

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RAKUŠA PETRA

**DOLOČITEV MEJNIH VREDNOSTI PRI PREISKAVI
FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA**

**DETERMINING OF CUT-OFF VALUES IN FLUORESCENT *IN SITU*
HIBRIDIZATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v Hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ.dipl.inž.kem.inž.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so vložili svoj čas in trud ter mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

Diplomsko delo v celoti posvečam bratrancu Mihu.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž.

Ljubljana, september, 2009

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Borut Božič, mag. farm. spec. med. biokem.
Članica diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	3
POVZETEK.....	5
SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
1 UVOD	8
1.1 CITOGENETSKE PREISKAVE V HEMATOLOGIJI	8
1.2 STANDARDNA CITOGENETSKA PREISKAVA	10
1.2.1 <i>Gojenje celic</i>	11
1.2.2 <i>Odvzem in izolacija celic</i>	12
1.3 FLUORESCENTNA »IN SITU« HIBRIDIZACIJA – FISH.....	13
1.3.1 <i>Princip dela</i>	15
1.3.2 <i>FISH sonde</i>	17
1.3.2.1 <i>Lokusno specifične sonde</i>	17
1.4 KONTROLA KAKOVOSTI.....	18
1.4.1 <i>Zagotavljanje kakovosti</i>	19
1.4.2 <i>Kontrola kakovosti v citogenetskem laboratoriju</i>	20
1.4.2.1 <i>Zagotavljanje kakovosti pri preiskavi FISH</i>	20
1.4.2.2 <i>Vrednotenje preparatov</i>	22
1.4.2.3 <i>Podajanje rezultatov</i>	22
1.4.2.4 <i>Kontrola kakovosti</i>	22
1.4.2.5 <i>Ugotavljanje uspešnosti hibridizacije</i>	23
1.4.3 <i>Smernice proizvajalca za notranjo kontrolo kakovosti</i>	23
1.4.3.1 <i>Odpravljanje težav</i>	24
2 NAMEN DELA	25
3 EKSPERIMENTALNI DEL	25
3.1 MATERIALI	25
3.1.1 <i>Osnovne raztopine</i>	25
3.1.2 <i>Materiali za gojenje celic periferne krvi</i>	26
3.1.2.1 <i>Gojenje</i>	26
3.1.2.2 <i>Odvzem kulture in fiksiranje celic</i>	26
3.1.3 <i>FISH</i>	27
3.1.3.1 <i>Predpriprava stekel za analizo FISH</i>	27
3.1.3.2 <i>Nanos sond</i>	28
3.1.3.3 <i>Spiranje stekel po hibridizaciji</i>	28
3.1.4 <i>Aparature</i>	28
3.1.5 <i>Laboratorijski pribor</i>	29
3.1.6 <i>Opis uporabljenih DNA sond</i>	29
3.1.7 <i>Vzorci</i>	33
3.2 METODE	34
3.2.1 <i>Odvzem vzorcev</i>	34
3.2.2 <i>Gojenje celic periferne krvi</i>	34
3.2.3 <i>Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic</i>	34

<i>3.2.4 Nanosi na stekla</i>	35
<i>3.2.4.1 Priprava objektnih stekel za nanos.....</i>	35
<i>3.2.4.2 Nanos vzorca</i>	36
<i>3.2.4.3 Staranje nanosov</i>	36
<i>3.2.5 FISH</i>	36
<i>3.2.5.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA</i>	36
<i>3.2.5.2 Spiranje stekel po hibridizaciji</i>	37
<i>3.2.6 Vrednotenje preparatov FISH.....</i>	38
<i>3.2.6.1 Vzorec za analizo.....</i>	38
<i>3.2.6.2 Delovni postopek</i>	39
<i>3.2.7 Obdelava rezultatov.....</i>	39
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	40
<i>4.1 KAKOVOST PREPARATOV.....</i>	40
<i>4.2 DOLOČANJE MEJNIH VREDNOSTI.....</i>	41
<i>4.2.1 LSI BCR/ABL.....</i>	41
<i>4.2.2 PANEL 1: LSI ATM in LSI p53</i>	43
<i>4.2.3 PANEL 2: LSI D13q14.3, LSI D13q34, CEP 12</i>	44
<i>4.3 IZRAČUN MEJ OBČUTLJIVOSTI ZA IZBRANE SONDE</i>	46
<i>4.4 PRIMERJAVA DOLOČENIH MEJNIH VREDNOSTI Z DEKLARIRANIMI VREDNOSTMI PROIZVAJALCA.....</i>	48
<i>4.5 PONOVLJIVOST REZULTATOV.....</i>	49
<i>4.6 SKUPNE UGOTOVITVE</i>	50
5 SKLEPI	53
6 LITERATURA	54
7 PRILOGE.....	56

POVZETEK

Fluorescentna »in situ« hibridizacija (FISH) je molekularno citogenetska metoda za ciljno določanje kromosomskih sprememb. Temelji na hibridizaciji med enoverižno vzorčno DNA in enoverižno DNA izbrane sonde, ki je fluorescentno označena. DNA-sonda ima točno določeno zaporedje organskih baz, s čimer ustrezza specifičnemu kromosomskemu področju. Če je prisotna kromosomska sprememba, pride do spremembe vzorca ali števila signalov. Rezultat hibridizacije opazujemo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa.

Standardno fluorescentno »in situ« hibridizacijo izvajamo na predhodno kratkotrajno gojenih celicah, ker se praviloma hitreje razmnožujejo maligno spremenjene celice. Po gojenju celice izoliramo in nanesemo na objektna stekla. Na tako pripravljenih celicah izvedemo fluorescentno »in situ« hibridizacijo.

Pri naši nalogi smo fluorescentno »in situ« hibridizacijo izvedli na gojenih celicah venske krvi zdravih preiskovancev. Uporabili smo šest različnih DNA-sond proizvajalca Vysis (Abbott Molecular). Preparate smo vrednotili trije analitiki in na vsakem steklu prešteli skupaj po 500 celic. Za vsako od izbranih sond smo določili mejo občutljivosti, to je delež lažno pozitivnih celic, ki jih dobimo pri izvedbi preiskave pri uporabi normalnih celic.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALL	akutna limfatična levkemija
AML	akutna mieloblastna levkemija
ATM	mutiran gen ataksije telangiektazije
BAC	umetni bakterijski kromosom
BCR/ABL	fuziran (zliti) gen, tirozin-kinaza
cIg FISH	citoplazemski imunoglobulin FISH
CEP	DNA-sonda za centromero kromosoma
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol dihidroklorid
del	delecija
DNA	deoksiribonukleinska kisina
DP	diseminirani plazmocitom
EtOH	etanol
FISH	fluorescentna »in situ« hibridzacija
FBS	fetalni goveji serum
g	zemeljski pospešek
GTG	G – proganje – tripsin - Giemsa
ID	identiteta
inv	inverzija
ISCN	Mednarodni sistem za nomenklaturo v humani citogenetiki
bp	bazni par
KML	kronična mieloična levkemija
KLL	kronična limfocitna levkemija
LAMP 1	lizosomom pridruženi membranski protein 1 (CD107a)
Lkci	levkociti
LSI	lokusno specifična DNA-sonda
MRD	minimalni preostanek bolezni
NP- 40	raztopina za spiranje, neionski detergent
PAC	kromosomski vektor P1
PBS	fosfatno pufrana slanica
PBT	puferna raztopina za spiranje s Tweenom

PHA	fitohemaglutinin
QA	zagotavljanje kakovosti
RNA	ribonukleinska kislina
SOP	standardni operacijski postopek
SSC	citratni pufer
t	translokacija
TEL	telomerna DNA-sonda
WCP	DNA-sonda za obarvanje celotnega kromosoma
YAC	umetni kromosom kvasovke

1 UVOD

Obdobje klinične citogenetike se je začelo leta 1956. Takrat sta Tijo in Levan potrdila, da ima človek 46 kromosomov. Sledila so odkritja sprememb v številu kromosomov pri Downovem sindromu, Turnerjevem sindromu in tudi odkritje kromosoma Philadelphia pri kronični mieloični levkemiji. Leta 1960 so na konferenci v Denverju razporedili 23 parov kromosomov v 7 skupin (A–G). Leta 1970 sta Caspersson in Chaudhuri razvila prvo tehniko proganja kromosomov, ki je omogočila proučevanje strukturnih nepravilnosti in s tem velik razvoj področja (1, 2).

Zaradi izredno hitrega razvoja tehnik proganja kromosomov in metod gojenja celičnih kultur, so napredovale tudi raziskave kromosomskih sprememb v malignih celicah. Prav zato je proučevanje humanih tumorjev najhitreje razvijajoče se področje citogenetike, ki se ukvarja s strukturo in funkcijo kromosomov (3).

1.1 *Citogenetske preiskave v hematologiji*

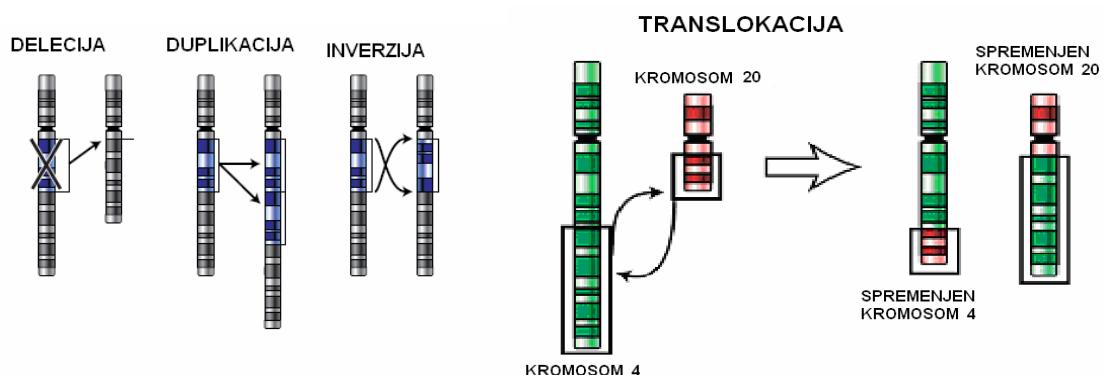
Standardna citogenetika prepoznavata spremembe pri kromosomih, ko je celica v fazi mitoze oz. v metafazi celične delitve. Največ podatkov o malignih kromosomskih spremembah je znanih prav pri levkemijah in limfomih. Za postavitev pravilne diagnoze, določitev napovednega pomena, za ustrezno izbiro terapije in sledenje njene učinkovitosti, je ključnega pomena tudi določitev kromosomskih nepravilnosti. Uspešnost terapije lahko določamo na osnovi doseganja t.i. citogenetske remisije. Tudi ob ponovitvi bolezni pogosto odkrijemo enake kromosomske spremembe, lahko pa so prisotne še dodatne nepravilnosti. Kromosomske preuređitve pa ne pomenijo vedno slabe prognoze. Nekatere preuređitve pomenijo ugodno prognozo (*Tabela I*) (3).

Med kromosomskimi spremembami pri levkemijah so najpogosteje translokacije, delecije in spremembe števila kromosomov (Slika 1).

Translokacije so lahko uravnotežene (recipročne) ali neuravnotežene. Tu gre najpogosteje za prenos segmenta kromosoma na nehomologni kromosom. So glavni mehanizem aktivacije protoonkogenov. Rezultat translokacije je bodisi sprememba ravni izražanja (derekulacija) protoonkogena bodisi zliti gen (3).

Delecije so kromosomske spremembe, kjer pride do izgube določenega dela kromosoma. Povzročijo maligno preobrazbo celic zaradi izgube t.i. supresorskih genov. Za napredovanje maligne novotvorbe sta pomembni mutacija preostalega normalnega alela in pomnožitev predhodno mutiranega mesta, ki omogoči razširitev populacije malignih celic (3).

Aneuploidnost je sprememba števila kromosomov. Če gre za izgubo določenega kromosoma, govorimo o monosomiji. Če pa gre za dodatno kopijo posameznega kromosoma, govorimo o trisomiji (5, 6). Lahko gre tudi za spremembe v ploidnosti. Takrat govorimo npr. o tri- ali tetra- ploidnem kariotipu.



Slika 1: Najpogostejše kromosomske spremembe (13).

Tabela I: Najpogostejše ponavljajoče kromosomske preureditve pri nekaterih rakavih krvnih boleznih (3).

BOLEZEN	PREUREDITEV	NAPOVEDNI POMEN	VPLETENI GEN
<i>AML</i>	t(8;21) t(15;17) preureditev 11q23	dober dober slab	AML1/ETO PML/RARA MLL
<i>ALL</i>	t(9;22) t(8;14) t(12;21)	slab slab dober	BCR/ABL IGH/MYC TEL/AML1
<i>KML</i>	t(9;22)	Ključen za diagnozo	BCR/ABL
<i>LIMFOM</i>	t(14;18) t(11;14) t(11;18) t(8;14)	Ključen za diagnozo	IGH/BCL2 BCL1 BIRC3/MALT1 IGH/MYC
<i>PLAZMOCITOM</i>	del(13) t(4;14) t(11;14) t(14;16) del(17)(p13)	slab slab dober slab slab	RB1 IGH/FGFR3 BCL1 IGH/MAF p53

1.2 Standardna citogenetska preiskava

Standardna citogenetska preiskava ostaja temeljno, preprosto in učinkovito orodje za vpogled v genom. Pomembna je v vseh obdobjih bolezni: za opredelitev diagnoze, za določitev velikosti malignega klona, posredno za napoved poteka bolezni, za potrditev remisije in ugotovitev ponovitve bolezni. Poleg teh neposredno uporabnih rezultatov pa je pomembna tudi na področju osnovnih raziskav genov, ki so ključni za nastanek novotvorbe. Ugotavljanje specifičnih kromosomskih sprememb zgolj s pomočjo fluorescenčne »in situ« hibridizacije (FISH) lahko povzroči, da spregledamo dodatne kromosomske preureditve, ki so prisotne že ob ugotovitvi bolezni, ali pa nastanejo med ali

po zdravljenju. Po smernicah ameriških medicinskih genetikov uporabimo preiskavo FISH po predhodno opravljeni standardni citogenetski preiskavi. Sterilno odvzet aspirat kostnega mozga za citogenetsko preiskavo prenesemo v sterilno gojišče, ki omogoča ohranitev vitalnosti celic med prenosom vzorca v citogenetski laboratorij. Gojišču mora biti dodan Na-heparin, ki v nasprotju z nekaterimi antikoagulantmi, npr. EDTA, ne deluje toksično na kasnejšo delitev celic v kulturi. Prenos do laboratorija mora biti hiter, na vsak način pa izveden prej kot v 24-ih urah. Poteka lahko pri sobni temperaturi, transport na ledu ni priporočljiv. Kariotip navadno razkrije ponavljajoče in tudi preostale kromosomske nepravilnosti (4).

Standardna citogenetska preiskava je zahteven postopek, pri katerem mora biti vsaka stopnja izvedena natančno in dosledno, da končno pridemo do kariograma.

Ključne stopnje citogenetske preiskave so:

- a) gojenje celic,
- b) odvzem in izolacija celic,
- c) analiza kromosomov in izdelava kariograma.

Shematično so vse stopnje citogenetske preiskave povzete na sliki 2.

1.2.1 Gojenje celic

Vzorec za citogenetsko analizo v hematologiji je lahko kostni mozeg ali venska kri. Najpogosteje gojimo kostni mozeg, ker je delež celic, ki se še lahko delijo v njem, večji. Pri gojenju kostnega mozga največ uporabljammo kratkotrajno gojenje (24 ur). Vensko kri odvzamemo z antikoagulantom Na-heparinom, ker ne inhibira nadaljnje celične rasti. Vzorec za konstitutivni kariotip gojimo dolgotrajno (48-96 ur), medtem ko ga pri krvnih boleznih gojimo kratkotrajno, število levkocitov mora biti nad $1 \times 10^9/l$, vsaj 10 % celic mora biti nezrelih, bodisi mieloične ali limfatične vrste. Celice gojimo na različnih gojiščih z dodatkom telečjega serum. Za stimulacijo razmnoževanja T-limfocitov venske krvi pri nemalignih spremembah uporabljammo fitohemaglutinin. Kultivacija poteka pod strogimi pogoji aseptičnega dela.

Kulture so lahko odprte ali zaprte. Pri odprtih lahko pride do izmenjave plinov (O_2 in CO_2), medtem ko pri zaprtih to ni mogoče. Pri zaprtih sistemih je zato manjša verjetnost kontaminacije, odprti sistemi pa omogočajo celičnim kulturam, da izločajo plinske stranske

produkte metabolizma, ki so lahko toksični. V laboratoriju uporabljamo posodice za gojenje, ki imajo na pokrovčku luknjice. Te so prekrite s tanko membrano (filtrom), ki prepreči okužbo in hkrati dopušča izmenjavo plinov z okolico (2).

Običajna mešanica plinov v inkubatorju je 5% CO₂ s 15-18% O₂ oziroma 5% CO₂ z 2-5% O₂, ki je v ravnotežju z inertnim dušikom. CO₂ uravnava pH-vrednost celičnega medija na 7,25-7,40 preko pufra, ki je dodan mediju. 2-5% mešanica kisika pa pospeši rast mnogo različnih tipov celic.

