

### Predstavitev avtorja

Krištof Fortuna je že v osnovnošolskih klopetih spoznal, kako zelo ga privlačijo naravoslovne znanosti, med njimi predvsem kemija. Šolanje je nadaljeval na Škofijski klasični gimnaziji v Šentvidu, tretji in četrti letnik pa je končal na Mednarodni šoli Gimnazije Bežigrad, kjer je opravil mednarodno maturo. V okviru slednje je nastalo tudi pričujoče raziskovalno delo s področja farmacije – vede, ki Krištofu z vidika raziskovanja in izboljševanja življenja pomeni velik izziv za prihodnost. Trenutno je študent drugega letnika Medicinske fakultete v Ljubljani, zelo pa ga zanima kirurgija. V prostem času se ukvarja s tenisom in plezanjem, igra pa tudi klavir in orgle.

*Analizna kemija in medicina • Akutna promielocitna levkemija in arzenov trioksid*

## Akutna promielocitna levkemija in arzenov trioksid

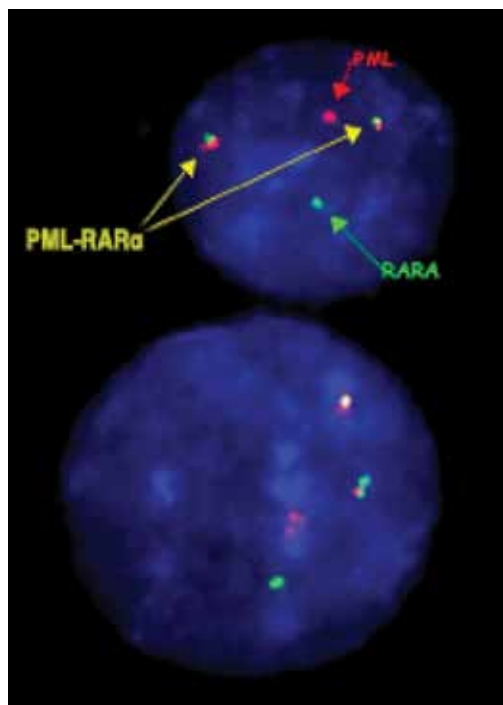
*Luka Petravič, Jon Škerlj in Špela Turk*

V okviru srednješolske raziskovalne naloge smo se trije dijaki z Gimnazije Novo mesto vključili v raziskovalno delo na področju zdravljenja akutne promielocitne levkemije z arzenovim trioksidom (ATO), ki poteka v sodelovanju Instituta Jožef Stefan in Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Pridobili smo veliko znanja o medicini in analizni kemiji. Akutna promielocitna levkemija je rakava bolezen krvotvornega tkiva, kjer pride do razraščanja nezrelih belih krvnih celic – promielocitov. Iz znanstvene literature je znano, da je arzenov trioksid učinkovito zdravilo v boju proti akutni promielocitni levkemiji in da se v telesu pretvori ter izloči z urinom v obliki arzenita (As(III)), arzenata (As(V)), monometil ar-

zenove kisline (MMA) in dimetil arzenove kisline (DMA) (Šlejkovec in sod., 2016). V naši raziskovalni nalogi smo zato želeli potrditi prisotnost teh metabolitov v urinu pacientke, zdravljene z arzenom, in njihove koncentracije glede na čas odvzema vzorca, torej pred infuzijo zdravila in po njej. Ker so lahko povišane koncentracije arzena prisotne tudi v hrani, smo pri kontrolnih vzorcih prostovoljcev določili koncentracije celokupnega arzena in arzenobetaina.

