

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut
Arstiteaduskond
Farmakoloogia instituut

KAILI ANIER

HPLC PÕHISE MEETODI VÄLJATÖÖTAMINE TIOPURIINI
METÜÜLTRANSFERAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMISEKS EESTI
POPULATSIOONIS JA RAVIMINTERAKTSIOONIDE ENNUSTAMINE
IN VITRO EKSPERIMENTIDE PÕHJAL

Magistritöö orgaanilise keemia erialal

Juhendajad: dots. Uno Mäeorg
dr. med. Kersti Oselin

Tartu 2006

SISUKORD

1	KASUTATUD LÜHENDID.....	4
2	SISSEJUHATUS.....	5
3	KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
	3.1 Puriini analoogid ja nende metabolism.....	6
	3.2 TPMT aktiivsus populatsioonis.....	7
	3.3 TPMT aktiivsuse analüüsimeetodid.....	8
	3.4 TPMT aktiivsuse normaliseerimine.....	14
	3.5 TPMT aktiivsus kooskasutamisel ravimitega	14
4	TÖÖ EESMÄRGID.....	16
5	EKSPERIMENTAALNE OSA.....	17
	5.1 Kemikaalid.....	17
	5.2 Aparatuur.....	18
	5.3 Eluendi ja lahuste valmistamine.....	18
	5.4 TPMT aktiivsuse määramine.....	18
	5.4.1 Hemolüsaadi ettevalmistamine.....	19
	5.4.2 Proovi ettevalmistamine inkubeerimiseks TPMT substraadi 6-MP.....	19
	5.4.3 HPLC tingimused 6-MP ja 6-MMP määramiseks.....	19
	5.5 Meetodi väljatöötamine TPMT aktiivsuse määramiseks Eesti populatsioonis.....	20
	5.6 Raviminteraktsioonide uurimine.....	20
6	TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
	6.1 Kromatograafilise meetodi väljatöötamine	22
	6.1.1 Kasutatava vooluti sobivuse kontroll 6-MMP määramiseks.....	22
	6.1.2 Detekteerimiseks sobiva lainepikkuse määramine.....	24
	6.1.3 Vereproovide töötlemiseks sobiva meetodi leidmine.....	25
	6.1.3.1 Töötlemine kloroform/2-propanool seguga.....	25
	6.1.3.2 Proovide sadestamine 70%-lise perkloorhappega.....	25
	6.1.3.3 Töötlemine atsetonitriiliga	26
	6.1.3.4 Töötlemine metanooliga	26
	6.1.3.5 Proovide kuumtöötlemine.....	26
	6.1.3.6 Töötlemine etanooliga.....	26
	6.1.4 Sobiva süsteruumala määramine.....	27
	6.1.5 Kromatograafia tingimuste optimeerimise tulemused.....	27

6.2	Ensüümreaktsiooni kineetika uurimine.....	28
6.2.1	Hemolüsaadi hulga varieerimine.....	28
6.2.2	Sobiva inkubatsiooniaja määramine.....	28
6.2.3	Inkubeerimine koos ja ilma SAM.....	29
6.2.4	6-MP kontsentratsiooni varieerimine.....	30
6.2.5	SAM kontsentratsiooni varieerimine.....	31
6.2.6	Ensüümkineetika mõõtmiste tulemused.....	32
6.3	Meetodi valideerimine.....	33
6.3.1	Määramis- ja kvantifitseerimispiir.....	33
6.3.2	Saagis.....	33
6.3.3	Analüüdi stabiilsus.....	35
6.3.3.1	Proovi stabiilsus HPLC aparatuuris.....	36
6.3.3.2	6-MMP põhilahuse stabiilsus.....	36
6.3.4	Meetodi mõõtetäpsus ja kordustäpsus.....	36
6.4	TPMT aktiivsuse määramise tulemused Eesti populatsioonis.....	39
6.5	TPMT aktiivsus kasutades erinevaid normaliseerimisfaktoreid.....	41
6.6	Raviminteraktsioonid.....	42
7	JÄRELDUSED.....	47
8	KOKKUVÕTE.....	48
9	SUMMARY.....	49
10	KASUTATUD KIRJANDUS.....	50
11	LISAD.....	54

1 KASUTATUD LÜHENDID

6-MMP	6-metüülmerkaptopuriin
6-MP	6-merkaptopuriin
6-MTG	6-metüüльтиoguaniin
6-TG	6-tioguaniin
6-TGN	6-tioguaniinnukleotiid
ACN	atsetonitriil
CV	variatsioonikoefitsient
DAD	diodmaatriksdetektor
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DTT	ditiotreitool
Er	erütrotsüüt
Ex./Em.	ergastus/kiirus lainepikkus
Hb	hemoglobiin
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
K_i	inhibeerimiskonstant
MSPVR	mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid
PBS	fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
PRBC	hematokritt (ing. k. <i>packed red blood cells</i>)
ROC	ing. k. <i>receiver operating characteristic</i>
SAM	S-adenosüül-L-metioniin
SAH	S-adenosüül-L-homotsüsteiin
SD	standardhälve
TPMT	tiopuriini metüültransferaas
UV	ultraviolet
UV-VIS	ultraviolet-nähtava ala detektor

2 SISSEJUHATUS

Tiopuriini metüültransferaas (TPMT, EC 2.1.1.67) on ensüüm, mis lagundab tiopuriinravimeid – 6-merkaptopuriini ja asatiopriini, mida on aastakümneid kasutatud leukeemia ravis ning immunosupressiooni saavutamiseks põletikulise soolehaigusega ja süsteemsete sidekoehaigustega patsientidel ning organtransplantatsiooni järgselt.

Asatiopriinist ja 6-merkaptopuriinist moodustuvad TPMT kaudu metaboliseerudes inaktiivsed metüülmetaboliidid. Tiopuriini analoogide standardannuste kasutamisel TPMT puudulikkusega patsientidel võivad aktiivsed 6-tioguaaniinnukleotiidid (6-TGN) kuhjuda ja põhjustada kõrvaltoimete sagenemist. Kõrvaltoimete tekkerisk tiopuriinide kasutamisel on suurem patsientidel, kes kannavad geneetilist mutatsiooni TPMT kodeerivas geenis ja omavad seetõttu madalamat TPMT aktiivsust.

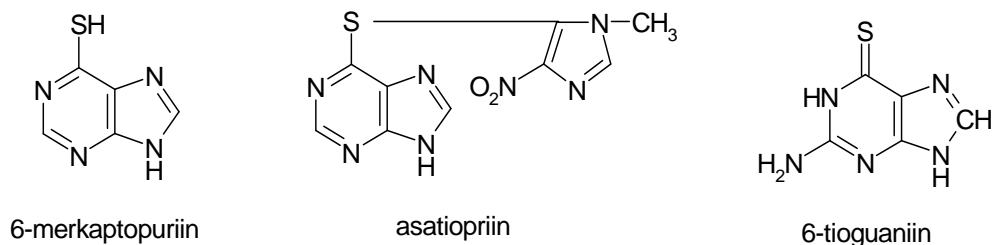
TPMT fenotüübi määramine enne ravi alustamist tiopuriinidega võimaldaks kõrvaltoimetest ohustatud patsientidel kasutada standardannustest väiksemaid annuseid. Teisalt on ka normaalse või kõrge TPMT aktiivsusega patsiendid ohustatud kõrvaltoimetest kui samaaegselt tiopuriinidega kasutatakse ravimeid, mis inhibeerivad TPMT aktiivsust. *In vitro* uuringud kinnitasid, et aminosalitsüülhappe derivaadid pärsvivad TPMT aktiivsust. Seetõttu määratakse patsientidel enne ravi alustamist tiopuriini analoogidega TPMT aktiivsus kas radioaktiivse meetodiga või kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (HPLC).

Kuna Eestis TPMT aktiivsust praegu veel ei määrata, siis oli töö eesmärgiks töötada välja HPLC põhine meetod TPMT aktiivsuse määramiseks. Selleks otsustati määrata TPMT aktiivsus inimese erütrosüütides sajal tervel vabatahtlikul, leidmaks referentsväärtused Eesti populatsiooni jaoks ning teostada *in vitro* eksperimendid TPMT aktiivsuse määramiseks inimese erütrosüütides erinevate ravimite kui potentsiaalsete TPMT inhibiitorite juuresolekul selgitamaks, millised ravimid lisaks aminosalitsüülhappe derivaatidele inhibeerivad TPMT aktiivsust.

3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

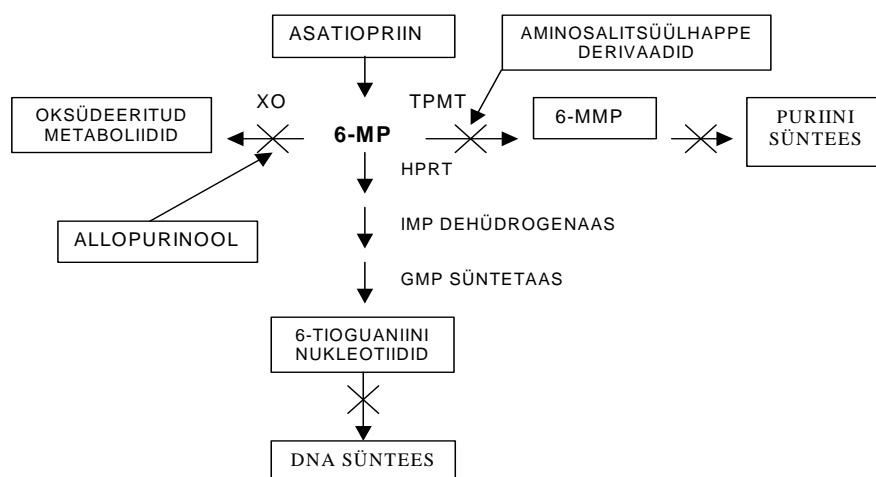
3.1 Puriini analoogid ja nende metabolism

6-tioguaaniin (6-TG), 6-merkaptopuriin (6-MP) ja asatiopriin on tiopuriini analoogid - antimetaboliitide klassi kuuluvad tsütotoksilised ravimid, mille peamine näidustus on immuunosupressiivne ja antiproliferatiivne toime [1].



Joonis 1. Tiopuriini analoogide keemiline struktuur [2, 3].

6-MP (C₅H₄N₄S) on hüpoksantiini analoog. Asatiopriin (C₉H₇N₇O₂S) on 6-MP imidasolüüli derivaat ja 6-TG (C₅H₅N₅S) on guaniini sulfhüdrüülanaloog. Kõik tiopuriinid on toimemehhanismilt puriini antimetaboliidid [4]. Asatiopriin laguneb organismis kiiresti 6-MP, mis muudetakse täiendavalt metaboliitideks ja mis omakorda *de novo* inhibeerivad puriinide sünteesi. Kirjanduse andmetele tuginedes on leitud, et tiopuriini analoogide terapeutiline ja toksiline toime on seotud 6-TGN moodustumisega [5].



Joonis 2. Tiopuriinide biotransformatsioon.

6-MP-6-merkaptopuriin; 6-MMP-6-metüülmerkaptopuriin; XO-ksantiini oksüdaas; TPMT-tiopuriini metüültransferaas; HPRT-hüpoksantiini fosforibosüültransferaas; IMP-inosiin monofosfaat; GMP-guanosiin monofosfaat [6, 7].

Asatiopriin muudetakse organismi sattudes kiiresti 6-MP, mis laguneb mööda kolme konkureerivat metabolismi rada. Kui 6-TGN moodustumiseni viiv metabolismi rada on osaliselt või täielikult ülekaalus (see saab toimuda kui inhibeerida ensüüme ksantiini oksüdaasi ja/või TPMT), kujuneb tiopuriini analooge standardannustes saavatel patsientidel väga kõrge 6-TGN kontsentratsioon. See omakorda võib viia eluohtliku müelosupressiooni tekkimiseni [8].

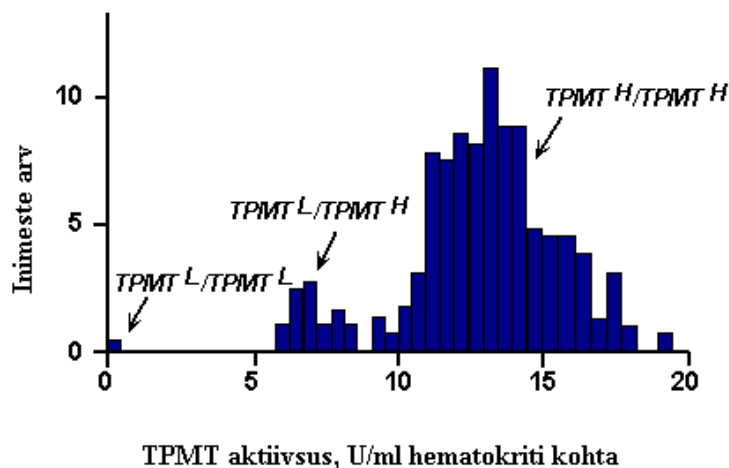
TPMT on oluline ensüüm tiopuriini analoogide metabolismis [9] ning on leitud, et TPMT aktiivsus erütrotsüütides korreleerub hästi TPMT aktiivsusega maksas ja neerudes, mistõttu määratakse TPMT aktiivsus sageli erütrotsüütides [10]. Varasemates töödes on näidatud, et erütrosüütide TPMT aktiivsus on pöördvõrdelises seoses tsütotoksiliste tiopuriini analoogide metaboliitide moodustumisega ehk siis mida kõrgem on TPMT aktiivsus, seda madalam on 6-TGN tase erütrotsüütides ja vastupidi [11].

3.2 TPMT aktiivsus populatsioonis

Enamik bioloogilisi tunnuseid on populatsiooni tasandil kirjeldatavad normaal- ehk Gaussi jaotuskõveraga.

1980.-ndal aastal avastasid Weinshilboum ja Sladek, et TPMT aktiivsus populatsiooni tasandil on trimodaalne. Uurimuses osales 298 juhuslikult valitud isikut, nendest 88,6 % tuvastati erütrotsüütides kõrge TPMT aktiivsus ning nad arvati olevat homosügootid kõrge ensüümi aktiivsusega alleeli (TPMT^H, ing. k. *high activity*) suhtes; 11,1 % tuvastati keskmine TPMT aktiivsus ja nad arvati olevat heterosügootid (TPMT^H/TPMT^L, ing. k. *low activity*); 0,3 % puudus ensüümi aktiivsus täielikult ning nad arvati olevat homosügootid madala aktiivsusega alleeli (TPMT^L) suhtes.

TPMT aktiivsus 1 U oli defineeritud kui 6-MMP moodustumine 1 nmol/ml hematokriti kohta pärast 60 minutist inkubeerimist 37 °C juures (Joonis 3) [12].

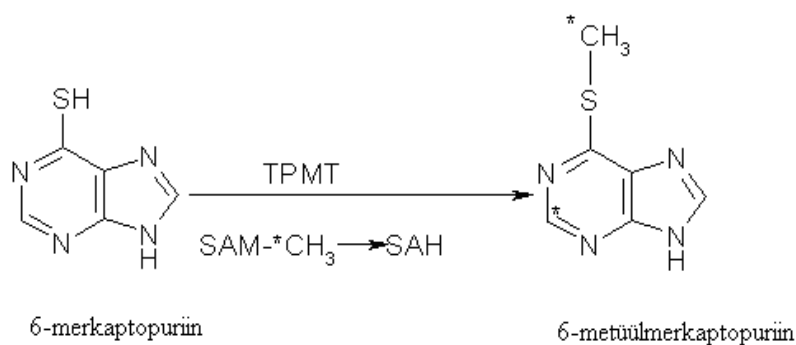


Joonis 3. TPMT aktiivsus erütrotsüütides valgetel ameeriklastel [12].

Hilisemates uuringutes on leitud kinnitust väitele, et TPMT aktiivsus inimese erütrotsüütides on geneetiliselt determineeritud ning geneetilise polümorfismi kandlus vastavas geenis põhjustab TPMT puudulikkuse [13, 14].

3.3 TPMT aktiivsuse analüüsimeetodid

Esimene meetod, mida kasutati TPMT aktiivsuse määramiseks töötati välja aastal 1978 ja see oli radiokeemiline meetod, kus kasutati radioaktiivset ^{14}C märgistusega metüülrühma doonorit. 6-MP tekib TPMT kaudu metaboliseerudes 6-MMP. Selles reaktsioonis osaleb metüülrühma doonorina S-adenosüül-L-metioniin (SAM), mis muutub pärast metüülrühma loovutamist S-adenosüül-L-homotsüsteiiniks (SAH). Metüülrühma aktseptoriteks on tiopuriinid, näiteks 6-MP, mis seob vabanenud metüülrühma endaga muutudes 6-MMP (Joonis 4) [15].



Joonis 4. 6-merkaptopuriini metaboliseerumine TPMT kaudu [15].

1994. aastal töötasid kaks uurimisrühma Lennard jt. ning Jacqz-Aigrain jt. üksteisest sõltumatult välja mitte-radioaktiivse HPLC põhise meetodi määramaks *in vitro* 6-MMP moodustumist [16, 17]. Metüülrühma doonorina kasutati mitte-radioaktiivset SAM. Mõlemad uurimisgrupid leidsid, et esines tugev korrelatsioon HPLC meetodi ja radiokeemilise meetodiga saadud tulemuste vahel ($r>0,68$; $P<0,0001$) [16, 17].

Viimastel aastatel on TPMT aktiivsuse määramiseks peamiselt kasutatud HPLC põhiseid meetodeid nii UV, DAD kui ka fluorestsentsdetektoriga. Iga labor on välja töötanud just neile sobiva meetodi, lähtudes olemasolevast aparatuurist ja selle kasutamise võimalustest ning seepärast erinevad need meetodid üksteisest nii mobiilfaaside koostise, pH, analüütiliste lainepikkuste, süstemahtude, proovi ekstraheerimismeetodite ja analüüsi kestvuse poolest. Vastavalt kirjanduse andmetele on analüüsi teostamiseks põhiliselt kasutatud pöördfaas C_{18} kolonne, milles sorbendiosakeste läbimõõt on 5 μm või 3 μm , kolonni mõõdud olid peamiselt 125 x 4 mm, kuid kasutatud oli ka lühemaid ja pikemaid kolonne.

