega kvadranta so v zgodnji fazi apoptoze in predstavljajo apoptotične celice. Izpostavljeni PS ostanki na zunani strani celične membrane se obarvajo s FITC. Celična membrana je nepoškodovana, zato ni obarvanja s PI (44).



Slika 6: Histogram razporeditve celic po označevanju celic z Aneksinom V-FITC in PI.

Reagenti in priprava reagentov

Reagenčni komplet vsebuje:

- ❖ 100 µL aneksina V-FITC, ki vsebuje 1 mg/mL BSA, koncentracija: 5 µg/mL aneksina V-FITC
- ❖ 1,7 mL 10X koncentriranega veznega pufra
- ❖ 250 µL PI

Priprava reagentov

1. Raztopina veznega pufra

Raztopino 10X koncentriranega veznega pufra smo razredčili z destilirano vodo, v razmerju 10% koncentriranega veznega pufra in 90% destilirane vode. Tako pripravljen pufer smo prenesli na led. Raztopino veznega pufra smo vedno pripravili sproti.

2. Raztopina propidijevega jodida

250 µg PI smo raztopili v 1 mL raztopine veznega pufra in jo prenesli na led.

Pripravljeni raztopini smo pri nadaljnji uporabi hranili na 2-8°C.

Postopek dela

Postopek dela po navodilih proizvajalca

1. V epruveto smo odpipetirali 400 µL celične suspenzije, kateri smo predhodno uravnali koncentracijo celic na $5 \times 10^5/\text{mL}$ – $5 \times 10^6/\text{mL}$. Celice smo centrifugirali, odstranili supernatant in sprali z raztopino 1x PBS. Po centrifugiranju smo dodali 400 µL mrzle raztopine veznega pufra. Vzorce smo nato prenesli na led.
2. Iz 400 µL celične suspenzije smo odpipetirali 100 µL vzorca. Dodali smo 5 µL raztopine Annexin V-FITC in 2,5 µL raztopine PI.
3. Epruvetko s celično suspenzijo smo postavili na led in inkubirali 10 minut v temnem prostoru.
4. V celično suspenzijo smo dodali 150 µL ledeno mrzle raztopine veznega pufra.
5. Celično suspenzijo smo analizirali na pretočnem citometru.

Postopek dela po navodilih proizvajalca z dodatkom protitelesa CD138-PE

1. V epruveto smo odpipetirali 400 µL celične suspenzije, kateri smo predhodno uravnali koncentracijo celic na $5 \times 10^5/\text{mL}$ – $5 \times 10^6/\text{mL}$. Celice smo centrifugirali, odstranili supernatant in sprali z raztopino 1x PBS. Po centrifugiranju smo dodali 100 µL 1x PBS.
2. K 100 µL celične suspenzije smo dodali 20 µL protitelesa CD138-PE in 15 minut inkubirali v temi na ledu. Po končani inkubaciji smo dodali 500 µL 1x PBS.
3. Celično suspenzijo smo centrifugirali, odstranili supernatant in dodali 400 µL veznega pufra.
4. Iz 400 µL celične suspenzije smo odpipetirali 100 µL, dodali 5 µL raztopine Annexin V-FITC in 2,5 µL raztopine PI.
5. Epruvetko s celično suspenzijo smo postavili na led in inkubirali 10 minut v temnem prostoru.
6. Celični suspenziji smo dodali 150 µL ledeno mrzle raztopine veznega pufra.
7. Celično suspenzijo smo analizirali na pretočnem citometru.

3.3.5.2 Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit

Osnovne značilnosti metode FAM

Značilnost zgodnje faze apoptoze je aktivacija cisteinskih proteaz kspaz (cysteine-aspartic acid specific proteases). Ti encimi so udeleženi v vrsti reakcij, ki jih sproži odgovor na proapoptotične signale. Rezultat je cepitev proteinskih substratov in kasnejša razdružitev celice. Prepoznavno zaporedje v tarčnem substratu vedno vključuje ostanek asparaginske kisline. Do cepitve pride na karbonilnem koncu tega ostanka.

Metoda FAM uporablja novejši pristop za detekcijo aktivnih kspaz, ki temelji na uporabi fluorescenčnega ireverzibilnega inhibitorja kspaz (FLICATM). Reagent vsebuje fluorometil ketonsko funkcionalno skupino (FMK), ki kovalentno reagira s cisteinom, in sicer s kspazno specifičnim aminokislinskim zaporedjem. Za kspaze-3 in -7 reagent je to prepoznavno zaporedje asparaginska kislina-glutaminska kislina-valin-asparaginska kislina (DEVD). Karboksifluorescenčna skupina (FAM) je pripeta na poročevalca. FLICA reagent reagira z encimskim reaktivnim centrom aktivirane kspaze preko prepoznavnega zaporedja ter se nato kovalentno veže s FMK skupino. FLICA inhibitor prodira v celico in ni citotoksičen. Nevezane molekule FLICA difundirajo iz celice ter se sperejo. Preostali zelen fluorescenčen signal je premo sorazmeren s količino aktivne kspaze, prisotne v času dodatka inhibitorja. FLICA reagenti se uporabljajo za proučevanje apoptoze s pretočno citometrijo in fluorescenčno mikroskopijo.

Nedavne objave poročajo, da je celična fluorescencija reagenta močno povezana s kspazno aktivnostjo v apoptotskih celicah, vendar interakcija z drugimi celičnimi mesti prispeva k intenzivnosti signala tudi v neapoptotičnih celicah. Reagenčni komplet FAM vsebuje FLICA reagent, ki je specifičen za kspaze-3 in -7, Hoechst 33342 barvilo in PI, ki omogoča istočasno zaznavanje kspazne aktivnosti, membranske prepustnosti in celičnega cikla (45).

Reagenti in priprava reagentov

Reagenčni komplet vsebuje:

- ❖ 1 stekleničko z liofiliziranim FLICA FAM-DEVD-FMK kaspaza-3 in -7 reagentom
- ❖ 400 µL 1 mM raztopine Hoechst 33342 v H₂O
- ❖ 1 mL 250 µg/mL raztopine PI v H₂O
- ❖ 500 µL DMSO
- ❖ 6 mL raztopine fiksativa, 10% raztopina formaldehida
- ❖ 15 mL 10X spiralnega pufra

Priprava reagentov

1. 1X spiralni pufer iz 10X spiralnega pufra

10X spiralni pufer smo segreli, tako da so se raztopili vsi kristali soli. 1 del 10X spiralnega pufra smo dodali k 9 delom redestilirane vode. Pripravljen spiralni pufer je stabilen 14 dni pri 2-8 °C.

2. Raztopina 150X FLICA

50 µL DMSO smo dodali k liofiliziranemu FLICA reagentu. Tako pripravljeno raztopino smo mešali, dokler se vsebina ni popolnoma raztopila. Neuporabljeni del smo shranili za nadaljnjo uporabo, zaščitenega pred svetlobo na -20°C.

Raztopina 150X FLICA se lahko zamrzne in tali največ dvakrat. Ko se drugič odtali, se del raztopine 150X FLICA, ki se tistega dne ne porabi, zavrže.

3. Delovna raztopina 30X FLICA

1 del raztopine 150X FLICA smo dodali k 4 delom 1x PBS (pH=7,4). Če uporabimo celotno stekleničko, dodamo 200 µL PBS k 50 µL raztopine 150X FLICA. Delovno raztopino 30X FLICA, ki se do konca dne ne porabi, zavrzemo.

Postopek dela

Postopek dela po navodilih proizvajalca

1. Iz gojišča smo odpipetirali vzorec, in sicer:
 - a) koncentracija v gojišču je bila večja od 1×10^6 celic/mL. Iz gojišča smo odpipetirali V (mL) = 3×10^5 celic/c_i, pri čemer je c_i=izmerjena koncentracija v gojišču. Odpipetiran volumen smo dopolnili z gojiščem do 0,3 mL ($V_{\text{dodani}} = 0,3$ mL - V)
 - b) koncentracija v gojišču je bila manjša od 1×10^6 celic/mL. Iz gojišča smo odpipetirali V (mL) = 3×10^5 celic/c_i, pri čemer je c_i=izmerjena koncentracija v gojišču. Odpipetiran volumen smo nato centrifugirali, ter zavrgli toliko supernatanta, da je končni volumen znašal 0,3 mL ($V_{\text{zavrženi}} = V - 0,3$)
 - c) koncentracija v gojišču je bila 1×10^6 celic/mL. Iz gojišča smo odpipetirali 0,3 mL celične suspenzije.
2. 10 µL delovne raztopine 30X FLICA smo dodali k 300 µL celične suspenzije.
3. Celice smo inkubirali 60 minut pri 37°C in 5% CO₂ zaščitene pred svetlobo. Med inkubiranjem smo epruvetko 2x dobro pretresli.
4. Po končani inkubaciji smo dodali 2 mL 1X spiralnega pufra.
5. Celice smo centrifugirali, odstranili supernatant in jih resuspendirali v 1 mL 1X spiralnega pufra.
6. Celice smo ponovno centrifugirali, odstranili supernatant in dodali 400 µL 1X spiralnega pufra.
7. V celično suspenzijo smo odpipetirali 2 µL PI in najmanj 5 min inkubirali na ledu in v temi.
8. Analiza vzorca na pretočnem citometru.

Postopek dela po navodilih proizvajalca z dodatkom protitelesa CD138-PE

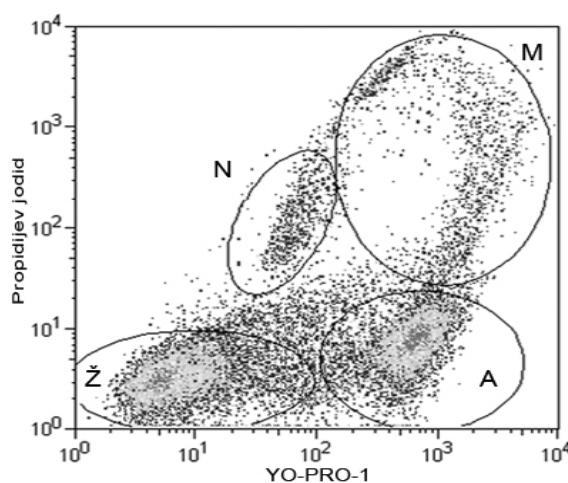
Delali smo po zgornjem postopku, vendar smo pred dodatkom raztopine FLICA (točka 2) dodali še 20 µL protitelesa CD138-PE in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi v temi. Po inkubaciji smo dodali 200 µL gojišča KMM. Nadaljevali smo po zgornjem postopku do konca.

3.3.5.3 Določanje apoptoze z reagenčnim kompletom Vybrant® Apoptosis Assay Kit #4

Osnovne značilnosti metode KIT4

Za razpad jedra med procesom apoptoze je značilna fragmentacija kromatina, razgradnja jedrne ovojnice, nastanek mehurčkov in tvorba mikrojeder. Vse to so razlogi, zaradi katerih so DNK barvila pomembna pri zaznavanju tudi majhnega števila apoptotičnih celic v celični populaciji. Metoda KIT4 je hiter in uporaben test določanja apoptoze. Apoptizo zazna na osnovi spremembe permeabilnosti celične membrane. Komplet vsebuje za uporabo pripravljene raztopine DNK barvil YO-PRO-1 in PI. YO-PRO-1 (zelena fluorescensa) selektivno prehaja celično membrano apoptotičnih celic in se veže na DNK. Celična membrana žive celice je za PI neprepustna. Fluorescensa živih celic je zelo majhna ali pa je sploh ni. Pri nekrotičnih celicah, kjer je celična membrana poškodovana, lahko PI (rdeča fluorescensa) prehaja v celico in se veže na DNK. Fluorescensa PI naraste 20 do 30x po vezavi na DNK.