### Akutna promielocitna levkemija

Akutna promielocitna levkemija je maligna rakava bolezen krvotvornega tkiva, kjer pride do razraščanja nezrelih belih krvnih celic – promielocitov. Njihova prekomerna razrast



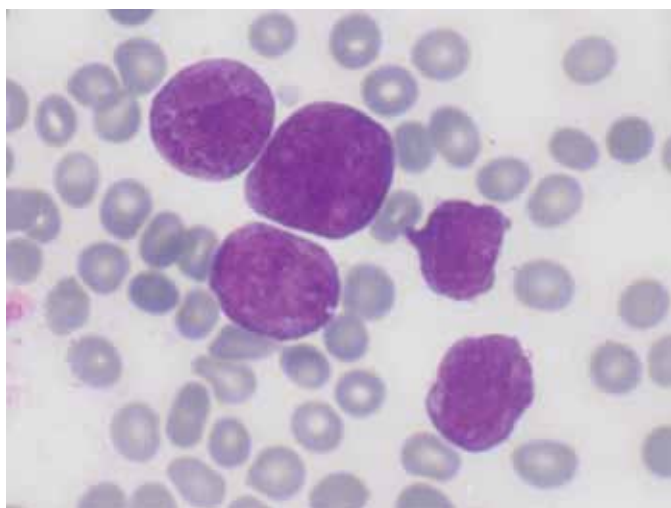
*Slika 1: FISH: slika interfaznih jeder z označenimi fuziranimi signali (rumeni), ki potrjujejo prisotnost fuzijskega gena in translokacije t(15;17). Fotografija: Helena Podgornik, Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana.*

povzroči primanjkljaj normalnih krvničk. Akutno promielocitno levkemijo označuje specifična kromosomska translokacija t(15;17), katere posledica je nastanek fuzijskega gena PML-RAR $\alpha$  (slika 1).

### Zdravljenje akutne promielocitne levkemije

Ker gre za akutni tip levkemije, akutna promielocitna levkemija zahteva takojšnjo potrditev diagnoze ter hitro in specifično zdravljenje. V zadnjih nekaj desetletjih se je akutna promielocitna levkemija spremenila iz ene najbolj malignih levkemij v eno najbolj ozdravljivih. Ugotovili so, da so levkemične celice pri akutni promielocitni levkemiji zaradi prej omenjene specifične genske spremembe občutljive za tako imenovana diferenciacijska zdravila. Ta signalizirajo levkemičnim promielocitom, naj dozori v zrele celice mieloidne vrste, in se navadno uporabljajo v kombinaciji s klasičnimi kemoterapevtskimi učinkovinami. Obstajata dve zdravili s takim učinkom, in sicer ATRA (All Trans Retinoic Acid - Tretinoin® ali Vesanoid®) in ATO (arzenov trioksid - Trisenox®).

*Slika 2: Venska kri bolnika z akutno promielocitno levkemijo z levkemičnimi promielociti. Fotografija: Helena Podgornik, Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana.*



## Arzenov trioksid

Arzen je eno od najstarejših poznanih zdravil, tako v zahodni medicini kot tudi v tradicionalni kitajski medicini. Arzenov trioksid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) je strupena arzenova spojina, ki je v vodnih raztopinah prisotna v obliki  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ ,  $\text{HAsO}_3^{2-}$  in/ali  $\text{AsO}_3^{3-}$ . S skupnim imenom jih poimenujemo arzenit. V levkemičnih celicah lahko razgradi nastali fuzijski protein PML - RAR $\alpha$ . Najpogosteje se uporablja pri zdravljenju bolnikov, ki doživijo ponovitev bolezni, lahko pa tudi v kombinaciji z zdravilom ATRA že ob začetku zdravljenja. Zdravljenje z zdravilom ATO je dolgotrajno, prejeti odmerki arzena pa zelo visoki.

ATO je bil pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo prvič uporabljen v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja na Kitajskem in v zgodnjih devetdesetih na zahodu. Vodil je k doseganju velikega deleža popolnega izboljšanja bolezni (complete remission, CR) in razmeroma dolgega trajanja izboljšanja, ko je bil uporabljen kot samostojni agent. Kombinacija zdravil ATRA in ATO pa je pokazala izjemni sinergizem ter omogočila ciljno zdravljenje brez dodane kemoterapije. Sledilo je še mnogo študij po svetu, ki so spodbujale uporabo zdravila ATO kot prvovrstno zdravljenje zaradi njegove učinkovitosti ter razmeroma blage toksičnosti.

