

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA ISLAMOVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

**MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA ISLAMOVIĆ

PRIMERJAVA REZULTATOV AKTIVNOSTI IN KONCENTRACIJE
SERUMSKE TIMIDIN-KINAZE PRI IZBRANIH HEMATOLOŠKIH
RAKAVIH OBOLENJIH

COMPARISON OF RESULTS OF ACTIVITY AND CONCENTRATION OF
SERUM THYMIDINE KINASE FOR THE SELECTED HEMATOLOGICAL
CANCERS

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Zahvala:

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, spec. med. biokem., za vso pomoč, vodenje, dostopnost in hitro odzivnost na vse moje težave, s katerimi sem se srečevala tekom dela.

Zahvaljujem se tudi svojim domačim za izjemno podporo in pomoč ob časovnih stiskah.

Zahvala gre tudi mojemu fantu za vso potrpežljivost in podporo v težkih trenutkih tekom študija.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Sabina Islamović

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 HEMATOLOŠKE MALIGNE BOLEZNI	2
1.1.1 <i>NORMALNA HEMATOPOEZA</i>	2
1.1.2 <i>LEVKEMIJA</i>	4
1.1.3 <i>LIMFOM</i>	5
1.1.3.1 <i>HODKINOV LIMFOM</i>	5
1.1.3.2 <i>NE-HODKINOVI LIMFOMI</i>	6
1.2 DIAGNOSTIKA HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNI	6
1.2.1 <i>RAZMAZ PERIFERNE KRVI</i>	7
1.2.2. <i>PREGLED KOSTNEGA MOZGA</i>	7
1.2.3 <i>IMUNOHISTOKEMIJA</i>	7
1.2.4 <i>PRETOČNA CITOMETRIJA</i>	8
1.2.5 <i>CITOGENETIKA</i>	8
1.2.6 <i>MOLEKULARNA GENETIKA</i>	9
1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	9
1.3.1 <i>ENCIMI KOT TUMORSKI OZNAČEVALCI</i>	10
1.4 TIMIDIN KINAZA 1	10
1.4.1 <i>TIMIDIN KINAZA 1 IN MALIGNE BOLEZNI</i>	13
1.4.1.1 TIMIDIN KINAZA 1 PRI HEMATOLOŠKIH RAKIH	14
1.4.2 <i>METODE DOLOČANJA TIMIDIN KINAZE V SERUMU</i>	15
2. NAMEN DELA.....	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 VZORCI.....	18
3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE TIMIDIN KINAZE 1 Z METODO ELISA	18
3.2.1 <i>IZVEDBA TESTA</i>	19
3.2.2 <i>PRIPRAVA REAGENTOV TK210/HEM ELISA KITA</i>	20

3.2.3 POSTOPEK.....	20
3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI TIMIDIN KINAZE 1 Z METODO CLIA NA ANALIZATORJU LIAISON®	21
3.3.1 IZVEDBA TESTA	23
3.3.1.1 PRIPRAVA INTEGRALNEGA REAGENTA.....	23
3.3.1.2 KALIBRATORJI IN KONTROLE.....	23
3.3.1.3 VSTAVLJANJE VZORCEV V ANALIZATOR	23
3.3.1.4 POSTOPEK REAKCIJE V ANALIZATORJU	24
4. REZULTATI	25
4.1 VZORCI.....	25
4.2 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE TK1 S TESTOM ELISA	26
4.2.1 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNIH.....	27
4.2.2 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI LEVKEMIJAH.....	28
4.2.3 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI LIMFOMIH.....	29
4.3 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE TK1 Z METODO CLIA	30
4.3.1 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNIH.....	31
4.3.2 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI LEVKEMIJAH	32
4.3.3 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI LIMFOMIH.....	33
5. RAZPRAVA	35
6. SKLEP	39
7. VIRI	40
8. PRILOGE	47

POVZETEK

Timidin kinaza je tumorski označevalec, ki ima diagnostično uporabnost pri različnih hematoloških malignih boleznih. Timidin kinaza spada v družino encimov deoksiribonukleozid kinaze in katalizira reakcijo prenosa fosfatne skupine iz nukleozid trifosfata (ponavadi ATP) na 5'-hidroksilno skupino timidina ob prisotnosti magnezijevih ionov. Ker je količina encima odvisna od celične delitve, bi bil lahko uporaben kot tumorski označevalec pri nekaterih malignih boleznih.

V naši nalogi smo primerjali diagnostično uporabnost dveh metod za merjenje timidin kinaze pri preiskovancih s potrjeno hematološko maligno boleznijo: metodo ELISA, ki meri njegovo koncentracijo, in avtomatizirano metodo CLIA, ki meri aktivnost tega encima. Vključili smo 51 bolnikov s potrjeno hematološko boleznijo in 114 zdravih naključno izbranih ljudi (kontrolna skupina).

Pri ELISA testu smo dobili 76 % občutljivost in 77 % specifičnost (pri "cut off" vrednosti 1,005 ng/mL), pri metodi CLIA pa 92 % občutljivost in 84 % specifičnost (pri "cut off" vrednosti 5,5 U/L).

ABSTRACT

Thymidine kinase is a tumor marker which has diagnostic value in a variety of hematologic malignancies. Thymidine kinase belongs to the family of enzymes deoxyribonucleoside kinases, and catalyzes the reaction of the transfer of a phosphate group from a nucleoside triphosphate (usually ATP) to the 5'-hydroxyl group of thymidine in the presence of magnesium ions. Because the amount of the enzyme depends on cell division, it could be useful as a tumor marker in some malignant diseases.

In our study we compared the diagnostic value of two methods for the measurement of thymidine kinase in subjects with confirmed haematological malignancies: ELISA method, which measures its concentration, and automated CLIA method, which measures the activity of this enzyme. We included 51 patients with a confirmed hematologic disease and 114 healthy, randomly selected people (control group).

ELISA test showed a 76 % sensitivity and 77 % specificity (at a "cut off" value of 1.005 ng / mL), CLIA method showed a 92 % sensitivity and 84 % specificity (at a "cut off" value of 5.5 U / L).

KLJUČNE BESEDE

Tumorski označevalci

Timidin kinaza 1

Hematološke maligne bolezni

Koncentracija timidin kinaze 1

Aktivnost timidin kinaze 1

ELISA

Kemiluminiscenca

Specifičnost metode

Občutljivost metode

SEZNAM OKRAJŠAV

DNK – deoksiribonukleinska kislina

SZO – Svetovna zdravstvena organizacija

HL – Hodkinov limfom

NHL – ne-Hodkinov limfom

KLL – kronična limfatična levkemija

KML – kronična mieloidna levkemija

ALL – akutna limfatična levkemija

AML – akutna mieloidna levkemija

FISH – fluorescenčna hibridizacija *in situ*

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PSA – prostatični specifični antigen

TK – timidin kinaza

ATP – adenozin trifosfat

mRNA – obveščevalna ribonukleinska kislina

RIA – radioimunski test

AZT – azidotimidin

AZTMP – azidotimidin monofosfat

ELISA – encimskoimunski test

CLIA – kemiluminiscenčno imunski test

1. UVOD

Rak je genska bolezen, ki nastane zaradi poškodbe DNA molekule, zaradi česar pride do nekontrolirane delitve in razraščanja maligno spremenjenih celic. Te celice izgubijo svojo prvotno fiziološko funkcijo in postanejo patološke. Človeško telo ima določene mehanizme, s katerimi natančno uravnava delitev in rast celic. Če ti mehanizmi odpovejo (zaradi poškodbe DNA), pride do nenadzorovane delitve malignih celic. Spremembe v sekvenci DNA (mutacije) se lahko zgodijo med podvajanjem DNA pri celični delitvi, kot posledica delovanja karcinogenih dejavnikov ali pa zaradi slabih in neučinkovitih popravljalnih sistemov (1). Da se razvije bolezen, je potreben določen čas, posledice pa so lahko nepopravljive (2). Rak vedno nastane iz ene same celice, pri kateri se mora zgoditi približno 5 do 10 mutacij, da se ta celica spremeni v maligno (1).

Pri nastanku bolezni sta pomembni dve veliki skupini genov: protoonkogeni oziroma onkogeni in tumor zaviralni geni (antionkogeni). Protoonkogeni, ki se zaradi mutacij spremenijo v onkogene, nosijo zapis za celično delitev in razraščanje rakastih celic, antionkogeni pa preko mehanizma apoptoze preprečujejo nekontrolirano proliferacijo (1, 3). Maligno spremenjena celica izgubi kontaktno inhibicijo, zato se razrašča v več plasteh, je bolj gibljiva kot nemaligna in ima spremenjeno izražanje antigenov na svoji površini (te antigene pogosto izkoriščamo pri diagnostiki). Maligna novotvorba je v večini primerov sestavljena iz nediferenciranih in nezrelih celic, take celice pa imajo večjo težnjo po delitvi in hitrem razraščanju (3).

Po podatkih projekta Globocan je leta 2012 rak zahteval 8,2 milijona žrtev po vsem svetu, kar ga uvršča med enega vodilnih vzrokov smrti (4). V Sloveniji je za rakiom leta 2010 zbolelo skoraj 13.000 ljudi, umrlo skoraj 6.000 ljudi, vseh bolnikov pa je bilo dobrih 81.000. Večina ljudi zboli po 65. letu starosti in ker se slovenska populacija stara, pričakujemo, da se bo pojavnost te bolezni še povečevala (5). Razlog za povečevanje incidence pa lahko najdemo tudi v uporabi vedno boljših in občutljivejših diagnostičnih postopkov.

Slovenija je leta 1950 ustanovila obvezen register raka, ki zbira, shranjuje, analizira in poroča podatke o pojavnosti raka v Sloveniji (2).

1.1 HEMATOLOŠKE MALIGNE BOLEZNI

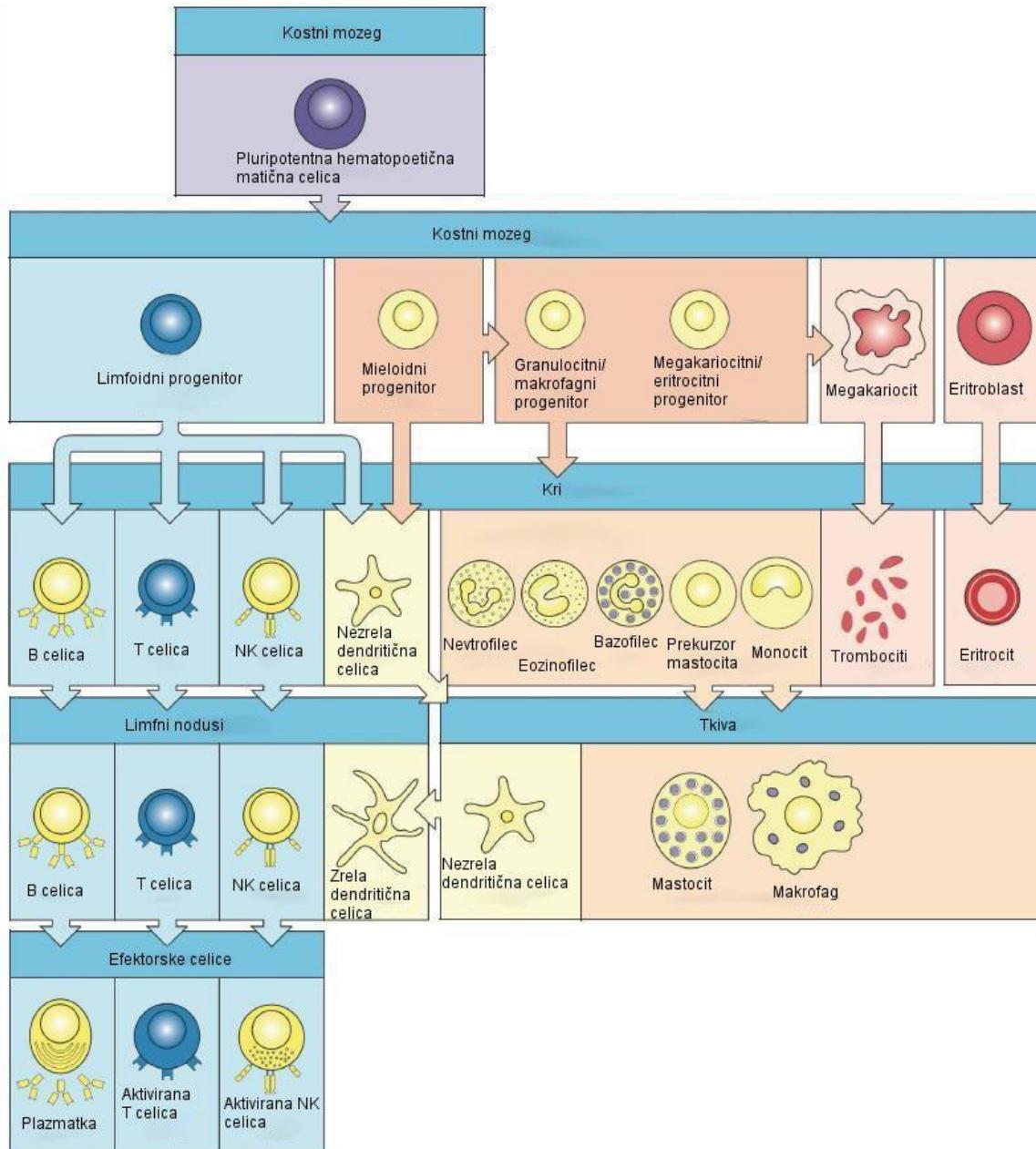
Hematološke maligne bolezni so skupina bolezni, ki prizadenejo celice krvotvornih organov ali celice imunskega sistema. Pred uveljavitvijo novejših diagnostičnih metod je sistem klasifikacije teh bolezni temeljal le na morfoloških značilnostih celic. Ta sistem pa je kmalu zastaral, zato danes uporabljam klasifikacijo, ki jo je leta 2001 oblikovala Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) in jo leta 2008 še preoblikovala. Ta klasifikacija vključuje tudi klinične značilnosti bolezni, imunofenotip, citogenetske in genske značilnosti (6). V grobem ločimo mieloidne novotvorbe, limfoidne novotvorbe (levkemije, limfomi), limfoproliferativne motnje in novotvorbe histiocitov in mastocitov (6, 7).

