

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ŠNELJER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ŠNELJER

**PROUČEVANJE GENETSKIH IN METABOLNIH DEJAVNIKOV
OBČUTLJIVOSTI LIMFOBLASTOIDNIH CELIC NA TIOPURINE**

**GENETIC AND METABOLIC FACTORS INFLUENCING
RESPONSES OF LYMPHOBLASTOID CELLS TO THIOPURINES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na katedri za Klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom asist. Dunje Urbančič.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan za sodelovanje in pomoč pri nastajanju magistrskega dela. Velika zahvala gre somentorici asist. Dunji Urbančič za strokovno vodenje, pomoč pri laboratorijskem delu in pisanju magistrske naloge. Hvala tudi moji družini in prijateljem za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom asist. Dunje Urbančič.

Tina Šneljer

Komisija:

Predsednik: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Somentorica: asist. Dunja Urbančič, mag. farm.

Član: izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

VSEBINA**Kazalo vsebine**

1. UVOD	- 1 -
1.1 Tiopurini	- 1 -
1.1.1 Vloga tiopurinov pri zdravljenju levkemij in avtoimunskih bolezni	- 2 -
1.1.2 Presnova tiopurinov	- 3 -
1.1.3 Mehanizem delovanja tiopurinov	- 5 -
1.1.4 Genetski dejavniki odziva na terapijo s tiopurini	- 6 -
1.2 Tiopurin-S-metiltransferaza	- 7 -
1.2.1 Vpliv genetskih polimorfizmov na aktivnost TPMT	- 8 -
1.2.2 TPMT kot farmakogenetski označevalec	- 10 -
1.2.3 Ujemanje med genotipom in fenotipom TPMT	- 11 -
1.3 Metaboliti tiopurinov	- 12 -
1.3.1 Vpliv metabolitov na klinični odziv	- 13 -
1.4 Membranski prenašalci tiopurinov	- 14 -
2. Namen dela	- 16 -
3. Materiali in metode	- 17 -
3.1 Shema dela	- 17 -
3.2 Kemikalije in reagenti	- 18 -
3.3 Pripomočki in aparature	- 19 -
3.4 Limfoblastoidne celične linije	- 20 -
3.5 Gojenje celic	- 21 -
3.6 Štetje celic	- 21 -
3.7 Določanje občutljivosti celic	- 22 -
3.7.1 Merjenje metabolne aktivnosti	- 22 -
3.7.2 Analiza celičnega cikla	- 24 -
3.8 Določanje aktivnosti TPMT	- 26 -
3.8.1 Določanje mase proteinov	- 28 -

3.9 Določanje metabolitov 6-MP	- 29 -
3.9.1 Tretiranje celic za merjenje metabolitov	- 29 -
3.9.2 Določanje metabolitov z analizo HPLC	- 30 -
3.10 Določanje izražanja genov za sekretorne prenašalce	- 31 -
3.11 Statistična obdelava podatkov.....	- 32 -
4. Rezultati in razprava.....	- 33 -
4.1 Občutljivost celic na 6-MP in 6-TG.....	- 33 -
4.1.1 Celice različnih posameznikov se različno odzovejo na tiopurine	- 33 -
4.1.2 Celice pod vplivom 6-MP ne zastanejo v nobeni od faz celičnega cikla	- 35 -
4.1.3 6-TG in 6-MP imata soroden mehanizem delovanja.....	- 37 -
4.2 Vpliv encima TPMT na občutljivost celic	- 39 -
4.2.1 Genski polimorfizmi v <i>TPMT</i> vplivajo na aktivnost encima.....	- 39 -
4.2.1 Genotip <i>TPMT</i> ne korelira z občutljivostjo celic na tiopurine.....	- 40 -
4.2.2 Aktivnost TPMT korelira z občutljivostjo celic na 6-TG.....	- 41 -
4.3 Metaboliti 6-merkaptopurina	- 42 -
4.3.1 Količina 6-MMP korelira z aktivnostjo TPMT	- 44 -
4.3.1 Občutljivost celic je povezana s količino nastalih 6-TGN	- 46 -
4.4 Izražanje prenašalca ABCB1 korelira z občutljivostjo celic na 6-MP.....	- 48 -
4.5 Preučitev posameznih primerov.....	- 50 -
4.5.1 Pričakovan odziv na tiopurine glede na aktivnost in genotip TPMT	- 50 -
4.5.1 Nepričakovan odziv na 6-MP glede na genotip in aktivnost TPMT	- 51 -
4.6 Prihodnost napovedi odziva na terapijo s tiopurini.....	- 54 -
5. Sklep.....	- 55 -
6. Literatura	- 56 -
7. Priloge	- 65 -
7.1 Priloga 1.....	- 65 -
7.2 Priloga 2.....	- 69 -
7.3 Priloga 3.....	- 70 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturne formule endogenih purinskih baz in tiopurinov.	- 1 -
Slika 2: Shema zdravljenja akutne limfoblastne levkemije.....	- 3 -
Slika 3: Shema presnove tiopurinov.....	- 4 -
Slika 4: Shema treh mehanizmov delovanja tiopurinov.....	- 5 -
Slika 5: Shema kromosoma 6 in lokacija gena za TPMT.	- 7 -
Slika 6: Shema najpogostejših alelov humanega TPMT gena.	- 8 -
Slika 7: Shema nastanka 6-metilmerkaptopurinskih in 6-tiogvaninskih nukleotidov tekom presnove 6-MP.....	- 13 -
Slika 8: Shema normalnega in okvarjenega delovanja prenašalcev ABC.....	- 14 -
Slika 9: Shema metod dela in njihov namen.	- 17 -
Slika 10: Shema štetja celic na Neubauerjevem hemocitometru.....	- 22 -
Slika 11: Shema določanja metabolne aktivnosti s testom MTS.	- 23 -
Slika 12: Shema celičnega cikla.....	- 24 -
Slika 13: Faze celičnega cikla določene s pretočno citometrijo.....	- 25 -
Slika 14: Shema določanja aktivnosti TPMT in mase proteinov.	- 28 -
Slika 15: Shema tretiranja celic za določanje metabolitov.....	- 29 -
Slika 16: Shema določanja metabolitov.	- 31 -
Slika 17: Razvrstitev metabolne aktivnosti po izpostavitvi celic LCL 10 μ M 6-MP in 1 μ M 6-TG..	- 34 -
Slika 18: Primerjava rezultatov analize celičnega cikla in merjenja MA.....	- 36 -
Slika 19: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla.	- 37 -
Slika 20: Korelacija med občutljivostjo celic na izpostavitve 10 μ M 6-MP in 1 μ M 6-TG.....	- 37 -
Slika 21: Primerjava toksičnosti 6-MP in 6-TG.....	- 38 -
Slika 22: Aktivnost TPMT v celicah LCL glede na genotip <i>TPMT</i>	- 39 -
Slika 23: Občutljivost celic LCL na 6-MP in 6-TG glede na genotip <i>TPMT</i>	- 41 -
Slika 24: Metabolna aktivnost celic LCL pri 1 μ M 6-TG v odvisnosti od aktivnosti TPMT.	- 42 -
Slika 25: Celokupna količina 6-TGN in 6-MMP v posameznem LCL-u.	- 43 -

Slika 26: Količina 6-TGN v mediju in v celicah LCL v odvisnosti od časa.	- 44 -
Slika 27: Množina 6-MMP glede na genotip <i>TPMT</i>	- 45 -
Slika 28: Množina 6-TGN glede na genotip <i>TPMT</i>	- 46 -
Slika 29: Občutljivost celic LCL v odvisnosti od količine celokupnega 6-TGN.	- 46 -
Slika 30: Občutljivost celic v odvisnosti od hitrosti nastajanja 6-TGN.	- 47 -
Slika 31: Izražanje genov <i>ABCB1</i> , <i>ABCC4</i> in <i>ABCC5</i>	- 48 -
Slika 32: Občutljivost celic LCL v odvisnosti od izražanja <i>ABCB1</i>	- 49 -
Slika 33: Grafi odvisnosti metabolne aktivnosti od koncentracije 6-MP in 6-TG.	- 68 -
Slika 34: Metabolna aktivnost 72 h in 96 h po izpostavitvi 6-MP.	- 69 -

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljene kemikalije in reagenti	- 18 -
Preglednica II: Uporabljeni pripomočki in aparature	- 19 -
Preglednica III: Seznam 26 limfoblastoidnih celičnih linij.	- 21 -
Preglednica IV: Reagenti za pripravo celic na merjenje celičnega cikla.	- 26 -
Preglednica V: Priprava pufrov za določanje aktivnosti <i>TPMT</i>	- 27 -
Preglednica VI: Priprava osnovne zmesi za qPCR reakcijo.	- 32 -
Preglednica VII: Temperaturni program inkubacije v cikličnem termostatu.	- 32 -
Preglednica VIII: Preglednica korelacij.	- 70 -

POVZETEK

Tiopurini so pomembna skupina protitumornih in imunosupresivnih zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo v klinični praksi že preko 50 let. Zaradi ozkega terapevtskega indeksa in inter-individualnih razlik med pacient, so neželeni učinki ali neodzivnost na terapijo pogosti. Najpomembnejši farmakogenomski biološki označevalec pri zdravljenju s tiopurini, na osnovi katerega v klinični praksi najpogosteje prilagodijo odmerke posamezniku, je tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT). Kljub dobri korelaciji genskih polimorfizmov in posledično aktivnosti encima na izid zdravljenja, vseh primerov odziva na terapijo s tiopurini ne moremo pojasniti samo s poznavanjem statusa TPMT.

V sklopu magistrske naloge smo na modelu 26 limfoblastoidnih celičnih linij (LCL), pridobljenih iz limfocitov zdravih krvodajalcev, proučevali dejavnike, ki bi izboljšali napoved odziva na tiopurine. V prvem delu smo z merjenjem metabolne aktivnosti ugotovili, da celice izkazujejo močno inter-individualno raznolikost v občutljivosti na 6-merkaptopurin (6-MP) in 6-tiogvanin (6-TG). Variabilnost v odgovoru smo potrdili še z analizo celičnega cikla na izbranih LCL-ih: zelo občutljivem, normalno občutljivem in neodzivnem. Pri celicah LCL, ki so bile odzivne oziroma občutljive na 6-MP, smo opazili sicer večji delež celic v fazah celične smrti kot pri neodzivnih celicah, nismo pa opazili pomembnega zastoja celic v nobeni od faz celičnega cikla.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, kako vpliva TPMT na odziv celic po izpostavitvi tiopurinom. Lizatom celic smo dodali 6-MP ter z analizo HPLC določili količino nastalega 6-metilmerkaptopurina (6-MMP) in izračunali aktivnost TPMT. Prisotnost polimorfizmov je statistično značilno znižala aktivnost TPMT. Ugotovili smo, da nižja aktivnost TPMT pomeni večjo občutljivost celic na 6-TG, ne pa tudi na 6-MP.

V iskanju dejavnika občutljivosti na 6-MP smo v naslednjem koraku izpostavili celice LCL-ov 10 μ M 6-MP za obdobje 24-72 h in z analizo HPLC določili količino nastalih metabolitov: 6-MMP in 6-tiogvaninskih nukleotidov (6-TGN). Količina nastalega 6-MMP je pozitivno korelirala z aktivnostjo TPMT, medtem ko je količina 6-TGN po 48 in 72 urah pozitivno korelirala s toksičnostjo 6-MP. Prav tako je višja hitrost nastajanja 6-TGN pomenila večjo toksičnost 6-MP.

Ker mnoge farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti tiopurinov še vedno ostajajo neznane, smo preverili dejavnike občutljivosti na 6-MP tudi na nivoju izražanja sekretornih prenašalcev. Z analizo qPCR smo določili izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* v 38 LCL-ih in ugotovili, da višje izražanje *ABCB1* pomeni manjšo toksičnost 6-MP za celice LCL.

Naši rezultati potrjujejo pomen aktivnosti TPMT pri občutljivosti na 6-TG ter hkrati izpostavljajo pretvorbo 6-MP do njegovih aktivnih metabolitov in izražanje transporterja *ABCB1* kot pomembna dejavnika občutljivosti na 6-MP. S tem naslavlja nadaljnje raziskave h klinični validaciji *ABCB1* kot farmakogenetskega biološkega označevalca, ki bi izboljšal napoved zdravljenja s tiopurini.

Ključne besede: tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT), 6-merkaptopurin, 6-tiogvanin, metaboliti 6-MP, *ABCB1*.

ABSTRACT

Thiopurines represent important group of anti-neoplastic and immunosuppressive drugs in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and autoimmune diseases for over 50 years. Due to narrow therapeutic index and inter-individual differences, side effects or thiopurine resistance are frequent. In clinical practice thiopurine dose is adjusted according to TPMT activity or TPMT genotype. However, not all responses to thiopurines can be explained only on the basis of TPMT activity or genotype.

We studied genetic and metabolic factors, influencing the response to thiopurines on lymphoblastoid cell line (LCL) model. Wide intra-individual differences in metabolic activities of LCLs were observed, when the cells were treated with 6-mercaptopurine (6-MP) or 6-thioguanine (6-TG). Additionally, cell cycle analysis of LCLs with extreme metabolic activities corroborated higher amount of cells in Sub-G1 phase in sensitive LCL compared to resistant LCL after treatment with 5 μ M 6-MP. Based on results from cell cycle analysis, we conclude that 6-MP did not induce arrest in any of the phases of cell cycle.

To analyse the involvement of TPMT in response to 6-MP, we next measured TPMT activity in LCLs. 6-methylmercaptopurine (6-MMP) concentration was determined using HPLC method in cell lysates after incubation with 6-MP, and TPMT activity was calculated. Lower TPMT activity was associated with higher sensitivity of LCLs to 6-TG but not to 6-MP.

Since TPMT was not primary factor of susceptibility to 6-MP, we pursued the research towards investigation of its metabolites after the exposure of 18 LCLs to 10 μ M 6-MP for 24-72 h. 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-MMP in cell lysates and culture medium were measured by HPLC method. Amount of 6-MMP positively correlated with TPMT activity, while amount of 6-TGN after 48 and 72 hours significantly correlated with cytotoxicity of 10 μ M 6-MP. The rate of 6-TGN formation also negatively correlated with metabolic activity.

Lastly, we evaluated the gene expression of efflux transporters, which have been previously reported to be involved in secretion of thiopurines or other anti-neoplastic drugs. Expression of *ABCB1*, *ABCC4* and *ABCC5* was performed on cDNA samples from 38 LCLs by qPCR assay. *ABCB1* expression positively correlated with metabolic activity of LCLs after exposure to 2.5 and 5 μ M 6-MP.

Our findings highlight the importance of TPMT activity on susceptibility to 6-TG and expose 6-MP transformation towards active 6-TGN metabolites and expression of *ABCB1* transporter as markers for response of LCLs to 6-MP. Further studies should be performed leading to clinical validation of *ABCB* as potential new pharmacogenetic biomarker.

Key words: thiopurine-S-methyltransferase (TPMT), 6-mercaptopurine (6-MP), 6-thioguanine (6-TGN), *ABCB1*.

SEZNAM OKRAJŠAV

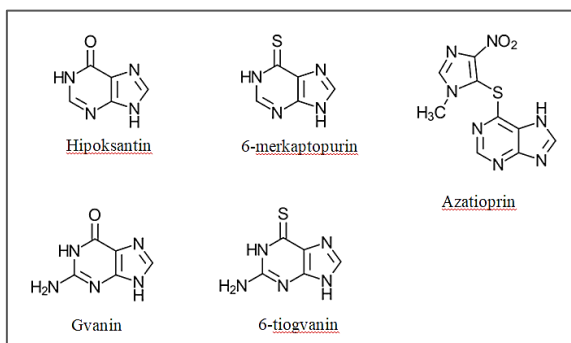
6-MMP	6-metilmerkaptopurin
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiogvanin
6-TGN	6-tiogvaninski nukleotidi
ABCB1	prenašalec z domeno za vezavo ATP, poddružina B, član 1
ABCC4	prenašalec z domeno za vezavo ATP, poddružina C, član 4
ABCC5	prenašalec z domeno za vezavo ATP, poddružina C, član 5
ALL	akutna limfoblastna levkemija
AZA	azatioprin
DNPS	<i>de novo</i> sinteza purinov
dTGTP	deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat
GMPS	gvanozinmonofosfat-sintetaza
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
HPRT	hipoksantin/gvanin-fosforiboziltransferaza
IMPDH	inozinmonofosfat-dehidrogenaza
ITPA	inozintrifosfat-pirofosfataza
LCL	limfoblastoidna celična linija
MDR	odpornost proti več snovem (<i>angl.</i> multiple drug resistance)
MeTIDP	6-metiltioinozin-5'-difosfat
MeTIMP	6-metiltioinozin-5'-monofosfat
MeTITP	6-metiltioinozin-5'-trifosfat
MMR	popravljalni mehanizem DNA (<i>angl.</i> mismatch repair)
MTHFR	metilentetrahidrofolat-reduktaza
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, notranja sol]
PPAT	fosforibozilpirofosfat-amidottransferaza
PRPP	fosforibozilpirofosfat
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
Rac1	signalni protein G (<i>ang.</i> Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
RBC	eritrociti (<i>angl.</i> red blood cells)
SAM	S-adenozilmetionin
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (<i>angl.</i> single nucleotide polymorphism)
TGDP	6-tiogvanozin-5'-difosfat
TGMP	6-tiogvanozin-5'-monofosfat
TGTP	6-tiogvanozin-5'-trifosfat
TIMP	6-tioinozin-5'-monofosfat
TITP	6-tioinozin-trifosfat
TPMT	tiopurin-S-metiltransferaza
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev
XO	ksantin-oksidaza

1. UVOD

Genetska raznolikost lahko vodi v nepredvidljiv in spremenljiv odziv na zdravljenje z zdravili. Na podlagi poznavanja genetskih značilnosti lahko terapijo prilagodimo posamezniku in s tem izboljšamo učinkovitost zdravila, zmanjšamo neželene učinke in izboljšamo stroškovno učinkovitost zdravljenja. Veja genetike, ki proučuje vpliv genetskih variant pri odgovoru na zdravilo, je farmakogenomika. Tiopurini so učinkovine, na katere se bolniki odzovejo zelo variabilno, saj je njihova presnova zapletena in pogojena z mnogimi genetskimi in metabolnimi dejavniki. Med najpomembnejšimi je encim tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT), katerega genetski polimorfizmi predstavljajo enega najuspešnejših primerov prenosa farmakogenomike v klinično prakso. V zadnjem desetletju so novejši visokozmogljivi genetski pristopi omogočili odkritje številnih novih genetskih polimorfizmov, ki so povezani z odzivom na tiopurine. Spoznanje, da odziv na zdravljenje s tiopurini ni odvisen samo od enega genetskega dejavnika, je spodbudilo iskanje in validacijo farmakogenetskih označevalcev, s katerimi bi lahko natančneje opredelili bolnike, ki so nagnjeni k neodzivnosti na zdravljenje ali imajo večjo verjetnost za nastanek neželenih učinkov (1,2).

1.1 Tiopurini

Leta 1951 so sintetizirali in *in vitro* preizkusili preko 100 purinov. Izkazalo se je, da zamenjava kisika z žveplom na mestu C6 gvanina in hipoksantina zavira vgradnjo endogenih purinov (3). Danes v klinični praksi uporabljajo 6-merkaptopurin (6-MP), 6-tiogvanin (6-TG) in azatioprin (AZA) (Slika 1), ki jih po anatomsko terapevtski klasifikaciji uvrščamo v skupino zdravil z delovanjem na novotvorbe in imunomodulatorje (4).



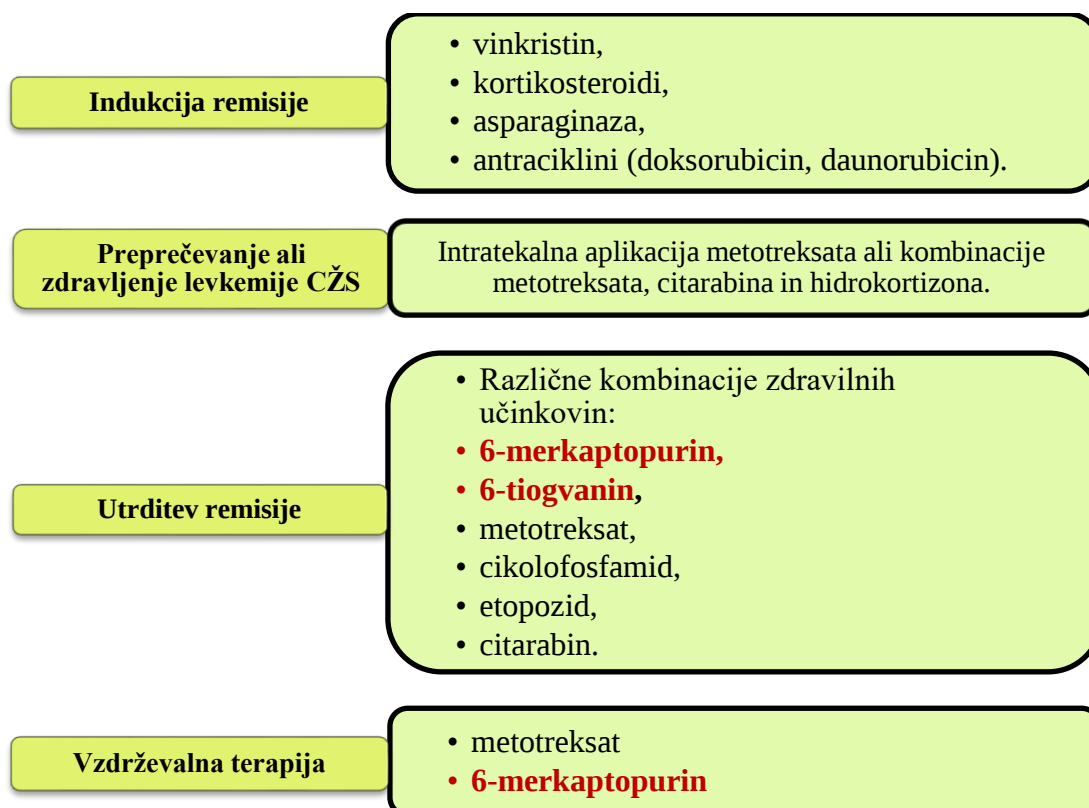
Slika 1: Strukturne formule endogenih purinskih baz in tiopurinov.
Prirejeno po (3).

1.1.1 Vloga tiopurinov pri zdravljenju levkemij in avtoimunskih bolezni

Uvedba tiopurinov v terapijo je pomenila velik napredek v zdravljenju mnogih bolezni. Tiopurine še danes uporabljajo v terapiji rakavih bolezni za zdravljenje akutne limfoblastne levkemije (ALL), kot imunosupresive pri presaditvi organov, pri zdravljenju avtoimunskih bolezni, kot so vnetna črevesna bolezen (ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen), revmatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, dermatopolimiozitis, multipla skleroza in miastenija gravis (6).

Uporaba tiopurinov skupaj z ostalimi zdravili za zdravljenje ALL je preživetje povečala iz začetnih 5 % (7) na današnjih 90 % (8,9). Kompleksna shema zdravljenja ALL zajema 4 faze (Slika 2) (10). Prva je indukcija remisije, v kateri želimo doseči remisijo bolezni in traja 4-6 tednov (11). Vse sprejete smernice zdravljenja ALL vključujejo fazo zdravljenja oziroma preprečevanja levkemije centralnega živčevja, ki poteka sočasno s prvo fazo ali ves čas trajanja terapije (11,12). V stanju remisije bolezni je lahko še vedno prisoten ostanek levkemičnih celic (10), zato indukciji remisije sledi utrditev remisije, ki traja 6-9 mesecev (11). Zadnja in hkrati najdaljša je vzdrževalna terapija, ki traja najmanj 2 leti. Z njo želimo preprečiti ponovitev bolezni (11). Tiopurini se prav tako uporabljajo pri vzdrževalni terapiji vnetne črevesne bolezni in ostalih avtoimunskih bolezni (13), a daljši čas (14) in hkrati v manjšem odmerku kot pri ALL (15,16).

V primerjavi z ostalimi zdravilnimi učinkovinami, ki se uporabljajo v prvih treh fazah zdravljenja ALL, so tiopurini deležni večje pozornosti, saj je terapija z njimi dolgotrajna (17). Kot večina drugih citotoksičnih zdravilnih učinkovin imajo tudi tiopurini ozek terapevtski indeks in lahko izzovejo nekatere neželene učinke (1,5). Najpogosteje se pojavijo izpuščaji, hepatitis, mialgija, artralgijske težave, vročina, infekcije in pankreatitis (18,19). Najresnejši neželeni učinek je mielosupresija, ki je lahko smrtno nevarna (5). Omenjeni neželeni učinki so eden glavnih razlogov za prekinitev terapije s tiopurini (14). V zadnjem času je na voljo vse več bioloških zdravilnih učinkovin (npr. infliksimab, adalimumab in efalizumab) (20), ki so začele nadomeščati tiopurine ali se sočasno uporabljati z njimi (21). Kljub temu ostajajo tiopurini zaradi svoje učinkovitosti še vedno temelj vzdrževalnega zdravljenja (2).



Slika 2: Shema zdravljenja akutne limfoblastne levkemije.

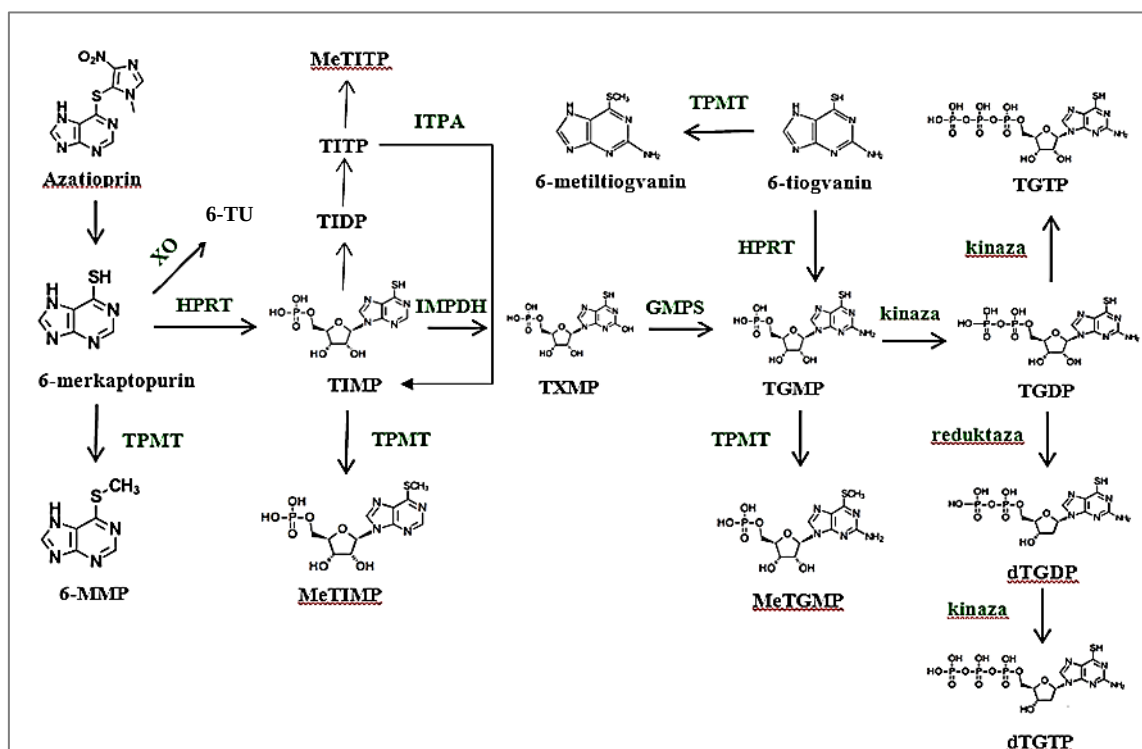
Zdravljenje ALL s protitumornimi učinkovinami poteka v štirih fazah. Tiopurine (označeni rdeče) uporabljamo v fazi utrditve remisije in vzdrževalni fazi zdravljenja, ki traja več let. CŽS: centralni živčni sistem. Povzeto po (11).

