

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK GOMEZELJ

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE AKTIVNEGA  
TRANSPORTA IMATINIBA IN N-DESMETIL IMATINIBA V  
LEVKOCITIH BOLNIKOV S KRONIČNO MIELOIČNO  
LEVKEMIJO**

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR  
DETERMINATION OF IMATINIB AND N-DESMETHYL IMATINIB  
ACTIVE TRANSPORT IN LEUKOCYTES OF CHRONIC  
MYELOGENOUS LEUKEMIA PATIENTS**

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložbo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

## ZAHVALA

Za mentorstvo in nasvete se iskreno zahvaljujem doc. dr. Simonu Žaklju, mag. farm. Velika zahvala za pomoč gre Evi Kralj, mag. farm., in doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm., ki sta me vodila skozi praktični del moje diplomske naloge.

Zahvala gre tudi vsem drugim sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so tako ali drugače pripomogli k izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se svoji družini in ostalim bližnjim za podporo na svoji študijski poti.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

Rok Gomezelj

Ljubljana, oktober 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>I</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA .....	1
1.2 ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE.....	3
1.2.1 Imatinib.....	4
1.2.2 Modernejše metode zdravljenja.....	9
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALI .....</b>	<b>12</b>
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL .....	12
3.2 STANDARDI .....	12
3.3 REAGENTI IN TOPILA .....	12
3.4 NAPRAVE IN PRIBOR .....	14
<b>4. METODE .....</b>	<b>17</b>
4.1 GOJENJE CELIČNE KULTURE K-562 .....	17
4.2 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN .....	17
4.3 IZOLACIJA LEVKOCITOV .....	20
4.3.1 Izolacija granulocitov in mononuklearnih celic preko fikola .....	21
4.3.2 Izolacija granulocitov s pozitivno selekcijo prek magnetnih kolon .....	24
4.3.3 Izolacija s histopaque medijem .....	26
4.3.4 Štetje celic.....	26
4.4 INKUBACIJA .....	27
4.5 IZBIRA INTERNEGA STANDARDA.....	28
4.6 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA/N-DESMETIL IMATINIBA..	28
4.7 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA ROSUVASTATINA .....	29
4.8 PRIPRAVA VZORCEV ZA UMERITVENE KRIVULJE .....	29
4.9 MERJENJE NA HPLC/MS SISTEMU .....	31

<b>5. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 VPLIV INKUBACIJSKIH POGOJEV NA PRIVZEM IMATINIBA V CELICE K-562</b>	<b>35</b>
5.1.1 Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba .....	35
5.1.2 Vpliv temperature na privzem imatiniba .....	35
5.1.3 Povezava med koncentracijo proteinov, koncentracijo celic in koncentracijo imatiniba v inkubacijski zmesi .....	35
<b>5.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH POSTOPKOV CELIČNIH IZOLACIJ .....</b>	<b>36</b>
5.2.1 Zaporedno določanje koncentracije proteinov po posameznih izolacijskih stopnjah	36
5.2.2 Vpliv izolacije prek fikola na znotrajcelični upad imatiniba.....	36
5.2.3 Določitev kritične stopnje izolacije celic za upad znotrajcelične koncentracije imatiniba.....	37
5.2.4 Izolacija s histopaque medijem .....	37
5.2.5 Primerjava različnih postopkov izolacije levkocitov iz polne krvi prostovoljca in njihovega vpliva na privzem imatiniba v celice.....	37
5.2.6 Primerjava kinetike izgubljanja učinkovine pri toplem in hladnem spiranju	38
<b>5.3 PRISOTNOST IN AKTIVNOST PRENAŠALCEV OCT-1, P-gp IN BCRP .....</b>	<b>38</b>
5.3.1 Vpliv temperature in prisotnosti oz. odsotnosti prazosina na privzem imatiniba in N-desmetil imatiniba v celice K-562 .....	38
5.3.2 Privzem imatiniba v granulocite in mononuklearne celice ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT-1 prazosina .....	39
5.3.3 Primerjava inhibicije privzema imatiniba z različnimi inkubacijskimi koncentracijami prazosina v celicah K-562 .....	39
5.3.4 Primerjava inhibicije privzema imatiniba v granulocitih pri različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina .....	40
5.3.5 Določanje vezave imatiniba na celične proteine .....	40
5.3.6 Aktivnost P-gp prenašalca v celični liniji K-562.....	41
5.3.7 Povezava med koncentracijo rosuvastatina v inkubacijski zmesi in privzemom.....	42
5.3.8 Aktivnost BCRP prenašalca v celični liniji K-562 .....	42
<b>5.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....</b>	<b>43</b>

<b>6. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>45</b>
6.1 VPLIV INKUBACIJSKIH POGOJEV NA PRIVZEM IMATINIBA V CELICE K-562	45
6.1.1 Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba.....	45
6.1.2 Vpliv temperature na privzem imatiniba.....	45
6.1.3 Povezava med koncentracijo proteinov, koncentracijo celic in koncentracijo imatiniba v inkubacijski zmesi .....	46
6.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH POSTOPKOV CELIČNIH IZOLACIJ .....	48
6.2.1 Določanje koncentracije proteinov po posameznih izolacijskih stopnjah....	48
6.2.2 Vpliv izolacije preko fikola na znotrajcelični upad imatiniba.....	49
6.2.3 Določitev kritične stopnje izolacije celic za upad znotrajcelične koncentracije imatiniba.....	51
6.2.4 Izolacija s histopaque medijem .....	52
6.2.5 Primerjava različnih postopkov izolacije levkocitov iz polne krvi prostovoljca in njihovega vpliva na privzem imatiniba v celice.....	53
6.2.6 Primerjava kinetike izgubljanja učinkovine pri toplem in hladnem spiranju	54
6.3 PRISOTNOST IN AKTIVNOST PRENAŠALCEV OCT-1, P-gp IN BCRP ....	56
6.3.1 Vpliv temperature in prisotnosti oz. odsotnosti prazosina na privzem imatiniba in N-desmetil imatiniba v celice K-562 .....	56
6.3.2 Privzem imatiniba v granulocite in mononuklearne celice ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT-1 prazosina .....	57
6.3.3 Primerjava inhibicije privzema imatiniba z različnimi inkubacijskimi koncentracijami prazosina v celični liniji K-562 .....	59
6.3.4 Primerjava inhibicije privzema imatiniba v granulocite pri različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina .....	60
6.3.5 Določanje vezave imatiniba na celične proteine .....	61
6.3.6 Prisotnost in aktivnost P-gp prenašalca v celični liniji K-562 .....	62
6.3.7 Povezava med koncentracijo rosuvastatina v inkubacijski zmesi in privzemom.....	64
6.3.8 Aktivnost BCRP prenašalca v celični liniji K-562 .....	64
<b>7. SKLEP .....</b>	<b>66</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Imatinib .....	4
Slika 2: Imatinib mezilat .....	5
Slika 3: N-desmetil imatinib .....	6
Slika 4: Strategija za zdravljenje kronične mieloične levkemije v kronični fazji. ....	10
Slika 5: Izolacija mononuklearnih celic in granulocitov preko fikola. ....	20
Slika 6: Raztopina fikola in periferne krvi pred centrifugiranjem. ....	21
Slika 7: Vzorec po centrifugiranju – ločitev celic glede na razlike v specifični gostoti. ....	22
Slika 8: Shema izolacije granulocitov s pozitivno selekcijo preko magnetnih kolon. ....	25
Slika 9: Neubajerjeva komora na stekelcu za štetje celic.....	26
Slika 10: Rosuvastatin.....	29
Slika 11: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo imatiniba v bioloških vzorcih.....	32
Slika 12: Masni kromatogram multirezidualne metode (MRM) vzorca akceptorske raztopine. ....	32
Slika 14: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo rosuvastatina v bioloških vzorcih.....	33
Slika 13: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo N-desmetil imatiniba v bioloških vzrocih. ....	33
Slika 15: Masni kromatogram multirezidualne metode (MRM) vzorca akceptorske raztopine. ....	34
Slika 16: Koncentracija proteinov v odvisnosti od števila celic.....	46
Slika 17: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od koncentracije proteinov. ....	46
Slika 18: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od števila celic.....	46
Slika 20: Vpliv izolacije na koncentracijo proteinov v vzorcu. ....	48
Slika 19: Umeritvena krivulja za proteine.....	48
Slika 21: Vpliv izolacije na koncentracijo imatiniba v celicah. ....	50
Slika 22: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	55
Slika 23:Koncentracija IM in DMI po inkubacijah pri različnih temperaturah. ....	56
Slika 24: Koncentracija imatiniba v celicah prostovoljcev. ....	58

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pomen oznak v enačbah za štetje celic.....	27
Preglednica 2: Priprava umeritvene krivulje za rodamin. ....	30
Preglednica 3: Priprava umeritvene krivulje za rosuvastatin. ....	31
Preglednica 4: Program gradientnega spiranja na koloni po injiciranju vzorca.....	34
Preglednica 5: Razmerja volumnov raztopin v petih standardih za pripravo inkubacijskih raztopin z različnimi koncentracijami prazosina.....	39
Preglednica 6: Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba. ....	45
Preglednica 7: Vpliv temperature med inkubacijo na privzem imatiniba. ....	45
Preglednica 8: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od števila celic v inkubacijski zmesi. ....	47
Preglednica 9: Koncentracija imatiniba po izpostavitvi različnim tipom spiranja.....	51
Preglednica 10: Koncentracija imatiniba po različnih inkubacijah celic, izoliranih preko histopaque medijev.....	52
Preglednica 11: Koncentracija imatiniba po različnih izolacijah in inkubacijah mononuklearnih celic oz. granulocitov. ....	53
Preglednica 12: Primerjava povprečij privzemov imatiniba v celice, izolirane iz krvi prostovoljcev. ....	58
Preglednica 13: Primerjava privzema imatiniba po različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina v celicah K-562. ....	59
Preglednica 14: Primerjava privzema imatiniba po različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina v granulocitih. ....	60
Preglednica 15: Razlika v koncentracijah imatiniba ob posameznih tipih povzročitve celične smrti. ....	61
Preglednica 16: Razlika v privzemu imatiniba v žive/mrtve celice ob prisotnosti/odsotnosti prazosina. ....	61
Preglednica 17: Vpliv prisotnosti PSC 833 na znotrajcelično koncentracijo rodamina.....	62
Preglednica 18: Koncentracija rodamina po inkubaciji mrtvih celic. ....	63
Preglednica 19: Vpliv prisotnosti PSC 833 na znotrajcelično koncentracijo imatiniba.....	63
Preglednica 20: Koncentracija rosuvastatina po ekstrakciji iz celičnega lizata v odvisnosti od koncentracije inkubacijske raztopine .....	64
Preglednica 21: Privzem rosuvastatina v celico ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja BCRP. ....	64
Preglednica 22: Privzem imatiniba v celico ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja BCRP.....	64

## POVZETEK

V diplomski nalogi smo razvijali metodo za določanje privzema imatiniba ter njegovega glavnega metabolita N-desmetil imatiniba v različne vrste levkocitov. V različnih poskusih smo proučevali več parametrov, za katere smo sklepali, da bi *in-vitro* lahko vplivali na privzem učinkovine in njenega metabolita v levkocite. Glede na že znana dejstva o prenosu imatiniba prek celične membrane smo sklepali, da sta za uspešnost terapije kronične mieloične levkemije bistvena delovanje in aktivnost treh prenašalcev, ki so v membrani levkocitov: OCT-1 naj bi bil odgovoren za privzem obej spojin ter BCRP in P-gp, ki sodelujeta pri njunem izločanju. Aktivnost treh prenašalcev smo preverjali z inkubacijo 1,5 oz. 3 milijonov gojenih oz. izoliranih celic z različnimi substrati ob prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorja za posamezen prenašalec. Celice smo inkubirali v koncentraciji 600 000 celic/1mL RPMI hranilnega medija. Aktivnost OCT-1 smo določali z inkubacijo z imatinibom oz. N-desmetil imatinibom v prisotnosti oz. odsotnosti prazosina. Prenos učinkovine prek BCRP smo dokazovali s substratom BCRP rosuvastatinom in specifičnim inhibitorjem Ko134, interakcijo s P-gp pa s substratom rodaminom123 in inhibitorjem P-gp PSC 833. Sprva smo poskuse izvajali na celični liniji K-562, ki je linija levkemičnih celic bolnice s kronično mieloično levkemijo. S temi poskusi smo želeli preveriti, kako na IUR vplivajo parametri, kot so površina inkubacijske posode, inkubacijska temperatura, izpostavljenost celic različnim medijem med izolacijo ter temperatura medija za spiranje. Pozneje smo inkubacijske poskuse z imatinibom in prazosinom izvedli še na granulocitih, ki smo jih izolirali iz periferne krvi prostovoljcev prek fikola, histopaque gradientnih medijev ali prek magnetnih kolon, ter na mononuklearnih celicah, ki smo jih izolirali prek fikola. Znotrajcelično koncentracijo učinkovine smo po lizi celic in ekstrakciji spojine iz lizata določili s sklopljeno LC/MS metodo. Koncentracijo rodamina123 smo po spiranju in dodatku HCl izmerili na spektrofotometru. Ugotovili smo, da je OCT-1 prenašalec aktiven v vseh proučevanih levkocitnih celicah, medtem ko je aktivnost BCRP in P-gp prenašalca glede na naše rezultate nejasna. Temperatura pomembno vpliva na privzem imatiniba v celico (večji je pri višji inkubacijski temperaturi) in na izgubljanje učinkovine med izolacijo in spiranjem (večje izgube pri višji temperaturi). Višanje koncentracije prazosina nad 50  $\mu$ M bistveno ne poveča inhibicije privzema imatiniba prek OCT-1. Rezultati kažejo na to, da je OCT-1 najbolj aktiven v K-562 celicah, v nekoliko manjši meri v granulocitih, najmanj aktiven pa je v mononuklearnih celicah.

## **ABSTRACT**

In our research we have developed a method for determining the uptake of imatinib and its main metabolite N-desmethyl imatinib in different types of leukocytes. Within the method we have studied several parameters for which we supposed that in-vitro could influence on the uptake of the anticancer compound and its metabolite in leukocytes. In light of the known facts about the influx and efflux of imatinib, we have supposed that the success of the therapy of chronic myelogenous leukemia essentially depends on the activity of three transporters that are present in leukocytes: OCT-1, BCRP and P-gp. Activity of the three transporters has been verified by incubating 1,5 or 3 million cultured/isolated cells with various substrates in the presence/absence of the inhibitor for each carrier. Cells were incubated at a concentration of 600 000 cells/1mL RPMI nutrient medium. OCT-1 activity has been examined by the incubation with imatinib/N-desmethyl imatinib and prazosin, BCRP activity by imatinib/rosuvastatin and Ko134 and P-gp by imatinib/rhodamine123 and PSC 833. Initially, we did the experiments on the cell line K-562, which in fact is a line of leukemic cells from a patient with chronic myelogenous leukemia. With these experiments, we wanted to examine how some incubation parameters such as surface incubation area, exposure to different media between isolation, incubation temperature, temperature of the medium for rinsing. Later, we performed incubation experiments with imatinib and prazosin in granulocytes which were isolated from the peripheral blood of volunteers by gradient medium (ficol or histopaque) or through magnetic columns, and the mononuclear cells by ficol. After causing cell death and extraction of the active substance, we measured its intracellular concentration with the LC/MS coupled system.

We have discovered that OCT-1 transporter is active in all of the three leukocyte cells, while the activity of BCRP and P-gp transporter is, according to our results, unclear. Temperature significantly affect the uptake of imatinib in cell (higher at higher incubation temperature) and the loss of substance between the isolation and rinsing (higher losses at higher temeperature). Higher prazosin concentraton than 50 $\mu$ M does not increase uptake inhibition by imatinib OCT-1. The results show that OCT-1 is the most active in K-562 cells, less active in granulocytes and least active in mononuclear cells.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

**ARA-C** – Arabinofuranozil citidin (angl. Arabinofuranosyl Cytidine)

**AS** – Aritmetična sredina

**ATP** – Adenozin trifosfat (angl. Adenosine Triphosphate)

**BCRP** – Rezistenten protein raka dojke (angl. Breast Cancer Resistance Protein)

**DMI** – N-desmetil imatinib

**DMSO** – Dimetilsulfoksid

**FBS** – Serum govejega ploda (angl. Fetal Bovine Serum)

**GIT** – Gastrointestinalni trakt

**GRA** – Granulociti

**HLA** – Glikoproteinske molekule, s katerimi telo loči lastno od tujega (angl. Human Leukocyte Antigen)

**HPLC** – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Pressure Liquid Cromatography)

**IM** – Imatinib

**IUR** – Znotrajcelični privzem in zadrževanje (angl. Intracellular Uptake and Retention)

**KML** – Kronična mieloična levkemija

**MACS** – Z magnetom pogojeno ločevanje celic (angl. Magnetic-activated Cell Sorting)

**MNC** – Mononuklearne celice

**MMR** – Večinski molekularni odgovor (angl. Major Molecular Response)

**MS** – Masna spektrometrija (angl. Mass spectrometry)

**Nsign.** – Ni statistično značilne razlike

**OCT** – Prenašalec organskih kationov (angl. Organic Cation Transporter )

**PBS** – Izotonični fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffer Saline)

**Ph** – Kromosom Philadelphia

**PK** – Periferna kri

**PRA** – Prazosin

**P-gp** – P-glikoprotein (angl. P-glycoprotein)

**RHO** – Rodamin123

**ROS** – Rosuvastatin

**RPMI** – Medij za gojenje celic K-562

**SD** – Standardni odklon

**SEM** – Standardna napaka srednje vrednosti (angl. Standard Error of Mean)

**Sign.** – Statistično značilna razlika

## 1. UVOD

### 1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

Kronična mieloična levkemija (KML) je neoplastična bolezen, ki se kaže v porastu mieloičnih celic ter tudi eritrocitov in trombocitov. Je relativno redka bolezen (1–2 primera/100 000 prebivalcev/leto), ki se pojavlja predvsem pri starejših (srednja starost je 53 let), lahko pa se pojavi tudi pri otrocih. V 95 % primerov je v jedru levkemičnih celic pri tej bolezni prisoten kromosom Philadelphia (Ph). Ime je dobil po ameriškem mestu, kjer je bil ta kromosom prvič opažen. Ph kromosom se tvori kot posledica translokacije kromosoma 9 in kromosoma 22. Gre za spojitev dveh genov (gena BCR iz kromosoma 22 in gena ABL iz kromosoma 9), ki sta v normalnih celicah ločena. Hibridni gen BCR-ABL, ki se tvori, igra pomembno vlogo v razvoju KML, saj poveča proliferativno sposobnost levkemičnih celic ter jih naredi odporne proti sistemom, ki kontrolirajo celično delitev. Molekularna patogeneza kronične mieloične levkemije je dobro znana, ni pa znano, kaj povzroči gensko translokacijo. Eden od mogočih razlogov je radioaktivno sevanje, saj je bilo po atomskem bombardiranju na Japonskem zaznati večji porast novih primerov KML. Pri ostalih 5 % bolnikov se pojavijo drugačne translokacije. V primeru KML, kjer ni prisotnosti kromosoma Philadelphia (približno 5 %), je mogoče s tehnikami molekularne biologije vseeno dokazati prisotnost fuzijskega gena BCR-ABL [1].

Nezdravljeni KML prepoznamo po kliničnem razvoju, ki se odraža v dveh ali treh obdobjih. V prvem obdobju, ki mu pravimo tudi kronično obdobje, število levkemičnih celic raste z večanjem števila levkocitov v periferni krvi in s prostornino vranice. Celice v tem obdobju ohranjajo sposobnost razvoja, zorenja in pretvarjanja v normalne, zrele krvne celice. V tej fazi je kontrola bolezni dokaj enostavna. Po treh do petih letih sledi drugo obdobje, ki mu pravimo blastno obdobje. V njem neoplastične celice izgubijo zmožnost diferenciacije in bolezen postane agresivnejša, kar je značilna lastnost akutne levkemije. Nastanek blastne faze lahko neposredno sledi koncu kronične faze, lahko pa je vmes še pospešeno obdobje, ki lahko traja od nekaj tednov do nekaj mesecev [2].

KML je v veliki večini (približno 85 %) primerov diagnosticirana v kroničnem obdobju. Sami simptomatski kazalci v kliničnem smislu ne povedo veliko in pri vsaj tretjini bolnikov se pride diagnoze naključno, npr. med preverjanjem prisotnosti drugih bolezni. Najpogosteje opaženi simptomi so utrujenost, izguba telesne teže, povišana telesna

temperatura, bolečine v mišično-skeletnem sistemu. Najpogosteji očitni znak KML je povečanje vranice, ki vzbudi občutek napetosti v trebuhu in zgodnje sitosti po obroku. Povečanje prostornine limfnih vozlov na drugi strani ni značilno za to vrsto levkemije in zdravnik se usmerja v druge bolezni. Okoli 40 % bolnikov je asimptomatskih, pri katerih do diagnoze privedejo laboratorijski izvidi. Ti v primeru KML skoraj vedno kažejo na povečanje števila levkocitov in pogosto tudi na porast trombocitov ali blažjo anemijo. Bolnik, pri katerem rezultati izvidov kažejo na morebitno prisotnost KML, mora obvezno obiskati specialista hematologa in opraviti celotno krvno sliko z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza periferne krvi ter punkcijo in biopsijo vzorca kostnega mozga za citološki in histološki pregled. Diagnoza mora biti potrjena bodisi z opaženim značilnim kromosomom Philadelphia med analizo kariotipa (študija kromosomov v krvnih celicah, imenovana tudi citogenetska analiza) bodisi z dokazom prisotnosti fuzijskega gena BCR-ABL s tehnikami molekularne genetike [2]. V tem primeru sta najbolj uporabljeni naslednji metodi:

1. Fluorescenčna hibridizacija in situ - FISH (angl. Fluorescence In Situ Hybridization). S to preiskavo lahko pridobimo kvantitativno citogenetsko informacijo. Pri tej metodi ni treba gojiti celic ali analizirati celic v metafazi. Bistvo te preiskave je iskanje prisotnosti kromosoma Ph v celici.

2. Polimerazna verižna reakcija – PCR (angl. Polymerase Chain Reaction). Ta detektira RNA v celicah periferne krvi. Gre za zelo občutljivo metodo. V vzorcu, ki vsebuje več milijonov celic, lahko ta metoda v ozadju  $10^5$  do  $10^6$  normalnih celic detektira že eno Ph-pozitivno celico. Za razliko od FISH metode s PCR metodo iščemo prisotnost fuzijskega gena BCR-ABL. Posledica visoke občutljivosti je tudi široka uporabnost metode. Ta je poleg diagnostičnega namena uporabljená tudi za ocenitev uspešnosti terapije in možne prisotnosti bolezni med ali po zdravljenju [1] [3].

Glede na rezultat citogenetskih in molekularnogenetskih raziskav ločimo tri različno dobre odgovore na zdravljenje:

- popolni citogenetski odgovor: pri analizi kariotipa ni zaznati prisotnosti kromosoma Philadelphia;
- večinski molekularni odgovor (MMR): molekularna analiza kaže, da je ekspresija BCR-ABL v RNA za  $\geq 3$ -log zmanjšana (0,1 %) glede na začetno standardno vrednost;

- popolni molekularni odgovor: molekularna analiza ni zmožna dokazati ekspresije hibridnega gena BCR-ABL [2] [4].

Doseg enega od odgovorov je za bolnika zelo pomemben. Glede na občutljivost preiskave z veliko verjetnostjo potrdimo uspešnost zdravljenja. A ker tudi z najbolj občutljivimi metodami ne moremo zaznati najmanjših preostankov levkemično transformiranih matičnih zarodnih krvotvornih celic, je terapija kronična. Kariotip vzorcev kostnega mozga opravljamo na 12 mesecev, da ugotovimo morebitne kromosomske anomalije v celicah, ki nimajo Ph kromosoma. Veliko raziskav kaže na to, da imajo bolniki s popolnim citogenetskim odgovorom in večinskim molekularnim odgovorom zelo visoko možnost dolgega življenja brez napredovanja bolezni v pospešeno/blastno fazo [2] [5].

## **1.2 ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE**

Skoraj celo stoletje je bil glavni cilj zdravljenja KML zmanjševanje mase levkemičnih celic. Ta cilj so od 50. let dvajsetega stoletja žeeli doseči z uporabo konvencionalnih kemoterapevtikov v nizkih odmerkih, med katerimi sta prevladovala hidroksiurea in busulfan. Tako zdravljenje je izboljšalo kakovost bolnikovega življenja, ni pa moglo spremeniti zgodovine bolezni, niti preventivno delovati na njen razvoj v pospešeno oz. blastno fazo. Zavedanje omejitev tovrstnega zdravljenja je privedlo do nekaterih poskusov prilagajanja terapevtskih režimov, ki pa jih je kmalu izpodrinilo hitro napredovanje transplantacije matičnih celic zdravega dajalca na bolnika (alogenična presaditev). Presaditev krvotvornih matičnih celic je še danes edina možnost, ki lahko izkorenini KML, še posebno če je izvedena v kronični fazi bolezni. Je pa tovrstna presaditev zelo zapleten in potencialno nevaren postopek. Prav zato (10–70 % incidanca umrljivosti) se uporablja le pri bolnikih, mlajših od 55 let, ki nimajo istočasnih hujših bolezni. Zaradi višje starosti bolnikov in zaradi težavnega iskanja primerrega (kompatibilnega) dajalca matičnih celic je ta poseg realna možnost zdravljenja za zelo majhen delež bolnikov s KML. Pričetek zdravljenja z interferonom- $\alpha$  okoli leta 1980 je popolnoma spremenil vlogo konvencionalnega zdravljenja in zmanjšal indikacije za presaditev matičnih celic. Raziskave kažejo, da 20-30% bolnikov zdravljenih s tem biološkim zdravilom lahko doseže popolni citogenetski odgovor. Omejitev uporabe interferona- $\alpha$  je posledica njegove toksičnosti, ki je ne gre prezreti predvsem pri zdravljenju starejših bolnikov. V želji po

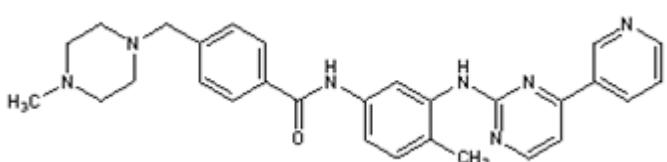
izboljšanju dobljenih rezultatov je bil interferon- $\alpha$  uporabljen v kombinaciji z drugimi citotoksičnimi spojinami.