V Sloveniji so bile med leti 2005 in 2009 med moškimi v starostni skupini do 19 let med vsemi raki na prvem mestu levkemije (24 %) in na petem mestu ne-Hodkinovi limfomi (9,9 %). V starostni skupini med 20 in 34 let pa so bili Hodkinovi limfomi med vsemi raki na petem mestu (6,1 %), tem pa so sledile levkemije (4 %). V istem obdobju se je tudi pri ženskah v starostni skupini do 19 let najpogosteje pojavljala levkemija (30,1 %), na petem mestu so bili Hodkinovi limfomi (7,2 %), tem pa so sledili ne-Hodkinovi limfomi (4,6 %). V starostni skupini med 20 in 34 let so se Hodkinovi limfomi pojavili na šestem mestu (4,9 %) (8).

1.1.1 NORMALNA HEMATOPOEZA

Prva stopnja pri nastajanju krvnih celic v kostnem mozgu je pluripotentna matična celica. Njena glavna lastnost je sposobnost samoobnavljanja in s tem ohranjanja svojih lastnosti. Ta celica dozoreva v multipotentne matične celice, ki so lahko usmerjene v mieloično vrsto ali limfatično vrsto. Obe vrsti matičnih celic imata še vedno sposobnost samoobnove. Multipotentne mieloične matične celice dozorevajo v matične celice, ki so usmerjene v rdečo

vrsto, nevtrofilno-monocitno vrsto, eozinofilno in bazofilno vrsto. Iz teh se razvijejo zrele celice. Iz multipotentne limfatične matične celice se razvijejo limfociti B, T in plazmatke (9).



Slika 1: Razvoj celic iz pluripotentne hematopoetične matične celice (prirejeno po 10)

1.1.2 LEVKEMIJA

Levkemija je maligna bolezen, pri kateri pride do spremembe na ravni matične celice hematopoeze (7). Glede na vrsto teh celic, ki so prizadete, jih delimo na limfatične levkemije, pri katerih so prizadete celice, ki tvorijo limfocite, in mieloične levkemije, kjer so prizadete celice, ki tvorijo eritrocite, določene vrste levkocitov in trombocite (11).

Glede na potek bolezni pa jih delimo na akutne in kronične levkemije. Pri akutnih se zaradi zavrtega dozorevanja nezrele neoplastične celice (blasti) kopijo v kostnem mozgu. Število levkemičnih celic naglo narašča, kar matičnim celicam normalne hematopoeze onemogoča nadaljnji razvoj (7).

Pri akutnih levkemijah gre za pridobljene somatske mutacije, ki privedejo do nenadzorovane rasti multipotentne matične celice. Ponavadi so prizadeti geni, ki so odgovorni za delitev in dozorevanje hematopoetičnih matičnih celic. Vse levkemične celice izvirajo iz ene same maligno spremenjene celice, ki so sposobne delitve, ne pa dozorevanja (9). Akutne levkemije potekajo naglo z znaki anemije, infekcijami in krvavitvami (znaki zavrte normalne hematopoeze) (7).

Pri kroničnih levkemijah imajo prizadete celice v začetni fazi še sposobnost dozorevanja in imajo tudi ohranjen določen del funkcije normalnih celic, vendar se ne odzivajo na fiziološke mehanizme, ki uravnavajo rast normalnih matičnih celic. V začetni fazi simptomov ni, a s časom se kronična levkemija slabša, kar privede do zatekanja limfnih nodusov in raznih infekcij (7, 12).

Glede na te delitve obstajajo širje glavni tipi levkemij: kronična limfatična levkemija (KLL), kronična mieloidna levkemija (KML), akutna limfatična levkemija (ALL) in akutna mieloidna levkemija (AML).

1.1.3 LIMFOM

Limfomi so heterogena skupina bolezni, ki izvirajo iz limfatičnega tkiva (13). Za razraščanje teh celic je dovolj, da se ena sama celica B ali T maligno preobrazi (9). Večina limfomov je B-celičnih. Limfome v grobem delimo na Hodkinove (HL) in ne-Hodkinove limfome (NHL). Hodkinovi so B-celični, za njih so značilne Reed-Sternbergove celice, ne-Hodkinovi pa so B ali T-celični (13). Incidenca NHL se v Sloveniji v zadnjih letih nekoliko povečuje, pogostost pa narašča s starostjo. HL pa se najpogosteje pojavljajo v starostni skupini med 15. in 34. letom (14).

Določeno vlogo pri razvoju limfoma imajo dedni dejavniki, zdravljenje z imunosupresivi, okužba z nekaterimi virusi. Vsi ti dejavniki povzročajo resno imunsko oslabelost organizma, kar pa je lahko vzrok nastanka bolezni (13).

1.1.3.1 HODKINOV LIMFOM

Hodkinov limfom, ali kot ga drugače imenujemo Hodkinova bolezen, se začne v limfatičnem sistemu, ponavadi v limfnih nodusih. Ker se limfociti nekontrolirano delijo, limfni nodusi otečejo (15). Bolezen ima progresiven potek (9).

Bolezen delimo na klasični HL in HL s prevladovanjem limfocitov v nodusu bezgavke (HLPLN) (9), pri čemer je klasični tip pogostejši. Za določanje stadija se poslužujemo Ann Arbor klasifikacije, ki HL deli v štiri stadije, pri čemer je stadij I zgodnji, stadij IV pa napredovani. V vsakem stadiju ločimo še podkategorije, ki jih označujemo s črkami A, B in E, glede na simptome, ki jih bolnik ima ob postavitvi diagnoze (16).

Za HL so značilne Hodkinove (enojedrne) in Reed-Sternbergove celice (večjedrne). Te celice izražajo receptor CD30, ki spada v družino TNF receptorjev. S pomočjo označenih protiteles proti CD30 lahko te celice prikažemo (17). Vse maligne celice Hodkinovega limfoma izvirajo iz germinalnih centrov B celic (9).

1.1.3.2 NE-HODKINOVI LIMFOMI

V to skupino spada veliko število vrst hematoloških rakov, katerih skupna značilnost je poškodba DNA v limfocitni progenitorni celici. Te spremembe DNA so v večini primerov pridobljene (18). Po SZO obstaja približno 30 različnih podtipov te bolezni. Večinoma zbolevajo starejši odrasli med 60. in 70. letom starosti (19). Incidenca je med letoma 1970 in 1995 močno porasla, vzrok deloma pripisujejo okužbam z virusom HIV in z njim povezanim razvojem NHL (20).

Prizadete so lahko celice B, T ali naravne celice ubijalke (NK). Večina je B celičnih NHL. Glede na histološke značilnosti delimo te bolezni na NHL nizke, srednje in visoke stopnje (klasifikacija po Kielu) (20). NHL visoke stopnje (agresivni NHL) napreduje in se širi zelo hitro. Bolniku se ponavadi pojavi otekline na različnih delih telesa, ki se lahko v kratkem času močno povečajo. Ponavadi je bolezen, še preden je postavljena diagnoza, že zelo razširjena (21). NHL nizke stopnje napreduje počasi in bolnik dolgo časa nima simptomov (22). V začetni fazi bolezni zdravljenje velikokrat niti ni potrebno, bolnika se le pozorno spremlja in opazuje. Kljub temu, da so to bolezni nizke stopnje, so to hude bolezni, ki so v večini primerov neozdravljive. Čez čas veliko NHL nizke stopnje napreduje do agresivnega NHL (21). Podobno kot pri HL, tudi pri NHL ločimo štiri stadije glede na razširjenost bolezni, glede na simptome, ki jih pacient ima, pa stadiju pripišemo še podkategorijo A ali B (22).

1.2 DIAGNOSTIKA HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNI

Diagnostika hematoloških rakov je zelo kompleksen in drag proces, ki zahteva veliko znanja o posameznih boleznih. Ker je na tržišču na voljo veliko testov, je za optimalno izbiro le-teh potrebno tudi dobro poznavanje principov in vloge, ki jo imajo taki testi pri hematoloških rakah. Ključne pri postavljanju diagnoze so preiskave celične morfologije, celičnega fenotipa, citogenetika in molekularna genetika (23). Kljub temu, da s pomočjo morfologije dobimo pomembne informacije, je za natančno klasifikacijo v večini primerov potrebno imunofenotipiziranje s pretočno citometrijo ali imunohistokemijo (6).

1.2.1 RAZMAZ PERIFERNE KRVI

Prvi klinični znak, ki se pojavi pri hematoloških rakah, je ponavadi odstopanje od referenčnih vrednosti krvnih celic. To odstopanje vodi v preiskavo krvnega razmaza, s pomočjo katerega se lahko diagnoza v določenih primerih že postavi ali pa se postavi sum na neko diagnozo (23). Če z avtomatiziranim sistemom ugotovimo nepojasnjeno levkocitozo, limfocitozo, monocitozo ali pa celo pojav blastnih celic, moramo vedno narediti tudi razmaz periferne krvi (24).

1.2.2. PREGLED KOSTNEGA MOZGA

Leta 2007 je Mednarodno združenje za standardizacijo v hematologiji (ICSH) oblikovalo smernice za preiskavo kostnega mozga. Združenje je oblikovalo obširen seznam, v katerih primerih je potrebna preiskava kostnega mozga (25).

Pri opredeljevanju limfoma je pregled kostnega mozga nujen, vendar pa so verjetnosti sprememb na kostnem mozgu pri različnih tipih limfomov različne. Zato se pri postavljanju diagnoze poslužujemo uporabe dodatnih pomožnih testov. Če morfološko limfom ni dokazan, je pri teh testih potrebna velika previdnost pri interpretaciji. Zato se priporoča rutinski morfološki pregled aspirata in biopsije kostnega mozga, saj se s tem poveča občutljivost ugotavljanja klasičnega HL in NHL (23). Pri postavljanju diagnoze limfoma sicer uporabljamo biopsijo limfnega nodusa, vendar pa nam lahko pregled kostnega mozga pri tistih bolnikih, ki imajo kostni mozeg prizadet, lahko služi kot orodje za diagnostiko. Nesmiseln pa je pri bolnikih, pri katerih v krvnem obtoku krožijo limfomske celice, saj tam uporabimo imunofenotipizacijo periferne krvi (26).

1.2.3 IMUNOHISTOKEMIJA

Pri tej metodi uporabljamo z encimom ali fluoroforom označena protitelesa (večinoma monoklonska), s katerimi prikažemo željene antigene na površini celic. Ker ima vsaka celična populacija na svoji površini določen antigenski profil, nam ta metoda lahko pomaga pri

postavljanju in klasificiranju hematoloških rakov, lahko pa nam služi tudi kot pomožno orodje pri ugotavljanju stadija limfoma (23).

Če z morfološkim pregledom ali pretočno citometrijo ugotovimo abnormalne celice, lahko z ustreznimi protitelesi nadaljno okarakteriziramo celično populacijo, kar je pri diagnostiki limfoma ključnega pomena. Uporabljamo protiteesa proti B celičnim (CD20) in T celičnim (CD3) antigenom, proti lahkim verigam κ in λ in proti CD45, CD15 in CD30, če vidimo velike displastične celice. Znotraj vsake kategorije lahko uporabimo še bolj specifična protiteesa, na primer proti beljakovini BCL (27).

1.2.4 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je ena izmed najpomembnejših metod pri diagnostiki hematoloških rakov (23, 28). Omogoča uporabo več protiteles hkrati, ki so označena z različnimi fluorokromi, detektiramo in kvantificiramo pa lahko površinske in znotrajcelične antigene (23).

Pri postavljanju diagnoze limfoma predstavlja ta metoda pomemben dodatek celični morfologiji. Omogoča nam zaznavo majhne populacije neoplastičnih celic, ki so pomešane z normalno populacijo, zaznamo lahko tudi spremenjeno izražanje nekaterih antigenov. Omogoča nam kvantitativno določanje celične DNK in s tem celični cikel. Pri limfomih ima S faza prognostični pomen (28).

1.2.5 CITOGENETIKA

Citogenetika nam omogoča analizo kromosomov in kromosomalnih sprememb pri določenih boleznih. Celice morajo biti v fazi delitve, saj so kromosomi vidni le takrat (29). Za diagnostiko hematoloških rakov je osnova za vse genetske preiskave kostni mozeg. Pred samo analizo citogenetike se vzorec ustrezeno obdela: za kratek čas se ga postavi v ustrezeno gojišče, kar sproži celično delitev, z dodatkom kolcemida pa celice zadržimo v metafazi (23).

Fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH) je metoda, ki nam omogoča detekcijo kromosomalnih nepravilnosti tudi pri nedelečih se celicah. To je še posebno uporabno pri hematoloških rakah z nizko proliferacijo. Druga pomembna prednost te metode je, da jo lahko

izvedemo tudi na tkivih, vpetih v parafin. Pri tej metodi uporabljamo fluorescenčno označene enovijačne DNA sonde, ki se komplementarno vežejo na tarčni genom (23).

Pri diagnostiki limfoma ima klasično kariotipiziranje majhen pomen, saj v večini primerov zaradi mitotično aktivnega ozadja normalnih celic ne zaznamo počasneje se delečih limfomskih celic. Je pa zato pri limfomih, ki imajo točno določeno genetsko anomalijo, bolj uporabna metoda FISH. Pozitivni rezultati FISH so sicer redko diagnostično specifični, zato jih je treba interpretirati skupaj z rezultati ostalih metod (23).