1.1.2 Presnova tiopurinov

Tiopurini so predzdravila in za svoje delovanje potrebujejo znotrajcelično pretvorbo do aktivnih 6-tiogvaninskih nukleotidov (6-TGN) (5). Azatioprin (AZA) se v delno encimski reakciji v jetrih pod vplivom glutathion-S-transferaze pretvori v 6-MP. Nadalje se 6-MP presnavlja preko treh kompetitivnih encimov: ksantin-oksidade (XO), TPMT in hipoksantin/gvanin-fosforiboziltransferaze (HPRT) (18) (Slika 3). Prva dva predstavljata deaktivacijski poti tiopurinov, medtem ko slednji začne aktivacijo proti 6-TGN.

Encim XO presnavlja 6-MP v farmakološko neaktivno 6-tiosečno kislino, medtem ko TPMT pretvori 6-MP v 6-metilmerkaptopurin (6-MMP), pri čemer je donor metilne skupine S-adenozilmetionin (SAM). HPRT presnavlja 6-MP v 6-tioinozin-5'-monofosfat (TIMP), od koder gre njegova presnova naprej po dveh poteh. Z encimom TPMT se pretvori do 6-metiltioinozin-5'-monofosfata (MeTIMP) ali pa se z inozinmonofosfat-

dehidrogenazo (IMPDH) pretvori v 6-tioksantozin-5'-monofosfat (TXMP). Ta se nadalje presnavlja z gvanozinmonofosfat-sintetazo (GMPS) v 6-tiogvanozin-5'-monofosfat (TGMP) (18). Končna pretvorba TGMP vodi preko 6-tiogvanozin-5'-difosfata (TGDP) in dveh kinaz do 6-tiogvanozin-5'-trifosfata (TGTP) ali pa se TGDP reducira in s kinazo pretvori do deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfata (dTGTP) (5,18).



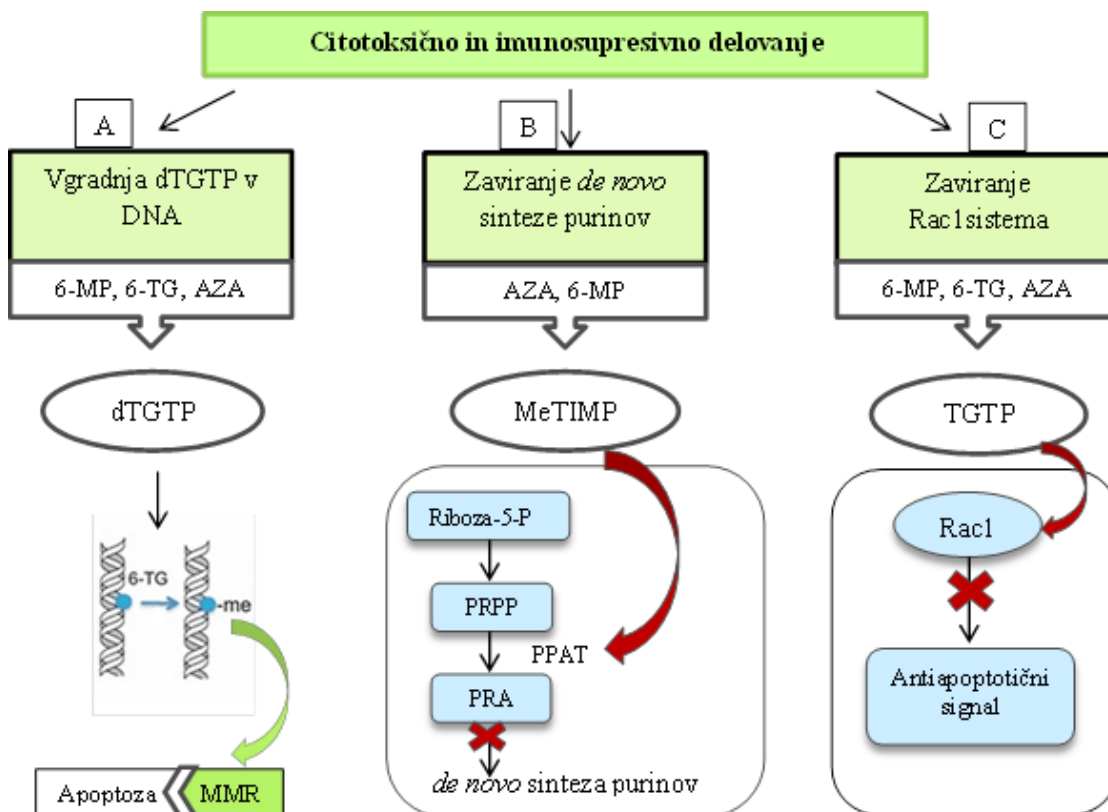
Slika 3: Shema presnove tiopurinov

6-MMP: 6-metilmerkaptopurin; dTGDP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-difosfat; dTGTP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat; GMPS: gvanozinmonofosfat-sintetaza; HPRT: hipoksantin/gvanin-fosforibosiltransferaza; IMPDH: inozinmonofosfat-dehidrogenaza; ITPA: inozintrifosfat-pirofosfataza; MeTGMP: 6-metiltiogvanozin-5'; MeTIMP: 6-metiltioinozin-5'-monofosfat; MeTITP: 6-metiltioinozin-5'-trifosfat; PPAT: fosforibozilpirofosfat-amidottransferaza; PRA: fosforibozilamin; PRPP: fosforibozilpirofosfat; TGDP: 6-tiogvanozin-5'-difosfat; TGMP: 6-tiogvanozin-5'-monofosfat; TGTP: 6-tiogvanozin-5'-trifosfat; TIDP: 6-tioinozin-5'-difosfat; TIMP: 6-tioinozin-5'-monofosfat; TITP: 6-tioinozin-5'-trifosfat; TPMT: tiopurin-S-metiltransferaza; 6-TU: 6-tiosečna kislina; TXMP: 6-tioksantozin-5'-monofosfat; XO: ksantin-oksidaza. Prirejeno po (7,22).

Presnova 6-tiogvanina (6-TG) je manj kompleksna kot presnova 6-MP (Slika 3). 6-TG se s HPRT pretvori v TGMP, ki se nadalje s kinazami ali/in reduktazami presnovi v TGTP ali dTGTP. 6-TG se deaktivira z istima encimoma kot 6-MP, in sicer se s TPMT pretvori v 6-metiltiogvanin in s XO do tiosečne kisline (5,18).

1.1.3 Mehanizem delovanja tiopurinov

Citotoksično in imunosupresivno delovanje tiopurinov je usmerjeno v programirano celično smrt (t.i. apoptozo) in inaktivacijo limfocitov (2,5,18) preko treh različnih mehanizmov, ki jih vodijo 6-TGN in metiliran produkt MeTIMP (Slika 4).



Slika 4: Shema treh mehanizmov delovanja tiopurinov.

A: Vsi tiopurini se presnovijo do dTGTP, ki se vgradi v DNA. Med podvojevanjem DNA pride do vgradnje napačne baze, kar prepozna popravljalni mehanizem DNA in sproži apoptozo limfocitov. B: Pri presnovi AZA in 6-MP nastane metiliran produkt MeTIMP, ki je inhibitor *de novo* sinteze purinov. C: Končni produkt presnove vseh tiopurinov je TGTP, ki se veže na Rac1 in zavre njegovo delovanje.

6-MP: 6-merkaptopurin; 6-TG: 6-tiogvanin; AZA: azatioprin; dTGTP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat; MMR: popravljalni mehanizem DNA; MeTIMP: 6-metiltioinozin-5'-monofosfat; PPAT: fosforibozilpirofosfat-amidotransferaza; PRA: fosforibozilamin; PRPP: fosforibozilpirofosfat; Rac1 - signalni protein G (ang. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), TGTP: 6-tiogvanozin-5'-trifosfat. Slika povzeta po (23–25).

DNA polimeraza prepozna dTGTP in ga vgradi v DNA na mesto gvanina (Slika 4A). Tiolna skupina tiopurinov je mnogo bolj reaktivna kot kisik v gvaninu in je dovzetna za neencimsko metilacijo s SAM. Metiliran produkt (me6-TG) vgrajen v matrično DNA nosi nejasen zapis za vgraditev komplementarne baze, zato se med podvojevanjem namesto citozina (C) vgradi timin (T) (5,6). Bazni par me6-TG:T prepozna mehanizem popravljanja

neujemanja v DNA (MMR – *angl.* mismatch repair) (26), katerega cilj je izrezati napačno vgrajen nukleotid v hčerinski DNA. V matrično DNA vgrajenemu me6-TG popravljalni mehanizem ne najde komplementarne baze, zato nepopravljena DNA vstopa v naslednjo S fazo celičnega cikla. Tu pride do nastanka nepravilnih struktur DNA in zastoja celičnega cikla v fazi G2. Učinek tiopurinov nastopi s časovnim zamikom, saj morajo te preiti skozi dve S fazi celičnega cikla (6).

Metiliran produkt presnove 6-MP, MeTIMP, je močan inhibitor *de novo* sinteze purinov (DNPS) (Slika 4B). Zavira namreč encim fosforibozilpirofosfat-amidottransferazo (PPAT), kar privede do kopičenja fosforibozilpirofosfata (PRPP), koencima HPRT pri pretvorbi 6-MP do TIMP (5,6). Ob povečanem nastajanju meTIMP se zmanjšajo tudi endogene zaloge ATP in GTP, ki so nujne za sintezo DNA in RNA, za celično presnovo in signaliziranje, kar povzroči upočasnitev rasti limfocitov (5,6). Ostali metilirani produkti ne veljajo za inhibitorja *de novo* sinteze purinov (27).

Tretji mehanizem delovanja vključuje neposredno apoptozo preko sistema Rac1 (Slika 4C), GTP-aze, katere naloga je regulacija številnih celičnih funkcij, med drugim tudi celične rasti. TGTP se namesto gvanozin-5'-trifosfata veže na Rac1, zavre njegovo delovanje in aktivira apoptozo (2,18,28).

1.1.4 Genetski dejavniki odziva na terapijo s tiopurini

Genetska raznolikost med posamezniki je vzrok spremenljivega odziva na terapijo (29). Poznavanje genetskih dejavnikov je še posebej pomembno pri zdravilnih učinkovinah kot so tiopurini, saj imajo te ozek terapevtski indeks (22). Prvi farmakogenetski dejavnik, ki je pojasnil odziv na tiopurine, je bil encim **TPMT** (30). Trenutno je to najpomembnejši in edini farmakogenetski označevalec, na podlagi katerega smernice zdravljenja priporočajo prilagoditev odmerka tiopurinov (22).

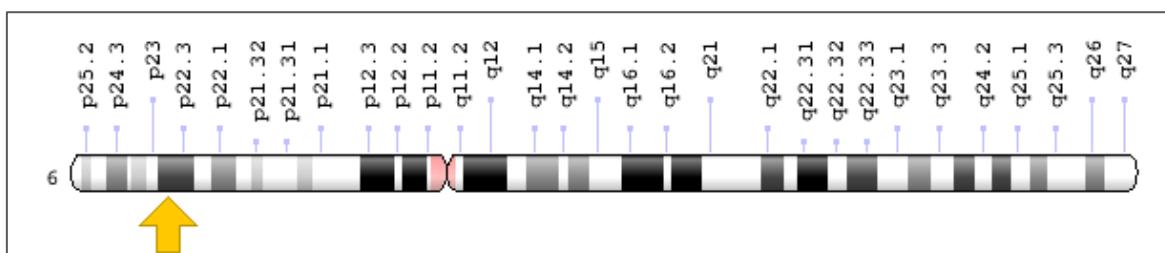
Poleg encima TPMT lahko na variabilnost odziva vplivajo tudi polimorfizmi v drugih encimih, ki so vključeni v presnovo tiopurinov. Prvi encim pri znotrajcelični presnovi 6-MP in 6-TG je **HPRT**. Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP) v *HPRT* povzročijo popolno ali delno odsotnost aktivnosti encima (31). Posamezniki s popolno odsotnostjo aktivnosti encima HPRT (Lesch-Nyhanov sindrom) niso sposobni pretvorbe tiopurinov do aktivnih metabolitov in so zato neodzivni nanje, kar je dokazano tako *in vivo* (32) kot *in*

vitro (33). Neodzivnost na tiopurine so na modelu mišjih levkemičnih celic L1210 že pripisali zmanjšani aktivnosti encima HPRT (34,35). Nadalje je bil polimorfizem c.495_496insA, ki povzroči signifikantno znižanje aktivnosti HPRT, odgovoren za nezmožnost humanih levkemičnih celic, da pretvorijo tiopurine do aktivnih 6-TGN (36).

Najnovejša študija na bolnikih z ALL kaže, da so polimorfizmi v intronih **IMPDH** povezani s slabšim preživetjem in povečanim tveganjem za ponovitev bolezni (37). Med ostalimi genetskimi variantami, ki vplivajo na zdravljenje s tiopurini, so polimorfizmi v genih za Rac1, ITPA, NUDT15 in membranske prenašalce. Genetske variante v **Rac1** so napovedovale slabši klinični odziv na tiopurine pri odraslih bolnikih z vnetno črevesno boleznijo (38). Povečano toksičnost tiopurinov lahko pripišemo polimorfizmu v encimu inozin-trifosfat-pirofosfataza (**ITPA**), ki pretvarja 6-tioinozin-trifosfat (TITP) v TIMP (Slika 3). Na vzorcu bolnikov z vnetno črevesno boleznijo so zaznali povezavo med polimorfizmi v *ITPA* in neželenimi učinki, kot so infekcije, pankreatitis in levkopenija (39). Tako *in vivo* kot *in vitro* so dokazali vpliv polimorfizma v **NUDT15** na toksičnost tiopurinov (40). Dobro pojasnjen dejavnik variabilnega odziva na terapijo so tudi **membranski prenašalci** za privzem in izmet skozi membrano celice, ki so podrobneje opisani v poglavju 1.4.1.

1.2 Tiopurin-S-metiltransferaza

Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT; EC 2.1.1.67) je citosolni encim z molekulkso maso 26kDa, ki ga sestavlja 245 aminokislin (5,7,41). *TPMT* leži na kromosomu 6 na mestu p22.3 (Slika 5), obsega 10 eksonov in 9 intronov (41).



Slika 5: Shema kromosoma 6 in lokacija gena za TPMT.

Z rumeno puščico je označeno mesto, na katerem leži *TPMT*. Prirejeno po (42).

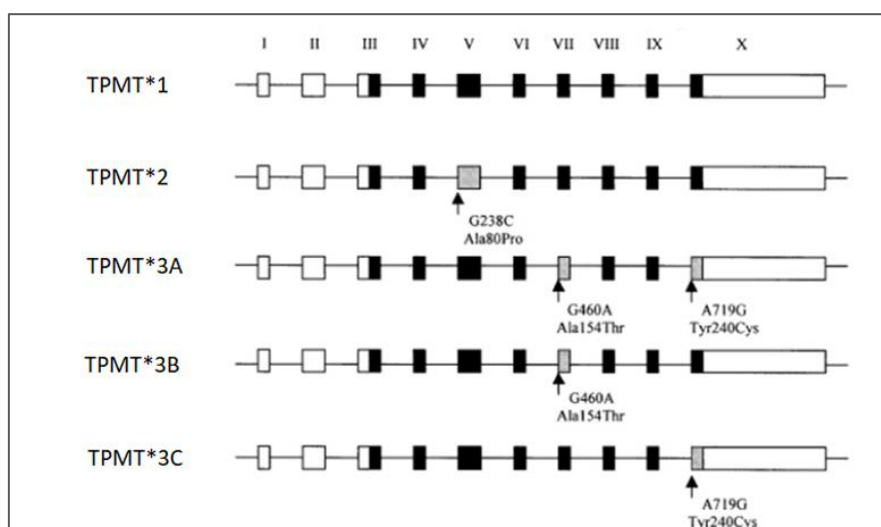
TPMT je prisoten v možganskih strukturah, ščitnici, ledvicah, koži in mnogih drugih tkivih (43,44). Katalizira S-metiliranje aromatskih in heterocikličnih spojin, med katerimi so

farmakološko najpomembnejši tiopurini (5). Predvideva se, da je fiziološka vloga TPMT pretvorba žveplovih in selenovih organskih in anorganskih spojin v manj toksične metilirane produkte (7).

1.2.1 Vpliv genetskih polimorfizmov na aktivnost TPMT

Genetski polimorfizmi encima TPMT so eden najbolj raziskanih primerov v farmakogenetiki. Dokazanih je bilo že 52 polimorfizmov *TPMT* znotraj kodirajoče regije (45). Večina teh je SNP-jev, ki spremenijo zapis za aminokislino (46). Posledica polimorfizmov je pogosto zmanjšana aktivnost TPMT (45). Več kot 95 % primerov nizke aktivnosti TPMT je posledica treh variantnih alelov *TPMT*2*, *TPMT*3A* in *TPMT*3C* (Slika 6). Med Kavkazijci je najpogostejši variantni alel *TPMT*3A*, v Afriki in Aziji pa *TPMT*3C* (2,46). Nevariantni oziroma divji tip (*angl.* wild-type) alela je definiran kot *TPMT*1*. Posamezniki, ki imajo visoko aktivnost TPMT, so običajno homozigoti za divji tip alela, tisti s srednjo aktivnostjo so heterozigoti z enim variantnim alelom, nizko aktivnost pa imajo homozigoti za varianten alel (47).

Alel *TPMT*2* je posledica polimorfizma c.238G>C, ki v TPMT povzroči zamenjavo alanina s prolinom na mestu 80 (p.Ala80Pro) (41,45). V ekspresijskem sistemu kvasovk izkazuje ta polimorfizem 100-krat nižjo aktivnost TPMT v primerjavi z divjim tipom TPMT, kar je posledica spremembe terciarne TPMT in povečanja njene nestabilnosti (48).



Slika 6: Shema najpogostejših alelov humanega TPMT gena.

Pravokotniki prikazujejo eksone v humanem TPMT genu in so označeni z rimskimi številkami od I-X, črte prikazujejo introne. Črni pravokotniki so eksoni, ki so del odprtega bralnega okvirja in se prepišejo v funkcionalen encim. Beli pravokotniki so neprevedljive regije. S sivimi pravokotniki in puščicami so označeni eksoni, ki vsebujejo polimorfizme posameznega nukleotida. Prirejeno po (5,11,13).

Alel ***TPMT*3B*** nastane zaradi polimorfizma c.460G>A. Ta polimorfizem privede do zamenjave alanina na mestu 154 s treoninom (p.Ala154Thr) (41,45), kar vodi v izgubo β vijačnice proteina TPMT (50). Alel ***TPMT*3C*** je posledica polimorfizma c.719A>G in povzroči zamenjavo tirozina s cisteinom na mestu 240 (p.Tyr240Cys) (41,45).

Alela ***TPMT*3B*** in ***TPMT*3C*** skupaj tvorita haplotip ***TPMT*3A*** (41,45). Prisotnost dveh variantnih alelov ***TPMT*3A*** ima največji vpliv na terciarno strukturo TPMT. Protein, ki ga kodira alel ***TPMT*3A***, se razgradi mnogo hitreje kot divji tip TPMT in hitreje kot encimi z variantnimi aleli ***TPMT*3C***, ***TPMT*3B*** in ***TPMT*2*** (50).

Protein, ki ga kodirata alela divjega tipa, se v normalnih pogojih pravilno zvije (46). Prisotnost variantnih alelov ***TPMT*2***, ***TPMT*3A***, ***TPMT*3C*** in ***TPMT*3B*** pa povzroči nepravilno zvitje proteina in povečano razgradnjo TPMT (7,46). Nepravilno zvit protein zapade procesu ubikvitinacije. Nanj se veže več molekul ubikvitina, kar je signal za razgradnjo v proteasomu (46). V primerjavi s proteinom divjega tipa je najbolj nestabilen ***TPMT*3A***, kar je posledica prisotnosti dveh polimorfizmov. Sledijo mu še zelo nestabilen ***TPMT*3B*** in nekoliko bolj stabilna ***TPMT*3C*** in ***TPMT*2*** (51).

Na aktivnost TPMT vplivajo tudi polimorfizmi v nekodirajočih regijah. Eden od proučevanih polimorfizmov v promotorski regiji je območje z variabilnim številom tandemskih ponovitev (VNTR). Najpogostejša sta alela s štirimi (VNTR*V4) in petimi (VNTR*V5) ponovitvami. Na vzorcu 191 posameznikov so dokazali negativno korelacijo med številom ponovitev na obeh alelih in aktivnostjo TPMT (52). V primerjavi s polimorfizmi v kodirajoči regiji imajo VNTR najverjetneje majhen vpliv na aktivnost TPMT (39).

1.2.2 TPMT kot farmakogenetski označevalec

Določanje genotipa *TPMT* je široko uporabljeno in stroškovno učinkovito farmakogenetsko testiranje (2), ki ga priporoča FDA (Food and Drug Administration; ameriška vladna ustanova za nadzorovanje hrane in zdravil) (53) ter mnoge smernice zdravljenja s tiopurini (54). V Veliki Britaniji je testiranje *TPMT* obvezno pri otrocih in mladostnikih pred uvedbo zdravljenja ALL s tiopurini (55). Namen testiranja *TPMT* je predvsem opredelitev bolnikov z nizko aktivnostjo *TPMT* (54). Nizka aktivnost *TPMT* pomeni zmanjšan obseg deaktivacijske poti tiopurinov in kopičenje večjih količin aktivnih metabolitov, kar poveča tveganje za toksične učinke tiopurinov. Homozigoti za variantna alela imajo skoraj 100 % verjetnost za nastanek mielosupresije znotraj nekaj tednov po začetku terapije s standardnim odmerkom (56), zato smernice priporočajo, da prejmejo le 10 % standardnega odmerka tiopurinov (47). Povečano tveganje za mielosupresijo imajo tudi heterozigoti zdravljeni s standardnimi odmerki tiopurinov (56). Pri njih je odmerjanje odvisno od vrste tiopurina. Smernice Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) pri zdravljenju z AZA in 6-MP priporočajo 30-70 % standardnega odmerka in pri 6-TG 30-50 % standardnega odmerka (47). Nekateri heterozigoti lahko prenesejo standardni odmerek, zato se priporoča višanje začetnega prilagojenega odmerka tekom terapije glede na odziv posameznika (55). Na drugi strani je visoka aktivnost *TPMT* povezana s slabo odzivnostjo na terapijo. V teh primerih je potrebno povečati standardni odmerek za doseg terapevtskega učinka (47). Predvsem pri vnetni črevesni bolezni se v zadnjem obdobju pacientom z zmanjšanim odzivom na tiopurine pogosto sočasno predpisuje alopurinol, ki zmanjša deaktivacijo tiopurinov (57).

Status *TPMT* določajo z genotipizacijo *TPMT* v DNA izolirani iz levkocitov (47) ali z merjenjem aktivnosti *TPMT* v eritrocitih (46,47). Metodi imata svoje prednosti in slabosti. Genotipizacija za tri najpogostejše variantne alele *TPMT**2, *TPMT**3A in *TPMT**3C predstavlja diagnostično metodo, ki se v več kot 95 % ujema z aktivnostjo *TPMT* (7). Slabost genotipizacije je ta, da z njo ne opazimo redkih polimorfizmov v *TPMT* (47). Z genotipizacijo tudi ne prepoznamo posameznikov z zelo visoko aktivnostjo *TPMT*, ki bi potrebovali večji odmerek zdravila za zadosten klinični odziv (55).

Na drugi strani merjenje aktivnosti *TPMT* manj zanesljivo napove odziv na tiopurine v primeru nedavno prejete transfuzije krvi, regeneracije krvi po pancitopeniji in kemoterapije pri bolnikih z ALL. Našteti dejavniki lahko privedejo do povišanja aktivnosti *TPMT* (2).

Pri določanju aktivnosti obstaja večja verjetnost, da posameznika z nizko aktivnostjo TPMT uvrstimo v populacijo s srednjo aktivnostjo v primerjavi z genotipizacijo (55). Novejše študije kot bolj zanesljivo metodo za opredelitev bolnikov, ki imajo večje tveganje za nastanek mielosupresije, zato predlagajo genotipizacijo in jo priporočajo kot metodo izbora za določanje statusa TPMT pred uvedbo terapije (2,47,58).

1.2.3 Ujemanje med genotipom in fenotipom TPMT

V kavkaški populaciji se aktivnost TPMT porazdeljuje trimodalno (2). Približno 89-94 % populacije ima normalno aktivnost TPMT, 6-11 % ima srednjo aktivnost TPMT in 0,3-0,5 % nizko aktivnost TPMT (2). Več študij poroča tudi o manjšem deležu populacije z zelo visoko aktivnostjo TPMT (58,59). Zmanjšana aktivnost je pogosto posledica prisotnih polimorfizmov v genu, ki zapisuje TPMT. Kljub temu se porazdelitev encimskih aktivnosti ne ujema vedno s prisotnostjo najpogostejših polimorfizmov v *TPMT* (47).

V študiji na zdravih prostovoljcih so ugotovili 98,4 % skupno ujemanje med genotipom in fenotipom. 86 % ujemanje med srednjo aktivnostjo TPMT in heterozigotnim genotipom se je z odkritjem novih polimorfizmov povečalo na 89 %, a nesignifikantno (58). Nedavna retrospektivna študija je pokazala 93,4 % skupno ujemanje med genotipom in fenotipom TPMT in le 73,3 % znotraj heterozigotov (59). Omenjeni študiji sta pokazali različno skupno ujemanje med genotipom in fenotipom, kar je lahko posledica izbire različnih tiopurinov za merjenje količine nastalih metiliranih produktov. Nepopolno ujemanje med genotipom in fenotipom TPMT kaže na to, da na aktivnost TPMT poleg genotipa TPMT lahko vplivajo polimorfizmi, ki jih pri genotipizaciji ne določamo, še neodkriti polimorfizmi in tudi negenetski dejavniki (59). Testiranje za redke polimorfizme v *TPMT* bistveno ne izboljša ujemanja med genotipom in fenotipom, kar kaže na vpliv dodatnih dejavnikov na aktivnost TPMT (55).

