

Intracellulær interaksjon mellom ganciklovir og lamivudin

Hovedfagsoppgave i farmasi



Nanthiny Kumarasamy Aune

**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt
Det matematiske naturvitenskapelige fakultetet
Universitetet i Oslo
Januar 2008**

Innholdsfortegnelse

1	INTRODUKSJON	6
1.1	HUMANT CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)	6
1.1.1	Humant cytomegalovirus infeksjon og sykdom	8
1.1.2	Behandling av humant cytomegalovirus infeksjon	12
1.2	HEPATITT B (HBV) VIRUS INFEKSJON OG SYKDOM	15
1.2.1	Behandling av hepatitt B virusinfeksjon	16
1.3	HUMANT IMMUNSVIKT VIRUS (HIV) INFEKSJON OG SYKDOM	17
1.3.1	Behandling av HIV	17
1.4	CO-INFEKSJON	18
1.4.1	Behandling av co-infeksjon	18
1.5	LEGEMIDDELINTERAKSJON	18
1.5.1	Farmakokinetisk legemiddelinteraksjon VS Farmakodynamisk legemiddelinteraksjon	19
1.6	MÅL MED OPPGAVEN	19
2	MATERIALER OG METODER	20
2.1	MATERIALER	20
2.1.1	Generelle løsninger	20
2.1.2	Materialer relatert til celler	20
2.1.2.1	Celler, virus og legemidler	20
2.1.2.2	Vekstmedier og materialer til nedfrysing av celler	21
2.1.2.3	Reagenser til Cellesplitting	22
2.1.2.4	Cellepellet	22
2.1.2.5	Materialer relatert til høyrensing av virus	22
2.1.3	Materialer relatert til HPLC analyse	23
2.1.4	Materialer relatert til DNA isolering og radioaktiv måling av ganciklovir trifosfat	23
2.1.4.1	Materialer relatert til DNA isolering	23
2.1.4.2	Materialer relatert til kvantifisering av DNA	24
2.1.4.3	Materialer relatert til radioaktiv måling	24
2.2	METODER	24
2.2.1	Metoder relatert til generelt cellekulturarbeid	24
2.2.1.1	Metoder relatert til høyrensing av virus (Mg/Na-Tartrat-gradient)	26
2.2.1.2	Metoder relatert til infisering av celler	27
2.2.2	Cellearbeid relatert til oppgaven	28
	Til påvisning av GCV-TP med HPLC	28
2.2.3	Cellepellet	29
	Til HPLC	29
	Til påvisning av inkorporering av H^3 -GCV i virus-DNA	30
2.2.4	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	30
2.2.5	Metoder relatert til DNA isolering og radioaktiv måling av GCV-TP	34
2.2.5.1	DNA isolering	34
2.2.5.2	Kvantifisering av DNA	35
2.2.5.3	Radioaktiv måling av H^3 -GCV	35
2.2.6	Data behandling	36
3	RESULTATER	37
3.1	HPLC METODEVALIDERING	37
3.2	KONSTRASJONER AV GCV-TP I CELLENE	40
3.3	INKORPORERING AV H^3 -GCV-TP I VIRUS DNA	40
4	DISKUSJON	42
4.1	GCV-TP KONSENTRASJON I CMV INFISERTE CELLER	42
4.2	H^3 -GCV-TP INKORPORERING I VIRUS DNA	45
5	KONKLUSJON	46
6	VIDERE ARBEID	47
7	REFERANSER	48

8	APEDIX	51
8.1	APENDIX 1	51
8.2	APPENDIX 2.....	53
8.3	APPENDIX 3.....	54
8.4	APPENDIX 4.....	56

Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, avdeling for Farmasøytisk biovitenskap og Rikshospitalet, avdeling Mikrobiologisk institutt fra januar 2007 til november 2007.

Jeg takker alle på avdeling for Farmasøytisk biovitenskap på Farmasøytisk institutt og Mikrobiologisk institutt på Rikshospitalet for et trivelig år sammen med dere.

Jeg vil gi mange takk til mine veiledere Anders Åsberg, professor ved avdeling for Farmasøytisk biovitenskap på Farmasøytisk institutt, Halvor Rollag, professor og seksjonsoverlege ved Mikrobiologisk institutt på Rikshospitalet og Leon Reubsaet, professor ved Farmasøytisk institutt for god veiledning, oppfølging og ikke minst oppmuntring gjennom hele perioden.

Jeg takker også ingeniør Ragnhild Slettebakk og sivilingeniør Toril Ranneberg-Nilsen for gode råd og veiledning i celloarbeid på cellolaboratoriet ved Mikrobiologisk institutt på Rikshospitalet.

Mange takk til Adam Babinski, IT ansvarlig ved Farmasøytisk institutt, Manickam Yogalingham, IT ansvarlig ved Rikshospitalet og Gordon Simon, avdelingsingeniør ved Mikrobiologisk institutt på Rikshospitalet for god teknisk hjelp.

Til slutt vil jeg gi mange takk til familien min som har støttet og oppmuntret meg hele veien.

Sammendrag

Denne hovedfagsoppgaven tar sikte på å undersøke intracellulær interaksjon mellom to antivirale midler, ganciklovir og lamivudin. De antivirale midlene ganciklovir og lamivudin brukes primært mot henholdsvis infeksjoner med cytomegalovirus (CMV) og HIV (humant immunsvikt virus) /hepatitt B virus. Det er vanlig å bruke de to legemidlene samtidig når en med CMV infeksjon er co-infisert med enten HIV/ hepatitt B virus infeksjon. Det er tidligere vist at ganciklovir ikke påvirker trifosforyleringen og dermed aktiveringen av lamivudin i hepatitt B infiserte celler. Hittil er liknende forsøk ikke gjort for å undersøke effekten av lamivudin på trifosforyleringen og aktiveringen av ganciklovir. Denne oppgaven tar derfor sikte på å måle effekten av lamivudin på ganciklovir trifosfat nivåene i CMV infiserte humane embryonale fibroblast celler i celler i kultur.

Ganciklovir trifosfat ble relativ-kvantifisert ved hjelp av væske kromatografi (HPLC-UV). Inkorporering av H^3 -GCV-TP i CMV-DNA ble målt ved hjelp av en væske scintillasjonsteller.

Inkorporering av H^3 -GCV-TP i virus DNA viste at inkorporeringen var redusert med over 50 % i celler inkubert med både lamivudin og H^3 -GCV sammenlignet med celler inkubert kun med H^3 -GCV. Derimot viste GCV-TP konsentrasjonen i CMV infiserte celler økningen i konsentrasjonen ved koinkuberingen.

Ut i fra resultatene kan man ikke trekke en konklusjon på at trifosforyleringen av ganciklovir påvirkes av lamivudin, men resultatene fra inkorporering av H^3 -GCV-TP indikerer at det er en interaksjon mellom GCV og lamivudin. Konsentrasjonsmåling av inkorporeringen av H^3 -GCV-TP i virus DNA i forhold konsentrasjonsmåling av GCV-TP i celler ligger nærmere det kliniske bilde man skal undersøke. Begge metodene har sine svakheter og derfor er det nødvendig å bekrefte dette ved hjelp av flere forsøk og eventuelt ved alternative metoder.

En sikker konklusjon på om trifosforyleringen av ganciklovir påvirkes av lamivudin krever ytterligere utvidede undersøkelser.

1 Introduksjon

Med den stadige utviklingen av nye og eksisterende legemidler, vil legemiddelinteraksjoner forbli et viktig område innen forskning og ved behandling av pasienter.

Legemiddelinteraksjoner mellom proteasehemmere og non-nuklosid reverstranskriptasehemmere (NNRTI) som brukes mot humant immunsvikt virus (HIV) forekommer ofte ¹. Hyppig reaktivering av cytomegalovirus (CMV) kan sees ved cellulær immunsvikt, som ved immunsuppressiv behandling etter organtransplantasjon eller malign sykdom og ved Acquired immuno deficiency syndrom (AIDS). Seronegative pasienter som mottar organer fra seropositive givere med enten CMV eller hepatitt B, får som regel profylaktisk behandling med ganciklovir (GCV) og lamivudin i tre måneder. Det er også vanlig at HIV pasienter med CMV infeksjon får de to legemidlene sammen. GCV brukes mot CMV infeksjon og lamivudin brukes mot HIV og hepatitt B virus infeksjon. De to legemidlene omdannes til aktivt virkestoff (trifosfatene) i cellene til stor grad via samme mekanisme.

Formålet med denne oppgaven er å finne ut om lamivudin påvirker aktiveringen av GCV til ganciklovir trifosfat (GCV-TP) (intracellulær trifosforyleringen). Dersom resultatene fra oppgaven viser en interaksjon mellom GCV og lamivudin, kan dette være til hjelp ved dosereguleringer hos berørte pasienter.

1.1 Humant cytomegalovirus (HCMV)

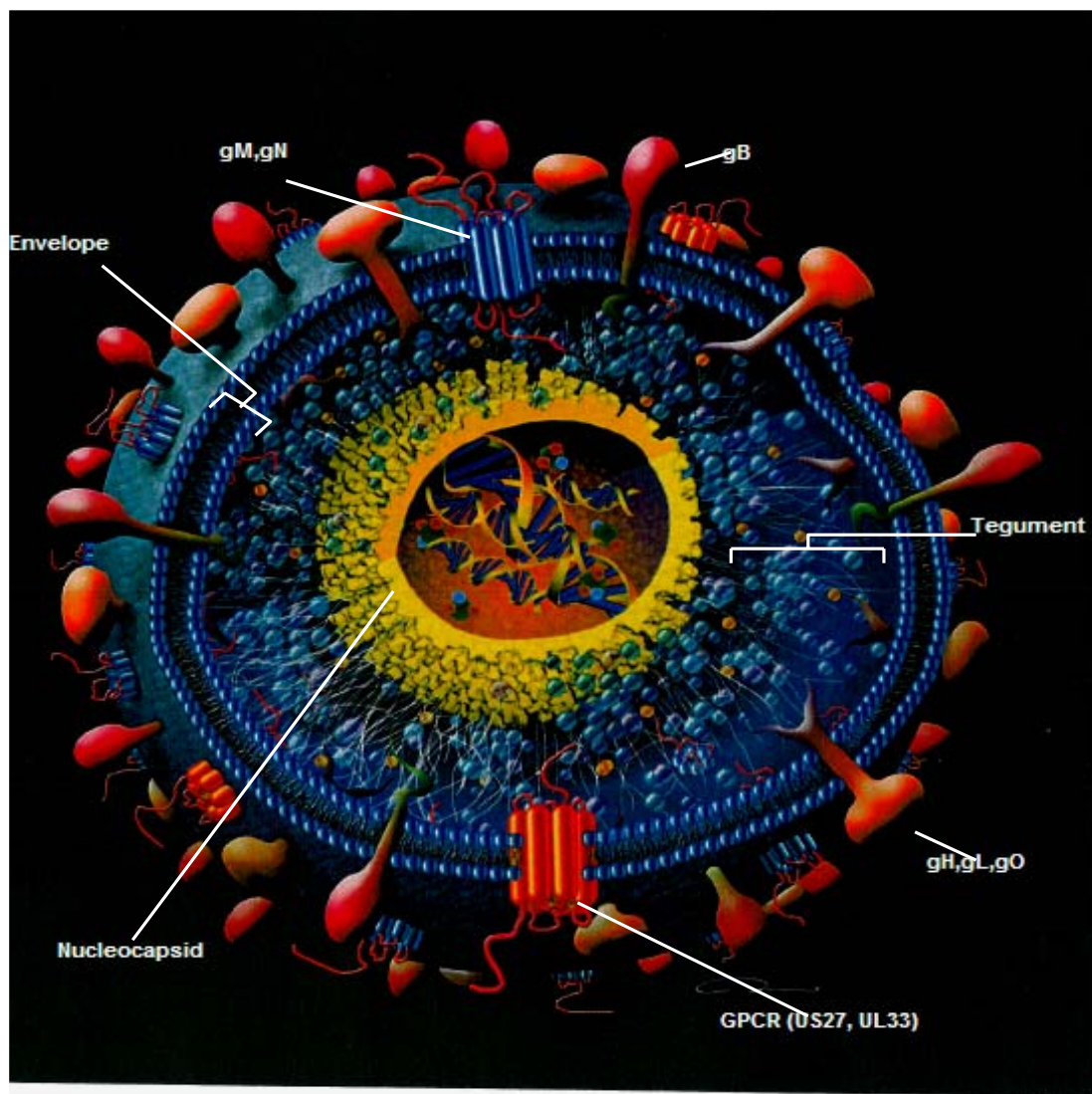
Humant cytomegalovirus (HCMV), er et vanlig humanpatogent virus. Virusinfiserte celler er store og dermed navnet ”cytomegalo” som betyr stor celle på latinsk. CMV eller herpes hominis virus 5 (HHV 5) tilhører familien Herpesviridae og subfamilien Beta-herpesvirinae ²⁻⁴. CMV er det største av herpesvirusene. Funksjonelt har CMV-genomet tre typer gener, alfa-beta- og gamma som herpes simplex-virus ⁴. Medlemmer i subfamilien Beta-herpesvirinae har likheter i deres geninnhold og organisering. Alle i denne subfamilien har streng artsspesifisitet og relativt langsom replikasjonsyklus ².

CMV er et membrankledd virus som er bygget opp som herpes simplex-virus.

Elektronmikroskopisk kan man ikke skille CMV fra andre i familien Herpesviridae. Virus i denne familien har et dobbelttrådet DNA (deoksyribonukleinsyre) som er omgitt av et ikosahedertalt kapsid. Kapsidet består av 162 heksagonal kapsomere og er omgitt av en

amorfmasse som kalles tegument. Rundt tegumentet er det en løselig lipid membran med virale glykoproteiner (figur.1.1).

Figur 1.1 CMV morfologi er vist i figuren. g står for glykoprotein ³.



Genomet til CMV er et 230 kbp lineært dobbeltrådet DNA som er delt inn i ”unique short” (US), ”unique long” (UL) og repeterende regioner ^{2,3,5}. Hele genomet til AD169 (en laboratoriestamme som brukes til forsøket) er sekvensert og har 225 ”open reading frames” (ORFs) ⁵. På grunn av ”splicing” mekanismer kan man forutsi at viruset har ca 202 proteiner. Noen av disse proteinene finnes i to kopier på grunn av repeterende regioner i genomet. Dette fører til ca 178 forskjellige proteiner ². Det er to proteiner som er involvert i GCV metabolismen, pUL97 (protein som er kodet av den nittisyvende ORF i UL regionen)

og pUL54 (protein som er kodet av den femtjette ORF i UL regionen). Genet UL97 koder for to proteiner. De to proteinene er viral serin-threonin proteinkinase (pUL97) og tegument protein⁶. pUL97 tilhører HvUL (Herpes virus UL familien) protein kinase familien og er kanskje det mest atypiske medlemmet i denne familien⁷. pUL97 har mange uvanlige egenskaper, blant annet høyt pH optimum, resistens mot høye saltkonsentrasjoner, og en uvanlig preferanse for peptidsubstrater med base residuer ved P + 5 posisjon⁷. pUL97 er nødvendig for effektiv replikasjon av CMV⁸. Det er anslått til å være minst tre stadier i viral replikasjon for pUL97 og dets regulatoriske funksjoner, eks. viral genom syntese, modulering av cellulære faktorer som er involvert i transkripsjonen og translasjonen, og ”nuclear egress of viral capsids”⁸. I tillegg fosforylerer pUL97 visse nukleosidanaloger som for eksempel GCV. pUL54 er en viral DNA polymerase og fungerer som en katalysator i CMV-DNA replikasjonen.

1.1.1 Humant cytomegalovirus infeksjon og sykdom

HCMV er en opportunistisk patogen som finnes overalt. I de fleste utviklingsland blir man smittet med CMV i tidlig barnealder. I industrialiserte land er de fleste smittet med viruset i godt voksen alder. Human placenta er ikke en effektiv barriere for CMV smitte og viruset kan replikere i placenta med eller uten overføring til fosteret. Spedbarn kan smittes under fødsel eller via morsmelk dersom moren er infisert. Ca 15 % gravide med primærinfeksjon spontanaborterer³. Kongenital CMV infeksjon rammer 1-3 % av babyer i USA årlig og fører til mortalitet eller permanent fysisk og/eller psykisk handikap³. Den største smitteveien i barnealder er bruk av samme drikkeflaske eller biting på samme leke. Fra pubertetsstadiet er seksuell kontakt den vanligste smitteveien. I Norge er mellom 60-80 % av befolkningen smittet med CMV i voksen alder⁹.

CMV smittes via spytt, morsmelk, urin, sæd, cervixsekret og som blodsmitte. De fleste vil ikke vise noen tegn til symptomer som et resultat av enten primær infeksjon, reaktivering, eller reinfeksjon fordi viruset er veladoptert av verten. Midlertidig kan CMV forårsake alvorlige sykdommer hos foster eller hos individ med nedsatt immunforsvar. CMV replikerer i og sprer seg gjennom mange celletyper i en vert, som allerede er blitt infisert. I noen celletyper, antagelig hematopoietiske stamceller, forblir viruset hvilende og går i latent tilstand. Cytomegalovirus er speciesspesifikk, men de fleste arter har sin egen variant av cytomegalovirus. CMV-infeksjon hos gangere har vært mye brukt som modellinfeksjoner. CMV fra forskjellige arter har noen gener med fellestrekk. I tillegg har de imidlertid gener

som er unike, altså helt spesifikke for hver enkelte art. Et humant virus vil for eksempel ikke infisere en gnager og omvendt.

CMV infeksjoner kan deles i akutte og kroniske infeksjoner. Virulogisk og immunologisk karakterisering av akutt og kronisk CMV sykdomsbilde er gitt i tabellen nedenfor.

Tabell 1.1.1 Karakter av akutte og kroniske sykdommer assosiert med CMV infeksjoner³ (se appendix 2 for detaljer).

	Virus replikasjon	Multipel organ sykdommer	Immun kontroll mekanismer	Immun assosierte sykdommer
Akutte sykdommer				
Mononukleose syndrom	Høy	Ja	Medfødt / adaptiv	Nei
Kongenitale infeksjoner; perinatale infeksjoner i premature barn	Høy	Ja	Ukjent	Ja
CMV sykdomsbilde hos allograft mottakere	Høy	Ja	Adaptiv	Nei
Disseminated infeksjoner i AIDS pasienter	Høy	Ja	Adaptiv	Nei
Kroniske sykdommer				
Kongenitale infeksjoner	Lav	Nei	Ukjent	Ja
Vaskulære sykdommer hos organtransplanterte	Lav	Nei	Adaptiv	Ja
Vaskulære sykdommer i normale individ	Lav	Nei	Adaptiv	Ja
Inflamatoriske sykdommer og malignitet	Lav	Nei	Ukjent	Ja

CMV infeksjon kan affisere multipel organer. CMV formerer seg best i endotelceller i kroppen. I tillegg er fibroblaster og parenchymaleceller i ulike organer permissive for CMV. Replikasjonen har vært demonstrert i polymorfonukleære leukocytter, monocytter, T lymfocytter (CD 4+ og CD 8+) og B lymfocytter². Dette betyr at CMV infeksjonen er en systemisk infeksjon. Virus vil lett reaktiveres ved nedsatt celleformidlet immunitet. Cytokiner, som for eksempel interleukin-8 og tumor nekrose faktor- α (TNF- α) kan indusere

virus replikasjonen ⁴. Man kan få generalisert CMV infeksjon dersom man har redusert celleformidlet immunitet sammen med betennelsesreaksjon.

Diagnosen stilles enten ved hjelp av serologiske eller virologiske tester. Når man begynner å merke symptomer ved primære infeksjoner, kan samtidig IgM antistoffer påvises. Senere i sykdomsforløpet kan man påvise IgG antistoffer.

De virologiske testene baserer seg på å påvise viruset i urin, spytt, hvite blodlegemer, biopsier fra fostervann mv. CMV DNA kan påvises ved hjelp av PCR metode, RNA amplifisering og CMV-RNA /DNA hybridisering ^{2, 4, 10}.

