

Analiza abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba zonskom kapilarnom elektroforezom

Begović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:797679>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Iva Begović

**Analiza abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba
zonskom kapilarnom elektroforezom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i divnoj doktorandici Lu s kojom sam provodila svoje dane u labosu i koja mi je uvijek bila spremna pomoći i doktorandima Mariu i Edvinu koji su učinili moje vrijeme u labosu zabavnijim.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, od onih iz osnovne preko onih iz srednje do onih s fakulteta, svi ste bili tu za mene kada je trebalo. Zajedno smo se veselili, putovali, ispijali kave, učili i nervirali se oko teških ispita.

Zahvaljujem se i svom dečku na velikoj podršci i ljubavi kroz godine fakulteta.

Veliko hvala i CPSA-i i svim timovima i mnoštvu ljudi s kojima sam radila. Bilo je izazovno, ali uvijek ispunjavajuće. CPSA-e ću se uvijek sjećati sa smiješkom na licu, donijela mi je mnoge lijepe uspomene i još ljepša prijateljstva.

I za kraj veliko hvala mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima! Bili ste tu kad god je trebalo, podržavali moj put na studiju uvijek i svugdje i podržavali sve moje avanture, rad u CPSA-i i putovanja.

Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom Nova bioanalitička rješenja za personalizacije terapije raka dojke (HRZZ-UIP-2019-04-8461).



Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. RAK DOJKE	1
1.1.1. Vrste raka dojke	1
1.1.2. Etiologija raka dojke	2
1.1.3. Dijagnostika	3
1.2 LIJEČENJE RAKA DOJKE	4
1.2.1. Kirurško liječenje	4
1.2.2. Zračenje	5
1.2.3. Kemoterapija	5
1.2.4. Endokrina terapija	5
1.2.5. Ciljana terapija	7
1.3. CIKLIBI	8
1.3.1. Mehanizam djelovanja cikliba	9
1.4. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	9
1.4.1. Načelo kapilarne elektroforeze	9
1.4.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu	11
1.4.3. Vrste kapilare korištene u kapilarnoj elektroforezi	12
1.4.4. Primjena kapilarne elektroforeze u analitici lijekova	14
1.4.5. Kapilarna zonska elektroforeza	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE	17
3.1.1. Standardne supstancije	17
3.1.2. Supstancije i kemikalije	17
3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR	18
3.2.1. Radni instrumenti	18

3.2.2. Pribor.....	18
3.2.3. Programski paketi	18
3.3. METODE	19
3.3.1. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina	19
3.3.2. Priprema otopine radnog pufera.....	19
3.3.3. Uvjeti analize kapilarne elektroforeze	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Odabir radnog pufera	21
4.2. Optimiziranje koncentracije radnog pufera	22
4.3. Optimizacija napona kapilare	27
4.4. Optimizacija temperature kapilare	31
4.5. Optimizacija prekondicioniranja i postkondicioniranja kapilare	34
4.6. Ispitivanje drugih vrsta pH i pufera	36
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41
7. SAŽETAK/ABSTRACT	44

1. UVOD

1.1. RAK DOJKE

Rak dojke je najčešće dijagnosticirani rak u žena u svim svjetskim regijama, a također kod žena uzrokuje i najveću smrtnost uspoređujući s drugim vrstama raka. Prema podacima iz 2018., godišnje se otkrije 2,1 milijuna slučajeva raka dojke, ali brojka raste svake godine. Primijećene su značajno veće stope incidencije u regijama s većim dohotkom po glavi stanovnika (92 na 100 000 u Sjevernoj Americi) u odnosu na regije s nižim dohotkom (27 na 100 000 u Srednjoj Africi i Istočnoj Aziji). Bolja prognoza se i dalje povezuje s otkrivanjem u ranim stadijima bolesti zbog čega se naglašava važnost pravovremenog i poboljšanog probira (Ahmad i sur., ured., 2019; Winters i sur., 2017).

Rak je bolest u kojoj se stanice u tijelu nekontrolirano šire i rastu pa dolazi do nastajanja abnormalnih nakupina tkiva koje čine čvrstu masu koju nazivamo tumorom. Našem su tijelu u normalnim okolnostima potrebne nove stanice koje dobivaju kontroliranim rastom i dijeljenjem stanica. Također je prisutna apoptoza, stanice koju su oštećene ili stare odumiru i na njihovo mjesto dolaze nove stanice. Rak, odnosno tumor je posljedica pogreške u opisanom procesu pa abnormalne ili oštećene stanice rastu i množe se kada ne bi trebale (www.cancer.gov; www.onkologija.hr; www.breastcancer.org).

Tumori mogu biti benigni ili kancerozni. Kancerozni ili zloćudni tumori napadaju i šire se u tkiva koja ih okružuju, a mogu se kretati po organizmu i stvarati nove tumore u procesu metastaziranja. Benigni tumori se ne šire u okolno tkivo i kada ih se ukloni najčešće ne izrastu ponovo (www.cancer.gov).

1.1.1. Vrste raka dojke

Rak dojke prema proširenosti dijelimo na neinvazivni ili lokalizirani „*in situ*“ i invazivni rak dojke, a obzirom na probijanje bazalne membrane dojke razlikujemo neinfiltrirajuće koji ne probijaju bazalnu membranu i infiltrirajuće koji probijaju membranu. Neinfiltrirajući se smatraju lokaliziranim, a infiltrirajući invazivnim rakom dojke.

Oko 90% otkrivenih karcinoma dojke čine duktalni karcinomi koji se odnose na karcinome u mliječnim kanalićima, a oko 10% čine lobularni koji se javljaju u mliječnim žlijezdama pa ih tako dijelimo prema mjestu nastanka (Hećimović, 2016). Lokalizirani duktalni karcinom obično nema simptoma i otkriva se tijekom mamografije. Uspješno se liječi, a neliječen može prijeći u invazivni. Lokalni lobularni karcinom obično se otkriva tek biopsijom dojke, a nakon što se otkrije, obavezni su kontrolni pregledi, a postoji i 20% veća šanse za razvoj invazivnog oblika (Hećimović, 2016; www.zzjzdnz.hr).

Prema molekulskoj osnovi tumore možemo podijeliti prema hormonskom i HER-2 statusu.

Hormonskim tumorima smatramo one tumore koji na sebi imaju receptore za jedan ili oba ženska spolna hormona estrogen (ER pozitivni) i progesteron (PR pozitivni). Takve tumore ženski spolni hormoni potiču na zloćudno ponašanje i rast. Kod ovog tipa tumora potrebno je spriječiti djelovanje spolnih hormona na receptore kako bi tumor prestao rasti i posljedično kako bi zloćudne stanice odumrle (Podolski i sur., 2015; www.cancer.org/cancer).

Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (*engl. Human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) je protein koji se normalno nalazi na svim stanicama dojke, a potiče rast i diobu stanica. Prema HER2 statusu tumore dijelimo na HER2+ ili HER2-. Stanice koje u većoj mjeri ekspimiraju HER2 nazivaju se pozitivne (HER2+). Ovi tumori imaju tendenciju rasta i širenja bržu od ostalih karcinoma dojke, imaju lošiju prognozu i brže metastaziraju. HER2 je najčešće prekomjerno ekspimirani biljeg i smatra se relevantnim biomarkerom za liječenje raka dojke (www.cancer.org/cancer).

1.1.2. Etiologija raka dojke

Osim važnosti ranog otkrivanja raka dojke, važno je proučavati i rizične čimbenike u nastanku i razvoju raka kako bi se na neke od njih moglo utjecati. Dob je važan rizični čimbenik jer rizik od obolijevanja raste od puberteta pa sve do 75.-80. godine života. Rak dojke ili jajnika u obitelji također povećava rizik za 2-3 puta ukoliko je rak prethodno imao netko iz prvog koljena s majčine strane. Iako je mali postotak raka dobiven nasljeđem, mutirani geni naslijeđeni s očeve ili majčine strane BRCA1 i BRCA2 gen (Breast Cancer Gene 1 i 2) važni su u etiologiji nastanka raka. BRCA geni imaju važnu ulogu u popravku oštećenja DNA. Pošto kod mutacije BRCA gena ne dolazi do popravka DNA u stanici, stanica postaje osjetljivija na djelovanje

drugih štetnih čimbenika. Od ukupno oboljelih od raka dojke, 5-10% žena ima mutaciju BRCA gena. Kod žena koje imaju mutaciju BRCA gena, podaci pokazuju da će čak 55-87% razviti rak dojke do sedamdesete godine života. Kod osoba koje na temelju anamneze imaju rizik od naslijeđene mutacije provodi se BRCA genski test kako bi se otkrilo jesu li nositelji naslijeđenih mutacija.

Rizični čimbenici uključuju i ranu prvu mjesečnicu, kasnu menopauzu, trudnoću u kasnijim godinama, 5-7 godina hormonskog nadomjesnog liječenja, atipičnu hiperplaziju žljezdanog tkiva dojke, nodularno povećanu gustoću na mamografskom nalazu, zračenje tijekom djetinjstva ili odrastanja, prethodno preboljeli rak dojke i pretilost u menopauzi. Također, u obzir treba uzeti i prehranu, posebice uz veliku količinu životinjskih masti i prekomjernu konzumaciju alkohola i manjak tjelesne aktivnosti. Etnička pripadnost je također značajna. Židovke, bjelkinje i crkinje imaju dvostruko veći rizik razvoja karcinoma dojke od azijskinja. Pokazalo se da dugotrajno dojenje smanjuje rizik razvoja raka dojke, a primjena oralne kontracepcije ima vrlo malo utjecaja (povećanje od 5 slučajeva na 100 000 žena) (Kolak i sur., 2017; Podolski i sur., 2015; <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>).

1.1.3. Dijagnostika

Dijagnoza raka dojke temelji se na različitim dijagnostičkim metodama. U metode ranog otkrivanja raka dojke uvrštavaju se radiološki pregledi koji uključuju mamografiju, ultrazvučni pregled i magnetsku rezonanciju, liječničke preglede i tkivnu dijagnostiku.

Mamografija obuhvaća rendgensko snimanje dojki i smatra se zlatnim standardom u dijagnostici. Na ovaj način rak je moguće otkriti u ranom stadiju kada još nisu prisutni simptomi ni znakovi bolesti. U Republici Hrvatskoj provodi se preventivni program ranog otkrivanja raka dojke u kojem se žene u dobi od 50 do 69 godina pozivaju na besplatan pregled jer je pokazano da redovita mamografska snimanja u toj dobi mogu smanjiti rizik raka dojke za 30%. Ultrazvučni pregled je metoda koja se koristi kod žena mlađih od 40 godina jer bi zbog zgusnutosti tkiva rezultati mamografije bili manje pouzdani. Magnetska rezonancija je dijagnostička metoda u kojoj se ne koristi rendgensko zračenje, a moguće je dobiti slikoviti prikaz dojke.

U tkivnu dijagnostiku se ubrajaju aspiracijska biopsija tankom iglom, *core*-biopsija debelom iglom i kirurška otvorena biopsija. Biopsijom smatramo postupak uklanjanja tkiva za patohistološki pregled. Svaka sumnjiva tvorba na dojci se pregledava kako bi se utvrdilo radi li se o zloćudnom tumoru.

Uz spomenute dijagnostičke metode treba istaknuti i važnost samopregleda. Samopregled je pregled koji žene trebaju početi obavljati u dobi od 20 do 25 godina jednom mjesečno. Pipanjem se vrši pregled dojki, pazuha i okolnih područja (Podolski i sur., 2015; www.zzjzdnz.hr).

1.2 LIJEČENJE RAKA DOJKE

Liječenje se provodi s ciljem odstranjivanja vidljivog tumorskog tkiva iz dojke i limfnih čvorova i sprječavanja ponovne pojave raka. Liječenje se sastoji od lokalnih zahvata na dojci koji obuhvaćaju kirurško liječenje i radioterapiju te od sistemskog liječenja koje obuhvaća kemoterapiju, endokrinu terapiju i imunoterapiju (Podolski i sur., 2015).

1.2.1. Kirurško liječenje

Liječenje raka dojke većinom započinje kirurškim liječenjem. Tumor na dojci i na pazušnim limfnim čvorovima se odstrani i šalje na patohistološke analize. O odabiru tipa operacije najviše ovisi veličina, vrsta i pozicija tumora na dojci kao i veličina dojke. Tumorektomija i segmentektomija ili kvadrantektomija smatraju se pošteđenim zahvatima i u njima se ne uklanja cijela dojka. Kod tumorektomije otklanja se samo tumor u dojci, a kod segmentektomije se uz tumor otklanja i dio okolnog zdravog tkiva oko tumora. Mastektomija, subkutana mastektomija i radikalna mastektomija su metode u kojima se uklanja cijela dojka. Kod mastektomije se dojka amputira, a time se uklanja tumor, ali i zdravo tkivo dojke i koža bradavice. Supkutana mastektomija se razlikuje od mastektomije jer se ne uklanja koža dojke i bradavica, već samo tkivo dojke. Radikalna mastektomija je metoda u kojoj se amputira cijela dojka s okolnim pazušnim limfnim čvorovima, a katkad i s mišićem stijenke prsnog koša. Prije kirurškog zahvata, za veće i lokalno uznapredovale tumore, sve se više koristiti neoadjuvantna terapija kako bi došlo do smanjivanja mase tumora i kako bi tumor postao operabilan (Podolski i sur., 2015; www.zzjzdnz.hr/hr).

1.2.2. Zračenje

Adjuvatno liječenje podrazumijeva dodatno sistemsko liječenje u svrhu sprječavanja povratka tumora. Zračenje ili radioterapija je metoda adjuvantnog liječenja koja uključuje terapiju zračenja s visokoenergetskim zrakama koje ubijaju stanice raka. Primjenjuje se nakon pošteđenih zahvata kako bi se spriječila šansa da se rak vrati u istu dojku ili limfni čvor. Mora se primjenjivati i nakon mastektomije ako je tumor bio veličine preko 5 cm ili ako je nađen u limfnim čvorovima. Također se primjenjuje ako se rak proširio na druge dijelove tijela, primjerice kosti ili mozak. Pacijentice zračenje primaju najčešće kroz 5-6 tjedana (Podolski i sur., 2015; www.cancer.org).

1.2.3. Kemoterapija

Kemoterapija je metoda neoadjuvantnog i adjuvantnog liječenja u kojoj se koriste citostatici kojima je cilj zaustavljanje rasta tumora. Adjuvantna kemoterapija smanjuje smrtnost u prosjeku 25-35% godišnje kod premenopauzalnih žena, a kod postmenopauzalnih žena 9-19%. Režimi kemoterapije u kojima se lijekovi daju u kombinacijama pokazali su se najučinkovitijima. Najčešće primjenjivani kemoterapijski lijekovi uključuju 5-fluorouracil, metotreksat, ciklofosamid, antracikline (epirubicin i doksorubicin) i taksane (docetaksel i paklitaksel). Terapija se najčešće primjenjuje intravenski, osim u slučajevima ciklofosfamida i metotreksata koji se mogu primjenjivati i oralno. Pošto citostatici djeluju na sve stanice koje se dijele, osim 90% tumorskih stanica, obuhvaćaju i 10% normalnih stanica zbog čega često dovode do nuspojava. Nuspojave kemoterapije uključuju gubitak kose, promjene na noktima, gubitak apetita, promjene u težini, mučninu i povraćanje, proljev, umor, bolne upale sluznice (Podolski i sur., 2015; <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>; www.onkologija.hr; www.cancer.org).