Celične kulture, ki jih pridobivamo iz človeških tkiv, najbolje rastejo pri fiziološki telesni temperaturi (37-37,5°C). Če temperatura naraste nad 38°C, pride do odmrtja celic, pri temperaturi manjši od 37°C, pa se rast zelo upočasni.

Osnovni rastni medij poleg osnovnih hranič (glukoza, aminokisline, vitamini) vsebuje še serum s proteini (fetalni goveji serum) in rastne faktorje. Vedno vsebuje tudi antibiotike in antimikotike, lahko pa še selen, inzulin, itd. Rastni medij je običajno zapufran. Vrsta pufra je odvisna od tega, ali je uporabljen zaprt ali odprt način gojenja (2,6).

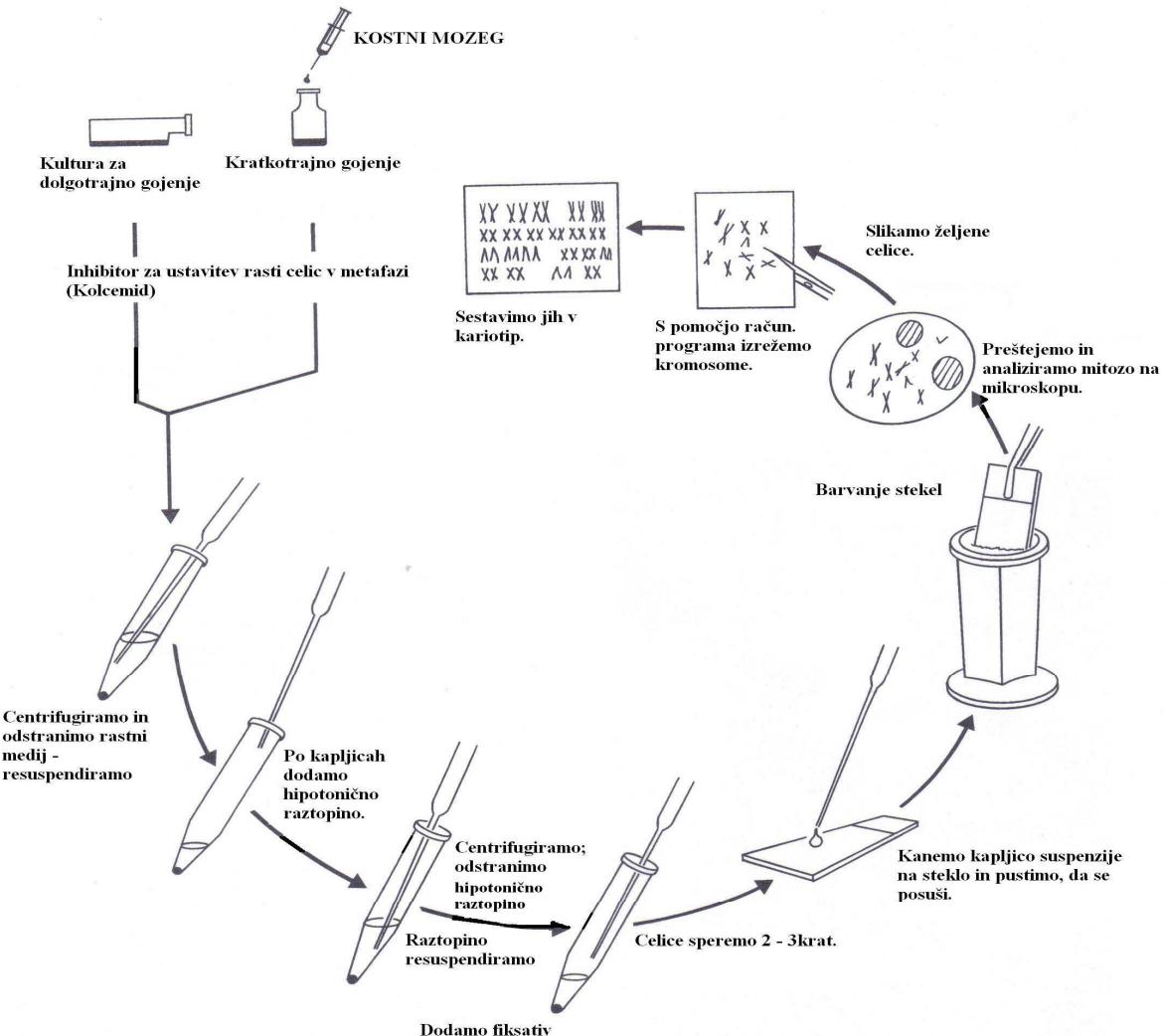
1.2.2 Odvzem in izolacija celic

Priprava celic po gojenju je večstopenjski proces. Pomembne so predvsem tri faze, in sicer ustavitev mitoze, prenos v hipotonično raztopino ter fiksacija celic. Pol ure pred odvzemom celic dodamo v gojišče kolcemid, ki ustavi celično delitev v metafazi. Kolcemid prepreči nastanek delitvenega vretena in povzroči kondenzacijo kromosomov, ki je odvisna predvsem od časa izpostavitve celic njegovemu delovanju in koncentracije kolcema (2).

Nadaljujemo z izolacijo celic, pri kateri celice najprej prenesemo v hipotonično raztopino, da nabreknejo. To je najpomembnejši del celotnega procesa, ker vpliva na debelino in separacijo kromatid ter lizo eritrocitov. Hipotonična raztopina mora biti segreta na 37°C. Zaradi razlik v osmotskem tlaku voda vstopa v celice skozi lipidne citoplazemske membrane. Predolga izpostavljenost povzroči prevelik vdor vode in celice popokajo. Posledice so izguba kromosomov in nepopolne metafaze (1).

Delovanje hipotonije ustavimo z dodatkom nekaj kapljic fiksacijske raztopine (etanol/ocetna kislina), ki stabilizira celično membrano. S postopnim dodajanjem fiksacijske raztopine celice dokončno fiksiramo. S tem iz njih odstranimo vodo in jih konzerviramo. Pazimo, da je fiksacijska raztopina sveže pripravljena, ker hitro absorbira

vlogo iz zraka. Sveže pripravljeno fiksacijsko raztopino postavimo v hladilnik, ker nižja temperatura izboljša morfologijo kromosomov in zmanjša izhlapevanje (2).



Slika 2: Shema vseh stopenj citogenetske preiskave (1).

1.3 Fluorescentna »in situ« hibridizacija – FISH

Leta 1981 je skupina genetikov prvič uspela dokazati kopijo gena v metafazi s pomočjo »in situ« hibridizacije in radioaktivno označene sonde. V letu 1986 pa se je rodila preiskava FISH, ki jo je odlikovalo hitrejše delo, boljša prostorska resolucija ter občutljivost.

Standardni postopek FISH lahko opišemo v šestih korakih, vsak od njih pa je odločilnega pomena za doseganje uspešnega rezultata analize FISH:

1. priprava vzorca
2. priprava sonde in označevanje
3. denaturacija
4. hibridizacija
5. spiranje vzorcev po hibridizaciji
6. pregled in vrednotenje (fluorescenčni mikroskop)

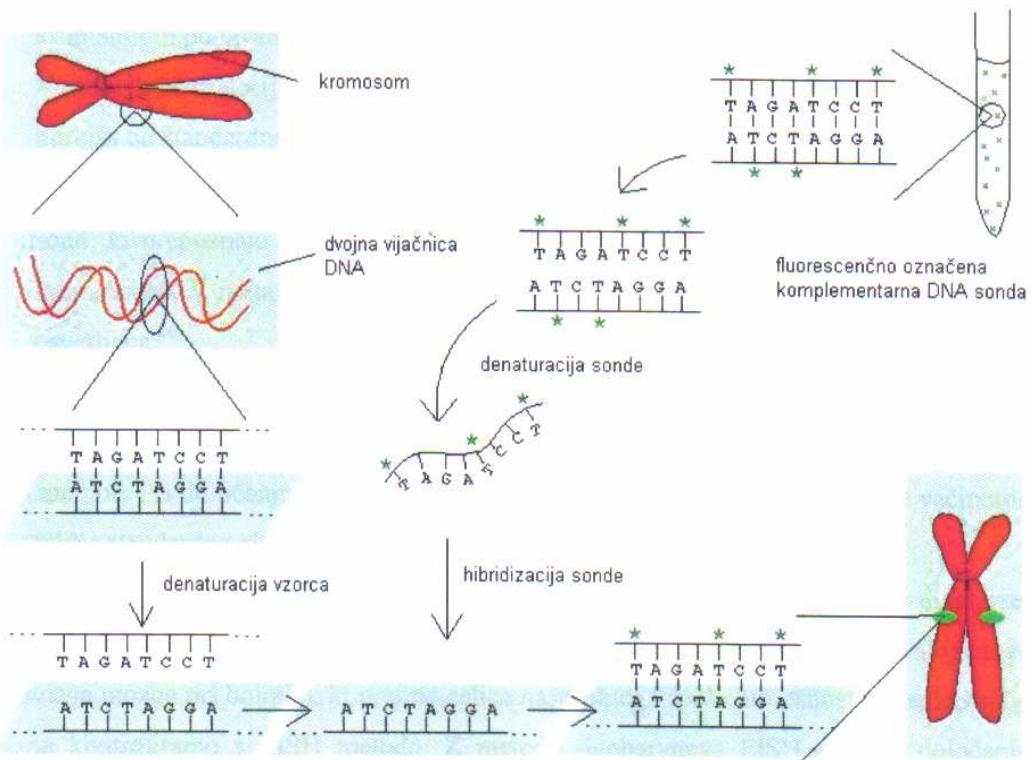
Prednost analize FISH je, da lahko uporabljamo celice tudi v interfazi celične delitve. Priprava celic do metafaze je zlasti pri malignih obolenjih včasih zelo zahtevna (majhen mitotski indeks). Pred uporabo te tehnike mora biti že znana določena okvara gena. Na osnovi poznavanja tega gena oz. zaporedja v genu lahko ustvarimo komplementarno zaporedje DNA ali RNA, ki je označeno radioaktivno ali fluorescentno. Tako sintetizirano DNA ali RNA imenujemo **sonda** (1).

Tarčna molekula je DNA v interfaznem ali metafaznem jedru celice, ta pa je pritrjena na predmetno mikroskopsko steklo. S tako pritrjeno DNA hibridizira enoverižna komplementarna DNA-sonda. Nukleotidi sonde so označeni s fluorescentnim barvilom, kar omogoči kasnejšo oceno označenih celic s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (4).

V hibridizacijsko mešanico je dodan presežek ponavljajočih DNA sekvenc, da blokirajo nespecifično vezavo sond na komplementarno DNA. Presežek nespecifično vezanih sond speremo po hibridizaciji s spiralnimi raztopinami detergentov (NP-40 in PBT). Na preparat nanesemo še fluorokrom, ki je nasprotno obarvan (DAPI) (Slika 4) (2).

Po zgradbi DNA-sond ločimo različne izvedbe preiskave FISH. Pri določanju kompleksnejših kromosomskih preureditev lahko uporabimo tudi t.i. večbarvni FISH (M-FISH), pri katerem uporabimo 3 do 5 različno obarvanih sond. Pri določanju številčnih kromosomskih nepravilnosti (monosomije, diploidije, trisomije) uporabljamo centromerne sonde. Obenem FISH omogoča zaznavanje določenih preureditev, ki jih s klasično kariotipizacijo ne opazimo. Zato se je delež bolnikov, pri katerih odkrijemo kromosomske nepravilnosti, z uvedbo tehnike FISH zelo povečal. Preiskava FISH je ključna predvsem ob postavitvi diagnoze, v začetku zdravljenja ali ob ponovitvi bolezni, ko je količina nenormalnih celic velika in je potrebna sorazmerno majhna analitska občutljivost. Za ugotavljanje minimalnega preostanka bolezni (MRD) po zdravljenju pa je FISH premalo občutljiv, saj le pri najboljših sondah občutljivost seže pod 1% . FISH lahko izvedemo

neposredno na celicah krvi (odvzeta z dodatkom Na-heparina) ali kostnega mozga, ki jih izoliramo. Navadno pa jih predhodno kratkotrajno gojimo kot za standardno citogenetično preiskavo. FISH pa je zlasti pomembna pri tistih vzorcih, kjer klasična citogenetična preiskava zaradi odsotnosti metafaz ni mogoča (4).



Slika 3: Shematični prikaz FISH (6).

1.3.1 Princip dela

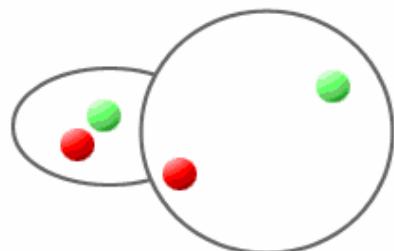
S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa in ustreznih filtrov ovrednotimo preparat. Ugotavljamо lahko spremembo števila signalov (zmanjšanje ali povečanje) oziroma spremembo vzorca signalov (pojav ali odsotnost zlitih signalov). Vzorec in število signalov pri normalni in patološki celici sta specifična za uporabljeno DNA-sondo. Zato pred pričetkom štetja za vsako sondу, ki smo jo uporabili, preverimo oba našteta podatka. Pri tem si pomagamo s katalogom proizvajalca sond (Vysis/Abbott), s slikami in podatki na internetu oziroma s kratkim povzetkom.

Pri vrednotenju fluorescentnih signalov se držimo navodil za štetje pozitivnih in negativnih celic, kot jih navaja proizvajalec sond (Slika 4) (2).

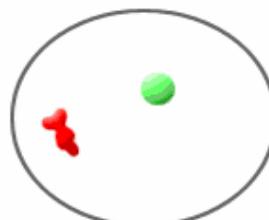
Ne štejemo - prekrivanje jeder in celotno področje jeder ni vidno.

● zelen signal

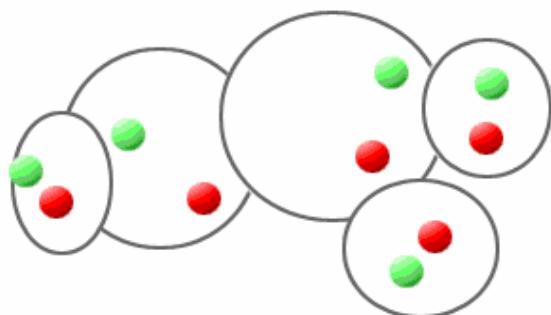
● rdeč signal



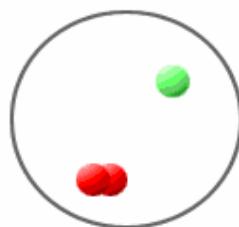
**Štejemo kot en rdeč in en zelen signal.
Rdeč signal je difuzen.**



Ne štejemo. Jedra so si preblizu in ne moremo določiti njihovih robov.



**Štejemo kot en rdeč in en zelen signal.
Rdeč signal je prelomljen.**



Slika 4: Štetje signalov pri analizi FISH (Vysis)

1.3.2 FISH sonde

Za izvajanje analize FISH lahko uporabimo sonde različnih vrst. Ločimo jih na osnovi tega, na katero področje kromosoma se vežejo. Nekatere sonde obarvajo celoten kromosom, druge le specifično področje kromosoma ali centromero kromosoma. Sonde lahko označijo telomere na p in q kraku (TEL), CEP sonde označijo centromero, nekatere pa obarvajo posamezna specifična področja na kromosomskem segmentu. (Slika 4). Medsebojno se razlikujejo tudi po dolžini baznih parov. Do 1 Mbp dolge sonde so sekvenčne sonde, ki hibridizirajo na posamezno kopijo DNA-zaporedja na določenem delu kromosoma (YAC, PAC, BAC, kozmidi, plazmidi in RNA sonde). Vektorski kromosom PAC je dolg od 130-150 kbp, vektorski kromosom BAC ima do 300 kbp, kozmid 40-50 kbp, plazmid in RNA sonda pa do 10 kbp. Uporabljamo še oligonukleotide, ki so najmanjši segmenti (do 0,10 kbp). Te so edine sintetsko pridobljene DNA-sonde, ki se uporabljajo za prikaz sekvenc na centromerni in telomerni regiji kromosoma (2,6).

1.3.2.1 Lokusno specifične sonde

Pri vezavi lokusno specifične sonde (LSI) na ustrezeno kromosomske področje lahko pride glede na različne kromosomske preureditve do:

- fuzije (zlitja) signalov
- razcepa signalov
- izgube ali pomnožitve signalov

Fuzijo signalov lahko opazimo pri translokacijah. Tu se označen del kromosoma odcepi in veže na drug (praviloma) nehomologni kromosom. Pri tem pride do zlitja dveh signalov: če se zelen in oranžen signal prikrivata, opazimo zliti rumeni signal.

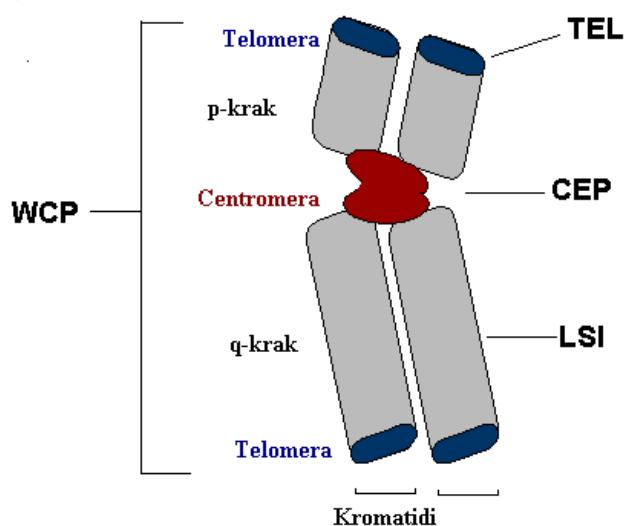
Razcep signalov opazimo pri preureditvah, kjer opazujemo le eno kromosomske področje. Normalna celica fluorescira z dvema zlitima signaloma na obeh homolognih kromosomih. Če pride na enim do preureditve, se zliti signal razcepi na oranžen in zelen signal.

