

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA FARIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA FARIČ

**STIMULACIJA LIMFOCITOV B PRI KRONIČNI LIMFOCITNI LEVKEMIJI S
CpG-OLIGODEOKSINUKLEOTIDI IN INTERLEVKINOM 2**

**THE STIMULATION OF B LYMPHOCYTES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC
LEUKAEMIA WITH CpG-OLIGODEOXYNUCLEOTIDE AND INTERLEUKIN 2**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., za vso strokovno pomoč, svetovanje in vodenje skozi izdelavo magistrske naloge. Zahvaljujem se vsem zaposlenim v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo. Posebna zahvala gre zaposlenim v laboratoriju za citogenetiko, ki so mi namenili čas in trud za učenje ter omogočili in pomagali, da sem usvojila delo v citogenetskem laboratoriju in tako samostojno opravila eksperimentalni del magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem bližnjim, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in mi zaupali.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž.

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

Jasmina Farič

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
KLJUČNE BESEDE	IV
SEZNAM KRATIC, OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	V
1. UVOD.....	1
1.1 Standardna citogenetska preiskava	2
1.2 Standardna citogenetska preiskava v hematologiji	2
1.3 Kultivacija celic kostnega mozga in periferne krvi	3
1.3.1 Rastni medij.....	4
1.3.2 Citokini in IL-2.....	5
1.3.3 Stimulatorji celične delitve.....	6
1.3.3.1 CpG-oligodeoksinukleotidi (CpG-ODN)	6
1.4 Celična sinhronizacija.....	7
1.5 Kriterij za oceno uspešnosti gojenja celic.....	8
1.6 Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	8
1.6.1 Velikost malignega klona.....	9
1.7 Kronična limfocitna levkemija (KLL).....	9
1.7.1 Klinična slika.....	9
1.7.2 Diagnoza.....	10
1.7.3 Imunofenotip	10
1.7.4 Genetske spremembe pri KLL	10
1.7.5 Določanje kromosomskih preureditev pri KLL	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DEL	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Kemikalije, reagenti in raztopine.....	14
3.1.1.1 Priprava vzorcev KM in periferne krvi za gojenje.....	14
3.1.1.2 Gojenje celic KM in pK	14
3.1.1.3 Za odvzem celične kulture in fiksacijo celic KM in pK	15
3.1.1.4 GTG barvanje.....	16

3.1.1.5 FISH postopek.....	17
3.1.1.5.1 Nanosi FISH sond	18
3.1.1.5.2 Spiranje FISH stekelc po hibridizaciji	20
3.2 Biološki vzorci	20
3.2.1 Vzorci za določitev mitotskega indeksa (MI) in oceno morfologije kromosomov	20
3.2.2 Vzorci bolnikov s KLL, gojeni brez in s stimulacijo s CpG-ODN	21
3.3 Laboratorijske aparature	22
3.4 Laboratorijski pribor	23
3.5 METODE DELA	24
3.5.1 Odvzem vzorca KM in pK	24
3.5.2 Prenos vzorcev v laboratorij.....	24
3.5.3 Priprava vzorcev KM in pK za gojenje.....	25
3.5.4 Gojenje celic KM in PK.....	25
3.5.5 Celična sinhronizacija	26
3.5.6 Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic	28
3.5.7 Nanos na stekelca	28
3.5.8 Predobdelava s tripsinom in barvanje z Giemso (GTG proganje)	29
3.5.9 Ocena mitotskega indeksa (MI)	30
3.5.10 Ocena morfologije kromosomov.....	30
3.5.11 FISH postopek.....	31
3.5.11.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA.....	31
3.5.11.2 Priprava sond.....	32
3.5.11.3 Denaturacija vzorca in hibridizacija sonde s tarčnim zaporedjem DNA	32
3.5.11.4 Spiranje stekel po hibridizaciji.....	33
3.5.11.5 Štetje signalov in interpretacija rezultatov	33
3.6 Statistična obdelava podatkov	34
4. REZULTATI	36
4.1. Vpliv CpG-ODN na mitotski indeks (MI).....	36
4.1.1 Vpliv dodatka CpG-ODN glede na vrsto vzorca	39
4.1.2 Vpliv CpG-ODN glede na čas gojenja.....	40
4.1.3 Vpliv CpG-ODN glede na celično sinhronizacijo	40
4.2. Ocena morfologije kromosomov	40

4.3. Primerjava rezultatov citogenetskih preiskav pri KLL pri gojenju celic brez dodatka CpG-ODN in z dodatkom CpG-ODN	45
4.3.1 Pojavnost ponavljajočih kromosomskih preureditev, ki jih določamo s FISH preiskavo	45
4.4 Primerjava rezultatov standardne citogenetske preiskave.....	46
4.5 Primer bolnika s KLL: primerjava rezultatov glede na način gojenja	48
5. RAZPRAVA.....	49
5.1. Mitotski indeks.....	49
5.2 Morfologija kromosomov	50
5.3 Primerjava skupin vzorcev, gojenih brez in z dodatkom CpG-ODN.....	51
5.4 Standardna citogenetska preiskava pri gojenju s CpG-ODN.....	52
6. SKLEPI.....	53
7. VIRI IN LITERATURA.....	54
8. PRILOGE	i
Priloga 1	i

KAZALO SLIK

Slika 1: Koraki pri standardni citogenetski preiskavi (2).....	3
Slika 2: Zaporedje CpG-ODN DSP30 (23)	7
Slika 3: Tekoči komercialni rastni mediji.....	14
Slika 4: Uporabljeni laboratorijski material: a) sterilne centrifugirke, b) sterilne posodice za gojenje celic.....	24
Slika 5: Vrednotenje signalov v celicah pri FISH analizi	33
Slika 6: Mitotski indeksi (MI) v treh različnih gojiščih (RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP in KMM).....	37
Slika 7: Vzorci istega bolnika (zap.št. 24) po gojenju v treh različnih gojiščih: A) RPMI + EKAMP + IL-2, B) KMM + EKAMP in C) KMM pri 100-kratni povečavi.....	37
Slika 8: Kvartilni diagram vrednosti MI za tri različna gojišča	38
Slika 9: Kvartilni diagram vrednosti MI v treh različnih gojiščih pri gojenju vzorcev PK 40	
Slika 10: Primerjava razporeditve kromosomov v treh gojiščih	42
Slika 11: Primerjava proganosti kromosomov v treh gojiščih	43

Slika 12: Kvartilni diagram ocene razporeditve kromosomov	44
Slika 13: Kvartilni diagram ocene proganosti kromosomov	44
Slika 14: Delež bolnikov s posamezno kromosomsko preureditvijo glede na način gojenja	46

KAZALO TABEL

Tabela I: Demografski podatki bolnikov	21
Tabela II: Priprava gojišč	26
Tabela III: Postopek celične sinhronizacije	27
Tabela IV: Mitotski indeksi v treh različnih gojiščih	36
Tabela V: Vrednosti Q_1 , Me in Q_3 za MI v testiranih gojiščih ne glede na vrsto vzorca in čas gojenja	38
Tabela VI: Statistični parametri vrednosti MI pri vzorcih PK	39
Tabela VII: Ocene morfologije na različnih gojiščih	41
Tabela VIII: Izbrani podatki bolnikov, ki smo jih upoštevali pri oceni morfologije kromosomov	42
Tabela IX: Ocena razporeditve kromosomov. Parametri statistične analize (Q_1 , Me , Q_3).	43
Tabela X: Parametri statistične analize ocene proganosti kromosomov	44
Tabela XI: Delež bolnikov z ugotovljeno kromosomsko preureditvijo v vsaki od skupini.	45
Tabela XII: Primerjava rezultatov kariotipizacije za skupini 1 in 2	46

POVZETEK

Za kronično limfocitno levkemijo (KLL) je značilno, da se maligne celice v gojišču slabo delijo, kar je pogosto vzrok za neuspešno izvedbo kariotipizacije, pri kateri analiziramo celice v metafazi celične delitve. V magistrski nalogi smo testirali uspešnost delitve limfocitov B pri KLL v dveh različnih rastnih medijih RPMI 1640 in KMM z dodanim CpG-oligodeoksinukleotidom (CpG-ODN), ki naj bi pospešil delitev limfocitov B. Pri tem smo hoteli dokazati vpliv CpG-ODN na povečanje mitotskega indeksa in morfologijo kromosomov ter hkrati primerjati dva rastna medija (KMM, RPMI 1640), ki se bistveno razlikujeta po sestavi in ceni. Prav tako smo opazovali vpliv biološkega vzorca, časa gojenja in uporabe celične sinhronizacije na delitev celic KLL v posameznem gojišču. V drugem delu naloge smo ocenjevali vpliv CpG-ODN na rezultate FISH analize in kariotipizacije. Za oceno uspešnosti delitve celic KLL v posameznem gojišču smo zbrali 24 vzorcev bolnikov s KLL. Celice smo nacepili na testna gojišča, jih gojili 24, 48 ali 72 ur, in jih nato izolirali ter fiksirali. Za določitev mitotskih indeksov in oceno morfologije kromosomov smo uporabili standardno GTG proganje kromosomov. Rezultate FISH preiskave smo analizirali pri 110 bolnikih, pri 72 bolnikih pa rezultate kariotipizacije. Primerjava mitotskih indeksov (MI) in morfologije kromosomov je pokazala, da sta rastna medija KMM in RPMI 1640 enako uspešna pri gojenju celic KLL ($p > 0,05$). Pri gojenju vzorcev kostnega mozga (KM) med gojišči ni razlik v vrednosti MI, prav tako dodatek CpG-ODN ni pospešil delitve celic KLL. Pri vzorcih periferne krvi (PK) pa CpG-ODN izboljša delitev celic saj je med gojišči statistična razlika v vrednosti MI ($p < 0,05$). Čas gojenja celic KLL in uporaba celične sinhronizacije ne vplivata na uspešnost delitve celic KLL v posameznem gojišču. Med skupinama vzorcev bolnikov, ki sta bili gojeni brez in z dodatkom CpG-ODN, ni bistvenih razlik v deležu odkritih bolnikov s posamezno kromosomsko spremembo. CpG-ODN pa je pomembno vplival na uspešnost kariotipizacije, saj je bil pri gojenju z dodatkom CpG-ODN delež neuspešne kariotipizacije manjši za 19,3 %. Prav tako je bil značilno manjši delež bolnikov (za 16,4 %), pri katerih je bil kariotip normalen kljub pozitivni FISH analizi. Pri teh je delež odkritih kromosomskih sprememb večji. Delež dodatnih kromosomskih sprememb, ki jih s FISH analizo nismo našli, je bil večji za 19,5 %. Naša raziskava je potrdila, da CpG-ODN

specifično pospešuje delitev malignih limfocitov B, kar je ključno za uspešno citogenetsko analizo pri KLL.

ABSTRACT

Malignant cells in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) are known for their poor division ability in the growth medium, which often represents a cause for unsuccessful karyotypization, where the cells are analysed in the metaphase stage of cellular division. In this master's thesis we tested the success of B lymphocytes division in CLL in two different growth media RPMI 1640 and KMM with CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) added, which is supposed to promote B lymphocytes division. Thus we tried to prove the effect of CpG-ODN on mitotic index increase and chromosome morphology and at the same time compare two growth media (KMM, RPMI 1640), which essentially differ from each other according to composition and price. Furthermore, we observed the effect of the biological sample, cultivation time and the use of cellular synchronisation on CLL cellular division in individual growth medium. The second part of the thesis includes the assessment of the CpG-ODN effect on the results of FISH analysis and karyotypization. In order to assess the CLL cellular division success in individual medium we collected 24 samples from CLL patients. Cells were cultivated for 24, 48 or 72 hours and then isolated and fixed. The standard GTG banding of chromosomes was used to determine mitotic indexes and chromosome morphology. We analysed the results of FISH analysis in 110 patients and the results of karyotypization in 72 patients. The comparison of mitotic indexes and chromosome morphology showed that the mitotic indexes were equal ($p > 0,05$) in KMM and RPMI 1640. There were no differences between the growth media in growing bone marrow samples in relation to MI values. Likewise, the addition of CpG-ODN did not promote CLL cell division. Regarding the peripheral blood samples there is a statistical difference between the growth media in MI value ($p > 0,05$), the CpG-ODN improves cellular division. The cultivation time and the use of cellular synchronisation did not affect the CLL cell division in individual media. The groups of patient samples, which were grown with or without CpG-ODN addition, did not essentially differ regarding a particular chromosomal aberration. However, unsuccessful karyotypization decreased by 19.3 % with the addition of CpG-ODN. Likewise the proportion of patients whose karyotype was normal despite a positive FISH analysis decreased significantly (by 16.4

%). In those patients the proportion of discovered chromosome changes was higher. The share of additional chromosome changes which were not found with FISH analysis increased by 19.5 %. We confirmed that CpG-ODN specifically affects the division of malignant B lymphocytes, which is essential for successful cytogenetic analysis in CLL.

KLJUČNE BESEDE

Kronična limfatična levkemija, CpG-oligodeoksinukleotid, mitotski indeks, morfologija kromosomov, kariotipizacija, FISH analiza

Chronic lymphocytic leukaemia, CpG-oligodeoxynucleotide, mitotic index, chromosome morphology, karyotypization, FISH analysis

SEZNAM KRATIC, OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

APRIL	protein, ki sodeluje pri zaviranju apoptoze (angl. <i>a proliferation - inducing ligand</i>)
ATM	gen na kromosomskem področju 11q22 (angl. <i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
BS	biopsijski stebriček
CCND1	gen na kromosomskem področju 11q13
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CpG-ODN	CpG oligodeoksinukleotid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DLEU	gen na kromosomskem področju 13q14
EKAMP010	komercialno ime za CpG - oligodeoksinukleotid (EuroClone, Italija)
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal bovine serum</i>)
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
GLI	gen na kromosomskem področju 12q13
IGH	gen na kromosomskem področju 14q32
IL-2	interlevkin 2
KM	kostni mozeg
KMB	Bone Marrow Karyotyping Medium (BI Biological Industries, Izrael)
KMM	rastni medij MarrowMax™ Bone Marrow Medium (Gibco™, Invitrogen, Velika Britanija)
KLL	kronična limfocitna levkemija
LPS	lipopolisaharid
LPC	limfom plaščnih celic
MDM2	gen na kromosomu 12 (angl. <i>murine double - minute protein 2</i>)
miRNA	mikroRNA
Me	mediana

1. UVOD

Citogenetika je področje genetike, ki preučuje strukturo in število kromosomov. Začetek citogenetike sega v leto 1888, ko je Walther Flemming prvi ponazoril človeške kromosome. Prav tako je prvi opisal kromatin in uporabil izraz mitoz (1, 2).

Razvoj citogenetike se je nadaljeval leta 1950, ko so prišli do dveh odkritij, ki sta se pozneje izkazali za napačni. Prvo odkritje je bilo, da človeška celica vsebuje 48 kromosomov, drugo pa je bilo prepričanje, da spol zarodka v sesalski celici določi število kromosomov X. Leta 1956 sta znanstvenika Tijo in Levan s kultivacijo človeških zarodnih fibroblastov dokazala, da človeška celica vsebuje 46 kromosomov. Še vedno pa ni bilo znano dejstvo, da se lahko nekatere kromosomske nepravilnosti fenotipsko izrazijo kot bolezen (2).

V naslednjih treh letih je znanje o kromosomih hitro napredovalo, saj so na podlagi spremenjenega števila kromosomov že diagnosticirali tri sindrome: Downov, Turnerjev in Klinefelterjev sindrom. Leta 1960 sta znanstvenika Nowell in Hungerford poročala o prisotnosti t.i. "Philadelphia kromosoma" pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo in prva pokazala povezavo med kromosomi in rakom.

Do leta 1970 so poznali že več kot 20 različnih kromosomskih nepravilnosti, v naslednjih dvajsetih letih pa je bilo opisanih več kot šeststo kromosomskih nepravilnosti, kar je bil zlasti rezultat razvoja na področju proganja kromosomov (1).

Leta 1971 so izdelali in objavili enotne vzorce prog za vsak par človeških kromosomov. Številne raziskave so prispevale k natančnejšemu poznavanju genoma. Na podlagi tega znanja so lahko izdelali sonde, ki so omogočile uporabo FISH tehnike (2).

1.1 Standardna citogenetska preiskava

Standardna citogenetska analiza ali kariotipizacija je metoda, s katero pridobimo informacije o številu in zgradbi kromosomov določene celice. Pri tem ugotavljamo morebitne kromosomske nepravilnosti, ki so pomembne pri postavitvi diagnoze, pri napovedi poteka bolezni, vplivajo na izbiro zdravljenja in omogočajo spremljanje odgovora na zdravljenje (3).

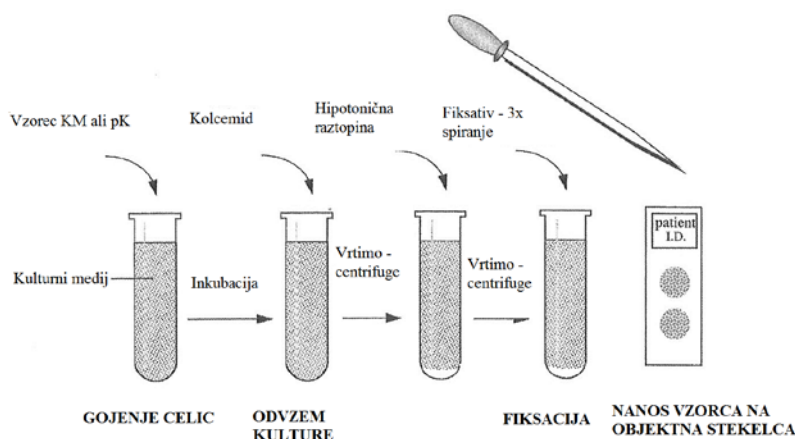
1.2 Standardna citogenetska preiskava v hematologiji

Standardna citogenetska preiskava v hematologiji, ki jo uporabljamo danes, temelji na pripravi metafaznih razmazov in vključuje **odvzem vzorca, gojenje in izolacijo celic, nanos na stekelca ter proganje kromosomov** (Slika 1) (4).

Pri standardni citogenetski preiskavi so celice, ki se delijo, nujno potrebne, da lahko preučujemo kromosome. Pri kariotipizaciji analiziramo kromosome v metafazi mitoze, saj so za analizo najprimernejši metafazni kromosomi. Kromosome razporedimo v kariotip, kjer jih razvrstimo glede na velikost, položaj centromere in obarvanost prog. Pri tem si pomagamo s kromosomi človeškega idiograma (5).

Pri izbiri ustreznega vzorca za citogenetsko analizo pri raku je pomembno, da so v izbranem vzorcu prisotne morebitne tumorske celice. Najpogostejši vzorec v hematologiji je kostni mozeg (KM). Za analizo zadostuje od 2 do 3 mL vzorca, če pa je celic malo, ga je potrebno odvzeti več. Pri transportu vzorca kostnega mozga je nujna uporaba medija, ki zmanjša verjetnost izgube materiala, prisotnost hranil v mediju pa pomaga ohraniti preživetje, ko je število celic veliko.

Poleg kostnega mozga lahko kot biološki vzorec uporabimo periferno kri, vendar samo, če ta vsebuje več kot 20 % blastov ali nezrelih celic. (4, 6).