Peamiselt kasutati analüüsimiseks UV detektoriga varustatud HPLC süsteemi, sest see on detektoritest kõige laialdasemalt levinud ja odavam. Lainepikkus, mille juures mõõtmisi teostati oli enamasti 290 nm. Süstemaht HPLC kolonni oli keskmiselt 50 μl ja voolutiks peamiselt kas naatrium- või kaaliumdivesinikfosfaatpuhver, millele lisati erinevates kogustes orgaanilist komponenti. Vooluti pH varieerus vahemikus 2,5-7,9.

Kuna analüüsid teostatakse hemolüsaadi lahusest, on oluline enne kromatografeerimist proove töödelda, et vältida analüütilise kolonni saastumist. Proovide töötlemiseks on kirjanduses kasutatud erinevaid meetodeid, millest levinumad olid vedelik-vedelik ekstraheerimise meetodid. Peamiselt kasutati ekstraheerimiseks kas kloroform/2-propanool segu või perkloorhapet, kuid leidis ka teisi töötlemismeetodeid, mida on lähemalt kirjeldatud materjalide ja meetodite peatükis.

Ülevaade erinevatest kirjanduses toodud HPLC põhistest meetoditest koos kirjanduse viidetega on esitatud tabelis 1. Lisaks erinevatele analüüsi tingimustele on tabelis toodud iga meetodiga määratud TPMT aktiivsuse väärtused ning madalaimad määramispiiri väärtused. Samas pole siiani veel avaldatud ühtki artiklit, kus oleks erinevaid HPLC põhiseid analüüsimeetodeid omavahel võrreldud ja analüüsitud.

Tabel 1. Ülevaade teaduskirjanduses avaldatud HPLC põhistest analüüsimeetoditest TPMT aktiivsuse määramiseks.

TPMT substraat/ määratav aine	Eluent, pH	Kolonn, voolukiirus	Detektor, lainepikkus	Detekteerimise piir, süstemaht	TPMT aktiivsus	Viide
6-MP/ 6-MMP	A: 0,1 % äädikhape B: atsetonitriil, mille kogust varieeriti vahemikus 2-50%, pH väärtus-andmed puuduvad	C ₁₈ ; 125 x 4.0 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	UV, 290 nm	8,31 ng/ml, süstemaht 100 µl	4,3-28,7 U/ml PRBC; keskmine 12,0 U/ml PRBC	[3]
6-MP/ 6-MMP	metanool/vesi (80:20, v/v), sisaldas 0,1 M trietüülamiini, pH=3,2 saavutati ortofosforhapet kasutades	C ₁₈ ; 100 x 8.0 mm; 5 µm; 1,5 ml/min	DAD, 303 nm	20 ng/ml, süstemaht 50 µl	0,65-18,8 U/ml PRBC; keskmine 12,9 U/ml PRBC	[16]
6-MP/ 6-MMP	atsetonitriil/vesi (7:93, v/v), mis sisaldas lisaks 0,2 % äädikhapet ja 0,1 % DTT, pH väärtus-andmed puuduvad	C ₁₈ ; 250 x 4 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	UV, 280 nm	12,5 ng/ml, süstemaht 50 µl	4,7-35,3 U/ml PRBC; keskmine 19,3 U/ml PRBC	[17]
6-TG/ 6-MTG	0,05 M kaalium- divesinikfosfaatpuhver/ atsetonitriil/ tetrahüdrofuraan (91:5:4, v/v), pH=6,2	C ₁₈ ; 125 x 4 mm; 5 µm; 1,2 ml/min	Fluorestsents Ex. 315 nm Em. 390 nm	0,04 ng/ml, süstemaht 30 µl	1,3-68,3 U/gHb; keskmine 38,8 U/gHb	[18]

TPMT substraat/ määratav aine	Eluent, pH	Kolonn, voolukiirus	Detektor, lainepikkus	Detekteerimise piir, süstemaht	TPMT aktiivsus	Viide
6-MP/ 6-MMP	vesi/atsetonitriil/ trietüülamiin (91,7:8:0,03, v/v), pH=3,2 saavutati ortofosforhapet kasutades	C ₁₈ ; 250 x 4.6 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	UV, 290 nm	5 ng/ml, süstemaht 50 µl	7,8-27,8 U/ml PRBC; keskmine 18,2 U/ml PRBC	[19]
6-MP/ 6-MMP	0,02 M fosfaatpuhver/ metanool (86:14, v/v), pH=6,4	C ₁₈ ; 150 x 6.0 mm; 5 µm; 2,5 ml/min	UV, 289 nm	100 ng/g Hb, süstemaht 20 µl	Andmed puuduvad	[20]
6-MP/ 6-MMP; 6-TG/ 6-MTG	0,04 M kaalium- divesinikfosfaatpuhver/ atsetonitriil (90:10, v/v), pH=7,9	C ₁₈ ; 125 x 4.0 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	UV, 290 nm	Andmed puuduvad, süstemaht 30 µl	1) 6-MMP 1,1-59,9 U/g Hb; keskmine 35,8 U/g Hb 2) 6-MTG 2,5-82,0 U/g Hb; keskmine 54,4 U/g Hb	[21]
6-TG/ 6-MTG	0,05 M fosfaatpuhver/ atsetonitriil/ tetrahüdrofuraan (91:5:4, v/v), pH=6,2	C ₁₈ ; 150 x 4.6 mm; 5 µm; 2,0 ml/min	Fluorestsents Ex. 310 nm Em. 390 nm	910 ng/g Hb, süstemaht 50 µl	11,3-63,8 U/g Hb; keskmine 34,8 U/g Hb	[22]

TPMT substraat/ määratav aine	Eluent, pH	Kolonn, voolukiirus	Detektor, lainepikkus	Detekteerimise piir, süstemaht	TPMT aktiivsus	Viide
6-MP/ 6-MMP	0,01 M naatrium- fosfaatpuhver/ atsetonitriil (93:7, v/v), pH=2,7 saavutati ortofosforhapet kasutades	C ₁₈ ; 70 x 3.0 mm; 3 µm; 0,5 ml/min	UV-VIS, 290 nm	33 ng/ml, süstemaht 25 µl	Leukeemia haigetel lastel : 11,4-55,4 U/g Hb; keskmise 33,3 U/g Hb, tervetel lastel: 48,0-82,0 U/g Hb; keskmise 62,8 U/g Hb	[23]
6-MP/ 6-MMP	A: 0,1 M fosfaatpuhvri ja 6 M tetrabutüülvesinik- fosfaadi segu (pH=5,5) B: metanool, mille kogust varieeriti 7-30 %	C ₁₈ ; 75 x 4.6 mm; 3 µm; 1,0 ml/min	UV, 280 nm	Andmed puuduvad, süstemaht 100 µl	5-32 U/g Hb; keskmise kohta andmed puuduvad	[24]
6-MP/ 6-MMP	A: 0,02 M kaalium- divesinikfosfaatpuhver (pH=3,5) B: metanool, mille kogust varieeriti vahemikus 0-35 %	C ₁₈ ; 125 x 4.0 mm; 5 µm; 1,2 ml/min	DAD, 291 nm	7,5 ng/ml, süstemaht 80 µl	10,4-41,7 U/ml PRBC; keskmise 28,9 U/ml PRBC	[25]

TPMT substraat/ määratav aine	Eluent, pH	Kolonn, voolukiirus	Detektor, lainepikkus	Detekteerimise piir, süstemaht	TPMT aktiivsus	Viide
6-MP/ 6-MMP	vesi/atsetonitriil/ trietüülamiin/DTT (92,7:7:0,2:0,1, v/v), pH=3,2 saavutati ortofosforhapet kasutades	C ₁₈ ; 250 x 4.6 mm; 5 µm; 1,25 ml/min	UV, 280 nm	5 ng/ml, süstemaht 50 µl	Andmed puuduvad	[26]
6-MP/ 6-MMP	A: 0,03 M ammoonium- fosfaatpuhver (pH=2,99)/ metanool (98:2, v/v) B: sama puhver, mis juhul A/metanool (60:40, v/v), pH=2,9	C ₁₈ ; 250 x 4.6 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	DAD, täpsed andmed puuduvad, vahemik oli 295-330 nm	3,3 ng/ml, süstemaht 50 µl	Andmed puuduvad	[27]
6-MP/ 6-MMP	A: 0,03 M ammoonium- fosfaatpuhver (pH=2,9)/metanool/ (98:2, v/v) B: sama puhver, mis juhul A/metanool (60:40, v/v), pH=2,9	C ₁₈ ; 250 x 4.6 mm; 5 µm; 1,0 ml/min	UV-VIS, 290 nm	4,5 U/ 5x10 ⁶ Er, süstemaht 80 µl	Andmed puuduvad	[28]

Kasutatud lühendid: DAD - diodmaatriksdetektor; UV – ultraviolett; PRBC (ing. k. *packed red blood cells*) - hematokritt; U=nmol/h/ml, väljendab ensüümi aktiivsust; Hb - hemoglobiin; UV-VIS - ultraviolett-nähtav ; 6-MTG - 6-metüül-tioguaaniin; 6-TG - 6-tioguaaniin; Ex/Em - ergastus/kiirgus lainepikkus; Er-erütrotsüüt.

3.4 TPMT aktiivsuse normaliseerimine

Sõltumata sellest, kas TPMT aktiivsust määratakse radiokeemilise või HPLC põhise meetodiga, peab iga labor enne selle meetodi kasutuselevõttu kliinilises praktikas leidma ensüümi aktiivsuse iseloomustamiseks referentsväärtused, sest üheselt kindlaks määratud ja aktsepteeritud väärtusi TPMT aktiivsuse kohta ei esine. Vaatamata sellele, kas kasutatakse radiokeemilist või HPLC meetodit, normaliseeritakse metüleeritud metaboliidi moodustumine erütrotsüütides. Normaliseerimiseks on lisaks hematokritile nagu Weinshilboun jt. oma 1978. aastal ilmunud töös seda tegid [15], teised autorid kasutanud hemoglobiini, erütrotsüütide arvu või valgu sisaldust hemolüsaadis [17, 20-25, 29, 30]. Siiani pole teostatud uuringuid võrdlemaks TPMT aktiivsuse tulemusi, mis on saadud erinevaid normaliseerimisfaktoreid kasutades. Seepärast kasutasin oma töös TPMT aktiivsuse normaliseerimiseks nii erütrotsüütide arvu, hemoglobiini, hematokriti kui valgu sisaldust ning võrdlesin saadud tulemusi normaliseerimata TPMT aktiivsusega.

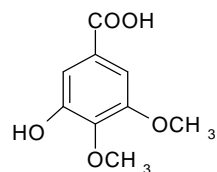
3.5 TPMT aktiivsus kooskasutamisel ravimitega

Kirjanduse andmete põhjal on leitud, et mitmed bensoehappe derivaadid inhibeerivad TPMT aktiivsust. Uuringud on näidanud, et olulist rolli mängivad inhibeerimisel asendajad bensoehappe struktuuris ning nende asukoht aromaatses tsüklis. Metoksü- ja/või hüdroksüülrühma sisseviimine bensoehappe tsüklisse suurendab inhibeerimisvõimet. Tugevad TPMT inhibiitorid on 3,4-dimetoksü-5-hüdroksübensoehape ja atsetüülsalitsüülhape. Samuti on näidatud, et täiendav karboksüülrühma liitumine bensoehappe aromaatses tsüklis avaldab inhibeerivat toimet [31].

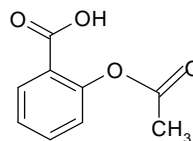
Sarnaselt atsetüülsalitsüülhappele on põletikuvastase toimega ravimid aminosalitsüülhappe derivaadid, näiteks olsalasiin ja tema metaboliit olsalasiin-O-sulfaat, potentsiaalsed TPMT inhibiitorid [32].

Antud magistritöö raames võeti vaatluse alla mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid (MSPVR) ja uuriti, millised nendest avaldavad TPMT aktiivsusele inhibeerivat toimet. Uurisime, kas TPMT aktiivsust mõjutavad tselekoksiib, lornoksikaam, paratsetamool, metamisool, ibuprofeen, diklofenak ja piroksikaam. Kuna kirjanduse põhjal oli teada, et potentsiaalsed inhibiitorid on atsetüülsalitsüülhape ja olsalasiin, siis olid need ained antud töös positiivseks kontrolliks ning negatiivseks kontrolliks oli ravim, mis ei inhibeerinud TPMT,

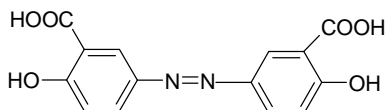
allopurinool. Järgneval joonisel on toodud nende ravimite ja 3,4-dimetoksü-5-hüdroksübensoehape keemiline struktuur.



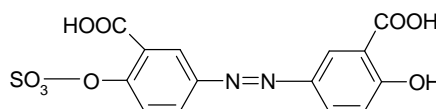
3,4-dimetoksü-5-hüdroksübensoehape



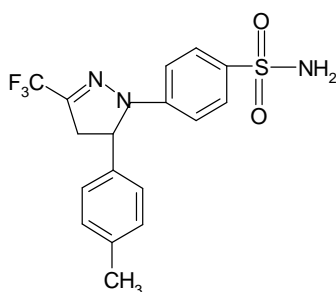
atsetüülsalitsüülhape



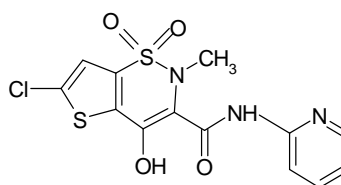
olsalasiin



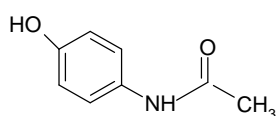
olsalasiin-O-sulfaat



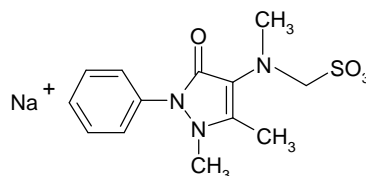
tselekoksiib



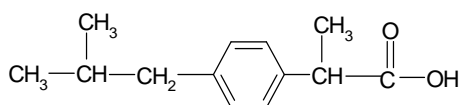
lornoksikaam



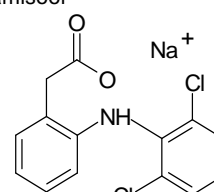
paratsetamool



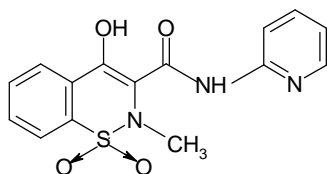
metamisool



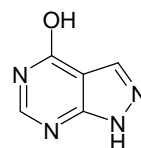
ibuprofeen



diklofenak



piroksikaam



allopurinool

Joonis 5. Uuritud ravimite ja 3,4-dimetoksü-5-hüdroksübensoehape keemilised struktuurid [32-35].

4 TÖÖ EESMÄRGID

Töö eesmärkideks olid:

- 1) Välja töötada, optimiseerida ja valideerida HPLC meetod TPMT aktiivsuse määramiseks ja leida referentsväärtused Eesti populatsiooni jaoks.
- 2) Võrrelda TPMT aktiivsuse tulemusi kasutades erinevaid normaliseerimisfaktoreid.
- 3) Uurida, kas MSPVR inhibeerivad TPMT aktiivsust *in vitro* ja võivad põhjustada ravimite koostoimeid.

5 EKSPERIMENTAALNE OSA

MATERJALID JA MEETODID

5.1 Kemikaalid

Standardained - 6-MP, 6-MMP, SAM (Sigma, St.Louis, MO, USA), DTT (Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Saksamaa). NaH₂PO₄*2H₂O, NaCl, KCl osteti firmast Janssen Chimica (Geel, Belgia). NaOH (EKA Nobel, Bohus, Rootsi). KH₂PO₄ pärines firmast Reanal (Budapest, Ungari).

DMSO ja HCl muretseti firmast Sigma (St.Louis, MO, USA), perkloorhape (70%-line) osteti firmast YA Kemia (Helsingi, Soome), HPLC puhtusega atsetonitriil (ACN) ja metanool pärinesid firmast Rathburn Chemicals (Walkerburn, Šotimaa). Kloroform, 2-propanool ja etanool olid pärit firmast Fluka (Buchs, Šveits).

Lahuste ja eluendi valmistamiseks kasutati firma Aries Vaponics (Rockland, MA, USA) veepuhastussüsteemiga puhastatud vett.

Tabel 2. Kasutatud reagentide füüsikalised omadused [35].

Reagentid	CAS Nr.	M (g/mol)	st (°C)	kt (°C)	n _D	d (g/cm ³)	puhtus (%)
6-MP	6112-76-1	170,19	315	-	-	-	98
6-MMP	50-66-8	166,2	221-222	-	-	-	99
SAM	24346-00-7	434,9	-	-	-	-	70
DTT	3489-12-3	154,3	42-43	-	-	-	99
DMSO	67-68-5	78,13	16-19	189	1,479	1,10	99,5
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	7558-80-7	156,01	60	-	-	-	99,9
KH ₂ PO ₄	7778-77-0	136,09	-	-	-	-	99
CH ₃ CN	75-05-8	41,05	-48	81-82	1,344	0,789	99
HClO ₄	7601-90-3	100,46	-	-	-	1,664	70
NaOH	1310-73-2	40,00	318	-	-	-	98,5
NaCl	7647-14-5	58,44	801	-	-	-	99,5
KCl	7447-40-7	74,55	770	1420	-	-	99
HCl	7647-01-0	36,46	-	>100	-	1,200	37,4
CH ₃ OH	67-56-1	32,04	-98	64,7	1,329	0,791	99
CHCl ₃	67-66-3	119,38	-63	60-62	1,445	1,492	99
C ₃ H ₈ O	67-63-0	60,10	-89,5	81-83	1,377	0,785	>99
C ₂ H ₅ OH	64-17-5	46,07	-114	78	1,3600	0,789	99,8

5.2 Aparatuur

HPLC süsteem koosnes WatersTM 717 plus Autosampler, Alltech 426 HPLC pumbast, Waters 486 UV-VIS detektorist ning personaalarvutist. Uuritava segu kromatograafiliseks lahutamiseks kasutati kolonni Inertsil[®] ODS-3 C₁₈, (150 mm x 4.6 mm, osakeste läbimõõt 5 µm) ja firma Alltech GmbH eelkolonni Platinum C₁₈ 100A (5 µm, 7.5 x 4.6 mm). Kromatograafi tööd kontrolliti ning andmeid koguti ja töödeldi Kromex 32S programmi abil (Akrom-EX OÜ, Tartu).