S sodobnim zdravljenjem je ponovitev akutne promielocitne levkemije redke pojav, saj devetdeset odstotkov pacientov doseže popolno ozdravljenje po začetnem zdravljenju, osemdeset odstotkov pa jih je popolnoma ozdravljenih po zaključenem zdravljenju. Večino pacientov, ki ne dosežejo popolnega ozdravljenja, predstavljajo tisti, pri katerih zdravilo ATRA povzroči hude stranske učinke ali pa so neodzivni na zdravljenje. Najuspešnejša učinkovina za zdravljenje teh pacientov je zdravilo ATO, zato je leta 2000 ameriška administracija za hrano in zdravila (United States Food and Drug Administration, US FDA) odobrila zdravilo ATO za zdravljenje bolnikov z akutno promielocitno

levkemijo v primerih ponovitve bolezni ali pri neodzivnosti na standardno zdravljenje.

Citotoksičnost arzenovih spojin je odvisna od oksidacijskega stanja in kemijske sestave. Spojine, ki vsebujejo trivalentni arzen (arzenit), so bolj strupene od petvalentnih spojin. Arzenit neposredno deluje tako, da napade -SH in -SeH skupine aminokislin. Za levkemične promielocite so isti odmerki arzenita bolj strupeni kot za zdrave celice. Eden izmed vzrokov je, da imajo levkemične celice precej slabše antioksidativne sposobnosti zaradi nizke vsebnosti antioksidativnih encimov (glutation peroksidaza, katalaza) in molekul, kot je reducirani glutation (GSH). Prav tako vsebujejo nižje količine GSH-S-transferaze, to je encim, ki je odgovoren za odstranjevanje arzena iz celic. Arzen v živih organizmih reagira tudi z metalotioneini, ki imajo prav tako antioksidativno vlogo. To so s cisteinom bogati nizkomolekularni proteini, ki preko cisteinskih -SH skupin lahko vežejo (in sproščajo) kovine ter različne radikale. Njihove naloge v telesu so vzdrževanje homeostaze cinka in bakra, ohranjanje celičnega oksido-reduktivnega ravnotežja ter detoksifikacija kovin.

## Metabolizem arzena

Ker je anorganski arzen strupena snov, se telo na povišane količine odzove z indukcijo zaščitnih spojin, kot so glutation in metalotioneini, in hkrati s posebnim mehanizmom metilacije arzena. Gre za niz ponavljajočih se reduktivnih in oksidativnih procesov z vezavo  $\text{CH}_3^+$  skupin. Tako se anorganski arzen pretvori v oblike, ki se iz telesa predvsem z urinom hitreje izločajo (Aposhian, Aposhian, 2006). Proces metilacije poteka tako med zastrupitvami kot tudi med zdravljenjem z zdravilom ATO ter ob izpostavljenosti nizkim koncentracijam arzena preko hrane ali vode, v kateri se anorganski arzen lahko nahaja v tri- in petvalentni obliki (arzenit, As(III), in arzenat, As(V)). Tako arzenit kot tudi arzenat se v