Manjši prispevek k aktivnosti TPMT bi lahko imeli polimorfizmi VNTR znotraj promotorske regije (55). Na aktivnost TPMT vpliva tudi SAM, ki stabilizira strukturo TPMT in sodeluje kot metilni donor pri presnovi tiopurinov (60). Posredno vplivajo na aktivnost TPMT encimi, ki sodelujejo pri sintezi SAM. Eden najpomembnejših encimov pri prenosu metilne skupine v folatnem in metioninskem ciklu na SAM je metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR). Dva najpogostejša genska polimorfizma v

MTHFR 677C>T in 1298A>C sta povezana z nizko aktivnostjo *MTHFR* (61), kar lahko vodi v znižanje koncentracije SAM in zmanjšano stabilnost TPMT (62).

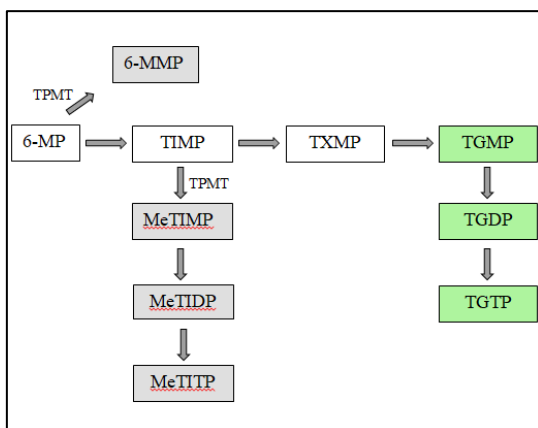
Med negenetskimi dejavniki, ki vplivajo na aktivnost TPMT, so sočasno jemanje drugih zdravilnih učinkovin, transfuzija krvi ter starost (57). Aktivnost TPMT je višja pri otrocih kot pri odraslih (63). Zdravila, ki inhibirajo TPMT, so derivati acetilsalicilne kisline, sulfasalazin in mesalazin, ki se uporabljata za zdravljenje vnetne črevesne bolezni (55).

Na podlagi testiranja TPMT lahko tako sklepamo, kaj se bo med terapijo dogajalo, ne moremo pa pojasniti vseh kliničnih odzivov na terapijo (55). Dodatno informacijo nam poda merjenje ravni metabolitov tiopurinov, ki odraža kombinacijo kompleksnih genetskih in drugih dejavnikov, ki so vpleteni v presnovo tiopurinov (2,55).

1.3 Metaboliti tiopurinov

Spremljanje koncentracije zdravil (TDM – *angl.* therapeutic drug monitoring) je na področju uporabe tiopurinov relativno novo področje (64). Kljub temu je v klinični praksi določanje nivoja celokupnih metiliranih metabolitov in 6-tiogvaninskih metabolitov (Slika 7) v eritrocitih (RBC - *angl.* red blood cells) relativno pogosto, predvsem pri avtoimunskih boleznih (2,65). Spremljanje ravni metabolitov se priporoča po uvajanju terapije, pred prilagoditvijo odmerka, v času remisije bolezni, pri pojavu neželenih učinkov, pri sočasnem jemanju drugih zdravil, ki vplivajo na tiopurine, pri sumu na nesodelovanje pacienta, pri pacientih z nizko aktivnostjo TPMT ter za nadzor, ali je prišlo tekom terapije do spremembe aktivnosti TPMT (66).

Terapevtsko območje za 6-TGN je interval vrednosti med 235 in 450 pmol/8x10⁸ RBC (2,64). Nad zgornjo mejo tega intervala se poveča verjetnost za nastanek mielosupresije (59). Koncentracije metiliranih metabolitov 6-MMP nad 5700 pmol/8x10⁸ RBC povečajo tveganje za hepatotoksičnost (67) in neodzivnost na tiopurine (68). Če zaznamo koncentraciji 6-TGN in 6-MMP, ki sta drastično nižji od 230 pmol/8x10⁸ RBC, lahko posumimo na nesodelovanje pacienta pri zdravljenju. Nivo metabolitov poda tudi informacijo o aktivnosti TPMT. Ob visokih koncentracijah 6-TGN nad 450 pmol/8x10⁸ RBC in hkrati zelo nizkih koncentracijah 6-MMP je verjetno aktivnost TPMT zelo nizka. Zelo visoko razmerje 6-MMP/6-TGN nasprotno nakazuje na visoko aktivnost TPMT (66).



Slika 7: Shema nastanka 6-metilmerkaptopurinskih in 6-tiogvaninskih nukleotidov tekom presnove 6-MP.

Sivo obarvani kvadrati predstavljajo 6-metilmerkaptopurine (6-MMP), zeleno obarvani pa 6-tiogvaninske nukleotide (6-TGN). 6-MP: 6-metilmerkaptopurin; 6-MMP: 6-metilmerkaptopurin; 6-TG: 6-tiogvanin; MeTIDP: 6-metiltioinozin-5'-difosfat; MeTIMP: 6-metiltioinozin-5'-monofosfat; MeTITP: 6-metiltioinozin-5'-trifosfat; TGDP: 6-tiogvanozin-5'-difosfat; TGMP: 6-tiogvanin-5'-monofosfat; TGTP: 6-tiogvanozin-5'-trifosfat, TIMP: 6-tioinozin-5'-monofosfat; TXMP: 6-tioksantozin-5'-monofosfat. Prirejeno po (64).

1.3.1 Vpliv metabolitov na klinični odziv

Tiopurini izkazujejo svoje učinke predvsem preko 6-TGN. Učinkovitost tiopurinov je povezana s količino 6-TGN tako pri odmerjanju glede na telesno težo (69), kot tudi pri odmerjanju, ki je prilagojeno količini izmerjenih 6-TGN (70). Hkrati količina 6-TGN korelira z neželenimi učinki, predvsem levkopenijo (67). Na drugi strani raven 6-MMP ne korelira z odzivom na tiopurine, povezana pa je s hepatotoksičnostjo (67). Približno 20 % pacientov zdravljenih s tiopurini izkazuje nezadosten odziv na terapijo s tiopurini (14). Velik delež posameznikov te skupine v večji meri tvori 6-MMP in ima običajno nizke koncentracije 6-TGN (68). S povečanjem odmerka pri teh posameznikih velikokrat ne dosežemo terapevtskega območja 6-TGN, še dodatno pa se povišajo koncentracije 6-MMP (56,71). Rešitev za tovrstne primere je lahko razdelitev dnevnega odmerka tiopurinov na več odmerkov ali sočasno jemanje nizkega odmerka tiopurinov z alopurinolom (2).

Več študij je proučevalo vpliv količine 6-TGN na remisijo bolezni, vendar študije niso enotne. Na eni strani so študije pri bolnikih z vnetno črevesno boleznijo pokazale, da imajo tisti z remisijo bolezni signifikantno višje koncentracije 6-TGN v primerjavi s tistimi z aktivno obliko bolezni (72). Nasprotno je imelo 58 % pacientov z remisijo bolezni koncentracije 6-TGN nižje od $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RKC}$, ki predstavlja spodnjo mejo terapevtskega območja (65). V takšne študije je lahko vključenih veliko pacientov, ki so v

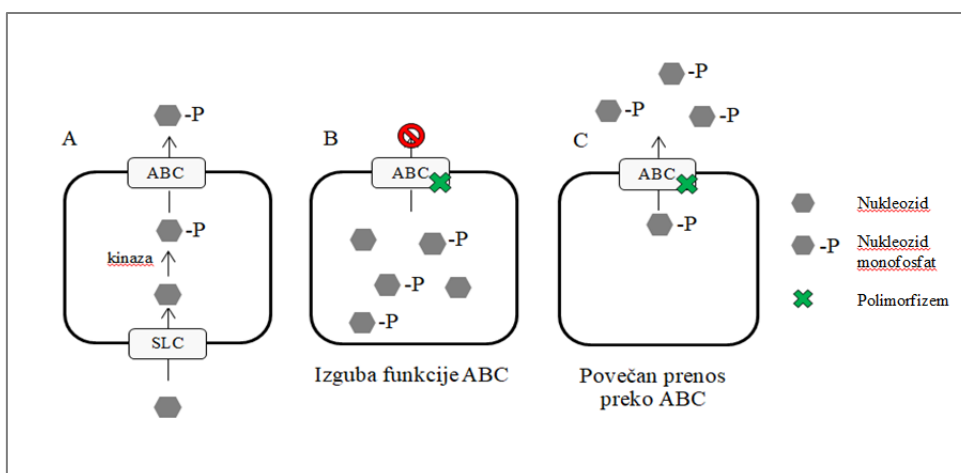
stanju remisije neodvisno od terapije s tiopurini, kar bi lahko bil vzrok, da je težko najti povezavo med koncentracijo 6-TGN in remisijo bolezni (73).

1.4 Membranski prenašalci tiopurinov

Uspešnost zdravljenja temelji na doseganju zadostne koncentracije zdravilne učinkovine na mestu delovanja. Eden od dejavnikov, ki vpliva na koncentracijo tiopurinov znotraj celice, so prenašalci za privzem in izmet preko membrane celice (74).

6-TG in 6-MP sta strukturna analoga gvanina oziroma hipoksantina, zato se prenašata z istimi prenašalci kot endogeni nukleotidi (5). Privzem v celico poteka z olajšano difuzijo preko prenašalcev iz družine SLC29 in z aktivnim prenosom preko prenašalcev iz družine SLC28. Med prenašalci za pasivni prenos sta najpomembnejša SLC29A1 in SLC29A2, ki prenašata purinske in pirimidinske nukleozide, SLC29A2 pa tudi nukleotidne baze (5). Aktivni privzem tiopurinov poteka preko dveh prenašalcev SLC28A2 in SLC28A3, ki prenašata purinske nukleozide (5,74).

Izmet zdravilnih učinkovin poteka z aktivnim prenosom preko sekretornih prenašalcev iz družine ABC z domeno za vezavo ATP (*angl.* ATP binding cassette transporters). Prenašalca ABCC4 in ABCC5, ki ju imenujemo tudi MDR4 in MDR5, prenašata metabolite tiopurinov v monofosfatni obliki. Substrata za prenašalca ABCC4 in ABCC5 sta TIMP in TGMP, medtem ko je substrat za ABCC5 tudi TXMP (75). Polimorfizmi v prenašalcih iz družine ABC lahko povzročijo izgubo funkcije prenašalca ali pa se prenos preko prenašalca poveča (Slika 8) (74).



Slika 8: Shema normalnega in okvarjenega delovanja prenašalcev ABC.

A: Prenašalec z normalno funkcijo prenese substrat iz celice. B: Izguba funkcije prenašalca povzroči, da se v celici kopičijo zdravilne učinkovine in/ali njihovi metaboliti. C: Povečan prenos preko prenašalca zniža koncentracijo zdravilne učinkovine in/ali njihovih metabolitov v celici. Prirejeno po (74).

Povišano izražanje *ABCC4* in *ABCC5* bi lahko bilo vzrok za nekatere nepojasnjene primere neodzivnosti na zdravljenje s tiopurini (74). V študiji na mišjem modelu so razložili povezavo med izražanjem *ABCC4* in toksičnostjo tiopurinov. Miši z odsotnim *ABCC4* so izkazovale večjo občutljivost na 6-MP in hujšo mielosupresijo kot miši z divjim tipom *ABCC4*, kar je posledica višje znotrajcelične koncentracije 6-TGN. Predpostavili so, da bi lahko polimorfizmi v *ABCC4* povzročili povečano toksičnost tiopurinov pri pacientih, kjer mielosupresije ni mogoče pojasniti z nizko aktivnostjo TPMT (76).

Spoznanja o vplivu izražanja *ABCC4* na toksičnost tiopurinov so bila povod za nadaljnje klinične študije. V japonski populaciji so polimorfizmi v *TPMT* redki in se mielosupresija pojavlja pogosto pri homozigotih za divji tip alela *TPMT*. Na tej populaciji so ugotovili večjo pojavnost polimorfizmov v *ABCC4*, ki zmanjšajo funkcijo transporterja, kot v kavkaški populaciji (77).

Najnovejše študije potrjujejo vpliv sekretornih prenašalcev na klinični odziv zdravljenja s tiopurini. Pri otrocih z ALL so testirali prisotnost polimorfizmov v genih, ki bi lahko bili povezani z odzivom na terapijo. Ugotovili so močno povezavo med kliničnim odzivom in SNP-ji v *ABCC4* in *ABCC5*. Njihovo povišano izražanje bi lahko pojasnilo neodzivnost na terapijo in povečano tveganje za ponovitev bolezni (37).

Pomemben in eden prvih odkritih prenašalcev iz družine ABC je ABCB1, ki ga imenujemo tudi P-glikoprotein ali MDR1. ABCB1 ima visoko afiniteto do mnogih ksenobiotikov, med katerimi je veliko zdravilnih učinkovin za zdravljenje raka (29,74). Njegovo visoko izražanje povzroči pospešen izmet učinkovine iz celice in vodi v pojav odpornosti proti več snovem (MDR – *angl.* multiple drug resistance) (29). ABCB1 je odgovoren za neodzivnost na mnoge citotoksične zdravilne učinkovine. Obstaja malo študij, ki bi dokazovale vpliv ABCB1 na prenos tiopurinov, saj je bila sprva uveljavljena teorija, da tiopurini niso substrati za ABCB1 (78). Posamezniki s prisotnima polimorfizmoma G2677T/A in C3435T, ki povišata aktivnost prenašalca ABCB1, imajo večjo verjetnost za neodzivnost na zdravljenje z AZA (79). V novejši študiji so proučevali omenjena polimorfizma in ugotovili prav nasprotno, da se osebe s polimorfnim genotipom bolje odzivajo na terapijo z AZA (80).

2. Namen dela

Pomemben vpliv pri odzivu posameznika na zdravljenje s tiopurini imajo genetski dejavniki, med katerimi igra največjo farmakogenetsko vlogo encim TPMT. V klinično prakso je dobro vpeljana določanje genskih polimorfizmov in aktivnosti encima TPMT, a kljub temu ostajajo mnogi primeri neodzivnosti na tiopurine ali njihove povečane toksičnosti nepojasneni. V ta namen bomo na *in vitro* modelu limfoblastoidnih celičnih linij (LCL) skušali najti dejavnike, ki pojasnijo variabilen odziv na tiopurine.

Pri našem delu smo si postavili naslednje hipoteze:

- Celice različnih posameznikov se med seboj razlikujejo v občutljivosti na 6-MP in 6-TG
- Genski polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na aktivnost encima in na občutljivost celic izpostavljenih tiopurinom
- Aktivnost TPMT vpliva na občutljivost celic izpostavljenih tiopurinom in na profil metabolitov 6-MP
- Izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* za sekretorne prenašalce vpliva na toksičnost tiopurinov

Celice LCL bomo izpostavili 6-MP in 6-TG ter določili odziv na tiopurine z merjenjem metabolne aktivnosti in z analizo celičnega cikla. V lizatih celic bomo po izpostavitvi letih 6-MP z ustaljeno metodo HPLC merili količino nastalega 6-MMP in iz nje preračunali aktivnost TPMT ter preverili vpliv genskih polimorfizmov v *TPMT* na aktivnost TPMT. Statistično bomo ovrednotili povezavo med aktivnostjo TPMT in odzivom celic po izpostavitvi 6-MP in 6-TG. Nadalje bomo z analizo HPLC določili količino nastalega 6-MMP in 6-TGN v celicah in v mediju po izpostavitvi celic 6-MP. Statistično bomo ovrednotili korelacijo med metabolnim profilom, aktivnostjo TPMT in občutljivostjo celic na tiopurine. Z metodo qPCR bomo določili izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* ter statistično ovrednotili povezavo med njihovim izražanjem in občutljivostjo celic na tiopurine.

3. Materiali in metode

3.1 Shema dela

1. Test MTS

- Preverjanje občutljivosti celic na tiopurine

2. Pretočna citometrija

- Preverjanje občutljivosti celic na tiopurine
- Preverjanje zastoja celic v celičnem ciklu

3. HPLC

- Merjenje 6-MMP v celičnih lizatih po tretiranju le-teh s 6-MP in preračun aktivnosti TPMT
- Merjenje 6-MMP in 6-TGN v celicah in mediju po tretmaju celic s 6-MP

4. qPCR

- Določanje izražanja genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* za sekretorne prenašalce

Slika 9: Shema metod dela in njihov namen.

3.2 Kemikalije in reagenti

Preglednica I: Uporabljene kemikalije in reagenti

Reagent	Proizvajalec
Gojišče RPMI 1640	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Fetalni goveji serum (FBS)	Invitrogen, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Antibiotik / antimikotik (10000 U/ml penicilin; 10 mg/ml streptomycin, 25 µg/ml amfotericin B)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (reagent MTS)	Promega, ZDA
Natrijev hidrogenfosfatv dodekahidrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (čistota $\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (čistota $\geq 99,0\%$)	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Kalijev klorid, KCl (čistota $\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (čistota $\geq 99,0\%$)	Riedel-de Hën AG, Nemčija
Natrijev klorid, NaCl (čistota: 99,5 %)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
6-merkaptopurin monohidrat, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{SxH}_2\text{O}$ (čistota $\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
6-metilmerkaptopurin, $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$ (čistota $\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
6-tiogvanin, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{S}$ (čistota $\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Barvilo tripan modro	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
DMSO: Chromasolv Dimethyl sulfoxide for high-performance liquid chromatography, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, čistota min 99,7%	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Acetonitril HPLC grade, čistota $\geq 99,93\%$	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Metanol: LiChrosolv Methanol for liquid chromatography, MeOH (čistota $\geq 99,8\%$)	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Absolutni etanol	KEFO, Ljubljana, Slovenija
PI/RNase Staining Buffer	BD Pharmingen
NP-40 (Nonidet™ P 40 Substitute)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Propidijev jodid	Invitrogen, ZDA
RNase	Qiagen, Nemčija
DC Protein Assay	BIO-RAD, ZDA
Albumin govejega seruma-(BSA)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
D,L-ditiotreitol (DTT), $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, čistota $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Klorova(VII) kislina 70 %, HClO_4 , čistota $\geq 70\%$	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
S-adenozilmetionin, $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
SYBR Green Master Mix 2x	Applied Biosystems, ZDA
Zmes začetnih oligonukleotidov ABCC4	Integrated DNA Technologies, ZDA

5'-CCTCCATTTACAGTGACATTTAGC-3' 5'-GTGCTCACTGGATTGTCTTCA-3'	
Zmes začetnih oligonukleotidov ABCC5 5'-CATCTTCTCTGAGTGGAGGTTC-3' 5'-CCGCTATAAAGGCTTGTGTTTGC-3'	Integrated DNA Technologies, ZDA
Zmes začetnih oligonukleotidov ABCB1 5'-TCATTTCTCCAAACACCAGCA-3' 5'-GGAAAAGAAACCAACTGTCAGTG-3'	Integrated DNA Technologies, ZDA

3.3 Pripomočki in aparature

Preglednica II: Uporabljeni pripomočki in aparature

Pripomočki / Aparature
Aparat za PCR v realnem času: Roche LightCycler 480, Roche, Švica
Centrifuga: Eppendorf, Nemčija
Centrifugirke (15 in 50 ml): Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Hemocitometer: Brand Neubauer, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop: Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Komora za delo z RNA in DNA: Biosan, Riga, Latvija
Mikrocentrifugirke (0,5 ml, 1,5 ml in 2 ml): Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Mikrotitrski čitalec: Tecan, Genios, Zürich, Švica
Multikanalne pipete (100, 300 µl): Eppendorf, Nemčija
Naprava za čiščenje vode: PureLab Flex; ELGA Labwater, VB
Nastavki za pipete (10-1000 µl): Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
PCR ploščice in folije za zatesnitev: Roche, Švica
pH meter: Mettler Toledo SevenEasy S20; Columbus, Ohio, ZDA
Pipete (2,5-1000 µl): Eppendorf, Nemčija
Ploščice za gojenje celičnih kultur z vdolbinami (velikost 6, 12, 24 in 96): TPP Trasadingen, Švica
Pretočni citometer Attune NxT: Invitrogen, ZDA
Serološke pipete (2, 5, 10, 25 ml): TPP, Trasadingen, Švica
Sistem HPLC Agilent 1100 Series: Agilent Technologies, CA, ZDA
Stekleničke za gojenje celičnih kultur (rastna površina 25, 75 in 150 cm ²): TPP, Trasadingen, Švica
Obratnofazna C18 kolona Agilent Zorbax ODS (4.6 x 250 mm, velikost delcev 5µm); Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA
Obratnofazna C18 predkolona Agilent Zorbax ODS Analytical Guard Column (4,6 x 12,5 mm, velikost delcev 5µm); Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA
Obratnofazna C18 kolona ZORBAX Eclipse Plus (4.6 x 150 mm, velikost delcev 5µm); Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA

3.4 Limfoblastoidne celične linije

Za proučevanje citotoksičnosti tiopurinov smo izbrali *in vitro* model LCL, ker ta predstavlja alternativo izoliranim limfocitom, ki so *in vivo* tarča delovanja tiopurinov (33). Celice LCL so pridobljene iz B-limfocitov periferne krvi prostovoljcev in transformirane z Epstein Barr virusom. Tako pripravljene celice pridobijo sposobnost neomejene delitve in skoraj popolnoma ohranijo značilnosti starševskih celic, zato so dober model za farmakogenomske študije (81). V zadnjem času na LCL-ih pogosto izvajajo asociacijske študije na celotnem genomu (GWAS – *angl.* Genome Wide Association Studies), kjer iščejo genske variante povezane z razlikami v inter-individualnem odzivu na terapijo. Model LCL največkrat služi za proučevanje citotoksičnih zdravilnih učinkovin in iskanje potencialnih farmakogenetskih označevalcev. Kljub temu, da je model LCL široko uporabljen in učinkovit, ima nekatere pomanjkljivosti. Pomanjkljivost merjenja učinka citotoksičnih zdravilnih učinkovin na modelu LCL je ta, da limfoblastoidne celice niso tumorske celice (82). Nadalje, v študijah presnove zdravilnih učinkovin ne dobimo dejanske slike dogajanja v človeškem telesu, saj *in vitro* model LCL ne vključuje pedsistemske presnove (37,82).

Naš vzorec je zajemal 26 LCL-ov, ki so imeli predhodno določen genotip *TPMT* (Preglednica III). LCL-e smo pridobili v sodelovanju z NLGIP (National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations, Univerza Tel-Aviv, Izrael) in z Estonsko biobanko (Estonian Genome Center, Univerza Tartu). Med 26 LCL-i je bilo 15 homozigotov za divji tip alela (*1/*1), 9 heterozigotov (*1/*3) in 2 dvojno variantna LCL-a (*3/*3). Eden od dvojno variantnih LCL-ov je homozigot za variantna alela (*3A/*3A), drugi pa variantni heterozigot (*3C/*3A).

Preglednica III: Seznam 26 limfoblastoidnih celičnih linij.

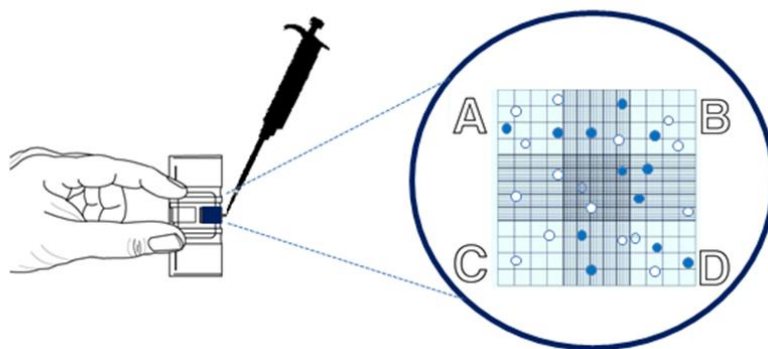
LCL	genotip <i>TPMT</i>	LCL	genotip <i>TPMT</i>	LCL	genotip <i>TPMT</i>
2	*1/*1	381	*1/*3A	383	*3C/*3A
3	*1/*1	384	*1/*3A	390	*3A/*3A
7	*1/*1	385	*1/*3A		
9	*1/*1	386	*1/*3C		
10	*1/*1	387	*1/*3A		
380	*1/*1	388	*1/*3A		
382	*1/*1	389	*1/*3A		
1112	*1/*1	1516	*1/*3A		
1515	*1/*1	5876	*1/*3A		
1728	*1/*1				
1754	*1/*1				
1823	*1/*1				
1976	*1/*1				
6037	*1/*1				
6417	*1/*1				

3.5 Gojenje celic

Delo s celicami poteka v aseptičnih pogojih v komori z laminarnim pretokom zraka. Celice smo gojili v rastnem mediju RPMI 1640 z dodatkom fetusnega seruma goveda (10 %), glutamina (4 mM) in antibiotika/antimikotika (100 U/ml penicilin; 100 µg/ml streptomycin, 0,25 µg/ml amfotericin B) v stekleničkah za gojenje celic z različnimi ravnimi površinami. Med gojenjem smo jih shranjevali v inkubatorju pri konstantnih pogojih 37 °C, 100 % relativni vlažnosti (RH) in 5 % CO₂.

3.6 Štetje celic

Celice smo šteli pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Iz stekleničke za gojenje celic smo odvzeli 10 µl celične suspenzije in ji primešali 10 µl barvila tripan modro, ki omogoča ločevanje živih in mrtvih celic. Barvilo vstopa skozi membrano poškodovanih in mrtvih celic in jih obarva temno modro. V žive celice barvilo ne vstopa, zato jih vidimo pod mikroskopom obarvane belo. 10 µl mešanice suspenzije celic in barvila smo nanесли na Neubauerjev hemocitometer (Slika 10), v štirih poljih prešteli žive celice in izračunali povprečno število živih celic na mililiter (Enačba 1).



Slika 10: Shema štetja celic na Neubauerjevem hemocitometru.

Na Naubauerjevo ploščico s pipeto nanesemo suspenzijo celic in barvila ter v štirih poljih (A, B, C in D) preštejemo žive celice, ki so obarvane belo.

$$\text{Št.celic / ml} = \frac{A+B+C+D}{4} \times FR \times 10^4$$

A, B, C, D ... število živih celic v posameznem polju hemocitometra

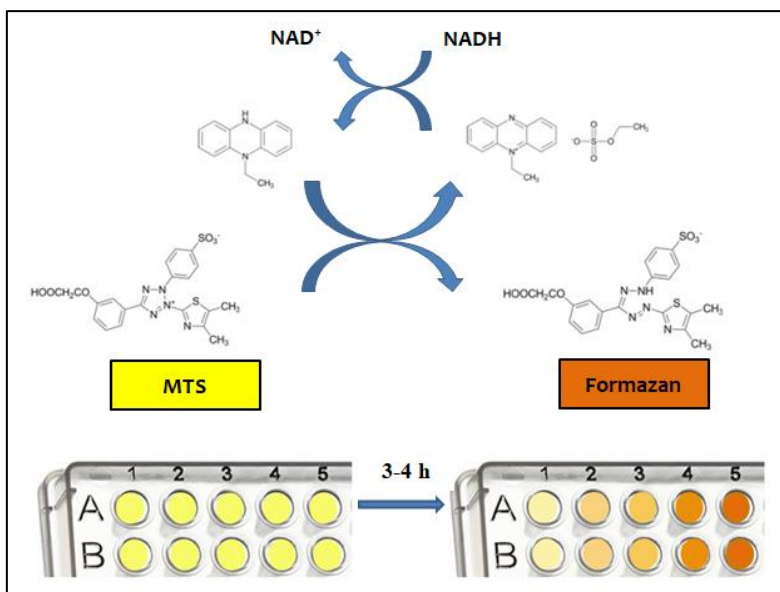
FR ... faktor redčenja

Enačba 1: Enačba za izračun koncentracije celic.