Žive, apoptotične in nekrotične celice razlikujemo s pomočjo pretočnega citometra z argonskim laserjem pri 488 nm. Slika 7 prikazuje diagram pretočnega citometra po označevanju celic z YO-PRO-1 in PI. Žive celice (\checkmark) so YO-PRO-1 in PI negativne, zgodnje apoptotične celice (A) so YO-PRO-1 pozitivne, PI negativne. Mrtve celice (M) so YO-PRO-1 in PI pozitivne. Pri nekrotičnih celicah (N), kjer DNK propade pa se fluorescensa obeh barvil nekoliko zmanjša (46, 47, 48).



Legenda: A - apoptotične celice, M - mrtve celice, N - nekrotične celice, \checkmark - žive celice.

Slika 7: Histogram razporeditve celic po označevanju celic z YO-PRO-1 in PI (37).

Reagenti

Reagenčni komplet vsebuje:

- ❖ 200 µL 100 mM raztopine barvila YO-PRO®-1 v DMSO
- ❖ 200 µL 1 mg/mL (1,5 mM) raztopine propidijevega jodida v dH₂O

Postopek dela

Postopek dela po navodilih proizvajalca

1. Iz gojišča smo odpipetirali: $V(\text{mL})=1 \times 10^6 \text{ celič/c}_i$, pri čemer je c_i =izmerjena koncentracija iz gojišča.
2. Vzorec smo centrifugirali, odstranili supernatant in sprali z 1x PBS.
3. Vzorec smo ponovno centrifugirali.
4. Supernatant smo zavrgli in sedimentu dodali 1 mL 1x PBS.
5. V 1 mL celične suspenzije s koncentracijo $1 \times 10^6 \text{ celič/mL}$ smo dodali 1 µL YO-PRO®-1 in 1 µL PI.
6. Celice smo inkubirali na ledu 20-30 minut.
7. Celično suspenzijo smo analizirali na pretočnem citometru.

Postopek dela po navodilih proizvajalca z dodatkom protitelesa CD138-PE

1. Iz gojišča smo odpipetirali: $V(\text{mL})=1 \times 10^6 \text{ celič/c}_i$, pri čemer je c_i =izmerjena koncentracija iz gojišča.
2. Vzorec smo centrifugirali in sprali z 1x PBS.
3. Vzorec smo centrifugirali in dodali 100 µL 1x PBS.
4. Po dodatku 20 µL protitelesa CD138-PE, smo 15 minut inkubirali v temi na ledu.
5. Po inkubaciji s protitelesom smo dodali 900 µL 1x PBS.
6. V 1 mL celične suspenzije s koncentracijo $1 \times 10^6 \text{ celič/mL}$ smo dodali 1 µL YO-PRO®-1 in 1 µL PI.
7. Celice smo inkubirali na ledu 20-30 minut.
8. Celično suspenzijo smo analizirali na pretočnem citometru.

3.3.6 Vrednotenje rezultatov

Pri poskusih z vsemi tremi reagenčnimi kompleti smo kot negativno kontrolo vselej uporabili celice gojene brez vseh dodatkov v gojišče. Ker smo pri poskusih spremajali številne dejavnike (koncentracija, čas), predvsem pa je bil zelo specifičen vsak posamezen biološki vzorec, smo dobljene rezultate normirali na vrednost negativne kontrole, da bi dobili medsebojno primerljivost sicer slabo primerljivih rezultatov.

Normiran obseg apoptoze smo izračunali tako, da smo delež celic v kvadrantu B4 (apoptotične celice), ki smo ga dobili po gojenju ob prisotnosti induktorja apoptoze (ATO), delili z deležem celic v istem kvadrantu pri negativni kontroli. Pozitivna kontrola s KPT je služila predvsem kontroli samega postopka. Rezultate smo prikazali v obliki normiranega obsega apoptoze pozitivne kontrole. Normiran obseg apoptoze pozitivne kontrole smo izračunali tako, da smo delež celic v kvadrantu B4 (apoptotične celice), ki smo ga dobili po dodatku induktorja apoptoze (KPT), delili z deležem celic v istem kvadrantu pri negativni kontroli.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ZAMEJITEV USTREZNE POPULACIJE PRI PRETOČNI CITOMETRIJI

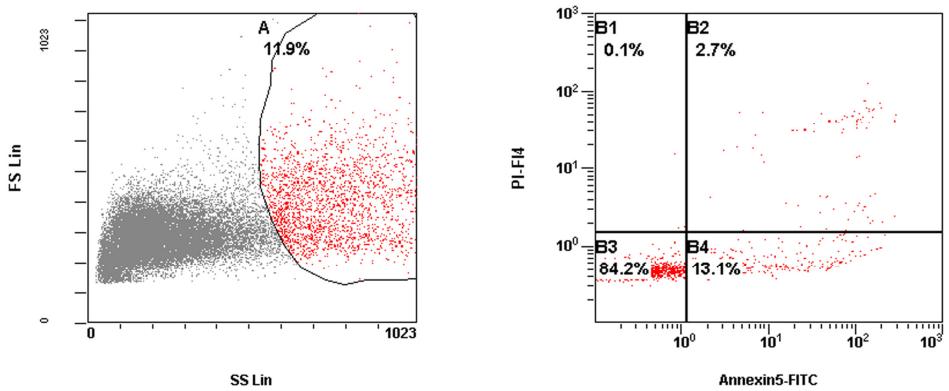
Reagenčni kompleti Aneksin, FAM in KIT4 za določanje obsega apoptoze s pomočjo pretočne citometrije so razviti za delo z uniformnimi populacijami celic-s celičnimi kulturami. Naš biološki vzorec pa so bile kratkotrajno kultivirane celice KM bolnikov z diagnozo plazmocitoma. Tako smo se že na začetku našega dela soočili s problemom zamejitve ustrezne populacije celic, na kateri določamo obseg apoptoze.

4.1.1 Nativna populacija

Izbrano populacijo celic, na kateri smo določali obseg apoptoze z vsemi tremi metodami, smo zamejili kot subpopulacijo vseh celic. V izbrani subpopulaciji smo nato določali obseg apoptoze, spremljali pa smo tudi pozno apoptozo in nekrozo ter delež živih celic.

Slika 8 prikazuje način izbire populacije celic pri bolniku z DP (citomorfološko 60% plazmocitomskih celic). Celice smo gojili ob prisotnosti KPT, delež apoptotičnih celic pa določili z uporabo Aneksina. Subpopulacijo celic A smo zamejili v histogramu, kjer so celice razvrščene glede na sisanje (direktno in pod kotom). S tem smo izločili celični debri, kjer so ostanki nekrotičnega tkiva in eritrociti (slika 8a). Slika 8b pa prikazuje histogram razporeditve celic glede na vezavo PI na jedrno DNK in s FITC označenega Aneksina V, ki se veže na apoptotične celice.

Celice v kvadrantu B3 so žive, celice v kvadrantu B4 so apoptotične, celice v kvadrantu B2 pa so v pozni apoptizi in nekrozi. Zamejitev subpopulacije je nujna, ker sicer v kvadrantu B3 poleg živih celic ostane tudi celični debri in eritrociti, kar izrazito poveča delež navidezno živih celic ter posledično znatno zmanjša delež apoptotičnih in nekrotičnih celic.

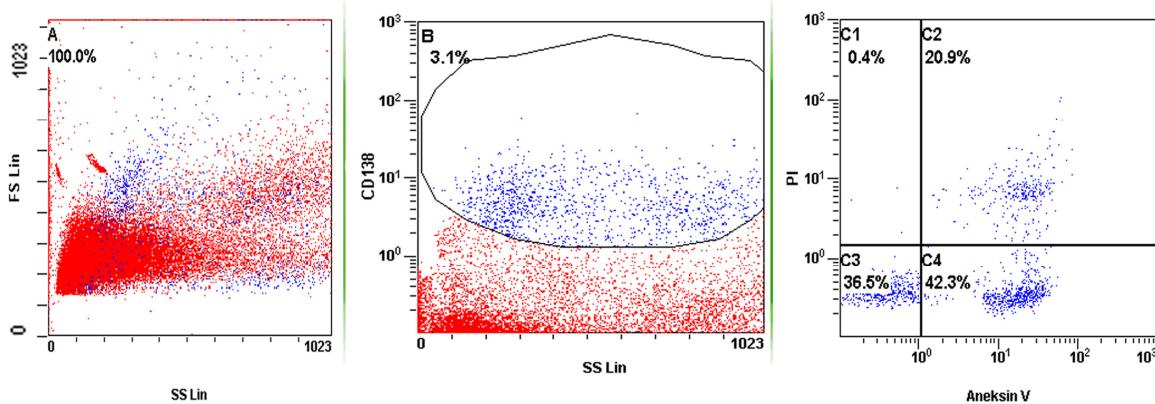


Slika 8: Zamejitev ustrezone populacije celic pri bolniku z DP (A). Celice gojene ob prisotnosti KPT. Določitev obsega apoptoze z Aneksinom (B).

4.1.2 Označevanje s protitelesom CD138-PE

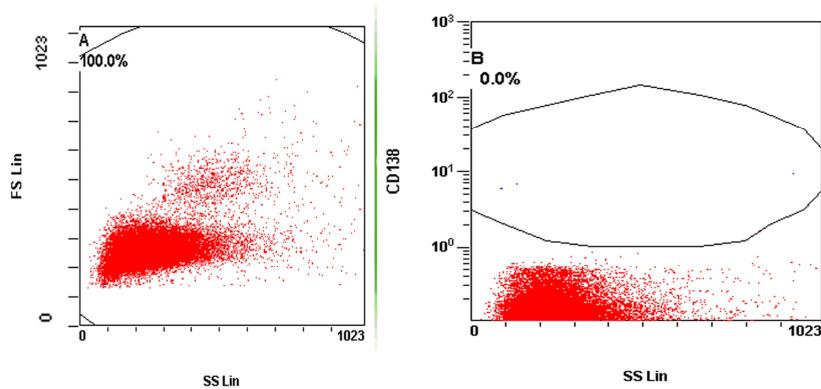
Da bi zmanjšali vpliv subjektivne zamejitve subpopulacije, smo poskusili plazmatke oz. plazmocitomske celice označiti z zanje dokaj specifičnim protitelesom CD138-PE in le na njih določiti obseg apoptoze.

Slika 9 prikazuje način zamejitve populacije celic pri bolniku z DP (citomorfološko 48% plazmocitomskih celic). Celice smo gojili ob prisotnosti KPT, plazmatke označili s protitelesom CD138-PE, obseg apoptoze pa določili z Aneksinom. V celotni populaciji celic A (slika 9a), smo zamejili subpopulacijo B (slika 9b), na katere se je vezalo protitelo CD138-PE. Odstotek celic z vezanim protitelesom je bil majhen, le 3,1%, kar je znatno manj kot pa je bil delež ocenjen pri citomorfološkem pregledu vzorca (48%). Slika 9c prikazuje histogram razporeditve celic, pri določitvi apoptoze z Aneksinom znotraj subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic.



