

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA TURNŠEK

**DOLOČANJE Z ARZENOVIM TRIOKSIDOM POVZROČENE APOPTOZE
PLAZMOCITOMSKIH CELIC**

APOPTOSIS OF MYELOMA CELLS CAUSED WITH ARSENIC TRIOXIDE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Černelču in somentorici doc. dr. Heleni Podgornik za strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Najlepša hvala tudi celotnemu osebju Specializiranega hematološkega laboratorija v UKC Ljubljana, ki so mi vedno bili pripravljeni pomagati. Posebna zahvala pa Katarini Reberšek, mag.farm., za svetovanje in veliko pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem tudi mojim najbližjim, ki so mi ves čas stali ob strani in me podpirali.

Izjava

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

Ljubljana, november 2010

Urška Turnšek

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Kerec Kos

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
SEZNAM SLIK	VIII
SEZNAM PREGLEDNIC	IX
1 UVOD	1
1.1 KOSTNI MOZEG IN MATIČNE KRVNE CELICE	1
1.2 LIMFOCITI B IN PLAZMATKE.....	2
1.3 PLAZMOCITNE NOVOTVORBE.....	3
1.3.1 PLAZMOCITOMSKE CELICE.....	4
1.3.2 DISEMINIRANI PLAZMOCITOM	4
1.3.2.1 Definicija	4
1.3.2.2 Prevalenca	5
1.3.2.3 Klinična slika	5
1.3.2.4 Diagnoza	6
1.3.2.5 Potek in prognoza	7
1.3.2.6 Zdravljenje	7
1.3.3 SOLITARNI PLAZMOCITOM.....	8
1.3.4 MONOKLONSKA IMUNOGLOBULINEMIJA NEOPREDELJENEGA POMENA (MINP)	8
1.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT	9
1.4.1 POMEN APOPTOZE.....	9
1.4.2 KASPAZE.....	10
1.4.3 POTEK IN URAVNAVANJE APOPTOZE.....	10

1.4.4	RAZGRADNJA IN MORFOLOŠKE SPREMEMBE CELICE PRI APOPTOZI.....	12
1.5	NEKROZA.....	13
1.6	ARZENOV TRIOKSID.....	13
1.6.1	MEHANIZEM DELOVANJA ARZENOVEGA TRIOKSIDA.....	14
1.6.1.1	Vpliv arzena na celično signaliziranje	14
1.6.1.2	Vpliv arzena na oksidacijsko-redukcijsko ravnotežje in celični odziv na stres	15
1.6.1.3	Vpliv arzena na plazmocitomske celice	15
1.7	DOLOČANJE APOPTOZE	16
1.7.1	SPLOŠEN KRATEK PREGLED RAZLIČNIH ANALIZNIH METOD.....	16
1.7.1.1	Značilnosti aneksina	16
1.7.1.2	Vloga kamptotecina pri določanju apoptoze	17
1.7.2	DOLOČANJE APOPTOZE S PRETOČNIM CITOMETROM.....	18
1.7.2.1	Pretočna citometrija	18
1.7.3	MONOKLONSKA PROTITELESA ZA OZNAČEVANJE PLAZMATK.....	19
1.7.3.1	CD138-PE	20
1.7.3.2	CD38-PC5.....	20
2	NAMEN DELA	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	PREISKOVANCI.....	22
3.2	OPREMA.....	23
3.3	METODE.....	24
3.3.1	GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA.....	24
3.3.1.1	Priprava celic kostnega mozga za gojenje.....	24
3.3.3	GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA OB PRISOTNOSTI ARZENOVEGA TRIOKSIDA IN KAMPTOTECINA	27
3.3.4	OSAMITEV PLAZMOCITOMSKIH CELIC.....	28

4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	POSTOPEK DOLOČANJA APOPTOZE V PLAZMOCITOMSKIH CELICAH.....	30
4.2	UGOTAVLJANJE VPLIVA ČASA IZPOSTAVLJENOSTI PLAZMOCITOMSKIH CELIC ARZENOVEMU TRIOKSIDU	34
4.3	DOLOČANJE APOPTOZE IN NEKROZE V PLAZMOCITOMSKIH CELICAH.....	36
4.4	RAZPRAVA	40
4.4.1	DOLOČANJ APOPTOZE NA REALNIH VZORCIH KOSTNEGA MOZGA Z ANEKSINOM V	40
4.4.2	ČASOVNA ODVISNOST OBSEGA APOPTOZE	40
4.4.3	DOLOČANJE APOPTOZE NA REALNIH VZORCIH BOLNIKOV S PLAZMOCITOMOM.....	41
5	SKLEP	42
6	LITERATURA.....	43

POVZETEK

Arzenov trioksid (ATO) dokazano učinkuje na različne maligne celice, med drugim tudi na plazmocitomske. Njegovo delovanje še ni popolnoma razjasnjeno, dokazano pa sproži apoptozo ali programirano celično smrt. ATO se občasno uporablja pri zdravljenju bolnikov s plazmocitomom in akutno promielocitno levkemijo tudi v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

Namen našega dela je bil določanje obsega apoptoze z aneksinom V s pomočjo pretočne citometrije. Postopek, ki je sicer namenjena študiju celičnih kultur, smo želeli uporabiti pri realnih vzorcih kostnega mozga (KM), kjer imamo opraviti z raznoliko populacijo celic. Obseg apoptoze, ki jo sproži dodatek ATO v gojišče, smo želeli določati zgolj na populaciji plazmocitomskih celic.

Vpliv ATO na apoptozo smo preučevali na vzorcih KM bolnikov s plazmocitomom. Celice kostnega mozga smo gojili z dodatkom 2 in 5 μM ATO. Za pozitivno kontrolo smo izbrali gojišča z dodatkom kamptotecina, ki je induktor apoptoze, celice, gojene brez dodatkov so služile kot negativna kontrola. Apoptozo smo določali z reagenčnim kompletom Annexin V-FITC Kit, Beckman Coulter®, ki je namenjen predvsem delu s celičnimi linijami. Določili smo tudi časovno odvisnost obsega apoptoze pri zgoraj navedenih koncentracijah ATO.

Plazmocitomske celice smo dodatno zamejili s protitelesi CD-138 in CD-38, ki sta specifični za označevanje teh celic. Postavili smo dokaj zanesljivo metodo določanja apoptoze zgolj plazmocitomskih celic v realnih vzorcih kostnega mozga. Ugotavljali smo časovno odvisnost obsega apoptoze in nekroze izzvane z dodatkom ATO v gojišče s celicami kostnega mozga. Za določanje pri realnih vzorcih bolnikov smo izbrali čas gojenja 24 ur. Glede na izsledke pri večjem številu vzorcev lahko zaključimo, da je ta čas gojenja predolg. Ugotovili smo tudi, da na izsledke vpliva začetni delež plazmocitomskih celic v vzorcu.

ABSTRACT

Arsenic trioxide (ATO) is effective in treatment of patients with acute promyelocytic leukemia. It has antitumor activity also in other cell types. ATO was shown to induce growth inhibition and apoptosis in multiple myeloma (MM) cell lines and primary cells from MM patients at clinically achievable concentrations. Its action is not completely understood but it was proved that it triggers apoptosis. Studies on MM cell apoptosis triggered by ATO were mainly performed on MM cell lines. Therefore, methods that allow us to specifically address MM plasma cells from diagnostic samples are warranted.

Purpose of our work was to determine the extent of apoptosis with annexin V and flow cytometry. This procedure is intended for study of cell cultures, but we used it with bone marrow samples where diverse cell populations are found. We wanted to determine the extent of apoptosis only on MM plasma cells.

We studied the effect of ATO apoptosis on bone marrow samples from MM patients. Cells were cultivated with addition of ATO (2 and 5 μM) or camptothecin (positive control). Cells cultivated in growth medium only served as negative control. The extent of MM cell apoptosis was evaluated by flow cytometry (FC500, Beckman Coulter) using annexin V (Annexin V-FITC Kit, Beckman Coulter).

Gating strategy was additionally modified applying antibodies CD-138 and CD-38, which are specific for MM cells. We set a fairly reliable method for apoptosis determination in MM cells using real samples of bone marrow cells. The time course of the extent of apoptosis and necrosis during cultivation induced by ATO was studied. 24 hours of cultivation were chosen to determine the apoptosis in 20 samples from MM patients. We observed the influence of initial infiltration of bone marrow sample with plasma cells on extent of apoptosis triggered by ATO.

SEZNAM OKRAJŠAV

AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APL	akutna promielocitna levkemija
Apo-1	Fas receptor
ATO	arzenov trioksid
BH	homologne domene
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation- označevanje antigenov na površini posameznih celic
cIg	citoplazemski imunoglobulini
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DP	diseminirani plazmociotom
FADD	fas associated death domain
FALS	forward angle light scatter
Fas L	Fas ligand
GSH	reduciran glutation
IAP	inhibitors of apoptotic proteins
Ig	imunoglobulin
IGF-I	inzulinu podoben rastni faktor-I
IL-6	interlevkin-6
IKK	I κ B kinase
JNK	c-Jun NH2 terminal kinase
KM	kostni mozeg
KMB	gojišče Marrow Karyotyping Medium, BIOLOGICAL Industries Kibbutz Beit Haemek Israel
KMC	krvotvorne matične celice
KMM	gojišče Marrow Max TM , GIBCO [®]
KPT	kamptotecin
MAP	mutogen activated protein

mIg	monoklonski imunoglobulin
MINP	monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena
NFκB	jedrni faktor κB
PI	propidijev jodid
RALS	right angle light scatter
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
Smac/DIABLO	second mitochondrial activator of caspases
TNF	tumorski nekrotični faktor
TRADD	TNF1-associated death domain
TRAIL	tumor nekrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	žilni endotelijski rastni faktor

SEZNAM SLIK

Slika 1: Plazmocitomske celice v KM (2).....	4
Slika 2: Proces apoptoze (30).....	12
Slika 3: Morfološke spremembe celice pri apoptozi (29)	13
Slika 4: Razporeditev celic po označbi z Aneksinom in PI (25).....	17
Slika 5: Prikaz pretočnega citometra (21).....	18
Slika 6: Citocentrifuga Cytospin Shandon (levo) in vpeta filter kartica v citološki nastavek (desno)	26
Slika 7: Razporeditev celice glede na velikost (FS Lin) in granuliranost (SS Lin)	30
Slika 8: Zamejitev populacije CD38-PC5 pozitivnih celic	31
Slika 9: Zamejitev populacije CD138-PE in CD38-PC5 pozitivnih celic	32
Slika 10: Določitev obsega apoptoze z aneksinom	33
Slika 11: Celice so samo v apoptozi in žive (A), celice so enakomerno razporejene po vseh štirih kvadrantih (B), večina celic je v nekrozi (C).....	34
Slika 12: Odvisnost apoptoze plazmocitomskih celic od časa gojenja.....	35
Slika 13: Odvisnost nekroze plazmocitomskih celic od časa gojenja	35
Slika 14: Korelacija med deležem plazmatk v vzorcu za pretočno citometrijo in infiltracijo KM	37
Slika 15: Odvisnost obsega apoptoze od infiltracije KM s plazmatkami	38
Slika 16: Odvisnost obsega nekroze od infiltracije KM s plazmatkami	38
Slika 17: Odvisnost obsega apoptoze in nekroze od konc. ATO	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Plazmocitne novotvorbe (1).....	3
Preglednica II: Preiskave ob ugotovitvi DP (5).....	6
Preglednica III: Diagnostična merila za DP (1)	7
Preglednica IV: Demografski podatki o bolnikih s plazmocitomom	22
Preglednica V: Volumni in koncentracije ATO v gojišču	27
Preglednica VI: Obseg apoptoze pri realnih vzorcih bolnikov s plazmocitomom.....	36

1 UVOD

1.1 KOSTNI MOZEG IN MATIČNE KRVNE CELICE

Vse krvne celice nastajajo pri odraslem človeku v rdečem kostnem mozgu (KM) in limfatičnem tkivu. V KM pri zdravem človeku nastajajo granulociti, eritrociti, monociti, megakariociti in limfociti.

Ob rojstvu je rdeč KM v vseh kosteh, po četrtem letu starosti pa ga začne nadomeščati rumeni KM, ki ga tvorijo predvsem maščobne celice. Pri zdravem odraslem človeku je rdeči KM v vretencih, rebrih, lobanji, medenici, stegnenici in nadlahtnici. Krvotvorne celice ležijo med mrežjem opornega tkiva in žil. Vse krvne celice nastajajo iz matičnih celic v KM. Glavni značilnosti matične celice sta sposobnost samoobnove in s tem ohranitve svojih lastnosti in sposobnost dozorevanja v matične celice, ki so usmerjene v določeno vrsto krvnih celic.

Osnovna matična celica je pluripotentna. Z delitvijo se obnavlja, po drugi strani pa dozoreva v multipotentne. Poznamo dve vrsti multipotentnih celic, mieloično in limfatično. Obe sta sposobni samoobnove in dozorevanja v usmerjene matične celice. Multipotentna celica mieloične vrste dozoreva v usmerjene matične celice rdeče vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz multipotentne matične celice limfatične vrste se razvijejo med posebnim procesom transformacije, ki poteka v limfatičnem tkivu, limfociti vrste B in T ter plazmatke. Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano in omogoča stalno in enakomerno nadomeščanje propadlih krvnih celic (1).

1.2 LIMFOCITI B IN PLAZMATKE

Celice limfocitne vrste T in B nastanejo med zorenjem v kostnem mozgu iz multipotentne, v limfatično vrsto usmerjene matične celice. Multipotentna matična celica, usmerjena v limfatično vrsto, se v kostnem mozgu deli in zori od celice pre-B (B- bone marrow ali Fabricijeva burza) do zgodnjega, nezrelega, vmesnega in zrelega limfocita B. Delitev in zorenje potekata brez prisotnosti antigena. Zreli limfociti B preidejo v kri in sekundarne limfatične organe. Ob prisotnosti antigena, limfocitov T in makrofagov se zreli limfociti B preobrazijo v velike imunoblaste B. Nastanejo sekundarni limfatični folikli ali germinalni centri s centroblasti, centrociti in spominskimi celicami B. Imunoblast B se deli in zori od plazmoblasta, proplazmocita v plazmatke in limfoplazmocitoidne celice (1).