3.7 Določanje občutljivosti celic

3.7.1 Merjenje metabolne aktivnosti

Preko metabolne aktivnosti (MA) celic ugotavljamo živost in proliferacijo celic. Test merjenja MA s tetrazolijevo soljo spada med kolorimetrične metode in omogoča določanje dovzetnosti celic na posamezne učinkovine. Osnovni sestavini reagenta sta MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, notranja sol] (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) in reagent za prenos elektronov fenazin etosulfat (Slika 11). V metabolno aktivnih, običajno živih, celicah se MTS reducira do obarvanega produkta formazana, ki ga izmerimo spektrofotometrično pri 490 nm na čitalcu mikrotitrskih ploščic (83).



Slika 11: Shema določanja metabolne aktivnosti s testom MTS.

3-4 ure po dodatku reagenta MTS se pojavi rjavkasto obarvanje, ki je odvisno od MA oziroma živosti celic. Več kot je živih celic, višja je MA in obarvanje je močnejše.

Za izvedbo testa smo celice redčili z medijem na koncentracijo $3 \cdot 10^5$ celic/ml. Nato smo na ploščico s 24 vdolbinami prenesli 300 μ l celične suspenzije in dodali 33,3 μ l raztopine reagenta 6-MP oziroma 6-TG raztopljenega v fosfatnem pufru z NaCl (PBS). Celice smo izpostavili širokemu razponu koncentracij raztopin 6-MP (od 0,5 - 1000 μ M) in 6-TG (od 0,05 - 50 μ M). Na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami smo v dveh tehničnih ponovitvah prenesli 100 μ l tako pripravljene zmesi celic in reagenta. Kontrolni vzorec celic je vseboval 10 % PBS. Slep vzorec je predstavljalo gojišče brez celic. Ploščico smo postavili v inkubator (37°C, 100 % RH, 5 % CO₂), po 72 urah smo dodali 10 μ l reagenta MTS in inkubirali še 3-4 ure. Nato smo izmerili absorbanco s čitalcem mikrotitrskih ploščic pri 490 nm in relativno na kontrolni vzorec izračunali MA (Enačba 2).

$$MA = \frac{A_{vz} - A_{medij}}{A_{ctrl} - A_{slepa}}$$

A_{vz} ... absorbanca vzorca

A_{medij} ... absorbanca medija

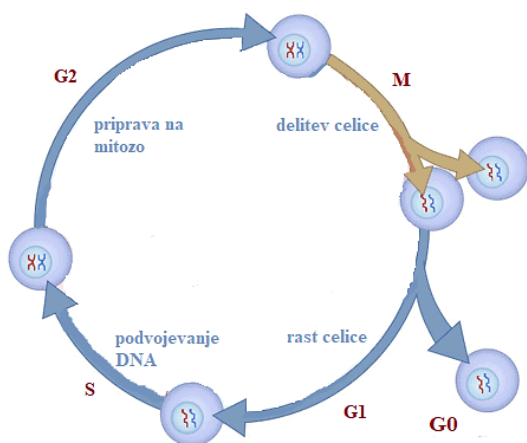
A_{ctrl} ... absorbanca kontrole

A_{slepa} ... absorbanca slepe

Enačba 2: Enačba za izračun metabolne aktivnosti.

3.7.2 Analiza celičnega cikla

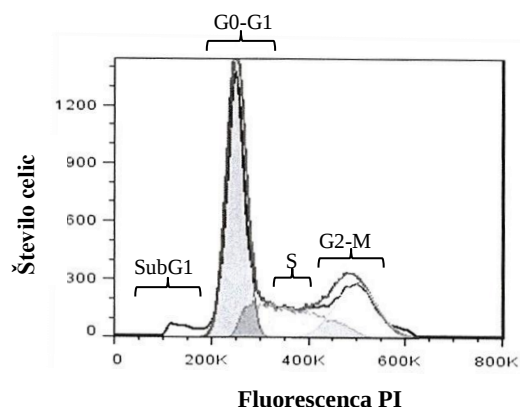
Celični cikel predstavlja 5 faz skozi katere preide celica med delitvijo na dve hčerinski celici (Slika 12). Prva je G0 faza, v kateri celica miruje. Ko pride do signala za delitev celice, celica vstopi v fazo G1, kjer tvori celične sestavine potrebne za podvojevanje. Sledi faza S, v kateri celica podvoji svoj genetski material. V fazi M z delitvijo kromosomov, jedra ter citoplazme nastaneta dve hčerinski celici (84). Skozi različne faze celičnega cikla se spreminja količina DNA. V prvi fazi celičnega cikla G0-G1 je količina DNA najmanjša ($2n$), približno dvakrat večjo količino ima celica v fazi G2-M ($4n$), med obema fazama se nahaja faza S s spremenljivo količino DNA (od $2n$ do $4n$) (85).



Slika 12: Shema celičnega cikla.

V fazi G0 je celica v mirovanju. V fazi G1 celica raste in v fazi S tvori celične sestavine potrebne za podvojevanje DNA. Celica po podvojevanju nadalje raste v fazi G2 in se v fazi M deli v dve hčerinski celici. Prirejeno po (84).

V našem primeru smo količino DNA določili s propidijevim jodidom (PI), ki se veže na DNA (86). Jakost fluorescence posamezne celice, ki jo oddaja ligand vezan na DNA, smo merili s pretočno citometrijo. Fluorescenčno označene celice se razporedijo v značilen distribucijski histogram (Slika 13), na katerem ločimo celice po vsebnosti DNA, zaznamo torej celice v različnih fazah delitve. Iz distribucijskega histograma nato določimo delež celic/delcev v posamezni fazi celičnega cikla. Z analizo celičnega cikla določimo tudi SubG1 fazo, ki predstavlja fragmentirane dele celic, med katerimi so tudi apoptotične celice.



Slika 13: Faze celičnega cikla določene s pretočno citometrijo.

Y os predstavlja število celic, x os pa fluorescenca PI, ki je sorazmerna količini DNA. Vir: lastne meritve.

Po štetju celic smo iz celične suspenzije odvzeli ustrezen volumen celic, centrifugirali (1300 rpm, 5 min, Tr), odstranili celični medij ter dodali svežega, da smo dobili koncentracijo celic $1 \cdot 10^6$ celic/ml. V ploščico z 12 vdolbinami smo v dve vdolbini za vsako celično linijo prenesli po 1 ml celične suspenzije. V eni vdolbini smo celice izpostavili $5 \mu\text{M}$ koncentraciji 6-MP, druga vdolbina je bila kontrolni vzorec. Ploščico smo inkubirali 72 ur in nato izvedli postopek za pripravo celic na analizo celičnega cikla:

- celice iz ploščice smo prenesli v epruvete za pretočno citometrijo,
- centrifugirali (1800 rpm, 5 min, Tr) in odstranili medij,
- sprali celice z 1 ml PBS,
- centrifugirali (1800 rpm, 5 min, Tr) in odstranili PBS,
- resuspendirali celice v 200 μl PBS, dobro premešali,
- dodali 1 ml hladnega absolutnega etanola ($T = 0^\circ\text{C}$), dobro vorteksirali,
- vzorce postavili na -20°C za 20 min,
- centrifugirali (2300 rpm, 5 min, Tr) in odstranili etanol,
- resuspendirali celice v 1 ml PBS in inkubirali na sobni temperaturi 15 min,
- centrifugirali (2300 rpm, 5 min, Tr) in odstranili PBS,
- celice resuspendirali v 500 μl vezavnega pufra s PI in RNazami,
- inkubirali 15 min pri sobni temperaturi zaščiteno pred svetlobo,
- analizirali na pretočnem citometru.

Za pripravo celic na analizo celičnega cikla smo uporabili 1 x PBS in ostale reagentne navedene v preglednici IV. S PBS smo spirali celice, da odstranimo snovi, ki bi motile fluorescenca propidijevega jodida. Z absolutnim etanolom smo celice fiksirali in permeabilizirali membrano ter celice nato rehidrirali s PBS. Vezavni puffer ohranja pH za

stabilnost propidijevega jodida. NP-40 je detergent in povzroči lizo zunanje membrane celic, ohranja intaktno jedrno membrano in omogoča ponovno homogenizacijo pelete, ne da bi poškodoval jedrno membrano. Propidijev jodid se veže tako na DNA kot na RNA, zato moramo za selektivno vezavo na DNA dodati RNAze, ki razgradijo RNA.

Preglednica IV: Reagenti za pripravo celic na merjenje celičnega cikla.

Reagent	Priprava
10 x PBS , pH = 7,4	80 g NaCl, 2 g KCl, 36,3 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ , raztopimo v 800 ml ultračiste vode, uravnamo pH s HCl oziroma NaOH, dopolnimo z ultračisto vodo do 1 l
1 x PBS , pH = 7,4	10 x PBS redčimo 1 : 10 z ultračisto vodo, uravnamo pH s HCl oziroma NaOH.
Pufer za barvanje (Staining buffer)	100 mM Tris, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,1 % Nonident P-40
Vezavni pufer	45 ml ultračiste vode, 5 ml PI 10x pufra za barvanje (Staining buffer), 500 µl 10 % NP-40.
Vezavni pufer s propidijevim jodidom (1500x) (PI) in RNAzami (100x)	5 ml vezavnega pufra, 3,3 µl PI, 50 µl RNAze, Pripravljeno zaščitimo pred svetlobo.

3.8 Določanje aktivnosti TPMT

Aktivnost TPMT smo določili z analizo HPLC. Metoda temelji na izpostavitvi lizata celic 6-MP in merjenju koncentracije nastalega 6-MMP, ki je pokazatelj aktivnosti TPMT.

Za določanje aktivnosti TPMT smo pripravili pelet s $5 \cdot 10^6$ celicami in jo do analize shranili v zamrzovalniku na -80 °C. Pelet smo vzeli iz zamrzovalnika, dodali 80 µl 150 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,4), vsebino raztalili in suspendirali z vibracijskim mešalnikom ter lizirali celice z ultrazvokom (najvišja jakost, 15 sekund) (Slika 14A). 10 µl raztopine smo odvzeli in shranili na -80 °C za kasnejše določanje proteinov. Preostalemu celičnemu lizatu smo dodali 75 µl predhodno pripravljene raztopine (100 µM SAM in 500 µM ditioneitol (DTT) v 150 mM kalijevem fosfatnem

pufri) in 1,5 µl 225 mM raztopine 6-merkaptopurina. Tako pripravljen vzorec smo inkubirali na vodni kopeli s 37 °C. Po dveh urah smo zaustavili reakcijo z dodatkom 5 µl 70 % HClO₄, premešali in za 10 minut položili na led. Vsebino smo centrifugirali (14.000 g, 5 min, 4 °C), supernatant prenesli v novo epico in dodali 10 µl 4 M K₂HPO₄. Vsebino smo dobro premešali, epico postavili na led za 5 minut, zopet centrifugirali (14.000 g, 5 min, 4 °C) in vzorce prenesli na mikrotitrsko ploščico za analizo HPLC. Za umeritveno krivuljo smo pripravili standardne raztopine 6-MMP v kalijevem fosfatnem pufri (pH = 7,4) s koncentracijami 4 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM in 0,125 µM.

Pri analizi HPLC smo uporabili obratnofazno kolono C18 Agilent Zorbax ODS (4.6 x 250 mm, 5µm velikost delcev), ki je bila opremljena s predkolono Agilent Zorbax ODS Analytical Guard Column. Kot mobilno fazo smo uporabili 50 mM kalijev fosfatni pufer v 25 % metanolu (pH = 7,4). Elucija je potekala izokratsko pri pretoku 1,5 ml/min, temperaturi 30 °C in delovnem tlaku okoli 240 barov. Analiza posameznega vzorca je trajala 13 minut, volumen vbrizganega vzorca je bil 100 µl. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 290 nm. Iz površin kromatografskih vrhov standardov pri 290 nm smo določili umeritveno premico in iz nje koncentracijo nastalega 6-MMP v vzorcih. Aktivnost TPMT smo preračunali na količino proteinov in jo izrazili v enoti $\frac{\text{pmol 6-MMP}}{\text{h} \times \text{mg.proteina}}$.

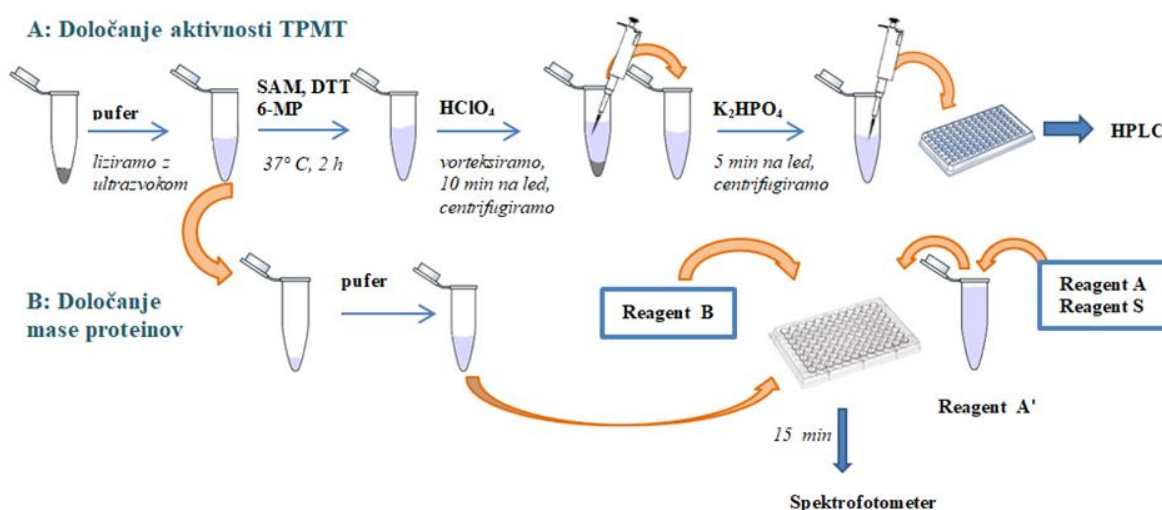
Preglednica V: Priprava pufrov za določanje aktivnosti TPMT.

Pufer	Priprava
150 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 7,4)	0,259 g KH ₂ PO ₄ , 2,26 g K ₂ HPO ₄ , raztopimo v 100 ml ultračiste vode, uravnamo pH z 2M H ₃ PO ₄ .
50 mM kalijev fosfatni pufer v 25 % metanolu (pH = 7,4)	1,09 g KH ₂ PO ₄ , 7,30 g K ₂ HPO ₄ , raztopimo v 700 ml destilirane vode, dodamo 250 ml metanola, uravnamo pH z 2M H ₃ PO ₄ , dopolnimo z destilirano vodo do 1 l.

3.8.1 Določanje mase proteinov

Količino proteinov smo določili z diketonsko (DC) kolorimetrično metodo. Za analizo smo uporabili komplet reagentov, ki je sestavljen iz reagenta A, reagenta S in reagenta B. Reagent A vsebuje bazično raztopino bakrovega tartrata, ki tvori kompleks s proteini. Reagent S vsebuje vodno raztopino SDS, ki lizira celice in tako omogoči določitev celokupnih proteinov celice. Kompleks med bakrom in proteini nato reagira z reagentom B. Ta vsebuje raztopino natrijevega naftokinonsulfonata (Folin reagent), ki se po reakciji obarva modro.

Maso proteinov smo določili v peleti za določanje aktivnosti TPMT (Slika 14B). Pripravili smo standardne raztopine albumina govejega seruma (BSA) s koncentracijami 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 in 1,5 mg /ml v 150 mM kalijevem fosfatnem pufru (pH=7,4). Predhodno odvzeti vzorec za določanje proteinov smo 5-krat redčili s 150 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH=7,4). V 1 ml reagenta A smo dodali 20 μ l reagenta S, da smo pripravili reagent A', ki smo ga nanесли v količini 25 μ l na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinami. V vdolbine smo dodali po 5 μ l vzorcev in standardov v treh tehničnih ponovitvah in še 200 μ l reagenta B. Ploščico smo rahlo pretresli, počakali 15 min in izmerili absorbanco pri 750 nm. Iz umeritvene krivulje smo določili koncentracijo proteinov v vzorcu in iz nje maso proteinov v peleti.

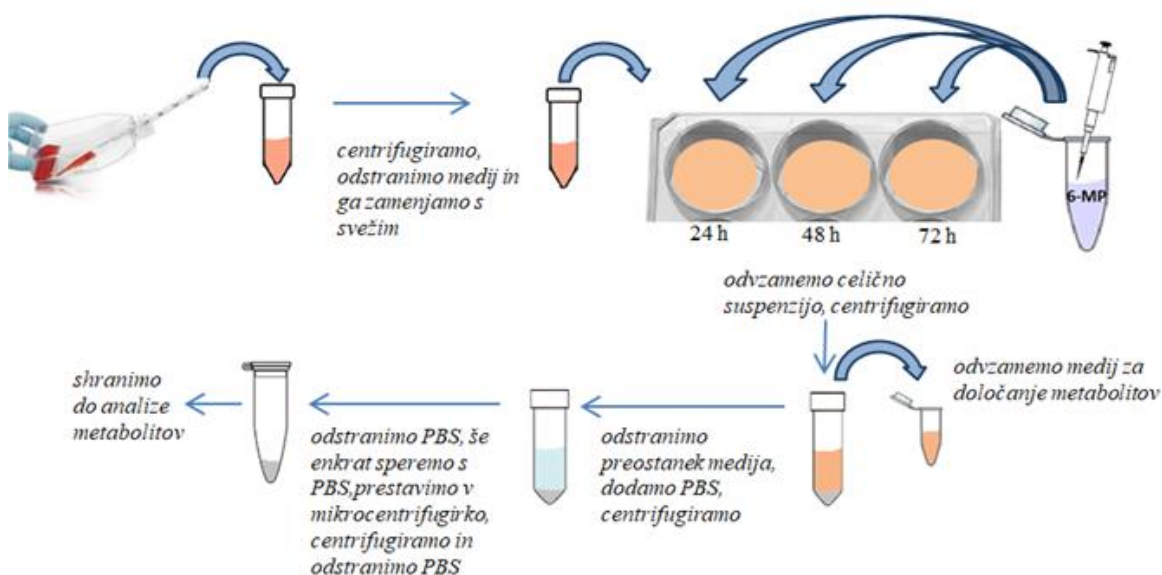


Slika 14: Shema določanja aktivnosti TPMT in mase proteinov.

3.9 Določanje metabolitov 6-MP

3.9.1 Tretiranje celic za merjenje metabolitov

Da smo lahko vrednotili nastajanje metabolitov v celicah, smo celice najprej izpostavili 6-MP. Po številu celic smo odvzeli ustrezen volumen celične suspenzije, ga centrifugirali (1300 rpm, Tr, 5 min), odstranili medij in ga zamenjali s svežim, da smo dobili koncentracijo $1 \cdot 10^6$ celic/ml (Slika 15). Na ploščico s 6 vdolbinami smo v tri vdolbine prenesli 5 ml tako pripravljene celične suspenzije, celice izpostavili $10 \mu\text{M}$ 6-MP in ploščico inkubirali 72 ur (37°C , 5 % CO_2 , 100 % RH). Po 24 urah, 48 urah in 72 urah smo odvzeli celično suspenzijo iz ustrezne vdolbine, v njej prešteli celice in preostanek centrifugirali (1300 rpm, Tr, 5 min). Odvzeli smo 200 μl medija in ga shranili na -80°C za kasnejšo analizo, preostanek medija smo odstranili. Celično pelet smo resuspendirali v 10 ml PBS, centrifugirali (1300 rpm, Tr, 5 min), odstranili PBS, resuspendirali pelet v 1 ml PBS, jo prestavili v 1,5 ml epruvetko ter ponovno centrifugirali (1300 rpm, Tr, 5 min). Peleti smo odstranili PBS ter jo shranili na -80°C do analize.



Slika 15: Shema tretiranja celic za določanje metabolitov.

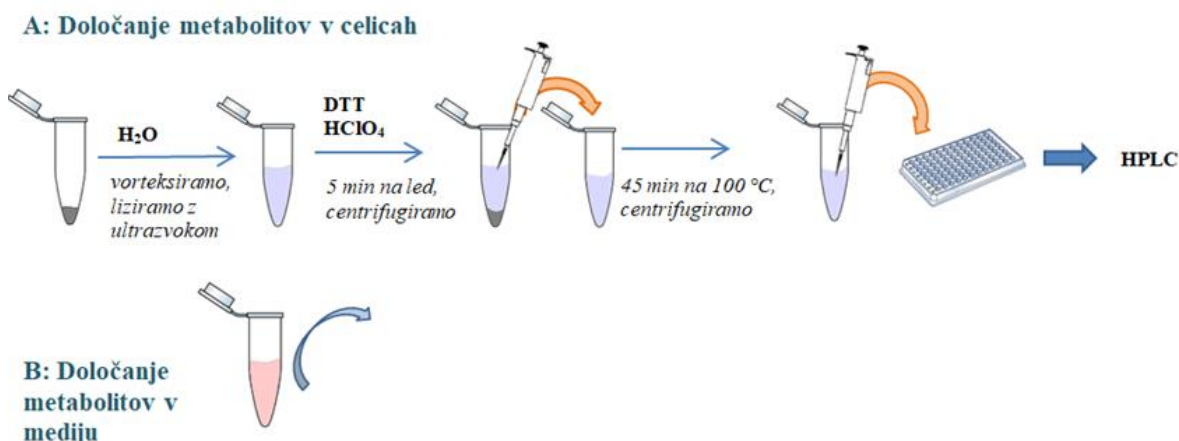
Celice smo izpostavili $10 \mu\text{M}$ 6-MP za 24 h, 48 h in 72 h. V ustrezni časovni točki smo odvzeli celično suspenzijo in jo centrifugirali. Del medija smo shranili za analizo metabolitov, preostanek zavrgli in pelet dvakrat sprali s PBS ter jo shranili za analizo metabolitov.

3.9.2 Določanje metabolitov z analizo HPLC

Z metodo HPLC smo določali celokupno nastajanje neriboziliranih in riboziliranih 6-MMP in 6-TGN na vzorcu celic po izpostavitvi 6-MP. Peleto in medij smo vzeli iz zamrzovalnika. Peleti smo dodali 200 μ l demineralizirane vode, vsebino raztalili in suspendirali z vibracijskim mešalnikom ter lizirali celice z ultrazvokom (najvišja jakost, 15 sekund) (Slika 16). Celičnemu lizatu in mediju smo dodali 25 μ l 0,5 M DTT in 20 μ l 70 % HClO_4 . DTT je reducent in preprečuje povezavo 6-TGN med seboj z disulfidno vezjo, z dodatkom kisline HClO_4 oborimo proteine. Vzorce smo postavili za 5 min na led in jih nato centrifugirali (14.000 g, 10 min, 4 °C). Supernatant smo prenesli v novo epico in ga segrevali na termobloku (100°C, 40 min), da je potekla kisl hidroliza, ki odstrani ribozo iz riboziliranih 6-MMP in 6-TGN. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali (14.000 g, 10 min, 4 °C) in jih prenesli na mikrotitrsko ploščico za analizo HPLC. Za umeritveni krivulji smo pripravili standardne raztopine 6-TG in 6-MMP v vodi s koncentracijami 6-TG in 6-MP 800/6000, 400/3000, 200/1500, 50/400, 25/200, 12,5/100 pmol v 200 μ l.

Pri analizi HPLC smo uporabili obratnofazno kolono C18 ZORBAX Eclipse Plus (4.6 x 150 mm, velikost delcev 5 μ m), ki je bila zaščitena s predkolono Eclipse plus. Kot mobilno fazo smo uporabili 98 % 20 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 2) in 2 % acetonitril. Elucija je potekala izokratsko pri pretoku 1 ml/min, delovnem tlaku 60 barov in temperaturi 30 °C. Analiza posameznega vzorca je trajala 20 minut, volumen vbrizganega vzorca je bil 30 μ l. Detekcija je potekala pri valovnih dolžinah 303 in 342 nm. Iz površin kromatografskih vrhov standardov pri valovnih dolžinah 303 nm za 6-MMP in 342 nm za 6-TG smo določili umeritveni premici in iz njiju izračunali količino nastalega 6-MMP in 6-TGN v vzorcih. Količino nastalih metabolitov smo preračunali na število celic in izrazili v enoti

$$\frac{\text{pmol metabolita}}{1 \cdot 10^6 \text{ celic}}.$$



Slika 16: Shema določanja metabolitov.

Določanje metabolitov v celicah se prične z liziranjem po dodatku vode. Z liziranjem sprostimo metabolite iz celice. Ta korak pri določanju metabolitov v mediju ni potreben. Medij v naslednjih korakih pripravimo za določanje metabolitov po enakem postopku kot celični lizat.

3.10 Določanje izražanja genov za sekretorne prenašalce

Izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* za prenašalce smo določili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR – *angl.* quantitative real time polymerase chain reaction). qPCR predstavlja nadgradnjo splošnega PCR, saj omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med reakcijo, kar preko določanja praznega cikla (C_t - *ang.* threshold cycle) omogoča natančno kvantifikacijo tarčne cDNA. Za potek reakcije je potreben vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva začetna oligonukleotida, deoksinukleozid-trifosfati, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza. Detekcija produkta poteka sočasno s pomnoževanjem in temelji na merjenju fluorescence (20).

Za določanje izražanja genov smo uporabili predhodno izolirane vzorce cDNA iz LCL s koncentracijo $20\text{ ng}/\mu\text{l}$, ki smo jih nadalje redčili do koncentracije $0,625\text{ ng}/\mu\text{l}$. Pripravili smo raztopine standardov s koncentracijami $0,039\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,078\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,3125\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,625\text{ ng}/\mu\text{l}$, $1,25\text{ ng}/\mu\text{l}$, $2,5\text{ ng}/\mu\text{l}$, $5\text{ ng}/\mu\text{l}$ in $10\text{ ng}/\mu\text{l}$. Na mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinami smo v vsako vdolbino prenesli $7\text{ }\mu\text{l}$ predhodno pripravljene osnovne zmesi (Preglednica VI) ter $3\text{ }\mu\text{l}$ standarda oziroma redčenega vzorca v dveh tehničnih ponovitvah.

Preglednica VI: Priprava osnovne zmesi za qPCR reakcijo.

Reagent	V (μ l)
SYBR Green Master Mix	5
Zmes začetnih oligonukleotidov (20 μ M)	0,25
Dideionizirana voda	1,75

Ploščico smo zaščitili s prozorno samolepljivo folijo in jo centrifugirali (2200 rpm, 2 min, Tr), da smo odstranili mehurčke in posedli reagente na dno vdolbine. Nato smo ploščico vstavili v ciklični termostat (*angl.* - thermo cycler), nastavili ustrezen temperaturni program in časovni interval (Preglednica VII). Po končani reakciji smo izračunali koncentracijo DNA in jo normalizirali na koncentracijo referenčnih genov (*angl.* - housekeeping gen) GAPDH in TBP, ki sta bila na teh vzorcih že predhodno določena.

Preglednica VII: Temperaturni program inkubacije v cikličnem termostatu.