Do izgube signalov pride pri delecijsih oziroma pri monosomijah. Normalna celica sveti z dvema signaloma enake barve na obeh homolognih kromosomih. Ko pride do delecie dela

kromosoma, izgubimo tudi en signal. Pri pomnožitvi genov ali povečanju števila kromosomov, pa pride tudi do pomnožitve signalov (15).

Sendo opazujemo pod fluorescenčnim mikroskopom s specifičnimi filtri za fluorokrom. Odvisno od izbrane sonde opazujemo vzorce signalov. Lahko opazimo pomnožitev ali zmanjšanje števila signalov oziroma pojav ali odsotnost zlitih signalov.

Tako lahko zaznamo izgubo ali pomnožitev celotnih kromosomov ali njihovih delov oziroma prisotnost translokacij (1, 3).



Slika 5: Kromosomska področja, na katera se vežejo različne DNA-sonde pri FISH (13).

Legenda: WCP – sonde za obarvanje celotnega kromosoma

TEL – telomerno specifične sonde

CEP – centromerno specifične sonde

LSI – lokus specifične sonde

1.4 Kontrola kakovosti

V medicinskih laboratorijih izvajamo analize biološkega materiala. Rezultati analiz so namenjeni ugotavljanju zdravstvenega stanja preiskovancev, postavljanju diagnoz in/ali spremeljanju zdravljenja. Namen dosežemo, če naročnikom storitev nudimo pravilne diagnostične informacije ob pravem času in v primerni obliki – z ustrezno interpretacijo.

Kakovost dela v kliničnih laboratorijih zagotavljamo z vzpostavitvijo celovitega sistema kakovosti, ki obsega predanalitično, analitično in poanalitično fazo procesa.

Notranja kontrola kakovosti (internal quality control) pomeni analiziranje kontrolnega materiala znanih vrednosti in primerjanje dobljenih rezultatov s pričakovanimi (ciljnimi) vrednostmi. Nadziramo ponovljivost oz. natančnost. Na tak način laboratorijsko osebje ocenjuje ali je rezultat dovolj zanesljiv za izdajo ali ne, zazna morebitne napake in jih lahko odpravi preden začne analizirati vzorce preiskovancev.

S pomočjo postopkov notranje kontrole kakovosti zagotovimo, da so rezultati zanesljivi, ponovljivi ter preverjamo kakovost dnevne rutine. Z dnevno kontrolo odkrijemo sistemske napake, poveča se natančnost. Ne moremo pa odkriti naključnih napak.

Zunanja ocena kakovosti je sistem za retrogradno preverjanje in sledenje kakovosti laboratorijskih rezultatov na osnovi medlaboratorijske primerljivosti. Gre za programe, kjer neka zunanjia, neodvisna inštitucija, organizira nabavo kontrolnega materiala in ga pošlje v analizo sodelujočim laboratorijem. Laboratoriji analizirajo vzorce kot »neznane«, na enak način kot analizirajo vzorce preiskovancev. Rezultate vrnejo organizatorju, ki jih statistično obdela in vrne laboratorijem z oceno o ustreznosti. Meje sprejemljivosti, to je tisto območje v katerem morajo biti rezultati, da so v soglasju z rezultati drugih laboratoriјev, vnaprej določimo. Razlike med rezultati laboratoriјev so lahko le tolikšne, da ne vplivajo na interpretacijo rezultata.

1.4.1 Zagotavljanje kakovosti

Sistem zagotavljanja kakovosti (QA – quality assurance) je zbirka pisnih postopkov, ki omogočajo sistematično spremljanje dejavnikov, ki lahko vplivajo na kakovost rezultata. Vsebuje navodila za delo, navodila za beleženje napak, ukrepanje in odpravljanje le-teh, če do njih pride, postopke za ovrednotenje procesa po korekcijskih ukrepih in postopke informiranja osebja o spremembah v sistemu. Analitično kakovost zagotavljamo z uporabo primernih validiranih metod, izvajanjem notranje kontrole kakovosti in sodelovanjem v zunanji oceni kakovosti. Kakovost dela pa je odvisna tudi od organizacije laboratorijske dejavnosti – ustrezena razporeditev kadrov, zagotovitev primernih prostorov, dobro usposobljeno osebje z ustrezeno izobrazbo in izkušnjami, izbira instrumentov, pisna

navodila za delo (standardni operativni postopki - SOP) in nenazadnje dobre finančne osnove. Tako lahko preprečujemo tudi naključne napake (8).

Lokacija in prostori medicinskega laboratorija morajo biti primerni za delo, zagotovljena mora biti varnost pred vstopom nepooblaščenih oseb. Aparature, ki se jih poslužujemo v laboratoriju, morajo biti redno servisirane in validirane (7).

Evropske smernice narekujejo, da mora biti sistem kakovosti vsakega citogenetskega laboratorija v skladu z najnovejšimi nacionalnimi oz mednarodnimi standardi (ISO).

Za vse postopke morajo biti napisani in dostopni SOP-i. Prav tako mora biti zagotovljena popolna sledljivost vzorca in dokumentiranje celotnega postopka (pisanje laboratorijskih dnevnikov). Preden pa končno poročilo zapusti laboratorij, ga je potrebno temeljito pregledati in podati mnenje, kar je pristojnost odgovorne osebe (7).

1.4.2 Kontrola kakovosti v citogenetskem laboratoriju

Laboratorij mora zagotoviti dostopnost ustreznih transportnih medijev za biološki material, ki prihaja v laboratorij. Z izjemo »tveganih vzorcev« naj bi bila optimalna številčna koncentracija celične kulture 1×10^6 /ml. Če vzorec vsebuje dovolj celic, ga gojimo vsaj v dveh paralelkah – na dveh gojiščih. Za štetje in vrednotenje preparatov je število celic sicer priporočeno, le-to pa se lahko prilagodi vsakemu preparatu posebej. Če je kvaliteta preparata slabša, ali je analitik še neizkušen na področju vrednotenja citogenetskih preparatov, število preštetih celic povečamo. Izvid izda pooblaščen citogenetik z ustrezno izobrazbo (specialist). Vsako poročilo o rezultatih analize naj bi vsebovalo tudi potrdilo, ki zagotavlja kontrolo kakovosti med samo analizo in upoštevanje razlogov napotitve (11).

1.4.2.1 Zagotavljanje kakovosti pri preiskavi FISH

Fluorescentna »in situ« hibridizacija lahko daje zanesljive rezultate pri različnih patoloških stanjih. Priporočljiva je kontrola učinkovitosti hibridizacije, kot tudi same sonde s hibridizacijo na normalnih kromosomih. Velika analitska občutljivost in specifičnost sta

pri določanju diagnoze zelo pomembni. Med posameznimi preparati lahko opazimo precejšnjo razliko med signali, kar je med drugim odvisno od starosti in kvalitete preparata, nanosa vzorca itd. Prav tako se signali razlikujejo tudi pri enem preparatu. Najboljša kontrola učinkovitosti hibridizacije je, da FISH izvedemo na normalnih vzorcih.

S temi postopki se zagotovi tudi notranja kontrola celotnega postopka FISH. V primeru, ko hibridizacija ni optimalna, se analiza ponovi. Kasneje, če je možno, pa se rezultate spremišča z analizo kariotipa. Vse preparate morata ovrednotiti dva analitika. Za vsak primer sonde oz. pacienta morata biti ohranjeni vsaj 2 fotografiji celic.

Vsaka nova serija sond naj bi bila validirana, preden se uporabi v diagnostične namene. Validacija vključuje testiranje specifičnosti vezave sonde na tarčno mesto pri normalnih oz. abnormalnih kromosomih, ter specifičnost in občutljivost same analize. Pri komercialno dostopnih sondah v večini primerov proizvajalec sam poda vrednosti teh parametrov. Če pa le-te niso podane, moramo občutljivost sonde določiti z oceno razmerja signalov v posameznem preparatu (razporejenost signalov med celicami). Specifičnost pa določimo z razmerjem signalov, razporejenih na tarčna mesta na kromosomih, glede na ostale kromosomske regije. Postopek validacije in vsi rezultati morajo biti v celoti dokumentirani (7, 10, 11). Število pregledanih interfaznih jeder naj bi bilo v različnih laboratorijih med 100 in 500 za posamezno sondo. Če delež celic z neustreznim številom ali vzorcem signalov presega mejno vrednost (cut-off), določeno z interno validacijo za vsako sondu posebej, se izda pozitiven izvid za iskano klonsko nepravilnost (17).

»Cut-off« je v slovenščini prazna vrednost (iz praga, ki je dosežen), zato izraz cut off, ko gre za vrednost, do katere številčni rezultat ni pomemben vsebinsko, raje prevajamo kot prag oz. prazna vrednost (19). V našem primeru izraz »cut-off« pomeni spodnjo mejno vrednost in je kot tak uporabljen tudi v tuji literaturi, zato smo povsod uporabljali izraz »mejna vrednost«.

Poročilo o rezultatih analize FISH mora vsebovati rezultate v pisni obliki in njihovo razlago za vsako uporabljeni sondi, z uporabo nomenklature ISCN. V primeru, da se naredi tudi kariotip, se izvid analize FISH poda kot delni rezultat. Izvid mora biti oddan v najkrajšem možnem času, odvisno pa je tudi od stopnje nujnosti, najkasneje pa v enem dnevu po končani analizi. Evropske smernice narekujejo, da je za vzorce kostnega mozga priporočljivo izvid kariotipizacije oddati najkasneje v 21 dneh, v urgentnih primerih in

primerih vzorcev venske krvi pa je ta čas celo 7 dni. Vsa poročila in ostala dokumentacija, ter sami vzorci, se arhivirajo po standardnem operacijskem postopku in se shranjujejo najmanj 5 let ali več (7, 10, 11).

1.4.2.2 Vrednotenje preparatov

Dva preiskovalca preštejeta po 200 celic. Vsak prešteje po 100 celic v dveh ločenih področjih preparata. Če je prvih 200 celic negativnih, je dovolj, da drugi preiskovalec prešteje le 100 celic. Rezultat je povprečje obeh štetij. V primeru nenormalnega vzorca signalov je priporočljivo, da se analizira vsaj pet metafaznih celic, če so prisotne v danem vzorcu. Če se število pozitivnih izsledkov med preiskovalcema razlikuje za več kot deset odstotkov, mora šteti še tretji preiskovalec. Rezultat je povprečje tistih dveh vrednosti, ki odstopata za manj kot 10%. Pri deležih pozitivnih celic pod 20% lahko rezultati med obema preiskovalcema odstopajo za ± 6 celic (na 200 preštetih). V primeru, da štejemo samo določeno vrsto celic (cIg FISH), preštejemo vse celice v preparatu.

Če uporabljamo analizo FISH za določanje minimalnega preostanka bolezni, šteje vsak preiskovalec 500 celic.

1.4.2.3 Podajanje rezultatov

Številčno podamo vrednost negativnih (z normalnim vzorcem in/ali številom signalov) in delež pozitivnih (s preurejenim vzorcem in/ali številom signalov) celic. Rezultat podamo v tabeli na skupno število 200 pregledanih celic za vsako uporabljeno DNA-sono. V mnenju rezultat podamo kot delež (%) nenormalnih celic v vzorcu. V izvidu navedemo tudi, katero DNA-sono smo uporabili in njenega proizvajalca.

1.4.2.4 Kontrola kakovosti

Vsak preiskovalec vpisuje rezultate v svoj dnevnik. Po končanem štetju preiskovalca preverita rezultate. Če odstopajo od postavljenih kriterijev, ponovita štetje ali počakata na štetje tretjega. Šele po tem, ko so rezultati v skladu s predpisanimi kriteriji, jih izpišemo v dnevnik preiskave. Oba preiskovalca se podpišeta pod rezultate.

1.4.2.5 Ugotavljanje uspešnosti hibridizacije

Pri sondah z interno kontrolo so signali za področja, kjer ne prihaja do sprememb, ustrezeno merilo uspešnosti hibridizacije. Delež jeder, kjer ni signalov, mora biti manjši kot 2% celic. Enako velja za sonde, ki se razcepijo (break-apart), ali sonde, kjer prihaja do fuzije signalov.

Pri sondah, kjer določamo delecijo ali amplifikacijo brez notranje kontrole, je potrebno preveriti število neoznačenih jeder. Pri uporabi teh sond vedno delamo vsaj dva preparata istočasno, sicer pripravimo kontrolni preparat z nanosom limfocitov zdravega dajalca. Če je neoznačenih jeder več kot 2% pri obeh (ali več) preparatih, jih ne vrednotimo, ampak analizo ponovimo.

Analitično specifičnost in občutljivost podaja proizvajalec za vsako uporabljenou sondu. Potrdila shranjujemo ob prejemu sonde v mapi. Za vse sonde, ki so v trenutni uporabi ali v rezervi, hranimo potrdila. Zavržemo jih, ko je sonda porabljena.

1.4.3 Smernice proizvajalca za notranjo kontrola kakovosti

Proizvajalec navaja nekatere priporočene smernice za analizo FISH:

- Celice morajo biti enakomerno porazdeljene na steklu. Skupki celic na steklu lahko nakazujejo na nepravilno predpripravo stekel ali vzorca ter slabe nanose. V vidnem polju pri 400-kratni povečavi mora biti vidnih najmanj 8 celic.
- Jedra in kromosomi ne smejo »svetiti«. Gre za močno refleksijo obsevane svetlobe na površini samih celic. Če opazimo, da celice »svetijo«, gre vedno za napako v pripravi preparata. Pred obdelavo vzorcev vedno optimiziramo postopek z uporabo kakovostnega preparata limfocitov venske krvi.
- Okrog jeder in metafaz ne sme biti vidna citoplazma, ker le-ta lahko prepreči hibridizacijo. Hibridizacija je neučinkovita in rezultati so posledično netočni.

Vsi delovni postopki morajo slediti navodilom, ki so priložena sondam. Vedno uporabljamo ustrezeni fluorescenčni mikroskop, filtre in postopke, kot so zapisani v navodilih oz SOP-ih. Vse te zahteve in navodila je potrebno izpolnjevati za optimalni

postopek hibridizacije. Kontrolne vzorce analiziramo / vrednotimo z uporabo fluorescenčnega mikroskopa. Vsak hibridiziran preparat mora biti ovrednoten s kontrolnimi parametri, ki so določeni s strani laboratorija. Uporaba primerenega mikroskopa, svetlobni filtri, specifičnost hibridizacije, intenziteta signalov sond in signali artefaktov ter ozadja, morajo biti ovrednoteni, da lahko ugotovimo ali je bila hibridizacija optimalna za nadaljnjo analizo. Vsaj 85% vseh jeder v vidnem polju se da zlahka prešteti – moteče ozadje je minimalno, jedra ne svetijo. Vsi signali sonde morajo biti zlahka vidni pri 400-kratni povečavi. Jedra v preparatu ne smejo biti povezana z okoliškimi jedri, prav tako ne smejo biti prekrita s citoplazmo. Prisotnost številnih skupkov jeder (več kot tri jedra skupaj) preprečuje primerno homogeno porazdelitev jeder na preparatu za točno vrednotenje. Preparati, ki ne ustrezajo kriterijem, se za vrednotenje ne smejo uporabiti. Štetje signalov izvajamo za vsako sondu posebej, vendar je signale nekaterih sond smiselno prešteti istočasno (15).

1.4.3.1 Odpravljanje težav

VYSIS navaja nekatere možne napake in nepravilnosti med samo analizo ter pri vrednotenju preparatov, vzroke napak in kako je napake možno odpraviti. Podatki so povzeti v tabeli, v Prilogi 1.

2 NAMEN DELA

Namen naloge je določiti mejne vrednosti za izbrane sonde pri preiskavi FISH. Gre za nekatere sonde, ki so po dosedanjih izkušnjah v rutinskem delu bodisi težavne za vrednotenje oziroma pogosteje uporabljene: DNA-sonde LSI p53 in LSI ATM, LSI D13S319, LSI 13q34, CEP 12 in LSI BCR/ABL ES. Mejna vrednost je v tem primeru tisti delež pozitivnih celic, ki ga določimo tudi pri zdravem preiskovancu brez maligne krvne bolezni. Dobljene rezultate bomo primerjali s tistimi, ki jih proizvajalec navaja na certifikatu posamezne sonde.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

Analizirali smo 6 različnih DNA-sond proizvajalca Vysis na vzorcih venske krvi zdravih preiskovancev. Naš namen je bil določiti spodnjo mejno vrednost. To je tisti delež pozitivnih celic, ki ga določimo tudi pri zdravem preiskovancu brez maligne krvne bolezni.

