

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELZA OSTERMAN

**STIMULACIJA MALIGNIH LIMFOCITOV B V GOJIŠČU Z
12-O-TETRADEKANOIL-FORBOL-13-ACETATOM**

**STIMULATION OF MALIGNANT B LYMPHOCYTES IN
MEDIUM WITH 12-O-TETRADECANOYL-PHORBOL-13-
ACETATE**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž..

Eksperimentalni del diplomske naloge sem v celoti opravila v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Urošu Mlakarju, dr. med., ki mi je omogočil opravljati diplomsko nalogo pod njegovim mentorstvom.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., ki me je ves čas vodila skozi eksperimentalni del diplomske naloge.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v laboratoriju za citogenetiko, ki so mi vedno prihiteli na pomoč in mi s svojimi obsežnimi delovnimi izkušnjami pomagali odgovoriti na marsikatero vprašanje.

Nenazadnje pa se moram zahvaliti tudi moji družini, fantu in najbližjim prijateljem, ki so me ves čas podpirali in mi trdno stali ob strani.

Izjava

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

Ljubljana, december 2010

Elza Osterman

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Član diplomske komisije: asist. dr. Janez Mravljak

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM KRATIC, OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	V
SEZNAM SLIK	VI
SEZNAM PREGLEDNIC	VIII
1 UVOD	1
1.1 BIOLOŠKI VZORCI ZA CITOGENETSKE PREISKAVE	2
1.2 STANDARDNA CITOGENETSKA PREISKAVA	2
1.2.1 DELITEV CELICE IN NJENE FAZE	3
1.2.2 GOJENJE CELIČNIH KULTUR	6
1.2.3 VREDNOTENJE USPEŠNOSTI GOJENJA CELIC	9
1.3 FLUORESCENČNA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA (FISH)	10
1.3.1 DNA-SONDE ZA PREISKAVO FISH.....	11
1.4 KRONIČNA LIMFATIČNA LEVKEMIJA (KLL)	13
1.5 12-O-TETRADEKANOIL-FORBOL-13-ACETAT	16
2 NAMEN DELA.....	18
3 EKSPERIMENTALNI DEL	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.1.1 OSNOVNE KEMIKALIJE, TOPILA, REAGENTI IN RAZTOPINE.....	19
3.1.2 VZORCI KOSTNEGA MOZGA.....	23
3.2 LABORATORIJSKE APARATURE.....	25
3.3 LABORATORIJSKI PRIBOR	25
3.4 METODE DELA	27
3.4.1 POTEK DELA POD STERILNIMI POGOJI (ASEPTIČNA TEHNIKA DELA).....	27
3.4.2 ODVZEM VZORCA KOSTNEGA MOZGA IN PRENOS V LABORATORIJ.....	27
3.4.3 PRIPRAVA VZORCA ZA GOJENJE	28
3.4.4 GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA	29
3.4.5 ODVZEM KULTURE, PRENOS V HIPOTONIČNO RAZTOPINO IN FIKSACIJA CELIC.....	30
3.4.6 NANOS NA STEKLA.....	31

3.4.7 BARVANJE OBJEKTNIH STEKEL Z GIEMSO IN TRIPSINOM (GTG PROGANJE).....	32
3.4.8 DOLOČANJE MITOTSKEGA INDEKSA	33
3.4.9 SLIKANJE MITOZ ZA OCENO MORFOLOGIJE KROMOSOMOV	33
3.4.10 POSTOPEK PREISKAVE FLUORESCENČNE <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJE (FISH)	35
3.4.11 STATISTIČNA ANALIZA.....	38
4 REZULTATI	39
4.1 DOBLJENE VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV	39
4.2 OCENA MORFOLOGIJE KROMOSOMOV	41
4.3 DOLOČITEV VELIKOSTI MALIGNEGA KLONA S PREISKAVO FISH... 43	
4.3.1 PRIMERJAVA REZULTATOV PRI VSEH UPORABLJENIH DNA-SONDAH	44
4.3.2 PRIMERJAVA REZULTATOV PRI SPECIFIČNIH KROMOSOMSKIH PREUREDITVAH.....	45
4.4 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE	47
4.4.1 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE MITOTSKIH INDEKSOV	47
4.4.2 STATISTIČNE ANALIZE PODATKOV PREISKAVE FISH ZA VSE OPAZOVANE KROMOSOMSKE PREUREDITVE	48
4.4.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV PREISKAVE FISH ZA POSAMEZNE OPAZOVANE KROMOSOMSKE PREUREDITVE	49
5 RAZPRAVA	51
5.1 VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV	51
5.2 REZULTATI OCENE MORFOLOGIJE KROMOSOMOV	52
5.3 OBSEG MALIGNEGA KLONA	52
5.3.1 OBSEG MALIGNEGA KLONA PRI VSEH UPORABLJENIH DNA-SONDAH	52
5.3.2 OBSEG MALIGNEGA KLONA PRI SPECIFIČNIH PREUREDITVAH.....	53
5.4 ZAKLJUČEK	54
6 SKLEPI	56
7 VIRI IN LITERATURA	57

POVZETEK

Kljub velikemu napredku v sodobni citogenetski diagnostiki, standardna citogenetska preiskava pri kronični limfatični levkemiji (KLL) še vedno ostaja težavna. Za rakaste celice je sicer značilno, da se tudi v gojišču hitro delijo, kar pa ne velja za limfocite B pri KLL. Zato smo predvsem v namen zvečanja mitotskega indeksa in morebitnega zvečanja deleža preurejenih celic pri kronični limfatični levkemiji, preizkusili reagent 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (TPA), ki naj bi pospešil delitev limfocitov B.

Glavni namen našega dela je bila primerjava mitotskih indeksov po običajnem gojenju celic in po gojenju celic ob dodatku TPA. Preverjali in primerjali smo tudi, kako dodatek TPA vpliva na morfologijo kromosomov v obeh gojiščih ter njegov vpliv na delež pozitivnih (malignih) celic z določeno kromosomsko preureditvijo v obeh gojiščih s pomočjo fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH).

V raziskavo smo vključili 30 vzorcev kostnega mozga bolnikov s KLL. Vzorce smo nacepili na testna gojišča, jih kratkotrajno gojili in nato celice izolirali. Izolirane celice smo nanесли na objektna stekla ter jih GTG-progali (G-proge-tripsin-Giemsa) za standardno citogenetsko preiskavo. Za primerjavo deleža malignih celic s specifično kromosomsko preureditvijo smo izvedli preiskavo FISH z uporabo specifične DNA-sonde.

Ugotovili smo, da se je pri standardni citogenetski preiskavi – torej določanju mitotskih indeksov – bolje izkazalo običajno gojišče. To nam je potrdila tudi statistična analiza z dvostranskim Wilcoxonovim testom predznačenih rangov ($p < 0,05$). Običajno gojišče se je bolje izkazalo tudi pri oceni morfologije kromosomov. Pri določanju deleža malignih celic s preiskavo FISH, kjer smo določili odstotek pozitivnih (malignih) celic, pa se je kar v 70,8 % pokazal večji obseg klona v gojišču z dodatkom TPA. Razlika je tudi statistično značilna ($p < 0,05$). Statistično smo lahko pri posameznih kromosomskih preureditvah obdelali le rezultate za delecijo del(13)(q14), določano z DNA-sondo ON DLEU ($N > 6$), kjer pa se je izkazalo, da ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$), kar pomeni, da sta gojišči med seboj enakovredni. Pri kromosomski spremembi del(17)(p13) (DNA-sonda ON p53) ni bilo opazne razlike med gojiščema, medtem ko smo pri del(11)(q22) (ON ATM) in trisomiji 12 (ON GLI) lahko opazili veliko razliko v prid gojišču z dodatkom TPA.

ABSTRACT

Despite a great progress in modern cytogenetic diagnostics, conventional cytogenetic analysis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) remains difficult. Cancer cells tend to divide rapidly even in the growth medium while terminally differentiated B lymphocytes in CLL do not. To increase the mitotic index (MI) of B lymphocytes in samples obtained from CLL patients, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) was added into the growth medium.

The main purpose of our work was to compare the mitotic index in routinely used growth medium with the MI of cells grown with the addition of TPA. We also tested how addition of TPA affects the morphology of chromosomes as well as its impact on the proportion of positive (malignant) cells with a specific chromosomal abnormality applying fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

30 bone marrow samples of CLL patients were tested. Samples were harvested after short-term cultivation. GTG banding (G-band-trypsin-Giemsa) was used for MI determination and evaluation of chromosome morphology. The proportion of malignant clones with specific chromosomal abnormality was determined by the FISH analysis using a specific DNA probe.

Routinely used growth medium was found to give higher MIs. This was confirmed by a statistical analysis made by using the 2-tailed Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$). The same growth medium has proved to be better also in the evaluation of the chromosomes' morphology. In contrast, the proportion of malignant cells, which we determined with the FISH analysis, was higher in the growth medium containing TPA in 70,8% of the samples. This difference is also statistically significant ($p < 0.05$). Statistical analysis for the specific rearrangement was possible only for deletion del(13)(q14), performed by the DNA probe ON DLEU ($N > 6$). It was shown to be statistically non-significant ($p > 0.05$), which means that both mediums are equivalent. In deletion (11)(q22) (ON ATM) and trisomy 12 (ON GLI), we observed a difference in favor of the medium with the addition of TPA.

SEZNAM KRATIC, OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ALL	akutna limfatična levkemija
AML	akutna mieloična levkemija
ATM	gen <i>ATM</i> (angl. <i>ataxia telangiectasia mutated</i>), kromosomsko področje 11q22
CSF	kolonije spodbujajoči faktor (angl. <i>colony stimulating factor</i>)
DAPI	4,6-diamino-2-fenildiol
DLEU	gen na kromosomskem področju 13q14
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FBS	fetalni telečji serum (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
GLI	gen na kromosomskem področju 12q13
ID	identifikacijska številka biološkega vzorca
KLL	kronična limfatična levkemija
KM	kostni mozeg
KMB	rastni medij <i>Bone Marrow Karyotyping MediumTM</i> (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael)
KML	kronična mieloična levkemija
KMM	rastni medij <i>MarrowMaxTM Bone Marrow Medium</i> (GIBCO, Invitrogen, Velika Britanija)
MI	mitotski indeks
TP53	gen <i>TP53</i> , kromosomsko področje 17p13
PBS	raztopina soli v fosfatnem pufru (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PKC	protein kinaza C
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	merska enota za število obratov na minuto (angl. <i>revolutions per minute</i>)
RPMI 1640	rastni medij <i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640TM</i> (GIBCO, Invitrogen, Velika Britanija)
TPA	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat

SEZNAM SLIK

SLIKA 1: A) 1000-KRATNA POVEČAVA CELICE V METAFAZI CELIČNE DELITVE, OBARVANA Z GIEMSO IN TRIPSINOM (GTG PROGANJE); B) ŽENSKI KARIOGRAM. (SLIKANO S POMOČJO SVETLOBNEGA MIKROSKOPA OLYMPUS BX41).	3
SLIKA 2: SHEMA CELIČNEGA CIKLA (8).	4
SLIKA 3: SHEMA FAZ CELIČNE DELITVE OZIROMA MITOZE (9).	5
SLIKA 4: RASTNI MEDIJI ZA GOJENJE CELIČNIH KULTUR.	8
SLIKA 5: PREISKAVA FISH V METAFAZI MITOZE (A) IN NA INTERFAZNIH JEDRIH (B). UPORABLJENA JE DNA-SONDA POSEIDON ON ATM / GLI, KI ZAZNA DELECIJO GENA ATM (11Q22) (RDEČI SIGNALI) IN TRISOMIJO 12 (ZELENI SIGNALI).....	10
SLIKA 6: SONDA POSEIDON ON DLEU / P53 ZAZNA PODROČJA NA KROMOSOMU 13 IN 17 (14).	12
SLIKA 7: SONDA POSEIDON ON ATM / GLI ZAZNA PODROČJA NA KROMOSOMU 11 IN 12 (15).	12
SLIKA 8: KOPIČENJE MALIGNIH LIMFOCITOV B V KRVI PRI KLL (20).	13
SLIKA 9: KROMOSOMSKA PODROČJA, KJER NAJPOGOSTEJE PRIHAJA DO SPREMEMB PRI KLL (21).	15
SLIKA 10: KEMIJSKA STRUKTURA 12-O-TETRADEKANOIL-FORBOL-13-ACETATA (23).	16
SLIKA 11: NEKAJ KEMIKALIJ, TOPIL, REAGENTOV IN RAZTOPIN, KI SMO JIH UPORABLJALI ZA RAZISKOVALNO DELO.	23
SLIKA 12: NEKAJ LABORATORIJSKEGA PRIBORA, KI SMO GA UPORABLJALI ZA RAZISKOVALNO DELO.....	26
SLIKA 13: A) PREMALO TRIPSINIZIRANI KROMOSOMI – TEMNI IN BREZ VIDNIH PROG; B) PREVEČ TRIPSINIZIRANI KROMOSOMI – SVETLI IN PUHASTI (11).....	32
SLIKA 14: SHEMA POSTOPKA STANDARDNE CITOGENETSKE PREISKAVE (29).....	34
SLIKA 15: PRIMER, KAKO SO VIDNI SIGNALI PRI DELECIJI GENA ATM IN TRISOMIJI 12 (A) (SONDA ON ATM / GLI) (ID VZORCA BI), TER DELECIJI DEL(13) IN GENA TP53 (B) (SONDA ON DLEU /P53) (ID VZORCA DV).....	37
SLIKA 16: PRAVILA ZA ŠTETJE CELIC OZIROMA JEDER PRI PREISKAVI FISH.....	37
SLIKA 17: PRIMERJAVA MITOTSKIH INDEKSOV PO GOJENJU CELIC KOSTNEGA MOZGA V GOJIŠČU KMM IN TPA.....	41
SLIKA 18: PRIMER DOBREGA PROGANJA IN RAZPOREDITVE KROMOSOMOV (KMM), TER DOBREGA PROGANJA IN SLABE RAZPOREDITVE KROMOSOMOV (TPA) (ID VZORCA: RB).	41
SLIKA 19: PRIMERJAVA OCENE MORFOLOGIJE KROMOSOMOV V GOJIŠČU KMM IN TPA GLEDE NA PROGANJE (A) IN RAZPOREDITEV KROMOSOMOV (B).	42

SLIKA 20: PRIMERJAVA VELIKOSTI KLONA, DOLOČENO S FISH PREISKAVO, PO GOJENJU CELIC KOSTNEGA MOZGA V GOJIŠČIH KMM IN TPA, NE GLEDE NA KROMOSOMSKE SPREMEMBE.	44
SLIKA 21: PRIMERJAVA DELEŽA CELIC Z DELECIJO DEL(13) PO GOJENJU V GOJIŠČIH TPA IN KMM.	45
SLIKA 22: PRIMERJAVA DELEŽA CELIC S TRISOMIJO 12 PO GOJENJU V GOJIŠČIH TPA IN KMM.	46
SLIKA 23: PRIMERJAVA DELEŽA CELIC Z DELECIJO GENOV <i>TP53</i> (A) IN <i>ATM</i> (B).	46
SLIKA 24: KVARTILNI DIAGRAMI PORAZDELITVE VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV V GOJIŠČU KMM IN TPA.	48
SLIKA 25: KVARTILNI DIAGRAMI PORAZDELITVE DELEŽA POZITIVNIH CELIC V GOJIŠČIH KMM IN TPA, NE GLEDE NA KROMOSOMSKE PREUREDITVE.	49
SLIKA 26: KVARTILNI DIAGRAMI PORAZDELITVE VREDNOSTI POZITIVNIH CELIC GLEDE NA SPECIFIČNO KROMOSOMSKO PREUREDITEV. SLIKA PRIKAZUJE RAZLIKE PO GOJENJU CELIC KOSTNEGA MOZGA V GOJIŠČU KMM IN TPA ZA VSAKO KROMOSOMSKO SPREMEMBO POSEBEJ.	50

SEZNAM PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: PODATKI BOLNIKOV.	24
PREGLEDNICA 2: VRSTE GOJIŠČ, KI JIH POTREBUJEMO ZA RAZISKOVALNO DELO IN NJIHOVE SESTAVINE.	29
PREGLEDNICA 3: MITOTSKI INDEKSI (MI) GLEDE NA UPORABLJENO GOJIŠČE.	40
PREGLEDNICA 4: REZULTATI OCENE MORFOLOGIJE KROMOSOMOV.	42
PREGLEDNICA 5: DELEŽ CELIC S TARČNO PREUREDITVIJO, DOLOČENO S FISH PREISKAVO, V DVEH GOJIŠČIH.	43
PREGLEDNICA 6: PORAZDELITEV VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV. PRIMERJAVA PARAMETROV STATISTIČNE ANALIZE V GOJIŠČU KMM IN GOJIŠČU TPA.	47
PREGLEDNICA 7: PORAZDELITEV PARAMETROV STATISTIČNE ANALIZE DOLOČENIH DELEŽEV POZITIVNIH CELIC V GOJIŠČIH KMM IN TPA, NE GLEDE NA KROMOSOMSKE SPREMEMBE.	48

1 UVOD

Razvoj genetike se je začel že davnega leta 1842 z odkritjem kromosomov pri rastlinah, ki mu je 40 let kasneje sledilo še odkritje kromosomov pri delitvi živalske celice (1). V začetku 20. stoletja so odkrili, da so kromosomi nosilci genskih lastnosti (genov), Levitsky prvi opredeli besedo kariotip, ključno vprašanje, s katerim so se ukvarjali več let, pa je ostajalo: koliko kromosomov vsebujejo diploidne človeške celice? Leta 1931 so s preučevanjem kromosomov koruze prišli tudi do ugotovitve, da je citološka rekombinacija (preureditev) določenih kromosomov povezana z rekombinacijo genskih lastnosti (1, 2).

Moderna citogenetika se je tako pričela leta 1956, ko sta Tjio in Levan odkrila, da normalna človeška celica vsebuje 46 kromosomov. To odkritje je bilo rezultat nove tehnike priprave preparatov z uporabo hipotonične raztopine, ki povzroči nabrekanje celic in primerno razporeditev kromosomov za lažje štetje. Pred tem so namreč mislili, da ima človek 48 kromosomov. Zaradi lažjega štetja kromosomov so v naslednjih letih prišli do odkritja sindromov in bolezni, povezanih s številčnimi kromosomskimi spremembami. Odkrili so sindrome, povezane s spremenjenim številom kromosomov: Downov (+21), Turnerjev (45,X), Klinefelterjev (47,XXY), Patau-jev (+13) in Edwardov (+18). Leta 1960 so pri kronični mieloični levkemiji (KML) kot ponavljajoč vzrok odkrili majhen kromosom, ki so ga poimenovali kromosom Philadelphia. 13 let pozneje se je izkazalo, da gre za translokacijo med kromosomoma 9 in 22: t(9;22) (2).

V poznih 60. letih je Caspersson razvil tehniko proganja. To omogoči razlikovanje kromosomov ne le glede na velikost in lego centromere, pač pa tudi na različno obarvanje krakov (pokažejo se proge), omogoči pa tudi prepoznavanje strukturnih sprememb, translokacij, inverzij ter delecij. Uvede se diagram identifikacije kromosomov, ki ga imenujemo kariogram oziroma idiogram. Leta 1980 se razvoj moderne citogenetike nadaljuje kot molekularna citogenetika, pri kateri je dosežen velik napredek z odkritjem tehnike, imenovane fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) (1, 2).

Zaradi sorazmerno dobre dostopnosti in homogenosti vzorcev krvi in kostnega mozga (KM) so se zgoraj naštete citogenetske preiskave pridobljenih kromosomskih preureditev najbolj uveljavile prav na področju hematologije (3).

1.1 BIOLOŠKI VZORCI ZA CITOGENETSKE PREISKAVE

Za kariotipizacijo, kjer je potrebno celice kratkotrajno gojiti, kot izhodiščni biološki vzorec lahko uporabimo aspirat KM, vzorec venske krvi ali pa biopsijski stebriček. Kariotipizacija je najuspešnejša pri aspiratu KM (4).