1.2.4. Endokrina terapija

Endokrina terapija je vrsta adjuvantnog liječenja koja se koristi u terapiji tumora na čijoj površini nalazimo estrogenske ili progesteronske receptore. Osnovni princip endokrine terapije

obuhvaća sprječavanje interakcija između spolnih hormona i njihovih receptora kroz blokiranje proizvodnje spolnih hormona ili blokiranje receptora. Bez upotrebe endokrine terapije, spolni hormoni se vežu za receptore prisutne na raku dojke koji je hormonski ovisan i potiču njegov rast i metastaziranje. U premenopauzi estrogen se proizvodi u jajnicima, ali u postmenopauzi proizvodnja estrogena događa se u različitim dijelovima organizma (jetra, masno tkivo, mišići, nadbubrežna žlijezda, tkivo dojke). Estrogen se u perifernim tkivima proizvodi iz androgena pomoću enzima aromataze (Podolski i sur., 2015; Goldhirsch i Colleoni, 2002).

Prema mehanizmu djelovanja poznajemo različite vrste endokrine terapije. Selektivni modulatori estrogenskih receptora (*engl. Selective estrogen receptor modulators, SERM*) djeluju agonistički ili antagonistički na estrogenske receptore ovisno o tkivu u kojem se nalaze. U tkivu dojke djeluju antagonistički i zato su učinkoviti u liječenju estrogen receptor pozitivnog (*engl. Estrogen receptor positive, ER+*) raka dojke. Tamoksifen je najvažniji predstavnik ove skupine. Uz antagonističko djelovanje u tkivu dojke, ima i agonističko djelovanje u kostima pa pokazuje pozitivne učinke na održavanje gustoće kostiju (An, 2016). Tamoksifen, također, zbog svog agonističkog utjecaja dovodi do smanjenja serumskog kolesterola i smanjene kardiovaskularne smrtnosti, ali može dovesti do hiperplazije i raka endometrija (Cano i Hermenegildo, 2000). Terapija tamoksifenom se može započeti prije ili poslije operacije, a najčešće se uzima 5-10 godina. Većinom se koristi kod žena s ranim stadijem raka dojke i žena koje još nisu ušle u menopauzu (www.cancer.org).

Inhibitori aromataze inhibiraju enzim aromatazu koji je izrazito važan u postmenopauzalnim ženama jer sudjeluje u stvaranju estrogena iz androstendiona. Razlikujemo steroidni ireverzibilni inhibitor eksemestan i nesteroidne reverzibilne inhibitore letrozol i anastrozol. Često se preporučuju kod postmenopauzalnih žena kao adjuvantna terapija u različitim shemama prije ili nakon uzimanja tamoksifena na 5 do 10 godina (Miller, 2003; www.cancer.org).

Fulvestrant se također koristi u terapiji, a djeluje antagonistički na estrogenske receptore. Najčešće se koristi u naprednom stadiju raka dojke nakon što se terapija drugim opcijama pokazala neuspješnom (tamoksifen, inhibitori aromataze) (www.cancer.org).

Kod premenopauzalnih žena mogu se koristiti lijekovi za supresiju funkcije jajnika LHRH agonisti, leuprolid i goserelin. Mogu se uzimati u kombinaciji s drugom hormonskom terapijom (www.cancer.org).

Endokrina terapija sa sobom nosi brojne prednosti, selektivna je, dobre je učinkovitosti, dobre je podnošljivosti, male toksičnosti i niske cijene. Nedostatak je jedino ograničenost u primjeni pošto se može koristiti samo u liječenju hormonski ovisnih tumora (Vrdoljak i sur., 2013).

1.2.5. Ciljana terapija

Ciljana terapija raka dojke obuhvaća lijekove koji blokiraju rast tumora inteferirajući s funkcijom specifične molekule koja je potrebna za proliferaciju i preživljavanje tumorske stanice (Masoud i Pagès, 2017). Posebnost ciljane terapije je da uništava tumorsku stanicu bez da pritom uništi zdravo okolno tkivo pa na taj način ne izaziva nuspojave kao primjerice kemoterapija. Za razliku od kemoterapije koja djeluje selektivno, ciljana terapija precizno djeluje na promjene na stanicama raka koje uzrokuju njegov rast, diobu ili širenje. Biološkom terapijom odnosno protutijelima moguće je djelovati na one stanice koje na svojoj površini ekspimiraju biljege koji djeluju kao antigeni. Do aktivacije imunološkog sustava dolazi kada se monoklonsko protutijelo veže na antigen na tumorskoj stanici (www.onkologija.hr).

Trastuzumab je prvi razvijeni lijek za HER2+ rak. Daje se intravenski, najčešće u trotjednim intervalima, obično nakon kemoterapije. Konjugirano monoklonsko protutijelo trastuzumab emtansin također se može koristiti kod ove vrste raka. Monoklonsko protutijelo vezano je za citotoksični derivat maitanzina (*engl. maytansine derivative*, DM1). Trastuzumab transportira DM1, inhibitor mikrotubula, direktno u dojkju gdje sprječava rast tumora. Pertuzumab i lapatinib se također koriste u terapiji HER+ raka dojke, ali kod njih može doći do razvijanja rezistencije i uzrokovanja značajnih nuspojava. Lapatinib i neratinib na HER2 djeluju kao inhibitori kinaze (Masoud i Pagès, 2017; Podolski i sur., 2015; www.cancer.org).

Abemaciclib, ribociklib i palbociklib su inhibitori ciklin ovisnih kinaza 4 i 6 (*engl. Cyclin-dependent kinase 4/6*, CDK4/6) i koriste se u liječenju hormonski ovisnog raka dojke negativnog na HER2 (Ban i sur., 2019). Everolimus, inhibitor ciljane molekule rapamicina u sisavaca (*engl. Mammalian Target of Rapamycin*, mTOR) odobren je za liječenje raka dojke negativnog za humani epidermalni faktor rasta (HER2), a pozitivnog za hormonski receptor (HR) (Lee i sur., 2015).

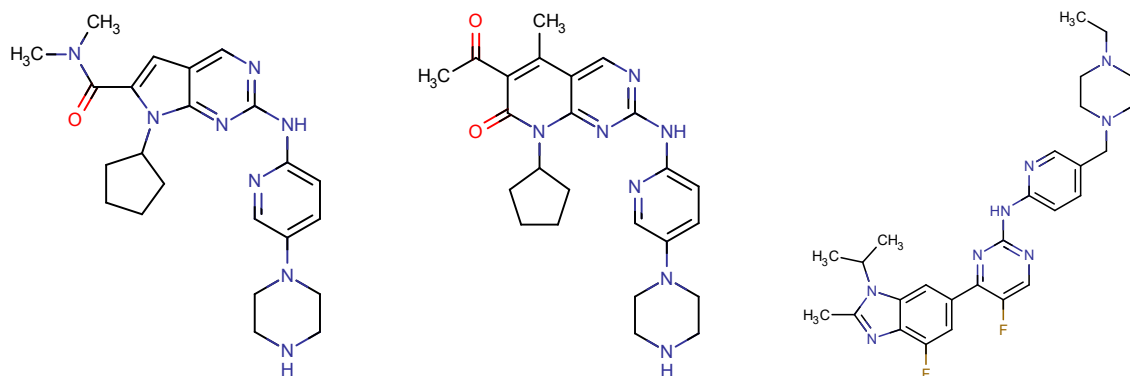
Inhibitori poli ADP-riboza polimeraze (PARP) pokazali su se uspješnima u liječenju HER2-uznapredovalog raka dojke s linijom mutacije gena BRCA1 i BRCA2. Za sada su u EMA-i

registrirani olaparib, niraparib, rukparib i talazoparib, a veliparib i pamiparib su u fazi razvoja (Gonçalves i sur., 2020).

1.3. CIKLIBI

Ribociklib, palbociklib i abemaciklib su novi antineoplastici u terapiji raka dojke. Indicirani su za liječenje žena s lokalno uznapredovalim ili metastatskim rakom dojke pozitivnim na hormonski receptor (HR) i negativnim na receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2). Mogu se primjenjivati u kombinaciji s inhibitorom aromataze ili fulvestrantom. U kombinaciji s fulvestrantom, abemaciklib i ribociklib se mogu koristiti i kao početna endokrina terapija, ali i u žena koje su prethodno primale endokrinu terapiju, a palbociklib samo u žena koje su prethodno primile endokrinu terapiju. U indikaciji sva tri lijeka također stoji da je u žena u pre- i perimenopauzi endokrinu terapiju potrebno kombinirati s agonistom hormona koji oslobađa luteinizirajući hormon (LHRH). Doziranje i način primjene sva tri citostatika, moraju započeti i nadzirati liječnici s iskustvom u primjeni lijekova za liječenje raka. Palbociklib se uzima u preporučenoj dozi 125 mg jednom dnevno tijekom 21 uzastopnog dana nakon čega slijedi 7 dana bez terapije kako bi se dovršio ciklus od 28 dana. Abemaciklib se u kombinaciji s endokrinom terapijom primjenjuje u preporučenoj dozi 150 mg dvaput na dan. Ribociklib se uzima u preporučenoj dozi 600 mg (tri filmom obložene tablete po 200 mg) jedanput na dan tijekom 21 dana, nakon čega slijedi 7 dana bez liječenja. Svi su namijenjeni za peroralnu primjenu i liječenje s ova tri lijeka se nastavlja dok bolesnica ostvaruje kliničku korist od terapije ili do pojave neprihvatljive toksičnosti (<https://www.halmed.hr/>). Palbociklib i ribociklib uzimaju se uz pauze, a abemaciklib se uzima kontinuirano. Uspoređujući njihove strukture, primjetno je da su strukture palbocikliba i ribocikliba slične, a struktura abemacikliba se razlikuje u većoj mjeri (Slika 1). Kliničke studije koje su do sada provedene nisu pokazale značajniju razliku u učinku koji ispoljavaju ili u mehanizmu djelovanja lijekova. Razlika je pronađena u prodiranju kroz krvno-moždanu barijeru, pokazalo se da abemaciklib prodire bolje od preostala dva lijeka.

Ispitivane su studije učinkovitosti i podnošljivosti inhibitora CDK4/6 na hormonski tumor i pokazano je da imaju povoljan klinički značaj u preživljavanju bez progresije bolesti, a ujedno imaju i zadovoljavajući sigurnosni profil i mali rizik toksičnosti (Ban i sur., 2019).



Slika 1. Kemijske strukture palbocikliba, ribocikliba i abemacicliba

1.3.1. Mehanizam djelovanja cikliba

Ciklibi su selektivni inhibitori o ciklinu ovisnih kinaza 4 i 6 (engl. cyclin-dependent kinases, CDK). Kinaze su važne u signalnim putevima jer dovode do staničnog ciklusa i stanične proliferacije, a do njihove aktivacije dolazi nakon vezanja za D-cikline (<https://www.halmed.hr/>). U raku dojke ciklin D1 je pretjerano izražen u 50% stanica. Nakon vezanja s D-ciklinima, kinaze dovode do fosforilacije retinoblastomskog proteina (Rb). Rb hipofosforiliran čvrsto veže transkripcijski faktor E2F. Kada se E2F otpusti dolazi do transkripcije koja pomiče ciklus iz G1 u S fazu. Inhibicijom CDK4/6 postignut je prestanak rasta i razmnožavanja stanice (Ban i sur., 2019).

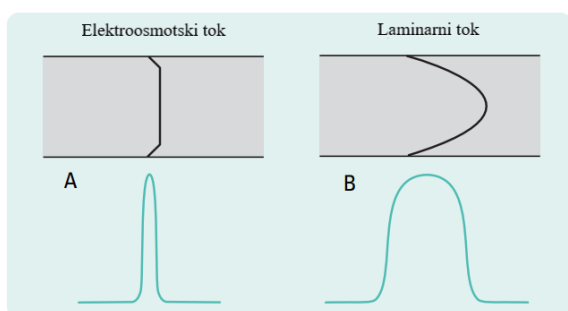
1.4. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

1.4.1. Načelo kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) je separacijska tehnika koja se, između ostalog, koristi u farmaceutskoj analizi. Osnovno načelo ove tehnike uključuje migraciju električki nabijenih čestica u uskoj kapilari pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV) prema jednoj od elektroda. Brzina putovanja iona ovisi o njihovoj elektroforetskoj pokretljivost kao i o primijenjenom električnom polju, a jakost polja o primijenjenom naponu i dužini kapilare. Elektroforetska pokretljivost proporcionalna je s

nabojem iona, a obrnuto proporcionalna s viskoznošću otopine i s polumjerom čestice. Brzina migracije analita je veća što je naboj čestice veći, a polumjer manji. U CE se koristi izraz vrijeme migracije za razliku od kromatografije u kojoj se koristi vrijeme zadržavanja. Vrijeme migracije predstavlja količinu vremena koja je analitu potrebna za dolazak do detektora (Sertić, 2013; Damić i Nigović, 2010; Watson 1999).

Iz dosada spomenutih tvrdnji, očito je da se s CE mogu analizirati nabijene čestice odnosno da nakon primjene električnog polja one putuju prema anodi ili katodi, ali također je moguće analizirati i nenabijene odnosno neutralne čestice. Neutralni spojevi mogu se kretati pomoću elektroosmotskog toka (*engl. Electroosmotic flow, EOF*). Elektroosmotski tok je tok čistog pufera u kapilari, a do njega dolazi zbog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Ako se radi o standardno korištenoj kapilari, s unutrašnje strane građena je od izvučenog kvarca i sadrži silanolne skupine koje su različito ionizirane, ovisno o pH. Negativni naboj silanolnih skupina raste s porastom pH. pI silanolnih skupina je teško odrediti, ali eksperimentalno se zna da EOF postaje dostatan nakon pH 4. Kod dodatka otopine elektrolita u kapilaru, kationi iz otopine su privučeni od strane silanolnih skupina i tvore električni dvosloj. Električni dvosloj se sastoji od dva dijela – čvrstog i nepomičnog dijela u kojem se kationi iz otopine vežu za silanolne skupine i difuzijskog sloja u kojem nalazimo i katione i anione. Kada dođe do primjene napona, kationi iz difuzijskog sloja putuju prema katodi koja je negativno nabijena i za sobom povlače i tekućinu. Kationi će prvi doći do detektora, onda slijede neutralne čestice. Anioni migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, ali pošto je EOF jači od elektroforetske pokretljivosti aniona, dovodi ih do detektora. Porastom pH, veći je broj disociranih silanolnih skupina pa je veća i količina negativnog naboja na stijenci, a posljedično i EOF (Sertić, 2016, 2013; Watson 1999).

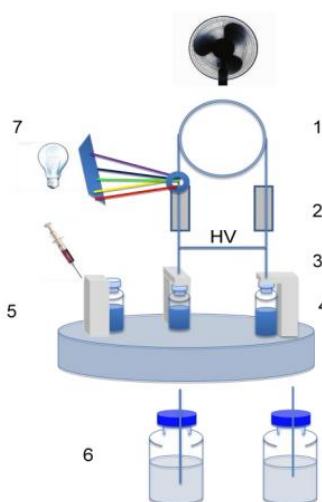


Slika 2. Prikaz razlike elektroosmotskog i laminarnog toka i pripadajućih pikova (Prilagođeno iz: Rozing i Lauer, 2014)

Tok je u kapilarnoj elektroforezi uniforman kroz cijelu kapilaru, za razliku od tekućinske kromatografije u kojoj je tok laminaran ili parabolni (slika 2). Uniformnost toka posljedica je sila koja jednoliko djeluje na sve dijelove kapilare, a ravan profil toka koji je postignut zaslužan je za oštre pikove i bolje razlučivanje (Roziing i Lauer, 2014; Sertić, 2013).