3.1 *Materiali*

3.1.1 Osnovne raztopine

- Hipotonični KCl (Sigma, St.Louis, ZDA); 0,075M (5,59 g/l)
- Pepsin (2,5%) (Sigma, St.Louis, ZDA)
- 1 M MgCl₂ (Kemika, Zagreb, Hrvaška); 203,31 g/l MgCl₂×6H₂O
- 1 M HCl (Kemika, Zagreb, Hrvaška) 4.24 mL konc. HCl (36%) + 50 mL H₂O
- Raztopina SSC ("sodium saline citrat"), raztopina za spiranje

20×SSC:

3 M NaCl (175,3 g/l) (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

0,3 M Na₃C₆H₅O₇×2H₂O (88,25 g/l) (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

Dolijemo vodo, uravnamo pH-vrednost na 6,3 ali 5,3 z 1 M HCl in dopolnimo do oznake. Raztopino prefiltriramo preko 0,45 µm filtra in hranimo na sobni temperaturi.

- Raztopina PBS

10×PBS:

NaCl (80 g/l)

KCl (2 g/l)

KH₂PO₄ (2 g/l)

Na₂HPO₄ (11,5 g/l)

Proizvajalec vseh štirih kemikalij je Kemika (Zagreb, Hrvaška).

Dolijemo destilirano vodo do 900 ml ter uravnamo pH-vrednost na 7,4. Dopolnimo z destilirano vodo do oznake in steriliziramo.

- Fosfatni pufer

a) 245 ml 0,06 M Na₂HPO₄ (8,52 g/l Na₂HPO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška))

b) 255 ml 0,06 M KH₂PO₄ (8,16 g/l KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška))

pH vrednost uravnamo na 6,8 z dodajanjem enega ali drugega fosfata in jo hranimo v hladilniku.

3.1.2 Materiali za gojenje celic periferne krvi

3.1.2.1 Gonenje

- Gojišče Chromosome medium + Phytohaemagglutinin (Gibco) (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- Timidin (0,025 M) (Sigma, St.Louis, ZDA)
Raztopino 0,025 M timidina pripravimo tako, da 1 g timidina raztopimo v 167 ml raztopine Hank's-a.
- Kolcemid (Invitrogen, New York, ZDA)

3.1.2.2 Odvzem kulture in fiksiranje celic

- Hipotonična raztopina

Hipotonično raztopino pripravimo vsakič svežo in sicer iz:

- 7 ml 0,0075 M hipotoničnega KCl
- 6 ml destilirane vode
- 1 ml seruma FBS (Sigma, St.Louis, ZDA)

▪ Raztopina za fiksacijo celic – fiksacijska raztopina:

Absolutni etanol (Riedel-de Haen AG, Seelze, Nemčija) : Oacetna kislina 100% (Merck Darmstadt, Nemčija) = 3:1

Fiksacijsko raztopino vedno pripravimo svežo in jo takoj po uporabi dobro pokrijemo s parafilmom.

3.1.3 FISH

3.1.3.1 Predpriprava stekel za analizo FISH

▪ 2 SSC

Zmešamo 100 mL 20 SSC (pH=6.3) in 850 mL dest. H₂O. Uravnamo pH na 7.0±0.2.

Dopolnimo z vodo do 1000 mL. Raztopino hranimo v hladilniku.

▪ 1 M MgCl

▪ 1 M NaOH

▪ 1 M HCl

▪ PBS

▪ Raztopina pepsina (0,005%)

V 100 ml bučko nalijemo nekaj destilirane vode in dodamo 1 ml 1 M HCl. Z destilirano vodo dopolnimo do oznake. Raztopino prelijemo v stekleno kiveto in dodamo 200 µl 2,5% pepsina.

▪ Raztopina formaldehida

V 100 ml bučko pripravimo 5 ml 1 M MgCl₂ in 2,5 ml 37% formaldehida ter nalijemo 2×SSC (pH = 7) do oznake. Raztopino prelijemo v kiveto za objektna stekla.

▪ Raztopine etanola:

Absolutni etanol redčimo do ustrezne koncentracije (70%, 90%)

3.1.3.2 Nanos sond

- DNA sonde Vysis (Abbott, Illinois, ZDA)
- Krovna stekla (Brand, Wertheim, Nemčija)
- Gumijasti cement Fixo Gum (Marabu, Tamm, Nemčija)

3.1.3.3 Spiranje stekel po hibridizaciji

- Raztopina za spiranje NP-40

V reagenčno steklenico damo 0,9 g detergenta NP-40 (BDH Chemicals Ltd, Poole, Anglija), 60 ml 20×SSC (pH = 6,3) in 240 ml destilirane vode. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi. Naslednji dan jo prefiltriramo skozi 0,2 µm sterilni filter.

- Raztopina za spiranje PBT

V 500 ml bučko damo 2 ml BSA ("bovine serum albumin", 6% raztopina) (Sigma, St.Louis, ZDA) in 0,5 ml Tween 20 (Sigma, St.Louis, ZDA). Z 1×PBS pufrom dopolnimo do oznake in pustimo čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi. Naslednji dan jo prefiltriramo skozi 0,2 µm sterilni filter.

- DAPI counterstain II (Abbott, Illinois, ZDA)

3.1.4 Aparature

- Zaščitna laminarna komora – vertikalna (Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija)
- CO₂ Inkubator, (Newbrunswick Scientific, New Jersey, ZDA)
- Vodna kopel GFL 1086 (Electra bema d.o.o., Brezovica, Slovenija)
- Vrtinčnik (vortex), Vibromix 10 (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- pH meter (Mettler Toledo, Ohio, ZDA)
- Tehnica AX in MX/UMX (Mettler Toledo, Ohio, ZDA)
- Invertni mikroskop (Opton, Zahodna Nemčija)
- Vodna kopel (Termoproc, Ljubljana, Slovenija)
- Grelna plošča (Termoproc, Ljubljana, Slovenija)
- Centrifuga Labofuge 400 (Thermo, Manchester ZDA)
- Centrifuga – minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Hibridizator – Thermobrite (Abbott Molecular, Illinois, ZDA)

- Fluorescenčni mikroskop (OLYMPUS BX-41) s programsko opremo za citogenetske analize (Cytovision, Applied Imaging)
- Števec za štetje celic

3.1.5 Laboratorijski pribor

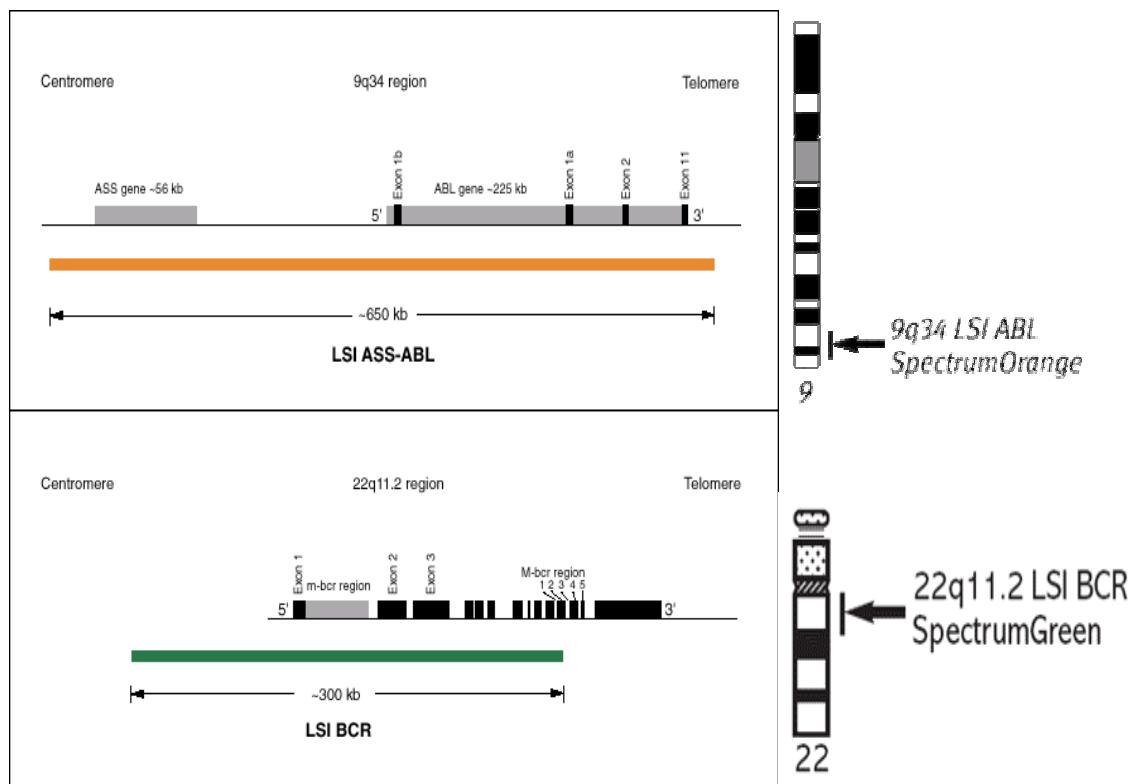
- Mikroskopska objektna stekla (Biognost, Zagreb, Hrvaška)
- Steklene kivete za objektna stekla
- Plastične epruvete s koničastim dnom, »centrifugirke«, 15 ml (Greiner Bio One, Frickenhausen, Nemčija)
- Pasteurjeve pipete 3 ml (Falcon, Kalifornija, ZDA)
- Bučka (100 ml, 500 ml, 1000 ml)
- Sterilne pipete Dispenser (10 ml)
- Pipete Eppendorf (10 µl, 20 µl, 1000µl)
- Easypet pipetor (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Sterilni nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Črne mikrocentrifugirke (1,5 ml)
- Aluminijasta folija
- Parafilm
- Merilni valji (50 ml, 100 ml)
- Črne škatlice z dvojnim dnom
- Diamantni svinčnik za rezanje po steklu

3.1.6 Opis uporabljenih DNA sond

Pri svojem delu sem uporabljala DNA-sonde proizvajalca Vysis (Abbott) (15).

a) LSI BCR/ABL

Sonda LSI BCR/ABL se uporablja za določanje translokacije t(9;22)(q34;q11.2) (Philadelphia kromosom). Sonda za področje 9q34 je označena z oranžnim barvilkom (*ABL* onkogen) (650 kb), za področje 22q11.2 pa z zelenim barvilkom (*BCR* gen) (300 kb). Translocirana celica s prelomom v glavnem področju fluorescira z enim zelenim, enim velikim oranžnim in enim malim oranžnim signalom ter z enim zlitim signalom (rumen). Če je prelom pri translokaciji v manjšem področju, pa fluorescira z enim zelenim, enim oranžnim in dvema zlitima signaloma. Normalna celica pa fluorescira z dvema zelenima in dvema oranžnima signaloma (Slika 6). Določanje t(9;22) je ključno pri diagnostiki KML.

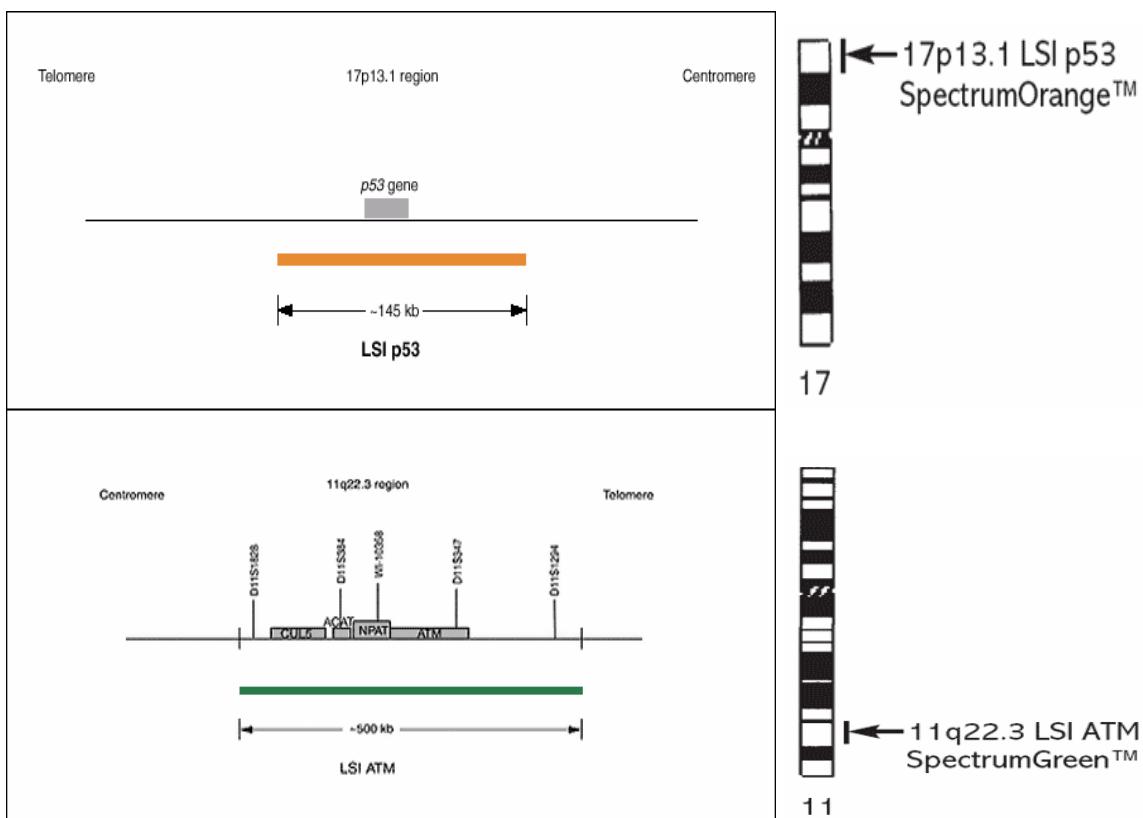


Slika 6: Področje vezave sonde LSI BCR/ABL (15).

b) Panel 1 - LSI p53 / LSI ATM

Sonde v Panelu 1 uporabljamo za določanje delekcije gena *p53* in gena *ATM* (ataxia telangiectasia mutated gene). Oba gena sta supresorja tumorjev in sodelujeta v DNA popravljalnih mehanizmih. Sonda LSI p53 hibridizira na področju 17p13.1 in pokriva

celoten gen *p53* ter obsega 145 kb. Označena je z oranžnim barvilom. Približno 500 kb velika sonda LSI ATM hibridizira na področju 11q22.3 kromosoma 11 in pokriva celoten *ATM* gen (184 kb), ter nekatere druge gene. Označena je z zelenim barvilom (slika 7). Normalna celica z dvema kopijama kromosomov 17 in 11, fluorescira z dvema oranžnima in dvema zelenima signaloma. Če se pojavi delecija enega ali drugega področja na omenjenih kromosomih, vidimo to kot izgubo signala za to področje.

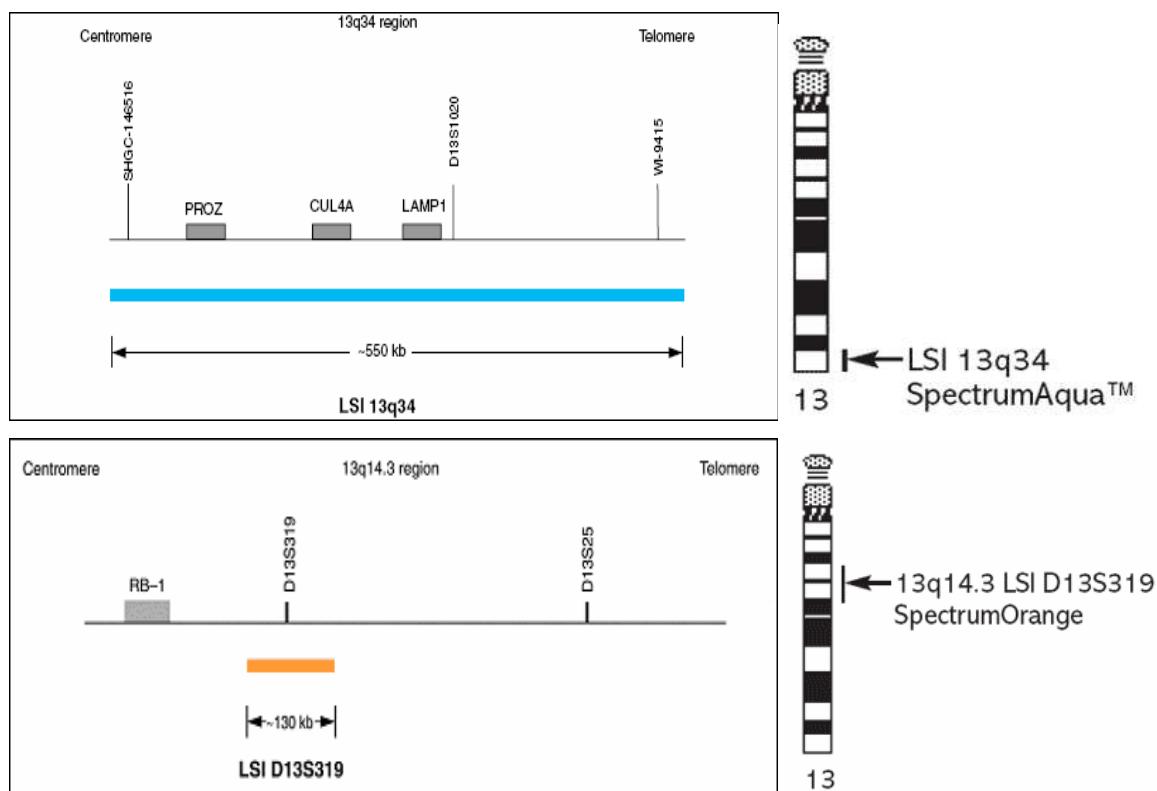


Slika 7: Področje vezave sond LSI p53 in LSI ATM (15)

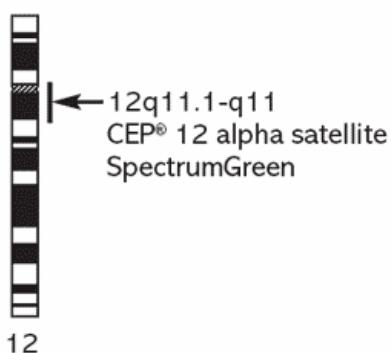
c) Panel 2 - LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12

Panel 2 vsebuje sonde, s katerimi določamo morebitno delecijo na dolgem kraku kromosoma 13 (področji 13q14.3 ter 13q34) in trisomijo kromosoma 12. LSI D13S319 hibridizira na približno 130 kb velikem področju 13q14.3 in je označena z oranžnim barvilom, LSI 13q34 hibridizira s 550 kb velikem področju 13q34, ki zajema gen *LAMP1*

ter nekatere druge gene in je označena z modrim barvilm ter sondno CEP 12, ki hibridizira s centromero kromosoma 12 (področje 12p11.1-q11) in je označena z zelenim barvilm. Normalna celica z dvema normalnima kopijama kromosomov 13 in 12 fluorescira z dvema oranžnima, dvema modrima in dvema zelenima signaloma (slika 8, 9). Če je prisotna delecija 13q14.3, vidimo en oranžen, dva modra in dva zelena signala. Pri monosomiji 13 vidimo en oranžen, en moder in dva zelena signala. Pri deleciji homozigotnih genov (13q14.3) pa samo dva modra in dva zelena signala. Če je prisotno spremenjeno število kopij kromosoma 12 (monosomija, trisomija), vidimo to kot enega ali tri zelene signale.