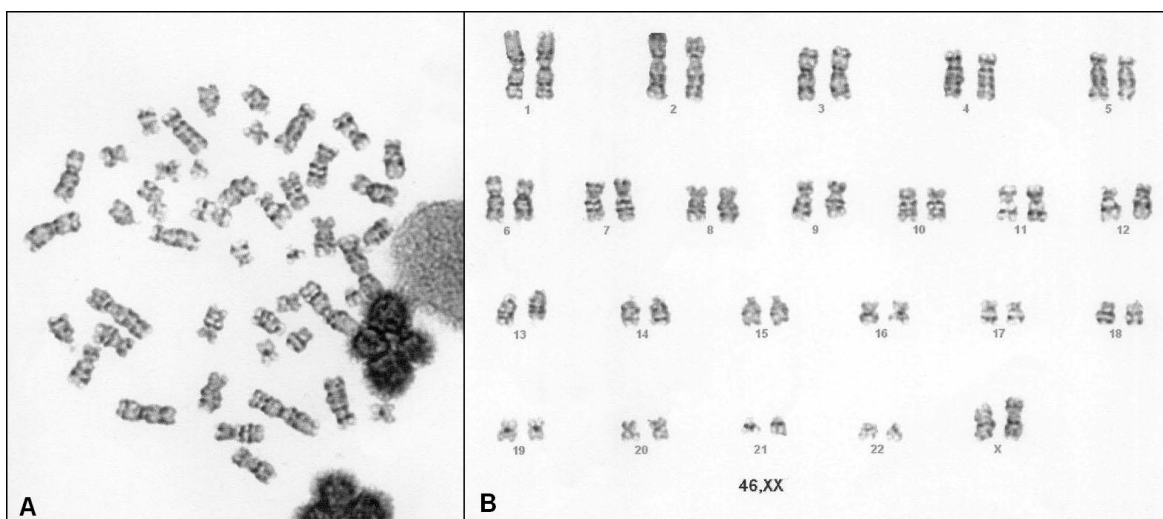
Aspirat KM je suspenzija celic KM, ki jo pridobimo s postopkom imenovanim punkcija, kjer se z vbodom tanke igle v predelu zadnjega črevničnega trna odvzame material za nadaljnje diagnostične postopke in terapevtske namene. Včasih se zgodi, da je punkcija »suha« (vsebuje premalo celic KM), zato v takem primeru odvezamo biopsijski stebriček. Dobimo ga s postopkom biopsije, v katerem s posebno iglo malo večjega premera izvrtamo delček ploščate kosti, iz katere lahko sprostimo celice KM (5).

1.2 STANDARDNA CITOGENETSKA PREISKAVA

To je osnovna preiskava, s katero določamo morebitno prisotnost kromosomskih sprememb v metafazi celične delitve pri gojenih vzorcih KM in venske krvi. Omogoča razlikovanje kromosomskih preureditev, ki so večje od 4×10^6 baznih parov (bp). Kromosome se uredi v kariogram ali idiogram (slika 1). V njem je urejeno diploidno število kromosomov (22 parov somatskih in 1 par spolnih kromosomov, vseh skupaj je 46) glede na padajočo velikost, lego centromere in obarvanost posameznih prog na krakih kromosomov. Pove nam tudi število kromosomov v celici (6).

Ugotovimo lahko torej dve vrsti kromosomskih sprememb (7):

- ◆ **številčne kromosomske spremembe**, spremembe števila kromosomov, npr:
 - monosomija – samo 45 kromosomov, kot prirojena ta sprememba ni združljiva z življenjem, je pa pogosta pri malignih boleznih (-5,-7,...)
 - trisomija – 47 kromosomov v telesnih celicah (npr. pri Downovem sindromu), tudi pogosta pri krvnih boleznih (+8, +21,..)
- ◆ **strukturne kromosomske preureditve**, kjer gre za spremembo v zgradbi:
 - translokacija – medsebojno se izmenjata dela dveh kromosomov (uravnotežena)
 - delecija – manjka del kromosoma
 - inverzija – del kromosoma se prelomi, obrne za 180° in spremeni vrstni red genov
 - duplikacija – del kromosoma se podvoji



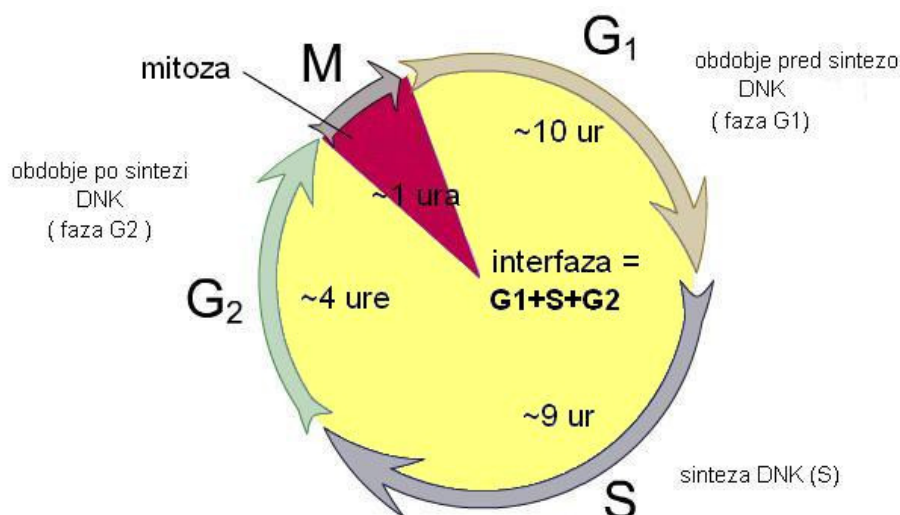
Slika 1: A) 1000-kratna povečava celice v metafazi celične delitve, obarvana z Giemso in tripsinom (GTG proganje); B) ženski kariogram. (Slikano s pomočjo svetlobnega mikroskopa Olympus BX41).

Kljub temu, da so jo odkrili že pred nekaj desetletji, ostaja kariotipizacija še vedno temeljna, preprosta in učinkovita preiskava, ki omogoča vpogled v genom. Pomembna je za postavitev diagnoze, izbiro terapije, določitev velikosti malignega kлона, napoved prognoze, potrditev remisije in ugotovitev ponovitve bolezni – torej je pomembna v vseh obdobjih bolezni (3).

Za izvedbo standardne citogenetske preiskave je celice nujno potrebno spraviti v metafazo celične delitve. To dosežemo z gojenjem celic KM ali venske krvi v ustreznih celičnih kulturah.

1.2.1 Delitev celice in njene faze

V življenju celice ločimo interfazo, ko je celica v mirovanju, in obdobje delitve ali faze M, ki sestoji iz delitve jedra (mitoza) in delitve citoplazme (citokineza). Kolikokrat se bo določena celica delila in koliko časa bo delitev potekala, je odvisno od vsake celice posebej. Celični cikel (slika 2) ponavadi traja približno 18-24 ur, ključno pa je, da se dedne informacije materinske celice v vsakem ciklu podvojijo in nato enakomerno razdelijo na dve hčerinski celici (8).



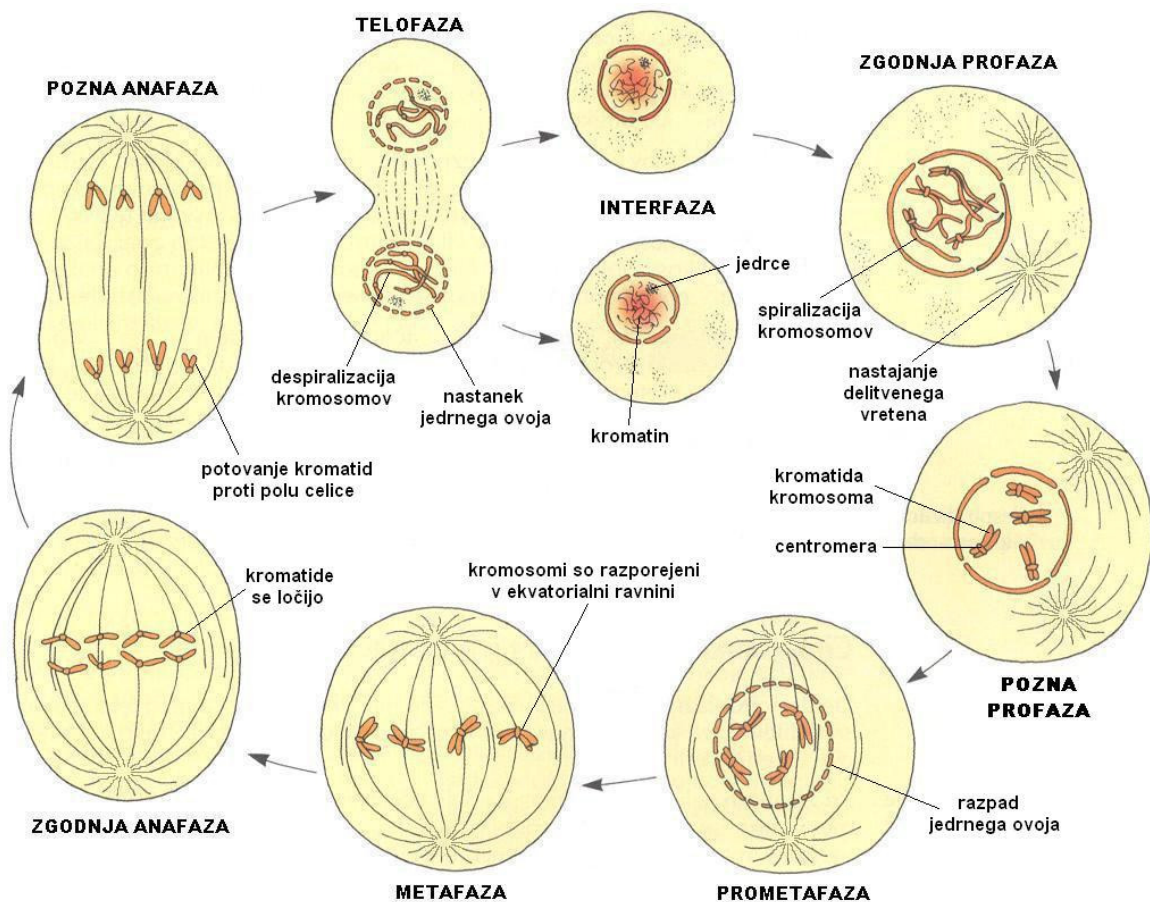
Slika 2: Shema celičnega cikla (8).

Pri interfazi, obdobju celice med dvema zaporednima delitvama, ločimo faze G1, S in G2. V **fazi G1**, obdobju od konca mitoze do začetka podvajanja dednega zapisa, poteka intenzivna sinteza snovi, ki gradijo celico. Sledi ji **faza S**, kjer se dedni zapis podvoji (poteče podvojitev DNK, da iz ene kromatide nastaneta dve sestrski kromatidi). V **fazi G2**, obdobju od končanega podvajanja dednega zapisa do začetka mitoze, se celica začne pripravljati na delitev (8, 9).

Delitev jedra oziroma mitoza (slika 3) poteka v več zaporednih fazah. V **profazi** se iz dolgih, tankih nitk kromatina začnejo oblikovati kromosomi, ki se v procesu spiralizacije (večkratno zaporedno zvijanje) krajšajo in debelijo. Vsak kromosom je zgrajen iz dveh enakih kromatid, ki ju povezuje centromera. V citoplazmi začne nastajati delitveno vreteno iz mikrotubulov, ki se podaljšujejo proti nasprotnemu polu celice. V **prometafazi** jedrni ovoj razpade, zato se lahko niti delitvenega vretena podaljšajo do kromosomov in se pritrdijo v predelu centromer. Na vsak kromosom se vežeta dva mikrotubula in vsak je iz nasprotnega pola, zato se kromosomi začnejo razvrščati proti ekvatorialni ravnini. V **metafazi** so kromosomi poravnani v ekvatorialni ravnini – so tudi najkrajši in najdebelejši, zato so v tej fazi najbolj primerni za preučevanje oblike in števila (npr. sestavljanje kariograma). V **anafazi** se kromatidi končno ločita in tako se vsak dvokromatidni kromosom razdeli na dva enokromatidna kromosoma. Niti delitvenega vretena nato vsako ločeno kromatido potegnejo proti nasprotnem polu. Zadnjo fazo mitoze predstavlja še **telofaza**, ki se začne, ko so enokromatidni kromosomi na nasprotnih polih. Ta faza poteka

obratno od profaze, saj delitveno vreteno postopno izgine, okrog skupine kromosomov na vsakem polu pa se začne ustvarjati jedrni ovoj. Kromosomi se začnejo razvijati in s tem postajajo vse daljši in tanjši (pretvorba v kromatin). Znotraj jedra se izoblikuje tudi jedrce (9).

Proti koncu anafaze se začne tudi **delitev citoplazme (citokineza)**. Celična membrana se začne v predelu ekvatorialne ravnine ugrezati proti središču, dokler hčerinski celici nista popolnoma ločeni. Ko je končana delitev jedra, se konča tudi delitev citoplazme (9).



Slika 3: Shema faz celične delitve oziroma mitoze (9).

1.2.2 Gojenje celičnih kultur

Gojenje celičnih kultur je proces, kjer se celice gojijo pod nadzorovanimi pogoji. Izraz »celična kultura« pomeni gojenje celic, ki so odvzete iz večceličnih organizmov (rastlinske in živalske celice). Gojenje živalskih celičnih kultur je šele okoli leta 1950 postala običajna laboratorijska tehnika, čeprav začetki segajo že v 19. stoletje (10).

Celice lahko gojimo v **suspenzijskih kulturah** ali pa v **adherentnih kulturah**. Celice kostnega mozga in krvi, ki že po naravi živijo v tekočini in niso nikamor pritrjene, gojimo v suspenzijskih kulturah, za katere se uporablja tekoče rastne medije. V adherentnih kulturah pa gojimo celice, ki so po naravi pritrjene na površino (celice čvrstih tkiv). Tu se za gojenje celic uporablja trdno podlago (steklo, plastične ploščice), ki je ponavadi prevlečena s sestavinami zunajceličnega matriksa. Matriks pospeši pritrnitev celic na podlago ter s tem njihovo rast in razmnoževanje (10).

Najpogosteje se za gojenje celic uporabljajo plastične posodice s pokrovčki in rastno površino 25 cm², obstajajo pa tudi površine 12 – 500 cm². Gojenje celic lahko izvedemo tudi v Petrijevih posodah, sterilnih 15 mL centrifugirkah in ploščicah z vdolbinicami (11).

1.2.2.1 Splošne zahteve za gojenje celičnih kultur

Gojenje celic *in vitro* zahteva dobro uravnotežene in stabilne dejavnike okolja, zlasti glede osnovnih parametrov, kot so pH, temperatura in vzdrževanje sterilnih pogojev. Od teh in še nekaterih drugih parametrov je namreč odvisna uspešnost gojenja (11).

- ❖ **pH vrednost:** Najustreznejše pH območje za celične kulture je od 7,2 do 7,4. Rahlega odstopanja pH ali povišanja nad 8,0 celice ne prenašajo dobro, medtem ko je padec pH vrednosti pod 7,0 vzrok za ustavitev celične delitve. pH vrednost uravnavajo različne kombinacije pufrov in plinov (CO₂, O₂).
- ❖ **Temperatura:** Za gojenje človeških celičnih kultur je najustreznejša temperatura med 37,0 in 37,5°C, ki jo uravnavajo posebni inkubatorji. Nihanje temperature ne sme biti večje od 0,25°C. Zvišanje temperature lahko pospeši delitev celic, vendar le do temperaturne meje, ki še ni smrtonosna, medtem ko znižanje temperature zmanjša celični metabolizem, kar pa nima škodljivih učinkov na celično kulturo.

- ❖ **Vzdrževanje sterilnih pogojev:** Celice v kulturi nimajo imunskega sistema za premagovanje okužb kot celice *in vivo*. Tako so poleg dodajanja antibiotikov v rastne medije potrebne tudi aseptične tehnike dela, zato delo s celičnimi kulturami poteka v laminariju z vgrajenim pretočnim filtrom zraka, ki sproti odstranjuje prašne delce, kateri bi lahko kontaminirali celično kulturo.
- ❖ **Čas:** Celice lahko gojimo kratkotrajno (24 ur) ali pa dolgotrajno (nekaj dni ali tednov).
- ❖ **Pufri za vzdrževanje pH vrednosti:** Za nevtralizacijo kislosti odpadnih produktov uporabljamo bikarbonatni pufer v ravnotežju s 5% CO₂ atmosfero ali pa organske pufre (HEPES, TRICIN), ki ne potrebujejo posebnega zunanjšega dotoka plinov.
- ❖ **Vlažnost:** Optimalno je, če je vlažnost od 90 do 95%, saj se s tem zaradi izgube vode izognemo spremembam v ionski koncentraciji.

1.2.2.2 Osnovne sestavine rastnih medijev

Rastni medij (oziroma gojišče) za gojenje celičnih kultur mora imeti uravnoteženo sestavo kljub vsem mogočim dodanim snovem, ki jih zahtevajo različne vrste celic. Vsak rastni medij vsebuje raztopino soli in ogljikove hidrate kot vir energije. Pri prehranskih potrebah in dodatkih pa upoštevamo, da so razlike med različnimi celicami organov in tkiv, glede na dolžino gojenja celičnih kultur, namen gojenja in zatiranje neželenih vrst celic (11). Na tržišču nam je zato na voljo ogromna izbira različnih rastnih medijev. Med pomembnimi dodatki velja omeniti (11):

- ❖ **Serum:** Rastnim medijem se doda v zelo minimalnih koncentracijah ali pa v koncentracijah do 25% sestave medija. V citogenetiki se uporablja fetalni goveji serum (FBS), serum novorojenega teleta, telečji serum, ter avtologni ali homologni človeški serum. Vsebuje različne snovi, med drugim rastne faktorje in hormone.
- ❖ **Biološko aktivne snovi:** Sem prištevamo različne vitamine, esencialne in neesencialne aminokisliline, hormone, encime in maščobne kisline, ki so dodane rastnim medijem.
- ❖ **L-glutamin:** Spada med neesencialne aminokisliline in je pomembno hranilo, saj služi kot vir energije. Je tudi zelo nestabilen dodatek rastnim medijem, saj ob neprimernem

shranjevanju hidrolizira v amoniak (kopičenje strupenih presnovkov) in glutaminsko kislino, kar spremeni pH vrednost gojišča.

- ❖ **Antibiotiki:** Najpogosteje se kot dodatek rastnim medijem uporablja penicilin G in streptomycin ali pa kombinacija obeh. Dodajajo se transportnim gojiščem in primarnim kulturam, da se prepreči oziroma nadzoruje kontaminacijo vzorca z mikrobi.
- ❖ **Antimikotiki:** Dodajajo se z namenom preprečitve rasti plesni in gliv. Rastnim medijem se dodaja predvsem amfotericin B in nistatin.
- ❖ **Fenol rdeče:** Pogosto je dodan rastnim medijem kot pH indikator – v ustreznem pH območju (7,2 – 7,4) je rdeče-oranžne barve, v alkalnem območju ($\text{pH} > 8$) rožnate barve in v kislem območju ($\text{pH} < 6,8$) rumene barve.
- ❖ **Ostale sestavine:** Rastnim medijem so dodane še nekatere druge snovi, kot so recimo peptoni, proteinski hidrolizati in ekstrakt kvasa.