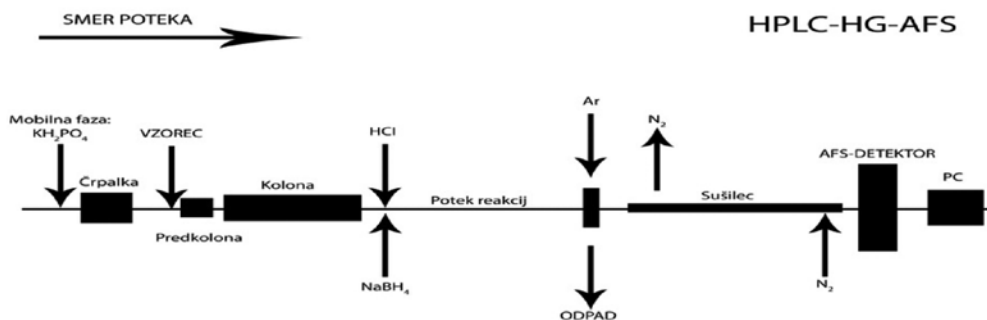
človeškem telesu metilirata do mono- in dimetil arzenove kisline ter se nato izločita z urinom. Obe vsebujeta petvalentni arzen. Toksičnost anorganskih in organskih oblik arzena v petvalentnem stanju je zelo majhna, zato je pri zdravljenju treba ohranjati visoko koncentracijo trivalentne spojine.

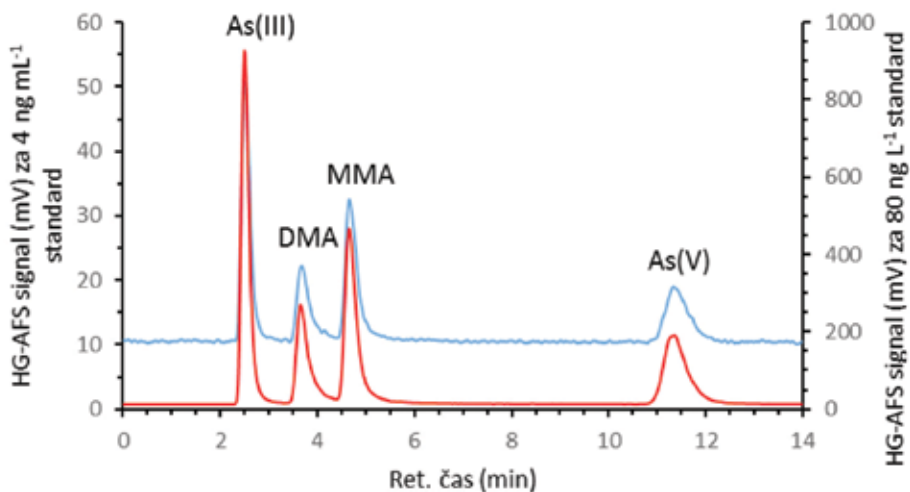
### Določanje arzena in njegovih spojin

Za spremljanje koncentracije arzenita in njegovih pretvorb v telesu je treba določiti koncentracije arzenita, arzenata ter mono- in dimetil arzenove kisline v urinu obolelih. Tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je tehnika za ločevanje različnih snovi v tekočih vzorcih. Ločitev temelji na različnem potovalnem času snovi, raztopljenih v mobilni fazi, skozi stacionarno fazo. Za ločevanje anionov uporabljamo anionske kolone. Te imajo pozitivno nabite funkcionalne skupine, na katerih se najbolj negativni ioni zadržijo najdlje in tako iz kolone pridejo nazadnje, manj negativni ioni potujejo hitreje, nenabite molekule pa iz kolone pridejo najhitreje. V primeru arzenovih spojin najhitreje potuje arzenit, sledijo pa mu dimetil arzenova kislina, monometil arzenova kislina in najpočasneje arzenat. Po ločitvi arzenovih spojin te s hidridno tehniko (Hydride Generation, HG) pretvorimo