Slika 8: Področje vezave sond LSI 13q34 in LSI D13S319 (15).



Slika 9: Področje vezave sonde CEP 12.

3.1.7 Vzorci

Vsi preiskovani vzorci so bili venska kri zdravih prostovoljcev, brez hematološke bolezni. Vsi preiskovanci, ki sem jih izbrala naključno, so prostovoljno soglašali, da se njihova venska kri uporabi za analizo FISH v okviru diplomske naloge. Povprečna starost je bila 27,8 let. Izbrali smo mlajšo populacijo preiskovancev, da smo dodatno izključili možnost morebitnih kromosomskih sprememb zaradi izpostavljenosti mutagenom. Podatki so zbrani v tabeli II.

Tabela II: Podatki o preiskovancih in njihovih vzorcih ter uporabljenih sondah

ID	Starost	Spol	Število levkocitov $\times 10^9/L$	UPORABLJENA SONDA **		
				KLL Panel 1 ¹	KLL Panel 2 ²	LSI BCR/ABL
1	24	ž	6,8	1x	1x	ND*
2	27	ž	6,7	1x	1x	ND*
3	26	ž	9,7	2x	2x	2x
4	27	ž	4,9	2x	2x	2x
5	25	ž	6,7	2x	2x	2x
6	24	ž	9,7	2x	2x	2x
7	27	m	4,7	1x	1x	2x
8	25	m	8,0	1x	1x	2x
9	22	m	7,2	2x	2x	2x
10	29	m	/	2x	2x	2x
11	23	m	5,7	1x	1x	1x
12	26	m	9,7	2x	2x	2x
13	24	ž	8,8	1x	1x	1x
14	24	ž	12,5	1x	1x	1x
15	45	ž	8,8	1x	1x	1x
16	24	ž	5,8	1x	1x	1x
17	54	ž	8,3	1x	1x	1x
18	25	m	6,6	1x	1x	1x

* - ni delano

** - število nanosov posamezne sonde na vzorec istega preiskovanca (kontrola ponovljivosti sonde)

¹ KLL Panel 1: LSI ATM, LSI p53

² KLL Panel 2: CEP 12, LSI D13S319, LSI 13q34

3.2 Metode

3.2.1 Odvzem vzorcev

Vzorce venske krvi je odvzela medicinska sestra v hematološki ambulanti, po standardnem postopku za odvzem venske krvi. Vzorci so bili odvzeti v epruveto (Vacutainer, UK) z antikoagulantom Na-heparin. V vsakem vzorcu smo s hematološkim analizatorjem izmerili število levkocitov.

3.2.2 Gojenje celic periferne krvi

Za gojenje smo uporabili komercialno pripravljeno popolno gojišče Chromosome medium A, ki vsebuje fitohemaglutinin (PHA). Vzorec venske krvi je bil odvzet v epruveto z Na-heparinom in prenesen v laboratorij pri sobni temperaturi.

V sterilne centrifugirke smo sterilno odpipetirali 8 ml gojišča. Postavili smo jih za nekaj minut v vodno kopel na 37°C. Nato smo vanje odpipetirali 0,5 ml polne krvi. Na centrifugirke smo napisali ime in priimek preiskovanca, tip gojišča, datum in čas začetka kultivacije. Gojenje je potekalo v inkubatorju pri 37°C, 5% CO₂, v vlažni atmosferi. Centrifugirke so bile položene nekoliko vzdignjene pri pokrovčku, ki je le rahlo privit, da je med gojenjem omogočen prehod plinov v gojišče. Po 48 urah smo dodali v vsako gojišče 400 µl timidina. Po 70 urah smo dodali še 100 µl kolcemida in pustili v inkubatorju še 2 uri (2).

3.2.3 Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic

Celice različnih tkiv smo po gojenju po predpisanim postopku (2) izolirali in trajno fiksirali za nadaljnjo citogenetsko analizo. S hipotonično obdelavo smo dosegli ustrezno nabrekanje celic, da so se kromosomi primerno razporedili, medtem ko smo s fiksacijo obdelali celice na tak način, da smo lahko z njimi izvajali nadaljnje postopke. Obenem smo jih s tem konzervirali za dolgotrajno hranjenje.

Centrifugirke smo prenesli iz inkubatorja, jih dobro zaprli in vzorec premešali, nato ga odcentrifugirali na 500 g (10 min). Odstranili smo supernatant in temeljito premešali z vrtinčnikom (18). Dodali smo 8 mL hipotonične raztopine, ki smo jo predhodno segreli na 37°C. Prve 2-3 mL hipotonične raztopine smo dodajali po kapljicah, zamašili epruvete in jih pustili stati v vodni kopeli pri 37°C **25 min**. Ob izteku časa smo dodali v vsako centrifugirko 3 kaplje fiksativa, nato odcentrifugirali pri 500g (8 min). Odstranili smo supernatant in temeljito premešali (vrtinčnik). Nato smo dodali 8 mL fiksativa, prve 2-3 mL po kapljicah. Pustili smo na sobni temperaturi stati 15 min, nato spet odcentrifugirali na 500 g (8 min). Odstranili smo supernatant in temeljito premešali (vrtinčnik). Počasi smo dodali 8 ml fiksativa. Zadnji postopek smo ponovili vsaj še dvakrat oziroma dokler ni bila raztopina prozorna.

Po zadnjem centrifugiranju smo pustili v epruveti približno pol ml supernatanta in dobro premešali, ter shranili v zamrzovalnik (-20°C). Tam smo pustili najmanj dve uri pred nanosom na stekla (2).

3.2.4 Nanosi na stekla

Citogenetsko analizo smo izvajali le na nanosih suspenzije celic na objektna stekla. Uporabili smo predhodno ustrezno izolirane in fiksirane celice. Celice so pred nanosi na stekla vsaj dve uri mirovale v zamrzovalniku pri -20°C (2).

3.2.4.1 Priprava objektnih stekel za nanos

Nova stekla smo pred uporabo zložili v ležečo kadičko za objektna stekla. Na dno kadičke smo nalili približno 1 cm Kemexa A in do vrha dolili mlačno vodo. Kadičke smo pokrili in pustili stati čez noč. Naslednji dan smo stekla najprej dobro sprali s hladno tekočo vodo, nato pustili 20 min do pol ure spirati z vročo vodo in na koncu še 10 min z mrzlo vodo. Sprana stekla smo nato sprali še z destilirano vodo in jih, povsem pokrita z destilirano vodo, postavili v hladilnik (2).

3.2.4.2 Nanos vzorca

Vzorce smo dali iz zamrzovalnika in jih odcentrifugirali 500 g (10 min). Odlili smo supernatant in k sedimentu dodali nekoliko fiksativa, tako da smo dobili ustrezeno gostoto celic.

Stekla smo vzeli iz vode in rahlo odcedili na celulozni vati (staničevini). Proti svetlobi smo preverili, če voda ni odtekala le v eno smer. Nanašali smo nad paro. S konico nastavka za avtomatsko pipeto z vzorcem (20 µl) smo se rahlo dotaknili sredine stekla, nato z višine (nekaj cm) kanili preostanek vzorca na objektno steklo, da se je enakomerno razlezel po celotni površini. Ko se je vzorec na steklu posušil, smo pod invertnim mikroskopom preverili, če je gostota celic ustreza. Če je bil vzorec preredek, smo nekoliko povečali uporabljen volumen (30 µL), nekatere pa smo ponovno centrifugirali in odstraniti nekaj supernatanta. Pred nanosom smo nato ponovno dobro premešali. Če je bil vzorec pregost, smo dodali nekoliko fiksativa (2).

3.2.4.3 Staranje nanosov

Stekla smo starali pol ure na 60°C, nato pa še pol ure na 90°C na grelni plošči.

3.2.5 FISH

3.2.5.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA

Pod invertnim mikroskopom smo preverili, če je preparat primeren za hibridizacijo. Celice so bile razporejene enakomerno, vidnih je bilo precej metafaz, celice so bile puhastega videza in niso svetile. Z diamantnim rezilom (svinčnikom) smo označili področje na steklu, ki je najustreznejše za izvedbo hibridizacije, približno 2cm x 2cm.

V vodni kopeli, temperature 37°C, smo segreli 2 kiveti za objektna stekla s 100 ml raztopin 2SSC in pepsina. V vsaki smo zaporedoma pustili objektna stekla 5 min.

Na sobni temperaturi pa smo pripravili raztopine za spiranje, v katere smo nato zaporedoma pomakali stekla z vzorcem.

2×SSC; 2 min

2×SSC; 2 min

2×SSC; 2 min

formaldehidna raztopina; 10 min

2×SSC; 2 min

2×SSC; 2 min

2×SSC; 2 min

70% etanol; 2 min

90% etanol; 2 min

100% etanol; 2 min

Stekla smo pustili na sobni temperaturi, da so se posušila.

V temi (v centrifugi) smo odtalili sonde, ki smo jih predhodno vzeli iz zamrzovalnika.

Na hitro smo jih premešali z vrtinčnikom in jih odcentrifugirali. V črno mikrocentrifugirko smo odpipetirali:

7 µl hibridizacijskega pufra

2 µl redestilirane vode

1 µl sonde

Vsebino smo dobro premešali in odcentrifugirali. Celotno količino hibridizacijske mešanice smo odpipetirali na sredino označenega polja na steklu, nanjo položili krovno stekelce, pri čemer smo pazili, da ne nastanejo zračni mehurčki in robove zalili z gumijastim cementom za tesnjenje krovnega stekla. Stekla smo položili na ploščo hibridizatorja, ki je bila segreta na 37°C in pustili hibridizirati 16 ur (čez noč) na ustreznom programu, ki smo ga nastavili na aparatu (denaturacija 1 min na 75°C, hibridizacija 16 ur na 37°C) (2).

3.2.5.2 Spiranje stekel po hibridizaciji

S stekel, ki so bila čez noč v hibridizatorju, smo odstranili krovna stekla. Postavili smo jih v raztopino za spiranje NP-40 za 4 min, ki je postavljena v vodni kopeli na 73°C. Stekla smo nato postavili za 4 min v posodico s PBT na sobni temperaturi. Na mokro steklo, ki smo ga odcedili na staničevini, smo nanesli 10 µl DAPI counterstain II na sredino označenega polja, ter ga prekrili z velikim krovnim stekлом.

S staničevino smo ovili steklo in ga dobro popivnali ter osušili. Stekla smo položili v plastične temne posode s pokrovom. Za pol ure smo jih postavili v hladilnik.

Vzorce smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom (2).

3.2.6 Vrednotenje preparatov FISH

3.2.6.1 Vzorec za analizo

Ustrezno pripravljene preparate smo do analize hranili v temni komori. Pri vrednotenju preparatov smo upoštevali podatke proizvajalca o pričakovanem vzorcu signalov pri normalnih in patoloških celicah (Tabela III).

Proizvajalec Vysis je izdelal kontrolni list, s katerim si pomagamo pri oceni ustreznosti preparata za preiskavo FISH. (Priloga 2: Kontrolni obrazec za spremljanje kakovosti pri analizi FISH)

Kontrolni list je sestavljen iz treh delov. V prvem delu vrednotimo ustreznost samega preparata - nanos celic, ozadje, nepotrebni celični in drugi drobci, ki so vidni v preparatu in so moteči za nadaljnje vrednotenje. V drugem delu vrednotimo intenziteto sonde in signalov, obarvanje jeder z »Dapi II«, ozadje sonde in na splošno celotno kakovost preparata. Če je le-ta ovrednotena kot slaba, preparata za štetje signalov in nadaljnjo analizo ne smemo uporabiti. V tretjem delu pa zabeležimo identiteto vzorca, ime sonde, ki je bila uporabljena, vrsto filtra, ki smo ga uporabili za štetje signalov te sonde in število pretečenih ur UV žarnice, ki ne sme presegati 200 ur. Označimo številko posameznega stekla in zapišemo, koliko celic smo prešteli na tem steklu in koliko signalov smo prešteli na posamezni celici (1 signal, 2 signala, 3 signali, več kot trije signali).

Tako izpolnjen kontrolni list nam služi kot kontrola kakovosti celotnega postopka analize FISH za vsak preparat posebej.

Tabela III: Vzorci in število signalov pri DNA-sondah

IME SONDE	KROMOSOMSKO PODROČJE	DIAGNOZA	NORMALEN VZOREC SIGNALOV	VZOREC SIGNALOV PRI SPREMENIBI
BCR/ABL	9q34/22q11.2	KML	2O, 2Z	2O, 1Z, 1F
LSID13S319	13q14.3	DP / KLL	2O	1O ali nič
LSI 13q34	13q34	KLL	2M	1M ali nič
LSI p53	17p13.1	VSI	2O	1O ali več O
CEP 12	12p11q11	KLL	2Z	3Z
LSI ATM	11q22.3	KLL	2Z	1Z

O – oranžni signal M – moder signal

Z – zeleni signal F – fuziran (zliti) signal

3.2.6.2 Delovni postopek

V našem primeru smo na skupno 500 celicah signale šteli trije tehniki. Eden po 300 celic, dva pa naknadno vsak po 100 celic. Signale smo pregledovali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa in jih vrednotili v skladu z navodili proizvajalca. Uporabili smo 4 različne filtre: zelen, oranžen in moder za vsako sondu posebej, ter kombiniran za pregledovanje oranžnih in zelenih signalov hkrati (rumeni signali). Rezultate smo vpisovali na poseben obrazec, ki ga priporoča Vysis za kontrolo kakovosti pri analizi FISH (Priloga 2).

3.2.7 Obdelava rezultatov

Pri računanju mejnih vrednosti za posamezne sonde smo uporabili statistično funkcijo β inverzija (16).

Mejna vrednost smo določili s statistično oceno, z uporabo binomske porazdelitve. Ker podatki niso porazdeljeni v tipično zvonasto (Gaussovo) krivuljo, mejne vrednosti ne morejo temeljiti na izračunih standardne deviacije (SD). Mejne vrednosti smo izračunali s pomočjo programa Microsoft Excel s statistično funkcijo »BETAINV«. Ta funkcija izračuna enostransko zgornjo mejo zaupanja na podlagi natančnega izračuna za binomsko porazdelitev. To lahko naredimo s preverjanjem rezultatov za 20 normalnih vzorcev iste vrste in z identifikacijo vzorca z največjim številom napačnih pozitivnih celic (jeder) za kateri koli vzorec signala. Število lažnih pozitivnih celic, smo vstavili v β inverzno funkcijo za določitev mejne vrednosti za odkrivanje resnično nenormalnih klonov. Za izračun mejnih vrednosti smo izbrali 95% interval zaupanja, pri čemer smo potrebovali število vseh preštetih celic (100 do 500) in število lažno pozitivnih celic s katerimkoli nenormalnim vzorcem signalov (16).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Vsi preparati so bili pripravljeni po standardnem operacijskem postopku za preiskavo FISH, po 72 h gojenju venske krvi za konstitutivni kariotip. Vsi vzorci so bili periferna kri zdravih dajalcev.

Preparate smo vrednotili trije analitiki, tako da smo skupno vrednotili po 500 celic za vsako sondu. Uporabili smo 4 različne barvne filtre na fluorescenčnem mikroskopu. Rezultate smo obdelali s pomočjo statistične funkcije » β inverzija« s pomočjo programa Microsoft Excel.

4.1 Kakovost preparatov

Vse rezultate smo vpisovali v posebne kontrolne liste, ki jih priporoča Vysis za spremljanje kakovosti analize FISH. Podrobni opis kontrolnega lista je naveden v poglavju 3.2.6 (vrednotenje preparatov FISH), primer kontrolnega lista pa je v prilogi (Priloga 2).