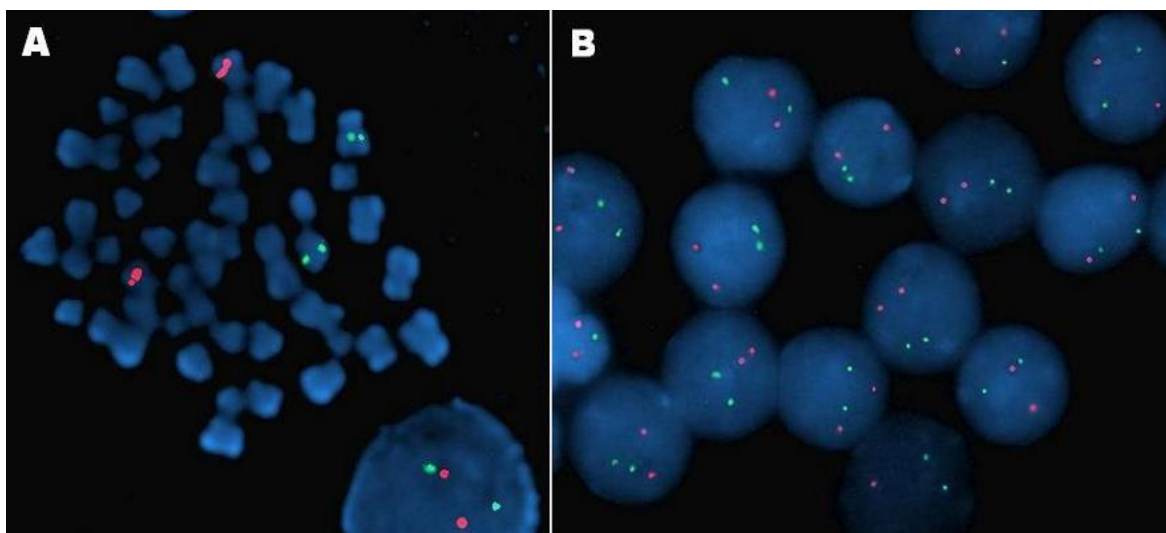
Slika 4: Rastni mediji za gojenje celičnih kultur.

1.2.3 Vrednotenje uspešnosti gojenja celic

- ❖ **Mitotski indeks (MI):** Uporablja se za oceno stopnje celične proliferacije. Opredelimo ga kot razmerje med številom celic v fazi mitoze (celice z vidnimi kromosomi) in celotnim številom celic (12). Glede na število prešteti celic, ga lahko izrazimo v odstotkih (%) ali v promilih (‰).
- ❖ **Ocena morfologije kromosomov:** Ocenjuje se morfologija proganih kromosomov. Najpogosteje se uporablja barvanje s pomočjo Giemse in tripsina (GTG barvanje). Resolucija proganja se podaja v številu prog na haploidno število kromosomov (400-850). Pri citogenetski analizi kostnega mozga se navadno uporablja manjše število prog zaradi siceršnje slabše morfologije kromosomov. Morfologijo ocenjujemo kvalitativno. Značilno je, da imajo kromosomi normalnih celic boljšo morfologijo od patoloških celic.
- ❖ **Obseg malignega kлона:** Je delež celic s specifično kromosomsko preureditvijo. Lahko ga določamo s standardno citogenetsko analizo glede na celotno število analiziranih metafaz (vsaj 20) ali s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH) s pregledom 200 interfaznih jeder. Ponavadi ga izrazimo v odstotkih (%).

1.3 FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA (FISH)

Velika prednost preiskave FISH (slika 5) v primerjavi s kariotipizacijo je v tem, da zanjo ne potrebujemo metafaz, ampak lahko uporabimo interfazne celice – poznati moramo le tarčne gene, ki so značilno vpleteni pri določeni bolezni. V interfaznem ali metafaznem jedru celice je tarčna molekula ponavadi DNA, s katero hibridizira enostranska komplementarna sonda, označena s fluorescenčnim barvilom – označene celice kasneje ocenimo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa. Preiskava FISH omogoča tudi zaznavanje nekaterih manjših preureditev, ki jih s kariotipizacijo ne moremo opaziti. Delež bolnikov z ugotovljenimi kromosomskimi nepravilnostmi se je zato z uvedbo preiskave FISH zelo povečal (3).



Slika 5: Preiskava FISH v metafazi mitoze (A) in na interfaznih jedrih (B). Uporabljena je DNA-sonda Poseidon ON ATM / GLL, ki zazna delecijo gena *ATM* (11q22) (rdeči signali) in trisomijo 12 (zeleni signali).

FISH je tehnika, ki omogoča neposreden viden prikaz genetskih sprememb v celici. Z njo dokazujemo uravnotežene (npr. translokacije, inverzije) ali neuravnotežene (npr. delecije, duplikacije, trisomije) kromosomske spremembe. Preiskavo FISH ponavadi uporabimo šele po opravljeni kariotipizaciji, saj se lahko zgodi, da z uporabo samo te preiskave spregledamo dodatne kromosomske preureditve, ki so prisotne že ob začetku bolezni in pred ali po zdravljenju. Pomembna je ob postavitvi diagnoze, v začetku zdravljenja in ob ponovitvi bolezni. Glede na standardno citogenetsko preiskavo jo odlikuje večja analitska občutljivost, saj je količina tumorskih celic v interfazi bistveno večja (3).

1.3.1 DNA-sonde za preiskavo FISH

Poznavanje nekaterih kromosomskih preureditev, ki so značilne za določeno krvno bolezen, je omogočilo pripravo molekularskih sond za izvajanje preiskave FISH. Sonde so s fluorescentnim barvilom označena zaporedja DNA in RNA, ki se prilegajo (hibridizirajo) s področjem na tarčni DNA. Sonde lahko ustrezajo celotnim kromosomom ali pa samo njihovim posameznim krakom. S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa z ustreznimi filtri lahko ugotovimo izgubo ali pomnožitev števila signalov oziroma pojav zlitih ali razcepljenih signalov, odvisno od kromosomske preureditve in zgradbe DNA-sonde (13).

Po zgradbi DNA-sond ločimo različne vrste preiskav FISH. Uporabimo lahko (3):

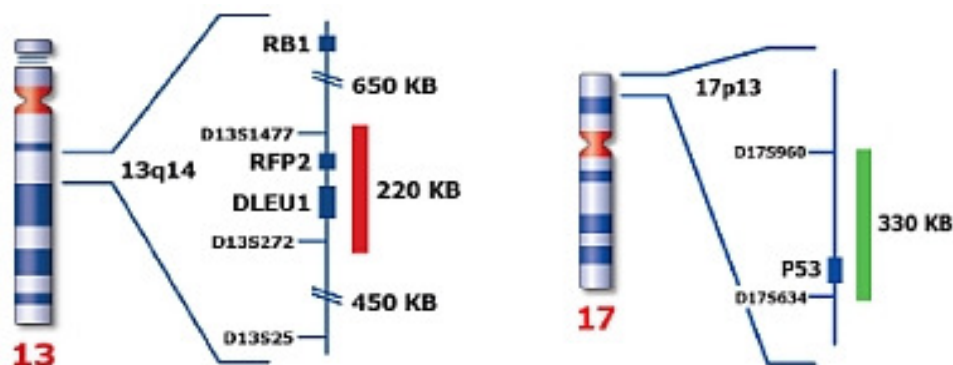
- ◆ **lokus specifične sonde** – se prilegajo izbranemu področju DNA; lahko uporabljamo do 4 različno obarvane sonde;
- ◆ **centromerne in telomerne sonde** – za določanje številčnih (monosomije, trisomije,...) ali drugih kromosomskih nepravilnosti;
- ◆ **WCP (whole chromosome painting) sonde** – za določanje kompleksnejših kromosomskih preureditev.

V nadaljevanju sta podrobneje predstavljeni DNA-sondi, ki se uporabljata v sodobni diagnostiki kronične limfatične levkemije (KLL).

1.3.1.1 Sonda Poseidon ON DLEU / p53 (Kreatech, Nizozemska)

DNA-sonda DLEU, ki je označena s »PlatinumBright550« in je pod fluorescenčnim mikroskopom vidna rdeče, zazna delecijo na kromosomskem področju 13q14. Majhno kritično območje leži med genom RB1 in markerjem D13S25, vmes pa ležijo še geni DLEU1, DLEU2 in RFP2 (14).

DNA-sonda p53 je optimizirana za zaznavanje delecije na kromosomskem področju 17p13. Označena je s »PlatinumBright495« in pod fluorescenčnim mikroskopom vidna zeleno (14). Ključna je za določitev delecije gena *TP53*, ki je napovedno najpomembnejša (neugodna) sprememba pri KLL.

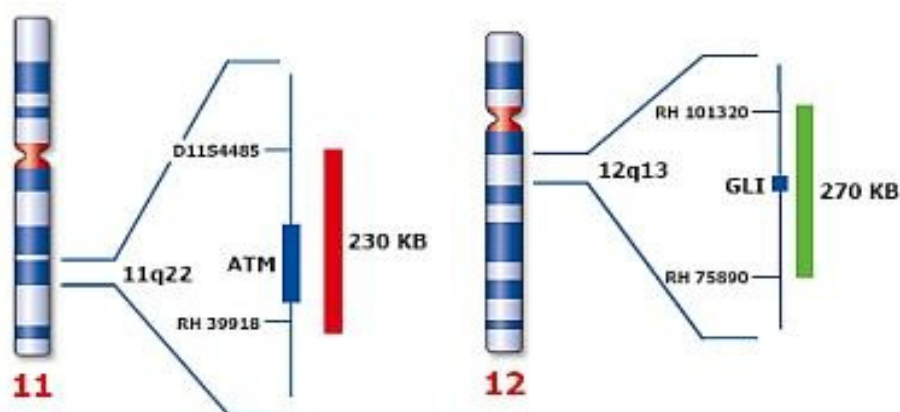


Slika 6: Sonda Poseidon ON DLEU / p53 zazna področja na kromosomu 13 in 17 (14).

1.3.1.2 Sonda Poseidon ON ATM / GLI (Kreatech, Nizozemska)

DNA-sonda ATM zazna delecijo na dolgem kraku kromosoma 11, in sicer v regiji 11q22. Kritično genomsko območje leži v področju 11q22,3-q23,1 in poleg ostalih genov vsebuje tudi ATM (angl. *ataxia telangiectasia mutated*) gen. Sonda ATM je označena s »PlatinumBright550« in je pod fluorescenčnim mikroskopom vidna rdeče (15).

DNA-sonda GLI zazna trisomijo kromosoma 12, ki je pogosta sprememba pri bolnikih s KLL. Majhno podvojeno območje leži na 12q13 in vsebuje gena GLI in CDK4. Signal se pojavi pri dodatnih 5% KLL bolnikih, čeprav ne gre za celotno trisomijo kromosoma 12. Sonda GLI je označena s »PlatinumBright495« in je vidna v zeleni barvi (15).



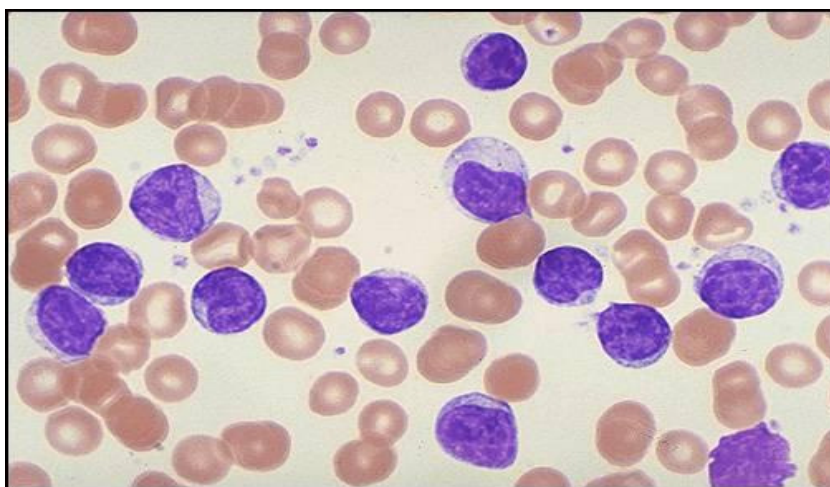
Slika 7: Sonda Poseidon ON ATM / GLI zazna področja na kromosomu 11 in 12 (15).

1.4 KRONIČNA LIMFATIČNA LEVKEMIJA (KLL)

Kronična limfatična levkemija (v nadaljevanju KLL) je najpogostejša med kroničnimi limfoproliferativnimi boleznimi in predstavlja kar 30 % vseh levkemij. Je najpogostejša oblika levkemij v Evropi in severni Ameriki ter prizadene predvsem starejše ljudi po 60. letu (16, 17). Napreduje počasi, zato je doba preživetja bolnikov zelo različna, in sicer od več mesecev do desetletij (17). Bolezen se pojavi pri približno 3 ljudeh na 100.000 prebivalcev in se pri moških pojavlja dvakrat pogosteje kot pri ženskah (13, 16).

Kot je značilno za kronične levkemije, kamor spada tudi KLL, so pri večini bolnikov bolezen ugotovili slučajno z rutinsko preiskavo krvi. Bolniki imajo lahko nespecifične simptome (utrujenost, slabost), povečane bezgavke ali/in organe, pogoste bakterijske okužbe ali pa poslabšanje sočasnih bolezni (18). V zgodnjem stadiju brez simptomov zdravljenje ponavadi sploh ni potrebno oziroma se odsvetuje. Če se povečajo bezgavke ali organi, lahko bolezen več let obvladujemo z peroralno kemoterapijo (16). Mnogi ljudje s KLL povsem normalno živijo in ponavadi umrejo zaradi drugih vzrokov (19).

KLL je maligna limfoproliferativna bolezen neznanega vzroka nastanka, pri kateri prekinitev normalne apoptoze vodi do kopičenja imunološko nefunkcionalnih zrelih limfocitov v kostnem mozgu, limfatičnih organih in krvi (slika 8). Klon levkemičnih celic ima v več kot 95% primerov membranske značilnosti limfocitov B, kar pomeni, da gre za B-KLL, v majhnem odstotku (2-5%) pa značilnosti limfocitov T, torej gre za T-KLL (13, 18). Ko govorimo o KLL, ponavadi mislimo na B-KLL, saj je T-KLL pri nas zelo redka bolezen (13).



Slika 8: Kopičenje malignih limfocitov B v krvi pri KLL (20).

Merila, s katerimi opredelimo klinično diagnozo KLL (sprejeta z International Chronic Lymphocytic Leukemia Working Group in National Cancer Institute Working Group), obsegajo limfocitozo v periferni krvi (več kot $5 \times 10^9/L$) z zrelemi limfociti značilnega imunofenotipa in infiltracijo kostnega mozga z več kot 30% limfocitov (18). Pri napredovani bolezni je koncentracija imunoglobulinov nižja od normalne (13).

KLL po Binet-u razdelimo na tri klinično razvojne stopnje (16):

- ◆ **stopnja A:** povečane bezgavke v manj kot treh območjih; ni anemije in trombocitopenije;
- ◆ **stopnja B:** povečane bezgavke v treh ali več območjih; tipljiv organ; ni anemije ali trombocitopenije;
- ◆ **stopnja C:** anemija (koncentracija hemoglobina pod 100 g/L) in/ali trombocitopenija (število trombocitov pod $100 \times 10^9/L$), z ali brez povečanih bezgavk in organov.

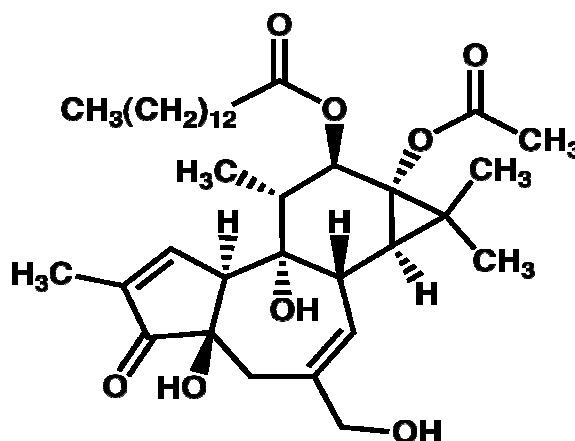
Pri bolnikih s KLL je bil z določitvijo molekularnih in celičnih označevalcev, ki lahko napovedo napredovanje bolezni, dosežen ogromen napredek. Napovedno so pomembni še mutacijski status gena za težko verigo imunoglobulinov in nekatere citogenetske nepravilnosti (preureditve). Vendar pa je ta napredek sprožil nova vprašanja o biologiji, prognozi in zdravljenju KLL (17).

Za določitev citogenetskih sprememb se poslužujemo kariotipizacije in preiskave FISH. Ker KLL spada med bolezni, kjer je mitotski indeks majhen, mnogokrat zelo težko izvedemo kariotipizacijo, saj so v vzorcu zelo redke metafaze – ena sama preurejena celica je tako lahko edina deleča se maligna celica. Kar pri okoli 80% bolnikov s KLL so prisotne kromosomske spremembe oziroma preureditve (slika 9). Najpogostejše spremembe so delecija 13q14 pri več kot 50% bolnikov ter delecija 11q22-23 in trisomija kromosoma 12 pri približno 20% bolnikov. Dostikrat je lahko prisotna tudi delecija 17p13 (gen *TP53*) pri 10% in delecija 6q21 pri 5% bolnikov (13).

Seveda pa so te kromosomske spremembe povezane tudi z različno dobo preživetja bolnikov. Napovedno najugodnejša sprememba, kar pomeni tudi počasnejši potek bolezni, je delecija 13q14. Hitrejši potek bolezni in s tem neugodno napoved pa imajo delecija 11q22-23 in trisomija 12, še posebno neugodna pa je izguba gena *TP53* (13).

1.5 12-O-TETRADEKANOIL-FORBOL-13-ACETAT

Ester forbola 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (v nadaljevanju TPA), znan tudi kot forbol 12-miristat 13-acetat (angl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) ali PMA in pod kemijsko formulo $C_{36}H_{56}O_8$ (slika 10), je dražljiva in vnetna kemikalija (23). Je aktivna komponenta semenskega olja (angl. *croton oil*), ki se pridobiva iz listnatega grma *Croton tiglium L* iz družine *Euphorbiaceae*, rastočega v jugovzhodni Aziji (24).



Slika 10: Kemijska struktura 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetata (23).

TPA se v minimalni koncentraciji pogosto uporablja v biomedicinskih raziskavah, saj je močan tumor promotor, ki s hitro aktivacijo protein kinaze C (PKC) spodbudi celično proliferacijo (rast in razmnoževanje). Ta učinek TPA je rezultat posnemanja naravnega aktivatorja PKC, poznanega kot diacilglicerol (angl. *diacylglycerol*) (23, 25). TPA so raziskali tudi kot zdravilo pri zdravljenju različnih hematoloških tumorjev (23).

Čeprav so TPA začeli raziskovati pri ljudeh šele okoli devetdesetih let prejšnjega stoletja, mu lahko pripišemo širok razpon celičnih in potencialno koristnih farmakoloških učinkov. Leta 1998 so Han in sod. (26) v študiji ugotovili, da ima TPA terapevtski učinek. Bolniki z levkemijo, ki se niso odzivali na terapijo s prvotnimi kemoterapevtiki, so prejeli vsaj en odmerek intravenske infuzije s TPA, kar je povzročilo zmanjšanje števila mieloblastov v kostnem mozgu in periferni krvi, ter s tem doseglo remisije. Med potekom te študije pa so pri bolnikih z levkemijo, ki so imeli pred intravensko infuzijo s TPA nizko število belih krvnih celic (WBC), ugotovili tudi, da je dodatek TPA za 1-krat do 2-krat povečal število WBC in nevtrofilcev (26).

TPA pa se dodaja v gojišče, da se stimulira celice limfocitov B k delitvi. Leta 2007 sta Sánchez in Aventín (27) v svoji raziskavi primerjala rezultate preiskave FISH nestimuliranih mononuklearnih celic venske krvi in z dodatkom TPA stimuliranih celic venske krvi po gojenju. Pri izvedbi preiskave FISH so se osredotočili na kromosomske preureditve, ki se najpogosteje pojavijo pri KLL – torej delecijo del(13), delecije gena *ATM* in *TP53* ter trisomijo 12. Rezultati so pokazali, da je delež preurejenih celic višji pri stimulaciji celic z dodatkom TPA. Z izjemo enega primera, pa so se v vseh ostalih primerih kromosomske preureditve lahko potrdile tudi s preiskavo FISH na metafaznih celicah ali s standardno citogenetsko preiskavo. Poleg večjega deleža preurejenih celic ob dodatku TPA lahko zaznamo tudi nekatere KLL primere s preureditvami, ki jih lahko spregledamo, če celice niso stimulirane.