T ($^{\circ}$ C)	čas	
50	2 min	
95	2 min	
95	15 s	45 x
60	60s	
Talilna krivulja		
Ohlajanje		

3.11 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel in GraphPad Prism. Pri statistični obdelavi podatkov smo zajeli poskuse, kjer smo izvedli najmanj dve neodvisni biološki ponovitvi. Podatke razporejene v skupine smo predstavili v grafih z mediano in interkvartilno razliko. Analizirali smo jih z neparametričnim testom Mann Whitney ali s testom Kruskal-Wallis. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ .

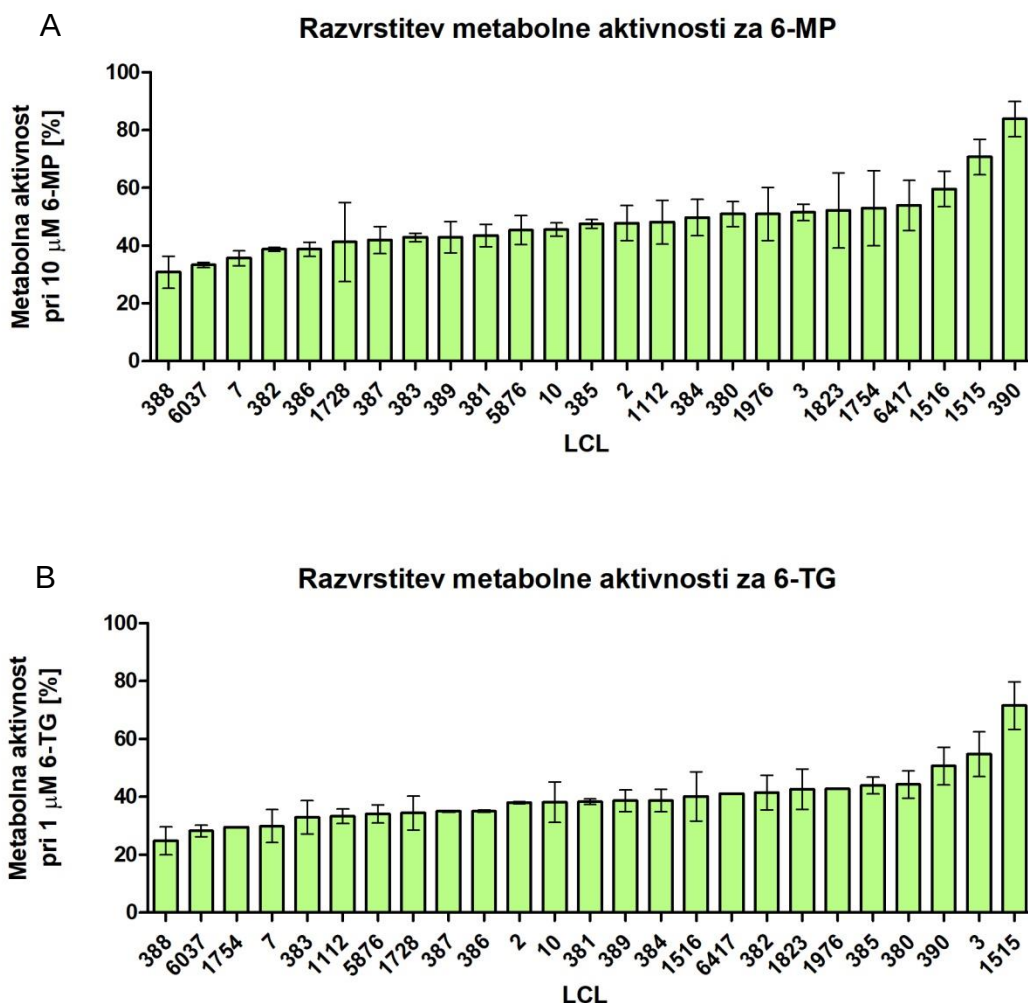
4. Rezultati in razprava

4.1 Občutljivost celic na 6-MP in 6-TG

V presnovo tiopurinov do aktivnih metabolitov je vpletenih veliko encimov in kofaktorjev, ki lahko vplivajo na odziv celic po izpostavitvi 6-MP in 6-TG, zato se posamezniki zdravljeni s tiopurini različno odzovejo na terapijo. Preverili smo, ali se tudi celice izolirane iz različnih posameznikov med seboj razlikujejo v občutljivosti na 6-MP in 6-TG ter ali obstaja razlika v toksičnosti 6-MP in 6-TG. Občutljivost celic smo določili z merjenjem MA glede na netretiran kontrolni vzorec 72 h po izpostavitvi 6-MP in 6-TG ter z analizo celičnega cikla 72 h po izpostavitvi 6-MP.

4.1.1 Celice različnih posameznikov se različno odzovejo na tiopurine

MA smo določili 25 LCL-om. Rezultate za vsak LCL smo prikazali v obliki grafa, ki prikazuje odvisnost MA od koncentracije 6-MP in 6-TG (Priloga 1: Slika 33). Pri vseh celičnih linijah opazimo padanje MA s koncentracijo 6-MP ter 6-TG, kar potrjuje toksično delovanje obeh tiopurinov na celice. Celice posameznikov so se različno odzvale na izpostavitve tiopurinom. Za primerjavo občutljivosti celic različnih LCL-ov smo izbrali MA pri koncentracijah 10 μM 6-MP in 1 μM 6-TG (Slika 17), ki sta pogosto uporabljeni v študijah (27,87,88). V našem primeru so bile pri teh koncentracijah razlike v občutljivosti celic med LCL-i največje. Povprečne MA pri 10 μM 6-MP zavzemajo vrednosti od 31 % - 84 % (mediana = 48 %) in pri 1 μM 6-TG od 25 % - 72 % (mediana = 38 %). Z veliko variabilnostjo MA v izbranih koncentracijskih točkah smo pokazali, da se celice različnih posameznikov razlikujejo v občutljivosti na 6-MP in 6-TG. Visoka MA pomeni, da so celice manj občutljive na tiopurine, medtem ko nizka MA pomeni visoko občutljivost celic. Mediana vrednosti MA se pri koncentracijah 10 μM 6-MP in 1 μM 6-TG najbolj približa vrednosti 50 % in predstavlja najboljši približek povprečne vrednosti IC_{50} . Vrednosti IC_{50} v našem primeru ne bi bile zanesljive za ugotavljanje razlik v občutljivosti celic, ker je plato MA celic različnih LCL-ov zelo variabilen. Namesto vrednosti IC_{50} so MA pri koncentraciji blizu IC_{50} v študijah že predhodno večkrat uporabili (27,33,81,89).



Slika 17: Razvrstitev metabolne aktivnosti po izpostavitvi celic LCL 10 μ M 6-MP in 1 μ M 6-TG.

MA za posamezen LCL je podana glede na netretiran kontrolni vzorec kot povprečje vsaj dveh bioloških ponovitev s standardnim odklonom po 72-urni izpostavitvi 10 μ M 6-MP (A) in 1 μ M 6-TG (B). Povprečne MA pri 10 μ M 6-MP zavzemajo vrednosti od 31 % - 84 % (mediana = 48 %) in pri 1 μ M 6-TG od 25 % - 72 % (mediana = 38 %).

Pri odzivu celic na 72-urno izpostavitve 6-MP in 6-TG smo opazili pojav platoja MA. Plato se je ustvaril pri zelo različnih MA. Po izpostavitvi celic 6-MP je bil ta pri relativno visokih MA (min. 30 %) v primerjavi s platojem po izpostavitvi celic 6-TG (max. 15 %). Nadalje nas je zanimalo, kaj se zgodi s platojem pri povešanju koncentracije 6-MP in po daljšem času izpostavitve 6-MP. Na podskupini 10 LCL-ov smo ugotovili, da se tudi pri izpostavitvi višjim koncentracijam 6-MP (250 μ M in 1000 μ M) pri večini celičnih linij ohrani plato pri isti MA (Priloga 1: Slika 33). Prav tako se je pri podaljšanju časa

izpostavitve celic iz 72 h na 96 h še vedno ohranil plato MA, vendar pri nekoliko nižji MA kot po 72 h (Priloga 2: Slika 34).

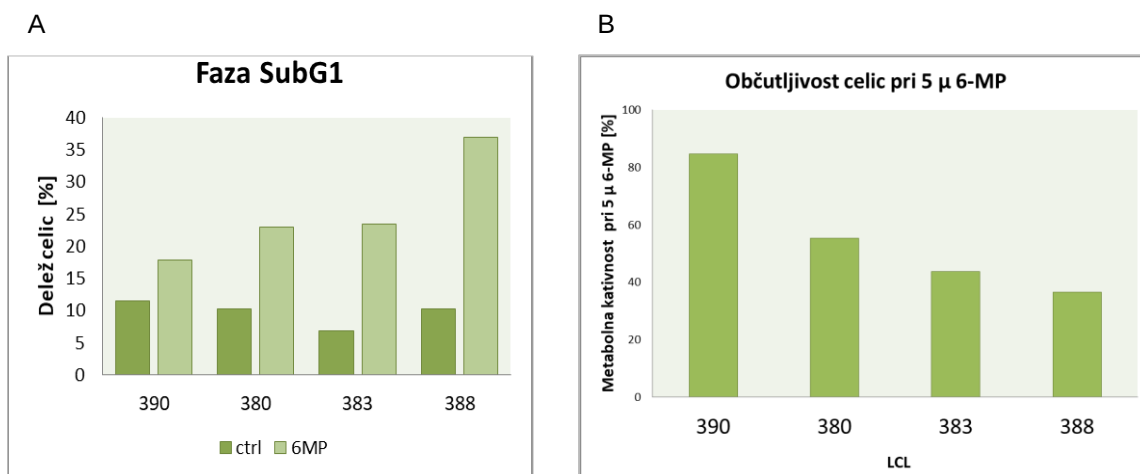
Naše ugotovitve o pojavu platoja se ujemajo s predhodnimi študijami, kjer so proučevali odziv celic po izpostavitvi naraščajočim koncentracijam tiopurinov. Na ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO) se z višanjem koncentracije 6-TG ustvari plato poškodb DNA (90). Na človeških levkemičnih celičnih linijah so opazili celo naraščanje MA pri koncentracijah višjih od 100 μM 6-MP (91). Obstaja več možnih vzrokov za pojav platoja ter za upadanje toksičnosti z naraščajočo koncentracijo tiopurinov. Izčrpanje znotrajceličnih zalog ATP, ki je potreben za pretvorbo TXMP v TGMP pri presnovi 6-MP v aktivne metabolite, lahko vodi do zastoja toksičnega delovanja 6-MP (5). Nenazadnje, pri visokih koncentracijah lahko pride do detoksifikacije tiopurinov z odstranitvijo žvepla iz strukture, kar povzroči pretvorbo tiopurinov v endogene purine (91). Upadanje toksičnosti tiopurinov pri povišanju koncentracije *in vitro* ni klinično pomembno, saj do njega pride pri koncentracijah, ki jih pri zdravljenju s tiopurini ne dosežemo (5).

4.1.2 Celice pod vplivom 6-MP ne zastanejo v nobeni od faz celičnega cikla

Občutljivost celic smo še dodatno preverili z analizo celičnega cikla. Merjenje MA v *in vitro* sistemih ima namreč nekatere negativne lastnosti in lahko prikazuje lažno pozitivne rezultate zaradi vpliva več dejavnikov. Določanje MA temelji na merjenju delovanja oksidacijskih mehanizmov v mitohondriju, zato lahko na rezultat vplivajo nekateri dodatni dejavniki (npr. neencimska redukcija reagenta MTS s kemičnimi reducenti, izpostavitve reagenta MTS svetlobi, reakcija s spojinami ...) (96). Nadalje nas je pri analizi celičnega cikla zanimalo tudi, ali 6-MP zaustavi celice v kateri od faz celičnega cikla.

Celični cikel smo analizirali pri LCL-ih 390, 380, 383 in 388, kjer smo po fiksaciji celic z etanolom in barvanju le-teh s PI določili delež celic v fazah SubG1, G0-G1, S in G2-M. Za ovrednotenje občutljivosti celic smo analizirali fazo SubG1 (Slika 18 A), ki med drugim predstavlja apoptotične celice. Po izpostavitvi LCL-ov 5 μM 6-MP se v primerjavi s kontrolo poveča delež delcev v SubG1 fazi pri vseh LCL-ih. Pri vsakem LCL-u opazimo drugačen delež celic, ki zapadejo apoptozi, s čimer smo še potrdili, da se celice različnih posameznikov razlikujejo v občutljivosti na 6-MP. LCL 390 izkazuje največjo neodzivnost na 6-MP in hkrati največji delež celic v SubG1 fazi (17,9 %), sledijo mu LCL 380

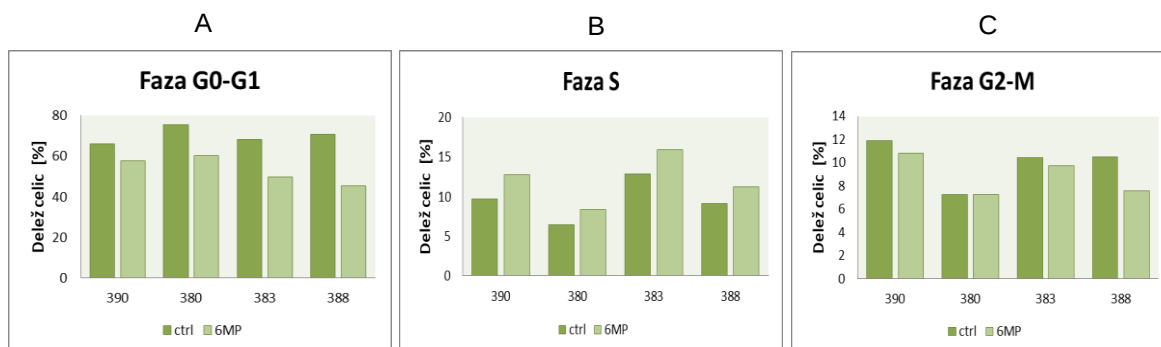
(23,0 %), LCL 383 (23,4 %) in LCL 388 (36,9 %), ki je najbolj občutljiv na 6-MP. Enako zaporedje občutljivosti celic na 6-MP smo določili tudi z merjenjem MA pri 5 μ M 6-MP (390: 84 %, 380: 55 %, 383: 44%, 388: 36 %) (Slika 18 B). Z analizo celičnega cikla smo potrdili rezultate merjenja MA, kar nakazuje na to, da pri testu MTS ni prišlo do večjega vpliva neželenih interferenc.



Slika 18: Primerjava rezultatov analize celičnega cikla in merjenja MA.

A: Delež celic v fazi SubG1 72 h po izpostavitvi 5 μ M 6-MP in barvanju s PI. B: MA celic 72 h po izpostavitvi celic 5 μ M 6-MP.

Z analizo faz G0-G1, S in G2-M (Slika 19) smo preverili, če 6-MP povzroči zastoj v kateri od faz celičnega cikla. Ugotovili smo, da se v fazi G2-M ohrani primerljiv delež celic kot pri kontroli. V fazi S smo opazili rahel porast celic po izpostavitvi 6-MP. V G0-G1 fazi opazimo manjši padec števila celic po izpostavitvi 6-MP, kar je najverjetneje posledica apoptoze celic. Iz rezultatov lahko tako sklepamo, da 6-MP ne izzove večjega zastoja celičnega podvojevanja v nobeni od faz celičnega cikla. V več študijah so namreč po izpostavitvi celičnih linij 6-MP ugotovili izrazitejši zastoj v fazi S (89,92). Naše ugotovitve se najbolj ujemajo z eno najnovejših študij, kjer so največji porast števila celic oziroma njihovih fragmentov ugotovili v fazi SubG1 (93).

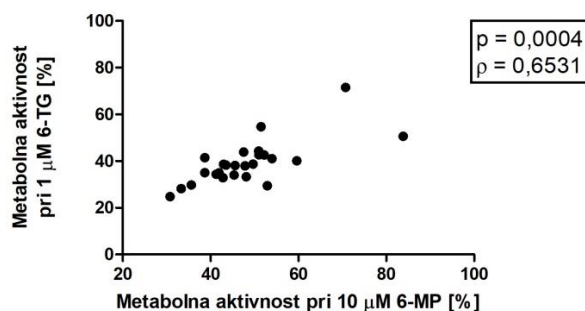


Slika 19: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla.

Celični cikel smo analizirali 72 h po izpostavitvi 5 μM 6-MP in barvanju celic s PI. Na grafih je prikazan delež celic v fazi G0-G1 (A), fazi S (B) in fazi G2-M (C).

4.1.3 6-TG in 6-MP imata soroden mehanizem delovanja

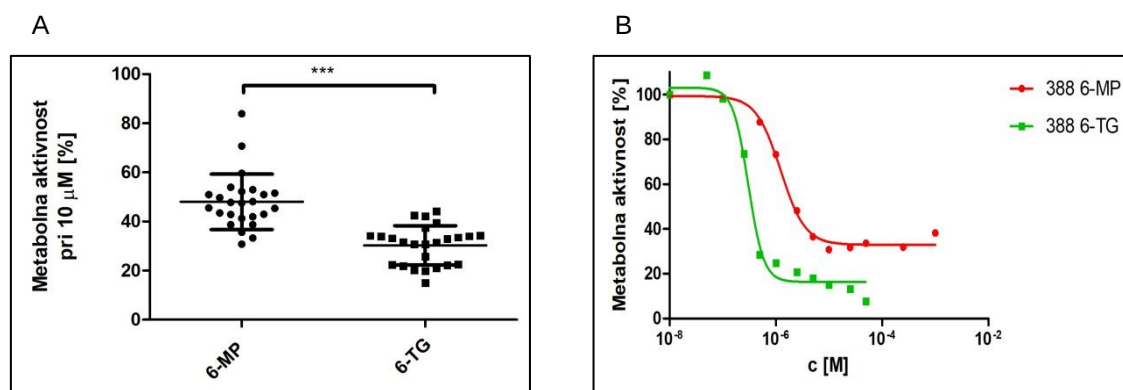
6-MP in 6-TG imata skupen velik del presnove in delujeta na iste tarče, zato smo želeli preveriti, ali obstaja povezava med občutljivostjo celic na 6-MP in 6-TG. LCL-i so dober *in vitro* model za napovedovanje tarč učinkovine in njenega načina delovanja. Na podlagi korelacije med citotoksičnostjo dveh učinkovin lahko napovemo, ali učinkovini delujeta po enakem mehanizmu in na isto tarčo. Na modelu LCL so že predhodno dokazali močno korelacijo med citotoksičnim delovanjem učinkovin s sorodnim delovanjem (81). V ta namen smo tudi mi primerjali MA celic po izpostavitvi 6-MP in 6-TG (Slika 20). Ugotovili smo statistično značilno pozitivno korelacijo ($p = 0,0004$, $\rho = 0,6531$) med MA celic po izpostavitvi 10 μM 6-MP in 1 μM 6-TG, kar potrjuje predhodne študije (33) in soroden mehanizem delovanja 6-MP in 6-TG (Slika 3).



Slika 20: Korelacija med občutljivostjo celic na izpostavitvi 10 μM 6-MP in 1 μM 6-TG.

MA celic je predstavljena kot povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev po 72-urni izpostavitvi 10 μM 6-MP in 1 μM 6-TG.

Znano je, da je presnova 6-TG do aktivnih metabolitov manj kompleksna kot presnova 6-MP (Slika 3), zato smo želeli v naslednjem koraku preveriti, ali je 6-TG bolj toksičen kot 6-MP pri isti koncentraciji in po enakem času izpostavitve učinkovini. Najprej smo primerjali MA 72 h po izpostavitvi celic 6-MP in 6-TG pri koncentraciji 10 μ M (Slika 21A). 6-TG je izkazoval signifikantno značilno višjo toksičnost kot 6-MP (test Mann-Whitney, $p < 0.001$). Nadalje smo primerjali krivulji odvisnosti MA od koncentracije obeh tiopurinov na izbranem LCL-u po 72-urnem tretmaju (Slika 21B). Pomik krivulje v levo, proti nižjim koncentracijam, in doseganje večje inhibicije proliferacije s 6-TG pomeni tako večjo učinkovitost (efficacy), kot tudi hitrejšo delovanje (potency) 6-TG.



Slika 21: Primerjava toksičnosti 6-MP in 6-TG.

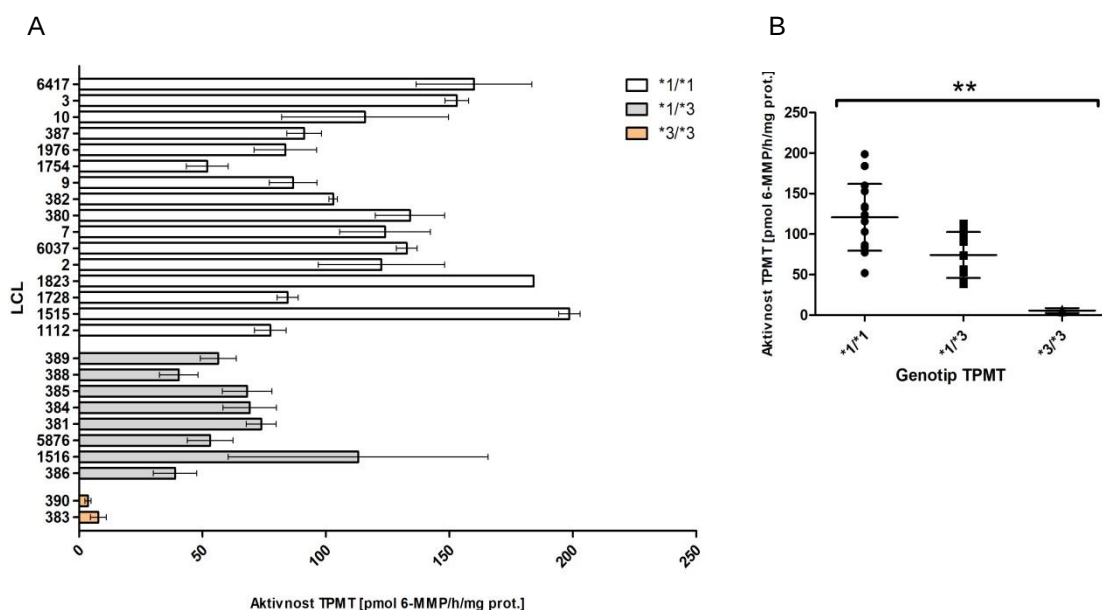
A: Graf prikazuje povprečne MA celic posameznih LCL-ov po 72-urni izpostavitvi 10 μ M 6-MP in 6-TG. Srednja vrednost je predstavljena z mediano in razpršenost z interkvartilnim razmikom. *** test Mann-Whitney, $p < 0.001$. B: MA celic izbranega LCL-a 388 v odvisnosti od koncentracije 6-MP in 6-TG po 72-urni izpostavitvi posameznemu tiopurinu.

Večja toksičnost 6-TG v primerjavi s 6-MP je bila predhodno že večkrat dokazana na celičnih linijah Jurkat (94), MOLT-4, CCRF-CEM ter Wilson (95). 6-TG izkazuje večjo citotoksičnost zaradi bolj neposredne in manj kompleksne presnove do 6-TGN (Slika 3) ter zmožnosti tvorbe višjih koncentracij 6-TGN (66). Kljub večji citotoksičnosti 6-TG *in vitro*, klinične študije ne dajejo prednosti 6-TG v primerjavi s 6-MP, saj ima 6-TG slabši profil neželenih učinkov (96,97). Uporaba 6-TG je povezana s podaljšano mielosupresijo (97), venookluzivno boleznijo jeter (96), portalno hipertenzijo in nodularno regenerativno hiperplazijo (66). Zaradi večjega nabora neželenih učinkov 6-TG ostaja 6-MP zdravilo izbora pri vzdrževalni fazi vnetne črevesne bolezni in ALL. 6-TG uporabijo v primeru zdravljenja, če se pojavijo občutljivostne reakcije ali neodzivnost na 6-MP (98–100).

4.2 Vpliv encima TPMT na občutljivost celic

4.2.1 Genski polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na aktivnost encima

Eden najpomembnejših in najbolj proučenih encimov v metabolni poti tiopurinov je TPMT, ki sodeluje pri deaktivaciji 6-MP in 6-TG. Varianten *TPMT* običajno nosi zapis za zmanjšano aktivnost encima TPMT, kar je povezano z nastankom večjih količin aktivnih metabolitov (101). Na našem vzorcu 26 LCL-ov je bil genotip *TPMT* predhodno določen, in sicer je imelo 15 LCL-ov genotip $*1/*1$, 9 LCL-ov $*1/*3$ in 2 LCL-a $*3/*3$ (Preglednica III). Ker je dejanska aktivnost TPMT lahko drugačna od tiste, ki jo predvidimo na podlagi genotipa (58), smo LCL-om določili aktivnosti TPMT (Slika 22A). Želeli smo preveriti, ali znani najpogostejši in klinično najpomembnejši polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na aktivnost encima.



Slika 22: Aktivnost TPMT v celicah LCL glede na genotip *TPMT*.

A: Povprečne vrednosti najmanj dveh bioloških ponovitev meritev aktivnosti TPMT s standardno deviacijo v posameznem LCL-u. **B:** Razporeditev aktivnosti TPMT v LCL-ih glede na genotip *TPMT*. Srednja vrednost je predstavljena z mediano in razpršenost z interkvartilnim razmikom. ** test Kruskal-Wallis, $p < 0,01$.

V celičnih lizatih LCL smo po 2-urni izpostavitvi le-teh 6-MP z metodo HPLC izmerili nastanek 6-MMP in izračunali aktivnost TPMT. Po razvrstitvi LCL-ov v skupine glede na genotip *TPMT* smo opazili padanje aktivnosti TPMT pri posameznikih, ki nosijo zapis za *TPMT* z vsaj enim variantnim alelom. Mediana aktivnosti TPMT je bila v skupini z

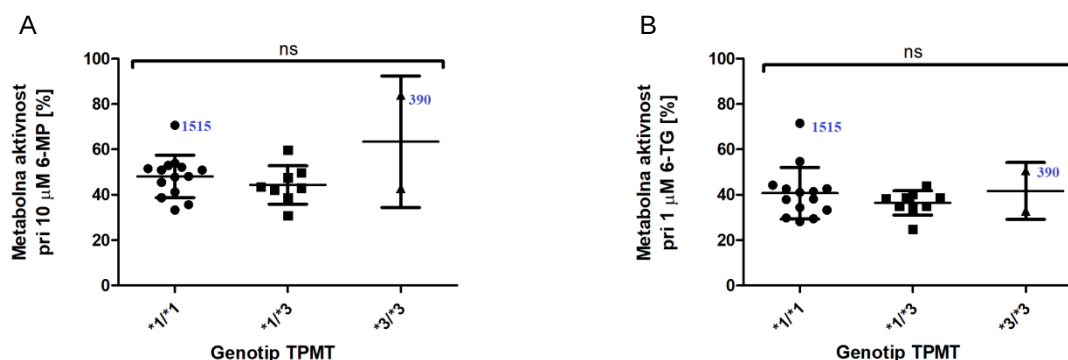
genotipom $*1/*1$ 122,4 pmol 6-MMP/h/mg prot. z razponom aktivnosti TPMT od 51,9 - 198,6 pmol 6-MMP/h/mg prot., v skupini $*1/*3$ je znašala 73,8 pmol 6-MMP/h/mg prot. z razponom od 38,9- 113,0 pmol 6-MMP/h/mg prot in pri skupini $*3/*3$ 5,7 pmol 6-MMP/h/mg prot z razponom od 3,6 - 7,9 pmol 6-MMP/h/mg prot. Ugotovili smo, da predhodno določeni polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na aktivnost encima, saj se aktivnost TPMT med skupinami z različnim genotipom *TPMT* signifikantno razlikuje (test Kruskal-Wallis, $p = 0,0045$) (Slika 22B).