Slika 1: Koraki pri standardni citogenetski preiskavi (2)

1.3 Kultivacija celic kostnega mozga in periferne krvi

Kultivacija celic je potrebna, da pridobimo ustrezno število mitoz. Če je le možno, gojimo celice v dveh ločenih kulturah, kar zagotavlja, da ne izgubimo celic v primeru kakšne napake, ki se lahko zgodi v času gojenja celic. Celične kulture lahko gojimo v odprtem ali zaprtem sistemu. Odprt sistem gojenja omogoča prosto izmenjavo plinov med kulturo in okoljem. Zato mora za optimalno rast in delitev celic gojenje potekati v ustreznih pogojih, ki morajo biti uravnoteženi in enakomerni. Zagotovljena mora biti ustrezna temperatura, vlažnost, pH-vrednost, koncentracija CO_2 in sterilnost (2, 7).

Optimalna temperatura za rast človeških celic je **37 °C**, ta mora biti med gojenjem enakomerna. Previsoka temperatura povzroči odmrtnje kulture, če pa je prenizka, se celični metabolizem upočasni. Nihanja v temperaturi ne smejo biti večja od 0,25 °C. Optimalna koncentracija CO_2 znaša **5 %** in je pomembna zaradi uravnavanja primerne **pH**-vrednosti. Ta se uravnava s pomočjo bikarbonatnega pufra. Za celične kulture je najbolj ugodno območje pH-vrednosti med **7,2** in **7,4**. V okolju, kjer je pH-vrednost blizu 8 ali več, celice preživijo samo nekaj ur. Če je pH-vrednost nižja od 7,0, pa se celice nehajo deliti. **Vlažnost** mora biti **97 %**, kar prepreči spremembe v ionski moči, ki nastanejo z izgubo vode. Če vlažnost ni kontrolirana, pride do izsušitve gojišč (2, 7).

Čas gojenja je odvisen od vrste celic. Za rakave celice uporabljamo kratkotrajno gojenje celic, ki traja 24 ur. Daljše gojenje celic, ki traja od 24 do 48 ur, omogoča, da pridobimo večje število mitoz. Za določene bolezni, kot je KLL, velja, da se tumorske celice delijo počasi, zato v takih primerih celice gojimo dalj časa, da dobimo ustrezno število mitoz (2).

1.3.1 Rastni medij

Gojenje celic poteka v ustreznem tekočem rastnem mediju. Nekateri mediji so sestavljeni tako, da ustrezajo točno določenim celičnim tipom, spet drugi kulturni mediji so primerni za različne tipe celic (npr. RPMI 1640). Rastni mediji so uravnotežene raztopine soli z različnimi dodatki, kot so soli, glukoza, in puferskim sistemom za vzdrževanje pH-vrednosti. V nadaljevanju sta opisana rastna medija, ki ju uporabljajo pri gojenju celic kostnega mozga in periferne krvi za citogenetske preiskave v specializiranem hematološkem laboratoriju in smo ju uporabili tudi v eksperimentalnem delu magistrske naloge.

Marrow MaxTM, Bone Marrow Medium (GibcoTM, Invitrogen, Velika Britanija)

Je osnovni medij, dopolnjen s fetalnim telečjim serumom, gentamicinom, L-glutaminom, dodan pa je ustrezno pripravljeno medij, ki ga pripravijo z uporabo človeške stromalne celične linije iz kostnega mozga in vsebuje edinstveno mešanico hematopoetičnih rastnih faktorjev (citokinov). Namenjen je za kratkotrajno gojenje celic kostnega mozga in drugih hematopoetskih celic za *in vitro* diagnostiko v citogenetiki (8).

Ready Mix RPMI 1640 (PAA laboratories, Avstrija)

Ime medija **RPMI 1640** izhaja iz začetnic: **Roswell Park Memorial Institute**. Primeren je za gojenje različnih vrst sesalskih celic, obstaja pa več različic tega medija. Po sestavi se razlikuje od drugih medijev, saj vsebuje reducent glutation in visoko koncentracijo vitaminov (biotin, vitamin B₁₂). Poleg vitaminov sta v visokih koncentracijah prisotna tudi inozitol in holin. Osnovni medij RPMI 1640 ne vsebuje proteinov, lipidov in rastnih faktorjev, zato ga je potrebno dopolniti z dodatki. Ready Mix RPMI 1640 je dopolnjen z 10 % FBS in z L-glutaminom (9).

Sestava rastnih medijev je ponavadi nepopolna, zato je za gojenje celic potrebno medij dopolniti z dodatki (2):

L-glutamin je nujno potrebna aminokislina za celično rast. Zaradi možne pretvorbe v D-glutamin morajo biti gojišča z L-glutaminom zamrznjena.

Serum je pomembna sestavina, ki zagotavlja dobro celično rast. Serum mora biti v ustrezni koncentraciji, da doseže svoj učinek. Največ se uporablja fetalni telečji serum (FBS). Rastni mediji so dopolnjeni z 10–30 % FBS.

Antibiotiki se v celične kulture dodajajo zato, da preprečijo rast mikroorganizmov (MO). Največ se uporabljajo penicilin/streptomycin, kanamicin in gentamicin, ki vsi uspešno zaustavijo kontaminacijo z MO. Prav tako se uporabljajo **fungicidi**, kot sta nistatin in amfotericin B.

1.3.2 Citokini in IL-2

Rastni faktorji se uporabljajo za doseganje optimalne celične rasti za različne vrste vzorcev. Citokini so majhne proteinske molekule, ki uravnavajo mnogo celičnih funkcij in sodelujejo v medceličnem prenosu signalov. Vplivajo na celično razmnoževanje, diferenciacijo in preživetje. Njihovo delovanje je pogojeno z vezavo na specifične receptorje, preko katerih posredujejo svoj biološki učinek. Najpomembnejše celice, ki proizvajajo citokine, so celice pomagalke in makrofagi (10).

Človeški IL-2 je 15 kDa velik faktor, ki ga proizvajajo aktivirane celice pomagalke v odgovor na antigensko ali mitogeno stimulacijo. Sinteza in izločanje IL-2 se sproži ob aktivaciji zrelih celic T. Deluje tako, da izzove napredovanje celičnega cikla mirujočih celic iz faze G1 v fazo S celičnega cikla, in omogoča klonsko razmnoževanje aktiviranih celic T, zato ga prištevamo med imunoregulatorne citokine. Razen tega, da spodbuja rast in diferenciacijo celic T, pospeši tudi rast in citolitično vlogo naravnih celic ubijalk, deluje na aktivirane celice B, monocite in na oligodentrocite *in vitro*. Igra pomembno vlogo v hematopoezi, sodeluje pri nadzoru tumorske rasti in protivnetni reakciji, zato igra osrednjo vlogo v imunskem odgovoru. Danes lahko s pomočjo rekombinantne tehnologije pripravimo velike količine IL-2, kar omogoča njegovo uporabo v medicini (10, 11, 12). Rekombinantni človeški IL-2 je biološko aktiven in pospeši delitev limfocitov v kulturi. V citogenetiki se IL-2 uporablja kot dodatek pri gojenju celic, saj naj bi skupaj s CpG-ODN učinkovito spodbudil celice k delitvi. Dokazali so, da so bile celice B pri KLL, ki so bile stimulirane s CpG-ODN in IL-2, najbolj dovzetne za delitev (13).

1.3.3 Stimulatorji celične delitve

Stimulatorji celične delitve (mitogeni) se uporabljajo, ko se nekatere celice, kot so zreli limfociti, ne delijo spontano in jih moramo zato k delitvi spodbuditi. Zaradi nizke mitotske aktivnosti celic pri KLL mnogo laboratorijev uporablja B-celične mitogene, ki spodbudijo delitev celic B (14). Pri gojenju celic KLL so v preteklosti uporabljali mitogene, kot so t.i. Pokeweed mitogen (PWM), lipopolisaharid (LPS), protein A, 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (TPA), vendar se ti mitogeni niso izkazali kot učinkoviti, saj so pri njihovi uporabi odkrili samo 40–50 % malignih klonov (11). Kot bolj učinkovita sta se izkazala ligand CD40 in CpG-oligodeoksinukleotid (CpG-ODN) (2, 15).

Leta 2010 so Wu in sodelavci primerjali načine stimulacije celic KLL. Pri tem so kultivirali celice periferne krvi (PK) in KM s CpG-ODN in interlevkinom 2 (IL-2), s TPA, s PWM in samo IL-2. Od vseh načinov stimulacije celic KLL se je najbolje izkazal CpG-ODN + IL-2, saj je bil v tem primeru delež odkritih kromosomskih nepravilnosti največji (16).

1.3.3.1 CpG-oligodeoksinukleotidi (CpG-ODN)

CpG-ODN so kratke enoverižne DNA molekule, dolge od 19 do 25 baznih parov. Vsebujejo nemetilirane CpG dinukleotide, t.i. CpG motive. CpG motiv sestoji iz citozin trifosfat deoksinukleotida (C), kateremu sledi gvanin trifosfat deoksinukleotid (G), oba nukleotida pa med seboj povezuje fosfodieterska vez (17).

CpG motivi aktivirajo celice imunskega sistema, ker imajo enake lastnosti kot bakterijska DNA. V bakterijski DNA so CpG motivi v nemetilirani obliki in 20-krat pogostejši kot pri sesalski DNA (13). Prav zaradi tega lahko celice imunskega sistema razlikujejo med bakterijsko DNA in lastno DNA in aktivirajo imunski vnetni odgovor. Pri tem pride do aktivacije prirojenega imunskega sistema, kjer imunske celice prepoznajo stare ohranjene molekulske strukture, med katere spada tudi CpG-ODN. Prepozna jih Toll like receptor 9 (TLR 9), ki se konstitutivno izraža v limfocitih B in plazmacitoidnih dendritičnih celicah (pDC) in na katerega se vežejo CpG-ODN ter tako močno aktivirajo imunski odgovor (13, 18, 19).

CpG-ODN vstopijo v celice B in posredno preko delovanja TLR9 sprožijo sintezo citokinov ter izražanje visoko afinitetnih IL-2 receptorjev (15, 20). Tako spodbudijo celično delitev, povečajo izražanje celičnih površinskih molekul (CD25 in CD40) in proizvodnjo imunoglobulinov (21). Thomas Decker in sodelavci so leta 2001 ugotovili, da so se celice KLL veliko bolj delile, če so pri gojenju le-teh uporabili CpG-ODN in IL-2 (13).

Uporaba CpG-ODN in IL-2 pri gojenju celic KLL naj bi vplivala na povečan delež odkritih kromosomskih nepravilnosti in kompleksnih kariotipov pri KLL (15). Thorsten Zenz in sodelavci so leta 2007 objavili študijo, kjer poročajo, da so po stimulaciji celic KLL s CpG-ODN in IL-2 s kariotipizacijo odkrili primerljiv delež kromosomskih nepravilnosti kot s FISH analizo. Pri takšni stimulaciji celic KLL so s kariotipizacijo odkrili še dodatne kompleksne kromosomske preureditve, ki jih s FISH analizo ne moremo ugotoviti, ker z njo dokazujemo samo znane kromosomske preureditve (22). Kompleksen kariotip ima pomembno napovedno vrednost, saj z njim določimo podskupino bolnikov, ki imajo večje tveganje za hitro napredovanje bolezni (19).

Pri praktičnem delu magistrske naloge smo pri gojenju celic KLL uporabili CpG-ODN DSP30 proizvajalca Euroclone (Italija), ki ima komercialno ime EKAMP010 in je dolg 27 baznih parov (Slika 2). CpG-ODN DSP30 izzove napredovanje celičnega cikla celic KLL *in vitro* iz blokade, ki nastane v fazi G0/G1 (13). V celicah KLL sproži sintezo alfa-verige IL-2 receptorja in tako omogoča, da se lahko izrazijo visoko afinitetni IL-2 receptorji (20). Zato uporaba IL-2 skupaj s CpG-ODN ustvari dodatne kostimulatorne učinke (21). Liang Hua s sodelavci je leta 1996 dokazal, da IL-2 močno poveča učinek CpG-ODN na celice B (23).

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC-3'

Slika 2: Zaporedje CpG-ODN DSP30 (23)

1.4 Celična sinhronizacija

Ko se celica bliža metafazi, postajajo kromosomi vse krajši, pri tem pa se spreminja tudi vzorec proganja. Če celično delitev ustavimo v srednji metafazi, dobimo od 300 do 400

prog na haploidni set. Prekomerno kondenzacijo kromosomov lahko preprečimo s sinhronizacijo celic v pozni profazi oz. zgodnji metafazi, kjer so kromosomi daljši. S celično sinhronizacijo pridobimo večje število prometafaz, kjer so kromosomi najprimernejši za tehnike, kjer je potrebna visoka ločljivost prog (več kot 850 do 1000 prog na haploidni set). Pri celični sinhronizaciji celice ob točno določenem času zaustavimo in nato sprostimo iz celičnega cikla, tako da v času odvzema kulture pridobimo čim večji delež celic v profazi ali prometafazi. Celično delitev najprej zaustavimo v fazi G1/S celične delitve z uporabo inhibitorja timidilat sintetaze (napr. metotreksat). Po 17-ih urah celice sprostimo iz te faze z dodatkom visoke koncentracije timidina. Največje število prometafaz se pojavi po 5–6 urah, ko je tudi najprimernejši čas za odvzem celične kulture (2, 24).

1.5 Kriterij za oceno uspešnosti gojenja celic

Mitotski indeks (MI) je razmerje med številom celic v mitози in celotnim številom pregledanih celic. Izražamo ga v promilah (‰). MI je merilo uspešnosti celične delitve v dani kulturi (25, 26).

1.6 Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH)

Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) je tehnika, ki omogoča vidno ponazoritev genetskih sprememb v celici. Temelji na interakciji med označenim enoverižnim DNA ali RNA zaporedjem ali t.i. sondo, ki je komplementarna tarčnemu DNA zaporedju. Tarčno DNA zaporedje lahko dokazujemo na metafaznih kromosomih ali interfaznih jedrih. Celice, na katerih izvajamo FISH preiskavo, morajo imeti ohranjeno morfološko strukturo, da lahko zaznamo mesto vezave sonde, zato je potrebna predhodna fiksacija celic na objektna stekelca. Preiskava FISH omogoča odkritje nekaterih manjših preureditev, ki jih s kariotipizacijo ne opazimo. Za analizo uporabljamo DNA sonde, ki se prilegajo točno določenemu zaporedju DNA. Sonde so označene s fluorescenčnim barvilom, zato označene celice ocenjujemo s fluorescenčnim mikroskopom (3, 7, 27).

1.6.1 Velikost malignega klona

Pri FISH preiskavi pregledamo 200 interfaznih jeder, pri tem pa štejemo celice, ki imajo prisotno določeno kromosomsko preureditev, in nato izračunamo delež takih celic. Velikost malignega klona je delež celic, ki imajo prisotno določeno kromosomsko preureditev, ki smo jo ciljano iskali s FISH preiskavo. Velikost malignega klona ali delež preurejenih celic izrazimo v odstotkih (%). S FISH preiskavo lahko prikažemo kromosomske spremembe, ki so značilne za bolezen KLL.

1.7 Kronična limfocitna levkemija (KLL)

Kronična limfocitna levkemija (KLL) spada med bolezni celic limfatične vrste, in sicer gre za novotvorbe zrelih celic B ali T. Takšne novotvorbe imenujemo maligni limfom (ML) in so posledica razraščanja celic limfatičnega tkiva. Pri tem pride do maligne spremembe ene od celic limfocitne vrste. Pri KLL nastane sprememba pri celici, ki je usmerjena v B celično vrsto, njene lastnosti pa podedujejo vse hčerinske celice (28). Celice se ustavijo v G0/G1 fazi celičnega cikla, se ne delijo več spontano in se kopičijo predvsem zaradi zmanjšane apoptoze (15).

Pri nas je najbolj razširjena B-KLL, T-KLL je v Sloveniji zelo redka bolezen. Kljub počasnemu poteku bolezni imajo bolniki s KLL krajše preživetje. Bolezen je pogostejša pri ljudeh, ki so starejši od 50 let, moški pa zbolevajo pogosteje kot ženske. Nekateri viri navajajo, da imajo sorodniki bolnikov s KLL sedemkrat večje možnosti, da bodo zboleli za KLL (28).

1.7.1 Klinična slika

Bolniki s KLL so lahko povsem brez simptomov. Pogosti simptomi, ki jih opisujejo, so: utrujenost, hujšanje, povišana telesna temperatura, nočno potenje in zmanjšan tek. Zatipamo lahko povečano vranico in bezgavke (28). Limfociti B se kopičijo v kostnem mozgu, periferni krvi, vranici in limfatičnem tkivu (29).

1.7.2 Diagnoza

O KLL govorimo, kadar je koncentracija zrelih limfocitov B v krvi več kot $4 \times 10^9/L$. V razmazu periferne krvi so vidni limfociti z gostim grudastim kromatinom, rob citoplazme pa je ozek. Kostni mozeg je značilno hipercelularen, kopičijo se predvsem zreli limfociti, ki jih je ponavadi več kot 30 %. Zaradi nezadostnega nastajanja eritrocitov je prisotna anemija. Nekateri limfomi imajo podobne lastnosti kot KLL, zato je za potrditev diagnoze potrebna diferencialna diagnostika za izključitev bolezni, kot so limfom plaščnih celic, prolimfocitna levkemija, levkemija dlakastih celic in ostali Ne-Hodgkinsovi limfomi (NHL). Z določitvijo celičnih označevalcev in s pomočjo histoloških in citogenetičnih metod se bolezen KLL jasno loči od omenjenih bolezni (28, 30).

1.7.3 Imunofenotip

Za KLL so značilni določeni celični površinski označevalci kot so CD5, CD23, CD19, CD20, CD22, CD79a in CD43. Lahko je prisoten tudi CD38, CD23 pa slabše izražen ali celo odsoten. Negativna sta CD10 in ciklin D1. Delež površinskih imunoglobulinov CD20 in CD79b je manjši kot pri normalnih zrelih limfocitih B. Klon levkemičnih celic pri B-KLL ima izraženo lahko verigo imunoglobulinov kapa ali lambda. Izraženost površinskega imunoglobulina M ali D je pri KLL šibka. S pretočno citometrijo lahko ugotovimo tudi klonalnost limfocitov B. Ko bolezen napreduje, se zmanjša koncentracija imunoglobulinov. Ugotovimo lahko prisotnost monoklonskega imunoglobulina G ali M (28, 30).

1.7.4 Genetske spremembe pri KLL

Pri KLL imajo limfociti B daljše preživetje od normalnega. Vzrok temu je porušenje signalizacijskih poti, ki uravnavajo apoptozo. Aktivnost dejavnikov, ki pospešujejo apoptozo je zmanjšana, medtem ko je povečana aktivnost dejavnikov, ki zavirajo apoptozo. Vzroki za to se skrivajo v spremenjenih genih in proteinih. Pomembna proteina, pri katerih je aktivnost zmanjšana, sta PKR in p53, povečana pa je aktivnost APRIL in TCL1.

Najpogostejša delecija pri KLL je na področju kromosoma 13, kjer so kodirani zapisi za mikroRNA (miRNA), ki regulirajo izražanje genov. Delecija miRNA vodi v povečano

izražanje proteina TCL1, ki normalno podaljšuje celično preživetje, prav tako pa se poveča izražanje Bcl2, ki je zaviralec apoptoze. Ostale kromosomske spremembe pri KLL so močno povezane s tumor-supresorskim genom *TP53*, ki nosi zapis za protein p53, ki je glavni mediator apoptoze, kadar pride do poškodbe DNA. Pri njegovi deleciji (kromosom 17) pride do izgube proteina p53. Gen *ATM* kodira zapis za kinazo, ki aktivira p53, zato njegova delecija (kromosom 11) zmanjša apoptozo. Pri trisomiji 12 se pomnoži zapis za gen *MDM2*, ki negativno uravnava aktivnost p53. Poleg znanih genov, ki so jih odkrili pri kromosomskih nepravilnostih, obstaja še mnogo drugih genov, ki so spremenjeni pri KLL. Vsi delujejo na podoben način, in sicer vplivajo na podaljšano preživetje limfocitov B (31).