Prilikom razvoja nove metode važno je optimizirati različite parametre koji utječu na elektroforetsku pokretljivost i elektroosmotski tok. Parametri uključuju pH i koncentraciju pufera, temperaturu, napon, dodatak organskih tvari te vrstu i koncentraciju površinski aktivnih tvari, kao i izbor kapilare. Također, važno je optimizirati ispiranje kapilare jer uvelike utječe na reproducibilnost vremena migracije analita (Roziing i Lauer, 2014; Watson 1999).

1.4.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu



Slika 3. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu (Preuzeto iz: Sertić 2016.)

Uređaj za kapilarnu elektroforezu (Slika 3) sastoji se od termostatirane kapilare (1), dvije elektrode (2), visokonaponskog izvora istosmjerne struje (3), ulaznog i izlaznog spremnika za pufer (4), sustava za unošenje uzorka odnosno sustava za injektiranje (5), sustava za izmjenu pufera (6) i detektora (7). Krajevi kapilare uronjeni su u otopine pufera i preko elektroda iz visokonaponskog izvora struje uspostavlja se električno polje. Injektiranje uzoraka većinom je automatizirano. Na kraju kapilare, na mjestu za detektor kapilara se najčešće pali korištenjem uređaja za spaljivanje pomoću užarene žice. Tako možemo ukloniti sloj poliimida koji nije UV

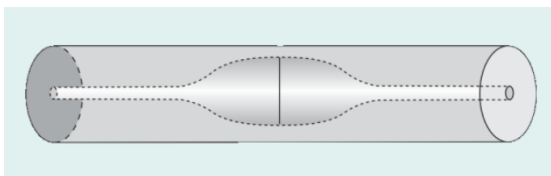
propustan. Kao detektor najčešće se koristi UV-Vis detektor odnosno detektor s više dioda (*engl. Diode Array Detector, DAD*) koji je zamijenio ranije korišteni monokromatski detektor. Osim njega još se mogu koristiti i amperometrijski, konduktometrijski, fluorescencijski, beskontaktni detektor vodljivosti i maseni spektrometar (Hranilović, 2017; Sertić, 2016, 2013).

1.4.3. Vrste kapilare korištene u kapilarnoj elektroforezi

Kapilare su jako važne jer se u njima odvija razdvajanje svih sastavnica smjese tijekom analize kapilarnom elektroforezom. Različite vrste kapilara, ali i njihova duljina te unutrašnji promjer utječu na razlučivanje i učinkovitost razdvajanja. Važno je da su izrađene od materijala koji su kemijski i električki inertni kako ne bi dolazilo do promjene analita za vrijeme analize (Sertić, 2016; Rozing i Lauer, 2014).

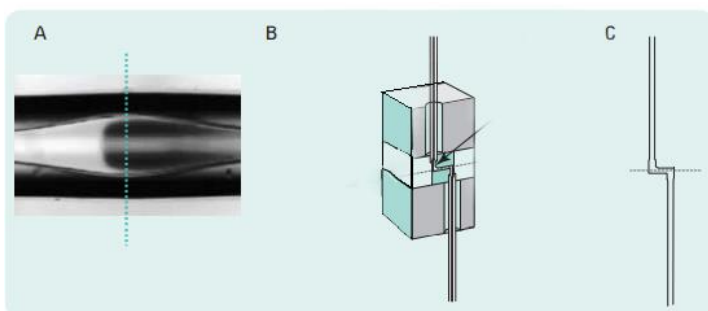
Kapilare od izvučenog kvarca se standardno koriste za analize u kapilarnoj elektroforezi. Kod ovog tipa kapilare na unutrašnjoj površini nalaze se samo silanolne skupine kvarca. S vanjske strane presvučene su s zaštitnim slojem poliimida. Unutrašnji promjeri ovih kapilara variraju između 10 i 200 μm , a najčešće korišteni su 25-100 μm . Vanjski promjeri postoje u različitim opcijama, najčešće se koriste između 350-400 μm . Kako bi se skratilo vrijeme analize preporuča se korištenje što kraćih kapilara, najčešće se radi o 25-75 cm (Rozing i Lauer, 2014).

Bubble cell su kapilare (Slika 4) koje omogućavaju povećanje optičkog puta pa to pridonosi povećanju osjetljivosti u odnosu na standardno korištene kapilare. Naziv *bubble cell* nose zbog proširenja kapilare na mjestu detektora u obliku mjehurića. Unutarnji promjer ovakvog tipa kapilare ostaje jednak kao i kod standardno korištenih kapilara (primjerice 25, 50, 75, 100 μm) zbog čega korištenje ove kapilare neće promijeniti razlučivanje ili vrijeme analize, a također neće imati utjecaja niti na povećanje struje. Promjer mjehurića može biti 2,7-5 puta veći od promjera unutrašnjeg dijela kapilare, ipak najčešće se radi o povećanju tri puta. Koliko je optički put povećan, toliko se povećava i signal što direktno pokazuje utjecaj na povećanje osjetljivosti (Sertić, 2016, 2013; Rozing i Lauer, 2014).



Slika 4. Prikaz *bubble cell* kapilare (Prilagođeno iz: Rozing i Lauer, 2014)

Z kapilare se također mogu svrstati u kapilare s promijenjenim optičkim putem. One za razliku od *bubble cell* kapilara nemaju mjehurić odnosno proširenje, nego je kapilara savijena i izgleda kao slovo Z. Ključne za ovaj tip kapilare su safirne leće koje služe za fokusiranje svjetlosti. Kako svjetlost prolazi kroz kapilaru, dolazi do refleksije između kvarca i zraka. Prolazak svjetlosti se temelji na refleksiji i refrakciji i višestruko ovisi o indeksu refrakcije otopine. Korištenjem ćelije visoke osjetljivosti (Slika 5) možemo poboljšati nedostatke klasične Z kapilare jer je zbog reflektivne unutrašnjosti ćelije omogućena gotovo potpuna transmisija svjetlosti što kod klasične Z kapilare bez ćelije nije slučaj. Također, omogućena je i bolja spektralna analiza, povećana je osjetljivost i poboljšana je kvantitativna analiza jer je šum značajno smanjen što doprinosi preciznijem integriranju pikova i manjim limitima kvantifikacije (Sertić, 2016; Rozing i Lauer, 2014; Moring i sur., 1993).



Slika 5. Prikaz *bubble cell* kapilare (A), ćelije visoke osjetljivosti (B) i Z-kapilare (C) (Prilagođeno iz: Rozing i Lauer, 2014)

Razlikujemo i drugačije tipove kapilara čija je unutrašnja površina promijenjena – PVA i CEP presvučene kapilare. PVA kapilare su presvučene slojem polivinil alkohola i njihova uloga je da umanje elektrostatske i hidrofobne interakcije otapalo-zid kapilare, a samim time i da uklone elektroosmotski tok. Uz PVA kapilare može se koristiti većina poznatih pufera, primjerice

pogodan je i fosfatni i boratni pufer jer je kapilara stabilna u širokom pH rasponu od 2,5 do 9,5. S obzirom da nema EOF-a, zahtjevne procedure ispiranja mogu se ukloniti, a također se može poboljšati i reproducibilnost mjerenja. CEP kapilare su presvučene slojem polimera koje je trajno vezan, a zaštićuje silanolne skupine. Adsorpcija uzorka je spriječena, EOF je eliminiran i ovaj tip kapilare stabilan je u rasponu pH od 2 do 8. Pogodne su za analizu DNA molekula (Sertić, 2016).

1.4.4. Primjena kapilarne elektroforeze u analitici lijekova

Iako se kapilarna elektroforeza još uvijek ne koristi u rutinskim analizama, ima sve veću primjenu u analitici lijekova. Primjenjuje se u analizi velikih molekula (primjerice nukleinskih kiselina, proteina), ali i malih molekula (hormoni, biljni metaboliti, lijekovi) (Sertić, 2013; Damić i Nigović, 2010).

Primjenu pronalazi i u analizi kiralnih spojeva kao jednostavna i jeftina metoda. Za analize u tom slučaju nisu potrebne kiralne kolone, već je dovoljan dodatak kiralnog selektora, najčešće ciklodekstrina. Primjenu pronalaze u provjeri čistoće, razdvajanju i ispitivanju stabilnosti enantiomera (Sertić i sur., 2010).

Koristi se u analizama različitih ljekovitih oblika, ali također i složenih uzoraka poput seruma, tkiva, urina, plazme. Posebno je važna u analizi peptida i proteina, kao i u peptidnom mapiranju. Uz primjenu afinitetne kapilarne elektroforeze može se utvrditi i stupanj vezanja lijeka na proteine plazme. Metoda može u nekim slučajevima zamijeniti i ionsku kromatografiju, kod razdvajanja organskih kiselina i anorganskih iona (Damić i Nigović, 2010). Primjenjuje se i u biotehnologiji kod analize RNA, DNA, proteina, a zamijenila je ranije korištenu i već tradicionalnu elektroforezu u gelu (Sertić, 2013).

U nekoliko posljednjih desetljeća kapilarna elektroforeza je iz istraživanja ušla u praksu u mnogim područjima, uključujući biofarmaceutiku, ali i forenzičku, prehrambenu, okolišnu, kemijsku i biokemijsku analizu. Trendovi idu prema povezivanju kapilarne elektroforeze s masenom spektroskopijom i mikročipiranjem kapilarne elektroforeze (Rozing i Lauer, 2014).

1.4.5. Kapilarna zonska elektroforeza

Kapilarna zonska elektroforeza (*eng. Capillary zone electrophoresis, CZE*) je najjednostavniji i najvažniji oblik kapilare elektroforeze. Kapilara je u ovom tipu elektroforeze ispunjena samo puferom koji nam je važan za elektrolizu. Osim u kapilari pufer se nalazi i u spremnicima u koji su uronjene elektrode. Na temelju različite elektroforetske pokretljivosti dolazi do razdvajanja analita, oni se u kapilari razdvoje u zone i u zonama putuju kapilarom. Kreću se različitim brzinama koje ovise o elektroforetskoj pokretljivosti pojedinačnih analita, ali i o elektroosmotskom toku. Ovom vrstom kapilarne elektroforeze možemo razdvajati samo nabijene molekule, katione i anione, jer oni uz pomoć elektroosmotskog toka putuju prema katodi. Ipak, ova vrste CE nije pogodna za razdvajanje neutralnih molekula jer koeluiraju s elektroosmotskim tokom (Sertić, 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak dojke je najčešće dijagnosticirani rak u žena i rak koji uzrokuje najveću smrtnost. Pojavnost mu raste iz godine u godine i sve je važnije pronalaziti nova terapijska rješenja koja će uspješno povećavati stopu preživljavanja bez progresije bolesti. Podjednako je važno razvijati metode detekcije koje mogu značajno pridonijeti terapijskom praćenju lijekova (*engl. Therapeutic drug monitoring, TDM*) i pospješiti uspjeh terapije.

Ribociklib, palbociklib i abemaciklib su novi antineoplastici indicirani za liječenje žena s lokalno uznapredovalim ili metastatskim rakom dojke pozitivnim na hormonski receptor (HR) i negativnim na receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2). Selektivni su inhibitori CDK4/6 (o ciklinu ovisne kinaze 4 i 6) i prepoznati su kao klinički vrlo važni lijekovi s pozitivnim sigurnosnim profilom i malim rizikom toksičnosti.

Svrha ovog istraživanja je razvijanje nove kapilarnoelektroforetske metode kako bi se na jednostavan, brz i točan način mogao detektirati ili kvantificirati neki od promatranih lijekova iz skupine cikliba – abemaciklib, ribociklib ili palbociklib. Odabrana metoda može pomoći u terapijskom praćenju lijekova kod pacijentica na monoterapiji ili na politerapiji s inhibitorima aromataze ili fulvestrantom. Izabrana tehnika je kapilarna zonska elektroforeza.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE

3.1.1. Standardne supstancije

- Palbociklib (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Ribociklib (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)
- Abemaciklib (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)

3.1.2. Supstancije i kemikalije

- Acetonitril (Bisolve Chimie SARL, Dieuze, Francuska)
- Fosforna kiselina 10% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Izopropanol (Bisolve Chimie SARL, Dieuze, Francuska)
- Limunska kiselina 1-hidrat (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina fosfatnog pufera pH=2,5 50mM (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina klorovodične kiseline 1M (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
- Otopina natrijevog hidoksida 0,1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina natrijevog hidoksida 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR

3.2.1. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Digitalni pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Sustav za pročišćivanje vode WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Vortex miješalica (Ika, Njemačka)

3.2.2. Pribor

- Bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu, 1,5 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Injekcijski membranski filtri, veličina pora 0,2 μm , promjera 25mm (VWR Chemicals, Randor, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 30 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm , duljine do detektora 27 cm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

3.2.3. Programski paketi

- 3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, SAD)

3.3. METODE

3.3.1. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina

Matična standardna otopina abemacikliba pripravljena je vaganjem standarda odvage 2,068 mg i otapanjem u 1,5 mL metanola. Tako je postignuta koncentracija 1,38 mg/mL. Nakon izrade matična standardna otopina je čuvana na +4 °C u hladnjaku.

Matična standardna otopina palbocikliba priređena je u tikvici od 10 mL otapanjem u smjesi acetonitril:voda (50:50, v/v). Dobivena je koncentracija 225 µg/mL. Nakon izrade matična standardna otopina je čuvana na +4 °C u hladnjaku.

Matična standardna otopina ribocikliba priređena je u tikvici od 10 mL otapanjem u metanolu. Dobivena je koncentracija 1,04 mg/mL. Nakon izrade matična standardna otopina je čuvana na +4 °C u hladnjaku.

Matične standardne otopine abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba razrijeđene su do koncentracija 100 µg/mL u smjesi metanol:voda (50:50, v/v) i tako je dobivena radna standardna otopina korištena za optimizaciju metode.

Za izradu matične standardne otopine i radne standardne otopine, s obzirom da je riječ o citostaticima, korištena je odgovarajuća zaštitna oprema.

3.3.2. Priprema otopine radnog pufera

Otopina limunske kiseline 500 mM pripravljena je otapanjem odgovarajuće količine limunske kiseline u odmjerne tikvici od 50 mL u ultračistoj vodi. Otopina natrijevog citrata 364 mM pripravljena je otapanjem 5,3531 g u odmjerne tikvici od 50 mL uz ultračistu vodu. Korištena je ultrazvučna kupelj kako bi se ubrzalo i pospješilo otapanje. Otopina citratnog pufera priređivana je iz otopine limunske kiseline i otopine natrijevog citrata u različitim omjerima. Pomoću pH metra različitim otopinama citratnog pufera određivali smo pH. Prije korištenja, pufer je profiltriran kroz injekcijski membranski filter (veličina pora 0,2 µm, promjera 25mm, VWR Chemicals, Randor, SAD).

Korištena je komercijalno dostupna otopina fosfatnog pufera pH 2,5 50 mM (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka).

Otopine limunske kiseline i natrijevog citrata kao i otopine citratnog i fosfatnog pufera čuvane su na sobnoj temperaturi.

