

# **Tyrosiinikinaasientsestäjä dasatinibin vaikutukset hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin *in vitro***

Lääketieteen tiedekunta

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Laatija:

Miisael Nieminen

Ohjaajat:

Väitöskirjatutkija, LL Anna Eggert

Dosentti, FT, yliopisto-opettaja Juho-Antti Mäkelä

23.04.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Syventävien opintojen kirjallinen työ

**Oppiaine:** Fysiologia

**Tekijä:** Miisael Nieminen

**Otsikko:** Tyrosiinikinaasiestäjä dasatinibin vaikutukset hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin *in vitro*

**Ohjaajat:** Väitöskirjatutkija, LL Anna Eggert ja dosentti, FT, yliopisto-opettaja Juho-Antti Mäkelä

**Sivumäärä:** 23 sivua

**Päivämäärä:** 23.04.2025

Dasatinibi on pienimolekyylinen tyrosiinikinaasiestäjä (TKE), jota käytetään useiden syöpäsairauksien hoitoon sekä lapsilla että aikuisilla. Vaikka dasatinibia käytetäänkin useiden eri syöpien hoidossa, ei sen vaikutuksia hyvälaatuisiin kudoksiin ja soluihin ole kattavasti tutkittu. Tässä tutkimuksessa selvitimme dasatinibin vaikutuksia hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin (mouse embryonic fibroblast, MEF) soluviljelymallilla.

Fibroblastit altistettiin dasatinibille annoksilla: 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 2,0; 5,0 ja 10  $\mu\text{M}$ , joista yli 1,0  $\mu\text{M}$  annokset vastaavat yliannostustilanteita ihmisellä. Kokeiden kesto oli 24, 48, 72 tuntia tai yksi viikko. Kokeissa tutkittiin dasatinibin vaikutusta fibroblastien määrään ja elossa säilymiseen. Altistuskokeita tehtiin yhteensä 12 kappaletta. Käytössä oli kahdesta eri hiirestä eristettyjä fibroblastisolulinjoja.

Tuloksemme osoittavat, että dasatinibilla on merkittäviä haittavaikutuksia hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin *in vitro* yli 1,0  $\mu\text{M}$  annoksilla. Alle 1,0  $\mu\text{M}$  annoksilla ei havaittu merkittävää haittaa inaktivoitujen fibroblastien selviytymiseen. Tehtyjen kokeiden perusteella alle 1,0  $\mu\text{M}$  dasatinibiannokset sopivat parhaiten aloitettaville kantasolukokeille (Eggert ym., 2024).

**Avainsanat:** dasatinibi, hiiren sikiökautinen fibroblasti (mouse embryonic fibroblast, MEF), tyrosiinikinaasiestäjä (TKE), *in vitro* -toksikologia

## **Sisällysluettelo**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Johdanto</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2</b> | <b>Aineisto ja menetelmät</b>                                       | <b>7</b>  |
| 2.1      | Hiiren alkion fibroblastien eristäminen ja viljely                  | 7         |
| 2.2      | Hiiren alkion fibroblastien altistukset dasatinibille               | 7         |
| 2.3      | Tilastolliset menetelmät  | 8         |
| <b>3</b> | <b>Tulokset</b>   | <b>9</b>  |
| 3.1      | 24 tunnin altistukset hiiren alkion fibroblasteille                 | 9         |
| 3.2      | 48 tunnin altistus hiiren alkion fibroblasteille                    | 10        |
| 3.3      | 72 tunnin altistukset hiiren alkion fibroblasteille                 | 11        |
| 3.4      | 72 tunnin altistukset inaktivoituilla hiiren alkion fibroblasteille | 14        |
| 3.5      | Viikon altistukset inaktivoituilla hiiren alkion fibroblasteille    | 15        |
| <b>4</b> | <b>Pohdinta</b>   | <b>17</b> |
| <b>5</b> | <b>Johtopäätökset</b>   | <b>19</b> |
|          | <b>Lähteet</b>  | <b>20</b> |

# 1 Johdanto

Proteiinityrosiinikinaaseilla (TK) on tärkeä rooli solujen kasvussa, solunjakautumisessa, aineenvaihdunnassa ja ohjelmoidussa solukuolemassa (Ebrahimi ym., 2023). Siksi proteiinityrosiinikinaasien esto on ollut yksi johtavista lähestymistavoista kohdennetussa syöpähoidossa (Ebrahimi ym., 2023).

Tyrosiinikinaasiestäjät (TKE) näyttävät vaikuttavan haitallisesti munasolujen ja siittiöiden kypsyymiseen sekä sukurauhasten toimintaan (Rambhatla ym., 2021a). TKE-hoidon lopettamisen jälkeisistä pitkän aikavälin vaikutuksista hedelmällisyyteen ei ole kuitenkaan riittävästi tutkimuksia (Rambhatla ym., 2021a). Useat eläintutkimukset ja tapausraportit ovat kuitenkin osoittaneet, että tyrosiinikinaasiestäjillä on vaikutuksia miesten hedelmällisyyteen (Rambhatla ym., 2021b). Lisää yksityiskohtaisia lääkealtistustutkimuksia tarvitaan, jotta eri lääkeaineiden todelliset vaikutukset pystyttäisiin täysin ymmärtämään.

Kivesten kehitys, hormonituotanto, testosteronin määrä ja spermatogeneesi ovat riippuvaisia kahden proteiinityrosiinikinaasireseptorin: c-KIT:in ja verihiutaleperäisen kasvutekijäreseptori a:n (Platelet-Derived Growth Factor Receptor a, PDGFRa:n) välityksellä tapahtuvasta signaloinnista. Näiden signalointireittien on havaittu häiriintyneen jyrksijöiden TKE-altistuksen jälkeen (Cengiz Seval ym., 2017; Zamah ym., 2011). Verihiutaleperäisen kasvutekijän (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) ja sen tyrosiinikinaasireseptorin (PDGFR) tiedetään ilmentyvän kivesten Leydigin soluissa, ja näiden kasvutekijöiden ja reseptorien normaalin signaloinnin häiriintyminen johtaa Leydigin solujen apoptoosiin ja niiden kokonaismäärän vähenemiseen (Gnessi ym., 2000; Yan ym., 2000).

Tyrosiinikinaasireseptori c-KIT:llä ja sen vuorovaikutuksella kantasolutekijän (Stem Cell Factor, SCF) kanssa on olennainen merkitys kiveksen itusolujen selviytymiselle ja siten siittiötuotannolle (Novi & Saba, 1968; Orth ym., 1997).

Hematologisten syöpien hoidossa Suomessa käytetään tyrosiinikinaasiestäjiä, kuten imatinibia, dasatinibia, bosutinibia ja nilotinibia (Pharmaca Fennica 2024). Toisen sukupolven TKE:llä tehdyt kliiniset tutkimukset raportoivat tilastollisesti merkitsevämmistä ja nopeammista vasteista kuin ensimmäisen polven TKE:llä (Jabbour & Kantarjian, 2022).

Suomessa dasatinibia, joka on toisen sukupolven TKE, käytetään varhaisesti diagnosoidun kroonisen myelooisen leukemian (KML) ja akuutin lymfaattisen leukemian (ALL) hoitoon (Lääketietokeskus, 2023). Dasatinibia voidaan käyttää myös ruuansulatuskanavan

stroomatumorin (Gastrointestinal Stromal Tumor, GIST) hoitoon niillä, joilla imatinibi- ja sunitibihoito ei ole tuottanut toivottua tulosta (Zhou ym., 2020). Dasatinibin vaikutus GIST:iin on tutkimuksen mukaan ollut vaatimatonta, haittavaikutukset taas potilaille siedettäviä (Zhou ym., 2020). Dasatinibi toimii pääasiassa estämällä Bcr-Abl- ja SRC-tyrosiinikinaasin (SFK) signalointireittiä (Lombardo ym., 2004; Szczylik ym., 1991; Thomas & Brugge, 1997), mutta samalla se estää myös c-KIT-, PDGF- ja Bcr-Abl-sukuisten geenien (ARG) reseptoreita (Fabbro ym., 1999). Näistä ainakin PDGF-A- ja c-KIT-tyrosiinikinaasit ovat tärkeitä miehen lisääntymis- ja terveyden kannalta (Gnessi et al., 2000, Manova et al., 1990; Yoshinaga et al., 1991). Dasatinibin etuna on, että se tehoaa monissa tapauksissa, joissa muut hoidot eivät tuo parannusta lääkeresistenssin tai -intoleranssin vuoksi (O'Hare ym., 2005; Shah ym., 2004). Dasatinibin vaikutuksia raskauteen ja miesten kykyyn hedelmöittää kumppaninsa on alettu seurata. Tehdyissä analyyseissä on todettu, että useimmat raskaudet ovat osoittautuneet normaaleiksi, jotka ovat hedelmöittyneet miehestä, jota on hoidettu dasatinibilla kroonisen leukemian aikana (Cortes ym., 2015; Pye ym., 2008). Tapausten vähäisen määrän vuoksi jatkoseuranta on kuitenkin tarpeen. Dasatinibilla hoidetuilla naisilla on taas havaittu mahdollisia vaikutuksia raskauteen, mikä tukee nykyistä suositusta, jonka mukaan naisten tulisi välttää raskaaksi tulemistä dasatinibihoidon aikana mahdollisten sikiövaurioiden riskien vuoksi (Cortes ym., 2015).