DNA replikasjon

CMV replikerer i mange differensierte celletyper i verten, men de fleste studier som går på å forstå generens funksjon er gjort i primære fibroblaster ⁶. Replikasjon i andre celletyper krever virusstammer som bevarer karakteregenskapene til kliniske isolater ⁶. CMV genomets replikasjon og pakking skjer i kjernen av infiserte celler. Viral DNA syntese starter 14-16 timer etter infeksjonen. Viruset er avhengig av vertcellens metabolisme for å sikre nok tilførsel av dNTP (deoksyribonukleosider) for sin DNA replikasjon. Dette fordi viruset mangler egne deoksyribonukleotid biosyntetiske enzymer, som tymidin kinase, dihydrofolat reduktase, tymidylat syntetase, og en aktiv form av ribonukleotid reduktase ⁵.

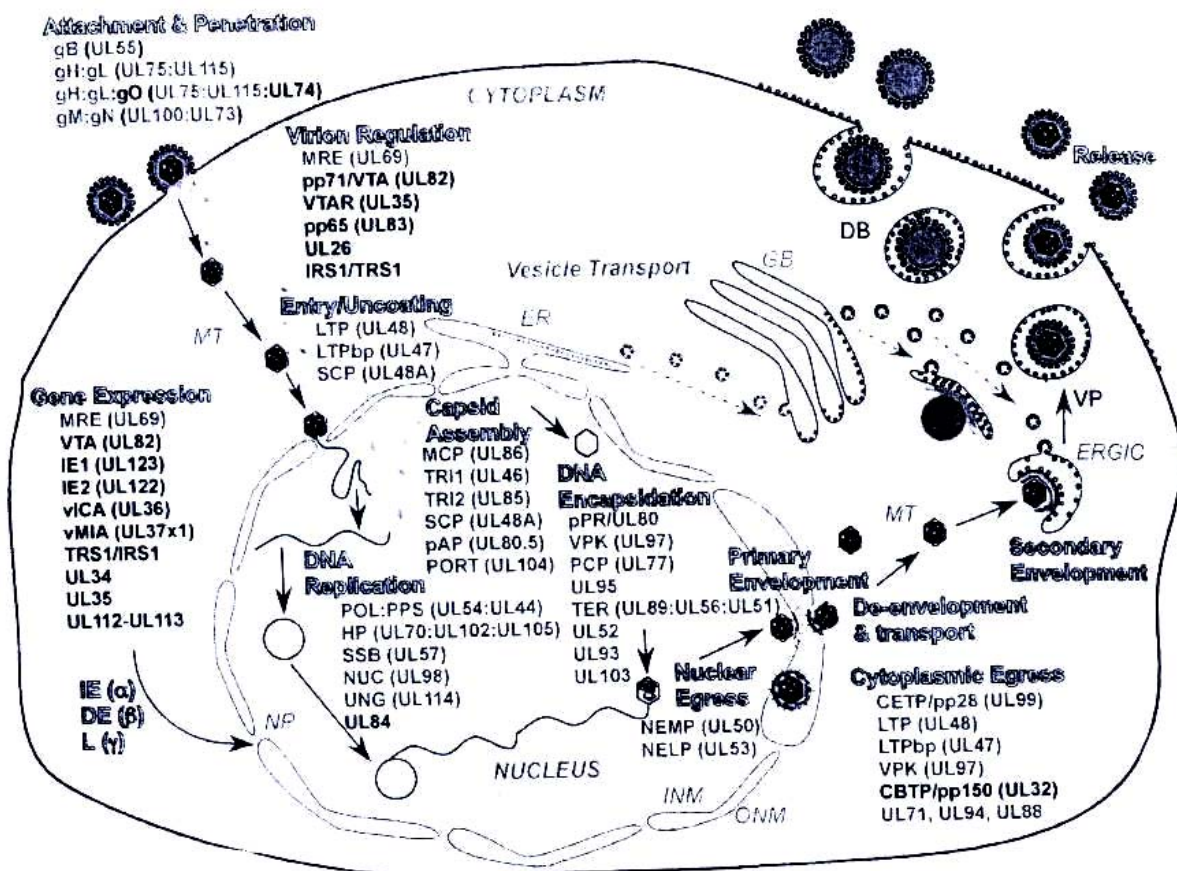
Hovedtrinnene i replikasjonsveien er følgende (figur 1.1.2.1):

Virus partikler fester seg til spesifikke reseptorer (antagelig epidermal growth factor reseptor) på celleoverflaten og deretter fusjoneres cellens cytoplasmatiske membran med viruskapsidet. Nukleokapsid frigjøres inn i cellen.

- Transport av nukleokapsid inn i cellekjernen og fjerning av viruskappen.
- Dannelse av mRNA (mesenger ribonucleic acid). CMV uttrykker sin mRNA samtidig som vertcellen fortsetter å syntetisere sin egen mRNA. Altså CMV kodende gener transkriberes i cellekjernen i infiserte celler, av vertcellens RNA polymerase II og assosierte transkripsjonsmaskineriet. Det dannes tre mRNA klasser: "immediate early" (α), "Delayed early" (β), og "Late" (γ). "Immediate early" koder for regulatoriske proteiner og "delayed early" koder for proteiner som er involvert i DNA replikasjon, blant annet pUL54. "Late" mRNA koder for proteiner som er nødvendig for dannelse av viruspartikler og utslipp av virus fra kjernen.
- Kapsid samling og DNA innkapsling.
- Frigjøring av viruspartikler fra cellene.

CMV replikerer sakte. Replikasjonssyklusen tar 48-72 timer for å slippe ut sine etterkommere. Uttrykk av "immediate early" genprodukter starter umiddelbart etter opptak av virus-DNA i cellekjernen.

Figur 1.1.2.1 CMV replikasjonsveier i human fibroblaster ⁶. Hovedtrinnene i replikasjonszyklusen er merket med tykk skrift. Under hovedtrinnene fremkommer de genene som er involvert.



DNA replikasjon i CMV og andre herpesvirus er en to-fase prosess. Etter infeksjonen sirkulariseres CMV genomet og DNA replikasjonen skjer via "rolling-circle" mekanismen ^{11, 12}.

1.1.2 Behandling av humant cytomegalovirus infeksjon

Det er tre legemidler som er markedsført i Norge mot CMV infeksjon. Ganciklovir, foscarnet og cidofovir kan alle hemme CMV replikasjonen. Cidofovir er en cytidin analog og hemmer replikasjon av DNA kjeden. Kanskje hemmer det også aktiviteten til virus DNA-polymerase. Foscarnet er en fosfonomaursyrederivat, som virker som en selektiv hemmer av viral DNA-polymerase. Under omtales ganciklovir, som er det legemidlet som ble undersøkt i studien.

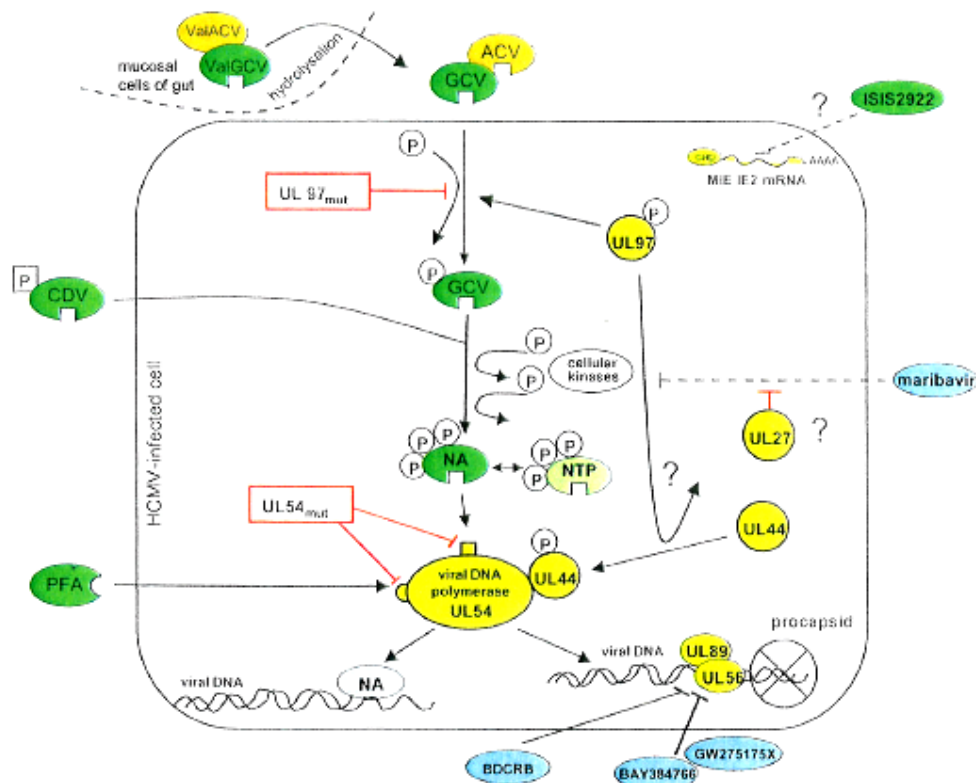
Ganciklovir

GCV er en syntetisk analog til 2'-deoksyguanosin. Det virker ved å hemme replikasjonen av herpes virus in vitro og in vivo. HCMV, herpes simplex virus-1, og -2 (HSV-1 og HSV-2), human herpes virus-6, -7 og -8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8), Epstein-Barr virus (EBV), varicella-zoster virus (VZV) og hepatitt B virus er følsomme mot GCV (www.legemiddelverket.no, SPC data).

Virkemekanisme: I CMV infiserte celler, fosforyleres GCV til ganciklovirmonofosfat (GCV-MP) av viralt proteinkinase, pUL97, og deretter skjer fosforyleringen ved hjelp av cellulære kinaser til GCV-TP (figur 1.1.3.1). Da monofosforyleringen i overveiende grad er avhengig av viralt enzym, skjer fosforyleringen av GCV fortrinnsvis i virusinfiserte celler. Den virusstatistiske aktiviteten av legemidlet skyldes hemming av DNA syntesen. Dette skjer på følgende måter(www.legemiddelverket.no, SPC data).

- 1) Kompetitiv hemming av inkorporering av deoksyguanosin-trifosfat (GTP) i DNA av viral DNA-polymerase, og
- 2) Inkorporering av GCV-TP i viralt DNA, som stopper opp eller begrenser DNA forlengelse.

Figur 1.1.3.1 Virkemekanismen til ganciklovir (GCV) og andre antivirale midler³. Ganciklovir gitt som valganciklovir omdannes i kroppen til ganciklovir. NTP er en samlebetegnelse for ATP, GTP, UTP, CTP og TTP. Ganciklovir trifostat er en GTP analog.



I Norge er GCV markedsført med legemiddel navnene, Valcyte og Cymevene. Valcyte inneholder valganciklovirhydroklorid. Valganciklovir er en L-valylester (prodrug) av GCV. Valganciklovir metaboliseres til GCV av intestinale og hepatiske esteraser etter oralt inntak. Denne metabolismen skjer hurtig og ekstensivt (www.legemiddelverket.no, SPC data). Cymevene er et pulver til infusjonsvæske og oppløsning, og inneholder ganciklovir natrium. Dosering: Voksne og barn over 12 år;

1. Parenteralt (langsom intravenøs infusjon):

- Initialt ved alvorlig CMV infeksjon; 5 mg/kg kroppsvekt, to ganger i minst 14 dager.
- Vedlikeholdsbehandling; 5 mg/kg daglig, evt. 6 mg/kg daglig, fem dager i uka. Infusjonsvæsken er sterkt alkalisk og må ikke komme ekstravasalt, da dette kan føre til vevsskade.

2. Peroralt: Vedlikeholdsbehandling etter initialt parenteral intravenøs infusjon: Induksjonsbehandling; 900 mg, en gang per dag. Kapslene skal tas til mat. Dosereduksjon ved tegn til anemi, leukocytopeni, trombocytopeni, og ved nedsatt nyrefunksjon og dialyse behandling. Ved vedvarende immunsvikt kan det være nødvendig med langvarig vedlikeholdsbehandling.

Bivirkninger: Anemi, neutropeni og trombocytopeni er vanlige bivirkninger. Reduksjon av lever- og nyrefunksjon forekommer, like ens symptomer på påvirkning av sentralnervesystemet, fra ørhet til forverringstilstander, ataksi og koma. Legemidlet påvirker også gonade funksjonen.

Resistens til GCV varierer med sykdom, behandlingsform og behandlingstid^{6, 13}. GCV resistens hos R+ (seropositiv mottaker) organtransplanterte med CMV infeksjon er sjelden. Ved forbyggende behandling med GCV over tre måneder hos nyre eller pankreas eller lunge transplanterte, varierer resistensrate fra 1-4 %. Derimot er resistens hos D+/R- (seronegativ mottaker som har fått seropositiv organ) organtransplanterte høy og varierer fra 0-5 % i nyre, hjerte og lever transplanterte og fra 9-27 % i nyre og pankreas eller lunge transplanterte^{6, 14}. Et studie som er gjort i McGill University i Canada viser at prevalens av CMV UL97 mutasjon i polymorfnukleær leukocytter (PMNL) hos 19 AIDS pasienter som ble behandlet med GCV intravenøst over tre måneder var 30,8 % versus de som ble behandlet under tre måneder¹⁵.

Det er også oppdaget mutasjoner i UL54 genet som gir resistens mot både ganciklovir og cidofovir.

Det fins ingen vaksine De fleste CMV stammer erverver resistens gjennom mutasjoner i UL97 genet, men det er mot CMV infeksjon per i dag, men nye vaksinstudier gir lovende resultater i prekliniske studier¹⁶.

1.2 Hepatitt B (HBV) virus infeksjon og sykdom

Det første hepatitt B viruset ble oppdaget hos en australsk aborigin. Antigenet ble tilfeldigvis oppdaget i en studie som gikk ut på å finne genetiske forskjeller hos mennesker. I undersøkelsen ble det brukt serum fra individer som fikk multiple blodtransfusjon⁶.

Hepatitt B virus tilhører familien *Hepadnaviridae*. Genomet består av en dobbeltrådet DNA med ca 30 kb, som replikerer ved reverstranskripsjon. Mennesket er det naturlige smittereservoaret, mens sjimpanser er det eneste dyret som kan påføres HBV-infeksjon.

Viruset finnes først og fremst i blod, men i mindre mengder i de fleste andre kroppsvæsker. Smitten skjer hovedsakelig via blod. Smitte via andre typer kroppsvæsker sees sjeldnere. I Norge skjer overføring av viruset hovedsakelig ved seksuell kontakt og ved forurensede sprøytespisser blant narkomane ⁴.

HBV-infeksjoner er utbredt i hele verden. Verdens helseorganisasjon (WHO) estimerer at det for tiden er fire hundre millioner individer, som er kronisk smittet med HBV og at 25 % av dem vil dø av kroniske leversykdommer eller hepatocellulært karsinom ⁶. I immunkompetente individer blir HBV infeksjoner spontant borte, mens hos de fleste barn under fire måneder og hos småbarn forblir infeksjonen kronisk ¹⁷. En kronisk infeksjon har fire faser. Disse er: immuntoleranse, hepatitt B e antigen (HBeAg) -positiv kronisk hepatitt, inaktivt hepatitt B overflate antigen bærer, eller HBeAg-negativ kronisk hepatitt. Av disse kan HBeAg-positiv kronisk hepatitt og HbeAg-negativ kronisk hepatitt utvikles til cirrose og hepatocellulært karsinom ^{17, 18}.

1.2.1 Behandling av hepatitt B virusinfeksjon

Hepatitt B behandles med interferon og lamivudin. Her omtales kun lamivudin.

Lamivudin

Legemidlet lamivudin er en cytosinnukleosidanalogue og en reverstranskriptasehemmer. Lamivudin gir markert reduksjon i HBV-DNA nivået, men seponering gir igjen stigende verdier til samme nivå som før behandling ⁴. Lamivudin metaboliseres, både av infiserte og ikke-infiserte celler til ett trifosfat (TP) derivat som er den aktive formen av modersubstansen. Dette gjøres med celledoesifikke enzymer. Lamivudin-TP fungerer som et substrat for den HBV virale polymerasen. Dannelsen av ytterligere viralt DNA blokkeres ved inkorporering av lamivudin-TP i kjeden som resulterer i kjedeterminering. Lamivudin-TP interfererer ikke med den normale cellulære deoksynukleotid metabolismen. Lamivudin mot kronisk hepatitt B er markedsført i Norge med legemiddelnavnet Zeffix.

Behandling med Zeffix bør initieres av lege med erfaring i behandling av kronisk hepatitt B. Det fins vaksine mot hepatitt B og vaksinen tilbys til helsepersonell. Hepatitt B vaksinen er ikke ført opp i barnas vaksinasjonsprogrammet, men det tilbys vaksine til barn som har foreldre fra høyendemisk områder.

1.3 Humant immunsvikt virus (HIV) infeksjon og sykdom

Viruset ble oppdaget i begynnelsen av 1980, og forårsaker Acquired immunodeficiency syndrom kalt AIDS. HIV er delt i to hovedtyper, HIV-1 og HIV-2. HIV-2 ble oppdaget i vest Afrika 1985. Det har redusert virulens sammenliknet med HIV-1, men forårsaker AIDS-liknende sykdom. HIV-1 er det dominerende viruset som forårsaker pandemi.

HIV tilhører familien Retroviridae og replikerer gjennom en ekstraordinær og unik livssyklus, som differensierer dem fra andre virusfamilier. Viruset har to enkeltrådet genomisk RNA, men når de kommer inn i vertcellen dannes en av de to til en enkeltrådet DNA som deretter konverteres til dobbeltrådet DNA av enzymet reverstranskriptase. Deretter integreres virusets DNA inn i vertens kromosomale DNA. Det integrerte virus DNA (provirus) brukes videre som templat for dannelse av viral RNA og proteiner som er nødvendig for nye virioner.

Hittil er det mer enn 65 millioner mennesker som er blitt infisert med HIV og ca 25 millioner mennesker er døde på grunn av AIDS ¹⁹.

Smitten skjer hovedsakelig via seksuell kontakt (både hetero-og homoseksuell kontakt). Barn kan smittes i uterus under fødsel og via morsmelk. HIV kan også spre seg gjennom kontaminert blod via blodtransfusjon, blodprodukter og kontaminerte sprøytespisser (narkomane og helsepersonell kan smittes på denne måten).

1.3.1 Behandling av HIV

Antivirale midler mot HIV er klassifisert ut i fra deres virkemekanisme; nukleosid analog reverstranskriptasehemmere (NARTIs), nukleotid analog reverstranskriptasehemmere, non-nukleosid reverstranskriptasehemmere (NNRTIs), protease hemmere (PIs) og fusjonshemmere. Legemidlene gis i kombinasjon, vanligvis tre antivirale midler sammen for å få bedre effekt og redusere utvikling av virus resistente stammer. I tillegg inkluderer behandlingen overvåkning av opportunistiske infeksjoner eller maligne sykdommer, og symptomkontroll. Fordi det brukes flere typer legemidler hos HIV pasienter, så er det ikke uvanlig at forekomst av interaksjoner mellom legemidlene er store. Legemiddelinteraksjoner mellom proteasehemmere og non-nukleosid reverstranskriptasehemmere (NNRTI) forekommer ofte ¹ Her omtales kun lamivudin som inngår i oppgaven.

Lamivudin for behandling av HIV infeksjon markedsført i Norge har tre legemiddelnavn; Kivexa, Epivir og Combivir.

1.4 Co-infeksjon

CMV infeksjon er et stort problem for organtransplanterte pasienter og i noen grad hos AIDS pasienter. CMV forårsaker hyppig korioretinitt, kolitt, og øsofagitt hos AIDS pasienter.