Plazmatke izločajo v kri in limfo veliko količino protiteles. Protitelesa so beljakovine sestavljene iz dveh dolgih, težkih verig in dveh krajših, lahkih verig. Plazmatke izločajo pet razredov protiteles, in sicer IgA, IgE, IgM, IgG in IgD. Protitelesa IgA izločajo pretežno plazmatke v sluznicah. Protitelesa IgA ob vezavi s tujkom ne sprožijo vnetja, ampak omogočijo odstranitev tujka iz telesa. Protitelesa IgG in IgM se izločajo pretežno v kri in sprožijo ob vezavi na tujek vnetno reakcijo. Protitelesa IgE ščitijo pred paraziti in sodelujejo pri vnetnih reakcijah. Protitelesa IgD se nahajajo v krvi, njihovo delovanje pa še ni razjasnjeno (3, 4).

Plazmatka meri 12 do 20 μm in je ovalne oblike. Ovalno jedro leži bližje enemu polu celice, kromatin je gost. Citoplazma je intenzivno modre barve, ob enem delu jedra je nekoliko svetlejša. V plazmatkah lahko najdemo Russelova telesca, ki so ovalna ali okrogla, vijolična ali rožnata. V njih so mukopolisaharidi in imunoglobulini (1).

1.3 PLAZMOCITNE NOVOTVORBE

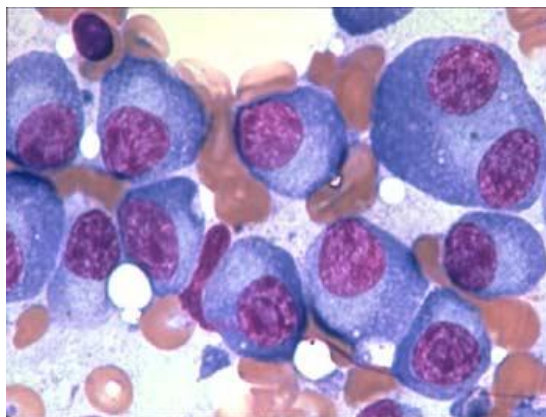
Plazmocitne novotvorbe nastanejo kot posledica nekontrolirane razrasti limfocitov B, ki so skoraj dosegli zrelost plazmatke in proizvajajo monoklonski imunoglobulin ali pa le del molekule imunoglobulina. Posledica monoklonske rakave razrasti plazmatk sta plazmocitom in plazmacelična levkemija, posledica razrasti plazmatk in limfocitov pa Waldenströmovi makroglobulinemija in bolezni težkih verig. Monoklonska imunoglobulinemija neopredeljenega pomena (MINP) je posledica predrakave delitve plazmatk. Med boleznimi plazmatk spadajo še bolezni zaradi odlaganja Ig v tkiva, kot so primarna amiloidoza, bolezni odlaganja težkih in lahkih verig Ig. Plazmocitne novotvorbe so predstavljene v preglednici I (1).

Preglednica I: Plazmocitne novotvorbe (1)

DISEMINIRANI PLAZMOCITOM • nesekrecijski plazmocitom • indolentni plazmocitom • tleči plazmocitom • plazmacelična levkemija
OMEJENI PLAZMOCITOM • solitarni plazmocitom kosti • solitarni plazmocitom mehkih tkiv
BOLEZNI Z ODLAGANJEM MONOKLONSKEGA IMUNOGLOBULINA • primarna amiloidoza • bolezni odlaganja lahkih in težkih verig imunoglobulinov
OSTEOSKLEROTIČNI PLAZMOCITOM
BOLEZEN TEŽKIH VERIG • bolezen težkih verig γ • bolezen težkih verig μ • bolezen težkih verig α

1.3.1 PLAZMOCITOMSKE CELICE

Plazmocitomske celice se od normalnih plazmatk ločijo po tem, da ima njihovo jedro rahlo kromatinsko zgradbo, jedrca so običajno večja in svetlejša, citoplazma je sivkastomodra in svetlejša, v nekaterih celicah so različni vložki (Russelova telesca).



Slika 1: Plazmocitomske celice v KM (2)

1.3.2 DISEMINIRANI PLAZMOCITOM

1.3.2.1 Definicija

Plazmocitom je maligna novotvorba, ki nastane iz limfocitov vrste B, ki so skoraj dosegli zrelost plazmatke. Najbolj pogost je diseminirani plazmocitom (DP). Značilno je otočkasto ali/in difuzno razraščanje plazmocitomskih celic v kostnem mozgu. Predvsem je prizadet rdeči kostni mozeg ploščatih kosti vretenc, reber, glave, medenice, stegenic, ključnic in lopatic. Lahko se pojavi tudi v mehkih tkivih, takrat govorimo o solitarnem ekstramedularnem plazmocitomu. Ta se pojavlja največkrat v predelu nosu, obnosnih sinusih, žrelu in grlu.

Če plazmocitomske celice izločajo monoklonski imunoglobulin razreda A, G ali D, govorimo o plazmocitomu IgA, IgG ali IgD. Redko so plazmocitomske celice tako spremenjene, da ne izločajo monoklonskega imunoglobulina.

1.3.2.2 Prevalenca

DP se pojavlja na 3/100000 prebivalcev. Obolevnost moških je enaka kot žensk. Najpogosteje zbolijo med šestdesetim in sedemdesetim letom.

1.3.2.3 Klinična slika

Pogosto je prvi znak bolezni bolečina v ledvenem predelu hrbtenice. Plazmocitomske celice izločajo citokin, ki spodbudi osteoklaste k večji dejavnosti. Posledica tega je lahko osteoporoza, osteolize kosti ali kombinacija obojega s prelomi. V krvi se lahko poveča vsebnost kalcija. Pri napredovani bolezni plazmocitomske celice spodrinejo normalne krvotvorne celice v KM. Posledica tega je anemija, zato so pogoste okužbe, predvsem pljučnice, zaradi nevtropenije in zmanjšane koncentracije poliklonskih imunoglobulinov. Plazmocitomske celice onemogočijo nastajanje normalnih plazmatk, ki proizvajajo protitelesa. Zato je zmanjšana protitelesna imunska odzivnost. Pri več kot četrtini bolnikov s plazmocitomom je prisotna tvorba lahkih verig v prebitku. Zato se lahko pojavi odpoved ledvic in posledično povečana koncentracija kalcija in sečne kisline v krvi. Pri skoraj eni četrtini bolnikov se pojavi amiloidoza (1).

1.3.2.4 Diagnoza

Preglednica II: Preiskave ob ugotovitvi DP (5)

Klinični pregled
Celotna krvna slika
Kreatinin in kalcij v serumu
Elektroforeza in imunofiksacija beljakovin v serumu
Kvantitativna določitev imunoglobulinov z nefelometrijo
Elektroforeza in imunofiksacija beljakovin v urinu
(Proste lahke verige v serumu)
Punkcija in biopsija KM (citogenetika, imunofenotip, IO)
RTG plazmocitomska serija (CT, MRI, PET)
β_2 M, albumini (CRP, LDH)

V krvni sliki je lahko normocitna ali normokromna anemija, nevtropenija, trombocitopenija in majhen odstotek plazmocitomskih celic. Monoklonski imunoglobulin ugotavljamo v serumu ali urinu z elektroforezo. Razred imunoglobulina in vrsto lahkih verig določamo z imunoelektroforezo. Delež plazmatk v KM ugotovimo s citološko oceno KM. Če delež ne presega 20%, upoštevamo predvsem morfološko spremembo celic. Za boljšo ocenitev stopnje infiltracije naredimo biopsijo. Spremembe skeleta ugotavljamo na rentgenskih posnetkih glave, celotne hrbtenice, medenice in gornje tretjine stegenic. S tem ugotovimo prizadetost kosti. Računalniška tomografija se uporablja za natančnejši prikaz sumljivih osteolitičnih sprememb, posebno v predelih, ki jih standardna rentgenska preiskava težko prikaže. Magnetnoresonančno slikanje omogoča oceno vrste in obsega prizadetosti mehkih tkiv. Določitvi koncentracij β_2 mikroglobulina in albuminov v serumu sta pomembni predvsem za oceno napovedi izida bolezni (5).

V preglednici III so prikazani znaki za potrditev DP. Da je bolezen potrjena, morajo biti potrjen vsaj en veliki in en mali znak, ali trije mali znaki, vendar obvezno prva dva (1).

Preglednica III: Diagnostična merila za DP (1)

VELIKI ZNAKI • >30% plazmocitomskih celic v KM • plazmocitomski infiltrat potrjen z biopsijo tkiva • mIg: serum - IgG>35g/L, IgA>20g/L; urin - >1g/24ur beljakovine Bence-Jones
MALI ZNAKI • 10-30% plazmocitomskih celic v KM • mIg je prisoten, vendar v manjši koncentraciji • osteolitične spremembe kosti • zmanjšana koncentracija normalnih Ig (<50% normalne): IgG <6g/L, IgA <1g/L, IgM <0,5g/L

1.3.2.5 Potek in prognoza

DP je neozdravljiva bolezen. Nekateri bolniki umrejo kljub zdravljenju v nekaj tednih. Pri drugih je potek počasen in živijo več kot 10 let. Prognoza je odvisna od razvojne stopnje, ledvičnega delovanja, uspešnosti zdravljenja in naravnega poteka bolezni (1).

1.3.2.6 Zdravljenje

Razlikujemo začetno oziroma prvo zdravljenje, vzdrževalno zdravljenje in zdravljenje neodzivnosti ali ponovitve bolezni. Razlikujemo dve vrsti začetnega zdravljenja: standardno zdravljenje s kombinacijo citostatikov in zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (PKMC). Bolnike, starejše od 65 let, pa tudi mlajše, ki zaradi sočasnih drugih bolezni niso primerni za zdravljenje s PKMC, zdravimo na standardni način. Cilj standardnega zdravljenja je doseči terapevtski odgovor s čim manj neželenimi toksičnimi učinki (5).

Najbolj učinkovit način zdravljenja DP je avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC). Pri avtologni PKMC v najprimernejšem obdobju zdravljenja odvezamemo

bolnikove lastne krvotvorne matične celice, ki jih lahko zberemo iz periferne krvi ali KM. Uspešnost avtologne PKMC povečamo, če jo opravimo dvakrat zapored v obdobju šestih mesecev. Bolezen se sicer ne pozdravi, saj se ponovi pri več kot 90% bolnikov. Poveča pa se učinkovitost zdravljenja in podaljša se preživetje zdravljenih bolnikov (28).

1.3.3 SOLITARNI PLAZMOCITOM

Kadar se plazmocitomske celice razraščajo omejeno, na enem mestu v KM, govorimo o solitarnem plazmocitomu. Kadar se plazmocitomske celice pojavijo omejeno v mehkem tkivu govorimo o ekstramedularnem plazmocitomu. Ta oblika se pojavi pri 3-5% bolnikov s plazmocitomom, predvsem pri bolnikih starih okoli 55 let. Pri moških se pojavi enkrat pogosteje kot pri ženskah (1).

1.3.4 MONOKLONSKA IMUNOGLOBULINEMIJA NEOPREDELJENEGA POMENA (MINP)

Ugotovljena je skoraj pri 1% zdravih oseb, starejših od 50 let, in pri 3% zdravih, starejših od 70 let. Nimajo težav, znakov bolezni ali sprememb v skeletu. Pri 75% bolnikov z MINP je prisoten IgG, pri 15% IgM in pri 10% bolnikov IgA. V serumu je koncentracija monoklonskega IgG do 35 g/L ali do 20 g/L IgA. Koncentracija normalnih imunoglobulinov v serumu ni zmanjšana. V KM je manj kot 10% plazmatk.

Pri okoli 25% bolnikov z MINP bolezen preide v DP, primarno amiloidozo, makroglobulinemijo ali drugo imunoproliferativno bolezen. Bolezen se skrbno spremlja, medtem ko zdravljenje ni potrebno (1).

1.4 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT

Prvi je apoptozo opisal Carl Vogt leta 1842. Apoptoza, ali programirana celična smrt, je običajni del razvoja večceličnih organizmov. Celice odmrjejo v odgovor na številne dražljaje. Apoptoza je proces, v katerem imajo celice aktivno vlogo pri svoji smrti, zato pogosto rečemo da je to samomor celice. Proces apoptoze poteka po nadzorovanem, urejenem načinu. Pride do morfoloških sprememb celice, ki se kažejo kot kondenzacija kromatina, skrčenje celice, fragmentacija jedra, tvorba apoptotskih teles in mehurčkov na membrani. Končni rezultat apoptoze je celična smrt, ne da bi prišlo do vnetja (6, 7).

1.4.1 POMEN APOPTOZE

Naloga apoptoze je vzdrževanje ravnotežja v fizioloških procesih, kakršna sta embrionalni razvoj in homeostaza tkiv. Lahko nastane tudi kot posledica patoloških dejavnikov.

Z apoptozo se odstranjujejo nezaželene strukture embriogeneze in celice, poškodovane zaradi genetskih napak, staranja, bolezni ali delovanja škodljivih dejavnikov. Pomembna je tudi pri imunskih reakcijah, saj prepreči vstop okuženih ali neustreznih limfocitov T iz timusa v kri (7).

Motnje uravnavanja apoptoze lahko povzročijo nastanek različnih bolezni. Lahko nastanejo bolezni ali stanja zaradi zavrte apoptoze in povečanega preživetja celic, kot so maligna obolenja, avtoimunske bolezni in virusne okužbe. Poznamo tudi bolezni in stanja zaradi povečane apoptoze in čezmernega odmiranja celic. To so degenerativne bolezni osrednjega živčevja (spinalna mišična atrofija, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen), ishemična okvara, limfocitna deplecija zaradi virusne okužbe (8).