3.3.3. Uvjeti analize kapilarne elektroforeze

Prije prvog korištenja, kapilara je aktivirana ispiranjem 30 minuta s 1 M NaOH, 10 minuta s ultračistom vodom, 30 minuta s 1 M HCl, 10 minuta s ultračistom vodom, 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, 10 minuta s ultračistom vodom i na kraju 30 minuta s radnim puferom. Na početku radnog dana kapilara je ispirana 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, 10 minuta s ultračistom vodom i 20 minuta s radnim puferom, a na kraju dana 20 minuta s ultračistom vodom nakon čega se kapilara uranjala u vijale s ultračistom vodom. Kapilara je prije svake analize kondicionirana 5 minuta s otopinom radnog pufera.

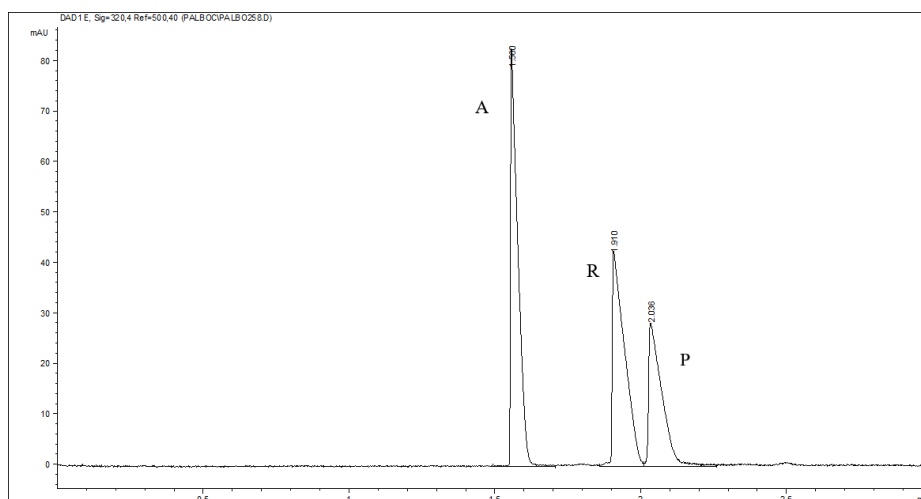
Analize su izvođene na uređaju za kapilarnu elektroforezu (3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757), Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka), a korištena je kapilara od izvučenog kvarca duljine 32,5cm unutrašnjeg promjera 50 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Uzorci su u kapilaru injektirani pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi 25 °C tijekom 6 sekundi. Valna duljina na kojoj su provođene analize iznosi 320 nm. Analize su provođene pri naponu od 27,5 kV i korišten je 50 mM fosfatni pufer pH 2,5.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir radnog pufera

Prilikom razvoja nove CE metode prvi ispitivani parametar je vrsta i pH radnog pufera. pH ima direktni utjecaj na EOF, mijenjanjem pH pufera mijenja se i zeta potencijal jer pH mijenja naboj na unutrašnjoj stijenci kapilare. Porastom pH, raste i EOF jer je veći broj silanolnih skupina ioniziran. Važno je pronaći odgovarajući pH pufera jer iako je poželjno imati što bržu analizu, nije nužno dobro imati visoki pH pufera ukoliko se pri tom pH molekule nisu uspjele razdijeliti. pH osim utjecaja na EOF, utječe i na elektroforetsku pokretljivost analita. Očekivano je da će palbociklib, ribociklib i abemaciklib zbog njihovih procijenjenih pKa vrijednosti biti najviše ionizirani pri nižem pH i da će im takav pH odgovarati. Pri niskom pH EOF će biti sporiji, ali ciklibi će biti u ioniziranom obliku i bez obzira na sporiji EOF moći će se kretati prema katodi na temelju svoje elektroforetske pokretljivosti (Bobić, 2020; Sertić, 2013).

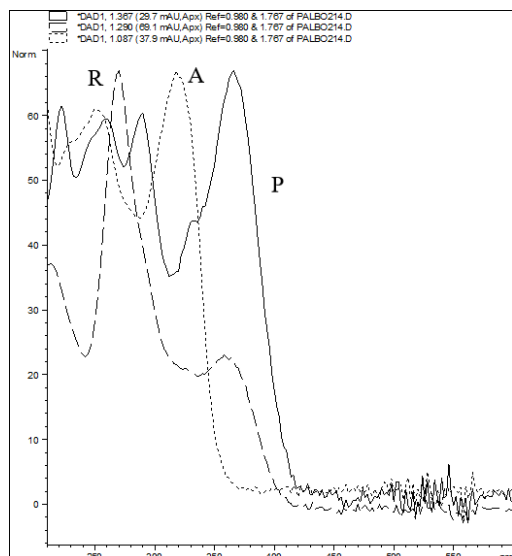
Kao prvi pufer isproban je fosfatni pufer pH 2,5 koncentracije 50 mM i postignuto je odgovarajuće razdvajanje ($R_s \geq 1,5$) pa je odabran kao radni pufer u daljnjim ispitivanjima. Redoslijed izlaženja pikova bio je isti pri svim mjerenjima na pH 2,5. Prvi je izašao abemaciklib, drugi ribociklib, a treći palbociklib (slika 6).



Slika 6. Elektroferogram smjese standardnih otopina abemacikliba (A), ribocikliba (R) i palbocikliba (P)

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)

Uz odabir vrste i pH pufera odabrana je i valna duljina pri kojoj je provođena detekcija. Za smjesu analita abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba odabrana je valna duljina 320 nm.



Slika 7. Uv-Vis spektar abemacikliba (A), ribocikliba (R) i palbocikliba (P)

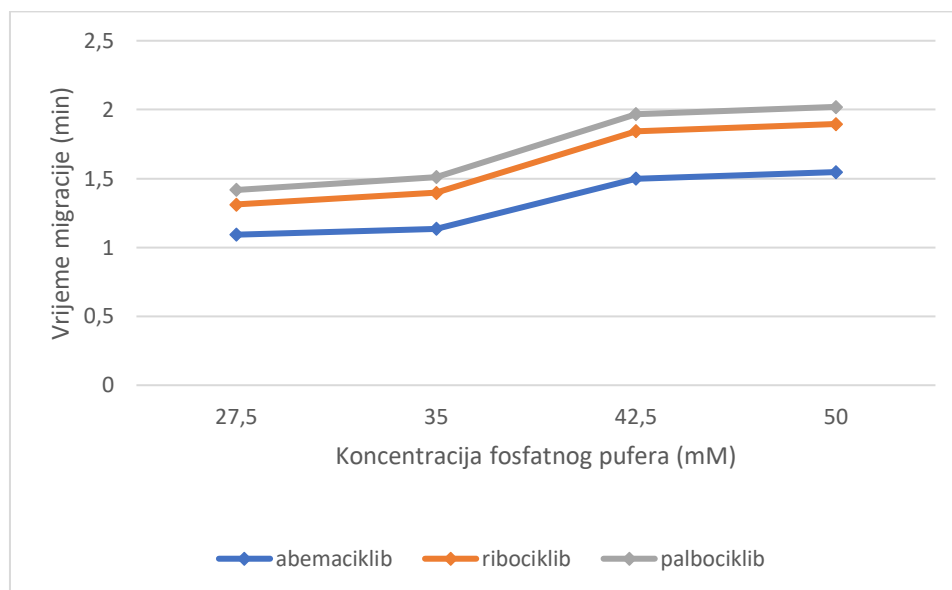
Slika 7 prikazuje UV-Vis spektar smjesa standardnih otopina analita kojom je potvrđen redoslijed izlaženja pikova i koji je poslužio kao potvrda da tri pika koja su dobivena na elektroforogramu odgovaraju trima analitima.

4.2. Optimiziranje koncentracije radnog pufera

Nakon odabira fosfatnog pufera pH 2,5 slijedilo je optimiziranje koncentracije radnog pufera. Koncentracija pufera, odnosno ionska jakost pufera ima značajan utjecaj na elektroosmotski tok pa samim time i na razlučivanje analita. Povećanjem koncentracije odnosno ionske jakosti pufera, smanjuje se elektroosmotski tok pa se vrijeme migracije analita produljuje (Bobić, 2020).

U svrhu optimizacije koncentracije pufera, ispitan je utjecaj koncentracija u rasponu od 15 mM do 50 mM fosfatnog pufera pH 2,5. Koncentracije 15 mM i 20 mM nisu uvijek davale reproducibilna mjerenja i oblik struje je bio promjenjiv. Zaključeno je da pri spomenutim niskim koncentracijama pufera, a vjerojatno kao posljedica nereproducibilnih mjerenja,

vremena migracije ne rastu s povećanjem koncentracije pufera. Pri rasponu koncentracija od 27,5 mM do 50 mM vremena migracije su se povećavala s povećanjem koncentracije (slika 8) što je u skladu s očekivanjima i teorijskim postavkama kapilarne elektroforeze.



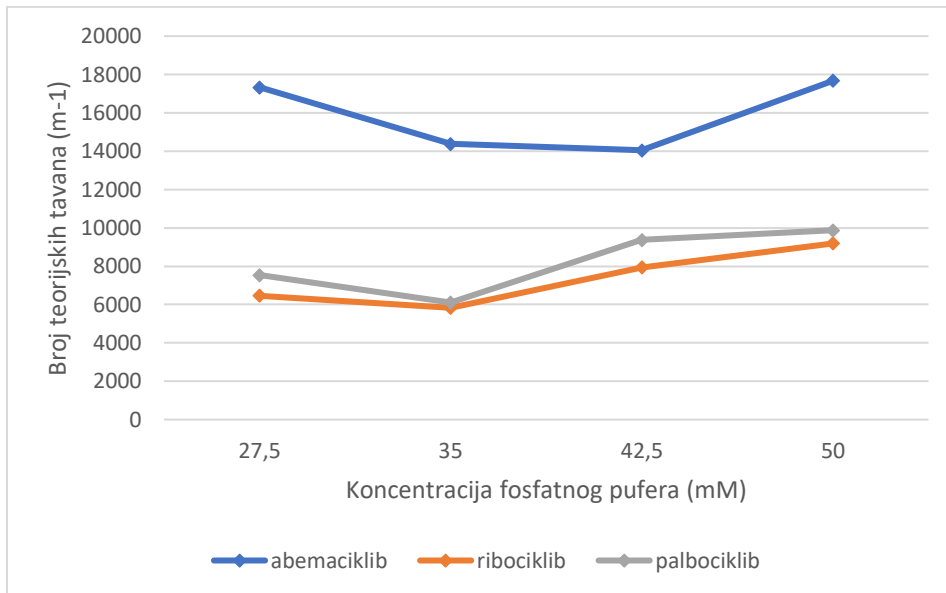
Slika 8. Ovisnost vremena migracije abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba o koncentraciji pufera

Uvjeti analize: 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Kod optimizacije parametara nove metode, korisno je gledati i broj teorijskih tavana. Taj broj nam govori kolika je učinkovitost upotrebene kapilare. Broj teorijskih tavana opisuje hipotetsko stanje, koliko puta je u kapilari uspostavljena ravnoteža između nepokretne i pokretne faze, odnosno u ovom slučaju radnog pufera. Veći broj teorijskih tavana ukazuje na veću učinkovitost kapilare (Sertić, 2013).

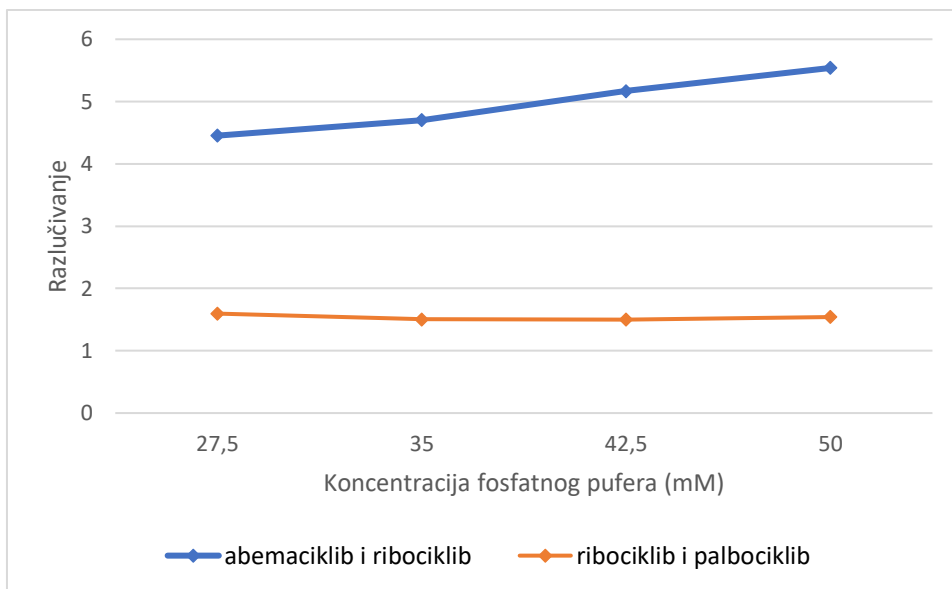
Promatrajući ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji pufera zamjetno je da se, uz blage iznimke, kod ribocicliba i palbocicliba broj teorijskih tavana povećava s povećanjem koncentracije pufera. Kod abemacicliba u dijelovima grafa također je vidljivo povećanje broja teorijskih tavana s koncentracijom pufera, ali ističe se veliki broj teorijskih tavana na 27,5 mM približno jednak najvećem broju teorijskih tavana pri 50 mM koncentraciji pufera (slika 9).

Razlučivanje između abemacikliba i palbocikliba raste s povećanjem koncentracije i najveće je pri koncentraciji 50 mM (slika 10). Razlučivanje između ribocikliba i palbocikliba u rasponu od koncentracije 27,5 mM do koncentracije 50 mM približno je jednako na svim spomenutim koncentracijama ($R_s \geq 1,5$) što predstavlja prihvatljivo odjeljivanje pikova na baznoj liniji (slika 10).