Organtransplanterte pasienter kan få alvorlige sykdommer ved CMV infeksjon. Primær infeksjon hos organtransplanterte blir oftest overført med det transplanterte organet. Viruset ligger latent i makrofager og endotelceller i organet og reaktiveres etter transplantasjonen.

Seropositive organ overfører viruset i 60-80% av tilfellene ². Hos organtransplanterte pasienter og AIDS pasienter er det CMV som er den mest vanligste årsak til morbiditet ^{2, 16, 20, 21}. Organtransplanterte pasienter som får CMV infeksjon kan co-infiseres med andre herpes virus typer.

Det er heller ikke uvanlig at man finner hepatitt B hos HIV pasienter, da smitten hovedsakelig skjer via de samme smitteveiene. Forekomst av hepatitt B er høyere hos HIV infiserte pasienter enn hos den generelle populasjonen. HBV co-infeksjon er ikke den vesentligste årsaken til HIV, men HIV co-infeksjon endrer forløpet til HBV sykdommer betydelig ²². En studie som var gjort i sykehus i Frankrike viser at av 477 HBV infiserte pasienter, var 55 % av dem co-infisert med HIV ²³. HIV infiserte pasienter har mindre sjanse for å kvitte seg med HBV og HIV/ HBV co-infiserte pasienter hadde høy risiko for leverrelaterte dødsfall, enn i forhold til de som er monoinfiserte ²².

1.4.1 Behandling av co-infeksjon

CMV co-infeksjon med hepatitt B / HIV behandles vanligvis for begge infeksjonene og derfor gir man ofte GCV og lamivudin samtidig hos co-infiserte pasienter.

1.5 Legemiddelinteraksjon

Definisjon

Legemiddeinteraksjon vil si at effekten av et legemiddel endres ved tilstedeværelse av enten et annet legemiddel, mat, drikke eller kjemiske stoffer som fins i miljøet ^{1, 24, 25}.

Netto effekt av de kombinasjonene kan være:

- synergisme eller additiv effekt av et eller flere legemidler
- antagonisme av et eller flere legemidler
- endringer i effekten av et eller flere legemidler eller produksjon av idiosynkratiske effekter.

Legemiddelinteraksjon skjer via ulike mekanismer, men visse mekanismer sammentreffer oftere.

1.5.1 Farmakokinetisk legemiddelinteraksjon VS Farmakodynamisk legemiddelinteraksjon

Farmakokinetisk interaksjon

Farmakokinetiske legemiddelinteraksjoner er de interaksjoner, som kan påvirke prosesser via legemiddel absorpsjon, distribusjon, metabolisme, eliminasjon^{1, 24-26}. Korresponderende endringer i farmakologiske responser eller terapeutiske resultater skjer ikke nødvendigvis¹.

Farmakodynamisk interaksjon

Farmakodynamiske interaksjoner er interaksjoner hvor effekten av et eller flere legemidler endres ved tilstedeværelse av andre legemidler på virkestedet. Noen ganger konkurrerer legemidler direkte for de aktuelle reseptorene, men reaksjonen er ofte mer indirekte og involverer interferering med fysiologiske mekanismer²⁴. Konsekvensen er følgende:

- Additive eller synergiske effekter
- Antagonisme eller moteffekter
- Endringer i legemiddeltransport mekanismer (dette kan også være kinetisk)
- Forstyrrelse i elektrolyttbalanse

Den intracellulær interaksjonen som skal undersøkes i denne oppgaven er en farmakokinetisk interaksjon. Nukleosid reverstranskriptasehemmere (NRTIs) kan gi intracellulære interaksjoner i deres aktiveringsveier. NRTIs er prodrug som fosforyleres intracellulært til deres aktive form ved hjelp av cellulære enzymer. Det kan tenkes at NRTIs konkurrerer for samme cellulære enzymer for fosforyleringen og dermed endrer hverandres konsentrasjoner i cellene. Både GCV og lamivudin er nukleosidanaloger som må trifosforyleres i cellen for å bli aktive. Det er publisert at GCV ikke påvirker lamivudin i hepatitt B infiserte celler²⁷. Hittil er det ikke gjort liknende forsøk hvor man har sett på effekten av lamivudin på GCV.

1.6 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å finne ut om trifosforylering og inkorporering i virus DNA av ganciklovir påvirkes av tilstedeværelse av lamivudin i celler i kultur.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Materialene er oppgitt med produktnavn, konsentrasjon og renhet, katalog nummer og produsenter med adresser.

2.1.1 Generelle løsninger

Sterilt vann, destillert vann, PBS, MilliQ vann, 0,85 % NaCl og 8 mMNaOH , 60 % metanol til ekstraksjon (32,04 g/mol, VWR via kjemiteknikk A/S, Oslo, 99,8 % metanol ble fortynnet med destillert vann til 60 %).

PBS

8 g NaCl (~ 99 %, Prolabo via VWR, Oslo, Norge)

200 mg KCL (99.5 %, 1.04936.1000, Merck, Darmstadt, Tyskland)

1,4 g Na₂HPO₄ (99,5 %, 1.06580.1000, Merck)

240 mg KH₂ PO₄ (99 %, 1.05104.1000, Merck)

dH₂O til 1 L.

pH justeres til 7,4 ved tilsetning av HCl.

NaCl 0,85 %

8,5 g NaCl (58,44 g/mol, 27810295, Prolab via Chemi-Teknikk AS)

Destillert vann til 1000 ml.

NaCl løses i vann. Autoklaveres. Holdbarhet i rør: 8 uker ved 2-8°C og 1 år i flasker.

Milli-Q vann

Destillert vann, ionebyttet med Millipore Filtreringssystem.

2.1.2 Materialer relatert til celler

2.1.2.1 Celler, virus og legemidler

Humane embryonale fibroblaster (HE) (Nasjonalt Folkehelseinstituttet, Divisjon for smittevern, seksjon for SMAL-VI, pb 4404, Nydalen, Oslo, Norge). De cellene er primære celler og er brukt til alle forsøkene.

Cytomegalovirus (CMV) AD169 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD). AD169 er en laboratoriestamme som er brukt til alle forsøkene.

Ganciklovir (255,2 g/mol, G2536-100mg, Sigma-Aldrich, Oslo, Norge)

Ganciklovir, (8-³H)- (Preparert med reduktiv dehalogenering med tritium gass),
spesifikt aktivitet 5,9 Ci/mmol, Konsentrasjon 1,0mCi/ml; 43,3µg/ml, radiokjemisk renhet
99,6 %, Moravek Biochemicals, Inc. 577 Mercury Lane, Brea California, USA)

Aciklovir (Acycloguanosine, 225,2 g/mol, A4669-50 mg, minimum 99 % HPLC, Sigma-
Aldrich, Oslo, Norge)

Lamivudin (3CT, (-)-BCH-189,3'-Thia-2',3'-dideoxycytidine) (229,26 g/mol, 98 %, Toronto
Research Chemicals inc, 2 Brisbane Road, North York, ON. M3J 2J8 Canada)

2.1.2.2 Vekstmedier og materialer til nedfrysing av celler

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (D6429, Sigma-Aldrich, Oslo, Norge).

Minimum Essential Medium (MEM) (61100-087 , Invitrogen, Oslo, Norge).

Endotoksin- og mykoplasmafritt føtalt kalveserum (FCS) (S1810/500, Biowest, Miami,
Florida, USA).

L – Glutamin (200 mM i 0,85 % NaCl løsning, BE17-605 E, Biowhittaker (Cambrex), East
Rutherford, NJ, USA).

Gentamicin (Garamycin; 40 mg/ml, 029033, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA).

Fungizone (50 mg lost i 20 ml MQ vann, 436444, Bristol- Meyers Squibb, New york, NY,
USA).

Benzylpenicillin (0,6 g (1000000E) løst i 10 ml MQ vann, 505503, PanPharma, Fougères,
Frankrike).

Natrium bikarbonat (lages på substratlaboratoriet på Mikrobiologisk institutt på
Rikshospitalet)

Dimethyl sulphoxide (DMSO) (D2650, Sigma-Aldrich, Oslo, Norge)

Natriumbikarbonat (Natrium hydrogen karbonat)

44 g NaHCO₃ (84,01 g/mol, 99,5-100,5 %, 27778.293, Prolab)

5ml Fenyrlødt løsning 0,4 %

Milli-Q vann til 1000 ml.

Natrium bikarbonat løses i Milli-Q vann, så tilsettes fenyrlødt løsningen. Deretter blåses CO₂
gass gjennom løsningen. Sterilfiltreres gjennom 0,22µm millipore filter.

2.1.2.3 Reagenser til Cellesplitting

Versen

24 g NaCl (58,44 g/mol, ~99 %, 27810295, Prolab via Chemi-Teknikk AS)

0,6 g KCl (74,55 g/mol, 99,5 %, 1.04936.1000, Merck via Prolab)

4,3 g Na₂HPO₄ (177,99 g/mol, 99,5 %, 1.06580.1000, Merck via Prolab)

0,6 g KH₂PO₄ (174,18 g/mol, 99 %, 1.05104.1000, Merck via Prolab)

0,6 g Versen (EDTA-Na salt, 372,24 g/mol, 100935V, BDH)

Milli-Q vann til 1000 ml.

Kjemikaliene løses i Milli-Q vann og autoklaveres.

Trypsin

8 g NaCl (~99 %, Prolab via VWR)

200 mg KCl (99,5 %, 1.04936.1000, Merck)

1,4 g Na₂HPO₄ (99,5 %, 1.06580.1000, Merck)

240 mg KH₂PO₄ (99 %, 1.05104.1000, Merck)

1,0 g D-glukose (180, 16 g/mol, 1.08337.1000, Merck)

dH₂O til 1000 ml.

Kjemikaliene løses og 10 g Trypsin250 (215240, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

tilsettes og løses under magnetomrøring i 37° termostat i 1 time. Sterilfiltreres og oppbevares i dypfryser.

2.1.2.4 Cellepellet

Sentrifuger

Megafuge 1.0 (Heraeus Instrument)

Mikrofuge® R Centrifuge (Beckman)

Maxi dry lyo (Medinor)

2.1.2.5 Materialer relatert til høyrensing av virus

Na L-Tartrat Dihydrat (99+ %, 22,872-9, Sigma-Aldrich)

Na L-Tartrat Dihydrat løsning 1

41,5 g Na L-Tartrat Dihydrat, juster til 100 ml med PBS og autoklaveres

Na L-Tartrat Dihydrat løsning 2

17,8 g Na L-Tartrat Dihydrat, 30 ml 100 % glycerol, justeres til 100 ml med PBS og autoklaveres

Sentrifuger

Sorvall® Instruments sentrifuge RC5C

Beckman Optima™ LE-80K Ultrasentrifuge

2.1.3 Materialer relatert til HPLC analyse

Mobilfase, HPLC kolonne, HPLC maskin (Agilent 1100 series)

Mobilfase

Ammoniumdihydrogenfosfat (115,03 g/mol, HPLC egnet, 1.01126.0500, Merck)

100 % Methanol (32,04 g/mol, 1.06018.2500, Merck)

Destillert H₂O

HPLC kolonne

Partisil 10µm SAX 250 * 4,6 mm (P10SAX-250A, Teknolab AS, Trollåsen, Norge)

2.1.4 Materialer relatert til DNA isolering og radioaktiv måling av ganciklovir trifosfat

2.1.4.1 Materialer relatert til DNA isolering

DNAzol® Genomic DNA isolation reagent (DN 127, 5645 Montgomery Rd., Cincinnati, Ohio 45212, USA)

96 % etanol (rektifisert sprit, inneholder etanol, Arcus AS, Oslo)

75 % etanol (Fortynnet 96 % etanol i sterilt vann)

8mM NaOH (40,00 g/mol, 1.06.498.1000, Merck)

NaOH

2M NaOH (40,00 g/mol, 1.06.498.1000, Merck) fortynnes til 8mM med sterilt vann etter behov.

Sentrifuger

Eppendorf Minispin

Mikrofuge® Centrifuge (Beckman)

2.1.4.2 Materialer relatert til kvantifisering av DNA

GeneQuant II, RNA/DNA calculator (10 mm lysvei, Pharmacia biotech (GE-healthcare))

PRÄZISIONS-KÜVETTEN (10 mm)

2.1.4.3 Materialer relatert til radioaktiv måling

Ultima Gold™ telleveske (5L, 6013159, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA)

Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyzer (Packard Acanberra Company, 800 Research Company, Meriden, CT 06450)

2.2 Metoder

2.2.1 Metoder relatert til generelt cellekulturarbeid

Laging av cellekultur medium med 20 %, 10 % og 2 % FCS

- 500 ml MEM tilsettes 500 µl garamycin, 500 µl fungizone, 500 µl benzylpenicillin, 5 ml L-glutamin og 15 ml natrium bikarbonat.
- 500 ml DMEM tilsettes 500 µl garamycin, 500 µl fungizone, 500 µl benzylpenicillin.
- De to mediene blandes 1:1.
- Mediet tilsett FCS slik at det blir enten 20 %, 10 % eller 2 % FCS i mediet.

Nedfrysing av celler

Formål med nedfrysing er å sikre backup før evt. infeksjoner samt unngå for mange passasjer av cellene (spontane transformasjoner).

Man kjøper celler med lav passasje (gjerne passasje nummer 11 eller 12) og deretter splittes de til 1:3 og lar dem vokse i ca to døgn slik at cellene er i vekstfase før de fryses ned i flytende nitrogen.

Tilsett membranstabilisator DMSO (NB: karsinogent). Cellene i væskefase tåler DMSO meget dårlig, slik at denne tiden bør være minimal. Cellesuspensjonen holdes kjølig på is).

Frys ned ca 1 millioner celler/ml ampulle slik at det er nok til en 75 cm² flaske.

Stamløsning 1: 50 % kalveserum i medium (løsningen holdes kjølig på is).

Stamløsning 2: 20 % DMSO i medium med kalveserum (løsningen holdes kjølig på is, bland godt).

- Sentrifuge (4°C) og iskaldt medium.
- Merk fryseampullene og sett dem i fryser.
- Resuspender cellene etter splitting i kjent volum iskald stamløsning 1 (50 % serum). Beregn 0,5 ml per fryseampulle.
- Ta ut fryseampullene, skru av lokkene (arbeid sterilt)
- Bland til likt volum med iskald stamløsning 2 slik at endelig DMSO-konsentrasjon blir 10 %. Bland godt, fordel 1ml i hver fryseampulle og skru ampullen godt til. Vær meget raskt her.
- Sett umiddelbart i -70°C-fryser. Stå her i minimum 1-2 timer eller over natt før overføring til N₂-tank.
- Tin en ampulle dagen etter for å sjekke viabiliteten.

Tining av celler

Celler tåler som nevnt DMSO meget dårlig i væskefasen, og det er viktig at DMSO fortynnes ut eller vaskes bort i kaldt medium snarest.

- Bruk kjølesentrifuge, kaldt medium og 10 ml sentrifugerør med medium på is.
- Tin ampullen raskt (ca 1 min) i 37°C-vannbad, beveges hele tiden. Da det bare er en knappenålsstor isklump igjen, dusjes ampullen med sprit og innholdet helles over på sentrifugerøret med iskaldt medium.
- Spinn ned ved 259 g i 5 minutter ved 4°C.
- Sug av supernatanten, og resuspender cellene i kaldt medium og så ut i dyrkningsflaske. Her brukes 20 % FCS og 1,5 % bikarbonat i mediet.
- Skift medium dagen etter for å fjerne celledetrit. Her kan man bruke enten 10 % eller 20 % FCS og 3 % bikarbonat i mediet.

Celledyrking og vedlikehold av cellene

Til splitting av celler bruker man medium med 10 % føtalt kalveserum (FCS) og til vedlikehold av cellene brukes medium med 2 % FCS. Cellene splittes en gang per måned og da splittes de 1:3 (man kan også telle cellene i tellekammer og så ut 1 million celler i en 75 cm²). For å vedlikeholde cellene skiftes mediet ut to ganger i uken.

Cellene vokser i 37°C inkubatorskap med 5 % karbondioksid og 95 % luftfuktighet.

Cellesplitting

Tilsett litt versen til celleflasken slik at cellene er dekket med versen og hell deretter av versenen (vask) og tilsett en blanding av versen og trypsin (5ml trypsin per 100ml versen) slik at cellene er dekket (trypsinering). Hell denne løsningen raskt av og la liten mengde av løsningen være i flasken igjen. Celleflasken inkuberes ved 37°C i cirka 5 minutter til cellene løsner fra flaskebunnen.

Cellene resuspenderes i ønsket mengde medium med 10 % FCS og såes ut i nye flasker (25ml medium per 75cm² flaske).

Celletelling

Overfør 20 µl cellesuspensjonen til Bürker tellekammer og tell cellene i lysmikroskopet (10* objektiv og 10* okular, Se appendix 3 for detaljer).

2.2.1.1 Metoder relatert til høyrensing av virus (Mg/Na-Tartrat-gradient)

Prosedyre

- Fordel mediet fra åtte flasker eller to 850 cm² rollere HCMV-infiserte HE-celler med opp mot 100 % CPE (cytopatogen effekt) på 50ml Falcon rør. Sentrifuger ved 4°C ved 1619 g i 10min.
- Overfør supernatanten til sterile Nalgene sentrifugerør og sentrifuger i Sorvall ved 4°C, i 90 min ved 47816g.
- Lag en gradient av tartrat-glycerol i etanol-sterilisert ultrasentrifugerør, med 1,32ml løsning 1 og 1,65ml løsning 2. Ta en gang til med 1,32ml løsning 1 og 1,65ml løsning 2. La ekvilibrere i ca 30 min.
- Hell av supernatanten etter sentrifugeringen. Sug av siste rester av mediet med pipette. Løse pelletten i til sammen 0,5ml PBS. Tilsett forsiktig på toppen av gradienten.

- Sentrifuger (4°C) i ultrasentrifuge i 60 min ved 156800 g.
- Sug opp øverste skarpe, hvite bånd = viruspartikler (under klumpete celledbris-bånd) og nederste brede, diffuse bånd = dense bodies. Enkelte ganger kan også et tynt hvitt bånd være synlig mellom det kornete celledbris-båndet og det melkehvite skarpe virusbåndet. Dette er non-infectious enveloped particles (NIEPs).
- Fortynn til ca 30 ml med kald DMEM i et sterilt Nalgene sentrifugerør og sentrifuger 90 minutter ved 4°C i 47810 g.
- Løse pelletten i 10 ml DMEM med gentamicin og 2 % FCS. Fordel på fryseampuller. Husk å lage til en ampulle for titrering (150 µl) og frys ned i -70°C-fryseren. Fordel 10 ml DMEM med garamycin og 2 % FCS i tilsvarende volumer for mock.
- Så ut HE-celler (helst passasje under 20) i ett 24 brønners brett + ett 6 brønners brett. La cellene vokse til ca.80-90 % konfluens. Lag fortynningsrekke av tint titerampulle fra 10^{-1} - 10^{-7} i medium med 2 % FCS.
- I et 24 brønners brett så ut 100 µl i tre parallelle brønner av 10^{-2} - 10^{-7} fortynning + tre brønner med 100 µl ufortynnet mock, og tre brønner med bare 2 % dyrkningsmedium (DMEM + MEM med 2 % FCS). Eventuelt kan også 10^{-8} fortynning lages med tre brønner for denne. Bruk da to brønner for mock, ett brønn for medium. Inkuber i 1 time og 30 min i 37°C inkubatorskap med 5 % karbondioksid. Hell av mediet og tilsett 1 ml nytt medium. Cellene vedlikeholdes som nevnt under vedlikehold av celler
- I tre brønner hver i 6 brønners brett så ut 100 µl av 10^{-5} og 100 µl av 10^{-6} fortynning + 400 µl medium med 2 % FCS i hver brønn. Inkuber i 1 time og 30 min i 37°C inkubatorskap med 5 % karbondioksid. Hell av mediet og tilsett 3 ml nytt medium. Cellene vedlikeholdes som nevnt under vedlikehold av celler.
- Etter 10-14 dager kan plaque telles i 6 brønners brettene. Kontroller at disse resultatene stemmer overens med 24 brønners brettet.