Dasatinibin tavanomainen kliininen annos on 100–140 mg, joka otetaan suun kautta kerran päivässä. Lapsille annostus on painon mukainen ja pienempi kuin aikuisilla. Potilailla havaittavat plasmapitoisuudet vaihtelevat tyypillisesti välillä 0,005–0,16  $\mu\text{M}$  (He ym., 2021; Miura, 2015a; Shah ym., 2008). Kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että ihanteellinen dasatinibin plasmapitoisuus on yli 0,1  $\mu\text{M}$  (Miura, 2015a). Kuitenkin potilailla on havaittu jopa pitoisuuksia 0,8  $\mu\text{M}$ , sillä annostusta säädetään yleensä tavoiteplasmapitoisuuksien saavuttamiseksi, mikä parantaa tehoa ja pienentää haittavaikutusten riskiä (Christopher ym., 2008a; Miura, 2015b; Takahashi ym., 2012).

Ihmisillä dasatinibin puoliintumisaika seerumissa on noin 4 tuntia (Christopher ym., 2008b), mikä on pidempi kuin dasatinibin puoliintumisaika hiirellä, joka on noin 0,9 tuntia (Kamath ym., 2008). Dasatinibi vaikuttaa ihmisellä jo yli 40 nM:n annoksena (0,04  $\mu\text{M}$ ) lukitsemalla mm. lepäävät CD8- ja CD4-positiiviset CAR-T-solut lepotilaan. Toimintokyvyttömän tilan käynnistämiseksi ja ylläpitämiseksi CAR-T-soluissa tarvitaan  $\geq 40$  nM dasatinibin tasainen pitoisuus (Christopher ym., 2008b; Mestermann ym., 2019a). Analyysit dasatinibin farmakokinetiikasta ihmisillä ovat myös osoittaneet, että  $\geq 40$  nM:n seerumipitoisuudet

voidaan saavuttaa ja ylläpitää helposti 100–140 mg:n päivittäisin kerta-annoksin (Christopher ym., 2008b). Suun kautta otettu 100 mg:n dasatinibi imeytyy hyvin, mutta tunkeutuu heikosti aivo-selkäydinnesteeseen (Gong ym., 2021). Suuremman lääkeannoksen (140 mg/d) käyttö voi kuitenkin lisätä systeemistä lääkealtistusta ja tehostaa dasatinibin tunkeutumista aivo-selkäydinnesteeseen (Gong ym., 2021). Tutkimustuloksia dasatinibin kyvystä läpäistä verikivesesteen ei vielä toistaiseksi ole saatavilla.

Motivaationa tälle työlle oli se, että dasatinibin vaikutuksia miehen lisääntymisterveyteen, spermatogeneesiin ja sukusolujen kantasoluihin on tutkittu vain vähän. Aikaisemmin on selvitetty, että imatinibilla on haitallisia vaikutuksia uroshiiren kiveksen itusolujen kantasoluihin (Eggert ym., 2023). Uudempi tyrosiinikinaasiestäjä dasatinibi estää osittain samoja tyrosiinikinaaseja kuin imatinibi, joten tässä tutkimuksessa halusimme selvittää dasatinibin vaikutusta hiiren sikiökautisiin fibroblastisoluihin soluviljelymallilla, jonka perusteella pystyimme tutkimaan, että onko dasatinibilla samanlaisia vaikutuksia kiveksen itusolujen kantasoluihin kuin imatinibilla (Lindauer & Hochhaus, 2018). Hiiren alkion fibroblasteja käytetään feeder-soluina koiraan ituradan kantasoluviljelyssä (Eggert ym., 2024). Jotta dasatinibin suoria vaikutuksia kantasoluihin voidaan tutkia, tulee ensin selvittää dasatinibipitoisuudet, jotka eivät ole haitallisia feeder-soluina käytettäville hiiren alkion fibroblasteille. Tämän lääketieteen lisensiaatin syventävien opintojen kirjallisessa työssä selvitimme, millaisia dasatinibipitoisuuksia hiiren sikiökautiset fibroblastit (MEFs) kestävät *in vitro*. Kokeita tehtiin 24, 48, 72 tunnin ja yhden viikon mittaisina altistuksina.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Hiiren alkion fibroblastien eristäminen ja viljely

Raskaana (raskauspäivä 13,5; tulpan havaitseminen päivänä 0,5) olevat naarashiiret (> 2 kuukauden ikäisiä; sekalainen geneettinen tausta) lopetettiin hiilidioksidikaasulla, minkä jälkeen niska katkaistiin. Kohtu leikattiin irti ja siirrettiin petrimaljalle, joka sisälsi PBS:ää (phosphate-buffered saline). Alkiot vapautettiin tekemällä viilto kohtuun. Alkioiden päät leikattiin pois ja sisäelimet poistettiin. Jäljelle jääneet kudokset siirrettiin 6-kuoppalevyille (yksi alkio per kuoppa), leikattiin pieniksi paloiksi ja pilkottiin entsyymaattisesti käyttämällä trypsiiniä (0,6 mg/ml; Worthington) ja DNAasi I:tä (4,5 U/ml; Worthington) yhteensä 15 min ajan 37 °C:ssa, ja dissosioitiin pipetoimalla. Solususpensiot sekoitettiin elatusaineeseen ja siirrettiin petrimaljoille viljelyä varten. Kun viljelmät olivat konfluentteja, MEF:t kerättiin käyttämällä 0,05 % trypsiini/EDTA:ta (5 min, 37°C).

MEF-kasvatusliuos sisälsi seuraavia ainesosia: DMEM:F12 (Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco) 250 ml, vasikan seerumi (FBS, fetal bovine serum, Gibco) 45 ml, penisilliini-streptomysiini (100×) 2,95 ml ja L-glutamiini (100×, Gibco) 2,95 ml. MEF:it ruokittiin kolmesti viikossa antaen edellä mainittua kasvatusliuosta esilämmitettynä 37 °C:een.

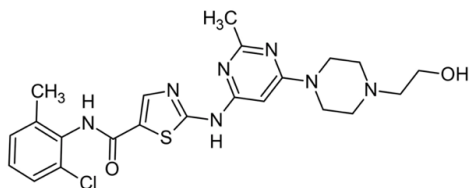
MEF:ien ylläpidossa kasvatusalustoina käytettiin petrimaljaa (100 mm). Kaikki MEF-kasvatusalustat päällystettiin gelatiinilla (4%, steriilissä vedessä (w/v)) 5 min 37 °C:ssa, minkä jälkeen gelatiini imettiin pois. MEF:ejä kasvatettiin 37 °C:ssa, 5 % CO<sub>2</sub>:ssa, ja jaettiin noin 5–10 päivän välein käyttämällä 0,05% trypsiiniä/EDTA:ta.

### 2.2 Hiiren alkion fibroblastien altistukset dasatinibille

Tämän tutkimuksen kokeisiin käytettiin MEF:ejä solusukupolvissa 4–18 (P4-P18). Solunjakautumiskokeita ja mitomysiini-inaktivoituja (10 μM, 4 h) kokeita varten solut oli istutettu 12- tai 24-kuoppalevyille. Soluja inkuboitiin 0; 0,01; 0,1; 0,3; 1, 2, 5 ja 10 μM dasatinibissa 24, 48 ja 72 tunnin tai yhden viikon ajan riippuen kokeesta. Verrokkikuoppiin (ctrl) annosteltiin dimetyylisulfoksidia (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 1:1000, koska dasatinibi oli liuotettu DMSO:hon.