Slika 9: Zamejitev populacije celic pri bolniku z DP (A). Celice gojene ob prisotnosti KPT. Zamejitev subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic (B). Določitev obsega apoptoze z Aneksinom (C).

Slika 10 prikazuje rezultate dobljene s pretočno citometrijo, ko v prejetem vzorcu KM ni bilo plazmatk. Celice smo gojili ob prisotnosti KPT, plazmatke označili s protitelesom CD138-PE, obseg apoptoze pa določili z Aneksinom. V celotni populaciji celic A (slika 10a), smo zamejili subpopulacijo B (slika 10b), ki je prazna, ker se protitelo CD138-PE ni vezalo, saj v vzorcu bolnika z DP ni bilo plazmatk.



Slika 10: Zamejitev populacije celic pri bolniku z DP, kjer v vzorcu ni bilo plazmatk (A). Celice gojene ob prisotnosti KPT. Zamejitev subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic (B).

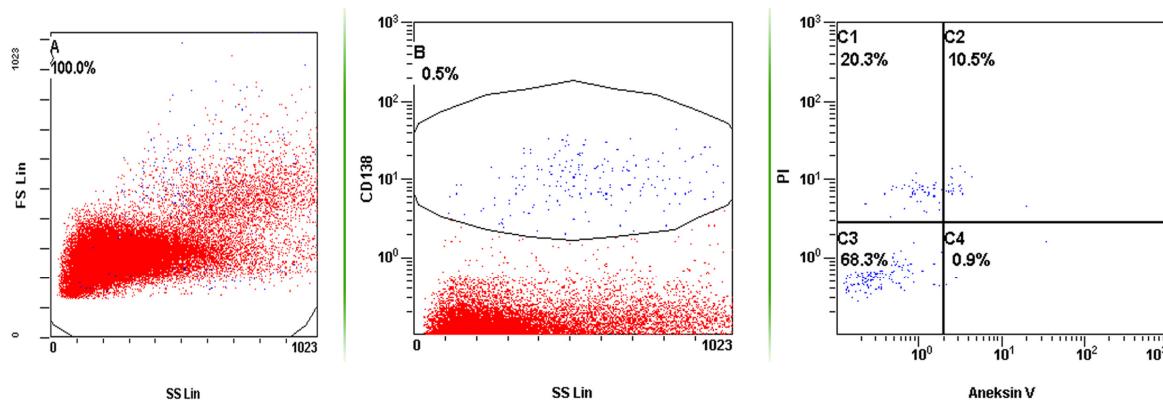
Protitelo CD138-PE se na plazmocitomske celice očitno ni vezalo, glede na znatno večji delež plazmocitomskih celic v kulturi KM. Makromolekula CD138, imenovana tudi syndecan-1, na katero se veže protitelo CD138-PE, je izražena na površini plazmocitomskih celic. Nekatere plazmocitomske celice bolnikov z DP imajo bolj druge pa manj izražen CD138 (39). V literaturi (49, 50) smo zasledili, da lahko izražanje CD138

zmanjša tudi apoptoza, saj povzroči izplavljanje CD138 s celične površine plazmocitomske celice. Serumski CD138 je zato pri bolnikih z DP povečan in ima slab napovedni pomen. V prej navedeni literaturi tudi ugotavljajo, da lahko samo gojenje zmanjša vezavo CD138, vendar sami tega nismo ugotovili. Izmerili smo namreč odstotek vezanega CD138-PE pred gojenjem in ga primerjali z odstotkom vezanega CD138-PE, ki smo ga izmerili po 24 urnem gojenju. Ugotovili smo, da med odstotkoma vezave CD138-PE ni razlike.

4.1.3 Liza eritrocitov s hipotonično raztopino in označevanje s protitelesom CD138-PE

Z namenom, da bi se izognili eritrocitom, ki predstavljajo velik del debrija pri določitvah s pretočno citometrijo, smo preizkusili obdelavo vzorca s hipotonično raztopino.

Pri bolniku z DP (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) smo celice gojili ob prisotnosti KPT in kasneje lizirali eritrocite s hipotonično raztopino, ter plazmatke označili s protitelesom CD138-PE (slika 11). Obseg apoptoze smo določili z Aneksinom. V celotni populaciji celic A (slika 11a), smo zamejili subpopulacijo celic B, ki vsebuje plazmatke, na katere se je vezalo protitelo CD138-PE (slika 11b). Samo v tej populaciji smo z Aneksinom določili delež celic v apoptozi (slika 11c).



Slika 11: Zamejitev populacije celic pri bolniku z DP (A). Celice gojene ob prisotnosti KPT in liza eritrocitov s hipotonično raztopino. Zamejitev subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic (B). Določitev obsega apoptoze z Aneksinom (C).

Preglednica VI podaja obseg apoptoze in vezave CD138-PE pri vzorcu, obdelanem s hipotonično raztopino in brez. Vzorec KM (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) smo gojili ob prisotnosti KPT in plazmatke označili s protitelesom CD138-PE. Obseg

apoptoze smo določili z Aneksinom, FAM in KIT4. Odstotki vezave CD138-PE so navedeni v preglednici VI. S hipotonično obdelavo se odstotek celic z vezanim CD138-PE ni povečal. Iz tega lahko sklepamo, da ta postopek ni ustrezен za odstranitev celičnega debrija. Primerjava obsega apoptoze pri kontrolah s hipotonično predobdelavo in brez ne pokaže pomembnih razlik. Uporaba hipotonične raztopine torej ne vpliva na obseg določene apoptoze (kvadrant B4) in nekroze (kvadranta B1 in B2).

Preglednica VI: Vpliv lize eritrocitov s hipotonično raztopino. Celice KM (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) gojene ob prisotnosti KPT ($66,7 \mu\text{M}$), plazmatke označene s CD138-PE. Obseg apoptoze določen z Aneksinom, FAM in KIT4.

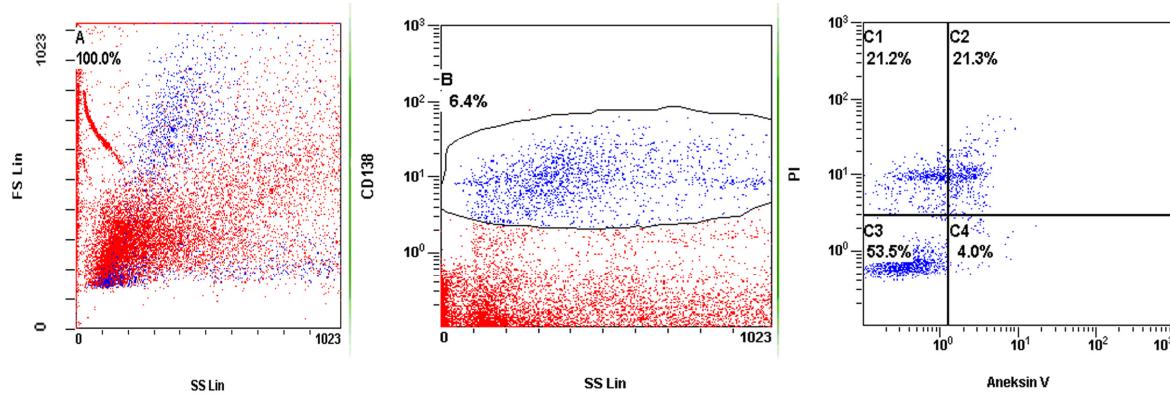
BREZ HIPOTONIJE + protitelo CD138-PE	B(%)	KIT4		FAM		ANEKSIN	
		Kontrola	KPT	Kontrola	KPT	Kontrola	KPT
		0,7% CD138-PE	1,3% CD138-PE	0,7% CD138-PE	0,8% CD138-PE	0,6% CD138-PE	0,8% CD138-PE
B1	1,9	2,7	6,6	10,1	28,4	35,8	
B2	19,6	23,6	4,2	5	9,1	2,8	
B3	75,2	68,9	82,6	79,7	61,2	61	
B4	3,2	4,8	6,6	5,1	1,4	0,4	

HIPOTONIJA + protitelo CD138-PE	B(%)	KIT4		FAM		ANEKSIN	
		Kontrola	KPT	Kontrola	KPT	Kontrola	KPT
		0,7% CD138-PE	0,8% CD138-PE	1% CD138-PE	1% CD138-PE	0,5% CD138-PE	0,5% CD138-PE
B1	0,8	2,3	6,5	9	15	21	
B2	8,1	13,2	4,3	4,6	13,5	10,7	
B3	89,2	78,8	81,3	75,5	67,2	67,5	
B4	1,9	5,7	7,8	10,9	4,4	0,8	

Legenda: B1 - delež celic v nekrozi, B2 - delež celic v pozni apoptozi in nekrozi, B3 - delež živih celic, B4 - delež apoptotičnih celic

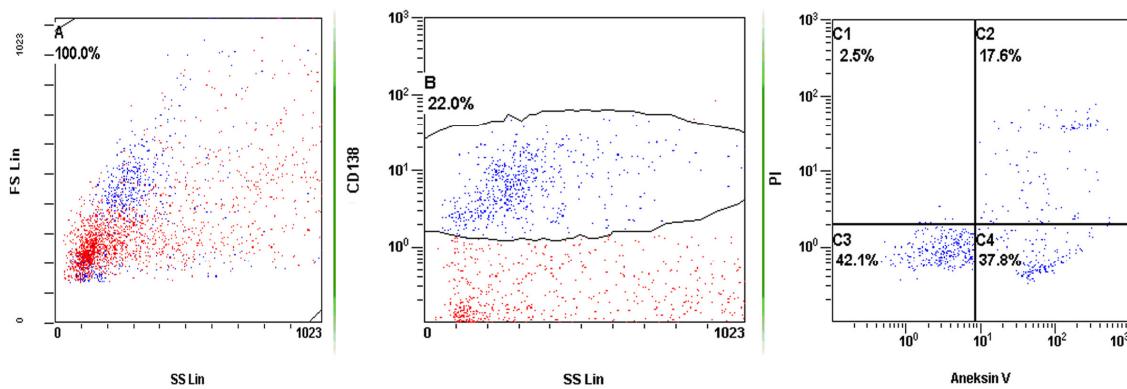
4.1.4 Ločba mononuklearnih celic preko fikola in označevanje s protitelesom CD138-PE

Z ločbo mononuklearnih celic preko fikola smo se žeeli izogniti predvsem eritrocitom v vzorcu. Slika 12 prikazuje rezultate pretočne citometrije, kjer smo mononuklearne celice KM (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) najprej ločili preko fikola, jih gojili ob prisotnosti KPT in plazmatke označili s protitelesom CD138-PE. Obseg apoptoze smo določili z Aneksinom. V celotni populaciji celic A (slika 12a), smo zamejili subpopulacijo B, ki vsebuje plazmatke, na katere se je vezalo protitelo CD138-PE (slika 12b). Samo v tej populaciji smo z Aneksinom določili delež celic v apoptozi (slika 12c).



Slika 12: Zamejitev populacije celic pri bolniku z DP (A). Mononuklearne celice ločene na fikolu in gojene ob prisotnosti KPT. Zamejitev subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic (B). Določitev obsega apoptoze z Aneksinom (C).

Slika 13 prikazuje rezultate poskusa s celicami KM pri bolniku z DP (citomorfološko 48% plazmocitomskih celic). Tudi tukaj smo se z uporabo ločbe mononuklearnih celic preko fikola izognili celičnemu debriju. Odstotek vezave CD138-PE je znašal kar 22%, a smo dobili tako majhno količino celic, da nismo mogli nadaljevati s poskusi (slika 13a).