1.7.5 Določanje kromosomskih preureditev pri KLL

Citogenetika ima pri KLL pomembno napovedno vrednost. Kadar obstaja sum na KLL, se izvede preiskava FISH, s katero odkrijemo preureditve pri približno 80 % bolnikov. Prav tako se lahko izvede standardna citogenetska preiskava. V splošnem sta kompleksni kariotip in visok delež preurejenih metafaz povezana s slabšim potekom bolezni kot pa kariotip le z eno ali dvema kromosomskima nepravilnostima. Standardna citogenetska preiskava proganih kromosomov omogoča odkritje kompleksnih kromosomskih preureditev pri B-KLL, vendar je preiskava pogosto omejena zaradi nizkega mitotskega indeksa, ki je značilen za neoplastične celice pri KLL. Preiskava FISH omogoča občutljivo odkritje specifičnih genomskih sprememb na interfaznih in metafaznih celicah, zato je pogostost odkritih nepravilnosti večja kot pri kariotipizaciji. To kaže na dejstvo, da kariotipizacija večinoma zajame normalne celice in ne malignih celic (14).

Najpogostejša kromosomska preureditev pri KLL je delecija dolgega kraka kromosoma 13 (13q14.1), ki jo opazimo v več kot 50 % primerov. Ima ugoden napovedni pomen, bolniki pa dolgo preživetje, če je prisotna kot osamljena kromosomska nepravilnost. Pri 20 % bolnikov s KLL je prisotna delecija kromosoma 11q (gena *ATM*), ki ima neugoden napovedni pomen in jo opazimo zlasti pri mlajših moških. Povezana je s hitrim potekom bolezni in kratkim preživetjem. V enakem odstotku kot delecija 11q je prisotna trisomija 12. Bolniki s to kromosomsko spremembo imajo enako preživetje kot bolniki brez prisotnih kromosomskih nepravilnosti. Izmed vseh sprememb ima delecija kratkega kraka kromosoma 17 (del(17p)) oziroma gena *TP53* najbolj neugoden napovedni pomen, bolniki

s potrjeno del(17p) pa najkrajše preživetje. Delecija in mutacija gena *TP53* je povezana s slabim odzivom na zdravljenje in slabim preživetjem bolnikov (14, 28).

2. NAMEN DELA

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je bolezen, za katero je značilna nizka mitotska aktivnost limfomskih celic, kar otežuje analizo proganih kromosomov. Tudi uporaba nekaterih mitogenov, ki delujejo na limfocite B (TPA, CpG oligonukleotid sam), ni dala bistveno boljših rezultatov.

Stimulacija celic KLL s CpG-ODN v kombinaciji z interlevkinom 2 (IL-2) pa se je izkazala kot zelo učinkovita, saj naj bi selektivno vplivala na pospešeno delitev limfocitov B in posledično omogočila večji delež odkritih preurejenih kariotipov (15).

Zato bomo gojili vzorce krvi in kostnega mozga bolnikov s KLL z dodatkom CpG-ODN in IL-2 v dveh različnih komercialnih rastnih medijih. Določili bomo mitotske indekse in ocenili morfologijo kromosomov in na ta način skušali oceniti uspešnost delitve celic KLL pri uporabi mitogena CpG-ODN ter pri tem primerjali uspešnost gojenja celic v obeh rastnih medijih. Ocenjevali bomo tudi, ali vrsta vzorca, čas gojenja in izvajanje celične sinhronizacije vplivajo na uspešnost gojenja celic KLL v posameznem gojišču.

Testirali bomo tudi, ali uporaba CpG-ODN pri gojenju celic KLL vpliva na rezultate kariotipizacije in FISH analize. Tako bomo vzorce bolnikov s potrjeno diagnozo KLL razdelili glede na način gojenja na dve skupini: gojeni brez dodatka CpG-ODN (skupina 1) ter gojene z dodatkom CpG-ODN (skupina 2). Med skupinama bomo primerjali delež bolnikov s prisotno kromosomsko spremembo, ki jo odkrijemo s FISH analizo. Pri tistih bolnikih, kjer je bila opravljena kariotipizacija, bomo primerjali rezultate kariotipizacije obeh skupin in skušali ugotoviti vpliv CpG-ODN na specifično delitev malignih limfocitov B.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije, reagenti in raztopine

3.1.1.1 Priprava vzorcev KM in periferne krvi za gojenje

RPMI: Transportno gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom, antibiotikom in Na-heparinom, (Gibco[®], Invitrogen, Velika Britanija).

Hank's: 100 mL uravnotežene raztopine soli, 10-krat koncentrirana, brez Ca^{2+} , Mg^{2+} ali HCO_3 , vsebuje: NaCl 80 g/l, KCl 4 g/L, glukoza 10 g/L, KH_2PO_4 600 mg/L, Na_2HPO_4 475 mg/L in fenol rdeče 170 mg/L (SIGMA-ALDRICH[®], ZDA).

Priprava raztopine Hank's:

Komercialno raztopino smo redčili v 1 L destilirane vode, pH-vrednost smo naravnali na 7,2 z nasičenim NaHCO_3 in jo nato sterilno prefiltrirali (brizge, filtri 0,2 μm).

KMB: Bone Marrow Karyotyping (BI Biological Industries, Izrael).

3.1.1.2 Gojenje celic KM in pK

KMM: Marrow Max[™], Bone Marrow Medium (Gibco[™], Invitrogen, Velika Britanija).

Ready Mix PRMI 1640: 500 mL, z L-glutaminom in 10 % FBS (PAA laboratories, Avstrija).



Slika 3: Tekoči komercialni rastni mediji

CpG-oligodeoksinukleotid (EKAMP010): EKAMP010 (EuroClone[®], Italija)

Preden smo odprli kriovialo, smo jo centrifugirali 20 s, da se je pelet zbral na dnu krioviale. Nato smo resuspendirali liofilizirani oligonukleotid v 500 µl TE pufra s pH 7,5 (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7,5) in previdno premešali na vorteksu. Pelet smo resuspendirali v vodni kopeli pri 65 °C 10 do 15 minut, ter premešali na vorteksu vsakih 5 minut. V aseptični komori smo jo razdelili po 9 µl v vsako epico in do uporabe shranili na -20 °C.

IL-2: človeški IL-2, rekombinantni protein, vir *E.coli*, čistost: > 98 %, aktivnost raztopine: $5,7 \cdot 10^6$ U/mg (eBioscience, ZDA).

V vialo z IL-2 smo odpipetirali 0,53 mL sterilne vode. Nato smo premešali in razdelili v epice po 60 µL raztopine IL-2. Tako pripravljeno raztopino smo zamrznili do uporabe na -20 °C. Posamezno epico smo porabili vsaj v dveh tednih in jo med tem hranili v hladilniku. Končna koncentracija IL-2 v gojišču je bila 100 U/mL.

Sinhronizacijski raztopini: Synchro set, sinhronizacijski raztopini A in B (EuroClone[®], Italija).

160 µL komercialno pripravljene sinhronizacijske raztopine A ali B smo odpipetirali in dodali ustreznemu gojišču v posodice za gojenje.

3.1.1.3 Za odvzem celične kulture in fiksacijo celic KM in pK

Kolcemid: KaryoMAX COLCEMID Solutione Technologies (Gibco[™], Invitrogen, Nemčija).

Hipotonična raztopina KCl:

Za pripravo 0,075 M KCl smo natehtali 5,59 g KCl (MERCK, Nemčija) in ga raztopili v 1 L destilirane vode.

Sterilna, dvakrat destilirana voda: pH: 5,0–7,0 (Lekarna UKC Ljubljana, Ljubljana).

Raztopina za fiksacijo celic:

Raztopino za fiksacijo celic smo pripravili iz mešanice absolutnega etanola (Lex-chem, Lex, d. o. o., Slovenija) in očetne kisline (Lex-chem, Lex, d. o. o., Slovenija) v razmerju 3:1. Pripravili smo vedno svežo raztopino in jo prekrili s parafilmom, da ni izhlapevala. Po uporabi smo fiksativ hranili v hladilniku.

3.1.1.4 GTG barvanje**Fosfatni pufer:**

245 mL 0,06 M Na_2HPO_4 (8,52 g/L Na_2HPO_4 ali 10,8 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Hrvaška)

255 mL 0,06 M KH_2PO_4 (8,1 g/L KH_2PO_4)

pH-vrednost naj bi bila 6,8. Uravnavali smo jo z dodajanjem enega ali drugega fosfata. Pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku.

10 x PBS:

Za 1 L pripravljene raztopine 10 x PBS smo natehtali 80 g NaCl (SIGMA-ALDRICH®, ZDA), 2 g KCl (MERCK, Nemčija), 2,4 g KH_2PO_4 (Gram-mol, d. o. o., Hrvaška), 14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvaška).

Dolili smo destilirano vodo do 900 mL ter uravnali pH-vrednost na 7,4. Dopolnili smo z destilirano vodo do oznake 1000 mL in sterilizirali.

1 x PBS:

100 mL 10 PBS smo zlili v 1000 mL bučo. Potem smo dolili destilirano vodo do 1000 mL oznake ter preverili pH-vrednost. Če je bilo potrebno, smo jo uravnali na 7,4.

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

1 M NaOH : v 500 mL bučki smo raztopili 20 g NaOH (Kemika, Hrvaška) in z destilirano vodo dopolnili do oznake.

Tripsin: tripsin, tip II-S, pridobljen iz prašičje trebušne slinavke (SIGMA-ALDRICH®, ZDA).

Za pripravo 0,2 % raztopine tripsina v PBS (1 x) pufru smo natehtali 1 g tripsina in ga raztopili v 500 mL bučki z 1 x PBS ter dopolnili do oznake. Po 35 do 40 mL pripravljene raztopine tripsina smo razdelili v 50 mL epruvete in zamrznili. Pred uporabo smo jo odtalili na 37 °C.

3.1.1.5 FISH postopek

20 SSC:

3 M NaCl (175,3 g/L) (SIGMA-ALDRICH[®], ZDA)

0,3 M Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O (88,25 g/L) (Kemika, Hrvaška)

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

2 SSC:

Zmešali smo 100 mL 20 SSC (pH = 6,3) in 850 mL destilirane vode. Vrednost pH smo uravnali na 7,0 +/- 0,2 z NaOH (1 M) in dopolnili z vodo do 1000 mL. Po pripravi smo raztopino hranili v hladilniku.

Pepsin: pepsin, pridobljen iz prašičje želodčne sluznice, 3,200–4,500 U/mg protein, liofilizirani (SIGMA-ALDRICH[®], ZDA).

2,5-odstotna raztopina: Pazili smo na aktivnost originalnega pepsina (liofiliziranega). Originalno stekleničko s pepsinom (250 mg) smo raztopili :

- v 10 mL destilirane vode, če je bila aktivnost encima 3200–4500 enot .
- v 6,7 mL destilirane vode, če je bila aktivnost encima 2500–3000 enot.

Razredčeno raztopino smo razdelili po epicah po 1 mL (2,5-odstotna raztopina pepsina).

Raztopina formaldehida:

Za pripravo raztopine formaldehida (SIGMA-ALDRICH[®], ZDA) smo porabili 5 mL pripravljene raztopine MgCl in 2,5 mL 37-odstotnega formaldehida, tako da je bila v končni raztopini koncentracija MgCl 5 mM in koncentracija formaldehida 1-odstotna. Nato

smo dopolnili do 100 mL z raztopino 2 x SSC in prelili v stekleno kiveto za objektna stekelca.

1 M MgCl₂: 203,31 g MgCl x 6 H₂O smo raztopili v 100 mL destilirane vode, (Lekarna UKC Ljubljana, Ljubljana).

Raztopine etanola:

Etanole naraščajočih koncentracij (70 %, 90 %, 100 %) smo iz izhodiščnega 100-odstotnega etanola (Lex-chem, Lex, d. o. o., Slovenija) pripravili tako, da smo ga ustrezno redčili z destilirano vodo. Pri redčenju smo upoštevali kemijsko enačbo $C_1V_1 = C_2V_2$.

3.1.1.5.1 Nanosi FISH sond

- **ON ATM (11q22) / GLI (12q13)** (PoseidonTM, KREATECHTM, Nizozemska)

Delecija dolgega kraka kromosoma 11 (11q) je pogosta strukturna kromosomska preureditev in je prisotna pri različnih limfoproliferativnih boleznih. Kritično genomsko področje se nahaja na področju 11q22.1-q23.3, kjer se poleg drugih genov nahaja tudi gen *ATM*. S pomočjo sonde *ATM* lahko odkrijemo število kopij gena *ATM* na področju 11q22. Delecija na tem mestu ima slab napovedni pomen.

Pogosta kromosomska nepravilnost pri KLL je trisomija 12. Na področju 12q13 so identificirali majhno podvojeno regijo, kjer leži tudi gen *GLI*. Pomnožitev gena *GLI* na mestu 12q13 ima vmesni napovedni pomen (32).

Sonda **ATM/GLI** je označena z dvema barvama, ki omogočata odkritje delecije v področju 11q22 in pomnožitve na področju 12q13. Če je prisotna delecija, ki vključuje gen *ATM*, je prisoten 1 rdeč signal in 2 zelena signala za *GLI* na področju 12q13. Pomnožitev, ki vključuje področje *GLI*, pokaže 3 ali več zelenih signalov in 2 rdeča signala za *ATM* na področju 11q22. Če sta hkrati prisotni delecija in pomnožitev, ki vključujeta obe kritični področji 11q22 in 12q13, je prisoten 1 rdeč in 3 ali več zelenih signalov. Dva posamezna rdeča signala in dva posamezna zelena signala označujeta dva normalna kromosoma 11 in 12 oz. normalno celico (32).

- **ON DLEU (13q14) / p53 (17p13)** (Poseidon™, KREATECH™, Nizozemska)

Gen *DLEU* se nahaja na področju 13q14. Delecija na mestu 13q, ki vključuje progo q14, se pogosto pojavlja pri B-celični KLL in plazmacitomu. Delecija na kromosomu 13q14 napoveduje dober potek bolezni. Gen *TP53* se nahaja na področju 17p13. Delecija gena *TP53* je pri KLL povezana z neugodnim potekom bolezni in ima pomembno napovedno ter terapevtsko vrednost (32).

Sonda *DLEU/p53* je sestavljena iz dveh barv, ki omogočata odkritje delecij 13q14 in 17p13. Če je v vzorcu prisotna delecija gena *DLEU*, sta vidna en rdeč in dva zelena signala na področju 17p13. Deleciji, ki vključujeta obe kritični področji 13q14 in 17p13, pokažeta samo en rdeč in en zelen signal. Dva posamezna rdeča signala in dva posamezna zelena signala najdemo pri normalni celici (32).

- **LSI IGH/CCND1** (Vysis, Abbott Molecular Inc., ZDA)

Translokacija t(11;14) se značilno pojavlja pri limfomu plaščnih celic (LPC) in vključuje gena *IGH* in *CCND1*. LPC in KLL imata veliko podobnih lastnosti, saj se pri obeh boleznih izražajo CD19 in CD20 skupaj s CD5 ter lahka veriga monoklonalnega površinskega imunoglobulina. Razlika med obema boleznima je pozitivno izražen CD23, ki se pojavi pri KLL. V določenih primerih obstajajo prekrivanja, ko je tudi pri KLL CD23 negativen. Tako lahko z ugotavljanjem t(11;14)(q13;q32) razlikujemo med obema boleznima. Če s FISH analizo odkrijemo t(11;14)(q13;q32), ta potrdi LPC in izključi KLL. t(11;14)(q13;q32) je prisotna pri več kot 70 % bolnikov z LPC (14).

Fuzijska sonda IGH/CCND1 je označena z dvema barvama in zaznava translokacijo (11;14)(q13;q32). Pri normalnem vzorcu vidimo 2 oranžna in 2 zelena signala. Pri nenormalnih vzorcih pa so prisotni 1 oranžni, 1 zelen in 2 fuzijska signala (33).

Gumijasto lepilo (cement): Fixogum, MARABU (KREATECH , Nizozemska)

3.1.1.5.2 Spiranje FISH stekelc po hibridizaciji

Spiralna raztopina NP-40 (Nonidet-40) (Vysis, Abbot Molecular Inc., ZDA)

Raztopino smo pripravili tako, da smo v reagenčno steklenico natehtali 0,9 g reagenta NP-40, 60 mL 20 x SSC (pH = 6,3) in 240 mL destilirane vode. Raztopino smo pustili stati čez noč, nato pa smo jo prefiltrirali preko 0,2 µm sterilnega filtra v prej sterilizirano reagenčno steklenico. Hranili smo jo v hladilniku.

PBT:

Za pripravo 1000 mL raztopine smo v reagenčno steklenico dali 4 mL 7-odstotne raztopine BSA (VITROS[®], Johnson & Jonsons, ZDA) 1 mL Tween[®]20 (SigmaUltra, SIGMA-ALDRICH[®], ZDA) in dopolnili do oznake z 1 x PBS pufrom. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent raztopil, nato smo jo prefiltrirali preko 0,2 µm sterilnega filtra v sterilno steklenico.

Kontrastno sredstvo – DAPI : DAPI II Counterstain ((125 ng/mL) (Abbott Molecular, ZDA)) je kontrastno sredstvo za večino CEP in LSI sond. To je raztopina, ki je sestavljena iz 4',6-diamino-2-fenilindola in 1,4-fenilenediamina, raztopljen v fosfatnem pufri in glicerolu. Pri uporabi za FISH analizo sveti kot živo modra barva na interfaznih in metafaznih jedrih (34).

3.2 Biološki vzorci

3.2.1 Vzorci za določitev mitotskega indeksa (MI) in oceno morfologije kromosomov

Za oceno MI in morfologije kromosomov smo zbrali skupno 24 vzorcev bolnikov s potrjeno diagnozo KLL. Od tega je bilo 16 vzorcev KM, 7 vzorcev PK in 1 biopsijski stebriček (BS). Vzorce smo zbirali v obdobju med januarjem in junijem 2013. Od 24-ih bolnikov je bilo 14 moških in 10 žensk. Povprečna starost vseh bolnikov je bila 67,8 let. Povprečna starost moških je bila 62,6 let (40 do 78), žensk pa 70,6 let. Podatki bolnikov so zbrani v Tabeli I.