2.2.1.2 Metoder relatert til infisering av celler

Den mengde virus som tilsvarer 5 plaque forming unit (PFU) per celle løses i cirka 7 ml medium med 2 % FCS per 175 cm² flaske. Dyrkningsmediet i flasker med celler som skal infiseres helles av. Virusløsningen tilsettes flasken og inkuberes i 37°C inkubatorskap med 5 % karbondioksid. Til kontroll brukes mock infiserte celler. Man tar da like mange ml mock som antall ml med CMV.

2.2.2 Cellearbeid relatert til oppgaven

Til påvisning av GCV-TP med HPLC

Til alle forsøkene ble det brukt HE-celler attende passasje. Til hvert oppsett ble det tatt tre 175 cm² flasker og en 75 cm² flaske med celler. Cellene ble trypsinert og overført i et rør. Videre ble 2,3 millioner celler per 175cm² flaske sådd ut til forsøkene. Cellene vokste i 48 timer (for å få 80 % konfluens) og etter 48 timer ble cellene infisert med CMV på 5PFU per celle. Ett døgn etter infeksjonen ble det tilsatt legemidler til hver flaske (se tabellen 2.2.2.1). I utgangspunktet ble det brukt GCV i terapeutisk konsentrasjon (40 µM)^{33b} til forsøket. Siden man ikke kunne påvise GCV-TP i denne konsentrasjonen ble det valgt å bruke 300µM GCV og lamivudin som er beskrevet i artiklene av Agbaria R et.al,²⁸ og Stephen Kewn et al.,²⁷.

Tabell 2.2.2.1 Oppsett av legemidler tilsatt CMV infiserte og mock infiserte celler til HPLC analyse.

Cellekulturflasker med legemidler	CMV infiserte celler	Mock infiserte celler
Cellekulturflasker med GCV	300µM GCV og det ble brukt tre prøvereplikater	300µM GCV og det ble brukt en prøvereplikat
Cellekulturflasker med lamivudin	300µM lamivudin og det ble brukt tre prøvereplikater	300µM lamivudin og det ble brukt en prøvereplikat
Cellekulturflasker med GCV og lamivudin	300µM GCV og 300µM lamivudin og det ble brukt tre prøvereplikater	300µM GCV og 300µM lamivudin og det ble brukt en prøvereplikat
En cellekulturflaske med GCV og lamivudin (kontroll for internstandard)	300µM GCV, 300µM lamivudin og det ble brukt en prøvereplikat	

Cellene ble trypsinert 24 timer etter at legemidlene ble tilsatt og cellepelleten ble videre behandlet for forsøket i henhold til metoden. Dette forsøket ble gjort på tre ulike dager (paralleller).

Til påvisning av inkorporering av tritiert GCV (H³-GCV) i virus-DNA

Til alle forsøkene ble det brukt HE-celler syttende passasje. Det ble sådd ut seks 75 cm² flasker med celler som ble infisert med CMV og tre 75 cm² flasker til mock infisering. I hver 75 cm² flaske ble det sådd ut 1 millioner celler. Cellene vokste i 4 dager og deretter ble de

infrisert med henholdsvis CMV (2,5 PFU per celle) og mock. Etter to døgn ble legemidlene tilsatt. H³-GCV på en konsentrasjon 1,0mCi/ml; 43,3µg/ml ble fortynnet 1:10. Det ble tilsatt 250 µl av den fortynnede H³-GCV til prøvene (se tabell 2.2.2.2).

Tabell 2.2.2.2 Oppsett av legemidler tilsatt CMV infiserte og mock infiserte celler til radioaktiv måling av H³-GCV-TP i CMV-DNA.

Cellekulturflasker med legemidler	CMV infiserte celler	Mock celler
Cellekulturflaske med H ³ - GCV og lamivudin	250µl 0,1 mM radioaktiv H ³ - GCV og 300µM lamivudin. Det ble brukt tre prøvereplikater	250µl 0,1 mM radioaktiv H ³ - GCV og 300µM lamivudin. Det ble brukt tre prøvereplikater
Cellekulturflaske med kun H ³ - GCV.	250µl 0,1 mM H ³ - GCV. Det ble brukt tre prøvereplikater	
Cellekulturflaske med lamivudin	300µM lamivudin. Det ble brukt kun en prøvereplikat	

To døgn etter at legemidlet ble tilsatt, ble cellene trypsinert og cellepelleten ble behandlet videre til forsøket som er beskrevet i metoden.

2.2.3 Cellepellet

Til HPLC

- HE-celler ble trypsinert og vasket i PBS.
- Cellesuspensjonen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert i Megafuge 1.0 ved 404 g i 10 minutter ved 4°C for å pelletere cellene.
- Supernatanten ble fjernet og cellene i pelleten ble lysert ved å fryse de ved -70°C i to minutter. Deretter ble pelleten tilsatt 300µl 60 % metanol for å reløse GCV-TP og suspensjonen ble overført til ependorfrør.
- Til suspensjonen ble det tilsatt aciklovir (ACV) (1 mg/ml) som intern standard. Til første intraday forsøk ble det tatt 5 µl intern standard og til de to andre intraday forsøkene ble det tatt 10 µl intern standard. En prøve med CMV infiserte celler ble beholdt uten intern standard.

- Løsningen i eppendorfrøret ble vortex mikset og ble satt på varmeblokk i to minutter ved 95°C.
- Prøvene ble så sentrifugert (15300 g i 4 minutter) i Mikrofuge® R Centrifuge.
- Supernatanten ble overført til nytt eppendorfrør og prøven ble frysetørket i Maxi dry lyo og fryst ned i -20°C til de skulle analyseres med HPLC metoden.

Til påvisning av inkorporering av H³-GCV i virus-DNA

- He-celler ble trypsinert og vasket i PBS (man kan også bruke 0,85 % NaCl).
- Cellesuspensjonen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert i Megafuge 1.0 ved 1500 rpm i 10 min ved 4°C for å pelletere cellene.
- Supernatanten ble fjernet, pelleten ble brukt videre til DNA isolering.

2.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

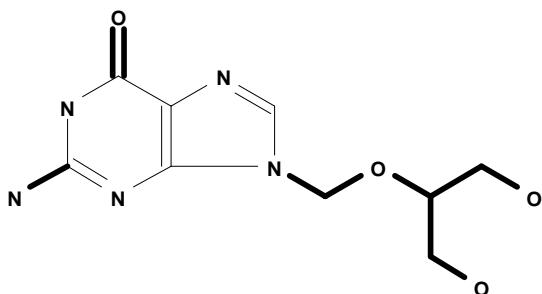
Metoden som ble benyttet i oppgaven baserer seg på en tidligere publisert metode av Agbaria R. et al.,²⁸ der ammoniumdihydrogenfosfat buffere er brukt som mobilfase. Den publiserte artikkelen er igjen basert på en artikkel av Stephen Kewn et al.,²⁷ hvor kaliumdihydrogenfosfat buffere ble brukt som mobilfase. Kaliumdihydrogenfosfat buffere ble i utgangspunktet benyttet i oppgaven, men på grunn av stor UV-absorbans for bufferen ble mobilfasen byttet ut til ammoniumdihydrogenfosfat buffere.

Prøveopparbeidelse til HPLC er gjort som beskrevet under avsnitt 2.2.3. Ekstraktet ble frysetørket. Pulveret (inneholder blant annet GCV-TP og ACV) ble løst med 100 µl destillert vann (prøveløsning) til HPLC analyse og 50 µl av løsningen ble injisert til HPLC injektoren. Den relativ-kvantitative bestemmelsen i HPLC analysen er basert på å sammenligne topphøydeforholdet mellom den interne standarden (ACV) og GCV-TP.

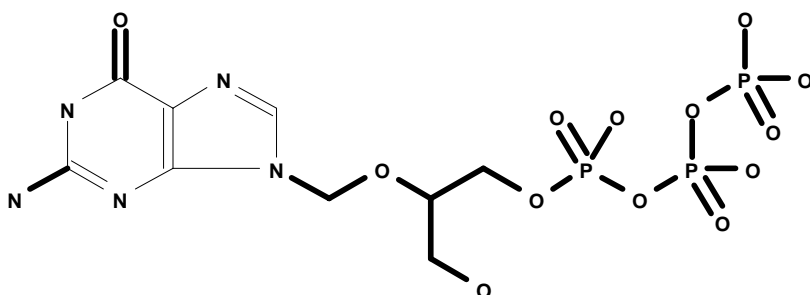
Separasjonsprinsippet brukt i oppgaven er sterk anionebyttechromatografi hvor Partisil 10µm SAX 250 * 4,6 mm kolonnen er positivt ladet. GCV-TP og lamivudin-TP er negativt ladet i løsningen ved lav pH. De ladede GCV-TP og lamivudin-TP interagerer med motjonen i kolonnen og blir retardert på kolonnen. Stoffene elueres ved hjelp av økt ionestyrke som bryter inone interaksjonene. GCV-TP elueres etter 54 minutter, mens ACV elueres etter 4,1 minutter. Lamivudin-TP elueres etter 53 minutter.

(se kjemiske strukturer under).

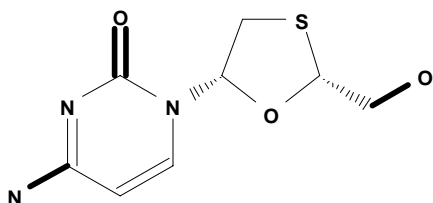
Ganciklovir



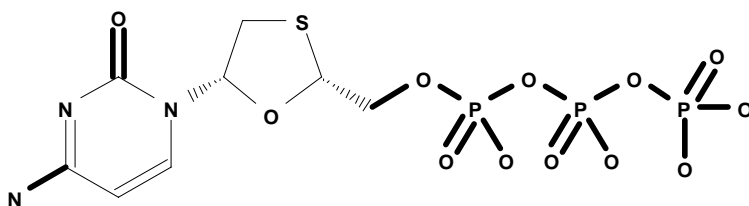
Ganciklovir trifosfat



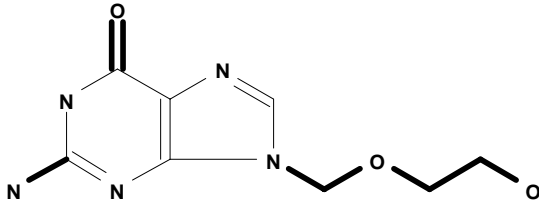
Lamivudin



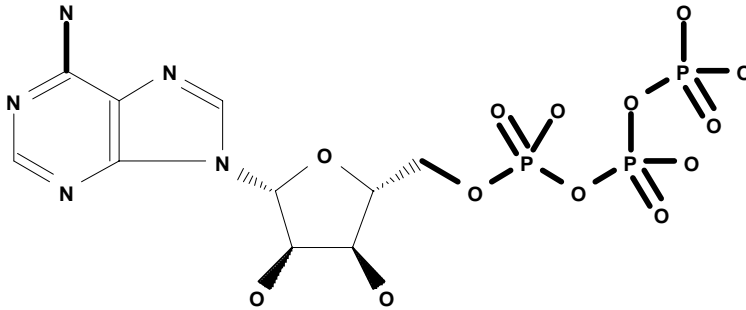
Lamivudin trifosfat



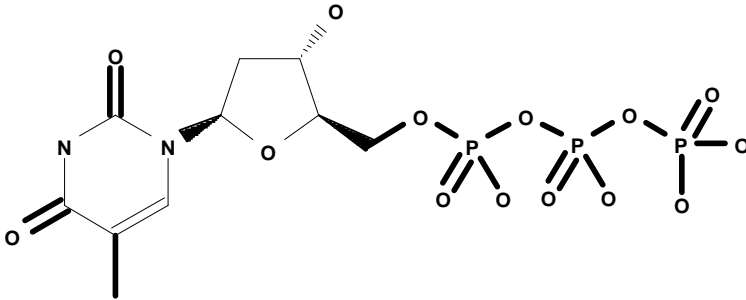
Aciklovir



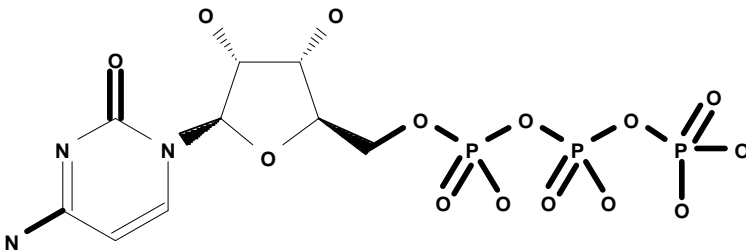
Adenosin 5'-(tetrahydrogen trifosfat) (ATP)



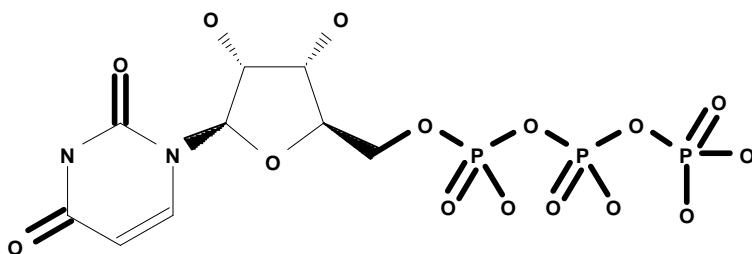
Tyminidin 5'-(tetrahydrogen trifosfat) (TTP)



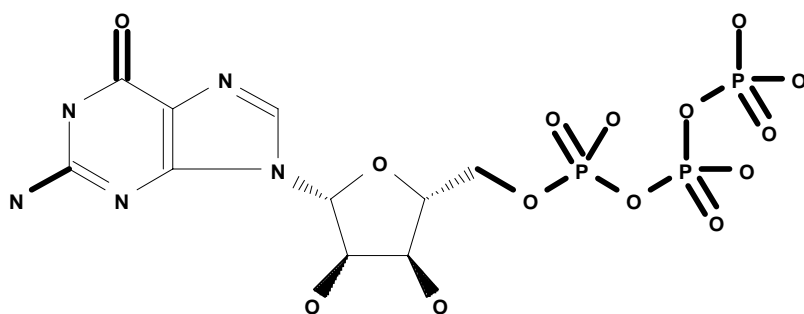
Cytidin 5'-(tetrahydrogen trifosfat) (CTP)



Uridin 5`-(tetrahydrogen trifosfat) (UTP)



Guanosin 5`-(tetrahydrogen trifosfat) (GTP)



Elueringen med ammoniumdihydrogenfosfat buffere ble gjort på følgende måte:

Buffer A: 0,02 M ammoniumdihydrogenfosfat løsning i nativ pH.

Buffer B: 0,7 M ammoniumdihydrogenfosfat løsning i nativ pH + 10 % metanol.

Løsning C: destillert vann til HPLC (til kolonne vask).

Løsning D: metanol (til kondisjonering av kolonnen).

Første dags prøver (*intraday run 1*) analysert med buffergradienten som er vist i tabellen under (se tabellen 2.2.4.1).

Tabell 2.2.4.1 gradienteskjema for HPLC analysen med ammoniumfosfatbuffere, analyselengde på 90 minutter.

Tid	% Buffer B	% Buffer A
0,00	0,0	100,0
5,00	0,0	100,0
42,00	67,0	33,0
75,00	100	0,0
76,00	100	0,0
76,10	0,0	100,0
90	0,0	100,0

Analysering i 90 minutter ga dårlig separasjon og derfor ble analysemetoden modifisert og endelig lengde på en analyse ble 135 minutter. Prøvene på dag to og tre (*parallel 2 og 3*) ble analysert med buffergradienten som er vist i tabell 2.2.4.2.

Tabell 2.2.4.2 gradientskjema for HPLC analyse med ammoniumfosfatbuffer, analyselengde på 135 minutter.

Tid	% Buffer B	% Buffer A
0,00	0,0	100,0
5,00	0,0	100,0
42,00	67,0	33,0
108,00	100	0,0
109,00	100,0	0,0
109,10	0,0	100,0
135,00	0,0	100,0

Stoffene ble relativkvantifisert ved hjelp av en UV detektor. Bølgelengden som ble benyttet til analysen er 254 nm.

2.2.5 Metoder relatert til DNA isolering og radioaktiv måling av GCV-TP

2.2.5.1 DNA isolering

- Cellepelleten ble tilsatt 250 µl DNAzol (lysat) og cellene ble lysert ved å passere lysatet flere ganger gjennom pipetten (det er beregnet 1ml lysat per 10^7 celler). Løsningen ble overført til eppendorfrør.
- De lyserte cellene ble sentrifugert i Mikrofuge® Centrifuge (Beckman)
- i 10000 g i 10 minutter (temperatur 4°C).
- Supernatanten ble overført til nytt eppendorfrør og tilsatt 750 µl 96 % etanol og røret ble snudd 6-8 ganger opp og ned slik at alt ble blandet.
- Røret ble lagt vertikalt i 3 minutter (man vil nå se DNA trådene).
- Deretter ble røret sentrifugert i Eppendorf Minispin i 5000 g i 5 minutter og supernatanten ble fjernet (temperatur 4-25°C).
- Presipitatet ble vasket to ganger med 0,8 ml 75 % etanol. Til hver vask ble DNA suspendert i etanol ved å snu røret opp og ned 3-6 ganger. Røret ble stående vertikalt i 1 minutt. Videre ble all væsken fjernet slik at det kun var presipitatet igjen i røret.

- Presipitatet ble løst opp ved å tilsette 300 μ l 8mM NaOH.

2.2.5.2 Kvantifisering av DNA

Nukleinsyrer absorberer UV-lys og har et absorpsjonsmaksimum ved 260 nm. Man måler absorbansen på 260 nm og 280 nm. Ratioen av absorbansene (A_{260}/A_{280}) gir et mål på hvor ren DNA prøvene er. DNA ratio til den isolerte DNA vil ligge mellom 1,6-1,9 avhengig av molekylvekten til DNA (20-100 kb). Molekylvekten til DNA vil være avhengig av deling av DNA i biter under lysering, homogenisering og solublisering av presipitatet. Det isolerte DNA inneholder noe RNA. Hvis reduksjon av RNA-innhold under 3 % er nødvendig, må prøven sentrifugeres ved 10000 g i 10 minutter en gang til.

2 μ l av DNA løsningen ble fortynnet med 98 μ l MQ-vann og DNA mengden ble målt ved hjelp av GeneQuant II, RNA/DNA calculator.

2.2.5.3 Radioaktiv måling av H^3 - GCV

Væske scintillasjonsteller (Liquid Scintillation Counting) er en analytisk teknikk som er brukt for telling av radioaktivitet. Når man tilsetter Ultima GoldTM tellevæske til den radiomerkede prøven, konverteres den kinetiske energien av nukleær emisjon i prøven til emitterte fotoner. Resultatet utgis som desintegrasjon per minutt (DPM) i displayet.

Tritium er et radioaktiv isotop til hydrogen. Kjemisk er tritium som hydrogen, men med overskudd av nøytroner i sin kjerne. Nedbrytningen av nukliden resulterer i en emisjon av to partikler, et elektron kalt beta-partikkel og et nøytrino. De to partiklene frigjøres samtidig og bærer med seg sin nedbrytningsenergi fra kjernen. Energien til beta maksimum er 18.6 keV (kiloelektron volt) og denne energien benyttes i væske scintillasjonsteller. Beta-partikler utleverer sin energi til tellevæsken ved kollisjon. Tellevæsken har høy tetthet og beta-partikler til tritium har kort rekkevidde. Derfor vil hele den kinetiske energien til beta-partiklene utleveres til tellevæsken.

Tritium merket ganciklovir har halveringstid på 12.4 år. Fordi tritium har lav beta-energi, er det vanskelig å kontrollere stoffet direkte. Det er derfor viktig å arbeide forsiktig for å ivareta arbeidsmiljøets renhet. Tritium kan absorberes gjennom huden og egnede hansker er av den grunn nødvendig for å beskytte huden godt. En DNA-forløper som for eksempel tritiert tymidin, bør behandles mer toksisk enn tritiert vann, fordi aktiviteten delvis er konvertert inn i cellekjernen.