1.4.2 KASPAZE

Kaspaze so cisteinske proteaze. V celici so prisotne v neaktivni obliki (prokaspaze). Igrajo pomembno vlogo pri procesu apoptoze. Kaspaze, ki sodelujejo pri apoptozi, delimo v aktivatorske (npr. kaspazi 8 in 9) ter efektorske (npr. kaspazi 3 in 7). Za njihovo aktivacijo je potrebna proteolitična cepitev na dveh mestih. Tako se od prokaspaze odcepi provera, iz preostalega dela pa nastaneta dve podenoti, velika in mala. Aktivna kaspaza je sestavljena iz dveh heterodimerov, dveh malih in dveh velikih podenot.

Pri apoptozi pride do aktivacije kaspaz v zgodnji fazi. Aktivira jih avtoproteolitična cepitev ali cepitev drugih kaspaz. Kaspaze prepoznavajo specifična tetrapeptidna zaporedja proteinov in cepijo peptidno vez na C-terminalni strani aspartatnega ostanka znotraj tetrapeptidnih zaporedij. Aktivirane kaspaze cepijo celične molekule potrebne za normalne celične funkcije.

Pri sesalcih je poznanih 14 različnih kaspaz, od tega sodelujejo pri apoptozi kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9 in 10 (7, 9).

1.4.3 POTEK IN URAVNAVANJE APOPTOZE

Proces apoptoze je uravnan preko različnih signalov, ki so lahko zunajcelični ali znotrajcelični. Zunajcelični signali so lahko hormoni, rastni faktorji in toksini, ki morajo preiti celično membrano ali se vezati na membranski receptor. Receptorju, na katerega se vežejo zunajcelični signali, pravimo tudi receptor smrti. Znotrajcelični signali, ki so povezani z mitohondrijem, pa so lahko celični stres, virusne okužbe, hipoksija, pomanjkanje hranilnih snovi, povečana koncentracija kalcijevih ionov.

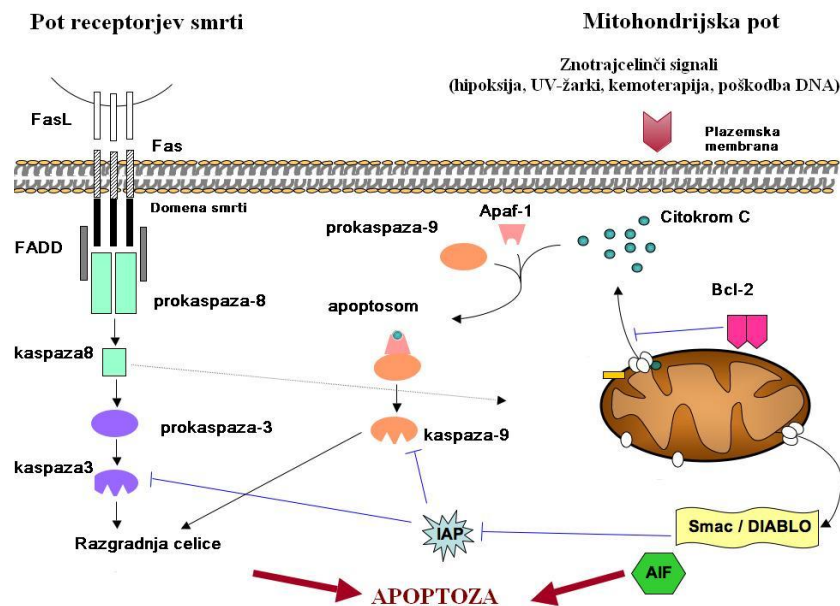
Proces apoptoze tako lahko poteka preko dveh poti, in sicer preko receptorjev smrti ter mitohondrijev. Za neposredno sprožitev receptorjev smrti sta odgovorna dva faktorja, in sicer tumorski nekrotični faktor (TNF) in Fas ligand (FasL). TNF je citokin, ki ga večinoma proizvajajo aktivirani makrofagi. TNF in drugi ligandi receptorjev smrti so trimeri oz. so zgrajeni iz treh enakih polipeptidnih verig, zato pride pri vezavi do trimerizacije receptorjev. Večina celic ima dva receptorja za TNF, in sicer TNF-R1 in

TNF-R2. Pri vezavi na TNF-R1 pride do aktivacije kaspaz preko posrednih submembranskih proteinov TRADD (TNFR1 associated death domain) in FADD (Fas associated death domain). FasL se veže na Fas receptor (tudi imenovan Apo-1 ali CD95), transmembranski protein in pripadnik TNF družine. Vezava sproži nastanek DISC kompleksa (angleško *death-inducing signaling complex*), v katerem so udeleženi FADD, kaspaza 8 in kaspaza 10. Pri nekaterih tipih celic kaspaza 8 neposredno aktivira druge kaspaze, v drugih tipih celic pa se sproži izločanje proapoptotičnih proteinov iz mitohondrijev, s čimer se ojača aktivacija kaspaze 8.

Mitohondrijsko pot uravnavaajo člani družine Bcl-2, ki jih sestavljajo proapoptotski in antiapoptotski proteini. Pri sesalcih poznamo več kot 20 članov te družine. Proapoptotski proteini se ponavadi nahajajo v citosolu in se lahko premaknejo preko mitohondrijeve membrane, ko pride do poškodbe celice ali stresa. Ko proteini zaznajo stres, se prenesejo na površino mitohondrija. Zaradi interakcij med pro- in antiapoptotičnimi proteini nastanejo pore v zunanji mitohondrijski membrani (MAC - Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel). Iz mitohondrija se skozi nastale MAC sprosti citokrom C. Citokrom C se v citosolu poveže z adaptorno Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), ATP-jem ter pro-kaspazo 9, ki skupno tvorijo kompleks imenovan apoptosom. Ta cepi prokaspazo 9 v aktivno kaspazo 9, ki nato cepi efektorsko kaspazo 3 in aktivira še druge izvrševalne kaspaze (10, 11).

Zaradi zvečane prepustnosti mitohondrijske membrane vstopi v citosol mitohondrijski protein SMAC/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases). SMAC z vezavo na IAP (inhibitors of apoptotic proteins) inhibira delovanje teh proteinov. Ker se aktivni IAP vežejo na kaspaze in jih inaktivirajo, vezava SMAC vodi do aktivacije kaspaz in nadaljevanje apoptoze (10).

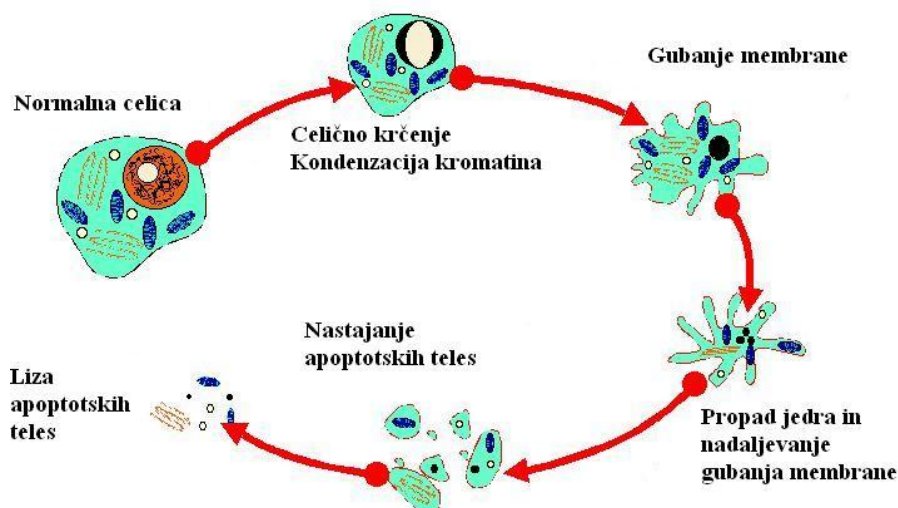
Iz mitohondrija se v citoplazmo sprošča tudi beljakovina AIF (angl. apoptosis-inducing factor). Potuje v jedro in neodvisno od kaspaz lahko cepi DNA na dolge fragmente in povzroči kondenzacijo kromatina, vendar njen dejanski pomen ni poznan (9).



Slika 2: Proces apoptoze (30)

1.4.4 RAZGRADNJA IN MORFOLOŠKE SPREMEMBE CELICE PRI APOPTOZI

1. Kromatin v jedru se zgosti in razporedi na periferiji jedra, kar se imenuje piknoza.
2. Citoplazma se zgosti in organeli so razporejeni tesno skupaj.
3. Sočasno se celica skrči in postane bolj sferična zaradi razgradnje citoskeleta, stiki s sosednjimi celicami so prekinjeni.
4. Jedrna ovojnica postane prepustna, DNA v jedru pa je razrezana na posamezna kromatinska telesca ali nukleosomalne enote (karioheksiza).
5. Celična membrana se naguba.
6. Sledi razpad celice na številna apoptotska telesca, ki vsebujejo po več jedrnih delcev. (11)



Slika 3: Morfološke spremembe celice pri apoptozi (29)

1.5 NEKROZA

Nekroza je patološko odmiranje celic, zato jo imenujemo tudi celični umor. Povzročijo jo zunanji dejavniki, kot so hipertermija, ishemija, toksini, okužbe in različne poškodbe. Zaradi poškodbe celične membrane začnejo v celico vstopati voda in ioni. Celotna celica nabrekne, kar povzroči lizo celice. Vsebina celice s proteolitičnimi encimi se sprosti v zunajcelični prostor, kar privede do poškodb sosednjih celic in vnetnega procesa (12).

1.6 ARZENOV TRIOKSID

Arzen se v naravi nahaja v obliki strupenih, kemično nestabilnih oksidov in sulfidov ter kot natrijev, kalcijev ali kalijev arzenat. V naravi ga najpogosteje najdemo vezanega v svetlo rumen sulfidov kompleks. Poznamo anorganske in organske spojine arzena. Anorganske spojine so rumene, rdeče in bele. Rumeni (arzenov trisulfid, As_2S_3 , arzenikon, avripigment) in rdeči (arzenov disulfid, As_2S_2 , realgar) sta strupena in kemično nestabilna sulfida. Beli (arzenov trioksid, As_2O_3) je stranski industrijski proizvod pri žganju realgarja. Organske spojine arzena so sestavljene iz arzenovega atoma v tri ali petvalentni obliki, ki je kovalentno vezan na ogljikov atom (13,24).

Arzen se v medicini uporablja že več kot 2400 let. Pred skoraj sto leti so arzenov trioksid (ATO) uporabljali za zdravljenje sifilisa, parazitskih bolezni in pri kroničnih levkemijah. Kitajski znanstveniki so v novem času začeli ATO uporabljati za zdravljenje akutne promielocitne levkemije (APL) kot samostojno zdravilo in v kombinaciji z drugimi citostatiki. V nadaljnjih raziskavah pri zdravljenju relapsa APL je bil učinkovit pri več kot 85% teh bolnikov. Na osnovi teh raziskav so njegovo učinkovitost ugotovili tudi za zdravljenje akutne mieločne levkemije, plazmocitoma, kronične B-celične limfatične levkemije in omejenih tumorjev. Na osnovi vseh raziskav je prišlo do registracije zdravila Trisenox, ki je kemijsko raztopina As_2O_3 in je registriran za uporabo pri rezistentni APL ali relapsu APL (14, 15).

1.6.1 MEHANIZEM DELOVANJA ARZENOVEGA TRIOKSIDA

1.6.1.1 Vpliv arzena na celično signaliziranje

ATO vpliva na znotrajcelične signalne transdukcijske poti in povzroča spremembe celičnih funkcij. Sproži apoptozo, inhibira rast in stimulira diferenciacijo. Arzen sproži zunanjo pot apoptoze preko MAP (mitogen activated protein) kinaz, še posebej z JNK (c-Jun NH_2 terminal kinase) spremljano indukcijo Fas liganda ali Fas izražanjem. Rekrutiranje domene smrti (vsebujejo proteine FADD in TRADD) aktivira kaspazo 8. Aktivacija kaspaze 8 in kaspaze 9 vodi do aktivacije izvrševalnih kaspaz. To sta kaspaza 3 in kaspaza 7. JNK so pomembne za fosforilacijo transkripcijskih faktorjev, ki povečajo izražanje zgodnjih genov. Arzen stimulira aktivnost JNK z inhibicijo JNK fosfataze, katere naloga je vzdrževanje nizke bazične aktivnosti JNK v nestimuliranih celicah. JNK je tudi potrebna za aktivacijo proapoptotskega proteina Bid. Ta se prenese iz citosola na mitohondrijsko membrano in povzroči sproščanje citokroma C (16, 17).

Arzen blokira vnetni transdukcijski signal preko inhibicije IKK (I κ B kinaza), ki je potrebna za aktivacijo vnetnega transkripcijskega faktorja NF κ B. NF κ B transkripcijska aktivnost je pomembna v patogenezi hematoloških malignih bolezni, predvsem pri plazmocitomu, zaradi regulacije ekspresije IL-6 in ekspresije adhezijskih molekul. Posledica inhibicije in razgradnje I κ B je nenehna vezava inhibitorja na NF κ B. Preprečen je

prenos NF κ B v jedro, s tem pa spremenjena regulacija IL-6 in drugih genov. Pride do zmanjšanja koncentracije IL-6, manjše rasti klonov plazmocitomskih celic in manjše odpornosti na apoptozo (16, 18).

1.6.1.2 Vpliv arzena na oksidacijsko-redukcijsko ravnotežje in celični odziv na stres

Arzen moti naravno oksidacijsko-redukcijsko ravnotežje z endogenimi oksidanti in celičnimi antioksidativnimi sistemi. Proteini z dostopnimi tiolnimi skupinami so občutljivi na oksidacijo. Z oksidacijo tiolnih skupin arzen odpre kompleks prepustnih membranskih por. Kovine same ali s kovinami povzročene reaktivne kisikove zvrsti (ROS) takoj sprožijo pot apoptoze v mitohondriju. Mitohondriji so vključeni v tvorbo ATP, ki zahteva velike količine kisika, kar vodi v pospešeno nastajanje ROS. Med ROS spadajo vodikov peroksid, hidroksilni radikal, superoksidni anion in anorganski peroksidi, ki poškodujejo celice. Pomembno obrambno vlogo pred oksidativnim stresom ima GSH (reduciran glutation) redoks sistem, ki uravnava antiproliferativni in proapoptotični vpliv. Nahaja se v mitohondriju. Večje količine ROS in inhibicija GSH povzročita oksidativni stres, poškodujeta mitohondrij in sprožita apoptozo. Apoptoza sprožena z ATO je povezana z izgubo mitohondrijskega potenciala. ATO poveča znotrajcelično koncentracijo vodikovega peroksida, ta pa zmanjša mitohondrijski potencial. Citokrom C se iz poškodovanih mitohondrijev sprosti v citosol, veže na Apaf-1 in aktivira kaspazo 9. Poškodovani mitohondriji prav tako lahko sprostijo AIF, ki sproži apoptozo neodvisno od kaspaz in SMAC, ki nasprotuje antiapoptotičnemu vplivu IAP proteinov. ATO obenem tudi blokira encima glutation transferazo in glutation peroksidazo, ki razstrupita ATO s konjugacijo GSH in pretvorbo vodikovega peroksida v vodo (16, 17, 19).