Samo istočasno jemanje arabinofuranozil citozina (ARA-C) je pokazalo še večjo učinkovitost pri zdravljenju kot interferon sam, ni pa ta kombinacija pokazala jasnih prednosti za splošno preživetje bolnikov s KML [2].

### 1.2.1 Imatinib

Imatinib (Slika 1 [6]) je močan 2-fenilaminopirimidinski inhibitor BCR-ABL kinaze, ki kompetitivno inhibira vezavo ATP na ATP-jev vezavni žepk na omenjeni encim [7]. Uporablja se za zdravljenje KML, gastrointestinalnega stromalnega tumorja (GIST), ki se ga kirurško ne da odstraniti ter metastaz z izraženim c-KIT receptorjem [8] [9]. S prihodom te spojine na trg se je zdravljenje KML pomembno spremenilo. BCR-ABL kinaza ima pomembno vlogo pri preživetju levkemičnih celic in je torej idealna molekulska tarča za t. i. usmerjene ali pametne terapije. Imatinib je bil znotraj kliničnih študij prvič testiran leta 1999, od leta 2001 pa je registriran v Evropi [10]. Štiri leta pozneje je postal zdravilo prvega izbora za zdravljenje KML v vseh bolezenskih obdobjih. Zelo široka mednarodna študija za bolnike s KML v kronični fazi (študija IRIS) je pokazala jasne prednosti imatiniba kot terapije prvega izbora v primerjavi s kombinacijo interferona in ARA-C, torej v primerjavi s predhodno najboljšo farmakološko kombinacijo zdravljenja. Imatinib je izzval pozitiven odgovor pri 87 % bolnikov. Ti so se odzvali s popolnim citogenetskim odgovorom in skoraj pri vseh je imatinib posledično v celoti spremenil potek zdravljenja, izboljšal kakovost življenja in podaljšal preživetje [1].

Za imatinib je značilno tudi to, da ga bolniki dobro prenašajo, zato ga lahko brez težav uporablja večina med njimi, vključno z ostarelimi [2]. Posledica dobrih rezultatov zdravljenja z imatinibom je, da je imatinib 400 mg/dan danes standardna oblika zdravljenja bolnikov v kroničnem obdobju KML [1] [11]. Odmerek imatiniba za bolnike, odkrite v napredovalnem obdobju, naj bi znašal 600–800 mg/dan. To dejstvo je zelo zmanjšalo indikacije za presaditev matičnih celic



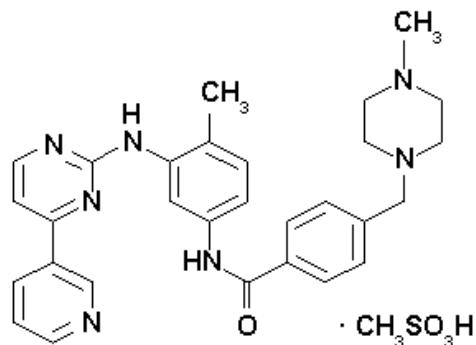
Slika 1: Imatinib

kot terapijo prve izbire v napredovalni fazi levkemije, ostaja pa ta možnost za primere, ko je odgovor z imatinibom nižji od optimalnega, in

pri bolnikih, ki ne prenašajo zdravljenja z imatinibom. Izjema so tudi otroci, če imajo HLA identičnega sorodnega darovalca krvotvornih matičnih celic (KMC), in odrasli z enojajčnim dvojčkom. Pri teh je alogenična presaditev smiselna in predstavlja zdravljenje prvega izbora [11].

Stranski učinki pri zdravljenju z imatinibom so redki in nenevarni. Znani pa so primeri resnih stranskih učinkov, ki so posledica hematološke toksičnosti – nevtropenia, trombocitopenija, anemija ter porast jetrnih encimov [1].

### 1.2.1.1 Farmakokinetika imatiniba



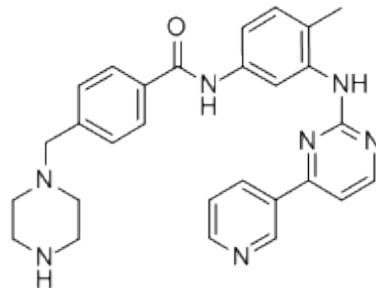
Slika 2: Imatinib mezilat

#### Sproščanje in absorpcija

Imatinib mezilat (Slika 2 [12]) je na trgu na voljo v obliki kapsul in tablet (Gleevec v ZDA in Glivec v Evropi), pri čemer obe obliki sestavlja bel do belo rjavkast kristaliničen prašek. Kemijsko gledano je imatinib na pH občutljiva kvadrivalentna baza zaradi treh aminskih in ene piridinske skupine s štirimi pKa med 1,52 in 8,07. Dobro se razaplja v območju s pH, nižjim od 5,5 in v polarnih organskih topilih, medtem ko se v nepolarnih topilih razaplja slabo ( $\log P = 1,267$  pri  $37^{\circ}\text{C}$ ). Z biofarmacevtskega vidika je zelo pomembno, da je v celotnem prebavnem traktu, vključno z želodčnim sokom, stabilen. Prav tako pa je ugodno dejstvo, da se zelo dobro absorbira. Njegova biološka uporabnost znaša okoli 98 %, največja plazemska koncentracija pa je dosežena v času med dvema in štirimi urami po aplikaciji [13]. Pri obeh biofarmacevtskih parametrih vrsta in količina predhodno ali pozneje zaužite hrane zanemarljivo vplivata na absorpcijo [14].

## Distribucija

Imatinib se po prehodu v telo obsežno razširi v telesna tkiva. Po več kot uro dolgi intravenski infuziji 100 mg imatiniba znaša povprečni volumen distribucije (Vd) 435 L. Razpolovni čas imatiniba znaša približno 18 ur, medtem ko je razpolovni čas njegovega metabolita N-desmetil imatiniba (Slika 3 [15]) (CGP74588) daljši, med 40 in 70 ur. Večji je tudi Vd metabolita, ki znaša med 1000 in 3200 L. Meritve v CŽS so med drugim pokazale, da imatinib prehaja hematoencefalno pregrado zgolj v manjši meri. Sodeč po opravljenih *in vivo* poskusih je koncentracija imatiniba v CŽS od 40- do 100-krat nižja kot v plazmi. *In vitro* eksperimenti kažejo na to, da je 95 % imatiniba vezanega na  $\alpha$ 1-kisli glikoprotein in albumin. Dodatna študija je pokazala tudi, da je bila koncentracija imatiniba v stacionarnem stanju kar osemkrat višja v mononuklearnih celicah periferne krvi, kar je morda posledica nasičenosti  $\alpha$ 1-kislega glikoproteina. Gre namreč za sistem z visoko afiniteto, toda nizko kapaciteto vezave. Dokazano je tudi, da imatinib pri doječih materah prehaja v materino mleko, zato se uporaba zdravila v času nosečnosti odsvetuje oz. se odsvetuje hranjenje otroka z materinim mlekom [1] [13].



Slika 3: N-desmetil imatinib

## Metabolizem

Imatinib se presnavlja predvsem z encimi citokrom P<sub>450</sub> – CYP3A4 in CYP3A5, v manjšem obsegu pa tudi s CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 in CYP2C19 ter FMO-3 (flavin vsebujoča monooksigenaza-3). V krvi so do zdaj našli vsaj štirinajst metabolitov imatiniba, glede na razmerja v masni bilanci pa je verjetno, da jih obstaja še veliko več. Glavni metabolit imatiniba je N-desmetil imatinib, ki je tudi farmakološko aktiven. 10–15 % apliciranega imatiniba se presnovi do N-desmetil imatiniba. Mogoče je, da se del imatiniba v N-desmetil imatinib pretvori tudi v samih tarčnih celicah, saj so dokazali izražanja nekaterih jetrnih (CYP450) kot tudi izvenjetrnih (CYP1A1 in CYP1B1) citokromov tudi v levkocitih [13].

## Eliminacija

Imatinib in njegovi metaboliti se izločijo pretežno z blatom. Po peroralni aplikaciji 14C-imatinib mezilata je bilo približno 81 % odmerka izločenega v sedmih dneh s fecesom in urinom, pri čemer se je 68 % izločilo z blatom, 13 % pa z urinom.

Di Gion in sodelavci so ugotovili [13], da je bilo v prvih 72 urah po odmerku izločene skupno samo 6,8 % učinkovine. Nespremenjen imatinib je bil najpogosteje zastopana frakcija tako v blatu (20 %) kot v urinu (5 %).

### 1.2.1.2 Prenos imatiniba preko celične membrane

Prenos imatiniba v levkemične celice je najpomembnejši pogoj za uspešno terapijo in ugoden klinični rezultat. Individualne razlike v terapiji so s farmakološkega vidika neposredna posledica različne občutljivosti za inhibicijo BCR-ABL tirozin kinaze, kar je v veliki meri rezultat različne farmakokinetike imatiniba v smislu njegovega privzema in akumulacije. Privzem spojine v celico je odvisen predvsem od aktivnosti posameznih prenašalcev, na katere se veže imatinib izven tarčne celice in znotraj nje.

*In vitro* in *in vivo* poskusi so pokazali, da so za prenos imatiniba pomembni predvsem prenašalci OCT-1, BCRP in P-gp [16].

Številne študije so pokazale, da ima pri privzemu in akumulaciji najpomembnejšo vlogo prenašalec **OCT-1** (organski kationski prenašalec – angl. Organic Cation Transporter) [17]. OCT-1 spada v družino SLC prenašalcev in deluje kot črpalka, prek katere se imatinib prenese v notranjost celice. Aktivnost OCT-1 je bila v krvi bolnikov pred terapijo določena kot razlika v privzemu imatiniba v mononuklearne celice ob inhibiciji OCT-1 in brez nje. Dokazana je bila dobra korelacija OCT-1 aktivnosti z doseganjem glavnega molekularnega in citogenetskega odgovora. Pri bolnikih, pri katerih je bila OCT-1 aktivnost višja od srednje vrednosti, je namreč kar 85 % bolnikov doseglo MMR po 24 mesecih zdravljenja, medtem ko je MMR pri tistih z nižjo aktivnostjo OCT-1 doseglo zgolj 45 % bolnikov [18].

Vzrok različnih aktivnosti so polimorfizmi v genu za OCT-1. Tako kvalitativne kot kvantitativne spremembe v OCT-1 imajo vpliv na privzem imatiniba. V raziskavah se je kot inhibitor OCT-1 uporabljal predvsem prazosin (antagonist  $\alpha$ 1-adrenoreceptorjev), ki je močan inhibitor OCT-1 ( $IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$ ) in deloma tudi OCT-3 prenašalca. Da je vzrok za razlike v koncentraciji prav v inhibiciji OCT-1 in s tem v zavrtetu transportu imatiniba, so

dokazali z vzporednim poskusom, ko so kot inhibitor uporabili prokainamid. Ta je inhibitor OCT-1 in OCT2, ni pa inhibitor OCT-3. Rezultati IUR imatiniba so bili podobni. Pri poskusih so dokazali korelacijo med IC<sub>50</sub> (zmanjšanjem fosforilacije proteina Crkl na polovico) in koncentracijo imatiniba v tarčni celici. Dodatno potrditev za pomembnost OCT-1 prenašalca so pokazali s tem, ko so razliko v IUR med pacienti z visoko aktivnostjo OCT-1 in nizko aktivnostjo OCT-1 praktično izenačili, ko je bil v inkubacijsko zmes dodan prazosin.

Zanimivo je, da je 85 % bolnikov z visoko OCT-1 aktivnostjo, ki so prejemali bodisi 600 mg bodisi 400mg imatiniba na dan ne glede na odmerek, v 24 mesecih doseglo odličen molekularni odgovor. Na drugi strani je bil odgovor tistih z nizko aktivnostjo OCT-1 precej odvisen od odmerka: pri tistih, ki so jemali dnevni odmerek nižji od 600 mg, jih po 18 mesecih kar 82 % ni doseglo MMR (pri bolnikih z visokim OCT-1 8 %). Ko pa so odmerek povišali na 800mg, se je ta odstotek znižal na 44%. Tako je bilo dokazano, da nekateri bolniki z nizko OCT-1 aktivnostjo lahko dosežejo MMR, če se zdravijo z visokim odmerkom, medtem ko nekateri MMR ne dosežejo kljub kritično visokim odmerkom imatiniba [18].

Glavni dolgoročni cilj analize aktivnosti OCT-1 prenašalca je načrtovano individualizirano zdravljenje, oziroma da se z genetskimi metodami še pred začetkom zdravljenja ugotovi, ali bo bolnik odziven na imatinib v standardnih odmerkih, ali bodo za dosego MMR potrebeni višji odmerki, ali pa bolnik MMR z imatinibom sploh ne bo dosegel [18].

**P-glikoprotein** (MDR1, P-gp, gen ABCB1) je član ABC (angl. ATP-binding cassette) družine prenašalcev, sicer ene največjih družin transmembranskih prenašalcev [19]. Gre za prenašalec, ki igra pomembno vlogo pri prenosu imatiniba iz tarčne celice. To je posledica njegovega visokega izražanja v rakavih celicah, zaradi česar odločilno prispeva k IUR v celici in k neuspešni citostatični terapiji. V literaturi se zato njegovo ime nadomešča tudi z MDR1 (angl. Multidrug Resistance Protein 1), ki pove, da je prenašalec odgovoren za rezistenco proti določenim zdravilnim učinkovinam, saj onemogoča njihovo zadrževanje v tumorski celici in jih črpa v njeno zunanjost, še preden bi učinkovina lahko delovala [20].

Mahon in sodelavci [21] so v svoji študiji na celični liniji K-562, ki v veliki meri izraža P-gp, pokazali, da celice kljub dodani učinkovini preživijo. Iz tega so sklepali, da je bilo imatiniba premalo, da bi učinkoval na svojo znotrajcelično tarčo [19] [21].

P-gp prenašalec je široko substratno specifičen, v odnosu do imatiniba pa velja, da je njegov najpomembnejši prenašalec za efluks v levkemičnih celicah. Njegovo delovanje lahko zavremo z različnimi inhibitorji, med katerimi so npr. verapamil, kinidin, ciklosporin A in PSC 833 [18]. S temi inhibitorji lahko torej zmanjšamo vpliv aktivnosti P-gp na znotrajcelično koncentracijo imatiniba in začasno odstranimo ali vsaj omilimo rezistenco, ki se pojavi zaradi visoke aktivnosti P-gp [19].

Imatinib je znan substrat tudi za tretji pomemben prenašalec – **BCRP** (MXR, ABCG2) oz. rezistenten protein, izoliran pri raku na dojki (angl. Breast Cancer Resistance Protein). Gre za izločevalni prenašalec, ki pa ima glede na raziskave manjšo vlogo pri rezistenci na zdravljenje z imatinibom kot P-gp. Rezultat terapije je manj odvisen od njegovega izražanja. To je tudi glavna razlika pri vlogi obeh prenašalcev. Ima pa BCRP veliko vlogo pri zdravljenju z nekaterimi drugimi citostatiki (npr. s topotekanom). BCRP lahko prav tako inhibiramo z različnimi inhibitorji (na primer Ko134 in Ko143).

Tako BCRP kot P-gp se izražata tudi v celicah prebavnega trakta. Eden pogostejših razlogov za neuspešno terapijo z imatinibom je hkratna povečana ekspresija obeh izločevalnih prenašalcev, BCRP in P-gp [9] [16]. Z inhibicijo lahko utišamo izražanje gena Bcrp1, ki kodira prenašalni BCRP protein. Skupna inhibicija BCRP in P-gp prenašalca ter utišanje obeh kodirajočih genov je za sam klinični rezultat citostatičnega zdravljenja najbolj primerna. Bihorel in sodelavci so pri tovrstni inhibiciji v miših opazili kar od 3,3- do 3,8-krat povečano koncentracijo imatiniba v celici [16].

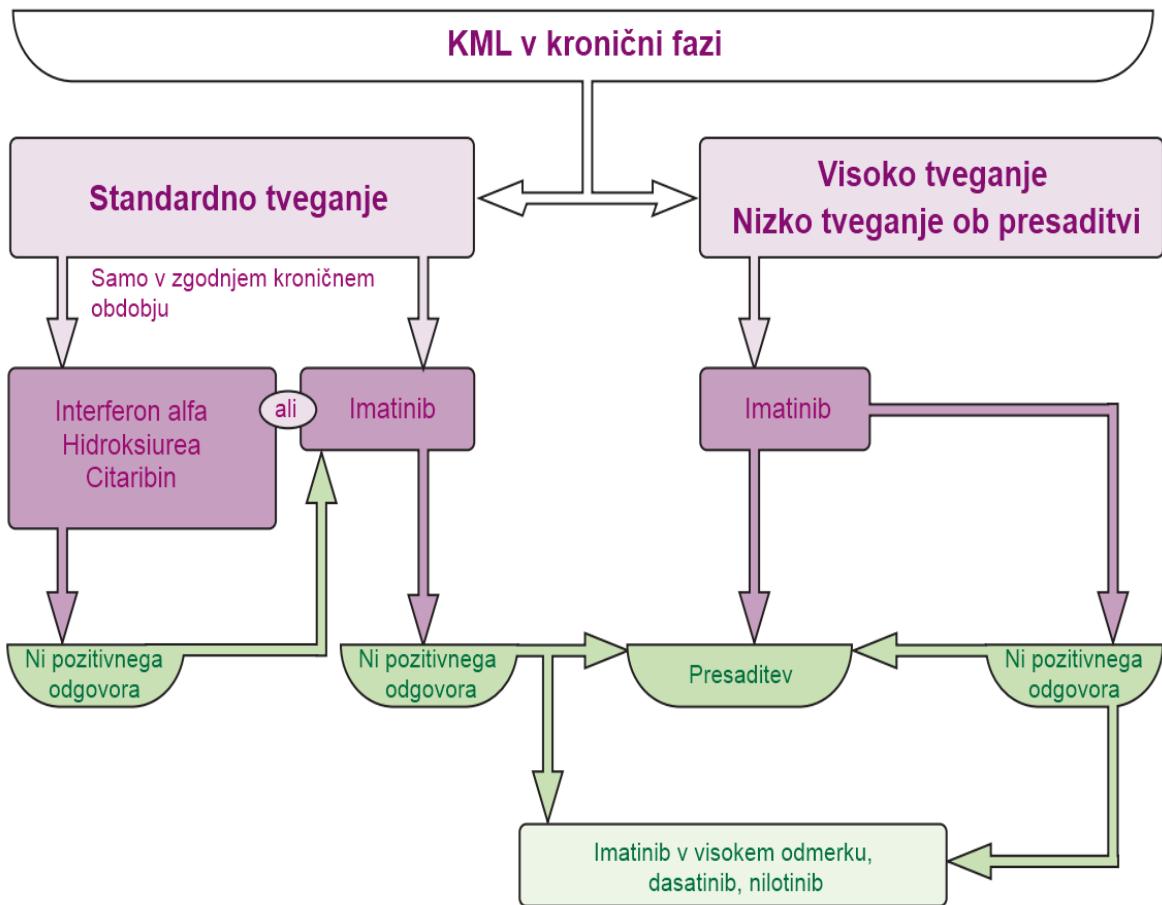
### 1.2.2 Modernejše metode zdravljenja

Poleg že omenjenih starejših možnosti in možnosti terapije z imatinibom lahko za bolnike, ki ne prenašajo imatiniba oz. terapija z njim ni dovolj uspešna, danes hematologi posežejo po terapiji z novejšimi inhibitorji tirozin kinaze druge generacije (dasatinib, nilotinib), z inhibitorji aurora kinaze in inhibitorji histon deacetilaze ali pa s kmalu pričakovanimi inhibitorji tirozin kinaze tretje generacije.

Dosedanje študije kažejo na to, da sta oba inhibitorja tirozin kinaze druge generacije v terapevtskih koncentracijah učinkovita proti večini znanih mutacij, ki povzročajo rezistenco proti imatinibu, žal pa nobeden ni učinkovit proti mutaciji T315I.

V vsakem primeru je potrebno zdravljenje KML s katerokoli metodo/zdravilom od vseh naštetih predhodno proučiti skupaj s specialistom hematologom [1].

Strategija za zdravljenje KML je povzeta v spodnji shemi (Slika 4 [1]):



Slika 4: Strategija za zdravljenje kronične mieloične levkemije v kronični fazi.

## 2. NAMEN DELA

Imatinib je danes zdravilo prvega izbora za zdravljenje kronične mieloične levkemije. Uspešnost zdravljenja je odvisna od njegovega privzema in zadrževanja v mestu delovanja, od česar je odvisna uspešnost vezave na BCR-ABL tirozin kinazo, s čimer preprečuje fosforilacijo tega encima in s tem rast in delitev tumorskih celic.

Za različne rezultate zdravljenja z imatinibom so po zadnjih podatkih iz literature lahko odgovorni tudi prenašalci OCT-1, P-gp in BCRP, ki se pri posameznikih izražajo v različni meri in lahko imajo tudi različno aktivnost.

Zaradi kompleksnih in po dolgih letih še ne povsem raziskanih transportnih poti želimo razviti metodo, s katero bi kvalitativno in kvantitativno proučili transport imatiniba in njegovega metabolita N-desmetil imatiniba v različnih vrstah levkocitov. Glavna cilja diplomske naloge bosta optimizacija določanja znotrajcelične koncentracije imatiniba pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo ter optimizacija poskusa določanja privzema imatiniba v celice bolnikov s kronično mieloično levkemijo z namenom določati aktivnost OCT-1.

Pri tem bomo v prvi fazi za razvoj posameznih testov uporabili levkemično celično linijo K-562. Ker je znano, da se prenašalci različno izražajo v različnih tumorskih celicah, bomo pozneje za primerjavo izvedli poskuse tudi na celicah, izoliranih iz krvi prostovoljcev, in sicer na granulocitih in mononuklearnih celicah periferne krvi (MNC). Te celice bomo izolirali po treh različnih postopkih – prek magnetnih kolon in prek fikola ali histopaque medija, ki bosta uporabljeni kot gradientna medija. S specifičnimi substrati za določene prenašalce (imatinib oz. N-desmetil imatinib kot substrat in prazosin kot inhibitor za prenos prek OCT-1, rosuvastatin kot substrat in Ko134 kot inhibitor za prenos prek BCRP, rodamin123 kot substrat in PSC 833 kot inhibitor za prenos prek P-gp) bomo preverili aktivnost posameznih prenašalcev v omenjenih celicah.

Po inkubacijskih postopkih bomo iz liziranih celic z ekstrakcijskim postopkom poskusili ekstrahirati preiskovane spojine in jih kvantificirati s sklopljeno LC/MS analizo. Dobljene rezultate bomo primerjali z ugotovitvami iz literature.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Poskuse smo najprej izvajali na celični liniji K-562 (American Type Culture Collection, Manassas, ZDA; ATCC številka: CCL-243<sup>TM</sup>). Gre za linijo, pridobljeno na osnovi levkemičnih celic 53-letne ženske, obolele za KML v blastni fazi. Druge poskuse smo izvajali na granulocitih ter mononuklearnih celicah, izoliranih iz periferne krvi različnih prostovoljcev. Kri prostovoljcev (antikoagulant heparin ali EDTA) smo pridobili v Zdravstvenem domu za študente Univerze v Ljubljani, Aškerčeva 4, 1000 Ljubljana.