v njihove hlapne analoge (arzin, monometil arzin in dimetil arzin), njihovo koncentracijo pa določimo z atomsko fluorescenčno spektrometrijo (AFS). V AFS-detektorju arzenovi hidridi zgorijo v plamenu, pri čemer nastanejo prosti atomi arzena. Žarek ultravijolične svetlobe jih vzbudi tako, da elektroni preidejo na višje energijske nivoje, pri prehodu nazaj v osnovno stanje pa oddajo energijo v obliki fluorescence. Z atomsko fluorescenčno spektrometrijo lahko določimo arzenove spojine v koncentraciji od 0,1 do nekaj 100 ng ml<sup>-1</sup> vzorca. Vse omenjene tehnike - tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo, hidridna tehnika in atomska fluorescenčna spektrometrija - so medsebojno povezane v tako imenovani sistem HPLC-HG-AFS (Šlejkovec, van Elteren, 1999) in celotna analiza od injiciranja vzorca, ločitve spojin, tvorbe njihovih hidridov in njihove določitve poteka v tem sklopu aparaturne (slika 3). Sistem je nato povezan še z računalnikom, ki riše višino signala v odvisnosti od časa, ki ga imenujemo kromatogram (slika 4).

Slika 3: Shematski prikaz sistema HPLC-HG-AFS.





Slika 4: Kromatogram standardov arzenovih metabolitov pri koncentraciji 80 in 4 ng As mL<sup>-1</sup>. Kromatografski pogoji: kolona Hamilton PRP-X100, mobilna faza 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.1.

### Raziskovalno delo in rezultati

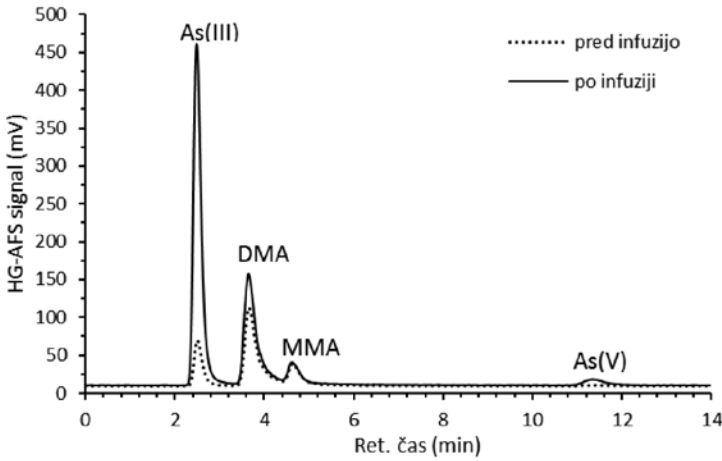
#### Arzen in njegovi metaboliti v urinu pacientke z akutno promielocitno levkemijo, zdravljeni z zdravilom ATO

V vzorcih urina pacientke z akutno promielocitno levkemijo, ki je dnevno približno dve uri prejela intravensko infuzijo arzenovega trioksida (0,15 mg kg<sup>-1</sup> na dan), smo določili celotne koncentracije arzena. Prisotnost arzena smo preverili tudi v urinu pred prvim terapevtskim odmerkom zdravila in zaznali normalno vsebnost arzena, ki je pri ljudeh lahko prisotna zaradi arzena iz hrane ali vode (pod 10 ng mL<sup>-1</sup> urina). Jutranji vzorci, vzeti pred infuzijo, so predstavljali najnižje dnevne vrednosti arzenita, vzorci po končani infuziji pa najvišje.

Ker celotne koncentracije arzena v urinu niso dober pokazatelj njegovih učinkov, smo v urinu pacientke določili tudi vsebnost posameznih arzenovih spojin (slika 5). Vsebnost arzenita se takoj po prvem intravenoznem doziranju močno poveša (323 ng mmol<sup>-1</sup> kreatinina, slika 6). To je tudi optimalno stanje, saj so trivalentne oblike arzena najbolj toksične v boju proti malignim celicam.