Den resterende DNA løsningen fra DNA isoleringen ble blandet med 2 ml tellervæske og radioaktiviteten ble målt.

2.2.6 Data behandling

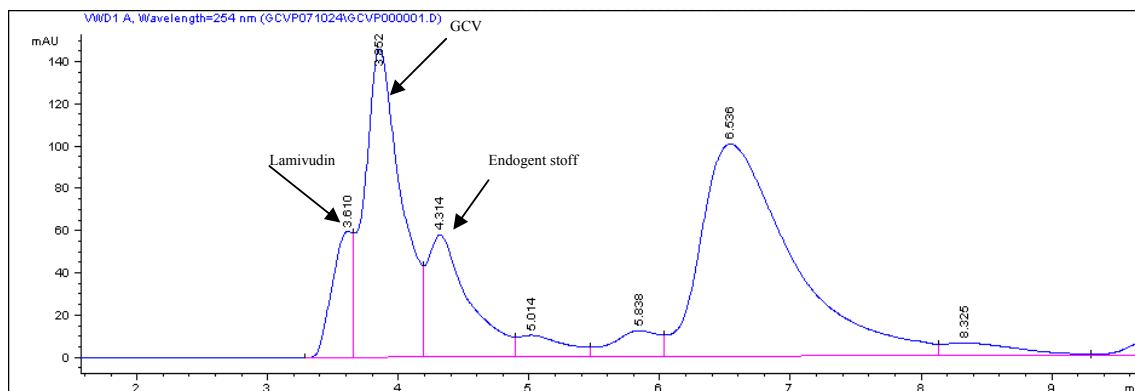
Resultatene ble oppgitt som median og ikke som gjennomsnitt. Antall prøvereplikater i hvert forsøk og totalt antall forsøk er for få til at et gjennomsnitt kunne vært brukt. Totalt ble det gjort tre forsøk (*parallel 1, 2 og 3*) og i hvert forsøk ble det brukt tre prøvereplikater som nevnt tidligere. Det ble også benyttet topphøydeforholdene mellom GCV-TP og ACV istedenfor arealforholdene. Grunnen til dette var at både ACV og GCV-TP i prøvene ikke hadde grunnlinjeseparasjon.

3 Resultater

3.1 HPLC metodevalidering

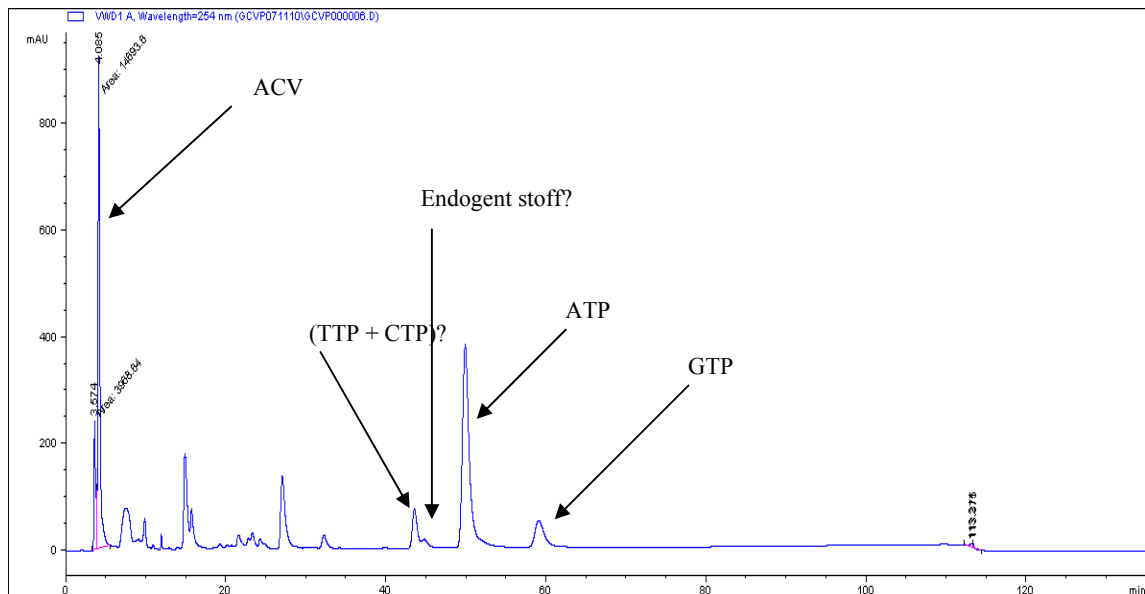
Kromatogrammer for rene stoffene ACV, GCV, lamivudin og blanding av rene nukleotider CTP, TTP, ATP og GTP viste grunnlinjeseparasjon unntatt CTP og TTP. Kromatogrammene for de rene stoffer er vist i appendix 4. Legemidlene ACV, lamivudin og GCV hadde retensjonstider henholdsvis 4,1 minutter, 3,7 minutter og 3,9 minutter (appendix 4). CMV infiserte celler tilsatt både GCV og lamivudin viste at stoffene ikke var grunnlinjeseparert og i tillegg ble et endogent stoff eluert ved en retensjonstid på 4,3 minutter (figur 3.1). Nukleotidene ATP og GTP hadde retensjonstider henholdsvis 51,2 minutter og 59,7 minutter. CTP og TTP ble eluert etter 42,7 minutter, men de var ikke separert (appendix 4). UTP ble ikke analysert fordi stoffet ikke var tilgjengelig. Retensjonstidene for GCV-TP og lamivudin-TP er henholdsvis 55,4 minutter (figur 3.3) og 53,2 minutter (figur 3.4).

Figur 3.1 CMV infiserte celler GCV og lamivudin, men ikke internstandard ACV.

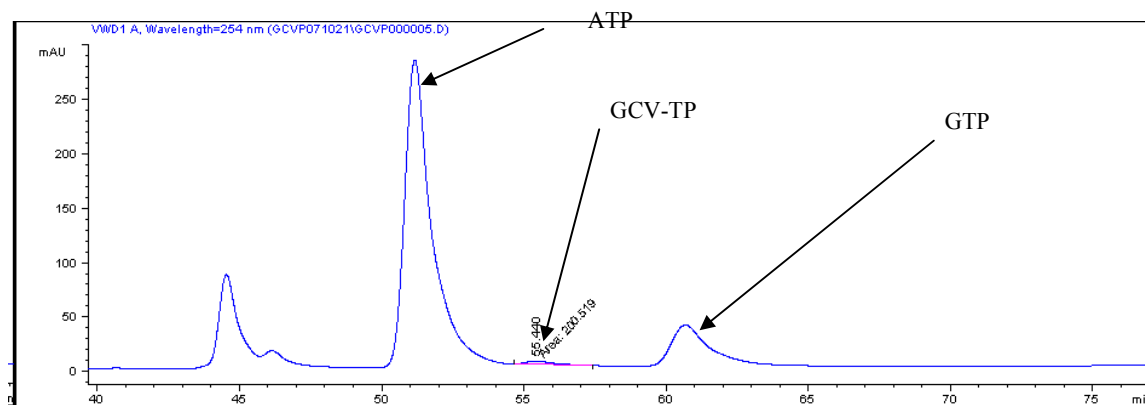


Figuren 3.1 viser at det er et endogent stoff som har en retensjonstid på 4,3 minutter. Dette stoffet vil koelueres med ACV og Utgjør cirka 3 % av topphøyden til ACV-toppen.

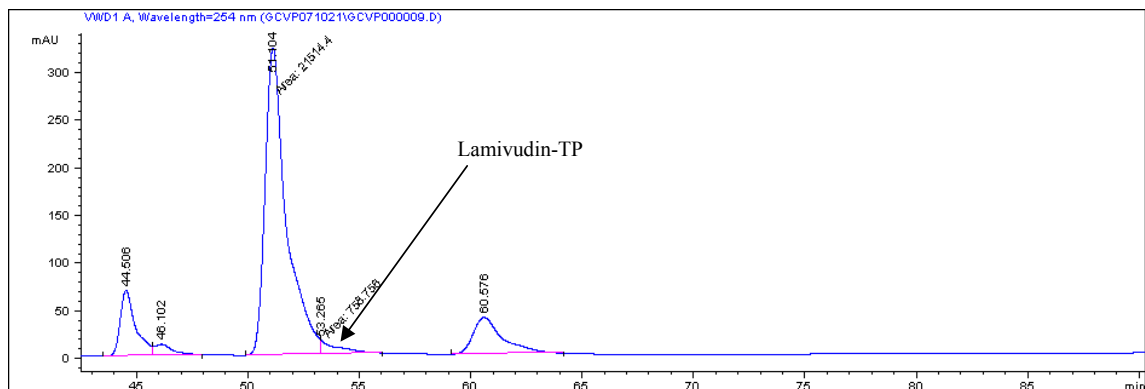
Figur 3.2 Mock infiserte celler tilsatt GCV.



Figur 3.3 CMVinfiserte celler tilsatt GCV.

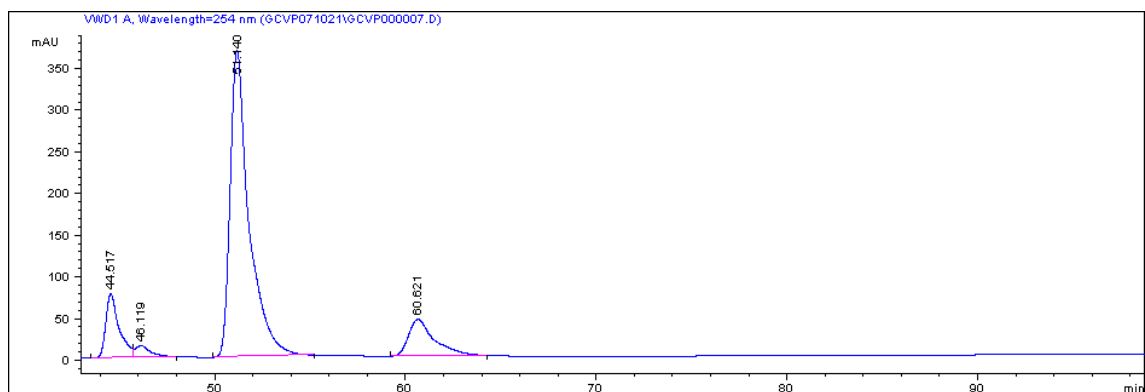


Figur 3.4 Mock infiserte celler tilsatt lamivudin.



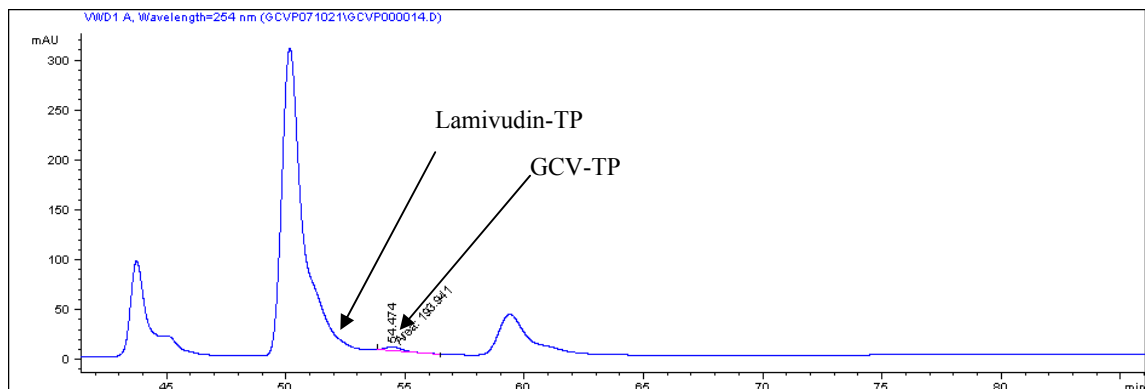
Deteksjon av GCV-TP (figur 3.3) og lamivudin-TP (figur 3.4) var spesifikke da ingen topper var til stede i mock celler (figur 3.5). Det ser ut som toppene for GCV-TP og lamivudin-TP er separert ut i fra det man ser i figur 3.6. GCV-TP og lamivudin-TP var ikke separert i analyselengde på 90 minutter (appendix 4). Lamivudin-TP produksjon er uavhengig av virus enzymet da toppen ble påvist også i mock celler (figur 3.4).

Figur 3.5 Mock infiserte celler tilsatt ingen legemidler.



Figur 3.5 er en kontroll for figur 3.4. Det er ingen topp ved retensjonstiden 53 minutter.

Figur 3.6 CMV infiserte celler tilsatt GCV og lamivudin.



3.2 Konsetrasjoner av GCV-TP i cellene

GCV-TP konsentrasjon er 15-35 % høyere når GCV koinkuberes med lamivudin sammenlignet med når GCV inkuberes alene (tabell 3.1). GCV-TP i mock infiserte celler tilsatt de to legemidlene var ikke detekterbart.

Tabell 3.1 GCV-3P konsentrasjoner i CMV infiserte celler (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) for tre paralleller. Hver parallell ble det analysert i triplikater.

	GCV	GCV + lamivudin
Parallell 1 *	$6,5 * 10^{-3}$	$9,9 * 10^{-3}$
Parallell 2	$3,5 * 10^{-3}$	$4,0 * 10^{-3}$
Parallell 3	$3,9 * 10^{-3}$	$4,6 * 10^{-3}$
Median	$3,7 * 10^{-3}$	$4,3 * 10^{-3}$

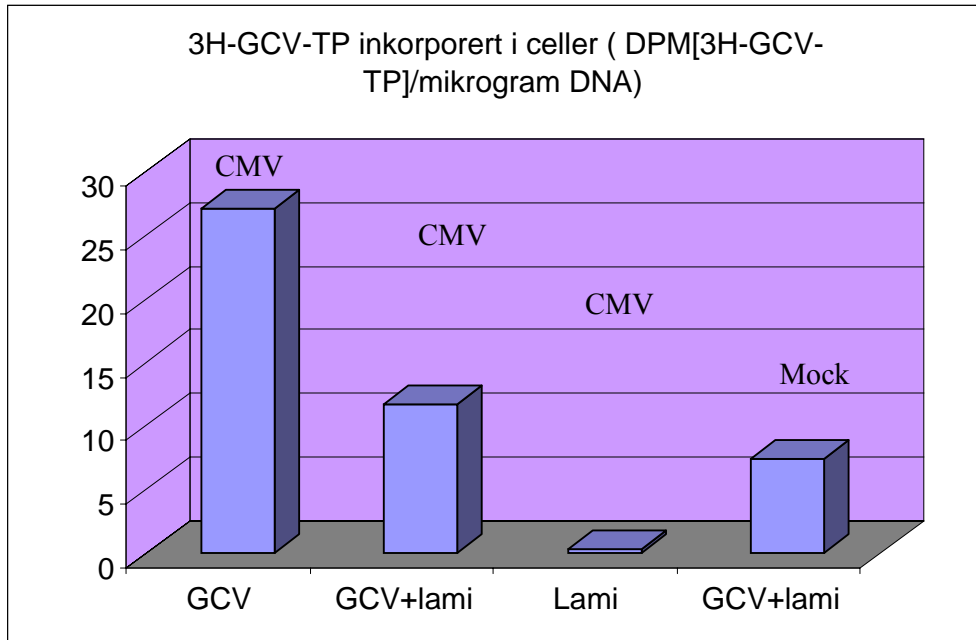
* Parallell 1 er analysert i kun 90 minutter mens de øvrige i 135 minutter (se materialer og metode).

3.3 Inkorporering av H³-GCV-TP i virus DNA

Inkorporering av H³-GCV i virus DNA ble 57 % lavere når cellene var koinkubert med både GCV og lamivudin sammenlignet med cellene inkubert med GCV alene (27,2 DPM/ µg DNA versus 11,7 DPM/ µg DNA) (figur 3.3).

Median DPM/ µg DNA i mock infiserte celler tilsatt H³-GCV og lamivudin var 7,44 DPM/ µg DNA.

Figur 3.3 GCV inkorporering i virus DNA. CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV (søyle 1). CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin (søyle 2). CMV infiserte celler tilsatt kun lamivudin (søyle 3). Mock infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin (søyle 4).



4 Diskusjon

Hensikten med dette arbeidet var å finne ut om lamivudin hemmer trifosforyleringen av GCV i CMV infiserte celler. Dette ble undersøkt på to forskjellige måter. For det første ved å måle mengden GCV-TP i cellene ved hjelp av en HPLC-UV metode. Derneft ble det målt mengden H³-GCV som ble trifosforylert og satt inn i CMV-DNA.

4.1 GCV-TP konsentrasjon i CMV infiserte celler

GCV-TP konsentrasjon i celler var på 15-35 % høyere når cellene ble koinkubert med både GCV og lamivudin sammenlignet med cellene inkubert med kun GCV. Dette er motsatt av det man hadde forventet. Parallell 1 analysert med en analyselengde på 90 minutter hadde en GCV-TP konsentrasjon som var 35 % høyere i celler koinkubert med begge legemidlene i forhold til celler kun inkubert med GCV. De andre parallellene (135 minutter analysetid) hadde henholdsvis 15 % og 16 % høyere GCV-TP konsentrasjon når de var koinkubert med begge legemidlene. Parallell 2 og 3 hadde samme analysebetingelser og resultatene viser en antydning til god reproduserbarhet, men det trengs flere undersøkelser for å bekrefte dette. Intraassay presisjon ble ikke målt fordi prøvereplikat volumet var for lite til å analysere flere ganger. Den økte GCV-TP konsentrasjonen i celler koinkubert med både GCV og lamivudin kan skyldes problemer i separasjon av toppene for GCV-TP og lamivudin-TP. Selv om toppene for de to stoffene ser ut til å være separert i figur 3.6, må dette bekreftes ved en sikker identifikasjonstest. Hadde toppene vært høye og smale ville det vært lettere å se på spesifisiteten til kolonnen. I CMV infiserte celler inkubert med GCV alene er det eluert et stoff etter 54 minutter. Det er mest sannsynlig at dette er GCV-TP, da det ikke ble eluert noen stoffer i det tidspunktet, i kontroll cellene. I tillegg kan man se at Agbaria R et.al, i sin artikkel om " Biosynthetic Ganciclovir Triphosphate" ²⁸ har beskrevet at GCV-TP elueres mellom ATP og GTP. Produksjon av lamivudin-TP er uavhengig av virus enzymet ²⁹. Det bekrefter funnene i denne studien. Det er mest sannsynlig at toppen ved 53,2 minutter er lamivudin-TP, fordi lamivudin-TP har struktur likheter med GCV-TP. Retensjonstidene for ATP og GTP produsert i celler er i overensstemmelse med retensjonstidene for ren stoffblanding av nukleotidene. Ren UTP ble ikke analysert, men UTP i følge Agbaria R et.al, ²⁸ skal elueres før CTP. Analyse av ren stoffblanding viste at CTP og TTP ble koeluert. Det er to topper som ligger nær hverandre etter retensjonstiden 42,7 minutter. En av toppene tilhører CTP og TTP, men det trengs en bekreftende test for si hvilken topp som tilhører CTP og TTP. Hvis den lille toppen er CTP og TTP er det mest sannsynlig at den store toppen er UTP. Hvis det motsatte

er tilfelle er den lille toppen noe annet enn et nukleotid og UTP må da produseres i udetekterbar mengde av cellene.

Kromatogram 4.6 i appendix 4 hvor cellene er koinkubert med GCV og lamivudin og analysert i 90 minutter, viser godt at GCV-TP og lamivudin-TP ble koeluert. Dette var årsaken til at de to andre parallellene ble analysert i 135 minutter for å få forbedret spesifisiteten til analysen. Selv om man har forbedret spesifisiteten, antyder resultatene at forbedringen av spesifisiteten ikke var god nok, med mindre lamivudin stimulerer økt GCV-TP produksjon. Resultatene fra inkorporering av radiomerket GCV-TP hadde en reduksjon i inkorporering av H^3 -GCV-TP, der cellene var koinkubert med begge legemidlene. Det er derfor tenkelig at årsaken til høyere konsentrasjon av GCV-TP i celler koinkubert med begge legemidlene skyldes separasjonsproblemer. Det kreves flere parallelle forsøk, flere replikater og sikre identifikasjonstester for å kunne bekrefte dette.