#### 3.2 STANDARDI

**D8-imatinib**,  $C_{29}H_{23}D8N_7O_4$  M = 501,66 g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

**Imatinib**,  $C_{29}H_{31}N_7O$  M = 493,60 g/mol (Imatinib mesylate); (Sequoia research products Ltd, Pangbourne, Združeno kraljestvo)

**N-desmetil imatinib**,  $C_{28}H_{29}N_7O$  M = 479,59 g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

**Prazosin**,  $C_{19}H_{21}N_5O_4$  M = 383,40 g/mol (Prazosin hydrochloride minimum 99 % TLC); (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

**Rosuvastatin**,  $C_{22}H_{28}FN_3O_6S$  M = 481,54 (Rosuvastatin Ca, Sequoia research products Ltd, Pangbourne, Združeno kraljestvo)

**Rodamin123**,  $C_{21}H_{17}ClN_2O_3$  M = 380,82 (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

**PSC 833**,  $C_{63}H_{111}N_{11}O_{12}$  M = 1214,62 (Tocris, Bristol, Velika Britanija)

**Ko134**,  $C_{25}H_{33}N_3O_4$  M = 439,47 (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

#### 3.3 REAGENTI IN TOPILA

Ultračista voda, pridelana z Milli Q – Advantage A10; specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) ≤ 5 ppb (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Združene države Amerike)

Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; 96 %, M = 46,07 g/mol (Kefo, d. o. o, Ljubljana, Slovenija)

Klorovodikova kislina, HCl; Titrisol ® 1 M, M = 36,46 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Natrijev hidroksid, NaOH; Titrisol ® 1 M, M = 40,00 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Amonijev formiat, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, M = 63,06 g/mol (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Etilacetat, CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, M = 88,10 g/mol (Panreac, Barcelona, Španija)

Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, M = 41,05 g/mol (MS-grade, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)

Heksan Emsure ®ACS, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>; M = 86,18 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

PBS (sestava: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies B. V., Nizozemska)

Fetalni goveji serum (ATCC®, Manasas, Virginia, Združene države Amerike)

Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švedska)

Histopaque®-1119 (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

DMSO C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS; M = 78,13 g/mol (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Tripansko modrilo C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>; M = 872,88 g/mol (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

MACS CD15 Whole Blood Micro Beads (Macs, Teterow, Nemčija)

autoMACS® Rinsing Solution (2,1mM EDTA, pH = 7,2) (Macs, Teterow, Nemčija)

MACS® BSA Stock Solution (raztopina 90 % PBS brez Ca<sup>2+</sup> in Mg<sup>2+</sup>, 10 % BSA) (Macs, Teterow, Nemčija)

AutoMACS Running buffer (pufer za spiranje; pripravljen je z mešanjem autoMACS® Rinsing Solution in MACS® BSA Stock Solution v razmerju 20 : 1) (Macs, Teterow, Nemčija)

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 + L-glutamin (Gibco® Life technologies, Carlsbad, Kalifornija, Združene države Amerike)

### **3.4 NAPRAVE IN PRIBOR**

HLADILNIK (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

ZAMRZOVALNIK –20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

ZAMRZOVALNIK –70 °C (Sanyo Electric Biomedical, Japonska)

TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

TURBOVAP LV (Caliper, Hopkinton, Massachusets, Združene države Amerike)

ELEKTROMAGNETNO MEŠALO ROTAMIX 550 MMH (Tehnica, Železniki, Slovenija)

ULTRAZVOČNA KADIČKA BANDELIN SONOREX DIGITAL 10 P (Schalltec, Mörfelden – Walldorf, Nemčija)

STRESALNIK VIBROMIX 403 EVT (Tehnica, Železniki, Slovenija)

MIKROTITRSKE PLOŠČE NUNC TM 96 POLJ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusets, Združene države Amerike)

LOČEVALNI MAGNET MIDIMACS MULTISTAND (Macs, Teterow, Nemčija)

LOČEVALNA KOLONA MACS LS (Macs, Teterow, Nemčija)

INKUBATOR SANYO MCO – 18 AIC (Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japonska)

SPEKTROSKOP TECAN SAFIRE 2 (TecanAustria GmbH, Grödig, Avstrija)

STRIPETE CORNING COSTAR® 5 mL, 15 mL, 30 mL (Corning incorporated, Corning, New York, Združene države Amerike)

INKUBACIJSKE PLOŠČE CORNING COSTAR® (Corning incorporated, Corning, New York, Združene države Amerike)

PLOŠČE ZA GOJENJE (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica)

MIKROSKOP OLYMPUS CKX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japonska)

OBJEKTNO STEKELCE ZA ŠTETJE CELIC NEUBAUER (Labor optik, Lancing, Združeno kraljestvo)

CENTRIFUGA CENTRIC 322a (Tehnica, Železniki, Slovenija)

CENTRIFUGA EPPENDORF 5415 R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

CENTRIFUGIRKE TPP (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica)

VIALE Z ZATALJENIM INSERTOM 350 µL (Cronus, Gloucester, Združeno kraljestvo)

SPEEDVAC PLUS SC 110a SAVANT (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusets, Združene države Amerike)

MEŠALNIK VIBROMIX 10 (Tehnica, Železniki, Slovenija)

TERMOSTAT VORTEMP 56 EVC (Tehnica, Železniki, Slovenija)

POLAVTOMATSKE PIPETE 2-20 µL, 20-200 µL in 200-1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

PLASTIČNE EPRUVETE oz. MIKROCENTRIFUGIRKE 2,0 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

DRUG INVENTAR: čaše, bučke, erlenmajerice, magnetno mešalo, spatule, tehtiči, nastavki za pipete, Parafilm®

HPLC/MS SISTEM

UHPLC: Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Združene države Amerike),

Kolona: Kinetex 2,6 µm C18, 50 × 2,1 mm, (Phenomenex, Torrance, Združene države Amerike),

Predkolona Security Guard C18, 4 × 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, Združene države Amerike)

Ionski izvor: ESI JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije

Masni detektor (MS): Agilent 6460 MSD Triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, Združene države Amerike)

## 4. METODE

### 4.1 GOJENJE CELIČNE KULTURE K-562

Celice levkemične linije K-562 so bile gojene v mediju Iscove's Modified Dulbecco's Medium z dodatkom 10% fetalnega govejega seruma (FBS) in 100 UE/mL penicilina pri 37 °C ob prisotnosti 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> in vlage. Gostota celic ob nasajanju na plošči T-75 s plinsko prepustnim zamaškom je bila  $2 \times 10^5$  celic/mL, zamenjava medija z vnovičnim nasajanjem je potekala vsak drugi dan. Inkubacija celic za določanje privzema imatiniba je potekala v RPMI 1640 mediju z dodatkom 10-odstotnega FBS in koncentracijo  $6 \times 10^5$  celic/mL (4.4).

### 4.2 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN

#### a) Priprava 1 x pufra PBS

Najprej smo iz 10 x pufra PBS pripravili 1 x pufer PBS. 10 x pufer PBS smo razredčili v sterilni bučki, velikosti 1000 mL, v razmerju 1 : 10 s prečiščeno deionizirano vodo, tako da smo 100 mL 10 x PBS pufra dopolnili z deionizirano vodo do oznake na bučki. Premešali smo z obračanjem. pH dobljene raztopine je znašal 7,1. Če ne bi bilo tako, bi ga po potrebi uravnali s HCl ali NaOH. Pufer smo nato do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri +4 °C.

#### b) Matična raztopina za lizo eritrocitov-10×

Natehtali smo soli: 82,6 g NH<sub>4</sub>Cl, 10,0 g KHCO<sub>3</sub>, 0,37 g EDTA in jih v celoti prenesli v bučko velikosti 1000 mL. S sterilno, redestilirano vodo smo dopolnili do oznake in dobljeno prek vakumsko-filtracijskega sistema z vodno črpalko filtrirali v dve steklenički velikosti 500 mL. Označili smo ju z imenom (»Matična raztopina za lizo eritrocitov -10×«) in napisali datum priprave. Raztopino smo shranili v hladilniku pri +4 °C.

#### c) Raztopina za lizo eritrocitov

Raztopino smo pripravili z 10-kratnim redčenjem »Matične raztopine za lizo eritrocitov«. 100 mL te z merilnim valjem prenesemo v bučko velikosti 1000 mL in dodamo sterilno, redestilirano vodo do oznake. Z obračanjem bučke smo raztopino premešali, prenesli v plastično steklenico, označili (»Raztopina za lizo«) in na steklenico napisali datum priprave. Raztopino smo shranili v hladilniku pri +4 °C.

**d) Priprava internega standarda**

Pred začetkom ekstrakcije smo pripravili raztopino internega standarda D8-imatiniba. Osnovno raztopino ( $c = 2 \text{ mg/L}$ ) smo redčili s prečiščeno vodo (0,1875 mL/5 mL s  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $c(\text{IM-D8}) = 75 \mu\text{g/L}$ ).

**e) Priprava inkubacijskih raztopin**

Imatinib/N-desmetil imatinib + prazosin: v 5 mL (2,5 mL) raztopine za inkubacijo smo želeli imeti  $2 \mu\text{M}$  IM in  $100 \mu\text{M}$  PRA, pri čemer je bil  $V(\text{»učinkovina}) = 0,3 \text{ mL}$  ( $0,15 \text{ mL}$ ). Za tako razmerje med V in c smo morali pripraviti  $0,0333 \text{ mM}$  IM in  $1,67 \text{ mM}$  PRA.

IM (DMI): najprej smo natehtali  $58,97 \text{ mg}$  imatinib mesilata (47,69 DMI) in ga raztopili v  $10 \text{ mL}$  etanola. Tako smo dobili osnovno  $10 \text{ mM}$  raztopino IM (DMI), ki smo jo shranjevali v hladilniku in iz katere smo pripravljeni sveže raztopine pred vsakim poskusom.  $0,292 \text{ mL}$  te raztopine smo nadalje redčili s 50-odstotnim etanolom do  $5 \text{ mL}$  ( $c = 0,583 \text{ mM}$ ).  $1 \text{ mL}$  te raztopine smo redčili s 50-odstotnim etanolom do  $5 \text{ mL}$  ( $c = 0,1166 \text{ mM}$ ).  $1,432 \text{ mL}$  te raztopine pa smo redčili v  $5 \text{ mL}$  hraničnega medija (RPMI) in dobili raztopino, ki smo jo dodajali celičnemu vzorcu ( $c = 0,0333 \text{ mM}$ ).  $300 (150) \mu\text{L}$  te raztopine smo dodali celicam tik pred inkubacijo.

PR: najprej smo natehtali  $15,3 \text{ mg}$  prazosin hidroklorida in ga raztopili v  $5 \text{ mL}$  50-odstotnega etanola. Tako smo dobili osnovno  $7,29 \text{ mM}$  raztopino PRA. To smo dali na ultrazvok za  $15\text{min}$ , saj se sicer PR ni raztopil v celoti.

Mešanico IM (DMI) in PR v želenih inkubacijskih koncentracijah smo pripravili tako, da smo zmešali  $4 \text{ mL}$   $7,29 \text{ mM}$  PR in  $1 \text{ mL}$   $0,583 \text{ mM}$  IM (DMI). Od te raztopine smo vzeli  $716 \mu\text{L}$  in jih do  $2,5 \text{ mL}$  razredčili s prečiščeno vodo.  $300 (150) \mu\text{L}$  te raztopine smo dodali celicam tik pred inkubacijo.

PSC 833: inkubacijsko raztopino s PSC smo pripravili tako, da smo natehtali  $16,68 \text{ mg}$  PSC 833 in ga raztopili v  $10 \text{ mL}$  50-odstotnega EtOH. Po vorteksiranju smo od te raztopine vzeli  $0,364 \text{ mL}$  in do  $0,5 \text{ mL}$  dopolnili s 50-odstotnim etanolom.  $50 \mu\text{L}$  smo dodali suspenziji  $1,5$  milijona celic v hraničnem mediju do skupnega  $V = 2,5 \text{ mL} - c(\text{PSC 833}) = 10 \mu\text{M}$ .

RHO: v  $1,8 \text{ mL}$  etanola smo najprej raztopili  $1,37 \text{ mg}$  Rodamina123 in tako dobili  $2 \text{ mM}$  raztopino RHO. To smo nato desetkrat redčili z etanolom,  $25 \mu\text{L}$  te  $200 \mu\text{M}$  raztopine RHO pa dodali suspenziji  $1,5$  milijona celic v hraničnem mediju do skupnega  $V = 2,5 \text{ mL} - c(\text{RHO}) = 2 \mu\text{M}$ .

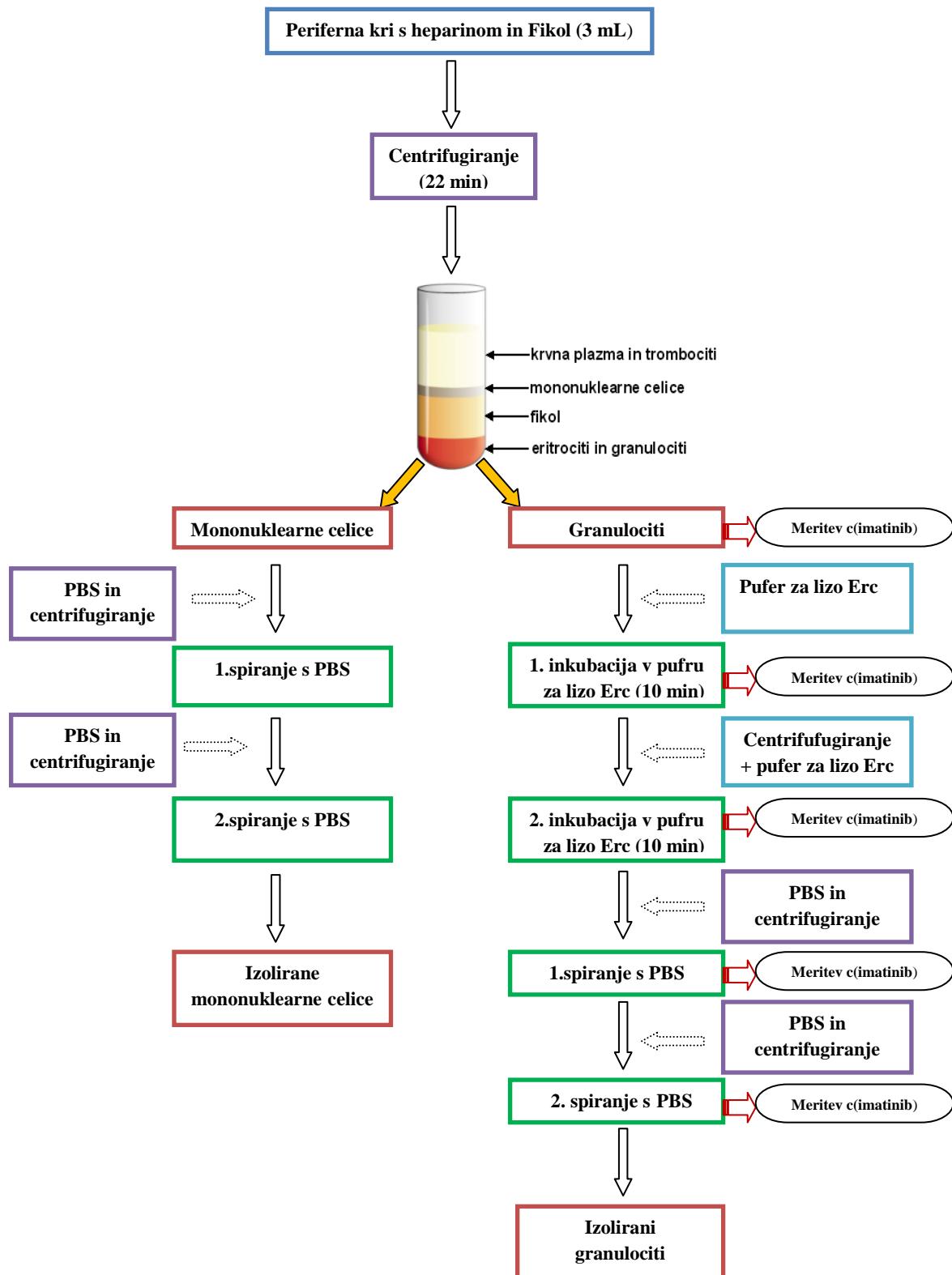
**ROS:** V epico smo prenesli 20,02 mg Rosuvastatin Ca in ga raztopili v 1 mL topila (etanol : DMSO = 50 : 50). 50 $\mu$ L te raztopine dodamo hranilnemu mediju in 3 milijonom celic, tako da dobimo skupni V = 5mL in skupno inkubacijsko koncentracijo ROS 200  $\mu$ M.

**Ko134:** Raztopino Ko134 smo pripravili tako, da smo raztopili 5 mg Ko134 v 11,35 mL DMSO. Raztopino smo desetkrat redčili v DMSO, nato pa 50  $\mu$ L razredčene raztopine Ko134 dodali suspenziji celic v hranilnem mediju z dodatkom 50  $\mu$ L ROS do skupnega V = 5 mL – c(Ko134) = 5  $\mu$ M.

**f) Priprava 4,5 mM NH<sub>4</sub>-formiata**

4,5 mM NH<sub>4</sub>-formiat smo pripravili tako, da smo natehtali 14,19 mg trdnega amonijevega formiata in ga kvantitativno raztopili v 50 mL vode.

### 4.3 IZOLACIJA LEVKOCITOV



Slika 5: Izolacija mononuklearnih celic in granulocitov preko fikola.

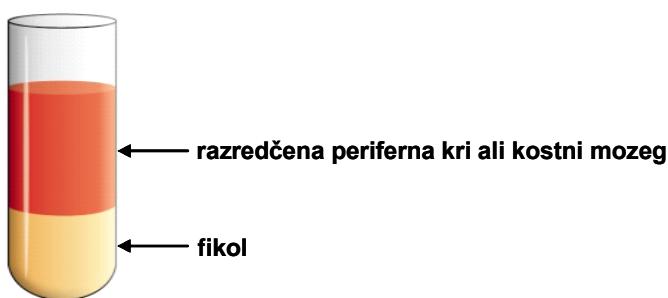
#### 4.3.1 Izolacija granulocitov in mononuklearnih celic preko fikola

Pri delovnem postopku izolacije prek fikola smo bili pozorni, da so bili vsi reagenti (tudi vzorci) segreti na sobno temperaturo.

Periferna kri je bila odvzeta v ambulanti za sistematske preglede v Zdravstvenem domu za študente v Ljubljani. Vzorec krvi smo shranili v epruveto Vacutainer z antikoagulantom K<sub>2</sub>EDTA/K<sub>3</sub>EDTA (vijoličen zamašek) ali s heparinom (zelen zamašek) in to razredčili v razmerju 1 : 1 z raztopino 1×PBS. Če smo izhajali iz dveh epruvet periferne krvi (10 ml), smo polovico vzorca prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko ter v centrifugirko in epruveto Vacutainer dodali enako količino 1×PBS, kot smo imeli vzorca. Tako smo dobili končni volumen vzorca približno 20 ml.

V 15-mililitrske plastične epruvete Falcon smo z iglo in brizgalko vbrizgali 2 ml fikola (Ficoll-Paque™ PLUS). Gre za že pripravljeno polisaharidno sterilno raztopino, ki na podlagi svoje gostote loči plasti celic periferne krvi oziroma bolj pravilno – loči mononuklearne celice od drugih celic. Naš reagent je vodna raztopina fikola (Ficoll™ 400) in natrijevega diatrizata z gostoto 1,077 + 0,001 g/ml. Raztopina je bila predhodno testirana na endotoksine (< 0,12 EU/ml) [22].

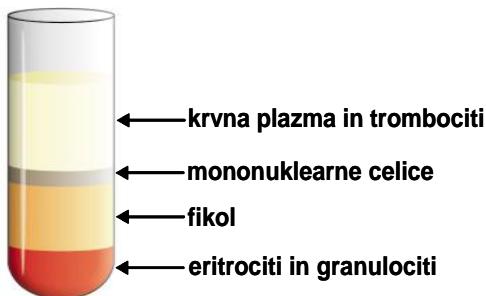
Z 1×PBS razredčena vzorca periferne krvi smo počasi in previdno pipetirali ob steni epruvete na plast fikola, da je meja med fikolom in krvjo ostala jasna (Slika 6 [22]). Če smo izhajali iz 10 ml periferne krvi (dve epruveti Vacutainer), smo pripravili dve epruveti s fikolom. Če smo imeli v epruvetah Vacutainer 20 mL, pa smo pripravili štiri. Za vsako posamezno epruveto/vzorec s 5 mL krvi smo torej pripravili eno epruveto s fikolom.



Slika 6: Raztopina fikola in periferne krvi pred centrifugiranjem.

Sledilo je centrifugiranje – 22 minut pri 2200 obratih/min ([rpm]; angl. revolutions per minute) v centrifugi z nihajočim rotorjem (Centric 322A, Tehnica). Pri centrifugiranju so se eritrociti in granulociti zaradi večje specifične gostote posedli na dno epruvete pod plast

fikola. Nad plastjo fikola, ki ostane bistra, se je pojavila plast mononukleranih celic. Njena debelina je bila odvisna od količine mononuklearnih celic, ta pa je različna pri vsakemu posamezniku (odvisna od zdravstvenega stanja, genetskega zapisa itn.). Na samem vrhu suspenzije, v supernatantu, pa so bili krvna plazma, trombociti in maščobe ter PBS (Slika 7 [22]). Ta plast je bila v primerjavi z mononuklearno plastjo bistrejša in rumenkaste barve.



Slika 7: Vzorec po centrifugiranju – ločitev celic glede na razlike v specifični gostoti.

a) **Izolacija mononuklearnih celic:** S pipeto smo previdno odstranili supernatant s PBS, krvno plazmo, trombociti in maščobami. Plast mononuklearnih celic smo previdno odstranili in celice prenesli v novo 15-mililitrsko epruveto. Pomembno je, da smo bili pri pipetiranju pozorni. Prenesti smo morali čim manj fikola, ki je toksičen za celice, hkrati pa smo stremeli k izolaciji čim večjega števila mononuklearnih celic. Vzorec z mononuklearnimi celicami smo dopolnili do 14 ml z 1 x pufrom PBS in raztopino dobro premešali v popolnoma zaprti centrifugirki. To smo centrifugirali v hladni centrifugi 10 min pri 1700 obratih/min. Supernatant smo odlili in ponovili vse korake. Dobljeni oborini in preostanku tekočine smo spet dodali PBS do 14 mL, resuspendirali predhodno dobljeno oborino z dna centrifugirke ter centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo znova odstranili in vzorce prenesli v dvomililitrske epice. Koncentracijo celic smo ocenili s štetjem pod mikroskopom.

b) **Izolacija granulocitov:** V centrifugiranih epruvetah s preostankom polne krvi smo odstranili ves preostali fikol. Plast rdečih krvnih celic in granulocitov, ki je ostala na dnu epruvete, smo prenesli v 50-mililitrsko plastično centrifugirko (eno za en izhodni vzorec), 15-mililitrske epruvete sprali s 3–5 ml pufra za lizo eritrocitov, in to raztopino dodali vzorcu celic v 50-mililitrski centrifugirki. Vzorec smo do 45 ml dopolnili z raztopino za lizo eritrocitov s tris-amonijevim kloridom. Vzorec smo premešali z obračanjem, pri čemer je morala biti centrifugirka popolnoma zaprta. Po mešanju smo celice inkubirali deset

minut pri sobni temperaturi (eritrociti v tem času popokajo), med inkubacijo pa smo vzorce nekajkrat premešali z obračanjem. Časa inkubacije nismo smeli prekoračiti.

Naslednja stopnja je bilo petminutno centrifugiranje pri 1600 obratih/min. Granulociti so se medtem posedli na dno epruvete. Supernatant smo previdno odlili in preostalo oborino celic raztopili v preostali tekočini. Dodali smo 25 mL pufra za lizo eritrocitov in inkubirali deset minut na sobni temperaturi.

Po inkubaciji je znova sledilo petminutno centrifugiranje pri 1600 obratih/min. Supernatant smo previdno odlili in preostalo oborino celic raztopili v preostali tekočini ter vse skupaj prenesli v novo 15-mililitrsko centrifugirko. Z 1×pufrom PBS smo dopolnili do 14 ml in dobro premešali z obračanjem trdno zaprte centrifugirke. Vnovič je sledilo petminutno centrifugiranje pri 1600 obratih/min in previdno odlitje supernatanta.

Korake iz zgornjega odstavka smo ponovili: resuspendirali smo celice, dodali 1×pufer PBS do 14 ml, premešali, centrifugirali in odlili supernatant. Postopek smo nadaljevali tako, da smo celice resuspendirali v 1×pufru PBS do koncentracije  $3 (1,5) \times 10^6$  celic v  $200 \mu\text{l}$  raztopine 1×PBS, pri čemer je bil volumen pufra odvisen od števila celic. Koncentracijo celic smo predhodno ocenili s štetjem pod mikroskopom.