Dasatinibi (#ab142050, Abcam, Alankomaat) liuotettiin DMSO:hon 20 mM vahvuiseksi stock-liuokseksi. Se jaettiin eppendorf-putkiin 10μl:n eriin jatkokäytettävyyden vuoksi ja säilytettiin -20 °C:ssa. Jokaista koetta varten otettiin uusi eppendorf-putki, joka sisälsi

dasatinibia, jota välilaimennettiin 2 mM liuokseksi 90 ml:lla MEF-kasvatusliuoksella. Tästä välilaimennoksesta laimennettiin lopulliset lääkeannokset. Dasatinibin molekyylikaava on esitetty alla olevassa kuvassa.



**Kuva 1. Dasatinibin molekyylikaava.**

Altistusten lopuksi kasvatusliuos pestiin pois PBS:llä inkuboimalla 5 min 37 °C:ssa. Tämän jälkeen PBS aspiroitiin pois kasvatuskuopista, lisättiin 0,05 % trypsiini/EDTA ja inkuboitin 5 min 37 °C:ssa. Trypsiini/EDTA inaktivoitiin lisäämällä kasvatusliuosta kuopille vähintään neljä kertaa trypsiini/EDTA:n määrä, minkä jälkeen solususpensio kerättiin 1,5 ml eppendorf-putkiin pipetillä. Putket sentrifugoitiin 300 g:n nopeudella 5 min +4°C:ssa. Supernatantti aspiroitiin pois ja resuspensoitiin 100 µl:an kasvatusliuosta. Solumäärät laskettiin käyttämällä automaattista TC20-solulaskuria (Bio-Rad, Yhdysvallat). Trypan Blue -väriainetta (1:1) käytettiin hajonneiden solujen havaitsemiseen näytteistä. Hajonneiksi soluiksi arvioitiin solut, jotka värjäytyivät siniseksi Trypan Blue -käsittelyssä ja nämä laskettiin TC20-automaattilaskurilla.

Mitomysiini C -inaktivointi tehtiin soluille, kun ne olivat 80–100 % konfluentteja.

Kasvatusliuos poistettiin petrialjalta aspiroimalla. Soluja inkuboitin mitomysiini C:lla (1:100 kasvatusliuoksessa) 37 °C:ssa, 5 % CO<sub>2</sub>:ssa 4 tunnin ajan, minkä jälkeen mitomysiini C -liuos aspiroitiin. Solut pestiin käsittelyn jälkeen 2 kertaa 5 minuutin ajan kasvatusliuoksella.

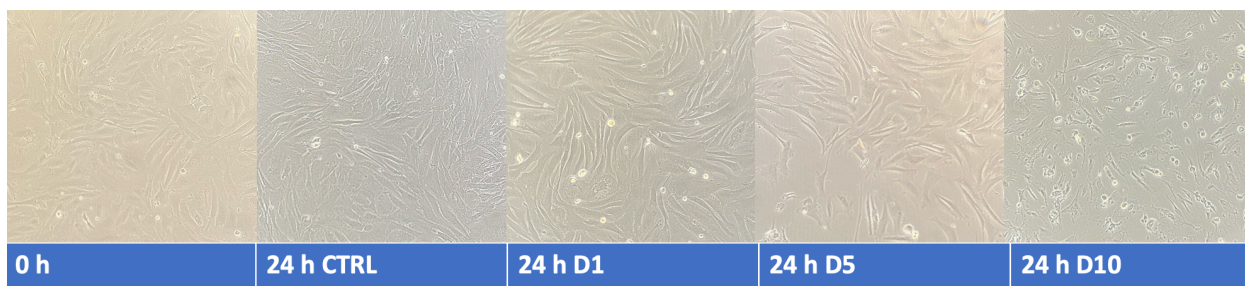
### 2.3 Tilastolliset menetelmät

Kaikki aineistot analysoitiin tilastollisesti merkitsevien erojen havaitsemiseksi käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA), t-testiä tai ei-parametrinen testiä (Kruskal–Wallis), jonka jälkeen suoritettiin Tukeyn tai Dunnin monivertailutesti GraphPad Prism 5 -ohjelmistolla (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Merkitsevyytasoksi asetettiin  $p < 0,05$ .

### 3 Tulokset

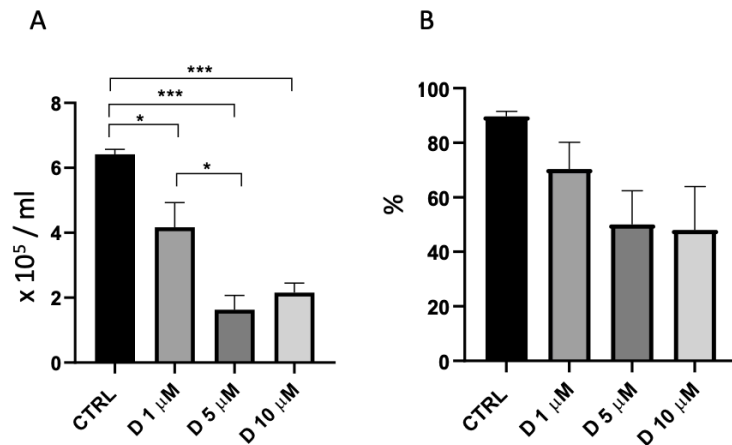
#### 3.1 24 tunnin altistukset hiiren alkion fibroblasteille

Ensimmäiset kokeet päätettiin tehdä lyhytkestoisina, jotta voitaisiin nähdä, miten korkeita annoksia dasatinibia MEF:eille voidaan käyttää. Kokeessa käytössä olivat dasatinibiannokset: 0; 1,0; 5,0 ja 10,0  $\mu\text{M}$ . Kuvassa 2 esitetään käsittelemättömät solut alkutilanteessa (0 h) ja verrokkikuopan sekä dasatinibin eri annoksilla (1,0; 5,0 ja 10,0  $\mu\text{M}$ ) käsitellyt solut 24 tunnin kohdalla. Kokeiden alussa konfluenssi oli 75 % ja solut altistettiin dasatinibilille jo kolmantena päivänä niiden jaosta. Verrokkikuopissa ei 24 tunnin altistuksen jälkeen havaittu muutoksia suhteessa alkutilanteeseen. Suurilla dasatinibiannoksilla havaittiin muutoksia: solumäärän laskuun viittaavan solujätteen määrä kasvatusliuoksessa lisääntyi ja MEF:ien morfologia muuttui pitkänomaisesti pyöreäksi ja soikeaksi. Solu-solu-kontaktien määrä myös näytti vähenevän.



**Kuva 2. Valomikroskooppinäkyvä MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja jälkeen kokeen (24 h) eri dasatinibiannoksilla.** Korkeilla dasatinibiannoksilla (D5 ja D10) oli vaikutusta solujen morfologiaan. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