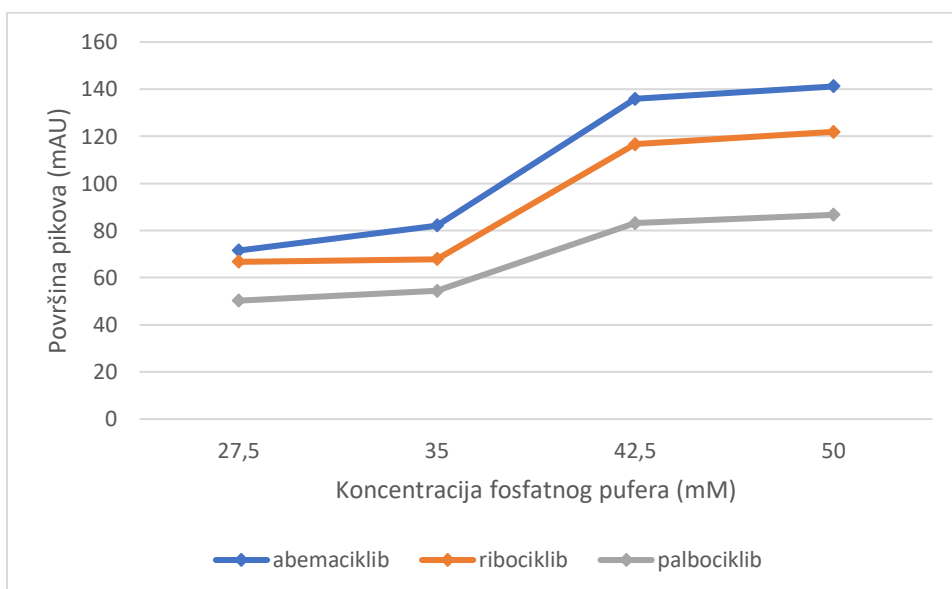
Slika 9. Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji pufera

Uvjeti analize: 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)



Slika 10. Ovisnost razlučivanja abemacicliba i ribocikliba i ribocikliba i palbocikliba o koncentraciji fosfatnog pufera

Uvjeti analize: 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)

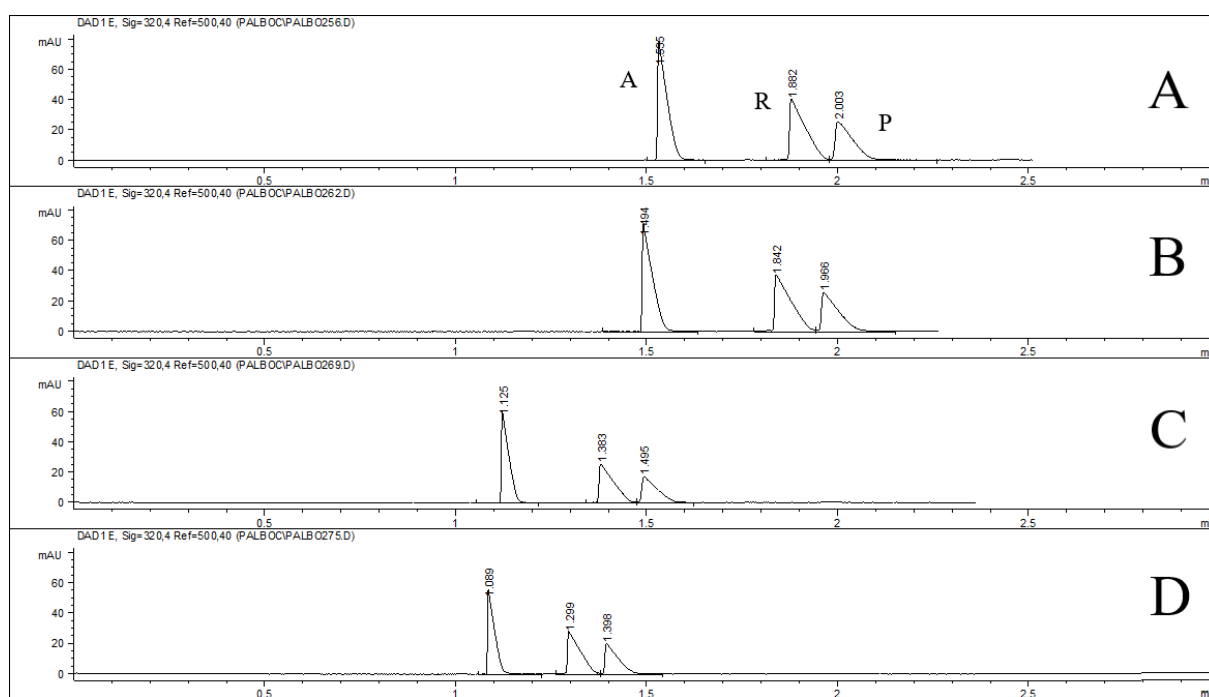


Slika 11. Ovisnost površina pikova o koncentraciji fosfatnog pufera

Uvjeti analize: 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)

Promatrajući ovisnost površine pikova o koncentraciji, nakon najmanjih koncentracija 15 i 20 mM, površina pikova raste s porastom koncentracije pufera (slika 11). Veća površina pikova poželjna je radi veće osjetljivosti.

Na temelju svih provedenih eksperimenata, optimalna koncentracija pufera je 50 mM. Pri toj koncentraciji najduže je vrijeme migracije analita, ali taj parametar manje je značajan jer svi analiti pri svim koncentracijama pufera izlaze unutar 2 minute. Također, pri koncentraciji 50 mM broj teorijskih tavana je najveći kao i površina pikova. Razlučivanje ključnih pikova ribocikliba i palbocikliba približno je jednako. Na elektroferogramu (slika 12) prikazan je redosljed izlaženja analita. Prvi izlazi abemaciklib, drugi ribociklib zatim treći palbociklib, a vidljivo je i povećanje površine pikova i duže vrijeme analize s porastom koncentracije.



Slika 12. Elektroferogram smjese standardnih otopina abemacikliba (A), ribocikliba (R) i palbocikliba (P) u ovisnosti o koncentracijama fosfatnog pufera: (A) 50 mM, (B) 42,5 mM, (C) 35 mM, (D) 27,5 mM

Uvjeti analize: 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)

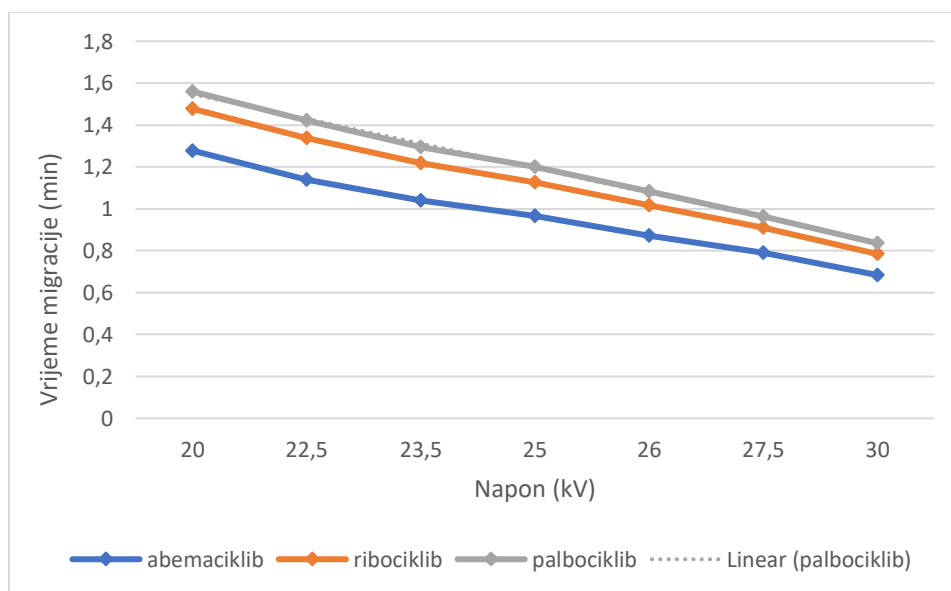
4.3. Optimizacija napona kapilare

Napon je vrlo važan parametar i svakako ga treba optimizirati pri razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode. Napon djeluje tako da povećava električno polje što dovodi do povećanog EOF-a, ali i povećane elektroforetske pokretljivosti analita. Velika vrijednost napona, a samim time i električnog polja može dovesti do generiranja topline u kapilari i Jouleovog zagrijavanja. Posljedica pretjeranog zagrijavanja može biti neželjeno širenje pikova analita (Sertić, 2013).

Prije optimizacije napona, kapilara je, nažalost, puknula. Zbog puknuća kapilare očekivano je skraćeno vrijeme migracije analita i manje razlučivanje zbog manjeg puta kapilare.

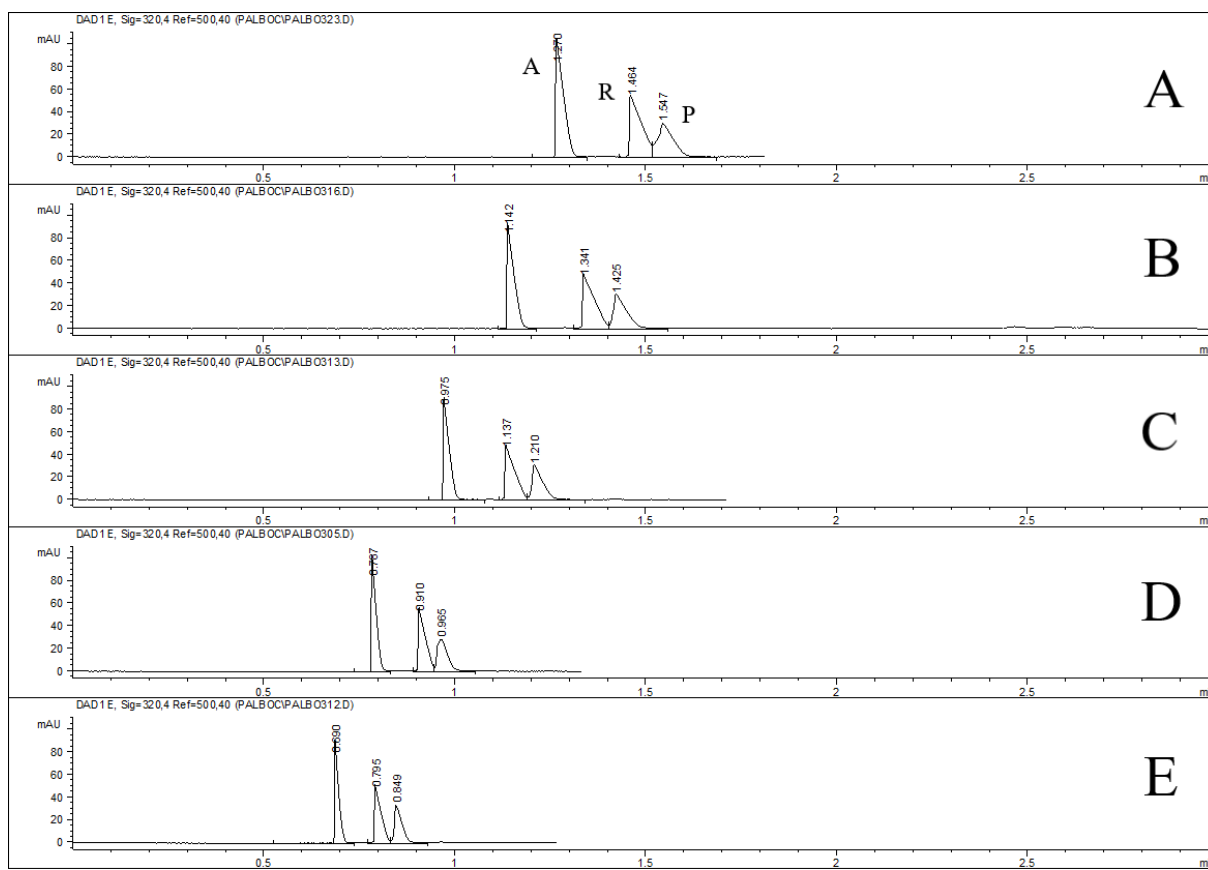
U svrhu optimizacije napona, ispitan je utjecaj napona u rasponu od 20 kV do 30 kV.

Vrijeme migracije se smanjuje povećanjem napona jer je povećan EOF, a samim time i brzina analize (slika 13). Pri najvećem naponu struja je postala jako visoka i nestabilna pa se napon od 30 kV neće razmatrati za optimizaciju.



Slika 13. Ovisnost vremena migracije abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba o primijenjenom naponu

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)



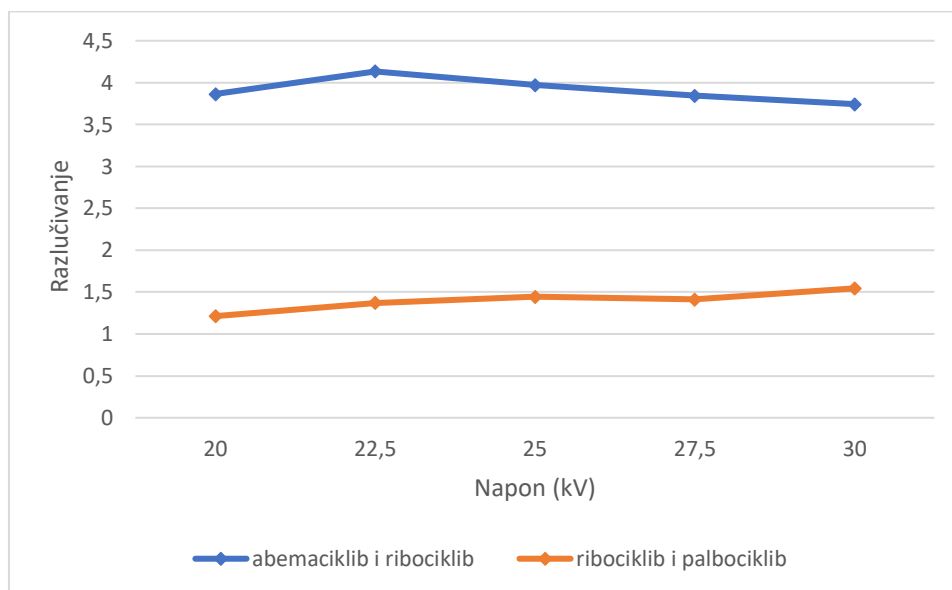
Slika 14. Elektroferogram smjese standardnih otopina abemacicliba (A), ribocicliba (R) i palbocicliba (P) u ovisnosti o naponu (A) 20 kV, (B) 22,5 kV, (C) 25 kV, (D) 27,5 kV, (E) 30 kV

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Na elektroferogramu (slika 14) vidimo redoslijed izlaženja analita, abemaciclib, ribociclib i palbociclib. Usporedbom elektroferograma (slike 12 i 14), ali i grafova (slike 8 i 13) vidljivo je da je vrijeme migracije analita, očekivano, smanjeno nakon što je kapilara puknula.

Razlučivanje između abemacicliba i ribocicliba se povećanjem napona blago smanjivalo, ali je i dalje pri svim naponima R_s vrijednost dovoljno velika ($R_s > 3,5$) da bi pikovi bili dostatno razlučeni. Razlučivanje ribocicliba i palbocicliba blago raste s povećanjem napona. Najviša R_s vrijednost je na 30 kV i to je jedini R_s koji prelazi dostatnu razinu razlučivanja dva pika na baznoj liniji od 1,5, ali je vrijednost tog napona izuzeta kao optimizacijski parametar zbog

Jouleovog zagrijavanja i loše reproducibilnosti mjerenja. Na 25 kV i 27,5 kV pikovi ribocikliba i palbocikliba su podjednako razlučeni i R_s vrijednosti su bliske dostatnom razlučivanju od 1,5 (slika 15).