»Odličen« preparat ima primerno porazdeljenost celic, ki se ne prekrivajo, signali so lepo vidni na vseh jedrih, njihova intenziteta je močna, ni artefaktov in nespecifične vezave sonde. »Dobri« preparati imajo nekoliko slabše oz. redkejše nanose, več artefaktov in nespecifične vezave sonde, signali so slabše intenzitete, vendar so še vedno ustrezni za štetje/vrednotenje. Celice in signali so še vedno lepo vidni, tako da se ti preparati še smatrajo kot ustrezni za vrednotenje. »Slabih« preparatov ni bilo. Le-ti se izločijo in ne štejejo, vendar je takšnih preparatov malo.

Tako smo pri skupni oceni kakovosti 75 preparatov dobili 63 (84%) odličnih in 12 (16%) dobrih preparatov, kar pomeni, da smo nalogo izvedli na preparatih primerne kakovosti. K deležu »dobrih« preparatov je največ prispevala sonda LSI P53 v Panelu 1 (58,3%).

Na 28 (37,3%) preparatih je bilo nekoliko bolj izraženo ozadje sonde. Predvsem je šlo za nespecifično vezavo sond v okolici jeder in izven »ciljne točke« (slika 11b), ter za razpadla jedra, na katere se veže DapiII (slika 10b). Intenziteta je bila najslabša pri sondi LSI p53. Od skupno 26 preparatov, ki so bili ocenjeni kot »dobri« glede intenzitete signalov, zajema LSI p53 kar 65,4% le-teh. Sledijo mu BCR/ABL (19,2%) ter LSI D13S319 in LSI ATM (15,4%). Pri »Panelih« se je v 65% vseh »dobrih« preparatov pojavila delna slabša intenziteta signalov, predvsem pri sondah LSI p53 in LSI D13S319 (oranžni signali),

medtem, ko smo pri CEP12 in ATM zabeležili precej boljšo intenziteto signalov. Kvaliteta preparatov FISH je številčno povzeta v tabeli IV.

Tabela IV: Kvaliteta preparatov FISH

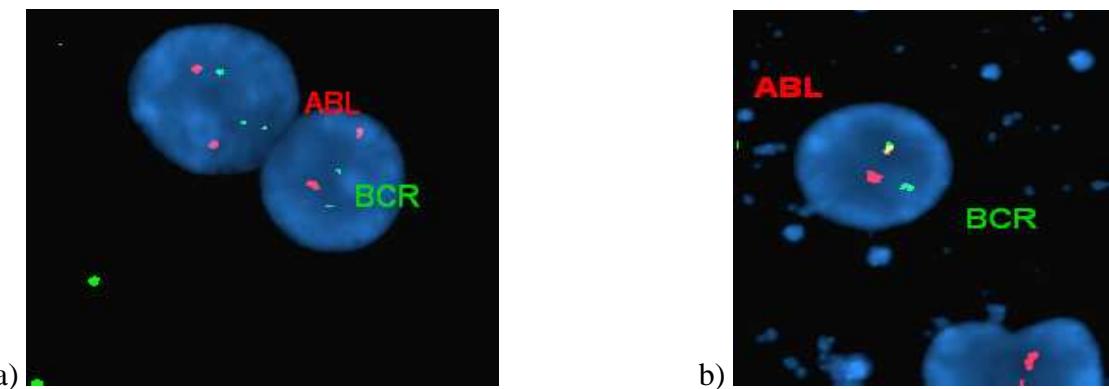
	SONDA	Št. vseh preparatov	INTENZITETA SIG.		OZADJE		CELOTNA KVALIT.	
			ODLIČNI	DOBRI	ODLIČNI	DOBRI	ODLIČNI	DOBRI
Panel 1	LSI p53	25	8	17	14	11	18	7
	LSI ATM		21	4				
Panel 2	LSI D13S319	25	21	4	13	12	22	3
	LSI 13q34		25	0				
	CEP12		25	0				
	BCR/ABL	25	20	5	20	5	23	2

4.2 Določanje mejnih vrednosti

4.2.1 LSI BCR/ABL

Pri omenjeni sondi smo na skupno 25 preparatih 16-ih preiskovancev dobili v povprečju 1,2% abnormalnih signalov in 98,8% normalnih (negativnih) signalov. Najvišji pozitiven rezultat je bil 3,3%, ki pa ga je določil le en tehnik. Odstotke smo za vsako sondu izračunali za vsak preparat posebej glede na število preštetih celic in število dobljenih signalov (Tabela V.)

Pri sondi LSI BCR/ABL ES vidimo pri zdravem preiskovancu dva oranžna signala in dva zelena signala. Pri translokaciji t(9;22) vidimo z uporabo kombiniranega filtra običajno dva oranžna signala, en zelen signal in en zliti – rumen signal, kar potrebuje translokacijo med kromosomoma 9 in 22 (slika 10). Pri naših preparatih nismo zasledili nobenega tipičnega pozitivnega vzorca signalov (1F2O1Z), kar pomeni da je mejna vrednost za tipični signal 0, za atipični, ki se pojavlja pri terminalni deleciji 9q (1F1O1Z) pa smo določili 5 oz 3 (diplomant) takšne signale pri zdravih preiskovancih.



Slika 10: Sonda LSI BCR/ABL za določanje t(9;22). a) normalni vzorec signalov (na jedru levo zgoraj vidimo dodatni zeleni signal, ki pa je artefakt); b) spremenjen vzorec signalov pri translokaciji ali kolokalizaciji signalov

Tabela V: Rezultati vrednotenja preparatov z uporabo DNA sonde BCR/ABL.

BCR/ABL						
ID	število preštetih celic			število pozitivnih atipičnih signalov		
	T1	T2	D	T1	T2	D
3	100	100	300	3	1	5
	100	200	300	2	0	3
4	100	100	300	1	2	9
	100	100	300	0	0	2
5	100	100	300	2	2	0
	100	100	300	2	0	4
6	100	100	300	2	1	2
	100	100	300	0	0	3
7	100	100	300	1	0	10
	100	100	300	1	2	1
8	100	100	300	0	1	7
	100	100	300	3	1	4
9	100	100	300	1	1	4
	100	100	300	0	1	5
10	100	100	300	0	2	6
	100	100	300	1	0	1
11	100	100	300	1	2	4
12	ni št.	200	300	/	2	7
	100	100	300	1	0	4
13	100	100	300	2	1	9
14	100	100	300	2	2	3
15	100	100	300	1	2	4
16	100	100	300	1	2	4
17	100	100	300	1	2	3
18	100	100	300	1	0	1

- (T1, T2, D) – tehnik 1, tehnik 2, diplomant; - atipični signal: 1 zlit, 1 oranžen, 1 zelen

4.2.2 PANEL 1: LSI ATM in LSI p53

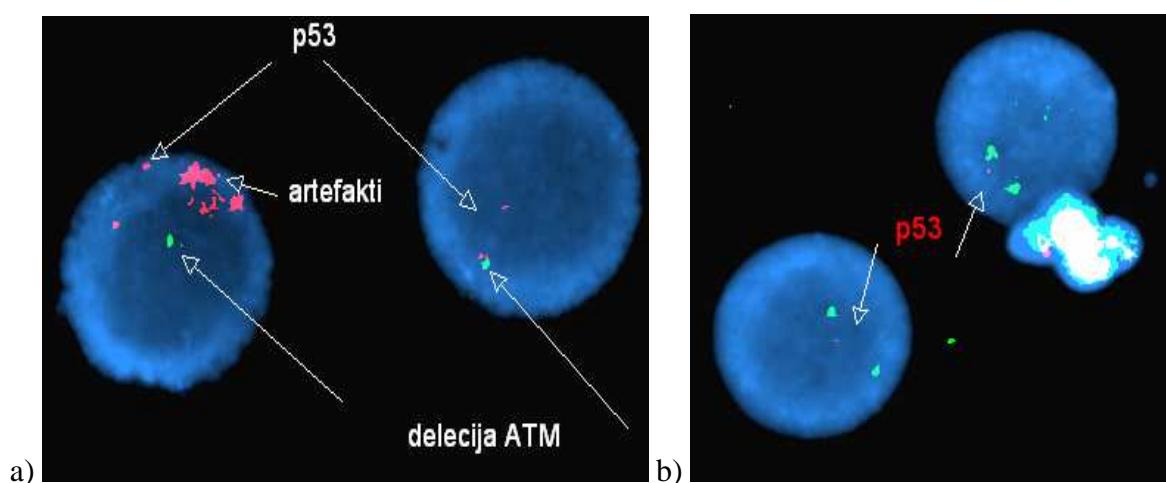
Pri sondi LSI ATM smo na skupno 25 preparatih 18-ih preiskovancev, dobili v povprečju 0,8% celic z enim signalom, 0,3% celic s tremi signali ter 98,9% celic z normalnim vzorcem signalov; – 2 zelena signala. Največji delež celic z enim signalom je bil 3%, s tremi pa 4%.

Pri sondi LSI p53 smo na skupno 25 preparatih 18-ih preiskovancev, dobili v povprečju 1,2 % celic z enim signalom, 0,6 % celic s tremi signali in 98,2 % celic z normalnim vzorcem signalov – dva oranžna signala. Največji delež celic z enim signalom je bil 3,3%, s tremi signali pa kar 6 %. Ker pri omenjenem preparatu z velikim deležem ostala dva analitika nista dobila znatnega odstopanja od normale, sklepamo, da je teh 6% abnormalnih celic posledica subjektivnega vpliva (Tabela VI).

Pri sondi LSI ATM vidimo pri zdravem preiskovancu 2 zelena signala. Pri patološkem vzorcu signalov vidimo na zelenem filtru bodisi 1 ali več kot 2 signala (slika 11a).

Pri sondi LSI p53, pri kateri je štetje najtežje zaradi šibkih signalov, vidimo pri zdravem preiskovancu 2 oranžna signala. Signali niso intenzivni, zato so nekoliko slabše vidni.

Pri patološkem vzorcu signalov vidimo na oranžnem filtru en signal, lahko tudi več kot 2 (slika 11b).



Slika 11: a) Delecija ATM (vidimo en zeleni signal), p53 je negativen (normalen vzorec signalov); b) delecija področja p53 – vidimo en oranžen signal (ATM je negativen).

Tabela VI : Rezultati vrednotenja preparatov z uporabo DNA sond v PANELU 1

				LSI ATM						LSI p53					
ID	število preštetih celic			število pozitivnih atipičnih signalov						število pozitivnih atipičnih signalov					
	T1	T2	D	T1		T2		D		T1		T2		D	
				1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s
1	100	ni št.	500	1	0	/	/	11	2	0	4	/	/	13	3
2	100	ni št.	500	1	0	/	/	11	5	0	2	/	/	13	4
3	100	100	300	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	9	3
	100	100	300	0	4	1	0	2	1	0	1	2	0	3	1
4	100	100	300	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0	3	8
	100	100	300	0	0	1	0	7	1	0	0	0	0	9	1
5	100	100	300	0	0	1	0	5	3	1	0	0	0	3	1
	100	100	300	0	0	0	0	8	0	1	0	0	0	9	5
6	100	100	300	0	0	0	0	0	3	0	4	3	0	6	2
	100	100	300	1	0	0	2	4	0	2	0	0	0	10	0
7	100	100	300	0	0	2	0	3	2	0	1	0	0	7	6
8	100	100	300	2	0	1	0	4	3	1	1	0	0	8	4
9	100	100	300	1	0	1	0	6	1	1	0	2	0	6	1
	100	100	300	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	6	0
10	100	100	300	1	0	3	0	5	0	1	3	2	0	5	4
	100	100	300	0	0	0	1	2	4	3	3	0	0	2	0
11	100	100	300	1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	9	2
12	ni št.	200	300	/	/	1	0	5	1	/	/	1	0	3	2
	100	100	300	0	0	2	0	4	2	1	0	0	0	6	1
13	100	100	300	0	0	2	0	5	1	3	0	0	0	3	3
14	100	100	300	0	3	0	0	2	0	0	0	3	0	5	1
15	100	100	300	0	0	0	0	2	1	0	1	2	0	0	1
16	100	100	300	1	0	1	0	4	2	1	0	2	0	7	0
17	100	100	300	0	1	2	0	1	2	0	0	1	0	6	0
18	100	100	300	1	0	0	0	1	2	0	0	2	0	4	1

- (T1, T2, D) – tehnik 1, tehnik 2, diplomant

- atipični signal: ATM: 1zelen oz 3zeleni, p53: 1oranžen oz 3oranžni

- s – signal

4.2.3 PANEL 2: LSI D13q14.3, LSI D13q34, CEP 12

Pri sondah za delecijo na dolgem kraku kromosoma 13 smo na skupno 25 preparatih 18-ih preiskovancev dobili v povprečju:

- za sondo D13S319 (13q14.3) 1,1 % celic z enim signalom, 0,4 % celic s tremi signali in 98,6 % celic z normalnim vzorcem signalov – dva oranžna signala. Največji delež celic z enim signalom je bil 2,7 %, s tremi signali pa 3 %.

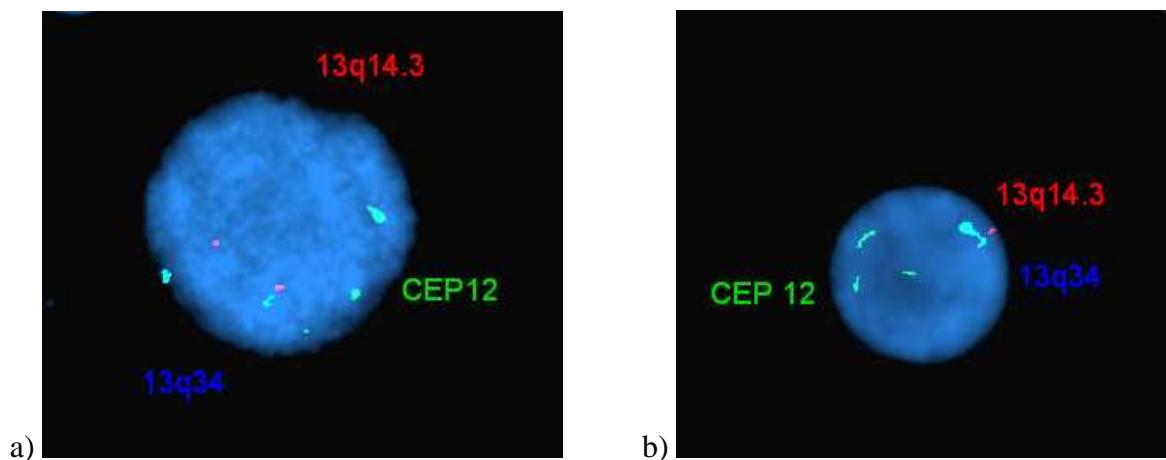
- za sondu D13q34 pa 1,3 % celic z enim signalom, 0,4 % celic s tremi signali in 98,3 % celic z normalnim vzorcem signalov – dva modra signala. Največji delež celic z enim signalom je bil 5 %, s tremi signali pa 4%.

Pri sondi CEP 12 pa smo na skupno 25 preparatih 18-ih preiskovancev dobili v povprečju 2,2 % celic z enim signalom, 0,1% celic s tremi signali in 97,7% celic z normalnim vzorcem signalov – dva zelena signala. Največji delež celic z enim signalom je bil 6%, s tremi signali pa 3% (Tabela VII).

Pri sondi LSI D13q14.3 vidimo pri zdravem preiskovancu 2 oranžna signala.. Pri sondi LSI D13q34 pa vidimo 2 modra signala. Oranžni signali so nekoliko manj intenzivni, ampak še vedno lepo vidni, medtem ko so modri signali bolj intenzivni.

Pri patološkem vzorcu signalov vidimo odsotnost ali prisotnost enega ali več oranžnih oz modrih signalov.

Pri sondi CEP 12 vidimo pri zdravem preiskovancu 2 zelena signala. Patološki vzorec signalov vidimo kot eden oz. več kot dva signala (slika 12).



Slika 12: a) normalno prisotni obe kopiji celotnega kromosoma 13 – dva oranžna in dva modra signala, ter kromosoma 12 – dva zelena signala; b) trisomija 12, delecija področja 13q14.3 in normalen vzorec signalov za področje 13q34.