5.3 Eluendi ja lahuste valmistamine

Eluendina kasutati 0,04 M naatriumdivesinikfosfaatpuhvri (pH=7,9) ja metanooli segu (80/20, v/v).

Naatriumdivesinikfosfaatpuhver valmistati 0,1 M NaH₂PO₄*2H₂O lahustamisel deioniseeritud vees ja pH seati 7,45 kontsentreeritud NaOH lahusega.

PBS (fosfaatpuhverdatud isotooniline soolalahus) valmistati 80 g NaCl, 2 g KCl, 7,65 g NaH₂PO₄*2H₂O ja 2 g KH₂PO₄ lahustamisel 1 liitris vees ja pH seati 7,40 kontsentreeritud NaOH lahusega.

6-MP lahustati 1 M NaOH ja neutraliseerimiseks lisati juurde sama palju 1 M HCl. SAM ja DTT lahustati deioniseeritud vees. 6-MMP lahuse valmistamiseks lahustati 5,7 mg ainet 1,14 ml 0,1 M NaOH ja 8,86 ml vee segus saades niimoodi 6-MMP põhilahuse kontsentratsiooniga 0,5 mg/ml. Seda lahust hoiti –80 °C juures ja analüüside teostamiseks tehti vahetult enne eksperimenti vastavad lahjendused.

5.4 TPMT aktiivsuse määramine

6-MP TPMT kaudu moodustuv peamine metaboliit on 6-MMP. Erinevad meetodid TPMT aktiivsuse määramiseks põhinevad 6-MMP moodustumisel erütrotsüütides *in vitro*.

TPMT aktiivsus väljendati 6-MMP moodustumine ng/ml pärast 60 minutulist inkubeerimist 37 °C juures ja normaliseeriti grammi hemoglobiini, hematokriti, 10⁸ erütrotsüütide arvu ja grammi valgu sisalduse kohta hemolüsaadis.

5.4.1 Hemolüsaadi ettevalmistamine

Liitium-hepariinkatsutisse võeti 7 ml täisverd, mida tsentrifuugiti 3200 g juures 3 minutit (RC5C Sorvall Instruments). Pärast tsentrifuugimist eemaldati Pasteuri pipetiga erütrotsüütide kihilt plasma ja leukotsüüdid. Erütrotsüüdid pesti kaks korda PBS puhvriga (1:1, v/v) ja tsentrifuugiti 3200 g juures 3 minutit.

Pärast viimast tsentrifuugimist eemaldati erütrotsüütide massilt PBS kiht. Erütrotsüütide arvu, hemoglobiini ja hematokriti määramiseks pipeteeriti 100 µl erütrotsüütide massi 1,5 ml Eppendorfi tuubi ja lisati 100 µl PBS puhvrit. Erütrotsüütide arv, hematokritt ja hemoglobiin määratati TÜ Kliinikumi Ühendlaboris.

Uude 8 ml tuubi pipeteeriti 1 ml erütrotsüütide massi ja lisati 4 ml puhastatud vett. Saadud hemolüsaat tsentrifuugiti 13000 g juures 10 minutit (RC5C Sorvall Instruments). Supernatant säilitati -80°C juures määramiseni. Sellise temperatuuri juures püsib TPMT aktiivsus hemolüsaadis stabiilsena [3].

5.4.2 Proovi ettevalmistamine inkubeerimiseks TPMT substraadi 6-MP

Proovi inkubeerimiseks pipeteeriti 3 ml klaasist tuubi 50 µl 6-MP (kontsentratsioon proovis 1 mM) ja 25 µl segu, mis koosnes SAM (40 µM) ja DTT (1 mM), 200 µl hemolüsaati ja 125 µl 0,1 M fosfaatpuhvrit (pH=7,45). Proovi koguruumalaga 400 µl inkubeeriti 37 °C juures 60 minutit.

5.4.3 HPLC tingimused 6-MP ja 6-MMP määramiseks

Peale proovi inkubeerimist reaktsioon peatati sadestamisel ACN. 400 µl proovile lisati 2 ml ACN, loksutati ja jäeti -20 °C 30 minutiks seisma. Protsessi käigus eraldus kaks kihti, ülemine ehk orgaanika kiht eemaldati ja kanti teise tuubi. Alles jäänud proovile lisati veel 1 ml ACN, loksutati ja jäeti uuesti 30 minutiks -20 °C juurde, millele järgnes uuesti orgaanilise kihi eemaldamine. Kogutud orgaanilised kihid liideti ja puhuti õhuvooluga kuivaks, moodustunud sade lahustati üles 100 µl eluendis. 6-MMP sisaldust analüüsiti lainepikkusel 290 nm.

Kolonni süstiti 40 µl proovi eluendi voolukiirusel 1,3 ml/min, detekteerimisaeg oli keskmiselt 20 minutit.

5.5 Meetodi väljatöötamine TPMT aktiivsuse määramiseks Eesti populatsioonis

Meetodi väljatöötamine koosnes järgmistest etappidest:

I kromatograafilise meetodi väljatöötamine - 6-MMP määramiseks hemolüsaadis tehti kindlaks sobiv vooluti koostis, vooluti pH väärtus ja eluendi voolukiirus, detekteerimiseks sobiv lainepikkus, ekstraheerimismeetod, süsteruumala. Erinevates kontsentratsioonides standardlahuste abil koostati kalibreerimisgraafik 6-MMP kvantitatiivseks määramiseks.

II ensüümkinetika mõõtmine – uuriti ensüümreaktsiooni kineetikat (hemolüsaadi hulga ja inkubeerimisaja varieerimise mõju 6-MMP moodustumisele, inkubeerimine koos ja ilma SAM, 6-MP ja SAM kontsentratsioonide varieerimine proovides ning neile vastavate K_m ja V_{max} väärtuste leidmine).

III meetodi valideerimine – selles etapis määrati saagis, selektiivsus, meetodi mõõtetäpsus ja kordustäpsus, analüüdi stabiilsus, minimaalne määramispiir ja minimaalne kvantifitseerimispiir.

5.6 Raviminteraktsioonide uurimine

Vaatluse alla võeti 8 erinevat ravimit: tselekoksiib, lornoksikaam, parasetamool, metamisool, ibuprofeen, diklofenak, piroksikaam, atsetüülsalitsüülhape, eesmärgiga välja selgitada, millised neist ravimitest võivad inhibeerida TPMT aktiivsust. Oli teada, et potentsiaalsed TPMT inhibiitorid on olsalasiin ja atsetüülsalitsüülhape, allopurinool oli negatiivseks kontrolliks, mis TPMT ei inhibeerinud. Teiste põletikuvastaste ravimite kohta puudusid andmed, kas nad inhibeerivad TPMT. Selle väljaselgitamiseks valmistati ette proovid, milles ravimi lõppkontsentratsioonid varieerusid 0-1000 μM . Proovid koosnesid 200 μl hemolüsaadist, 50 μl 6-MP (1 mM), 25 μl SAM (40 μM) ja DTT (1 mM) segust, 125 μl fosfaatpuhvrist (pH=7,45) ja lisati 10 μl ravimilahust, mille kontsentratsioonid olid vastavalt 0, 1, 10, 50, 100 ja 1000 μM . Proove inkubeeriti 1 h 37 °C juures, sadestati ACN ja analüüsiti.

Järgnevas peatükis kirjeldatakse täpsemalt tehtud töid ja saadud tulemusi.

6 TULEMUSED JA ARUTELU

Reeglina on terapeutilise ravimi monitooringu (ing. k. *therapeutic drug monitoring*) aluseks ravimi seerumi kontsentratsiooni määramine, mille järgi toimub ravimi annuse kohaldamine. Selline lähenemine pole asatiopriini ja 6-MP puhul rakendatav. Peale suukaudset manustamist on seerumis leitavad üksnes väga väikesed kogused ravimist, kuna ravim elimineeritakse kiiresti (poolväärtusaeg 0,9-1,5 h) ja ravimil on kalduvus kiiresti laguneda väävlit sisaldavateks derivaatideks.

Populatsiooni põhised farmakokineetilised uuringud on näidanud, et patsiendil määratud tiopuriini analoogide seerumi kontsentratsiooni ja ravi efektiivsuse ning kõrvaltoimete esinemise vahel korrelatsioon puudub. Osaliselt on see seletatav sellega, et farmakoloogiliselt aktiivsed on ainult metaboliidid, mitte tiopuriini analoogid ise. Seetõttu kasutatakse tiopuriinravi individualiseerimiseks TPMT aktiivsuse määramist [36].

Eestis TPMT aktiivsust praegu veel ei määrata. Töö eesmärgiks oli välja töötada HPLC põhine meetod TPMT aktiivsuse määramiseks, mis põhineb 6-MMP moodustumisel erütrotsüütides *in vitro*. Lisaks uurisime, millised ravimid võivad osutada potentsiaalseteks TPMT aktiivsuse inhibiitoriteks ja põhjustada kooskasutamisel tiopuriinravimitega koostoimeid.

6.1 Kromatograafilise meetodi väljatöötamine

6.1.1 Kasutatava vooluti sobivuse kontroll 6-MMP määramiseks

Vooluti sobivuse kontrollimiseks kasutati spaigitud vesilahuse ja hemolüsaadi proove. Hemolüsaadi proovid valmistati analüüsiks ette töötlemisel ACN.

Esiialgu valiti voolutiks vastavalt kirjanduse andmetele [37] 0,04 M fosfaatpuhvri (pH=7,90) ja ACN segu (90/10, v/v). Voolukiirus oli 1 ml/min. Sellise koostisega vooluti kasutamisel saadi 6-MMP retentsiooniajaks 13 minutit, 6-MP 2,8 minutit ja DTT 10 minutit. Seejärel varieeriti puhvri ja atsetonitriili kogust eluendis sooviga lühendada 6-MMP retentsiooniaega:

- a) fosfaatpuhver/ACN (88/12, v/v) - 6-MMP piik kattus osaliselt DTT piigiga;
- b) fosfaatpuhver/ACN (86/14, v/v) - muutus piikide kolonnist väljumise järjestus, 6-MMP piik oli eespool DTT piigist ja nad kattusid osaliselt;
- c) fosfaatpuhver/ACN (85/15, v/v) - DTT ja 6-MMP piigid saadi küll lahku, kuid 6-MMP piik oli 6-MP piigist halvasti lahutunud;
- d) fosfaatpuhver/ACN (80/20, v/v) - tulemus oli sama, mis eelneva vooluti kasutamisel.

Lisaks selgus, et kui vooluti koosnes fosfaatpuhvri/ACN segust (90/10, v/v), oli uuritava 6-MMP piigi all segav piik hemolüsaadist. Seetõttu asendati vooluti koostises olev ACN metanooliga ja varieeriti metanooli kogust. Voolukiirus jäeti esialgu samaks, s.t. 1 ml/min.

Testiti 3 voolutit : 1) fosfaatpuhver/metanool (90/10, v/v) - sellise vooluti kasutamisel ei täheldatud 20 minuti jooksul 6-MMP piiki ja analüüs lõpetati.

2) fosfaatpuhver/metanool (85/15, v/v) - DTT piik ilmus nähtavale 18 minuti juures, aga analüüs lõpetati 20 minuti pärast, kuna 6-MMP polnud selleks ajaks veel kolonnist väljunud.

3) fosfaatpuhver/metanool (80/20, v/v) - 6-MMP piik oli nähtav 19 minutil, kuid oli lai ja lame.

Kuna voolukiirusel 1 ml/min oli 6-MMP piigi retentsiooniaeg pikk ning piik ise oli lai ja lame, suurendati voolukiirust. Voolukiirust varieeriti 1-1,5 ml/min, kõige paremaks osutus piikide lahutuvuse seisukohalt voolukiirus 1,3 ml/min ja vooluti koostisega

0,04 M fosfaatpuhver (pH=7,90)/metanool (80/20, v/v). 6-MMP retentsiooniajaks saadi keskmiselt 14 minutit. Samuti oli oluline, et piigi alune ja ümbur olid segavatest piikidest puhtad.

Allpool toodud valemeid kasutades arvutati välja piigi asümmeetriafaktor, lahutuvuskriteerium, kolonni teoreetiliste taldrikute arv, selektiivsusfaktor ning analüüdi mahtuvusfaktor.

- analüüdi mahtuvusfaktor:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- kolonni teoreetiliste taldrikute arv

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

- piigi asümmeetriafaktor

$$A_S = \frac{w_2}{w_1}$$

- lahutuvuskriteerium

$$R_S = \frac{t_{R(A)} - t_{R(B)}}{0,85 \cdot (w_{1/2(A)} - w_{1/2(B)})}$$

- selektiivsusfaktor

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Parameetrid: t_R - retentsiooniaeg; t_M - surnud aeg, $w_{1/2}$ - piigi laius poolel kõrgusel, w – piigi laius kõrgusel, mis on 10 % piigi kõrgusest [38].

Vastavad väärtused 6-MMP piigi jaoks olid: mahtuvusfaktor $k'=6,92$; kolonni teoreetiliste taldrikute arv $N=4798$; piigi asümmeetriafaktor $A_S=1,33$; lahutuvuskriteerium $R_S=5,15$ ja selektiivsusfaktor $\alpha=1,45$.

Mahtuvusfaktor kirjeldab aine kolonnis liikumise kiirust ja heaks tulemuseks loetakse kui k' väärtus on vahemikus $1 < k' < 20$ ja väga heaks kui k' on vahemikus $2 < k' < 10$.

Teoreetiliste taldrikute arvu kasutatakse kromatograafilise kolonni efektiivsuse iseloomustamiseks. Kromatograafilise kolonni efektiivsuseks nimetatakse kolonni võimet takistada mööda kolonni liikuvate ainete tsoonide laienemist.

Asümmeetriafaktor korral loetakse normaalseks väärtust kui $A_S < 2$. Lahutuvuskriteerium iseloomustab kromatograafilise süsteemi võimet lahutada kahe komponendi piigid ja piigid loetakse lahutunuks kui $R_S > 1,5$ ning ohutu on kui $R_S = 1,7 \dots 2,0$ [38].

Selektiivsusfaktor iseloomustab süsteemi võimet eraldada kahte komponenti ja α väärtused peaksid jääma vahemikku 1,1...1,4, kuid võrreldes lahutuvuskriteeriumiga ei ole see nii hea näitaja, sest ta ei võta arvesse piikide laiust [38].

6.1.2 Detekteerimiseks sobiva lainepikkuse määramine

Kirjanduse andmetele tuginedes [37] valiti proovide analüüsimiseks UV-VIS detektoriga lainepikkuseks 290 nm. Testiti ka teisi lainepikkusi: 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340 nm. Tulemused on esitatud tabelis 3. Nende andmete põhjal oli 6-MMP piigi kõrgus kõige suurem lainepikkusel 290 nm.

Lisaks sellele analüüsiti proovi ka diodmaatriksdetektoriga (DAD) ning kõige intensiivsemat neeldumist täheldati 290 nm juures (spektrid on toodud lisas 1.).

Tabel 3. 6-MMP piigi kõrguse ja pindala väärtused erinevatel lainepikkustel.

Lainepikkus $\lambda(\text{nm})$	6-MMP piigi kõrgus (mV)	6-MMP piigi pindala (mV*min)
220	316	175
240	113	57
260	107	43
280	414	251
290	487	282
300	254	129
320	21	5
340	Piik puudus	Piik puudus

6.1.3 Vereproovide töötlemiseks sobiva meetodi leidmine

Sobivaima meetodika leidmiseks kasutati erinevaid kirjanduses toodud ja meie laboris välja töötatud meetodeid:

- kloroform/2-propanool segu :
 - a) 90 % kloroform ja 10 % 2-propanool [21]
 - b) 80 % kloroform ja 20 % 2-propanool [26]
- 70%-line perkloorhape [23, 28]
- ACN (meie laboris välja töötatud)
- metanool (meie laboris välja töötatud)
- proovi kuumutamine 3 minutit 120 °C juures [22, 25]
- etanool [3]

Töö teostamiseks valmistati ette rida proove, mis kõik sisaldasid 200 µl hemolüsaati, 25 µl DTT (1 mM) ja SAM (40 µM) segu, 50 µl 6-MP (0,6 mM) ja 125 µl 0,1 M fosfaatpuhvit pH=7,45. Proovid töödeldi järgnevalt.

6.1.3.1 Töötlemine kloroform/2-propanool seguga

Proovile lisati reaktsiooni peatamiseks 1 ml kloroform-2-propanooli segu (90/10, v/v), seejärel segati proovi 10 minutit miniloksutil ja tsentrifuugiti 13000 g juures 10 minutit. Eraldus 2 kihti, millest analüüsiks võeti ülemine kiht. Süstemaht HPLC kolonni oli 40 µl. Sellist meetodit kasutades ei õnnestunud saada piisavalt intensiivset 6-MMP piiki (piigi kõrgus oli 29 mV ja pindala 5,78 mV*min).

Teisel juhul lisati proovile pärast inkubeerimist 5 ml kloroform/2-propanool segu (80/20, v/v), segati ja tsentrifuugiti 13000 g juures (temperatuuril +4 °C) 10 minutit. Ülemine kiht eemaldati, puhuti õhuvooluga kuivaks ja lahustati 250 µl mobiilfaasis. Analüüsiks süstiti HPLC kolonni 40 µl proovi, kuid 6-MMP piik oli halvasti lahutunud teistest piikidest (piigi kõrgus oli 186 mV ja piigi pindala 57,77 mV*min).

6.1.3.2 Proovide sadestamine 70%-lise perkloorhappega

Pärast inkubeerimist lisati proovile reaktsiooni peatamiseks 100 µl 70 % perkloorhapet. Proovi loksutati miniloksutil ja tsentrifuugiti seejärel 10 minutit 13000 g juures. Analüüsiks koguti 300 µl supernatanti ja kolonni süstiti 40 µl proovi. 6-MMP piik oli madala intensiivsusega ja lai (piigi kõrgus 72 mV ja pindala 35,65 mV*min).

6.1.3.3 Töötlemine atsetonitriiliga

Proovidele lisati reaktsiooni peatamiseks 1 ml ACN, loksutati ja viidi 30 minutiks $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ külmruumi seisma. Eraldus 2 kihti, millest ülemist orgaanilist faasi koguti $\sim 800\text{ }\mu\text{l}$ ja see kanti uude tuubi ning puhuti õhuvooluga kuivaks. Järelejäänud sade lahustati $100\text{ }\mu\text{l}$ mobiilfaasis ja analüüsiks võeti $40\text{ }\mu\text{l}$. 6-MMP piik oli sümmeetriline ja intensiivne (piigi kõrgus ja pindala olid vastavalt 300 mV ja $145,19\text{ mV}\cdot\text{min}$).