Slika 13: Zamejitev populacije celic pri bolniku z DP (A). Mononuklearne celice ločene na fikolu in gojene ob prisotnosti KPT. Zamejitev subpopulacije CD138-PE pozitivnih celic (B). Določitev obsega apoptoze z Aneksinom (C).

Preglednica VII primerja obseg apoptoze in nekroze ter vezave CD138-PE z uporabo ločbe mononuklearnih celic preko fikola in brez ločbe preko fikola. Vzorec KM (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) smo gojili ob prisotnosti KPT in plazmatke označili s protitelesom CD-138-PE. Obseg apoptoze smo določili z Aneksinom, FAM in KIT4. Z ločbo mononuklarnih celic preko fikola se je odstotek vezave CD138-PE povečal glede na

vzorec, kjer ločbe na fikolu nismo uporabili. Iz navedenega lahko sklepamo, da smo se z ločbo mononukleranih celic preko fikola uspeli izogniti motečim komponentam vzorca. Primerjava kontrol pokaže celo nekoliko večji delež apoptoze in nekroze v primeru, kjer mononuklearnih celic nismo ločili preko fikola. Iz tega lahko sklepamo, da sama uporaba fikola ne vpliva na apoptozo in nekrozo. Lahko tudi rečemo, da je ločba preko fikola boljša, saj se s tem izognemo eritrocitom, ki v gojišču porablja hranila in tako lahko pospešijo apoptozo in nekrozo drugih celic v gojišču.

Ločba celic na fikolu se je izkazala kot najprimernejša, vendar z eno veliko slabostjo. To je zelo majhna količina celic, ki jih z uporabo takšne ločbe na koncu dobimo. Tudi označevanje plazmocitomskih celic s CD138-PE se je izkazalo za uporabno le v kombinaciji z ločbo na fikolu. Zato smo se odločili, da ga v poskusih, kjer celic nismo ločevali, ne bomo uporabljali. Nenazadnje gre tudi za cenovno in časovno neugoden dodaten korak v celotnem postopku.

Preglednica VII: Vpliv ločbe mononuklearnih celic na fikolu. Celice KM (citomorfološko 40% plazmocitomskih celic) gojene ob prisotnosti KPT (66,7 µM), plazmatke označene s

CD138-PE. Obseg apoptoze določen z Aneksinom, FAM in KIT4.

BREZ FIKOLA + protitelo CD138-PE	B (%)	KIT4		FAM		ANEKSIN	
		Kontrola	KPT	Kontrola	KPT	Kontrola	KPT
		0,9% CD138-PE	1,3% CD138-PE	0,7% CD138-PE	0,9% CD138-PE	0,5% CD138-PE	2,6% CD138-PE
	B1	0	0	14,1	12,3	10,9	33,9
	B2	35,4	49,1	6,3	6,9	43,1	47
	B3	59	43,2	75,1	78,2	45,4	16,8
	B4	5,6	7,7	4,4	2,6	9,6	2,2

FIKOL + protitelo CD138-PE	B(%)	KIT4		FAM		ANEKSIN	
		Kontrola	KPT	Kontrola	KPT	Kontrola	KPT
		7,6% CD138PE	15,2% CD138-PE	5,6% CD138-PE	6,7% CD138-PE	4,7% CD138-PE	6,7% CD138-PE
	B1	0	0	8,4	6,3	11,3	19,8
	B2	19,7	26,6	4,5	6,3	16,9	22,5
	B3	75,2	62,5	83,6	80,4	65,3	54,4
	B4	5,1	10,8	3,5	7	6,5	3,3

Legenda: B1 - delež nekrotičnih celic, B2 - delež celic v pozni apoptozi in nekrozi, B3 - delež živih celic, B4 - delež apoptotičnih celic

4.2 UPORABA KAMPTOTECINA KOT POZITIVNE KONTROLE

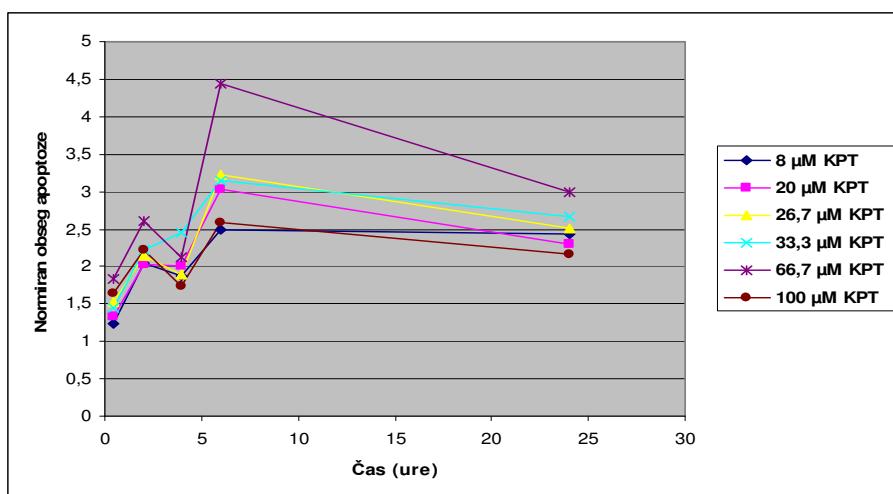
V opravljenih poskusih smo kot negativno kontrolo uporabili celice, ki smo jih gojili brez dodatka induktorja apoptoze. Kot pozitivno kontrolo smo izbrali gojenje celic ob prisotnosti KPT, ki je dobro znan induktor apoptoze. Je inhibitor topoizomeraze I in se uporablja kot protitumorna učinkovina, ki sproži apoptozi v delečih se celicah. Kot pozitivno kontrolo so ga uporabili tudi proizvajalci testiranih reagenčnih kompletov. Glede na specifičnost uporabljenega sistema (celice KM) smo najprej določili koncentracijski in časovni optimum za gojenje celic ob dodatku KPT.

4.2.1 Uporaba kamptotecina pri metodi z Aneksinom

Želeli smo določiti najmanjšo koncentracijo KPT, kjer apoptoza že doseže najvišjo vrednost. Poskuse smo zaradi omejene količine biološkega materiala izvedli le z Aneksinom. Izbrali smo vzorec KM z velikim deležem plazmocitomskih celic (okoli 50%) in celice gojili 0,4, 2, 4, 6 in 24 ur ob prisotnosti različnih koncentracij KPT. Za negativno kontrolo so služile celice gojene brez dodatka induktorja apoptoze. Koncentracijske in časovne poskuse smo izvedli istočasno.

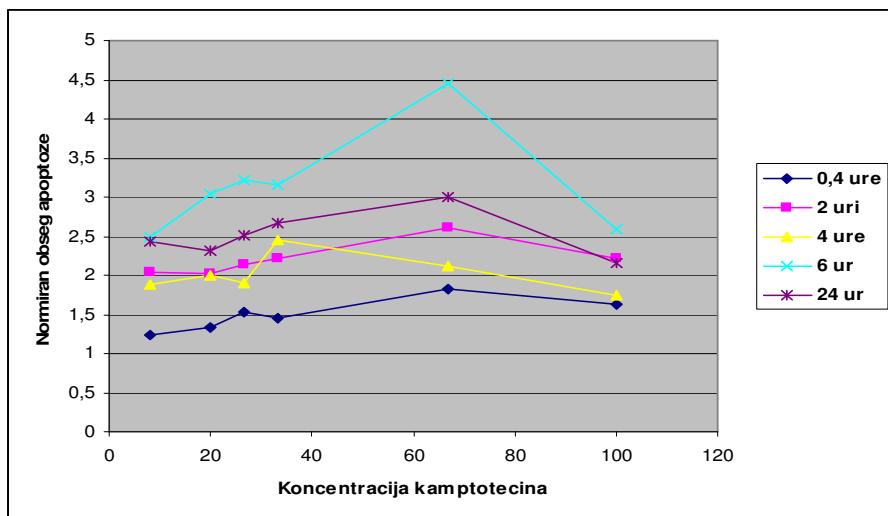
V grafu 1 smo povzeli vse rezultate poskusa. Ugotovili smo, da moramo uporabiti čase gojenja nad 4 ure. Ko smo čas gojenja podaljšali na 24 ur, se je obseg apoptoze izenačil tudi v širokem koncentracijskem intervalu.

Graf 1: Odvisnost na kontrolo normiranega obsega apoptoze od časa gojenja pri različnih koncentracijah kamptotecina.



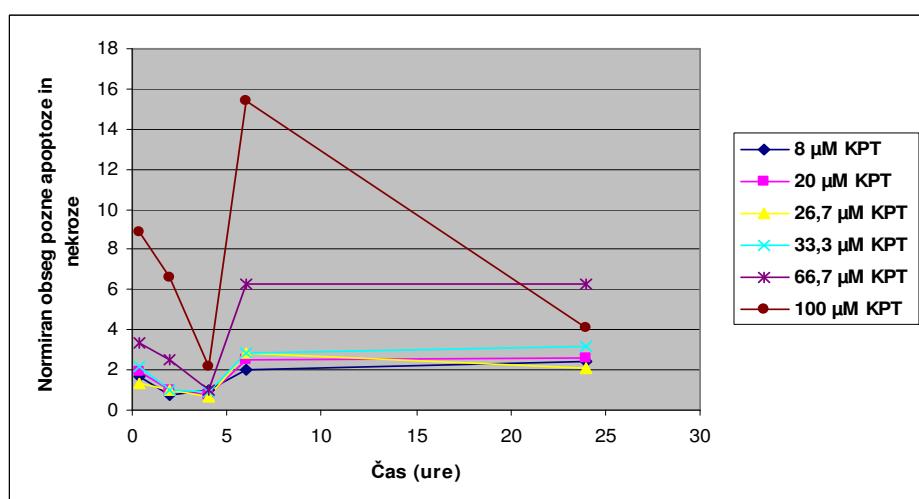
Graf 2 podaja koncentracijsko odvisnost obsega apoptoze vseh opravljenih časov gojenja. Vidimo, da smo dobili optimalne rezultate v relativno širokem koncentracijskem območju. Obseg apoptoze je dosegel največje vrednosti okrog $60 \mu\text{M}$ KPT in pri času 6 ur. Nadaljnje gojenje ne doprinese k končni vrednosti.

Graf 2: Odvisnost na kontrolo normiranega obsega apoptoze od koncentracije kamptotecina pri različnih časih gojenja.



Visoke koncentracije KPT ($66,7 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$) so povečale deleže celic v fazi pozne apoptoze in nekroze. Ostale uporabljene koncentracije na pozno apoptozo in nekrozo niso imele bistvenega vpliva (graf 3).

Graf 3: Odvisnost na kontrolo normiranega obsega pozne apoptoze in nekroze od časa gojenja pri različnih koncentracijah kamptotecina.