1.2.6 MOLEKULARNA GENETIKA

Molekularne metode so ene najpomembnejših metod na tem področju. Najbolj znana je verižna reakcija s polimerazo (PCR), pri kateri določeno sekvenco DNA več tisočkrat pomnožimo (23). Lahko nam služi za direktno ugotavljanje sprememb v genomu ali pa le kot orodje za pomnoževanje želene sekvence, ki jo nato analiziramo z drugimi metodami (29).

1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Proces odkrivanja malignih bolezni temelji na razlikovanju med zdravo in maligno celico. Maligne celice v okviru svojega metabolizma izločajo določene snovi, ki so lahko telesu lastne (in se pri zdravem človeku nahajajo v zelo nizkih koncentracijah) ali tuje. Te celice pa lahko vplivajo tudi na sosednje zdrave celice, da te začnejo izločati določene snovi. Vse te molekule, ki kažejo na razliko med zdravo in maligno celico, imenujemo tumorski označevalci (30). Služijo nam kot podpora pri postavljanju diagnoze, pri izbiri najustreznejše terapije in pri spremljanju odziva na terapijo (31). Da se neka snov lahko uporablja v presejalne namene, mora imeti visoko občutljivost in visoko specifičnost. Visoka občutljivost tumorskega označevalca pomeni, da le-ta zajame visok delež pacientov z določeno maligno spremembou (malo lažno negativnih rezultatov). Visoka specifičnost pa pomeni, da je tumorski označevalec pri ljudeh, ki določene maligne spremembe nimajo, v referenčnem območju (30, 31). Ker večina tumorskih označevalcev nima dovolj visoke občutljivosti in specifičnosti, se redko uporablja kot presejalni test (izjema je PSA) (32).

1.3.1 ENCIMI KOT TUMORSKI OZNAČEVALCI

Encimi so po strukturi proteini, ki imajo katalitične lastnosti. Njihova struktura je zelo pomembna za biološko aktivnost, saj vsaka poškodba ali sprememba strukture vodi v zmanjšanje katalitične učinkovitosti. Encimi so bili eni prvih odkritih tumorskih označevalcev. Znotraj celice se encimi nahajajo v zelo visokih koncentracijah. Ob poškodbi celice (tudi tumorske) ali spremembi prepustnosti celične membrane, pa se ti sprostijo v kri, kjer izmerimo njihovo povišano koncentracijo (33). Ker je izražanje genov v malignih celicah drugačno kot pri zdravih celicah, lahko pri malignih ugotovimo povišane vrednosti encimov skoraj vseh metabolnih procesov celice. Njihova specifičnost pa je precej omejena, saj z izjemo PSA, samo na podlagi povišane vrednosti encimov ne moremo ugotoviti tipa maligne bolezni (34).

Merimo lahko aktivnost encima, in sicer preko določevanja reakcijskega časa. Pogoji teh reakcij so točno določeni in strogo kontrolirani. Če nam uspe zagotoviti take pogoje, so te metode zelo občutljive in specifične za določanje encimov v serumu. Merimo hitrost reakcije pretvorbe substrata v produkt (merimo lahko padec koncentracije substrata ali porast koncentracije produkta). Encimsko aktivnost izražamo v mednarodnih enotah (U), ki povejo količino encima, ki katalizira reakcijo $1\mu\text{mol}$ substrata v eni minuti. Katalitična koncentracija pa se izraža kot U/L (33).

Poleg encimske aktivnosti lahko merimo tudi masno koncentracijo encima. V tem primeru merimo encim kot protein z različnimi imunskimi testi, kjer uporabljamo očiščen protein (encim) kot kalibrator. Protitelesa, ki jih v takih testih uporabljamo, se vežejo na vse ustrezne antigenske determinante. To pomeni, da s takimi testi zaznamo tudi neaktivne encime (33).

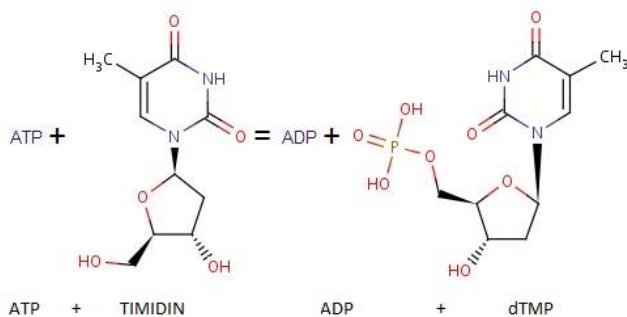
1.4 TIMIDIN KINAZA 1

Timidin kinaza spada v družino encimov deoksiribonukleozidne kinaze (35). Deoksiribonukleotidi v telesu nastajajo po dveh poteh: poti *de novo* in obnovitveni poti (36). Pri prvi deoksiribonukleotidi nastanejo z reakcijo redukcije ribonukleotidov, ki jo katalizira encim ribonukleotid reduktaza (36, 37). V obnovitveni poti pa se deoksiribonukleotidi

reciklirajo iz hrane ali razgrajene DNK zunaj celice (36). Ti v celico vstopijo preko posebnega substratno specifičnega membranskega prenašalnega proteina, kjer sledi reakcija fosforilacije s pomočjo encimov deoksiribonukleozidnih kinaz (prenos fosfatne skupine iz nukleozid trifosfata na deoksiribonukleozid). Nastane deoksiribonukleozid monofosfat, ki ima negativen naboj in zato ostane ujet v celici (36).

Skupino deoksiribonukleozidnih kinaz pri sesalcih sestavljajo štirje encimi: deoksicitidin kinaza (dCK), deoxsigvanozin kinaza (dGK) in dve timidin kinazi, TK1 in TK2. Deoksicitidin kinaza in timidin kinaza 1 sta citoplazemska encima, deoxsigvanozin kinaza in timidin kinaza 2 pa mitohondrijska (35). Ti encimi so povezani z različnimi stanji, ki so lahko podedovana ali pa nastanejo kot posledica kemoterapije. Zmanjšanja aktivnosti encimov TK2 in dGK povzročata bolezni, pri katerih pride do zmanjšanja količine mitohondrijske DNK (35). Zmanjšana aktivnost dCK povzroča neučinkovitost antivirusnih in antitumorskih zdravil (38), zmanjšana aktivnost TK1 pa naj bi celice varovala pred poškodbami DNA z UV-žarki (39). Deoksiribonukleozid kinaze so pomembni encimi, ki sodelujejo tudi pri protivirusni in protitumorski terapiji. Aktivirajo nukleozidne analoge in jih s tem spremenijo v toksične (35).

Timidin kinaza 1 (ATP: timidin 5'-fosfotransferaza, EC 2.7.1.21) je encim, ki katalizira reakcijo prenosa fosfatne skupine iz nukleozid trifosfata (ponavadi ATP) na 5'-hidroksilno skupino timidina ob prisotnosti magnezijevih ionov (slika 2) (35). Nastane deoxsitimidin monofosfat, ki se naprej v dveh reakcijah fosforilacije pretvori v deoxsitimidin trifosfat. Za razliko od ostalih deoksiribonukleozidnih kinaz, ima TK1 največjo substratno specifičnost (fosforilira le deoxsitimidin in deoksiuridin) (35, 37) in je popolnoma odvisna od celičnega cikla (37). Deoxsitimidin monofosfat lahko nastane tudi po *de novo* poti, vendar je ta pot za celico bolj potratna (40).



Slika 2: Reakcija, ki jo katalizira encim timidin kinaza 1 (prirejeno po 41)

Gen za TK1 se nahaja na kromosomu 17 (42), protein, ki nastane z ekspresijo tega gena, pa ima molekulsko maso 25 kDa (40). Aktivnost encima je močno odvisna od celičnega cikla (S-fazno specifičen encim), saj ta zelo naraste ob prehodu celice iz G1 v S fazo, hitro pade med G2 in M fazo in je neaktivен v mirajočih, nedelječih se celicah (40, 43, 44) (slika 3). Aktivnost encima med S fazo korelira s količino ustreznega proteina, ne pa s količino mRNA, saj je porast mRNA približno petkrat manjša kot porast proteina. To kaže na zelo učinkovite translacijske mehanizme v tej fazi in zelo veliko stabilnost novo sintetiziranega encima (45).



Slika 3: Faze celičnega cikla (prirejeno po 43).

Regulacija izražanja gena za TK1 je kompleksen proces, ki poteka na več nivojih: transkripcijskem, posttranskripcijskem, translacijskem in posttranslacijskem nivoju (36). Na genu obstaja 20 bp dolg promotor, ki je odgovoren za aktivacijo transkripcije. Hitrost

transkripcije se nekajkrat poveča in s tem se stimulira rast neproliferirajočih celic in celic v celični delitvi. Razpolovna doba TK1 mRNA in TK1 proteina vpliva na regulacijo na posttranskripciji in posttranslacijski ravni. Študije na HeLa celicah so pokazale, da 40 aminokislin dolga sekvenca na C-terminalnem delu vpliva na stabilnost TK1 proteina. Ta sekvenca uravnava izločanje proteina ob mitozi. Posledica mutacije tega dela gena je, da se encim ne razgradi v določeni fazi celične delitve in da se gen lahko izraža celo v fazi G0 (44).

Timidin kinaza 1 se pri človeku pojavlja v dveh oblikah: kot dimer in kot tetramer. Prva ima nizko afiniteto do timidina, druga visoko (46, 47). Regulacija tega reverzibilnega prehoda med eno in drugo obliko je odvisna od ATP in od same koncentracije TK1 (48). Potrebne so le dve ali tri fosfatne skupine ATP za pretvorbo v katalitično učinkovitejšo tetramerno obliko. Ob visokih koncentracijah encima pa je ta vedno v obliki tetramera, tudi ob odsotnosti molekul ATP (47).

1.4.1 TIMIDIN KINAZA 1 IN MALIGNE BOLEZNI

Timidin kinaza 1 bi zaradi svoje fiziološke vloge lahko bila označevalec zgodnjega zaznavanja delitve malignih celic in proliferacije (43). Proliferacija malignih celic ima pomembno vlogo pri metastaziranju, odzivu bolnika na terapijo in na preživetje bolnika, zato je pomembno njeno zgodnje odkrivanje (49). Narejenih je bilo veliko študij, kjer povisano vrednost encima povezujejo z različnimi malignimi boleznimi: rakom dojke, pljučnim rakom, rakom ledvic, rakom prostate, rakom mehurja, hematološkimi raki, kolorektalnim rakom ... (40, 43, 44).

Timidin kinazo 1 pri normalni, zdravi celici uravnava celični cikel, kjer njena koncentracija doseže vrh v S fazi celičnega cikla. Študija iz leta 1994 pa je pokazala, da pri celicah, ki so zaradi onkogenih virusov spremenjene, ta regulacija ne deluje. Pri teh celicah koncentracija TK1 ostaja enako visoka tudi skozi G2 fazo (50). V serumu zdravih ljudi je praktično nezaznavna, močno pa se povisja pri malignih boleznih, odvisno od tipa, stadija in hitrosti rasti ter zdravljenja. Encim se v serumu pojavi zaradi razpada tumorske celice, vrednost pa korelira z velikostjo tumorja (51).

1.4.1.1 TIMIDIN KINAZA 1 PRI HEMATOLOŠKIH RAKIH

Timidin kinaza 1 ima na tem področju veliko veljavo, saj odraža stopnjo proliferacije, ki pa je glavna značilnost hematoloških malignih bolezni (44). Objavljenih je kar nekaj raziskav, ki obravnavajo povezavo med tem encimom in različnimi hematološkimi raki. Že na začetku osemdesetih let so ugotovili povišane vrednosti TK pri pacientih z določenimi hematološkimi malignimi boleznimi (52).

Leta 1984 so Källander in sodelavci objavili študijo, kjer so v serumu nezdravljenih pacientov s KLL merili nivo TK. Rezultati so pokazali, da imajo višje vrednosti tega encima pacienti s progresivno obliko bolezni. Ugotovili so, da nam vrednost TK v serumu pomaga pri ugotavljanju napredovanja bolezni in s tem prognoze in pri ugotavljanju učinkovanja terapije (52). Kronična limfatična levkemija ima pri različnih bolnikih lahko zelo različen potek. Vrednost TK1 v serumu teh bolnikov nam lahko pomaga pri napovedovanju prognoze in izbiri prave terapije (44, 53). Eden najmočnejših prognostičnih pokazateljev pri KLL je somatska mutacija gena V_H . Bolniki z nemutiranim genom imajo slabši potek bolezni. Ker pa so molekularne preiskave precej drage metode, ki zahtevajo tudi določen čas, so leta 2003 dokazali, da obstaja obratna povezava med to mutacijo in vrednostjo timidin kinaze v serumu, katera bi lahko posredno kazala na prisotno ali odsotno mutacijo. Višje vrednosti encima naj bi kazale na odsotno mutacijo (54). V kasnejši študiji iz leta 2010 so to obrazložili, da pri odsotni mutaciji celica verjetno konstantno prejema antiapoptotične ali proliferacijske signale, in dokazali, da ima pri odsotni mutaciji bolezen progresiven potek in višje vrednosti TK1 (53).