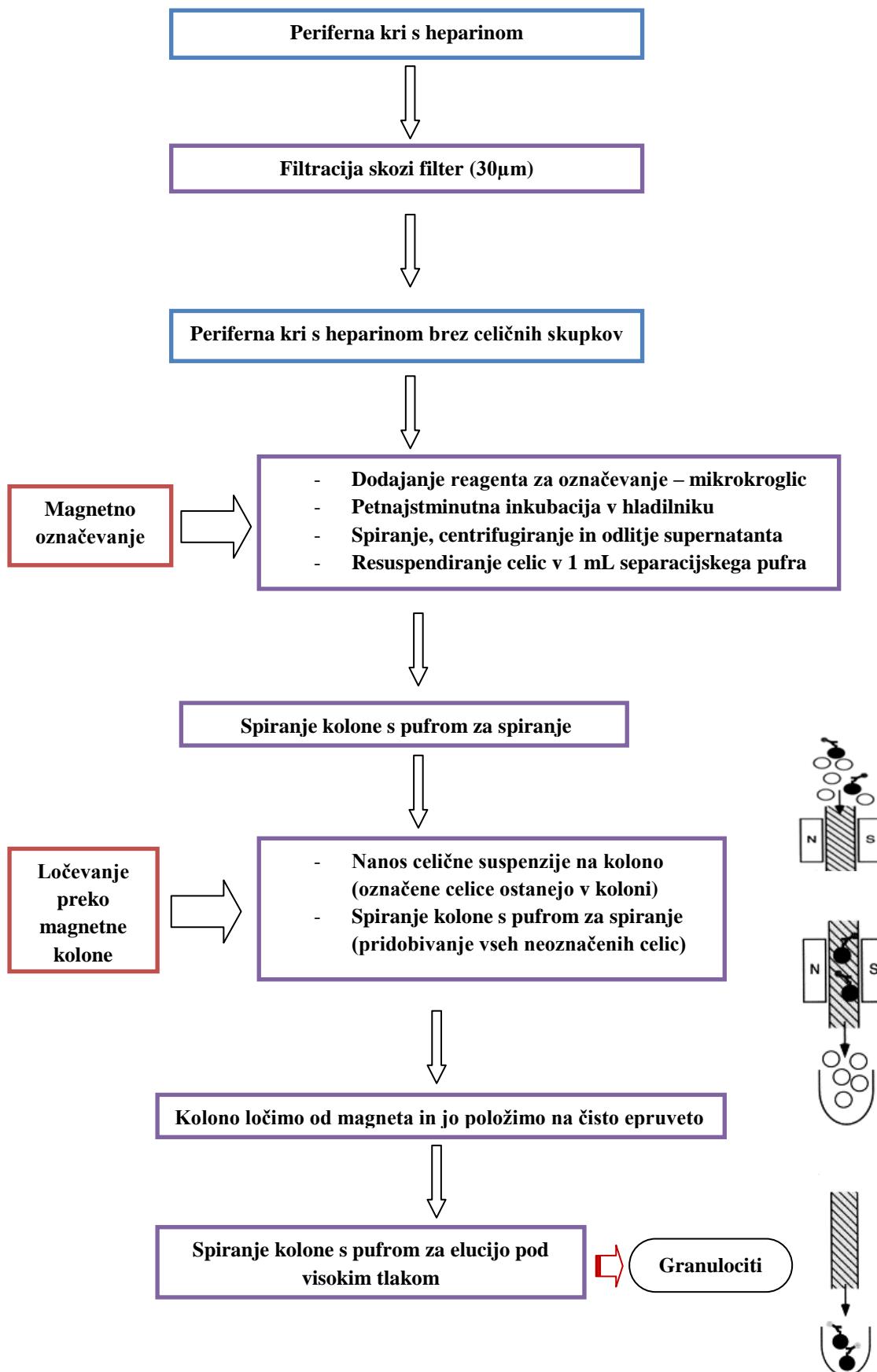
#### 4.3.2 Izolacija granulocitov s pozitivno selekcijo prek magnetnih kolon

Granulocitne celice smo izolirali tudi prek magnetnih kolon, in sicer s pozitivno selekcijo (Slika 8 [23] [24]). Pozitivna selekcija pomeni, da določen antigen, ki se izraža na tarčnih celicah, magnetno označimo. Zaradi pridobljenih lastnosti se ta celica zadrži v koloni, medtem ko druge celice iz heterogenega celičnega sistema nemoteno potujejo skozi kolono [23]. Sistem z magnetom in kolono je bil razvit z namenom hitrega in zanesljivega ločevanja granulocitov. V primerjavi s prej omenjenimi postopki tukaj nista bila potrebna ločevanje celic prek gradientnega medija in liza eritrocitov. Postopek ločevanja granulocitov temelji na tem, da imajo magnetne mikrokroglice (MicroBeads), s katerimi celice inkubiramo, na svoji površni pripeto protitelo proti antigenu 3-fukozil-N-acetillaktozamina (CD15). To omogoča ločevanje granulocitov (nevtrofilcev) od limfocitov in monocitov, saj ti vrsti levkocitov ne izražata antiga CD15 [25], zaradi česar se ne zadržujeta v koloni.

Kri iz epruvete z antikoagulantom smo filtrirali skozi 30 µm najlonski filter. S tem smo odstranili skupke celic, ki lahko zamašijo kolono. Prva stopnja same izolacije je bilo magnetno označevanje. 1 mL polne krvi smo dodali 50 µL reagenta »CD15 MicroBeads« (če smo vzeli več krvi, je bilo sorazmerno treba povečati tudi volumen reagenta za označevanje). Dobljeno celično suspenzijo smo dobro premešali in inkubirali v hladilniku (2–8 °C) 15 minut. Celice smo nato sprali z 2–5 mL pufra za ločevanje (»autoMACS running buffer«)/1 mL krvi in centrifugirali v centrifugi 10 minut pri 1700 obratih/min. Supernatant smo odstranili. Ob tem smo bili pozorni, da ga nad plastjo celic ni ostalo več kot 1–2 mm. Celice smo resuspendirali z dodatkom separacijskega pufra do končnega volumena 1 mL.

Ločevanje z magnetom smo začeli tako, da smo MidiMACS ločevalec pripeli na MidiMACS stojalo. V ločevalec smo vstavili »Whole Blood« kolono, pod katero smo postavili zbirno epruveto. V kolono smo nanesli 3 mL pufra za spiranje (»autoMACS Rinsing Solution«) ter počakali, da vsa tekočina steče skozi. Na kolono smo nato nanesli celično suspenzijo. To smo trikrat sprali s 3 mL pufra. Pri tem smo pred vsakim naslednjim spiranjem počakali, da je bila kolona prazna. Celoten eluat smo nato zavrgli.

Kolono smo nato odstranili iz MACS ločevalca in jo položili na novo, čisto epruveto. S pipeto smo v kolono prenesli 5 mL pufra za elucijo, z močnim pritiskom na bat pa smo slednjo hitro sprali in tako sprali granulocite iz kolone.



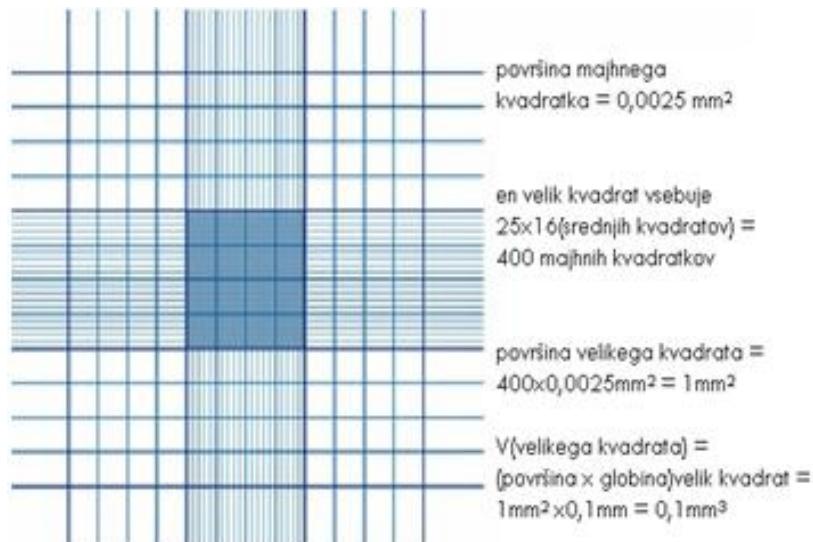
Slika 8: Shema izolacije granulocitov s pozitivno selekcijo preko magnetnih kolon.

### 4.3.3 Izolacija s histopaque medijem

Histopaque je gradientni medij, s katerim lahko ob pravilni uporabi ločimo mononuklearne celice in granulocite iz manjših količin krvi. V 15-mililitrsko centrifugirko smo sprva vnesli 3 mL Histopaque-1119. Nauj smo previdno odpipetirali enak volumen Histopaque-1077. Na zgornjo plast smo previdno odpipetirali približno 6 mL polne krvi, ki smo jo pred tem odvzeli prostovoljcu v epruveto z antikoagulantom EDTA. Sledilo je polurno centrifugiranje pri 1900 obratih/min. Med centrifugiranjem se eritrociti sprimejo s sladkorji v raztopini in sedimentirajo. Iz centrifugirke smo previdno odvzeli plazmo do 0,5 cm do zgornje plasti. Celice iz te plasti smo nato prenesli v nove centrifugirke in jih ustrezno označili (mononuklearne celice). Vnovič smo odpipetirali vzorec do 0,5 cm do naslednje plasti ter od tam odvzeli celice in jih ustrezno označili (granulociti). Vse celične vzorce smo nato dopolnili s PBS do 14 mL in jih 2-krat spirali, kot je opisano v postopku 4.3.1 [26].

### 4.3.4 Štetje celic

Štetje pod mikroskopom je potekalo tako, da smo sediment celic raztopili v 2 mL PBS (če je bila suspenzija celic redka, smo uporabili le 1 mL). V epico smo odpipetirali 40 uL tripanskega modrila in 10 uL celične suspenzije in dobro premešali s pomočjo pipetnega nastavka. Štetje smo izvedli v dveh paralelkah. 10 uL zmesi smo prenesli na objektno stekelce za štetje in celice prešteli v vseh štirih kvadratkih (Slika 9 [27]). Izračunali smo povprečje obeh paralelk in iz njega število celic v naši suspenziji po sledečih enačbah:  $d = N \times 5 \times 10^4$ ,  $N = d \times V$  [28] (Preglednica 1).



Slika 9: Neubajerjeva komora na stekelcu za štetje celic.

**Preglednica 1: Pomen oznak v enačbah za štetje celic**

Oznaka	Pomen
d	Gostota celic v suspenziji (Število celic v suspenziji v 1 mL)
$5\times$	Redčenje suspenzije
N	Povprečno število celic v merilni mrežici na dnu komore objektnega stekla
$10^4$	Faktor, ki ga upoštevamo za 1 mL, saj je volumen merilne komore na objektnem stekelcu 100nL
V	Volumen suspenzije celic (V celotnega vzorca) [mm <sup>2</sup> ]

**4.4 INKUBACIJA**

Izolirane celice smo bodisi takoj uporabili v inkubacijskem poskusu z želeno učinkovino bodisi smo jih do nadaljnega zamrznili. Odmrznjene celice smo gojili v mediju Iscove's Modified Dulbecco's Medium z dodatkom 10 % FBS in 100 UE/mL penicilina pri 37 °C v prisotnosti 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> in vlage, da so se namnožile do želene koncentracije. Celice smo nato prešteli pod mikroskopom in jih inkubirali v koncentraciji 600 000 celic/1 mL medija. Volumen inkubacijske zmesi je bil 2,5 ali 5 mL, odvisno od tega, ali smo inkubirali 1,5 milijona ali 3 milijone celic. Vzorcu celic smo dodali različne učinkovine, substrate ali inhibitorje prenašalcev in po lizi celic in ekstrakciji spojin proučevali njihov privzem v celico oziroma aktivnost posameznih prenašalcev.

Inkubacija je potekala v inkubatorju pri stalni temperaturi 37 °C, 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>. Po dveurni inkubaciji smo inkubacijske plošče vzeli iz inkubatorja. Medij s celicami (2,5 mL ali 5 mL) smo prenesli v 15-mililitrske Falcon epruvete ter dopolnili s hladnim 1×PBS. Sledilo je centrifugiranje (5 min pri 1000 obratih/min). Supernatant smo previdno odlili in vse korake ponovili: dobljeni celični oborini in preostanku tekočine (poskrbeli smo, da je odteklo čim več tekočine in predvsem smo pazili, da po obeh odlitjih supernatanta nismo izgubili celic) smo spet dodali PBS (do 14 mL), nežno resuspendirali predhodno dobljeno oborino z dna centrifugirke ter centrifugirali pri enakih pogojih. Zatem smo celično peleto s preostankom tekočine (250 µL) prenesli v epice in nadaljevali z lizo in ekstrakcijo oziroma smo vzorec v epici do nadaljnega dela zamrznili v zmrzovalniku.

## 4.5 IZBIRA INTERNEGA STANDARDA

Kot interni standard smo uporabili devterirano različico preiskovane spojine – D8-imatinib, ki se pogosto uporablja pri validaciji HPLC/MS metode. Devterirane spojine se kot interni standardi uporabljajo zaradi identične strukture standarda s preiskovano spojino in posledično istega obnašanja standarda pri ekstrakciji in ločevanju na kromatografski koloni. Ker imajo poleg vseh fizikalno-kemijskih lastnosti tudi identičen retencijski čas kot preiskovane spojine, je vpliv matrice na odziv masnega detektorja enak za preiskovano spojino in za interni standard.

## 4.6 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA/N-DESMETIL IMATINIBA

Liza celic je potekala tako, da smo epice s suspenzijo celic izmenjaje trikrat potopili v tekoči dušik (zamrznitev) in vročo vodo (odtalitev).

V vsako 2 mL epico smo odpipetirali 50 µL internega standarda (D8-imatiniba), 200 µL 0,2M NaOH, celoten volumen celic in 1 mL organskega topila, sestavljenega iz heksana in etilacetata v razmerju heksan : etilacetat = 30 : 70.

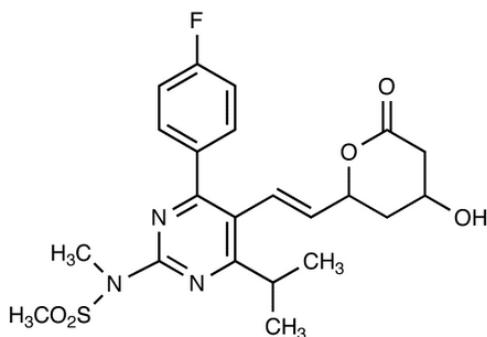
Vsako epico smo vorteksirali eno minuto in pozneje na stresalniku stresali 40 min pri 200 obratih/min. Epice morajo biti pri stresanju v vodoravnem položaju. Sledilo je hladno (5 °C) petminutno centrifugiranje pri 10 000 obratih/min. V tej stopnji se je organska faza dobro ločila od vodne faze. 800 µL organske faze smo nato previdno odpipetirali v čiste epice s pritrjenim zamaškom ter vsebino posušili na TurboVapu pri 45 °C do suhega ostanka (približno 15 min). Pri tem smo bili pozorni na pogoje sušenja (poleg temperature in časa tudi na tlak – hitrost – izhajanja dušika iz šob nad epicami).

Posušen ostanek smo v istih epicah rekonstituirali v 250 µL mešanice 4,5 mM NH<sub>4</sub>- formiat : MeOH (50 : 50). Da smo dobro sprali posušen ostanek na epici smo epice znova eno minuto vorteksirali ter iz njih odpipetirali 200 µL v viale z zataljenim insertom. Vzorce v vialah smo nato posušili na SpeedVacu do suhega ostanka. Sušenje je trajalo devetdeset minut.

Suhemu ostanku v viali smo s pipeto dodali 40 µL mešanice 4,5 mM NH<sub>4</sub>-formiat : MeOH (80 : 20) ter koncentracijo imatiniba določili na sistemu tekočinske kromatografije in masne spektrometrije (LC/MS).

#### 4.7 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA ROSUVASTATINA

Liza celic in ekstrakcija rosuvastatina (Slika 10: Rosuvastatin Slika 10 [29]) sta potekali podobno kot pri imatinibu.



**Slika 10: Rosuvastatin**

Temeljna razlika med ekstrakcijama imatiniba in rosuvastatina je bila samo ena. V primeru imatiniba smo vzorec pred ekstrakcijo naalkalili z 0,2 M NaOH, v primeru rosuvastatina pa nakisali z 0,2 M HCl. To smo storili, da bi učinkovini pretvorili v neionizirano obliko. Imatinib je kvadrvivalentna baza, spojina s štirimi bazičnimi centri, ki se lahko protonirajo (pKa1 = 8,07; pKa2 = 3,73; pKa3 = 2,56; pKa4 = 1,52.) [6]. Da do ionizacije ne pride, moramo zagotoviti bazične pogoje, zato vzorec v presežku naalkalimo. Le neionizirana spojina namreč prehaja v organsko fazo. Podobno velja pri rosuvastatinu, le da gre v tem primeru za kislo spojino. Ocenjene pKa vrednosti so 3,8 (kisla karboksilna skupina), 4,9 in 5,5 (aminske skupine), kar kaže na to, da je spojina primarno prisotna kot anion [30].

#### 4.8 PRIPRAVA VZORCEV ZA UMERITVENE KRIVULJE

- a) **Imatinib:** umeritveno krivuljo za IM smo pripravili tako, da smo 50 µL 10 mM IM dopolnili do 1 mL s celičnim lizatom. 50 µL te raztopine smo dopolnili do 1 mL s celičnim lizatom. 40,5 µL te raztopine pa smo redčili do 1 mL s celičnim lizatom, s čimer smo dobili Standard 1: c(IM) = 1,013 µM oz. 500 µg/L, ki je predstavljal najbolj koncentriran standard za umeritveno krivuljo. Iz Standarda 1 smo z nadaljnjjim redčenjem pripravili še Standard 2 (400 µL Standarda 1 + 600 µL celičnega lizata; c =

200 µg/L), Standard 3 (250 µL Standarda 2 + 750 µL celičnega lizata;  $c = 50\mu\text{g}/\text{L}$ ) in Standard 4 (500 µL Standarda 3 + 500 µL celičnega lizata;  $c = 25\mu\text{g}/\text{L}$ ). Iz 250 µL standarda ( $V_{\text{standard}} = V_{\text{suspencije celic po inkubaciji}}$ ) smo ekstrahirali IM, kot je opisano v postopku 4.6.

- b) **N-desmetil imatinib:** umeritveno krivuljo za DMI smo pripravili tako, da smo 12 mg DMI raztopili v 2 mL etanola. 100 µL te raztopine smo razredčili z etanolom do 10 mL. 100 µL te raztopine smo razredčili s celičnim lizatom do 10 mL in dobili standard 1:  $c(\text{DMI}) = 600 \text{ ng/mL}$ . 300 µL te raztopine smo dopolnili s celičnim lizatom do 1 mL in dobili standard 2:  $c(\text{DMI}) = 180 \text{ ng/mL}$ . 500 µL standarda 2 smo dopolnili s celičnim lizatom do 1 mL in dobili standard 3:  $c(\text{DMI}) = 90 \text{ ng/mL}$ . 333 µL standarda 3 smo dopolnili s celičnim lizatom do 1 mL in dobili standard 4:  $c(\text{DMI}) = 90 \text{ ng/mL}$ .
- c) **Rodamin123:** 1,37 mg RHO smo raztopili v 1,8 mL etanola, s čimer smo dobili 2 mM raztopino RHO. To smo potem redčili do želenih koncentracij za vzorce za umeritveno krivuljo in za inkubacijske zmesi. Pripravili smo dve umeritveni krivulji. Pri prvi smo izhajali iz nerazredčene 2 mM raztopine RHO, pri drugi pa smo to raztopino 10-krat razredčili in tako dobili izhajajočo raztopino za drugo umeritveno krivuljo. Obe donorski raztopini smo pripravili tako, da smo 25 µL obeh prvotnih (nerazredčene in 10-krat razredčene) raztopin redčili s celičnim lizatom do skupnega volumna 2,5 mL. Tako smo dobili 20 µM oz. 2 µM donorsko raztopino, iz katerih smo pripravili standarde za umeritveni krivulji (Preglednica 2).

**Preglednica 2: Priprava umeritvene krivulje za rodamin.**

Delež donorske raztopine	$c (\mu\text{M}) - 1.\text{um.krivulja}$	$c (\mu\text{M}) - 2.\text{um.krivulja}$
0,2	4	0,4
0,1	2	0,2
0,04	0,8	0,08
0,02	0,4	0,04
0,01	0,2	0,02
0,004	0,08	0,008
0,002	0,04	0,004
0,001	0,02	0,002
0,0004	0,008	0,0008
0,0002	0,004	0,0004

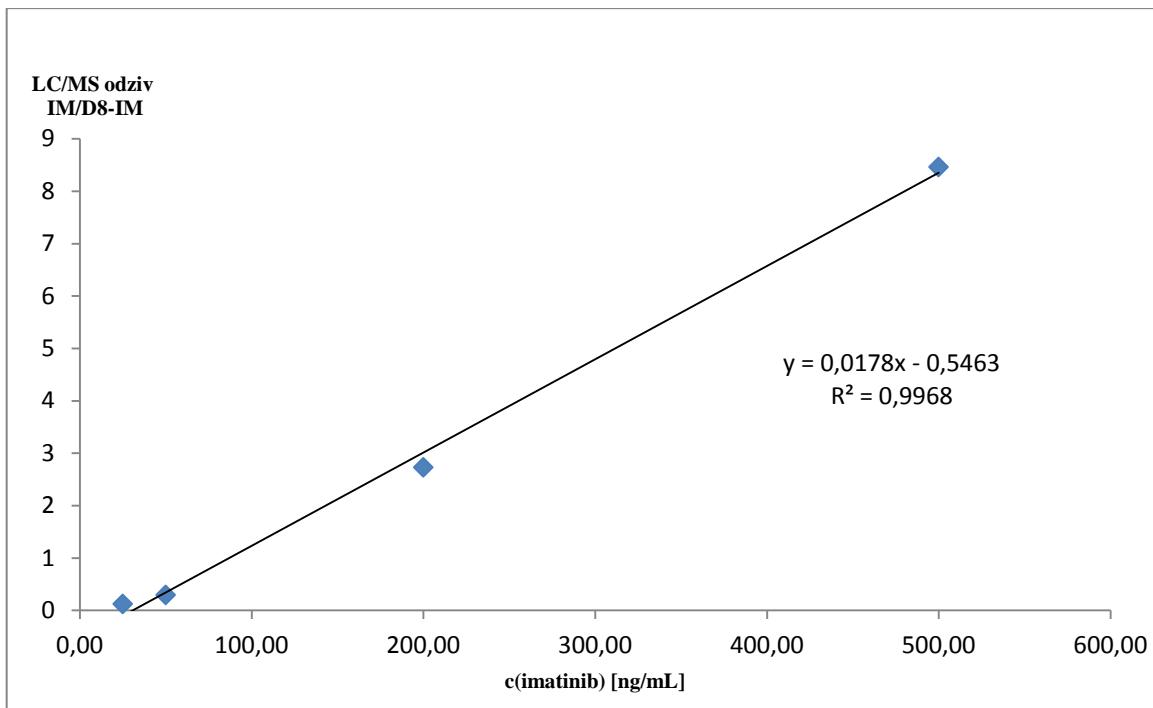
- d) **Rosuvastatin:** 20 mM raztopino ROS smo stokrat redčili, tako da smo 25 µL te raztopine do 2,5 mL dopolnili s celičnim lizatom. Dobljeno 200 µM raztopino ROS smo uporabili kot donorsko raztopino za standarde za pripravo umeritvene krivulje (Preglednica 3).

**Preglednica 3: Priprava umeritvene krivulje za rosuvastatin.**

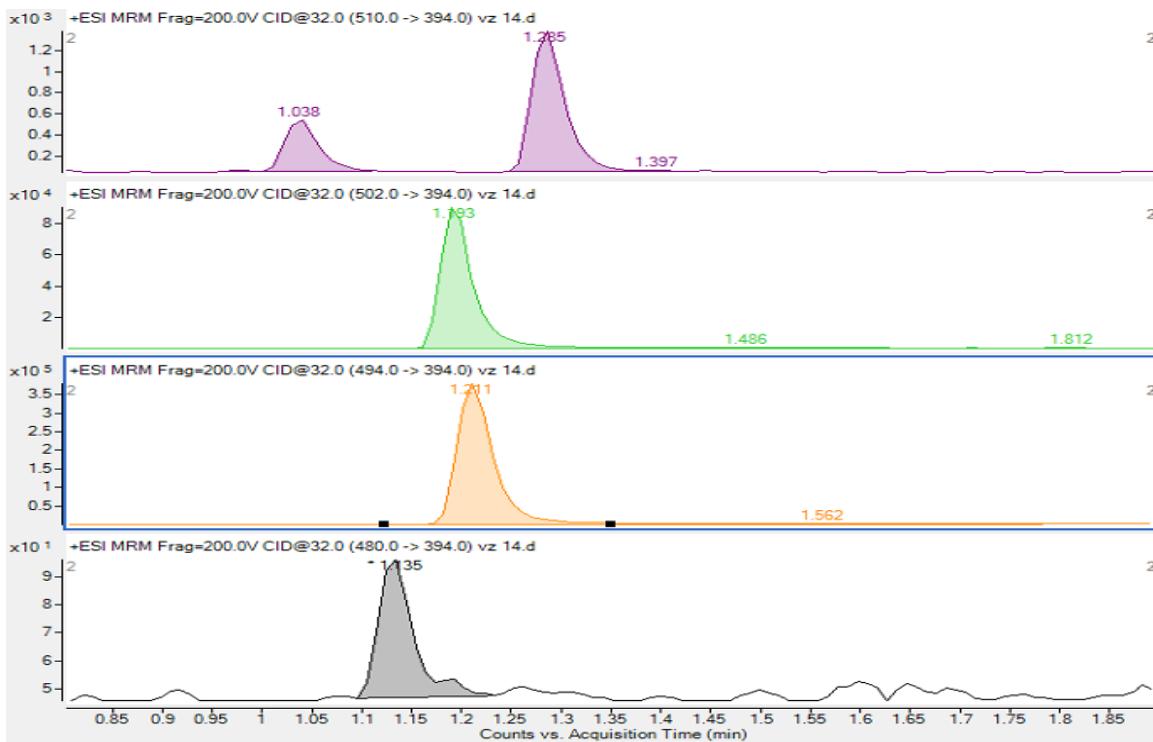
Delež donorske raztopine	c (µM)
0,1	20
0,02	4
0,004	0,8
0,001	0,2
0,0002	0,04

#### 4.9 MERJENJE NA HPLC/MS SISTEMU

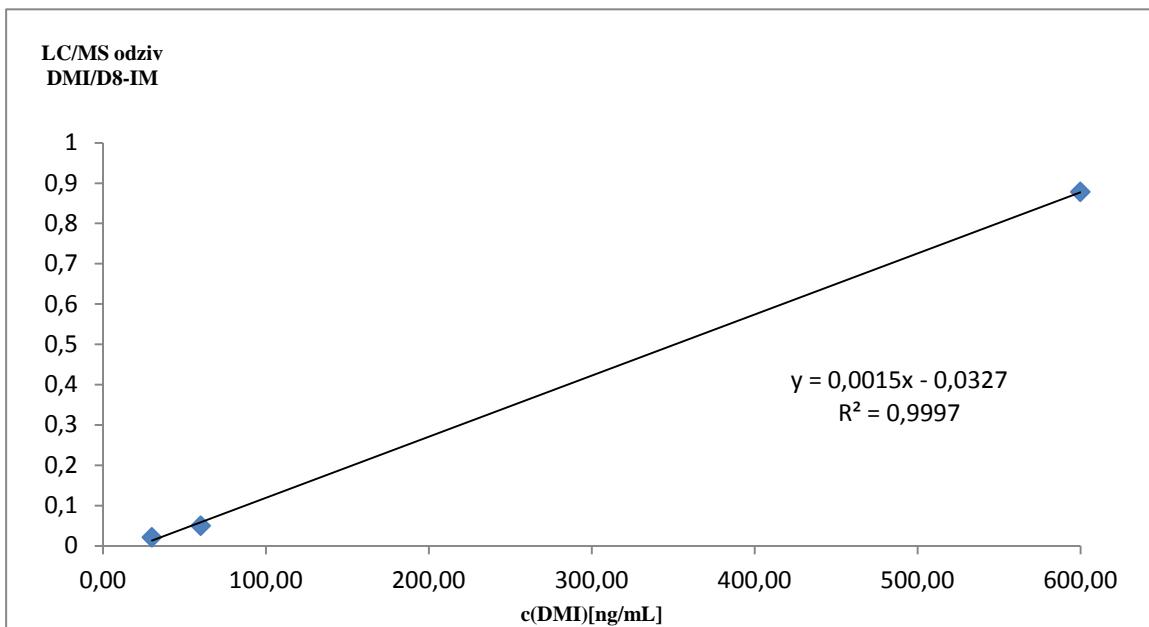
Za separacijo smo uporabili gradientno spiranje z mobilno fazo A (vodna faza), ki je vsebovala 0,1 % mravljične kisline v Milli-Q vodi in mobilno fazo B – organska faza: 100-odstotni acetonitril. Preglednica 4 predstavlja uporabljen linearni gradient. Temperatura kolone med analizo je bila 50 °C. Retencijski čas za imatinib in D8-imatinib je znašal 1,2 min (Slika 12), medtem ko je znašal čas celotne analize vključno z reekvilibracijo kolone 2,6 min. Uporabljen je bil ionski izvor JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije. Masni detektor je deloval v pozitivnem načinu multirezidualne analize (MRM), in sicer smo za kvantifikacijo imatiniba spremljali masni prehod  $m/z$  494,1 → 394,0, za kvantifikacijo D8-imatiniba pa  $m/z$  502 → 394, pri čemer je bila resolucija obeh kvadrupolov nastavljena na 2,5 enote. Čas vzorčenja je bil 80 ms. Parametri, kot so temperatura, tlak sušilnega in pomožnega plina ter energija za fragmentacijo, so bili optimizirani za kar največji možen signal imatiniba.