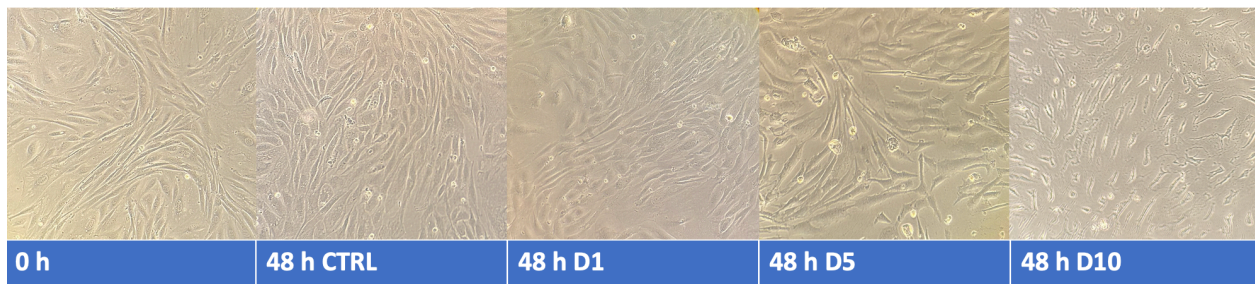
Dasatinibin vaikutus solujen elossa oloon ja määrään oli annosriippuvaista, ja tulokset osoittivat, että pitoisuuden kasvaessa solujen määrä väheni merkittävästi ja myös elossa pysyvien solujen osuus väheni trendinomaisesti, vaikkakaan merkitseviä eroja ei havaittu (Kuva 3). Verrokkikuopissa (CTRL) solujen kokonaismäärä ja elinkelpoisuus olivat korkeimmat, kun taas dasatinibin lisääminen johti solujen määrän laskuun. Jo 1,0  $\mu\text{M}$  pitoisuudella (D1) solujen määrä väheni tilastollisesti merkitsevästi ( $p < 0.05$ ) verrattuna verrokkiin, mutta suurin osa soluista pysyi vielä elinkelpoisina. Dasatinibin 5,0  $\mu\text{M}$  pitoisuudella (D5) solujen määrä laski huomattavasti enemmän ja oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin 1,0  $\mu\text{M}$  pitoisuudella ( $p < 0.001$ ). Dasatinibin 10,0  $\mu\text{M}$  pitoisuus (D10) aiheutti likimain yhtä suuren laskun solujen kokonaismäärässä kuin D5 ( $p < 0.001$ ).



**Kuva 3. Lyhyen (24 h) dasatinibialtistuksen vaikutus MEF:ien lukumäärään ja elinkelpoisuuteen.** A) Elossa olevien MEF-solujen määrä ja B) elossa pysyneiden solujen osuus prosentteina 24 tunnin dasatinibialtistuksen jälkeen. Verrokkikuopissa (CTRL) solujen määrä ja elinkelpoisuus olivat korkeimmat, kun taas dasatinibin lisääminen vähensi trendinomaisesti solujen määrää ja elossa pysymistä annosriippuvaisesti. Kaikilla dasatinibin pitoisuuksilla havaittiin merkittävä solumäärän lasku. n=3, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05

### 3.2 48 tunnin altistus hiiren alkion fibroblasteille

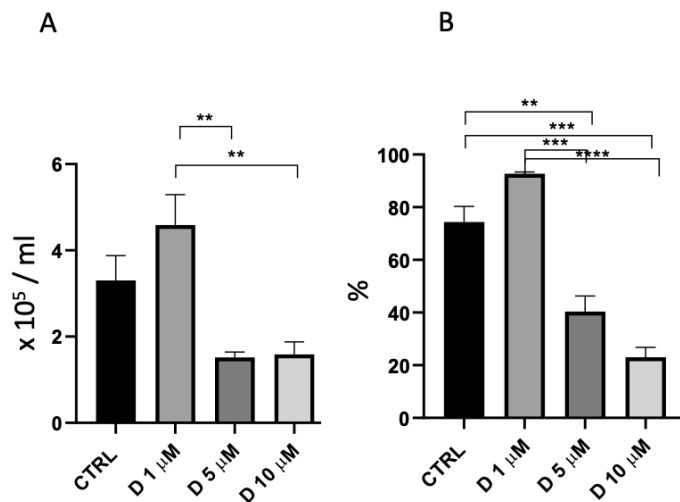
Seuraavaksi tehtiin 48 tunnin altistuskoe fibroblasteille. Kokeen alussa konfluenssi oli 80 % ja keskellä kuoppia oli havaittavissa hieman repaleisuutta, mikä saattoi johtua esimerkiksi siitä, että osa soluista oli irronnut ruokinnan yhteydessä. Käytössä olivat dasatinibiannokset 0; 1,0; 5,0 ja 10,0 μM. Kuvasta 4 nähdään, että korkeimmat dasatinibiannokset D5 ja D10 vaikuttivat selvästi solujen morfologiaan.



**Kuva 4. Valomikroskooppinäkömää MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja kokeen jälkeen (48 h) eri dasatinibiannoksilla.** Korkeilla dasatinibiannoksilla (D5 ja D10) oli vaikutusta solujen morfologiaan. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

Dasatinibin vaikutus fibroblastien määrään ja elossa oloon oli jossain määrin annosriippuvaista (Kuva 5), ja korkeammilla pitoisuuksilla solujen elinkelpoisuus heikkeni merkittävästi. Mikroskooppihavainnot osoittivat, että 5 μM (D5) ja 10 μM (D10) pitoisuuksilla solut vaikuttivat voivan huonosti, viljelmissä oli runsaasti vaurioituneita ja hajonneita soluja, kun taas verrokkikuopissa (CTRL) solut säilyivät hyväkuntoisina ja muodostivat eheitä soluryhmiä. Solulaskennan tulokset vahvistivat nämä havainnot: sekä solujen määrä (Kuva 5A) että elossa pysyneiden solujen prosenttiosuus (Kuva 5B) vähenivät

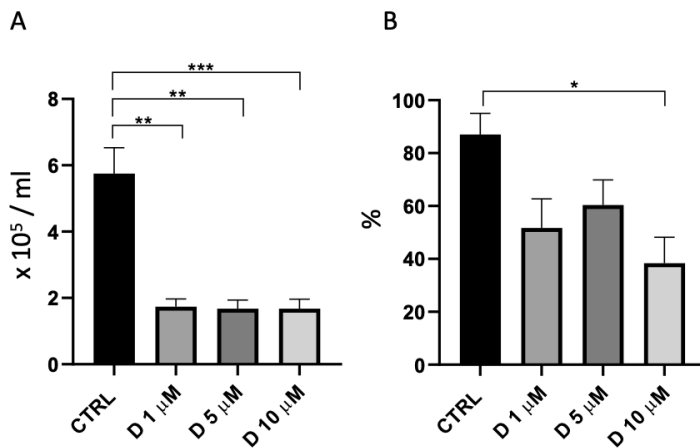
merkittävästi suurilla dasatinibipitoisuuksilla. Erityisesti 5  $\mu\text{M}$  ja 10  $\mu\text{M}$  ryhmissä havaittiin tilastollisesti merkitseviä eroja elossa olevien solujen määrässä verrattuna verrokkiin ( $p < 0.01$  ja  $p < 0.001$ ). Nämä tulokset osoittavat, että dasatinibin kohonnut pitoisuus heikentää fibroblastien elossa pysymistä merkittävästi, ja erityisesti yli 5  $\mu\text{M}$  annoksilla solujen määrä laskee huomattavasti.



**Kuva 5. Dasatinibin vaikutus fibroblasteihin 48 tunnin jälkeen.** A) Elossa olevien MEF-solujen määrä ja B) elossa pysyneiden solujen osuus prosentteina (B) 48 tunnin dasatinibialtistuksen jälkeen. Dasatinibiannoksella 1  $\mu\text{M}$  (D1) solujen määrä ja elinkelpoisuus olivat korkeimmat. Erityisesti 5,0  $\mu\text{M}$  ja 10,0  $\mu\text{M}$  pitoisuuksilla havaittiin merkittävä solumäärän ja elossa pysyneiden solujen määrän lasku verrattuna 1  $\mu\text{M}$  pitoisuuteen.  $n=3$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

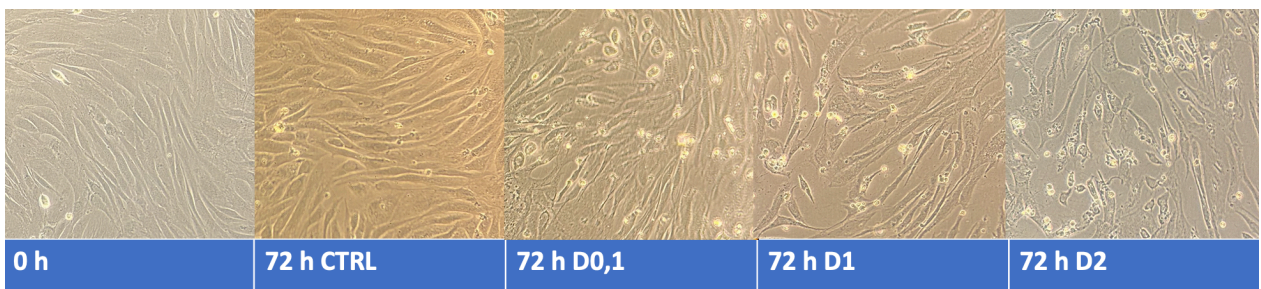
### 3.3 72 tunnin altistukset hiiren alkion fibroblasteille

Pidempää 72 tunnin toistoja tehtiin yhteensä kolme kappaletta. Käytössä oli ensimmäisellä toistokerralla edelleen dasatinibiannokset 0; 1,0; 5,0 ja 10,0  $\mu\text{M}$ . Ensimmäisen kokeen alussa konfluenssi oli 80 %. Kokeen lopussa havaittiin solujätteen määrän kasvavan korkeissa dasatinibipitoisuuksissa. Kokeen tulosten perusteella dasatinibi-annokset 1,0; 5,0 ja 10,0  $\mu\text{M}$  olivat liian korkeita fibroblasteille. Suurina annoksina dasatinibi esti fibroblastien määrän lisääntymistä ja elossa pysymistä (Kuva 6A-B).