Merjenje timidin kinaze je uporabno tudi pri limfomih. Njegovo povezavo z limfomi so dokazali že leta 1981, kjer so ugotovili, da aktivnost TK1 korelira s klasifikacijo NHL (55). Istega leta so objavili tudi študijo, kjer so ugotovili, da je pri pacientih z NHL, ki se slabo odzivajo na trenutno terapijo, TK1 vrednost povečana. V teh primerih bi bil potreben agresivnejši pristop zdravljenja (56). Prognostično in diagnostično vrednost encima pri NHL so dokazale številne študije. Vrednosti TK1 so pri NHL tudi 100-krat višje od vrednosti pri zdravih osebah. Osebe z višjo vrednostjo encima imajo ponavadi agresivnejšo obliko NHL in s tem tudi slabšo prognozo (57). Leta 2010 so prvič opisali dinamiko timidin kinaze 1 v

povezavi z učinkom kemoterapije pri pacientih z NHL. Vrednost encima so pri 37 pacientih merili pred začetkom kemoterapije, prvi dan kemoterapije in po 28 dneh od začetka zdravljenja. Vrednost TK1 je pred začetkom zdravljenja korelirala s stadijem bolezni, prvi dan zdravljenja so vrednosti zelo narašle in po 28 dneh močno padle (pod vrednost TK1 pred začetkom zdravljenja). S tem so dokazali uporabnost TK1 pri spremljanju učinka terapije pri NHL pacientih (58). Velik pomen vrednosti encima so ugotovili tudi pri Hodkinovem limfomu. Višje vrednosti encima pred zdravljenjem so povezane z naprevovalo boleznijo in slabo prognozo. Na podlagi vrednosti TK1 je mogoče bolnike s stadijem IA in IIA razdeliti v dve skupini glede na obdobje brez relapsa. Bolniki z višjimi vrednostmi so pogosteje doživeli ponovitev bolezni (59).

1.4.2 METODE DOLOČANJA TIMIDIN KINAZE V SERUMU

Na tržišču je danes kar nekaj metod za merjenje aktivnosti ali koncentracije timidin kinaze. Sprva so se uporabljale visoko občutljive radioencimske metode (RIA), ki merijo aktivnost encima. V preiskovani serum se doda analog substrata, ki je označen z radioaktivnim jodom ^{125}I . Timidin kinaza ta substrat pretvori v monofosfat, ki se veže na aluminijev oksid (suspendiran v mediju). Radioaktivnost aluminijevega oksida je proporcionalna aktivnosti timidin kinaze v serumu. Ta metoda se danes v rutini ne uporablja več, saj ima kar nekaj slabosti: zahtevna izvedba, uporaba radioaktivnega joda in relativno majhna specifičnost, saj deloma izmeri tudi aktivnost TK2 (44).

Danes se uporabljajo neizotopske metode, nekatere od njih so tudi že avtomatizirane. Pri eni izmed teh metod uporabljamо substrat 3'-azido-2',3'-deoksitimidin (AZT), ki ga TK1 fosforilira do AZT 5'-monofosfata (AZTMP). Nato dodamo kozje anti-AZTMP protitelo. Reakcijo izvedemo v mikrotitrskih ploščicah, ki imajo na svojo površino vezana zajčja anti-kozja protitelesa in AZTMP, ki je označen s hrenovo peroksidazo (HRP). Označen AZTMP tekmuje z neoznačenim (produkt reakcije TK1). Na koncu reakcije izmerimo koncentracijo označenega AZTMP, ki je proporcionalna aktivnosti TK1 v serumu (60).

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških rakavih obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

V naši nalogi smo uporabili dve metodi za določanje vrednosti TK1, in sicer metodo ELISA za določanje koncentracije, in metodo CLIA, na avtomatiziranem sistemu Liaison[®], za določanje aktivnosti encima. Vse vzorce smo testirali z obema metodama.

2. NAMEN DELA

Pri postavljanju diagnoz hematoloških malignih bolezni se poslužujemo precej invazivnih in dragih metod diagnostike in napovedovanja prognoze, ki so za preiskovanca lahko precej neprijetne. Te metode pa so za dokončno postavitev diagnoze še vedno nujne. Kot pri vsaki maligni bolezni, je tudi pri hematoloških malignih boleznih velikega pomena zgodnje odkrivanje malignega procesa. Za to odkrivanje potrebujemo visoko občutljive, neinvazivne in hitre metode, s katerimi lahko testiramo veliko število preiskovancev, pri katerih sumimo na določeno maligno bolezen. Take metode so pomembne tudi pri spremljanju učinka terapije, saj se paciente kontrolira večkrat na leto.

Timidin kinaza je pri raziskovalcih že pred časom vzbudila kar veliko zanimanje. Veliko raziskav dokazuje povezanost tega encima z malignimi procesi, tudi s hematološkimi raki. V preteklosti so se uporabljale za laboratorijskega delavca precej neprijetne tehnike (uporaba radioaktivnih izotopov), danes pa imamo na voljo hitre, preproste in celo avtomatizirane metode za določanje timidin kinaze.

V našem delu bomo preizkusili dve metodi za določanje timidin kinaze 1, in sicer ročno metodo ELISA, s katero določamo koncentracijo encima in avtomatizirano metodo CLIA na aparatu Liaison®, s katero določamo aktivnost timidin kinaze. Z obema metodama bomo izmerili encim v serumskih vzorcih bolnikov s hematološkimi malignimi boleznimi, nato pa z obema metodama le pri bolnikih z limfomom in le pri bolnikih z levkemijo. Za vsako primerjavo bomo izračunali občutljivost in specifičnost testa.

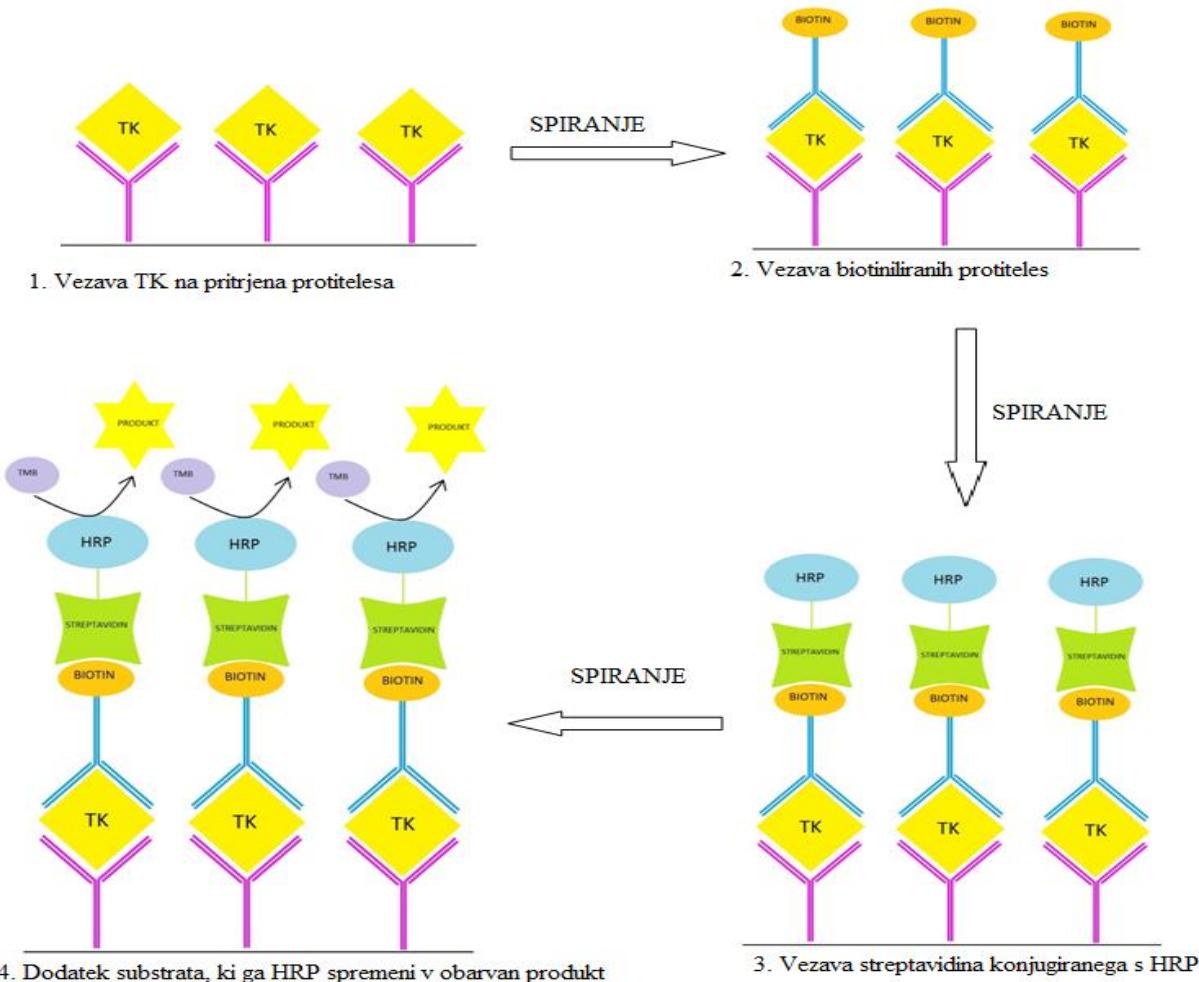
3. MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V mesecu marcu 2014 smo zbrali 51 serumskih vzorcev pacientov s Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Kot kontrolno skupino smo uporabili serume 114 zdravih preiskovancev. Do testiranja smo vzorce hranili na -20 °C, pred testiranjem smo jih odmrznili, dobro premešali in odstranili morebitne mehurčke.

3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE TIMIDIN KINAZE 1 Z METODO ELISA

Arocell Thymidine Kinase ELISA (TK 210 ELISA/HEM) je kvantitativni imunometrični test za določanje koncentracije TK v serumu. Test je specifičen za TK1. Reakcija teče v mikrotitrskih ploščicah, ki so prevlečene z monoklonskimi anti-TK protitelesi. Detekcijsko protitelo je označeno z biotinom in se veže na točno določen epitop na TK (na področju aminokislinskega zaporedja 210). Med prvo inkubacijo, ko v ustrezne luknjice mikrotitrsko ploščice odpipetiramo ustrezne količine kalibratorjev, kontrol in serumskih vzorcev, se TK veže na pritrjena monoklonska protitelesa. Sledi druga inkubacija z biotiniliranimi anti-TK protitelesi in tretja inkubacija s streptavidinom, ki ima vezano peroksidazo. Med vsako inkubacijo je faza spiranja, da odstranimo nevezane produkte. Ob dodatku substrata tetrametilbenzidina (TMB) ga peroksidaza spremeni vobarvan produkt. Intenziteto obarvanega produkta merimo pri 450 nm in ta je direktno proporcionalna koncentraciji TK v serumu.



Slika 4: Shematski prikaz ELISA testa

3.2.1 IZVEDBA TESTA

Laboratorijska oprema, reagenti in aparature:

- pipete volumna 50 µL, 100 µL, 250 µL, 5 mL,
- merilni valj 300 mL,
- destilirana voda,
- ura,
- stresalnik za mikrotitrsko plošče,

- spektrofotometer;
- TK 210/hem ELISA kit, ki vsebuje:
 - mikrotitrsko ploščo, prevlečeno z MAb 526 - 4 (96 luknjic, razdeljenih na 12 stripov),
 - dilucijski pufer v liofiliziranem stanju,
 - raztopina biotiniliranih piščančjih anti-TK protiteles,
 - konjugat streptavidin-HRP,
 - kalibratorji v liofiliziranem stanju (označeni z A, B, C, D, E in F),
 - kontrole v liofiliziranem stanju (označene z CTRL I in CTRL II),
 - raztopina substrata TMB,
 - "stop" raztopina (za ustavitev reakcije),
 - spiralni pufer (10× koncentrat).

Vse reagente TK 210/hem ELISA kita shranjujemo na 2–8 °C do roka uporabe.

3.2.2 PRIPRAVA REAGENTOV TK210/HEM ELISA KITA

1. Za pripravo spiralne raztopine redčimo koncentrat spiralnega pufra z destilirano vodo v razmerju 1:10.
2. Rekonstituiramo kalibratorje in kontrole z 0,25 mL destilirane vode, pustimo stati 15 minut in nato viale nežno premešamo.
3. Rekonstituiramo dilucijski pufer s 5 mL destilirane vode, pustimo stati 15 minut in nato vialo nežno premešamo.

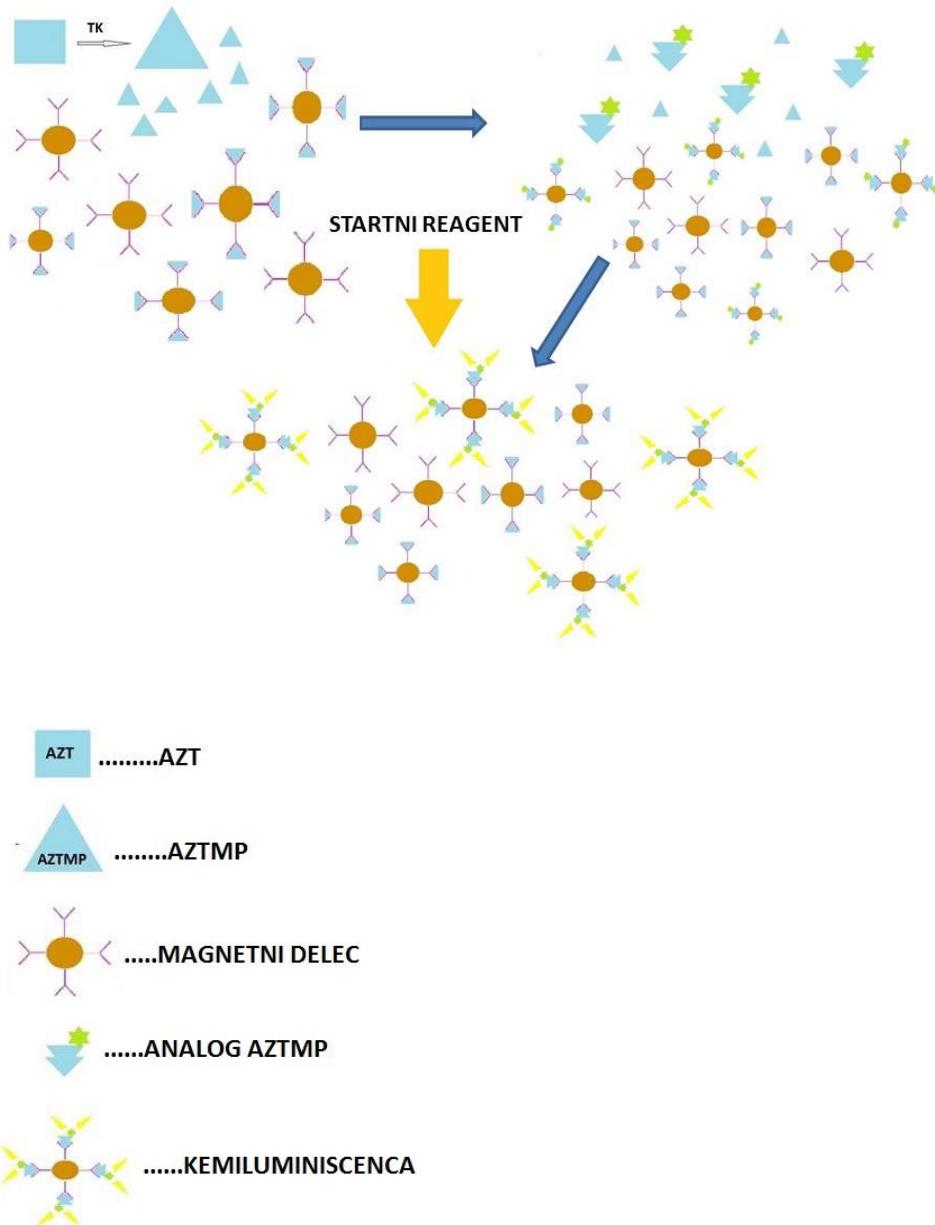
3.2.3 POSTOPEK

1. Odpipetiramo 100 µL kalibratorjev v ustrezne luknjice, razen Cal A (Cal A se dodatno redči z dilucijskim pufrom).
2. V luknjice, ki so namenjene kalibratorju A, kontrolam in vzorcem, odpipetiramo 50 µL dilucijskega pufra in dodamo 50 µL Cal A, kontrole ali vzorca.
3. Inkubiramo 2 uri na 25 °C in stresamo na 650 rpm.