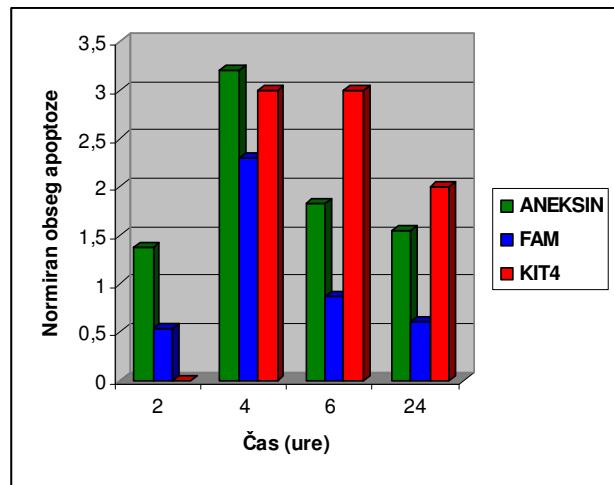
Opravljeni poskusi so pokazali, da koncentracija KPT ne vpliva pomembno na obseg apoptoze, vpliva pa na obseg pozne apoptoze in nekroze. Gojenje celic KM ob prisotnosti večjih koncentracij KPT zviša obseg pozne apoptoze in nekroze. Zanesljivejši so časi gojenja s KPT nad 4 ure. Najpomembnejša je ugotovitev, da dodatek tudi najmanjše koncentracije KPT pri vseh časih zviša obseg apoptoze glede na kontrolno skupino. Zato je uporaba KPT kot pozitivne kontrole ustrezna pri različnih časih gojenja, kot tudi pri različnih koncentracijah.

4.2.2 Vpliv časa gojenja s kamptotecinom na obseg apoptoze pri metodah Aneksin, FAM in KIT4

Uporabo KPT kot pozitivne kontrole smo želeli preveriti tudi pri metodah FAM in KIT4. Zaradi omejene količine biološkega materiala nam za metodi FAM in KIT4 ni uspelo narediti koncentracijske in časovne odvisnosti za KPT, kot smo to storili pri poskusih z Aneksinom, pač pa smo naredili primerjavo časovnega vpliva gojenja s KPT za vse tri metode. Primerjali smo tudi vse tri metode pri različnih vzorcih KM glede na infiltracijo s plazmocitomskimi celicami.

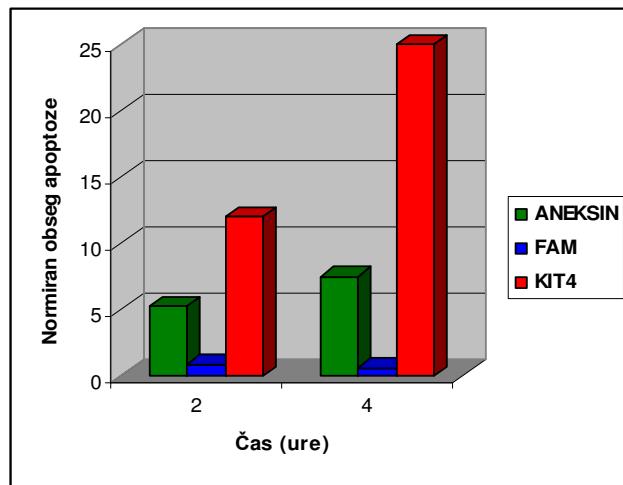
Graf 4 prikazuje obseg apoptoze normiran na kontrolno vrednost pri normalnem KM. KM smo gojili ob prisotnosti 8 µM KPT, kar je sicer najmanjša uporabljena koncentracija, ki pa se je prav tako pokazala za učinkovito pozitivno kontrolo pri metodi z Aneksinom. Rezultati metode FAM so bili uporabni le pri času 4 ure, pri krajših in daljših časih gojenja so bili rezultati nekonsistentni. Pri metodi z Aneksinom je prišlo do povečanja obsega apoptoze pri vseh časih gojenja. Pri metodi KIT4 je potrebno celice gojiti vsaj 4 ure za to, da je KPT lahko služil kot ustrezna pozitivna kontrola. Vendar je pri tem potrebno poudariti, da je bil obseg apoptoze pri vseh metodah zelo majhen. Koncentracija KPT je bila premajhna, da bi vplivala na obseg pozne apoptoze in nekroze.

Graf 4: Primerjava metod (Aneksin, FAM in KIT4) pri določanju obsega apoptoze v odvisnosti od časa pri normalnem KM ($8 \mu\text{M}$ KPT).



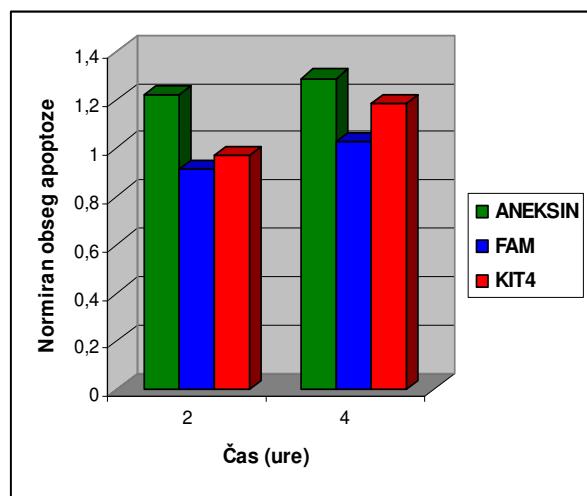
Graf 5 prikazuje obseg apoptoze normiran na kontrolno vrednost pri vzorcu bolnika z MINP. KM smo gojili ob prisotnosti $66,7 \mu\text{M}$ KPT. Metoda FAM ni dala uporabnih rezultatov. Pri metodi z Aneksinom in KIT4 se je z daljšim časom gojenja povečal tudi obseg apoptoze.

Graf 5: Primerjava metod (Aneksin, FAM in KIT4) pri določanju obsega apoptoze v odvisnosti od časa pri KM bolnika z MINP ($66,7 \mu\text{M}$ KPT).



Graf 6 prikazuje rezultate poskusa, kjer smo celice KM bolnika z DP (100% infiltracija s plazmocitomskimi celicami) gojili ob prisotnosti 8 μ M KPT. Pri metodi FAM je bil obseg apoptoze ponovno manjši kot pri kontroli. Z uporabo metode Aneksin smo potrdili uporabo KPT kot pozitivne kontrole, s podaljševanjem časa gojenja pa se je povečal tudi obseg apoptoze. Pri KIT4 smo morali celice gojiti vsaj 4 ure, da se je KPT izkazal kot ustreznega pozitivnega kontrolo.

Graf 6: Primerjava metod (Aneksin, FAM in KIT4) pri določanju obsega apoptoze v odvisnosti od časa pri KM bolnika z DP (8 μ M KPT).



Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je uporaba KPT kot pozitivne kontrole pri različnih časih gojenja in pri različni infiltraciji s plazmatkami povsem ustrezena le za metodo z Aneksinom, kjer je pri vseh časih gojenja in pri različnem deležu plazmatk prišlo do povečanja apoptoze glede na kontrolo. Metoda FAM se je izkazala kot nezanesljiva, saj KPT ni dal rezultatov pričakovanih za pozitivno kontrolo. Obseg apoptoze glede na negativno kontrolo je bil pri vseh opravljenih poskusih manjši in neodvisen od časa gojenja. Pri metodi KIT4 je bila uporaba KPT kot pozitivne kontrole večinoma ustrezena, a se je pokazalo, da na obseg apoptoze pomembno vpliva čas inkubacije celic s KPT. Celice smo morali gojiti vsaj 4 ure, da lahko z gotovostjo trdimo, da tudi najmanjša uporabljenega koncentracija KPT (8 μ M) ustreza kot pozitivna kontrola.

4.3 OCENA INDUKCIJE APOPTOZE Z ARZENOVIM TRIOKSIDOM PRI VSEH TREH METODAH

Posamezni avtorji v literaturi navajajo ATO kot sredstvo, ki sproži apoptozo. V večini primerov gre za poskuse na plazmocitomskih celičnih linijah (39, 40, 51, 52). Rousselot in sodelavci pa so pokazali, da ATO sproži apoptozo tudi na sveže izoliranih plazmocitomskih celicah KM bolnikov s plazmocitomom (39). Apoptozo so določali z uporabo metode z Aneksinom. Določanja apoptoze, ki temelji na principu metode FAM in KIT4, po gojenju z ATO na plazmocitomskih celičnih linijah, kot tudi na sveže izoliranih plazmocitomskih celicah v literaturi nismo zasledili.

Glavna težava, s katero smo se srečevali v tem delu naloge, je bila premajhna koncentracija celic. Zaradi tega smo bili zelo omejeni pri številu poskusov s posameznim vzorcem. Glede na predhodno navedene nekonsistentne rezultate, ki smo jih dobili z uporabo metode FAM, smo se tudi v nadaljnjih poskusih z ATO odločili, da v primerih, ko je bila količina biološkega vzorca premajhna, opustimo pokuse s to metodo.

Naslednja velika težava je bila prilagoditev metod, ki so razvite na celičnih kulturah, na naše realne vzorce celic KM. Tako izhodiščne koncentracije ATO, kot čase izpostavitve ATO in KPT smo morali med izvajanjem poskusov prilagajati. K omejeni količini razpoložljivega biološkega vzorca pri posameznem bolniku moramo prišteti še dejstvo, da je bila diagnoza postavljena šele po izvedbi poskusov (ali gre za DP, MINP, reaktivne spremembe KM, osebe z normalnim KM).

Vpliv ATO na obseg apoptoze smo opazovali pri bolnikih z DP, MINP, reaktivnimi spremembami KM in pri osebah z normalnim KM. Celice KM smo gojili ob prisotnosti različnih koncentracij ATO. Uporabili smo 2, 5, 10 in 25 μM ATO. Negativna kontrola je bila kultura brez dodatka induktorja apoptoze, pozitivna kontrola pa kultura z dodatkom KPT. Določili smo obseg apoptoze in tudi delež celic v fazi pozne apoptoze in nekroze.

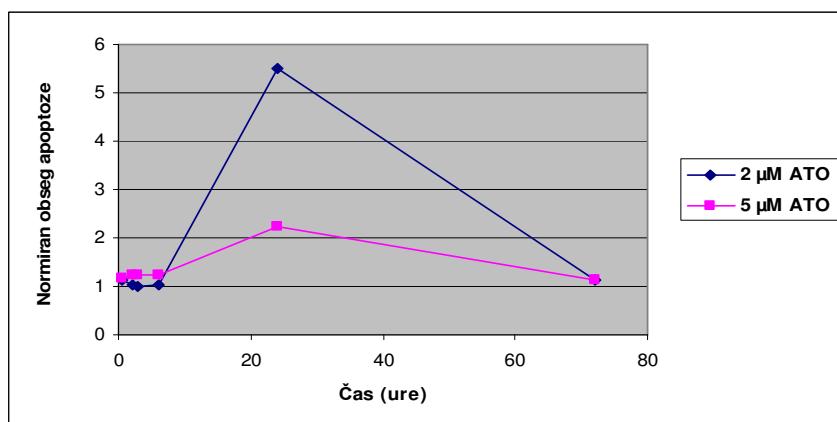
4.3.1 Vpliv začetne koncentracije in časa gojenja z arzenovim trioksidom

Pri poskusih ocene indukcije apoptoze z ATO smo se srečali s problemom izbire ustreznega koncentracije ATO in ustreznega časa gojenja celic z ATO. Pri izbiri ustreznega koncentracije ATO smo večinoma izhajali iz območja terapevtskih koncentracij (2 in 5 μM), ki smo jih nato zvečali do 25 μM , da bi preverili vpliv na indukcijo apoptoze. Pri izbiri časa gojenja pa je bil problem večji. Tarče apoptoze posameznih reagenčnih kompletov so različne in se aktivirajo v različnih fazah apoptoze. Časovni parameter je zato kritičen. V naših poskusih smo testirali širok časovni interval (od 0,4 do 72 ur). Ker pa smo bili zelo omejeni s količino razpoložljivega biološkega materiala, se pogoj v posameznih poskusih nekoliko razlikujejo.