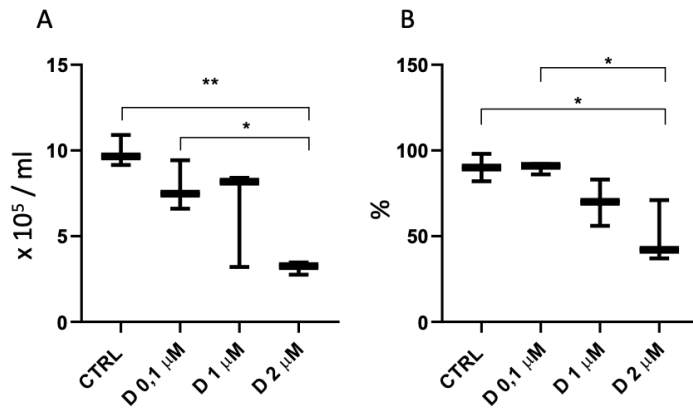
**Kuva 6. Dasatinibin vaikutus fibroblasteihin 72 tunnin jälkeen.** A) Elossa olevien MEF-solujen määrä ja B) elossa pysyneiden solujen osuus prosentteina 72 tunnin dasatinibialtistuksen jälkeen. Verrokkiuopissa (CTRL) solujen määrä oli merkittävästi korkeampi verrattuna dasatinibilla käsiteltyihin ryhmiin. Kaikilla dasatinibipitoisuuksilla (1,0 μM, 5,0 μM ja 10,0 μM) solujen määrä väheni merkitsevästi (\*\*p < 0.01 ja \*\*\*p < 0.001). Solujen elossa pysyminen laski merkitsevästi ainoastaan 10,0 μM dasatinibipitoisuudella (p < 0.05). n=3, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

Ensimmäisen kokeen perusteella todettiin, että dasatinibiannokset 5,0 ja 10,0 μM olivat liian korkeita, ja seuraavat kokeet päätettiin tehdä pienemmillä annoksilla. Annostusta pienentämällä pyrittiin löytämään sopivat dasatinibiannokset, jotka eivät vaikuttaisi merkittävästi fibroblastien määrään tai elossa säilymiseen. Toisessa kokeessa käytössä olivat dasatinibiannokset 0; 0,1; 1,0 ja 2,0 μM. Kokeen alussa konfluenssi oli 80. Koetta päätettäessä havaittiin selkeitä morfologisia eroja vain D1- ja D2-käsittelyjen jälkeen: soluja oli irronnut kasvatusalustan pohjasta ja niiden määrä oli laskenut (Kuva 7).



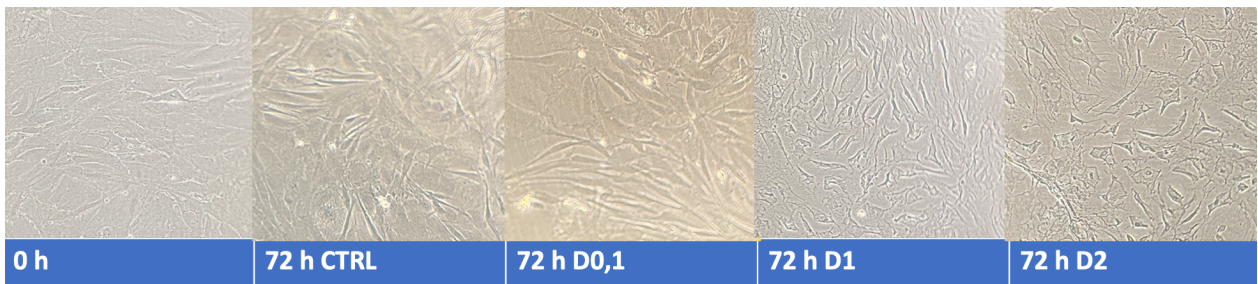
**Kuva 7. Valomikroskooppinäkyvä MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja kokeen jälkeen (72 h) eri dasatinibiannoksilla.** Etenkin dasatinibiannoksilla (D1 ja D2) oli vaikutusta solujen morfologiaan. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

D2-annos laski merkitsevästi fibroblastien määrää ja vähensi elossa pysymistä (\*\*p < 0.01 ja \*p < 0.05) (Kuva 8). Tämän kokeen solulaskentatuloksien perusteella todettiin, että myös 2 μM annos oli liian suuri fibroblasteille.



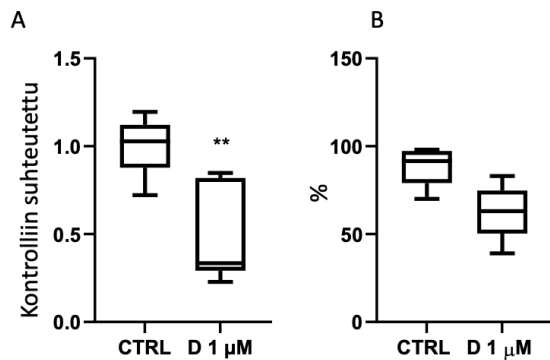
**Kuva 8. Dasatinibin vaikutus fibroblasteihin 72 tunnin jälkeen.** A) Elossa olevien MEF-solujen määrä ja B) elossa pysyneiden solujen osuus prosentteina 72 tunnin dasatinibialtistuksen jälkeen. Verrokkikuopissa (CTRL) solujen määrä ja elinkelpoisuus olivat merkittävästi korkeampia verrattuna D2-ryhmään (\*\*p < 0.01 ja \*p < 0.05). Solujen elossa säilyminen laski merkitsevästi myös D0,1 ja D2 välillä (\*p < 0,05). n=3, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

Kolmannessa kokeessa haluttiin varmistaa, että myös toinen MEF-solulinja reagoi dasatinibialtistukseen samalla tavalla. Käytössä olivat dasatinibiannokset 0; 0,1; 1,0 ja 2,0 μM. Kokeen alussa konfluenssi oli 85 %. Kokeen lopussa verrokkisolut näyttivät hyvinvoivilta. D0,1-kuopissa oli hieman havaittavissa repaleisuutta sekä solujätettä kasvatusliuoksessa. D1-kuopissa oli jälleen havaittavissa repaleisuutta ja solu-soluliitosten vähäisyyttä. Solut näyttivät myös kutistuneilta. Samat havainnot tehtiin D2-kuopissa (Kuva 9).



**Kuva 9. Valomikroskooppinäkyä MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja kokeen jälkeen (72 h) eri dasatinibiannoksilla.** Korkeilla dasatinibiannoksilla (D1 ja D2) oli vaikutusta solujen morfologiaan. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

Dasatinibiannos D1 laski solujen määrää, mutta elossa olevien solujen prosenttiosuudessa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää muutosta ilman solulaskentatuloksien normalisointia. Kun tulokset normalisoitiin, todettiin, että D1-annos esti fibroblastisolujen määrän lisääntymistä 72 tunnin altistuksessa tilastollisesti merkitsevästi verrokin ja D1-annoksen välillä (Kuva 10A-B).