Slika 11: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo imatiniba v bioloških vzorcih.

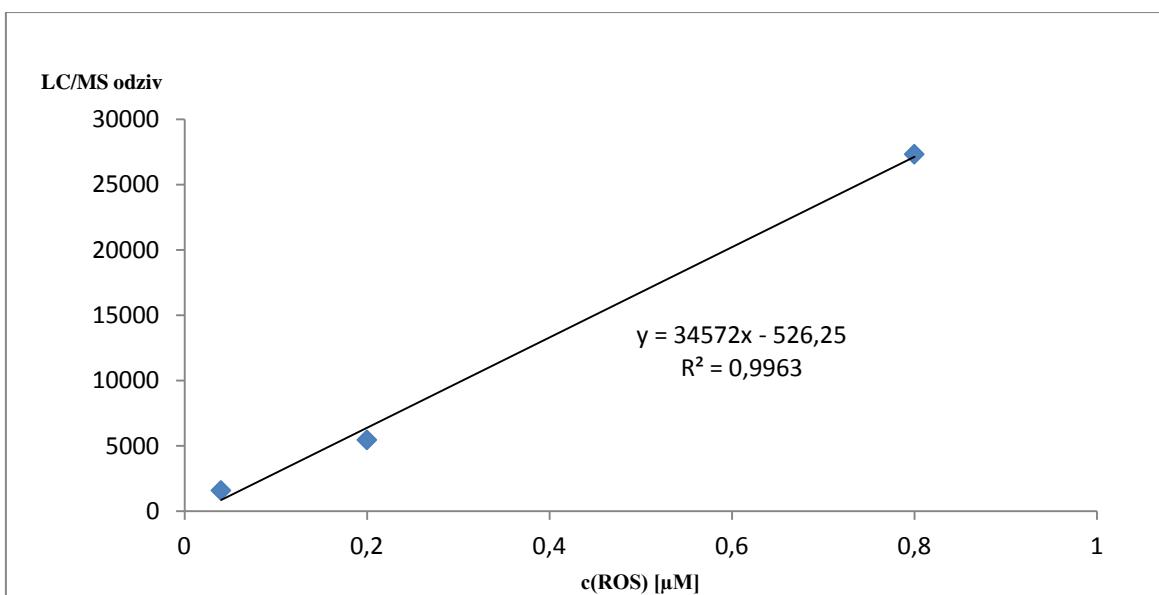


Slika 12: Masni kromatogram multirezidualne metode (MRM) vzorca akceptorske raztopine.

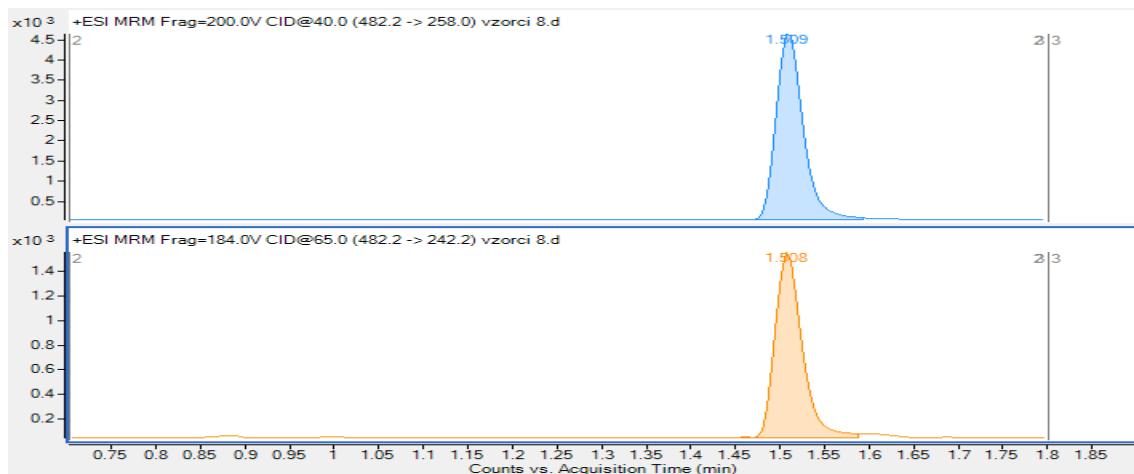


Slika 13: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo N-desmetil imatiniba v bioloških vzrocih.

Pri kvantifikaciji rosuvastatina smo spremljali masni prehod  $m/z$  482,2 → 258,0, pri čemer je bila resolucija obeh kvadrupolov nastavljena na 2,5 enote. Čas vzorčenja je bil 80 ms. Temperatura, tlak sušilnega in pomožnega plina ter energija za fragmentacijo so bili optimizirani za kar največji možen signal rosuvastatina. Retencijski čas rosuvastatina znaša 1,509 min (Slika 15).



Slika 14: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo rosuvastatina v bioloških vzorcih.



Slika 15: Masni kromatogram multirezidualne metode (MRM) vzorca akceptorske raztopine.

Preglednica 4: Program gradientnega spiranja na koloni po injiciranju vzorca

Čas od začetka injiciranja (min)	Delež mobilne faze B (%)	Pretok (mL/min)
0,25	10	0,8
0,5	20	0,65
1	30	0,65
1,25	50	0,65
1,7	50	0,65
1,75	10	0,65

## 5. EKSPERIMENTALNI DEL

### 5.1 VPLIV INKUBACIJSKIH POGOJEV NA PRIVZEM IMATINIBA V CELICE K-562

#### 5.1.1 Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba

Pri preverjanju vpliva inkubacijske površine ob istem volumnu smo inkubirali 2,5 milijona celic v 1 mL 2  $\mu\text{M}$  inkubacijske raztopine imatiniba. Površine inkubacijskih lukenj so bile 1,9  $\text{cm}^2$  (plošča s 24 luknjami), 3,8  $\text{cm}^2$  (plošča z 12 luknjami) in 9,5  $\text{cm}^2$  (plošča s 6 luknjami). Za boljši rezultat smo vsako meritev dobili na podlagi treh vzporednih paralelk, pri čemer ni bilo razlik med posameznimi vzporednimi poskusi.

#### 5.1.2 Vpliv temperature na privzem imatiniba

2,5 milijona celic smo inkubirali v 1 mL medija v plošči z dvanajstimi luknjami ter določili privzem imatiniba po inkubaciji v 2  $\mu\text{M}$  raztopini v hladilniku in v termostatu. Poskus smo izvedli v treh paralelkah, pri čemer znotraj posameznega poskusa ni bilo razlik v koncentraciji imatiniba in koncentraciji celic.

#### 5.1.3 Povezava med koncentracijo proteinov, koncentracijo celic in koncentracijo imatiniba v inkubacijski zmesi

Želeli smo preveriti povezavo med znotrajcelično koncentracijo IM in števolum celic (a) ter povezavo koncentracije proteinov s številom celic (b). Njun odnos pa smo želeli potrditi z meritvijo znotrajcelične koncentracije IM v odvisnosti od koncentracije proteinov (c). Najprej smo inkubirali 60 milijonov celic v 100 ml 2  $\mu\text{M}$  raztopine imatiniba. Po tem smo suspenzijo centrifugirali, medij odlili, resuspendirali s PBS in združili v 15 mL falkonko ter v njej dopolnili do 10 mL s PBS. Iz suspenzije smo takoj po resuspendiranju v epice prenesli po tri paralelke različnega števila celic ( $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  in  $8 \times 10^6$  celic). To smo nato centrifugirali v hladni centrifugi, medij odlili in celicam dodali 200  $\mu\text{L}$  PBS. Sledila je liza celic (šest paralelk vzorcev za posamezno število celic). V celičnem lizatu smo določili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu. V luknje na mikrotitrski plošči smo pipetirali 10  $\mu\text{L}$  vzorca, nato smo dodali 200  $\mu\text{L}$  Coomassie blue

barvila. Ploščo smo inkubirali v temi 30 minut pri temperaturi 37 °C in nato pomerili absorbanco na spektrofotometru pri 595 nm. Iz preostalega vzorca smo ekstrahirali IM in izmerili njegovo koncentracijo, kot je opisano v postopku 4.6. Linearno odvisnost med vsemi tremi parametri (število celic – koncentracija proteinov – koncentracija imatiniba) smo želeli preveriti še s tretjim poskusom (c). V 3 mL 2 µM raztopine IM smo inkubirali po 3 paralelke petih različnih koncentracij celic, in sicer  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  in  $8 \times 10^6$  celic/3mL. Sledila je liza celic in ekstrakcija IM, kot je opisano v postopku 4.6.

## 5.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH POSTOPKOV CELIČNIH IZOLACIJ

### 5.2.1 Zaporedno določanje koncentracije proteinov po posameznih izolacijskih stopnjah

V poskusu smo želeli ugotoviti, kako delovni postopek 4.3.1 vpliva na koncentracijo celic v vzorcu. Na osnovi predhodno prikazane korelacije smo sklepali, da je absorbanca zaradi proteinov prenosorazmerna koncentraciji celic v vzorcu. 2,5 milijona celic K-562 smo izpostavili pogojem, ki so enaki kot med delovnim postopkom 4.3.1. Sprva smo jih inkubirali v 2 µM raztopini imatiniba. Po dveh urah inkubacije smo jih ločili od inkubacijskega medija prek fikola, jih spirali s PBS, dodali pufer za lizo eritrocitov in jih še drugič spirali s PBS. Absorbanco smo merili zaporedno: po vsaki stopnji izolacije smo vzeli vzorec celic, ki smo ga lizirali s tekočim dušikom, celičnemu lizatu pa smo na spektrofotometru pri valovni dolžini 560 nm izmerili absorbanco. Za večjo zanesljivost poskusa smo vsako meritev izvedli v treh paralelkah.

### 5.2.2 Vpliv izolacije prek fikola na znotrajcelični upad imatiniba

V poskusu smo želeli preveriti, kako delovni postopek 4.3.1 vpliva na določeno znotrajcelično koncentracijo imatiniba v vzorcu. Celice K-562 smo izpostavili pogojem, ki so enaki kot med delovnim postopkom 4.3.1. Sprva smo 24 milijonov celic inkubirali v 50 mL 2 µM raztopine IM. Po dveh urah inkubacije smo jih z inkubacijskim medijem pipetirali na fikol, jih po ločitvi prek fikola pobrali, spirali s PBS, jim dodali pufer za lizo eritrocitov in jih še drugič spirali s PBS. Po vsaki stopnji izolacije smo vzeli del celic (2,5 milijona v treh paralelkah), jih sprali 2-krat s PBS, nato pa jih lizirali s tekočim dušikom in določili znotrajcelično koncentracijo učinkovine. Za večjo zanesljivost poskusa smo vsako meritev izvedli v treh paralelkah.

### 5.2.3 Določitev kritične stopnje izolacije celic za upad znotrajcelične koncentracije imatiniba

V tem poskusu smo preverjali, kako različne stopnje izolacije vplivajo na upad znotrajcelične koncentracije imatiniba med izolacijo granulocitov. Tri milijone celične linije K-562 smo najprej dve uri inkubirali v 5 mL 2 µM raztopine IM. Nato smo inkubirane celice izpostavili medijem, ki jih uporabljamo pri izolaciji, tako da smo inkubacijsko zmes iz posameznega polja prenesli v svojo centrifugirko in dopolnili do 14 mL s štirimi različnimi mediji: s fikolom (1), s pufrom za lizo eritrocitov (2,3), s PBS sobne temperature (4,5) in s hladnim PBS (4–8 °C) (6). V pufru za lizo eritrocitov in toplem PBS smo celice inkubirali enkrat oziroma dvakrat. Tako smo dobili šest različnih vzporednih poskusov. Za večjo zanesljivost poskusa smo vsako meritev izvedli na treh paralelkah.

### 5.2.4 Izolacija s histopaque medijem

Celice smo izolirali, kot je opisano v postopku 4.3.3. Celice smo nato prešteli in jih inkubirali v koncentraciji 1,5 milijona/2,5mL RPMI medija z imatinibom ob prisotnosti oz. odsotnosti prazosina. Inkubacija je potekala dve uri, po njej pa smo celice spirali in iz njih ekstrahirali IM ter izmerili njegovo znotrajcelično koncentracijo, kot je opisano v postopku 4.6. Poskus smo izvedli na celicah enega prostovoljca.

### 5.2.5 Primerjava različnih postopkov izolacije levkocitov iz polne krvi prostovoljca in njihovega vpliva na privzem imatiniba v celice

V poskusu smo želeli preveriti, kakšne so razlike v privzemu IM med mononuklearnimi celicami in granulociti, pridobljenimi po različnih postopkih izolacije. Posebej smo se osredotočili na razlike po inkubaciji med različno izoliranimi granulociti. Iz 5 mL krvi prostovoljke smo na fikolu ločili MNC in po nadaljnji lizi eritrocitov izolirali še GRA, kot je opisano v postopkih 4.3.1 in 4.3.2. Vzporedno smo iz drugih 5 mL krvi na magnetni koloni izolirali granulocite, tako kot je opisano v postopku 4.3.2. Po 1,5 milijona celic smo inkubirali v 2,5 mL hranilnega medija z 2 µM IM ob prisotnosti 100 µM prazosina oz. brez prazosina. Inkubacija je potekala dve uri, po njej pa smo celične vzorce dvakrat sprali s

PBS, jih lizirali in iz vzorcev ekstrahirali ter izmerili koncentracijo IM, kot je opisano v postopku 4.6.

### **5.2.6 Primerjava kinetike izgubljanja učinkovine pri toplem in hladnem spiranju**

V naslednjem poskusu smo želeli preveriti, kako hitro se imatinib izgublja iz celic, medtem ko celična suspenzija stoji v PBS. Pri tem smo po enakem postopku izvedli dva različna poskusa, in sicer s hladnim PBS in s PBS sobne temperature. 24 milijonov celic K-562 smo dve uri inkubirali v dveh vsebnikih s 50 mL 2  $\mu$ M raztopine imatiniba. Po inkubaciji smo jih prenesli v 50 mL centrifugirko, ju centrifugirali pri 800 obratih/min, supernatant odstranili ter resuspendirali v 50 mL PBS. Ob določenih časovnih točkah, to je ob času 0, 3, 6, 15, 30, 45, 60, 90 in 120 min, smo jemali vzorce v alikvotih po 1,8 mL, tako da smo zajeli približno 3 milijone celic. Celice smo odcentrifugirali, jih lizirali in določili znotrajcelično koncentracijo v določenih časovnih točkah.

## **5.3 PRISOTNOST IN AKTIVNOST PRENAŠALCEV OCT-1, P-gp IN BCRP**

### **5.3.1 Vpliv temperature in prisotnosti oz. odsotnosti prazosina na privzem imatiniba in N-desmetil imatiniba v celice K-562**

Poskusili smo z inkubacijo 1,5 milijona celic v 2,5 ml medija z RPMI. Naredili smo osem vrst inkubacij glede na inkubacijski prostor in inkubacijsko zmes. Celice smo inkubirali ali samo z imatinibom oziroma N-desmetil imatinibom ali pa smo obema učinkovinama dodali še prazosin kot specifični inhibitor OCT-1. Poskus smo izvedli v šestih paralelkah. Vse štiri tipe inkubacij smo vzporedno naredili v hladilniku in v termostatu (pri 37 °C). Inkubirane celice smo nato dvakrat spirali s hladnim PBS, jih lizirali v tekočem dušiku ter ekstrahirali in izmerili IM oz. N-desmetil imatinib, kot je opisano v postopku 4.6.

### 5.3.2 Privzem imatiniba v granulocite in mononuklearne celice ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT-1 prazosina

Iz periferne krvi smo izolirali granulocite, kot je opisano v metodi 4.3.2, mononuklearne celice pa kot je opisano v metodi 4.3.1. 1,5 milijona celic smo z  $2 \mu\text{M}$  IM inkubirali v  $2,5 \text{ mL}$  hranilnega medija v treh paralelkah za posamezen tip inkubacije. Naredili smo štiri tipe inkubacij: inkubacija granulocitov s prisotnostjo prazosina oz. brez nje ter inkubacija mononuklearnih celic s prisotnostjo prazosina oz. brez nje. Prazosin je bil prisoten v koncentraciji  $100 \mu\text{M}$ . Vse tipe inkubacij smo izvedli na celicah štirih prostovoljnih darovalcev krvi – skupaj torej šestnajst različnih inkubacij. Celične vzorce smo po dveurni inkubaciji dvakrat sprali s PBS, jih lizirali in iz vzorcev ekstrahirali ter izmerili koncentracijo IM, kot je opisano v postopku 4.6.

### 5.3.3 Primerjava inhibicije privzema imatiniba z različnimi inkubacijskimi koncentracijami prazosina v celicah K-562

Želeli smo preveriti, kako se v celični liniji K-562 IUR IM spreminja s spremenjeno koncentracijo prazosina kot inhibitorja prenašalca OCT-1. Pričakovali smo, da se inhibicija prenosa prek OCT-1 prenašalca s koncentracijo PRA povečuje.

**Preglednica 5: Razmerja volumnov raztopin v petih standardih za pripravo inkubacijskih raztopin z različnimi koncentracijami prazosina**

$7,29\text{mM}$ prazosin	$0,583\text{mM}$ IM	$50\%$ etanol
0 mL	0,5mL	2mL
0,5 mL	0,5 mL	1,5 mL
1 mL	0,5 mL	1 mL
1,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
2 mL	0,5 mL	0 mL

Iz  $7,29 \text{ mM}$  prazosina ( $19,44 \text{ g}$  prazosin hidroklorida v  $6,35 \text{ mL}$  50-odstotnega etanola),  $5,83 \text{ mM}$  imatiniba in 50-odstotnega etanola smo pripravili pet različnih primarnih raztopin z različnimi volumskimi deleži vseh treh spojin (Preglednica 5).

$716 \mu\text{L}$  teh raztopin smo razredčili do  $2,5 \text{ mL}$  s 50-odstotnim etanolom, nato pa  $300 \mu\text{L}$  tega prenesli v  $5 \text{ mL}$  medija in tako dobili inkubacijske raztopine, ki smo jih uporabili pri poskusu. Koncentracija IM je bila torej konstantna –  $2 \mu\text{M}$ , medtem ko je bila

koncentracija prazosina različna – 100  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  in 0  $\mu\text{M}$ . Za boljši rezultat smo posamezen tip inkubacije izvedli v petih paralelkah. Vse inkubacijske vzorce smo prenesli v svoje centrifugirke in jih dvakrat sprali s hladnim PBS. Sledila je liza celic v tekočem dušiku in ekstrakcija imatiniba, kot je opisano v postopku 4.6.

#### 5.3.4 Primerjava inhibicije privzema imatiniba v granulocitih pri različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina

Izvedli smo poskus, opisan pod točko 5.1.10, le da smo celično linijo K-562 zamenjali z granulociti. Granulocite smo izolirali iz periferne krvi prostovoljca, kot je opisano v metodi 4.3.2. Koncentracijo učinkovine smo v nekaterih poskusih določili tudi v supernatantu. Po centrifugiranju prenešenega vzorca smo iz sredine supernatanta vzeli 250  $\mu\text{L}$  in ga pozneje izspostavili postopku, opisanem pod točko 4.6. Za bolj zanesljiv rezultat smo posamezno inkubacijo izvedli v treh paralelkah. Vse inkubacijske suspenzije smo po dveurni inkubaciji dvakrat sprali s PBS, jih lizirali in iz vzorcev ekstrahirali ter izmerili koncentracijo IM, kot je opisano v postopku 4.6.

#### 5.3.5 Določanje vezave imatiniba na celične proteine

S poskusom smo želeli preveriti, ali je mogoče tudi po inkubaciji mrtvih celic v prisotnosti raztopine imatiniba določiti kaj na celice vezanega IM. Pri tem smo predpostavljeni, da so zaradi celične smrti prenosalci za prenos IM v celoti inhibirani. Na ta način smo želeli določiti, kolikšen delež znotrajcelične koncentracije, ki jo izmerimo v posameznem vzorcu, lahko pripisemo učinkovini, vezani na celične proteine. Prvi del poskusa smo izvedli tako, da smo s tekočim dušikom oz. z natrijevim azidom povzročili smrt celic, ki smo jih nato dve uri inkubirali v 2  $\mu\text{M}$  raztopini IM. Celični lizat smo po dveurni inkubaciji dvakrat sprali s PBS in iz vzorcev naredili ekstrakcijo in meritev IM, kot je opisano v postopku 4.6. Rezultat smo dobili le pri celicah, pri katerih smo celično smrt povzročili z azidom, saj smo le pri teh po inkubaciji dobili zadostno količino oborine za ekstrakcijo imatiniba. Natrijev azid je znan induktor celične smrti, čeprav mehanizem, ki privede do nje, še ni povsem raziskan [31]. Glavna razlika med obema metodama za povzročanje celične smrti je morfologija celic po izpostavitvi celičnega vzorca eni izmed obeh metod. Pri liziranju s tekočim dušikom (izmenično zamrzovanje celičnega vzorca v tekočem dušiku in odtaljevanje v vroči vodi – 4.6) celice počijo zaradi tvorjenja ledenih

kristalčkov med celičnimi strukturami. Pri povzročitvi celične smrti z natrijevim azidom pa celica v času trajanja poskusa ne lizira - ostane cela in morfološko prepoznavna. Za glavni del poskusa se nam je zaradi pridobitve večje količine oborine zdelo primernejše, da za povzročitev celične smrti uporabimo natrijev azid. Poskus smo izvedli tako, da smo z natrijevim azidom povzročili smrt celic in jih inkubirali bodisi v raztopini IM ( $2 \mu\text{M}$ ) bodisi v inkubacijski raztopini mešanice IM ( $c = 2 \mu\text{M}$ ) in PR ( $c = 100 \mu\text{M}$ ). Vzporedno smo z obema inkubacijskima raztopinama inkubirali enako koncentracijo (1,5 milijona celic/2,5 ml medija) živih celic. Celični lizat/žive celice smo po dveurni inkubaciji dvakrat sprali s hladnim PBS in iz vzorcev naredili ekstrakcijo in meritve IM, kot je opisano v postopku 4.6.