Primerjavo mitotskih indeksov (MI), proganja kromosomov, obsega malignega klona in deleža preurejenih celic pri bolnikih s KLL, pa so v svoji študiji leta 2010 preučevali Wren in sod. (28). Celice periferne krvi, so gojili kar na 6 različnih načinov: nestimulirane (24 ur), z dodatkom FCS, stimulacija z interlevkinom 4 (IL-4), z lipopolisaharidom (LPS), s TPA in s CpG-oligonukleotidom DSP30 + interlevkinom 2 (IL-2). Rezultati so bili boljši le v primeru stimulacije s TPA in DSP30 + IL-2, medtem ko so se ostali načini izkazali za neučinkovite. Ne glede na vrsto preiskave in časa od odkritja KLL, se je za najuspešnejšo med vsemi načini gojenja izkazala stimulacija celic periferne krvi z dodatkom TPA.

2 NAMEN DELA

Glavni namen našega dela bo primerjava gojenja celic bolnikov s potrjeno diagnozo KLL v gojiščih brez in z dodatkom 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetata (TPA). TPA naj bi pospešil delitev celic, ter s tem tudi zvišal MI, ki je sicer pri KLL zelo majhen. Tako bomo primerjali mitotske indekse po gojenju v običajnem gojišču in po gojenju v gojišču z dodatkom TPA. Gojenje v običajnem gojišču se med drugim vsakodnevno uporablja v laboratoriju za citogenetiko Specializiranega hematološkega laboratorija Kliničnega oddelka za hematologijo, v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Primerjali in ocenili bomo tudi morfologijo kromosomov v enem in v drugem gojišču – osredotočili se bomo predvsem na proganje kromosomov, kako dobro so proge izražene. Do sedaj je bil, poleg majhnega MI pri sestavljanju kariograma, problem tudi v slabi razporeditvi kromosomov pri nanosu na stekla. Zato bomo preverili, ali dodatek TPA v gojišču vpliva tudi na to.

Poleg tega bomo pri vzorcih, pri katerih je bila v rednem diagnostičnem postopku s preiskavo FISH določena katera od kromosomskih sprememb pri vsaj 20 % celic, določili tudi, če se delež malignega klona po gojenju v običajnem gojišču razlikuje od vrednosti po gojenju v gojišču z dodatkom TPA.

Dobljene vrednosti vseh postopkov bomo tudi statistično analizirali in ugotovili, ali ima dodatek TPA gojišču prednost pri diagnostični obravnavi bolnikov s KLL.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Osnovne kemikalije, topila, reagenti in raztopine

❖ **Predpriprava vzorca za gojenje:**

- ◆ Transportno gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom in Na-heparinom (GIBCO, Invitrogen, Velika Britanija)
- ◆ Raztopina Hank's: raztopina soli, ki vsebuje NaCl, KCl, glukozo, KH_2PO_4 , Na_2PO_4 in fenol rdeče (Sigma-Aldrich, ZDA)

Komercialno dostopno raztopino smo redčili v 1 L destilirane vode (10-kratno redčenje). pH vrednost smo z uporabo nasičene raztopine NaHCO_3 uravnali na 7,2, nato smo raztopino sterilno prefiltrirali (filter 0,2 μm). Posodici s po 500 mL raztopine smo hranili v zamrzovalniku. Pred uporabo smo raztopino odmrznili in hranili v hladilniku.

- ◆ Rastni medij *Bone Marrow Karyotyping Medium* z L-glutaminom in antibiotiki (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael)
- ◆ PBS: fosfatni pufer (angl. *phosphate-buffered saline*), pH = 7,4

➤ 10 x PBS:

Raztopino 10 x PBS smo pripravili iz NaCl (80 g/L), KCl (2 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L) in $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (14,41 g/L). Najprej smo do 900 mL dolili destilirano vodo in uravnali pH vrednost na 7,4, šele nato smo dopolnili do oznake 1000 mL in sterilizirali.

➤ 1 x PBS:

V 1000 mL bučko smo zlili 100 mL 10 x PBS in do oznake dolili destilirano vodo. Preverili smo pH vrednost in če je bilo potrebno, smo jo uravnali na 7,4.

❖ **Gojenje celic kostnega mozga:**

- ◆ Raztopina timidina: 0,025 M (Sigma-Aldrich, ZDA)

Raztopino timidina s koncentracijo 0,025 M smo pripravili tako, da smo 1 g timidina raztopili v 167 mL raztopine Hank's-a. Raztopino smo nato sterilizirali, razdelili v 15 mL epruvete z navojem in zamrznili. Odmrznili smo ga sproti in po potrebi.

- ◆ Rastni medij *MarrowMaxTM Bone Marrow Medium* z L-glutaminom in Gentamicin sulfatom (GIBCO, Invitrogen, Velika Britanija)

- ◆ Raztopina TPA: 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (Sigma-Aldrich, ZDA)

Raztopino TPA smo pripravili tako, da smo 1 mg komercialnega TPA raztopili v 2 mL topila DMSO (dimetil sulfoksid), (Sigma-Aldrich, ZDA). Tako koncentrirano raztopino smo nato po 10 μ L razdelili v 200 mikrocentrifugirk in jih zamrznili. Za uporabo smo odtalili potrebno količino in v mikrocentrifugirko s TPA odpipetirali še 615 μ L sterilnega gojišča RPMI 1640. Tako pripravljeno raztopino smo nato lahko uporabili, vendar če je nismo uspeli porabiti v 14 dneh, smo jo zavrgli in pripravili svežo.

- ◆ Raztopina *KaryoMax[®] Colcemid[®]*: 10 μ g/mL (GibcoTM, Invitrogen Corporation, Nemčija)

❖ **Fiksacija celic kostnega mozga:**

- ◆ Hipotonični KCl: 0,075 M (Merck, Nemčija)

Pripravili smo ga tako, da smo 5,59 g KCl raztopili v 1 L destilirane vode in sterilizirali. Hranimo ga v hladilniku.

- ◆ FBS: fetalni goveji serum (angl. *fetal bovine serum*), (Sigma, ZDA)

Komercialni serum smo takoj, ko ga dobimo, razdelili v epruvete po 10 mL in zamrznili. Odmrznili smo ga sproti in po potrebi.

- ◆ Hipotonična raztopina (hipotonija):

Sestavljena je iz raztopin A (0,075M KCl) in B (FBS : H₂O = 1:6), v razmerju 1:1. Za dva vzorca celic kostnega mozga smo hipotonijo pripravili tako, da smo skupaj zmešali 7 mL hipotoničnega KCl (0,075 M), 6 mL dvakrat destilirane vode in 1 mL FBS. K vsakemu vzorcu smo dodali 7 mL tako pripravljene raztopine. Vedno smo uporabili svežo, pred uporabo pripravljeno raztopino.

- ◆ Raztopina za fiksacijo celic kostnega mozga (fiksativ):

Raztopino za fiksacijo smo pripravili z mešanjem absolutnega etanola (Sigma-Aldrich, ZDA) in koncentrirane očetne kisline (Sigma-Aldrich, ZDA) v razmerju 3:1. Pripravili smo jo vedno svežo in jo takoj po pipetiranju prekrili s parafilmom.

❖ Priprava objektnih stekel za nanos celic:

- ◆ Kemex A (Kemika, Hrvaška)
- ◆ Dvakrat destilirana voda

❖ Barvanje preparatov:

- ◆ Raztopina tripsina: 0,2% raztopina v 1 x PBS pufru

Pripravili smo jo tako, da smo 1 g tripsina (Sigma-Aldrich, ZDA) v 500 mL bučki raztopili z 1 x PBS in dopolnili do oznake. Po 50 mL pripravljene raztopine tripsina smo razdelili v 50 mL epruvete z navojem in zamrznili. Pred uporabo smo jo odtalili na 37°C.

- ◆ 1 x PBS
- ◆ Fosfatni pufer:
 - 245 mL 0,06 M Na₂HPO₄ (8,52 g/L Na₂HPO₄)
 - 255 mL 0,06 M KH₂PO₄ (8,16 g/L KH₂PO₄)

pH vrednost mora biti 6,8, sicer smo jo uravnali z dodajanjem enega ali drugega fosfata. Pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku.

- ◆ Raztopina Giemse:

Pripravili smo jo iz 72 mL fosfatnega pufru in 3 mL reagenta Giemse (Carlo Erba Reagents SpA, Italija). Pripravljeno raztopino smo zlili v stekleno kiveto za objektna stekla.

❖ Preiskava fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH):

- ◆ 1 M MgCl₂:

20,331 g/L MgCl₂ x 6H₂O (Lekarna KC Ljubljana) smo raztopili v 100 mL in z destilirano vodo dopolnili do oznake.

- ◆ 1 M NaOH:

Pripravili smo ga iz 20 g NaOH (Kemika, Hrvaška), ki smo ga raztopili v 500 mL bučki in z destilirano vodo dopolnili do oznake.

- ◆ 1 M HCl:

4,24 mL koncentrirane HCl (36%) (Kemika, Hrvaška) smo dodali v 50 mL bučko z nekaj destilirane vode in nato dopolnili do oznake.

◆ 20xSSC:

- 3 M NaCl (175,3 g/L) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 0,3 M Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O (88,25 g/L) (Kemika, Hrvaška)

Dolili smo destilirano vodo, uravnali pH na 6,3 z 1 M HCl in dopolnili do oznake. Nato smo prefiltrirali preko 0,45 µm filtra. Raztopino smo hranili pri sobni temperaturi in zavrgli po 6 mesecih ali prej, če je postala raztopina motna.

◆ 2xSSC:

Zmešali smo 100 mL 20xSSC (pH=6,3) in 850 mL destilirane vode. pH smo uravnali na 7,0±0,2 z 1 M NaOH in nato dopolnili z vodo do 1000 mL. Hranili smo ga v hladilniku.

◆ 10xPBS, 1xPBS◆ Koncentrirana raztopina pepsina: iz prašičje želodčne sluznice

250 mg pepsina (Sigma-Aldrich, Nemčija) z aktivnostjo 3.200-4.500 enot/mg proteina smo razredčili z 10 mL destilirane vode in razdelili po 1 mL v mikrocentrifugirke. Hranili smo ga v zamrzovalniku in po potrebi odmrznili.

◆ Raztopina pepsina: 0,005%

Pripravili smo jo v 100 mL bučki iz 99 mL destilirane vode in 1 mL 1 M HCl. Tej raztopini smo dodali še 200 µL koncentrirane raztopine pepsina in jo prelili v stekleno kiveto za objektna stekla.

◆ Raztopina formaldehida (5 mM MgCl₂, 1% formaldehid):

Raztopino smo pripravili v 100 mL bučki iz 5 mL 1M MgCl₂ in 2,5 mL 37% formaldehida (Sigma-Aldrich, Nemčija), ter dopolnili do oznake z 2xSSC. Raztopino smo nato prelili v stekleno kiveto za objektna stekla.

◆ DNA-sonde:

- PoseidonTM ON DLEU (13q14) / p53 (17p13) (KreatechTM, Nizozemska)
- PoseidonTM ON ATM (11q22) / GLI (12q13) (KreatechTM, Nizozemska)

◆ Spiralna raztopina po hibridizaciji NP-40:

V reagenčno steklenico smo pripravili 0,9 g detergenta NP-40 (BDH Chemicals, Anglija), 60 mL 20xSSC (pH=6,3) in 120 mL destilirane vode. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent zanesljivo raztopil, nato pa smo jo prefiltrirali preko 0,2 µm sterilnega

filtra. Raztopino smo hranili v hladilniku in jo zavrgli takoj, ko se je pojavila motna usedlina.

◆ PBT:

V 500 mL bučko smo pripravili 2 mL BSA (6% raztopina) (Ortho-Clinical Diagnostics, ZDA) in 0,5 mL Tween 20 (Sigma-Aldrich, Nemčija). Z 1xPBS pufrom smo dopolnili do oznake. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent zanesljivo raztopil, nato smo jo prefiltrirali preko 0,2 um sterilnega filtra in shranili v hladilniku.

◆ DAPI II Counterstain: 125 ng/mL (Abbott Molecular, ZDA), hranimo na -20°C

◆ Gumijasti cement Fixogum: 125g (Marabu, Marabuwerke GmbH & Co., Nemčija)



Slika 11: Nekaj kemikalij, topil, reagentov in raztopin, ki smo jih uporabljali za raziskovalno delo.

3.1.2 Vzorci kostnega mozga

V raziskovalno delo smo vključili 30 sterilno odvzetih vzorcev KM (aspirat KM) bolnikov s potrjeno diagnozo KLL, v obdobju med septembrom 2009 in septembrom 2010. Odvzeti so bili 29 različnim bolnikom, starim od 45 do 76 let, med katerimi je bilo 20 moških in 9 žensk. Srednja starost pri moških je bila 59,1, pri ženskah pa 61,6 let. Srednja starost celotne vzorčne populacije, ne glede na bolnike in spol, je 59,4 let.

Podatke bolnikov, ki jih bomo potrebovali za nadaljnje raziskovanje pri opredelitvi MI, ocenjevanju morfologije slikanih kromosomov, vrednotenju rezultatov in končni razpravi, smo prikazali v preglednici 1. Poleg zaporedne številke, ki pomeni vrstni red sprejema, smo vzorcem dodali še dvočrkovno identifikacijsko oznako (ID). Navedli smo tudi spol bolnikov in njihovo starost na dan odvzema vzorca.

Preglednica 1: Podatki bolnikov.

zaporedna št.	ID*	spol**	starost
1	NM	M	58
2	KM	Ž	51
3	JG	M	71
4	OM	Ž	48
5	DZ	M	46
6	KJ	M	62
7	RM	M	62
8	MM	M	75
9	VC	M	74
10	SN	Ž	70
11	JJ	M	45
12	HC	Ž	54
13	KV	M	49
14	PZ	M	66
15	BI	M	47
16	HB	M	57
17	DV	M	46
18	MZ	Ž	60
19	RB	M	45
20	GD	M	57
21	GZ	M	53
22	JM	M	56
23	BE	M	48
24	TL	M	68
25	KK	M	72
26	DE	Ž	76
27	CF	Ž	61
28	ZJ	Ž	76
29	BP	Ž	58
30	TM	M	70

* ID – identifikacijska oznaka vzorca

** spol: M – moški; Ž - ženski

3.2 LABORATORIJSKE APARATURE

- ❖ Laminarij – laminarna zaščitna komora LFVP-12, Iskra PIO
- ❖ Stresalnik (Vortex) Vibromix 10, Tehnica®
- ❖ Laboratorijske centrifuge:
 - ◆ Function Line, Labofuge 400, Heraeus
 - ◆ Centric 322A, Tehnica®
- ❖ Vodna kopel Termoproc VKNP
- ❖ Hematološki analizator Coulter LH 750, Beckman Coulter® Inc., ZDA
- ❖ CO₂ inkubatorja:
 - ◆ Innova® CO-48, Newbrunswick Scientific Co.
 - ◆ Sanyo MCO-15AC, Sanyo Electric Co., Japonska
- ❖ Invertni mikroskop Opton, Nemčija
- ❖ Električna grelna plošča za preparate Termoproc TP
- ❖ Svetlobni mikroskop Olympus BX41, Olympus Optical Co., Japonska
- ❖ Diferenciacijski števec Eqar 8, Maras
- ❖ pH meter SevenEasy, Mettler Toledo, ZDA
- ❖ Električna grelna plošča z magnetnim mešalom za pripravo raztopin Rotamix 550MMH, Tehnica
- ❖ Precizna tehtnica Mettler Toledo AX 304, Mettler Toledo, ZDA
- ❖ Denaturator/hibridizator ThermoBrite™, StatSpin®, Abbott Molecular, ZDA

3.3 LABORATORIJSKI PRIBOR

- ❖ Sterilne centrifugirke z zamaškom in koničastim dnom (15 mL), Greiner Bio-one, Cellstar®
- ❖ Sterilne Pasteurjeve pipete (kapalke) za enkratno uporabo (3 mL), BD Falcon™
- ❖ Polavtomatske pipete za pipetiranje različnih volumnov:
 - ◆ Eppendorf Reference 10-100 µL, 100-1000 µL, 20 µL
 - ◆ Eppendorf Research 100-1000 µL
- ❖ Sterilni nastavki za polavtomatske pipete:
 - ◆ Eppendorf Dualfilter Tips 50-1000 µL
 - ◆ Eppendorf Dualfilter Tips 2-100 µL

- ❖ Avtomatski pipetor Eppendorf Easypet, Eppendorf, Nemčija
- ❖ Sterilne pipete za pipetor Dispenser (5 mL, 10 mL), TPP®
- ❖ Plastične mikrocentrifugirke Eppendorf Tubes (1,5 mL), Eppendorf, Nemčija
- ❖ Sterilne plastične posodice za gojenje celic z rdečim pokrovčkom (25 cm²), Cellstar®
- ❖ Stojala za centrifugirke in mikrocentrifugirke
- ❖ Objektna stekla Vitrognost®, Biognost, Nemčija
- ❖ Pinceta (pri delu z objektnimi stekli – nanos celic in barvanje preparatov)
- ❖ Celulozna vata (staničevina), rezana 25 x 20 cm, Tosama
- ❖ Plastične posode za sterilno filtracijo raztopin s filtrom 0,22 µm (500 mL), TPP®
- ❖ Steklovina:
 - ◆ Steklene ležeče kadičke za objektna stekla
 - ◆ Steklene kivete s pokrovom za barvanje objektnih stekel
 - ◆ Bučke (100 mL, 500 mL, 1000 mL)
 - ◆ Merilni valji (50 mL, 100 mL)
 - ◆ Čaše (500 mL, 1000 mL)



Slika 12: Nekaj laboratorijskega pribora, ki smo ga uporabljali za raziskovalno delo.

3.4 METODE DELA

3.4.1 Potek dela pod sterilnimi pogoji (aseptična tehnika dela)

Sterilno okolje je ključni pogoj za delo z biološkimi vzorci, s katerimi smo delali (v našem primeru s KM). Sterilnim pogojem pri delu s KM smo zadostili z delom v laminariju. To je komora z vertikalnim pretokom zraka, ki sproti odstranjuje prašne delce, hlapce in strupene kemikalije, ter nam tako zagotovi delo pod optimalnimi pogoji. Po koncu dela smo jo vedno očistili in razkužili s 70% etanolom ter prižgali UV svetilko.

Sterilne morajo biti tudi vse kemikalije, topila, reagenti, raztopine in laboratorijski pribor, ki smo jih/ga uporabljali. Za sterilizacijo pripomočkov se ponavadi uporablja avtoklave, medtem ko smo za sterilizacijo pripravljenih raztopin uporabljali plastične posodice s filtrom za sterilno filtracijo. V aseptični sobi je moral biti s sterilnimi pripomočki odvet tudi vzorec, ki se ga je nato preneslo v sterilno centrifugirko z navojem in koničastim dnom. Pri delu z vzorci smo ves čas nosili zaščitne rokavice, pri pipetiranju pa smo vselej pazili, da se nismo dotaknili stene epruvete z vzorcem ali česarkoli drugega, sicer smo nastavek takoj zavrgli in vzeli drugega.

3.4.2 Odvzem vzorca kostnega mozga in prenos v laboratorij

Vzorci KM so bili odvzeti v aseptični sobi, s postopkom imenovanim punkcija. Bolnik je pri tem ležal na desnem boku in imel noge čim bolj pokrčene k sebi. Zdravnik je na levem delu medenice izbrano mesto najprej očistil z razkužilom in nato vbrizgal lokalni anestetik. Ko je anestetik začel delovati je s posebno iglo z mandrenom, v predelu zadnjega črevničnega trna, zavrtal do spongioze. Mandren je nato odstranil in z brizgalko vsrkal vsebino. KM je bil viden kot kri, v kateri so pomešani kosmanci.

Za citogenetsko preiskavo smo približno 3 mL odvzetega vzorca KM prenesli v sterilno centrifugirko z navojem in koničastim dnom, v katerem je bilo 5 mL gojišča RPMI 1640 in 0,5 mL Na-heparina. Ta vsebina z gojiščem in Na-heparinom ohrani celice KM vitalne med prenosom v laboratorij. Na-heparin ni toksičen za celice KM in ima vlogo sredstva proti strjevanju krvi, zato prepreči koagulacijo. Prenos do laboratorija je moral biti čim hitrejši, na sobni temperaturi in pri vseh vzorcih izveden v manj kot enem dnevu.