Koncentracijske in časovne poskuse smo izvedli na celicah KM bolnikov z DP. Apoptozo smo določili le z metodo z Aneksinom, tako kot pri poskusih s KPT. Poskuse smo izvedli v dveh oz. treh zaporednih poskusih.

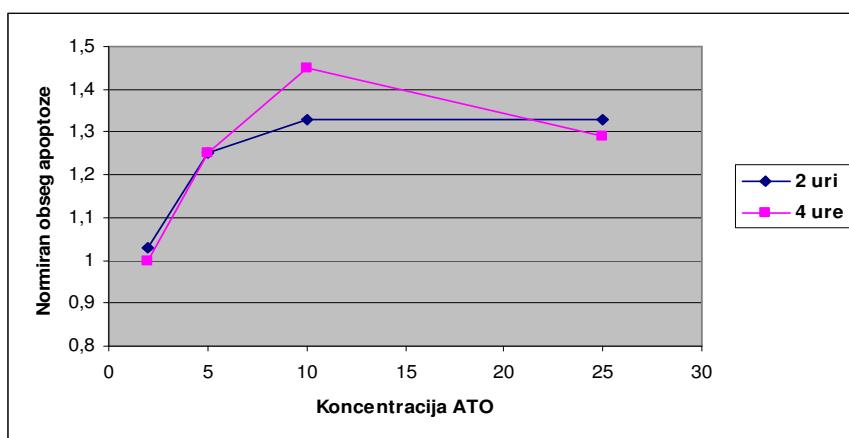
Graf 7 prikazuje rezultate na plazmocitomskih celicah (citomorfološko 60–100% plazmocitomskih celic). Gojili smo 0,4, 2, 3, 6, 72 ur s terapevtsko sprejemljivima koncentracijama ATO (2 in 5 μM). Pri krajših časih gojenja praktično ni prišlo do indukcije apoptoze z ATO. Po 24 urnem gojenju z ATO je bil obseg apoptoze največji, pri daljši izpostavitvi ATO pa obseg apoptoze ni več naraščal, pač pa se je nekoliko zmanjšal.

Graf 7: Odvisnost na kontrolo normiranega obsega apoptoze od časa gojenja z 2 in 5 μM ATO. Celice KM bolnikov z DP (citomorfološko 60-100% plazmocitomskih celic).



Graf 8 prikazuje rezultate pri poskusih s plazmocitomskimi celicami (citomorfološko 60-100% plazmocitomskih celic). Gojili smo 2 in 4 ure ob prisotnosti 2, 5, 10 in 25 μM ATO. Ugotovili smo, da je minimalna potrebna koncentracija za indukcijo apoptoze 5 μM ATO. 2 μM ATO je nekoliko premajhna koncentracija za indukcijo apoptoze na kulturah plazmocitomskih celic, večanje koncentracije ATO na 10 μM pa obsega apoptoze pomembno ne spremeni.

Graf 8: Odvisnost na kontrolo normiranega obsega apoptoze od koncentracije arzenovega trioksida po 2 in 4 urnem gojenju. Celice KM bolnikov z DP (citomorfološko 60-100% plazmocitomskih celic).

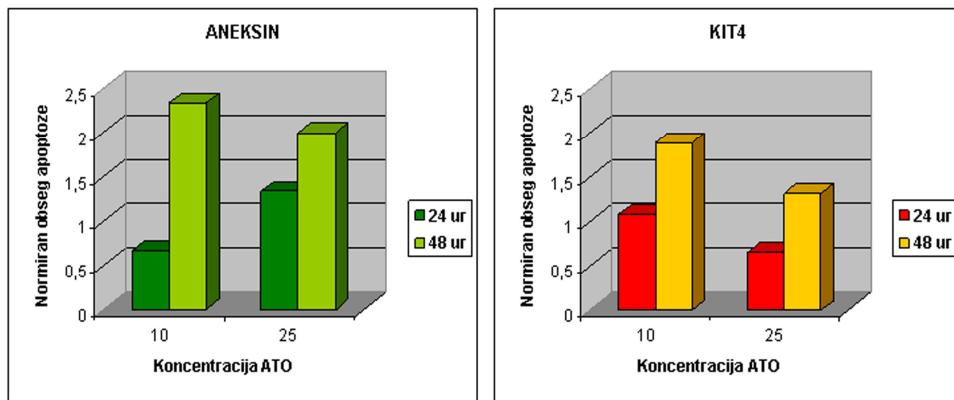


4.3.2 Primerjava metod Aneksin, FAM in KIT4 za oceno indukcije apoptoze z arzenovim trioksidom

Osebe z normalnim kostnim mozgom

Graf 9 prikazuje obseg apoptoze pri celicah normalnega KM. Vzorec KM smo gojili ob prisotnosti 10 in 25 μM ATO, obseg apoptoze pa določili po 24 in 48 urah gojenja z Aneksin in KIT4 metodo, ker nam zaradi premajhne količine biološkega materiala poskusov za FAM ni uspelo narediti. Pri obeh metodah je prišlo do indukcije apoptoze po 48 urnem gojenju z obema koncentracijama ATO. Po 24 urnem gojenju do povečanega obsega apoptoze ni prišlo pri nobeni koncentraciji ATO.

Graf 9: Normiran obseg apoptoze v odvisnosti od koncentracije ATO določen z Aneksinom in KIT4. 24 in 48 urno gojenje, 10 in 25 μ M ATO, normalen KM.



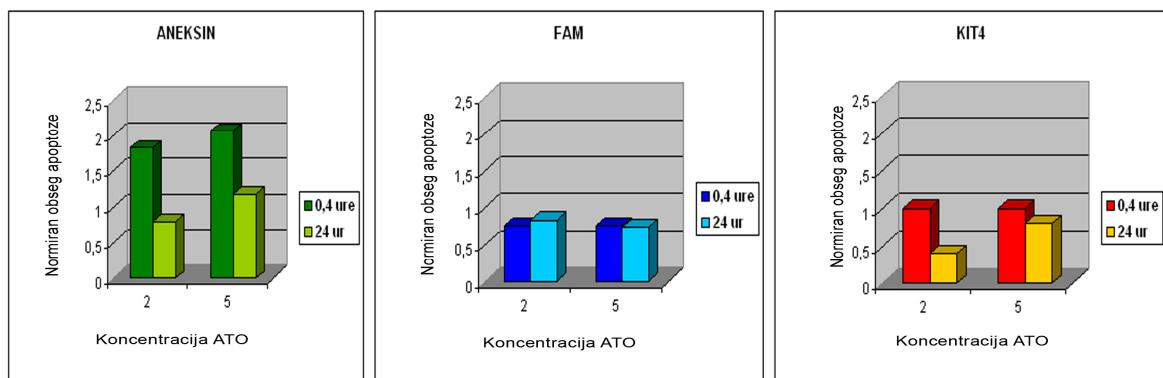
Bolniki z MINP

Indukcijo apoptoze po gojenju kulture z ATO smo ocenili tudi pri bolnikih z MINP. Kulturo smo gojili ob prisotnosti terapevtsko sprejemljivih koncentracij ATO (2 in 5 μ M). Apoptozo smo določili po 0,4 in 24 urnem gojenju z ATO in rezultate zbrali v grafu 10. Bolnik je imel okoli 9% plazmatk. Pozitivno kontrolo smo opravili z gojenjem ob prisotnosti 100 μ M KPT. Obseg apoptoze smo določili z Aneksinom, FAM in KIT4 metodo. Indukcijo apoptoze smo ponovno zaznali pri uporabi Aneksina, kjer pa se je obseg apoptoze z naraščanjem koncentracije povečal le po začetnem gojenju (0,4 ure). Po 24 urnem gojenju z ATO se je obseg apoptoze zmanjšal glede na negativno kontrolo pri obeh koncentracijah. Pri metodi FAM je bila apoptoza ponovno manjša od negativne kontrole pri obeh koncentracijah ATO in neodvisna od časa gojenja. Pozitivna kontrola s KPT ni bila ustrezna. Obseg apoptoze pri metodi KIT4 je bil manjši od negativne kontrole pri obeh koncentracijah ATO in obeh časih gojenja.

Graf 10: Normiran obseg apoptoze v odvisnosti od koncentracije ATO določen z Aneksinom, FAM in KIT4. 0.4 in 24 urno gojenje, vzorca z ATO, 2 in 5 μM ATO, KM bolnika z MINP (9% plazmocitomskih celic). Pozitivna kontrola: 100 μM KPT.

Normiran obseg apoptoze pozitivne kontrole (vrednosti so normirane glede na negativno kontrolo);

- po 0,4 urah gojenja: Aneksin 4.6, FAM 0.6, KIT4 13,
- po 24 urah gojenja: Aneksin 2.6, FAM 0.3, KIT4 1.7.



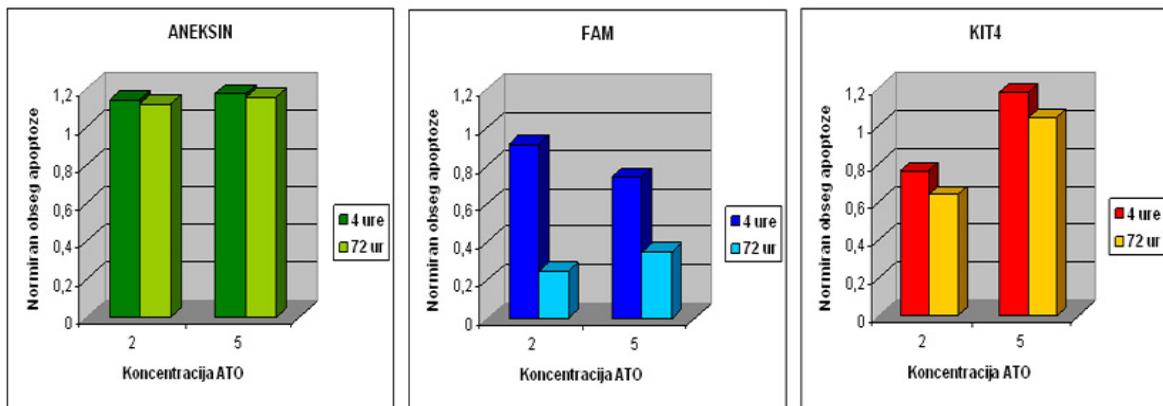
Bolniki z diseminiranim plazmocitomom

Pri našem delu nas je najbolj zanimal vpliv ATO na bolnike z DP. Graf 11 prikazuje rezultate pri bolniku z DP (citolomorfološko 60% plazmocitomskih celic). Celice KM smo gojili ob prisotnosti 2 in 5 μM ATO, obseg apoptoze pa določili po 4 in 72 urah gojenja. Pozitivno kontrolo smo opravili z gojenjem ob prisotnosti 20 μM KPT. Obseg apoptoze smo določili z Aneksinom, FAM in KIT4 metodo. Pri metodi z Aneksinom smo zaznali indukcijo apoptoze pri obeh koncentracijah in časih gojenja z ATO. Ustrezna je bila tudi pozitivna kontrola s KPT. Z metodo KIT4 smo zaznali indukcijo apoptoze pri obeh časih le pri 5 μM ATO. Pri metodi FAM indukcije apoptoze nismo zaznali.