### 5.3.6 Aktivnost P-gp prenašalca v celični liniji K-562

PSC 833 je specifični inhibitor P-gp prenašalca . Ta je znan kot najpomembnejši prenašalec za odstranjevanje IM iz celice. Njegovo čezmerno izražanje naj bi bilo odgovorno za rezistenco celic proti učinkovini, saj z njenim črpanjem v zunanjost celice preprečuje, da bi učinkovina lahko dosegla svoj učinek [19]. Zato smo želeli preveriti prisotnost in aktivnost P-gp v celični liniji K-562, tako da smo opazovali vpliv inhibitorja P-gp na transport znanega substrata (rodamina123) tega prenašalca. Za boljši rezultat smo posamezno inkubacijo izvedli v šestih paralelkah, in sicer 1,5 milijona celic v 2,5 mL inkubacijskega medija ( $c(\text{RHO}) = 2 \mu\text{M}$ ,  $c(\text{PSC 833}) = 10 \mu\text{M}$ ). Sledilo je dvakratno spiranje s hladnim PBS, liza celic v tekočem dušiku.  $50 \mu\text{L}$  resuspendiranega celičnega lizata smo prenesli v mikrotitrski plošče in jim dodali  $150 \mu\text{L}$  0,1 M HCl. Tem vzorcem smo pomerili fluorescenco pri valovni dolžini 534 nm.

Vzporedno smo določali privzem rodamina v mrtve celice. Celično smrt smo povzročili z lizo ali z dodatkom natrijevega azida v inkubacijsko zmes. Celični lizat smo po inkubaciji dvakrat sprali s PBS, kot je opisano v postopku 4.3.1.  $50 \mu\text{L}$  celičnega lizata smo dodali  $150 \mu\text{L}$  0,1 M HCl v mikrotitrski plošči ter vzorcem pomerili fluorescenco pri valovni dolžini 534 nm. Za večjo zanesljivost poskusa smo meritve izvedli v šestih paralelkah za vsakega od obeh tipov povzročitve celične smrti.

Vlogo P-gp prenašalca v celični liniji K-562 smo se odločili preveriti tudi z inkubacijo z imatinibom in PSC 833, inhibitorjem P-gp. Za boljši rezultat smo poskus izvedli v šestih

paralelkah za posamezen tip inkubacije, in sicer 1,5 milijona celic v 2,5 mL inkubacijskega medija ( $c(IM) = 2 \mu M$ ,  $c(PSC\ 833) = 10 \mu M$ ). Vzorce brez PSC smo inkubirali v šestih paralelkah po 1,5 milijona celic v 2,5 mL RPMI (2  $\mu M$  inkubacijske raztopine IM). Sledilo je dvakratno spiranje s hladnim PBS, liza celic v tekočem dušiku ter ekstrakcija in meritev IM, kot je opisano v postopku 4.6.

### 5.3.7 Povezava med koncentracijo rosuvastatina v inkubacijski zmesi in privzemom

S tem poskusom smo želeli preveriti prisotnost in aktivnost BCRP prenašalca. Pri tem smo celice inkubirali v raztopini znanega substrata BCRP rosuvastatina (ROS), ki smo ji pozneje dodali še specifični inhibitor BCRP Ko134. V študijah je dokazano, da je prenos imatinibja v celico v veliki meri odvisen prav od izražanja BCRP prenašalca na membranah rakavih celic [32]. Istočasno smo želeli ugotoviti še, kako koncentracija rosuvastatina v inkubacijski raztopini vpliva na privzem ROS v celico, in poiskati primerno inkubacijsko koncentracijo ROS za nadaljnje poskuse. V epicah smo pripravili dva koncentrata, in sicer 20 mM in 10 mM ROS (9,63 mg oz. 4,82 mg ROS v 1 ml topila – etanol : DMSO = 50 : 50).

50  $\mu L$  vsake od obeh raztopin smo inkubirali z RPMI in 3 milijoni celic, tako da smo dobili skupni  $V = 5 \text{ mL}$  in skupno inkubacijsko koncentracijo ROS 100  $\mu M$  oz. 200  $\mu M$ . Po inkubaciji smo inkubacijske vzorce trikrat sprali s hladnim PBS. Temu je sledila liza celic v tekočem dušiku in ekstrakcija, kot je opisano v postopku 4.7. Poskus smo izvedli v šestih paralelkah za vsako od obeh koncentracij ROS.

### 5.3.8 Aktivnost BCRP prenašalca v celični liniji K-562

- a) V prvem poskusu smo tri milijone celic inkubirali z 200  $\mu M$  inkubacijsko raztopino ROS ter z 200  $\mu M$  raztopino ROS ob prisotnosti Ko134 ( $c = 5 \mu M$ ). Po dveurni inkubaciji smo inkubacijske vzorce trikrat sprali s hladnim PBS, čemur je sledila liza celic v tekočem dušiku in ekstrakcija, kot je opisano v postopku 4.7.
- b) Drugi poskus je bil sestavljen iz inkubacije z 2  $\mu M$  raztopino IM in iz inkubacije z 2  $\mu M$  raztopino IM ob prisotnosti Ko134 ( $c = 5 \mu M$ ). Po dveurni inkubaciji smo celice trikrat

sprali s PBS, jih lizirali in iz vzorcev ekstrahirali ter izmerili IM, kot je opisano v postopku 4.6. Pri vsaki od inkubacij smo izvedli poskus v šestih paralelkah.

## 5.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultati poskusov v poglavju 6 so predstavljeni s povprečno vrednostjo - AS in standardno napako povprečja – SEM (AS  $\pm$  SEM).

Podatke pridobljene z meritvami smo statistično ovrednotili v programu Microsoft Excel 2007. Predvsem nas je zanimalo, ali so razlike med posameznimi tipi inkubacij statistično značilne. Podatke smo vrednotili s F-testom, Studentovim t-testom ter z razmerji vrednosti med primerjanimi meritvami. S F-testom smo preverjali morebitno razliko v varianci med posameznimi inkubacijami, s t-testom pa smo preverjali, če so razlike v znotrajceličnih koncentracijah statistično značilne. Uporabljen kriterij za značilnost razlike je bil  $p<0,05$  ( $\alpha=0,05$ ). Statistično analizo smo izvedli pri poskusih, kjer smo za posamezno meritev rezultat pridobili na podlagi treh paralelk ali več.

Za statistično vrednotenje smo postavili hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin znotrajceličnih koncentracij imatiniba - c(IM) ali drugih preiskovanih parametrov.

$$H_0: c(IM)_1 = c(IM)_2$$

$$H_1: c(IM)_1 \neq c(IM)_2$$

Kateri tip t-testa uporabiti, smo se odločili po opravljenem F-testu, ki nam pove, ali se varianci med dvema skupinama vzorcev razlikujeta. Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da se varianci dveh skupin vzorcev ne razlikujeta in alternativno hipotezo, ki pravi, da se varianci razlikujeta. Variance so bile izračunane po enačbi 1, F test pa je bil izведен po enačbi 2. Pri tem  $s^2$  predstavlja varianco,  $x_i$  posamezno meritev in  $n$  velikost vzorca.

Enačba 1:

\_\_\_\_\_

Enačba 2:

—

Če je bil eksperimentalni F ( $F_{exp}$ ) manjši od tabelaričnega F ( $F_{tab}$ ) oziroma je bila izračunana verjetnost p večja od kriterija  $\alpha=0,05$ , ničelne hipoteze nismo zavrnili. Privzeli

smo, da sta varianci enaki. V tem primeru smo za ugotavljanje enakosti aritmetičnih sredin s uporabili Studentov t-test za enake variance in uporabili enačbo 3:

Enačba 3:  $\overline{\quad}$   $\overline{\quad}$

Če smo ugotovili, da je  $F_{\text{exp}}$  večji od  $F_{\text{tab}}$  in je  $p < \alpha$ , smo ničelno hipotezo zavrnili in privzeli, da sta varianci različni. V tem primeru smo uporabili Studentov t-test za različne variance in računali po enačbi 4. Pri enačbah 2, 3 in 4 sta m in n velikosti vzorcev x in y, in njuni varianci, in pa sta povprečji vzorcev.

Enačba 4:  $\overline{\quad}$

$\overline{\quad}$   $\overline{\quad}$

V primeru, da je bil  $t_{\text{exp}}$  manjši od  $t_{\text{tab}}$  in  $p > \alpha$ , smo ničelno hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin sprejeli in s tem ugotovili, da se povprečja meritev med preiskovanimi poskusi ne razlikujejo značilno. Na drugi strani smo razlike med rezultati meritev lahko potrdili, kadar je bila izračunana verjetnost manjša od  $\alpha$ , kar pomeni, da je bil  $t_{\text{exp}}$  večji od  $t_{\text{tab}}$ .

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 6.1 VPLIV INKUBACIJSKIH POGOJEV NA PRIVZEM IMATINIBA V CELICE K-562

#### 6.1.1 Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba

Preglednica 6: Vpliv inkubacijske površine na privzem imatiniba.

Število lukanj v plošči	Površina lukanje	c(IM)/200 000 celic [ng]		Sig.	
		AS	SEM		
6	9,5 cm <sup>2</sup>	6,8	0,6	0,311	Nsign.
12	3,8 cm <sup>2</sup>	5,6	0,4	0,123	Nsign.
24	1,9 cm <sup>2</sup>	6,6	0,1	0,726	Nsign.

Iz rezultatov (Preglednica 6) je razvidno, da med posameznimi ploščami ne obstajajo signifikantne razlike v privzemu IM ( $p>0,05$ ), zato smo v naslednjih poskusih lahko uporabljali vse tri tipe inkubacijskih plošč. To smo izbrali glede na količino celic, ki smo jih želeli inkubirati v inkubacijskem mediju, pri čemer je bila koncentracija celic vedno 600 000 celic/1 mL medija.

#### 6.1.2 Vpliv temperature na privzem imatiniba

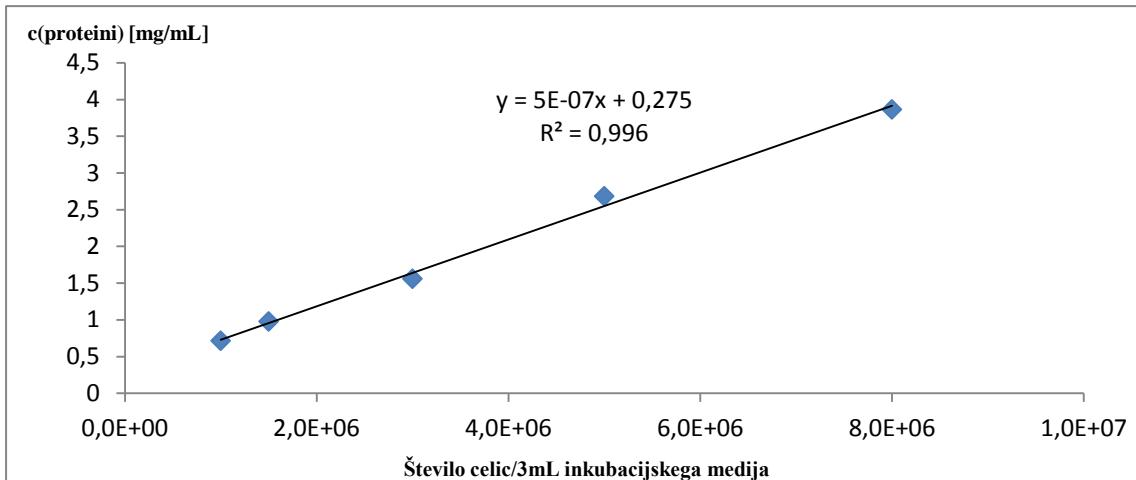
Preglednica 7: Vpliv temperature med inkubacijo na privzem imatiniba.

Tip inkubacije	c(IM)/[ng/200 000 celic]		t-test	
	AS	SEM		
Inkubacija v termostatu	5,4	0,2		
Inkubacija v hladilniku	3,0	0,3	0,024	Sign.

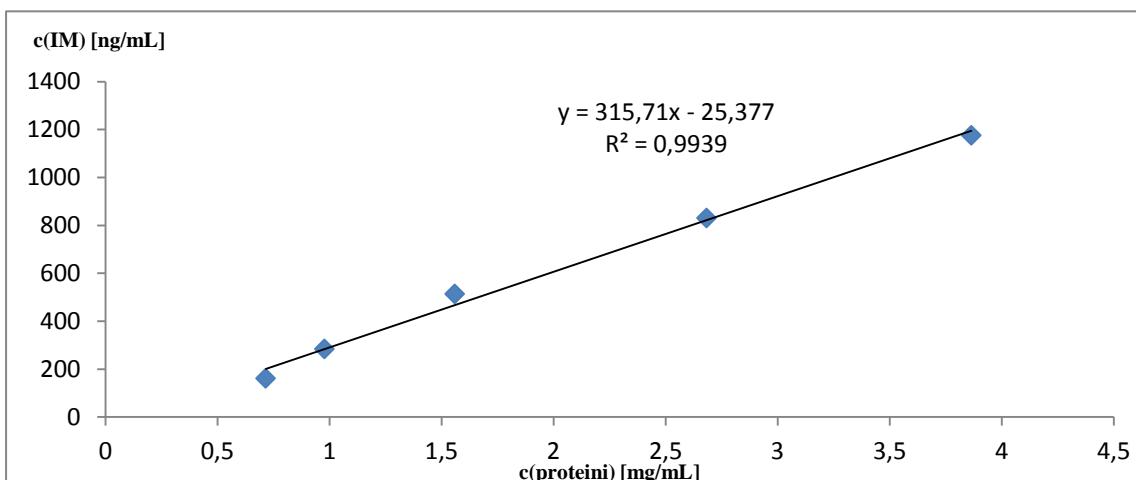
(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM znotrajceličnih koncentracij imatiniba po inkubaciji v termostatu in hladilniku. Na desni strani je predstavljena statistična razlika – p med obema inkubacijama).

V poskusu smo želeli preveriti, kakšne so razlike v privzemu imatiniba med inkubacijo v hladilniku in termostatu. Iz rezultatov (Preglednica 7) je razvidno, da je transport imatiniba v celico v našem primeru potekal v 1,8-krat večjem obsegu pri višji temperaturi (37°C) kot pri nižji (8°C) -  $p < 0,05$ . Verjeten vzrok za to je predvsem višja aktivnost prenašalcev pri višji temperaturi in deloma večja mobilnost molekul učinkovine.

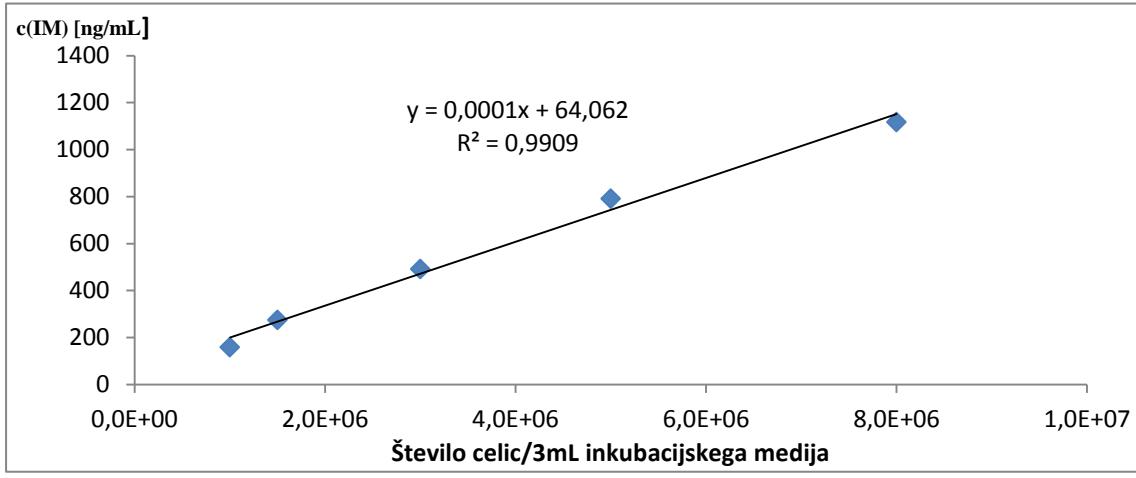
### 6.1.3 Povezava med koncentracijo proteinov, koncentracijo celic in koncentracijo imatiniba v inkubacijski zmesi



Slika 16: Koncentracija proteinov v odvisnosti od števila celic.



Slika 18: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od koncentracije proteinov.



Slika 17: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od števila celic.

Dokazali smo, da koncentracija proteinov narašča sorazmerno s koncentracijo celic (številom celic v konstantnem inkubacijskem volumnu - 3mL, Slika 16). Koncentracijo proteinov pri poskusu a) smo izračunali iz umeritvene krivulje za proteine:  $y = 0,3939 \cdot x(\text{ng/mL}) + 0,132; R^2 = 0,9976$

Dokazali smo, da na relativni privzem imatiniba ne vpliva število celic/koncentracija proteinov, saj koncentracija imatiniba narašča sorazmerno s številom celic/koncentracijo proteinov (Slika 16, Slika 18). Koncentracijo IM pri poskusu b) smo izračunali iz umeritvene krivulje za IM:  $y = 0,0168 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,435; R^2 = 0,9978$

Glede na premosorazmerne odnose med preiskovanimi parametri v poskusih a) in b) smo pred tretjim poskusom sklepali, da bo v celični liniji K-562 koncentracija IM premosorazmerna s koncentracijo celic v inkubacijskem polju. Dokazali smo, da privzem IM v celico ni odvisen od števila celic v območju od  $1 \times 10^6 - 8 \times 10^6$  celic. Če primerjamo koncentracije IM/200 000 celic pri inkubaciji posamezne koncentracije celic (Preglednica 8) vidimo, da znotrajcelična koncentracija IM v večini primerov ni odvisna od koncentracije celic. Pri primerjavi koncentracijske vrednosti IM med meritvami ne obstajajo signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Morebitnih razlik v rezultatih meritev v vzorcih z 8 milijoni celic z ostalimi inkubacijskimi vzorci nismo preverjali, saj nam je začetno število celic dopuščalo izvesti inkubacijo 8 milijonov celic samo v dveh paralelkah, kar ne zadostuje za preverjanje s statističnimi testi. Razlike v rezultatih so majhne in jih glede na nesorazmernost v primerjavi s koncentracijo celic težko pripisemo različnim koncentracijam celic v inkubacijski zmesi.

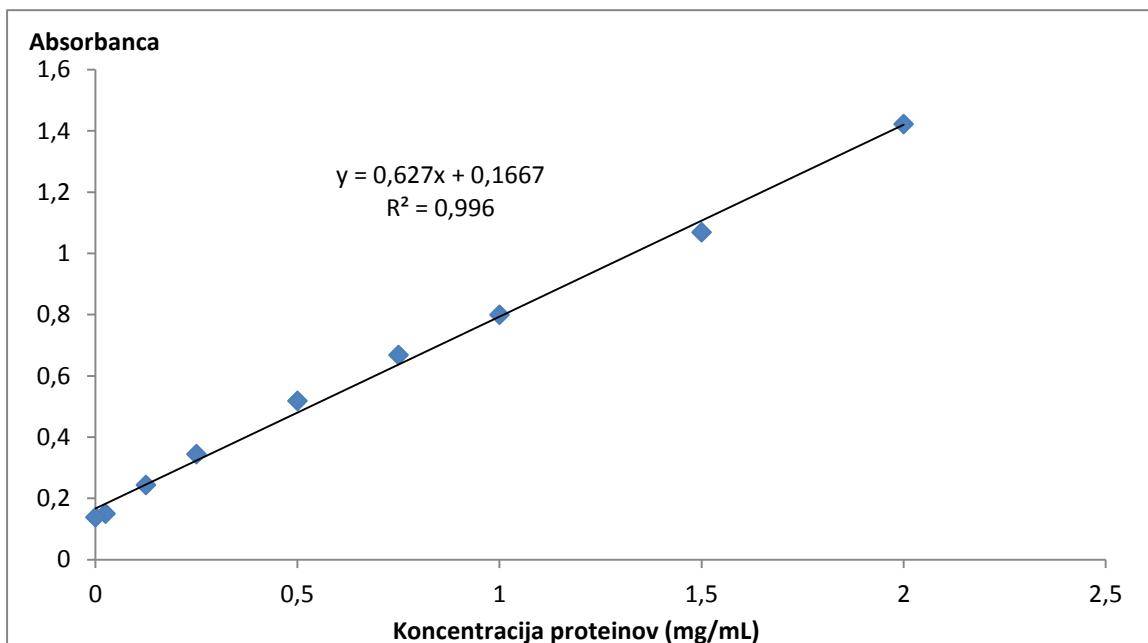
**Preglednica 8: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od števila celic v inkubacijski zmesi.**

Število celic/3mL	c(IM) [ng/200 000 celic]	
	AS	SEM
$1 \times 10^6$	7,9	0,6
$1,5 \times 10^6$	9,2	0,1
$3 \times 10^6$	8,2	0,2
$5 \times 10^6$	7,6	0,3
$8 \times 10^6$	7,0	0,1

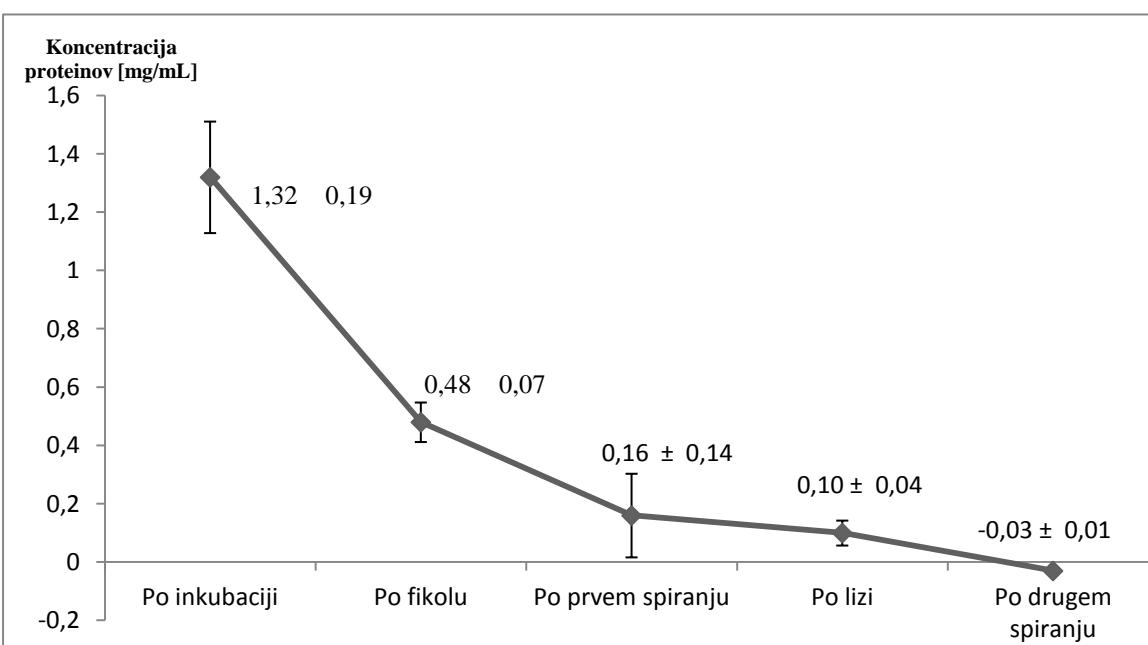
Koncentracijo IM pri poskusu c) smo izračunali iz umeritvene krivulje za IM:  
 $y = 0,0178 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,5463; R^2 = 0,9968$

## 6.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH POSTOPKOV CELIČNIH IZOLACIJ

### 6.2.1 Določanje koncentracije proteinov po posameznih izolacijskih stopnjah



Slika 19: Umeritvena krivulja za proteine.

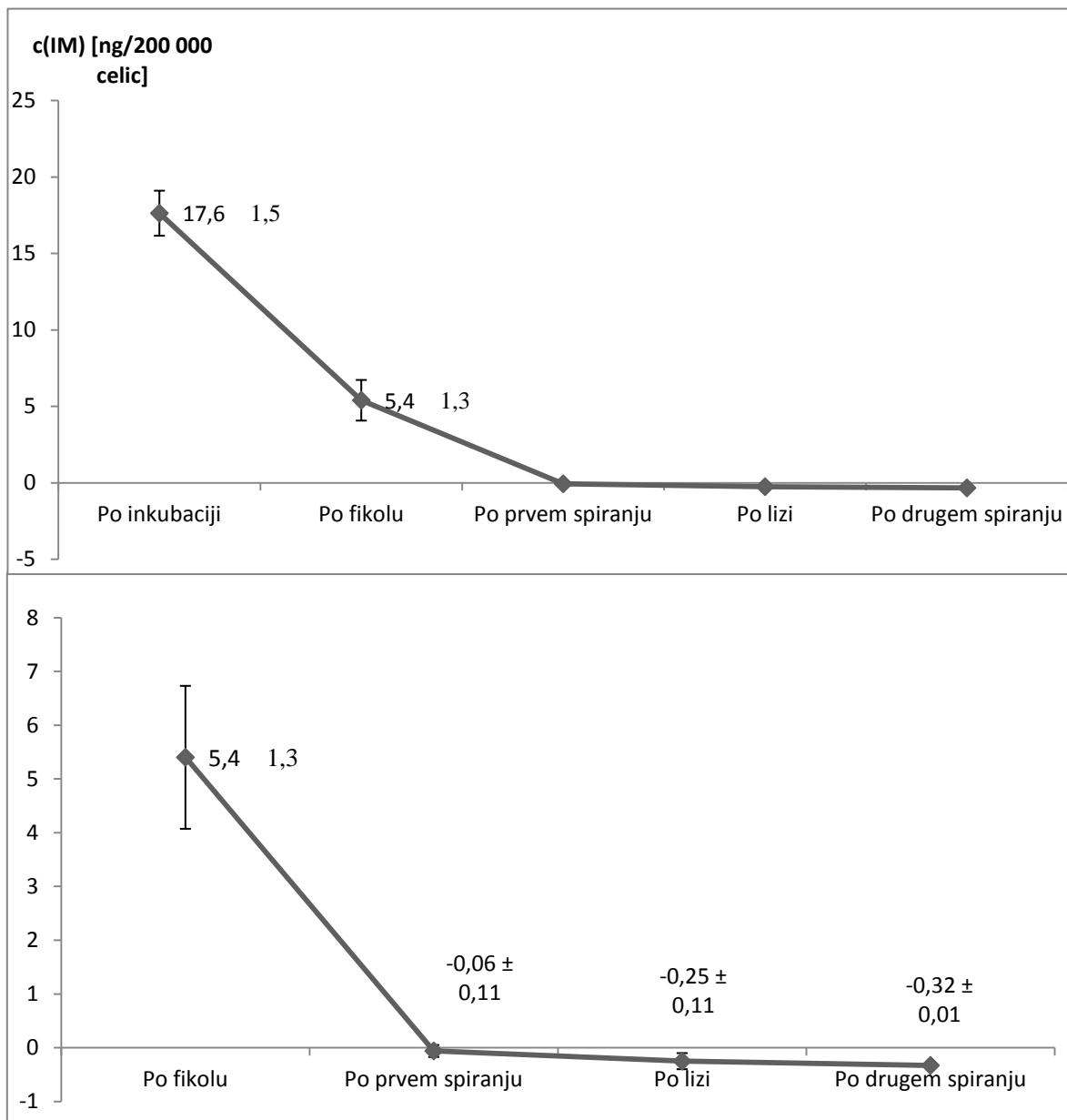


Slika 20: Vpliv izolacije na koncentracijo proteinov v vzorcu.