6.1.3.4 Töötlemine metanooliga

$400\text{ }\mu\text{l}$ inkubeeritud proovile lisati $400\text{ }\mu\text{l}$ metanooli. Proovi segati miniloksutil 15 minutit ja tsentrifugeeriti 4000 g juures 10 minutit ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant eraldati ja analüüsiti. 6-MMP piik oli madala intensiivsusega (piigi kõrgus oli 58 mV ja piigi pindala $18,24\text{ mV}\cdot\text{min}$).

6.1.3.5 Proovide kuumtöötlemine

Reaktsioon peatati proovi kuumutamiseks $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures 3 minutit, pärast jahtumist proovi tsentrifugeeriti 2000 g juures 15 minutit ($+15\text{ }^{\circ}\text{C}$) ja kogutud supernatant analüüsiti. Piik oli asümmeetriline (piigi kõrguseks saadi 229 mV ja piigi pindalaks $100,85\text{ mV}\cdot\text{min}$).

6.1.3.6 Töötlemine etanooliga

Proovile lisati $200\text{ }\mu\text{l}$ absoluutset etanooli, seejärel hoiti proovi 10 minutit jäävannis ning lisati seejärel $355\text{ }\mu\text{l}$ lahust, mis koosnes metanoolist ja $0,1\text{ M HCl}$ ($50/50, \text{ v/v}$), proovi tsentrifugeeriti 5000 g juures 5 minutit ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ja $40\text{ }\mu\text{l}$ supernatanti süstiti HPLC kolonni. Sellist meetodit kasutades oli 6-MMP piik lai (piigi kõrgus 71 mV ja pindala $39,35\text{ mV}\cdot\text{min}$).

Nendele andmetele tuginedes valiti edaspidi reaktsiooni peatamiseks ja vereproovide analüüsiks ettevalmistamiseks meie laboris välja töötatud ACN töötlemise meetod. 6-MMP piik oli kõrge, hästi lahutunud ja sümmeetriline. Teised eespool proovitud töötlemismeetodid andsid kas liiga madala piigi [3, 18, 26, 30] või oli 6-MMP piik asümmeetriline ning teistest piikidest halvasti lahutunud [39] (kromatogrammide erinevate töötlemismeetodite kohta on toodud lisa 2.).

Leheküljel 23 toodud valemite järgi arvutati erinevate töötlemismeetodite kohta parameetrid, mis iseloomustavad kromatograafilise meetodi sobivust ja need on esitatud tabelis 4:

Tabel 4. Erinevate proovi töötlemismeetodite võrdlus TPMT aktiivsuse määramiseks vereproovides.

Parameeter	ACN	Kloroform/ 2-propanool (90/10, v/v)	Kloroform/ 2-propanool (80/20, v/v)	Perkloor- hape (70%)	120 °C	Etanool	Meta- nool
Mahtuvus- faktor (<i>k</i>)	6,92	9,54	9,22	10,25	7,40	8,10	9,12
Teoreetiliste taldrikute arv (<i>N</i>)	4798	3042	3210	2804	2443	1274	2931
Asümmeetria faktor (<i>A_s</i>)	1,33	1,50	1,50	1,33	1,30	2,00	1,50
Lahutuvus- kriteerium (<i>R_s</i>)	5,15	2,50	2,35	2,50	1,62	1,76	2,67
Selektiivus (<i>α</i>)	1,45	1,23	1,24	1,22	1,17	1,23	1,24

6.1.4 Sobiva süsteruumala määramine

Analüüsiks sobivaima süsteruumala määramiseks süstiti HPLC kolonni järgmisi ettevalmistatud proovide koguseid: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ja 90 µl. 6-MMP piigi kõrgus ja pindala olid proportsionaalsed süsteruumalaga. Samas oli näha, et süsteruumaladel 70, 80 ja 90 µl, hakkasid piigid nn. “laienema”.

Kõige sobivamaks osutus süsteruumala 40 µl. Sellise koguse süstimisel saadi korralikud piigid ja ei tekkinud ohtu, et kolonn saaks üle koormatud ning piigid asümmeetriliseks muutuksid.

Samuti võimaldas see süsteruumala vajadusel ühest viaalist 2 korda järjest süstida. Pärast ACN sadestamist lahustati sade 100 µl mobiilfaasis, mis kanti üle analüüsimiseks vastavasse viaali.

6.1.5 Kromatograafia tingimuste optimeerimise tulemused

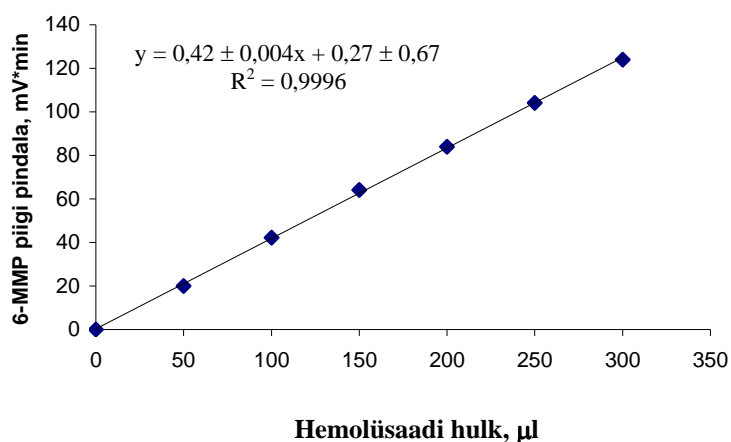
Kromatograafia meetodi väljatöötamisel leiti järgmised optimaalsed tingimused, mida kasutati edaspidi proovide analüüsimisel:

- a) vooluti koostis - 0,04 M fosfaatpuhver (pH=7,90)/metanool, (80/20, v/v)
- b) voolukiirus -1,3 ml/min, analüüsi kestvus 20 minutit
- c) lainepikkus - 290 nm
- d) proovide ettevalmistamine - töötlus ACN
- e) süsteruumala kolonni - 40 µl

6.2 Ensüümreaktsiooni kineetika uurimine

6.2.1 Hemolüsaadi hulga varieerimine

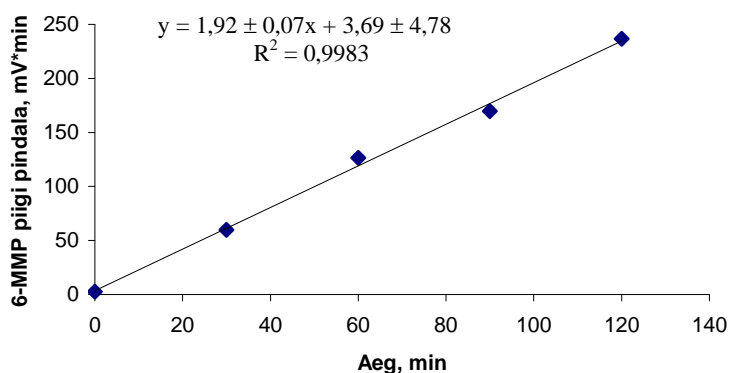
Analüüsiti 7 proovi, mille koostis oli järgmine: 150 µl 6-MP (0,6 mM), 75 µl DTT (1 mM) ja SAM (25 µM) segu, 75 µl puhvrit ja erinevas koguses (0-300 µl) hemolüsaati ning vett nii, et proovi koguruumala oli 600 µl. Proove inkubeeriti 1 h 37 °C juures, töödeldi ACN ja analüüsiti. Tulemuste põhjal koostati graafik, mis näitas, et 6-MMP piigi pindala oli lineaarses sõltuvuses hemolüsaadi kogusest. Analüüsiks otsustati edaspidi võtta 200 µl hemolüsaati.



Joonis 6. 6-MMP piigi pindala sõltuvus hemolüsaadi kogusest.

6.2.2 Sobiva inkubatsiooniaja määramine

Proovide analüüsiks sobiva inkubatsiooniaja määramiseks inkubeeriti proove 0-120 minutit. Koostati graafik teljestikus inkubatsiooniaeg ja moodustunud 6-MMP piigi pindala, mis andis lineaarse sõltuvuse (Joonis 7). Kuna enamikes artiklites oli inkubatsiooniajaks 60 minutit, jäädigi selle juurde.



Joonis 7. 6-MMP piigi pindala sõltuvus inkubatsiooniajast.

6.2.3 Inkubeerimine koos ja ilma SAM

Selleks, et uurida kas 6-MMP moodustub üksnes ensümaatilisel, kofaktor SAM juuresolekul, valmistati ette 2 proovi, mis sisaldasid 200 µl hemolüsaati, 50 µl 6-MP (0,6 mM), mis oli lahustatud DMSO, 25 µl DTT (1 mM) ja 125 µl puhvrit.

Esimesele proovile lisati 25 µl SAM (25 µM), teisele SAM ei lisatud, vaid lisati 25 µl vett. Proovid inkubeeriti, sadestati ACN, analüüsiti.

Selgus, et kui 6-MP lahustamiseks kasutati DMSO - kirjanduses [3, 18, 20, 30, 33] enim kasutatav lahusti, siis moodustus 6-MMP praktiliselt võrdselt nii SAM kui ilma SAM inkubeeritud proovides.

Samalaadsed tulemused saadi kui uuriti kolme erineva inimese verest valmistatud hemolüsaati.

Lennard jt. [16], Khalil jt. [23] ning Kröplin jt. [18, 37] on oma töödes näidanud, et kui kasutada 6-MMP lahustamiseks DMSO ja kui substraadi ja/või kofaktori kontsentratsioon on kõrge, esineb DMSO juuresolekul mitte-ensümaatilist metüleerimist (metüülrühma doonoriks on DMSO). Sellisele tulemusele jõuti ka antud töös.

Mitte-ensümaatilise metüleerimise vältimiseks lahustati 6-MP edaspidi 1 M NaOH, millele lisati ensüümreaktsiooni toimumiseks vajaliku neutraalse keskkonna saavutamiseks sama kogus 1 M HCl lahust. Tulemused on esitatud tabelis 5.

Tabel 5. Inkubeerimine koos ja ilma SAM.

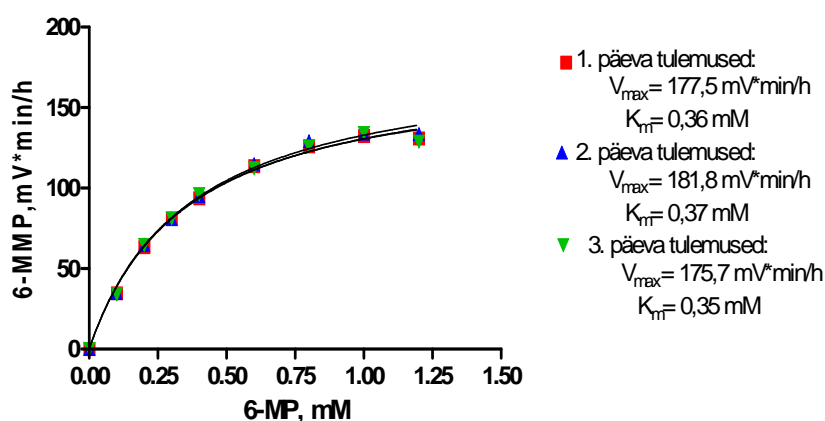
Proov nr	Lahusti 6-MP jaoks	6-MMP piigi kõrgus (mV)
1. Ilma SAM proov	DMSO	96
2. Koos SAM proov	DMSO	108
3. Ilma SAM proov	1 M NaOH	27
4. Koos SAM proov	1 M NaOH	122

6.2.4 6-MP kontsentratsiooni varieerimine

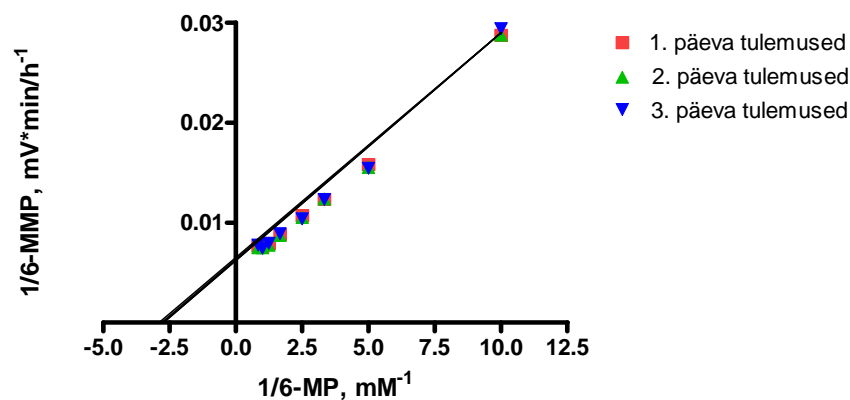
6-MP kontsentratsiooni proovides varieeriti vahemikus 0-1,2 mM, kofaktor SAM kontsentratsioon oli seejuures alati 25 μM . Analüüse korrati kolmel erineval päeval. Tulemusi töödeldi *GraphPad Prism 4,0* programmi abil, mis võimaldas määrata Michaelis-Menteni võrrandi V_{max} ja K_m väärtused. Kasutati järgmist võrrandikuju:

$Y = V_{\text{max}} * X / [K_m + X]$, kus X tähistab substraadi 6-MP kontsentratsiooni ja Y analüüsi käigus leitud 6-MMP piigi pindala väärtusi. V_{max} tähistab maksimaalkiirus, s.t kiirus tingimustes, kus kogu ensüüm on substraadiga seostunud [ES] vormis. K_m (Michaelise konstant) iseloomustas substraadi kontsentratsiooni, mille puhul reaktsioon on saavutanud poole oma maksimaalkiirusest.

Saadud andmete põhjal koostati graafik ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist ja Lineweaver-Burki graafik.



Joonis 8. Ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist.



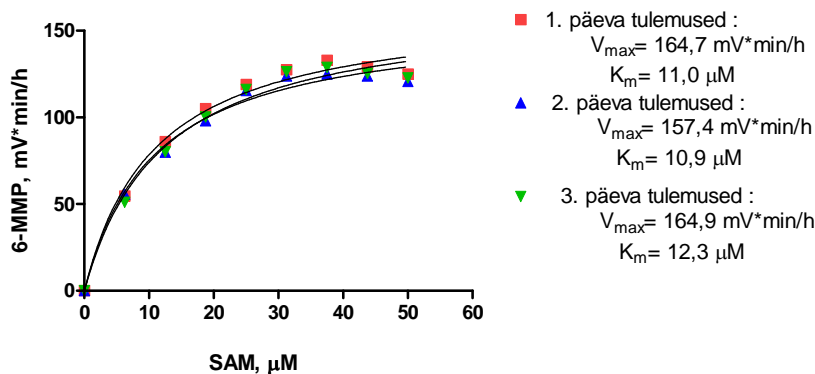
Joonis 9. Lineweaver-Burki graafik.

Kolmel erineval päeval tehtud katse tulemuste põhjal leiti K_m ja V_{max} keskmised väärtused: $K_m=0,4 \pm 0,01$ mM (CV=3 %) ja $V_{max}=178,3 \pm 3,1$ mV*min/h (CV=2%). Maksimaalne reaktsiooni kiirus saavutati substraadi kontsentratsioonil 1,0 mM ning edaspidi kasutati hemolüsaadi inkubeerimisel 6-MP just seda kontsentratsiooni.

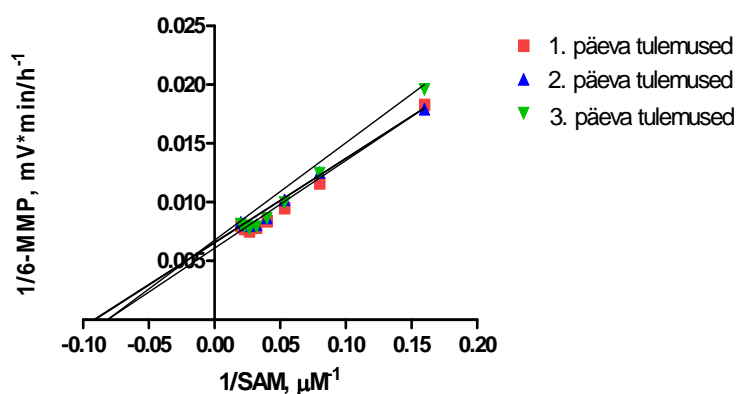
6.2.5 SAM kontsentratsiooni varieerimine

SAM kontsentratsiooni muudeti vahemikus 0-50 μ M, substraadi 6-MP kontsentratsioon oli 0,6 mM. Analüüsi korrati kolm korda erinevatel päevadel, andmeid töödeldi *GraphPad Prism 4,0* programmi abil. Kolmel erineval päeval tehtud katsetulemuste põhjal leiti K_m ja V_{max} keskmised väärtused:

$K_m=11,4 \pm 0,8$ μ M (CV=7 %) ja $V_{max}=162,3 \pm 4,3$ mV*min/h (CV=3 %).



Joonis 10. Ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus kofaktor SAM kontsentratsioonist.



Joonis 11. Lineweaver-Burki graafik.

Kirjanduses toodud andmed 6-MP ja SAM kontsentratsiooni kohta proovis on tabelis 6.

Tabel 6. Inkubeerimiseks kasutatud proovide koostis kirjanduses.

Lennard ja Singleton, 1994 [16]		Jacqz-Aigrain jt., 1994 [17]		Kroplin ja Iven, 2000 [21]		Boulieu jt., 2001 [25]		Anglicheau jt., 2002 [3]		
6-MP lahusti										
0,1 M NaOH/ 0,1 M HCl		DMSO		0,1 M NaOH/ 0,1 M HCl		0,1 M NaOH/ 0,1 M HCl		DMSO		
Proovi koostis										
	Maht (μ l)	C_L	Maht (μ l)	C_L	Maht (μ l)	C_L	Maht (μ l)	C_L	Maht (μ l)	C_L
Er	100	-	200	-	50	-	200	-	100	-
6-MP	90	558 μ M	15	4 mM	50	600 μ M	10	4 mM	5	3,8 mM
SAM	16	25 μ M	15	10 μ M	50	128 μ M	30	25 μ M	12,5	12 μ M
DTT	16	1 mM	15	250 μ M	-	-	-	1 mM	12,5	1 mM
Puhver	15	-	205	-	100	-	100	-	25	-
K	237	-	450	-	250	-	340	-	155	-
K_m väärtused										
6-MP	83 μ M	-	0,6 mM	-	130 μ M	-	-	-	426 μ M	-
SAM	-	-	1,3 μ M	-	-	-	-	-	1,9 μ M	-
V_{max} väärtused										
6-MP	15,6 μ mol/ ml PRBC/h	-	-	-	60 nmol/gHb/h	-	-	-	11,5 nM/min	-
SAM	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0 nM/min	-

Er – erütrotsüütide lüsaat; 6-MP – 6-merkaptopuriin; SAM – S-adenosüül-L-metioniin; DTT – ditiotreitol; K - kogu ruumala; C_L – lõppkontsentratsioon.