3.4.3 Priprava vzorca za gojenje

Centrifugirke z vzorcem smo najprej dali centrifugirat za 10 minut pri 1600 rpm. Supernatant smo s Pasteurjevo pipeto za enkratno uporabo previdno odstranili. Na fazni meji med zgornjo spiralno raztopino in spodnjimi eritrociti, smo z isto kapalko previdno povlekli močno viskozen KM. Pri tem smo morali s celicami KM prenesti čimmanj krvi, saj bi eritrociti motili nadaljnje postopke. S Pasteurjevo pipeto povlečen KM smo nato resuspendirali v 8 mL raztopine Hank's, segrete na 37°C. Zopet je sledilo centrifugiranje, 10 minut pri 1600 rpm. Supernatant smo s Pasteurjevo pipeto previdno odstranili, nato vanjo povlekli KM in ga prenesli v centrifugirko s približno 1 mL gojišča KMB. Vsebino smo dobro premešali (Vortex) in v označeno mikrocentrifugirko odpipetirali 100 µL vzorca v gojišču in 200 µL PBS pufra. S pomočjo hematološkega analizatorja smo izmerili koncentracijo levkocitov.

Dobljeno vrednost levkocitov (celic/L) smo pomnožili s 3 (faktor redčenja), da smo dobili pravo koncentracijo levkocitov v vzorcu – izrazili smo jo z X (celic/L). Nato smo izračunali potrební volumen vcepka, da je bila končna koncentracija 1×10^6 celic/mL, s pomočjo naslednje enačbe:

$$\frac{16[mL] \cdot 10^6 [celic / mL] \cdot 1000 [mL / L]}{X [celic / L]} = V [mL]$$

Če je bil izračunani volumen vcepka V (mL) manjši kot 0,3 mL, smo pripravili 2x večjo koncentracijo celic – torej smo pomnožili z 2. Če je bil volumen vcepka še vedno manjši, smo zopet pomnožili z 2 in tako nadaljevali, dokler ni volumen vcepka presegel 0,3 mL.

Primeren izračunani volumen vcepka smo nato dali v novo centrifugirko in zraven dodali toliko rastnega medija KMB, da je bil skupni volumen vcepka 2 mL – ta vcepek smo kasneje razdelili na gojišče KMM in gojišče KMM z dodatkom TPA. Ostanek celic iz prvotne epruvete smo dali na tretje gojišče (KMM ostanek), ki pa ni primerno za kasnejšo analizo, saj vsebuje preveliko koncentracijo celic, zato celicam med gojenjem zmanjka hranil, posledica pa je, da se slabo delijo. Če je bil izračunani volumen vcepka večji od volumna celic, ki smo ga imeli na razpolago, smo le-tega razdelili na dve gojišči.

3.4.4 Gojenje celic kostnega mozga

Gojenje celic je bil del rednega citogenetičnega postopka, tako da smo celice vsakega bolnika vzporedno gojili vsaj na dveh različnih rastnih medijih (odvisno od količine materiala). Celice smo gojili v sterilnih plastičnih posodicah z rdečim pokrovčkom, ki je imel luknjice in filter – na ta način so se lahko skozi luknjice z okolico izmenjali plini, filter pa je preprečeval okužbe. V te plastične posodice za gojenje celic KM (25 cm²) smo sterilno odpipetirali naslednje sestavine za različne vrste gojišč (preglednica 2).

Preglednica 2: Vrste gojišč, ki jih potrebujemo za raziskovalno delo in njihove sestavine.

gojišče KMM	gojišče KMM z dodatkom TPA
<ul style="list-style-type: none">◆ 6,5 mL rastnega medija KMM◆ 300 µL raztopine timidina	<ul style="list-style-type: none">◆ 7,5 mL rastnega medija KMM◆ 300 µL raztopine timidina◆ 50 µL raztopine TPA

Posodice s pripravljenim gojiščem smo najprej za nekaj minut postavili v vodno kopel (37°C) in nato vanje sterilno prenesli 1 mL predhodno pripravljenega vzorca KM. Na vsako posodico smo zapisali bolnikovo ime in priimek, datum odvzema vzorca, kratico rastnega medija in čas začetka gojenja. Posodice smo takoj prenesli v inkubator. Vzorce smo gojili kratkotrajno (24 ur), v vlažni atmosferi s 5% CO₂ in pri 37°C. Pol ure pred odvzemom kulture smo dodali 70 µL reagenta Colcemida. Vloga tega reagenta je zaustavitev celičnega ciklusa na stopnji metafaze, kjer so kromosomi najbolj kondenzirani in tako najprimernejši za sestavljanje kariograma.

3.4.5 Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksacija celic

S pomočjo pipete (10 ml) smo suspenzijo celične kulture sterilno prenesli iz posodice za gojenje v centrifugirko s koničastim dnom. Pred tem smo nanjo napisali bolnikovo ime in priimek, ter kratico gojišča. Po prenosu smo vzorec najprej centrifugirali 10 minut pri 1600 rpm, nato previdno odstranili supernatant in sediment temeljito premešali s stresalnikom. Po kapljicah smo vsakemu vzorcu dodali 7 mL hipotonične raztopine, ki smo jo predhodno segreli na 37°C. Centrifugirke smo nato zaprli in jih pustili stati v vodni kopeli 25 minut pri 37°C. Hipotonična raztopina je, napram notranjosti človeških celic, manj koncentrirana raztopina soli, katere vloga je, da celice v njej ustrezno nabreknejo in na ta način dosežemo primerno razporeditev kromosomov (2).

Ko je čas potekel, smo v vsak vzorec dodali 3 kapljice fiksativa in vzorce nemudoma dali centrifugirat za 8 minut pri 1600 rpm. Zopet smo previdno odstranili supernatant in sediment temeljito premešali. Nadalje smo postopoma (počasi, po kapljicah) dodali 8 mL fiksativa. Po 15 minutah na sobni temperaturi smo epruvete spet prenesli v centrifugo (8 minut, 1600 rpm), odstranili supernatant, temeljito premešali (Vortex) in počasi dodali 8 mL fiksacijske mešanice. Spiranje celic s fiksativom smo ponovili še 2-krat oziroma dokler raztopina ni bila popolnoma bistra.

Po zadnjem centrifugiranju smo v epruveti z vzorcem pustili približno 0,5 mL supernatanta in dobro premešali. Fiksirane celice smo hranili v zamrzovalniku (-20°C) vsaj dve uri pred nanosom na objektna stekla.

3.4.6 Nanos na stekla

❖ Priprava objektnih stekel:

Pred nanosom celic smo nova objektna stekla zložili v stekleno ležečo kadičko za objektna stekla. Na dno kadičke smo nalili približno 1 cm Kemexa A in jo do vrha dopolnili z mlačno vodo. Pokrito smo pustili stati vsaj čez noč. Naslednji dan smo stekla najprej dobro sprali s hladno tekočo vodo, jih nato 30 minut spirali z vročo vodo in na koncu še 5 minut z mrzlo vodo. Sprana stekla smo po koncu še 3-krat sprali z dvakrat destilirano vodo in jih nato pustili v celoti potopljena v sveže doliti destilirani vodi. V hladilniku smo jih lahko hranili do 3 dni.

❖ Nanos vzorcev na objektna stekla:

Vzorci smo vzeli iz zamrzovalnika in jih s pomočjo stresalnika dobro premešali. Da smo dobili pravšnjo gostoto celic, smo jim dodali fiksativ oziroma po centrifugiranju previdno odstranili supernatant.

Objektno steklo smo s pinceto vzeli iz vode in ga odcedili na staničevini. Steklo smo nato s pomočjo pincete držali v ekonom loncu, kjer se je ustvarjala para. S konico nastavka pipete, v katerega smo posrkali 20 μ L vzorca, smo se najprej rahlo dotaknili sredine stekla, nakar smo vzorec z višine 1-2 cm spustili na objektno steklo. Z nanosom nad paro smo tako dosegli ustrezno razporeditev metafaznih celic (enakomerna razporeditev celic po celotni površini). Za optimalen nanos celic naj bi bila temperatura zraka v prostoru okrog 25°C, relativna vlažnost zraka pa okrog 50%.

Ko so se stekla posušila, smo s pomočjo invertnega mikroskopa preverili, če je gostota celic ustrezna. V primeru preredkega nanosa, smo na stekelce nad paro še dodatno nanесли 20 μ L vzorca ali pa smo vzorec ponovno centrifugirali in odstranili nekaj supernatanta. Pregostim vzorcem smo dodali še nekaj fiksativa in jih tako zredčili. Pred vsakim nanosom vzorca na objektno steklo smo vsebino epruvete dobro pretresli.

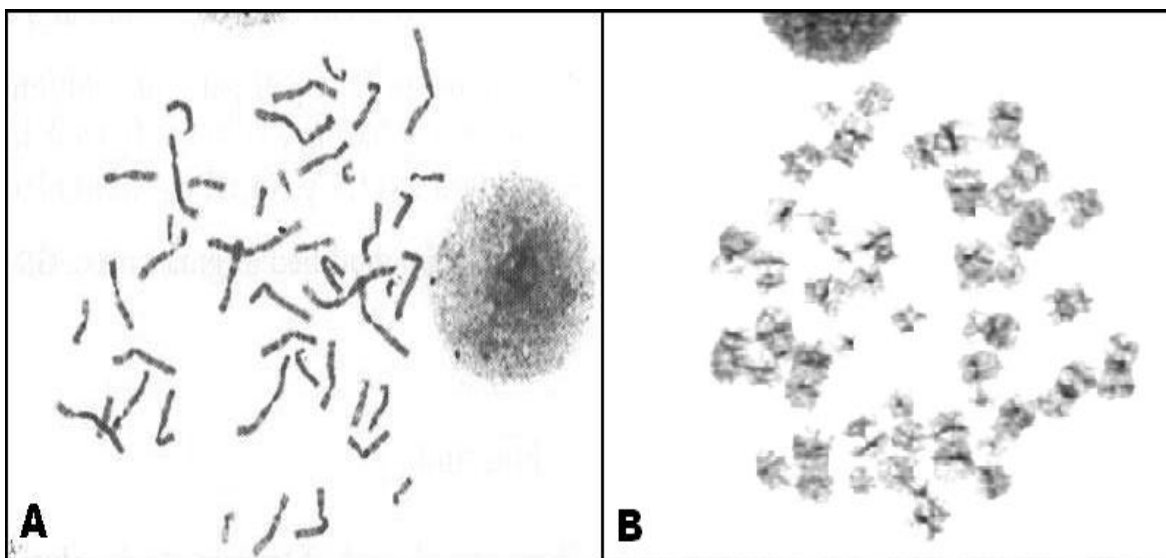
Vzorec iz vsake epruvete smo nanесли na 3 objektna stekla (1 poskusno steklo in 2 stekli za določanje mitotskega indeksa). Ko smo vsa stekla preverili pod invertnim mikroskopom, smo jih enega poleg drugega zložili na grelno ploščo in jih najprej starali 30 minut na 60°C, nato pa še 30 minut pri 90°C. Po zaključenem sušenju smo stekelca položili na podstavek, obložen s staničevino in počakali, da so se ohladila za barvanje.

3.4.7 Barvanje objektnih stekel z Giemso in tripsinom (GTG proganje)

Uporabljali smo barvanje z Giemso po predhodni tripsinizaciji. Na ta način smo ustvarili G-proge na kromosomih, proizvedene s pomočjo Giemse in tripsina (GTG proganje).

Delali smo pri sobni temperaturi. Vedno smo najprej pobarvali le poskusna objektna stekla z nanesenimi vzorci. Stekla smo zaporedoma pomakali v raztopine, in sicer smo vsako posamezno steklo najprej za 9 sekund pomočili v tripsin, ga nato hitro sprali v 1 x PBS in za 9 minut prenesli v raztopino Giemse. Ko je čas potekel, smo vsako steklo sprali pod tekočo vodovodno vodo in posušili na zraku.

S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo pregledali kvaliteto barvanja kromosomov na poskusnem steklu in prilagodili čas tripsinizacije. Če so bili kromosomi puhasti in zelo lepo najedeni, smo čas tripsinizacije skrajšali, če pa so bili zelo temni, smo ga podaljšali (slika 13) (11). Glede na oceno kvalitete barvanja kromosomov poskusnega stekla smo pobarvali še preostala stekla.



Slika 13: A) Premalo tripsinizirani kromosomi – temni in brez vidnih prog; B) preveč tripsinizirani kromosomi – svetli in puhasti (11).

3.4.8 Določanje mitotskega indeksa

Mitotske indekse (v nadaljevanju MI) smo določili s pregledom obarvanega preparata pod svetlobnim mikroskopom. Vsak preparat smo opazovali pri 100x povečavi kjer smo določili MI. Pri tem smo si pomagali z diferenciacijskim števcem. Ker pa so celice na objektnem steklu zelo neenakomerno razporejene, smo se vsakih 200 celic premaknili na drugo področje objektnega stekla in se s tem izognili napačni določitvi MI.

Za mitozo smo upoštevali vsak skupek, ki je imel vsaj polovico kromosomov – torej od 23 kromosomov dalje. Na vsakem objektnem steklu smo pregledali dvakrat po 1000 celic, skupno 2000 celic. Z diferenciacijskega števca smo na koncu še odčitali in zabeležili število mitoz (metafaznih celic) na vseh 1000 pregledanih celic. MI smo zaradi tega izrazili v promilih (‰).

3.4.9 Slikanje mitoz za oceno morfologije kromosomov

Po končanem štetju MI smo obarvane preparate dalje opazovali pri 100x povečavi in sicer smo sistematično pregledali vsak preparat tako, da nismo izpustili nobenega dela stekla. Ko smo našli mitozo dobre kvalitete (kromosomi so lepo ločeni in dovolj »napihnjeni«, da smo kasneje lahko izvedli analizo) ali pa slabe kvalitete (morfologija kromosomov pri preurejenih metafazah je ponavadi bistveno slabša), smo prestavili objektiv na 1000x povečavo in mitozo slikali. Na vsakem preparatu smo ponavadi poslikali prve tri mitoze, ki smo jih našli.

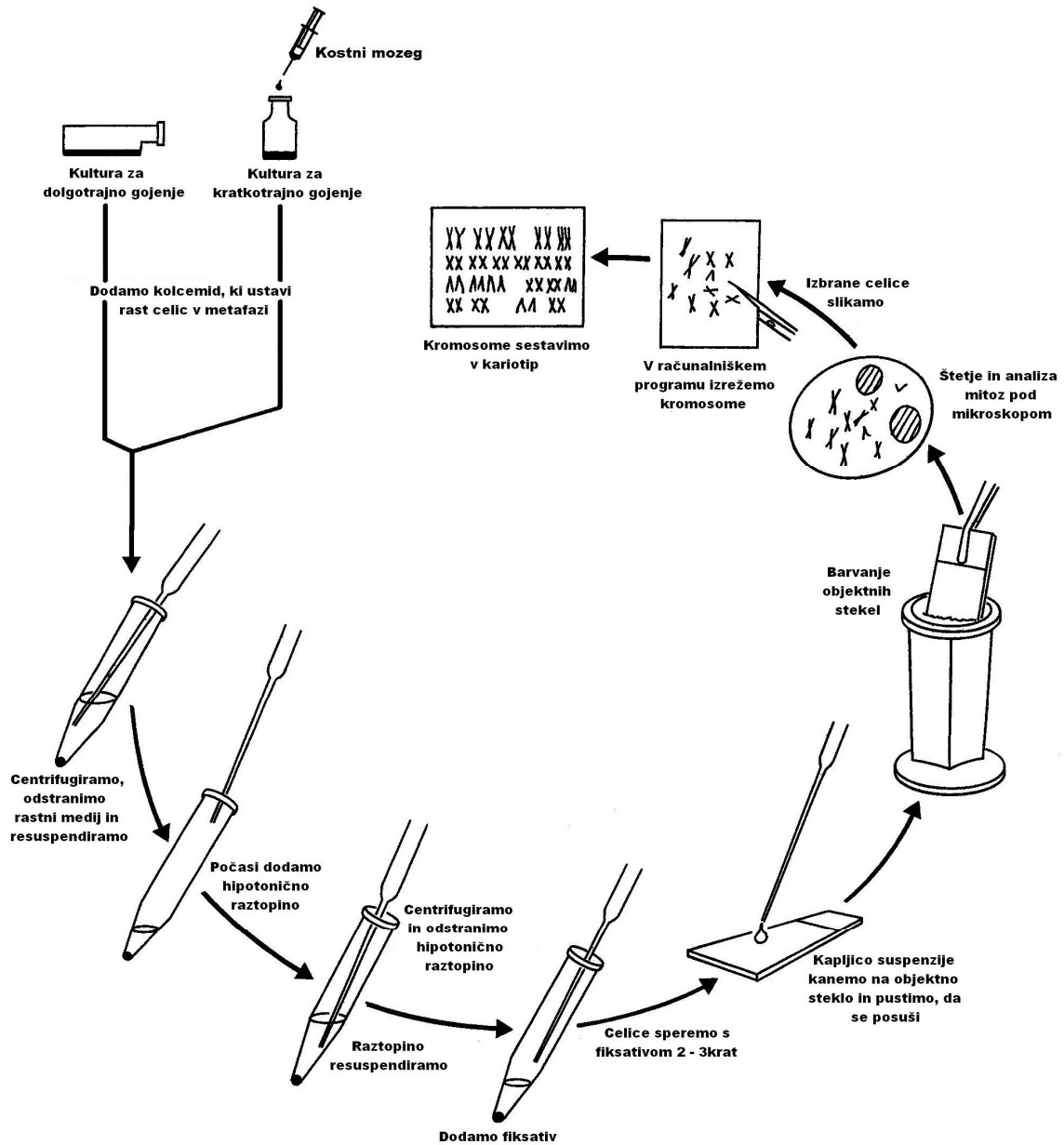
Za oceno morfologije kromosomov smo poslikali vsaj 3 in največ 6 mitoz za vsako vrsto gojišča, če smo jih seveda sploh našli. Vsako slikano mitozo smo si natančno ogledali in najprej ocenili kakovost proganja kromosomov in nato še kako dobro so le-ti razporejeni.

Proganje in razporeditev kromosomov za vsak parameter posebej smo ocenili številčno po naslednjem postopku:

- ◆ 1 – dobro;
- ◆ 2 – srednje;
- ◆ 3 – slabo.

Pregledana objektna stekla smo ob zaključku sprali še v raztopini Ultraclear (10 minut) in jih shranili v škatlo za shranjevanje objektnih stekel.

Vse posamezne stopnje za standardno citogenetsko preiskavo prikazuje slika 14.



Slika 14: Shema postopka standardne citogenetske preiskave (29).

3.4.10 Postopek preiskave fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH)

Predhodno ustrezno izolirane in fiksirane celice (3.4.5) smo nanesti na objektna stekla (3.4.6) in jih starali pol ure pri 60°C in pol ure pri 90°C.

3.4.10.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA

Pod invertnim mikroskopom smo nato preverili, če je preparat primeren za hibridizacijo. Celice so morale biti enakomerno razporejene in niso smele premočno svetiti. Z diamantnim rezilom smo označili področje na steklu, ki ustreza za izvedbo hibridizacije (velikosti približno 2x2 cm). Steklo smo označili na motnem robu s svinčnikom (priimek, sonda).

Na vodni kopeli (37°C) smo vmes že segreti kiveti za objektna stekla s po 100 mL spodaj navedenih raztopin in v vsaki zaporedoma pustili objektna stekla za 5 minut.

1. 2xSSC
2. raztopina pepsina

Na sobni temperaturi smo v kivete za objektna stekla pripravili še spiralne raztopine 2xSSC pufra in vanje predstavljali objektna stekla z vzorcem:

1. 2xSSC; 2 minuti
2. 2xSSC; 2 minuti
3. 2xSSC; 2 minuti
4. formaldehidna raztopina; 10 minut
5. 2xSSC; 2 minuti
6. 2xSSC; 2 minuti
7. 2xSSC; 2 minuti
8. 70% etanol (EtOH); 2 minuti
9. 90% EtOH; 2 minuti
10. 100% EtOH; 2 minuti, nato smo stekla dobro osušili.