1.6.1.3 Vpliv arzena na plazmocitomske celice

Ključnega pomena je potencialno sinergistično delovanje ATO z drugimi učinkovinami. Dokazali so sinergistično delovanje TRAIL (tumor nekrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) in ATO pri sprožanju apoptoze pri rezistentnih plazmocitomskih celicah. Z ATO se zaustavi celična cikla plazmocitomskih celičnih linij v G1 in G2M fazi zaradi sočasne indukcije od cisteina odvisnega kinaznega inhibitorja p21. Ugotovili so tudi, da

ATO zmanjša vezavo plazmocitomskih celic na stromalne celice KM, zavira IL-6 in izločanje VEGF ter blokira delitev plazmocitomskih celic (13, 20).

Pri zdravljenju plazmocitoma se ATO uporablja v kombinaciji z askorbinsko kislino, melfalanom, deksametazonom in interferonom α (18).

1.7 DOLOČANJE APOPTOZE

1.7.1 SPLOŠEN KRATEK PREGLED RAZLIČNIH ANALIZNIH METOD

Apoptozo lahko sledimo na različne načine, kot so fluorescenčna mikroskopija, DNA gelska elektroforeza in pretočna citometrija. Prednost pretočne citometrije, pred drugimi načini je ocena večjega števila celic naenkrat v kratkem času.

Značilnosti apoptotičnih celic, ki jih izkoriščamo pri detekciji so:

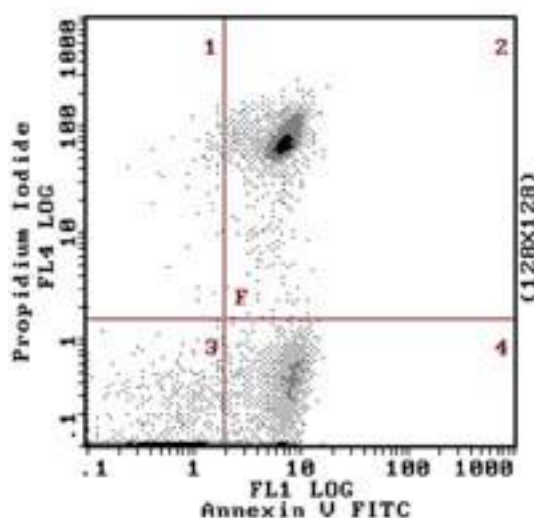
- sprememba celične membrane in njene prepustnosti,
- spremembe prepustnosti mitohondrijske membrane,
- sprememba v morfologiji, velikosti in obliki celice,
- aktivacija kaspaz,
- kondenzacija kromatina in cepitev DNA (31).

Razvili so različne teste, ki lahko apoptozo zaznajo na začetku, sredini in koncu postopka apoptotske kaskade, in ki odkrivajo apoptozo v različnih delih celice. Komercialno so dostopni različni testi, kot so: Annexin V (sprememba membranskih proteinov), induktorji apoptoze, testi za določanje različnih kaspaz, mitohondrijskega potenciala, membranske prepustnosti, DNA razdrobljenosti, ADP/ATP razmerja,... (32).

1.7.1.1 Značilnosti aneksina

Aneksini spadajo v skupino homolognih proteinov, ki se v prisotnosti kalcijevih ionov vežejo na fosfolipide. V zgodnji fazi apoptoze pride tudi do izgube fosfolipidne asimetrije. Fosfatidilserin je pri nepoškodovanih celicah del notranjega dela celične membrane, pri procesu apoptoze pa pride do translokacije na zunanji del, tako da se obrne v zunajcelični

prostor. Na ta način je v prisotnosti kalcijevih ionov omogočena vezava konjugata aneksin V-FITC na fosfatidilserin v apoptotičnih celicah. Pomembno je, da se aneksin V-FITC veže tako na pro-apoptotične celice, ki so še žive, a bodo napredovale z apoptotičnim procesom, in na koncu umrle, prav tako pa se veže tudi na mrtve celice. Propidijev jodid (PI) vstopa le v mrtve celice, katerih membrana je močno poškodovana. Z uporabo obeh označevalcev lahko torej ločimo med pro-apoptotičnimi (AnnV+/PI-, kvadrant 4, Slika 4) in mrtvimi celicami (AnnV+/PI+, kvadrant 2, Slika 4) (25).



Slika 4: Razporeditev celic po označbi z Aneksinom in PI (25)

1.7.1.2 Vloga kamptotecina pri določanju apoptoze

Kamptotecin (KPT) je citotoksični rastlinski alkaloid. Prvič je bil izoliran leta 1966 iz drevesa *Camptotheca acuminata*. Deluje kot inhibitor topoizomeraze I. KPT povzroči poškodbe DNA in prepreči ponovno združenje DNA, kar vodi v apoptozo celice. KPT sproži proces apoptoze preko vezave na kompleks topoizomeraza I-DNA v jedru. Interakcija med KPT in rastočimi replikacijskimi vilicami v S-fazi celičnega ciklusa povzroči prelome na dvojni vijačnici DNA, kar vodi v aktivacijo kaspaz in povzročitev apoptoze. Natančno zaporedje dogodkov, ki vodijo do poškodbe DNA in posledično do apoptoze celice, ni v celoti razjasnjeno (26, 27).

Zaradi intenzivne indukcije apoptoze pa ga obširno uporabljajo kot pozitivno kontrolo pri določanju obsega apoptoze.

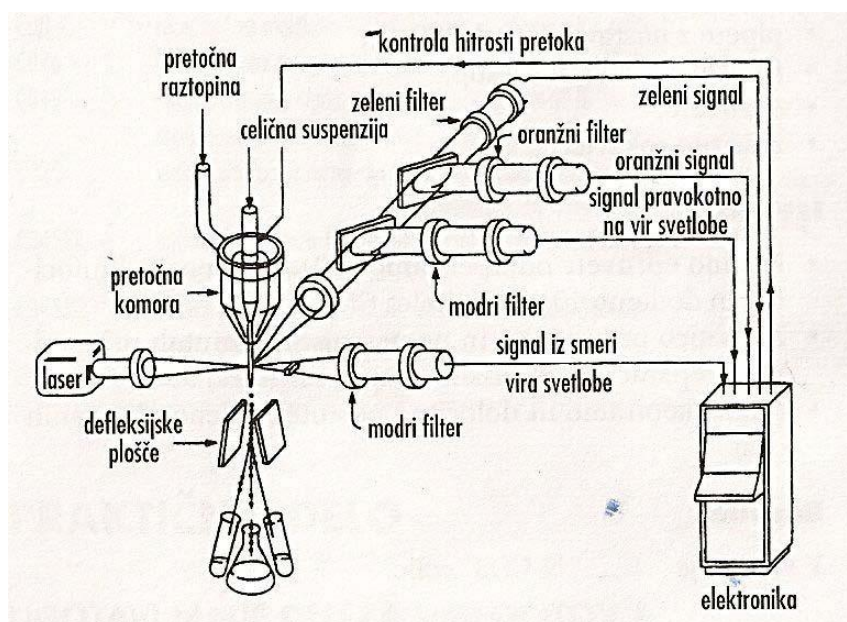
1.7.2 DOLOČANJE APOPTOZE S PRETOČNIM CITOMETROM

1.7.2.1 Pretočna citometrija

Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, razlikuje se le v tem, da je odčitavanje odstotka celic, ki fluorescirajo, hitrejše, objektivnejše in avtomatizirano. Za analizo na pretočnem citometru morajo biti celice v suspenziji. Celični suspenziji se doda monoklonsko protitelo, ki je označeno s fluorescenčnim barvilom. Mogoče je analizirati celice obarvane z več fluorescenčnimi barvili hkrati. Celice potujejo v tankem curku ena za drugo mimo vira svetlobe. Svetlobni žarek, ki zadane celico, se odbije ali lomi, ali se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Spremembe beleži sistem fotopomnoževalk.

Glavi sestavni deli pretočnega citometra so:

- vir svetlobe
- pretočna komora z optičnim sistemom ogledal, leč in filtrov,
- elektronika, ki spreminja svetlobne impulze v električne in slednje v digitalne,
- računalnik, ki zbira, analizira in usklajuje podatke ter uravnava delovanje aparata.



Slika 5: Prikaz pretočnega citometra (21)

Vir svetlobe je laserski žarek, ki je lahko argonski, kriptonski ali kombiniran helij-kadmijski ali helij-neonski. Pri starejših pretočnih citometrih so uporabljali živosrebrove ali redkeje ksenonske žarnice. Pretočni sistem je zgrajen iz pretočne komore, skozi katero tečejo celice v izotonični raztopini. Pri prehodu snopa žarkov odda posamezna celica signal, ki je odvisen od njenih lastnosti. Svetlobni signali, ki imajo enake valovne dolžine kot obsevalna (laserska) svetloba, nastanejo zaradi sipanja svetlobe na celičnih strukturah. Svetlobni signali, ki imajo večje valovne dolžine kot obsevalna svetloba, nastanejo zaradi fluorescence. Preko sistema leč in filtrov fotodetektorji zbirajo in razvrščajo signale.

Dva fotodetektorja merita odboj ali lom svetlobe. Eden meri iz smeri vira svetlobe, to je FALS (Forward Angle Light Scatter), drugi pa pravokotno na smer vpadne svetlobe, RALS (Right Angle Light Scatter). FALS detektor je pomemben za ugotavljanje velikosti celic, RALS pa glede na odbito svetlobo od celice ponazarja granuliranost in površinsko strukturo celice. Poleg detektorjev RALS in FALS ima pretočni citometer še več fluorescenčnih detektorjev, ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Pretočni citometri imajo navadno dva do štiri fluorescenčne fotodetektorje, od katerih vsak zajema fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in tako meri signal, ki ga oddaja fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Računalnik zabeleži električne signale in jih nato grafično in matematično prikaže. Osnovni rezultat pretočne citometrije je točkasti histogram, kjer vsaka točka predstavlja celico (21).

1.7.3 MONOKLONSKA PROTITELESA ZA OZNAČEVANJE PLAZMATK

Matične celice KM imajo sposobnost delitve in dozorevanja. Med dozorevanjem se spreminja velikost in oblika celice, poleg tega pa tudi antigeni na njeni površini in citoplazmi. Antigeni so večinoma makromolekule. Če proti njim izdelamo monoklonska protitelesa, jih lahko uporabimo za identifikacijo celic.

Monoklonska protitelesa so razdeljena v skupine CD (Cluster of Differentiation) in so označena s fluorescenčnimi barvili. Vsa monoklonska protitelesa, ki imajo isto številko CD, so uporabna za prikazovanje istega, dobro opredeljenega antigena na površini krvnih

celic. Celice med dozorevanjem pridobijo nove antigene, izgubijo pa prejšnje. Tako plazmatka izgubi vse celične označevalce, pridobi pa CD38 in CD138 in citoplazemske imunoglobuline (cIg) z lahkimi verigami lambda in kapa (1, 21).

1.7.3.1 CD138-PE

CD138 je transmembranska proteoglikanska adhezijska molekula (heparan sulfat proteoglikan) imenovan Syndecan-1. CD 138 se izraža pri normalnih in malignih plazmatkah v periferni krvi in KM. Vendar ne pri B in T limfocitih ali monocitih. Izražajo ga tudi nekatere normalne celice, npr. epiteljske, nevronske, endotelne in normalni hepatociti (22).

1.7.3.2 CD38-PC5

CD38 antigen je transmembranski glikoprotein tipa II z NH_2 koncem znotraj citoplazme. Je encim z več dejavnostmi, odgovoren za sintezo in hidrolizo ciklične ADP-riboze in NAD. Izraža se na aktiviranih T in B limfocitih, NK celicah, monocitih in plazmatkah. Izražanje CD38 je odvisno od diferenciacije in aktivnosti celic. Pri B limfocitih se CD38 izrazi v zgodnji fazi zorenja, ne izraža se med zorenjem in se ponovno izrazi pri zrelih plazmatkah. CD38 se pogosto uporablja pri študijah aktivnosti B in T limfocitov. Poleg tega je CD38 izražen v več tkivih, na primer možganih, mišicah, in ledvicah (22,23).

2 NAMEN DELA

Arzenov trioksid (ATO) dokazano učinkuje na različne maligne celice, med drugim tudi na plazmocitomske. ATO se občasno uporablja za zdravljenje plazmocitoma, tudi v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

Njegovo delovanje sicer še ni popolnoma razjasnjeno, dokazano pa sproži apoptozo oziroma programirano celično smrt.

Namen našega dela bo prilagoditi način določanja obsega apoptoze povzročene z ATO na plazmatkah kostnega mozga (KM) pri bolnikih s plazmocitomom. Odločili smo se za določanje obsega apoptoze z aneksinom V s pomočjo pretočne citometrije. Naša naloga pa bo potekala na realnih vzorcih, kjer bomo delali z raznoliko populacijo celic kostnega mozga. Ključni problem je zamejitev populacije zgolj plazmocitomskih celic. Plazmocitomske celice bomo poskusili nedvoumno omejiti z uporabo kombinacije ustreznih protiteles, in sicer CD-38 in CD-138. Ti dve protitelesi sta zelo specifični za označevanje plazmatk.