6.2.6 Ensüümkinetika mõõtmiste tulemused

Ensüümreaktsiooni kineetika uurimisel jõuti järgmiste tulemusteni, mida edaspidi rakendati proovide ettevalmistamisel ja analüüsimisel:

- 1) proovide inkubeerimisaeg 60 minutit 37 °C juures
- 2) hemolüsaadi hulk proovis 200 μ l
- 3) 6-MP lõppkontsentratsioon proovides 1 mM
- 4) SAM lõppkontsentratsioon proovides 40 μ M

6.3 Meetodi valideerimine

Meetodi valideerimine viidi läbi USA Toidu- ja Raviameti valideerimisjuhendi alusel [40].

6.3.1 Määramis- ja kvantifitseerimispiir

Kalibreerimisgraafik, mis koostati 6-MMP piigi pindala ja kontsentratsiooni suhtena, oli lineaarne vahemikus 3,91-250 ng/ml ($R^2 > 0,99$). 6-MMP määramisel osutus madalaimaks määramispiiriks kontsentratsioon 1,95 ng/ml, mille puhul piik oli veel müra eristatav, signaal-müra suhe oli suurem kui 3 ja madalaimaks kvantifitseerimispiiriks 6-MMP kontsentratsioon 3,91 ng/ml koos mõõtetäpsusega 102 % ja kordustäpsusega 7 %. Mõõtetäpsus ja kordustäpsus leiti tagasiarvutatud kontsentratsioonina iga kalibreerimisgraafiku punkti nominaalkontsentratsioonist.

6.3.2 Saagis

Saagise leidmiseks võeti 9 vesilahuse proovi ja 9 vereproovi, milles 6-MMP spaigiti kontsentratsiooni vahemikus 0-250 ng/ml. Mõlemal juhul koostati analüüsitulemuste põhjal kalibreerimisgraafikud. Vereproovide koostis:

50 µl 6-MP (1 mM), 50 µl vastava kontsentratsiooniga 6-MMP, 25 µl SAM (40 µM) ja DTT (1 mM) segu, 200 µl hemolüsaati ja 75 µl puhvrit. Vereproove koguruumalaga 400 µl töödeldi ACN, moodustunud sade lahustati 100 µl mobiilfaasis ja analüüsiti.

Saagise protsendid arvutati vesilahuste analüüsil saadud piigi pindalade ja kõrguste jagamisel vastavate veres määratud väärtustega ning tulemused korrutati 100-ga.

Töötlemisel 1 ml ACN varieerus saagis vahemikus 50 % (kõrgematel 6-MMP kontsentratsioonidel) kuni 94 %. Stabiilsema saagise saamiseks tõstisime ACN kogust proovi töötlemisel 2 ml, 2+1 ml ja 2+1+1 ml ACN.

Tabelites 7 ja 8 on toodud erinevate ACN kogustega töötlemisel saadud saagiste väärtused piigi pindalade ja kõrguste järgi, nende väärtuste keskmised, standardhälbed (SD) ja variatsioonikoefitsendid (CV).

Tabel 7. ACN hulga mõju 6-MMP saagisele (arvutatud piigi pindala järgi).

6-MMP (ng/ml)	Saagis (%)			
	Kasutatud ACN hulk (ml)			
	1 ml	2 ml	2 + 1 ml	2 + 1 + 1 ml
250	50,5	78,9	79,3	108,9
125	50,4	74,3	83,8	86,3
62,5	66,8	67,7	79,6	92,0
31,25	62,4	82,7	84,3	93,0
15,63	127,4	99,4	88,1	95,1
12,5	93,7	85,6	82,0	104,6
7,81	124,6	96,5	88,2	89,0
6,25	99,6	85,1	82,1	116,6
Keskmine	84,05	83,78	83,43	98,19
SD	30,78	10,58	3,40	10,66
CV	36,62	12,63	4,08	10,86

Tabel 8. ACN hulga mõju 6-MMP saagisele (arvutatud piigi kõrguste järgi).

6-MMP (ng/ml)	Saagis (%)			
	Kasutatud ACN hulk (ml)			
	1 ml	2 ml	2 + 1 ml	2 + 1 + 1 ml
250	51,8	79,2	76,9	104,6
125	50,9	73,1	85,8	83,4
62,5	67,7	62,3	87,5	87,9
31,25	64,5	82,8	89,0	88,9
15,63	123,4	97,5	98,1	102,3
12,5	91,2	77,5	90,2	104,8
7,81	125,7	92,3	90,6	100,0
6,25	98,5	96,7	86,7	114,8
Keskmine	84,21	82,66	88,10	98,34
SD	30,07	12,27	5,91	10,63
CV	35,71	14,84	6,71	10,81

Parimaid tulemusi andis töötlemine 2+1 ml ACN. Sellisel juhul oli saagise varieeruvus väikseim ning keskmine saagise väärtus piigi pindala järgi koos SD oli 83,4 % ± 3,4 % ja CV = 4,1 %. Proovide töötlemist 2+1 ml ACN korrati veel kahel päeval. Kolme mõõtmise tulemusel saadi, et keskmine saagis oli kogu kalibreerimisgraafiku ulatuses 84,6 % ± 2,1 % ja CV = 2,4 %. Seega võis 2+1 ml ACN töötlemise meetodit lugeda sobivaks.

Lisaks võrreldi, kas proovide ACN töötlemisele järgnev õhuvooluga orgaanilise kihi kuivaks puhumine võib põhjustada proovi oksüdeerumist. Selleks kasutati orgaanilise kihi kuivaks puhumiseks ühel juhul gaaside segu, mis koosnes 85 % lämmastikust, 10 % süsihappegaasist ja 5 % vesinikust ja teisel juhul õhku. Erinevusi 6-MMP saagistes ei leitud. Õhuvooluga puhumisel oli saagis $83,4 \% \pm 3,4 \%$ ja gaaside segu korral $82,1 \% \pm 4,0 \%$ üle kalibreerimisgraafiku. Seega ei põhjusta õhuvooluga kuivaks puhumine proovi oksüdeerumist.

6.3.3 Analüüdi stabiilsus

Analüüdi stabiilsust uuriti erinevatel tingimustel: stabiilsus HPLC aparatuuris, põhilahuse stabiilsus, külmutus- ja sulatustsükli stabiilsus, proovide stabiilsus toatemperatuuril ja $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures seismisel.

Analüüdi stabiilsusest HPLC aparatuuris ja põhilahuse stabiilsusest on räägitud eraldi alapunktides, külmutus- ja sulatustsükli stabiilsuse määramiseks valmistati spaigitud hemolüsaadi proovid, milles 6-MMP kontsentratsioonid olid 15,63 ng/ml, 31,25 ng/ml ja 125 ng/ml. Analüüsiks ettevalmistatud proove hoiti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures 3 päeva, iga päev sulatati proovid toatemperatuurile ning pärast seda külmutati uuesti. Pärast külmutus-sulatustsükli kordamist ei täheldatud olulisi muutusi 6-MMP piigi pindala muutuses võrreldes algsete tulemustega. Tulemused selle kohta on toodud tabelis 9.

Tabel 9. Külmutus- ja sulatustsükli stabiilsus.

6-MMP (ng/ml)	6-MMP piigi pindala (mV*min) proovide kohesel analüüsimisel	6-MMP piigi pindala (mV*min) pärast külmutus- ja sulatustsüklit
15,63	29,48	28,12
31,25	54,58	52,98
125	213,01	211,47

Proovid püsisid stabiilsetena nii 24 h toatemperatuuril (6-MMP piigi pindala oli muutunud 8 %, n=2) kui ka $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures seismisel (5 % muutus piigi pindala, n=2). Seega olid proovid stabiilsed nii lühiajalisel kui ka pikaajalisel säilitamisel.

6.3.3.1 Proovi stabiilsus HPLC aparatuuris

Proovide stabiilsuse uurimiseks kasutati spaigitud 6-MMP proove, mida töödeldi ACN, pärast töötlust analüüsiti neid kohe ning seejärel jäeti proovid 15 tunniks autosamplerrisse seisma ja analüüsiti uuesti järgmisel päeval. Saadud tulemused on tabelis 10.

Tabel 10. Proovide stabiilsus HPLC aparatuuris.

6-MMP (ng/ml)	6-MMP piigi pindala (mV*min) proovide kohesel analüüsimisel	6-MMP piigi pindala (mV*min) pärast 15 tunnist masinas seismist
15,63	28,75	27,14
31,25	52,68	51,27
125	208,12	206,39

Tabelis toodud tulemused näitasid, et proovid olid stabiilsed. Autosampler mahutab 48 proovi. Ühe proovi analüüsiks kulus keskmiselt 20 minutit. Seepärast oli oluline hinnata, et ka viimaste proovide analüüsimisel saadakse usaldusväärsed andmed ning need proovid pole ära lagunened.

6.3.3.2 6-MMP põhilahuse stabiilsus

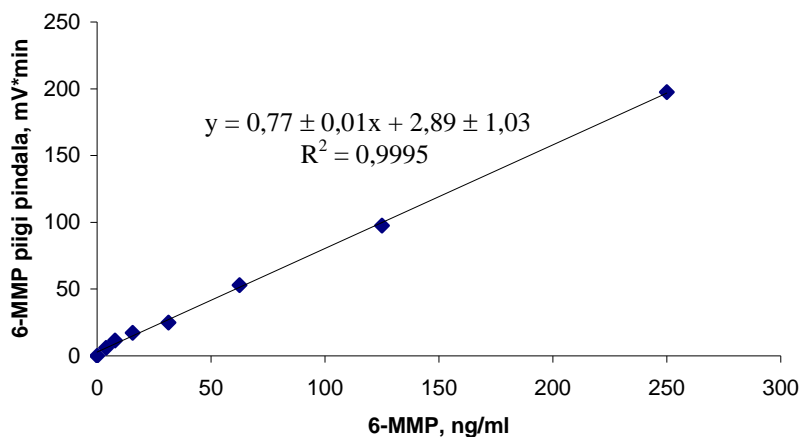
Stabiilsuse uurimiseks valmistati 6-MMP põhilahus kontsentratsiooniga 0,5 mg/ml ja asetati see -80° C juurde seisma. Saadud põhilahusest tehti lahjendused, milles 6-MMP kontsentratsioonid olid vahemikus 250-3,91 ng/ml. Lahused analüüsiti ja tulemuste põhjal koostati kalibreerimisgraafik. Protsessi korrati üks kord kuus. 6-MMP põhilahuse stabiilsust hinnati säilitamisel -80 °C juures pärast korduvat külmutamis- ja sulatamistsükleid ning tulemused näitasid, et lahus oli stabiilne 12 kuud -80 °C juures (CV=7,5 %, n=12).

6.3.4 Meetodi mõõtetäpsus ja kordustäpsus

Meetodi mõõtetäpsuse ja kordustäpsuse määramiseks koostati kalibreerimisgraafik, kus 6-MMP kontsentratsioonid olid vahemikus 250 - 0 ng/ml (8 proovi). Lisaks võeti analüüsimiseks kolm paralleelproovi 4 erineva 6-MMP kontsentratsiooniga (spaigitud, kvaliteedikontrolliproovid) ja kaks uuritavat vereproovi.

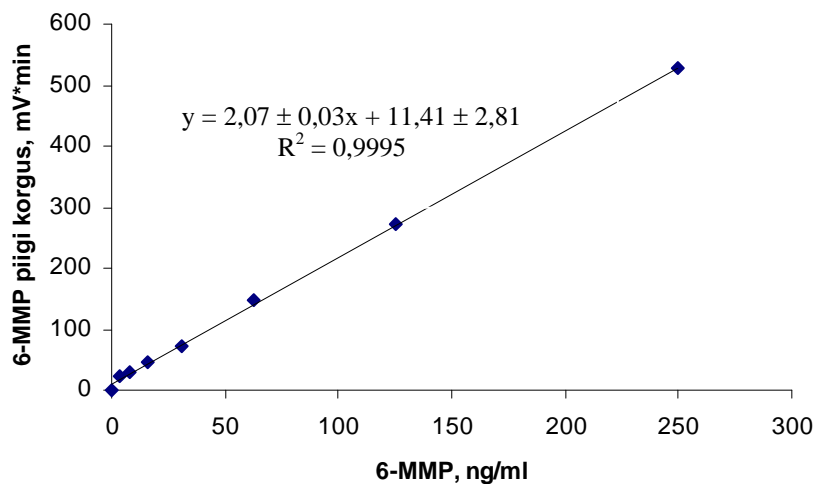
Kalibreerimisgraafiku ja kvaliteedikontrolliproove ei inkubeeritud, uuritavaid vereproove inkubeeriti. Saadud tulemuste põhjal koostati kalibreerimisgraafikud nii

piigi pindalade kui kõrguste väärtuste järgi ning sirge võrrandeid kasutades leiti 6-MMP sisaldus kvaliteedikontolli proovides ning uuritavas vereproovis. Katset korrati kolmel erineval päeval ja leitud 6-MMP sisaldused koos keskmiste, standardhälvete ja variatsioonikoefitsientidega on esitatud tabelis 11.



Joonis 12. 6-MMP kalibreerimine piigi pindala järgi.

6-MMP sisaldus proovides arvutati joonisel 12 toodud sirge võrrandi järgi, kus y tähistab analüüsi tulemusena saadud piigi pindala väärtust ja millest tundmatu x leitakse valemiga $x = (y - 2,89) / 0,77$.



Joonis 13. 6-MMP kalibreerimine piigi kõrguste järgi.

6-MMP sisaldus proovides arvutati joonisel 13 toodud sirge võrrandi järgi, kus y tähistab analüüsi tulemusena saadud piigi kõrguste väärtust ja millest tundmatu x leitakse valemiga $x = (y - 11,41) / 2,07$.

Järgnevas tabelis on esitatud kolmel erineval päeval tehtud mõõtmiste tulemused. Uuritavaks prooviks oli ühe inimese veri, millest tehti 2 paralleelproovi (tabelis tähistatud uuritav 1 ja 2).

Tabel 11. Kolmel erineval päeval leitud 6-MMP sisaldused kvaliteedikontrolli proovides.

Spaigitud 6-MMP, ng/ml	Proovi number	Määratud 6-MMP, ng/ml					
		Piigi pindala järgi			Piigi kõrguse järgi		
		1. päev	2. päev	3. päev	1. päev	2. päev	3. päev
125	proov 1	122,57	123,08	122,68	128,89	128,20	128,05
	proov 2	118,09	118,41	121,35	125,92	119,51	126,59
	proov 3	119,40	115,14	123,33	127,41	120,96	127,56
3 proovi	keskmine	120,02	118,88	122,45	127,41	122,89	127,40
	SD	2,31	3,99	1,01	1,49	4,65	0,75
	CV	1,92	3,35	0,83	1,17	3,79	0,59
15,63	proov 1	18,43	16,74	18,86	16,74	15,25	17,02
	proov 2	17,36	15,80	18,29	15,75	16,69	16,53
	proov 3	17,16	16,20	18,11	15,25	16,22	16,04
3 proovi	keskmine	17,65	16,25	18,42	15,91	16,05	16,53
	SD	0,68	0,47	0,38	0,76	0,74	0,49
	CV	3,88	2,91	2,09	4,76	4,59	2,96
7,81	proov 1	9,52	8,68	9,03	8,79	9,46	11,15
	proov 2	8,95	9,41	9,76	8,30	10,42	10,18
	proov 3	8,79	8,99	9,81	8,31	8,97	10,66
3 proovi	keskmine	9,09	9,03	9,53	8,47	9,62	10,66
	SD	0,38	0,36	0,43	0,29	0,73	0,48
	CV	4,22	4,01	4,61	3,38	7,66	4,58
3,91	proov 1	4,80	4,03	4,73	4,83	6,56	4,31
	proov 2	4,64	3,84	5,09	5,32	6,07	4,30
	proov 3	4,43	4,21	4,82	4,82	6,08	3,82
3 proovi	keskmine	4,62	4,03	4,88	4,99	6,24	4,14
	SD	0,19	0,18	0,19	0,29	0,28	0,28
	CV	4,10	4,48	3,82	5,74	4,47	6,81
uuritav	proov 1	73,89	73,47	73,74	72,01	74,54	74,67
uuritav	proov 2	73,62	73,29	74,58	73,73	74,41	75,67

Selleks, et võrrelda kui palju kolme päeva tulemused üksteisest erinevad, leiti päevade vaheline varieeruvus, mis on esitatud tabelis 12.

Tabel 12. Kolme päeva vaheline varieeruvus.

Spaigitud 6-MMP (ng/ml)	3 päeva mõõtmiste pindala keskmine	3 päeva mõõtmiste pindala SD	3 päeva mõõtmiste pindala CV	3 päeva mõõtmiste kõrguse keskmine	3 päeva mõõtmiste kõrguse SD	3 päeva mõõtmiste kõrguse CV
125	120,45	2,84	2,36	125,90	3,35	2,66
15,63	17,44	1,06	6,06	16,17	0,65	4,00
7,81	9,22	0,42	4,54	9,58	1,06	11,05
3,90	4,51	0,41	9,11	5,13	0,94	18,44
Uuritav 1	73,37	0,43	0,58	73,74	1,50	2,03
Uuritav 2	74,58	0,67	0,91	74,60	0,98	1,32

Seega on meie poolt välja töötatud HPLC meetod TPMT aktiivsuse määramiseks kordustäpsusega 1 %.

6.4 TPMT aktiivsuse määramise tulemused Eesti populatsioonis

TPMT aktiivsus Eesti populatsioonis määrati eespool kirjeldatud ja väljatöötatud HPLC põhise meetodiga. Töö teostamiseks oli olemas Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee luba ja uuringus osalesid Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskust külastavad veredoonorid.