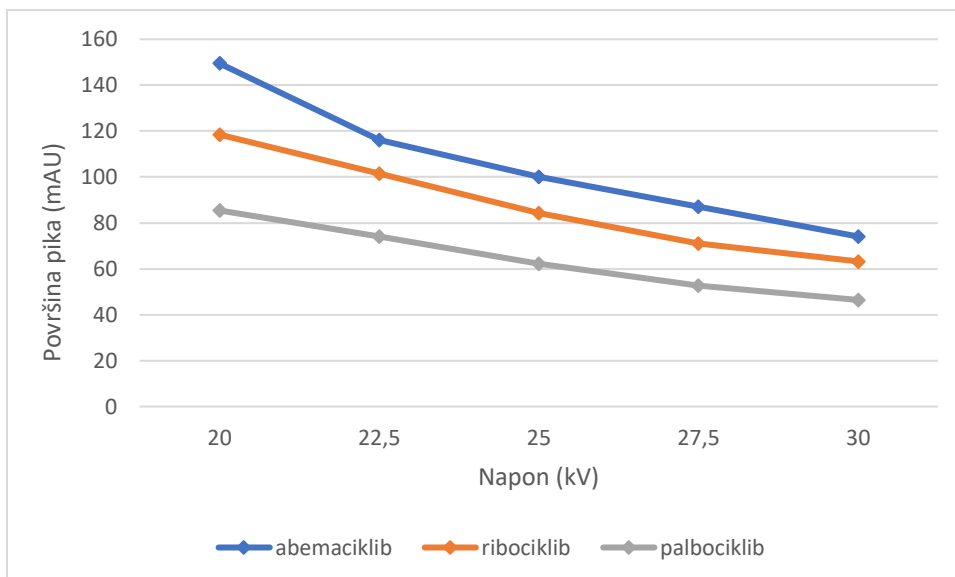


Slika 15. Ovisnost razlučivanja između abemacicliba i ribocikliba i ribocikliba i palbocikliba o naponu

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocikliba i palbocikliba (100 µg/ml)

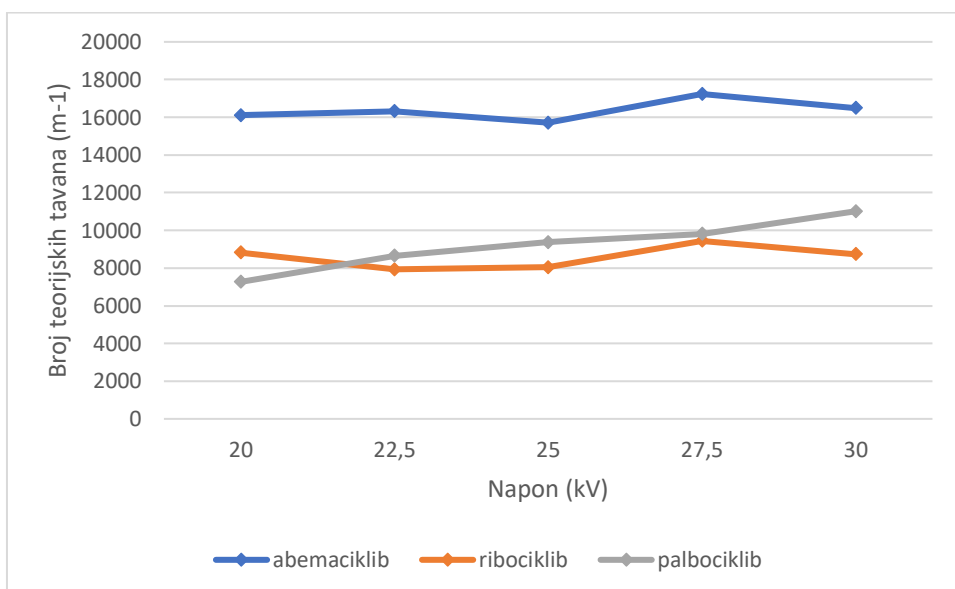
Površine pikova analita smanjuju se s povećanjem napona što može imati utjecaja na osjetljivost metode. Najveća površina pikova prisutna je na 20 kV (slika 16).

Vrijednosti teorijskih tavana abemacicliba i ribocikliba (slika 17) su podjednake na svim izmjerenim naponima, uz blago povećanje pri naponu 27,5 kV. Vrijednosti teorijskih tavana palbocikliba blago rastu s povećanjem napona, najviši su na 30 kV, a za optimizaciju nam je najznačajnija vrijednost na 27,5 kV zbog unaprijed objašnjenog izuzimanja vrijednosti na 30 kV.



Slika 16. Ovisnost površine pikova o naponu

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)



Slika 17. Ovisnost teorijskih tavana o naponu

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Zaključno, optimalan napon na kojem je izvedeno mjerenje je 27,5 kV. Pri tom naponu vrijeme migracije analita je najkraće, a vrijednosti teorijskih tavana su najveće. Razlučivanje ključnih pikova ribocikliba i palbocikliba podjednako je na 25 kV ($R_s=1,44$) i 27,5 kV ($R_s=1,41$).

4.4. Optimizacija temperature kapilare

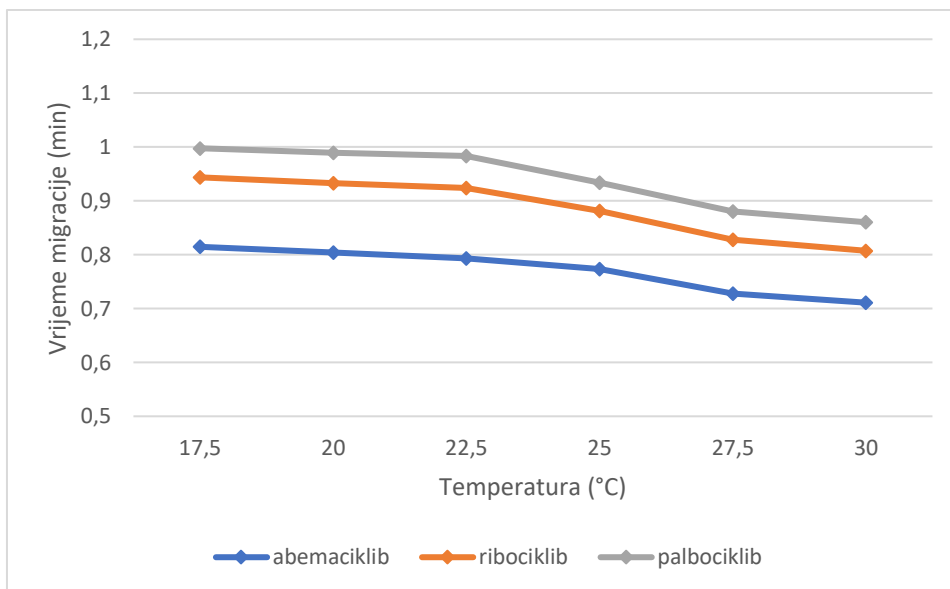
Smisao termostiranja kapilare je izbjeći Jouelovo zagrijavanje do kojeg može doći ako se temperatura ne održava stalnom zbog povećanja jakosti struje. Optimiziranje temperature je važno jer možemo istovremeno utjecati na 3 parametra – viskoznost, EOF i vrijeme analize odnosno vrijeme migracije analita. Osim toga temperatura može utjecati i na kemijsku ravnotežu i kinetiku. Kontroliranje temperature ima značajan utjecaj na viskoznost. Viskoznost se mijenja 2-3 % sa svakim °C što posljedično utječe na EOF i elektroforetsku pokretljivost analita. Kod ispitivanja temperature još moramo osigurati da je temperatura jednaka ili veća Krafftovoj točki kako bi topljivost ionskih surfaktanta u vodi bila dostatna, odnosno kako topljivost surfaktanta ne bi bila manje od kritične micelarne koncentracije (Roziing i Lauer, 2014; Sertić, 2013).

Ispitan je utjecaj temperature u rasponu od 17,5 °C do 30 °C. Na slici 18 vidljivo je da se vrijeme migracije analita abemacikliba, ribocikliba i palbocikliba smanjuje s porastom temperature. Došlo je do smanjenja viskoznosti pa je samim time i vrijeme analize brže, odnosno vrijeme migracije analita kraće.

Kada uspoređujemo razlučivanje abemacikliba i ribocikliba ono nije značajno jer je pri svim mjerenim temperaturama dostatno da bi se pikovi razdvojili što je vidljivo na slici 19.

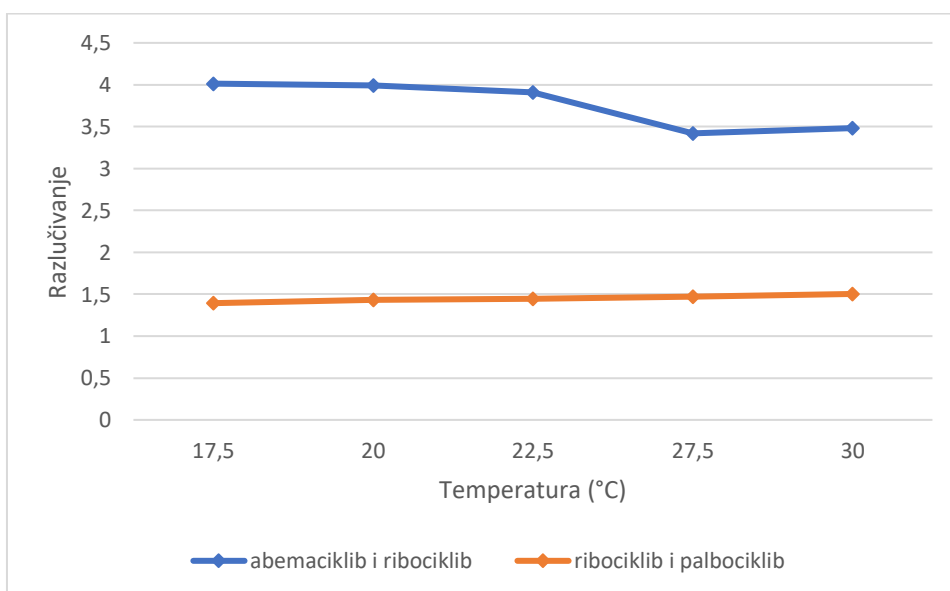
Razlučivanje ribocikliba i palbocikliba nam je značajnije za proučavanje jer raste s porastom temperature i zbog toga što se R_s mijenja i prelazi iz vrijednosti 1,39 pri 17,5 °C do 1,50 pri 30 °C (slika 19). Pri temperaturi 30 °C razlučivanje je najveće i to je jedina temperatura na kojoj razlučivanje iznosi 1,5 što smatramo dostatnim za razdvajanje pikova analita na baznoj liniji.

Površine pikova ne mijenjaju se značajno prilikom promjene temperature i nisu odlučujući parametar za optimizaciju (slika 20).



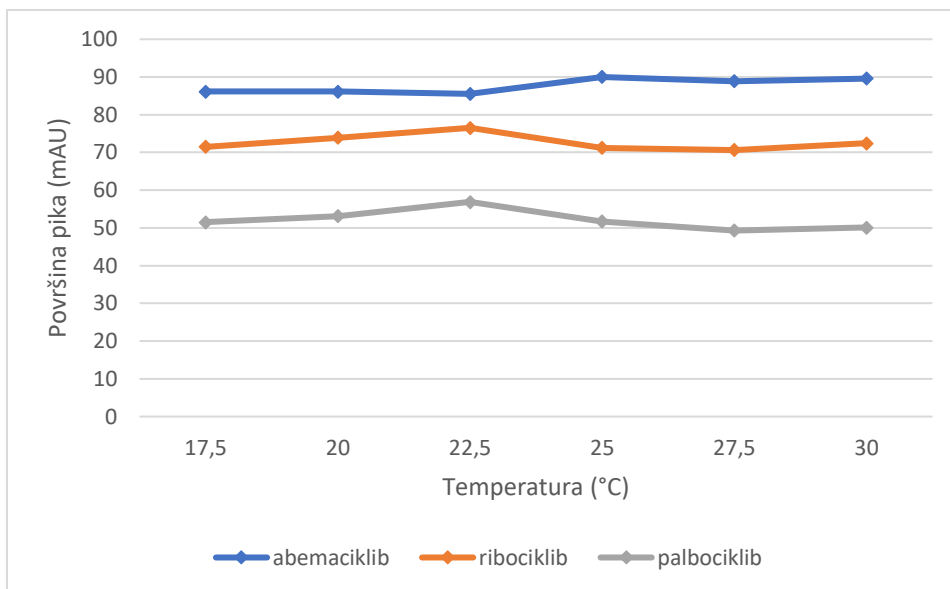
Slika 18. Ovisnost vremena migracije o temperaturi

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)



Slika 19. Ovisnost razlučivanja abemacicliba i ribocicliba i ribocicliba i palbocicliba o temperaturi

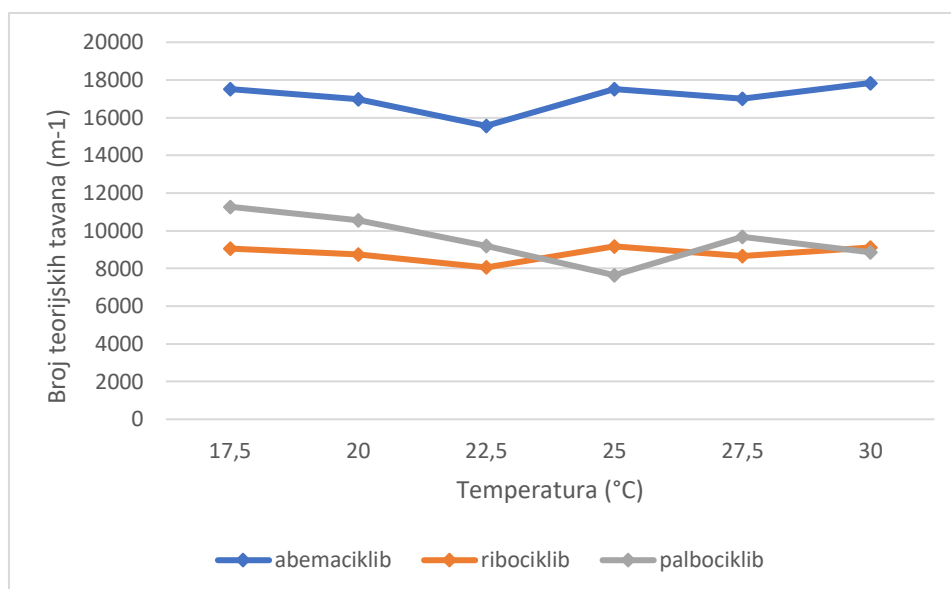
Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)



Slika 20. Ovisnost površina pika o temperaturi

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Teorijski tavnani abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba ne ponašaju se linearno prilikom promjene temperature. Kod abemacicliba i palbocicliba na većini temperatura prisutan je sličan broj teorijskih tavana, a kod palbocicliba najveći broj teorijskih tavana zabilježen je na najnižoj mjerenoj temperaturi 17,5 °C iako to nije toliko značajno jer pri drugim temperaturama nije zabilježen značajni pad (slika 21).



Slika 21. Ovisnost teorijskih tavana o temperaturi

Uvjeti analize: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Zaključno, optimalna temperatura na kojoj je izvedeno mjerenje je 30 °C. Pri toj temperaturi vrijeme migracije sva tri analita je najkraće, a razlučivanje između ribocicliba i palbocicliba je najveće i jedino pri toj temperaturi prelazi 1,5.

Uspoređujući vremena migracije pri istim uvjetima analize (50 mM fosfatni pufer pH 2,5, 27,5 kV, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)) kod optimizacije temperature i napona, postignut je visok stupanj reproducibilnosti zbog promijenjenih metoda ispiranja kapilare.

4.5. Optimizacija prekondicioniranja i postkondicioniranja kapilare

Kondicioniranje kapilare je preduvjet za razvijanje izdržljive metode za kapilarnu elektroforezu. Nereproducibilna migracijska vremena povezuju se s neispravnom metodom ispiranja koja dovodi do nedosljedne vrijednosti struje (Smith i sur., 1991). Vrlo važno je prilikom kondicioniranja paziti na mogućnost pojave histereze, stanja u kojem sustav ovisi o prethodnim uvjetima. Do histereze može doći kod brze izmjene visokog pH na niski. Cilj je dostatnim ispiranjem postići da površina unutrašnjosti kapilare bude u ravnoteži s pH pufera

(Rozing i Lauer, 2014). U proizvodnji kapilare na unutrašnjosti kapilare provedena je potpuna dehidroksilacija, a stajanjem u prisutnosti atmosferskog zraka može doći do rehidroksilacije pa se zato koristi NaOH u svrhu ponovne hidroksilacije unutrašnjosti kapilare, a pomaže i kako bi se uklonili potencijalni zaostali dijelovi dobiveni u proizvodnji same kapilare. HCl može ukloniti zaostale tragove metala. Ispiranje s puferom služi za ponovno postizanje ravnoteže kapilare (Gómez i Sandoval, 2008).