I oppgaven ble ACV brukt som intern standard. ACV har en retensjonstid på 4,1 minutter. Ut i fra det man ser i figur 3.1 vil ACV toppen interegere med både GCV som har en retensjonstid på 3,9 minutter og et endogent stoff som har en retensjonstid på 4,3 minutter. Bidraget fra det endogene stoffet vil utgjøre cirka 3 %. Derimot ville ACV topphøyden påvirkes en god del av GCV toppen. Det kan man se ut i fra figur 3.1 hvor CMV infiserte celler er koinkubert med GCV og lamivudin. Imidlertid var ACV ikke tilsatt. Bidraget i ACV topphøyden fra GCV vil være høyere i mock infiserte celler enn i CMV infiserte celler, da GCV mengden blir brukt i større grad i CMV infiserte celler. På grunn av de nevnte årsakene ovenfor og at ACV tidlig elueres ut av kolonnen er ACV ikke en optimal intern standard. Den ideelle intern standarden for å kvantifisere GCV-TP er et stoff som elueres etter cirka 57 minutter. Eksempelvis ville en modifisert GTP som ikke koeluertes med endogent GTP vært en godt intern standard. En slik intern standard var ikke kommersielt tilgjengelig og det var grunnen til at ACV ble valgt som intern standard. ACV er nesten lik i den kjemiske strukturen til GCV. Det ble vurdert å bruke ACV-MP (aciklovir-monofosfat) som intern standard (ACV-MP er kommersielt tilgjengelig). Fordi separasjonsproblemer var uungåelig innså man at ACV-MP ikke var godt nok som intern standard.

Som kontroll for CMV infiserte celler ble det benyttet mock infiserte celler. HPLC-UV metoden var basert på en tidligere brukt metode publisert av Stephen Kewn, et.al,²⁷, men i stede for radiometrisk deteksjon ble UV-deteksjon benyttet. Kaliumdihydrogen buffere med samme buffergradient som i artikkelen beskrevet av Kewn, et.al,²⁷ ble benyttet som mobilfase. UV-deteksjonen viste at kaliumdihydrogenfosfat buffere hadde et stort bakgrunnsstøy nivå hvor GCV-TP toppen muligens ble eluert. I tillegg var det ikke mulig å

påvise GCV-TP når 40 mM GCV ble inkubert med cellene. Det ble derfor besluttet å ta i bruk ammoniumdihydrogenfosfatbuffere i nativ pH, beskrevet av Agbaria R et.al,²⁸ som mobilfase til resten av forsøket.

I utgangspunktet var det bestemt å måle GCV-TP konsentrasjonen i celler kvantitativt ved hjelp av HPLC-UV. Formålet med den kvantitative målingen var å monitorere den terapeutiske dosen av GCV, dersom man fant en interaksjon mellom GCV og lamivudin. For å kunne validere en metode og dermed konsentrasjonsbestemme stoffer i biologiske materialer, stilles det en del krav som står beskrevet i ”guidance for industry-biomedical method validation”³⁰. For å oppfylle kravene trenger man den såkalte referansesubstansen, men det viste seg at GCV-TP ikke var kommersielt tilgjengelig. Det ble derfor besluttet å gjøre analysene relativt kvantitativt og i første omgang se om det var en interaksjon mellom GCV og lamivudin.

Forsøket ble gjort i HE-celler hvor cellene ble infisert med CMV-AD 169. Det ble også brukt GCV i terapeutisk konsentrasjon (40mM). Konsentrasjonen av GCV ble endret til 300 mM. I denne GCV konsentrasjonen ble det produsert 7,5 nmol/10⁶ celler GCV-TP i murin colon cancer celler transduert med herpes simplex virus-tymidin kinase (MC38/HSV-tk) i følge Agbaria R et.al,²⁸.

HPLC-UV metoden som ble brukt til å bestemme GCV-TP konsentrasjonen har en del svakheter. Noen av svakhetene er nevnt over. I tillegg har metoden andre svakheter som nevnes under.

- Lang analysetid per prøve (135 minutter). Dersom GCV-TP er ustabil (kunne ikke sjekke dette på grunn av mangel på referansesubstansen), vil dette påvirke resultatet.
- Fosfatbuffere er ustabile og derfor ble det lagd nye buffere for hver analysedag.
- Utfelling av fosfatbuffer. På kolonnens ender var det en del saltrester etter hver analyse. Det er ugunstig for analysen og i tillegg vil dette redusere kolonnens levetid.

Celldyrkingen viste stort sett optimal vekst. Når det gjelder antall forsøk er det brukt få paralleller og derfor kunne man ikke bruke dataene til å verifisere om det er en interaksjon eller ikke. På grunn av mangel på tid og begrensning på midler ble det ikke gjort nok antall forsøk. Det er heller ikke tatt nok prøvereplikater. Seks prøvereplikater er minstekravet til analysen³³ og dette ville tilsvare minst nitten prøver per parallell. Det tok over to døgn for å analysere ni prøver, blindprøve og kontroller. Fosfatbuffere er gode vekstmedier til bakterier. På grunn av de nevnte årsaker og begrensninger på midler ble antall prøvereplikater redusert til tre per parallell, hvilket er en begrensning ved denne metoden.

En mulig relevant metode i stede for HPLC-UV, er radiometrisk HPLC. I artiklene skrevet av Stephen Kewn, et al., og G.J. Veal, et al.,^{31,32} er denne metoden brukt i forsøk i forhold til intracellulær trifosforylering av lamivudin og zalcitabin. Hadde man brukt denne metoden, med radiomerket GCV, ville man kunne unngått separasjonsproblemene fra endogene stoffer og lamivudin. Radiomerket GTP kunne vært brukt som intern standard, hvilket ville vært det optimale for denne metoden. Årsaken til at metoden ikke ble brukt var i utgangspunktet å unngå å bruke radioaktivt stoff.

4.2 H³-GCV-TP inkorporering i virus DNA

Undersøkelsen på H³-GCV-TP inkorporering i virus DNA viste over 50 % reduksjon i inkorporeringen når cellene var koinkubert med både lamivudin og H³-GCV sammenlignet med cellene inkubert alene med H³-GCV. Dette svaret passer bedre med den hypotesen som er fremsatt i introduksjonen. Det ble også observert noe inkorporering av H³-GCV-TP i mock infiserte celler, som tyder på at noe GCV-TPV også produseres i uinfiserte celler og inkorporeres i cellenes DNA, med mindre radioaktiviteten skyldes forurensning av radioaktiviteten i DNAet.

Væske scintillasjonstelling ble besluttet tatt i bruk, nokså sent ut i prosjekt perioden, da man innså at man ikke ville få konklusive data fra måling av GCV-TP konsentrasjonen i celler. Hypotesen var at mesteparten av GCV-TP var inkorporert i virus DNA og derfor var det kun lave konsentrasjoner av GCV-TP i celler. Væske scintillasjonstelling sammenlignet med HPLC ligger nærmere den kliniske effekten man ønsker å undersøke. Ved væske scintillasjonstelling ser man på den mengde GCV-TP som inkorporeres i DNA. Det er denne inkorporeringen som har betydning i klinisk sammenheng. Det ble først gjort undersøkelser på den minste mengden DNA, som var nødvendig for undersøkelsen. Man kom fram til at det var gunstig å bruke cirka 2,3 millioner celler. Deretter ble det gjort undersøkelser på den minste mengden H³-GCV, som var nødvendig for å måle radioaktiviteten. Det ble besluttet å bruke 1µM H³-GCV til forsøket. Siden radioaktive forsøk ble tatt i bruk mot slutten av prosjektet, ble denne konsentrasjonen valgt for å være sikker på at det var nok radioaktivitet til telling. Om man hadde hatt mer tid til disposisjon kunne man gått ned i mengden av radioaktiv GCV og funnet den minste mengden som er nødvendig for undersøkelsen. Den radioaktive målingen ble først foretatt ett døgn etter tilsatt H³-GCV. Det viste seg at man måtte vente enda lengre tid for å måle radioaktiviteten i DNA i CMV infiserte celler. Det ble derfor valgt å telle radioaktivitet etter to døgn. I mock infiserte celler derimot kunne man

påvise radioaktivitet etter 24 timer. En mulig årsak til denne forskjellen i inkorporeringen kan være at i virus infiserte celler skjer en celledarrest, noe som ikke skjer i uinfiserte celler. Virus infiserte celler må først begynne å produsere enzymet UL-97 for å kunne omdanne GCV til GCV-TP. Som nevnt i introduksjonen kommer virus replikasjon godt i gang etter 48 timer. Man må derfor se bort i fra hypotesen om at ”mesteparten av GCV-TP var inkorporert i virus DNA og at dette var årsaken til den lave konsentrasjonen av GCV-TP i celler”. En mulig årsak til den lave konsentrasjonen av GCV-TP i celler er at det ikke er mer GCV-TP produksjon enn det som ble målt i celler. En annen mulighet er at UV-detektorens sensitivitet er for lav for GCV-TP. Den sistnevnte påstanden er minst sannsynlig da GCV-TP har mange UV absorberende atomer. Det kan også tenkes at den produserte GCV-TP pumpes aktivt ut av cellen.

Celledyrkningen viste at vekstbetingelsene for cellene ikke var optimale da det fløt en del døde celler i vekstmediet. Det var ikke mulig å finne noen forklaring på dette, da hovedfagsoppgaven hadde sine begrensninger i tid. For at celletallene ikke skulle avvike mellom replikatene, ble cellene i vekstmediet (døde celler) sentrifugert og slått sammen med resten av cellene. Dette var ugunstig da celledetruelse fra døde celler skapte problemer under isolering av DNA. For å fjerne debrisen ble DNA materialet sentrifugert mange ganger. Dette kan være forklaringen til at det ble målt litt lavere ratio (se appendix 4).

Det er kun gjort ett forsøk i tre prøvereplikater med væske scintillasjonsteller, hvilket ikke er nok til å kunne si med sikkerhet at det er en interaksjon. Det må foretas flere forsøk for å kunne verifisere om det er en interaksjon eller ikke.

5 Konklusjon

En sikker konklusjon kan ikke trekkes på grunn av få paralleller, men inkorporering av H^3 -GCV indikerer at lamivudin enten hemmer trifosforyleringen av GCV eller hemmer viruset. Den høye konsentrasjonen av GCV-TP i celler hvor cellene var koinkubert med både GCV og lamivudin er sannsynligvis et spesifisitets problem med overlappende elueringer av GCV-TP og lamivudin-TP. Metode forbedringer må til.

6 Videre Arbeid

Om en fortsettelse av hovedfagsoppgaven hadde vært mulig ville det ideelle ut ifra den nå ervervede kunnskapen ha vært en kombinasjon av metoden væske scintillasjonsteller og radiometrisk HPLC. Det er tidligere nevnt at arbeid med radioaktivitet helst bør unngås, men ut i fra resultatene ser man nå at dette er veien å gå videre.

I dette arbeidet ble det funnet ut at lamivudin hemmer mengden GCV-TP som blir inkorporert i CMV-DNA. Dette kan skyldes to fenomener. For det første at lamivudin hemmer trifosforylering av GCV eller at lamivudin hemmer CMV-replikasjonen. Hvis lamivudin hemmer CMV-DNA-replikasjonen blir det mindre CMV-DNA som kan inkorporere GCV-TP. Det må derfor undersøkes i hvilken grad lamivudin hemmer CMV-DNA-replikasjonen. Det må derfor settes opp følgende forsøk.

1. Måling av CMV-DNA-replikasjon uten tilstedeværelse av medikament.
2. Måling av CMV-DNA-replikasjon ved tilstedeværelse av GCV.
3. Måling av CMV-DNA-replikasjon ved tilstedeværelse av lamivudin
4. Måling av CMV-DNA-replikasjon ved tilstedeværelse av GCV og lamivudin.

Hvis lamivudin hemmer CMV-DNA replikasjonen alene og ved tilsetning av begge medikamenter, indikerer det at redusert inkorporering av GCV i CMV-DNA ved bruk av kombinasjonsbehandlingen først og fremst skyldes lamivudin induisert hemning av CMV-DNA-produksjon og ikke hemmet trifosforylering av GCV.

Tilslutt må man foreta undersøkelser i kliniske CMV-isolater med de dosene pasientene behandles med for eventuelt å regulere dosen.

7 Referanser

1. Piscitelli SC, Rodvold KA. Drug Interactions in infectious Diseases. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005. pp. 1-28, 41-57, 137-177.
2. Richman D, Whitley RJ, Hayden F. Clinical virology. Washington, D.C., 2002. pp. 433 - 455.
3. Reddehase Mattias J, Niels L. Cytomegalovirus. Caister Academic Press, UK, 2006. pp. 1-18, 3-61, 91-108, 152-160, 205-225, 573-602.
4. Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H. Medisinsk Mikrobiologi. Gyldendal Norsk Forlag AS, 2000. pp. 302-31, 318-330, 372-383.
5. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 98(3):269-297.
6. Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Vol. Two: Wolters Kluwer / Littincott Williams & Wilkins 2007. pp. 2702-2757, 2978-3013.
7. Baek MC, Krosky PM, Pearson A, Coen DM, Baek M-C, Krosky PM, Pearson A, Coen DM. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain in human cytomegalovirus-infected cells and in vitro by the viral UL97 protein kinase. *Virology* 2004; 324(1):184-93.
8. Romaker D, Schregel V, Maurer K, Auerochs S, Marzi A, Sticht H, Marschall M. Analysis of the structure-activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49(24):7044-53.
9. Ager-Wick EC. Endringer i mitokondrielle og apoptotiske parametere under Human Cytomegalovirus Infeksjon. Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Vol. Master: Universitetet for Miljø-og Biovitenskap, 2007. pp. 1-105.
10. Rubin RH. New perspective on Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. Indiana University School of Medicine, October 2002.
11. Courcelle CT, Courcelle J, Prichard MN, Mocarski ES, Courcelle CT, Courcelle J, Prichard MN, Mocarski ES. Requirement for uracil-DNA glycosylase during the transition to late-phase cytomegalovirus DNA replication. *Journal of Virology* 2001; 75(16):7592-601.
12. Mndigan MT, Martinko JM. *Brock biology of Microorganisms*. Pearson education international, 2006. pp. 179,248, 274, 278-279, 503, 506.
13. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* 2002; 185(1):20-7.
14. Limaye AP. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 35(7):866-72.
15. Gilbert C, Handfield J, Toma E, Lalonde R, Bergeron MG, Boivin G. Emergence and prevalence of cytomegalovirus UL97 mutations associated with ganciclovir resistance in AIDS patients. *Aids* 1998; 12(2):125-9.

16. Zhong J, Khanna R, Zhong J, Khanna R. Vaccine strategies against human cytomegalovirus infection. *Expert Review of Antiinfective Therapy* 2007; 5(3):449-59.
17. Pungpapong S, Kim WR, Poterucha JJ, Pungpapong S, Kim WR. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clinic Proceedings* 2007; 82(8):967-75.
18. Yim HJ, Lok AS, Yim HJ, Lok AS-F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1):S173-81.
19. Abdool Karim SS, Abdool Karim Q, Gouws E, Baxter C. Global epidemiology of HIV-AIDS. *Infectious Disease Clinics of North America* 2007; 21(1):1-17.
20. Bolovan-Fritts CA, Spector SA. Endothelial damage from cytomegalovirus-specific host immune response can be prevented by targeted disruption of fractalkine-CX3CR1 interaction. *Blood* 2007.
21. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77(8):4588-96.
22. Benhamou Y. Hepatitis B in the HIV-coinfected patient. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: JAIDS* 2007; 45 Suppl 2:S57-65; discussion S66-7.
23. Piroth L, Sene D, Pol S, Goderel I, Lacombe K, Martha B, Rey D, Loustau-Ratti V, Bergmann JF, Pialoux G, Gervais A, Lascoux-Combe C, Carrat F, Cacoub P. Epidemiology, diagnosis and treatment of chronic hepatitis B in HIV-infected patients (EPIB 2005 STUDY). *AIDS* 2007; 21(10):1323-31.
24. Stockley IH. *Stockley's Drug Interactions*. Pharmaceutical Press, 2002. pp. 1-14.
25. Walker R, Edwards C. *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Churchill Livingstone, 2003. pp. 21-30.
26. Reid JL, Rubin PC, Walters MR. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Blackwell Publishing, 2006. pp. 3-23, 101-189.
27. Kewn S, Veal GJ, Hoggard PG, Barry MG, Back DJ. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro. *Biochemical Pharmacology* 1997; 54(5):589-595.
28. Agbaria R, Candotti F, Kelley JA, Hao Z, Johns DG, Cooney DA, Blaese RM, Ford H. Biosynthetic Ganciclovir Triphosphate: Its Isolation and Characterization from Ganciclovir-Treated Herpes Simplex Thymidine Kinase-Transduced Murine Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289(2):525-530.
29. Tørisen HM. *Felleskatalogen*. Fagbokforlaget, 2007. pp. 1887-1888.
30. *Guidance for industry - Biomedical Method Validation*, US Food and Drug administration, may 2001.
31. Kewn S, Hoggard PG, Sales SD, Johnson MA, Back DJ, Kewn S, Hoggard PG, Sales SD, Johnson MA, Back DJ. The intracellular activation of lamivudine (3TC) and determination of 2'-deoxycytidine-5'-triphosphate (dCTP) pools in the presence and absence of various drugs in HepG2 cells. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2000; 50(6):597-604.

32. Veal GJ, M.G.Barry, D.J.Back. Zalcitabine (ddC) phosphorylation and drug interactions. Department of Pharmacology & Therapeutics, University of Liverpool 1995; 6:379-384.
33. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, 2004. pp. 53-66.
- 33b. Scott J, Partovi N, Ensom M. Ganciclovir in solid organ transplant recipients. Faculty of Pharmaceutical Science, 2004. pp. 68-77.

8 **Apedix**

8.1 Apendix 1

Forkortelser

ACV: Aciklovir

AD169: Cytomegalovirus laboratorie stamme

AIDS: Acquired immuno deficiency syndrom

ALAT: Alaninaminotransferase

ATP: Adenosin trifosfat

A_{is}: Topphøyde for aciklovir

A_p: Topphøyde for ganciklovir trifosfat

CMV: Cytomegalovirus

CTP: Cytidin trifosfat

CPE: Cytopatogen effekt

D+/R: Seronegativ mottaker som har fått seropositiv organ

DNA: Deoxyribo nucleic acid

dNTP: Deoxyribo nukleosider

DMEM: Dulbecco`s Eagle Medium

DMSO: Dimethyl sulphoxide

DPM: Desintegrasjon per minutt

EBV: Epstein-Barr virus

MEM: Minimum Essential Medium

FCS: Føtalt kalveserum

GCV: Ganciklovir

GCV-TP: Ganciklovir trifosfat

GTP: Guanosin trifosfat

HBV: Hepatitt B virus

H_vU_L: Herpes virus U_L familie

HPLC: High performance liquid chromatography

HCMV: Human cytomegalovirus

HHV: Herpes simplex virus

HIV: Human immunodeficiency virus

HE: Humane embryonale fibroblast celler
HBeAg: Hepatitt B e antigen
HPLC: High performance liquid chromatography
H³-GCV: Tritiert GCV
keV: Kiloelektronvolt
Lamivudin-TP: lamivudin trifosfat
mRNA: Mesenger ribonucleic acid
NNRTI: Non-nukleosid reverstranskriptase hemmere
ORF: Open reading frame
PCR: Polymerase chain reaction
pUL 97: Protein kodet av den nittisyvende ORF i UL regionen
pUL 54: Protein kodet av den femtifjerde ORF i UL regionen
PI: Protease hemmere
PFU: Plaque forming unit
PMNL: Polymorfonukleære leukocytter
RNA: Ribonucleic acid
RT: Revers transcriptase
R+: Seropositiv mottaker
TNF- α : Tumor nekrose factor- α
TTP: Tymidin trifosfat
UL: Unique long
US: Unique short
UTP: Uridin trifosfat
VZV: Varicella-zoster virus
WHO: Verdens helseorganisasjon

8.2 Appendix 2

Table 1.1 Characteristics of acute and chronic disease associated with HCMV

	Virus replication ¹	Multiple organ disease ²	Mechanisms of immune control ³	Immune-associated disease ⁴
Acute disease				
Mononucleosis syndrome	High	Yes	Innate/adaptive	No
Congenital infections; perinatal infections in premature infants	High	Yes	Unknown	Yes ⁵
CMV syndromes in allograft recipients	High	Yes	Adaptive	No ⁵
Disseminated infections in AIDS patients	High	Yes	Adaptive	No ⁵
Chronic disease				
Congenital infection	Low	No	Unknown	Yes ⁶
Vascular disease in transplant recipients	Low	No	Adaptive	Yes
Vascular disease in normal hosts	Low	No	Adaptive	Yes
Inflammatory disease and malignancy ⁷	Low	No	Unknown	Yes

¹Increased levels of virus replication determined by virus titration and/or viral burden assayed by quantitative PCR in peripheral compartments such as blood or within infected organs.