Vendar pa je to lahko tudi negativno z vidika možnih stranskih učinkov, kadar imajo tudi zdrave celice nizke zaloge glutaciona, metalotioneinov in predvsem endogenega selena. Selen pomembno vpliva na izločanje arzena iz telesa, hkrati pa je v obliki selenocisteina gradnik glutationperoksidaze. Vsi trije, glutation, metalotioneini in glutationperoksidaza, so znižani v levkemičnih celicah in hkrati nujni za normalno delovanje zdravih celic. Arzenit začne upadati takoj po končani infuziji, kar pomeni, da se takoj začne vezati na proteine po celem telesu, pretvarjati v druge arzenove spojine in predvsem z njimi tudi izločati iz telesa. Zato bi bilo idealno čas infuzije podaljšati na približno štiri ure, da bi tako dosegli zamik metilacije in čim daljšo prisotnost aktivne učinkovine in s tem bolj učinkovito delovanja arzena ob istem odmerku.

Arzenova metabolita mono- in dimetil arzenova kislina se v urinu pojavita šele drugi dan po infuziji. Koncentracija dimetil arzenove kisline postopoma narašča vsak dan, medtem ko je koncentracija monometil ar-

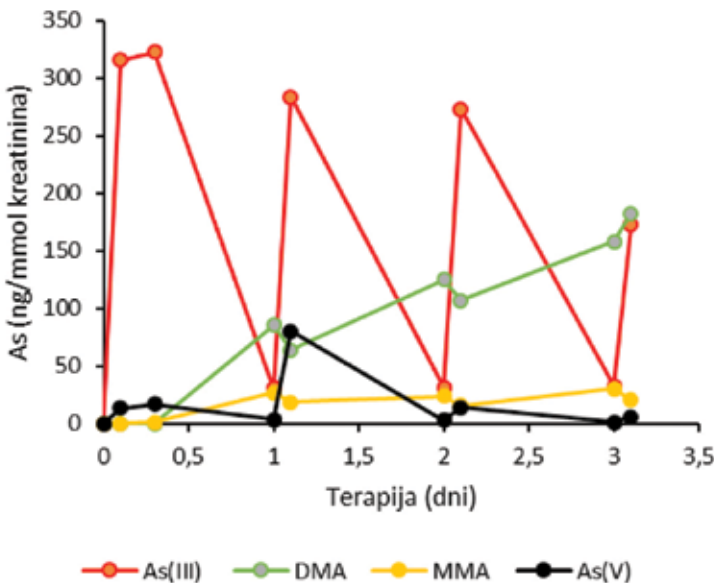


Slika 5: Kromatogram vzorcev urina pacientke, razredčenih v razmerju 1 : 50, odvzetih četrty dan zdravljenja, pred infuzijo ATO in po njej. Kromatografski pogoji so enaki kot na sliki 4.

zenove kisline skoraj nespremenjena v prvih dneh zdravljenja (slika 6). Višje koncentracije dimetil arzenove kisline v primerjavi z monometil arzenovo kislino so pokazatelj zmožnosti telesa, da zelo učinkovito metilira anorganski arzen. V urinah pred infuzijo nismo zaznali skoraj nič arzenata, v vzorcih po infuziji pa je prisoten v majhnih količinah.

V vzorcih urina pred infuzijo se v povprečju nahaja 17,6 odstotka arzenita, 65,8 odstotka dimetil arzenove kisline, 15,0 odstotka

monometil arzenove kisline in 1,6 odstotka arzenata. Deleži arzenovih spojin se nekoliko razlikujejo od predvidenih deležev, objavljenih v strokovni literaturi: 15 do 25 odstotkov arzenita, 35 do 55 odstotkov dimetil arzenove kisline, 25 do 30 odstotkov monometil arzenove kisline in 1 do 5 odstotkov arzenata. Od povprečnih vrednosti bistveno odstopa predvsem dimetil arzenova kislina, kar kaže na individualne razlike med sposobnostjo metilacije arzena pri posameznikih.



Slika 6: Arzenit (As(III)) in njegovi metaboliti arzenat (As(V)), monometil arzenova kislina (MMA) in dimetil arzenova kislina (DMA) v urinu pacientke z akutno promielocitno levkemijo v prvih dneh zdravljenja.