4. Vse luknjice štirikrat speremo s 350 µL spiralnega pufra.
5. Dodamo 100 µL biotiniliranih anti-TK protiteles.
6. Inkubiramo 1 uro na 25 °C in stresamo na 650 rpm.
7. Vse luknjice štirikrat speremo s 350 µL spiralnega pufra.
8. Dodamo 100 µL streptavidin-HRP.
9. Inkubiramo 20 minut na 25 °C in stresamo na 650 rpm.
10. Vse luknjice štirikrat speremo s 350 µL spiralnega pufra.
11. Dodamo 100 µL TMB substrata.
12. Inkubiramo 15 minut na sobni temperaturi (18–26 °C) v temi.
13. Dodamo 100 µL "stop" raztopine.
14. Izmerimo absorbanco pri 450 nm.

3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI TIMIDIN KINAZE 1 Z METODO CLIA NA ANALIZATORJU LIAISON®

Test temelji na principu indirektne, modificirane dvostopenjske, kompetitivne kemiluminiscenčne metode (CLIA), s katero kvantitativno določamo TK v serumu ali plazmi. Pri tej metodi timidin kinaza iz vzorca pretvori AZT (3'-azido-3'-deoksitimidin) v AZTMP (3'-azido-3'-deoksitimidin mono fosfat), katerega v reakciji detektiramo. V prvi stopnji vzorec inkubiramo s pufrom 1, pufrom 2 in z magnetnimi delci, ki so prevlečeni z anti-AZTMP poliklonskimi protitelesi. V tej stopnji se nastali AZTMP veže na magnetne delce. V drugi stopnji dodamo analog AZTMP, konjugiran z derivatom izoluminola (indikator), ki tekmuje z AZTMP za vezavo s protitelesi na magnetnih delcih. Sledi faza spiranja, kjer se odstranijo nevezane molekule. Na koncu dodamo "start" reagent, ki sproži reakcijo kemiluminisceence. Merimo svetlobni signal v obliki RLU (relative light unit), ki je obratno sorazmeren z aktivnostjo timidin kinaze v vzorcu. Vse stopnje se dogajajo v zaprtem sistemu, analizatorju Liaison®.



Slika 5: Shematski prikaz CLIA testa

3.3.1 IZVEDBA TESTA

3.3.1.1 PRIPRAVA INTEGRALNEGA REAGENTA

Zaprete reagente hranimo v hladilniku na 2–8 °C v pokončnem položaju.

Preden vstavimo integralni reagent v analizator, moramo dobro resuspendirati magnetne delce z vrtenjem ustreznega dela integrala, dokler barva magnetnih delcev ne postane rjava. Odstranimo zaščitne folije, pri tem pazimo, da integrala ne stresamo premočno ali obračamo, saj bi s tem lahko ustvarili nezaželeno penjenje reagentov.

Pripravljen integral vstavimo v analizator tako, da je črtna koda integrala obrnjena na levo. Pred startom testa mora integral v analizatorju stati 30 minut. V tem času se magnetni delci popolnoma resuspendirajo, saj analizator sam ves čas vrti ustrezeni del integrala.

3.3.1.2 KALIBRATORJI IN KONTROLE

Kakovost integralnega reagenta preverjamo s kontrolnim setom vsak dan uporabe testa. Če vrednosti kontrol ležijo znotraj določenih meja, je test veljaven. Če vrednosti padejo izven teh meja, je potrebna kalibracija in ponovitev kontrolnega seta.

Vsek integralni reagent ima v črni kodi zapis o kalibraciji tega integrala. Kalibratorji so v liofilizirani obliki in jih je zato treba pred uporabo raztopiti z 1 mL deionizirane vode. Viale nato pustimo stati na sobni temperaturi vsaj 10 minut in jih na koncu z obračanjem nežno premešamo. V epruveto za merjenje prenesemo 300 µL kalibratorja, kar zadošča za tri kalibracijske meritve (triplikat). Kalibracijo izvedemo ob vsakem novem lotu integralnega reagenta ali "start" reagenta, vsakih 14 dni, po vsakem servisiranju analizatorja in če padejo vrednosti kontrolnega seta izven določenih meja.

3.3.1.3 VSTAVLJANJE VZORCEV V ANALIZATOR

Serumske vzorce, ki so v ustreznih epruvetah, vstavimo v stojalo, namenjeno vzorcem. Vzorci ne smejo biti spenjeni ali imeti mehurčkov na gladini, saj s tem onemogočimo pravilno pipetiranje vzorca. Stojalo z vzorci vstavimo v analizator, kjer laser prebere črtno kodo na

stojalu in kode na vzorcih. Iz nabora preiskav, ki so nastavljene na analizatorju, izberemo pravo za vsak vzorec in na koncu pritisnemo tipko "start".

3.3.1.4 POSTOPEK REAKCIJE V ANALIZATORJU

1. V reakcijski modul odpipetira 50 µL vzorca, kalibratorja ali kontrole.
2. V reakcijski modul odpipetira pufer 1, pufer 2 in magnetne delce.
3. Inkubacija 40 minut.
4. V reakcijski modul odpipetira konjugat.
5. Inkubacija 20 minut.
6. Spiranje nevezanih molekul.
7. Doda "start" reagent in izmeri emitirano svetlobo.

Merilno območje testa je med 0,5 U/L in 100 U/L. Vrednosti pod 0,5 U/L podajamo kot <0,5 U/L. Pri vrednostih nad 100 U/L vzorec redčimo s posebnim redčitvenim pufrom, redčitev ponovno izmerimo in preračunamo.

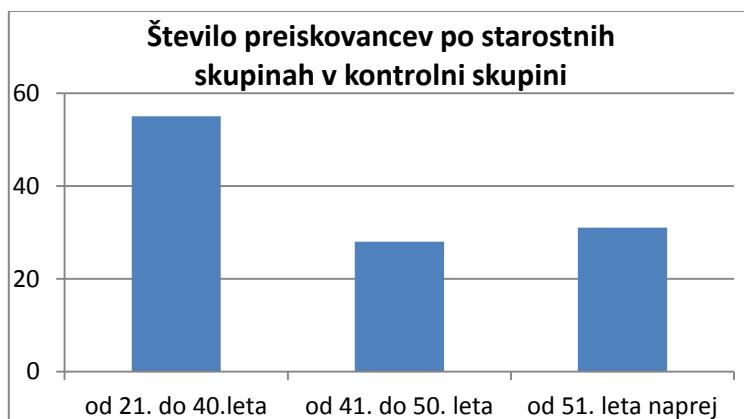
4. REZULTATI

4.1 VZORCI

Skupno smo z obema metodama pregledali 51 bolnikov s potrjeno hematološko boleznijo in 114 zdravih naključno izbranih ljudi (kontrolna skupina). Starostni razpon pri hematoloških bolnikih je bil med 31. in 85. letom starosti, v kontrolni skupini pa med 20. in 63. letom starosti. Med hematološkimi bolniki je bilo 22 (43 %) žensk in 29 (57 %) moških, v kontrolni skupini pa 55 (48 %) žensk in 59 (52 %) moških.



Slika 6: Število preiskovancev po starostnih skupinah med hematološkimi bolniki

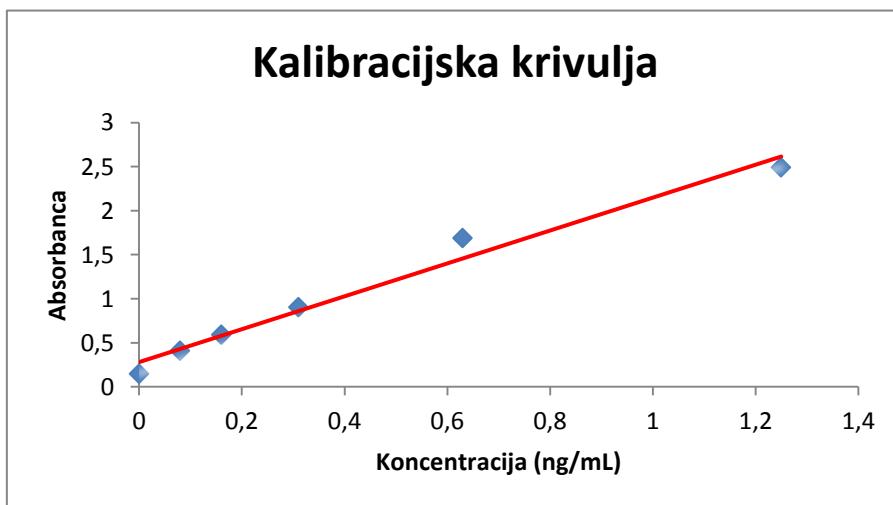


Slika 7: Število preiskovancev po starostnih skupinah v kontrolni skupini

Število bolnikov s hematološkimi malignimi boleznimi	51
Število bolnikov z levkemijo	14
Število bolnikov z limfomom	7

4.2 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE TK1 S TESTOM ELISA

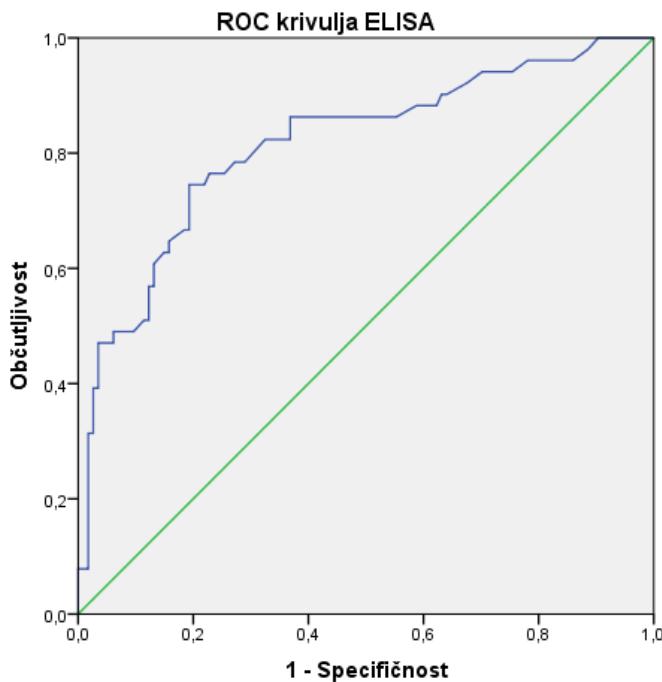
V vseh serumskih vzorcih hematoloških bolnikov in kontrolne skupine smo z ELISA testom na podlagi standardne krivulje določili koncentracijo timidin kinaze 1. S programom SPSS smo rezultate analizirali, naredili ROC krivuljo, določili optimalno "cut off" vrednost in določili specifičnost ter občutljivost testa. Enako smo naredili le pri pacientih z levkemijo in pri pacientih z limfomom.



Slika 8: Kalibracijska krivulja za test ELISA

4.2.1 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNIH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah A in D.



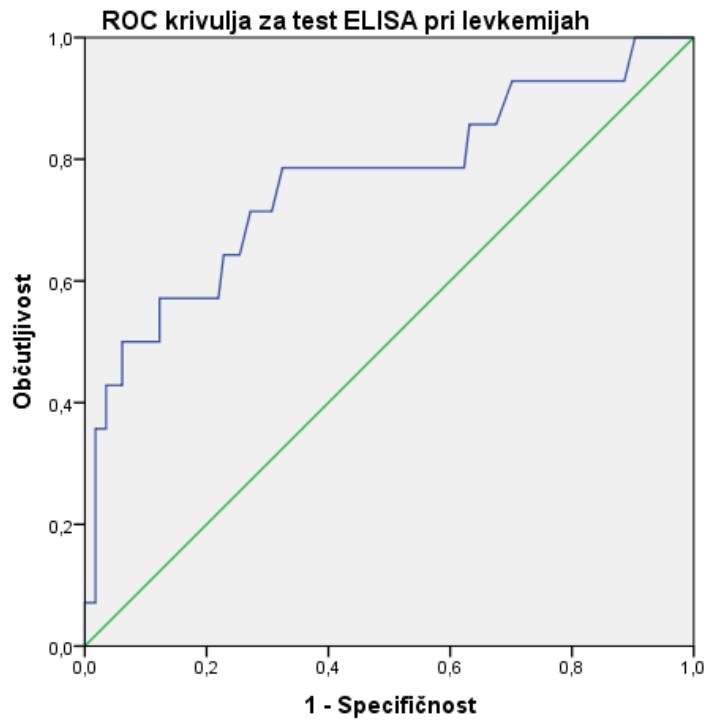
Slika 9: ROC krivulja za test ELISA

Vrednost "cut off"	0,1005 ng/mL
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	12
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	39
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	88
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	26
Površina pod krivuljo (AUC)	0,815

OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	76 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	77 %

4.2.2 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI LEVKEMIJAH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah B in D.