Tabela VII : Rezultati vrednotenja preparatov z uporabo DNA sonde PANEL 2

			CEP 12						LSI D13S319						LSI 13q34						
ID	št. preštetih celic			št. pozitivnih atipičnih signalov						št. pozitivnih atipičnih signalov						št. pozitivnih atipičnih signalov					
	T1	T2	D	T1		T2		D		T1		T2		D		T1		T2		D	
				1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s	1s	3s
1	100	ni št.	500	3	0	/	/	10	0	1	2	/	/	10	6	0	2	/	/	/	/
2	100	ni št.	500	4	0	/	/	9	2	0	0	/	/	9	9	2	0	/	/	/	/
3	100	100	300	1	0	0	0	9	0	0	0	0	0	6	4	2	0	0	0	/	/
	100	100	300	1	0	2	0	3	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	4	3
4	100	100	300	2	0	2	0	6	0	0	3	1	0	0	3	0	1	3	0	/	/
	100	100	300	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0	2	0	3	0
5	100	100	300	3	0	0	0	3	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	100	100	300	3	0	0	3	6	0	0	0	0	0	3	1	5	0	0	0	1	2
6	100	100	300	6	0	2	0	6	0	0	0	2	0	4	2	2	0	3	0	/	/
	100	100	300	4	0	1	0	7	0	0	0	2	0	4	1	0	1	2	0	2	1
7	100	100	300	3	0	2	0	6	0	0	0	3	0	3	2	1	0	0	0	/	/
8	100	100	300	2	0	1	0	4	1	3	1	1	0	7	1	3	0	0	0	/	/
9	100	100	300	3	0	2	0	4	0	0	2	2	0	5	1	0	3	1	0	/	/
	100	100	300	5	0	0	0	10	0	2	0	1	0	3	0	2	0	2	0	3	0
10	100	100	300	3	0	6	0	4	0	1	0	2	0	4	2	0	2	2	0	/	/
	100	100	300	0	0	2	0	8	1	2	0	1	0	3	0	0	1	0	0	2	0
11	100	100	300	4	0	4	0	4	0	2	0	1	0	4	1	4	2	2	0	/	/
12	ni št.	200	300	/	/	1	0	6	0	/	/	0	0	5	0	/	/	0	0	/	/
	100	100	300	4	0	2	0	3	0	1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	1	1
13	100	100	300	3	0	2	0	7	0	0	2	2	0	8	2	3	0	3	0	/	/
14	100	100	300	6	0	3	0	1	0	0	0	2	0	3	1	2	0	2	0	/	/
15	100	100	300	3	0	3	0	2	0	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	/	/
16	100	100	300	3	0	3	0	4	3	0	0	1	0	4	3	1	0	0	0	/	/
17	100	100	300	1	0	3	0	9	1	0	0	2	0	4	1	1	0	1	0	/	/
18	100	100	300	2	0	5	0	5	0	0	0	0	0	2	1	1	4	0	0	/	/

- (T1, T2, D) – trije različni analitiki

- atipični signali: CEP12: 1Z oz. 3Z, D13S319: 1O oz. 3O, 13q34: 1M oz. 3M

- s – signal

4.3 Izračun mej občutljivosti za izbrane sonde

V tabeli VIII so prikazane mejne vrednosti lažno pozitivnih rezultatov za izbrane sonde, izračunane s statistično funkcijo β inverzija. V programu Microsoft Excel izberemo funkcijo »BETAINV«, v katero vnesemo interval zaupanja, lažno pozitivne celice +1 in število preštetih celic. Lažno pozitivne celice so bile vse, pri katerih je število ali vzorec signalov odstopal od normalnega. Primer: Če pri pregledanih 100 celicah najdemo 5 lažno

pozitivnih, potem je vrednost BETAINV(0,95, 5, 100) 0,085851, kar pomeni 8,59% lažno pozitivnih celic. Tudi v našem primeru smo uporabili interval zaupanja 95%.

Tabela VIII: Izračun mejnih vrednosti iz največjih vrednosti preštetih signalov posameznega tehnika za vsako sondu

Vzorec signalov	Število preštetih celic	Analistik	Mejna vrednost za posamezno sondu (%)					
			LSI ATM	LSI D13S319	LSI 13q34	LSI p53	CEP12	LSI BCR/ABL #
1 signal	100	T1	6,04	7,36	9,75	7,36	10,87	7,36
	100	T2	7,36	7,40	7,36	7,36	10,87	8,59
	300	D	4,64	2,82	2,99	5,41	3,30	5,41
3 signali	100	T1	8,58	7,36	8,59	10,87	0,00	
	100	T2	6,04	6,00	0,00	0,00	7,36	
	300	D	2,99	1,81	2,54	4,64	1,53	

- različen vzorec signalov (1 zliti signal)

V tabeli IX so povzeti rezultati vseh izračunov, skupno za oba tehnika, ki sta preštela vsak po 100 celic in za diplomanta, ki je za vsako sondu preštel 300 celic. Povprečne vrednosti iz tabele VIII. smo zaokrožili, ker pri rutinskem delu potrebujemo kot mejno vrednost celo število, kakor podajamo tudi rezultat.

Tabela IX: Določene mejne vrednosti za testirane sonde

Število preštetih celic	Vzorec signalov	DNA –sonda					
		LSI ATM	LSI D13S319	13q34	LSI P53	CEP12	LSI BCR/ABL
100 celic	1 signal	7	7	9	7	11	8
	3 signali	7	7	4	5	4	
300 celic*	1 signal	5	3	3	5	3	5
	3 signali	3	2	3	5	2	

* - štetje diplomanta

Vrednosti so podane za 1 in za 3 signale pri Panelu 1 in Panelu 2, ter za pozitiven rezultat z enim zlitim signalom pri sondi LSI BCR/ABL. Za vsak vzorec signalov je navedena vrednost za štetje tehnikov (100 celic) in za štetje diplomanta (300 celic).

4.4 Primerjava določenih mejnih vrednosti z deklariranimi vrednostmi proizvajalca

Pri sondah PANELA1, kjer v rutini pri B-KLL iščemo delecijo gena ATM in/ali delecijo gena p53, je v našem primeru bolj pomemben rezultat, ki smo ga dobili za 1 signal (delecija). Prav tako za področje 13q14.3 in 13q34 v Panelu 2. S sondo CEP 12 določamo trisomijo kromosoma 12 in je zato pomembnejši rezultat, ki smo ga dobili za 3 signale. Število jeder z enim signalom je praviloma večje, kot je celic s tremi signali.

Vsaki sondi je priložen certifikat o analizi, ki jih poda proizvajalec in vsebuje podatke o zgornjih in spodnjih mejnih vrednostih za posamezne sonde ter številko serije (»lot«) in sledljivost komponent, informacija o testiranju sonde in deklaracija o kakovosti. Primeri certifikatov sond, ki smo jih uporabili pri našem delu, so v prilogi 4 in 5. Proizvajalec za sondi BCR/ABL navaja, da pri preštetih 200 jedrih pri preparatu venske krvi zdravega dajalca, ni lažno pozitivnih rezultatov, za preparate kostnega mozga pa rezultati niso podani (priloga 5).

Za Panely 1 in 2 pa podatki o rezultatih štetja niso navedeni (Priloga 4). Nekatere sonde, ki so zajete v Panelih, uporabljam tudi kot posamezne, le-te pa imajo svoje certifikate (priloga 6). Tako za sondi LSI p53 proizvajalec na certifikatu navaja, da pri 200 preštetih celicah lahko obstaja 0,33 celic (0,17%) z enim samim signalom in 1,33 celic (0,67%) s tremi signali (priloga 6c). Za sondi LSI D13S319 je 0,67 celic (0,34%) z enim signalom in 0,67 celic (0,34%) s tremi signali (priloga 6b). Pri sondi CEP 12 pa proizvajalec za normalne vzorce venske krvi navaja vrednosti 2,24% za en signal in 0,36% za 3 signale (priloga 6a).

4.5 Ponovljivost rezultatov

Naključno smo izbrali nekaj vzorcev, na katerih smo ponovili analizo FISH z isto DNAsondo. Izkazalo se je, da do bistvenih sprememb in odstopanj ni prišlo pri nobeni sondi. Čeprav je kar nekaj vrednosti nad določeno mejo občutljivosti tako pri prvi, kot pri drugi ponovitvi. Rezultati za posamezne vzorce, na katerih smo analizo FISH izvedli dvakrat, so prikazani v tabeli X.

Tabela X: Ponovljivost rezultatov

sonda	vzorec (ID)	1 signal		3 signali	
		ponovitev (povp. %)		ponovitev (povp. %)	
		1.	2.	1.	2.
ATM	3	0,2	0,6	0,1	1,4
	4	0	1,1	0,3	0,1
	5	0,9	0,9	0,3	0
	6	0	0,8	0,3	0,7
	9	1,3	0,9	0,1	0
	10	1,9	0,2	0	0,8
p53	3	1,3	1	1	0,4
	4	0,3	1	2,9	0,1
	5	0,7	1,3	0,1	0,6
	6	1,7	1,8	1,6	0
	9	1,7	0,7	0,1	0
	10	1,6	1,2	1,4	1
CEP12	3	1,3	1,3	0	0
	4	2	0,8	0	0
	5	1,3	1,7	0	1
	6	3,3	2,4	0	0
	9	2,1	2,8	0	0
	10	3,4	1,6	0	0,1
D13q14.3	3	0,7	0,7	0,4	0,2
	4	0,3	1,2	1,3	0
	5	1,2	0,5	0,2	0,2
	6	1,1	1,3	0,2	0,2
	9	1,2	1,5	0,8	0
	10	1,4	1,5	0,2	0
D13q34	3	1	1,3	0	1
	4	1,5	1,7	0,5	0
	5	0	2	0	0,7
	6	2,5	1,3	0	0,7
	9	0,5	2,3	1,5	0
	10	1	0,7	1	0,3

vzorec (ID)		pozitivni signal	
		1.ponov.(%)	2.ponov.(%)
BCR/ABL	3	1,9	1
	4	2	0,2
	5	1,3	1,1
	6	1,2	0,3
	7	1,4	1,1
	8	1,1	1,8
	9	1,1	0,9
	10	1,3	0,4

Za vrednotenje ponovljivosti metode sta dve meritvi premalo. Analizo FISH smo z isto sondno na istem preiskovancu izvedli dvakrat zgolj za informacijo o primerljivosti rezultatov posamezne sonde, za primer bistvenega odstopanja med meritvami, vendar pa število podatkov ne zadošča za statistično vrednotenje.

4.6 Skupne ugotovitve

Pri naši nalogi smo uporabljali vzorce venske krvi zdravih preiskovancev. Vensko kri smo gojili po protokolu za konstitutivni kariotip. Fiksirane celice smo hranili v zamrzovalniku in jih nato uporabili za analizo FISH.

Celice smo nanašali pri relativni zračni vlagi 50%, ki naj bi bila najprimernejša za nanose. Vlažnost lahko le delno reguliramo (uparevanje, klimatske naprave), se pa v prostoru hitro spreminja. Pred nanosom smo uravnali koncentracijo celic, tako da se na steklu niso prekrivale. Če je bil vzorec preredek, smo nanesli dvakrat, spiranje oz dodajanje svežega fiksativa, pa ni bilo potrebno pri nobenem vzorcu. Celice so bile puhaste (niso svetile), prisotnih je bilo tudi precej mitoz. Pri nanosih nismo imeli večjih težav, ker je šlo za vzorce gojenih celic venske krvi povsem zdravih preiskovancev. Patološko spremenjene celice, ki jih gojimo iz kostnega mozga, se po kakovosti velikokrat medsebojno precej razlikujejo.

Nanašanje sond, hibridizacija in spiranje preparatov po hibridizaciji je v celoti potekalo po predpisanim protokolu za analizo FISH. Preparate smo do štetja shranjevali v zamrzovalniku. Štetje signalov je potekalo izmenično s tremi analitiki, brez posebnega vrstnega reda. Osvetljevanje preparatov vpliva na intenziteto signalov in ta se z vsakim

naslednjim vrednotenjem preparata, manjša. Tako smo vsi analitiki imeli v povprečju enake pogoje, kar se tiče intenzitete signalov. Omeniti velja tudi, da neizkušen analitik porabi za štetje 100 celic bistveno več časa, kot izkušen analitik. Ravno zaradi tega smo preparate šteli izmenično.

Pri rezultatih analize FISH (tako pri naši nalogi, kot pri rutinskem delu) moramo upoštevati, da je v vseh fazah postopka prisoten vpliv človeškega faktorja. Priprava vzorcev poteka v celoti ročno, prav tako štetje signalov pod mikroskopom. Avtomatizirana je le kodenaturacija vzorca in sonde ter hibridizacija, ki potekata v hibridizatorju. Predvsem pri štetju signalov lahko prihaja do manjših ali večjih odstopanj. Pri manjših odstopanjih potrdimo rezultat tako, da prešteje signale še tretja oseba, če pa so odstopanja večja, analizo ponovimo. Naši preparati so bili zelo dobre kakovosti, zato lahko napake, ki bi bile posledica slabih nanosov ali neuspešne hibridizacije, izključimo.

Proizvajalec sond (Vysis) ponuja lastne kontrolne preparate na podlagi katerih tudi navaja smernice za kontrolo kakovosti in postopke za uspešno analizo FISH. Te smernice so odlično začetno izhodišče za vzpostavitev kvalitetnih laboratorijskih postopkov pri uporabi CEP® oz LSI® FISH-sond.

Pri naši nalogi smo skupno ovrednotili 75 nanosov vzorcev in ugotovili, da so bili v splošnem preparati zelo dobre kakovosti (Priloga 3). S samimi vzorci nismo imeli težav, celice so bile ustrezno gojene, nanosi dovolj gosti in celice niso svetile. Vse to vpliva na kasnejšo hibridizacijo, ki pa je pri naših vzorcih potekala zelo uspešno. Pri vrednotenju preparatov smo se zgledovali po kriterijih, ki jih navaja prizvajalec, in tudi mi smo uporabili tristopenjsko ocenjevanje preparatov (slabo, dobro, odlično). Ocenili smo intenziteto signalov za posamezne sonde, ozadje nanosa in celokupno kakovost preparatov. Pri slednjem smo upoštevali celoten mikroskopski izgled preparata, ki zajema nanos celic, hibridizacijo sonde in tudi možnost štetja signalov.

V literaturi (12) so mejne vrednosti za napačno pozitivne vrednosti določali na 5-ih vzorcih kostnega mozga širje tehniki, na preštetih 200 celicah. Podali so vrednosti s tremi standardnimi deviacijami (SD). Podatki so starejšega datuma (2005), uporabljeni sonde pa se razlikujejo od naših. Zato smo se odločili, da bomo za izračun mejnih vrednosti uporabili statistično funkcijo β inverzija, ki jo za tovrstne izračune priporoča novejša literatura eksplisitno za validacijo DNA-sond za področje hematologije (16).

Za vse preizkušane sonde smo določili mejne vrednosti, ki so višje, kot zagotavlja proizvajalec, se pa dobro skladajo s tistimi, ki jih navaja literatura (16). Izkazalo se je, da

so te večje pri manjšem številu preštetih celic, zato bi bilo v prihodnje najprimernejše validirati sonde s štetjem 200 celic, kolikor je običajno število vrednotenih celic. Smiselno bi bilo tudi ponoviti poskuse še na patoloških vzorcih, za katere vemo, da izbrana citogenetska sprememba ni prisotna. Preparati venske krvi zdravih preiskovancev, gojene po protokolu za konstitutivni kariotip, so v povprečju namreč lepši in ustreznejši za štetje kot preparati kostnega mozga preiskovancev s hematološko boleznjijo, zato je verjetno, da so mejne vrednosti za kostni mozeg večje.

Ponovljivost štetja med posameznimi tehniki je bila zadovoljiva.

5 SKLEPI

Sklepi naše naloge so:

- Z metodo β -inverzije, smo določili mejne vrednosti za 6 DNA-sond. Mejne vrednosti znašajo za sondi LSI ATM pri preštetih 100 celicah 7% in pri 300 celicah 5%, iste vrednosti smo dobili pri sondi LSI p53. Za sondi LSI D13S319 smo pri preštetih 100 celicah določili mejno vrednost 7%, pri 300 celicah pa 3%, pri sondi 13q34 so bile vrednosti pri 100 preštetih celicah 9%, pri 300 celicah pa prav tako 3%. Pri sondi CEP12, kjer določamo trisomijo, znašajo mejne vrednosti pri 100 preštetih celicah 4%, pri 300 pa 2%. Za sondi LSI BCR/ABL smo določili 8% pri 100 preštetih celicah in pri 300 celicah 5%, oboje za atypični signal. Pri omenjeni sondi tipičnih lažno pozitivnih signalov nismo zasledili pri nobenem vzorcu.
- Mejne vrednosti so večje kot jih navaja proizvajalec za nekatere DNA-sonde, saj zatrjuje, da lažno pozitivnih celic ni.