Za indukcijo apoptoze bomo uporabili dodatek 2 in 5 μM ATO v gojišče, v katerem bomo gojili celice KM. Kot pozitivno kontrolo bomo uporabili kamptotecin. Celice bomo ob prisotnosti ATO gojili 24 h in nato na plazmatkah določali apoptozo z reagenčnim kompletom Annexin V-FITC Kit, Beckman Coulter. Tako bomo ločili med živimi, pro-apoptotičnimi in mrtvimi celicami. Na voljo je več načinov sledenja apoptoze, mi se bomo odločili za pretočno citometrijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V Specializirani hematološki laboratorij Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo dobili aspirate KM, ki so bili odvzeti s punkcijo iz zadnjega trna črevnice. V raziskavi smo v obdobju od novembra 2009 do junija 2010 obravnavali 21 bolnikov, ki so imeli plazmocitomske celice v aspiratu KM. Od tega so bile 4 ženske drugi pa moški, povprečna starost bolnikov je bila 64 let.

Preglednica IV: Demografski podatki o bolnikih s plazmocitomom

BOLNIKI	SPOL	STAROST (let)	CITOLOŠKA OCENA INFILTRACIJE KM (5)
1	Ž	65	4
2	M	67	9
3	Ž	67	3
4	M	64	75
5	M	69	11
6	M	73	12
7	M	53	n.p.
8	M	59	55
9	M	44	8
10	M	58	n.p.
11	M	76	100
12	M	80	55
13	M	62	68
14	M	68	50
15	M	73	n.p.
16	Ž	73	n.p.
17	M	53	56
18	M	51	45
19	Ž	70	35
20	M	53	10
21	M	65	n.p.

(M- moški; Ž- ženska; n.p.- ni podatka)

3.2 OPREMA

- pipete 100-1000 μL , 10-100 μL , 0,5-10 μL ; Eppendorf
- nastavki za pipete 1000 μL , 100 μL , 10 μL ; Eppendorf
- stresalnik Vibromix 10; Tehnica
- centrifuga Labofuge 400; Heraeus
- centrifuga Centric 322A; Tehnica
- vodna kopel VKNPn b 323015 PID, Termoproc
- CO₂ inkubator Innova CO-48; New Brunswick scientific co., Inc.
- CO₂ inkubator MCO 15AC; Sanyo
- Pasteurjeve pipete 5 mL, 10 mL; Dispenser
- sterilne kapalke 3 mL; BD FalconTM
- centrifugirke 50 mL; FALCON[®]
- epice 1,5 mL; Eppendorf
- centrifugirke s koničastim dnom 15 mL; CELLSTAR[®]
- čaše
- 100 mL bučke
- plošča za gojenje s 24 vdolbinicami, CELLSTAR[®]
- posodice za gojenje 25 cm², 50 mL; CELLSTAR[®]
- pretočni citometer Cytomics FC 500, Beckman Coulter
- hematološki analizator Coulter LH 750, Beckman Coulter
- steklca Shandon Cytoslide[®], Thermo scientific
- filter kartice Shandon Single Cytotunnel[®], Thermo scientific
- citocentrifuga Cytospin Shandon

3.3 METODE

3.3.1 GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA

RAZTOPINE IN PRIPRAVA RAZTOPIN

- gojišče RPMI 1640 z antibiotikom; GIBCO®
- Hank's; Sigma

Komercialno raztopino smo redčili v 1 L destilirane vode. pH vrednost smo uravnali na 7,2 (NaHCO_3 , nasičena raztopina), sterilno smo prefiltrirali (brizge, filtri 0,2 μm).

- Timidin; Sigma (0,025M; 6 mg/mL).

1 g Timidina smo raztopili v 167 mL razredčene raztopine Hank' s-a in sterilizirali.

- gojišče Marrow Karyotyping Medium (KMB), Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Israel
- gojišče Marrow MaxTM (KMM), GIBCO®, ZDA
- 1x PBS

Pripravili smo ga iz 100 mL 10x PBS in 900 mL destilirane vode. pH vrednost smo uravnali na 7,4.

10x PBS smo pripravili iz NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.41 g/L (11.5 g Na_2HPO_4), uravnali pH na 7,4 ter sterilizirali.

3.3.1.1 Priprava celic kostnega mozga za gojenje

Vzorci KM smo dobili v sterilni epruveti v gojišču RPMI 1640 z antibiotikom in 0,5 mL Na-Heparina. Centrifugirke z vzorcem smo centrifugirali pri 1600 obratih/min 10 minut. Supernatant smo previdno odstranili s sterilno kapalko za enkratno uporabo. Na fazni meji med zgornjo spiralno raztopino in spodnjimi eritrociti se nahaja KM, ki smo ga s kapalko previdno povlekli. KM smo resuspendirali v 8 mL raztopine Hank's-ove raztopine, ki smo jo predhodno segreli na 37°C in nato centrifugirali pri 1600 obratih/min 10 minut. Supernatant smo s kapalko previdno odstranili, nato pa smo v kapalko povlekli KM, ki smo ga prenesli v približno 1 mL gojišča KMB. Dobro smo premešali na stresalniku. Sterilno smo odpipetirali 100 μL KM v gojišču in mu dodali 200 μL 1x PBS pufra. S

pomočjo hematološkega analizatorja smo izmerili koncentracijo levkocitov v tako rečenem vzorcu. Dobljeno vrednost X (celic/L) smo pomnožili s faktorjem 3 in izračunali potrební volumen vcepka, ki je bila končna koncentracija celic $1 \times 10^9/\text{L}$.

$$V = \frac{16 \text{ (mL)} \times 10^6 \left(\frac{\text{celic}}{\text{mL}} \right) \times 1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{L}} \right)}{X \left(\frac{\text{celic}}{\text{L}} \right)}$$

Izračunanemu volumnu celic smo dodali toliko rastnega medija KMB, da je bil skupni volumen 2 mL. V posodice za gojenje celičnih kultur (25cm^2) smo sterilno odpipetirali 6,5 mL gojišča KMM in 300 μL timidina. Gojišča smo za nekaj minut postavili v vodno kopel na 37°C in nato smo vanj prenesli 1 mL predhodno pripravljenega vzorca. Na posodico smo napisali ime in priimek preiskovanca, datum, oznako gojišča in čas začetka gojenja. Posodice smo takoj prenesli v inkubator. Gojili smo pri 37°C in 5% CO_2 v vlažni atmosferi 24 ur.

3.3.2 PRIPRAVA CITOCENTRIFUG

RAZTOPINE IN PRIPRAVA RAZTOPIN

- raztopina Giemsa, Fluka

Pripravili smo jo tako, da smo zmešali raztopino Giemse in fosfatnega pufru v razmerju 1:10 (10 mL Giemse in smo dodali fosfatni pufer do 100 mL).

- raztopina May-Grunwald, Fluka
- fosfatni pufer

V vsakem vzorcu smo preverili delež plazmocitomskih celic v preparatu pripravljenem s pomočjo citocentrifug.

Iz gojišča smo odvzeli 100 μL celične suspenzije, ki smo ji dodali 200 μL PBS (1X). Izmerili smo koncentracijo celic na hematološkem analizatorju in jo uravnali na $0,5\text{--}1,0 \times 10^9/\text{L}$. Za redčenje, če je bilo potrebno smo uporabili KMB gojišče. Ustrezni končni volumen (V_K) smo izračunali po naslednji enačbi:

$$V_2 = \frac{N (L^{-1}) \times 300 \mu L}{[0,5 \sim 1] 10^9 L^{-1}}$$

$$V_K = V_2 - 300 \mu L$$

Nato smo 200 μL pripravljene suspenzije nanесли na objektna stekla, ki smo jih vpeli na citološke nastavke. Centrifugirali smo 10 minut pri 700 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo preparate posušili na sobni temperaturi (2 uri). Posušene preparate smo pobarvali, in sicer najprej 5 minut v May-Grunwaldovi raztopini. Nato smo jih prenesli v naslednjo posodico, kjer je bila May-Grunwaldova raztopina in fosfatni pufer v razmerju 1:1. Po 1 minuti smo jih prestavili v raztopino Giemse v fosfatnem pufru za 20 minut. Na koncu smo jih sprali s fosfatnim pufrom in posušili na zraku. Posušene preparate smo pogledali pod svetlobnim mikroskopom na 1000-kratni povečavi.



Slika 6: Citocentrifuga Cytospin Shandon (levo) in vpeta filter kartica v citološki nastavki (desno)

3.3.3 GOJENJE CELIC KOSTNEGA MOZGA OB PRISOTNOSTI ARZENOVEGA TRIOKSIDA IN KAMPTOTECINA

RAZTOPINE IN PRIPRAVA RAZTOPIN

- 0,1% raztopina ATO; lekarna UKC
- 250 mg kamptotecin (KPT); Biocompare®
- DMSO; Sigma

Priprava raztopine ATO

Iz 0,1% raztopine ATO smo pripravili 2-krat po 100 mL raztopine dveh različnih koncentracij. Odpipetirali smo takšen volumen ATO, da smo dobili želene končne koncentracije v gojišču.

Preglednica V: Volumni in koncentracije ATO v gojišču

Koncentracija v 100 mL raztopine ATO (mol/L)	Volumen ATO dodanega v gojišče (μL)	Končna koncentracija ATO v gojišču (μM)
$1,2 \times 10^{-4}$	33,3	2
3×10^{-4}	33,3	5

Priprava raztopine KPT

Pripravili smo 2 mM KPT z DMSO v epruvetkah po 1 mL. Zamrznili smo jih v hladilniku pri -20°C. V gojišče smo odpipetirali 50 μL pripravljene raztopine KPT, tako da je bila končna koncentracija 50 μM.

Postopek:

Po 24 urah smo s Pasteurjevo pipeto združili vsa gojišča in dobro premešali na stresalniku. Na hematološkem analizatorju smo izmerili vrednost levkocitov. Izračunali smo volumen vzorca in volumen dodanega gojišča, da je bila končna koncentracija levkocitov 1×10^9 celic/L. Končni volumen gojišča, vzorca in ATO ali KPT je znašal 2 mL. V posodice smo odpipetirali gojišče, vzorec in ATO ali KPT, ter vse skupaj postavili v inkubator za 24 ur.

Celice smo gojili pri 37°C in pri 5% CO₂, v vlažni atmosferi. Za kontrolo smo pripravili še gojišče, ki mu nismo dodali induktorja apoptoze, to smo uporabili kot negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo pa smo uporabili gojišče s KPT.

3.3.4 OSAMITEV PLAZMOCITOMSKIH CELIC

REAGENTI IN PRIPRAVA REAGENTOV

- reagenčni komplet
 - 100 µL aneksin V-FITC, ki vsebuje 1 mg/mL BSA, koncentracija: 5 µg/mL
 - 250 µL PI
250 µg PI smo raztopili v 1 mL veznega pufra in jo prenesli na led. Pripravljeno raztopino smo hranili pri 2-8°C.
 - 1,7 mL 10-krat koncentriranega veznega pufra
10x koncentriran vezni pufer smo razredčili z destilirano vodo, v razmerju 1:10. Tako pripravljen vezni pufer smo prenesli na led. Raztopino smo pripravili vedno sproti.
- amonijev klorid (NH₄Cl)
10x NH₄Cl smo pripravili iz NH₄Cl 82,60 g/L; KHCO₃ 10,00 g/L; EDTA 0,37 g/L. Delovno raztopino smo pripravili tako, da smo 10x NH₄Cl redčili 1:10 z destilirano vodo, tik pred uporabo.

Postopek:

Postopek ni standardiziran, zato smo izvedli osamitev plazmocitomskih celic po 1, 3, 18, 24 in 48 urah od začetka gojenja v prisotnosti ATO.

Po končanem gojenju smo izmerili koncentracijo levkocitov v vsaki posodici na hematološkem analizatorju. Tako smo se prepričali, da je koncentracija res $1 \cdot 10^9$ celic/L. Iz vsake posodice smo v 50 mL centrifugirke odpipetirali po 1 mL vzorca, dodali smo 24 mL NH₄Cl (1X) ter inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Po končani inkubaciji smo centrifugirali v hlajeni (4°C) centrifugi 5 minut pri 1700 obratih/min. Po končanem

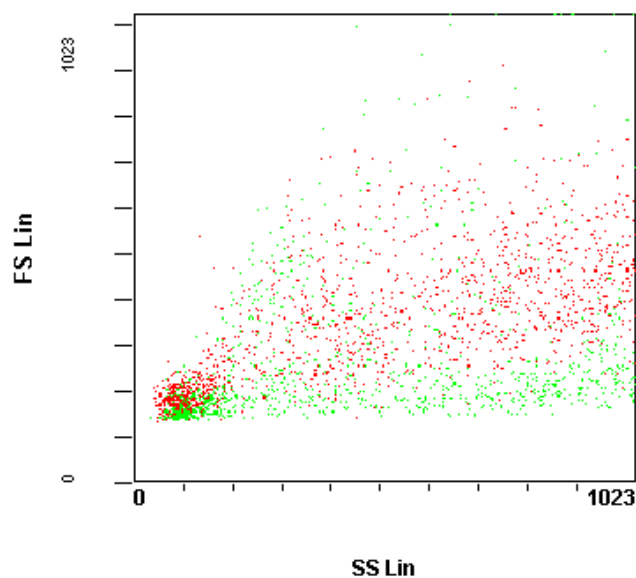
centrifugiranju smo odlili supernatant in sedimentu dodali 1 mL hladnega PBS (1X) ter dobro premešali na stresalniku. Celično suspenzijo smo prenesli v male epruvete in dodali 1 mL hladnega PBS (1X) ter dobro premešali na stresalniku. Nato smo centrifugirali v hlajeni centrifugi 5 minut pri 1500 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, sedimentu smo dodali 100 μ L hladnega PBS (1X) ter premešali. V vse epruvete, razen v epruveto kjer imamo suspenzijo, ki nam bo služila za določitev ozadja, smo dodali 20 μ L CD138-PE in 10 μ L CD38-PC5. Nato smo inkubirali v temi in na hladnem 15 minut. Po končani inkubaciji smo dodali 500 mL hladnega PBS (1X) ter premešali na stresalniku. Centrifugirali smo v hlajeni centrifugi 5 minut pri 1500 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, dodali smo 300 μ L hladnega veznega pufra (1X) ter premešali na stresalniku. Iz vsake epruvete smo odpipetirali 100 μ L celične suspenzije in dodali 5 μ L Anexina in 2,5 μ L PI. Anexina in PI nismo dodali v suspenzijo, ki nam bo služila za ozadje. Inkubirali smo 10 minut v temi in na ledu. Po končani inkubaciji smo dodali 400 μ L hladnega veznega pufra (1X) ter premešali na stresalniku. Analizirali smo na pretočnem citometru.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 POSTOPEK DOLOČANJA APOPTOZE V PLAZMOCITOMSKIH CELICAH