Antud magistritöö raames määrati eelnevalt kindlaks tehtud genotüübiga 99 inimese TPMT aktiivsus. Igalt uuringus osalejalt võeti pärast informeeritud nõusoleku saamist 7 ml verd liitium-hepariinkatsutisse. Hemolüsaat valmistati ja proove inkubeeriti nagu kirjeldatud materjalide ja meetodite osas. Iga proovide mõõtmise tsükli jaoks koostati kalibreerimisgraafik, kus 6-MMP kontsentratsioon oli vahemikus 250-3,91 ng/ml ja lisaks võeti üks null proov, millele 6-MMP ei lisatud kontrollimaks, et analüüsitava aine piigi alune ja ümbrus oleksid segavatest piikidest puhtad.

Kalibreerimisgraafiku proove ei inkubeeritud. Lisaks kalibreerimisgraafiku proovidele võeti iga kord analüüsimiseks üks kvaliteedikontrolliproov, mille TPMT aktiivsus oli teada ja mida inkubeeriti ja valmistati analüüsiks ette nii nagu tundmatuid analüüsitavaid proove. Inkubeeritavaid proove võeti 2 paralleeli, millest ühele proovile lisati SAM, teisel mitte, kontrollimaks, et ei toimu mitte-ensümaatilist metüleerimist.

6-MMP sisaldused analüüsitavates proovides leiti pärast 60 minutist inkubeerimist 37 °C juures kalibreerimisgraafiku abil.

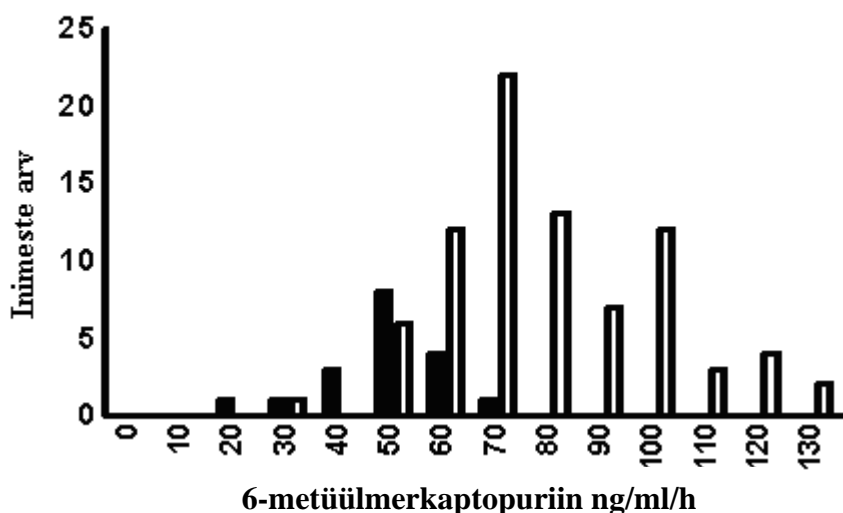
Analüüse teostati 12 erineval päeval. 6-MMP keskmine moodustumine kvaliteedikontrolliproovis oli $73,3 \pm 2,7$ ng/ml, 12 päeva vaheline varieeruvus oli 3,6 %. Uuritavatest proovidest 10 % (n=10) teostati kordusanalüüs, mis andis mõõtetäpsuse vahemikus 96 %-103 %.

TPMT aktiivsus 99 tervel vabatahtlikul veredoonoril (52 meest, 47 naist, keskmine vanus 31 ± 11 aastat, vanusevahemik 18-60 aastat) varieerus vahemikus 21,5 ng/ml/h kuni 129,6 ng/ml/h. 99 uuritavast olid 18 heterosügoodid, kes omasid TPMT aktiivsust $48,1 \pm 11,7$ ng/ml/h. Ülejäänud uuritavad inimesed (nn. "metsik" genotüüp ehk ingl. k. "*wild type*"), keda oli 81, omasid märgatavalt kõrgemat TPMT aktiivsust $79,3 \pm 20,7$ ng/ml/h ($P < 0,001$).

Neid tulemusi võib seletada lähtudes geneetilistest eripäradest. TPMT aktiivsuse individuaalsete erinevuste põhjuseks on osaliselt geneetilised faktorid. Geneetilised mutatsioonid TPMT kodeerivas geenis põhjustavad defektse ensüümi sünteesi, mis avaldub ensüümi aktiivsuse vähenemises ja suurenenud toksilisuses standarddoosides tiopuriinide suhtes.

Isikutel, kes kannavad kahte normaalset alleeli (homosügoodid normaalse alleeli suhtes), on TPMT aktiivsus reeglina normaalne. Isikutel, kes kannavad ühte mutantset ja ühte normaalset alleeli (heterosügoodid), on TPMT aktiivsus reeglina langenud. Isikutel, kes kannavad kahte mutantset alleeli (homosügoodid mutantse alleeli suhtes), TPMT aktiivsus puudub.

TPMT aktiivsus 99 tervel uuringus osalenud eestlasest vabatahtlikul on toodud joonisel 14.



Joonis 14. TPMT aktiivsus heterosügootidel [■] (kannavad ühte normaalset ja ühte mutantset alleeli TPMT geenis) ja normaalse genotüübiga [□] isikutel (kannavad kahte normaalset alleeli TPMT geenis).

6.5 TPMT aktiivsus kasutades erinevaid normaliseerimisfaktoreid

6-MMP moodustumist pärast 60 minutist inkubeerimist 37 °C juures normaliseeriti hemoglobiini, hematokriti, erütrotsüütide arvu ja valgu sisalduse kohta 99 inimese hemolüsaadis. Spearmani korrelatsiooni koefitsient kõigi paariti võrreldud erinevate normaliseerimisfaktorite vahel oli $\geq 0,97$ ($P < 0,001$) ja visuaalselt oli näha sarnast jaotusmudelit sageduse jaotuse histogrammil. Kõik sageduse jaotuse histogrammid näitasid sama jaotusmudelit nii heterosügootide kui “metsikut” tüüpi indiviidide kohta vaatamata sellele, millist normaliseerimise meetodit kasutati TPMT aktiivsuse väljendamiseks (vastavad histogrammid on toodud lisas 3).

Kui 6-MMP moodustumist ei normaliseeritud ning see väljendati kui 6-MMP moodustumine ng/ml/h, siis täheldati ka siin head korrelatsiooni võrreldes normaliseeritud väärtustega (Spearmani korrelatsiooni koefitsient $r^2 \geq 0,97$; $P < 0,001$).

Kuna me antud töös kasutasime TPMT aktiivsuse määramiseks ka ilma SAM proove kontrollimaks, et ei toimuks mitte-ensümaatilist metüleerimist, siis vaatlesime korreleeruvust SAM sisaldavate proovitulemuste ja tulemuste vahel, mis olid saadud

kui SAM sisaldava proovi tulemusest lahutasime maha ilma SAM inkubeeritud proovi tulemuse.

Ka siin täheldati tulemuste vahel head korrelatsiooni ning seepärast pole vaja analüüsi teostamiseks võtta SAM sisaldavale proovile kõrvale ilma SAM proovi.

Iga normaliseerimismeetodi jaoks tehti ROC (ing. k. *receiver operating characteristic*) kõvera analüüs, eristamaks heterosügootsete indiviidide TPMT aktiivsuse tulemusi “metsikut” tüüpi indiviidide aktiivsusest. ROC graafiline esitus tuuakse kujul tundlikkus *versus* 1-spetsiifilisus. ROC võimaldab hinnata diagnostilise testi ennustavat jõudu eristada positiivsed (ing. k. *true positives*) niinimetatud vale positiivsetest (ing. k. *false positives*) tulemustest [41].

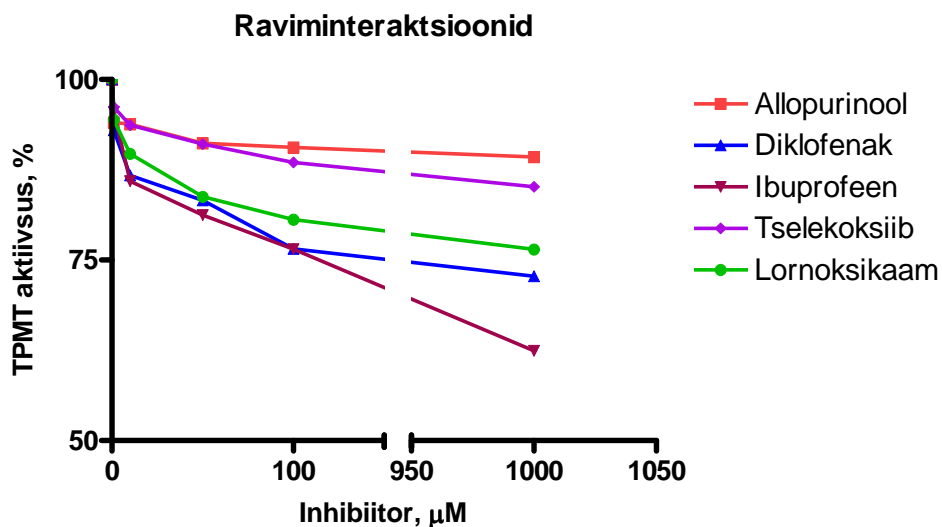
Antud töös oli eesmärgiks töötada välja analüüs, mis võimaldaks eristada heterosügootid ja “metsikut” tüüpi indiviidid TPMT aktiivsuse alusel. Kõik arvutustulemused, erinevaid normaliseerimisfaktoreid kasutades, andsid samalaadsed väärtused (ROC>0,9). Seega pole edasistes eksperimentides vaja kasutada normaliseerimist ei hemoglobiini, hematokriti, erütrotsüütide arvu ega valgu sisalduse kohta. Indiviidi TPMT aktiivsust väljendatakse 6-MMP moodustumine ng/ml/h. See võimaldab päevas teostada suurema arvu proovide analüüsimist.

6.6 Raviminteraktsioonid

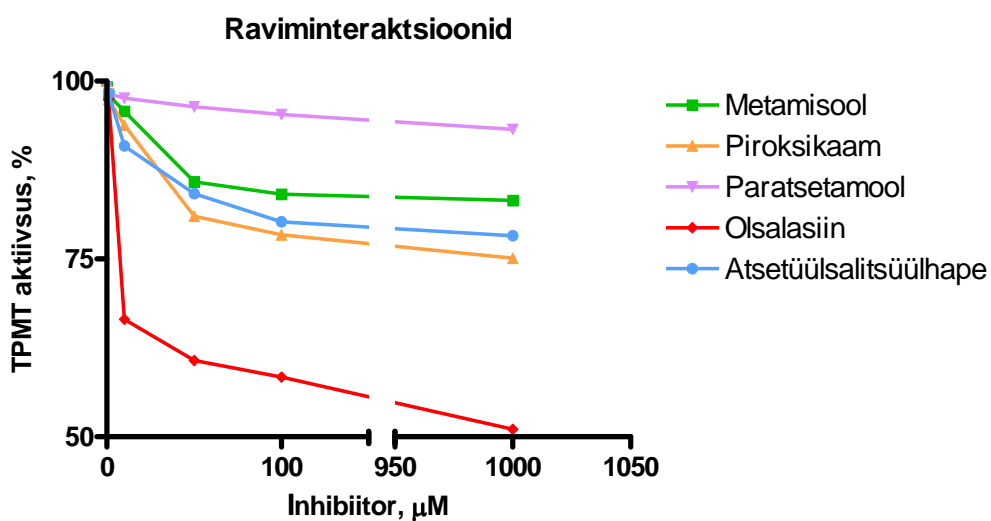
Raviminteraktsioonide uurimine oli vajalik välja selgitamiseks, millised ravimid võivad TPMT aktiivsust inhibeerida kui neid manustada koos tiopuriinidega. Antud töös võeti vaatluse alla 8 ravimit. Inhibeeriva toime välja selgitamiseks lisati proovidele, mis koosnesid 6-MP (1 mM), SAM (40 µM) ja DTT (1 mM) segust, puhvrast ja segatud hemolüsaadist (4 erineva inimese hemolüsaat) 10 µl vastavat ravimit kontsentratsioonide vahemikus 0-1000 µM.

Kõik ravimid, välja arvatud tselekoksiib ja ibuprofeen, mis lahustati DMSO-s, olid lahustatud vees. Proove inkubeeriti, töödeldi ja analüüsiti samadel tingimustel nagu TPMT aktiivsuse määramiselgi.

Tselekoksiib, lornoksikaam, paratsetamool, metamisool, diklofenak, piroksikaam, allopurinool ja atsetüülsalitsüülhape uuritud kontsentratsioonide vahemikus TPMT aktiivsust ei inhibeerinud. Raviminteraktsioonide määramist korrati. Kahe mõõtmise keskmiste põhjal koostati graafikud, mis on toodud joonistel 15 ja 16.



Joonis 15. Raviminteraktsioonid allopurinooli, diklofenaki, ibuprofeeni, lornoksikaami ja tselekoksiibiga (TPMT aktiivsus ilma inhibiitorita oli 100 %).



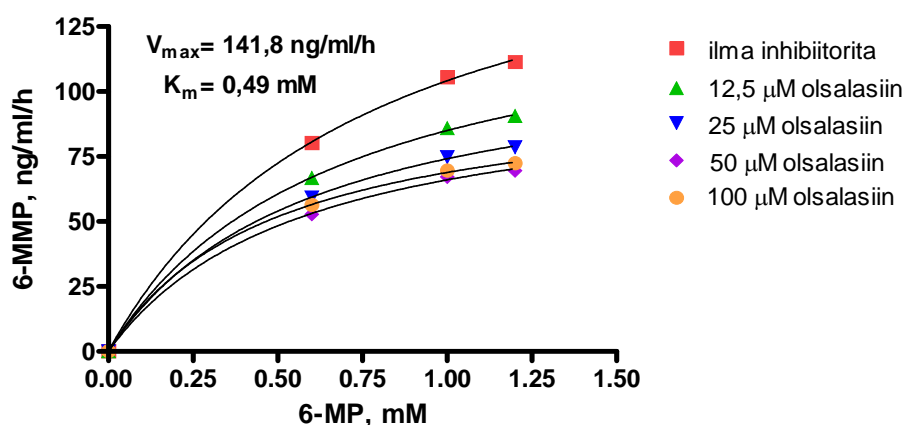
Joonis 16. Raviminteraktsioonid metamisooli, piroksikaami, paratsetamooli, olsalasiini ja atsetüülsalitsüülhappega (TPMT aktiivsus ilma inhibiitorita oli 100 %).

Toodud joonistelt on näha, et inhibeerivat mõju TPMT aktiivsusele avaldasid olsalasiin ja ibuprofeen ning seetõttu leiti nende ravimite K_i (inhibeerimiskonstant) väärtused.

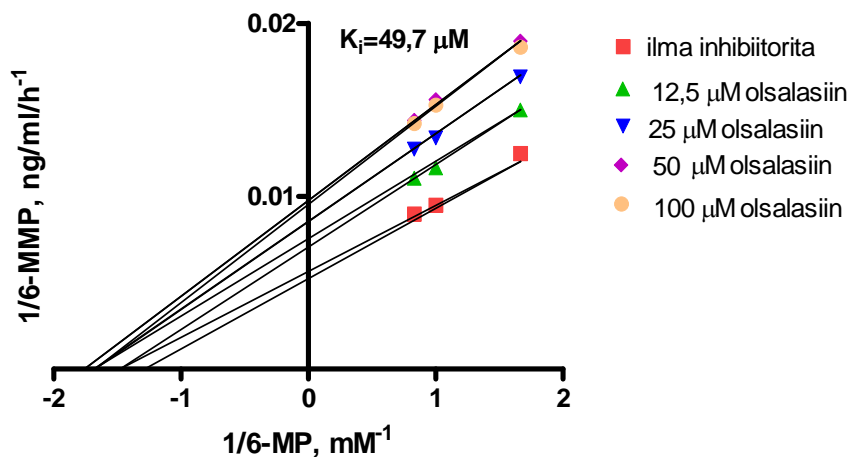
Olsalasiini korral võeti vaatluse alla kontsentratsioonid vahemikus 0-100 μM (0; 12,5; 25; 50; 100), kirjanduses [42] toodud andmete põhjal on olsalasiini seerumi kontsentratsioon standardannuste puhul umbes 35 μM . Ibuprofeeni puhul oli kontsentratsioonide vahemik 0-1000 μM (0; 125; 250; 500; 1000), kirjanduse [42] põhjal on ibuprofeeni seerumi kontsentratsioon standardannuste puhul umbes 300 μM . Lisaks varieeriti mõlema ravimi korral substraadi 6-MP kontsentratsiooni vahemikus 0-1,2 mM (0; 0,6; 1; 1,2). Proovide koostis, analüüsiks ettevalmistamine ja analüüsimine toimus samadel tingimustel nagu eespool kirjeldatud. Mõlema ravimiga korral analüüsi kolm korda.

Tulemuste põhjal koostati vastavad graafikud ning leiti inhibeerimiskonstandid. Graafikute joonestamiseks ja konstantide leidmiseks kasutati *GraphPad Prism 4,0* programmi. K_m ja V_{max} leiti peatükis 6.2 toodud valemi järgi. K_i arvutati järgmist võrrandit kasutades: $K_{mapp} = K_m * (1 + I/K_i)$; $Y = V_{max} * X / (K_{mapp} + X)$, kus X tähistab substraadi 6-MP kontsentratsiooni ja Y analüüsi käigus leitud 6-MMP sisaldust. Parameeter I tähistab inhibiitori kontsentratsiooni, K_{mapp} on näiline konstant ja K_m Michaelise konstant ning V_{max} iseloomustab maksimaalkiirust. Mõlema ravimi kohta leiti 3 mõõtmise tulemuste keskmised K_m , K_i ja V_{max} .

Olsalasiini korral olid kolme tulemuse keskmised järgmised: $K_m = 0,49 \pm 0,07$ mM (CV = 13,1 %); $V_{max} = 141,8 \pm 8,1$ ng/ml/h (CV = 5,7 %); $K_i = 49,7 \pm 3,6$ μM (CV = 7,0 %).



Joonis 17. Olsalasiini inhibeeriv toime TPMT aktiivsusele (3 tulemuse keskmiste põhjal koostatud graafik).