Tabela I: Demografski podatki bolnikov

zaporedna številka	ime in priimek bolnika	spol *	starost (leta)	vrsta vzorca **
1	DZ	Ž	78	KM
2	HT	Ž	60	KM
3	KŽ	M	53	KM
4	SS	Ž	82	KM
5	OM	M	76	KM
6	MA	Ž	75	KM
7	JT	M	40	KM
8	ČN	M	59	PK
9	SA	M	68	KM
10	CR	M	55	KM
11	HJ	M	70	PK
12	PM	Ž	59	KM
13	RI	M	59	KM
14	KJ	M	75	KM
15	GF	Ž	63	PK
16	KF	M	70	PK
17	TS	Ž	64	BS
18	LA	Ž	79	KM
19	SL	Ž	82	PK
20	PA	M	75	KM
21	SM	M	66	KM
22	GV	Ž	64	PK
23	DM	M	78	KM
24	MB	M	78	PK

*M – moški, Ž – ženska, **KM – kostni mozeg, PK – periferna kri, BS – biopsijski stebriček

3.2.2 Vzorci bolnikov s KLL, gojeni brez in s stimulacijo s CpG-ODN

Za oceno vpliva gojenja z dodatkom CpG-ODN na rezultate FISH analize in kariotipizacije, smo iz zdravstvene dokumentacije zbrali podatke bolnikov s potrjeno diagnozo KLL za obdobje od januarja 2012 do decembra leta 2013. Pri tem smo primerjali podatke o bolnikih s KLL, kjer so bile celice PK oziroma KM gojene na dva različna načina. V letu 2012 so bili vzorci gojeni kratkotrajno (24 h) brez dodatka CpG-ODN. V letu 2013 pa se je pri gojenju začel uporabljati CpG-ODN. V primerjavo smo vključili vse bolnike, ki so v zdravstveni dokumentaciji že imeli potrjeno diagnozo KLL. Preverili smo vse bolnike, ki so bili poslani v specializirani hematološki laboratorij na citogenetsko

diagnostiko s sumom na KLL. Kot diagnostični kriterij smo upoštevali s KLL skladen imunofenotip (CD5+/-, CD23+/-, CD19+/-, CD20š/-, CD79+/FMC7-). Če pri bolniku ni bilo podatkov o imunoloških označevalcih, ga nismo uvrstili v primerjavo. Če pa se je izkazalo, da je imel bolnik za KLL značilne kromosomske preureditve, smo ga vključili v skupino bolnikov s KLL. Tako smo zbrali 110 bolnikov s KLL v obdobju dveh let. Glede na način gojenja smo bolnike razdelili v dve skupini: **skupina 1** je vključevala bolnike, katerih celice so bile gojene brez dodatka CpG-ODN (gojišča: KMM, KMB), **skupina 2** pa bolnike, katerih celice so bile gojene z dodatkom CpG-ODN (EKAMP) (gojišča: RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP, KMM). Zbrani podatki se nahajajo v Prilogi 1 in 2.

3.3 Laboratorijske aparature

Laminarij (brezprašna komora) (Iskra PIO, LFVP12)

Stresalnik (Vorteks) (Vibromix 10, Tehnica[®])

Laboratorijske centrifuge:

- Function Line, Labofuge 400 (Heraeus, Cent)
- Rotofix 32 A (Hettlich, Velika Britanija)

Hematološki analizator (Coulter LH 750, Beckman Coulter[®] Inc., ZDA)

CO₂ inkubatorja (SANYO, Japonska):

- MCO-15AC
- MCO-19 AIC

Vodna kopel (Termoproc VKNP, Slovenija)

Komora za pripravo citogenetskih preparatov (Opti Chrome, EuroClone S.p.A, Italija)

Grelne plošče (Termoproc TP, Slovenija)

Invertni mikroskop (Opton, Nemčija)

Svetlobni mikroskop (Olympus BX , Olympus Optical Co., Japonska)

Diferenciacijski števec Eqar 8 (Maras, Slovenija)

Hibridizator (ThermoBrite[™] Statspin[®], ABBOT Molecular, ZDA)

pH-meter (Mettler Toledo, Seven Easy, ZDA)

Tehnica (Mettler Toledo AX 304, ZDA)

Merilci časa Digital timer (Assistent)

3.4 Laboratorijski pribor

Sterilne centrifugirke, 15mL (Greiner Bio-one, CELLSTAR[®], Nemčija)

Sterilne posodice za gojenje celic 50 mL, 25 cm², M. filter (GREINER, bio-one, CELLSTAR[®] GBO, Nemčija)

Sterilne Pasteurjeve pipete (kapalka); 3 mL (Alphalaboratories, Velika Britanija)

Sterilni nastavki za pipete; 100–1000 µL (Eppendorf, Duafilter)

Objektna stekelca dimenzije 26 mm x 76 mm (VITROGNOST[®] Biognost, Nemčija)

Krovna stekelca:

- pri nanosu sond: velikost: 22 mm x 22 mm, (BRAND)
- pri nanosu DAPI II: velikost 50 mm x 24 mm (Assistent, Nemčija)

Avtomatski pipetor Eppendorf Easypet (Eppendorf, Nemčija)

Nastavki za avtomatsko pipeto Eppendorf duafilter, različni volumni: 10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL (Eppendorf, Nemčija)

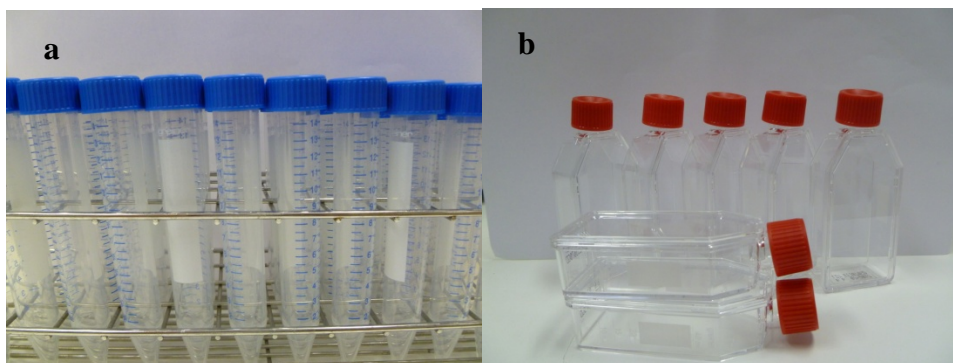
Steklovina:

- steklene kivete za barvanje objektnih stekel
- bučke (1000 mL) (Scott DURAN, Nemčija)
- merilni valji (50 mL, 100 mL)
- čaše (500 mL, 1000 mL)

Stojala za centrifugirke,

Celulozna vata, velikost 25 cm x 20 cm (Tosama)

Plastične posode za sterilno filtracijo raztopin, filter s premerom por 0,22 µm (TPP[®], Švica)



Slika 4: Uporabljeni laboratorijski material: a) sterilne centrifugirke, b) sterilne posodice za gojenje celic

3.5 METODE DELA

3.5.1 Odvzem vzorca KM in pK

Vzorec kostnega mozga smo pridobili s punkcijo kostnega mozga. Ta je potekala v aseptičnih pogojih. Naredili smo jo v predelu zadnjega črevničnega trna, redkeje pa iz prsnice. Poseg je izvedel zdravnik. Pred posegom je kožo razkužil in omrtvil mesto odvzema z lokalnim anestetikom. KM je punktiral s posebno iglo z mandrenom, kjer je s stalnim pritiskom na iglo z vrtajočimi gibi počasi prodril skozi kompaktno kost do spongioze. Nato je odstranil mandren in z brizgalko vsrkal vsebino. Če pri posegu ni dobil aspirata KM, je odvil vzorec biopsije KM. Za citogenetsko analizo je odvil približno 3 mL vzorca KM, katerega smo prenesli v sterilno gojišče RPMI 1640 z dodanim Na-heparinom (30). Vzorec PK je bil odvil v 7-mililitersko epruveto z modrim zamaškom, ki je bila prevlečena z antikoagulantom Na-heparinom.

3.5.2 Prenos vzorcev v laboratorij

Prenos do laboratorija mora biti hiter. Vzorec mora tja prispeti nekaj ur po odvzemu oz. na dan odvzema vzorca. Prenos vzorcev je potekal pri sobni temperaturi. Izpolnjeni morajo biti vsi opisani pogoji, da med transportom izgubimo čim manj celic.

3.5.3 Priprava vzorcev KM in pK za gojenje

Celotni vzorec KM smo centrifugirali pri 285 x g za 10 minut, da smo ločili levkocite od ostalih krvnih celic. Pri tem so se eritrociti posedli na dnu, na vrhu je ostala plazma, v vmesnem sloju pa se je nahajal kostni mozeg, ki smo ga s sterilno Pasteurjevo pipeto previdno povlekli. Ker je bil KM močno viskozen, se je potegnil vanjo sam. Povlečen KM smo suspendirali v 8 mL spiralne raztopine Hank's. Ta raztopina je bila predhodno segreta na 37 °C. Nato smo ponovno centrifugirali tako pripravljeno suspenzijo pri 285 x g za 10 minut. Supernatant smo previdno odstranili in s kapalko povlekli KM, ki smo ga prenesli v 1 mL rezervnega gojišča KMB in vse skupaj dobro premešali. V epico smo odpipetirali 100 µL suspendiranega vzorca kostnega mozga in dodali 200 µL pufra PBS. Pripravljenemu vzorcu KM smo izmerili koncentracijo levkocitov s pomočjo hemocitometra in jo upoštevali pri izračunu volumna vcepka. Volumen vcepka smo izračunali tako, da je bila končna koncentracija levkocitov, ki smo jo nacepili na gojišča, čim bližja $1 \times 10^6/\text{mL}$, ki predstavlja optimalno začetno koncentracijo celic za gojenje. Pri kultivaciji PK smo najprej naredili hemogram venske krvi in nato preračunali ustrezní V vcepka, da je bila koncentracija levkocitov, ki smo jo nacepili na gojišče, čim bližja $1 \times 10^6/\text{mL}$.

3.5.4 Gojenje celic KM in PK

Vzorci KM in pK bolnikov s KLL smo vzporedno gojili na treh gojiščih, ki so se med seboj razlikovala po vrsti rastnega medija in po dodanih mitogenih (Tabela II). Tako smo pripravili gojišče RPMI, katerega smo dopolnili z FBS in IL-2 in dodali CpG-ODN (reagent **EKAMP**). IL-2 smo dodali samo mediju RPMI 1640, ker je to osnovni medij brez hematopoetskih citokinov. Drugo gojišče je bil kompletni gojitveni medij KMM z dodanim EKAMP-om. Ime rastnega medija **KMM** izhaja iz kratic, kjer prvi črki (**KM**) označujeta vrsto biološkega vzorca – kostni mozeg, za katerega se medij uporablja –, zadnja črka (**M**) pa je začetnica imena medija (Marrow MaxTM). Proizvajalec medija KMM navaja, da ta kompletni medij vsebuje mešanico rastnih faktorjev, zato pri tem gojišču nismo dodajali IL-2. Tretje gojišče je samo gojitveni medij KMM brez vseh dodatkov, ki se je v laboratoriju predhodno že uporabljal za gojenje in je zato ustrezna kontrola za oceno vpliva dodatkov. Razlika v gojitvenih medijih RPMI in KMM je v sestavi, proizvajalcih in tudi v ceni. KMM je precej dražji od RPMI 1640. Obema smo dodali CpG-ODN (EKAMP), da

bi lahko primerjali njuno primernost za gojenje celic KLL. Gojišče KMM, ki je bilo brez vseh dodatkov, nam je služilo kot negativna kontrola. Dodatek CpG-ODN v gojiščih smo poimenovali s komercialnim imenom **EKAMP**. Na vsako gojitveno posodo smo zapisali ime in priimek bolnika, datum odvzema vzorca in vrsto gojišča. V sterilne posodice za gojenje celičnih kultur (25 cm²) smo odpipetirali reagente za posamezno gojišče. Celice posameznega bolnika smo tako gojili v treh različnih pripravljenih gojiščih: **RPMI + EKAMP+IL-2**, **KMM + EKAMP** in **KMM** (Tabela II).

Tabela II: Priprava gojišč

Gojišče RPMI + EKAMP + IL-2	Gojišče KMM + EKAMP	Gojišče KMM
8 mL gojitvenega medija RPMI 1640 9 µL EKAMP 010 10 µL IL-2 1 mL vzorca	8 mL gojitvenega medija KMM (Marrowmax) 9 µL EKAMP 010 1 mL vzorca	8 mL gojitvenega medija KMM (Marrowmax) 1 mL vzorca

Pripravljena gojišča smo za nekaj minut postavili na vodno kopel (37 °C), da so se segrela. Če je bila koncentracija levkocitov nizka (< 10 x 10⁹/L), smo vzorec enakomerno razdelili v vsa tri gojišča. Če pa je bila koncentracija levkocitov večja od 10 x 10⁹/L smo izračunali ustrezen volumen vcepka (V). Celice KM in pK smo gojili v sterilnih plastičnih posodah z odprtim sistemom, tako da je potekala prosta izmenjava plinov. Na koncu smo na gojitvene posodice zapisali še uro, ob kateri smo začeli gojiti celice, in posodice položili v CO₂ inkubator. Tako pripravljene celične kulture smo v gojiščih z dodatkom EKAMP-a gojili 48–72 ur, odvisno od dneva sprejema vzorca, v gojišču KMM pa kratkotrajno – 24 ur. Pol ure pred iztekom časa gojenja smo v vsako posodico dodali 70 µL kolcemida, tako da je bila njegova koncentracija v gojišču 10 µg/mL. Kolcemid je zaustavil delitev celic v metafazi. Kolcemid smo pustili delovati pol ure.

3.5.5 Celična sinhronizacija

Postopek celične sinhronizacije smo prilagodili dnevu prihoda vzorca, kot je prikazano v Tabeli III. Če smo vzorec gojili 72 ur, smo celično sinhronizacijo izvajali tako, da smo po 48 urah kultivacije dodali 160 µL sinhronizacijske raztopine A v gojitvene posode, dobro premešali in jih položili nazaj v inkubator. Z raztopino A smo povzročili zaustavitev

celične delitve v G1/S fazi. Po inkubaciji čez noč oz. po 19-ih urah smo istim vzorcem dodali 160 μ L raztopine B brez menjave gojišča ter inkubirali nadaljnih 5 ur do postopka izolacije celic. Z raztopino B smo blokirane celice sprostil iz faze G1/S in omogočili normalni potek celičnega cikla. Po 5-ih urah smo začeli z odvzemom kulture, saj naj bi bilo takrat največ celic v prometafazi. V primeru, da je vzorec prispel v laboratorij v sredo, smo ga gojili samo 48 ur. V takem primeru smo skrajšali čas delovanja raztopin A in B. Raztopino A smo takim vzorcem dodali po 24-ih urah, čez 19 ur pa še raztopino B. Če je vzorec prispel v četrtek in petek, celične sinhronizacije nismo izvajali. Pri vzorcih, kjer smo izvajali sinhronizacijo, smo v posamezno gojišče dodali 100 μ L kolcemida.

Tabela III: Postopek celične sinhronizacije

PRIHOD VZORCA	brez sinhronizacije	s sinhronizacijo: *A in B
ponedeljek	gojili 72 h (do četrta)	gojili 72 h (do četrta) po 48 h: dodali A po 67 h: dodali B
torek	gojili 72 h (do petka)	gojili 72 h (do petka) po 48 h: dodali A po 67 h: dodali B
sreda	gojili 48 h (do petka)	gojili 48 h (do petka) po 24 h: dodali A po 43 h: dodali B
četrtek	pustili vzorce do petka	pustili vzorce do petka
petek	gojili 72 h (do ponedeljka)	gojili 72 h (do ponedeljka)

* A in B: Sinhronizacijski raztopini A in B

3.5.6 Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic

Celice smo gojili od 24 do 72 ur. Po gojenju je sledila izolacija celic, ki je sestavljena iz treh korakov: odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic. Pred tem smo vsako centrifugirko označili z bolnikovim imenom in priimkom, datumom odvzema vzorca in vrsto gojišča. Ko se je čas delovanja kolcemida iztekkel, smo s pomočjo 10 mL pipete odpipetirali suspenzijo celične kulture v centrifugirke s koničastim dnom in jih centrifugirali pri 285 x g 10 minut. Potem smo odstranili supernatant in dobro premešali sediment. Nato je sledila **hipotonična obdelava**, s katero smo dosegli povečanje volumna celic, saj je zaradi koncentracijskega gradienta voda vdrla v celico. Zaradi tega so se kromosomi v celici lepše razporedili in manj prekrivali. V vsako centrifugirko smo dodali 7 mL pripravljene hipotonične raztopine, ki je bila predhodno segreta na 37 °C. Prve 2–3 mL hipotonične raztopine smo dodajali po kapljicah. Nato smo centrifugirke zamašili in jih dali v vodno kopel, kjer so stale 25 minut. Po izteku časa smo v vsako centrifugirko dodali 3 kapljice fiksativa, s čimer smo zaustavili delovanje hipotonije, in dali centrifugirat pri 285 x g za 8 minut. Odstranili smo supernatant in sediment dobro premešali na vorteksu. Nato smo dodali 8 mL **fiksativa**, ki smo ga sprva dodajali po kapljicah, da nismo poškodovali celic. Dodani fiksativ je pospešil lizo eritrocitov in prekinil vse celične procese ter odstranil vodo. Dodani fiksativ v vzorcu smo pustili delovati 15 minut in nato spet dali centrifugirat (285 x g/8min). Korak dodajanja fiksativa smo ponovili tolikokrat, da je bil supernatant čist in prozoren. Na koncu smo v centrifugirki z vzorcem pustili 1 mL fiksativa in ga shranili v zamrzovalnik na –20 °C. Tam smo vzorce pustili vsaj 2 uri, preden smo jih uporabili za nanos na stekelca (4).

3.5.7 Nanos na stekelca

➤ Priprava objektnih stekel za nanos

Objektna stekelca za nanos vzorcev smo morali pred uporabo ustrezno pripraviti. Nova stekelca smo zložili v ležečo kadičko in dolili približno v višini 1 cm kadičke Kemexa A in do vrha dopolnili z vodo. Kadičko smo pokrili in pustili stati čez noč. Naslednji dan smo stekelca sprali pod tekočo vodo; vsaj 20 minut pod vročo vodo in vsaj 10 min pod hladno vodo, na koncu pa jih sprali z redestilirano vodo in dolili svežo, tako da so bila stekelca v celoti pokrita z vodo.

➤ **Nanos vzorcev na objektna stekla**

Izbrane vzorce smo vzeli iz zamrzovalnika, jih sprali s fiksativom in dali centrifugirat 8 minut pri 285 x g. Vzorcem smo odstranili/dodali toliko fiksativa, da smo dobili ustrezno gostoto celic, ki je bila primerna za kariotipizacijo ali za FISH postopek. Nato smo začeli nanašati vzorce na objektna stekla. Pri tem smo s pinceto vzeli objektno stekelce iz vode in ga odcedili na staničevini. Odpipetirali smo 20 μ L izbranega vzorca in z višine kanili vzorec na objektno steklo pod kotom 20–30°. Na koncu smo obrisali spodnjo stran stekla ter ga označili z imenom in priimkom pacienta, ID številko in vrsto gojišča. To smo naredili kar se da hitro, nato pa stekelce položili v komoro Optichrome, v kateri smo ga pustili 4 minute. Komora je zagotavljala optimalno temperaturo in vlago, kar je predstavljalo ustrezne pogoje za izhlapevanje fiksativa. Ko je bilo stekelce enkrat v komori, je nismo več odpirali. Ko so bila stekla posušena, smo pod invertnim mikroskopom preverili, ali je bila gostota celic ustrezna. Če je bil vzorec predelek, smo ga ponovno centrifugirali in odstranili nekaj fiksativa. Če pa je bila gostota prevelika, smo vzorec razredčili z nekaj fiksativa. Ko smo dosegli ustrezno gostoto celic, smo začeli z nanosom na stekelca. Za oceno MI in morfologije kromosomov smo iz vsakega gojišča (RPMI + EKAMP, KMM + EKAMP, KMM) nanесли vzorec na 2 stekelci, torej skupaj 6 stekelc za posameznega bolnika s KLL.