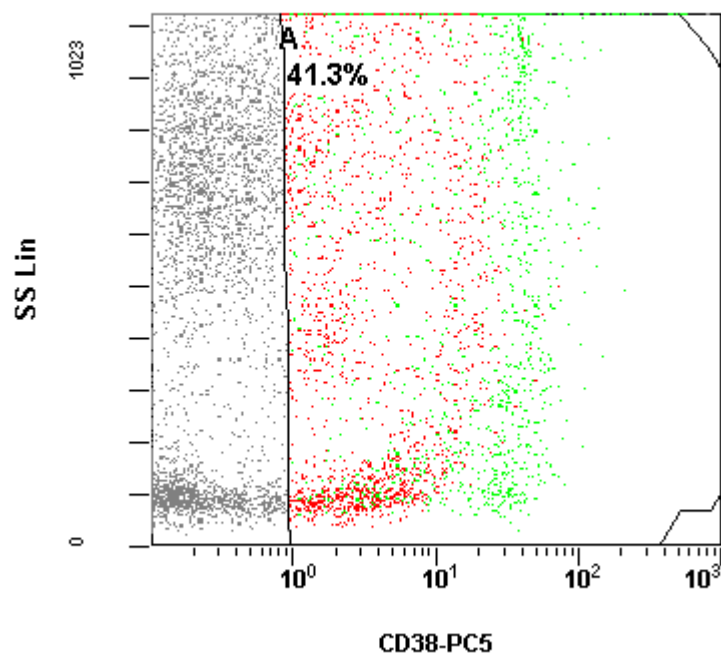
Apoptozo smo določali na pretočnem citometru. Spremljali smo tudi delež živih in nekrotičnih celic. Plazmocitomske celice smo zamejili s protitelesi CD138-PE in CD38-PC5.

Na sliki 7 so z zeleno barvo označene plazmocitomske celice, z rdečo pa ostale celice. Abscisna os podaja granularnost celic, ordinatna pa velikost celic. Plazmocitomske celice so razpršene po celem histogramu. Proces apoptoze namreč povzroči, da plazmocitomske celice spremenijo tako granularnost kot velikost.



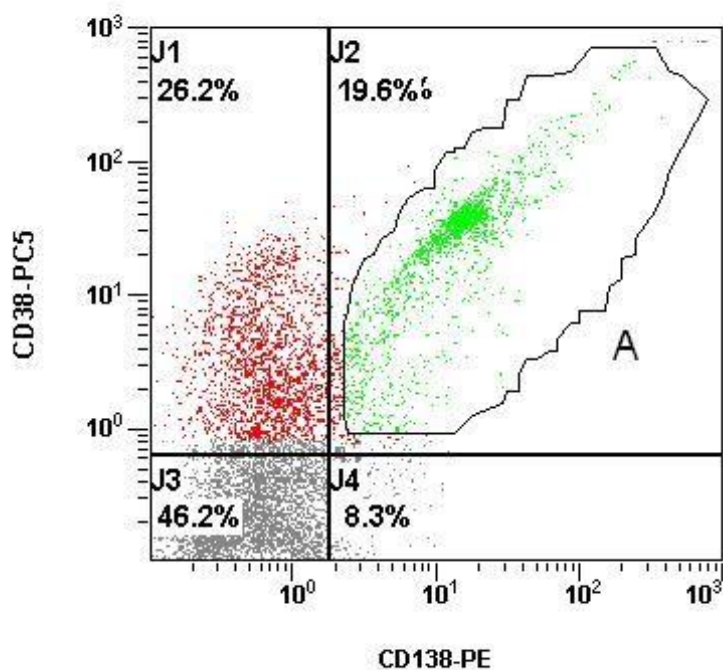
Slika 7: Razporeditev celice glede na velikost (FS Lin) in granularnost (SS Lin)

Slika 8 prikazuje zamejitev populacije glede na pozitivno fluorescenco s protitelesom CD38-PC5 označenih celic. Z zeleno barvo so označene celice, ki so CD38 in CD138 pozitivne (slika 9).



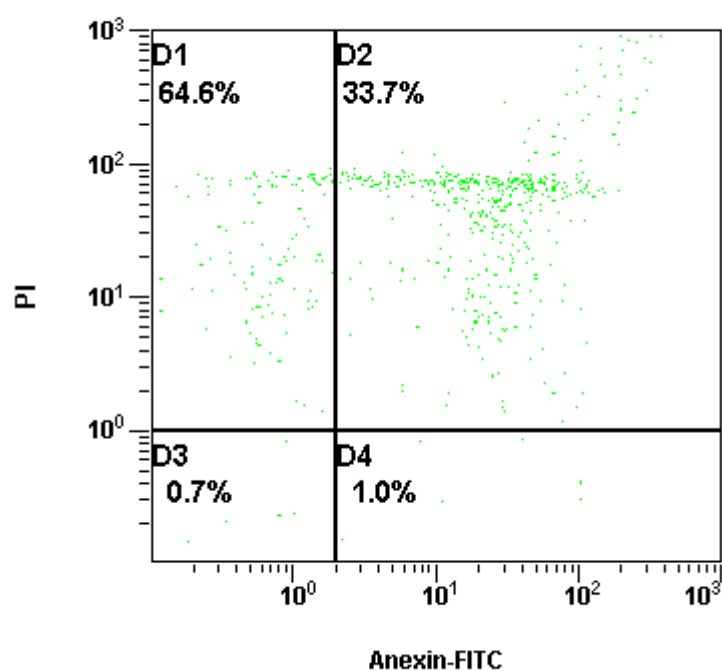
Slika 8: Zamejitev populacije CD38-PC5 pozitivnih celic

Slika 9 prikazuje zamejitev populacije s protitelesi CD138-PE in CD-38-PC5 pozitivnih celic. Ti dve protitelesi sta specifični za označevanje plazmatk. Apoptozo smo določali zgolj na označeni populaciji (področje A).



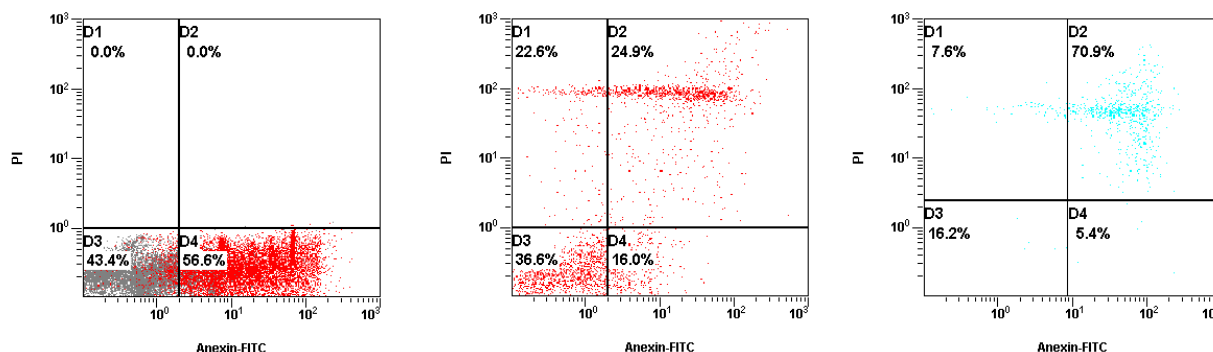
Slika 9: Zamejitev populacije CD138-PE in CD38-PC5 pozitivnih celic

Slika 10 prikazuje histogram razporeditve celic pri označevanju z Annexinom V-FITC in propidijevim jodidom (PI) znotraj subpopulacije plazmocitomskih celic. V kvadrantu D1 se nahajajo celice, ki so odmrle in so v zgodnji fazi nekroze. Celice se obarvajo s PI, ne veže pa se aneksin. V kvadrantu D2 so celice v nekrozi, obarvane s PI ter aneksinom. V izpostavljenem kvadrantu D3 so žive, neapoptotične celice, ki se ne obarvajo s PI in aneksinom. V kvadrantu D4 so celice v zgodnji fazi apoptoze. Nanje se veže aneksin, ker pa je celična membrana nepoškodovana, se ne obarvajo s PI.



Slika 10: Določitev obsega apoptoze z aneksinom

Slika 11 prikazuje različno razporeditev celic v histogramu pri različnem obsegu apoptoze.

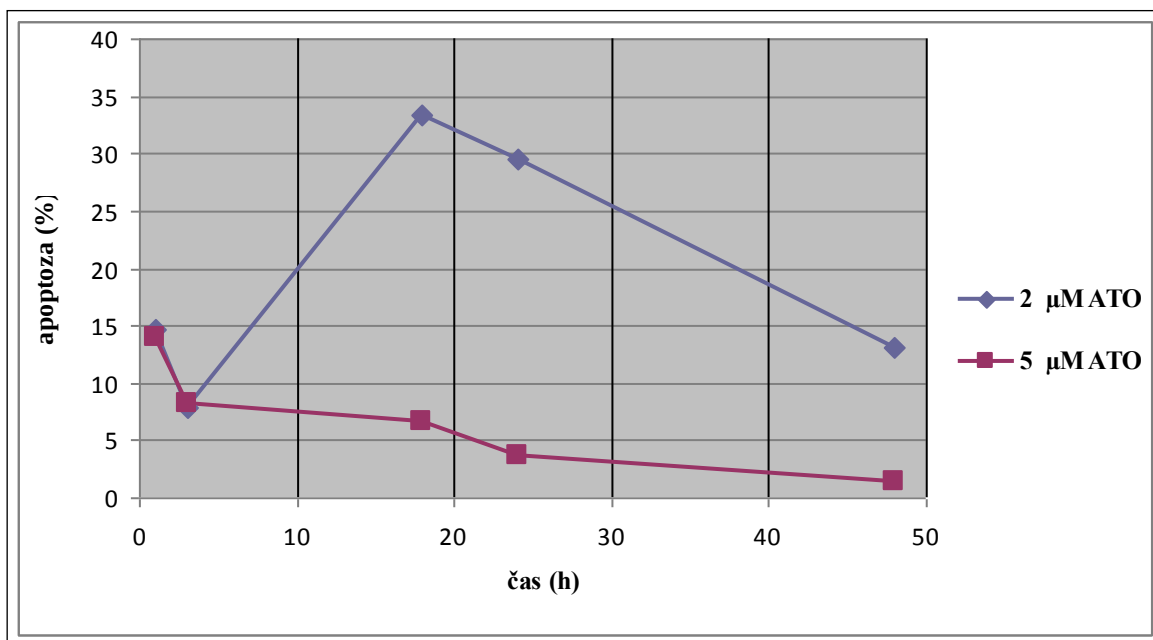


Slika 11: Celice so samo v apoptozi in žive (A), celice so enakomerno razporejene po vseh štirih kvadrantih (B), večina celic je v nekrozi (C)

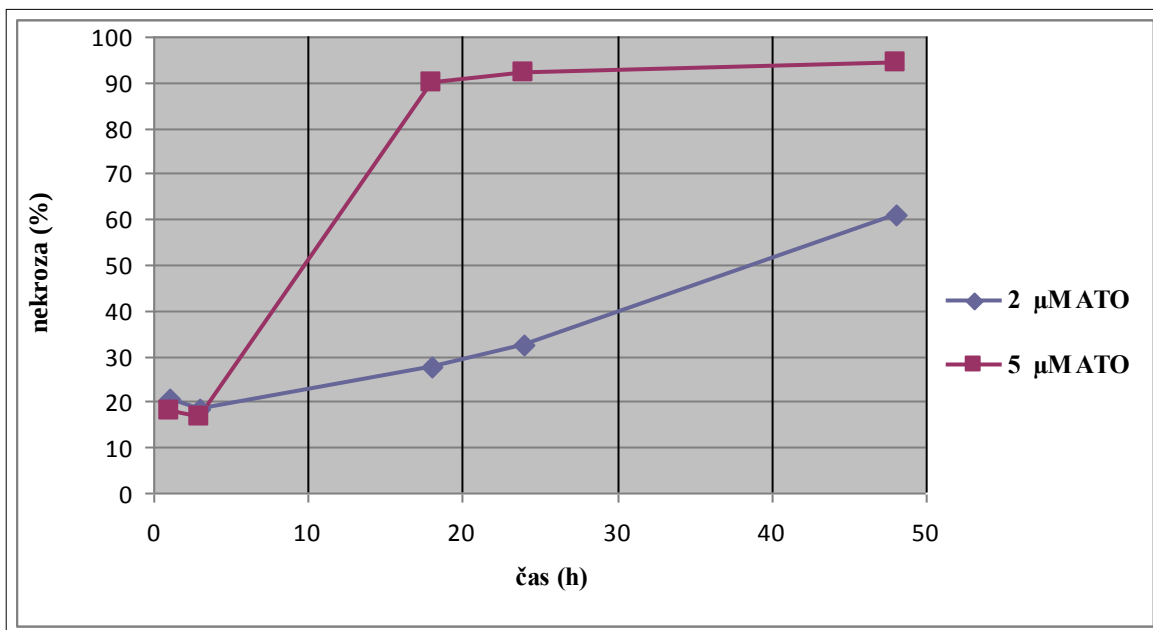
4.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA ČASA IZPOSTAVLJENOSTI PLAZMOCITOMSKIH CELIC ARZENOVEMU TRIOKSIDU

Preverili smo časovno odvisnost obsega apoptoze, sprožene s KPT v prisotnosti ATO na enem vzorcu. Ker je časovni parameter zelo kritičen, smo se odločili za dolg časovni interval gojenja. Tako smo gojili celice v prisotnosti 2 in 5 μM ATO, 1, 3, 18, 24 in 48 ur.