²Multiorgan disease include infection in liver/spleen, lung, gastrointestinal tract, CNS (congenital), eye, and in allograft recipients in the transplanted organ.

³Innate functions include interferons, NK cell responses. Adaptive responses include antiviral antibodies and CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocyte responses.

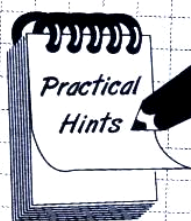
⁴Immune-mediated disease defined by organ dysfunction associated with inflammatory cell infiltrates in virus infected tissue, but specific immunopathological mechanisms have not been identified.

⁵Studies in a small number of humans and in experimental models of CMV retinitis suggest that disease is associated with apoptosis of retinal epithelial cells, perhaps secondary to expression of Fas ligand (Buggage et al., 2000; Cinatl et al., 2000; Scholz et al., 2003; Zhang and Atherton, 2002)

⁶Congenitally infected infants exhibit pathologic findings attributable to virus replication; however, persistent replication in infected infants and late manifestations such as hearing loss suggest that other mechanisms, including immunopathologic damage, may account for late onset disease.

⁷HCMV genetic material and viral proteins have been detected in human malignancies together with inflammatory cellular infiltrates. HCMV has been found in biopsy specimens from patients with inflammatory diseases of the gastrointestinal tract.

8.3 Appendix 3



The QIAGEN Guide to Animal Cell Culture

Part V: Counting cells

Welcome to the fifth of a series of articles providing useful hints for culturing animal cells. This article contains considerations for counting cells.

This protocol has been adapted from references 1–3. Protocols in this series are examples of methods for general cell culture and have not been rigorously validated and optimized by QIAGEN. There are many alternative protocols in current use.

Cell counting using a hemocytometer

It is often necessary to count cells, for example, when plating cells for transfection experiments. One method for counting cells is to use a hemocytometer. A hemocytometer contains 2 chambers (Figure 1). Each chamber is ruled into 9 major squares (volume of 0.1 mm³ or 1 × 10⁻⁴ ml each). Cell concentration is determined by counting the number of cells within a defined area of known depth (volume).

1. Clean the surface of the hemocytometer with 70% ethanol or another suitable disinfectant, taking care not to scratch the surface of the central area. Dry with lens paper.
2. Clean the coverslip, wet the edges very slightly, lay it over the grooves and central area of the hemocytometer and gently press down.

TIP It is important that the coverslip is properly attached to obtain the correct chamber depth. The appearance of Newton's rings (bright and dark rings caused by interference in the air between the coverslip and the glass surface of the hemocytometer) will confirm that the coverslip is attached properly.

3. Harvest the cells, either by trypsinization (adherent cell cultures; see QIAGEN News 2002 No. 3, 20) or by centrifugation at 200 × g for 5 min (suspension cell cultures). Resuspend the cells in an appropriate volume of prewarmed growth medium. At least 10⁶ cells/ml are required for accurate counting.

TIP It may be necessary to centrifuge cells and resuspend in a smaller volume to obtain the desired cell concentration for counting. For adherent cells, it is important to produce a single-cell suspension after trypsinizing. Cell clumping will make counting difficult and inaccurate.



- Mix the cell suspension sample thoroughly. Using a pipet, immediately transfer 20 μ l to the edge of one side of the coverslip to fill one chamber of the hemocytometer. Repeat for the second chamber.

TIP The cell distribution should be homogeneous in both chambers.

TIP The cell suspension is drawn under the coverslip and into the chamber by capillary action. The cell suspension should just fill the chamber. Blot off any surplus fluid without disturbing the sample underneath the coverslip.

- Transfer the slide to the microscope, and view a large square ruled by 3 lines using a 10x objective and 10x ocular. Count the total number of cells in 5 of the 9 major squares.

Count cells that overlap the top and left border of squares but not those overlapping bottom and right borders (Figure 1). This prevents counting overlapping cells twice. If the cell density is too high, the cell suspension should be diluted, noting the dilution factor.

- Repeat the counting for the second chamber to give a total of 10 squares.

- Add the number of cells counted in all 10 squares together to give the number of cells in 1×10^{-3} ml. Multiply by 1,000 to give the number of cells/ml.

IMPORTANT: If the original cell suspension was diluted for counting, multiply by the dilution factor to obtain the number of cells/ml.

- Clean the hemocytometer and coverslip by rinsing with 70% ethanol and then with distilled water. Dry with lens paper.

Counting Cells Using a Hemocytometer

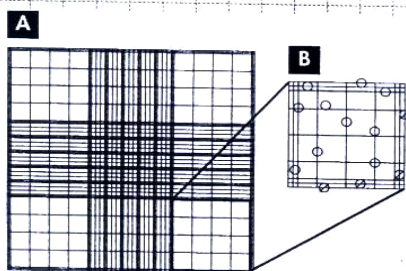


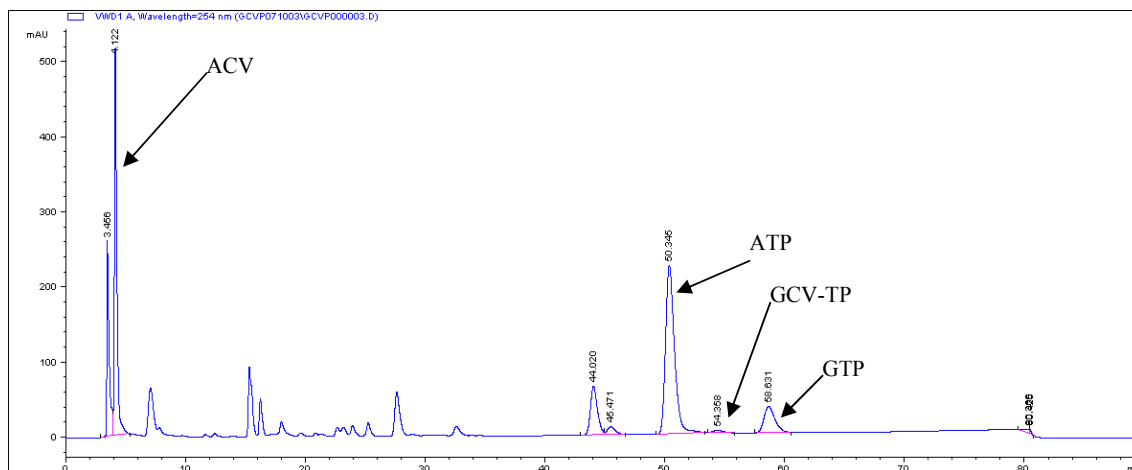
Figure 1 **A** One chamber of a hemocytometer slide under 10x objective and 10x ocular. The chamber is divided into 9 major squares. **B** Detailed view of one of the 9 major squares. Only cells that overlap the top and left borders of squares should be counted to avoid overestimating the cell concentration. \odot : cells that should be counted; \circ : cells that should be ignored.

The QIAGEN Guide to Animal Cell Culture will continue in future issues of QIAGEN News. If there is any other information you would like to see on these pages of QIAGEN News, please let us know by calling QIAGEN Technical Services or your local distributor.

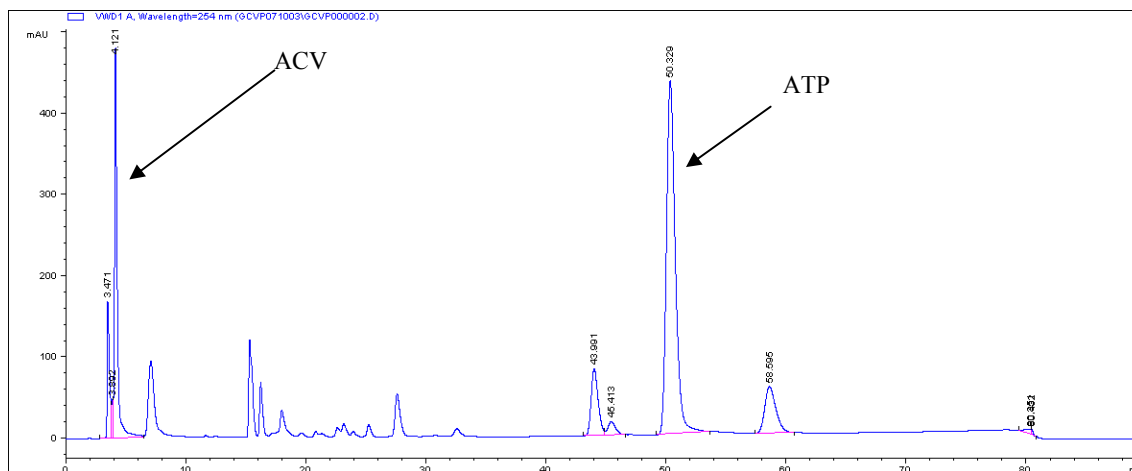
8.4 Appendix 4

Dag 1 analyse på HPLC

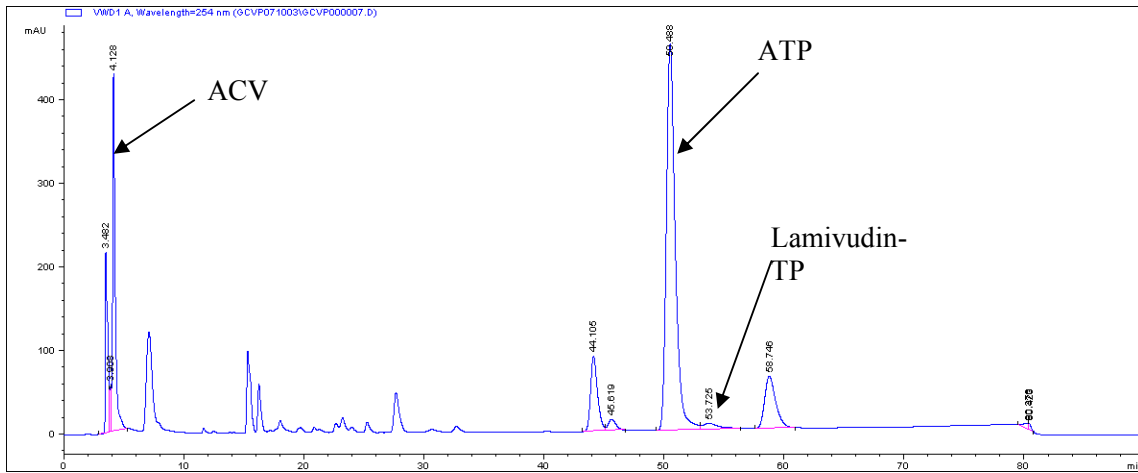
Kromatogram 4.1 CMV infiserte celler tilsatt GCV. ACV og GCV-TP har en retensjonstid på henholdsvis 4,12 minutter og 54,26 minutter. Toppene på retensjonstiden mellom 40 til 60 minutter er CTP, TTP, UTP, ATP, GCV-TP og GTP. TTP toppen er slått sammen med CTP toppen.



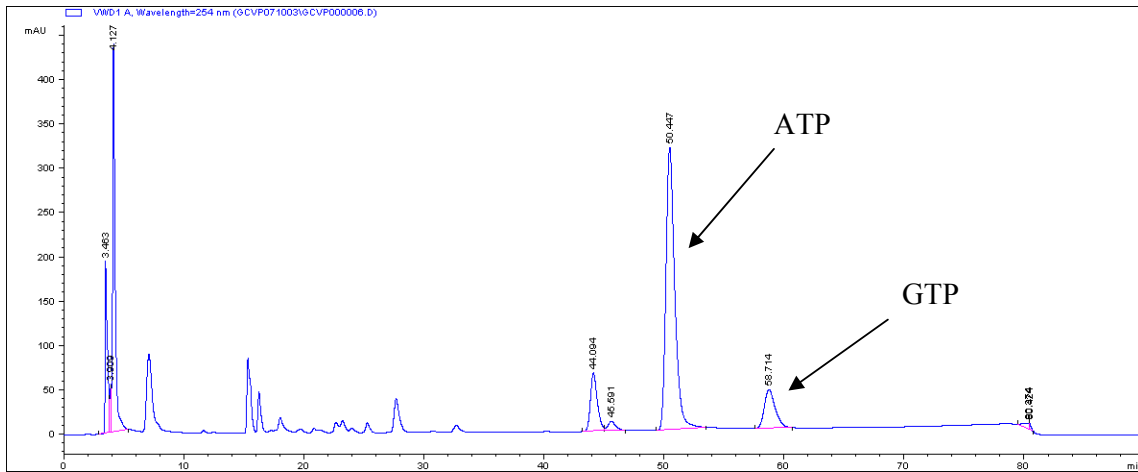
Kromatogram 4.2 Mock infiserte celler tilsatt GCV. Det er ingen topp ved 54,26 minutter. Dette er en kontroll for forrige kromatogram.



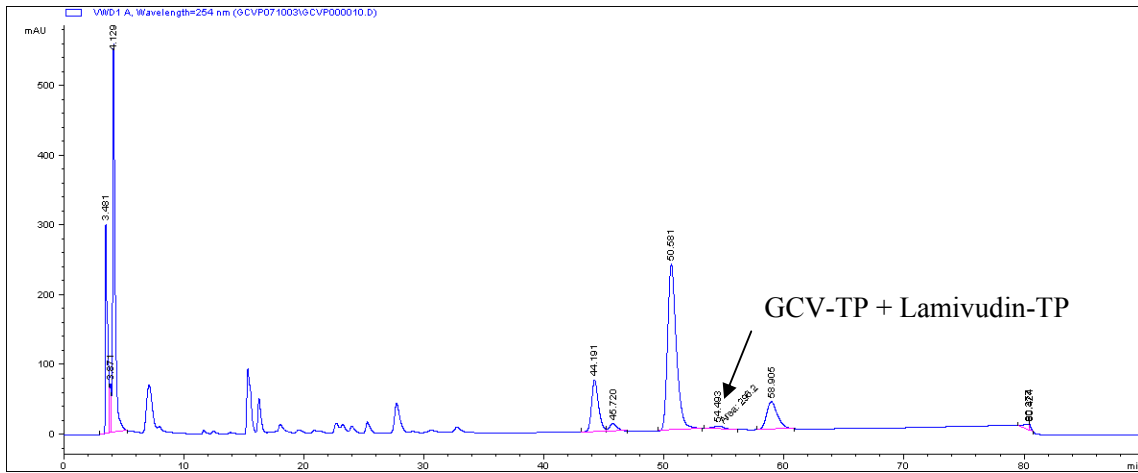
Kromatogram 4.3 Uinfiserte celler tilsatt lamivudin. Det er en topp ved 53 minutter som er lamivudin-TP.



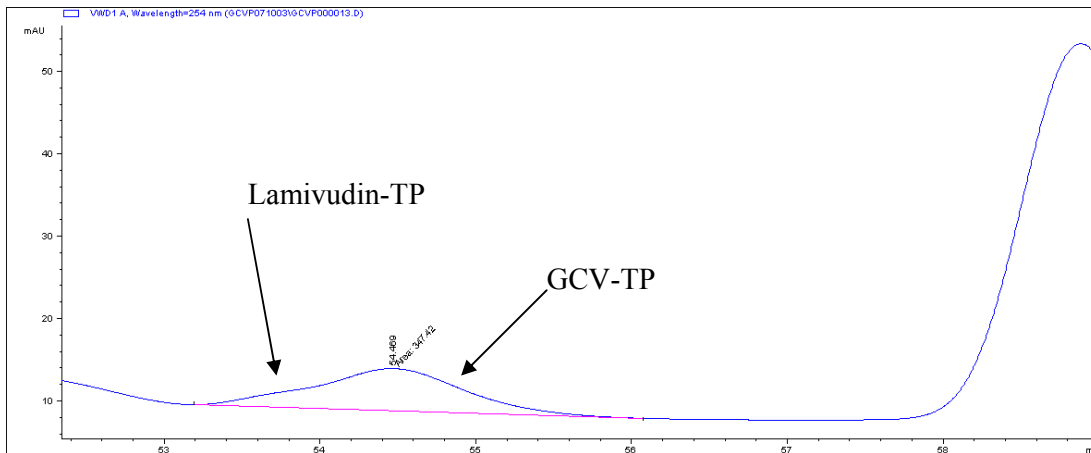
Kromatogram 4.4 Uinfiserte celler tilsatt ingen legemidler. Dette er en kontroll for lamivudin. Det er ingen topp ved 53 minutter.



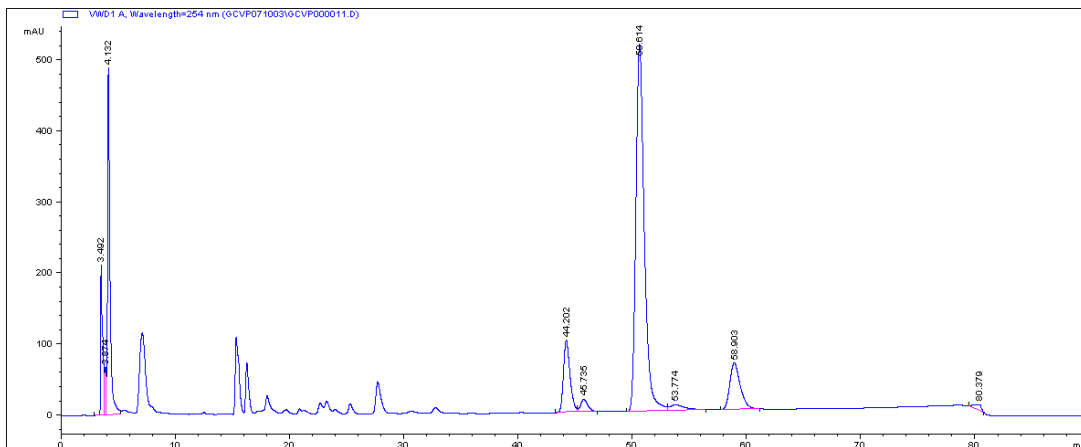
Kromatogram 4.5 CMV infiserte celler tilsatt lamivudin og GCV. GCV-TP og lamivudin-TP toppene ble ikke separert her. Neste kromatogram viser dette tydelig.



Kromatogram 4.6 Dette er det samme kromatogrammet som er vist ovenfor (kromatogram 3.1.5.9). Det er vist kun deler av kromatogrammet (retensjonstiden mellom 53- 55 minutter). Her ser man at lamivudin-TP toppen og GCV-TP går i hverandre (to topper), noe som betyr dårlig separasjon.



Kromatogram 4.7 Mock infiserte celler med lamivudin og GCV. Kontroll for det forrige kromatogrammet. Her ser man en topp ved 53,77 minutter som skyldes lamivudin-TP. Det er ingen topp ved 54,26 minutter.