3.4.10.2 Kodenaturacija vzorca in sonde (denaturacija/hibridizacija)

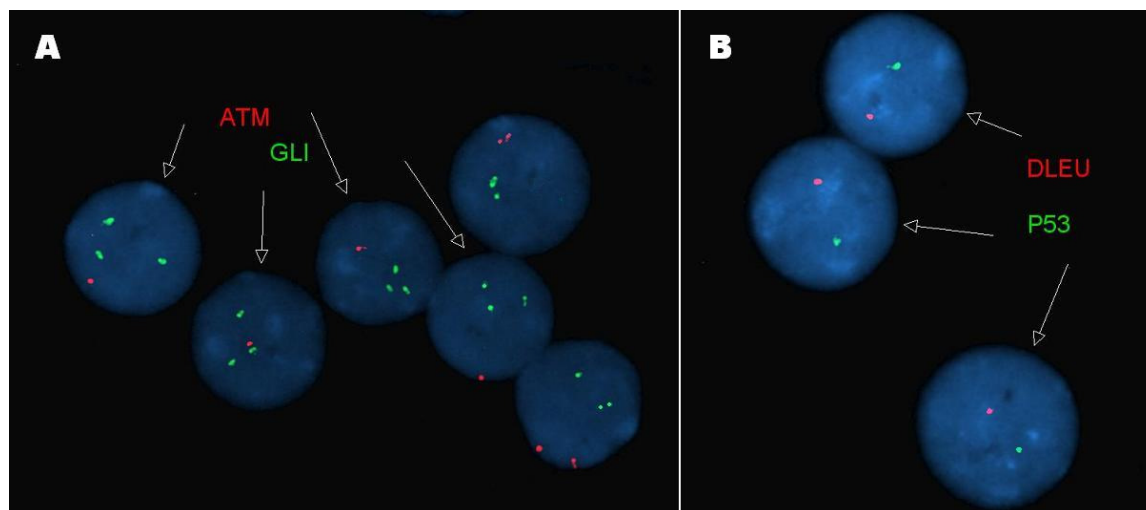
DNA-sonde smo vzeli iz hladilnika in jih na hitro centrifugirali, premešali in ponovno centrifugirali, da se je sonda zbrala na dnu. 10 μ L tako pripravljene sonde (Poseidon ON) smo nanесли na sredino označenega polja na steklu in nanjo položili krovno stekelce (22x22 mm), tako da ni mehurčkov. Robove krovnega stekelca smo zalili z »gumijastim cementom« za tesnjenje krovnega stekelca. Stekla smo nato položili na ploščo denaturatorja/hibridizatorja ThermoBrite, ter zagnali ustrezen program. Sonde in tarčna DNA so se najprej denaturirali 10 minut pri 75°C, nato pa se je aparat ohladil na 37°C in tako se je pričela hibridizacija sond. Hibridizacija je potekala ustrezen čas – navadno je to vsaj 16 ur, oziroma preko noči.

3.4.10.3 Spiranje stekel po hibridizaciji

1. S stekel smo odstranili krovna stekelca in stekla za 3 minute postavili v spiralno raztopino NP-40, ki smo jo predhodno segreli na 73°C.
2. Stekla smo nato prestavili za 3 minute v posodico s PBT na sobni temperaturi.
3. Na povsem mokro steklo, ki smo ga odcedili na staničevini, smo kanili 10 μ L DAPI Counterstain II ter ga pokrili z velikim krovnim steklom. Pri tem smo pazili, da niso nastali morebitni mehurčki.
4. S staničevino smo nato ovili stekla in jih dobro popivnali in osušili. Položili smo jih v črno plastično škatlo s pokrovom in jih postavili v hladilnik vsaj za pol ure.
5. Stekla smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom.

3.4.10.4 Vrednotenje preparatov

S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa in ustreznih filtrov smo ovrednotili preparat, ter ugotavljali spremembo števila signalov (zmanjšanje ali povečanje). Število signalov pri normalni in patološki celici je specifično za vsako uporabljeno DNA-sondo, zato smo pred začetkom štetja za vsako uporabljeno sondo preverili našete podatke. Pri sondah, kot sta Poseidon ON DLEU/p53 in ON ATM/GLI, ki smo ju uporabili za naše delo, sta pri normalnih celicah prisotna 2 rdeča in 2 zelena signala. V kolikor se je pojavil samo 1 signal za določeno barvo ali pa celo, da ni bilo signala, je šlo za delecijo (pri DLEU, p53 in ATM), v kolikor pa so se pojavili 3 signali, je šlo za trisomijo (pri GLI) (slika 15) (14, 15).



Slika 15: Primer, kako so vidni signali pri deleciji gena *ATM* in trisomiji 12 (A) (sonda ON *ATM* / *GLI*) (ID vzorca BI), ter deleciji del(13) in gena *TP53* (B) (sonda ON *DLEU* / *p53*) (ID vzorca DV).

Pri vrednotenju fluorescenčnih signalov smo se držali navodil za štetje pozitivnih in negativnih celic oziroma jeder – nismo šteli, če so si bila jedra preblizu in nismo mogli določiti njihovih robov (slika 16).



Slika 16: Pravila za štetje celic oziroma jeder pri preiskavi FISH.

Dva preiskovalca sta preštela vsak po 200 celic in sicer tako, da je vsak preštel po 100 celic v dveh ločenih področjih preparata. Če se je število izsledkov med preiskovancema razlikovalo za več kot 10%, je moral šteti še tretji preiskovalec – za rezultat smo tako upoštevali tisti dve vrednosti, ki sta odstopali za manj kot 10%. Končni rezultat smo podali kot delež (%) nenormalnih celic v vzorcu, za vsako uporabljeno DNA-sondo.

3.4.11 Statistična analiza

Za statistično analizo dobljenih vrednosti MI in preiskave FISH v gojišču KMM in TPA smo uporabili dvostranski Wilcoxonov test predznačenih rangov za dva odvisna vzorca (angl. *2-tailed Wilcoxon Signed Ranks Test*). To je neparametrični hipotezni test za primerjavo dveh med seboj odvisnih vzorcev. Lahko se uporablja kot alternativa parnemu Studentovemu t-testu, kadar se domneva, da populacija ni normalno porazdeljena. Ta test nas seznani, če med meritvami dveh odvisnih vzorcev obstajajo kakšne statistične razlike (30). Za ta neparametrični test smo se odločili na podlagi nenormalne porazdelitve opazovane spremenljivke in majhnega števila vzorcev. S testom smo lahko ugotovili ali je med gojiščema KMM in TPA prisotna statistično značilna razlika ($p < 0,05$) ali ne.

Dobljene vrednosti smo prikazali s pomočjo kvartilnih diagramov. To je priročen način, kjer so skupine podatkov grafično upodobljene v obliki tako imenovanih »škatel z ročaji« (angl. *box-and-whisker plots*). Vsaka škatla z ročajema ima pet točk: minimum (*min*), spodnji kvartil (Q_1), mediano (Q_2 , *Me*), zgornji kvartil (Q_3) in maksimum (*max*) (31, 32).

Prvi kvartil (Q_1), imenovan tudi spodnji kvartil ali 25. centil, je vrednost, od katere je 25 % vseh MI manjših in 75 % vseh MI večjih od vrednosti kvartila. Drugi kvartil (Q_2) je hkrati tudi mediana (*Me*). To je vrednost, ki razdeli populacijo na dva enaka dela – polovica vrednosti je od nje manjših in polovica vrednosti večjih. Tretji kvartil (Q_3), imenovan tudi zgornji kvartil ali 75. centil, pa je vrednost od katere je 75 % vseh MI manjših in le 25 % večjih od vrednosti kvartila (33).

Škatla, ki zajema srednjih 50 % vrednosti, sega med Q_1 in Q_3 (oziroma med 25. in 75. centilom) in je z mediano predeljena na dva dela. To območje srednjih vrednosti imenujemo tudi kvartilni razmik (31, 32, 34). Na obeh straneh sta škatli dodana ročaja, ki segata od škatle do najmanjšega oziroma največjega podatka (*min / max*), ki pa ne presega 1,5-kratne velikosti škatle. Če se pojavijo kakšne vrednosti, ki so oddaljene bolj, kot je dovoljena dolžina ročice, potem takšne vrednosti imenujemo osamelci ($^{\circ}$) in ekstremni osamelci (*) (31, 32).

Statistično analizo podatkov smo opravili z računalniškim statističnim programom SPSS (*SPSS 17.0 for Windows*).

4 REZULTATI

Za raziskovalno delo smo uporabili 30 vzorcev KM bolnikov s potrjeno diagnozo KLL. Celice vseh vzorcev smo kultivirali v dveh različnih gojiščih in sicer v gojišču KMM in gojišču KMM z dodatkom TPA (v nadaljevanju gojišče TPA).

Dobljene rezultate bomo predstavili na štiri načine:

- ◆ predstavitev dobljenih vrednosti mitotskih indeksov (MI)
- ◆ predstavitev ocene morfologije kromosomov
- ◆ predstavitev vrednosti fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) – v celoti in pri preurejenih kromosomskih spremembah
- ◆ predstavitev rezultatov statistične analize – statistična obdelava podatkov za MI in rezultate preiskave FISH

4.1 DOBLJENE VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV

V preglednici 3 so zbrani vsi podatki o 30-ih vzorcih KM KLL, vključno z izmerjenimi vrednostmi levkocitov, izračunanimi volumni vcepov (da smo dobili končno koncentracijo $1 \cdot 10^6$ celic/mL) in določenimi vrednostmi MI v posameznem gojišču po 24-urnem kultiviranju. Kjer je bilo celic zelo malo, jih nismo dodatno izgubljali z določitvijo številčne koncentracije.

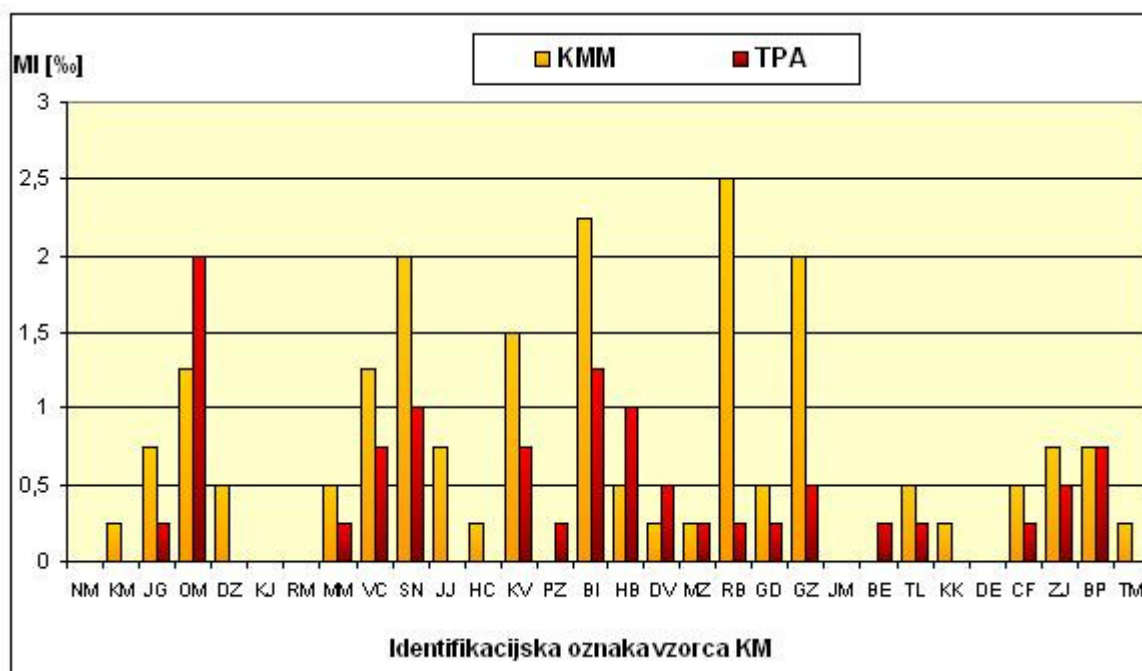
Vse vrednosti MI so aritmetične sredine določitev na dveh objektnih steklih, kjer smo na posameznem steklu prešteli 2-krat po 1000 celic. Poleg teh vrednosti smo izračunali še povprečno vrednost vseh vrednosti MI, ki je pri KMM znašala 0,675 ‰, pri TPA pa 0,375 ‰.

Preglednica 3: Mitotski indeksi (MI) glede na uporabljeno gojišče.

zaporedna številka	ID	izmerjeni levkociti [1 • 10 ⁹ celic/L]	volumen vcepka [mL]	MI [%o]	
				KMM	TPA
1	NM	malo celic	/	0	0
2	KM	malo celic	/	0,25	0
3	JG	68,4	0,469	0,75	0,25
4	OM	malo celic	/	1,25	2
5	DZ	malo celic	/	0,5	0
6	KJ	malo celic	/	0	0
7	RM	85,8	0,372	0	0
8	MM	malo celic	/	0,5	0,25
9	VC	91,2	0,351	1,25	0,75
10	SN	malo celic	/	2	1
11	JJ	malo celic	/	0,75	0
12	HC	25,2	0,635	0,25	0
13	KV	55,2	0,58	1,5	0,75
14	PZ	230,7	0,555	0	0,25
15	BI	25,8	0,62	2,25	1,25
16	HB	239,7	0,534	0,5	1
17	DV	84,9	0,377	0,25	0,5
18	MZ	98,7	0,324	0,25	0,25
19	RB	94,5	0,339	2,5	0,25
20	GD	20,7	0,773	0,5	0,25
21	GZ	malo celic	/	2	0,5
22	JM	59,4	0,539	0	0
23	BE	66,6	0,48	0	0,25
24	TL	114,9	0,557	0,5	0,25
25	KK	196,8	0,325	0,25	0
26	DE	42,0	0,381	0	0
27	CF	158,4	0,404	0,5	0,25
28	ZJ	104,4	0,307	0,75	0,5
29	BP	198,6	0,322	0,75	0,75
30	TM	89,7	0,357	0,25	0
povprečna vrednost				0,675	0,375

ID – identifikacijska oznaka vzorca KM; MI – mitotski indeks

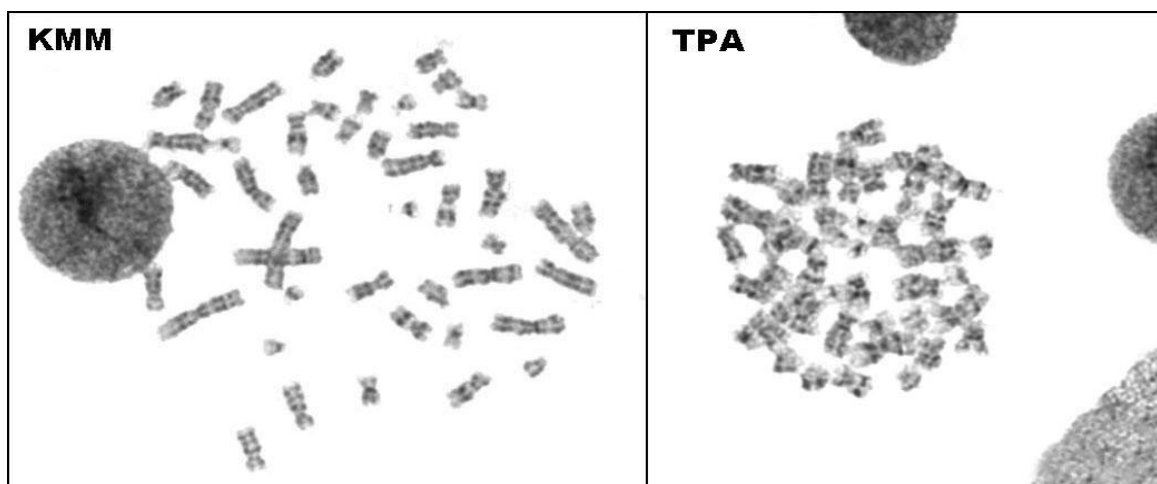
Primerjavo uspešnosti gojenja celic glede na vrednosti MI po kratkotrajnem gojenju v gojišču KMM in TPA prikazuje slika 17. Slika povzema podatke, ki so prikazani v predhodni preglednici 3.



Slika 17: Primerjava mitotskih indeksov po gojenju celic kostnega mozga v gojišču KMM in TPA.

4.2 OCENA MORFOLOGIJE KROMOSOMOV

Za oceno morfologije kromosomov smo uporabili le vzorce KM, pri katerih smo našli in poslikali vsaj 3 mitoze za vsako gojišče. Pri vsaki mitozni smo ocenili kakovost proganja kromosomov in razporeditev le-teh. Proganje in razporeditev smo ocenili semi kvantitativno po naslednjem postopku: **1 – dobro, 2 – srednje in 3 – slabo**. Primer ocene pri enem izmed vzorcev prikazuje slika 18.



Slika 18: Primer dobrega proganja in razporeditve kromosomov (KMM), ter dobrega proganja in slabe razporeditve kromosomov (TPA) (ID vzorca: RB).

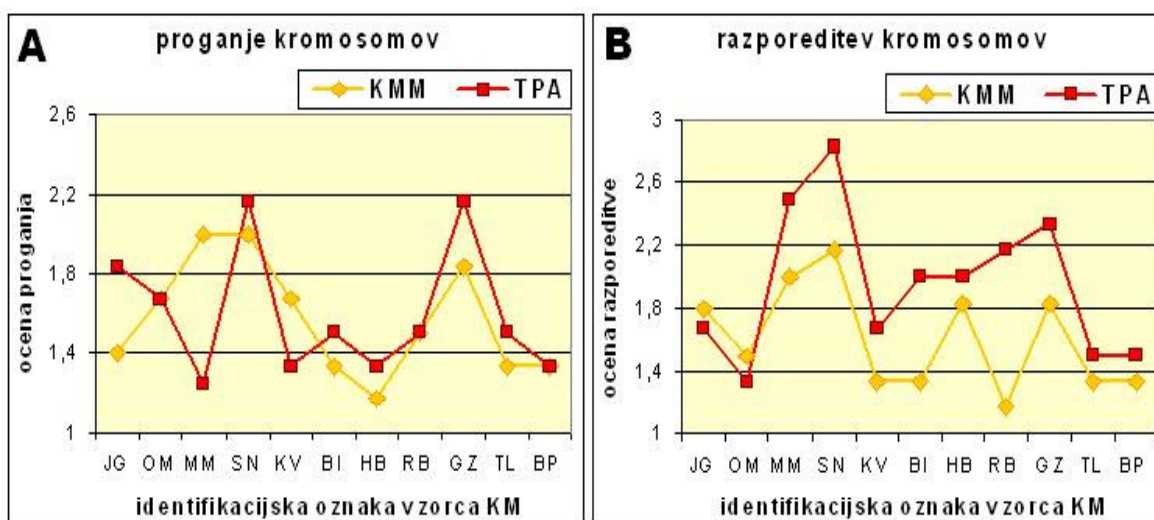
Podatki o vseh 11 vzorcih KM, ki so bili primerni za analizo morfologije kromosomov, so zbrani v preglednici 4. Podane ocene proganja in razporeditve kromosomov so izražene z aritmetično sredino.

Preglednica 4: Rezultati ocene morfologije kromosomov.

zapored. številka	ID	KMM		TPA	
		proganje	razporeditev	proganje	razporeditev
1	JG	1,4	1,8	1,83	1,67
2	OM	1,67	1,5	1,67	1,33
3	MM	2	2	1,25	2,5
4	SN	2	2,17	2,17	2,83
5	KV	1,67	1,33	1,33	1,67
6	BI	1,33	1,33	1,5	2
7	HB	1,17	1,83	1,33	2
8	RB	1,5	1,17	1,5	2,17
9	GZ	1,83	1,83	2,17	2,33
10	TL	1,33	1,33	1,5	1,5
11	BP	1,33	1,33	1,33	1,5
povpr. vrednost		1,57	1,6	1,6	1,95

ID – identifikacijska oznaka vzorca KM

Primerjavo ocene morfologije kromosomov v gojišču KMM in TPA glede na proganje in razporeditev kromosomov prikazuje slika 19.



Slika 19: Primerjava ocene morfologije kromosomov v gojišču KMM in TPA glede na proganje (A) in razporeditev kromosomov (B).

4.3 DOLOČITEV VELIKOSTI MALIGNEGA KLONA S PREISKAVO FISH

Kot tretji kriterij smo določali obseg malignega klona v obeh gojiščih. Analizirali smo le vzorce, pri katerih smo pri rednem diagnostičnem postopku v laboratoriju za citogenetiko v gojišču KMM določili vsaj 20% celic s tarčno preureditvijo.