Kot prikazujeta sliki 12 in 13 je pri 2 μM ATO do 24 ur obseg apoptoze naraščal, pri daljšem gojenju pa je začel upadati. Pri 5 μM ATO delež apoptoze pada od začetka gojenja dalje. Odstotek nekrotičnih celic pa je celoten čas gojenja naraščal pri obeh koncentracijah ATO.



Slika 12: Odvisnost apoptoze plazmocitomskih celic od časa gojenja



Slika 13: Odvisnost nekroze plazmocitomskih celic od časa gojenja

4.3 DOLOČANJE APOPTOZE IN NEKROZE V PLAZMOCITOMSKIH CELICAH

Glede na rezultate časovne odvisnosti poteka apoptoze in nekroze in tehnično izvedljivost eksperimenta smo izbrali 24 urno gojenje za poskuse na večjem številu vzorcev. Pri 21 bolnikih smo tako določili obseg apoptoze po 24 urah pri dveh različnih koncentracijah ATO.

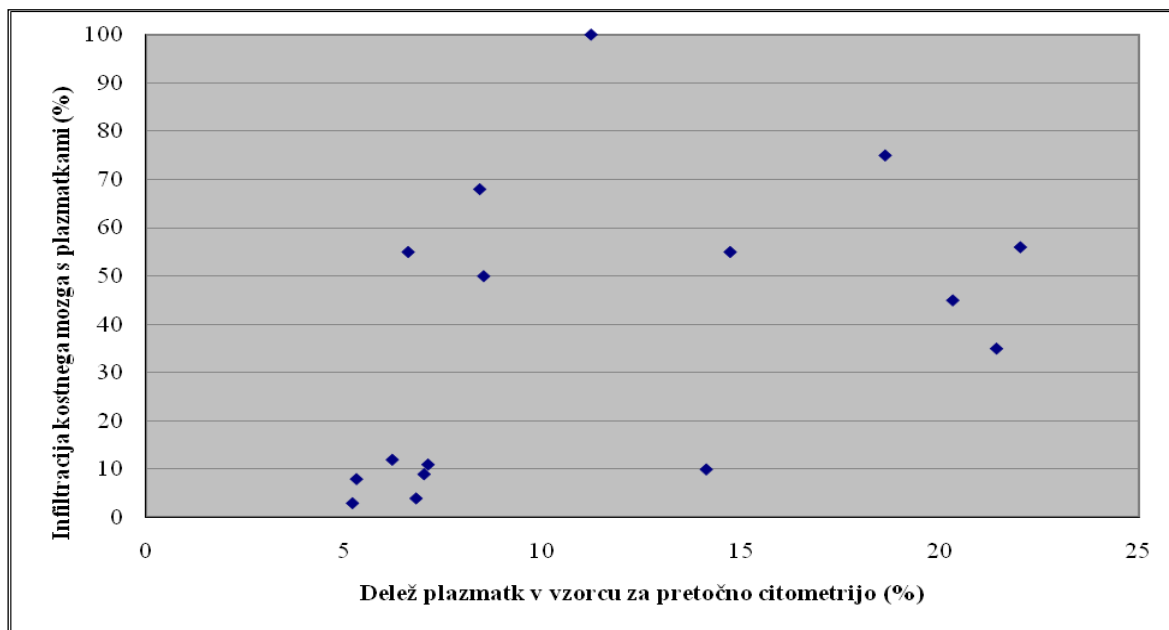
Ker smo imeli kot pozitivno kontrolo KPT, smo rezultate razvrstili glede na obseg apoptoze pri gojenju s KPT.

Preglednica VI: Obseg apoptoze pri realnih vzorcih bolnikov s plazmocitomom

BOLNIKI	CITOLOŠKA OCENA INFILTRACIJE KM (%)	CD38/ CD138 POZITIVNE CELICE V VZORCU (%)	APOPTOZA (%)		NEKROZA (%)		KAMPTOTECIN	
			2 µm ATO	5 µm ATO	2 µm ATO	5 µm ATO	APOPTOZA (%)	NEKROZA (%)
2	9	7	0,39	0,00	98,44	96,60	0	0,00
8	55	6,6	0,00	0,00	2,30	5,45	0	2,33
14	50	8,5	0,06	0,18	0,41	0,48	0,17	0,75
5	11	7,1	5,23	0,06	21,93	17,11	0,20	56,20
1	4	6,8	1,54	2,78	79,71	92,63	1,25	93,39
10	n.p.	7,5	0,69	2,69	39,54	59,18	1,57	86,54
3	3	5,2	9,19	7,16	86,37	85,53	1,59	94,04
7	n.p.	46,9	0,63	0,78	2,01	1,36	1,64	2,30
12	55	14,7	1,05	1,72	1,65	1,95	2,14	2,39
13	68	8,4	0,51	3,59	2,83	3,96	2,19	3,49
21	n.p.	30,4	29,48	3,70	32,67	91,90	4,87	91,81
20	10	14,1	1,00	4,07	33,69	86,82	5,26	71,96
6	12	6,2	8,02	5,47	44,07	77,68	5,70	89,75
11	100	11,2	2,14	1,13	12,57	95,61	6,37	93,13
16	n.p.	24,2	6,78	11,48	55,54	74,59	6,44	76,31
4	75	18,6	8,97	17,09	21,73	45,54	9,69	74,94
19	35	21,4	6,95	13,91	46,95	77,98	9,73	62,67
18	45	20,3	2,73	29,01	6,37	55,09	10,76	86,27
9	8	5,3	0,00	4,22	12,62	48,80	15,29	51,99
15	n.p.	31,6	20,82	19,61	32,11	50,99	21,03	28,35
17	56	22	11,20	13,88	19,15	51,91	39,41	42,75

(n.p.- ni podatka)

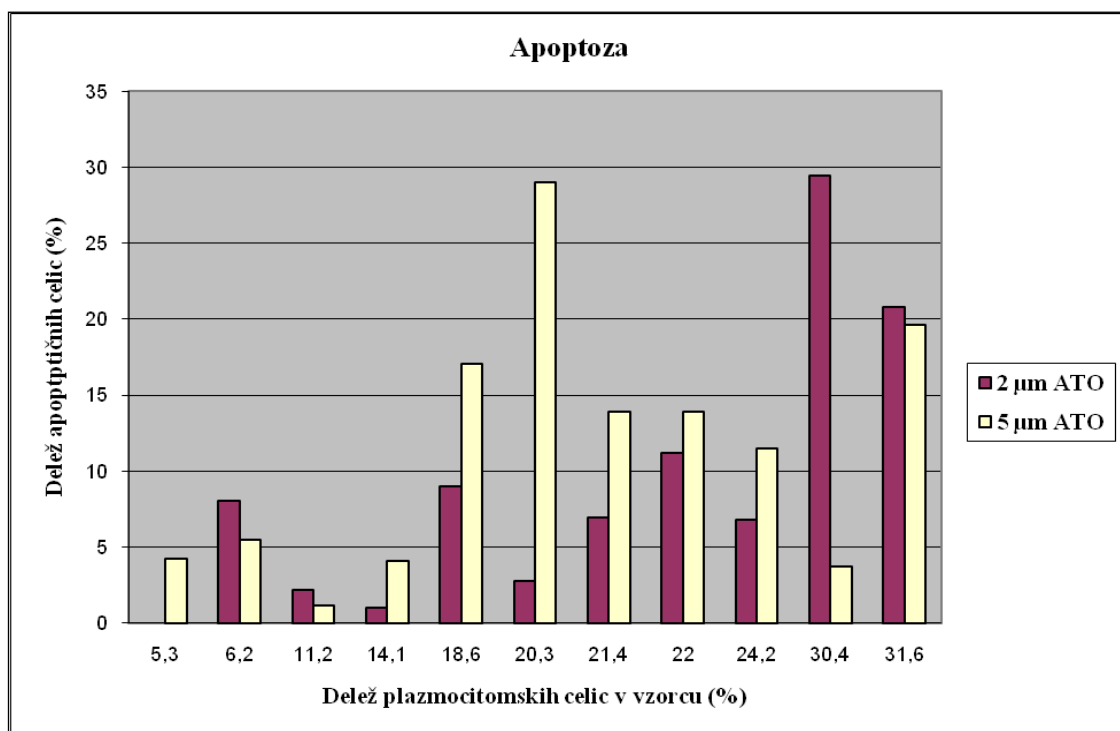
Slika 14 prikazuje odvisnost deleža CD38/CD138 pozitivnih celic v analiziranem vzorcu kostnega mozga od infiltracije KM s plazmatkami, določene s citomorfološko oceno KM. Kot je razvidno iz slike je korelacija slaba. V vzorcih bolnikov, ki so namenjeni za laboratorijsko diagnostiko je lahko tudi desetkrat manj plazmatk kot v stisnjencih KM. To je tudi eden od razlogov, da je dostopnost do vzorcev, primernih za poskuse, zelo slaba.



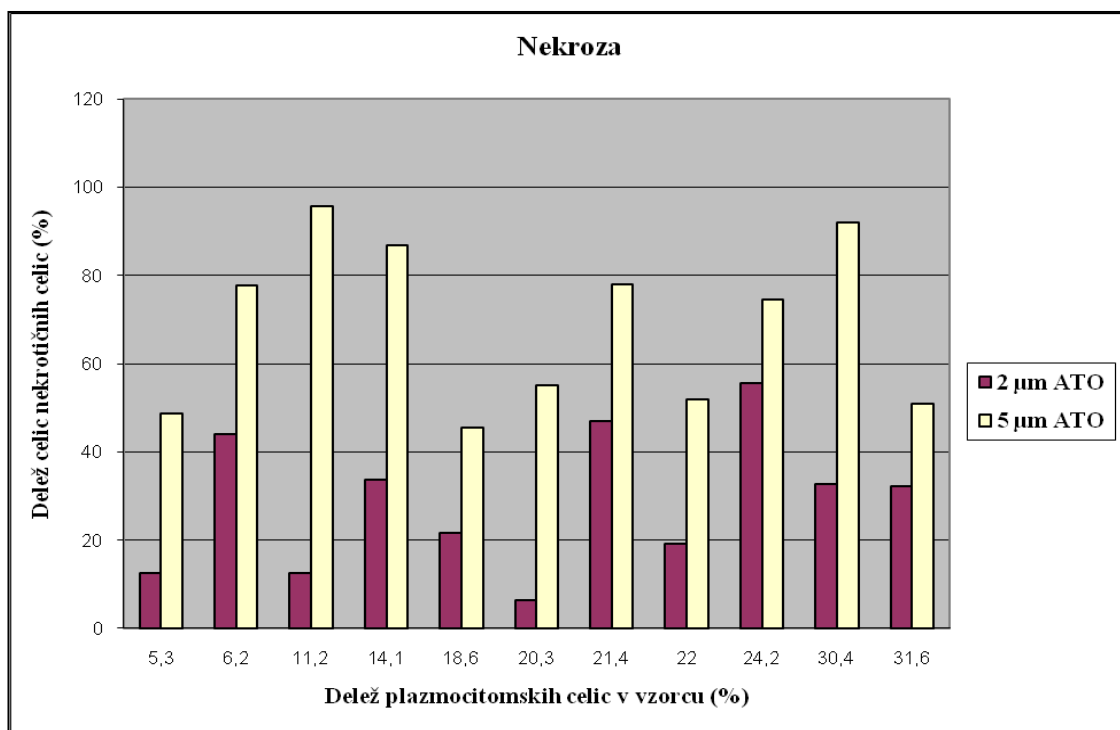
Slika 14: Korelacija med deležem plazmatk v vzorcu za pretočno citometrijo in infiltracijo KM

Pri polovici analiziranih vzorcev je bil obseg apoptoze izzvane s KPT manjši od treh odstotkov, pri polovici pa večji. Pri polovici vzorcev, kjer je bila pozitivna kontrola ustrezna (3 %), smo opazovali vpliv deleža plazmocitomskih celic na obseg apoptoze ter vpliv koncentracije ATO na procesa apoptoze in nekroze.

Sliki 15 in 16 prikazujeta odvisnost apoptoze oziroma nekroze od infiltracije kostnega mozga s plazmocitomskimi celicami. Pri vzorcih, kjer je prisotnih več kot 15% plazmocitomskih celic v vzorcu, je tudi delež apoptotičnih celic večji, medtem ko je zlasti pri 5 μ M ATO prevladujoč proces nekroze, neodvisno od infiltracije KM.