Graf 11: Normiran obseg apoptoze v odvisnosti od koncentracije ATO določen z Aneksinom, FAM in KIT4. 4 in 72 urno gojenje, 2 in 5 μ M ATO, KM bolnika z DP (60% plazmocitomskih celic). Pozitivna kontrola: 20 μ M KPT.

Normiran obseg apoptoze pozitivne kontrole (vrednosti so normirane glede na negativno kontrolo);

- po 4 urah gojenja: Aneksin 1.4, FAM 0.9, KIT4 1.5,
- po 72 urah gojenja: Aneksin 1.9, FAM 1, KIT4 0.7.



Z opravljenim delom smo ugotovili, da pri gojenju celic KM z ATO pri bolnikih z DP pride do indukcije apoptoze, ki smo jo vselej uspeli zaznati z Aneksinom. Dokazali smo ustreznost pozitivne kontrole s KPT. V primeru KPT kot tudi v primeru ATO se je povečal obseg pozne apoptoze in nekroze. Pri bolnikih z MINP apoptoze, inducirane z ATO, nismo uspeli zaznati z Aneksinom. Pozitivna kontrola s KPT pa je bila ustrezna. Pri uporabi KPT kot pozitivne kontrole se je povečal tudi obseg pozne apoptoze in nekroze. Pri bolnikih z reaktivnimi spremembami v KM smo indukcijo apoptoze z ATO uspeli zaznati z Aneksinom le v začetnem času. Ustrezna je bila tudi pozitivna kontrola s KPT. Pri uporabi KPT se je povečal tudi obseg pozne apoptoze in nekroze. Nismo pa uspeli določiti apoptoze po daljši izpostavljenosti ATO zaradi premajhe količine razpoložljivega biološkega materiala. Indukcijo apoptoze z ATO pri normalnem KM smo zaznali z Aneksinom, vendar je bil obseg apoptoze minimalen in se je povečal pri daljši izpostavljenosti ATO. Pozitivna kontrola s KPT je bila ustrezna, vendar je bil tudi v tem primeru obseg apoptoze minimalen.

Odzivi s KPT pri metodi z Aneksinom so se pokazali že zelo kmalu po dodatku KPT in so tudi trajali dalj časa. Lahko rečemo, da proces apoptoze traja dalj časa, ko je PS izpostavljen na zunanji strani celične membrane.

Lahko tudi trdimo, da je metoda FAM neprimerna za določanje apoptoze na *ex vivo* plazmocitomskih celicah KM. Ena od možnih razlag je, da je časovni interval v apoptizi plazmocitomskih celic, kjer delujeta kaspaza 3 in 7 tako kratek, da ga v teh časovnih intervalih nismo mogli zaznati. Indukcije apoptoze z ATO namreč nismo uspeli zaznati pri bolnikih z DP, MINP, kot tudi ne pri bolnikih z reaktivnimi spremembami v KM in osebah z normalnim KM. Neustrezna je bila tudi pozitivna kontrola s KPT. Obseg apoptoze je bil neodvisen od časa gojenja z ATO in koncentracije ATO.

Indukcije apoptoze z ATO pri bolnikih z DP tudi nismo uspeli zaznati s KIT4. Pozitivna kontrola s KPT je bila pri tej metodi ustrezna. Opazili smo porast obsega pozne apoptoze in nekroze pri KPT in ATO, kjer je le-ta naraščala s časom. Prav tako s KIT4 nismo uspeli zaznati indukcije apoptoze z ATO pri bolnikih z MINP. Pri tem je bila pozitivna kontrola s KPT ustrezna. Opazili smo porast obsega pozne apoptoze in nekroze pri KPT in ATO, ker se je le-ta povečevala s časom. Pri bolnikih z reaktivnimi spremembami s KIT4 prav tako nismo uspeli zaznati indukcije apoptoze z ATO. Pri tem je bila pozitivna kontrola s KPT ustrezna. Povečal se je tudi obseg pozne apoptoze in nekroze v primeru KPT. Pri ATO tega učinka nismo zasledili. Ena od možnih razlag je, da je to posledica prekratke izpostavljenosti ATO. Zmanjkalo je namreč biološkega materiala, da bi določili apoptozo tudi pri daljših časih. Indukcijo apoptoze z ATO smo pri normalnem KM zaznali, vendar je bil obseg apoptoze minimalen in se je pojavil šele pri daljši izpostavljenosti ATO. Enak učinek smo ugotovili tudi pri KPT.

V primeru reagenčnega kompleta KIT4 se je izkazalo, da zazna apoptozo šele 4 ure po dodatku induktorja apoptoze. Ta ugotovitev je tudi v skladu s pričakovanim, saj reagenčni komplet vsebuje barvilo YO-PRO-1, ki naj bi prehajalo celično membrano šele v zaključnem delu apoptoze. Izjema je uporaba velikih koncentracij KPT, kjer se kmalu po dodatku poveča delež celic v apoptizi ter pozni apoptizi in nekrozi. Lahko si razlagamo, da velike koncentracije KPT delujejo hitreje, poleg tega pa povzročijo tudi nekrozo.

Obseg apoptoze po gojenju z ATO smo preverili tudi po označevanju plazmatk s protitelesom CD138-PE pri dveh bolnikih z DP. Po inkubaciji s CD138-PE do indukcije

apoptoze po gojenju z ATO ni prišlo pri nobeni metodi. Označevanje s protitelesom CD138-PE je bilo slabo (do 1%), na označenih plazmatkah pa smo z vsemi metodami določili visok delež celic v pozni apoptozi in nekrozi. Iz tega smo sklepali, da sama vezava monoklonskega protitelesa vpliva na proces apoptoze. Zaradi tega in tudi zaradi slabe vezave, uporaba protitelesa CD138-PE pri določanju apoptoze inducirane z ATO ni smiselna.

5 SKLEP

V našem delu smo želeli izbrati najboljšo metodo za *ex vivo* določanje obsega apoptoze, inducirane z ATO, na kulturah celic KM bolnikov s plazmocitomom. Pri tem smo ugotovili, da je zelo težavna zamejitev ustrezne populacije celic pri pretočni citometriji, na kateri določamo obseg apoptoze. Zamejitev ustrezne populacije celic smo poskušali olajšati z označevanjem s protitelesom CD138-PE. Ugotovili smo, da je delež vezanega protitelesa CD138-PE znatno manjši od deleža plazmatk v vzorcu KM. Ker s protitelesom CD138-PE nismo uspeli označiti vseh plazmocitomskih celic, protitelesa CD138-PE v nadaljnjih poskusih nismo uporabljali.

Eritrocite smo lizirali s hipotonično raztopino. Uporaba hipotonične raztopine se ni izkazala kot uspešna, saj se delež vezanega protitelesa CD138-PE ni povečal glede na vzorce, ki jih predhodno nismo izpostavili hipotonični raztopini.

Ustrezno populacijo celic smo skušali ločiti od eritrocitov tudi z ločbo mononuklearnih celic preko fikola. Ločba mononuklearnih celic preko fikola je bila uspešna, saj se je delež vezanega CD138-PE povečal glede na vzorce, kjer mononuklearnih celic predhodno nismo ločili. Vendar se je postopek izkazal kot neprimeren, ker so bile izgube celic med samo osamitvijo prevelike.

Metodi z Aneksinom in s KIT4 sta se izkazali za uspešni, saj smo pri gojenju celic ob prisotnosti KPT vselej zaznali povečan obseg apoptoze. Z Aneksinom smo indukcijo apoptoze z ATO uspeli določiti pri bolnikih z DP. Pri metodi z Aneksinom je najustreznejša uporaba vsaj $5 \mu\text{M}$ ATO in 24 urna izpostavitev ATO. Z metodo KIT4 nismo uspeli določiti indukcije apoptoze z ATO. Morda bi bila potrebna daljša inkubacija z ATO. Ugotovili smo namreč, da je potrebna izpostavljenost celic daljša od 4 ure, da tudi pri KPT dobimo pričakovano povečanje apoptoze.

Metoda FAM se je izkazala kot neprimerna za določanje apoptoze na *ex vivo* kulturah KM. S to metodo tudi pri izpostavitvi celic KPT nikdar nismo zaznali povečanega obsega apoptoze.

Določanje apoptoze bi bilo smiselno nadaljevati z Aneksinom in KIT4. Metodi bi bilo potrebno preizkusiti na večji skupini bolnikov z DP in jih primerjati s skupinami MINP in

reaktivnimi spremembami v KM ter potrditi z dodatnimi poskusi pri različnih koncentracijah in časih izpostavljenosti ATO. Ker so metode Aneksin, FAM in KIT4 razvite in preizkušene na celičnih linijah, bi bilo smiselno primerjalno narediti tudi poskuse na celičnih linijah.

6 LITERATURA

1. Andolšek D: Bolezni krvi in krvotvornih organov. V Interni medicini, glavni uredniki Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D, Littera picta, 3. izdaja, Ljubljana, 2005: 1261-1266.
2. Vozelj M: 1. Poglavlje: Splošne značilnosti imunskega sistema in imunskega odziva v Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 1-21.
3. Kotnik V, Čurin Šerbec V, Ihan A, Jeras M, Malovrh T, Simčič S, Škoberne M, Wraber B : Imunologija, priročnik za vaje, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2001: 6-7, 13-14.
4. Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Huber H: The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 441-447.
5. Hussein MA: Nontraditional Cytotoxic Therapies for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *The Oncologist* 2002; 7 (suppl 1): 20-29.
6. Piazza FA, Gurrieri C, Trentin L, Gianpietro S: Towards a new age in the treatment of multiple myeloma. *Ann Hematol* 2007; 86: 159-172.
7. Mlakar U, Andoljšek D, Fikafak N, Glaser M, Grat M, Grmek-Zemljič T, Preložnik-Zupan I, Pretnar J, Zver S: Smernice za odkrivanje in zdravljenje diseminiranega plazmocitoma. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 3-8.
8. [http://www.multiplemeloma.org](http://www.multiplemyeloma.org)
9. Zulian GB, Barbare R, Zagonel V: Multiple myeloma Oncology/Hematology 1998; 27: 165-167.
10. Kodre V, Černelč P: Zdravljenje diseminiranega plazmocitoma z zdravilom bortezomib. *Zdrav Vestn* 2008; 77: I-87-92.
11. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease. *Amer J Med* 1999; Volume 107: 489-506.
12. <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash>

13. Schmitt CA, Lowe SW: Apoptosis and therapy. *Journal of pathology* 1999; 187: 127-137.
14. Reed JC: Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 2001; 7: 314-319.
15. Oancea M, Mani Aruna Hussein MA, Almasan A: Apoptosis of Multiple Myeloma. *Int J Hematol* 2004 October;80(3): 224-231.
16. Vermulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84: 627-639.
17. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP: A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 17907-17911.
18. Holdenrieder S, Stieber P: Apoptotic markers in cancer. *Clinical Bioch* 2004; 37: 605-617.
19. Vidic I, Šuput D, Milisav I: Modulatorji apoptoze kot nova zdravila. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 150-154.
20. Lewin B: Genes VIII, 8th ed., Pearson Prentice Hall, New York, 2004: 1027.
21. Susuin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemre G: Molecular characterization od mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.
22. Pegan K: Študij celične smrti pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kadmijevim in kromovim ionom. Diplomsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2007.
23. Veranič P, Pšeničnik M, Romih R, Sterle M, Kralj M: Osnove celične biologije z navodili za vaje, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 56-57.
24. Hussein MA: Arsenic Trioxide A New Immunomodulatory Agent in the Management of Multiple Myeloma. *J Medical Oncology* 2001; vol 18, no. 4: 239-242.

25. Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S: Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide. *Canc Res*, July 15, 2002; 62: 3893-3903.
26. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Richardson P, Schlossman RL, Dharminder C, Munshi NC, Waxman S, Anderson KC: Arsenic Trioxide Inhibits Growth of Human Multiple Myeloma Cells in the Bone Marrow Microenvironment. *Mol Cancer Therap* August 2002; Vol. 1: 851-860.
27. Evens AM, Tallman MS, Gartenhaus RB: The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *J Leuk Res* 2004; 28: 891-900.
28. Zhen-Yi Wang: Arsenic compounds as anticancer agents. *J of Canc Chemother Pharmacol* 2001; 48 (Suppl 1): S72-S76.
29. Antman KH: Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *J of The Oncol* 2001;6 (suppl 2): 1-2.
30. Munshi NC, Tricot G, Desikan R, Badros A, Zangari M, Toor A, Morris C, Anaissie E, Barlogie B: Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2002; 16: 1835-1837.
31. Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X: Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cellular Biochem* 2001; 222: 183-188.
32. Dalton WS: The Biology Behind, Targeting the Mitochondria: An Exciting New Approach to Myeloma Therapy. *Clin Canc Res* 2002; 8: 3643-3645.
33. Hussein MA: Trials of Arsenic Trioxide in Multiple Myeloma. *Cancer Control* September/October 2003; Vol 10, No. 5: 370-374.
34. Rodriguez-Hernandez A, Brea-Calvo G, Fernandez-Ayala DJM, Cordero M, Navas P, Sanchez-Alcazar JA: Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and Poly(ADP-ribose) polymerase Cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 131-139.

35. Hentze H, Latta M, Künstle G, Dhakshinamoorthy S, Yong NP, Porter AG, Wendel A: Topoisomerase Inhibitor Camptothecin Sensitizes Mouse Hepatocytes In vitro and In vivo to TNF-Mediated Apoptosis. *Hepatology* May 2004; Vol. 39, No 5: 1311-1320.
36. Ihan A: Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom, Kemomed, Ljubljana, 1999: 11-14.
37. Allen P, Davies D: Apoptosis Detection by Flow Cytometry v Macey MG: Flow Cytometry: Principles and Applications, Humana Press, Totowa, NJ, 2007: 147-163.
38. Bain BJ, Gupta R: A-Z of Haematology, Blackwell Publishing, London, 2003: 63.
39. Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP in sod.: Arsenic trioxide and melasoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Canc Res* 1999; 59: 1041-1048.
40. Tang B, Bajenova O, Feinman-Siegel R in sod.: Arsenic compounds induce apoptosis in multiple myeloma (MM), activate pro-caspase-3 but do not affect BCL2 family members (abstract 2631). *Blood* 1998; 92 (suppl 1, pt 1): 638a
41. Darzynkiewicz Z, Traganos F: Measurement of apoptosis v Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 62, Springer Berlin/Heidelberg, 1998: 33-73.
42. Vermes I, Haanen Clemens, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immun Methods* 1995; 184: 39-51.
43. Nexins Research BV: Annexin V-FITC Kit, System For Detection of Apoptosis, navodilo za delo, Beckman Coulter, Nizozemska.
44. Langdon SP: Cancer Cell Culture, Methodes and Protocols, Humana Press, New Jersey, 2004: 191-192.
45. Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit V35118, Product Information, Molecular Probes™ invitrogen detection technologies, 2004.
46. Haugland RP: Invitrogen, The handbook, a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen Corp, USA, 2005: 748-749.

47. Vybrant® Apoptosis Assay Kit #4, YO-PRO®-1/propidium iodide, 200 assays, Product Information, Molecular probes™, 2005.
48. Gawlitta D, Oomens CWJ, Baaijens FPT, Bouten CVC: Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. *Cytotechnology* 2004; 46: 139-150.
49. Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C: CD138. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16: 152-155.
50. Janosi J: Apoptosis and a characteristic marker (CD138) in multiple myeloma. Department of Haematology, National Medical Center Budapest, 2004.
51. Zang W, Ohnishi K, Shingeno K in sod.: The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms. *Leukemia* 1998; 12: 1383-1391.
52. Chen G-Q, Zhu XH, Shen Y-L in sod.: Pharmacologic concentrations of arsenic trioxide induces growth inhibition and apoptosis in malignant lymphocytes and multiple myeloma cells. (abstract 2632). *Blood* 1998; 92 (suppl I pt 1): 638a.

7 PRILOGA

Priloga 1

Bolnik	Spol	Delež plazmatk oz. plazmocitomskih celic (%)	Diagnoza	Metoda	Gojenje celic KM ob prisotnosti
S.P.	Ž	4	N	Aneksin, KIT4	ATO
R.N.	M	5		Aneksin, FAM, KIT4	KPT
L.M.	M	3		Aneksin, FAM, KIT4	KPT
Ž.E.	Ž	100		Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT
R.D.	Ž	90-100		Aneksin	ATO, KPT
B.F.	M	60		Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT
Š.M.	Ž	50-90		Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT, CD138-PE
Š.J.	M	do 28		Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT, CD138-PE
M.M.	Ž	50		Aneksin	KPT
P.P.*	M	70		Aneksin	KPT, CD138-PE
G.B.*	M	48	DP	Aneksin, FAM, KIT4	KPT, CD138-PE
V.S.* ^a	Ž	40		Aneksin, FAM, KIT4	KPT, CD138-PE
B.M.	M	N.P.		Aneksin, FAM, KIT4	ATO
L.A.	Ž	10		Aneksin	ATO, KPT
D.I.	Ž	16		Aneksin, FAM, KIT4	KPT
P.M.	Ž	9	MINP	Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT
K.A.	M	5		Aneksin, FAM, KIT4	ATO, KPT
V.F.	M	7		Aneksin, FAM	ATO, KPT
			RS		

Legenda:

♦ **Bolnik:**

- * osamitev mononuklearnih celic preko fikola,
- ^a liza eritrocitov s hipotonično raztopino.

♦ **Delež plazmatk oz. plazmocitomskih celic:**

- ocena deleža plazmatk oz. plazmocitomskih celic je iz citološkega izvida,
- N.P. - ni podatka.

♦ **Diagnoza:**

- N - »normalni« kostni mozeg,

- DP - diseminirani plazmocitom,
- MINP- monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena,
- RS - reaktivne spremembe v kostnem mozgu.

♦ **Metoda:**

- Aneksin - reagenčni komplet Annexin V- FITC Kit (Beckman Coulter[®]),
- FAM - reagenčni komplet Vybrant[®] FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Molecular Probes[®]),
- KIT4 - reagenčni komplet Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes[®]).

♦ **Gojenje celic KM ob prisotnosti:**

- ATO - arzenov trioksid,
- KPT - kamptotecin,
- CD138-PE - protitelo za označevanje plazmocitomskih celic.

Priloga 2



Professor Peter Černelč, MD,
Division for Haematology
University Medical Center of Ljubljana
Zaloška 7, SI-1525 Ljubljana
Slovenia

Our Ref.: KME 28/09/06
Date: 25th September 2006

Dear Professor Černelč,

The National Medical Ethics Committee (NMEC) received from you, with a covering letter dated 8th September 2006, a request to review your research project entitled:

"Arsenic trioxide (ATO) metabolites as biomarkers in leukaemia and multiple myeloma with regard to initial cytogenetic aberrations."

Dr. Zdenka Šlejkovec will be the principal investigator.

The NMEC, on its session of 19th September 2006, discussed the project and had no objections of ethical nature. Herewith we are issuing to you our approval.

I am enclosing a list of the Committee Members.

With kind regards and good wishes,
Sincerely,



Prof. Jože Trontelj, M.D.
Chairman,
National Medical Ethics Committee

Mailing Address: Prof. Dr. Jože V. Trontelj, University Institute of Clinical Neurophysiology,
Zaloška c.7, SI - 1525 Ljubljana, Slovenia, Tel +386 61 /143 1500, Fax +386 61 / 302-771, E-mail: tone.zakelj@kclj.si



Republic of Slovenia
THE NATIONAL MEDICAL ETHICS COMMITTEE

THE NATIONAL MEDICAL ETHICS COMMITTEE
LIST OF MEMBERS

Assoc. Prof. Dr. Jože Balažic (M)
MD, Deontologist, Spec. in Forensic Medicine
Institute of Forensic Medicine
Medical Faculty
Korytkova 2, 1000 Ljubljana

Prof. Dr. Eldar Gadžijev (M)
MD, Surgeon
Dept. of Abdominal Surgery
Maribor General Hospital
Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Dr. Roman Globokar (M)
Theologian, Professor of Moral Theology
Štula 23, 1210 Ljubljana-Šentvid

Prof. Dr. Matija Horvat (M)
MD, Cardiologist, *retired*, formerly:
Center for Intensive Internal Medicine
Univ. Department of Internal Medicine
University Medical Center
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prof. Dr. Marga Kocmür (F)
MD, Psychiatrist, Co-opted Member
Univ. Hospital for Psychiatry
Studenec 48, 1260 Ljubljana Polje

Prof. Dr. Damjan Korošec, LL.D. (M)
Department for Criminal Law
Faculty of Law in Ljubljana,
Poljanski nasip 2, 1000 Ljubljana

Assoc. Prof. Dr. Tone Pačnik (M)
Clinical Psychologist
Center for Mental Health
University Dept. of Psychiatry
Zaloška 29, 1000 Ljubljana

Prim. Dr. Dušica Pleterski-Rigler (F)
MD, Paediatrician (Associate Member)
Univ. Dept. for Infectious and Febrile Diseases
University Medical Center
Japljeva 2, 1525 Ljubljana

Prof. Dr. Pavel Poredos (M)
MD, Internist
Department of Vascular Diseases
University Medical Center
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Assoc. Prof. Dr. Janez Primožič (M)
MD, Paediatrician, co-opted Member
Department of Paediatric Surgery, UMC
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prof. Dr. Jože Trontelj, Chair (M)
MD, Neurologist
Univ. Institute of Clin. Neurophysiology
University Medical Center
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Assoc. Prof. Dr. Božidar Volč (M)
MD, Specialist in Family Medicine,
retired, formerly:
The National Institute of Transfusion Medicine
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Prof. Dr. Darja Zaviršek (F)
Sociologist
Faculty of Social Work
Topniška 31, 1000 Ljubljana

Dr. Marjetka Zorman-Terčelj (F)
MD, MSc, Internist-Pulmologist
Department of Pulmology and Allergology
University Medical Center
4204 Golnik

Mr. Tone Žakelj, Vice-Chair (M)
Research and Education Secretary,
Univ. Institute of Clin. Neurophysiology
University Medical Center
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

*The names of those Members present on the
132nd NMEC session of 19th September 2006
& taking decisions on ethical review of
research are printed in italics. Five members
constitute the quorum.*

*None of the Members has any conflict of
interest in the matter on which they voted.*

Signed:
Prof. Dr. Jože Trontelj
Chairman

Mailing Address: Prof. Dr. Jože V. Trontelj, University Institute of Clinical Neurophysiology,
Zaloška c.7, SI - 1525 Ljubljana, Slovenia, Tel +386 1 / 522-1525, Fax +386 1 / 522 1533, E-mail: joze.trontelj@kclj.si