Vseh določenih preureditev za preiskavo FISH je bilo 24 pri 18-ih različnih vzorcih KM. Pri 6-ih vzorcih sta bili določeni dve spremembi istočasno. Rezultati preiskave FISH so predstavljeni v preglednici 5.

Preglednica 5: Delež celic s tarčno preureditvijo, določeno s FISH preiskavo, v dveh gojiščih.

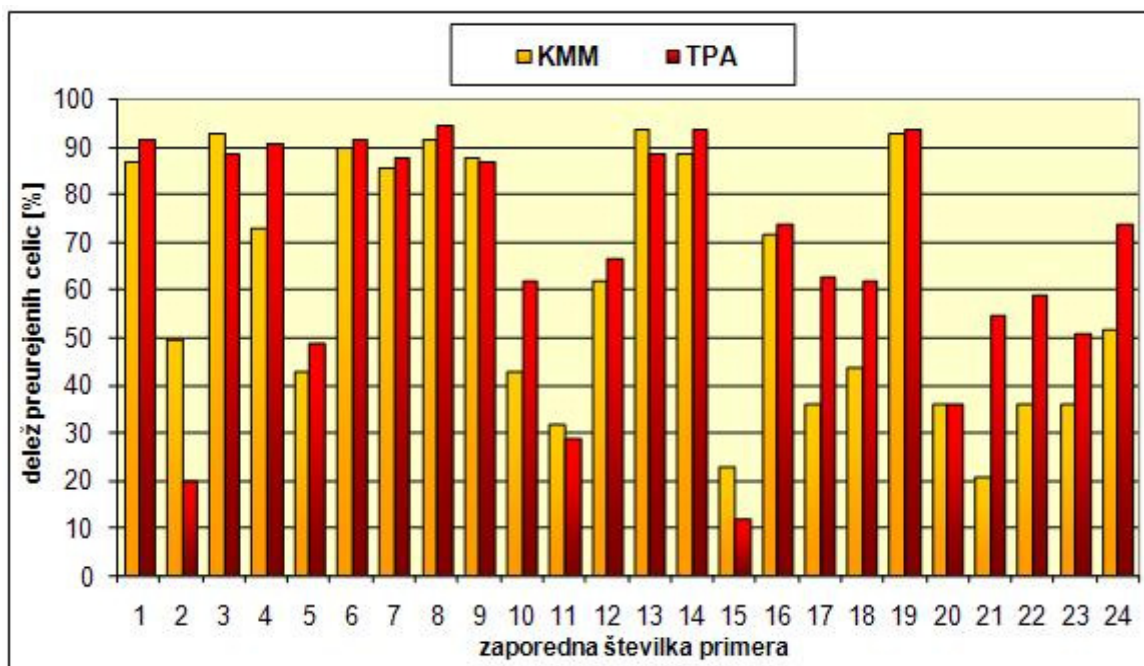
zaporedna številka	ID	DNA-sonda (Poseidon ON)	kromosomska preureditev	delež preurejenih celic [%]	
				KMM	TPA
1	KM	DLEU	del(13)	87	92
2	JG	DLEU	del(13)	50	20
3	DZ	DLEU	del(13)	93	89
4	KJ	DLEU	del(13)	73	91
5	KV	DLEU	del(13)	43	49
6	HB	DLEU	del(13)	90	92
7	DV	DLEU	del(13)	86	88
8	MZ	DLEU	del(13)	92	95
9	BE	DLEU	del(13)	88	87
10	TL	DLEU	del(13)	43	62
11	KK	DLEU	del(13)	32	29
12			bialelna del(13)	62	67
13	DZ	p53	del. gena <i>TP53</i>	94	89
14	DV	p53	del. gena <i>TP53</i>	89	94
15	BE	p53	del. gena <i>TP53</i>	23	12
16	CF	p53	del. gena <i>TP53</i>	72	74
17	BI	ATM	del. gena <i>ATM</i>	36	63
18	GD	ATM	del. gena <i>ATM</i>	44	62
19	JM	ATM	del. gena <i>ATM</i>	93	94
20	TL	ATM	del. gena <i>ATM</i>	36	36
21	NM	GLI	+12	21	55
22	VC	GLI	+12	36	59
23	BI	GLI	+12	36	51
24	BP	GLI	+12	52	74

ID – identifikacijska oznaka vzorca KM

4.3.1 Primerjava rezultatov pri vseh uporabljenih DNA-sondah

Za to analizo smo uporabili vseh 24 rezultatov preiskave FISH – torej smo vanjo vključili vse primere z delecijo del(13), delecije gena *ATM* in *TP53* ter trisomijo kromosoma 12.

Primerjavo deleža celic s specifično preureditvijo po gojenju celic KM v gojišču KMM in TPA, ne glede na tarčno spremembo, prikazuje slika 20.



Slika 20: Primerjava velikosti klona, določeno s FISH preiskavo, po gojenju celic kostnega mozga v gojiščih KMM in TPA, ne glede na kromosomske spremembe.

4.3.2 Primerjava rezultatov pri specifičnih kromosomskih preureditvah

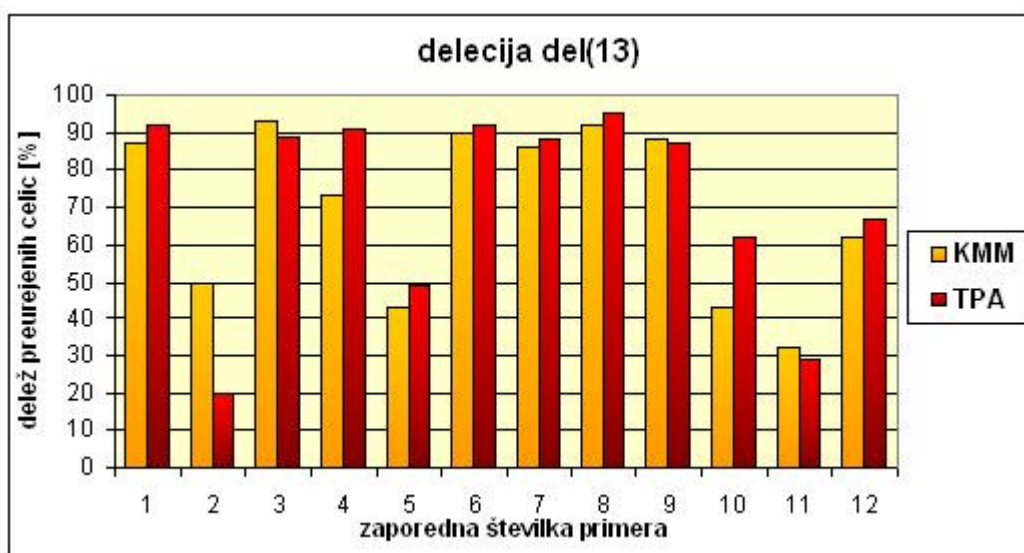
Analizirali smo 4 različne kromosomske spremembe, ki so značilne za bolnike s KLL: 12 primerov (50%) z delecijo del(13) (ON DLEU) in po 4 primere delecije gena *TP53* (ON p53), delecije gena *ATM* (ON ATM) in trisomije 12 (ON GLI) (Preglednica 5). Slednje tri bomo v nadaljevanju bolj ali manj le omenili, saj s štirimi določitvami ne moremo zanesljivo sklepati in potrditi, da je katero od uporabljenih gojišč boljše.

4.3.2.1 Rezultati FISH pri deleciji del(13)

V analizo smo vključili 12 primerov (50%) z delecijo del(13) (ON DLEU), ki so predstavljeni v preglednici 5.

V 1 primeru je šlo za bialelno delecijo del(13) (ID KK) kar pomeni, da pri šteju pod fluorescenčnim mikroskopom ni bilo zaznati nobenega signala (pri monoalelni deleciji del(13) je namreč prisoten 1 signal) (preglednica 5).

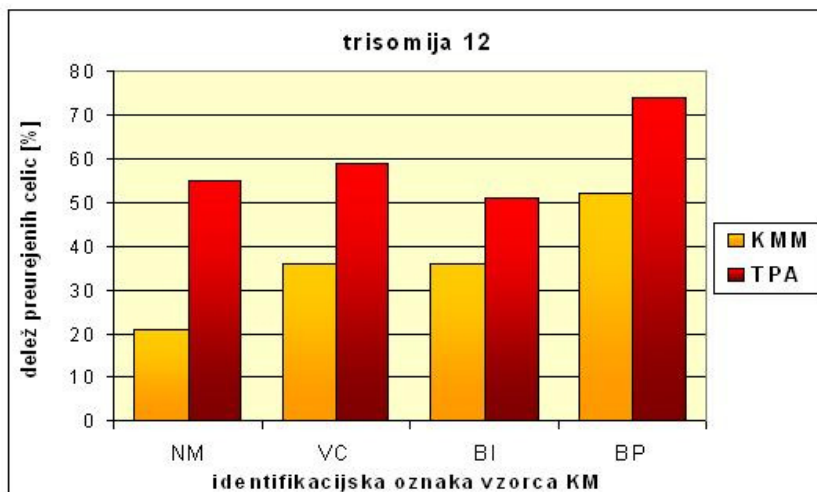
Primerjavo rezultatov FISH z delecijo del(13) po gojenju v gojiščih KMM in TPA, prikazuje slika 21.



Slika 21: Primerjava deleža celic z delecijo del(13) po gojenju v gojiščih TPA in KMM.

4.3.2.2 Rezultati FISH pri trisomiji 12

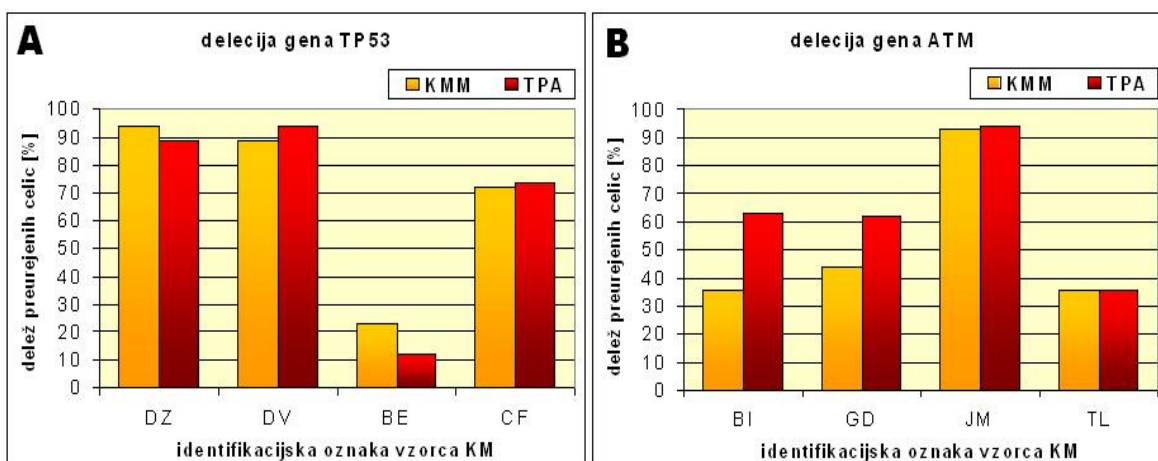
Čeprav smo lahko med seboj primerjali le 4 vzorce, je razlika med gojiščema KMM in TPA izrazita (preglednica 5). Primerjavo deleža celic s trisomijo 12 prikazuje slika 22.



Slika 22: Primerjava deleža celic s trisomijo 12 po gojenju v gojiščih TPA in KMM.

4.3.2.3 Rezultati FISH pri deleciji genov TP53 (17p13) in ATM (11q22)

Tako pri deleciji *TP53* kot tudi deleciji *ATM* smo primerjali le po 4 rezultate. Primerjavo za vsako kromosomsko preureditev posebej prikazuje slika 23.



Slika 23: Primerjava deleža celic z delecijo genov *TP53* (A) in *ATM* (B).

4.4 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

Za primerjavo vrednosti MI in preiskave FISH med gojiščema KMM in TPA smo uporabili neparametrični test, in sicer dvostranski Wilcoxonov test predznačenih rangov za odvisna vzorca. Izračunali smo tudi vrednosti kvartilov, ki smo jih nato še grafično predstavili s pomočjo kvartilnih diagramov.

4.4.1 Rezultati statistične analize mitotskih indeksov

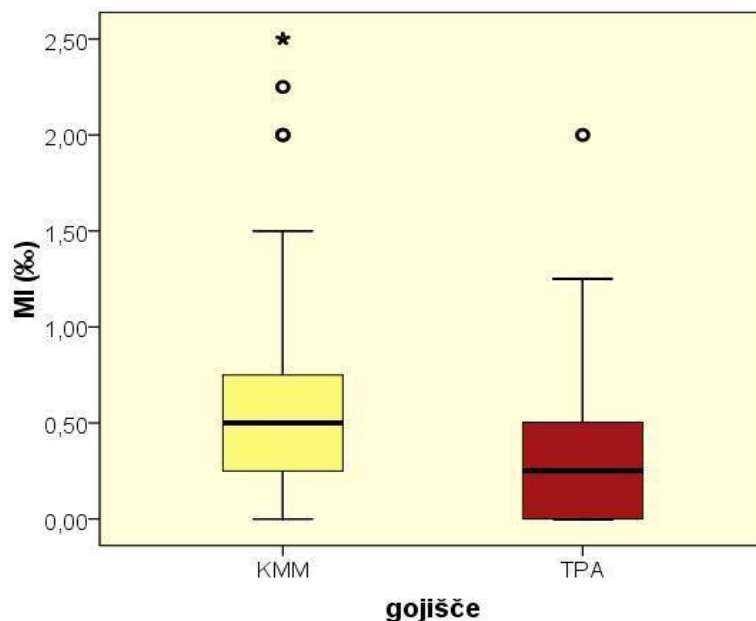
V statistično analizo MI smo vključili vseh 30 vzorcev, gojenih tako v gojišču KMM kot tudi TPA. Rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov nam je pokazal, da je razlika med MI dobljenimi v enem in drugem gojišču statistično pomembna ($p < 0,05$).

V preglednici 6 so zbrani parametri statistične analize vrednosti MI po gojenju celic KM v gojišču KMM in TPA. Prikazane so vrednosti mediane (Me), spodnjega in zgornjega kvartila (Q_1 in Q_3) ter minimum in maksimum populacije (min_{pop} in max_{pop}). Slednja parametra predstavljata najmanjšo oziroma največjo vrednost celotne populacije.

Preglednica 6: Porazdelitev vrednosti mitotskih indeksov. Primerjava parametrov statistične analize v gojišču KMM in gojišču TPA.

gojišče	min_{pop}	Q_1	Me	Q_3	max_{pop}
KMM	0	0,25	0,5	0,75	2,5
TPA	0	0	0,25	0,5	2

Dobljene vrednosti MI smo grafično prikazali s pomočjo kvartilnih diagramov. Slika 24 prikazuje porazdelitev vrednosti MI v gojiščih KMM in TPA. Vidimo, da se nad vrednostmi obeh gojišč pojavijo tudi nekateri osamelci (°) in ekstremni osamelci (*). Srednja polovica vrednosti, kot lahko razberemo iz pripadajoče preglednice 6, pri gojišču KMM zajema vrednosti med 0,25 ‰ in 0,75 ‰, medtem ko pri gojišču TPA zajema vrednosti med 0 ‰ in 0,5 ‰.



Slika 24: Kvartilni diagrami porazdelitve vrednosti mitotskih indeksov v gojišču KMM in TPA.

4.4.2 Statistične analize podatkov preiskave FISH za vse opazovane kromosomske preureditve

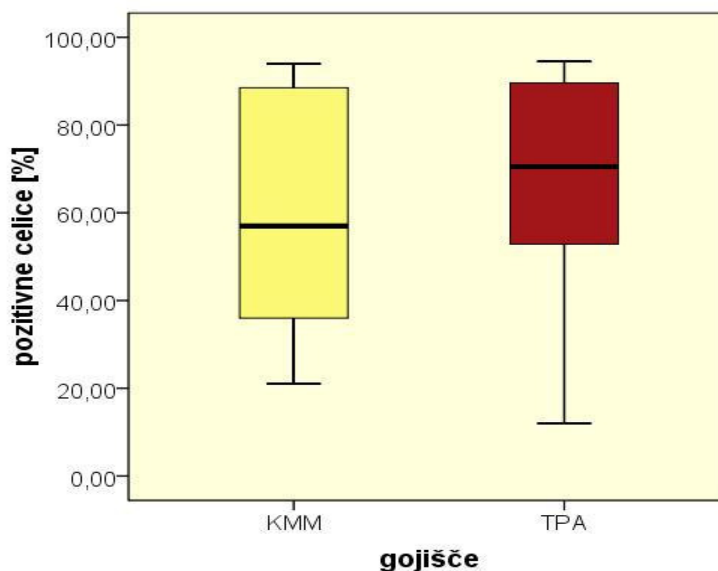
Razlike med vsemi vrednostmi FISH, dobljenimi v gojišču KMM in TPA, ne glede na kromosomske spremembe, smo prav tako analizirali z dvostranskim Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. V statistično analizo smo vključili 24 primerov, kjer je bila narejena preiskava FISH. Rezultat Wilcoxonovega testa je pokazal, da je razlika med vrednostmi FISH, dobljenimi v gojišču KMM in TPA statistično pomembna ($p < 0,05$).

Izračunani parametri statistične analize deleža pozitivnih celic po gojenju v gojiščih KMM in TPA za vse opazovane kromosomske spremembe, so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Porazdelitev parametrov statistične analize določenih deležev pozitivnih celic v gojiščih KMM in TPA, ne glede na kromosomske spremembe.

gojišče	min _{pop}	Q ₁	Me	Q ₃	max _{pop}
KMM	21	36	57	88,25	94
TPA	12	54	70,5	89,5	95

Porazdelitev vrednosti deleža celic s tarčno preureditvijo v gojiščih KMM in TPA ne glede na kromosomske preureditve, prikazuje slika 25. Iz slike in pripadajoče preglednice 7 lahko razberemo, da srednja polovica vrednosti (torej vrednosti, ki se nahajajo med kvartiloma Q_1 in Q_3) pri gojišču KMM zajema vrednosti med 36 % in 88,25 %, pri gojišču TPA pa vrednosti med 54 % in 89,5 %.



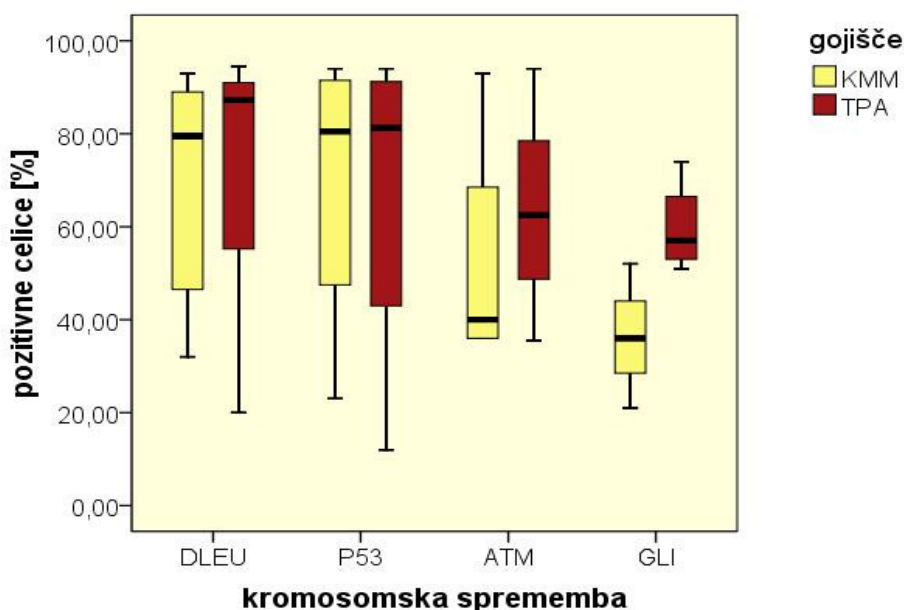
Slika 25: Kvartilni diagrami porazdelitve deleža pozitivnih celic v gojiščih KMM in TPA, ne glede na kromosomske preureditve.