Nanešena stekelca smo položili na grelno ploščo, na 60 °C. Na tej temperaturi smo starali stekelca pol ure, nato pa še pol ure na 90 °C. Po zaključenem staranju smo stekelca odstranili z grelne plošče, da so se ohladila.

3.5.8 Predobdelava s tripsinom in barvanje z Giemso (GTG proganje)

GTG proganje je eden od načinov proganja, kjer ustvarimo G-proge na kromosomih, ki jih dobimo s pomočjo delovanja tripsina in z barvanjem z barvilom Giemsa. Najprej smo objektna stekelca obdelali s tripsinom. Tripsinizacija je zelo pomemben korak, kjer pride do delne razgradnje proteinov v kromatinu (4). Celotni postopek smo izvedli pri sobni temperaturi. Objektno stekelce smo za 5 s izpostavili raztopini tripsina, nato pa takoj sprali v 1 x PBS in položili v kadičko s pripravljeno raztopino Giemsa, kjer smo stekelca pustili 14 minut. Na koncu smo stekelca sprali pod tekočo vodo in počakali, da se posušijo.

Vedno smo najprej pobarvali eno stekelce in s pomočjo svetlobnega mikroskopa pregledali kakovost proganja kromosomov ter prilagodili čas tripsinizacije. Če so bili kromosomi puhasti in najedeni, smo čas tripsinizacije skrajšali, če pa so bili temni, smo čas tripsinizacije podaljšali. Po ocenjenem poizkusnem stekelcu smo določili čas tripsinizacije in enak čas uporabili pri ostalih stekelcih (4).

3.5.9 Ocena mitotskega indeksa (MI)

MI smo ocenili na GTG proganih preparatih pod svetlobnim mikroskopom. Preparate smo opazovali pri 100-kratni povečavi in se premikali vzdolž celotnega preparata. Pri tem smo s pomočjo diferenciacijskega števca prešteli 200 celic na določenem delu preparata in beležili število opaženih mitoz. Nato smo se premaknili na drugo področje preparata in ponovili postopek. Tako smo pregledali 5 področij celotnega preparata, torej skupaj 1000 celic na eno objektno stekelce, pri tem pa beležili število mitoz. MI je tako predstavljal število mitoz na 1000 celic, zato smo MI izrazili v promilah (‰). Kot mitozo smo upoštevali le tiste skupke kromosomov, kjer je bilo skupaj več kot 23 kromosomov.

Da smo lahko primerjali MI med posamezni gojišči, smo za vsako gojišče pregledali 2 stekelci in na vsakem stekelcu prešteli 1000 celic za oceno MI. Končni MI za posamezno gojišče je predstavljalo povprečje MI na obeh stekelcih.

3.5.10 Ocena morfologije kromosomov

Ko smo na preparatu med štetjem MI našli mitozo, smo podrobno pregledali kromosome, da smo lahko ocenili njihovo morfologijo. Pri oceni morfologije kromosomov smo ocenjevali **razporeditev** ter **proganost kromosomov** pri 1000-kratni povečavi. Pri razporeditvi kromosomov smo ocenjevali, kako so bili kromosomi razporejeni, koliko so se med seboj prekrivali in koliko so bili med seboj ločeni. Pri proganju smo ocenjevali, kako dobro so bile vidne proge na kromosomih. Oba parametra (razporeditev in proganost) smo ocenili semikvantitativno tristopenjsko:

- 1 – dobro
- 2 – srednje
- 3 – slabo

Pri vsakem bolniku smo morfologijo kromosomov ocenjevali v vseh treh gojiščih (**RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP, KMM**). Za posamezno gojišče smo ocenili morfologijo pri 6-ih najdenih mitozah na dveh steklih. Končno oceno morfologije kromosomov posameznega gojišča je predstavljalo povprečje ovrednotene razporeditve in proganosti kromosomov na 6-ih mitozah. Če je bilo število mitoz v posameznem gojišču manjše od 6, morfologije v tistem gojišču nismo ocenili. S primerjavo ocene morfologije kromosomov v vseh treh gojiščih smo preverili, ali med gojišči obstaja razlika v razporeditvi in proganosti kromosomov in ali uporaba CpG-ODN vpliva na morfologijo kromosomov, ki je pomembna pri ugotavljanju kromosomskih sprememb pri KLL.

3.5.11 FISH postopek

Protokol za standardno FISH preiskavo je sestavljen iz šestih pomembnih korakov (21):

1. priprava vzorca ali tarčne DNA,
2. priprava sonde in označevanje,
3. denaturacija sonde in tarčnega zaporedja,
4. hibridizacija sonde s tarčnim zaporedjem,
5. spiranje po hibridizaciji,
6. detekcija.

3.5.11.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA

Predhodno ustrezno izolirane in fiksirane celice smo nanесли na objektno steklo. Pod invertnim mikroskopom smo preverili, ali je preparat primeren za hibridizacijo. Celice so morale biti razporejene enakomerno. Dobro je bilo, če so bile vidne metafaze. Celice niso smele svetiti premočno. Z diamantnim rezilom smo označili področje na steklu, ki je ustrezalo izvedbi hibridizacije (2 cm x 2 cm). Steklo smo označili na motnem robu s svinčnikom ali diamantnim rezilom. Stekelca smo nato greli na grelni plošči pol ure na 60 °C in pol ure na 90 °C. V vodni kopeli smo segreli (37 °C) kiveti za objektna stekla s 100 mL raztopin 2 x SSC in raztopino pepsina. V vsaki kiveti smo zaporedoma pustili objektna stekla 5 min. Na sobni temperaturi smo v posodicah za objektna stekla pripravili spiralne raztopine 2 x SSC pufra in vanje prestavljali stekla z vzorcem:

2 x SSC; 2 min

2 x SSC; 2 min

2 x SSC; 2 min

formaldehidna raztopina; 10 min

2 x SSC; 2 min

2 x SSC; 2 min

2 x SSC; 2 min

70 % EtOH; 2 min

90 % EtOH; 2 min

100 % EtOH; 2 min

Stekla smo osušili.

3.5.11.2 Priprava sond

Pred pričetkom dela smo določili nabor DNA sond. Pri bolnikih s sumom na KLL smo izbrali naslednje sonde: ON ATM/GLI, ON DLEU/p53 in LSI IGH/CCND1.

Priprava sonde **LSI Vysis** (IGH/CCND1) za nanos:

Sondo smo odtalili v temi. Nato smo jo hitro premešali na vorteksu in odcentrifugirali. Za nanos na eno stekelce s tarčnim področjem smo v črno epico odpipetirali: 1 μ L sonde, 7 μ L hibridizacijskega pufra in 2 μ L destilirane vode.

Vsebino smo na hitro centrifugirali, premešali in ponovno centrifugirali, da se je pelet zbral na dnu. Enako smo naredili s sondo, preden smo pripravili hibridizacijsko raztopino.

Priprava sonde **Poseidon** (ATM/GLI, DLEU/p53):

Vsebino smo na hitro centrifugirali, premešali in ponovno centrifugirali, da se je pelet zbral na dnu. Na stekelce z označenim področjem, velikim približno 22 mm x 22 mm, smo nanesli 10 μ L sonde.

3.5.11.3 Denaturacija vzorca in hibridizacija sonde s tarčnim zaporedjem DNA

Celotno količino predhodno denaturirane sonde smo odpipetirali na sredino označenega polja na steklu in nanjo položili krovno steklo (22 mm x 22 mm), tako da ni bilo vidnih mehurčkov. Robove krovnega stekla smo zalili z gumijastim cementom za tesnenje krovnega stekla in tako zagotovili za zrak neprepustno okolje za hibridizacijo. Stekla smo položili na ploščo denaturatorja/hibridizatorja ThermoBrite in izbrali program za

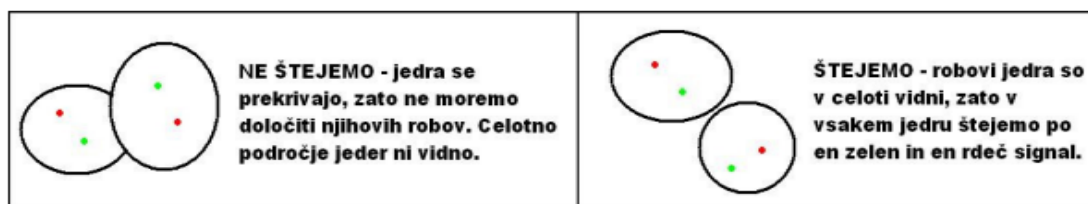
denaturacijo vzorca in DNA sonde (75 °C 10 minut). Po končani denaturaciji se začne program hibridizacije sonde s tarčnim zaporedjem DNA, ki je potekala pri 37 °C. Hibridizacija je trajala najmanj 16 ur oz. preko noči.

3.5.11.4 Spiranje stekel po hibridizaciji

S stekel smo odstranili krovna stekla. Nato smo jih za 4 minute postavili v spiralno raztopino NP-40, ki je bila predhodno segreti na 73 °C. Stekla smo nato za 4 minute prestavili v kiveto s spiralnim pufrom PBT, ki je bil ogret na sobno temperaturo. Na povsem mokro steklo, ki smo ga odcedili na staničevini, smo kanili 10 µL DAPI-ja in ga prekrili z velikim krovnim steklom, pri tem pa pazili, da ni bilo mehurčkov. S staničevino smo ovili stekla in jih dobro popivnali ter osušili. Nato smo stekla položili v črno škatlo in postavili v hladilnik za pol ure, za tem pa pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom. Če so preparati nespecifično svetili, smo jih ponovno spirali v spiralnih pufrih (NP-40 in PBT), a krajši čas.

3.5.11.5 Štetje signalov in interpretacija rezultatov

Vsaka sonda daje za njo značilen vzorec signalov pri normalni celici in pri spremenjeni oz. nenormalni celici. Zato smo pred pričetkom vrednotenja preparatov preverili navodila za štetje in interpretacijo signalov za posamezno sondo. Pri našem delu smo se pri vrednotenju FISH preparatov bolnikov s KLL seznanili z navodili za ustrezno razlago signalov za sonde ATM/GLI, DLEU/p53, IGH/CCND1. Pri štetju števila signalov sond v celici smo upoštevali le tiste celice, pri katerih se robovi jedra niso prekrivali z drugimi jedri, saj tako niso bili vidni morebitno prisotni signali v prekrivajočem jedru. Signale sond smo šteli le v tistih celicah, pri katerih so bili robovi jedra v celoti vidni, kot prikazuje spodnja slika (Slika 5).



Slika 5: Vrednotenje signalov v celicah pri FISH analizi

FISH preparate sta ovrednotila dva preiskovalca. Pri tem je vsak preiskovalec preštel 200 celic tako, da je preštel 100 celic v dveh ločenih področjih preparata. Če je med preiskovalcema prišlo do različnega vrednotenja rezultatov za več kot 10 %, je moral rezultate ovrednotiti še tretji preiskovalec. Kot končne rezultate smo upoštevali povprečje tistih, ki so odstopali za manj kot 10 %. Rezultat smo izrazili kot delež (%) nenormalnih celic v vzorcu, in to za vsako posamezno sondo.

3.6 Statistična obdelava podatkov

Vsa statistična testiranja smo opravili s pomočjo računalniškega programa za statistično obdelavo podatkov SPSS (IBM SPSS Statistics 20).

Porazdelitev opazovane spremenljivke ali test normalnosti smo preverili s pomočjo **Shapiro-Wilkovega testa**, s katerim smo preverili porazdelitev opazovane spremenljivke. Če so rezultati tega testa pokazali nenormalno porazdelitev spremenljivke ($p < 0,05$), smo uporabili neparametrične statistične teste (35).

Celice posameznega bolnika smo gojili vzporedno na treh gojiščih. Ista skupina bolnikov je bila opazovana pod več različnimi pogoji (gojiščih), vse opazovane vrednosti smo pridobili od istega bolnika. Zato so vzorci med seboj **odvisni** (35).

Za primerjavo več med seboj odvisnih vzorcev (vrednosti MI in morfologije kromosomov v vseh treh gojiščih), smo uporabili neparametrični **Friedmanov test**. Ta test predstavlja neparametrično različico testa za oceno razlik med več odvisnimi vzorci. Pove nam, ali obstaja razlika med testiranimi skupinami, ne pove pa nam, katera skupina se razlikuje od drugih. Če so rezultati Friedmanovega testa statistično neznačilni ($p > 0,05$), pomeni, da med skupinami ni statističnih razlik. Če pa smo s Friedmanovim testom dokazali statistično značilne razlike ($p < 0,05$), smo izvedli **Wilcoxonov test predznačenih rangov**, s katerim smo določili, med katerimi pari skupin je bila razlika (36, 37).

V drugem delu smo statistično analizirali dve skupini bolnikov s KLL: tiste, katerih celice smo gojili brez CpG-ODN (skupina 1), in tiste, katerih celice smo gojili s CpG-ODN (skupina 2). Skupini bolnikov s KLL, ki smo ju razdelili glede na način gojenja, sta bili med seboj neodvisni, ker so bili bolniki v obeh skupinah različni, zato smo za primerjavo

uporabili **Mann-Whitney U test**, ki je neparametrični statistični test za dva neodvisna vzorca (36). S pomočjo kvartilnega diagrama smo prikazali porazdelitev vrednosti opazovane spremenljivke. Na ta način smo grafično prikazali kvartilni razmik, ki zajame vrednosti med spodnjim (Q_1) in zgornjim (Q_3) kvartilom in obsega srednjo polovico vseh podatkov. Vrednost Q_1 predstavlja vrednost, pod katero se nahaja 25 % vseh vrednosti MI, Me pa je vrednost, od katere je polovica vseh vrednosti manjših, druga polovica pa večjih. Q_3 pa je vrednost, od katere je 25 % vrednosti večjih (35, 36).

4. REZULTATI

4.1. Vpliv CpG-ODN na mitotski indeks (MI)

V **Tabeli IV** so zbrani vsi podatki o 24-ih bolnikih s KLL, vključenih v ta del raziskave. V primeru, da količina vzorca ni zadoščala za vzporedno gojenje na treh različnih gojiščih, smo se odločili, da izpustimo gojenje na KMM. To je bila težava predvsem pri kostnem mozgu, zato v teh primerih nimamo podatka za KMM (oznaka ND). Izmed 24 vzorcev bolnikov smo zbrali 17 vzorcev KM in 7 vzorcev PK. 6 vzorcev smo gojili 24 ur, 4 vzorce 48 ur in 14 vzorcev 72 ur. Od 24 bolnikov smo pri 8-ih bolnikih izvedli celično sinhronizacijo (Tabela IV).

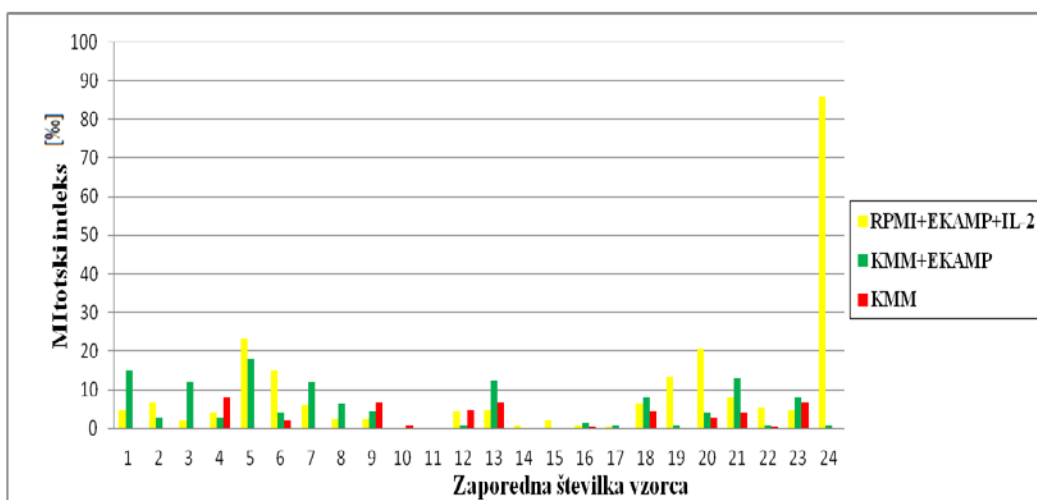
Tabela IV: Mitotski indeksi v treh različnih gojiščih

zaporedna številka	bolnik	starost [leta]	vrsta vzorca	čas gojenja [h]	mitotski indeks [%]			sinhronizacija DA/NE
					RPMI + EKAMP + IL-2	KMM + EKAMP	KMM	
1	DZ	78	KM	72	5	15	ND	NE
2	HT	60	KM	24	7	3	ND	NE
3	KŽ	53	KM	24	2	12	ND	NE
4	SS	82	KM	24	4	3	8	NE
5	OM	76	KM	72	23,5	18	ND	NE
6	MA	75	KM	72	15	4	2	NE
7	JT	40	KM	24	6	12	ND	NE
8	ČN	59	pK	72	2,5	6,5	0	NE
9	SA	68	KM	72	2,5	4,5	7	NE
10	CR	55	KM	24	0	0	1	NE
11	HJ	70	pK	72	0	0	0	DA
12	PM	59	KM	72	4,5	1	5	DA
13	RI	59	KM	48	5	12,5	7	NE
14	KJ	75	KM	72	1	0	0	NE
15	GF	63	pK	48	2	0	0	DA
16	KF	70	pK	48	1	1,5	0,5	DA
17	TS	64	BS	24	0,5	1	0	NE
18	LA	79	KM	72	6,5	8	4,5	DA
19	SL	82	pK	72	13,5	1	0	NE
20	PA	75	KM	72	20,5	4	3	NE
21	SM	66	KM	72	8	13	4	DA
22	GV	64	pK	48	5,5	1	0,5	DA
23	DM	78	KM	72	5	8	7	NE
24	MB	78	pK	72	86	1	0	DA
Povprečna vrednost:					9,4	5,4	2,6	

KM – kostni mozeg, PK – periferna kri, ND – ni delano

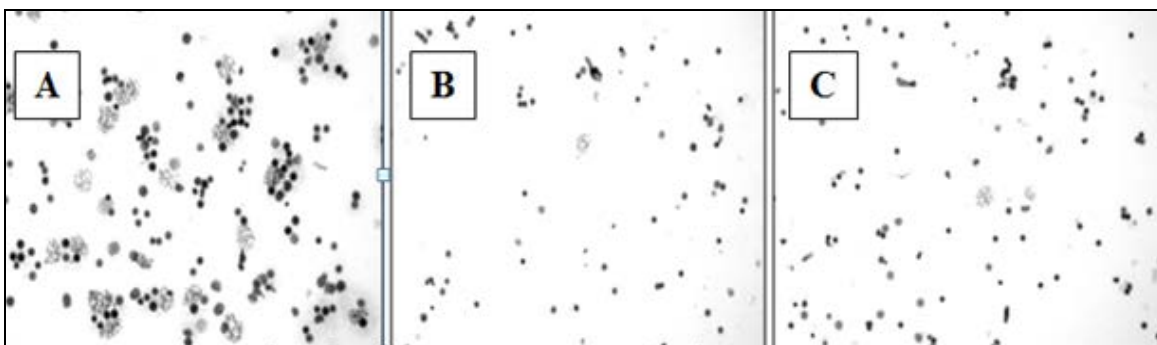
Vrednost MI v posameznem gojišču je aritmetična sredina dobljenih vrednosti MI na dveh objektnih stekelcih, pri čemer smo na posameznem stekelcu ovrednotili 1000 celic. Povprečna vrednost MI v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 znaša 9,4 %, v gojišču KMM + EKAMP 5,4 %, v gojišču KMM pa 2,6 %.