Opazimo, da v skupini z genotipom $*1/*1$ nekateri LCL-i izkazujejo aktivnost TPMT, ki je v območju vrednosti za heterozigotno skupino $*1/*3$. To lahko pomeni, da so v *TPMT* prisotni drugi polimorfizmi, ki jih pri genotipizaciji najpogostejših variantnih alelov nismo določili, ali pa na aktivnost TPMT v njih vplivajo drugi (zunanji) dejavniki. Aktivnost TPMT je pri skupini $*3/*3$ skoraj nezaznavna, saj LCL-a 390 in 383 nosita zapis za skoraj popolnoma nefunkcionalen encim TPMT. LCL 390 ima nižjo aktivnost TPMT (3.6 pmol 6-MMP/h/mg prot.) v primerjavi z LCL 383 (7.9 pmol 6-MMP/h/mg prot.), kar se ujema z njunim genotipom *TPMT*. LCL 390 nosi zapis za TPMT z dvema variantnima aleloma *TPMT*3A*, medtem ko je LCL 383 heterozigot za variantna alela *TPMT*3A* in *TPMT*3C*. Alel *TPMT*3C* vsebuje le en SNP in nima tako velikega vpliva na terciarno strukturo TPMT kot alel *TPMT*3A*, ki je posledica dveh SNP-jev. Znano je, da alel *TPMT*3A* povzroči večje spremembe v terciarni strukturi TPMT kot alel *TPMT*3C* in posledično večje znižanje aktivnosti TPMT (51), kar posredno potrjujejo tudi naši rezultati.

4.2.1 Genotip *TPMT* ne korelira z občutljivostjo celic na tiopurine

V nadaljevanju smo na podlagi poznavanja genotipa *TPMT* in aktivnosti TPMT preverili vpliv TPMT na občutljivost celic izpostavljenih tiopurinom. Dokazano je namreč, da se pacienti z nižjo aktivnostjo TPMT bolje odzovejo na terapijo s tiopurini (102), a imajo hkrati tudi večje tveganje za nastanek mielosupresije (103). Na našem modelu LCL smo najprej želeli preveriti, ali polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na občutljivost celic na 6-MP in 6-TG. Predpostavili smo, da bodo homozigoti za divji tip alela ($*1/*1$) izkazovali najnižjo občutljivost na 6-MP in 6-TG, heterozigoti ($*1/*3$) srednjo in dvojno variantni ($*3/*3$) največjo občutljivost. MA celic smo razvrstili glede na genotip *TPMT* ter statistično ovrednotili, ali obstaja razlika v občutljivosti celic na 6-MP in 6-TG glede na genotip *TPMT* (Slika 23). Genotip *TPMT* na našem vzorcu LCL-ov ne vpliva na občutljivost celic

izpostavljenih 6-MP in 6-TG, saj v skupinah z različnim genotipom *TPMT* nismo dokazali signifikantno značilne razlike v MA (Slika 23). Naše ugotovitve se ujemajo s predhodno študijo, kjer na 194 LCL-ih niso uspeli dokazati vpliva genotipa *TPMT* pri občutljivosti na 6-MP in 6-TG (104).

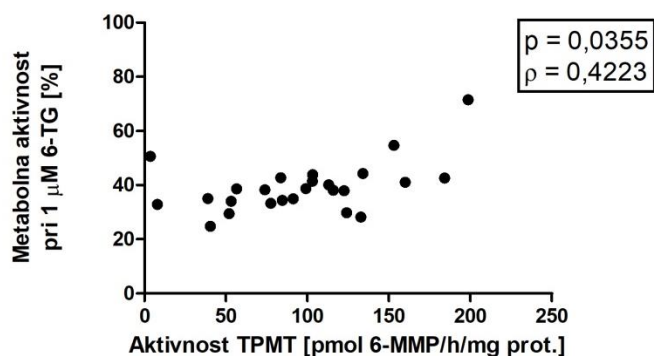


Slika 23: Občutljivost celic LCL na 6-MP in 6-TG glede na genotip *TPMT*.

MA celic LCL po 72-urni izpostavitvi 10 μ M 6-MP (A) in 1 μ M 6-TG (B) je razporejena glede na genotip *TPMT*. Srednja vrednost je predstavljena z mediano in razpršenost z interkvartilnim razmikom. (test Kruskal-Wallis, ns: ni signifikantno). Z modro barvo sta označena LCL-a 1515 in 390, ki sta podrobneje opisna v poglavju 4.5 Preučitev posameznih primerov.

4.2.2 Aktivnost *TPMT* korelira z občutljivostjo celic na 6-TG

V enem od prejšnjih odstavkov smo omenili, da je v skupini z divjim tipom *TPMT* (*1/*1) nekaj LCL-ov z nižjo aktivnostjo, kot bi jo pričakovali glede na genotip *TPMT*. Ker hkrati nismo zaznali povezave med genotipom *TPMT* in občutljivostjo celic, smo nadalje preverili, ali aktivnost encima *TPMT* vpliva na občutljivost celic izpostavljenih 6-MP in 6-TG. Ugotovili smo povezavo med aktivnostjo *TPMT* in občutljivostjo na 6-TG. Aktivnost *TPMT* je pozitivno korelirala z MA pri 1 μ M 6-TG ($p = 0,0355$ $\rho = 0,4223$) (Slika 24). Aktivnost *TPMT* ni korelirala z občutljivostjo na 6-MP.



Slika 24: Metabolna aktivnost celic LCL pri 1 µM 6-TG v odvisnosti od aktivnosti TPMT.

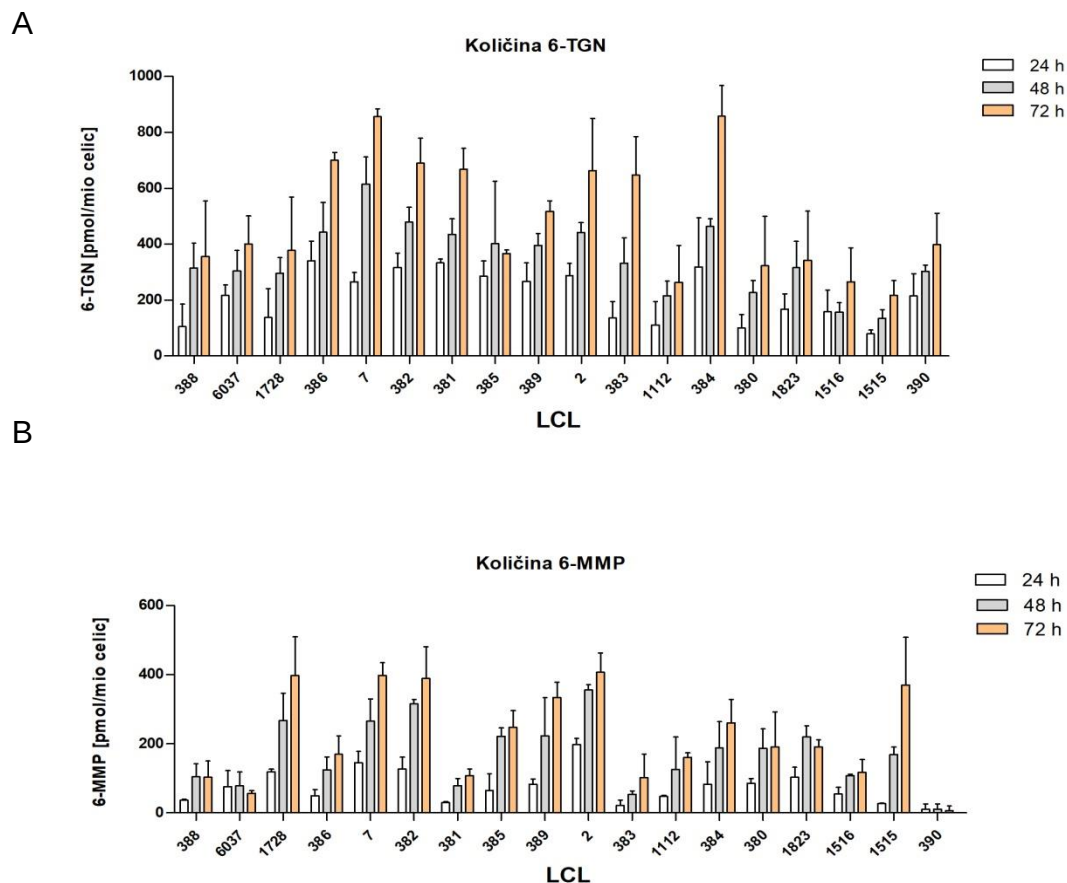
MA predstavlja povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev po 72-urni izpostavitvi celic LCL 1 µM 6-TG. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ .

Naše ugotovitve kažejo, da lahko na podlagi poznavanja aktivnosti TPMT na naši skupini LCL-ov delno napovemo občutljivost celic na 6-TG, ne pa tudi na 6-MP. Povezava med odzivom na 6-TG in aktivnostjo TPMT *in vitro* je bila predhodno že večkrat dokazana na modelu LCL (104), na celični liniji Jurkat (94) ter celični liniji MOLT4, kjer je zmanjšanje aktivnosti TPMT vodilo v večjo občutljivost celic na 6-TG, medtem ko ni imelo velikega vpliva na 6-MP (105). Encim TPMT predstavlja večji delež presnove pri 6-TG, zato je povezava med njegovo aktivnostjo in občutljivostjo celic lahko bolj izrazita. Presnovna pot 6-MP je daljša in vključuje več genetsko pogojenih dejavnikov kot presnova 6-TG, verjetno zato v našem primeru ni bilo mogoče odziva celic na 6-MP pojasniti samo z značilnostmi enega encima.

4.3 Metaboliti 6-merkaptopurina

Ker nismo opazili korelacije med aktivnostjo TPMT in občutljivostjo celic na 6-MP, smo iskali druge dejavnike, ki bi napovedali odziv na 6-MP. 6-MP se presnavlja do dveh poglavitnih skupin metabolitov: aktivnih 6-TGN in po večini neaktivnih metiliranih 6-MMP (Slika 3). Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike v množini nastalih 6-TGN in 6-MMP v skupinah z različnim genotipom *TPMT*, in ali se profil metabolitov ujema z aktivnostjo TPMT. V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali je občutljivost celic na 6-MP odvisna od količine nastalega citotoksičnega 6-TGN. V ta namen smo pri osemnajstih celičnih linijah določili količino metabolitov po izpostavitvi celic 6-MP. Celicam, ki so bile izpostavljene 10 µM 6-MP od 24-72 h, smo določili celokupno količino riboziliranih in neriboziliranih

6-TGN in 6-MMP v celicah in celičnem mediju s HPLC (Slika 25). Rezultate merjenja količine nastalih metabolitov smo izrazili kot množino 6-TGN in 6-MMP na število celic.

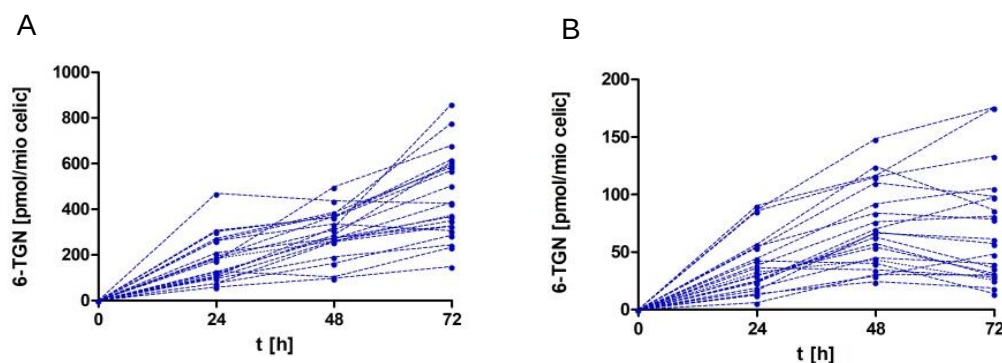


Slika 25: Celokupna količina 6-TGN in 6-MMP v posameznem LCL-u.

Metabolite smo merili 24, 48 in 72 ur po izpostavitvi LCL-ov 10 μ M 6-MP in podali njihovo količino kot povprečje meritev najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev s standardnim odklonom. A: Količina 6-TGN predstavlja vsoto izmerjene količine 6-TGN v celicah in v mediju. B: Količina 6-MMP izmerjena v celicah.

Pri večini celičnih linij vidimo, da celokupna količina 6-TGN in 6-MMP skozi 72-urno časovno obdobje narašča (Slika 25). 6-MMP v mediju nismo zaznali, kar pomeni, da LCL-i najverjetneje nimajo sekretornih prenašalcev za 6-MMP in njegov ribozid. Tako v celicah kot v mediju pa smo zaznali 6-TGN. V celicah smo izmerili približno 5-krat nižjo povprečno količino 6-TGN kot v mediju v vseh časovnih točkah. Do večje količine 6-TGN v mediju bi lahko prišlo zaradi hitrega izmeta citotoksičnih metabolitov preko sekretornih prenašalcev ali lize celic. Količina 6-TGN v mediju narašča skozi celotno 72-urno obdobje (Slika 26A). Količina 6-TGN v celici (Slika 26B) pa se večja do časovne točke 48 ur, nakar

se pri večini celičnih linij ustali ali upade, kar je lahko posledica upočasnitve presnove 6-MP kot posledica pomanjkanja ATP, lize celic zaradi toksičnega delovanja 6-MP ali povečanega izmeta 6-TGN, saj se ravno med časovnima točkama 48 in 72 ur najbolj poveča količina 6-TGN v mediju.



Slika 26: Količina 6-TGN v mediju in v celicah LCL v odvisnosti od časa.

18 LCL-ov smo izpostavili 10 μ M 6-MP. 6-TGN smo merili po 24, 48 in 72 urah v celičnem mediju (A) in v celičnih lizatih (B). Količina metabolitov je predstavljena kot povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev.

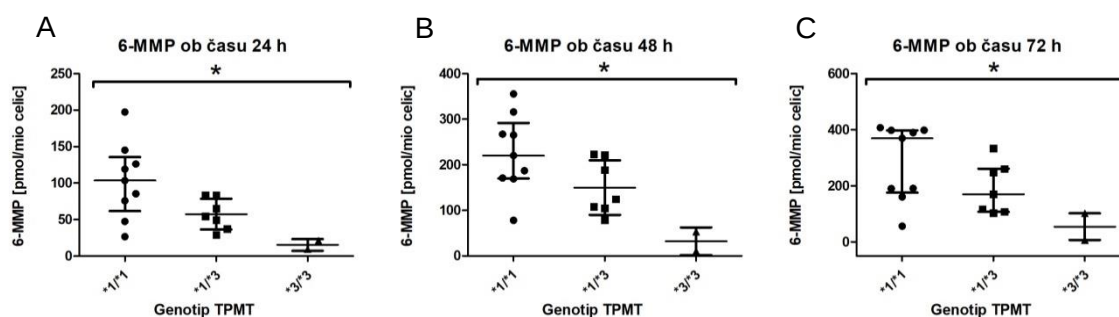
Upadanje količine 6-TGN v celici po 48 urah so zaznali že v predhodni študiji na hepatocitih (106) ter na mišjih levkemičnih celičnih linijah, kjer so ta pojav pripisali izčrpanju zalog kofaktorjev, ki sodelujejo pri aktivaciji 6-MP (npr. ATP) (107). To je potrdila tudi najnovejša študija, v kateri so dokazali padanje koncentracije ATP, ki je največje ravno po 48 h (93). V našem primeru upadanje količine 6-TGN v celici po 48 urah ne moremo v celoti pripisati pomanjkanju ATP, saj količina celokupnega 6-TGN še vedno narašča tudi po 48 urah.

4.3.1 Količina 6-MMP korelira z aktivnostjo TPMT

Nadalje smo preverjali vlogo TPMT pri presnovi 6-MP. Predpostavili smo, da večja aktivnost TPMT pomeni večjo količino nastalega 6-MMP. Posledično smo pričakovali, da bomo pri LCL-ih z vsaj enim variantnim alelom v *TPMT* izmerili več 6-TGN ter manj 6-MMP v primerjavi s skupino *1/*1 (Slika 7).

LCL-e smo razdelili v skupine glede na genotip *TPMT*. Količina nastalega 6-MMP je bila signifikantno različna med skupinami z različnim genotipom *TPMT* v vseh časovnih

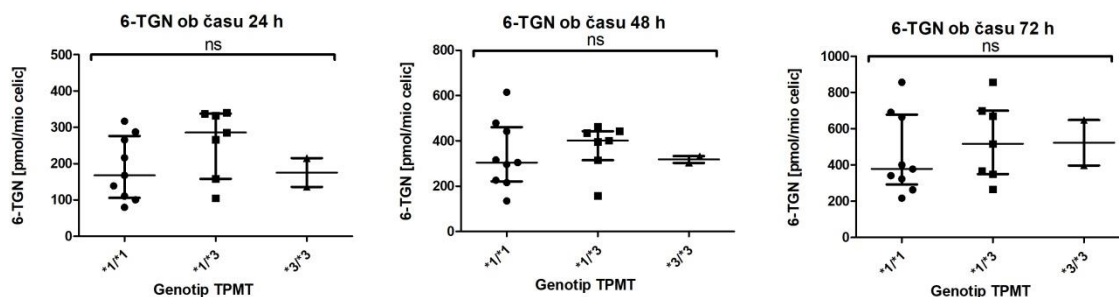
točkah (Slika 27). LCL-i z divjim tipom *TPMT* (*1/*1) so imeli najvišje izmerjene vrednosti 6-MMP, heterozigoti *TPMT* (*1/*3) srednje visoke in dvojno variantna LCL-a (*3/*3) najnižje količine izmerjenih 6-MMP. Nivo 6-MMP v celici je pozitivno koreliral tudi z aktivnostjo *TPMT* (24 h: $p = 0,0303$, $\rho = 0,5108$; 48 h: $p = 0,1126$, $\rho = 0,3870$, 72 h: $p = 0,0672$, $\rho = 0,4407$). Nastanek 6-MMP je neposredno povezan z encimom *TPMT*, zato so razlike med skupinami z različnim genotipom *TPMT* in korelacije z aktivnostjo *TPMT* pričakovane in v skladu s predhodnimi študijami (71).



Slika 27: Množina 6-MMP glede na genotip *TPMT*.

Količina nastalega 6-MMP po izpostavitvi celic LCL 10 μ M 6-MP za 24, 48 in 72 h po skupinah z različnim genotipom *TPMT*. Srednja vrednost je predstavljena z mediano in razpršenost z interkvartilnim razmikom. Test Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$.

Med skupinami z različnim genotipom *TPMT* nismo opazili signifikantno značilne razlike v množini 6-TGN (Slika 28). Prav tako količina nastalega 6-TGN ne korelira z aktivnostjo *TPMT*, kar pomeni, da imajo pri nastanku 6-TGN iz 6-MP večjo ali dopolnilno vlogo k encimu *TPMT* še drugi encimi, kofaktorji in prenašalci. Verjetno so ravno zaradi vpliva mnogih dejavnikov rezultati študij nasprotujoči, saj so v nekaterih *in vitro* (27) in *in vivo* (37,108) študijah dokazali negativno korelacijo med aktivnostjo *TPMT* in količino 6-TGN, v drugih pa ne (71).

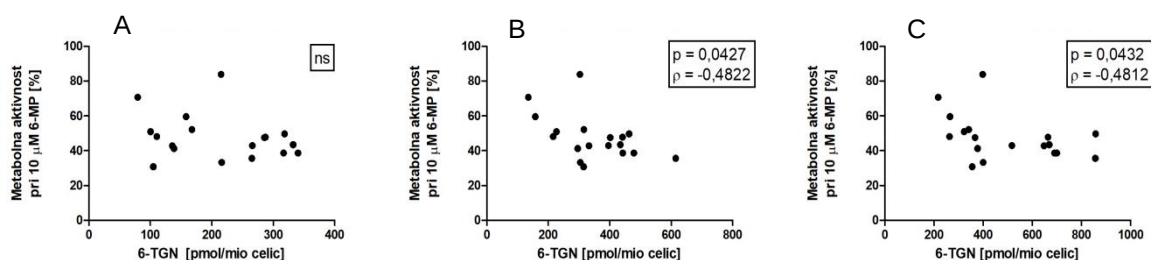


Slika 28: Množina 6-TGN glede na genotip *TPMT*.

Razporeditev celokupne količine 6-TGN po skupinah LCL-ov z različnim genotipom *TPMT* po inkubaciji z 10 µM 6MP po času 24, 48 in 72 h. *1/*1 - divji tip *TPMT*, *1/*3 – heterozigotni tip *TPMT*, *3/*3 - dvojno variantni *TPMT*. Srednja vrednost je predstavljena z mediano in razpršenost z interkvartilnim razmikom. Test Kruskal-Wallis, ns: ni signifikantno.

4.3.1 Občutljivost celic je povezana s količino nastalih 6-TGN

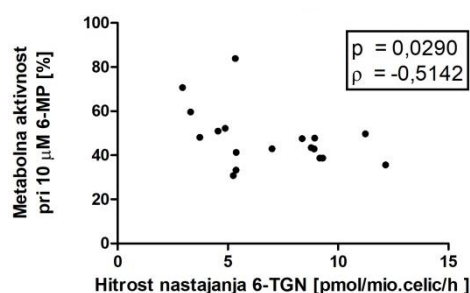
Znano je, da 6-TGN deluje citotoksično, zato smo želeli preveriti, ali celice, ki proizvedejo več 6-TGN, izkazujejo večjo občutljivost na 6-MP. Ugotovili smo signifikantno značilno negativno korelacijo med MA pri 10 µM 6-MP in celokupno količino 6-TGN (Slika 29). Rezultati kažejo, da večja količina nastalega 6-TGN pomeni višjo citotoksičnost po 48 in 72 urah, ne pa tudi po 24 urah. Ta ugotovitev nakazuje, da 6-MP izkazuje učinek s časovnim zamikom, saj se mora najprej aktivirati v znotrajcelični presnovi preko vrste encimov in nato preiti skozi S-fazo celičnega cikla, kjer se vgradi v DNA (6). Kot že omenjeno v uvodu so v študijah prišli do nasprotnih si rezultatov o vplivu 6-TGN na klinični odziv. V našem primeru je korelacija šibka, kar lahko pripišemo tudi majhnemu vzorcu celičnih linij.



Slika 29: Občutljivost celic LCL v odvisnosti od količine celokupnega 6-TGN.

MA celic LCL je podana kot povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) po izpostavitvi 10 µM 6-MP. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ . (ns: ni signifikantno)

Čeprav 6-TGN deluje na tarče znotraj celice, nismo ugotovili signifikantno značilne korelacije med količino 6-TGN v celici in MA. Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da smo celice izpostavili previsoki koncentraciji 6-MP. V celici je verjetno prišlo do presežnih koncentracij 6-TGN, ki so jih sekretorni prenašalci prenesli iz celice. Ob predpostavki, da smo celice izpostavili previsoki koncentraciji 6-MP, smo želeli primerjati občutljivost celic s parametrom, ki je neodvisen od koncentracije 6-MP, zato smo v analizo vpeljali hitrost nastajanja 6-TGN. Z linearno regresijo celokupne količine 6-TGN po času smo izračunali naklon, ki je predstavljal hitrost nastajanja 6-TGN. Ugotovili smo signifikantno značilno negativno korelacijo med MA po izpostavitvi 10 μ M 6-MP in hitrostjo nastajanja 6-TGN ($p = 0,0290$, $\rho = -0,5142$) (Slika 30), s čimer smo še dodatno potrdili citotoksičen vpliv 6-TGN na občutljivost celic.



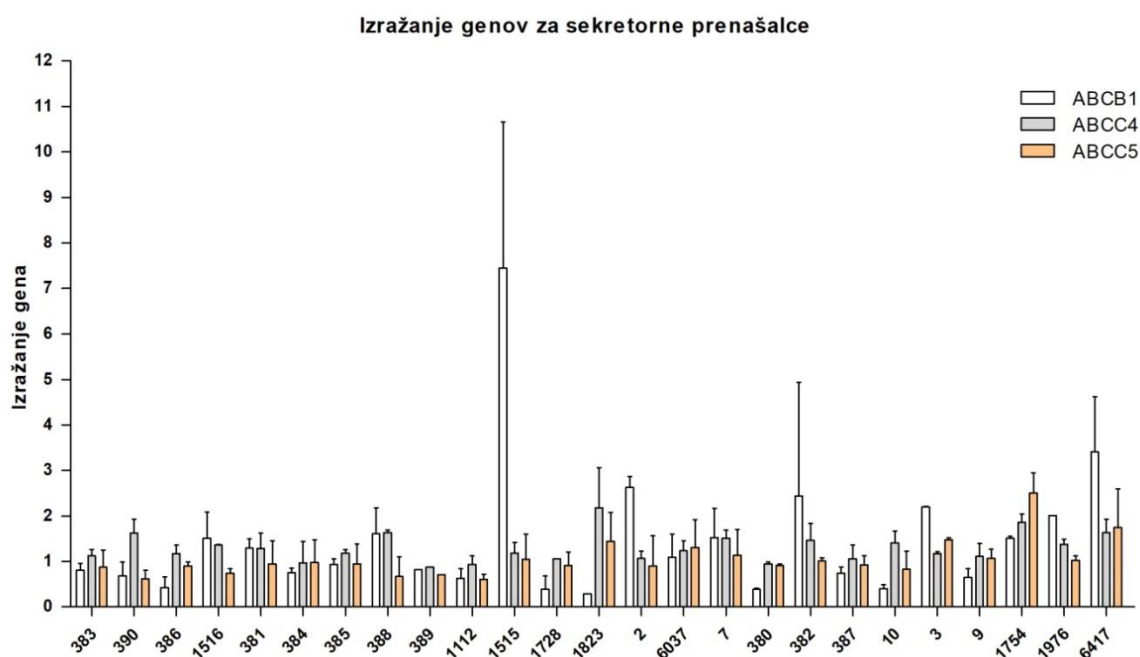
Slika 30: Občutljivost celic v odvisnosti od hitrosti nastajanja 6-TGN.

MA celic LCL je predstavljena kot povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev po 72-urni izpostavitvi 10 μ M 6-MP. Hitrost nastajanja 6-TGN je določena kot naklon premice na grafu odvisnosti celokupne množine 6-TGN od časa v razponu od 0 do 72 ur. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ .

Pričakovali smo, da bodo celice, ki proizvedejo več 6-MMP bolj neodzivne na 6-MP. Pri pacientih z vnetno črevesno boleznijo je namreč neodzivnost na tiopurine povezana z višjimi koncentracijami 6-MMP oziroma visokim razmerjem 6-MMP/6-TGN (98). Na našem vzorcu LCL-ov nismo odkrili tovrstne povezave. Vzrok bi lahko iskali v tem, da pri določanju 6-MMP zajamemo tako neaktivni metabolit 6-MMP, kot tudi citotoksični MeTIMP. Ta zavira *de novo* sintezo purinov, zato ima obraten prispevek k občutljivosti celic kot neaktiven neriboziliran 6-MMP.