Rad na kapilarnoj elektroforezi započet je s novom kapilarom. Prije korištenja, kapilara je aktivirana ispiranjem 30 minuta s 1 M NaOH, 10 minuta s ultračistom vodom, 30 minuta s 1 M HCl, 10 minuta s ultračistom vodom, 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, 10 minuta s ultračistom vodom i na kraju 30 minuta s radnim puferom.

Nakon početnog kondicioniranja, kapilara je ujutro prije mjerenja ispirana s 0,1 M NaOH 10 minuta, 10 minuta s ultračistom vodom, 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, ponovo 10 minuta s ultračistom vodom i na kraju 20 minuta s radnim puferom.

Kod ispitivanja različitih koncentracija pufera koristila se metoda prekondicioniranja 2 minute s radnim puferom i postkondicioniranja 2 minute s 10% fosfornom kiselinom i 2 minute s ultračistom vodom. Između mjerenja s različitim koncentracijama pufera, kapilara je ispirana 10 minuta s novim radnim puferom. Postignuta je zadovoljavajuća reproducibilnosti kod većine uvjeta, ali je kasnije utvrđeno da postoje i bolji uvjeti koji su se pokazali optimalnima.

Prvotno se kapilara na kraju dana ispirala 20 minuta s ultračistom vodom, ali je isprobana dodatna varijanta završnog ispiranja kako bi se pokušala poboljšati reproducibilnost i kako bi se izbjeglo *splitanje* pikova. Drugi način završnog ispiranja uključivao je ispiranje 15 minuta s ultračistom vodom, 10 minuta s 0,1 M NaOH i 10 minuta s ultračistom vodom. Dodatno završno ispiranje nije pokazalo značajne rezultate.

Isprobano je i ispiranje 20 minuta s radnim puferom na početku dana, ali se pokazalo neuspješno, dovelo je do nereproducibilnih mjerenja.

Kako bi se postigla bolja reproducibilnost isprobano je drugačije prekondicioniranje i postkondicioniranje, prije svakog mjerenja kapilara je ispirana 5 minuta s radnim puferom, a postkondicioniranje je izbačeno. Nakon uvođenja ovog načina prekondicioniranja, uz standardno ispiranje na početku radnog dana, utvrđeno je da se reproducibilnost mjerenja poboljšala. Migracijska vremena kod optimizacije napona i temperature pri istim uvjetima su bila vrlo reproducibilna.

Utvrđeno je da je reproducibilnost najbolja kada se na početku dana ispire 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, 10 minuta s ultračistom vodom i 20 minuta s radnim puferom, a na kraju dana 20 minuta s ultračistom vodom nakon čega se kapilara uroni u vijale s ultračistom vodom. Vezano uz prekondicioniranje i postkondicioniranje uz svako mjerenje, najbolje je na reproducibilnost utjecalo prekondicioniranje 5 minuta s radnim puferom i opcija bez postkondicioniranja.

4.6. Ispitivanje drugih vrsta pH i pufera

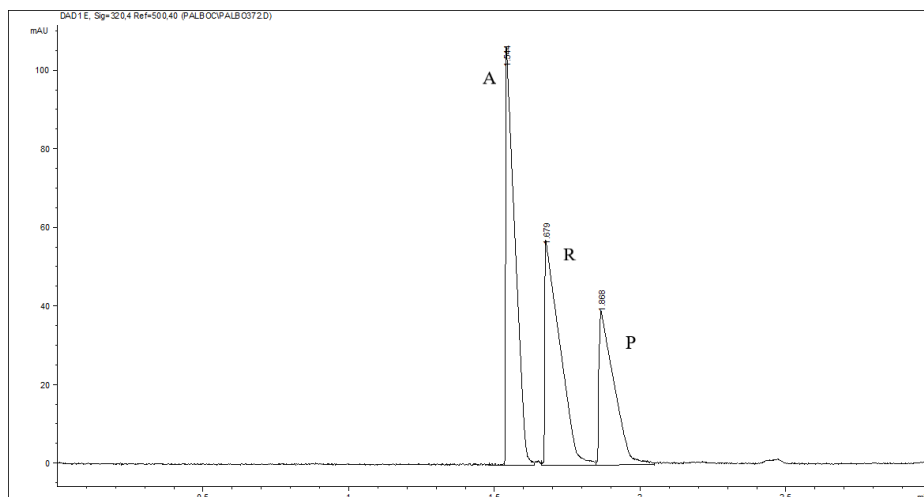
Nakon određenih optimalnih uvjeta na fosfatnom puferu pH 2,5 krenulo se u ispitivanje drugih vrsta i pH pufera. Druge vrste i pH pufera nisu ispitani na početku jer se prvi ispitivani pufer pokazao dovoljno dobrim, a također i zbog činjenice da učestalo mijenjanje pH može imati negativan utjecaj na unutrašnje stijenke kapilare i na reproducibilnost mjerenja.

U daljnjim eksperimentima ispitani su citratni puferi pH 3,17, 3,5 i 4,1. Temperatura je u svim ispitivanjima bila 25 °C, a koncentracije pufera i naponi su mijenjani kako bi se postigli optimalni uvjeti na pojedinom pH.

Citratni pufer pH 3,17 pri koncentracijama 47 mM i 56 mM pri različitim vrijednostima napona nije pokazivao dobre rezultate jer je dolazilo do *splitanja* pika palbocikliba. Ipak, pošto su svi pikovi bili razlučeni isprobane su više koncentracije pufera. Pri koncentraciji 93 mM citratnog pufera i naponu 30 kV dobiveni su pikovi zadovoljavajućeg izgleda, ali razlučivanje abemacikliba i palbocikliba nije bila dostatno ($R_s < 1$), dok je za ribociklib i palbociklib bilo zadovoljavajuće ($R_s=2,95$). U daljnjim analizama postupnim smanjivanjem napona postiglo se bolje razlučivanje abemacikliba i ribocikliba, a smanjilo se razlučivanje ribocikliba i palbocikliba (i dalje $R_s > 1,5$). Najbolji uvjeti pri koncentraciji 93 mM citratnog pufera pH 3,17 pronađeni su pri vrijednosti napona 20 kV. Srednja vrijednost R_s za abemaciklib i ribociklib iznosila je 1,78, a za ribociklib i palbociklib 2,1 (slika 22). Pri naponu 15 kV također su postignuti zadovoljavajući uvjeti, ali je mjerenje odbačeno kao optimalno zbog duljeg vremena analize (>1 min u odnosu na vrijednosti pri višim naponima).

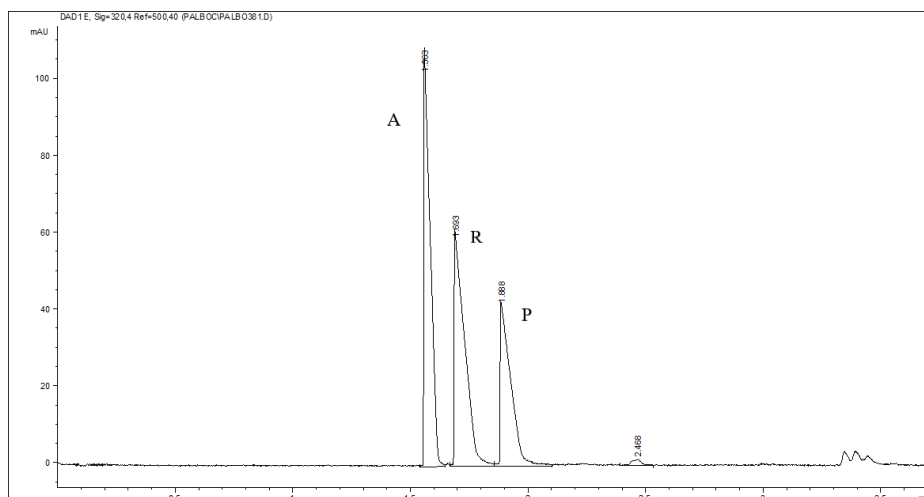
Ipak, najboljom koncentracijom pufera pri pH 3,17 pokazala se koncentracija 113 mM. Pri naponu 20 kV dobiveno je podjednako vrijeme analize u odnosu na uvjete sa slike 26, a R_s se malo poboljšao pa su srednje vrijednosti iznosile 1,86 za abemaciklib i ribociklib i 2,36 za

ribociklib i palbociklib (slika 23). Na pH 3,17 zadržan je isti redoslijed izlaska analita kao i kod fosfatnog pufera pH 2,5.



Slika 22. Elektroferogram smjese standardnih otopina abemacicliba (A), ribocicliba (R) i palbocicliba (P)

Uvjeti analize: 93 mM citratni pufer pH 3,17, 25 °C, 20 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

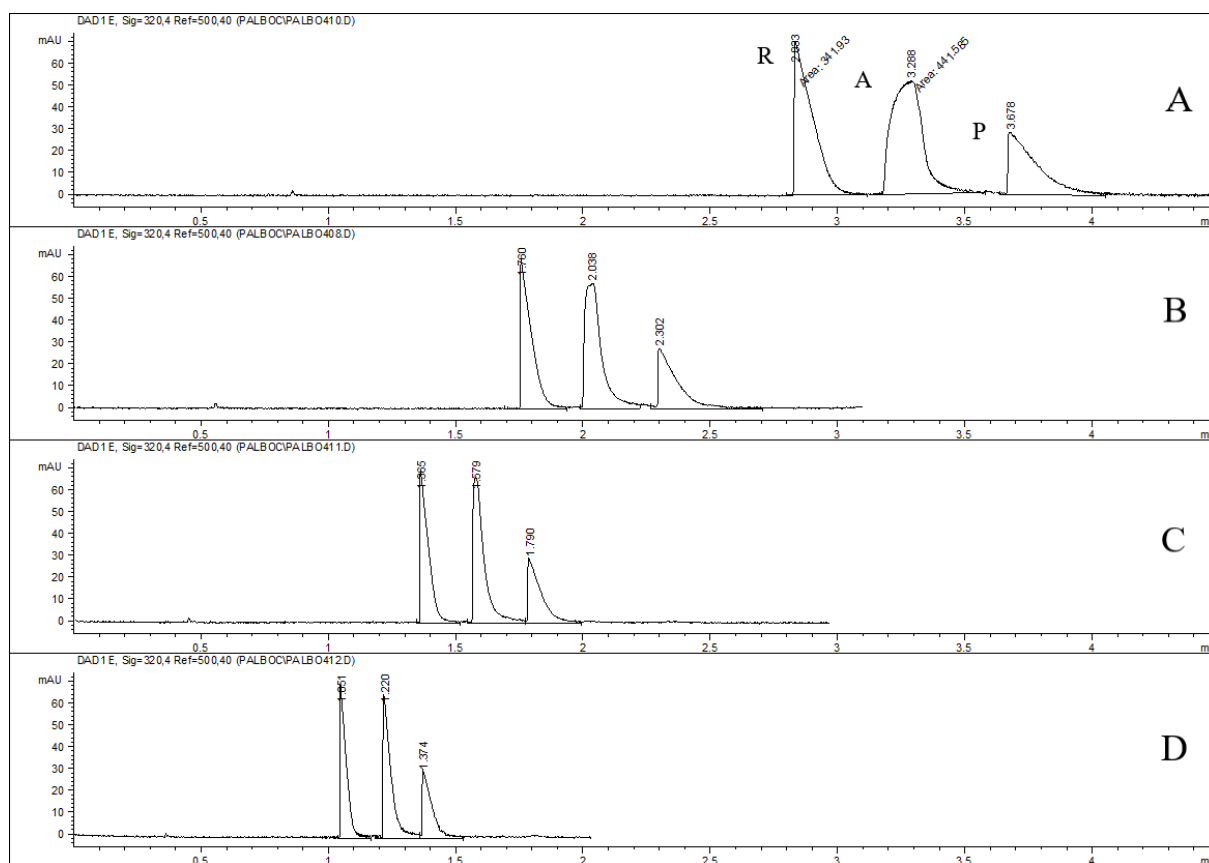


Slika 23. Elektroferogram smjese standardnih otopina abemacicliba (A), ribocicliba (R) i palbocicliba (P)

Uvjeti analize: 113 mM citratni pufer pH 3,17, 25 °C, 20 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba (100 µg/ml)

Iduća ispitivana pH vrijednost citratnog pufera bila je 3,5. Pri tom pH uz različite koncentracije pufera i vrijednosti napona nisu postignuti zadovoljavajući rezultati. Abemaciklib i ribociklib su bili loše razlučeni. Nije pomogao niti dodatak 10% izopropanola.

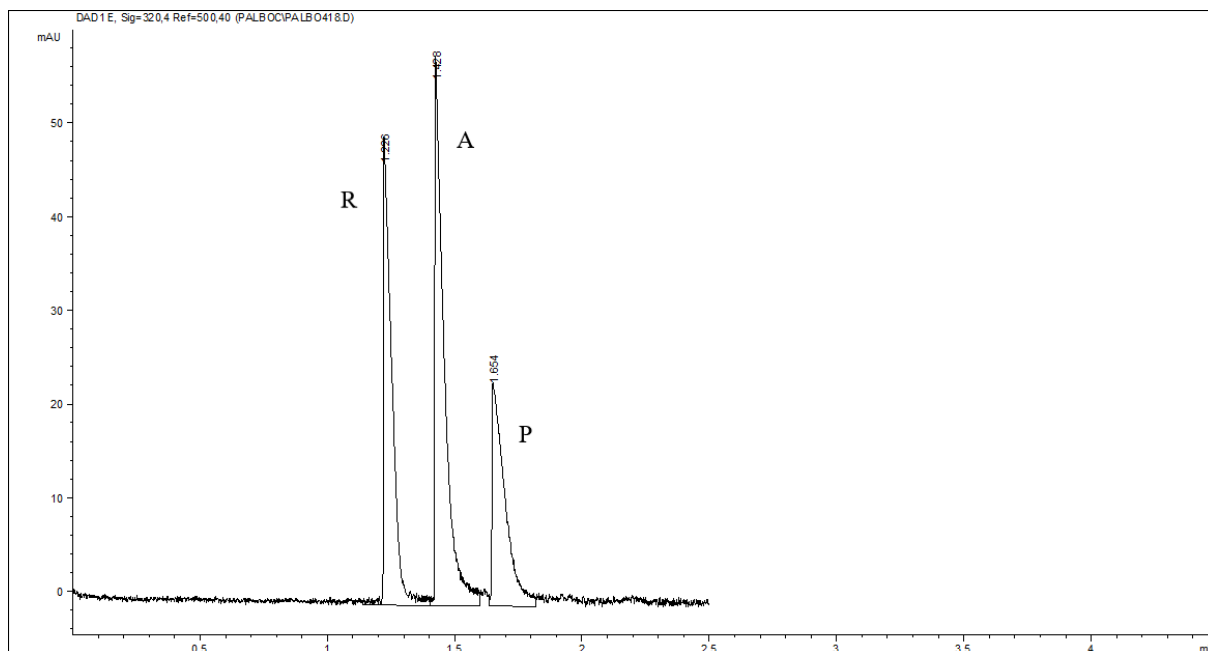
Posljednji ispitivani pH citratnog pufera bio je 4,1. Na ovom pH došlo je do promjene redoslijeda izlaska pikova, prvo je izlazio ribociklib, idući je izlazio abemaciklib i posljednji palbociklib. Pri koncentraciji pufera 50 mM počelo se s nižim naponom od 15 kV. Iako su pikovi bili dobro razlučeni, nije postignut zadovoljavajući izgled pikova. Postupno se povećavao napon kako bi se poboljšao izgled pikova (postajali su uži), iako im se time smanjila površina. Pri naponu 25 kV popravio se izgled i simetrija pikova, ali je struja u kapilari narasla i kako bi se izbjeglo Jouleovo zračenje nije se išlo u daljnje povećanje napona (slika 24).