Slika 6 prikazuje primerjavo vrednosti MI v vseh treh gojiščih. Nekateri MI so višji v gojišču KMM + EKAMP (zap. št. vzorca: 1, 3, 7, 13, 21), v nekaterih primerih pa se je boljše izkazalo gojišče RPMI + EKAMP + IL-2 (zap. št. vzorca: 5, 6, 19, 20, 24). V enem samem primeru (št. 9) je bil MI največji v gojišču KMM.



Slika 6: Mitotski indeksi (MI) v treh različnih gojiščih (RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP in KMM)

Največjo razliko v MI med gojišči smo opazili pri bolniku pod zaporedno številko 24. MI v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 je znašal 86 %, v gojišču KMM + EKAMP 1 % in pri KMM 0 %. Razlika v MI med gojišči je bila pri mikroskopiranju vidna pri 100-kratni povečavi (Slika 7).



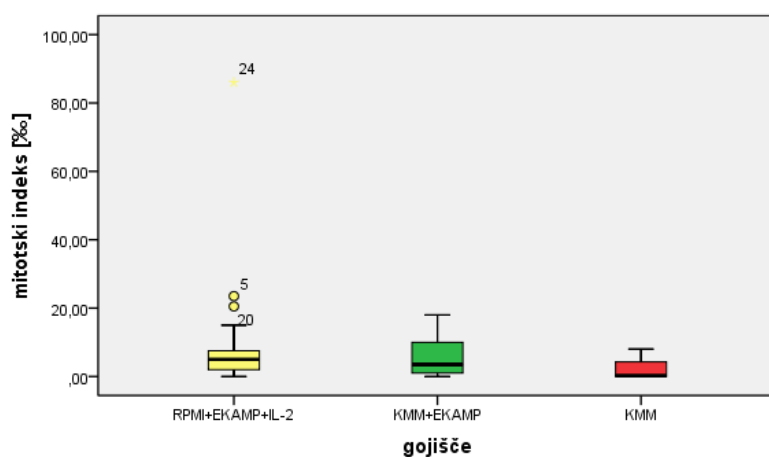
Slika 7: Vzorci istega bolnika (zap.št. 24) po gojenju v treh različnih gojiščih: A) RPMI + EKAMP + IL-2, B) KMM + EKAMP in C) KMM pri 100-kratni povečavi

Tabela V prikazuje statistične parametre vrednosti MI (Q_1 , Me, Q_3) v vseh treh gojiščih ne glede na vrsto vzorca. Srednja polovica vseh vrednosti MI v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 se nahaja med 1 in 8 %, v gojišču KMM + EKAMP med 1 in 6,5 % in v gojišču KMM med 0 in 5 %. Največja vrednost Me je v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 ($Me_{RPMI + EKAMP + IL-2} = 4,5$), najnižja pa v gojišču KMM ($Me_{KMM} = 1$). Primerjava teh parametrov kaže, da je glede na MI najboljše gojišče RPMI + EKAMP + IL-2, saj so vrednosti Q_1 , Me in Q_3 najvišje prav v tem gojišču. V kvartilnem diagramu (Slika 8) sta v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 prisotna osamelca ($^{\circ}$) in ekstremni osamelec (*). Primerjava vseh treh okvirjev z ročaji kaže, da med gojišči ni razlike v porazdelitvi vrednosti MI, kar lahko vidimo po višini vseh treh okvirjev (rumeni, zeleni, rdeči). Statistična analiza s Friedmanovim testom je pokazala, da – upošteva vse podatke ne glede na vzorec – med tremi gojišči ni statistično značilne razlike ($p > 0,05$) v vrednostih MI.

Tabela V: Vrednosti Q_1 , Me in Q_3 za MI v testiranih gojiščih ne glede na vrsto vzorca in čas gojenja

gojišče	Q_1	Me	Q_3
RPMI + EKAMP + IL-2	1	4,5	8
KMM + EKAMP	1	1,5	6,5
KMM	0	1	5

Q_1 – prvi kvartil, Me – mediana, Q_3 – tretji kvartil



Slika 8: Kvartilni diagram vrednosti MI za tri različna gojišča

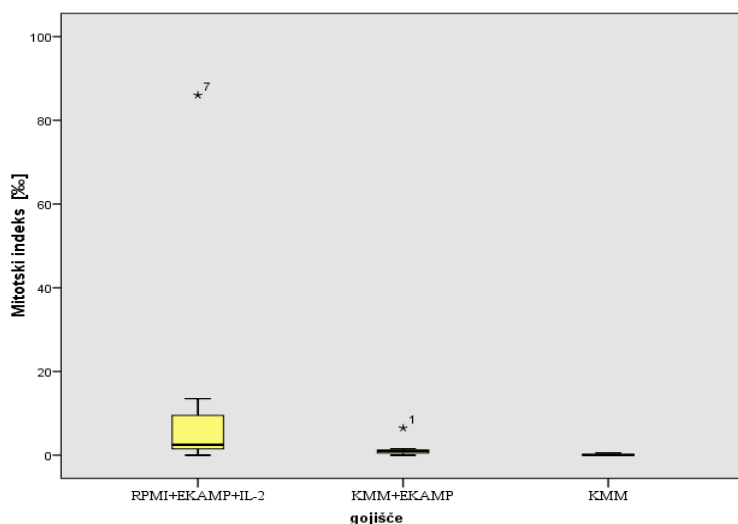
4.1.1 Vpliv dodatka CpG-ODN glede na vrsto vzorca

Nato smo primerjali vpliv CpG-ODN na MI glede na vrsto vzorca. Najprej smo testirali MI pri tistih bolnikih, pri katerih smo gojili vzorce KM ($N = 17$). Statistična analiza s Friedmanovim testom je pokazala, da pri vzorcih KM med gojišči ni statistično značilnih razlik v vrednostih MI ($p > 0,05$). Pri vzorcih KM dodatek CpG-ODN v gojišču torej ne poveča vrednosti MI.

Enako smo analizirali podatke za vzorce PK ($N = 7$). Statistična analiza s Friedmanovim testom je pokazala, da pri vzorcih PK med gojišči obstaja statistično značilna razlika v vrednostih MI ($p < 0,05$). Pri tem ima gojišče RPMI + EKAMP + IL-2 najvišjo vrednost mediane (Tabela VI, Slika 9). Zato smo pri teh vzorcih naredili parne primerjave z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov, s katerim smo skušali ugotoviti, med katerima gojiščema je razlika v vrednosti MI. Primerjava gojišč RPMI + EKAMP + IL-2 in KMM + EKAMP je pokazala, da med njima ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). Med gojiščema KMM + EKAMP in KMM pa smo dokazali statistično značilne razlike v vrednosti MI ($p < 0,05$). Vrednost mediane v gojišču KMM + EKAMP ($Me_{KMM + EKAMP} = 1$, $Me_{KMM} = 0$) kaže, da so v tem gojišču višji MI. Tudi med gojiščema RPMI + EKAMP + IL-2 in gojiščem KMM obstaja statistično značilna razlika v vrednosti MI ($p < 0,05$). Vrednost Me je višja v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 ($Me_{RPMI + EKAMP + IL-2} = 2,5$, $Me_{KMM} = 0$).

Tabela VI: Statistični parametri vrednosti MI pri vzorcih PK

gojišče	Q ₁	Me	Q ₃
RPMI + EKAMP + IL-2	1	2,5	13,5
KMM + EKAMP	0	1	1,5
KMM	0	0	0,5



Slika 9: Kvartilni diagram vrednosti MI v treh različnih gojiščih pri gojenju vzorcev PK

4.1.2 Vpliv CpG-ODN glede na čas gojenja

Testirali smo tudi uspešnost delitve celic KLL v posameznem gojišču glede na čas gojenja. Pri vzorcih bolnikov, ki smo jih gojili 24 ur ($N = 3$), med gojišči nismo dokazali statistično značilnih razlik v vrednostih MI ($p > 0,05$), kot tudi ne pri vzorcih, ki smo jih gojili 48 ur ($N = 4$). Prav tako po 72-urnem gojenju vzorcev KLL ($N = 12$) med gojišči ni statistično značilnih razlik v vrednostih MI ($p > 0,05$). Podaljšanje časa gojenja torej ne poveča MI.

4.1.3 Vpliv CpG-ODN glede na celično sinhronizacijo

Preverili smo tudi, ali celična sinhronizacija vpliva na uspešnost delitve celic KLL v posameznem gojišču. Pri vzorcih, kjer smo izvajali celično sinhronizacijo ($N = 8$), med gojišči ni statistično značilnih razlik v vrednostih MI ($p > 0,05$).

4.2. Ocena morfologije kromosomov

Drugi kriterij, s katerim smo ocenjevali uspešnost gojenja, je bila morfologija kromosomov, ki smo jo ocenili pri vseh 24-ih vzorcih bolnikov s KLL (Tabela VII). Pri oceni morfologije kromosomov smo ocenjevali **razporeditev** in **proganost kromosomov**. Oba parametra smo ocenili semikvantitativno:

1 – dobro , 2 – srednje, 3 – slabo.

Tabela VII: Ocene morfologije na različnih gojiščih

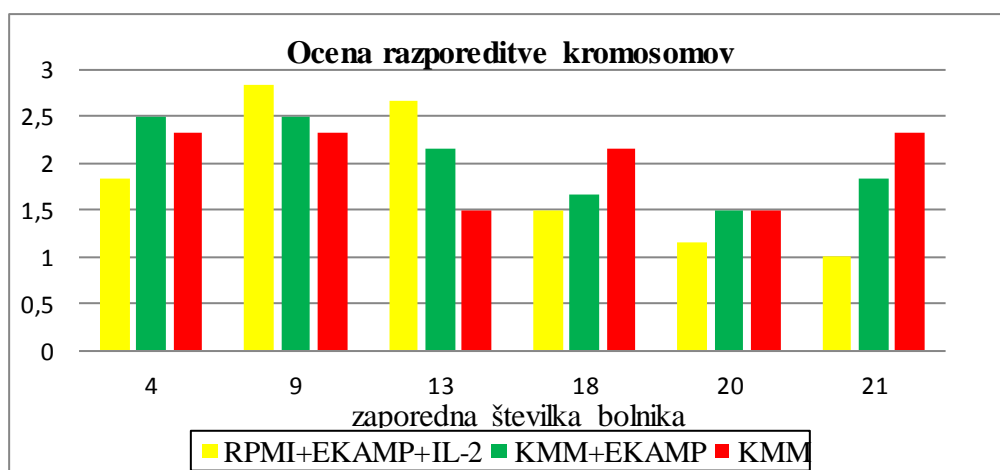
zaporedna številka	ID	bolnik	vrsta gojišča					
			RPMI + EKAMP + IL-2		KMM + EKAMP		KMM	
			razpored.	proge	razpored.	proge	razpored.	proge
1	4293	DZ	1,33	1,83	2,5	2,5	ni stekelca	ni stekelca
2	4314	HT	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	ni stekelca	ni stekelca
3	4319	KŽ	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	ni stekelca	ni stekelca
4	4378	SS	1,83	1,83	2,5	2,33	2,33	2,33
5	4399	OM	2,33	2,66	2	2,66	ni stekelca	ni stekelca
6	4413	MA	2	2	1,83	1,66	malo mitoz	malo mitoz
7	4427	JT	2,16	2,33	1,5	1,5	ni stekelca	ni stekelca
8	4430	ČN	1,83	2	1,83	2,16	malo mitoz	malo mitoz
9	4444	SA	2,83	2,83	2,5	2,5	2,33	2
10	4461	CR	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
11	4476	HJ	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
12	4478	PM	2,16	2,33	malo mitoz	malo mitoz	2	1,83
13	4491	RI	2,66	2,33	2,16	1,66	1,5	2,33
14	4492	KJ	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
15	4500	GF	1,83	2	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
16	4501	KF	malo mitoz	malo mitoz	1,16	1,16	malo mitoz	malo mitoz
17	4506	TS	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
18	4509	LA	1,5	1,66	1,66	2	2,16	2,5
19	4532	SL	1,16	2,16	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
20	4549	PA	1,16	1,66	1,5	1,5	1,5	2,5
21	4560	SM	1	1,16	1,83	2	2,33	2,5
22	4562	GV	1,33	2	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz
23	4569	DM	malo mitoz	malo mitoz	1,83	1,66	malo mitoz	malo mitoz
24	4596	MB	1,33	1,33	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz	malo mitoz

Za oceno povprečne vrednosti morfologije kromosomov posameznega gojišča in statistično primerjavo med gojišči (RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP, KMM) smo upoštevali samo podatke tistih vzorcev, pri katerih smo morfologijo kromosomov lahko ocenili v vseh treh gojiščih. To smo lahko storili samo pri 6-ih vzorcih (zaporedna številka vzorca: 4, 9, 13, 18, 20, 21) (Tabela VIII).

Tabela VIII: Izbrani podatki bolnikov, ki smo jih upoštevali pri oceni morfologije kromosomov

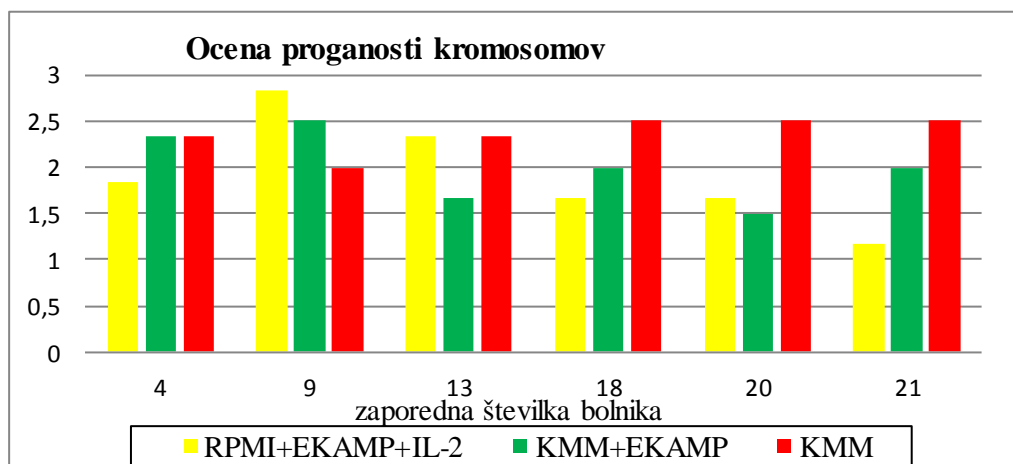
zaporedna številka	ID	ime in priimek	vrsta gojišča					
			RPMI + EKAMP + IL-2		KMM + EKAMP		KMM	
			razpored.	proge	razpored.	proge	razpored.	proge
4	4378	SS	1,83	1,83	2,5	2,33	2,33	2,33
9	4444	SA	2,83	2,83	2,5	2,5	2,33	2
13	4491	RI	2,66	2,33	2,16	1,66	1,5	2,33
18	4509	LA	1,5	1,66	1,66	2	2,16	2,5
20	4549	PA	1,16	1,66	1,5	1,5	1,5	2,5
21	4560	SM	1	1,16	1,83	2	2,33	2,5
povprečna vrednost			1,83	1,91	2,025	1,99	2,025	2,36

Povprečna vrednost ocene **razporeditve kromosomov** je najvišja v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2, kjer znaša 1,83, medtem ko znaša v gojiščih KMM + EKAMP in KMM 2,025. Prav tako je najboljša proganost v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 z oceno 1,91, sledi mu gojišče KMM + EKAMP z oceno 1,99, kot najslabše pa se je izkazalo gojišče KMM. Torej je morfologija kromosomov najboljša v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2. Na Sliki 10 je grafično prikazana primerjava razporeditve kromosomov pri bolnikih, pri katerih smo oceno morfologije določili v vseh treh gojiščih hkrati. V nekaterih primerih je razporeditev najboljša v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 (zap. št. 9, 13), pri drugih pa v gojišču KMM (zap. št. 18, 21). Samo v enem primeru je bila razporeditev najboljša v gojišču KMM + EKAMP (zap. št. 4).



Slika 10: Primerjava razporeditve kromosomov v treh gojiščih

Na Sliki 11 je primerjava ocene proganosti kromosomov v vseh treh gojiščih. V nekaj primerih je najboljša proganost ugotovljena v gojišču KMM (zap. št. 18, 20, 21), samo v enem primeru pa v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 (zap. št. 9).



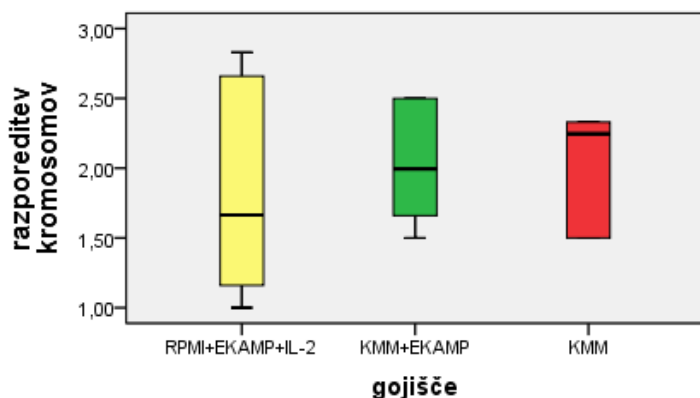
Slika 11: Primerjava proganosti kromosomov v treh gojiščih

V gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 je srednja polovica vseh vrednosti ocene razporeditve kromosomov med 1,12 in 2,7, v gojišču KMM + EKAMP med 1,62 in 2,5 ter v gojišču KMM med 1,5 in 2,33 (Tabela IX). Iz kvartilnega diagrama (Slika 12) je razvidno, da so trije stolpci, ki predstavljajo oceno razporeditve kromosomov v treh gojiščih, v isti višini, kar kaže na majhne razlike med gojiščih. V gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 je največji razpon vrednosti ocene razporeditve, prav tako pa je v tem gojišču vrednost Me najnižja ($Me_{RPMI + EKAMP + IL-2} = 1,66$), kar pomeni, da je v tem gojišču najboljša ocena razporeditve kromosomov. V ostalih dveh gojiščih so vrednosti Me nekoliko višje ($Me_{KMM + EKAMP} = 1,99$, $Me_{KMM} = 2,24$).

Tabela IX: Ocena razporeditve kromosomov. Parametri statistične analize (Q_1 , Me, Q_3)

razporeditev kromosomov	Q_1	Me	Q_3
RPMI + EKAMP + IL-2	1,12	1,66	2,7
KMM + EKAMP	1,62	1,99	2,5
KMM	1,5	2,24	2,33

Q_1 – prvi kvartil, Me – mediana, Q_3 – tretji kvartil



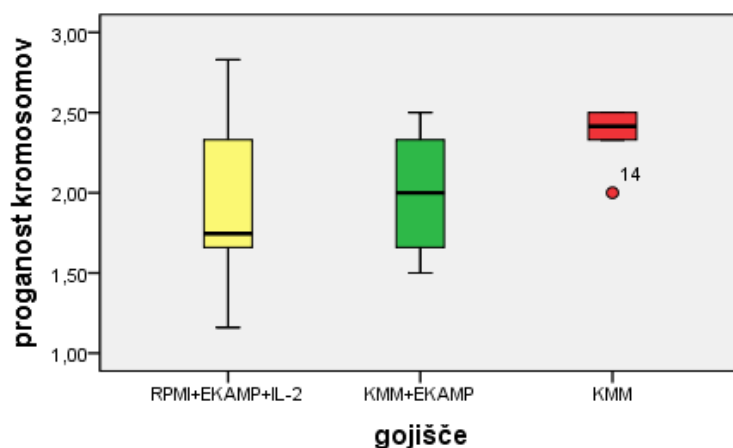
Slika 12: Kvartilni diagram ocene razporeditve kromosomov

Iz kvartilnega diagrama (Slika 13) je razvidno, da sta okvirja z ročicami, ki predstavljata gojišči RPMI + EKAMP + IL-2 in KMM + EKAMP, v isti višini, kar kaže na podobno oceno proganosti kromosomov v teh dveh gojiščih. V gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 je največja razpršenost vrednosti ocene proganosti kromosomov. Vrednost Me je najnižja v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 ($Me_{\text{RPMI} + \text{EKAMP} + \text{IL-2}} = 1,74$), v ostalih dveh pa je precej višja ($Me_{\text{KMM} + \text{EKAMP}} = 2$, $Me_{\text{KMM}} = 2,41$), kar kaže, da je proganost kromosomov najboljša v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 (Tabela X).