4.4 Izražanje prenašalca ABCB1 korelira z občutljivostjo celic na 6-MP

Ker pri občutljivosti na 6-MP nismo opazili korelacije z aktivnostjo ali genotipom *TPMT*, smo v naslednjem koraku želeli preveriti še dodaten dejavnik, ki bi ga lahko povezali z odzivom na terapijo. Izražanje membranskih prenašalcev se je v preteklosti izkazalo za pomembne dejavnike na izid zdravljenja (109). Povečano izražanje membranskega prenašalca ABCB1 je odgovorno za neodzivnost na mnoge protitumorne zdravilne učinkovine (74). Prenašalca ABCC4 in ABCC5 pa prenašata tiopurinske metabolite iz celice (74). Zanimalo nas je, ali izražanje sekretornih prenašalcev vpliva na toksičnost tiopurinov. Svojim LCL-om smo dodali še 13 LCL-ov, ki so imeli že predhodno izmerjeno občutljivost na 6-MP. Na vzorcu 38 LCL-ov smo določili diferencialno izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5* na nivoju mRNA (Slika 31).

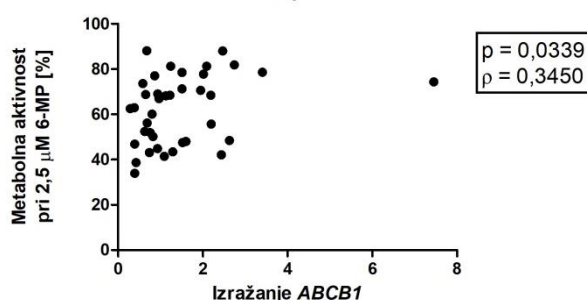


Slika 31: Izražanje genov *ABCB1*, *ABCC4* in *ABCC5*.

Izražanje genov je podano kot povprečje vrednosti najmanj dveh neodvisnih bioloških meritev s standardno deviacijo za prenašalce ABCB1 (mediana = 0,9326), ABCC4 (mediana = 1,180), ABCC5 (mediana = 0,9441). Predstavljene so meritve 25 LCL-ov, ki smo jih že predhodno uporabljali pri eksperimentalnem delu. Dodatno smo analizirali izražanje še 13 LCL-ov, ki so imeli predhodno določeno občutljivost na 6-MP.

Izražanje *ABCB1* se na našem vzorcu LCL-ov odraža z znatnimi inter-individualnimi razlikami v vrednostih (od 0,2849 do 7,450, mediana = 0,9326). Ugotovili smo signifikantno značilno pozitivno korelacijo med izražanjem *ABCB1* in MA pri nižjih

koncentracijah 6-MP (2,5 μ M: $p = 0,0339$, $\rho = 0,3450$, 5 μ M: $p = 0,0582$, $\rho = 0,3100$) (Slika 32), medtem ko korelacije s 6-TG nismo ugotovili. Vzrok za to je verjetno v tem, da smo imeli pri 6-TG premajhen vzorec, saj smo imeli podatke o občutljivosti celic le za 25 LCL-ov in ne dodatnih 13 kot pri 6-MP. Povezava med izražanjem *ABCB1* in odzivom na tiopurine je bila predhodno že pokazana *in vitro* na mišjih levkemičnih celičnih linijah (78). Obstaja tudi veliko *in vivo* študij, ki dokazujejo povezavo med polimorfizmi v *ABCB1*, učinkovitostjo terapije in neželenimi učinki pri zdravljenju ALL (110,111). V študijah so uporabljena poleg tiopurinov tudi druga zdravila skladno s protokoli zdravljenja, zato iz njih ne moremo neposredno sklepati na povezavo med polimorfizmi v *ABCB1* in tiopurini.



Slika 32: Občutljivost celic LCL v odvisnosti od izražanja *ABCB1*.

MA celic LCL po 72-urni izpostavitvi 2,5 μ M 6-MP in izražanje *ABCB1* sta predstavljena kot povprečje najmanj dveh neodvisnih bioloških ponovitev. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ .

Med izražanjem *ABCB1* in količino metabolitov nismo ugotovili povezave. V eni izmed študij na celicah s povečanim izražanjem *ABCB1* so ugotovili nižjo koncentracijo 6-MMP v primerjavi s kontrolo (78), iz česar sledi, da *ABCB1* najverjetneje povzroča izmet 6-MP ali njegovih metabolitov iz celice.

Med izražanjem prenašalcev *ABCC4*, *ABCC5* ter občutljivostjo celic ali količino metabolitov nismo ugotovili povezave, čeprav je bila ta že večkrat dokazana (37,77). *In vitro* povzroči odsotnost *ABCC4* kopičenje 6-TGN in večjo občutljivost na 6-MP (76). Pri pacientih so polimorfizmi v *ABCC4* in *ABCC5* povezani z neodzivnostjo na terapijo in povečanim tveganjem za ponovitev bolezni (37). Na naši skupini LCL-ov opazimo zelo ozek raztros vrednosti izražanja *ABCC4* (od 0,8736 do 2,182) in *ABCC5* (0,6050 do 2,503), kar onemogoča zaznavo razlik med celičnimi linijami na tako majhnem vzorcu.

4.5 Preučitev posameznih primerov

Tekom proučevanja LCL-ov smo se srečali z nekaterimi izstopajočimi primeri LCL-ov. V nadaljevanju jih bomo predstavili in skušali najti dejavnike, ki bi pojasnili njihov odziv na terapijo. Pri statistični analizi nismo izločili izstopajočih LCL-ov kot osamelce, saj je bistvo ravno v tem, da poiščemo dejavnik, ki bi zajel odziv vseh LCL-ov na izpostavitve tiopurinom. Primeri, ki odstopajo od pričakovanega odziva, lahko predstavljajo pomemben model pri nadaljnjem iskanju dejavnikov odziva na terapijo s tiopurini.

4.5.1 Pričakovan odziv na tiopurine glede na aktivnost in genotip TPMT

LCL 1515

Med LCL-i z genotipom $*1/*1$ je izstopal zelo neodziven **LCL 1515**, ki ima približno enkrat večjo MA kot je povprečje te skupine po izpostavitvi tako 6-MP kot tudi 6-TG (Slika 17). Vzrok za neodzivnost na tiopurine bi v tem primeru lahko bil v dejavniku, ki je skupen v presnovni poti 6-MP in 6-TG. Prvi dejavnik, ki pojasni veliko neodzivnost LCL-a 1515 na 6-MP in 6-TG, je najvišja aktivnost TPMT med vsemi LCL-i (Slika 22A). Nizke količine izmerjenega 6-TGN (Slika 25A) se ujemajo z visoko aktivnostjo TPMT. Na drugi strani vidimo, da hkrati proizvede količine 6-MMP (Slika 25B), ki so primerljive z nekaterimi LCL-i z nižjo aktivnostjo TPMT. Omenjena dejstva nakazujejo, da tudi pri LCL-u 1515 poleg TPMT obstaja dodaten dejavnik, ki uravnava količino 6-MMP in vpliva na občutljivost.

Na podlagi podatkov o izražanju sekretornih prenašalcev smo prišli do dodatnega razloga za visoko neodzivnost LCL-a 1515. Ta ima 8-krat višje izražanje *ABCB1* kot je mediana izražanja *ABCB1* vseh LCL-ov (Slika 31). *ABCB1* bi lahko prenesel 6-MP iz celice in tako zmanjšal obseg njihove aktivacije do citotoksičnega 6-TGN, ki ga je ta LCL proizvedel zelo malo. Prav tako je LCL 1515 proizvedel manj 6-MMP kot bi pričakovali glede na njegovo visoko aktivnost TPMT, kar bi lahko bila posledica izmeta 6-MP z *ABCB1*.

LCL 388

Na drugi strani je najbolj občutljiv tako na 6-MP, kot tudi na 6-TG **LCL 388**. Ta je heterozigot ($*1/*3$) in izkazuje eno najnižjih aktivnosti TPMT znotraj skupine heterozigotov (Slika 22A), kar lahko pojasni njegovo veliko občutljivost. Pri njem ne opazimo velikega izstopanja katerega od drugih analiziranih dejavnikov, zato predstavlja

enega od primerov, kjer bi se posameznik najverjetneje ustrezno odzval na terapijo le na podlagi poznavanja genotipa ali aktivnosti TPMT.

4.5.1 Nepričakovan odziv na 6-MP glede na genotip in aktivnost TPMT

LCL 390

LCL 390 je dvojno varianten homozigot (***3A/*3A**), kar pomeni, da nosi zapis za najnižjo aktivnost TPMT med vsemi LCL-i (Slika 22A). Glede na genotip *TPMT* in aktivnost TPMT smo pričakovali, da bo LCL 390 najbolj občutljiv na izpostavitve tiopurinom, vendar smo ugotovili prav nasprotno. LCL 390 je bila najbolj neodzivna celična linija na 6-MP. V koncentracijskem območju od 0,5-50 μ M 6-MP so izkazovale celice LCL-a 390 skoraj popolno neodzivnost z vrednostmi MA nad 85 % (Priloga: Slika 33). LCL 390 je nekoliko bolj občutljiv na 6-TG (MA = 50,6 %) kot na 6-MP, kar kaže na to, da na njegov odziv vpliva eden od dejavnikov, ki je vpleten v aktivacijsko pot 6-MP in ni skupen farmakokinetiki 6-TG.

Na podlagi zbranih podatkov o neodzivnosti celic LCL-a 390 in nizki aktivnosti TPMT, nas je še posebej zanimalo, kakšno količino metabolitov proizvede LCL 390. Pričakovano je komaj zaznavna količina 6-MMP (Slika 25B) odražala aktivnost in genotip *TPMT* tega LCL-a. Glede na nizko aktivnost TPMT bi pri LCL-u 390 pričakovali zelo visok nivo 6-TGN, a rezultati kažejo, da je proizvedena količina 6-TGN (Slika 25A) podobno nizka kot količina teh metabolitov v LCL-ih, ki imajo mnogo višjo aktivnost TPMT. To zopet nakazuje, da je lahko pri LCL-u 390 okvarjen kateri od encimov, ki sodelujejo pri nastanku 6-TGN iz 6-MP. V nadaljevanju smo pri tem LCL-u določili še relativno nizko izražanje prenašalca ABCB1, kar pomeni, da znižana občutljivost na 6-MP ni povezana s povečanim izmetom 6-MP iz celice. LCL390 je torej odziven na citotoksično delovanje 6-TG, ne pa 6-MP. V prihodnje bi bilo pri LCL-u 390 smiselno preveriti aktivnosti encimov IMPDH in GMPS, ki sodelujeta pri presnovi 6-MP, ne pa tudi 6-TG (Slika 3). Polimorfizme v intronih gena za encim IMPDH so v genomski asociacijski študiji že povezali s slabšim preživetjem in povečanim tveganjem za ponovitev bolezni (37). Polimorfizme v *GMPS* pa so pri bolnikih z vnetno črevesno boleznijo povezali z boljšim prenašanjem terapije s tiopurini (112). Omenjena encima sodelujeta pri aktivaciji 6-MP do 6-TGN, ne pa tudi pri aktivaciji 6-TG, zato bi lahko njihova aktivnost vplivala na odziv celic LCL-a 390. Glede na to, da se je LCL 390 odzval na citotoksično delovanje 6-TG, pri njem najverjetneje ne

gre za okvaro sistema MMR, kar je že bilo dokazano kot vzrok za neodzivnost na tiopurine (113).

V klinični praksi bi posamezniku, ki mu pripada LCL 390, z genotipizacijo ali z merjenjem aktivnosti TPMT pripisali ustrezno nizko aktivnost TPMT, čemur bi sledila prilagoditev odmerka. Ta posameznik ima na podlagi nizke aktivnosti TPMT teoretično večjo sposobnost tvorbe aktivnih metabolitov, zato bi prejel le okrog 10 % standardnega odmerka tiopurinov, saj bi se s tem želeli izogniti pojavu toksičnih učinkov. S proučevanjem njegovega LCL-a smo ugotovili že predhodno omenjeno veliko neodzivnost na 6-MP. Iz tega sklepamo, da pri pacientu, ki mu pripada LCL 390, ne bi prišlo do odziva na terapijo niti pri standardnem odmerku 6-MP.

LCL 6037

LCL 6037 nosi zapis za divji tip *TPMT* (*1/*1), kar se ujema z njegovo visoko aktivnostjo TPMT (Slika 22A). Glede na genotip *TPMT* in aktivnost TPMT smo pričakovali, da bo LCL 6037 med bolj neodzivnimi LCL-i, vendar smo ugotovili, da izkazuje skoraj najvišjo občutljivost tako na 6-MP (MA = 33 %), kot tudi na 6-TG (MA = 28 %) (Slika 17). Glede na visoko občutljivost celic LCL-a 6037, nas je nadalje zanimala količina metabolitov, ki jih proizvedejo celice po izpostavitvi 6-MP. LCL 6037 ne izstopa v količini 6-TGN, proizvede pa zelo malo 6-MMP (Slika 25), kar se ne ujema z njegovo visoko aktivnostjo TPMT. Verjetno obstaja dodaten dejavnik, ki uravnava količino 6-MMP in občutljivost celic na tiopurine, saj v nadaljevanju tudi z izražanjem genov za sekretorne prenašalce nismo uspeli pojasniti velike občutljivosti LCL-a 6037.

Potrebno je poudariti, da ima lahko model LCL, kljub svoji široki uporabnosti za proučevanje citotoksičnosti spojin, nekatere negativne lastnosti. Transformacija celic z Epstein-Barr virusom omogoči neomejeno delitev celice, a lahko posledično vpliva na rast celic in celično smrt (114), kar se lahko odraža v nepričakovanem odzivu celic na zdravilno učinkovino.

Na podlagi nepopolnega ujemanja med TPMT in odzivom na tiopurine se nam postavi vprašanje, ali bi bilo bolj kot merjenje aktivnosti TPMT ali določanje genotipa *TPMT*, smiselno pred terapijo preveriti občutljivost celic (npr. PBMC; enojedrne celice pridobljene iz periferne krvi) posameznika *in vitro*. To bi nam lahko podalo celovitejšo napoved dogajanja med terapijo, saj bi zajeli vse encime, kofaktorje in prenašalce, ki

sodelujejo pri presnovi in ne le encima TPMT. S študijami bi bilo potrebno dokazati, ali se odziv celic *in vitro* ujema z odzivom *in vivo*.

4.6 Prihodnost napovedi odziva na terapijo s tiopurini

Tiopurini imajo svoje mesto predvsem pri vzdrževalni terapiji ALL in vnetne črevesne bolezni. Terapija s tiopurini običajno traja več let, zato je pomembno, da zagotovimo njihovo varno uporabo s čim manj neželenimi učinki (17). Do sedaj je bil encim TPMT najbolj proučevan dejavnik odziva na terapijo s tiopurini. Posamezniki z odsotno ali srednjo aktivnostjo encima TPMT imajo večjo verjetnost za nastanek mielosupresije (103). Vendar zmanjšana aktivnosti encima TPMT povzroči le četrtno primerov mielosupresije. Ostalih neželenih učinkov, kot so na primer alergične reakcije, hepatotoksičnost in pankreatitis, ne moremo predvideti z določanjem aktivnosti ali genotipa *TPMT* (103).

Trenutno je v terapijo tiopurinov vpeljana le določanje genotipa ali aktivnosti TPMT. Genski polimorfizmi v *ITPA*, *NUDT15*, *IMPDH*, *ABCC5*, *ABCC4*, *ABCB1* in merjenje količine SAM so le nekateri od možnih farmakogenetskih in metabolomskih označevalcev, ki bi lahko bili v prihodnosti vpeljani v klinično prakso. Glede na številčnost genov, ki vplivajo na odziv zdravljenja s tiopurini, bo v prihodnje največja težava, na kateri gen se osredotočiti in kako prilagoditi terapijo. Študije celotnega genoma so omogočile hitrejšo določitev genetskih variant, ki so povezane z odzivom na terapijo, vseeno pa ostaja uvedba kliničnega testiranja za nov farmakogenetski označevalec zahteven in dolgotrajen postopek. Ko je farmakogenetska povezava med kandidatnim genom in odzivom na terapijo potrjena, je potrebno genetski test analitsko in klinično validirati ter dokazati njegovo korist na izid zdravljenja. Za posameznike z genotipom, ki predstavlja tveganje pri zdravljenju, je potrebno predlagati alternativne možnosti terapije. Pomembno je, da pripravimo smernice predpisovanja zdravila in zdravstvenim delavcem omogočimo uporabo sistema za podporo pri kliničnem odločanju (115). Najboljša rešitev bi bila razviti algoritem več dejavnikov, ki bi omogočili napoved odziva na terapijo (2). Naša študija kaže na možnost nadaljnjih raziskav na področju sekretornega prenašalca *ABCB1*.

5. Sklep

Na podlagi rezultatov smo prišli do naslednjih zaključkov (Priloga 3: Preglednica VIII):

- Tako z analizo celičnega cikla kot z merjenjem MA smo pokazali, da se celice različnih posameznikov razlikujejo v občutljivosti na 6-MP in 6-TG. Primerjava občutljivosti celic na 6-MP in 6-TG je pokazala večjo citotoksičnost 6-TG in sorodno farmakološko pot obeh učinkovin.
- Rezultati kažejo, da genski polimorfizmi v *TPMT* vplivajo na aktivnost encima. LCL-i z divjim tipom *TPMT* imajo višjo aktivnost encima kot heterozigoti in ti višjo aktivnost kot tisti z dvojno variantnim genotipom. Potrdili smo, da genotip *3A/*3A povzroči večje znižanje aktivnosti TPMT kot genotip *3C/*3A.
- Ugotovili smo, da lahko na podlagi poznavanja aktivnosti TPMT našega vzorca celičnih linij delno pojasnimo občutljivost celic na 6-TG, ne pa tudi na 6-MP.
- Količina nastalega metabolita 6-MMP pozitivno korelira z aktivnostjo TPMT. Na količino nastalega 6-TGN aktivnost TPMT nima vpliva.
- Ugotovili smo, da občutljivost celic na 6-MP po 72 h korelira s količino nastalega 6-TGN po 48 in 72 urah oziroma s hitrostjo nastajanja 6-TGN.
- Višje izražanje *ABCB1* pomeni manjšo citotoksičnost 6-MP, kar kaže na to, da bi *ABCB1* lahko prenašal 6-MP iz celice.

Na podlagi poznavanja aktivnosti TPMT na našem vzorcu celičnih linij ne moremo predvideti občutljivosti celic na 6-MP. Boljši vpogled v odziv celic na izpostavitve 6-MP nam poda merjenje količine nastalih 6-TGN. Določanje aktivnosti TPMT bo ostalo še naprej pomembno orodje za preprečevanje izpostavitve pacientov z nizko aktivnostjo TPMT prevelikemu odmerku tiopurinov. Prav tako je merjenje metabolitov uporabna metoda za prilagoditev odmerka na podlagi količine 6-TGN. Raziskave ves čas težijo k iskanju novega farmakogenetskega dejavnika, ki bi poleg encima TPMT pomagal pri prilagoditvi odmerka posamezniku in napovedi odziva na terapijo. Tiopurini so trenutno slabo raziskani kot potencialni substrati za *ABCB1*. Naše ugotovitve kažejo na to, da bi bilo smiselno nadaljevati v smeri proučevanja vpliva *ABCB1* na odziv zdravljenja s tiopurini. V nadaljnjih *in vitro* študijah bi bilo potrebno povečati vzorec celičnih linij in prenesti proučevanje na nivo kliničnih študij, saj bi tako prišli do močnejših ali novih korelacij.

6. Literatura

1. Karas-Kuzelicki N, Mlinaric-Rascan I. Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics*. avgust 2009.;10(8):1309–22.
2. Fong SCM, Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Marinaki AM, Sanderson JD. Getting the best out of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Biomark Med*. 2015.;9(1):51–65.
3. Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J Biol Chem*. oktober 1951.;192(2):505–18.
4. Centralna baza zdravil 2 - Zdravilo: Xaluprine 20 mg/ml peroral.susp. 100 ml [Internet]. [citirano 3. marec 2018.]. Dostopno na: <http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/FBB37557DEB2367EC125819800836053?opendocument>
5. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol*. 1. maj 2010.;79(9):1211–20.
6. Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer*. januar 2008.;8(1):24–36.
7. Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene*. 20. oktober 2003.;22(47):7403–13.
8. Vora A, Goulden N, Wade R, Mitchell C, Hancock J, Hough R, in dr. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. marec 2013.;14(3):199–209.
9. Schmiegelow K, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Kristinsson J, Söderhäll S, in dr. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. februar 2010.;24(2):345–54.
10. Modic Š. Uspehi zdravljenja akutne limfoblastne levkemije odraslih s protokolom UKALL XII na hematološkem oddelku v Ljubljani. *Zdravniški vestnik*. 2008(77):37–42.
11. Cooper SL, Brown PA. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am*. februar 2015.;62(1):61–73.
12. Leukemia Treatment Regimens: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) [Internet]. *Cancer Therapy Advisor*. 2016 [citirano 3. marec 2018.]. Dostopno na: <https://www.cancertherapyadvisor.com/hematologic-cancers/acute-lymphoblastic-leukemia-treatment-regimen/article/253742/>
13. Goel RM, Blaker P, Mentzer A, Fong SCM, Marinaki AM, Sanderson JD. Optimizing the use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Chronic Dis*. maj 2015.;6(3):138–46.
14. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*. april 2002.;50(4):485–9.

15. Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment Protocols: Treatment Protocols. 10. maj 2018. [citirano 3. junij 2018.]; Dostopno na: <https://emedicine.medscape.com/article/2004705-overview>
16. Inflammatory Bowel Disease Treatment & Management: Approach Considerations, Symptomatic Therapy/Supportive Care, Overview of Stepwise Therapy. 24. maj 2018. [citirano 4. junij 2018.]; Dostopno na: <https://emedicine.medscape.com/article/179037-treatment>
17. Rudin S, Marable M, Huang RS. The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. april 2017.;15(2):82–93.
18. de Boer NKH, van Bodegraven AA, Jharap B, de Graaf P, Mulder CJJ. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. december 2007.;4(12):686–94.
19. Goldberg R, Irving PM. Toxicity and response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. julij 2015.;9(7):891–900.
20. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Let. 2007. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 55-58, 555-561 str.
21. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol*. 14. december 2016.;22(46):10103–17.
22. Gerbek T, Ebbesen M, Nersting J, Frandsen TL, Appell ML, Schmiegelow K. Role of TPMT and ITPA variants in mercaptopurine disposition. *Cancer Chemother Pharmacol*. marec 2018.;81(3):579–86.
23. Thiopurine Pathway, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Overview [Internet]. PharmGKB. [citirano 10. marec 2018.]. Dostopno na: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2040>
24. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, in dr. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. april 2003.;111(8):1133–45.
25. Brem R, Karran P. Multiple forms of DNA damage caused by UVA photoactivation of DNA 6-thioguanine. *Photochem Photobiol*. februar 2012.;88(1):5–13.
26. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, in dr. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 23. avgust 1996.;273(5278):1109–11.
27. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res*. 1. avgust 2001.;61(15):5810–6.
28. Roberts RL, Barclay ML. Update on thiopurine pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics*. julij 2015.;16(8):891–903.

29. Ankathil R. ABCB1 genetic variants in leukemias: current insights into treatment outcomes. *Pharmgenomics Pers Med.* 2017.;10:169–81.
30. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 28. julij 1990.;336(8709):225–9.
31. Wilson JM, Young AB, Kelley WN. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. The molecular basis of the clinical syndromes. *N Engl J Med.* 13. oktober 1983.;309(15):900–10.
32. Kelley WN, Rosenbloom FM, Seegmiller JE. The Effects of Azathioprine (Imuran) on Purine Synthesis in Clinical Disorders of Purine Metabolism*. *J Clin Invest.* september 1967.;46(9):1518–29.
33. Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, Marchetti C, Ceballos-Picot I, Beaune P, in dr. Molecular insight into thiopurine resistance: transcriptomic signature in lymphoblastoid cell lines. *Genome Med.* 2015.;7(1):37.
34. Brockman RW. A mechanism of resistance to 6-mercaptopurine: metabolism of hypoxanthine and 6-mercaptopurine by sensitive and resistant neoplasms. *Cancer Res.* junij 1960.;20:643–53.
35. Davidson JD. Studies on the mechanism of action of 6-mercaptopurine in sensitive and resistant L1210 leukemia in vitro. *Cancer Res.* februar 1960.;20:225–32.
36. Yang F, Fang H, Wang D, Chen Y, Zhai Y, Zhou B-BS, in dr. HPRT1 activity loss is associated with resistance to thiopurine in ALL. *Oncotarget.* 5. januar 2018.;9(2):2268–78.
37. Matimba A, Li F, Livshits A, Cartwright CS, Scully S, Fridley BL, in dr. Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes. *Pharmacogenomics.* marec 2014.;15(4):433–47.
38. Seinen ML, van Nieuw Amerongen GP, de Boer NKH, van Bodegraven AA. Rac Attack: Modulation of the Small GTPase Rac in Inflammatory Bowel Disease and Thiopurine Therapy. *Mol Diagn Ther.* 2016.;20(6):551–7.
39. Moon W, Loftus EV. Review article: recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016.;43(8):863–83.
40. Yang S-K, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, in dr. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet.* september 2014.;46(9):1017–20.
41. OMIM Entry - * 187680 - THIOPURINE S-METHYLTRANSFERASE; TPMT [Internet]. [citirano 17. marec 2018.]. Dostopno na: <https://omim.org/entry/187680>
42. Reference GH. TPMT gene [Internet]. Genetics Home Reference. [citirano 19. september 2017.]. Dostopno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TPMT>
43. Tissue expression of TPMT - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [citirano 17. marec 2018.]. Dostopno na: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137364-TPMT/tissue>

44. TPMT thiopurine S-methyltransferase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citirano 17. marec 2018.]. Dostopno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=7172
45. tpmt[gene] - ClinVar - NCBI [Internet]. [citirano 1. julij 2018.]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=tpmt%5Bgene%5D>
46. Wang L, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*. 13. marec 2006.;25(11):1629–38.
47. Abaji R, Krajcinovic M. Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia, inflammatory bowel disease and autoimmune disorders: influence on treatment response. *Pharmgenomics Pers Med*. 2017.;10:143–56.
48. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14. februar 1995.;92(4):949–53.
49. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. april 2000.;14(4):567–72.
50. Tai H-L, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. junij 1997.;94(12):6444–9.
51. Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics*. november 2005.;15(11):801–15.
52. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, in dr. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol*. oktober 1998.;125(4):879–87.
53. Research C for DE and. Science & Research (Drugs) - Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling [Internet]. [citirano 22. marec 2018.]. Dostopno na: <https://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/ucm572698.htm>
54. Burnett HF, Tanoshima R, Chandranipapongse W, Madadi P, Ito S, Ungar WJ. Testing for thiopurine methyltransferase status for safe and effective thiopurine administration: a systematic review of clinical guidance documents. *Pharmacogenomics J*. december 2014.;14(6):493–502.
55. Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol*. april 2014.;77(4):704–14.
56. Teml A, Schaeffeler E, Herrlinger KR, Klotz U, Schwab M. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. *Clin Pharmacokinet*. 2007.;46(3):187–208.

57. Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Smith MA, Shobowale-Bakre EA, Fairbanks L, Irving PM, in dr. Mechanism of allopurinol induced TPMT inhibition. *Biochem Pharmacol.* 15. avgust 2013.;86(4):539–47.
58. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, in dr. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics.* julij 2004.;14(7):407–17.
59. Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard J-L, Pineau B, Chatellier G, in dr. Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics.* april 2014.;15(6):745–57.
60. Scheuermann TH, Keeler C, Hodsdon ME. Consequences of binding an S-adenosylmethionine analogue on the structure and dynamics of the thiopurine methyltransferase protein backbone. *Biochemistry.* 28. september 2004.;43(38):12198–209.
61. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2003.;48(1):1–7.
62. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia.* maj 2009.;23(5):971–4.
63. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, in dr. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics.* november 2009.;10(11):1753–65.
64. Gilissen LPL, Wong DR, Engels LGJB, Bierau J, Bakker JA, Paulussen ADC, in dr. Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy. *J Crohns Colitis.* 1. julij 2012.;6(6):698–707.
65. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1. september 2006.;24(5):715–29.
66. Al Hadithy AFY, de Boer NKH, Derijks LJJ, Escher JC, Mulder CJJ, Brouwers JRBJ. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis.* april 2005.;37(4):282–97.
67. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, in dr. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* april 2000.;118(4):705–13.
68. Sparrow MP, Hande SA, Friedman S, Lim WC, Reddy SI, Cao D, in dr. Allopurinol safely and effectively optimizes tioguanine metabolites in inflammatory bowel disease patients not responding to azathioprine and mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther.* 1. september 2005.;22(5):441–6.

69. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut*. september 1996.;39(3):401–6.
70. Kennedy NA, Asser TL, Mountifield RE, Doogue MP, Andrews JM, Bampton PA. Thiopurine metabolite measurement leads to changes in management of inflammatory bowel disease. *Intern Med J*. marec 2013.;43(3):278–86.
71. van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML. High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. maj 2012.;35(10):1181–9.
72. Hindorf U, Lyrenäs E, Nilsson A, Schmiegelow K. Monitoring of long-term thiopurine therapy among adults with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. november 2004.;39(11):1105–12.
73. Gearry RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. avgust 2005.;20(8):1149–57.
74. Fukuda Y, Schuetz JD. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 15. april 2012.;83(8):1073–83.
75. Wielinga PR, Reid G, Challa EE, van der Heijden I, van Deemter L, de Haas M, in dr. Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. *Mol Pharmacol*. december 2002.;62(6):1321–31.
76. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, in dr. Transporter-Mediated Protection against Thiopurine-Induced Hematopoietic Toxicity. *Cancer Res*. 1. julij 2008.;68(13):4983–9.
77. Tanaka Y, Manabe A, Fukushima H, Suzuki R, Nakadate H, Kondoh K, in dr. Multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. avgust 2015.;15(4):380–4.
78. Zeng H, Lin ZP, Sartorelli AC. Resistance to purine and pyrimidine nucleoside and nucleobase analogs by the human MDR1 transfected murine leukemia cell line L1210/VMDRC.06. *Biochem Pharmacol*. 1. september 2004.;68(5):911–21.
79. Mendoza JL, Urcelay E, Lana R, Martín MC, López N, Guijarro LG, in dr. MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. maj 2007.;13(5):585–90.
80. Cravo M, Ferreira P, Sousa P, Moura-Santos P, Velho S, Tavares L, in dr. Clinical and genetic factors predicting response to therapy in patients with Crohn's disease. *United European Gastroenterol J*. februar 2014.;2(1):47–56.
81. Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, Gurwitz D. Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics*. marec 2010.;11(3):327–40.

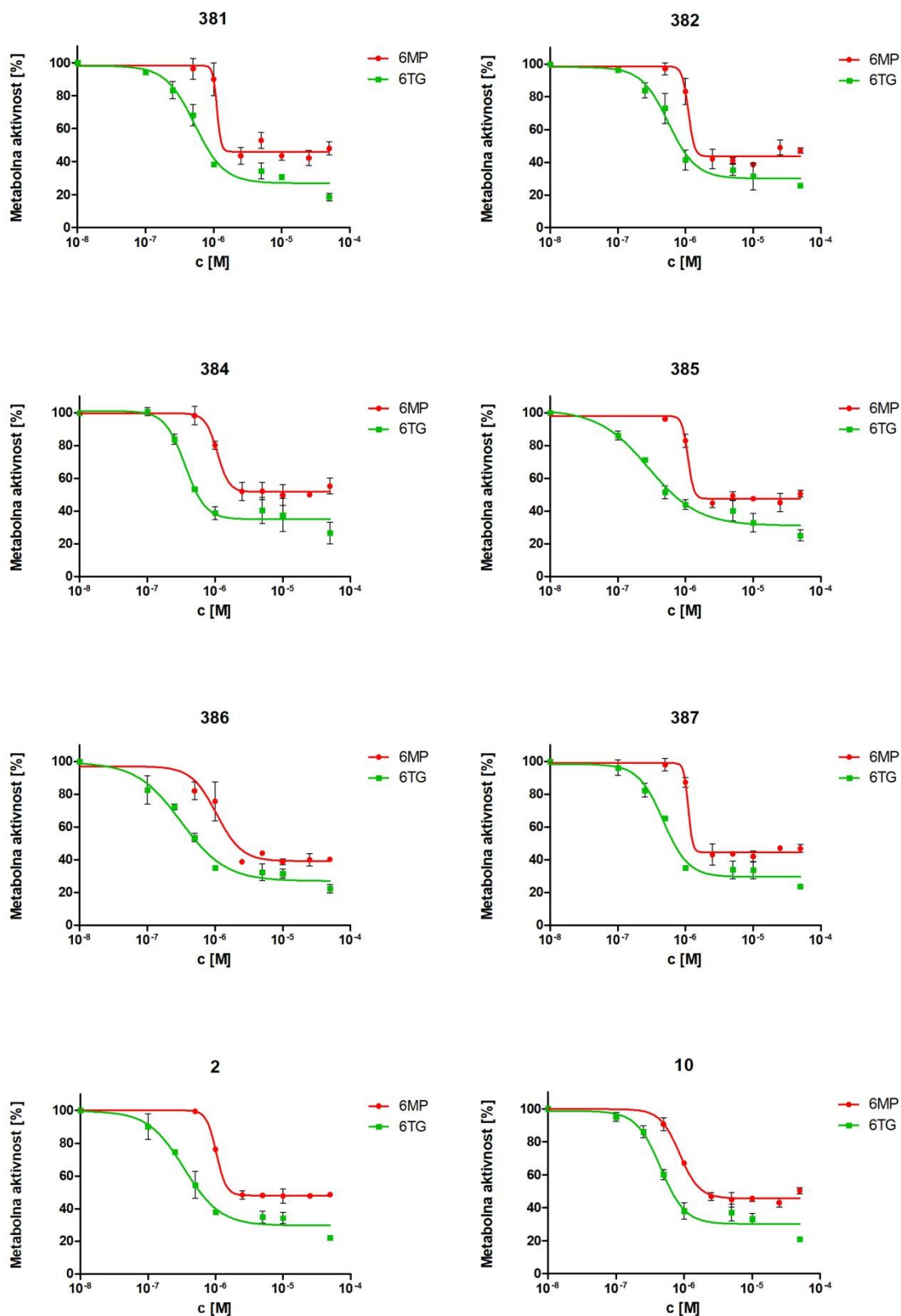
82. Wheeler HE, Dolan ME. Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation. *Pharmacogenomics*. januar 2012.;13(1):55–70.
83. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) [Internet]. [citirano 15. november 2017.]. Dostopno na: http://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/
84. Flow Cytometry - Cell cycle [Internet]. [citirano 30. marec 2018.]. Dostopno na: <http://www.flow-cytometry.us/index.php?page=cell-cycle>
85. Cell Cycle Analysis | Nexcelom Bioscience [Internet]. [citirano 26. avgust 2018.]. Dostopno na: <https://www.nexcelom.com/applications/cellometer/fluorescent-assays/cell-cycle-analysis/>
86. Flow cytometry introduction | Abcam [Internet]. [citirano 15. november 2017.]. Dostopno na: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
87. Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C, Albertioni F. Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem Biophys Res Commun*. 28. april 2006.;343(1):208–15.
88. Daehn I, Brem R, Barkauskaite E, Karran P. 6-Thioguanine damages mitochondrial DNA and causes mitochondrial dysfunction in human cells. *FEBS Letters*. 15. december 2011.;585(24):3941–6.
89. Panetta JC, Evans WE, Cheok MH. Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Cancer*. 16. januar 2006.;94(1):93–100.
90. Christie NT, Drake S, Meyn RE, Nelson JA. 6-Thioguanine-induced DNA damage as a determinant of cytotoxicity in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. september 1984.;44(9):3665–71.
91. Adamson PC, Balis FM, Hawkins ME, Murphy RF, Poplack DG. Desulfuration of 6-mercaptopurine. The basis for the paradoxical cytotoxicity of thiopurines in cultured human leukemic cells. *Biochem Pharmacol*. 2. november 1993.;46(9):1627–36.
92. Milek M, Karas Kuzelicki N, Smid A, Mlinaric-Rascan I. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*. 15. junij 2009.;77(12):1845–53.
93. Fernández-Ramos AA, Marchetti-Laurent C, Poindessous V, Antonio S, Laurent-Puig P, Bortoli S, in dr. 6-mercaptopurine promotes energetic failure in proliferating T cells. *Oncotarget*. 16. maj 2017.;8(26):43048–60.
94. Misdaq M, Andag R, Oellerich M, Asif AR, von Ahse N. Establishment of thiopurine S-methyltransferase gene knockdown in jurkat T-lymphocytes: an in vitro model of TPMT polymorphism. *Ther Drug Monit*. oktober 2012.;34(5):584–92.
95. Adamson PC, Poplack DG, Balis FM. The cytotoxicity of thioguanine vs mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. november 1994.;18(11):805–10.

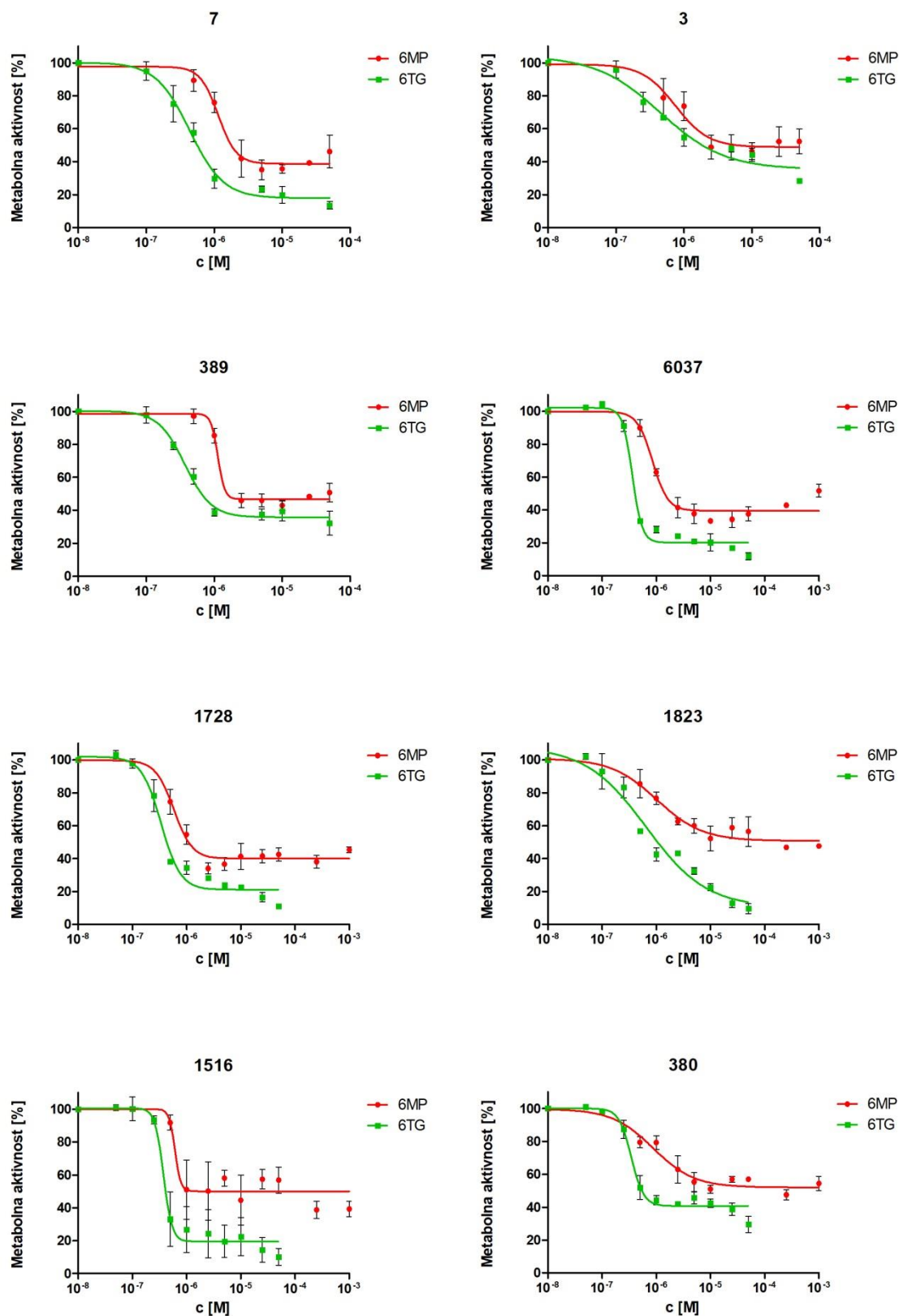
96. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Eden TOB, Kinsey SE, Lilleyman J, in dr. Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Lancet*. 14. oktober 2006.;368(9544):1339–48.
97. Harms DO, Göbel U, Spaar HJ, Graubner UB, Jorch N, Gutjahr P, in dr. Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance treatment of childhood ALL: results of the randomized trial COALL-92. *Blood*. 15. oktober 2003.;102(8):2736–40.
98. Amin J, Huang B, Yoon J, Shih DQ. Update 2014: advances to optimize 6-mercaptopurine and azathioprine to reduce toxicity and improve efficacy in the management of IBD. *Inflamm Bowel Dis*. februar 2015.;21(2):445–52.
99. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. *Am J Gastroenterol*. maj 2003.;98(5):1058–63.
100. Bonaz B, Boitard J, Marteau P, Lémann M, Coffin B, Flourié B, in dr. Tioguanine in patients with Crohn's disease intolerant or resistant to azathioprine/mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther*. 15. avgust 2003.;18(4):401–8.
101. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, Vora A. Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol*. julij 2013.;76(1):125–36.
102. Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. maj 2004.;2(5):410–7.
103. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics*. februar 2010.;11(2):177–88.
104. Li F, Fridley BL, Matimba A, Kalari KR, Pelleymounter L, Moon I, in dr. Ecto-5'-nucleotidase and thiopurine cellular circulation: association with cytotoxicity. *Drug Metab Dispos*. december 2010.;38(12):2329–38.
105. Karim H, Ghalali A, Lafolie P, Vitols S, Fotoohi AK. Differential role of thiopurine methyltransferase in the cytotoxic effects of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 26. julij 2013.;437(2):280–6.
106. Pelin M, Genova E, Fusco L, Marisat M, Hofmann U, Favretto D, in dr. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of thiopurines in an in vitro model of human hepatocytes: Insights from an innovative mass spectrometry assay. *Chemico-Biological Interactions*. 25. september 2017.;275:189–95.
107. Liliemark J, Pettersson B, Engberg B, Lafolie P, Masquelier M, Peterson C. On the paradoxically concentration-dependent metabolism of 6-mercaptopurine in WEHI-3b murine leukemia cells. *Cancer Res*. 1. januar 1990.;50(1):108–12.

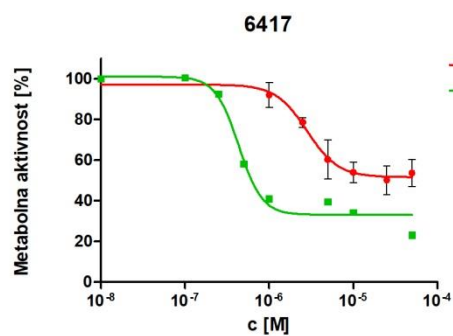
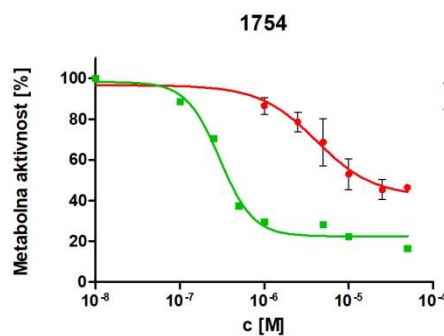
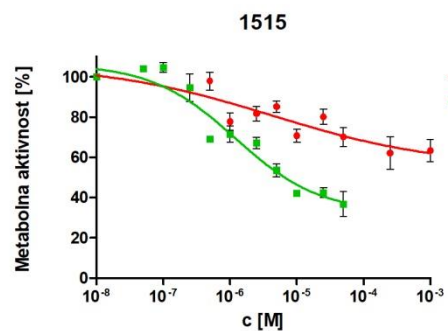
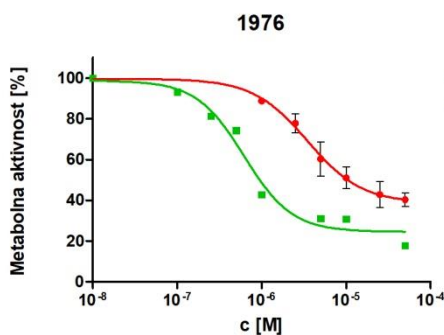
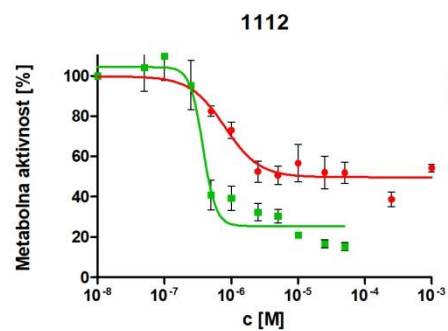
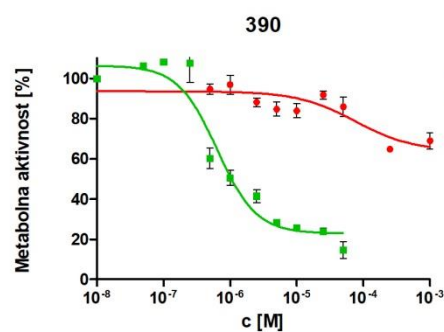
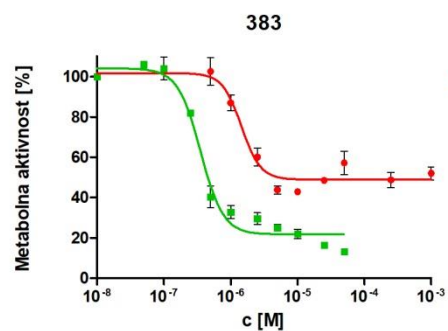
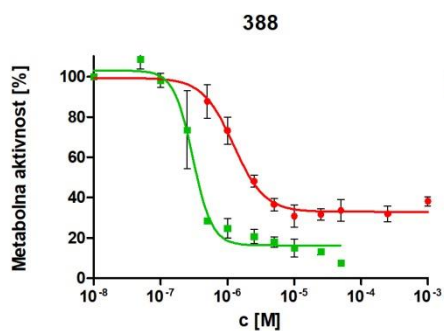
108. Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* januar 1987.;41(1):18–25.
109. Ban H, Andoh A, Imaeda H, Kobori A, Bamba S, Tsujikawa T, in dr. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* oktober 2010.;45(10):1014–21.
110. Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, in dr. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* avgust 2015.;15(4):372–9.
111. Rahgozar S, Moafi A, Abedi M, Entezar-E-Ghaem M, Moshtaghian J, Ghaedi K, in dr. mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol Ther.* januar 2014.;15(1):35–41.
112. Coelho T, Andreoletti G, Ashton J, Batra A, Afzal N, Gao Y, in dr. Genes implicated in thiopurine-induced toxicity: Comparing TPMT enzyme activity with clinical phenotype and exome data in a paediatric IBD cohort. *Scientific Reports.* 5. oktober 2016.;6:Article number: 34658.
113. Diouf B, Cheng Q, Krynetskaia NF, Yang W, Cheok M, Pei D, in dr. Somatic deletions of genes regulating MSH2 protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells. *Nat Med.* 25. september 2011.;17(10):1298–303.
114. Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015.;16(3):273–85.
115. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 15. oktober 2015.;526(7573):343–50.

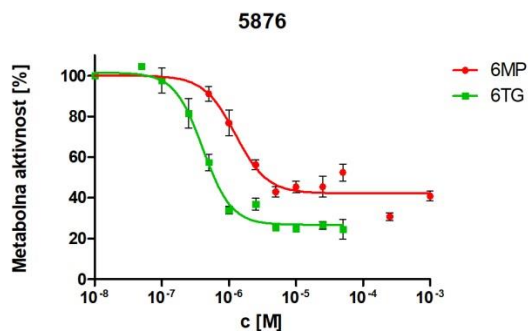
7. Priloge

7.1 Priloga 1





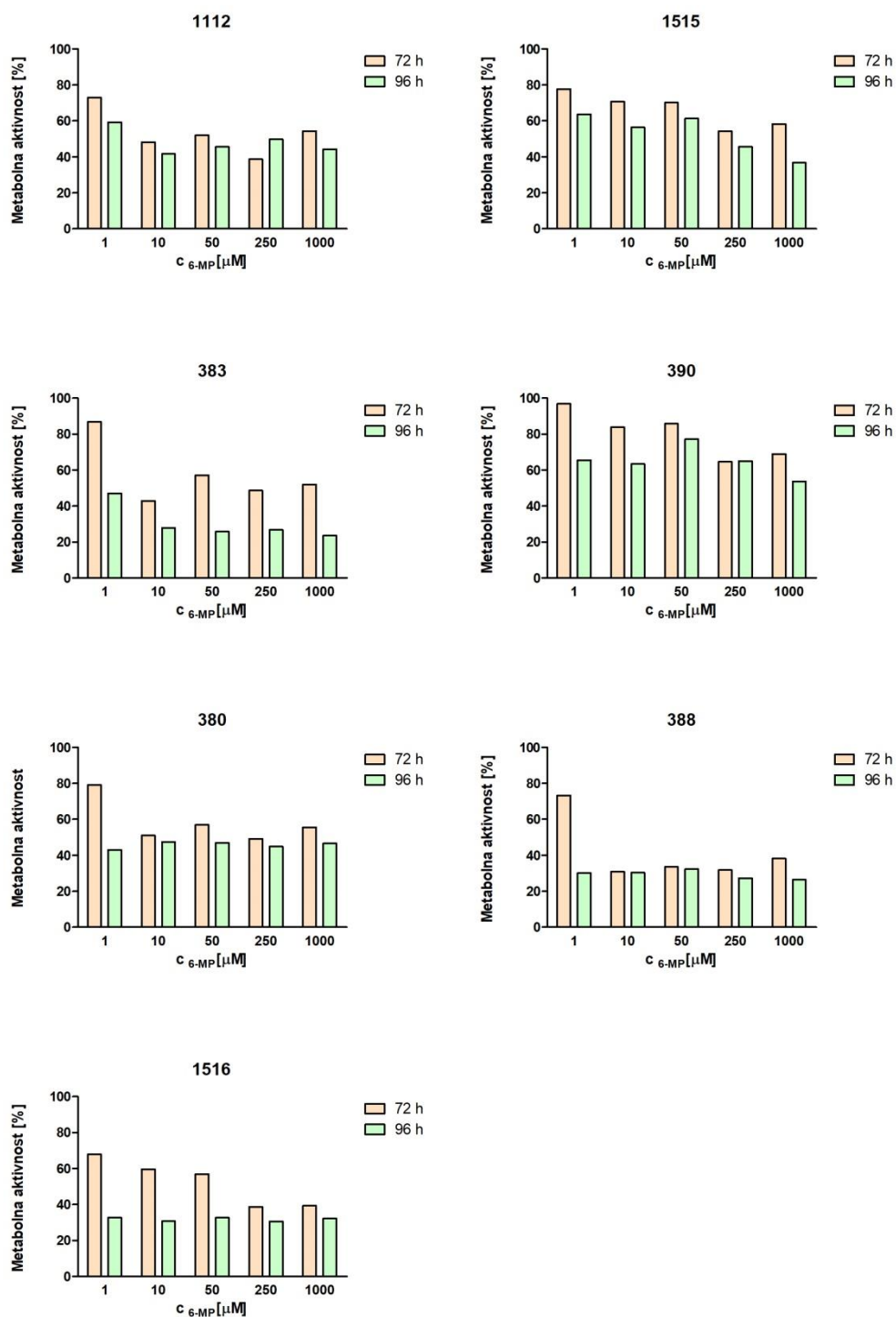




Slika 33: Grafi odvisnosti metabolne aktivnosti od koncentracije 6-MP in 6-TG.

MA smo izmerili 72 h po izpostavitvi 6-MP (0,5-50 μM) in 6-TG (0,05-50 μM). 11 LCL-ov je bilo izpostavljenih tudi visokim koncentracijam 6-MP (250 in 1000 μM). Točke so podane kot povprečje bioloških meritev s standardno napako aritmetične sredine (SEM - *angl.* standard error of the mean). Rdeča krivulja se prilega točkam MA po dodatku 6-MP, zelena pa točkam MA po dodatku 6-TG.

7.2 Priloga 2



Slika 34: Metabolna aktivnost 72 h in 96 h po izpostavitvi 6-MP.

Primerjava MA celic LCL 72 h in 96 h po izpostavitvi 1 μM, 10 μM, 50 μM, 250 μM in 1000 μM 6-MP.

7.3 Priloga 3

Preglednica VIII: Preglednica korelacij.

Parameter 1	Parameter 2	Faktor korelacije ρ	Vrednost p	Velikost vzorca
Metabolna aktivnost (10 μM 6-MP)	6-TGN _{celokupni} 48 h	-0,4822	0,0427	18
	6-TGN _{celokupni} 72 h	-0,4812	0,0432	18
	Hitrost nastajanja 6-TGN	-0,5142	0,0290	18
Metabolna aktivnost (1 μM 6-TG)	Aktivnost TPMT	0,4223	0,0355	22
Izražanje <i>ABCB1</i>	Metabolna aktivnost (2,5 μ M 6-MP)	0,3450	0,0339	38
	Metabolna aktivnost (5 μ M 6-MP)	0,3100	0,0582	38
Aktivnost TPMT	6-MMP 24 h	0,5108	0,0303	18
	6-MMP 72 h	0,4407	0,0672	18

Preglednica prikazuje signifikantno značilne ($p < 0,05$) in mejno signifikantne korelacije ($0,05 < p < 0,1$), ki smo jih pokazali pri našem raziskovalnem delu. Za analizo korelacij smo uporabili neparametrični Spearmanov test s faktorjem korelacije ρ