6 LITERATURA

1. Rautenstrauß BW, Liehr T (Eds.): *FISH Technology*, Springer Lab Manual, Berlin, 2001, 1: 3-41
2. Roulston D, Le Beau MM, Cytogenetic Analysis of hematologic Malignant Diseases. V: The AGT cytogenetics Laboratory Manual, *Molecular Cytogenetics: Definitions, Clinical Aspects and Protocols* Eds.:Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, Lippincott-raven, Philadelphia, 1997, str. 19-31, 325-372, 557-571.
3. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T, Podgornik H, Preložnik Zupan I, Pretnar J, Zver S: Bolezni krvi in krvotvornih organov, V: *Interna medicina* (Uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D); Littera picta, Ljubljana 2005, 1261-1265
4. Podgornik H, Pajič T, Kokalj-Vokač N, Zagorac A, Rupreht R, Černelč P: *Citogenetične in molekularnogenetične preiskave pri ugotavljanju kronične mieloične levkemije in spremeljanju zdravljenja*, Zdravniški vestnik, Ljubljana 2004; 73: Suppl. I: 13-7
5. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy Jr JD, Stewart AK, Avet-Loiseau H: *Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report*, Cancer Research, 2004, 1546-1558
6. <http://www.mostgene.org>, november 2008
7. Cytogenetics Guidelines and Quality Assurance, *A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations*, E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society; 2005, 17,21,22,25-30.
8. Bratož S: *Nadzor nad kakovostjo na področju obravnave laboratorijskih rezultatov*, Knjiga povzetkov, 3. kongres hematološkega društva laboratorijskih tehnikov, Podčetrtek, april 2008
9. Bijec N: *FISH preiskava na odtisnjencih kostnega mozga*, diplomska naloga, Ljubljana 2007
10. National pathology accreditation advisory council: *Guidelines for cytogenetic laboratories*, Australia, 2001

11. Association for Clinical Cytogenetics; Haemato-oncology best practice guidelines, *Professional guidelines for clinical cytogenetics*, British Society for Human Genetics, Clinical Genetics Unit, Birmingham Women's Hospital, Birmingham,,March 2007, v1.01, 3-12.
12. Harrison, Christine J.; Moorman, Anthony V.; Barber, Kerry E.; Broadfield, Zoë J.; Cheung, Kan L.; Harris, Rachel L.; Jalali, G. Reza; Robinson, Hazel M.; Strefford, Jonathan C.; Stewart, Adam; Wright, Sarah; Griffiths, Mike; Ross, Fiona M.; Harewood, Louise,; Martineau, Mary: *Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study*, 2005 Blackwell Publishing Ltd, British Journal of Haematology, 129, 520-530
13. <http://www.genome.gov/>, november 2008
14. Choo KHA: *Methods in Molecular Biology*, vol. 33: *In situ hybridization Protocols*, Humana Press Inc., New York, 1994, 45-66
15. <http://www.vysis.com/>, december 2008
16. Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 9, No. 2, April 2007, American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology DOI: 10.2353/jmoldx.2007.060128 : Guidance for Fluorescence in Situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders, 134-142.
17. Sreekantaiah C: FISH panels for hematologic malignancies, Clinical Cytogenetics, Dianin Systems, Stratford, CT (USA), June 2007, Cytogenetic and Genome research 118: 284-296 (2007)
18. <http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html> (junij,julij 2009)
19. osebna komunikacija – izr. prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.

7 PRILOGE

Priloga 1: Odpravljanje težav pri analizi FISH (Vysis)

TEŽAVA	MOŽEN VZROK	MOŽNA REŠITEV
Poškodovana morfologija kromosomov	Vzorci so šli prehitro skozi raztopine	Povečamo temperaturo vodne kopeli (zvečamo relativno vlago) med nanašanjem vzorcev na stekla
		Zmanjšamo temperaturo grelne plošče.
		Sušimo stekla vsaj čez noč pri sobni temperaturi in jih nato staramo najmanj 24 ur pri sobni temperaturi.
		Ne staramo stekel pri visoki temperaturi.
	Preparati niso dovolj temeljito posušeni pred denaturacijo	Pred denaturacijo preparate segrejemo na 45-50°C ali jih dehidriramo po eno minuto v seriji alkoholov (70%, 85%, 100%).
	Preparati so preveč »sveži« pred denaturacijo	Staramo preparate najmanj 24 ur pri sobni temperaturi
Močno ozadje in artefakti	Stekla pred nanosom niso dovolj čista	Pred nanosi pomočimo stekla v EtOH in jih obrišemo s celulozno vato.
	celični drobci v preparatu, metafaze vsebujejo citoplazmo	Speremo celice v svežem fiksativu in ponovno nanesemo vzorce Podaljšamo čas denaturacije na 10 minut
	Nezadostno sprani preparati po denaturaciji	Poskrbimo da so spiralne raztopine pripravljene po priloženih navodilih.
		Poskrbimo da sta pH vrednost in temperatura spiralnih tekočin ustrezna. Odstranimo krovna stekla in ponovimo spiranje.
	Spiralne raztopine so predolgo v uporabi ali so nepravilno shranjene	Vse spiralne raztopine po 1 dnevu zavrzemo
	Hibridizirane preparate pregledujemo z napačnim filterom.	Izberemo ustrezni filter
Šibki signali ali jih sploh ni	Preparati niso zadostno denaturirani	Zvišamo temperaturo denaturacije raztopine na 74°C
		Podaljšamo čas denaturacije na 2-4 minute.
	Preparati niso ustrezno pripravljeni za FISH	Preverimo pri Vysis-ovi tehnični službi protokole za pripravo prepartov za analizo FISH.
	Preparati so nepravilno starani po nanosih vzorca na stekla	Staramo preparte 24 ur na sobni temperaturi pred izvedbo FISH (ali jih damo v 2XSSC za 2 min na 73°C).
	Preparati niso temeljito posušeni pred denaturacijo	Pred denaturacijo segrejemo stekla na 45-50°C ali jih dehidriramo po eno minuto v seriji alkoholov (70%, 85%, 100%).
	Sonda ni dodana	Pripravimo novo hibridizacijsko mešanico. Sonda mora biti popolnoma odtaljena dobro premešamo reagente; na kratko odcentrifugiramo. Sondo pipetiramo počasi
	Sonda, hibridizacijski pufer ali celotna hibridizacijska mešanica pred uporabo niso bili dobro premešani.	Reagente dobro premešamo (vortex) in na kratko centrifugiramo

	Hibridizacijska mešanica je zasušena na preparatu	Takojo po nanosu sonde postavimo krovno steklo na označeno polje, kamor smo nanesli sondu.
		Pred spiranjem odstranimo krovno steklo le z enega preparata naenkrat in takoj pomočimo preparat v spiralno tekočino, še preden odstranimo krovno steklo z naslednjega preparata.
	Sonda je nepravilno redčena za hibridizacijo	Preverimo, če je razmerje sestavin v hibridizacijski mešanici pravilno. (7 µL hibridizacijskega pufera: 1 µL sonde: 2 µL redestilirane H ₂ O).
		Poskrbimo da so pipete kalibrirane. Hibridizacijski pufer mora biti popolnoma odtaljen in na sobni temperaturi. Pipetiramo počasi
	Sonda ni nanešena na tarčno mesto pravočasno, takoj po denaturaciji	Sondo nanesemo takoj, ko preparat odstranimo iz 100% alkohola. EtOH mora popolnoma izhlapeti iz vzorca pred nanosom sonde.
		Skozi cel postopek ohranjamo predpisano temperaturo in čas posamezne stopnje postopka.
	Zračni mehurčki so bili med postopkom ujeti pod krovna stekla	Spustimo krovno steklo takoj - ob prvem dotiku s kapljico hibridizacijske mešanice.
		Steklo položimo na celulozno vato (pivnik) in nežno iztisnemo vidne zračne mehurčke.
	Neustrezni pogoji hibridizacije	Temperatura in čas hibridizacije morata biti spremljana. Dobro zatesnimo krovno steklo z gumijastim cementom. Podaljšamo čas hibridizacije.
	Nepravilni pogoji spiranja ali napačne raztopine	Poskrbimo da so spiralne raztopine pripravljene po priloženih navodilih. Poskrbimo da je temperatura raztopin pravilna (predpisana) in jo ves čas spremljamo.
		Poskrbimo da so termometri in pH metri pravilno kalibrirani.
		Odstranimo krovno steklo preden potopimo preparate v spiralno raztopino
	Sonde in vzorci so bili nepravilno shranjeni	Nerazredčene sonde shranjujemo na temp. -20°C, zaščitene pred svetlobo. Nehibridizirane preparate shranjujemo na temperaturi -20°C ali manj za daljše obdobje ali na sobni temperaturi za krajše obdobje. Hibridizirane preparate shranjujemo na -20°C ali manj, zaščitene pred svetlobo največ 6 mesecev.
	Uporabljeno napačno jedrno barvilo. Jedrno barvilo je presvetlo.	Odstranimo krovno steklo. Pomočimo stekla za 5min v 2X SSC/0.1% NP-40 pri sobni temperaturi; dehidriramo preparate v seriji alkoholov za 1 min(70%, 85%, 100%). Posušimo na zraku in ponovno pipetiramo jedrno barvilo.
	Za analiziranje prepartatov FISH pod fluorescenčnim mikroskopom, uporabljen neprimeren nabor filterov	Kombinirani filtri prepuščajo manj svetlobe kot enojni filtri, zato izgledajo signali šibkejši pri uporabi kombiniranih filterov.
		Uporabimo pravilen filter za posamezno sondu oz fluorofor, ki ga vsebuje. Kontaktiramo Vysis-ovo tehnično službo za nadaljnje informacije.

	Nastavitev mikroskopa in objektivov niso primerne za pregled preparatov FISH, ali so poškodovani filtri.	Kontaktiramo proizvajalca mikroskopa.
Nizka specifičnost signalov	Sonde so neprimerno razredčene, pogosto preveč sonde v preparatu.	Poskrbimo, da je sonda pripravljena po postopku, navedenem v priloženih navodilih.
	Neprimerni pogoji hibridizacije	Temperatura hibridizatorja mora biti 37°C
	Temperatura spiralnih raztopin je prenizka.	Ohranjamo temperaturo spiralnih tekočin, v kiveto ne nalagamo več kot 4 preparate naenkrat in preverimo ustreznost temperature preden spiramo naslednjo serijo preparatov.
	Prenizka učinkovitost spiralne raztopine	Poskrbimo, da so spiralne raztopine pripravljene po priloženih navodilih.
Presvetlo ali prešibko jedrno barvilo	Preparati niso bili zadostno dehidrirani pred nanašanjem jedrnega barvila ali so prisotne oljne kapljice. Nepravilna koncentracija jedrnega barvila.	Odstranimo krovno steklo. Pomočimo stekla za 5min v 2X SSC/0.1% NP-40 pri sobni temperaturi; dehidriramo preparate v seriji alkoholov za 1 min(70%, 85%, 100%). Posušimo na zraku in ponovno pipetiramo jedrno barvilo
	Opomba: DAPI I jedrno barvilo je osemkrat bolj koncentrirano kot jedrno barvilo DAPI II.	Če je jedrno barvilo presvetlo, ga razredčimo v antifade raztopini preden ga nanašamo.
	DAPI II je prestar ali je bil za dlje časa izpostavljen svetlobi	DAPI II shranjujemo pri -20°C zaščiten pred svetlogo. Poskrbimo, da ga ne uporabljamo po izteku roka uporabnosti.

*Priloga 2: Kontrolni obrazec za spremljanje kakovosti pri analizi FISH.
(SlidePrepDocumentation) (15)*

Suggested documentation format for slide preparation and *in situ* hybridization quality control.

1. Rate each slide preparation according to adequacy for *in situ* hybridization.

Slide ID #	Poor	Good	Excellent	Evaluate Yes or No

2. Rate each target for *in situ* hybridization quality. Ratings; Poor, Good, Excellent.

Target / Slide ID#	Signal Intensity	Specificity	Background Noise	Overall Quality*

*Targets./slides receiving a poor overall quality evaluation should not be used for enumeration analysis.

2. Signal enumeration documentation:

Sample ID	Probe
Lamp watt hours	Filter Set Used

Target / Slide ID#	# nuclei counted	# nuclei w/ 1 signal	# nuclei w/ 2 signals	# nuclei w/ 3 signals	> 3 signals

Priloga 3: Kvaliteta preparatov FISH

ID	SONDA	Intenziteta signala	Ozadje	Celotna kvaliteta
1	ATM/P53	O/D	D	D
	CEP12/D13	O/D	O	O
2	ATM/P53	O/D	D	D
	CEP12/D13	O	D	O
3	ATM/p53	O	D	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
	ATM/p53	D/D(slabši)	D	D
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
4	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O/D	O	O
	BCR/ABL	D	D	D
	ATM/p53	O	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
5	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O/D	O	O
	BCR/ABL	O	D	O
	ATM/p53	D/D (artefakti)	D	D
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
6	ATM/p53	O/D	D	D
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
7	ATM/p53	D	D	D
	CEP12/D13	O	D	D
	BCR/ABL	D	D	D (malo celic)
	BCR/ABL	O	O	O (malo celic)
8	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O/D	D	D
	BCR/ABL	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O

9	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	D	O
	ATM/p53	O	D	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	D	O
10	ATM/p53	D/D (posut)	D	D
	CEP12/D13	O	D	D
	BCR/ABL	D	O	O
	ATM/p53	O	D	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	D	O	O
11	ATM/p53	O	O	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
12	ATM/p53	O	O	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
	ATM/p53	O	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
13	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
14	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O
15	ATM/p53	O	D	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
16	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
17	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	O	O
	BCR/ABL	O	O	O
18	ATM/p53	O/D	O	O
	CEP12/D13	O	D	O
	BCR/ABL	O	O	O

O – odličen

D – dober

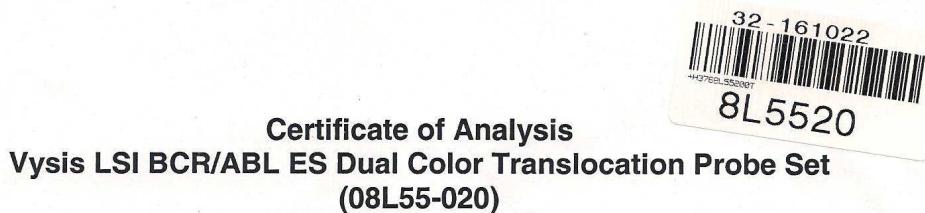
S – slab

Kriteriji so povzeti po »Vysis-u

Priloga 4: Certifikat o analizi za sondi Panel1 in Panel 2

		 8L5320 32-161025 +H3768L53200R								
<p style="text-align: center;">Certificate of Analysis Vysis LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multi-Color Probe Sets (08L53-020)</p>										
<p>Section 1: Lot Information and Component Traceability</p> <table border="1"><thead><tr><th>Part</th><th>Description</th><th>Lot</th><th>Expiration Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>32-161025</td><td>Vysis LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multi-Color Probe Sets</td><td>405142</td><td>04/13/09</td></tr></tbody></table>			Part	Description	Lot	Expiration Date	32-161025	Vysis LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multi-Color Probe Sets	405142	04/13/09
Part	Description	Lot	Expiration Date							
32-161025	Vysis LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multi-Color Probe Sets	405142	04/13/09							
<p>Section 2: Lot Testing Information</p> <table border="1"><tr><td>QP</td><td>Test Date</td><td>Probe 1 Lot</td><td>Probe 2 Lot</td></tr><tr><td>32-193000-300</td><td>04/18/07</td><td>403241</td><td>404745</td></tr></table>			QP	Test Date	Probe 1 Lot	Probe 2 Lot	32-193000-300	04/18/07	403241	404745
QP	Test Date	Probe 1 Lot	Probe 2 Lot							
32-193000-300	04/18/07	403241	404745							
<p>Product Description – Quality Declaration</p> <p>Refer to Package Insert for product description and intended use.</p>										
Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018		AM10-01-F252/R001								

Priloga 5: Certifikat o analizi za sondu BCR/ABL



**Certificate of Analysis
Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe Set
(08L55-020)**

Section 1: Lot Information and Component Traceability

Part	Description	Lot	Expiration Date
32-161022	Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe Set	402944	10-19-08

QP	Test Date	Probe Lot	LSI/WCP Hybridization Lot
30-190099-300	10-23-06	79632	401542

Section 2: Lot Testing Information

Counting Data for 200 nuclei	Negative - Peripheral Blood		Positive - Cell Line/Bone Marrow	
	# of cells-Positive	# of cells-Negative	# of cells-Positive	# of cells-Negative
	0.00	200.00	N/A	N/A

Product Description – Quality Declaration

Refer to Package Insert for product description and intended use.

Priloga 6: Primeri certifikatov za posamezne sonde; a) CEP 12, b) LSI D13S319, c) LSI p53

a)

Values Among Normal Peripheral Blood Specimens

FISH interphase analysis was performed on peripheral blood specimens from 30 normal subjects, at one pilot study site. Each specimen was enumerated for the percentage of cells with 1, 2, 3, and ≥ 4 signals. The signal distribution for this study population is summarized in Table 2.

Table 2
Distribution of Percentage of Cells With CEP 12 Signals
in 30 Normal Peripheral Blood Specimens

	Percentage of cells with:				
	0 signal	1 signal	2 signals	3 signals	≥ 4 signals
Mean	a	2.24	97.39	0.36	0.01
SD	a	1.29	1.29	0.26	0.03

^adata not collected

b)

Certificate of Analysis Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange Probe (01N34-020)

Section 1: Lot Information and Component Traceability

Part	Description	Lot	Expiration Date
32-160045	Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange Probe	405905	6-15-09

QP	Test Date	Probe Lot	LSI/WCP Hybridization Lot
QP-30-190045	8-13-07	405394	404383

Section 2: Lot Testing Information

	# cells, 0 dots	# cells, 1 dot	# cells, 2 dots	# cells, 3 dots	# cells, >3 dots
Counting Data for 200 nuclei	0.00	0.67	198.67	0.67	0.00

Product Description – Quality Declaration

Refer to Package Insert for product description and intended use.

c)

32 - 162008					
					
4H376SL64200T					
8L6420					
Certificate of Analysis					
Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe					
(08L64-020)					
Section 1: Lot Information and Component Traceability					
Part	Description	Lot	Expiration Date		
32-162008	Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe	401807	10-06-2008		
QP	Test Date	Probe Lot	LSI/WCP Hybridization Lot		
30-190000-300	01-10-2007	400741	400814		
Section 2: Lot Testing Information					
	# cells, 0 dots	# cells, 1 dot	# cells, 2 dots	# cells, 3 dots	# cells, >3 dots
Counting Data for 200 nuclei	0.00	0.33	198.33	1.33	0.00
Product Description – Quality Declaration					
Refer to Package Insert for product description and intended use.					