Slika 24. Elektroferogram smjese standardnih otopina ribocikliba (R), abemaciklib (A), palbociklib (P) u ovisnosti o naponu (A) 15 kV, (B) 20 kV, (C) 22,5 kV, (D) 25 kV

Uvjeti analize: 50 mM citratni pufer pH 4,1, 25 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina ribocikliba, abemacikliba, i palbocikliba (100 µg/ml)

Analiza je provedena i na koncentracijama citratnog pufera 35 mM i 75 mM. Pri koncentraciji pufera 75 mM i naponu 15 kV izgled pikova nije bio zadovoljavajući pa se nastavilo s povećanjem napona. Pri koncentraciji 75 mM i naponu 20 kV i pri koncentraciji 35 mM i 27,5 kV struja je iznosila više od 200 μ A pa su te analize neodržive zbog Jouleovog zagrijavanja, iako su razlučivanje i izgled odnosno simetrija pikova bili zadovoljavajući.



Slika 25. Elektroferogram smjese standardnih otopina ribocikliba (R), abemacikliba (A) i palbocikliba (P)

Uvjeti analize: 35 mM citratni pufer pH 4,1, 25 °C, 25 kV, uzorak: smjesa standardnih otopina ribocikliba, abemacikliba i palbocikliba (100 μ g/ml)

Najbolji uvjeti na pH 4,1 su pri koncentraciji pufera 35 mM i naponu 25 kV (slika 25). Razlučivanje između svih spojeva iznosi preko 3 i to je pokazatelj da su pikovi najbolje razlučeni u odnosu na ostale analize.

Uspoređujući najbolje rezultate na pH 2,5, 3,17 i 4,1, za sve se može reći da su dostatni za provođenje uspješne i reproducibilne analize. Može se izdvojiti uvjete analize pH 2,5, koncentraciju pufera 50 mM, napon 27,5 kV i temperaturi 30 °C jer imaju kraće vrijeme migracije analita (između pola minute i minutu kraće uspoređujući različite analite pri različitim pH vrijednostima), veći broj teorijskih tavana i veću simetriju pika.

5. ZAKLJUČCI

Budući da su ribociklib, palbociklib i abemaciclib novi lijekovi na tržištu i da se često primjenjuju u politerapiji pojavljuje se potreba za razvijanjem analitičke metode pomoću koje će se na brz i jednostavan način moći detektirati i kvantificirati u uzorku.

Tijekom istraživanja primijećeno je da se pri fosfatnom puferu pH 2,5 mogu uspješno detektirati i kvantificirati sva tri ispitivana cikliba i da je vrijeme analize kratko (kraće od 2 minute), a njihovo razlučivanje dostatno ($R_s \geq 1,5$) te je zbog toga fosfatni pufer pH 2,5 izabran kao optimalan. Kao optimalna vrijednost koncentracije radnog pufera odabrana je koncentracija 50 mM jer su pri toj koncentraciji broj teorijskih tavana i površina pikova najveći, a razlučivanje ključnih pikova ribocikliba i palbocikliba je podjednako kao i na drugim koncentracijama.

Kao optimalna vrijednost napona izabrana je vrijednost 27,5 kV. Pri tom naponu vrijeme migracije analita je najkraće, a vrijednosti teorijskih tavana su najveće. Razlučivanje ključnih pikova ribocikliba i palbocikliba zadovoljavajuće je i podjednako kao i na 25 kV.

Temperatura je bila idući optimizirani parametar i kao optimalna vrijednost odabrana je vrijednost 30 °C. Pri toj temperaturi vrijeme migracije sva tri analita je najkraće, a razlučivanje između ključnih pikova je najveće i jedino pri toj temperaturi prelazi 1,5.

Također je kao važan parametar u optimizaciji prepoznato pravilno ispiranje kapilare. Utvrđeno je da je reproducibilnost između mjerenja najveća kada se na početku dana ispiru 10 minuta s 10% fosfornom kiselinom, 10 minuta s ultračistom vodom i 20 minuta s radnim puferom, a na kraju dana 20 minuta s ultračistom vodom. Između ostalog pokazalo se i da je između mjerenja najviše utjecaja imalo prekondicioniranje 5 minuta s radnim puferom.

Zaključno su ispitivane različite vrijednosti pH pufera. Najbolji rezultati pronađeni su na pH 3,17 (113 mM, 25 °C, 20 kV) i pH 4,1 (35 mM, 25 °C, 25 kV). Metoda optimizirana na pH 2,5 kao i metode optimizirane na pH 3,17 i 4,1 sve su dostatne za provođenje uspješne i reproducibilne analize. Ipak, najbolja od tri razvijene metode je na pH 2,5 zbog kraćeg vremena migracije, značajno većih brojeva teorijskih tavana i simetrije pikova.

6. LITERATURA

Ahmad A. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham, Springer, 2019, str. 1-7.

American Cancer Society, 2021, www.cancer.org, pristupljeno 17.5.2021.

An KC. Selective estrogen receptor modulators. *Asian Spine J.*, 2016, 10, 787–791.

Ban M, Strikić A, Miše BA, Vrdoljak E. Uloga inhibitora CDK4/6 u liječenju hormonski ovisnoga metastatskog raka dojke negativnog na HER-2. *Liječ vjesn*, 2019, 141(1-2), 33-39.

Bobić D. Analiza palbocikliba metodom kapilarne zonske elektroforeze. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2020.

Breast cancer, 2021, <http://www.breastcancer.org/>, pristupljeno 17.5.2021.

Cano A, Hermenegildo C. The endometrial effects of SERMs. *Hum. Reprod. Update*, 2000, 6, 244–254.

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm. Glas.*, 2010, 66, 195–207.

Goldhirsch A., Colleoni CM. Endocrine therapy of breast cancer. *Ann. Oncol.*, 2002, 13, 61–68.

Gómez JE, Sandoval JE. The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance. *Electrophoresis*, 2008, 29, 381–392.

Gonçalves A, Bertucci A, Bertucci F. PARP inhibitors in the treatment of early breast cancer: The step beyond?. *Cancers*, 2020, 12, 1–16.

Hećimović I. Oralne nuspojave kao posljedica liječenja karcinoma dojke. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

Hranilović M. Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za istovremeno određivanje gemcitabina i njegovog onečišćenja. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.

Kolak A, Kamińska M, Sygit K, Budny A, Surdyka D, Kukielka-Budny B, Burdan F. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017, 549-553.

Lee JJX, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol. Med.*, 2015, 12, 342–354.

Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J. Clin. Oncol*, 2017, 8, 120–134.

Mediatelly baza lijekova, 2021, <https://mediately.co/>, pristupljeno 19.5.2021.

Miller WR. Aromatase Inhibitors: Mechanism of Action and Role in the Treatment of Breast Cancer. *Semin. Oncol.*, 2003, 30, 3–11.

Moring SE, Reel RT, van Soest REJ. Optical Improvements of a Z-Shaped Cell for High-Sensitivity UV Absorbance Detection in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3454–3459.

National Cancer Institute, 2021, www.cancer.gov, pristupljeno 17.5.2021.

Nowak PM, Woźniakiewicz M, Gładysz M, Janus M, Kościelniak P. Improving repeatability of capillary electrophoresis—a critical comparison of ten different capillary inner surfaces and three criteria of peak identification. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409, 4383–4393.

Onkologija, 2021, www.onkologija.hr, pristupljeno 17.5.2021.

Podolski P, Tomek R, Vrbanec D. Znanjem protiv raka dojke, informacijska knjižica za bolesnice. 3. izdanje, Hrvatska liga protiv raka, 2015.

Rak dojke, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>, pristupljeno 18.5.2021.

Rak dojke, 2019, www.zzjzdnz.hr, pristupljeno 17.5.2021.

Roziing GP, Lauer HH. High Performance Capillary Electrophoresis. A primer. Agilent Technologies, 2014.

Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013.

Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom. Specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

Sertić M, Nigović B, Jug M. Analiza kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom. *Farm. Glas.*, 2010, 66, 467–476.

Smith SC, Strasters JK, Khaledi MG. Influence of operating parameters on reproducibility in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1991, 559, 57–68.

Vrdoljak E, Šamića M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 193-201.

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis*. Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 1999, str. 376-397

Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. U: *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Approaches to Understanding Breast Cancer, Volume 151*. Texas Tech University Health Sciences Center, El Paso, Paul L Foster School of Medicine, SAD, 2017, str. 1-32.

7. SAŽETAK/ABSTRACT

Zbog sve veće pojavnosti raka dojke u populaciji, postoji potreba za razvijanjem analitičkih metoda koje će moći koristiti u terapijskom praćenju lijekova kako bi se pospješio uspjeh terapije.

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj nove kapilarnoelektroforetske metode kako bi se na jednostavan, brz i točan način mogao detektirati ili kvantificirati lijekove iz skupine cikliba – abemaciclib, ribociklib ili palbociklib. Korištena tehnika je zonska kapilarna elektroforeza.

Korištena je kapilara od izvučenog kvarca duljine 32,5 cm unutrašnjeg promjera 50 μm . Uzorci su u kapilaru injektirani pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi 25 °C tijekom 6 s. Valna duljina na kojoj su provođene analize iznosi 320 nm.

Optimizirani su sljedeći parametri - vrsta i pH pufera, koncentracija pufera, napon, temperatura i uvjeti ispiranja. Pratio se njihov utjecaj na vrijeme analize, površinu pika, broj teorijskih tavana i simetriju pika. Kao optimalne vrijednosti uzete su 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, napon 27,5 kV i temperatura 30 °C. Za optimalne uvjete ispiranja odabrano je da se na početku dana ispire 10 min s 10% fosfornom kiselinom, 10 min s ultračistom vodom i 20 min s radnim puferom, a na kraju dana 20 min s ultračistom vodom te da se između mjerenja radi prekondicioniranje 5 min s radnim puferom.

Pokazalo se da su za uspješnu i reproducibilnu analizu dostatni i uvjeti rada s citratnim puferom pri pH 3,17, koncentracije pufera 113 mM, temperature 25 °C, napona 20 kV i pH 4,11, koncentracije pufera 35 mM, temperature 25 °C i napona 25 kV.

Considering the growing incidence of breast cancer in our population, there is a need to develop an analytical method that can be used in therapeutic drug monitoring to enhance the success of therapy.

The goal of this research was to develop a new capillary electrophoresis method so that any of the observed drugs from the ciclib group – abemaciclib, ribociclib or palbociclib could be detected or quantified in a simple, fast and accurate way. The technique used is zone capillary electrophoresis.

This analysis was performed on a 32,5 cm long capillary of extracted quartz with an inner diameter of 50 μm . The samples were injected into the capillary under a pressure of 50 mbar, at a temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ for 6 seconds. A wavelength of 320 nm was used.

The following parameters were optimized through the study - type and pH of the buffer, buffer concentration, voltage, temperature and flushing conditions. Their influence on the analysis time, peak area, number of theoretical plates and peak symmetry was monitored. The optimal values found included 50 mM phosphate buffer, voltage 27.5 kV and temperature 30 $^{\circ}\text{C}$. For optimal flushing conditions, it was chosen to flush at the beginning of the day for 10 minutes with 10% phosphoric acid, 10 minutes with ultrapure water and 20 minutes with the working buffer, and at the end of the day 20 minutes with ultrapure water and to precondition for 5 minutes between measurements with the working buffer.

It turned out that for the successful and reproducible analysis, the working conditions with the citat buffer at pH 3.17, buffer concentration 113 mM, temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, voltage 20 kV and pH 4.11, buffer concentration 35 mM, temperature 25 $^{\circ}\text{C}$ and voltage 25 kV were also sufficient.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANALIZA ABEMACIKLIBA, RIBOCIKLIBA I PALBOCIKLIBA ZONSKOM KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Iva Begović

SAŽETAK

Zbog sve veće pojavnosti raka dojke u populaciji, postoji potreba za razvijanjem analitičkih metoda koje će moći koristiti u terapijskom praćenju lijekova kako bi se pospješio uspjeh terapije.

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj nove kapilarnoelektroforetske metode kako bi se na jednostavan, brz i točan način mogao detektirati ili kvantificirati lijekove iz skupine cikliba – abemaciklib, ribociklib ili palbociklib. Korištena tehnika je zonska kapilarna elektroforeza.

Korištena je kapilara od izvučenog kvarca duljine 32,5 cm unutrašnjeg promjera 50 μm . Uzorci su u kapilaru injektirani pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi 25 °C tijekom 6 s. Valna duljina na kojoj su provedene analize iznosi 320 nm.

Optimizirani su sljedeći parametri - vrsta i pH pufera, koncentracija pufera, napon, temperatura i uvjeti ispiranja. Pratio se njihov utjecaj na vrijeme analize, površinu pika, broj teorijskih tavana i simetriju pika. Kao optimalne vrijednosti uzete su 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, napon 27,5 kV i temperatura 30 °C. Za optimalne uvjete ispiranja odabrano je da se na početku dana ispiru 10 min s 10% fosfornom kiselinom, 10 min s ultračistom vodom i 20 min s radnim puferom, a na kraju dana 20 min s ultračistom vodom te da se između mjerenja radi prekondicioniranje 5 min s radnim puferom. Pokazalo se da su za uspješnu i reproducibilnu analizu dostatni i uvjeti rada s citratnim puferom pri pH 3,17, koncentracije pufera 113 mM, temperature 25 °C, napona 20 kV i pH 4,11, koncentracije pufera 35 mM, temperature 25 °C i napona 25 kV.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 25 grafičkih prikaza, 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Abemaciklib, ribociklib, palbociklib, kapilarna elektroforeza, rak dojke

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYSIS OF ABEMACICLIB, RIBOCICLIB AND PALBOCICLIB USING CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Iva Begović

SUMMARY

Considering the growing incidence of breast cancer in our population, there is a need to develop an analytical method that can be used in therapeutic drug monitoring to enhance the success of therapy.

The goal of this research was to develop a new capillary electrophoresis method so that any of the observed drugs from the ciclib group – abemaciclib, ribociclib or palbociclib could be detected or quantified in a simple, fast and accurate way. The technique used is zone capillary electrophoresis.

This analysis was performed on a 32,5 cm long capillary of extracted quartz with an inner diameter of 50 μm . The samples were injected into the capillary under a pressure of 50 mbar, at a temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ for 6 seconds. A wavelength of 320 nm was used.

The following parameters were optimized through the study - type and pH of the buffer, buffer concentration, voltage, temperature and flushing conditions. Their influence on the analysis time, peak area, number of theoretical plates and peak symmetry was monitored. The optimal values found included 50 mM phosphate buffer, voltage 27.5 kV and temperature 30 $^{\circ}\text{C}$. For optimal flushing conditions, it was chosen to flush at the beginning of the day for 10 minutes with 10% phosphoric acid, 10 minutes with ultrapure water and 20 minutes with the working buffer, and at the end of the day 20 minutes with ultrapure water and to precondition for 5 minutes between measurements with the working buffer. It turned out that for the successful and reproducible analysis, the working conditions with the citat buffer at pH 3.17, buffer concentration 113 mM, temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, voltage 20 kV and pH 4.11, buffer concentration 35 mM, temperature 25 $^{\circ}\text{C}$ and voltage 25 kV were also sufficient.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 25 figures and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: abemaciclib, palbociclib, ribociclib, capillary electrophoresis, breast cancer

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D., *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021