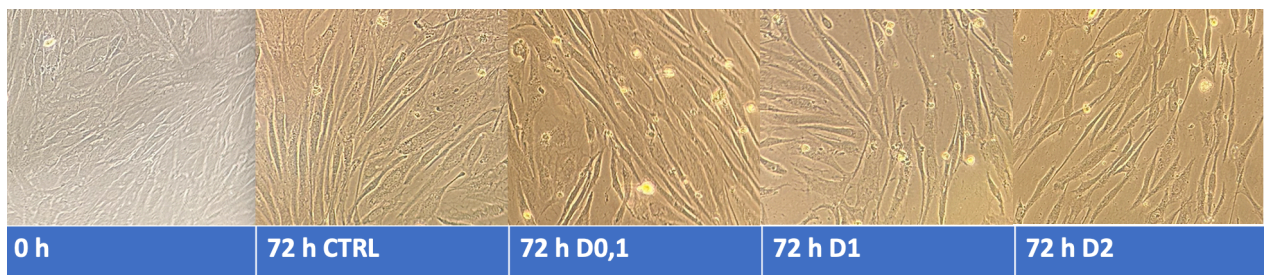
**Kuva 10. Dasatinibin vaikutus fibroblasteihin 72 tunnin jälkeen.** A) Normalisoitu ja verrokkiin suhteutettu solumäärä ja B) elossa pysyneiden solujen osuus prosentteina 72 tunnin dasatinibialtistuksen jälkeen. Elossa olevien solujen määrä laski dasatinibin 1 μM annoksella verrokkiryhmään verrattuna, kun solulaskennan tulos normalisoitiin (\*\* $p < 0.01$ ).  $n=6$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.4 72 tunnin altistukset inaktivoituilla hiiren alkion fibroblasteille

Seuraavissa kokeissa siirryttiin käyttämään mitomysiinillä inaktivoituja MEF:ejä.

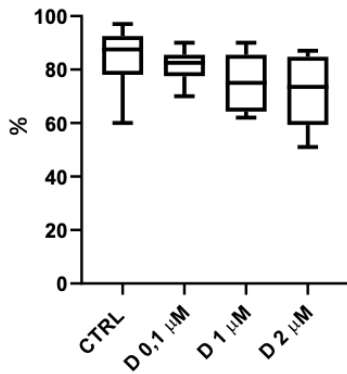
Inaktivoitujen MEF:ien 72 tunnin dasatinibialtistus toistettiin kaksi kertaa. Koeasetelmat olivat muutoin samoja kuin edellä mainituissa 72 tunnin altistuksissa. Käytössä olivat dasatinibiannokset 0; 0,1; 1,0 ja 2,0 μM. Kokeen alussa konfluenssi oli 95–100 %.

Kokeen lopussa verrokkikuoppien ja D0,1-kuoppien välillä ei havaittu mikroskopoitaessa eroa. Suuremmilla annoksilla (D1 ja D2) havaittiin jonkin verran repaleisuutta ja solusoluliitosten vähenemistä (Kuva 11).



**Kuva 11. Valomikroskooppinäkömää inaktivoituista MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja kokeen jälkeen (72 h) eri dasatinibiannoksilla.** Suuremmilla pitoisuuksilla (D1 ja D2) oli havaittavissa morfologiassa muutoksia. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

Inaktivoitujen MEF:ien 72 tunnin altistuksien yhdistetyissä tuloksissa ei havaittu merkitsevää eroa solujen elossa pysymisessä (Kuva 12).

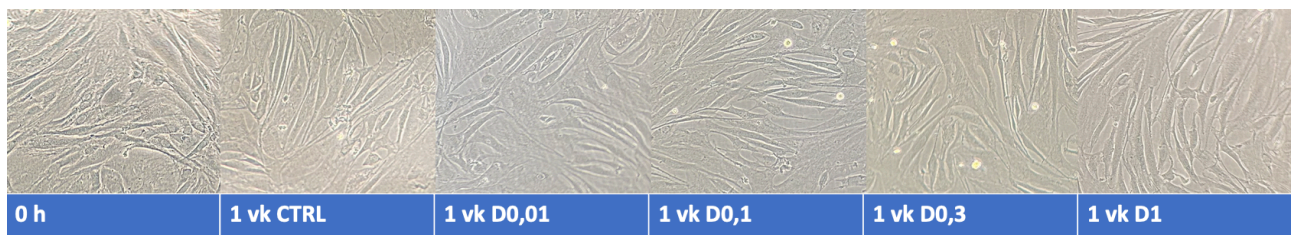


**Kuva 12. Dasatinibin vaikutus inaktivoituihin fibroblasteihin 72 tunnin jälkeen.** Merkitsevää eroa ei havaittu eri dasatinibiannoksien välillä. n=6

### 3.5 Viikon altistukset inaktivoituilla hiiren alkion fibroblasteille

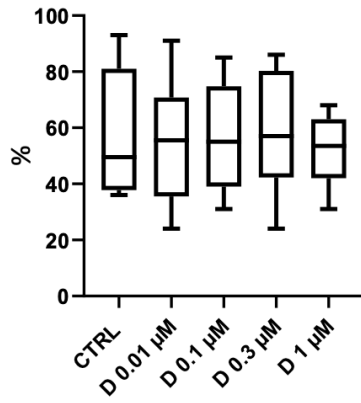
Seuraavaksi teimme viikon mittaisia altistuksia mitomysiini C:llä inaktivoituille fibroblasteille. Koeasetelmaan tehtiin muutoksia aikaisempiin kokeisiin verrattuna: Kaikki viikon mittaiset kokeet tehtiin 24-kuoppalevyillä, koska lääkannoksia oli enemmän. Viikon kestävissä kokeissa kasvatusliuos vaihdettiin kaksi kertaa eli noin 84 tunnin välein. Kaikissa toistoissa käytössä olivat dasatinibiannokset 0; 0,01; 0,1; 0,3 ja 1,0 µM. Kaikkien toistojen osalta kuoppien konfluenssi oli 100 %.

Kokeissa havaittiin, että verrokki-, D0,01- ja D0,1-kuopissa ei esiintynyt selkeitä morfologisia muutoksia kokeiden päättyessä. D0,3-annoksella havaittiin lievää solujen erkaantumista ja solu-soluliitosten vähenemistä. Suurimmalla annoksella, D1:llä, solujen erkaantuminen oli selkeämpää, ja kasvatusliuoksessa esiintyi eniten solujätettä (Kuva 13).



**Kuva 13. Valomikroskooppinäkömää MEF-viljelyistä ennen koetta (0 h) ja kokeen jälkeen (1 viikko) eri dasatinibiannoksilla.** Suurimmilla dasatinibiannoksilla (D0,3 ja D1) oli havaittavissa lievää solujen erkaantumista. Mikroskoopin suurennus kuvissa on 100x.

Inaktivoitujen MEF:ien viikon mittaisten altistuksien yhdistetyissä tuloksissa ei havaittu merkitsevää eroa solujen määrässä eikä solujen elossa pysymisessä. Kokeiden perusteella pääteltiin, että fibroblastit sietivät suhteellisen hyvin dasatinibia annoksilla 0,01 µM – 1,0 µM. Vaikkakin lievää annosvasteista solujen elossa pysymisen laskua oli havaittavissa (Kuva 14).



**Kuva 14. Dasatinibin vaikutus inaktivoituihin fibroblasteihin viikon jälkeen.** Merkitsevää eroa ei havaittu eri dasatinibiannoksien välillä. n=8

## 4 Pohdinta

Tyrosiinikinaasiestäjien käytöllä saattaa olla vaikutuksia niin naisten kuin miestenkin lisääntymisterveyteen. Miesten lisääntymisterveydestä on toistaiseksi vähemmän tietoja saatavilla varsinkin, jos kyseessä on toisen sukupolven tyrosiinikinaasiestäjä kuten dasatinibi, nilotinibi tai bosutinibi (Rambhatla ym., 2021a). Tutkimuksessamme selvitimme dasatinibiannoksien 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 2,0; 5,0 ja 10  $\mu\text{M}$  vaikutuksia hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin eri pituisilla kokeilla soluviljelymallilla (24, 48, 72 tuntia ja yksi viikko) yhteensä 12 kappaletta. Selvitimme elossa olevien MEF-solujen määrän ja elossa pysyneiden solujen osuuden prosentteina dasatinibialtistuksen jälkeen.