4.4.3 Statistična analiza podatkov preiskave FISH za posamezne opazovane kromosomske preureditve

Izmed 24 primerov, kjer smo izvedli preiskavo FISH je bilo 12 primerov z delecijo del(13), 4 primeri z delecijo gena *TP53*, 4 primeri z delecijo gena *ATM* in prav tako 4 primeri s trisomijo 12. Razlike med vrednostmi, dobljenimi v gojišču KMM in TPA, smo z dvostranskim Wilcoxonovim testom predznačenih rangov lahko analizirali le v primeru del(13) ($N > 6$), medtem ko je bilo preostalih primerov premalo (samo po 4), da bi rezultate lahko statistično obdelali.

Pri del(13) smo v statistično analizo vključili 12 primerov. Rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov nam je pokazal, da je razlika med vrednostmi, dobljenimi v gojišču KMM in TPA statistično nepomembna ($p > 0,05$).

Rezultate statistične analize prikazuje slika 26. Na njej so prikazane vrednosti numerične spremenljivke (pozitivne celice v %), dobljene glede na različne kromosomske spremembe. Rumene škatle z ročaji predstavljajo porazdelitev vrednosti pozitivnih celic po gojenju v gojišču KMM, rdeče pa porazdelitev vrednosti po gojenju v gojišču TPA. Kromosomske preureditve *TP53*, *ATM* in trisomijo 12 smo sicer tudi grafično prikazali, vendar teh rezultatov statistične analize ne bomo mogli jemati za zanesljive, ampak lahko o njih bolj ali manj samo razmišljamo, kako bi se izkazali, če bi bila populacija vrednosti pri teh kromosomskih preureditvah večja.



Slika 26: Kvartilni diagrami porazdelitve vrednosti pozitivnih celic glede na specifično kromosomsko preureditev. Slika prikazuje razlike po gojenju celic kostnega mozga v gojišču KMM in TPA za vsako kromosomsko spremembo posebej.

5 RAZPRAVA

Glavni namen dela je bila primerjava med običajnim gojiščem (gojišče KMM) in med enakim gojiščem, ki pa smo mu dodali še reagent 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (gojišče KMM z dodatkom TPA oziroma kar gojišče TPA). Najprej smo primerjali vrednosti MI, nato smo nekaj mitoz z ustreznim računalniškim programom slikali in ocenili še morfolgijo kromosomov. Nazadnje smo primerjali še delež pozitivnih celic za nekatere kromosomske preureditve, ki jih s preiskavo FISH rutinsko določamo pri KLL. Dobljene vrednosti MI in deleže pozitivnih celic smo na koncu še statistično analizirali z dvostranskih Wilcoxonovim testom predznačenih rangov, ki nam je razkril, če med gojiščema KMM in TPA obstajajo nekatere statistično značilne razlike.

5.1 VREDNOSTI MITOTSKIH INDEKSOV

MI so po kultiviranju celic v gojišču KMM v večini primerov nekoliko večji kot v gojišču TPA (preglednica 3). To se je pokazalo kar v 18 primerih (60 %), medtem ko je v 2 primerih (ID RB in GZ) MI v gojišču KMM kar nekajkrat večji kot v gojišču TPA. Ravno nasprotno pa se je izkazalo v 5-ih primerih (16,7 %) (ID OM, PZ, HB, DV in BE), ko je bilo kultiviranje v gojišču TPA uspešnejše kot v gojišču KMM. V dveh primerih (6,6 %) se vrednosti MI med gojišči KMM in TPA ne razlikujejo (ID MZ in BP), pri 5-ih primerih (16,7 %) pa pod mikroskopom ni bilo zaslediti niti ene same celice v fazi delitve (ID NM, KJ, RM, JM in DE) (slika 17).

Da je gojišče KMM nekoliko boljše od gojišča TPA, nam potrdi tudi povprečna vrednost vseh MI, ki je pri KMM (0,675 ‰) skoraj za 2-krat višja kot pri TPA (0,375 ‰).

Rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov je pokazal, da je razlika med MI dobljenimi v enem in drugem gojišču statistično signifikantna ($p < 0,05$), kar pomeni, da je gojišče KMM v primeru MI statistično gledano boljše od gojišča TPA.

V preglednici 6 razberemo, da je spodnji kvartil (Q_1) večji v gojišču KMM ($Q_1 = 0,25$ ‰). Enako se pokaže pri mediani, ki v gojišču KMM znaša 0,5 ‰, v TPA pa 0,25 ‰. Tudi pri tretjem oziroma zgornjem kvartilu (Q_3) se je bolje izkazalo gojišče KMM ($Q_3 = 0,75$ ‰).

Če pogledamo še minimum populacije (min_{pop}) je le-ta v obeh gojiščih enak, medtem ko je maksimum populacije (max_{pop}) višji v gojišču KMM z 2,5 ‰ kot pa v gojišču TPA z 2 ‰.

5.2 REZULTATI OCENE MORFOLOGIJE KROMOSOMOV

Pri oceni morfologije kromosomov (preglednica 4, slika 19) se je glede na proganje kromosomov malenkost bolje izkazalo gojenje celic v gojišču KMM (povprečna vrednost 1,57) kot pa v gojišču TPA (1,6). Prav tako se je gojišče KMM bolje izkazalo pri razporeditvi kromosomov (1,6) napram gojišču TPA (1,95). Pri proganju kromosomov se je dobro z oceno manj ali enako 1,5 izkazalo 6 vzorcev (54,5 ‰) v gojišču KMM in kar 7 vzorcev (63,6 ‰) v gojišču TPA, medtem ko se je pri razporeditvi kromosomov dobro izkazalo 6 vzorcev v gojišču KMM in le 3 vzorci (27,3 ‰) v gojišču TPA. V gojišču KMM je bilo proganje najboljše pri vzorcu HB, razporeditev pa pri vzorcu RB, medtem ko je bilo v gojišču TPA proganje najboljše pri vzorcu MM, razporeditev pa pri vzorcu OM. Najslabše so se kromosomi progali in razporejali pri vzorcu SN (slika 19).

5.3 OBSEG MALIGNEGA KLONA

5.3.1 Obseg malignega klona pri vseh uporabljenih DNA-sondah

Ne glede na tarčno kromosomsko spremembo smo v večini primerov določili večji obseg klona po gojenju celic v gojišču TPA. To se je pokazalo kar v 17 primerih (70,8 ‰), medtem ko je bil delež pri gojišču KMM večji le v 6-ih primerih (25,0 ‰) in enak v enem primeru (4,2 ‰) (preglednica 5). Razlike v rezultatih med gojiščema za več kot 10 ‰ so se pojavile pri 10-ih primerih, od tega je bil rezultat večji pri TPA kar v 8-ih primerih, pri uporabi gojišča KMM pa le v dveh (zaporedni številki 2 in 15).

Večje vrednosti praviloma dosegajo paralelke iz gojišča TPA (slika 20). Precejšnja razlika med gojiščema (vsaj 15 ‰) se pojavi pri 9-ih primerih, od tega je le v enem primeru rezultat večji pri gojišču KMM (primer 2). Pri ostalih 8-ih primerih, kjer so večji deleži v gojišču TPA, gre v 4-ih primerih za trisomijo 12 (ON GLI) (primeri 21, 22, 23 in 24), v dveh za delecijo gena *ATM* (primera 17 in 18) in v dveh za delecijo del(13) (ON DLEU) (primera 4 in 10).

Rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov je pokazal, da je razlika med vrednostmi FISH, dobljenimi v gojišču KMM in TPA statistično pomembna ($p < 0,05$), kar pomeni, da je gojišče TPA v primeru preiskave FISH statistično gledano boljše od gojišča KMM. Minimum populacije (min_{pop}) je celo višji pri gojišču KMM, medtem ko so vrednosti pri vseh ostalih parametrih višje pri gojišču TPA (preglednica 7). Pri prvem kvartilu (Q_1) in mediani (Me) je razlika med vrednostmi obeh gojišč za slabih 20 % višja v prid gojišču TPA, medtem ko pri tretjem kvartilu (Q_3) in maksimumu populacije (max_{pop}) ta velika razlika upade, a je še vedno za 1 % v premoči gojišče TPA.

Pri preiskavi FISH dobimo večje vrednosti v gojišču TPA napram gojišču KMM (slika 25). Če podrobneje pogledamo, vidimo da je mediana v gojišču KMM (Me = 57 %) približno v isti liniji (višini) kot spodnji kvartil v gojišču TPA ($Q_1 = 54$ %) – torej je pri KMM v tej višini že okoli 50 % vrednosti, medtem ko je pri TPA tu šele približno 25% vseh vrednosti.

5.3.2 Obseg malignega klona pri specifičnih preureditvah

Večji delež pozitivnih celic pri deleciji del(13) smo dobili po gojenju v gojišču TPA v 8-ih primerih, medtem ko se je ravno obratno pokazalo v 4-ih primerih (ID JG, DZ, BE in monoalelna DLEU pri KK) (preglednica 5). Razliko med gojiščema večjo kot 15 % smo opazili le v treh primerih, med katerimi je bil rezultat v dveh primerih večji pri TPA, v enem primeru pa pri gojišču KMM in to kar s 30 % razliko (slika 21).

V preglednici 5 vidimo, da je pri trisomiji 12 razlika med gojiščema KMM in TPA izrazita. V gojišču TPA pri trisomiji 12 očitno dobimo večji delež klona kot pri gojišču KMM. Le v enem primeru (ID BI) je bila med gojiščema razlika manjša kot 20 %. Da so vrednosti paralelne iz gojišča TPA izrazito večje kot iz gojišča KMM je razvidno s slike 22.

Pri preureditvah gena *TP53* in *ATM* nismo zaznali bistvenih odstopanj med gojiščema KMM in TPA. S precejšnjo razliko med gojiščema izstopata le 2 primera (ID BI in GD) pri deleciji gena *ATM*, medtem ko v ostalih primerih, tako pri *ATM* kot pri *TP53*, ni neke bistvene razlike (preglednica 5, slika 23).

Rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov je pri deleciji del(13) pokazal, da je razlika med vrednostmi, dobljenimi v gojišču KMM in TPA statistično nepomembna ($p > 0,05$). To pomeni, da pri del(13) med gojiščema KMM in TPA ni statistično značilnih

razlik, torej sta si gojišči med seboj enaki. Ostale kromosomske preureditve imajo premalo vrednosti (le po 4), da bi lahko rezultate statistične analize vrednotili za zanesljive.

Pri deleciji gena *ATM* so vrednosti nekoliko večje pri gojišču TPA (slika 26) – da pa bi to lahko potrdili, bi seveda potrebovali več vrednosti za statistično analizo. Kot zadnjo kromosomsko preureditev pa moramo omeniti še trisomijo 12, kjer so vrednosti pri uporabi gojišča TPA vedno večje v primerjavi z gojiščem KMM. Z veliko zanesljivostjo lahko sklepamo, da je gojišče TPA primernejše, čeprav imamo za to kromosomsko spremembo le 4 vrednosti.

5.4 ZAKLJUČEK

Pri bolnikih s KLL sta ključna razloga za težave pri izvedbi standardne citogenetske preiskave (kariotipizacija) zelo majhen MI in slabša morfologija kromosomov. To smo lahko opazili tudi pri našem delu. V gojišču KMM smo določili večje vrednosti MI kot v gojišču TPA, čeprav naj bi TPA spodbudil delitev limfocitov B in s tem povečal MI. Prav tako se je pri oceni morfologije kromosomov, kjer smo se osredotočili na proganje in razporeditev kromosomov, nekoliko bolje izkazalo gojišče KMM.

Zanimalo nas je še, kako način gojenja vpliva na delež preurejenih celic, določenih s preiskavo FISH. Že ob nanosu vzorca na objektno steklo in preverjanju gostote celic pod invertnim mikroskopom smo opazili, da so v preparatih, nanesenih iz gojišča TPA interfazne celice zelo lepe (velike in puhaste), medtem ko so interfazne celice v preparatih KMM zelo drobne in temne. Večje in bolj puhaste celice pomenijo boljše preparate za preiskavo FISH.

Tako se je pri preiskavi FISH, upošteva vse kromosomske preureditve, bolje izkazalo gojišče TPA. To torej pomeni, da reagent TPA spodbuja predvsem razmnoževanje celic s kromosomskimi preureditvami (maligne oziroma tumorske). Primerjava z literaturnimi navedbami (27, 28) pokaže, da, smo z našim delom dobili podobne rezultate pri preiskavi FISH (večji delež preurejenih celic v gojišču z dodatkom TPA), medtem ko so se pri nas rezultati MI izkazali za ravno obratne (pri nas se je gojišče stimulirano z dodatkom TPA odrezalo slabše kot nestimulirano gojišče KMM). To pa lahko pojasnimo še na en način; dobljeni rezultati namreč kažejo, da TPA stimulira razmnoževanje tumorskih (preurejenih)

celic, zato delež normalnih upade. Odtod tudi nižji delež v gojišču TPA. V literaturi pa najdemo tudi podatke, da ima TPA tumorsko zaviralno funkcijo – torej zavira rast malignih celic. Poleg tega je bil omenjen tudi kot zdravilo pri zdravljenju različnih hematoloških tumorjev (23, 25).

Glede na kromosomske preureditve sta se gojišči KMM in TPA pri del(13) in deleciji gena *TP53* izkazali za enakovredni, medtem ko se je pri deleciji gena *ATM* in trisomiji 12 boljše izkazalo gojišče TPA. Ta razlika je opazna zlasti pri trisomiji 12, vendar zaradi premajhnega števila vrednosti tega nismo mogli tudi statistično potrditi.

Za uspešno izvedbo standardne citogenetske preiskave je ključnega pomena, da analiziramo maligne celice v metafazi mitoze. Vendar se prav pri KLL pogosto zgodi, da pri rednem diagnostičnem postopku, kjer se uporablja gojišče KMM, ni preurejenih mitoz, ampak le mitoze, kjer je kariogram normalen. Obenem pa FISH preiskava potrdi ponavljajoče kromosomske preureditve. Kariotipizacija zgolj normalnih celic pa nima klinične vrednosti.

Pri našem delu smo tako ugotovili, da TPA ne poveča celokupnega MI, marveč poveča delež pozitivnih (malignih) celic pri preiskavi FISH. Se pravi: če so sicer pogostejše mitoze v gojišču KMM v veliki večini primerov normalne, je večja verjetnost, da so redke najdene mitoze v gojišču TPA preurejene. Tak primer se je namreč dogodil pri rednem diagnostičnem postopku pri bolniku z ID NM, ko smo našli eno in edino preurejeno mitozo le na preparatu, nanesenem iz gojišča TPA. Ker pa standardna citogenetska analiza ni bila vsebina našega dela, bi bilo to potrebno dodatno preveriti.

Se pa poraja vprašanje za koliko bi se standardna citogenetska preiskava podaljšala, če bi se v redni diagnostični postopek uvedlo gojenje s TPA z manjšim MI? KLL nedvomno spada med bolezni, kjer je MI majhen, zato je lahko ena sama deleča se celica (mitoza) lahko edina se deleča maligna celica (13). Zato bi bilo morda to vendarle smiselno.

6 SKLEPI

Ugotovili smo, da se je za izvedbo standardne citogenetske preiskave, gledano na delež mitoz, bolje izkazalo kultiviranje celic KM v že doslej uporabljanem gojišču KMM.

Gojišče KMM se je nekoliko bolje izkazalo napram gojišču TPA tudi glede proganja in razporeditve kromosomov – torej pri oceni morfologije le-teh.

Pri preiskavi FISH, se je ne glede na tarčno kromosomsko spremembo oziroma preureditev, za boljše izkazalo gojišče TPA, kjer smo določili večje število pozitivnih (malignih) celic.

Pri drugem delu preiskave FISH, kjer smo opazovali vrednosti pri posameznih kromosomskih preureditvah, pa so se pokazali različni rezultati. Pri del(13) in deleciji gena *TP53* sta se gojišči KMM in TPA izkazali za primerljivi, medtem ko se je pri deleciji gena *ATM* in trisomiji 12 za boljše izkazalo gojišče TPA. Za slednji spremembi nismo imeli zadostnega števila vrednosti, da bi rezultate tudi statistično potrdili.

Če povzamemo: standardno citogenetsko preiskavo lažje izvedemo s celicami iz gojišča KMM, vendar je verjetnost, da bo kariogram normalen, večja. Preparate za preiskavo FISH pa je vsekakor bolje nanesti iz gojišča TPA.

7 VIRI IN LITERATURA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cytogenetics>, 25.4.2010
2. <http://www.experiencefestival.com/a/Cytogenetics/id/2037369>, 25.4.2010
3. Podgornik H, Pajič T, Kokalj-Vokač N, Zagorac A, Ruprecht R, Černelč P: Citogenetične in molekularnogenetične preiskave pri ugotavljanju kronične mieloične levkemije in spremljanju zdravljenja. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 13-7.
4. Podgornik H, Prijatelj A, Černelč P: Citogenetske preiskave pri slovenskih bolnikih z akutno levkemijo. *Zdrav Vestn* 2008; 77: I-43-6.
5. Slovenski medicinski e-slovar, glavni urednik Kališnik M, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Lek d.d., Ljubljana, 2004.
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/Karyogram>, 26.4.2010
7. <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Mutacije>, 19.11.2010
8. Amon T: Genetika, <http://www.eduanim.com/genetika>, 2.5.2010
9. Stušek P, Podobnik A, Gogala N: *Biologija 1*, Celica, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1999: 102-5.
10. http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture, 3.5.2010
11. Wegner RD: *Diagnostic Cytogenetics (Lab Manual)*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999: 4-5, 9-20, 56-8.
12. http://en.wikipedia.org/wiki/Mitotic_index, 7.5.2010
13. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T, Podgornik H, Preložnik Zupan I, Pretnar J, Zver S: Bolezni krvi in krvotvornih organov, poglavje 12, *Interna medicina*, glavni uredniki Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 1172-3, 1185-7, 1250-8.
14. http://www.annovum.nl/Poseidon%20images/AM-KBI-10113_D1.0.pdf, 20.10.2010
15. http://www.annovum.nl/Poseidon%20images/AM-KBI-10108_D1.0.pdf, 20.10.2010
16. Glaser M: Kronične levkemije. *Med Razgl* 2005; 44(1): 33-41.
17. Dighiero G, Hamblin TJ: Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1017-29.
18. Andritsos L, Khoury H: Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Opt Oncol* 2002; 3: 225-31.
19. Baum N, Benson H, Brenner Z, Chow E, Furst D, Greene E in sod.: *Družinski zdravstveni vodnik*, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1998: 398-401.
20. <http://rebeccanelson.com/leukemia/cll.jpg>, 30.4.2010

21. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Virtual_karyotype_karyogram.jpg#file, 28.4.2010
22. Pajič T, Černelč P: Ugotavljanje mutacijskih sprememb v variabilnih genih preurejenih genov za težko verigo imunoglobulina pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo. *Zdrav Vestn* 2008; 77: I-69-71.
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate>, 4.5.2010
24. Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ in sod.: Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in patients with myelocytic leukemia: Preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95(9): 5357-61.
25. Kolb TM, Davis MA: The Tumor Promoter 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate Provokes a Prolonged Morphologic Response and ERK Activation in Tsc2-Null Renal Tumor Cells. *Toxicol Sci* 2004; 81(1): 233-42.
26. Han ZT, Tong YK, He LM, Zhang Y in sod.: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95(9): 5362-5.
27. Sánchez J, Aventín A: Detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia increased by interphase fluorescence in situ hybridization in tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells. *Cancer Gen Cyto* 2007; 175: 57-60.
28. Wren C, Moriarty H, Marsden K, Tegg E: Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gen Cyto* 2010; 198: 155-61.
29. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL: *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 3rd Edition, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, New York, 1997: 20.
30. http://en.wikipedia.org/wiki/Wilcoxon_signed-rank_test, 8.11.2010
31. http://en.wikipedia.org/wiki/Box_plot, 10.11.2010
32. Košmelj K: *Uporabna statistika*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2001: 43-9, 53-61.
33. <http://www.zbirka.si/kvartilni-razmik/>, 10.11.2010
34. <http://www.zbirka.si/kvartil/>, 8.11.2010