Tabela X: Parametri statistične analize ocene proganosti kromosomov

proganost kromosomov	Q ₁	Me	Q ₃
RPMI + EKAMP + IL-2	1,53	1,74	2,45
KMM + EKAMP	1,62	2	2,37
KMM	2,24	2,41	2,5

Q₁ – prvi kvartil, Me – mediana, Q₃ – tretji kvartil



Slika 13: Kvartilni diagram ocene proganosti kromosomov

S Friedmanovim testom smo naredili statistično primerjavo ocene morfologije kromosomov za vsa tri gojišča. Statistična analiza je pokazala, da med gojišči ni statistično značilne razlike v razporeditvi in proganosti kromosomov ($p > 0,05$).

4.3. Primerjava rezultatov citogenetskih preiskav pri KLL pri gojenju celic brez dodatka CpG-ODN in z dodatkom CpG-ODN

Podatki o vzorcih bolnikov s KLL, ki so bili gojeni brez dodatka CpG-ODN, so v Prilogi 1, podatki vzorcev bolnikov, ki so bili gojeni z dodatkom CpG-ODN, pa v Prilogi 2. Skupino vzorcev bolnikov, gojenih **brez CpG-ODN**, smo označili s **skupina 1**, vzorce, gojene s **CpG-ODN**, pa s **skupina 2**. Skupno 110 bolnikov smo zbrali tako, da je bilo v vsaki skupini 55 bolnikov. Skupini oz. vpliv uporabe CpG-ODN pri gojenju celic KLL smo primerjali tako, da smo med skupinama 1 in 2 primerjali delež bolnikov, pri katerih je bila prisotna določena kromosomska sprememba, in rezultate standardne citogenetske analize.

4.3.1 Pojavnost ponavljajočih kromosomskih preureditev, ki jih določamo s FISH preiskavo

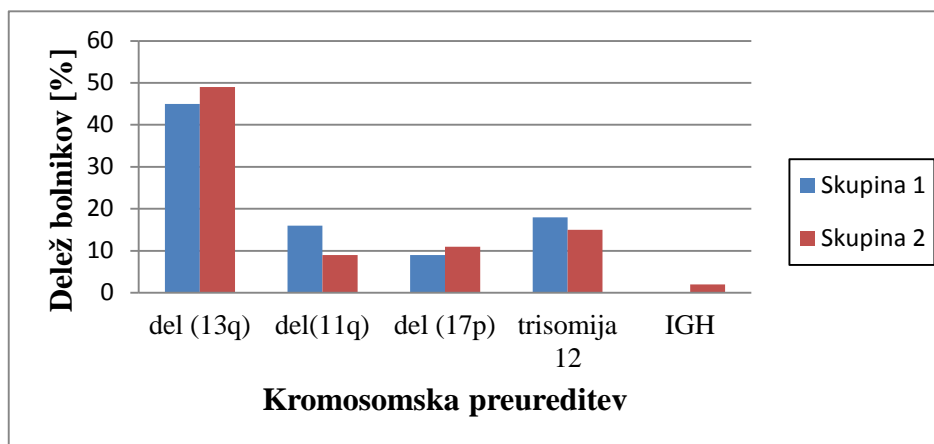
V vsaki skupini smo preverili, pri koliko bolnikih je bila ugotovljena posamezna kromosomska preureditev. To smo naredili za vsako posamezno preureditev in pri vsaki skupini posebej, da smo lahko primerjali delež bolnikov z določeno preureditvijo. V Tabeli XI so zbrani podatki za ponavljajoče kromosomske preureditve, ki jih pri KLL ugotavljamo s FISH preiskavo.

Tabela XI: Delež bolnikov z ugotovljeno kromosomsko preureditvijo v vsaki od skupin

preureditev	delež bolnikov [%]	
	skupina 1	skupina 2
del(13q)	45	49
del(11q)	16	9
del(17p)	9	11
trisomija 12	18	15
IGH	0	2

Slika 14 prikazuje delež bolnikov s posamezno kromosomsko preureditvijo pri obeh skupinah. Med skupinama 1 in 2 obstajajo majhne razlike v deležu odkritih bolnikov s

prisotno posamezno kromosomsko preureditvijo, ki so v okviru pričakovanih nihanj okrog pojavnosti teh preureditev. Te se skladajo tudi z navedbami v literaturi. Dodatek CpG v gojišče torej ne vpliva na pojavnost preureditev, ki jih določamo s FISH preiskavo.



Slika 14: Delež bolnikov s posamezno kromosomsko preureditvijo glede na način gojenja

4.4 Primerjava rezultatov standardne citogenetske preiskave

Zbrali smo 72 bolnikov s KLL, v vsaki skupini 36, kjer je bila opravljena standardna citogenetska preiskava (Priloga 3 in 4). Izračunali smo, kolikšen je bil delež neuspešnih kariotipizacij, pri koliko bolnikih je bil rezultat kariotipizacije normalen kljub pozitivni FISH analizi in pri koliko bolnikih so bile s kariotipizacijo odkrite dodatne kromosomske spremembe, ki jih FISH analiza ni pokazala (Tabela XII).

Tabela XII: Primerjava rezultatov kariotipizacije za skupini 1 in 2

primerjava	DELEŽ BOLNIKOV [%]	
	skupina 1	skupina 2
neuspešna kariotipizacija	22	2,7
normalni rezultat kariotipizacije, FISH analiza pozitivna (del(11q), trisomija 12, IGH preureditev)	19,4	3
odkrite dodatne kromosomske preureditve, ki jih s FISH analizo nismo odkrili	13,8	33,3

V obeh skupinah smo beležili delež bolnikov z neuspešno kariotipizacijo, ki je posledica majhnega števila mitoz oziroma slabe delitve celic KLL. Pri skupini 1 je bila kariotipizacija nespešna v 22 % primerov, pri skupini 2 pa le v 2,7 % primerov. Torej je v skupini, kjer so bile celice KLL gojene z dodatkom CpG-ODN, delež bolnikov z neuspešno kariotipizacijo zelo majhen v primerjavi s skupino, kjer so bile celice KLL gojene brez dodatka CpG-ODN.

Primerjali smo delež bolnikov, pri katerih kariotipizacija ni pokazala kromosomskih sprememb (normalen kariotip) kljub pozitivni FISH analizi. To kaže, da so se v gojišču delile le normalne in ne maligne celice. Pri FISH analizi smo upoštevali samo kromosomske spremembe, ki so na kariotipu dobro vidne: del(11q), trisomijo 12 in IGH preureditve, saj se del(13q) in del(17p) lahko ne opazita. V skupini 1 je bilo takih primerov 19,4 %, v skupini 2 pa samo 3 %. V skupini 1 je bilo bistveno več primerov, kjer je bil rezultat kariotipa normalen kljub pozitivni FISH analizi za posamezno kromosomsko spremembo. Nasprotno pa so pri skupini 2 samo 3 % takih primerov, kar pomeni, da se pri gojenju s CpG-ODN delijo predvsem maligne celice in zato odkrijemo več kromosomskih nepravilnosti.

Opazovali smo tudi delež bolnikov, pri katerih so bile odkrite dodatne kromosomske preureditve, ki jih s FISH analizo nismo našli. Tudi na ta način smo lahko testirali selektivni vpliv CpG-ODN na delitev malignih limfocitov B. Dodatne kromosomske preureditve, ki smo jih odkrili pri kariotipizaciji, so bile tiste, ki jih s FISH analizo nismo iskali. V skupini 1 je bil delež takih bolnikov 13,8 %, v skupini 2 pa 33,3 %. V skupini 2 je v primerjavi s skupino 1 bistveno večji delež bolnikov, pri katerih smo odkrili dodatne kromosomske preureditve. Pri gojenju z dodatkom CpG-ODN torej odkrijemo več dodatnih kromosomskih sprememb, tudi kompleksnih. Dodatek CpG-ODN torej vpliva predvsem na delitev malignih limfocitov B.

4.5 Primer bolnika s KLL: primerjava rezultatov glede na način gojenja

V zdravstveni dokumentaciji specializiranega hematološkega laboratorija smo našli primer bolnika s KLL, ki je bil poslan na citogenetsko diagnostiko leta 2013 (Priloga 1, zap. št 65) in nato še enkrat leta 2014. Zaradi spremembe načina gojenja celic pri KLL, so bile te gojene na dva različna načina: leta 2013 na klasičen način (brez Cp-ODN) in leta 2014 z dodatkom CpG-ODN. Pri gojenju celic brez dodatka CpG-ODN je opravljena kariotipizacija pokazala normalen kariotip (Priloga 1, zap. št 65), leta 2014 pa so bile celice tega bolnika gojene s CpG-ODN in je opravljena kariotipizacija razkrila kompleksno preurejen kariotip :

46,XY,del(6)(q13q23),t(8;14)(q24;q32),del(11)(q22),del(13)(q12q21)[5]/46,idem,der(2)dup(2)(p32p36)[6].

5. RAZPRAVA

Za bolezen KLL je značilna slaba delitev malignih limfocitov B v gojišču, zato težko pridobimo zadostno število celic v metafazi mitoze in posledično težko opravimo kariotipizacijo. CpG-ODN naj bi pospešil delitev malignih limfocitov B in tako omogočil večji delež odkritih kompleksnih kariotipov (15).

Glavni namen magistrske naloge je bila primerjava uspešnosti gojenja vzorcev bolnikov s KLL v dveh različnih rastnih medijih (RPMI 1640, KMM), ki smo jima dodali CpG-ODN (EKAMP) in IL-2. Za statistično analizo, kjer smo primerjali vrednosti MI v treh različnih gojiščih, smo zbrali 24 vzorcev bolnikov s potrjeno diagnozo KLL. Celice bolnikov smo vzporedno kultivirali na treh gojiščih: RPMI + EKAMP + IL-2, KMM + EKAMP in KMM. Uspešnost delitve celic KLL v gojiščih smo ocenili z določitvijo MI in morfologije kromosomov. Vrednosti MI smo najprej analizirali celokupno, ne glede na vrsto vzorca. Uspešnost delitve celic KLL smo nato ločeno ocenjevali glede na vrsto vzorca in glede na čas gojenja celic KLL. Preverili smo tudi, ali celična sinhronizacija vpliva na uspešnost gojenja celic KLL v posameznem gojišču. V drugem delu pa smo skušali oceniti vpliv uporabe CpG-ODN na rezultate FISH analize in standardne citogenetske preiskave ter s tem potrditi selektivni vpliv na deljenje malignih limfocitov B. To smo naredili tako, da smo primerjali rezultate FISH analize in kariotipizacije med skupinama bolnikov, kjer je bila ena skupina vzorcev gojena brez CpG-ODN, druga pa z dodatkom CpG-ODN.

5.1. Mitotski indeks

Povprečna vrednost MI ne glede na vrsto vzorca je najvišja v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2 z vrednostjo 9,4 %. Povprečno vrednost tega gojišča močno poveča pacient z zap. št. 24, kjer je MI 86 %, zato ne moremo primerjati uspešnost gojišča po povprečnih vrednostih. Po primerjavi vrednosti Q_1 , Me in Q_3 se je kot najboljše pokazalo gojišče RPMI + EKAMP + IL-2. Statistična analiza s Friedmanovim testom je pokazala, da upošteva vse podatke – ne glede na vrsto vzorca – med gojišči RPMI + EKAMP, KMM + EKAMP in KMM ni statistično značilne razlike v vrednostih MI ($p > 0,05$). Analiza MI v treh različnih gojiščih ne glede na vrsto vzorca je pokazala, da sta medija RPMI in KMM enako uspešna pri gojenju celic KLL, CpG-ODN pa ni imel nobenega vpliva na izboljšano delitev celic. Torej sta gojitvena medija RPMI 1640 in KMM, ki smo jima dodali CpG-

ODN (EKAMP), po dobljenih vrednostih MI primerljiva oz. enako uspešna, enako pa je uspešen medij KMM brez dodatka CpG-ODN. Če ne upoštevamo vrste vzorca, so pri izbiri gojišča, ki bi zadovoljilo zahtevo po čim višjem MI, vsa tri gojišča (RPMI + EKAMP, KMM + EKAMP, KMM) enakovredna.

Zanimalo nas je tudi, kako dodatek CpG-ODN vpliva na uspešnost gojenja v posameznem gojišču glede na vrsto vzorca. Pri vzorcih KM med gojišči ni statistično značilnih razlik v vrednosti MI ($p > 0,05$), kar kaže na to, da se pri vzorcu KM celice delijo primerljivo v vseh treh gojiščih, dodatek CpG-ODN pa ni vplival na izboljšanje vrednosti MI.

Pri vzorcih PK pa smo med tremi gojišči dokazali statistično značilno razliko v vrednostih MI ($p < 0,05$). Obstaja razlika med gojiščem z dodanim CpG-ODN in običajnim gojiščem brez dodanega CpG-ODN. Parna primerjava gojišč (KMM, RPMI), ki sta vsebovali CpG-ODN, je pokazala, da sta ti po vrednostih MI med seboj primerljivi. To smo dokazali za obe gojišči, ki sta vsebovali CpG-ODN. V obeh primerih se je glede na MI boljše izkazalo gojišče z dodanim CpG-ODN. Iz tega lahko sklepamo, da CpG-ODN res selektivno stimulira delitev malignih limfocitov B. V vzorcih KM je namreč infiltracija s celicami KLL lahko zelo različna, prisotne so tudi druge hematopoetske nezrele celice, ki se v gojišču delijo. Medtem pa je v PK bolnikov s KLL praviloma prisotna izrazita limfocitoza, drugih nezrelih celic, ki bi se delile, pa ni. Razumljivo je torej, da ni značilnih razlik v MI pri KM, ker pa je ta vzorec izrazito prevladoval pri naših poskusih, tudi ne za vse vzorce skupaj. Razlika pa je značilna pri PK, kjer imamo opraviti izključno z malignimi limfociti B.

Preverili smo tudi, ali čas gojenja vpliva na delitev celic KLL v različnih gojiščih. Ugotovili smo, da čas gojenja ni vplival na MI ne glede na uporabljeno gojišče in dodatek CpG-ODN. Enako smo ugotovili tudi za celično sinhronizacijo.

5.2 Morfologija kromosomov

Morfologija kromosomov je zelo pomemben dejavnik pri prepoznavanju kromosomskih preureditev pri KLL, saj dobra morfologija omogoča boljšo identifikacijo kromosomskih preureditev. Še bolj kot izbira rastnega medija na morfologijo kromosomov vpliva način nanosa. Ker je bil ta pri vseh vzorcih kolikor mogoče enak, smo poskusili tudi na ta način

oceniti morebiten vpliv dodatka CpG-ODN v gojišče. Ocenno morfologije kromosomov smo izvajali s pomočjo dveh parametrov: razporeditev in proganost kromosomov.

Če upoštevamo povprečno vrednost in vrednosti Q_1 , Me in Q_3 , je razporeditev in proganost kromosomov najboljša v gojišču RPMI + EKAMP + IL-2. Statistična analiza pa je pokazala, da med gojišči ni statistično značilne razlike v razporeditvi in proganosti kromosomov.

Kljub temu da po nekaterih parametrih najbolj izstopa gojišče RPMI + EKAMP + IL-2, so razlike med gojišči majhne. Pri nobenem parametru ocene morfologije kromosomov (razporeditev, proganost) ni statistično značilne razlike. Vzrok za to je lahko premajhno število vzorcev ($N = 6$), pri katerih je bilo možno izvesti primerjavo med vsemi tremi gojišči. Če bi hoteli dokazati statistično značilne razlike med gojišči, bi potrebovali večje število vzorcev. Tabela VII pokaže, da največkrat nismo mogli ocenjevati morfologije pri gojišču KMM (12x), sledita gojišči KMM + EKAMP (11x) in RPMI + EKAMP + IL-2 (8x). To je posledica dejstva, da smo v zadnjem gojišču največkrat imeli na voljo zadostno število mitoz za oceno morfologije, kar ponovno potrjuje, da je gojišče RPMI + EKAMP + IL-2 najprimernejše za gojenje pri KLL.

5.3 Primerjava skupin vzorcev, gojenih brez in z dodatkom CpG-ODN

Med skupinama vzorcev bolnikov s KLL, ki so bili gojeni brez in z dodatkom CpG-ODN, smo primerjali delež bolnikov s posamezno kromosomsko spremembo in rezultate kariotipizacije ter na ta način skušali ovrednotiti vpliv CpG-ODN na gojenje malignih celic pri KLL.

Med skupinama smo primerjali deleže bolnikov, pri katerih smo odkrili posamezno kromosomsko spremembo s FISH analizo in na ta način testirali, ali dodatek CpG-ODN vpliva na delež bolnikov, pri katerih odkrijemo kromosomsko spremembo, značilno za KLL. Pri vseh preureditvah je delež primerljiv in v okviru pričakovane pojavnosti. Glede na to lahko sklepamo, da dodatek CpG-ODN ne vpliva na pogostost odkritja posamezne kromosomske spremembe.

Pri gojenju limfocitov B pri KLL brez dodatka mitogena pogosto ne dobimo zadostnega števila mitoz za uspešno kariotipizacijo. Zato smo primerjali rezultate standardne

citogenetske preiskave pri obeh skupinah. Primerjava je pokazala, da je pri skupini vzorcev, ki so bili gojeni z dodatkom CpG-ODN, delež neuspešne kariotipizacije veliko manjši (za 19,3 %), kar kaže na to, da se pri uporabi CpG-ODN precej izboljša verjetnost, da bo kariotipizacija uspešna. Po uporabi mitogena neuspešnih kariotipizacij skorajda ni več.

5.4 Standardna citogenetska preiskava pri gojenju s CpG-ODN

Pri bolnikih s KLL, predvsem takrat, ko je izhodiščni vzorec kostni mozeg, pogosto dobimo normalen kariotip, ki je posledica deljenja normalnih hematopoetskih prekurzorjev in ne malignih limfocitov B, ki se slabo delijo. Pri teh bolnikih lahko s FISH analizo ugotovimo kromosomske spremembe (del13q, del11q, del17p, trisomija 12). Med skupinama bolnikov, katerih vzorci so bili gojeni brez in z dodatkom CpG-ODN, smo primerjali deleže bolnikov, pri katerih je bil rezultat kariotipa normalen kljub s FISH analizo ugotovljeni kromosomski spremembi (preureditve, ki jih lahko opazimo: del(11q), trisomija 12 in preureditev gena *IGH*). V skupini bolnikov, katerih vzorci so bili gojeni z dodatkom CpG-ODN, je samo 3 % takih primerov oz. 16,4 % manj kot v skupini bolnikov, katerih vzorci so bili gojeni brez dodatka CpG-ODN, kjer je takih primerov skoraj 20 %. Tako pri gojenju z dodatkom CpG-ODN odkrijemo več kromosomskih sprememb, kar znova potrjuje selektivni vpliv CpG na delitev malignih limfocitov B. Posledično je delež normalnih kariotipov manjši.