Rezultat (Slika 20) kaže na to, da imamo po inkubaciji v mediju razmeroma visoko koncentracijo proteinov (1.323 mg/mL), ki je posledica velikega števila celic K-562. Očitno je kritična točka izolacije je ločevanje celic preko fikola, ko koncentracija proteinov pade za več kot 60% (0,475 mg/mL). Po nadaljevanju izolacije se je izkazalo, da je delovni postopek 4.3.1. (postopek ločitve celic preko fikola) neprimeren, saj padec absorbance pri merjenju koncentracije proteinov pade pod mejo določljivosti. Slednje kaže na to, da v postopku izgubimo praktično vse celice, in zatorej morebitni dobljeni rezultati privzema imatiniba ne morejo biti uporabni.

### 6.2.2 Vpliv izolacije preko fikola na znotrajcelični upad imatiniba

Grafični rezultat (Slika 21), kaže na to, da se IM iz vzorca izgublja po podobni kinetiki kot proteini v predhodnem poskusu. Koncentracija IM po inkubaciji je bila 17,6 ng/200 000 celic, po ločevanju celic preko fikola pa je drastično upadla (5,4 ng/200 000) celic. Po nadalnjem postopku se IM še naprej izgublja iz celic, že po prvem spiranju pa ta vrednost pade pod mejo določljivosti. Menimo, da je upad vsebnosti IM v veliki meri posledica izgub celic med postopkom, kar smo dokazali z upadom koncentracije proteinov v celičnem lizatu. Ker pa so celice glede na vrednosti absorbanc v poskusu 6.1.3 še prisotne tudi po prvem spiranju, je očitno, da se imatinib izgublja tudi po drugi poti. Sklepamo, da je za dodatno izgubljanje odgovorno izpostavljanje celic relativno velikim volumnom obeh pufrov, v katere imatinib iz celic lahko prehaja tudi s pasivno difuzijo. Koncentracija IM je bila izračunana glede na umeritveno krivuljo za IM:  $y = 0,223 \cdot x(\text{ng/mL}) + 1,9428; R^2 = 0,9931$



Slika 21: Vpliv izolacije na koncentracijo imatiniba v celicah.

### 6.2.3 Določitev kritične stopnje izolacije celic za upad znotrajcelične koncentracije imatiniba

Vzoredni poskusi na posameznih stopnjah izolacijskega postopka so potrdili rezultate predhodnih zaporednih poskusov (Preglednica 9). Veliko učinkovine se izgubi ob stiku celic s fikolom, še bolj pa intracelično koncentracijo zniža liza celic, ki poteče v pufru. Ob primerjavi obeh dvakratnih spiranj vidimo, da 1. spiranje v obeh primerih veliko bolj odločilno vpliva na znižanje znotrajcelične koncentracije kot drugo spiranje. S t-testom smo pokazali, da ni signifikantnih razlik v koncentraciji IM po enkratnem ali dvakratnem spiranju s PBS-om sobne temperature ( $p=0,08$ ). Rezultati t-testa kažejo, da so razlike med enkratnim ali dvakratnim spiranjem s toplim in hladnim PBS statistično značilne ( $p_{1-H}=0,014$ ;  $p_{2-H}=0,003$ ). V primeru spiranja s hladnim PBS dobimo najvišje koncentracije IM, zato smo ta način uporabljali tudi v nadaljnih poskusih. Glede na to, da smo v prejšnjih poskusih pokazali, da sta za popolno ločitev ekstracelularnega IM od celične pelete potrebni dve spiranji s PBS, smo se po tem poskusu odločili za dvakratno spiranje s hladnim PBS. Koncentracija IM je bila izračunana glede na umeritveno krivuljo za IM:

$$y = 0,0117 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,2781; R^2 = 0,9983$$

Preglednica 9: Koncentracija imatiniba po izpostavitvi različnim tipom spiranja.

Tip spiranja	c(IM) [ng/ 200 000 celic]	
	AS	SEM
Fikol	2,72	0,41
Pufer za lizo - 1x	1,39	0,25
Pufer za lizo - 2x	0,50	0,02
PBS - 1x	8,23	0,60
PBS - 2x	6,79	0,38
Hladen PBS	10,45	0,29

$p = 0,085$ ; Nsign.

$p = 0,003$ ; Sign.

$p = 0,014$ ; Sign.

### 6.2.4 Izolacija s histopaque medijem

**Preglednica 10: Koncentracija imatiniba po različnih inkubacijah celic, izoliranih preko histopaque medijev.**

Tip inkubacije	c(IM) [ng/ 200 000 celic]	
	AS	SEM
<b>MNC IM</b>	5,0	0,3
<b>MNC IM+PR</b>	4,6	0,2
<b>GRA IM</b>	4,6	0,2
<b>GRA IM+PR</b>	4,7	0,2

(MNC = mononuklearne celice, GRA = granulociti IM = inkubacija z imatinibom, IM+P = inkubacija z imatinibom in prazosinom)

Rezultati poskusa (Preglednica 10) ne kažejo večjih razlik v meritvah. Kljub temu, da smo poskus izvajali po protokolu, smo imeli precej težav z ločevanjem celic, saj meja ločitve ni bila jasna. Glede na izredno podobne rezultate smo verjetno inkubirali med seboj pomešane celice. Tudi rezultati rezultati tokratnih inkubacij granulocitov niso pokazali vpliva PR na privzem imatiniba v celice, kar prav tako pripisujemo neustrezni ločitvi celic s preizkušanim postopkom in s tem neustreznim celičnim vzorcem. Zaradi slabih rezultatov, dobljenih s histopaque medijem pri enem prostovoljcu, se nismo odločili za izvedbo poskusa na večjem številu prostovoljev.

Koncentracija IM je bila izračunana glede na umeritveno krivuljo za IM:  
 $y = 0,011 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,2434; R^2 = 0,9958$

## 6.2.5 Primerjava različnih postopkov izolacije levkocitov iz polne krvi prostovoljca in njihovega vpliva na privzem imatiniba v celice

Preglednica 11: Koncentracija imatiniba po različnih izolacijah in inkubacijah mononuklearnih celic oz. granulocitov.

Tip celice Tip izolacije Tip inkubacije	c(IM) [ng/200 000 celic]	
	AS	SEM
MNC <b>Fikol</b> IM	3,0	0,1
MNC <b>Fikol</b> IM+PR	3,4	0,6
<b>GRA</b> <b>Fikol</b> IM	10,1	1,1
<b>GRA</b> <b>Fikol</b> IM+PR	2,1	0,3
<b>GRA</b> <b>Magnet</b> IM	8,7	/
<b>GRA</b> <b>Magnet</b> IM+PR	2,5	/

p = 0,017; Sign.

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM znotrajceličnih koncentracij imatiniba po različnih inkubacijah. MNC = mononuklearne celice, GRA = granulociti, IM = imatinib, PR = prazosin. Na desni strani je predstavljena statistična razlika – p med inkubacijama granulocitov po izolaciji prek fikola).

Preglednica 11 pokaže, da smo v GRA ponovno dobili veliko višje koncentracije IM kot v MNC, kar se ujema z rezultati prejšnjih poskusov. OCT-1 prenašalec je v granulocitih očitno bolj izražen kot v mononuklearnih celicah. Obe vrsti izolacij GRA, tako izolacija prek fikola, kot tudi z magnetno kolono, dala podobne rezultate pri meritvah znotrajceličnih koncentracij IM. Sklepamo lahko, da vrsta izolacije nima pomembnega vpliva na prenašalce oz. strukturo celice, ki bi lahko vplivala na spremenjen privzem v celice. Ob tem velja poudariti, da je bilo število GRA, pridobljenih po izolaciji preko magnetne kolone premajhno, da bi izvedli več kot eno paralelko, zato ponovljivost rezultata ni določena. Koncentracija IM se je pri GRA znova izkazala za zelo odvisno od prisotnosti PR. Razlika med obema meritvama je statistično značilna ( $p = 0,017$ ), medtem ko glede tega v MNC vidimo nejasne rezultate. Razlika je sicer relativno majhna (11,8%), statistične značilnosti pa zaradi izvedbe inkubacije v samo dveh paralelkah pri MNC nismo

preverjali. Ker je vrednost izmerjena v prisotnosti prazosina celo nekoliko višja od referenčne, rezultata z inhibicijo OCT-1 prenašalcev ne moremo pojasniti. Vzrok za tak rezultat je morda manjše izražanje OCT-1 prenašalca na celični membrani MNC. Prav tako je zanesljivost meritve nekoliko manjša, kot pri merjenju granulocitnih koncentracij, saj so absolutne vrednosti pri MNC manjše. Zaradi že naštetega razloga v primeru GRA, izoliranih preko magnetne kolone prav tako ni bilo možnosti za statistično obdelavo in postavljanje splošno veljavnih zaključkov, smo pa uspešno potrdili uporabnost samega postopka določanja IUR. Koncentracija IM je bila izračunana glede na umeritveno krivuljo za IM:  $y = 0,0121 x(\text{ng/mL}) + 0,9056; R^2 = 1$

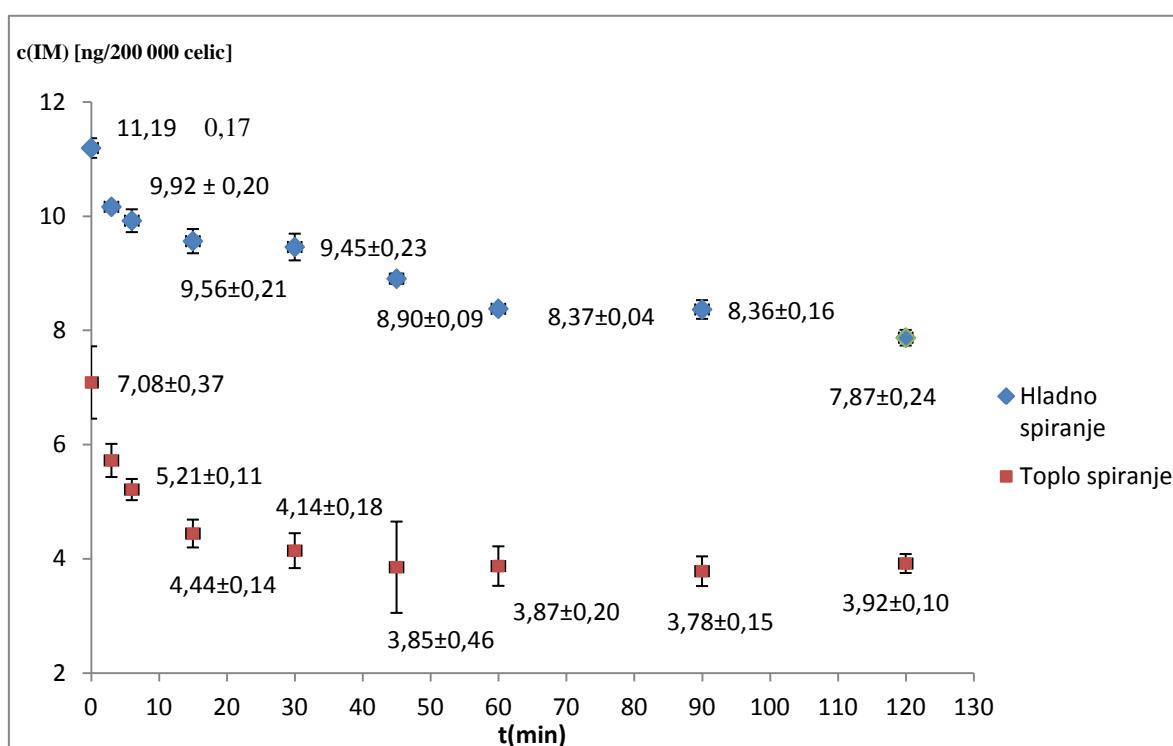
### **6.2.6 Primerjava kinetike izgubljanja učinkovine pri toplem in hladnem spiranju**

S prvimi poskusi smo že pokazali, da se več učinkovine izgubi pri toplem spiranju in ta poskus je to potrdil, saj je bila koncentracija IM pri vzorcih po toplem spiranju že od začetka nižja od tistih, ki smo jih izpostavili hladnemu spiranju. Povedati je treba, da je čas »0 min« zgolj teoretičen, saj v resnici preteče nekaj časa med resuspendiranjem in vzorčenjem. Še bolj nas je zanimalo, kdaj pride do ravnotežne koncentracije, tj. kdaj se izgubljanje učinkovine iz celic upočasni do te mere, da bistvenega znižanja znotrajcelične koncentracije ne zaznamo več. Ugotovimo, da sta kinetiki izgubljanja učinkovine iz celic v primeru spiranja s toplim in hladnim PBS zelo podobni:

- Pri hladnem spiranju koncentracija signifikantno pada v prvih treh minutah ( $p=0.016$ ). Nato se izgubljanje učinkovine precej upočasni, saj spremembe v koncentraciji izmerjenega imatiniba med naslednjimi vzorčenji večinoma niso signifikantne ( $p>0,05$ ). Opravljen t-test sicer kaže na statistično značilne razlike še v dveh primerih - med 45.in 60.minuto ter 90. in 120.minuto. V teh primerih je tudi čas med posameznimi vzorčenji daljši, zato je to razumljivo in manj pomembno. Povprečne vrednosti kažejo na to, da se izgubljanje učinkovine po šestdesetih minutah praktično ustavi, saj se koncentracija kasneje bistveno ne spremeni. Tako v prvih treh minutah po resuspendiranju koncentracija IM pade za 9,3% glede na začetno vrednost, v prvi uri za 25,2%, v naslednji uri pa le za nadaljnjih 4,5%.

- Pri toplem spiranju znotrajcelična koncentracija IM signifikantno pada v prvih treh minutah ( $p=0,027$ ) in z manjšo hitrostjo med 6. in 15. minuto ( $p=0,002$ ). V vseh ostalih časovnih intervalih koncentracija pada počasi - razlike niso statistično značilne ( $p>0,05$ ). Tudi pri toplem spiranju zabeležimo najvišje relativne izgube v prvih treh minutah po centrifugiranju (20,2%), v prvi uri se koncentracija zniža za 45,3%, v naslednji uri pa upadanja ne zasledimo.

V obeh poskusih (Slika 22) smo pokazali, da moramo postopek spiranja in centrifugiranja opraviti takoj po inkubaciji in brez premora med centrifugiranjem in spiranjem, saj le tako dobimo dokaj realne rezultate o privzemu IM v celico.



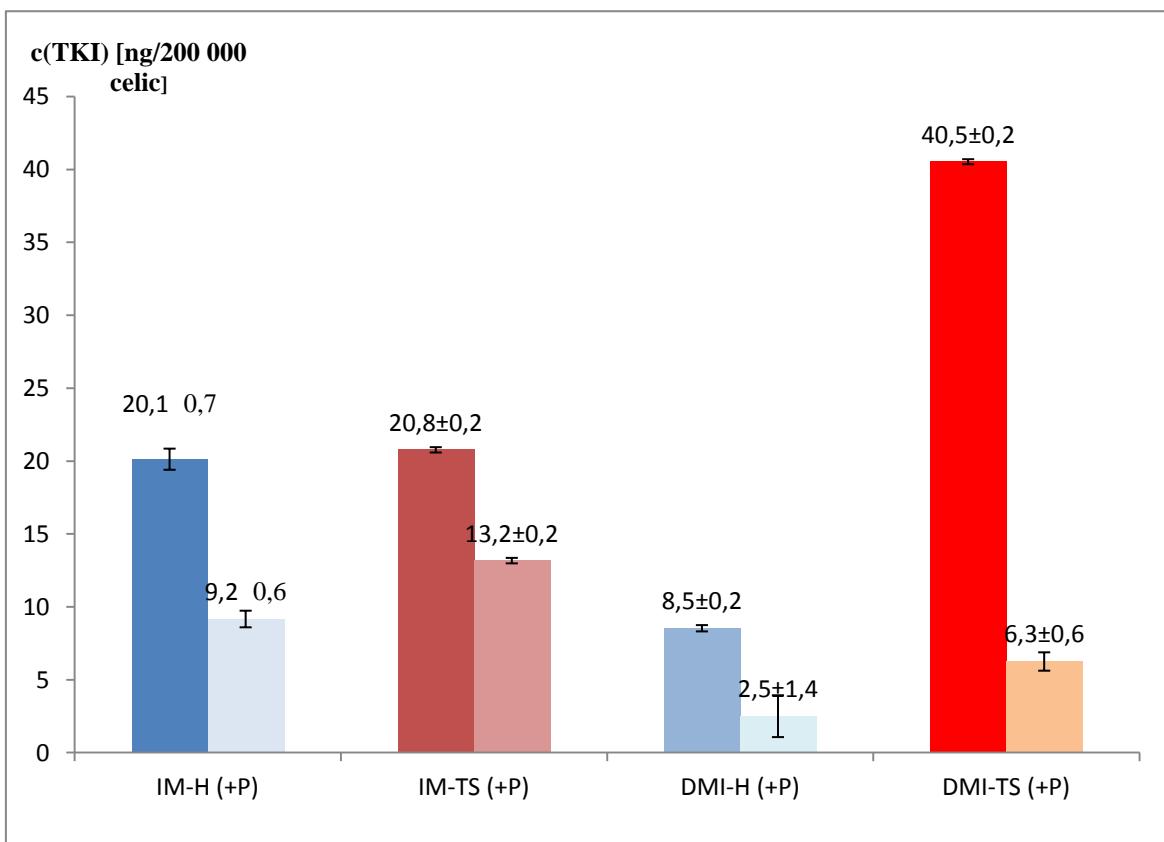
**Slika 22: Koncentracija imatiniba v odvisnosti od časa vzorčenja po hladnem/topljem spiranju.**

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM znotrajceličnih koncentracij IM po posameznih odvzemih. Vzorci so bili odvzeti 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45, 60, 90 in 120 min po resuspendirjanju).

Koncentracija IM pri hladnem spiranju je bila izračunana iz umeritvene krivulje:  $y = 0,0178 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,5463$ ;  $R^2 = 0,9968$ . Koncentracija IM pri topljem spiranju je bila izračunana iz umeritvene krivulje:  $y = 0,013 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,2598$ ;  $R^2 = 0,9995$

## 6.3 PRISOTNOST IN AKTIVNOST PRENAŠALCEV OCT-1, P-gp IN BCRP

### 6.3.1 Vpliv temperature in prisotnosti oz. odsotnosti prazosina na privzem imatiniba in N-desmetil imatiniba v celice K-562



Slika 23: Koncentracija IM in DMI po inkubacijah pri različnih temperaturah.

(Povprečja in standardne napake povprečij znotrajcelične koncentracije IM. IM = imatinib, DMI = N-desmetil imatinib, H = inkubacija v hladilniku, TS = inkubacija v termostatu. P = prazosin. Inkubacijo v prisotnosti prazosina prikazujejo desni grafi v posameznem paru grafov).

Grafična predstavitev izmerjenih znotrajceličnih koncentracij (Slika 23) kaže na aktivnejše znotrajcelične privzeme obeh učinkovin v termostatu ter na precejšen vpliv PR na rezultat (slika 23). Pri DMI so razlike zaradi temperature med inkubacijo statistično značilne ( $p=2,13\times10^{-6}$ ), medtem ko pri IM pri tem poskusu ni bilo statistično značilnih razlik ( $p=0,431$ ). Ob prisotnosti PR je znotrajcelična koncentracija IM pri obeh temperaturah za več kot 50% znižana ( $p_{IM-H} = 5,58\times10^{-5}$ ,  $p_{IM-TS} = 1,27\times10^{-4}$ ), pri DMI pa je ta razlika še višja ( $p_{DMI-H}=8,63\times10^{-9}$ ,  $p_{DMI-TS}=3,30\times10^{-6}$ ). Glede na rezultate lahko sklepamo, da se tudi

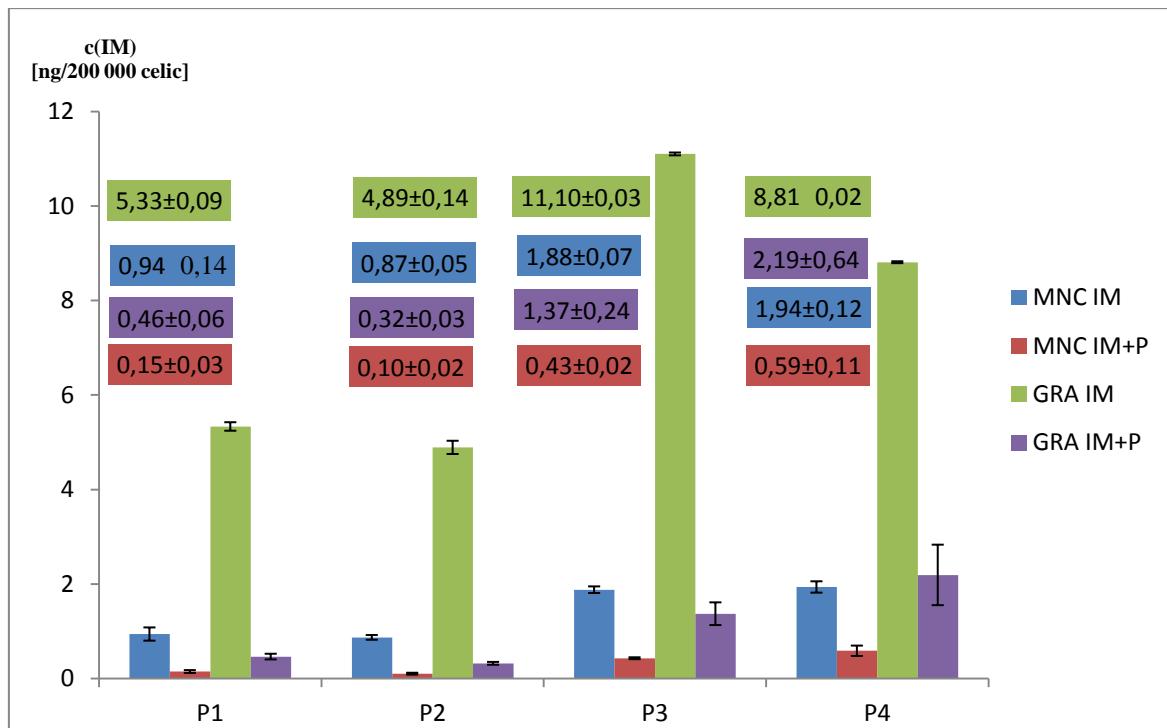
DMI v veliki meri prenaša preko OCT-1 prenašalca, OCT-1 aktivnost znaša  $34,2 \pm 0,8$  ng/200 000 celic.

Koncentracija IM je bila izračunana glede na odzive in predhodno dobljeno umeritveno krivuljo za IM:  $y = 0,0158 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,3547$ ;  $R^2 = 0,9933$ .

Koncentracija DMI je bila izračunana glede na odzive in predhodno dobljeno umeritveno krivuljo za DMI:  $y = 0,0015 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,0327$ ;  $R^2 = 0,9997$  (Slika 21).

### **6.3.2 Privzem imatiniba v granulocite in mononuklearne celice ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT-1 prazosina**

Poskus je tudi tokrat pokazal precejšnjo inhibicijo prenosa preko OCT-1 prenašalca. Rezultati kažejo, da je privzem v GRA v našem poskusu veliko večji kot v mononuklearne celice, saj je koncentracija IM v njih višja. Glede na podoben vrstni red privzema IM (Slika 24) v celico med različnimi inkubacijami smo rezultate vseh štirih prostovoljev združili in primerjali privzem v obeh celičnih vrstah ob prisotnosti/odsotnosti prazosina (Preglednica 12). Prav med vsemi inkubacijami so statistično značilne razlike v privzemu imatiniba ( $p < 0,05$ ). Poskus pokaže, da se OCT-1 prenašalec v obeh celičnih vrstah izraža drugače, v manjši meri ali z nižjo aktivnostjo. Pri GRA se ga v primerjavi z MNC očitno izraža več, kar lahko ocenimo na osnovi primerjave dobljenih vrednosti po inkubaciji brez PR ( $6,85 \pm 0,85$  :  $1,34 \pm 0,15$ ). Privzem IM, ki je posledica aktivnosti OCT-1 dobimo, če koncentraciji izmerjeni po inkubaciji brez prisotnosti PR, odštejemo koncentracijo ob prisotnosti PR. Rezultat znaša natanko 6,00 ng/200 000 celic. V povprečju poskusi kažejo na to, da GRA privzamejo manj IM kot celice K-562, kar potrjuje domneve, da celice levkemičnih bolnikov v večji meri izražajo OCT-1 prenašalec. V vzorcih s PR je privzem IM prav tako višji v GRA, toda razlike so tu manj očitne in v smislu afinitete PR na OCT-1 lahko v obeh primerih sklepamo na podobno mero inhibicije OCT-1 prenašalca.