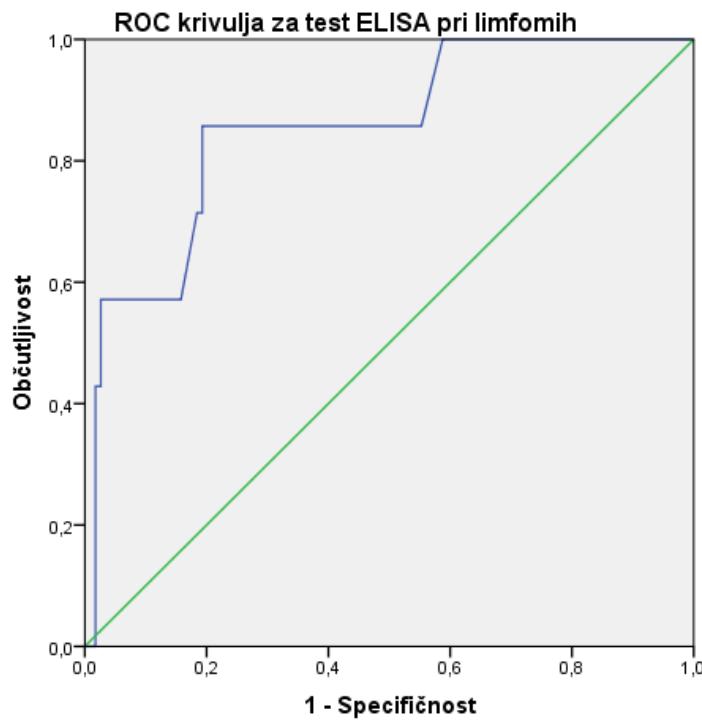
Slika 10: ROC krivulja za test ELISA pri pacientih z levkemijo

Vrednost "cut off"	0,0910 ng/mL
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	3
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	11
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	77
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	37
Površina pod krivuljo (AUC)	0,764

OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	78 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	67 %

4.2.3 VREDNOTENJE ELISA TESTA PRI LIMFOMIH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah C in D.



Slika 11: ROC krivulja za test ELISA pri limfomih

Vrednost "cut off"	0,1025 ng/mL
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	1
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	6
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	92
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	22
Površina pod krivuljo (AUC)	0,855

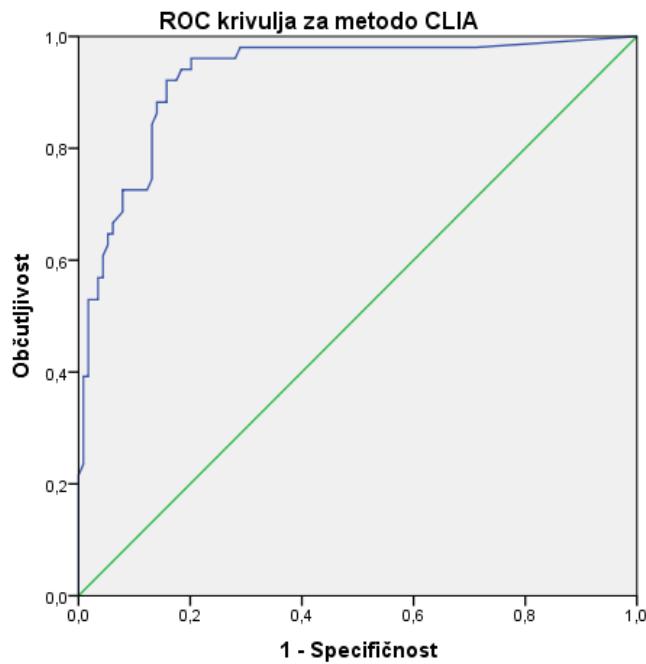
OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	86 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	81 %

4.3 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE TK1 Z METODO CLIA

V vseh serumskih vzorcih hematoloških bolnikov in kontrolne skupine smo z metodo CLIA na aparatu Liaison® določili koncentracijo timidin kinaze 1. S programom SPSS smo rezultate analizirali, naredili ROC krivuljo, določili optimalno "cut off" vrednost in določili specifičnost ter občutljivost testa. Enako smo naredili le pri pacientih z levkemijo in pri pacientih z limfomom.

4.3.1 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLEZNIH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah E in H.



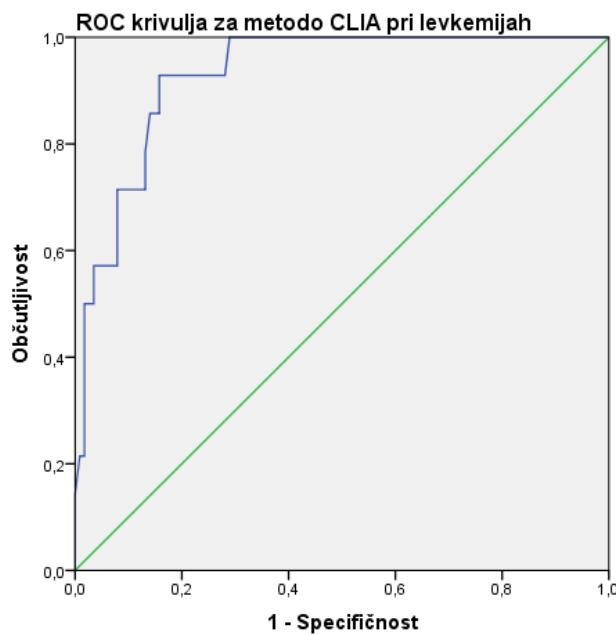
Slika 12: ROC krivulja za metodo CLIA

Vrednost "cut off"	5,5 U/L
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	4
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	47
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	96
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	18
Površina pod krivuljo (AUC)	0,929

OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	92 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	84 %

4.3.2 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI LEVKEMIJAH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah F in H.



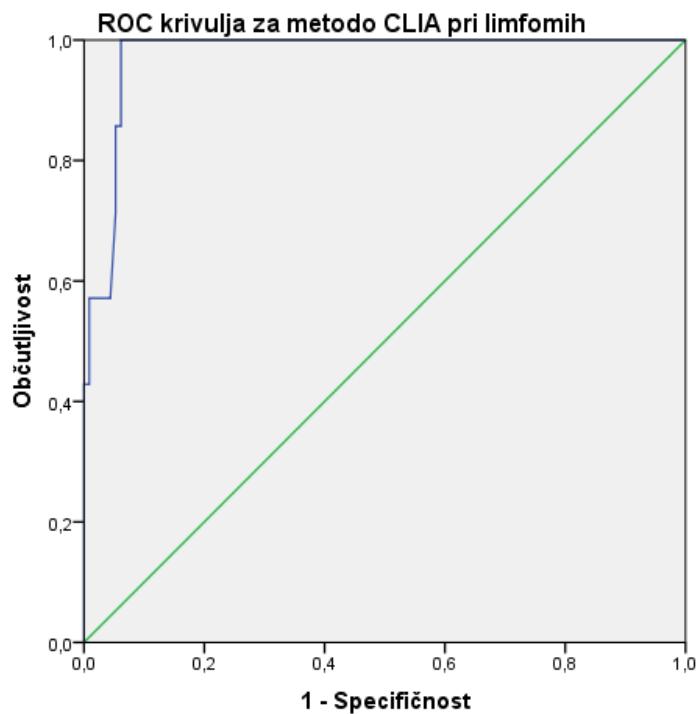
Slika 13: ROC krivulja za metodo CLIA pri levkemijah

Vrednost "cut off"	5,5 U/L
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	1
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	13
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	96
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	18
Površina pod krivuljo (AUC)	0,930

OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	93 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	84 %

4.3.3 VREDNOTENJE METODE CLIA PRI LIMFOMIH

Celotni rezultati so prikazani v prilogah G in H.



Slika 14: ROC krivulja za metodo CLIA pri limfomih

Vrednost "cut off"	8,8 U/L
Število lažno negativnih (LN) rezultatov	0
Število resnično pozitivnih (RP) rezultatov	7
Število resnično negativnih (RN) rezultatov	107
Število lažno pozitivnih (LP) rezultatov	7
Površina pod krivuljo (AUC)	0,976

OBČUTLJIVOST = RP / (RP + LN)	100 %
SPECIFIČNOST = RN / (RN + LP)	94 %

Tabela 1: Občutljivost in specifičnost obeh metod pri posameznih vrstah hematoloških rakov

	ELISA			CLIA		
	občutljivost	specifičnost	AUC	občutljivost	specifičnost	AUC
Vsi hematološki raki	76 %	77 %	0,815	92 %	84 %	0,929
Levkemija	78 %	67 %	0,764	93 %	84 %	0,930
Limfom	86 %	81 %	0,855	100 %	94 %	0,976

5. RAZPRAVA

Timidin kinaza je encim, katerega nivo je odvisen od faze celičnega cikla. Tesno je povezan s celično proliferacijo, zato je vzbudil veliko zanimanje kot potencialni tumorski označevalec pri diagnosticiraju malignih bolezni in pri napovedovanju prognoze.

V naši nalogi smo preiskovali timidin kinazo pri 51 bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi, kot kontrolno skupino pa smo uporabili serume 114 naključno izbranih zdravih preiskovancev. Timidin kinazo smo v serumih določali z dvema metodama: ELISA in CLIA. Pri prvi določamo koncentracijo encima, pri drugi pa aktivnost. Naše preiskovanje je bilo razdeljeno v tri sklope: v prvem smo določili občutljivost in specifičnost obeh metod, kjer smo uporabili serume vseh 51 serumov bolnikov s hematološkimi boleznimi. V drugem sklopu smo določili občutljivost in specifičnost obeh metod le pri bolnikih z levkemijo in v tretjem sklopu enako le pri bolnikih z limfomom.

Podatke smo analizirali s programom SPSS (IBM® SPSS® Statistics, Version 20), naredili smo ROC analizo, s pomočjo katere smo dobili podatek AUC (površina pod krivuljo). Ta podatek nam pove, kakšno sposobnost ima določena metoda, da razloči med zdravo in bolno populacijo. Za opredeljevanje metode uporabljamo naslednje kriterije (61):

VREDNOST AUC	OPREDELITEV METODE
0,9 - 1	Odlična
0,8 - 0,9	Dobra
0,7 - 0,8	Srednja
0,6 - 0,7	Slaba
0,5 - 0,6	Neuporabna

Pri vsaki ROC analizi smo izračunali še občutljivost in specifičnost metode. Občutljivost metode nam pove, kakšna je verjetnost pozitivnega rezultata, če je bolezen prisotna. Specifičnost pa nam pove, kakšna je verjetnost negativnega rezultata, če bolezen ni prisotna.

V naši raziskavi je metoda CLIA pokazala višjo specifičnost in občutljivost v vseh segmentih analize (določanje pri vseh 51 bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi, določanje le pri bolnikih z levkemijo in določanje le pri bolnikih z limfomom). Občutljivost te metode je bila vedno nad 90 %, pri ELISA metodi se je gibala med 76 % in 86 %. Specifičnost metode CLIA pri vseh hematoloških bolnikih in bolnikih z levkemijo je bila 84 %, pri bolnikih z limfomom pa 94 %, pri ELISA metodi smo dobili te vrednosti precej nižje (pri bolnikih z levkemijo je specifičnost ELISA testa padla na 67 %). Površina pod krivuljo je bila pri metodi CLIA vedno v rangu "odlično", pri metodi ELISA pri vseh hematoloških bolnikih in bolnikih z limfomom v rangu "dobro", pri bolnikih z levkemijo pa v rangu "srednje".

ELISA metoda je v naši raziskavi pokazala več lažno pozitivnih rezultatov v kontrolni skupini zdravih preiskovancev. Razlog je lahko v tem, da ELISA test meri koncentracijo encima in ne aktivnosti. To pomeni, da poleg aktivnega encima izmerimo tudi neaktivni encim. Timidin kinaza se lahko poviša tudi pri nemalignih obolenjih (infekcije, vnetja ...), zato je v tem primeru potrebna previdnost pri interpretaciji. Merjenje koncentracije timidin kinaze pa ima pri malignih obolenjih kljub temu svoj pomen, saj spremenjene maligne celice lahko proizvajajo in izločajo encim, ki ni aktiven in ga zato z metodami, ki merijo aktivnost, ne zaznamo.

Naše rezultate merjenja koncentracije ne moremo primerjati z ostalimi študijami, saj s tem reagentom koncentracije še ni merit nihče. Reagent je nov in ga še ni na tržišču, mi pa smo v naši nalogi preizkušali njegovo diagnostično vrednost. Do sedaj je večina raziskav za merjenje koncentracije timidin kinaze uporabljala metodo ECL dot blot, ki se je izkazala za uporabno metodo (62, 63). Še posebno zanimiva je raziskava, ki je bila objavljena leta 2010, v kateri so s to metodo skušali napovedati prognозу bolnikov z NHL po kemoterapiji. Metoda je dala dobre rezultate z AUC vrednostjo 0,95 (58).