Selektivni vpliv CpG-ODN na delitev malignih limfocitov B dodatno potrjujejo primeri bolnikov, pri katerih smo s kariotipizacijo našli dodatne kromosomske preureditve. Prepoznavanje teh sprememb, še zlasti kompleksnega kariotipa, omogoča boljše napovedno opredelitev pri bolnikih KLL. Pri gojenju z dodatkom CpG-ODN smo odkrili 20 % več dodatnih kromosomskih sprememb kot pri gojenju brez dodatka CpG-ODN. Ta pomemben doprinos smo osvetlili tudi s primerom bolnika, pri katerem je gojenje brez dodatka CpG-ODN pokazalo normalen kariotip. Gojenje celic istega bolnika z dodatkom CpG-ODN pa je razkrilo kompleksno preurejen kariotip. Pri gojenju brez dodatka CpG-ODN so se delili samo normalni limfociti B, delitev malignih limfocitov B pa ni bila zadostna, CpG-ODN je vplival na delitev malignih limfocitov B. Primer tega bolnika dokazuje, da gojenje z dodatkom CpG-ODN omogoča boljše napovedno opredelitev pri KLL.

6. SKLEPI

Celokupna analiza vrednosti MI ne glede na vrsto vzorca je pokazala, da sta rastna medija RPMI 1640 in KMM, ki se razlikujeta v sestavi, proizvajalcu in ceni, po vrednostih MI enako uspešna. Dodatek CpG-ODN prav tako ne vpliva na MI.

Za vzorce KM nismo dokazali razlik med gojišči, torej sta tudi v tem primeru rastna medija enakovredna, dodatek CpG-ODN tudi ni povečal delitve celic KLL. Pri vzorcih PK pa smo dokazali statistično razliko v vrednostih MI med gojišči. Medija RPMI 1640 in KMM sta po vrednostih MI med seboj primerljiva. Glede na to, da je cena RPMI 1640 približno 10-krat nižja, je njegova uporaba ekonomsko edino smiselna. Razlika pa je med gojišči z dodanim CpG-ODN in tistimi brez CpG-ODN. Pri tem sta se v obeh primerih kot boljši pokazali gojišči z dodanim CpG-ODN. Dokazali smo, da pri vzorcih PK dodatek CpG-ODN v gojišče poveča MI.

Čas gojenja celic KLL ne vpliva na uspešnost delitve celic KLL v posameznem gojišču, nobenega vpliva pa nima tudi celična sinhronizacija.

Morfologija kromosomov je v vseh treh gojiščih primerljiva. Tudi uporaba CpG-ODN pri gojenju celic KLL ne vpliva na morfologijo kromosomov. Za natančnejšo oceno morfologije kromosomov bi potrebovali večje število vzorcev.

Med gojenjem brez in z dodatkom CpG-ODN ni bistvenih razlik v pojavnosti ponavljajočih kromosomskih sprememb, ki jih ugotavljamo s FISH preiskavo (del(13q), del(11q), del(17p), trisomija 12, preureditev gena *IGH*).

Z uporabo dodatka CpG-ODN pri gojenju celic KLL se je izboljšala uspešnost standardne citogenetske preiskave, saj je delež neuspešnih kariotipizacij veliko manjši pri uporabi CpG-ODN.

CpG-ODN selektivno vpliva na delitev malignih limfocitov B pri bolnikih s KLL. Tako je pri skupini vzorcev, gojenih z dodatkom CpG-ODN, manjši delež primerov, kjer je bil kariotip normalen kljub pozitivni FISH analizi. V tej skupini je kariotipizacija pokazala večji delež dodatnih kromosomskih sprememb.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Gelehrter TD, Collins Francis S: Principles of medical genetics, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1990: 159–167
2. Gersen SL, Keagle MB: The Principles of Clinical Cytogenetics, Second edition, Humana Press, New Jersey, 2005: 3–6, 20, 32, 64–67, 75
3. Podgornik H, Pajič T, Kokalj V. N, Zagorac A, Rupreth R, Černelč P: Citogenetične in molekularnogenetične preiskave pri ugotavljanju kronične mieloične levkemije in spremljanju zdravljenja, Zdrav Vestn 2004; 73: 13–17
4. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL: The AGT cytogenetics laboratory manual. 3. izd. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 25–48, 269–273, 351–354
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Karyotype>, Dostop: 8. 8. 2013
6. Swansbury J: Cytogenetic Studies in Hematologic Malignancies, Methods in Molecular Biology, vol. 220, Cancer Cytogenetics; Methods and Protocols, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey
7. Wegner RD: Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999: 4–5, 305–310
8. <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/invitrogen/12260014.pdf>, Dostop: 10.8. 2013
9. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11875093?ICID=search-11875093>, Dostop: 17. 8. 2013
10. Vozelj M, Temelji imunologije, DZS, 2000: 249–250
11. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/interleukin-2>, Dostop: 4.9.2013
12. <http://www.ebioscience.com/human-il-2-recombinant-protein.htm>, Dostop: 4. 9. 2013
13. Decker T, Peschel C: Effect of Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells, Leukemia & Lymphoma, 2001; 42(3): 301–307
14. Reddy KS: Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel, British Journal of Haematology 2005; 132: 705–722
15. Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell ML, Koduru PRK, Aviram A, Smoley SA, Rassenti LZ, Greaves AW, Brown JR, Rai KR, Kipps TJ, Kay NE, Van Dyke DL: Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide

- gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010; 203: 134–140
16. Wu Y, Xue Y, Chen S, Yao L, Jiang H, Zhang J, Shen J, Pan J, Wang Y, Bai S: Chromosome study on chronic lymphocytic leukemia using CpG-oligodeoxynucleotide as immunostimulant agent, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2010; 27(1): 86–91
 17. http://en.wikipedia.org/wiki/CpG_Oligodeoxynucleotide, Dostop: 22.1.2014
 18. Krieg AM. et.al: CPG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374 (6522): 546–9
 19. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W: Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80 % of CLL patients: a study of 132 CLL casec with correlation to FISH, IgVH status and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152–3160
 20. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C: Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype, *Experimental Hematology*, 2000; 28(5): 558–68
 21. Struski S, Gervais C, Helias C, Herbrecht R, Audhuy B, Mauvieux L: Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities, *Leukemia*, 2009; 23: 617–619
 22. Thorsten Z, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer: Molecular diagnostics in chronic Lymphocytic leukemia – Pathogenetic and clinical implications, *Leukemia & Lymphoma*, 2008; 49: 864–873
 23. Liang H, Nishioka Y, Reich C.F, Pisetsky D.S, Lipsky P. E: Activation of Human B Cells by Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides, *The American Society for Clinical Investigation Inc.*, 1996; 98: 119–1129
 24. <http://www.amplitech.net/euro-en.html>, Dostop: 10. 8. 2013
 25. http://en.wikipedia.org/wiki/Mitotic_index, Dostop: 5. 7. 2013
 26. Batista U: Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih, Študentska založba, Ljubljana, 2005, 18–22
 27. Rautenstrauss BW, Liehr T: FISH technology, *Springer Lab Manual*, Heidelberg, 2001: 3–18

28. Zver S: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. Zdrav Vestn 2010; 79; 6: 465–474
29. Podgornik H, Gržinič N, Černelč P: Kronična limfatična levkemija, Farm Vestn 2013; 64; 341–412
30. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T, Podgornik H: Bolezni krvi in krvotvornih organov: 14–15, 69–74, 81–82
31. Chen J, McMillan NA: Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia, Cancer Biology & Therapy, 2008; 7(2): 174–9
32. <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>, Dostop: 4. 1. 2014
33. <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-ccnd1-xt-dual-color-dual-fusion-translocation-probe.html>, Dostop: 12. 8. 2013
34. http://www.abbottmolecular.com/us/products/general-purpose-reagents/Hybridization-Reagents.html#DAPI_II_Counterstain, Dostop: 4. 9. 2013
35. Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana 1995; 35–36, 89–91
36. Sanford B: Pharmaceutical Statistics, Marcel Dekker, New York, 1997: 549–552, 560
37. <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/friedman-test-using-spss-statistics.php>, Dostop: 5. 4. 2014

8. PRILOGE

Priloga 1: Zbrani podatki bolnikov s KLL, katerih vzorci so bili gojeni brez dodatka CpG-ODN

Gojenje celic KLL brez EKAMPA			Rezultat FISH analize – delež pozitivnih malignih celic [%]				
zaporedna številka	priimek in ime pacienta	rezultat KARIOTIP	del(13)	del(11q)	del(17p)	trisomija 12	IGH
1	GA	N		28		8	
2	RR	46,XY,t(5;7)(q34;q22)[3]/46,XY[13]		67			
3	JM	ND				48	
4	TI	N	61				
5	RB	N	53				
6	SL	46,XX,t(9;17)(p22;q21)[1]/46,XX[19]	96		93		
7	BO	N					
8	KJ	ND		78			
9	VJ	45,X,-X,i(17)(q10)[4]/46,XX[5]	20		59		
10	RR	N	50				
11	MS	N	68				
12	ŠI	ND	12,7			43	
13	JM	N					
14	KG	ND	47				
15	BSM	ND		95			
16	ŠS	46,XX,t(3;14)(p13;q32)[6]/46,XX[14]	68	6	25		
17	BA	46,XY[17]					
18	GZ	N	43				
19	BF	ND	78			8	
20	RV	N					
21	TB	N				58	
23	GA	ND		4			

24	KL	46,XY,del(20) (q11.2)[9]/46,XY[11]				37	
25	JF	neuspešna – ni materiala	79				
26	JA	neuspešna – ni mitoz	94				
27	KH	ND	80				
28	ČL	ND	75				
29	ZI	N	13				
30	MS	46,XY[11]	55	54	70		
31	MJ	ND	49				
32	TS	neuspešna – ni mitoz					
33	ŠJ	ND	29				
34	ŠB	neuspešna – ni mitoz				67	
35	GA	N	79	80			
36	BT	neuspešna – ni mitoz					
38	ŽM	46,XY[11]	65				
39	ZM	neuspešna – ni mitoz				13	
40	PI	ND				15	
41	EZ	neuspešna – ni mitoz	53				
42	SJ	N					
43	KI	N				24	
44	SJ	ND	ni celic	ni celic	ni celic	ni celic	ni celic
45	BA	N					
46	LŠ	ND					
47	TR	N					
48	SI	N	90	41			
49	LV	N					
50	KS	ND	90				
51	VS	N					
52	JP	neuspešna			89		
53	HJ	ND	33				
54	PM	ND					
55	ŠM	N					

KMM, KMB – vrsti gojišč; **N** – normalni kariotip, **ND** – ni delano

Priloga 2: Zbrani podatki bolnikov s KLL, katerih vzorci so bili gojeni z dodatkom CpG-ODN

Gojenje celic KLL z EKAMPOM			Rezultat FISH analize – delež pozitivnih malignih celic [%]				
zaporedna številka	priimek in ime pacienta	rezultat KARIOTIPA	del(13)	del(11q)	del(17p)	trisomija 12	IGH
1	OM	N	39				
2	GJ	N	9				
3	DJ	N	28				
4	JM	47,XX,+12[19]46, XX[1]				46	
5	NI	ND	93		21		
6	BSM	46,XY,del(11)(q22) [13]/46,XY[3]		95			
7	PS	ND			27		
8	JM	ND					
9	BS	46,XY,add(22)(p11.2) [12]/46,XY[8]	68				
10	KL	46,XX,del(13)(q14q22) [2]/46,XX[18]	43				
11	BJ	47,XX,t(2;18) (p11,q21),+12[6]/47,idem,t(8;14)(q24;q11)[4]/47,idem,del(13)(q14)[2]/47 idem,-4,add(8)(q24), +mar[1]/46,XX[2]	6			75	
12	KM	ND					
13	BI	N					
14	VM	ND					
15	ČS	N	11				
16	DBE	46,XX,del(13)(q12q14)C[12]/46,XX[9]	74				
17	NL	ND	71	66			
18	GV	N					
19	BM	N					
20	RL	N	47				

21	HV	46,XY,del(13)(q12q14) [9]/46-47,XY,- 3,t(4;11)(q25;p15), add(4)(p16),+1~2mar [cp3]/ 46,XY[8]	37				
22	BJ	47,XY,+i(2)(p10)[4] /46,XY[16]	9				
23	UF	ND	91				
24	MB	ND				56	
25	SJ	ND	30	72			
26	BA	46,XX,del(13)(q12q22) [2] /46,XX[18]	94				
27	SŠ	46,XY,t(13;14) (q14;q24)del(13) (q12q14)[5]/46, XY[16]	76				
28	TV	ND					
29	RM	47,XX,+12[1]/46, XX[20]				61	
30	DZ	47,XX,+12[15]/47, idem, t(11;20)(p10;q10)[5]				76	
31	HT	ND	29		49		
32	KŽ	N					
33	ŠS	45,X,-Y[19]	10				13
34	KJ	N					
35	SS	ND	38				
36	OM	ND					
37	MA	ND	61				
38	JT	N		15			
39	ČN	ND			14		
40	SA	N					
41	CR	ni mitoz					
42	RI	ND			42		
43	KJ	47,XY,t(3;12) (q21;q24),+12[2] /46,XY[18]				71	
44	GF	ND		16			
45	KF	ND	78				
46	TS	46,XX,del(13) (q12q22)[2]/ 46,XX[18]	91				
47	LA	ND					
48	SL	ND	9		81	81	

49	PA	ND	2				
50	SM	ND		10			
51	GV	ND	97				
52	DM	45,X,- Y[8] /48,XY,+12,+18 [9]/46,XY[12]				10	
53	MB	46,XY, del(13)(q12q22)[20]	91				
54	GS	N					
55	ŠM	46,XX,t(10;10) (q24;q34)[3]/47, idem,+mar[2]/46,XX [15]					

EKAMP – CpG-ODN DSP30; **N** – normalni kariotip (46, XX/XY), **ND** – ni delano

Priloga 3: Skupina 1: Bolniki z opravljeno kariotipizacijo; vzorci, gojeni brez dodatka CpG-ODN

OPRAVLJENA KARIOTIPIZACIJA							
Gojenje celic KLL brez EKAMPA			Rezultat FISH – delež pozitivnih malignih celic [%]				
zaporedna številka	priimek in ime pacienta	rezultat KARIOTIP	del(13q)	del(11q)	del(17p)	trisomija 12	IGH
1	GA	N		28		8	
2	RR	46,XY,t(5;7)(q34;q22)[3]/46,XY [13]		67			
3	TI	N	61				
4	RB	N	53				
5	SL	46,XX,t(9;17)(p22;q21)[1]/46,XX[19]	96		93		
6	BO	N					
7	VJ	45,X,-X,i(17)(q10)[4]/46,XX[5]	20		59		
8	RR	N	50				
9	MS	N	68				
10	JM	N					
11	ŠS	46,XX,t(3;14)(p13;q32)[6]/46,XX[14]	68	6	25		
12	BA	N					
13	GZ	N	43				
14	RV	N					
15	TB	N				58	
16	KL	46,XY,del(20)(q11.2)[9]/46,XY[11]				37	
17	JF	neuspešna – ni materiala	79				
18	JA	neuspešna – ni mitoz	94				
19	ZI	N	13				
20	MS	N	55	54	70		
21	TS	neuspešna – ni mitoz					
22	ŠB	neuspešna – ni mitoz				67	
23	GA	N	79	80			

24	BT	neuspešna – ni mitoz					
25	ŽM	N	65				
26	ZM	neuspešna – ni mitoz				13	
27	EZ	neuspešna – ni mitoz	53				
28	SJ	N					
29	KI	N				24	
30	BA	N				83	
31	TR	N					
32	SI	N	90	41			
33	LV	N					
34	VS	N					
35	JP	neuspešna – ni mitoz				89	
36	ŠM	N					

EKAMP – CpG-ODN DSP30; **N** – normalni kariotip (46, XX, XY)

Priloga 4: Skupina 2: Bolniki z opravljeno kariotipizacijo; vzorci, gojeni z dodatkom CpG-ODN

Gojenje celic KLL z EKAMPOM			Rezultat FISH – delež pozitivnih malignih celic [%]				
zaporedna številka	priimek in ime pacienta	rezultat KARIOTIP	del(13q)	del(11q)	del(17p)	trisomija 12	IGH
1	OM	N	39				
2	GJ	N	9				
3	DJ	N	28				
4	JM	47,XX,+12[19]/46, XX[1]				46	
5	BSM	46,XY,del(11)(q22) [13]/46,XY[3]		95			
6	BS	46,XY,add(22)(p11.2) [12]/46,XY[8]	68				
7	KL	46,XX,del(13)(q14q22) [2]/46,XX[18]	43				
8	BJ	47,XX,t(2;18)(p11,q21),+12[6]/47,idem,t(8;14)(q24;q11)[4]/47,idem,del(13)(q14)[2]/47 idem,-4,add(8)(q24),+mar[1]/46,XX[2]	6			75	
9	BI	N					
10	ČS	N	11				
11	DBE	46,XX,del(13)(q12q14)[12]/46,XX[9]	74				
12	GV	N					
13	BM	N					
14	RL	N	47				
15	HV	46,XY,del(13)(q12q14)[9]/46~47,XY,-3,t(4;11)(q25;p15),add(4)(p16),+1~2mar[cp3]/46,XY[8]	37				
16	BJ	47,XY,+i(2)(p10)[4]/46,XY[16]	9				
17	BA	46,XX,del(13)(q12q22)[2]/46,XX[18]	94				

18	SŠ	46,XY,t(13;14) (q14;q24)del(13) (q12q14)[5]/46, XY[16]	76				
19	RM	47,XX,+12[1]/46, XX[20]				61	
20	DZ	47,XX,+12[15]/47, idem, t(11;20)(p10;q10)[5]				76	
21	KŽ	N					
22	ŠS	45,X,-Y[19]	10				13
23	KJ	N					
24	JT	N		15			
25	SA	N					
26	CR	neuspešno – ni mitoz					
27	KJ	47,XY,t(3;12) (q21;q24),+12[2] /46,XY[18]				71	
28	TS	46,XX,del(13)(q12q22)[2]/ 46,XX[18]	91				
29	DM	45,X,-Y[8] /48,XY,+12,+18 [9]/46,XY[12]				10	
30	MB	46,XY, del(13)(q12q22)[20]	91				
31	GS	N					
32	ŠM	46,XX,t(10;10) (q24;q34)[3]/47, idem,+mar[2]/46,XX [15]					
33	TA	45,XY,del(11)(q21), dup(11)(q21q23),der (18;20)(q10;q10),der (22)add(22)(p13) ins(11;?) (q21q23;?)[5]	95	63 amp			
34	RF	N					
35	KJ	47,XY,+12[14]/47- 48,idem,1,t(2;9)(q33;q22), t(2;10)(q21;q26),- 4,del(6)(q14),add(7) (q36),+10,der(12) add(12)(p13)+1- 3mar[cp3]/46,XY[4]				87	
36	DS	N	68				

EKAMP – CpG-ODN DSP30; **N** – normalni kariotip (46, XX, XY)