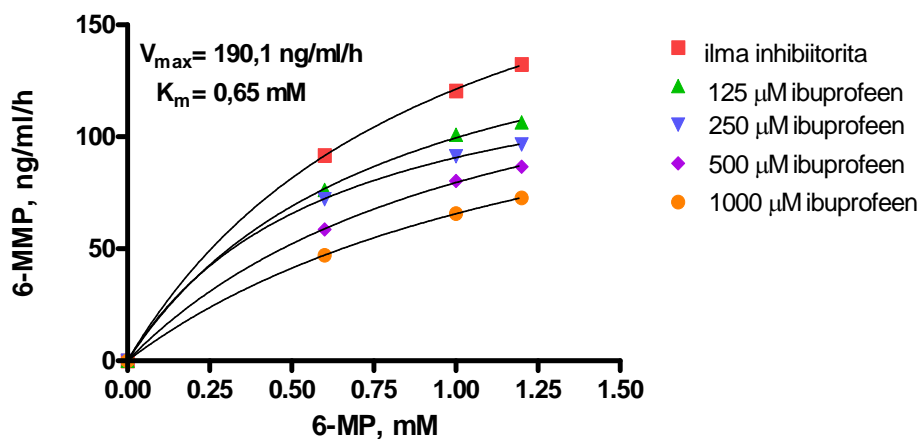
Joonis 18. Lineweaver-Burki graafik.

Olsalasiini korral on tegemist ebakonkureeriva inhibeerimisega, kuna V_{\max} ja K_m suhe ei muutunud.

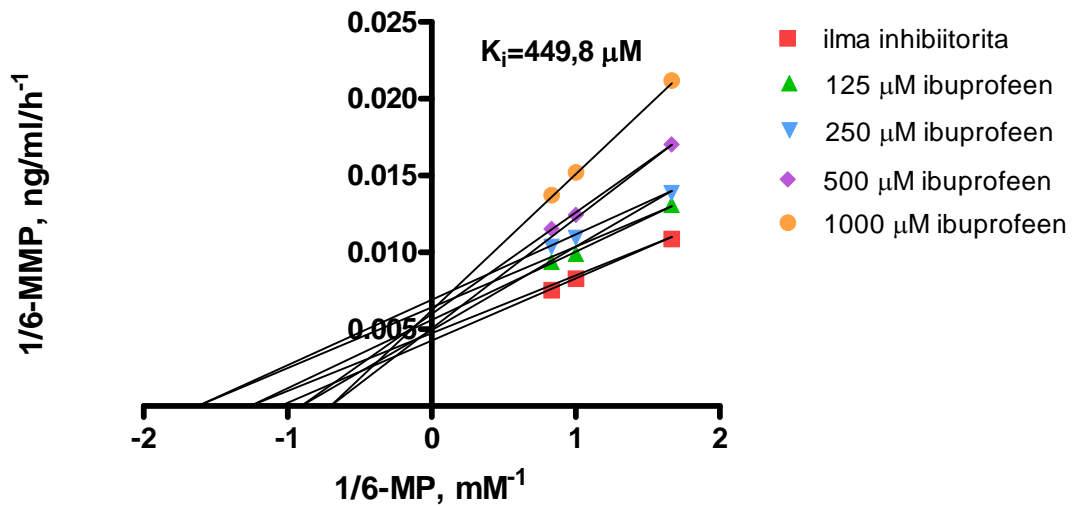
Ibuprofeeni korral olid kolme tulemuse keskmised väärtused järgmised:

$K_m = 0,65 \pm 0,04$ mM (CV=5,9 %); $V_{\max} = 190,1 \pm 13,4$ ng/ml/h (CV=7,3 %);

$K_i = 499,8 \pm 3,2$ μM (CV=0,84%).



Joonis 19. Ibuprofeeni inhibeeriv toime TPMT aktiivsusele (3 tulemuse keskmiste põhjal koostatud graafik).



Joonis 20. Lineweaver-Burki graafik.

Ibuprofeeni korral on tegemist segatüüpi inhibeerimisega. Madalamatel ibuprofeeni kontsentratsioonidel (125 ja 250 μM) leiab aset ebakonkureeriv inhibeerimine ja kõrgematel kontsentratsioonidel (500 ja 1000 μM) konkureeriv inhibeerimine. Madalamatel kontsentratsioonidel V_{\max} ja K_m suhe ei muutnud, kõrgematel kontsentratsioonidel aga muutus.

Hinnangud, mis nende kahe ravimi inhibeerimistüübi kohta toodi on oletuslikud ja vajavad täiendavaid uuringuid. Samas ei olnud inhibeerimistüübi määramine ka omaette eesmärgiks.

7 JÄRELDUSED

1) HPLC meetod:

- a) Erinevaid proovide töötlemise ja kromatografeerimise tingimusi võrreldes leidsime, et meie laboris välja töötatud meetod proovide töötlemiseks ACN võimaldas suurendada meetodi tundlikkust ja teostada analüüse kirjanduses toodud meetoditest madalamatel kontsentratsioonidel (meie töös oli madalaim kvantifitseerimispiir 3,91 ng/ml ja kirjanduses 5 ng/ml [26]).
- b) 6-MMP saagis üle kalibreerimisgraafiku oli $83,4\% \pm 3,4\%$, (CV = 4,1%) ning õhuvooluga orgaanilise kihi kuivaks puhumine ei põhjustanud proovi oksüdeerumist.
- c) 6-MMP põhilahus oli stabiilne 12 kuud $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures (CV=7,5%, n=12). Proovid püsisid nii 24 h toatemperatuuril (6-MMP piigi pindala oli muutunud 8%, n=2) kui ka $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures seismisel (5 % muutus piigi pindalas, n=2) stabiilsetena.
- d) 6-MP lahustamiseks ei sobinud DMSO, sest see põhjustas mitte-ensümaatilist metaboliidi tekkimist.

2) Normaliseerimise vajalikkus:

Erinevate normaliseerimisfaktorite võrdlemisel saadi sarnased tulemused, seetõttu piisas referentsväärtuste leidmiseks Eesti populatsiooni jaoks meetodist, milles 6-MMP moodustumist väljendati ng/ml/h.

3) TPMT aktiivsus Eesti populatsioonis:

TPMT aktiivsus 99 tervel vabatahtlikul veredoonoril (52 meest, 47 naist, keskmise vanusega 31 ± 11 aastat, vanusevahemik 18-60 aastat) varieerus vahemikus 21,5 ng/ml/h kuni 129,6 ng/ml/h, keskmine väärtus populatsiooni tasandil oli 70,5 ng/ml/h.

4) TPMT inhibiitorid ja raviminteraktsioonid:

Antud töös uuritud ravimitest avaldasid TPMT aktiivsusele uuritud kontsentratsioonides inhibeerivat toimet olsalasiin ja ibuprofeen, teiste ravimite puhul inhibeerivat toimet ei täheldatud.

8 KOKKUVÕTE

TPMT aktiivsuse määramine omab suurt tähtsust patsientidel, keda ravitakse tiopuriini analoogidega, sest see võimaldab ravi individualiseerida ja ära hoida ohtlike kõrvaltoimete teket. Kuna Eestis ühtegi meetodit TPMT aktiivsuse määramiseks polnud, oli käesoleva töö eesmärgiks välja töötada HPLC-UV põhine meetod TPMT aktiivsuse määramiseks ning leida Eesti populatsiooni jaoks referentsväärtused.

TPMT aktiivsus määrati inimese erütrotsüütides ja substraadina kasutati 6-MP. Meetodi väljatöötamisel võrreldi erinevaid proovide ettevalmistamise meetodeid ja kromatografeerimise tingimusi ning leiti, et meie laboris välja töötatud töötlemine ACN osutus proovide analüüsiks ettevalmistamise seisukohalt kõige paremaks, võimaldades analüüse teostada väga madalate määramispiiride juures.

TPMT aktiivsus määrati 99 eelnevalt kindlaks tehtud genotüübiga tervel eestlasel ja 6-MMP moodustumine normaliseeriti hemoglobiini, hematokriti, erütrotsüütide arvu ja valgu sisalduse kohta hemolüsaadis. Analüüsi tulemustest selgus, et referentsväärtuste leidmiseks Eesti populatsiooni jaoks piisas kui 6-MMP moodustumist väljendati ng/ml/h.

Tervete eestlaste TPMT aktiivsus varieerus vahemikus 21,5 kuni 129,6 ng/ml/h. Heterosügootsetel isikutel (n=18) oli TPMT aktiivsus $48,1 \pm 11,7$ ng/ml/h. Ülejäänud uuritavad (nn. "metsik" genotüüp ehk ing. k. "*wild type*"), keda oli 81, omasid märgatavalt kõrgemat TPMT aktiivsust $79,3 \pm 20,7$ ng/ml/h ($P < 0,001$).

Antud töös uurisime, kas mitte-steroidsed põletikuvastsed ravimid võiksid TPMT aktiivsust inhibeerida. Meie poolt uuritud ravimitest avaldasid TPMT aktiivsusele inhibeerivat toimet olsalasiin ja ibuprofeen.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et väljatöötatud HPLC põhine meetod võimaldab kvantitatiivselt määrata TPMT aktiivsust ja seda meetodit on võimalik rakendada igapäevaselt kliinises praktikas patsientide ravimisel tiopuriini analoogidega.

9 SUMMARY

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT, EC 2.1.1.67) is the key enzyme in the metabolism of thiopurine drugs. Thiopurines, such as mercaptopurine, azathioprine, and thioguanine are used following organ transplantation, in autoimmune and malignant diseases. Previous studies have shown that intracellular formation of thioguanine nucleotides has a major role in the efficacy and toxicity of thiopurines. Several studies have shown negative correlation between erythrocyte thioguanine nucleotide level and TPMT activity. Individuals with decreased TPMT activity have higher risk for side effects when treated with standard doses of thiopurines. Determination of TPMT activity has been used for the individualization of thiopurine dose.

TPMT activity measuring methods include a radiochemical assay and HPLC-based methods. In the present study we have developed and validated a HPLC method with UV detection for the determination of TPMT activity in human erythrocytes using 6-MP as a substrate. In HPLC assays, the product of the enzymatic reaction is extracted by a liquid-liquid or liquid-solid extraction. We compared different procedures for sample preparation published previously for TPMT assays and found that in-house developed extraction with acetonitrile provided perceptibly lower limit of quantification compared with other studies.

TPMT activity was determined in 99 previously genotyped healthy Estonians. TPMT activity was expressed as the formation of 6-methylmercaptopurine ng/ml/h and normalized either to haemoglobin, haematocrit, erythrocyte count or protein content. The ROC curve analysis revealed similar accuracy values for TPMT activity in predicting heterozygous and wild type individuals for each method of calculation.

In healthy Estonians TPMT activity varied from 21,5 to 129,6 ng/ml/h with a median for the total population of 70,5 ng/ml/h. For heterozygous individuals (n=18) TPMT activity was $48,1 \pm 11,7$ ng/ml/h. Wild type individuals (n=81) revealed significantly higher TPMT activity $79,3 \pm 20,7$ ng/ml/h ($P < 0,001$).

We also investigated several non-steroidal anti-inflammatory drugs to find if they inhibit TPMT activity in addition to aminosalicylate derivatives and may therefore cause drug interactions with thiopurines. Our experiments revealed that ibuprofen is a potential inhibitor of TPMT.

In conclusion, this sensitive HPLC assay for quantitative determination of TPMT activity could easily be used in clinical settings.

10 KASUTATUD KIRJANDUS

1. Pharmaca Estica 2004, OÜ Pharmaca Estica, Tartu, **2004**.
2. Aarbakke, J., Janka-Schaub, G., Elion, G. B. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **1997**, 18, 3-7.
3. Anglicheau, D., Sanquer, S., Lorient, M. A., Beaune, P., Thervet, E. Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J. Chromatogr. B.*, **2002**, 773, 119-127.
4. Chabner, B. A., Ryan, D. P., Paz-Ares, L., Garcia-Carbonero, R., Calabresi, P. Antineoplastic agents. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Edited by Hardman J.G. and Limbird L.E.), McGraw-Hill Companies, Inc. **2001**, 1411-1416.
5. Lennard, L., Rees, C. A., Lilleyman, J. S., Maddocks, J. L. Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1983**, 16 (4), 359-63.
6. Weinshilboum, R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug. Metab. Dispos.*, **2001**, 4, 601-605.
7. Seidman, E. G. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. *Rev. Gastroenterol. Disord.*, **2003**, 3, 30-38.
8. Lennard, L., Van Loon, J. A., Weinshilboum, R. M. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin. Pharm. Therap.*, **1989**, 46149-46154.
9. Corominas, H., Domenech, M., Laiz, A., Gich, I., Geli, C., Diaz, C., de Cuevillas, F., Moreno, M., Vazquez, G., Baiget, M. Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology*, **2003**, 42, 40-45.
10. Szumlanski, C. L., Honchel, R., Scott, M. C., Weinshilboum, R. M. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics*, **1992**, 2, 148-159.

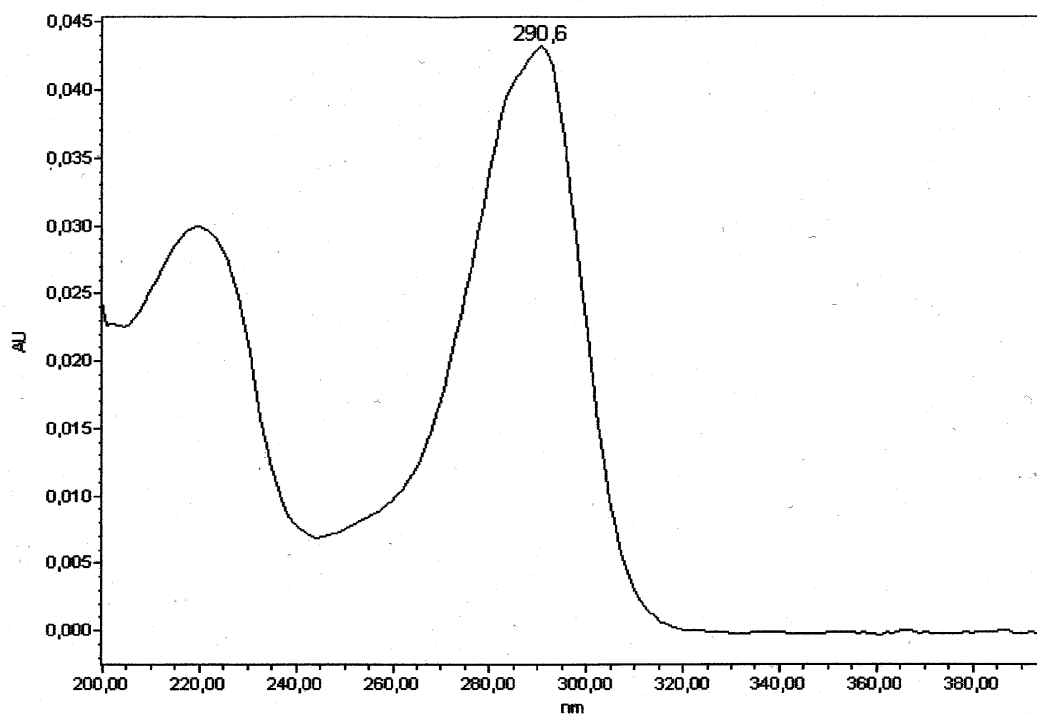
11. Lennard, L., Lilleyman, J. S., Van Loon, J., Weinshilboum, R. M. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **1990**, 336, 225-229.
12. Weinshilboum, R. M., Sladek, S. L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet.*, **1980**, 32, 651-662.
13. Schwab, M., Schaffeler, E., Marx, C., Fischer, C., Lang, T., Behrens, C., Gregor, M., Eichelbaum, M., Zanger, U. M., Kaskas, B. A. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*, **2002**, 12, 429-436.
14. Haglund, S., Lindqvist, M., Almer, S., Peterson, C., Taipalensuu, J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Chem.*, **2004**, 50, 288-295.
15. Weinshilboum, R. M., Raymond, F. A., Pazmino, P. A. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin. Chem. Acta.*, **1978**, 85, 323-333.
16. Lennard, L., Singleton, H. J. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J. Chromatogr. B.*, **1994**, 661, 25-33.
17. Jacqz-Aigrain, E., Bessa, E., Medard, Y., Mircheva, Y., Vilmer, E. Thiopurine methyltransferase activity in a French population: HPLC assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 38, 1-8.
18. Kröplin, T., Weyer, N., Gutsche, S., Iven, H. Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1998**, 54, 265-271.
19. Ganiere-Monteil, C., Pineau, A., Kergueris, M. F., Azoulay, C., Bourin, M. Thiopurine methyl transferase activity: new extraction conditions for high-performance liquid chromatographic assay. *J. Chromatogr. B.*, **1999**, 727, 235-239.
20. Mawatari, H., Kato, Y., Nishimuda, S., Sakura, N., Ueda, K. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay method for quantitating 6-mercaptopurine and its methylated and non-methylated metabolites in a single sample. *J. Chromatogr. B.*, **1998**, 716, 392-396.

21. Kröplin, T., Iven, H. Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine by thiopurine S-methyltransferase. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2000**, 56, 343-345.
22. Ford, L. T., Berg, J. D. Determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes using 6-thioguanine as substrate and a non-extraction liquid chromatographic technique. *J. Chromatogr. B.*, **2003**, 798, 111-115.
23. Khalil, M. N., Erb, N., Khalil, P. N., Escherich, G., Janka-Schaub, G. E. Interference free and simplified liquid chromatography-based determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes. *J. Chromatogr. B.*, **2005**, 821, 105-111.
24. Micheli, V., Jacomelli, G., Fioravanti, A., Morozzi, G., Marcolongo, R., Pompucci, G. Thiopurine methyltransferase activity in the erythrocytes of adults and children: an HPLC-linked assay. *Clin. Chim. Acta.*, **1997**, 259, 161-168.
25. Bouliou, R., Sauviat, M., Dervieux, T., Bertocchi, M., Mornex, J. F. Phenotype Determination of Thiopurine Methyltransferase in Erythrocytes by HPLC. *Clin. Chem.*, **2001**, 47, 956-958.
26. Medard, Y., Nafa, S., Jacqz-Aigrain, E. Thiopurine methyltransferase activity: new high-performance liquid chromatographic assay conditions. *J. Chromatogr. B.*, **1997**, 700, 275-277.
27. Su, Y., Hon, Y. Y., Chu, Y., Van de Poll, M. E. C., Relling, M. V. Assay of 6-mercaptopurine and its metabolites in patient plasma by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. B.*, **1999**, 732, 459-468.
28. Dervieux, T., Chu, Y., Su, Y., Pui, C. H., Evans, W. E., Relling, M. V. HPLC Determination of Thiopurine Nucleosides and Nucleotides in Vivo in Lymphoblasts following Mercaptopurine Therapy. *Clin. Chem.*, **2002**, 48, 61-68.
29. Nishida, A., Kubota, T., Yamada, Y., Higashi, K., Kitamura, K., Nakahara, K., Iga, T. Thiopurine S-methyltransferase activity in Japanese subjects: metabolic activity of 6-mercaptopurine 6-methylation in different TPMT genotypes. *Clin. Chim. Acta.*, **2002**, 323, 147-150.
30. Dervieux, T., Medard, Y., Baudouin, V., Maisin, A., Zhang, D., Broly, F., Loirat, C., Jacqz-Aigrain, E. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 48, 793-800.