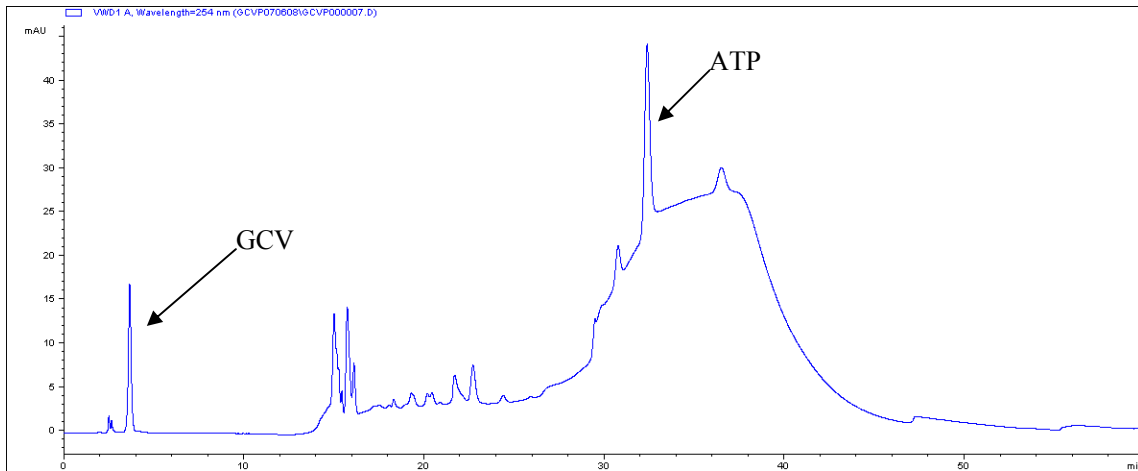
Tabell 4.1 Analysering av prøvene i HPLC med kaliumdihydrogenfosfatbuffer som mobilfase.

	Tid	% Buffer B	% Buffer A
1	0,00	0,0	100,0
2	2,00	0,0	100,0
3	62,00	100,0	0,0
4	64,00	100	0,0
5	64,10	0,0	100,0
6	90,00	0,0	100,0

Detektering av GCV-TP med kaliumdihydrogenfosfat buffere som mobilfase

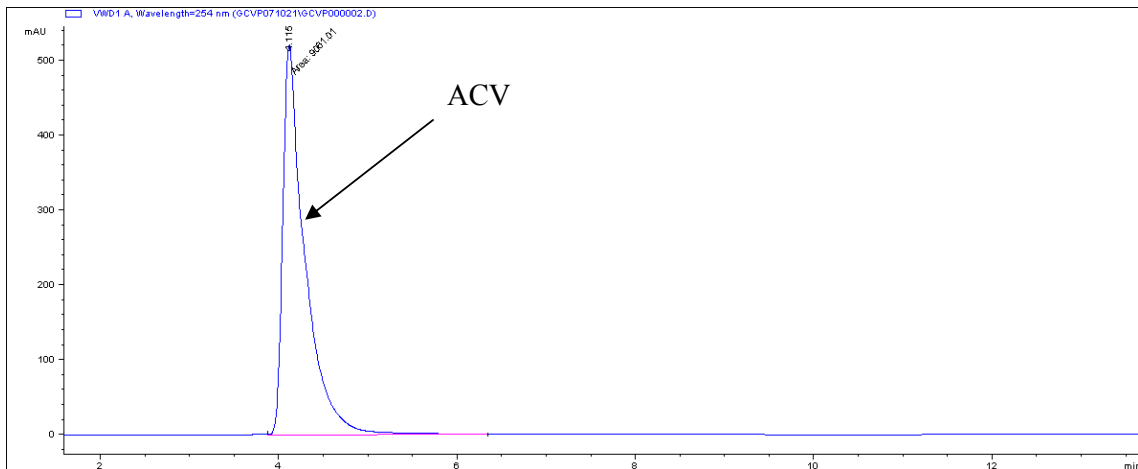
Eluering med kaliumdihydrogenfosfatbuffer ga en dårlig separasjon. Kromatogram for eluering med kaliumdihydrogenfosfat er lagt under.

Kromatogram 4.8 CMV infiserte celler tilsatt GCV og eluert med kaliumdihydrogen fosfatbuffere.

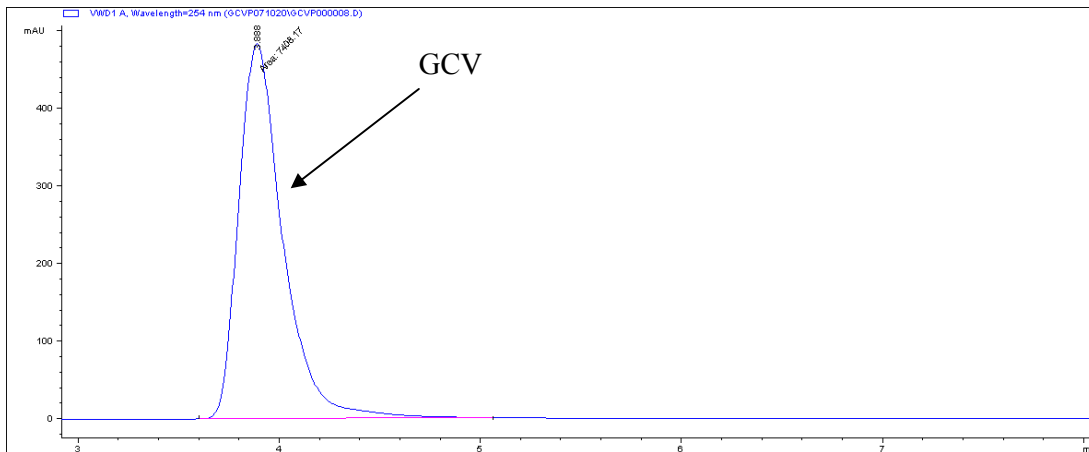


Kromatogrammer for rene legemidler og nukleotider

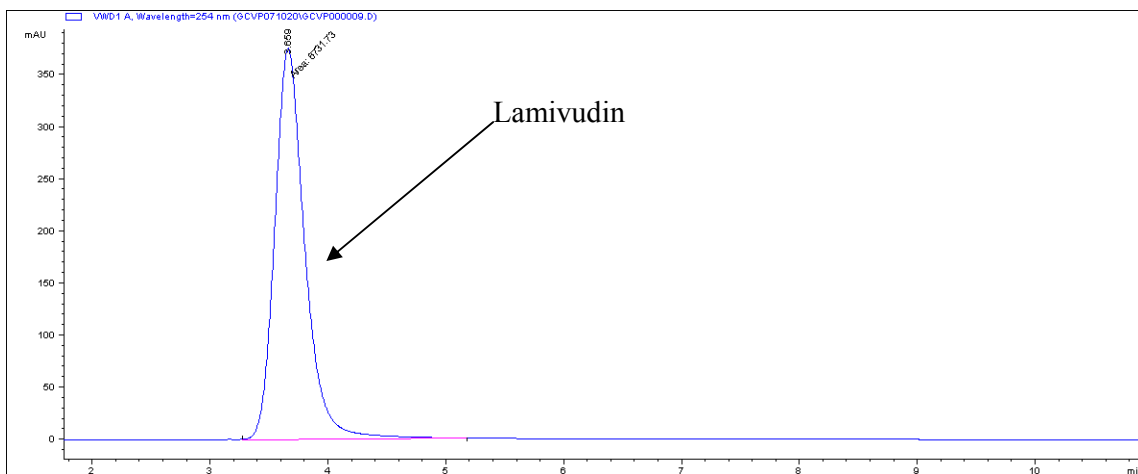
Kromatogram 4.9 Deler av kromatogrammet for ren ACV.



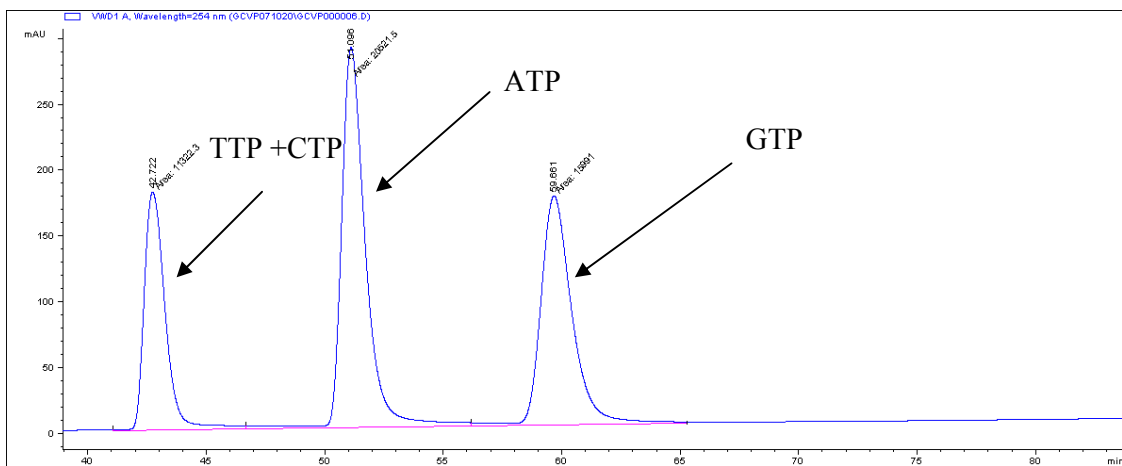
Kromatogram 4.10 Deler av kromatogrammet for ren GCV.



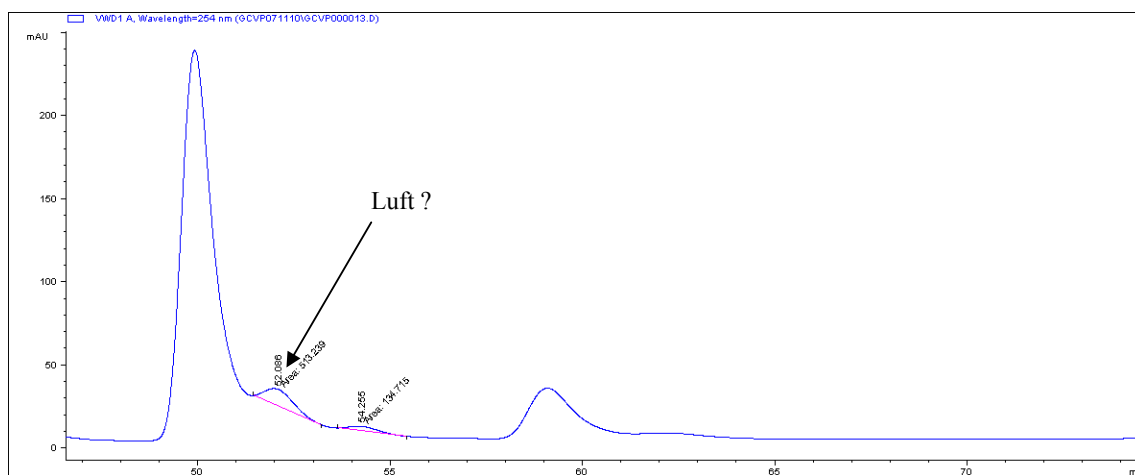
Kromatogram 4.11 Deler av kromatogrammet for ren lamivudin.



Kromatogram 4.12 Deler av kromatogrammet for ren stoffblending av ATP, TTP, CTP og GTP.



Kromatogram 4.13 Deler av kromatogram for CMV infiserte celler tilsatt GCV og lamivudin. Kromatogrammet er for prøverepliket som ble forkastet i dag 3.



Kromatogrammet over er for prøverepliket i parallell 3 som ble forkastet på grunn av problemer i kolonnen. Toppen ved retensjonstid 54,26 minutter kan være GCV-TP. Toppen ved retensjonstid 52,09 minutter skyldes problemer i kolonnen. Kun deler av kromatogrammet (retensjonstiden mellom 45 til 70 minutter) er vist.

Tabeller for parallell 1 (dag 1) med analyselengde på 90 minutter

Tabell 4.1 CMV infiserte celler tilsatt GCV (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 90 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøyde- forhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	3,22444	518,15082	6,22 * 10 ⁻³
Replikat 2	3,81430	480,97235	7,93 * 10 ⁻³
Replikat 3	3,21088	498,05948	6,45 * 10 ⁻³
			Median = 6,46 * 10 ⁻³

Tabell 4.2 CMV infiserte celler tilsatt GCV og lamivudin (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 90 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøydeforhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	4,46696	557,10828	$8,02 * 10^{-3}$
Replikat 2	5,14481	480,24911	$10,7 * 10^{-3}$
Replikat 3	5,00207	503,85284	$9,93 * 10^{-3}$
			Median = $9,93 * 10^{-3}$

Tabeller for parallell 2 (dag 2) med analyselengde på 135 minutter

Tabell 4.3 CMV infiserte celler tilsatt GCV (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 135 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøydeforhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	5,41903	886,78998	$6,11 * 10^{-3}$
Replikat 2	3,05050	895,52765	$3,41 * 10^{-3}$
Replikat 3	3,17151	917,79681	$3,46 * 10^{-3}$
			Median = $3,46 * 10^{-3}$

Tabell 4.4 CMV infiserte celler tilsatt GCV og lamivudin (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 135 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøydeforhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	3,47637	863,72046	$4,02 * 10^{-3}$
Replikat 2	3,50928	906,57074	$3,87 * 10^{-3}$
Replikat 3	3,66641	887,16595	$4,13 * 10^{-3}$
			Median = $4,02 * 10^{-3}$

Tabeller for parallell 3 (dag 3) med analyselengde på 135 minutter

Tabell 4.5 CMV infiserte celler tilsatt GCV (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 135 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøydeforhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	3,95178	920,10547	$4,29 * 10^{-3}$
Replikat 2	4,39751	1250,20825	$3,52 * 10^{-3}$
Replikat 3	3,86463	975,09888	$3,96 * 10^{-3}$
			Median = $3,96 * 10^{-3}$

Tabell 4.6 CMV infiserte celler tilsatt GCV og lamivudin (topphøydeforhold mellom GCV-TP og ACV) med analyselengde på 135 minutter.

	Toppøyde GCV-TP (A_p) i mAU	Toppøyde ACV (A_{Is}) i mAU	Toppøydeforhold (GCV-TP (A_p) / ACV (A_{Is}))
Replikat 1	3,82092	820,60248	$4,66 * 10^{-3}$
Replikat 2	3,88535	872,16559	$4,45 * 10^{-3}$
			Median = $4,56 * 10^{-3}$

Prøvereplikat nummer tre ble forkastet i tredje dagens analyse da det ble oppdaget en feil som skyldtes kolonnen

Tabeller relatert til radioaktiv måling

Tabell 4.7 DNA konsentrasjonen målt i prøver. Det er også beregnet antall µg DNA i 200 µl prøve som er brukt til radioaktiv måling.

	Ratio (A_{260}/A_{280})	Målt DNA konsentrasjon i µg/ml	Antall µg DNA i 200 µl prøve
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV (parallell I)	1,476	279,1	55,82
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV (parallell II)	1,504	264,5	52,90
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV (parallell III)	1,422	264,6	52,92
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell I)	1,638	364,1	72,82
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell II)	1,629	437,0	87,40
CMV infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell III)	1,349	237,8	47,56
Mock infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell I)	1,483	375,7	75,14
Mock infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell II)	1,622	320,2	64,04
Mock infiserte celler tilsatt H ³ -GCV og lamivudin (parallell III)	1,494	375,9	75,18
CMV infiserte celler tilsatt lamivudin	1,492	233,8	46,76

Tabell 4.8 Radioaktiv måling av H^3 -GCV-TP i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV.

Nummertelling	Desintegrasjon per minutt (DPM) for parallell I	Desintegrasjon per minutt for parallell II	Desintegrasjon per minutt for parallell III
1	1358,92	1416,99	1428,36
2	1407,67	1429,63	1387,93
3	1398,03	1451,02	1446,75
4	1416,58	1481,45	1473,41
5	1399,55	1452,01	1406,91
6	1403,74	1447,24	1492,17
Gjennomsnitt	1397,42	1446,89	1439,26
Standardavvik	19,20	21,26	39,55
Standardavvik i prosent	1,37 %	1,46 %	2,75 %

Tabell 4.9 Radioaktivitet i DPM per μg DNA i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV.

	Parallell I	Parallell II	Parallell III
DNA i 200 μl prøve	55,82 μg	52,90 μg	52,92 μg
DPM i 200 μl prøve	1397,42	1446,89	1439,26
DPM per μg DNA	25,03	27,35	27,19
Median = 27,19 DPM/ μg DNA			

Median DPM/ μg DNA i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV = **27,19**.

Tabell 4.10 radioaktiv måling av H^3 -GCV-TP i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin

Nummertelling	Desintegrasjon per minutt (DPM) for parallell I	Desintegrasjon per minutt for parallell II	Desintegrasjon per minutt for parallell III
1	850,83	1550,28	506,35
2	833,54	1546,64	510,83
3	859,87	1586,61	522,05
4	832,84	1563,62	276,05
5	852,05	1569,23	536,32
6	887,30	1547,74	495,83
Gjennomsnitt	852,74	1560,69	514,28
Standardavvik	20,07	15,66	15,50
Standardavvik i prosent	2,35 %	1,00	3,01

DPM for nummertelling 4 i parallell III er ikke tatt med til beregning av gjennomsnitt og standardavvik, da verdien avviker fra andre nummertellinger.

Q-test for forkasting av nummertelling 4 i parallell III

Ved Q-tester ordnes målingene på følgende måte: $x_{\text{kritisk}}, x_i, \dots, x_3, x_2, x_1$, hvor x_{kritisk} er den minste verdien og x_i er den nest minste verdien. Q-verdien beregnes på følgende måte.

$$Q = \frac{|x_i - x_{\text{krit}}|}{|x_1 - x_{\text{krit}}|}$$

(276,05), (495,83), (536,32), (522,05), (510,83), (506,35). Den verdien som er vesentlig forskjellig fra de øvrige verdiene er 276,05 og denne kalles kritisk verdi. Den nest minste verdien av parallell III = 495,83.

$$Q = \frac{|495,83 - 276,05|}{|506,35 - 276,05|}$$

$$Q = 0,95$$

Q-verdien på 96 % konfidensnivå for seks målinger er $0,64^{33}$. Siden den beregnede Q-verdien er større enn avlest verdi, kan den kritiske verdien forkastes.

Tabell 4.10 radioaktivitet i DPM per μg DNA i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin.

	Parallell I	Parallell II	Parallell III
DNA i 200 μl prøve	72,82	87,40	47,56
DPM i 200 μl prøve	852,74	1560,69	514,28
DPM per μg DNA	11,71	17,86	10,81
Median = 11,71 DPM/ μg DNA			

Median DPM/ μg DNA i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV = **11,71**.

Tabell 4.11 radioaktiv måling av H^3 -GCV-TP i mock infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin

Nummertelling	Desintegrasjon per minutt (DPM) for parallell I	Desintegrasjon per minutt for parallell II	Desintegrasjon per minutt for parallell III
1	897,23	476,40	513,18
2	885,84	462,57	515,94
3	908,04	468,74	525,82
4	934,23	480,13	527,95
5	890,29	482,59	511,48
6	903,26	487,17	505,88
Gjennomsnitt	903,15	476,27	516,71
Standardavvik	17,26	9,14	8,57
Standardavvik i prosent	1,91	1,92	1,66

Tabell 4.12 Radioaktivitet i DPM per μg DNA i mock infiserte celler tilsatt H^3 -GCV og lamivudin.

	Parallell I	Parallell II	Parallell III
DNA i 200 μl prøve	75,14	64,04	75,18
DPM i 200 μl prøve	903,15	476,27	516,71
DPM per μg DNA	12,01	7,44	6,87
Median = 7,44 DPM/ μg DNA			

Median DPM/ μg DNA i CMV infiserte celler tilsatt H^3 -GCV = **7,44**.