### Celotni arzen in selen v urinu pacientke

Iz slike 7 je vzporedno z izločanjem (vsega) arzena razvidno tudi izločanje selena. Če imajo bolniki normalne vrednosti selena pred začetkom zdravljenja z arzenom, so njihove zaloge selena običajno dovolj visoke, da njegovo izločanje skupaj z arzenom ne pomeni večje grožnje za organizem.

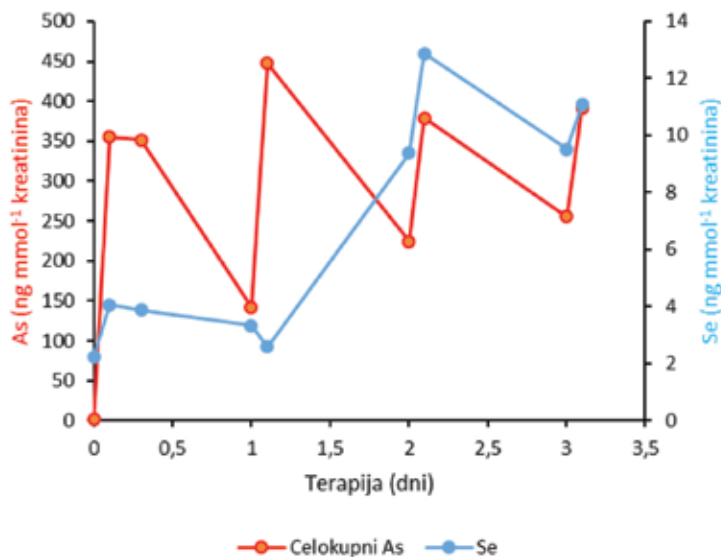
### Arzen in njegovi metaboliti v urinu zdravih prostovoljcev

Arzen se v urinu lahko pojavi v večjih količinah ne le zaradi zdravljenja ali zastrupitve, ampak tudi zaradi uživanja hrane, ki je bogata z arzenom. Gre predvsem za morskoro hrano ter nekatere gobe, ki lahko vsebujejo zelo visoke koncentracije arzena. V taki hrani med arzenovimi spojinami običajno prevladuje arzenobetain (AsB), ki pa je za razliko od večine arzenovih spojin povsem nestrupen, ker v organizmu ne vstopa v reakcije s proteini, ampak se z urinom hitro izloči iz telesa v nespremenjeni obliki. Zato celotne koncentracije arzena v urinu ne povedo ničesar o možnih negativnih učinkih na zdravje. Za ponazoritev tega problema smo v naši raziskavi analizirali tudi vzorce urina osmih zdravih prostovoljcev. Pro-

stovoljci 1-3 so v tednu pred odvzemanom vzorca urina uživali hrano brez rib in gob in zato so imeli v urinu pričakovane nizke koncentracije vsega arzena in tudi nizke koncentracije arzenobetaina; vrednosti so bile primerljive tistim, ki smo jih določili pri bolnici pred začetkom zdravljenja. Prostovoljci 4-8 (slika 8) z obalnega območja so v tednu pred oddajo vzorca očitno uživali hrano, bogato z arzenom (morska hrana). Tako smo pri njih zaznali močno povišane koncentracije vsega arzena, ki pa so bile posledica povišanih koncentracij arzenobetaina. Če primerjamo urine prostovoljcev z urini pacientke med zdravljenjem, lahko ugotovimo, da pri prostovoljcih prevladuje arzenobetain s približno 90 odstotki, le 10 odstotkov pa je ostalih arzenovih spojin, medtem ko pacientkin urin ne vsebuje arzenobetaina, prevladuje pa dimetil arzenova kislina s 66 odstotki.