Ena izmed prvih študij je leta 2007 dokazala diagnostično uporabnost metode CLIA pri pacientih z različnimi hematološkimi malignimi boleznimi. Rezultate so primerjali z radioencimsko metodo in s kliničnimi podatki o pacientih in dobili zelo dobro korelacijo. S tem je metoda CLIA postala potencialno uporabna v rutinski diagnostiki (64). Leto kasneje so podobno študijo izvedli tudi na psih (65).

Ena izmed novejših študij je bila predstavljena v obliki posterja leta 2013 v San Franciscu, kjer so z metodo CLIA 194 pacientom s hematološkimi malignimi boleznimi izmerili aktivnost timidin kinaze. Vključili so tudi kontrolno skupino zdravih preiskovancev, s pomočjo katerih so postavili zgornjo "cut off" vrednost 7,7 U/L. Ugotovili so, da obstaja signifikantna razlika v vrednosti encima med pacienti z zgodnjim in poznim stadijem limfoma in da so normalne vrednosti TK1 pri pacientih s pozним stadijem povezane z daljšim preživetjem (66).

Zanimiva je tudi raziskava, ki je bila objavljena marca 2014, v kateri so preiskovali vpliv starosti na vrednosti TK1 ter njegovo vrednost kot presejalni test pri KLL (ki se bolj pojavlja med starejšo populacijo). Vključili so zdravo populacijo 369 preiskovancev (18 do 86 let), ki so jih razdelili v starostne skupine, in populacijo 115 pacientov s KLL. Encim so merili z metodo CLIA. Ugotovili so, da obstaja signifikantna razlika v vrednosti timidin kinaze med mlado in starejšo populacijo zdravih preiskovancev in signifikantna razlika med mlado in srednje staro zdravo populacijo (mlada populacija ima najvišje vrednosti). Najnižja izmerjena vrednost med zdravo populacijo je bila 5 U/L, najvišja 35,6 U/L. Rezultate preiskovancev s KLL so primerjali z enakim številom rezultatov zdrave populacije, ki so se med seboj ujemali po spolu in starosti. S tem so dokazali, da obstaja signifikantna razlika v vrednosti timidin kinaze med zdravo populacijo in vsemi stadiji KLL. Podobno razliko so opazili tudi znotraj populacije s KLL, med začetnimi in napredovalimi stadiji (pri preiskovancih z napredovalimi stadiji so ugotovili višje vrednosti encima). Za razlikovanje med populacijo s KLL in zdravo populacijo so dobili vrednost ROC-AUC 0,840 ("cut off" 10,5 U/L), občutljivost 80,9 % in specifičnost 73,4 %. Pri isti vrednosti "cut off" pa so dobili, za razlikovanje med začetnim

stadijem KLL in zdravo populacijo, vrednost ROC-AUC 0,760 s 73,9 % občutljivostjo in 72,1 % specifičnostjo (67).

Kljub visokim odstotkom občutljivosti in specifičnosti CLIA metode, ki smo jih dobili pri naši raziskavi, bi bilo za še boljši vpogled treba testirati še večje število preiskovancev s hematološkimi malignimi boleznimi, še posebno bolnike s posameznimi diagnozami. Metoda CLIA je pri bolnikih z limfomi pokazala 100 % občutljivost. To pomeni, da pri 100 preiskovancih z limfomom dobimo pri vsakem od njih pozitiven rezultat. Tako občutljivost pa imajo le metode, ki so klasificirane kot zlati standard.

Korelacije med metodama, ki smo ju uporabili v nalogi, nismo naredili, saj ju težko primerjamo, ker ena metoda meri aktivnost, druga pa koncentracijo timidin kinaze.

6. SKLEP

- Metoda ELISA je v naši nalogi pokazala 76 % občutljivost in 77 % specifičnost pri bolnikih z različnimi hematološkimi raki, 78 % občutljivost in 67 % specifičnost pri bolnikih z levkemijo ter 86 % občutljivost in 81 % specifičnost pri bolnikih z limfomom.
- Metoda CLIA pa je pokazala 92 % občutljivost in 84 % specifičnost pri bolnikih z različnimi hematološkimi raki, 93 % občutljivost in 84 % specifičnost pri bolnikih z levkemijo ter 100 % občutljivost in 94 % specifičnost pri bolnikih z limfomom.
- Kljub boljši občutljivosti in specifičnosti CLIA metode, ne moremo zaključiti, da je ta metoda boljša oz. uporabnejša od metode ELISA, saj z vsako metodo dobimo popolnoma drugačen podatek o samem encimu. Vsekakor bo metoda ELISA, ob že rutinsko uporabljeni metodi CLIA, dodatno prispevala k boljši diagnostiki. Kot nadaljevanje te raziskave pa bi podatka o aktivnosti in koncentraciji lahko uporabili za izračun kvocienta med aktivnostjo in maso encima. S tem bi dobili podatek o aktivnosti timidin kinaze na enoto.
- Kljub uporabnosti tega encima v diagnostiki pa je potrebna določena stopnja previdnosti pri interpretaciji, saj moramo vrednost tega encima vedno interpretirati skupaj še z drugimi parametri in rezultati diagnostike. S kombinacijo pravih tumorskih označevalcev lahko dosežemo optimalno shemo za diagnostiko, napovedovanje prognoze ali spremjanje terapije pri posameznih boleznih. Zato je kljub temu, da sam označevalc kot individualni parameter nima velike vrednosti, še vedno pomembno odkrivanje novih potencialno uporabnih tumorskih označevalcev.

7. VIRI

1. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J: Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th ed., McGraw Hill Professional, 2011: 663–70
2. Santos SI: Cancer epidemiology: Principles and methods, International agency for research in cancer, Lyon, 1999: 355, 387
3. Finderle Črne N, Zorec R: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, 2011: 113–131
4. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx 30. 8. 2014 ob 12:00
5. Primc Žakelj M: Rak v Sloveniji 2010, Onkološki inštitut Ljubljana, 2013: 16
6. Sheehan A: Introduction to the WHO Classification of Hematologic Malignancies, ISS Refresher Course, 2011
7. Cerar A, Luzar B, Rott T, Zidar N: Patologija, 3. izdaja, Inštitut za patologijo MF UL, 2006: 131–139
8. Primc Žakelj M: Rak v Sloveniji 2009, Onkološki inštitut Ljubljana, 2013: 38–41
9. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T, Podgornik H, Preložnik Zupan I, Pretnar J, Zver S: Bolezni krvi in krvotvornih organov, 50–87
10. Murphy K: Janeway's immunobiology, 8th ed., Garland Science, New York, 2012: 5
11. Walter J: Chronic Lymphocytic Leukemia, Leukemia & Lymphoma Society, 2011: 5
12. What you need to know about leukemia booklet, National cancer institute, 2008: 4
13. Marcus R, Sweetenham WJ, Williams EM: Lymphoma: pathology, diagnosis and treatment, 2nd ed., Cambridge University Press, New York, 2014: 1–10

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških rakavih obolenjih
mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

14. http://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/maligni_limfomi/ 31. 8. 2014
ob 10:00

15. What you need to know about Hodgkin lymphoma booklet, National cancer institute, 2013: 3

16. Walker A: Understanding Hodgkin lymphoma, Irish Cancer Society, Ireland, 2003: 14–15

17. Küppers R, Hansmann ML: The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005; 37: 511–517

18. Non-Hodgkin lymphoma, Leukemia & Lymphoma Society, 2013: 7

19. Saba HI, Mufti GJ: Advances in Malignant Hematology, Blackwell Publishing, 2011: 274–295

20. Zelenetz AD, Abramson JS et al.: Non-Hodgkin's Lymphomas. The Journal of the National Comprehensive Cancer Network 2010; 8, 288–334

21. Eastwood A, Kleijnen J, McIntosh H: Improving Outcomes in Haematological Cancers, National Institute for Clinical Excellence, London, 2003: 17–18

22. What you need to know about non-Hodgkin lymphoma booklet, National cancer institute, 2007: 8–11

23. Erber WN: Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies, Cambridge University Press, New York, 2010: 28–89, 206–243

24. Bain B: Diagnosis from the Blood Smear. N Engl J Med 2005;353:498–507

25. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC: ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. International Journal of Laboratory Hematology 2008; 30, 349–364

26. Bain BJ: Bone marrow aspiration. Journal of Clinical Pathology 2001;54:657–663

27. Higgins RA, Blankenship EJ, Kinney CM: Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2008;132:441–461
28. Jennings CD, Foon KA: Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. Blood Journal 1997; 90: 2863–2892
29. Coleman WB, Tsongalis JG: Molecular diagnosis for the Clinical Laboratorian, 2nd ed., Humana Press Inc, New Jersey, 2006: 47, 173
30. Novaković S: Tumor markers in clinical oncology. Radiology and Oncology 2004; 38(2): 73-83
31. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-markers> 6.9.2014 ob 9:00
32. Perkins LG, Slater DE, Sanders GK, Prichard GJ: Serum Tumor Markers. American Family Physician 2003;68:1075–82
33. Burtis AC, Ascwood RE, Bruns ED: Tiets Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic, 4th ed., Elsevier, Missouri, 2006: 191–211, 597, 754
34. Majkić SM: Enzimi kao tumorski markeri. Jugoslovenska medicinska biohemija 2006; 25: 127–135
35. Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K, Eklund H: Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. Cellular and Molecular Life Sciences 2002; 59: 1327–1346
36. Eriksson S, Arner ESJ: Mammalian deoxyribonucleoside kinases. Pharmacology & Therapeutics 1995; 67(2): 155-186
37. Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, Carnrot C, Zhu C, Wang L, Eriksson S, Munch-Petersen B, Eklund H: Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. Proceedings of the National Academy of Sciences 2004; 101(52): 17970–17975
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1633> 7.9.2014 ob 12:00

39. Skovgaard T, Rasmussen LJ, Munch-Petersen B: Thymidine kinase 1 deficient cells show increased survival rate after UV-induced DNA damage (abstract). Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2010; 29(4-6): 347–51
40. O'Neill KL, Buckwalter MR, Murray BK: Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential. Expert Review of Molecular Diagnostics 2001; 1(4): 428–33
41. [http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=2.7.1.21&Suchword=&organism\[\]&Homo+sa/piens&show_tm=0](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=2.7.1.21&Suchword=&organism[]&Homo+sa/piens&show_tm=0) 7.9.2014 ob 18:00
42. Xu WM, Gorman PA, Rider SH, Hedge PJ, Moore G, Prichard C, Sheer D, Solomon E: Construction of a genetic map of human chromosome 17 by use of chromosome-mediated gene transfer. Proceedings of the National Academy of Sciences 1988; 85(22): 8563–7
43. Aufderklamm S, Todenhöfer T, Gakis G, Kruck S, Hennenlotter J, Stenzl A, Schwentner C: Thymidine kinase and cancer monitoring. Cancer Letters 2012; 316(1): 6–10
44. Topolcan O, Holubec L Jr: The role of thymidine kinase in cancer diseases. Expert Opinion on Medical Diagnostics 2008; 2(2): 129–141
45. Sherley LJ, Kelly JT: Regulation of Human Thymidine Kinase during the Cell Cycle. The Journal Of Biological Chemistry 1988; 236 (17): 8350–8358
46. Hanan S, Jagarlamudi KK, Liya W, Ellen H, Staffan E: Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of thymidine kinase 1 from dogs and humans. BMC Biochem 2012;13:12
47. Munch-Petersen B: Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate, in addition to tripolyphosphates, or high enzyme concentration. FEBS J. 2009; 276(2): 571–80
48. Mutahir Z, Clausen AR, Andersson KM, Wisen SM, Munch-Petersen B, Piškur J: Thymidine kinase 1 regulatory fine-tuning through tetramer formation. FEBS J. 2013; 280(6): 1531–41

49. Wang N, He Q, Skog S, Eriksson S, Tribukait B: Investigation on cell proliferation with a new antibody against thymidine kinase 1. *Analytical Cellular Pathology* 2001; 23(1): 11–9
50. Hengstschläger M, Knöfler M, Müllner EW, Ogris E, Wintersberger E, Wawra E: Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(19): 13836–42
51. Xiang Y, Zeng H, Liu X, Zhou H, Luo L, Duan C, Luo X, Yan H: Thymidine kinase 1 as a diagnostic tumor marker is of moderate value in cancer patients: A meta-analysis. *Bioscience Reports* 2013; 1(4): 629–637
52. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS: Serum Deoxythymidine Kinase Gives Prognostic Information in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer* 1984; 54(11): 2450–5
53. Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Gornet TG, St Romain S, Wang X, Inamdar K, Johnson MR, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE: High Serum Thymidine Kinase 1 Level Predicts Poorer Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 2010; 134(3): 472–7
54. Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppezzo P, Lévy V, Dighiero G, Ajchenbaum-Cymbalista F: Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; 17(1): 133–7
55. Ellims PH, Van der Weyden MB, Medley G: Thymidine kinase isoenzymes in human malignant lymphoma. *Cancer Research* 1981; 41(2): 691–5
56. Ellims PH, Eng Gan T, Medley G, Van Der Weyden MB: Prognostic relevance of thymidine kinase isozymes in adult non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1981; 58(5): 926–30
57. Gronowitz JS, Hagberg H, Källander CF, Simonsson B: The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Cancer* 1983; 47(4): 487–95