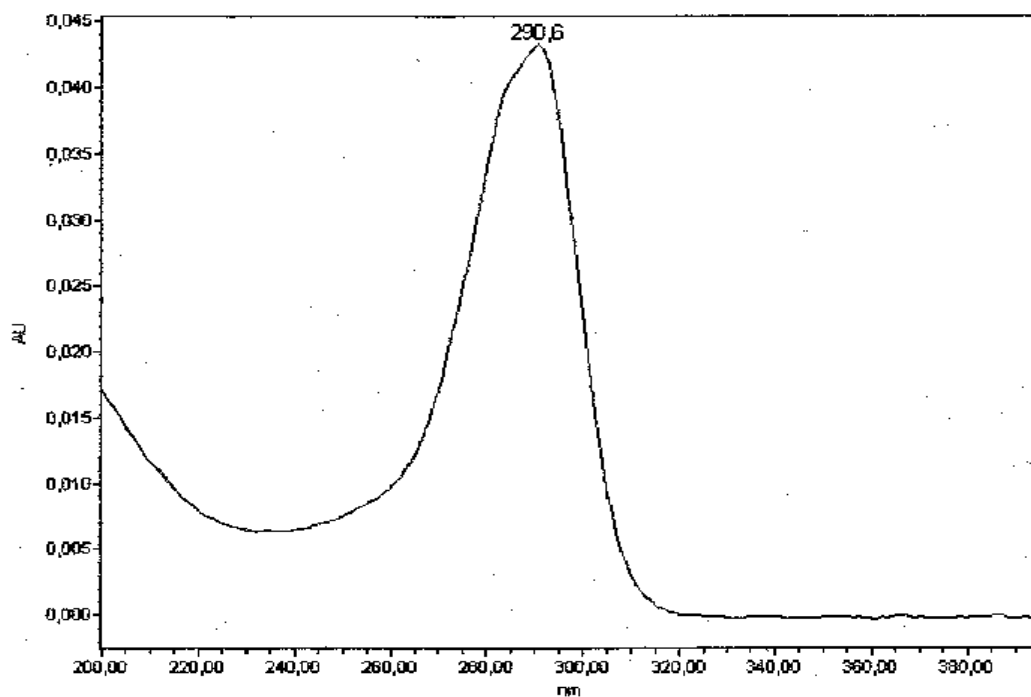
31. Woodson, L. C., Ames, M. M., Selassie, C. D., Hansch, C., Weinshilboum, R. M. Thiopurine Methyltransferase. Aromatic Thiol Substrates and Inhibition by Benzoic Acid Derivatives. *Molecular Pharmacology*, **1983**, 24, 471-478.
32. Lewis, L. D., Benin, A., Szumlanski, C. L., Otterness, D. M., Lennard, L., Weinshilboum, R. M., Nierenberg, D. W. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: A possible drug-drug interaction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **1997**, 62, 464-475.
33. *European Pharmacopoeia*, 5th ed., Council of Europe, **2004**.
34. *The Merck Index*, 12th ed., Merck & Co Inc., **1996**.
35. <http://www.sigma-aldrich.com>
36. *Therapeutic Drugs Second Edition* (Edited by Colin Dollery), UK, **1999**, A 254-257, M 52-55.
37. Kröplin, T., Fischer, C., Iven, H. Inhibition of thiopurine S-methyltransferase activity by impurities in commercially available substrates: a factor for differing results of TPMT measurements. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 55, 285-291.
38. Meyer, V. R., *Practical high-performance liquid chromatography*, Second Edition, Wiley & Sons, **1996**.
39. Stefan, C., Walsh, W., Banka, T., Adeli, K., Verjee, Z. Improved HPLC methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy. *Clin. Biochem.*, **2004**, 37, 764-771.
40. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, May, **2001**.
41. http://en.wikipedia.org/wiki/Receiver_operating_characteristic
42. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Gilman, A. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill Companies, Inc. **2001**.

11 LISAD

Lisa 1. 6-MMP UV-VIS spektrid.

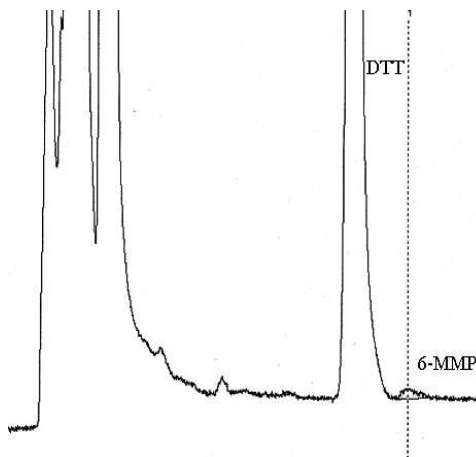


6-MMP spekter proovis. Maksimaalne neelduvus lainepikkusel 290,6 nm.

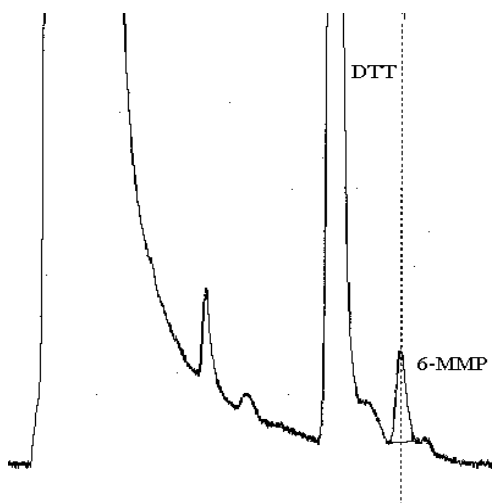


6-MMP spekter vesilahuses. Maksimaalne neelduvus lainepikkusel 290,6 nm.

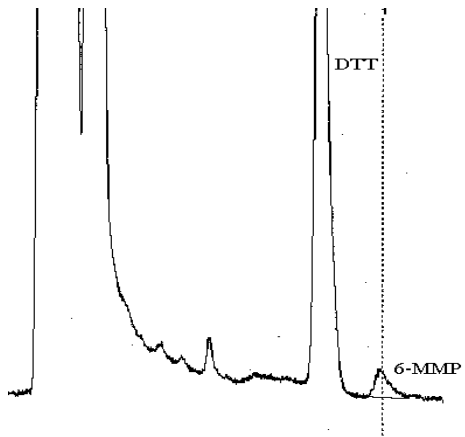
Lisa 2. Erinevate proovi töötlemismeetodite kromatogrammid. (A): töötlemine kloroform/2-propanool (90/10, v/v) seguga; (B): töötlemine kloroform/2-propanool (80/20, v/v) seguga; (C): töötlemine 70 %-lise perkloorhappega; (D): töötlemine ACN; (E): töötlemine metanooliga; (F): proovi kuumtöötlemine; (G): töötlemine etanooliga.



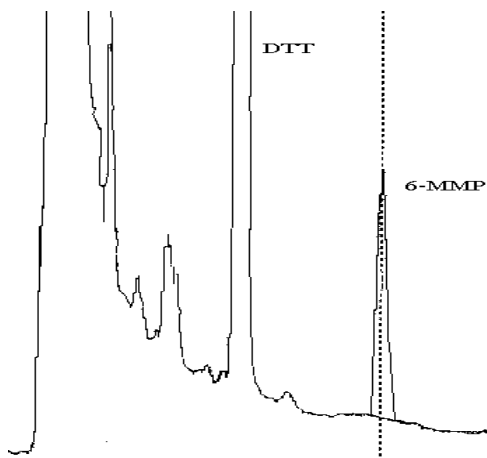
(A)



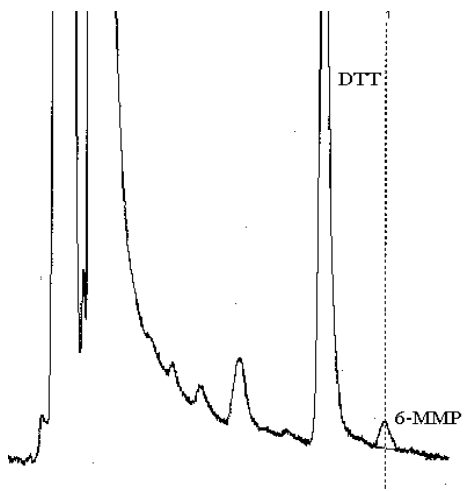
(B)



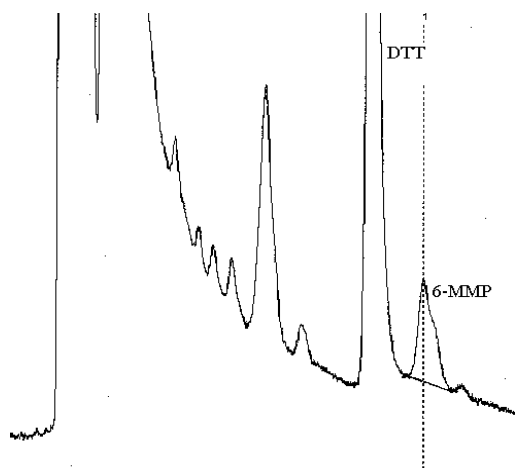
(C)



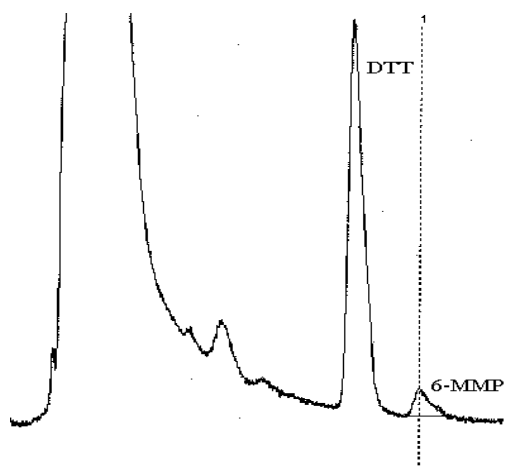
(D)



(E)

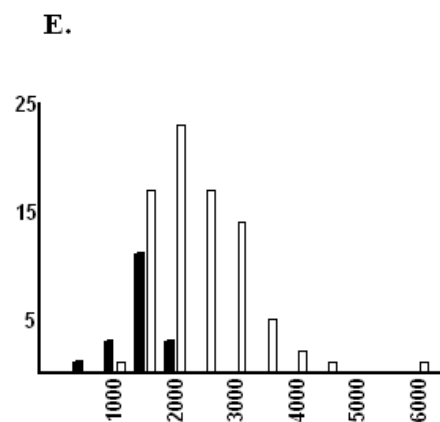
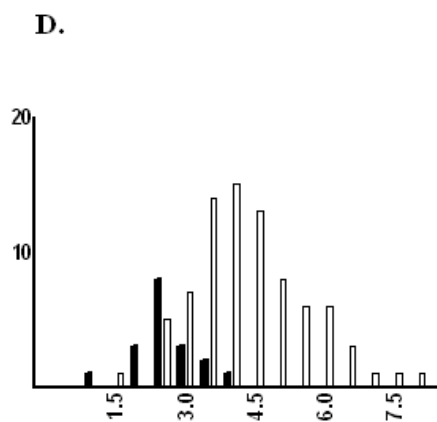
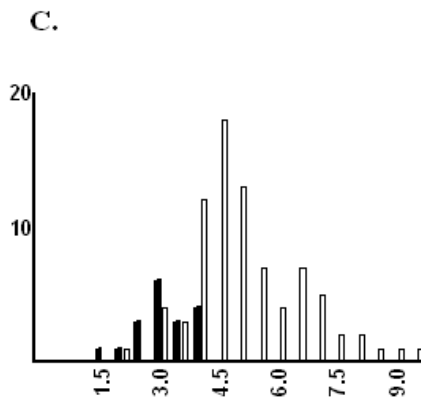
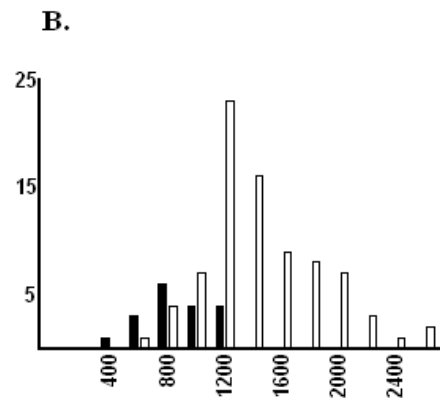
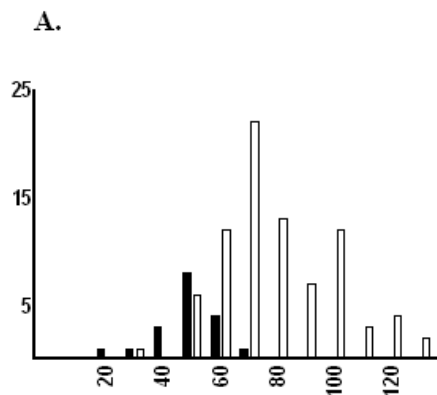


(F)

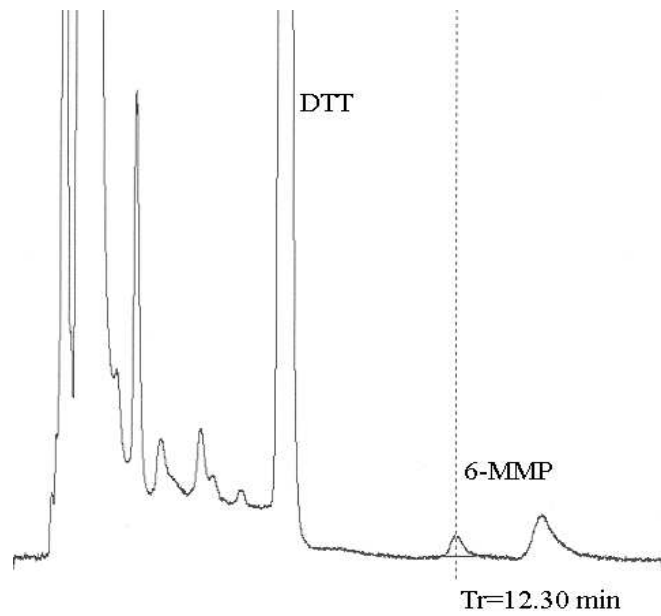


(G)

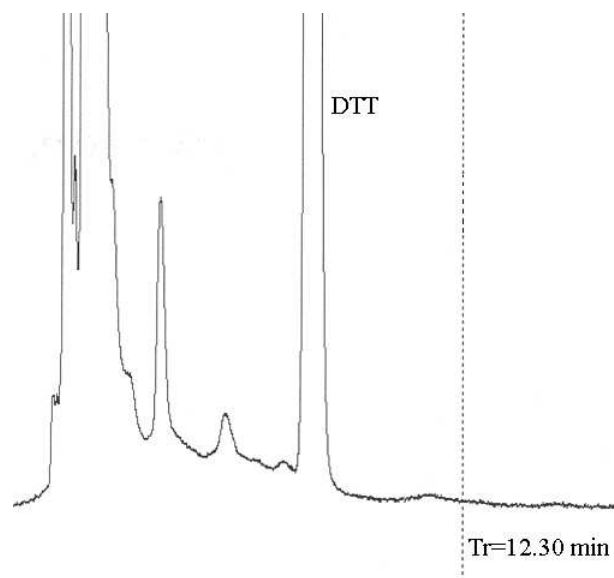
Lisa 3. TPMT aktiivsus heterosügootidel [■] ja normaalse genotüübiga [□] isikutel. Y-telg tähistab uuritavate arvu, X-telg TPMT aktiivsust, mis on väljendatud järgmiselt: (A): 6-MMP moodustumine ng/ml/h ja normaliseeritud (B): g Hb kohta; (C): ml hematokriti kohta; (D): 10^8 Er kohta; (E): g valgu kohta.



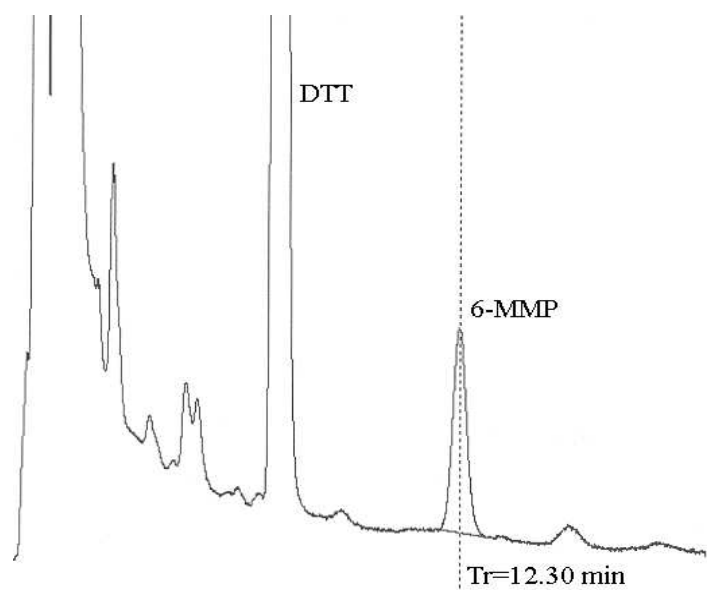
Lisa 4. 6-MMP kromatograafiline lahutamine. (A): madalaim kvantifitseerimispiir (madalaim kontsentratsiooni väärtus kalibreerimisgraafikul 3,91 ng/ml); (B): nullproov (ei sisalda 6-MMP); (C): proov, TPMT aktiivsus oli 90,3 ng/ml/h.



(A)



(B)



(C)