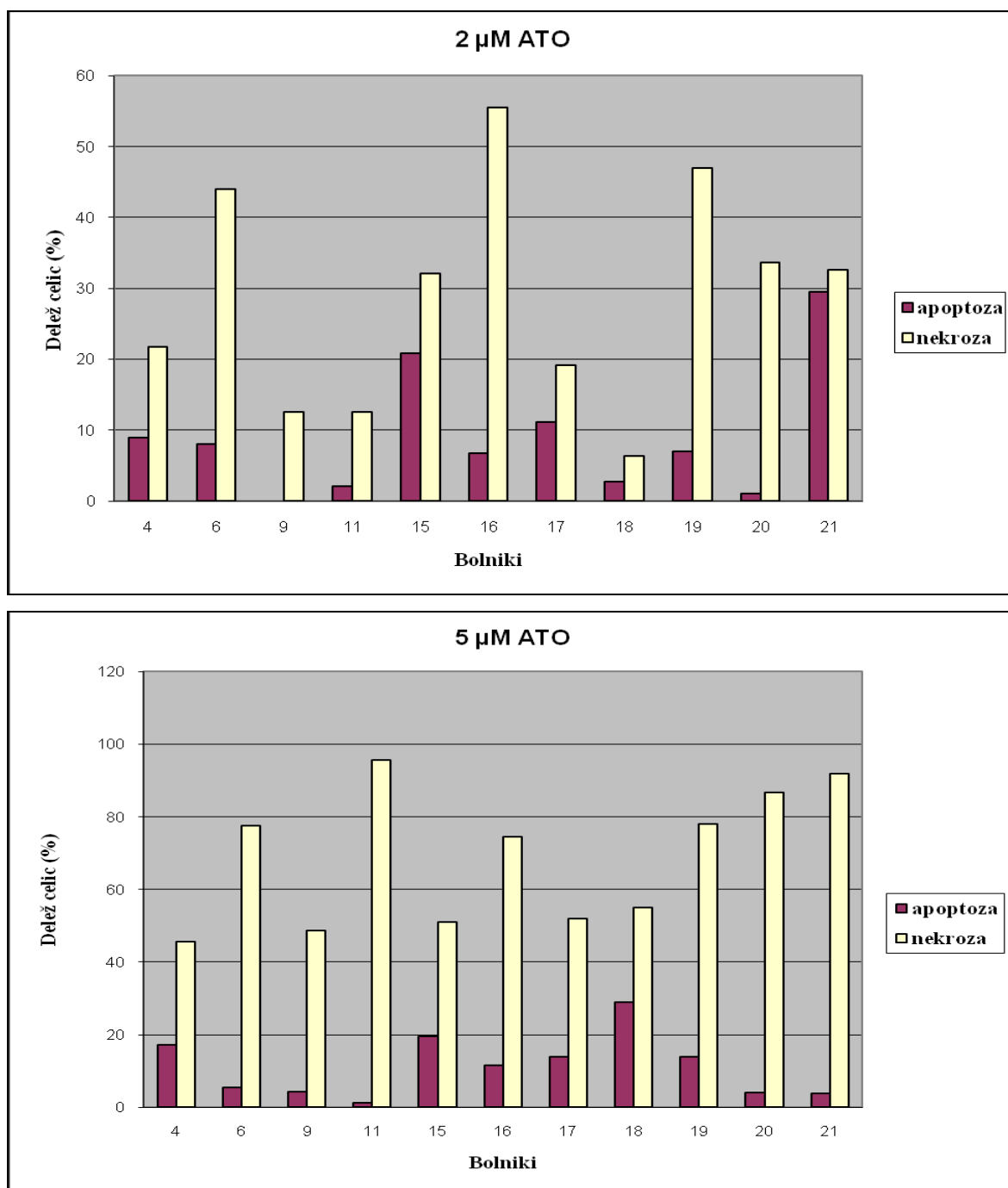


Slika 15: Odvisnost obsega apoptoze od infiltracije KM s plazmatkami



Slika 16: Odvisnost obsega nekroze od infiltracije KM s plazmatkami

Slika 17 prikazuje apoptozo in nekrozo pri obeh koncentracijah ATO pri bolnikih, kjer je bil obseg apoptoze pri pozitivni kontroli večji od 3%. Kot je razvidno iz slik je pri obeh koncentracijah ATO bolj izrazita nekroza kot apoptoza, vendar je pri nižji koncentraciji ATO razlika med obema procesoma manjša.



Slika 17: Odvisnost obsega apoptoze in nekroze od konc. ATO

4.4 RAZPRAVA

4.4.1 DOLOČANJ APOPTOZE NA REALNIH VZORCIH KOSTNEGA MOZGA Z ANEKSINOM V

Namen naše diplomske naloge je bil prilagoditi način določanja obsega apoptoze, povzročene z ATO, na plazmocitomskih celicah v realnih vzorcih kostnega mozga (KM) bolnikov z diseminiranim plazmocitomom. Uporabili smo komercialni reagenčni komplet Annexin V (Beckman Coulter), ki smo ga spremenili tako, da smo za zamejitev zgolj plazmocitomske populacije celic uporabili dodatno označevanje s protitelesi CD-38 in CD-138. Samo na osnovi fizikalnih lastnosti celic namreč zamejitev ni mogoča (Slika 8). Določanje na celotni populaciji celic je glede na zelo majhen delež plazmatk v analiziranih vzorcih (Preglednica VI) namreč neustrezna.

4.4.2 ČASOVNA ODVISNOST OBSEGA APOPTOZE

V prvem sklopu eksperimentov smo določali vpliv časa gojenja na obseg apoptoze. Ugotovili smo, da obseg apoptoze pri nižji koncentraciji ATO (2 μM) doseže največjo vrednost po 18 do 24 urah, medtem ko je večja koncentracija ATO (5 μM) očitno prevelika in obseg apoptoze se zmanjšuje od samega začetka gojenja. Nekroza med 48 urnim gojenjem dokaj linearno narašča pri 2 μM ATO, medtem ko pri 5 μM ATO doseže plato že po 18-ih urah gojenja.

Ker je dostopnost vzorcev KM bolnikov s plazmocitomom omejena, smo se odločili za vzporedne poskuse z 2 μM in 5 μM ATO. Izbrali smo 24 h gojenje, ker je tehnično skoraj neizvedljivo, da bi poskuse izvedli s časovnim zamikom 18 h. Ta čas, ki se je pri 2 μM ATO izkazal kot optimalen. Obenem pa je že iz teh poskusov razvidno, da pri večji koncentraciji ATO v izbranem času nekroza doseže končni obseg (Slika 13).

4.4.3 DOLOČANJE APOPTOZE NA REALNIH VZORCIH BOLNIKOVS PLAZMOCITOMOM

Glavna težava s katero se srečuje laboratorij pri diagnostiki plazmocitoma je neenakomerna infiltracija kostnega mozga s plazmocitomskimi celicami. Problem izhaja delno iz narave bolezni same, delno pa iz načina vzorčenja. Tudi v naših poskusih smo se srečali s problemom, da je bila vsebnost plazmatk v vzorcih bistveno manjša kot pri citomorfološkem pregledu (Slika 14).

V drugem sklopu eksperimentov smo izvedli 24 urno gojenje celic ob prisotnosti dveh različnih koncentracij ATO. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili kamptotecin (KPT) in izločili tiste vzorce, pri katerih KPT ni izzval apoptoze. Najmanj 3% apoptotičnih celic smo določili kot spodnjo arbitrarno mejo za vzorce, kjer smo nadalje analizirali rezultate. KPT naj bi namreč izzval apoptozo v takem obsegu, ki bi bil zanesljivo nad vrednostjo negativne kontrole. Takih vzorcev je bila polovica. Med tistimi, kjer je bila pozitivna kontrola neustrezna sta le dva, kjer je ATO izzval apoptozo v obsegu nad 5 %, medtem ko med opazovanimi desetimi rezultati z ustrezno pozitivno kontrolo ne najdemo nobenega, kjer ne bi vsaj večja koncentracija ATO izzvala apoptoze vsaj pri 3 % celic. Opazimo pa lahko še nekaj. Da imamo med izločenimi vzorci le dva z več kot 10 % plazmocitomskih celic in med opazovanimi vzorci le dva z manj kot 10% plazmocitomskih celic. Zato bi bilo v nadaljnjih poskusih z ATO morda smiselno izločiti vzorce, kjer je plazmocitomskih celic manj kot 10 %.

Ugotovili smo, da obseg nekroze ni odvisen od deleža plazmatk v vzorcu (Slika 16). Korelacijo smo ugotavljali s Spearmanov-ovim koeficientom. Pri 2 μ M koncentraciji ATO je koeficient 0,668, pri 5 μ M koncentraciji pa 0,748. Ker je pri obeh koncentracijah koeficient manjši od 0,9 ni korelacije. Medtem ko je obseg apoptoze večji pri deležu plazmatk nad 15 % (Slika 15). Nadalje lahko ugotovimo, da je pri vseh vzorcih prevladujoč proces nekroze, vendar je pri 5 μ M ATO to bistveno izrazitejše kot pri 2 μ M ATO (slika 16).

5 SKLEP

- Določili smo časovno odvisnost apoptoze in nekroze sprožene z ATO. Ugotovili smo, da je optimalni čas za določanje apoptoze 18-24 ur pri 2 μM koncentracija ATO. Pri večji koncentraciji ATO (5 μM) pa se obseg apoptoze zmanjšuje vse od začetka dodatka ATO v gojišče.
- Za spremljanje vzorcev bolnikov smo le-te gojili v prisotnosti ATO 24 ur. Ugotovili smo, da pri vseh vzorcih prevladuje nekroza nad apoptozo. Ker smo delali na realnih vzorcih, so se rezultati medsebojno precej razlikovali. Ugotovili smo, da obseg nekroze ni odvisen od deleža plazmatk v vzorcu, medtem ko je obseg apoptoze večji pri deležu plazmatk nad 15 %. Delež nekroze je bil pri vseh vzorcih velik, znatno večji pa pri 5 μM ATO glede na 2 μM ATO.
- Izsledki potrjujejo, da bi bilo smiselno skrajšati čas gojenja in obseg apoptoze, sprožene z ATO, določati le pri 2 μM koncentraciji ATO v gojišču. Primernejši za preiskave pa so vzorci z vsaj 10 % plazmocitomskih celic.

6 LITERATURA

1. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T: Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Inetrna medicina, glavna urednika Kocjančič A, Mrevlje F, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 1261-1266.
2. Top News.in. Novel Discovery Paves Way For Treatment Of Multiple Myeloma. (Dostopano 16.06.2010)
URL: <http://www.topnews.in/novel-discovery-paves-way-treatment-multiple-myeloma-2267033>
3. Vozelj M: Temelji imunologije. DZS, Ljubljana 2000: 1-20.
4. Kotnik V, Čurin Šerbec V, Ihan A, Jeras M, Malovrh T, Simčič S, Škoberne M, Wraber B: Imunologija priročnik za vaje. Medicinski razgledi, Ljubljana 2001, 6-7; 13-14.
5. Mlakar U, Andoljšek D, Fikfak N, Glaser M, Grat M, Grmek-Zemljčič T, Preložnik-Zupan I, Pretnar J, Zver S: Smernice za odkrivanje in zdravljenje diseminiranega plazmocitoma. Zdravniški vestnik 2006; 75: 3-8.
Dostopno na: <http://vestnik.szdl.si/st6-1/03-08.pdf>
6. Apoptosis info. Apoptosis. (Dostopano 16.06.2010)
URL: <http://www.apoptosisinfo.com>
7. Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group. Cell death. (Dostopano 10.06.2010)
URL: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash>
8. Cerar A, Luzar B, Rott T, Zidar N: Patologija : izbrana poglavja iz patologije z navodili za vaje, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana 2006; 15-17.
9. Pižem J, Cör A: Kaspaze. Medicinski razgledi 2001; 40: 283-291.
Dostopno na: http://www.medrazgl.si/e107_files/public/datoteke/mr01_3_03.pdf
10. Mayer B, Oberbauer R: Mitochondrial Regulation of Apoptosis. Physiology 2003; 18: 89-94.
Dostopno na: <http://physiologyonline.physiology.org/cgi/content/full/18/3/89>
11. Kumar V, Abbas A, Fausto N: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7. Izdaja, Philadelphia, 2005: 26-32.

12. Verenič P, Pšeničnik M, Romih R, Sterle M, Kralj M: Osnove celične biologije z navodili za vaje. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 2005; 56-57.
13. Evens A, Tallman M, Gartenhaus R: The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *Leukemia Research* 2004; 28: 891-900.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234563>
14. Goodman L S, Hardman J, Limbird L, Gilman A, Brunton L: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed., Medical publishing division, New York 2001; 1862-1864.
15. Dilda P, Hogg P: Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treatment Reviews* 2007; 33: 542-564.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624680>
16. Schipper H, Lee J, Singer J, Waxman S: Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide. *Cancer Research* 2002; 62: 3893-3903.
Dostopno na: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/14/3893.full>
17. Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X: Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001; 222: 183-188.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11678600>
18. Piazza F, Gurrieri C, Trentin L, Gianpietro S: Towards a new age in the treatment of multiple myeloma. *Ann Hematol* 2007; 86: 159-172.
19. Dalton W: Targeting the Mitochondria: An Exciting New Approach to Myeloma Therapy. *Clinical Cancer Research* 2002; 8: 3643-3645.
Dostopno na: <http://www.jsblood.org/documents/xxfb/2008310173736.pdf>
20. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Richardson P, Schlossman RL, Chauhan D, Munshi NC, Waxman S, Anderson KC: Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 851-60.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12492118>
21. Ihan A: Klinična uporaba limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Kemomed, Ljubljana, 1999: 11-14.
22. Cellular Analysis Catalog 2007/2008, Beckman Coulter.

23. Orciani M, Trubiani O, Guarnieri S, Ferrero E, Di Primio R: CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008; 105: 905-12.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759251>
24. Zhang Y, En-Hua Cao, Xiao-Qiu Liang, Jing-Fen Qin: Increasing sensitivity to arsenic trioxide-induced apoptosis by altered telomere state. *European Journal of Pharmacology* 2003; 141-47.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921855>
25. Beckman Coulter. Annexin V-FITC Kit System for Detection of Apoptosis.
26. Cavaliere R, Wen P, Schiff D: Novel Therapies for Malignant Gliomas. *Neurol Clin* 2007; 25: 1141-1171.
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964029>
27. Wikipedia. Camptothecin. (Dostopano 20.06.2010)
URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Camptothecin>
28. Zver A, Zver S, Mlakar U, Preložnik Zupan I, Pretnar J: Zdravljenje bolnikov z disseminiranim plazmocitomom s tandemsko avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic v Sloveniji. *Zdravniški vestnik* 2008; 77: 75-80.
Dostopno na: <http://vestnik.szdl.si/st08-s1/075-080.PDF>
29. Microbiology Bytes. Apoptosis. (Dostopano 07.07.2010)
URL: <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmazoff/baculo/baculohostinteract.html>
30. Frontiers in Bioscience. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. (Dostopano 07.07.2010)
URL: <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/figures.htm>
31. Allen P, Davies D: Apoptosis Detection by Flow Cytometry v Macey MG: *Flow Cytometry: Principles and Applications*, Humana Press, Totowa, NJ, 2007: 147-163.
32. BioVison. Apoptosis. (Dostopano 20.08.2010)
URL: <http://www.biovision.com/index.php?cPath=483&osCsid=9kb6rqrtteh071ddtenr1khcq57&gclid=CJvS8MSCnKQCFQ2S3wodCV-qDw>