Tyrosiinikinaasiestäjien kuten dasatinibin käyttö KML:n, ALL:n ja GIST:n hoidossa on kuitenkin parantanut huomattavasti lisääntymisikäisten aikuisten eloonjäämisastetta (Morita & Sasaki, 2021) ja tästä syystä tarve ymmärtää TKE:n vaikutuksia hedelmällisyyteen on lisääntynyt (Rambhatla ym., 2021a). Tutkimuksemme tuloksien mukaan dasatinibi vaikuttaa haitallisesti hiiren alkion fibroblasteihin yli 2  $\mu\text{M}$  annoksilla *in vitro*. Havaitimme myös, että 5  $\mu\text{M}$  ja 10  $\mu\text{M}$  annoksilla fibroblastien määrä vähenee ja elossa säilyminen heikkenee jo ensimmäisten 48 tunnin aikana. Kun annoksia pienennettiin 0,01–1,0  $\mu\text{M}$  suuruisiksi havaittiin edelleen annosvasteisesti elossa olevien solujen prosenttiosuuden lievää laskua etenkin suurimpien dasatinibiannosten kohdalla, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Dasatinibiannokset 0,01–1  $\mu\text{M}$  eivät vaikuttaneet merkitsevästi fibroblastien elossa pysymiseen. Kokeiden perusteella laajemmat kantasolukokeet voidaan aloittaa alle 1,0  $\mu\text{M}$  dasatinibiannoksilla, jotka sopivat parhaiten fibroblasteille (Eggert ym., 2024). Alle 1,0  $\mu\text{M}$  dasatinibipitoisuudet vastaavat myös suhteellisen hyvin potilailta löytyneitä plasmapitoisuuksia (Christopher ym., 2008a; He ym., 2021; Miura, 2015b, 2015a; Shah ym., 2008; Takahashi ym., 2012). Korkeilla annoksilla (yli 1,0  $\mu\text{M}$ ) oli selkeästi havaittavissa solujätteen määrän kasvua kasvatusliuoksessa sekä solu-solu-kontaktien vähenemistä, mikä viitannee mahdollisesti lisääntyneeseen solukuolemaan.

Aiempia täysin vastaavanlaisia tutkimuksia dasatinibin vaikutuksista hiiren sikiökautisiin fibroblasteihin ei ole tehty. Dasatinibin vaikutuksia muihin solutyyppeihin kuin MEF-soluihin on kuitenkin jonkin verran tutkittu. On esimerkiksi osoitettu, että dasatinibilla voidaan inaktivoida CAR T-soluja lymfosyyttispesifisen proteiinityrosiinikinaasin signalointireitin kautta, ja että ihmisen CAR T-solujen toiminnan pysäyttäminen onnistuu *in vitro* jo 40 nM (0,04  $\mu\text{M}$ ) dasatinibipitoisuudella (Mestermann ym., 2019b). Tämä pitoisuus on lähes 25

kertaa pienempi kuin 1,0  $\mu\text{M}$ , jonka ylittyessä MEF-soluviljelmissä havaitsimme selkeää haittavaikutusta, kuten solumäärän ja elossa pysymisen vähenemistä. Kliinisesti merkittävät seerumpitoisuudet ihmisillä ovat tyypillisesti 0,005–0,16  $\mu\text{M}$ , ja optimaalisina pitoisuuksina pidetään yli 0,1  $\mu\text{M}$  tasoja (He ym., 2021; Miura, 2015c). Näihin verrattuna MEF-solujen voidaan katsoa siis sietävän selvästi korkeampia pitoisuuksia ilman merkittävää elossa pysymisen heikkenemistä. Tämä viittaa mahdollisesti siihen, että MEF-solut ovat suhteellisen kestävästä solutyypistä dasatinibialtistukselle.

Samansuuntaista siedettävyyttä on havaittu myös dasatinibin ja luonnollisen flavonoidin, kversetiinin, yhdistelmähoidossa uroshiirillä. Yhdistelmähoito lisäsi hiirien testosteronitasoja ja siittiöiden määrää sekä paransi siittiöiden morfologiaa, ilman vaikutusta niiden hedelmällisyyteen (Garcia ym., 2023). Näissä kokeissa käytetyt dasatinibiannokset (5 mg/kg) tuottivat plasmapitoisuuksia, jotka vastaavat suunnilleen *in vitro* -tasolla alle 1,0  $\mu\text{M}$  pitoisuuksia (Garcia ym., 2023). Tämä havainto tukee tutkimuksemme päätelmää, jonka mukaan dasatinibin alle 1,0  $\mu\text{M}$  pitoisuudet eivät ole merkittävästi haitallisia MEF-soluille, ja tämän suuntaiset annokset saattavat olla biologisesti siedettäviä myös kokonaisissa elimistön järjestelmissä kuten ihmisessä. On kuitenkin huomattava, että yhdistelmähoito oli ollut hiirille pitkäkestoista ja käytössä oli myös ollut kversetiini, joten tulokset eivät ole täysin suoraan vertailukelpoisia omiin tuloksiimme.

## 5 Johtopäätökset

Tutkimuksessamme tutkimme pienimolekyylisen TKE:n dasatinibin vaikutuksia hiiren alkion fibroblasteihin. Tuloksemme osoittavat, että suurilla dasatinibiannoksilla on haitallisia vaikutuksia hiiren fibroblastisolujen elossa säilymiseen. Kaikkien altistuksien yhteenvedona todetaan, että fibroblastit sietävät dasatinibia annoksilla 0,01  $\mu\text{M}$  – 1,0  $\mu\text{M}$ , kun taas suuremmat annokset aiheuttivat elossa olevien solujen määrän laskua sekä mikroskooppisesti havaittavia haittavaikutuksia ja morfologiamuutoksia soluissa. Koska tyrosiinikinaasiesestäjien käyttö on alkanut laajenemaan onkologian ulkopuolelle sellaisten sairauksien hoitoon, johon on jo olemassa hyviä lääkkeitä, kuten tulehduksellisten sairauksien hoitoon (Seggewiss ym., 2008), tulisi TKE:en haittavaikutukset lisääntymisterveyteen tutkia huolellisesti ennen niiden käyttöönottoa.

## Lähteet

- Cengiz Seval, G., Özkavukçu, S., Seval, M., & Aylı, M. (2017). Gonadotoxic Effects of Nilotinib in Chronic Myeloid Leukemia Treatment Dose in a Mouse Model. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, 34(2), 137–142. <https://doi.org/10.4274/TJH.2016.0092>
- Christopher, L. J., Cui, D., Wu, C., Luo, R., Manning, J. A., Bonacorsi, S. J., Lago, M., Allentoff, A., Lee, F. Y. F., McCann, B., Galbraith, S., Reitberg, D. P., He, K., Barros, A., Blackwood-Chirchir, A., Humphreys, W. G., & Iyer, R. A. (2008a). Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(7), 1357–1364. <https://doi.org/10.1124/DMD.107.018267/ASSET/234A4F69-3475-4484-B450-E7BACEAA0AB0/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>
- Christopher, L. J., Cui, D., Wu, C., Luo, R., Manning, J. A., Bonacorsi, S. J., Lago, M., Allentoff, A., Lee, F. Y. F., McCann, B., Galbraith, S., Reitberg, D. P., He, K., Barros, A., Blackwood-Chirchir, A., Humphreys, W. G., & Iyer, R. A. (2008b). Metabolism and Disposition of Dasatinib after Oral Administration to Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(7), 1357–1364. <https://doi.org/10.1124/DMD.107.018267>
- Cortes, J. E., Abruzzese, E., Chelysheva, E., Guha, M., Wallis, N., & Apperley, J. F. (2015). The impact of dasatinib on pregnancy outcomes. *American journal of hematology*, 90(12), 1111. <https://doi.org/10.1002/AJH.24186>
- Ebrahimi, N., Fardi, E., Ghaderi, H., Palizdar, S., Khorram, R., Vafadar, R., Ghanaatian, M., Rezaei-Tazangi, F., Baziyar, P., Ahmadi, A., Hamblin, M. R., & Aref, A. R. (2023). Receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Teoksessa Cellular and Molecular Life Sciences* (Vsk. 80, Numero 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04729-4>
- Eggert, A., Laasanen, S., Nurmio, M., Wahlgren, A., Jahnukainen, K., Eerola, K., Nieminen, M., Olotu, O., Kotaja, N., Mäkelä, J., & Toppari, J. (2024). Imatinib decreases germ cell survival and germline stem cell proliferation in rodent testis ex vivo and in vitro. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13777>
- Eggert, A., Mäkelä, J.-A., Nurmio, M., Leskinen, S., Wahlgren, A., Jahnukainen, K., Kotaja, N., & Toppari, J. (2023). P08-07: Imatinib Decreases DNA synthesis, germ cell survival, and stem cell proliferation and differentiation in rodent testis. *Toxicology Letters*, 384, S127. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(23\)00558-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(23)00558-1)
- Fabbro, D., Buchdunger, E., Wood, J., Mestan, J., Hofmann, F., Ferrari, S., Mett, H., O'Reilly, T., & Meyer, T. (1999). Inhibitors of Protein Kinases: CGP 41251, a Protein Kinase Inhibitor with Potential as an Anticancer Agent. *Pharmacology & Therapeutics*, 82(2–3), 293–301. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00005-4)
- Garcia, D. N., Hense, J. D., Zanini, B. M., Isola, J. V. V., Pradiee, J., Prosczek, J. B., Alvarado-Rincón, J. A., Mondadori, R. G., Mason, J. B., Briño-Enríquez, M. A., Barros, C. C., Stout, M. B., Masternak, M. M., & Schneider, A. (2023). Dasatinib and quercetin increase testosterone and sperm concentration in mice. *Physiology international*, 110(2), 121–134. <https://doi.org/10.1556/2060.2023.00192>
- Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., & Betsholtz, C. (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 149(5), 1019–1025. <https://doi.org/10.1083/JCB.149.5.1019>
- Gong, X., Li, L., Wei, H., Liu, B., Zhou, C., Zhang, G., Liu, K., Lin, D., Gong, B., Wei, S., Li, Y., Mi, Y., Wang, Y., & Wang, J. (2021). A Higher Dose of Dasatinib May Increase the Possibility of Crossing the Blood-brain Barrier in the Treatment of Patients With

- Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical therapeutics*, 43(7), 1265-1271.e1. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2021.05.009>
- He, S., Bian, J., Shao, Q., Zhang, Y., Hao, X., Luo, X., Feng, Y., & Huang, L. (2021). Therapeutic Drug Monitoring and Individualized Medicine of Dasatinib: Focus on Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 797881. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.797881/BIBTEX>
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2022). Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American journal of hematology*, 97(9), 1236–1256. <https://doi.org/10.1002/AJH.26642>
- Kamath, A. V., Wang, J., Lee, F. Y., & Marathe, P. H. (2008). Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 61(3), 365–376. <https://doi.org/10.1007/S00280-007-0478-8>
- Lindauer, M., & Hochhaus, A. (2018). Dasatinib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 212, 29–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_2)
- Lombardo, L. J., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J. C., Behnia, K., Castaneda, S., Cornelius, L. A. M., Das, J., Doweiko, A. M., Fairchild, C., Hunt, J. T., Inigo, I., Johnston, K., Kamath, A., Kan, D., Klei, H., Marathe, P., Pang, S., ... Borzilleri, R. M. (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6658–6661. <https://doi.org/10.1021/JM049486A>
- Lääketietokeskus. (2023). *DASATINIB KRKA - Terveyskirjasto*. <https://www.terveyskirjasto.fi/far04292>
- Manova, K., Nocka, K., Besmer, P., & Bachvarova, R. F. (1990). Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), 1057–1069. <https://doi.org/10.1242/DEV.110.4.1057>
- Mestermann, K., Giavridis, T., Weber, J., Rydzek, J., Frenz, S., Nerreter, T., Madas, A., Sadelain, M., Einsele, H., & Hudecek, M. (2019a). The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Science Translational Medicine*, 11(499), 5907. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAU5907>
- Mestermann, K., Giavridis, T., Weber, J., Rydzek, J., Frenz, S., Nerreter, T., Madas, A., Sadelain, M., Einsele, H., & Hudecek, M. (2019b). The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Science translational medicine*, 11(499). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAU5907>
- Miura, M. (2015a). Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib for Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(5), 645–654. <https://doi.org/10.1248/BPB.B15-00103>
- Miura, M. (2015b). Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(5), 645–654. <https://doi.org/10.1248/BPB.B15-00103>
- Miura, M. (2015c). Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(5), 645–654. <https://doi.org/10.1248/BPB.B15-00103>
- Morita, K., & Sasaki, K. (2021). Current status and novel strategy of CML. *International journal of hematology*, 113(5), 624–631. <https://doi.org/10.1007/S12185-021-03127-5>
- Novi, A. M., & Saba, P. (1968). An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 86(3), 313–326. <https://doi.org/10.1007/BF00332472>

- O'Hare, T., Walters, D. K., Stoffregen, E. P., Jia, T., Manley, P. W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S. W., Lee, F. Y., Heinrich, M. C., Deininger, M. W. N., & Druker, B. J. (2005). In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer research*, *65*(11), 4500–4505. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0259>
- Orth, J. M., Qiu, J., Jester, W. F., & Pilder, S. (1997). Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biology of reproduction*, *57*(3), 676–683. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD57.3.676>
- Pye, S. M., Cortes, J., Ault, P., Hatfield, A., Kantarjian, H., Pilot, R., Rosti, G., & Apperley, J. R. (2008). The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*, *111*(12), 5505–5508. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-10-114900>
- Rambhatla, A., Strug, M. R., De Paredes, J. G., Cordoba Munoz, M. I., & Thakur, M. (2021a). Fertility considerations in targeted biologic therapy with tyrosine kinase inhibitors: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *38*(8), 1897–1908. <https://doi.org/10.1007/S10815-021-02181-6>
- Rambhatla, A., Strug, M. R., De Paredes, J. G., Cordoba Munoz, M. I., & Thakur, M. (2021b). Fertility considerations in targeted biologic therapy with tyrosine kinase inhibitors: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *38*(8), 1897. <https://doi.org/10.1007/S10815-021-02181-6>
- Seggewiss, R., Price, D. A., & Purbhoo, M. A. (2008). Immunomodulatory effects of imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors on T cells and dendritic cells: an update. *Cytotherapy*, *10*(6), 633–641. <https://doi.org/10.1080/14653240802317639>
- Shah, N. P., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Réa, D., Dorlhiac-Llacer, P. E., Milone, J. H., Vela-Ojeda, J., Silver, R. T., Khoury, H. J., Charbonnier, A., Khoroshko, N., Paquette, R. L., Deininger, M., Collins, R. H., Otero, I., Hughes, T., Bleickardt, E., Strauss, L., Francis, S., & Hochhaus, A. (2008). Intermittent Target Inhibition With Dasatinib 100 mg Once Daily Preserves Efficacy and Improves Tolerability in Imatinib-Resistant and -Intolerant Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(19), 3204–3212. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9260>
- Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., & Sawyers, C. L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5682), 399–401. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1099480>
- Szczylik, C., Skorski, T., Nicolaidis, N. C., Manzella, L., Malaguarnera, L., Venturelli, D., Gewirtz, A. M., & Calabretta, B. (1991). Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5019), 562–565. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1857987>
- Takahashi, N., Miura, M., Scott, S. A., Niioka, T., & Sawada, K. (2012). Pharmacokinetics of dasatinib for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia with acquired T315I mutation. *Journal of hematology & oncology*, *5*. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-23>
- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, *13*, 513–609. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.513>
- Yan, W., Kero, J., Huhtaniemi, I., & Toppari, J. (2000). Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Developmental biology*, *227*(1), 169–182. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9885>
- Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S. I., Kunisada, T., Fujimoto, T., & Nishikawa, S. I. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of

- spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development (Cambridge, England)*, 113(2), 689–699. <https://doi.org/10.1242/DEV.113.2.689>
- Zamah, A. M., Mauro, M. J., Druker, B. J., Oktay, K., Egorin, M. J., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2011). Will imatinib compromise reproductive capacity? *The oncologist*, 16(10), 1422–1427. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2011-0137>
- Zhou, Y., Zhang, X., Wu, X., Zhou, Y., Zhang, B., Liu, X., Wu, X., Li, Y., Shen, L., & Li, J. (2020). A prospective multicenter phase II study on the efficacy and safety of dasatinib in the treatment of metastatic gastrointestinal stromal tumors failed by imatinib and sunitinib and analysis of NGS in peripheral blood. *Cancer medicine*, 9(17), 6225–6233. <https://doi.org/10.1002/CAM4.3319>