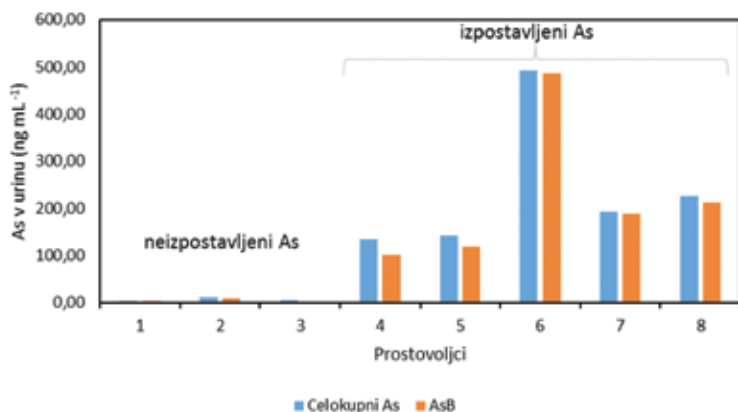
#### Literatura:

Aposhian, H. V., Aposhian, M. M., 2006: *Arsenic toxicology: five questions. Chemical Research in Toxicology*, 19: 1-15.  
Šlejkovec, Z., Podgornik, H., Černelc, P., Falnoga, I., 2016: *Exceptions in patterns of arsenic compounds in urine of acute promyelocyte leukemia patients treated with*



Slika 7:

Koncentracije celokupnega arzena in selena v urinu.



Slika 8: Koncentracija vsega arzena in arzenobetaina v kontrolnih urinih v ng mL<sup>-1</sup> urina.

*As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. BioMetals, 29: 107-118.*

Šlejkovec, Z., van Elteren, J. T., 1999: *Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-UV-HG-AFS. Talanta, 49: 619-627.*

Trisenox. <http://www.trisenox.com/bcp/default.aspx>.

(Dostop 11. decembra 2015).

Raziskovalno delo je bilo opravljeno pod mentorskim vodstvom doc. dr. Zdenke Šlejkovec in doc. dr. Ingrid Falnoga z Instituta Jožef Stefan (Odsek za znanosti o okolju), doc. dr. Helene Podgornik (Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični

oddelek za hematologijo) in profesorice na Gimnaziji Novo mesto Branke Klemenčič.

Raziskave pri bolnikih so potekale v okviru projektov ARRS J3-0161 (Vpliv metabolitov arzenovega trioksida na zdravljenje akutne promielocitne levkemije in multiplega mieloma) in J3-6104 (Biotransformacija As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in njen vpliv na učinkovitost zdravljenja APL), raziskave pri zdravi populaciji pa v okviru projekta PHIME (6. okvirni program Evropske unije).



## Predstavitev avtorjev

*Avtorji naloge.*

*Z leve proti desni: Jon Škerlj, Špela Turk, Zdenka Šlejkovec in Luka Petravič.*

*Foto: Luka Petravič, osebni arhiv.*

### **Luka Petravič, Jon Škerlj in Špela Turk**

*so dijaki Gimnazije Novo mesto in so v času raziskovalnega dela obiskovali 3. letnik. Vsi si želijo v prihodnosti študirati naravoslovje. Špela se je odločila za medicino, Luka izbira med medicino in biokemijo, Jon pa se bo vpisal na elektrotehniško fakulteto. Vsi se v prostem času ukvarjajo z glasbo in športom, kar jim je pomagalo pri poglobljanju medsebojnih vezi ter organizaciji dela. Pri raziskovalnem delu jim je močno pomagala*

*tudi njihova mentorica doc. dr. Zdenka Šlejkovec, ki jih je podpirala ter učila novih stvari med celotnim raziskovanjem. Vsi trije mladi raziskovalci se strinjajo, da je raziskovalno delo zanimivo, nekoliko naporno, saj zahteva veliko časa, vendar hkrati polno novih odkritij in poučnih vsebin, ki širijo njihova obzorja.*