58. Pan ZL, Ji XY, Shi YM, Zhou J, He E, Skog S: Serum thymidine kinase 1 concentration as a prognostic factor of chemotherapy-treated non-Hodgkin's lymphoma patients. *J Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2010; 136(8): 1193–9
59. Eriksson B, Hagberg H, Glimelius B, Sundström C, Gronowitz S, Källander C: Serum thymidine kinase as a prognostic marker in Hodgkin's disease. *Acta Oncologica* 1985; 24(2): 167–71
60. Ohrvik A, Lindh M, Einarsson R, Grassi J, Eriksson S: Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clinical Chemistry* 2004; 50(9): 1597–606
61. <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm> 4.10.2014 ob 08:00
62. Xu W, Cao X, Miao KR, Qiao C, Wu YJ, Liu Q, Fan L, Li JY: Serum thymidine kinase 1 concentration in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors (abstract). *International Journal of Hematology* 2009; 90(2): 205–11
63. Xu W, Shen QD, Yu H, Qiao C, Wu YJ, Liu Q, Zhu DX, Miao KR, Li JY: [Lipoprotein lipase and serum thymidine kinase level in chronic lymphocytic leukemia and their correlations with other prognostic factors (abstract)]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009; 30(1): 8–12
64. Fenske J, Tuttle A, Olson G, Aronsson CA, Schmidt J: Development of an automated, non-radiometric assay for thymidine kinase on the Liaison® analyzer – Technical and clinical evaluation (abstract). *Tumor Biology* 2007; 28(suppl 1): 56
65. Von Euler HP, Rivera P, Aronsson AC, Bengtsson C, Hansson LO, Eriksson SK: Monitoring therapy in canine malignant lymphoma and leukemia with serum thymidine kinase 1 activity--evaluation of a new, fully automated non-radiometric assay. *International Journal of Oncology* 2009; 34(2): 505–10
66. GaTT MD. Thymidine Kinase Levels Correlate With Prognosis In High Grade Lymphoma, and Can Discriminate Patients With a Clinical Suspicion Of Low Grade To High Grade Transformation. V: 56th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, ZDA, 2013, Poster No. 4309

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških rakavih obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

-
67. Szánthó E, Bhattoa HP, Csobán M, Antal-Szalmás P, Újfalusi A, Kappelmayer J, Hevessy Z: Serum thymidine kinase activity: analytical performance, age-related reference ranges and validation in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2014; 9(3): e91647

8. PRILOGE

Priloga A: Prikaz celotnih rezultatov ELISA testa pri vseh izbranih bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi

STAROST	SPOL	STK1 ELISA (ng/mL)	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
50	M	0,059	NEG	LN
80	M	0,061	NEG	LN
84	M	0,067	NEG	LN
48	M	0,073	NEG	LN
85	M	0,074	NEG	LN
62	Ž	0,077	NEG	LN
77	Ž	0,080	NEG	LN
59	M	0,088	NEG	LN
53	M	0,089	NEG	LN
57	Ž	0,092	NEG	LN
75	M	0,093	NEG	LN
62	Ž	0,096	NEG	LN
62	Ž	0,100	POZ	RP
49	Ž	0,102	POZ	RP
33	Ž	0,104	POZ	RP
79	M	0,140	POZ	RP
56	M	0,154	POZ	RP
51	Ž	0,167	POZ	RP
53	M	0,170	POZ	RP
69	M	0,176	POZ	RP
63	M	0,179	POZ	RP
74	Ž	0,181	POZ	RP
61	M	0,190	POZ	RP
68	M	0,192	POZ	RP
55	Ž	0,192	POZ	RP
50	Ž	0,204	POZ	RP
34	Ž	0,208	POZ	RP
57	M	0,222	POZ	RP
44	M	0,240	POZ	RP
64	M	0,273	POZ	RP
71	Ž	0,292	POZ	RP
49	M	0,339	POZ	RP
48	Ž	0,401	POZ	RP
50	Ž	0,401	POZ	RP
53	Ž	0,413	POZ	RP
79	M	0,430	POZ	RP
60	Ž	0,442	POZ	RP
64	M	0,454	POZ	RP
59	M	0,463	POZ	RP
57	M	0,554	POZ	RP
50	Ž	0,585	POZ	RP
79	M	0,585	POZ	RP

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških

rakavih obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

34	M	0,727	POZ	RP
61	Ž	0,820	POZ	RP
43	Ž	0,867	POZ	RP
52	M	0,959	POZ	RP
65	M	1,115	POZ	RP
49	Ž	1,662	POZ	RP
58	M	1,860	POZ	RP
32	M	3,166	POZ	RP
56	Ž	3,572	POZ	RP

Priloga B: Prikaz celotnih rezultatov ELISA testa pri vseh bolnikih z levkemijo

STAROST	SPOL	STK1 ELISA (ng/mL)	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
50	M	0,059	NEG	LN
48	M	0,073	NEG	LN
62	Ž	0,077	NEG	LN
57	Ž	0,092	POZ	RP
62	Ž	0,096	POZ	RP
62	Ž	0,100	POZ	RP
55	Ž	0,192	POZ	RP
34	Ž	0,208	POZ	RP
44	M	0,240	POZ	RP
60	Ž	0,442	POZ	RP
50	Ž	0,585	POZ	RP
34	M	0,727	POZ	RP
52	M	0,959	POZ	RP
58	M	1,860	POZ	RP

Priloga C: Prikaz celotnih rezultatov ELISA testa pri vseh bolnikih z limfomom

Starost	Spol	STK1 ELISA (ng/mL)	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
77	Ž	0,080	NEG	LN
33	Ž	0,104	POZ	RP
51	Ž	0,167	POZ	RP
49	M	0,339	POZ	RP
79	M	0,585	POZ	RP
43	Ž	0,867	POZ	RP
65	M	1,115	POZ	RP

Priloga D: Prikaz celotnih rezultatov ELISA testa pri kontrolni skupini (vrednotenje ELISA testa pri vseh bolnikih, le pri bolnikih z levkemijo in le pri bolnikih z limfomom)

Starost	Spol	STK1 ELISA (ng/mL)	VREDNOTENJE TESTA PRI VSEH BOLNIKIH		VREDNOTENJE TESTA PRI LEVKEMIJI		VREDNOTENJE TESTA PRI LIMFOMU	
			POZ/NEG	INTERPRETACIJA	POZ/NEG	INTERPRETACIJA	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
37	M	0,046	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,05	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	M	0,052	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,052	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	0,053	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
46	F	0,055	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
49	M	0,055	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	F	0,056	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	F	0,056	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	M	0,056	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
53	F	0,058	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,059	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
57	F	0,059	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
44	F	0,061	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	F	0,061	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
59	M	0,061	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	M	0,062	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,062	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	0,062	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	0,062	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	F	0,064	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,064	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
54	M	0,064	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
55	M	0,064	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
62	F	0,064	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	M	0,067	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
44	F	0,067	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
59	F	0,067	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	0,068	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	M	0,07	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	F	0,07	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
57	M	0,07	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
48	F	0,071	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
58	M	0,071	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	M	0,073	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	M	0,073	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	0,073	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	F	0,074	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	F	0,074	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,074	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,074	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
49	F	0,076	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških rakavih obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

32	M	0,077	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	0,079	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	M	0,079	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	F	0,079	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	0,079	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	0,08	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
34	F	0,08	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	F	0,08	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	M	0,08	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	M	0,081	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	F	0,081	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,081	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
32	M	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	M	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	M	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
56	M	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
59	F	0,083	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	F	0,084	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	F	0,084	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
50	M	0,084	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
23	M	0,086	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	F	0,086	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	F	0,086	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
22	F	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
31	M	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	M	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
53	F	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	M	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
54	F	0,087	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	M	0,09	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
48	M	0,09	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,09	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,09	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
56	F	0,09	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	F	0,092	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
34	M	0,092	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
27	F	0,093	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
43	M	0,093	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
32	M	0,095	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
52	F	0,095	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
28	F	0,096	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
63	M	0,096	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
22	M	0,098	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
36	M	0,098	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
20	F	0,099	NEG	RN	POZ	LP	NEG	RN
41	F	0,1	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
25	F	0,101	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
31	F	0,101	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
55	M	0,101	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
33	M	0,158	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
29	F	0,167	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških raka v obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

37	M	0,167	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
37	M	0,167	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
34	F	0,174	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
27	F	0,176	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
50	M	0,176	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
37	M	0,183	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
23	M	0,201	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
37	F	0,204	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
39	F	0,204	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
40	M	0,205	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
33	M	0,206	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
41	M	0,206	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
49	M	0,206	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
26	M	0,211	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
40	M	0,217	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
52	M	0,221	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
51	F	0,31	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
28	F	0,422	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
52	F	1,17	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
21	M	1,468	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP

Priloga E: Prikaz celotnih rezultatov metode CLIA pri vseh izbranih bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi

STAROST	SPOL	S-TK [U/L]	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
71	F	0,5	NEG	LN
48	M	4,1	NEG	LN
84	M	4,8	NEG	LN
69	M	5,1	NEG	LN
62	F	5,65	POZ	RP
80	M	5,75	POZ	RP
85	M	6,05	POZ	RP
62	F	6,2	POZ	RP
49	F	6,25	POZ	RP
75	M	6,4	POZ	RP
59	M	6,55	POZ	RP
64	M	6,6	POZ	RP
44	M	7	POZ	RP
63	M	7,3	POZ	RP
57	F	8,05	POZ	RP
62	F	8,2	POZ	RP
79	M	8,3	POZ	RP
51	F	9,3	POZ	RP
33	F	9,95	POZ	RP
77	F	10	POZ	RP
64	M	11,05	POZ	RP
79	M	12,35	POZ	RP
74	F	13,65	POZ	RP
55	F	14,55	POZ	RP

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških raka v obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

60	F	15,25	POZ	RP
63	M	15,45	POZ	RP
57	M	16,1	POZ	RP
52	M	16,2	POZ	RP
59	M	18,15	POZ	RP
50	M	18,6	POZ	RP
34	F	19,35	POZ	RP
48	F	26,75	POZ	RP
61	M	27,3	POZ	RP
50	F	31,85	POZ	RP
50	F	33,75	POZ	RP
65	M	34,4	POZ	RP
57	M	34,55	POZ	RP
53	F	36,25	POZ	RP
56	M	42,25	POZ	RP
34	M	50,7	POZ	RP
68	M	54,15	POZ	RP
61	F	55,3	POZ	RP
43	F	60,8	POZ	RP
49	M	60,85	POZ	RP
32	M	100	POZ	RP
49	F	100	POZ	RP
50	F	100	POZ	RP
56	F	100	POZ	RP
58	M	100	POZ	RP
63	M	100	POZ	RP
79	M	100	POZ	RP

Priloga F: Prikaz celotnih rezultatov metode CLIA pri vseh bolnikih z levkemijo

STAROST	SPOL	S-TK [U/L]	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
48	M	4,1	NEG	LN
62	Ž	5,65	POZ	RP
62	Ž	6,2	POZ	RP
44	M	7	POZ	RP
57	Ž	8,05	POZ	RP
62	Ž	8,2	POZ	RP
55	Ž	14,55	POZ	RP
60	Ž	15,25	POZ	RP
52	M	16,2	POZ	RP
50	M	18,6	POZ	RP
34	Ž	19,35	POZ	RP
34	M	50,7	POZ	RP
50	Ž	100	POZ	RP
58	M	100	POZ	RP

Priloga G: Prikaz celotnih rezultatov metoda CLIA pri vseh bolnikih z limfomom

STAROST	SPOL	S-TK [U/L]	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
51	Ž	9,3	POZ	RP
33	Ž	9,95	POZ	RP
77	Ž	10	POZ	RP
65	M	34,4	POZ	RP
43	Ž	60,8	POZ	RP
49	M	60,85	POZ	RP
79	M	100	POZ	RP

Priloga H: Prikaz celotnih rezultatov metode CLIA pri kontrolni skupini (vrednotenje metode CLIA pri vseh bolnikih, le pri bolnikih z levkemijo in le pri bolnikih z limfomom)

STAROST	SPOL	S-TK [U/L]	VREDNOTENJE TESTA PRI VSEH BOLNIKIH		VREDNOTENJE TESTA PRI LEVKEMIJI		VREDNOTENJE TESTA PRI LIMFOMU	
			POZ/NEG	INTERPRETACIJA	POZ/NEG	INTERPRETACIJA	POZ/NEG	INTERPRETACIJA
20	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
23	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
27	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
27	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
28	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
29	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
32	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
34	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
36	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
44	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
49	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
49	M	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških rakavih obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

53	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
54	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
57	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
62	F	0,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	F	0,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
44	F	0,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
55	M	0,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	M	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	F	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	F	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	M	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	0,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	M	0,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	M	0,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	F	0,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
56	M	0,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	M	1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
46	F	1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	1,1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	M	1,2	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	1,2	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
42	M	1,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
47	F	1,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
26	M	1,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	1,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	F	1,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	M	1,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
31	M	1,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
57	M	1,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
38	F	2,1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
48	F	2,2	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	2,3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	F	2,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	M	2,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	2,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
53	F	2,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
59	F	2,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
32	M	3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	3,1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	M	3,3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
33	M	3,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
41	M	3,5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
50	M	3,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
59	M	3,7	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
22	F	3,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
23	M	3,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	F	3,8	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
25	F	3,9	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	M	3,9	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
35	F	4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN

Islamović S., Primerjava rezultatov aktivnosti in koncentracije serumske timidin kinaze pri izbranih hematoloških raka v obolenjih

mag. naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

58	M	4,1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
43	M	4,2	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
34	F	4,3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
63	M	4,3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
37	M	4,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	M	4,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
40	M	4,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	F	4,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
39	M	4,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
51	F	4,6	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
32	M	4,9	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
34	M	5	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	F	5,1	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
52	M	5,3	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
50	M	5,4	NEG	RN	NEG	RN	NEG	RN
49	M	6	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
56	F	6	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
54	M	6,2	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
48	M	7,3	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
21	M	7,4	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
22	M	7,4	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
33	M	7,6	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
38	M	7,8	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
37	M	7,9	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
37	M	8,3	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
39	F	8,3	POZ	LP	POZ	LP	NEG	RN
59	F	9,4	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
55	M	10	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
37	F	12,7	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
31	F	14,6	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
41	M	14,6	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
51	F	21,4	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP
28	F	50,7	POZ	LP	POZ	LP	POZ	LP