**Slika 24: Koncentracija imatiniba v celicah prostovoljcev.**

(Povprečja in standardne napake povprečij posameznih inkubacij. GRA = inkubacija granulocitov, MNC = inkubacija mononuklearnih celic, IM = imatinib, P = prazosin. Številke označujejo posamezne prostovoljce).

**Preglednica 12: Primerjava povprečij privzemov imatiniba v celice, izolirane iz krvi prostovoljcev.**

Tip inkubacije	c(IM) [ng/200 000 celic]				
	AS	SEM	Stat. primerjava	p(t-test)	
MNC IM	1,34	0,15	GRA IM : GRA IM + PR	$9,37 \times 10^{-6}$	Sign.
MNC IM+PR	0,29	0,06	GRA IM : MNC IM	$2,67 \times 10^{-6}$	Sign.
GRA IM	6,85	0,78	GRA IM + PR : MNC IM + PR	0,032	Sign.
GRA IM+PR	0,85	0,23	MNC IM : MNC IM+PR	$3,73 \times 10^{-6}$	Sign.

(Na levi: povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM koncentracij imatiniba po različnih inkubacijah. MNC = mononuklearne celice, GRA = granulociti, IM = imatinib, PR = prazosin. Na desni: statistične razlike – p med posameznimi inkubacijami).

Povprečen rezultat znotrajcelične koncentracije IM/200 000 GRA je precej podoben podatkom iz literature. White in sodelavci so v TIDEL študiji primerjali privzem imatiniba v GRA bolnikov s KML z nizko in visoko OCT-1 aktivnostjo. Ob veliko večjem številu

preiskovanih levkemičnih bolnikov, so v poskusu določili povprečje aktivnosti OCT-1, ki je znašalo 7,2ng/200 000 celic. Povprečna aktivnost OCT-1 v GRA v našem poskusu se ni veliko razlikovala. To še posebej velja, če upoštevamo dejstvo, da so v študiji TIDEL določili izredno variabilne aktivnosti OCT-1: od 0 – 32 ng/200 000 celic [18], medtem ko je variabilnost pri nas precej manjša, kar je glede na število preiskovancev pričakovano.

Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:  
 $y = 0,0136 \cdot x(\text{ng/mL}) + 0,039; R^2 = 0,9973$

### 6.3.3 Primerjava inhibicije privzema imatiniba z različnimi inkubacijskimi koncentracijami prazosina v celični liniji K-562

Preglednica 13: Primerjava privzema imatiniba po različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina v celicah K-562.

c(PR) [ $\mu\text{M}$ ]	c(IM) [ng/200 000 celic]	
	AS	SEM
100	1,12	0,08
75	1,24	0,09
50	1,41	0,12
25	5,14	0,27
0	14,20	0,31

$p = 0,466; \text{Nsign.}$

$p = 0,603; \text{Nsign.}$

$p = 7,36 \times 10^{-5}; \text{Sign.}$

$p = 1,34 \times 10^{-7}; \text{Sign.}$

$p = 0,335; \text{Nsign.}$

$p = 5,16 \times 10^{-5}; \text{Sign.}$

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM znotrajceličnih koncentracij IM po inkubacijah z različnimi koncentracijami PR ter statistične razlike – p med posameznimi inkubacijami).

V poskusu (Preglednica 14) smo dokazali, da se inhibicija s koncentracijo povečuje do neke meje, po kateri spremembu koncentracije ne pride več do izraza, saj se inhibicija manj spremeni. Tako je med 50- in 100-odstotnim deležem relativno majhna in statistično neznačilna razlika (20,5%). V nasprotju s tem je statistično značilna razlika med 0- in 25-odstotnim deležem prazosina (276%) ter 25- in 50-odstotnim deležem PR (363%) v standardni inkubacijski zmesi. Pri 100  $\mu\text{M}$  in 75  $\mu\text{M}$  koncentracijah PR smo opazili celične skupke, ki morda kažejo na smrt celic. To lahko najverjetneje pripisemo toksičnim učinkom PR. Na osnovi teh meritev bi bilo smiselno razmisljiti o znižanju koncentracije inhibitorja na 50  $\mu\text{M}$  namesto 100  $\mu\text{M}$ , kot je uporabljena v referenčni literaturi [18] [33]. Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:  $y = 0,015 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,4113; R^2 = 0,9985$

### 6.3.4 Primerjava inhibicije privzema imatiniba v granulocite pri različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina

Preglednica 14: Primerjava privzema imatiniba po različnih inkubacijskih koncentracijah prazosina v granulocitih.

c(PR) [ $\mu\text{M}$ ]	c(IM) [ng/200 000 celic]	
	AS	SEM
100	0,13	0,02
75	0,21	0,03
50	1,28	0,02
25	5,04	0,12
0	12,40	0,80

$p = 0,162$ ; Nsign.

$p = 6,99 \times 10^{-5}$ ; Sign.

$p = 8,89 \times 10^{-4}$ ; Sign.

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM znotrajceličnih koncentracij IM po inkubacijah z različnimi koncentracijami PR ter statistične razlike – p med posameznimi inkubacijami).

Rezultati (Preglednica 14) meritev na izoliranih GRA so zelo podobni tistim, ki smo jih dobili na celični liniji K-562. To pomeni, da je tudi privzem IM z OCT-1 zelo podoben. Koncentracije IM ponovno potrdijo, da inhibicija raste s koncentracijo PR do  $50\mu\text{M}$ , pozneje pa se upočasni in rast koncentracije PR ne pripomore več veliko k inhibiciji OCT-1. Zgornjih trditev sicer ne moremo v celoti statistično potrditi. Zaradi premajhnega števila vzorcev (dve paralelki) med  $c(\text{PR})=0\mu\text{M}$  in  $c(\text{PR})=25\mu\text{M}$  nismo preverjali statističnih razlik med vzorci z dvema najnižjima koncentracijama PR, čeprav je na prvi pogled razlika v koncentraciji očitna. Moč rezultata je zaradi manjšega števila vzorcev (tri za posamezno koncentracijo PR) tudi pri ostalih vzorcih manjša, kot v primeru poskusa na K-562 celicah. Vseeno pa rezultati nakazujejo, da je ob teh pogojih pri inkubacijski  $c(\text{PR}) = 50\mu\text{M}$ , inhibicija transporta IM preko OCT-1 prenašalca zmanjšana za okoli 90%. Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:

$$y = 1775,2 \cdot x(\text{ng/mL}) + 41461; R^2 = 0,9983$$

### 6.3.5 Določanje vezave imatiniba na celične proteine

Preglednica 15: Razlika v koncentracijah imatiniba ob posameznih tipih povzročitve celične smrti.

Tip celične smrti	Liza celic s tekočim N <sub>2</sub>		Povzročitev celične smrti z NaN <sub>3</sub>		p(t-test)	Nsign.
	AS	SEM	AS	SEM		
c(IM) [ng/200 000 celic]	1,20	0,05	1,18	0,01	0,739	Nsign.

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM celičnih koncentracij IM po inkubaciji mrtvih celic ter statistična razlika – p med posameznimi inkubacijami).

Podobna rezultata (Preglednica 15) po inkubaciji mrtvih celic v šestih paralelkah sta pokazala, da sta obe metodi za ubijanje celic enako učinkoviti, saj dajeta oba poskusa statistično enake ( $p=0,739$ ) rezultate. Pri predinkubacijskem liziranju celic s tekočim dušikom smo po centrifugiranju vzorca dobili očitno manj celične oborine, kot po povzročitvi celične smrti z NaN<sub>3</sub>, zato je verodostojnost rezultatov vprašljiva. Zaradi velikosti oborine smo se v nadaljevanju poskusa raje odločali za povzročitev celične smrti z natrijevim azidom.

Preglednica 16: Razlika v privzemu imatiniba v žive/mrtve celice ob prisotnosti/odsotnosti prazosina.

Tip inkubacije	c(IM) [ng/200 000 celic]		Stat. primerjava	p(t-test)	Nsign.
	AS	SEM			
IM - žive c.	7,17	0,33	IM - žive c. : mrtve c.	$4,72 \times 10^{-5}$	Sign.
IM+PR - žive c.	1,06	0,02	IM - žive c. : IM+PR - žive c.	$5,18 \times 10^{-5}$	Sign.
IM - mrtve c.	1,01	0,02	IM - mrtve c. : IM+PR-mrtve c.	0,180	Nsign.
IM+PR - mrtve c.	1,15	0,01	IM+PR - žive c. : mrtve c	$1,22 \times 10^{-3}$	Sign.

(Povprečja - AS in standardne napake povprečij – SEM celičnih koncentracij IM po inkubaciji živih/mrtvih celic v prisotnosti/odsotnosti PR ter statistična razlika – p med posameznimi inkubacijami. GRA = inkubacija granulocitov, MNC = inkubacija mononuklearnih celic, IM = imatinib, PR = prazosin)

Glede na to, da so bile mrtve celice še cele in v njih ni potekal aktivni transport, smo z rezultati (Preglednica 16) pokazali, da se na zunajcelične strukture IM veže v relativno majhnem deležu. Z LC/MS metodo smo po ustrezni pripravi in obdelavi vzorcev izmerili koncentracijo IM. Rezultati kažejo, da predstavlja 85,9% IM znotrajcelični IM. To je pomembno dejstvo pri določanju IUR IM. Rezultati našega poskusa kažejo, da je večina izmerjenega IM ob prisotnosti PR posledica ravnotežnega stanja, ki se vzpostavi zaradi

vezave IM na izvencelične strukture. Razlike med AS koncentracij živih in mrtvih celic ob prisotnosti prazosina so statistično značilne ( $p=1,22\times10^{-3}$ ). Rezultati AS kažejo, da je koncentracija IM ob prisotnosti PR v živih celicah za 11,4% višja, kot v mrtvih celicah. To bi lahko pripisali inhibiciji aktivnega OCT-1 (ali drugih prenašalcev IM v celico) v živih celicah. Razlike v rezultatih po posameznih inkubacijah nakazujejo, da je privzem IM ob prisotnosti PR ( $c=50\mu M$ ) v približno 90% inhibiran in da prenos IM v celico poteka pretežno preko OCT-1 prenašalca.

Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:  
 $y = 0,0149 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,3649; R^2 = 0,9994$

### 6.3.6 Prisotnost in aktivnost P-gp prenašalca v celični liniji K-562

Preglednica 17: Vpliv prisotnosti PSC 833 na znotrajcelično koncentracijo rodamina.

Tip inkubacije	c(IM) [ng/200 000 celic]		<b>p(t-test)</b>	
	AS	SEM		
RHO	0,144	0,007	0,827	Nsign.
RHO+PSC 833	0,142	0,007		

- a) V preteklih študijah [19] [21] so poskuse izvajali na K-562 celicah z dodatno transfeciranim P-gp prenašalcem in tudi dokazali njegovo aktivnost K-562. Prav tako so v eni izmed študij dokazali, da je koncentracija RHO v celici odvisna od ekspresije P-gp ter od morebitnega inhibiranja le-tega s katerim izmed inhibitorjev [34]. Razumljivo je torej, da z našimi meritvami na običajni liniji K-562 celic tega ne moremo potrditi. Rezultata AS meritev (Preglednica 17) namreč kažeta na to, da P-gp prenašalec v naši celični liniji ni prisoten oz. aktiven, saj praktično ni razlik ( $p = 0,827$ ) v izmerjenih koncentracijah RHO po inkubacijah z inhibitorjem ali brez.

**Preglednica 18: Koncentracija rodamina po inkubaciji mrtvih celic.**

Tip celične smrti	Liza celic s tekočim dušikom		Povzročitev celične smrti z NaN <sub>3</sub>		p(t-test)	Nsign.
	AS	SEM	AS	SEM		
c(RHO) [nmol/200 000 celic]	0,016	0,002	0,012	0,001	0,092	Nsign.

V vzporedno narejenem poskusu smo ugotovili, da se približno 10% izmerjenega RHO veže na izvencelične strukture, prav tako pa smo ugotovili, da ga z dvakratnim spiranjem s PBS praktično v celoti izločimo iz vzorca mrtvih celic. Rezultati (Preglednica 18) kažejo, da med oba vrstama povzročitve celične smrti tudi tokrat ni bilo statistično značilnih razlik ( $p = 0,092$ ). Koncentracija RHO je bila izračunana iz umeritvene krivulje za RHO:  $y = 10435 \cdot x(\mu M) + 469,46$ ;  $R^2 = 0,9974$

- b) Tudi z drugim poskusom (Preglednica 19) nismo dokazali prisotnosti oz. aktivnosti P-gp. Rezultat t-testa kaže na statistično značilno razliko med obema inkubacijama, toda glede na vrednosti AS je prisotnost PSC 833 celo zmanjšala privzem IM v celico in s tem znižala znotrajcelično koncentracijo IM. Verjeten vzrok za take rezultate je ponovno majhno izražanje P-gp prenašalca v naši celični liniji oz. da P-gp prenašalec sploh ni prisoten. Rezultati preverjanja aktivnosti P-gp v obeh poskusih nam pokažejo, da P-gp v celični liniji K-562 ni prisoten oz. je v prisoten v tako nizki količini, da ne vpliva na znotrajcelično koncentracijo IM.

**Preglednica 19: Vpliv prisotnosti PSC 833 na znotrajcelično koncentracijo imatiniba.**

Inkubacijska raztopina	c(IM) [ng/200 000 celic]		p(t-test)	Sign.
	AS	SEM		
IM + PSC 833	11,2	0,6	$6,32 \times 10^{-4}$	Sign.
IM	14,9	0,5		

Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:  $y = 0,0123 \cdot x(\text{ng/mL}) - 0,2018$ ;  $R^2 = 0,9984$

### 6.3.7 Povezava med koncentracijo rosuvastatina v inkubacijski zmesi in privzemom

Preglednica 20: Koncentracija rosuvastatina po ekstrakciji iz celičnega lizata v odvisnosti od koncentracije inkubacijske raztopine

Inkubacijska raztopina	c(ROS) [ng/200 000 celic]		p(t-test)	
	AS	SEM		
ROS 100µM	0,68	0,13	$1,15 \times 10^{-3}$	Sign.
ROS 200 µM	1,54	0,08		

Rezultat (Preglednica 20) je v drugem primeru statistično značilno višji ( $p < 0,05$ ), s čimer so se naše domneve pred poskusom uresničile. Približno dvakratna razlika v rezultatu je morda posledica tega, da v inkubacijskih koncentracijah ROS od 100 do 200 ug/mL ne pride do nasičenja prenašalca BCRP. Koncentracija ROS je bila izračunana iz umeritvene krivulje za ROS:  $y = 34572 \cdot x(\mu\text{M}) - 526,25$ ;  $R^2 = 0,9963$

### 6.3.8 Aktivnost BCRP prenašalca v celični liniji K-562

Preglednica 21: Privzem rosuvastatina v celico ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja BCRP.

Inkubacijska raztopina	c(ROS) [ng/200 000 celic]		p(t-test)	
	AS	SEM		
ROS 200µM	1,41	0,18	$7,87 \times 10^{-3}$	Sign.
ROS 200µM + Ko134 5µM	2,15	0,09		

Preglednica 22: Privzem imatiniba v celico ob prisotnosti/odsotnosti inhibitorja BCRP.

Inkubacijska raztopina	c(IM) [ng/200 000 celic]		p(t-test)	
	AS	SEM		
IM 2µM	11,3	0,2	$4,15 \times 10^{-4}$	Sign.
IM 2µM + Ko134 5µM	9,1	0,3		

a) Rezultati AS (Preglednica 21) kažejo na to, da je po inkubaciji 3 milijonov celic v mediju z  $200 \mu\text{M}$  ROS ob prisotnosti specifičnega BCRP inhibitorja znotrajcelična koncentracija ROS statistično značilno višja ( $p = 7,87 \times 10^{-3}$ ). Poskus je pokazal, da je BCRP prisoten in aktiven v naši celični liniji in da ima njegova inhibicija lahko pomembno vlogo pri prenašanju učinkovin v celico ali iz nje. Koncentracija ROS je bila izračunana iz umeritvene krivulje za ROS:  $y = 34572 \cdot x(\mu\text{M}) - 526,25$ ;  $R^2 = 0,9963$

b) Pri inkubaciji 3 milijonov celic z IM in Ko134 (Preglednica 22) nismo dokazali inhibicije BCRP s Ko134. Znotrajcelična koncentracija IM je statistično celo značilno višja ( $p = 4,15 \times 10^{-4}$ ) v vzorcih, inkubiranih brez prisotnega inhibitorja. Rezultati poskusa so v nasprotju z rezultati poskusa 6.3.8 - a), zato bo potrebno za dokončne zaključke o prisotnosti BCRP v celični liniji K-562 narediti dodatne teste. Koncentracija IM je bila izračunana iz umeritvene krivulje za IM:  $y = 0,0141 \cdot x(\text{ng/mL}) + 0,0435$ ;  $R^2 = 0,9968$

Zaključni komentar: Vse poskuse smo izvedli v kontroliranih pogojih. Večina poskusov ima relativno nizko standardno napako povprečja in dobro ponovljivost med posameznimi meritvami. Glede na to je verjetnost laboratorijskih napak majhna, verodostojnost rezultatov pa vredna zaupanja. Kljub temu interpretacija rezultatov vseh naših poskusov terja določeno mero previdnosti. Dejstvo je, da smo v vseh primerih opravljali preliminarne poskuse z nizkim številom vzorcev (od 1-6), kjer so nas v grobem zanimale kritične točke celične izolacije in inkubacije v različnih inkubacijskih zmeseh. Prav tako so nas zanimale okvirne znotrajcelične koncentracijske vrednosti posameznih učinkovin po njihovi ekstrakciji iz vzorca s posamezno vrsto inkubiranih levkocitov.

## 7. SKLEP

V sklopu diplomskega dela smo razvijali metodo za proučevanje aktivnega transporta imatiniba in N-desmetil imatiniba v različne vrste levkocitov. Celice linije K-562 smo gojili v potrebnih količinah, medtem ko smo mononuklearne celice in granulocite izolirali iz periferne krvi prostovoljcev. Celice smo inkubirali v mediju RPMI z dodanimi spojinami in proučevali tudi aktivnost treh prenašalcev, ki veljajo za najpomembnejše prenašalce imatiniba in N-desmetil imatiniba. Pri prenosu učinkovine v levkemično celico naj bi sodeloval OCT-1, iz celice pa naj bi imatinib odstranjevala P-gp in BCRP. Na podlagi rezultatov opravljenih poskusov navajamo naslednje ugotovitve:

1. Ugotovitve, ki neposredno vplivajo na optimizacijo postopkov za kasnejše poskuse na vzorcih prostovoljcev in vpeljavo metod za klinične preiskave pri bolnikih:
  - Inkubacijska površina oz. uporabljeni vsebniki ne vplivajo na privzem imatiniba.
  - Najprimernejši postopek za izolacijo celic iz inkubacijskega medija z imatinibom je dvakratno spiranje celičnega vzorca s hladnim PBS.
  - Temperatura pomembno vpliva na privzem imatiniba v celice.
  - Ločevanje predhodno inkubiranih celic na fikolu ni ustrezno za določanje znotrajcelične koncentracije imatiniba, ker med postopkom večino učinkovine izgubimo.
  - Prazosin močno inhibira OCT-1 prenašalec (znotrajcelična koncentracija imatiniba je ob prisotnosti prazosina od 2,5- do 10-krat manjša). Z višanjem koncentracije prazosina do  $c(PRA) = 50 \mu\text{M}$  inhibicija OCT prenašalca narašča, nadaljnje višanje koncentracije inhibitorja privzema imatiniba pomembno ne zmanjša, se pa močno poveča učinek citotoksičnosti prazosina.

**2. Ostale ugotovitve:**

- Število celic in proteinov ter količina privzetega imatiniba so v celični liniji K-562 linearno odvisni. Koncentracija imatiniba izražena v ng/200 000 celic ni odvisna od števila inkubiranih celic v intervalu od 1 do 8 milijonov celic.
- Izolacija celic s histopaque mediji se ni izkazala za ustrezno in ni primerna za naše delo. Pogosto je ločitev mononuklearnih celic in granulocitov nejasna.
- Imatinib in N-desmetil imatinib se v levkocite prenašata prek OCT-1 prenosa. Najvišjo aktivnost OCT-1 (neto prenos imatiniba v celico) imajo celice K-562 (12,53ng/200 000 celic), približno dvakrat nižjo granulociti (6,45ng/200 000 celic), medtem ko se OCT-1 v mononuklearnih celicah izraža v precej manjši meri (1,63ng/200 000celic).
- Celična linija K-562 ni primerna za raziskave delovanja P-gp, saj aktivnost P-gp ni bila zaznana.
- Višje višji neto privzem imatiniba v celicah K-562 lahko pripisemo višjemu izražanju OCT-1 ali neaktivnosti P-gp.
- Prisotnosti oz. aktivnosti BCRP nismo dokazali. Razlike v višjem privzemu rosuvastatina ob prisotnosti inhibitorja BCRP nakazujejo, da je BCRP prisoten in aktiven, medtem ko je vpliv inhibitorja BCRP na znotrajcelične koncentracije imatiniba nasproten.

## **8. LITERATURA**

- [1] Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M.: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007; 370; 342-350.
- [2] <http://www.ematbo.unibo.it/ricerca/lmc.asp> (2.7.2012).
- [3] Cross N.C., Feng L., Chase A., Bungey J., Hughes T.P., Goldman J.M.: Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts of chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 82; 1929-1936.
- [4] Press R.D.: Major Molecular Response in CML Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors: The Paradigm for Monitoring Targeted Cancer Therapy. *The oncologist* 2010; 15; 744-749.
- [5] Baccarani M., Saglio G., Godman J., et al.: Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108; 1809–20.
- [6] <http://www.drugfuture.com/chemdata/imatinib.html> (10.8.2012).
- [7] Teoh M., Narayanan P., Moo K.S., Radhakrisman S., Pilappan R., Bukhari N.I., Segarra I.: HPLC determination of imatinib in plasma and tissues after multiple oral dose administration to mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;23; 35-41.
- [8] Hu S., Franke R.M., Filipski K.K., Hu C., Orwick S. J., de Bruijn E.A., Burger H., Baker S.D., Sparreboom A.: Interaction of Imatinib with Human Organic Ion Carriers. *Clinical cancer research* 2008; 14(10); 3141-8.
- [9] Radujkovič A., Schad M., Topaly J., Veldwijk M.R., Laufs S., Schultheis B.S., Jauch A., Melo J.V., Fruehauf S., Zeller W.J: Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL – Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia* 2005; 19; 1198-1206.
- [10] Glaser M., Grmek-Zemljic T., Borin P.: Naše izkušnje pri zdravljenju kronične mieloične levkemije z imatinib mesilatom. *Zdravniški vestnik* 2004; 73; 207-10.

- [11] Združenje hematologov Slovenije, Preložnik Zupan I., Pajič T.: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. *Zdravniški vestnik* 2008; 77; 5-10.
- [12] <http://www.addexbio.com/productdetail?pid=361> (10.8.2012).
- [13] Di Gion P., Kanefendt F., Lindauer A., Scheffler M., Doroshyenko O., Fuhr U., Wolf J., Jaehde U.: Clinical Pharmacokinetics of Tyrosine Kinase Inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clinical Pharmacokinetics* 2011; 50 (9); 551-603.
- [14] Peng B., Loyd P., Schran H.: Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clinical Pharmacokinetics* 2005; 44(9); 879-894.
- [15] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB41176575.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB41176575.htm) (10.8.2012).
- [16] Oostendorp R.L., Buckle T., Beijnen J.H., van Tellingen O., Schellens J.H.M.: The effect of P-gp (Mdr1a/1b), BCRP (Bcrp1) and P-gp/BCRP inhibitors on the in vivo absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib. *Invest New Drugs* 2009; 27; 31-40.
- [17] White D.L., Dang P., Engler J., Frede A., Zrim S., Osborn M., Saunders V.A., Manley P.W., Hughez T.P.: Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase Chronic Myeloid Leukemia treated with imatinib. *Journal of clinical oncology* 2010; 28(16); 2761-7.
- [18] White D.L., Saunders V.A., Dang P., Engler J., Venebles A., Zrim S. et al.: Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007; 110; 4064-4072.
- [19] O'zvegy-Laczka C., Cserepes J., Barry Elkind N., Sarkadi B.: Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates* 2005; 8; 15-26.

- [20] Ni L.N., Li J.Y., Miao K.R., Qiao C., Zhang S.J., Qiu H.R., Qian S.X.: Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical Oncology* 2010; 28; 265-269.
- [21] Mahon F.X. et.al.: MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; 101 (6); 2368-73.
- [22] [http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/2eme-annee/purification\\_prot/PDF/18115269AB.pdf](http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/2eme-annee/purification_prot/PDF/18115269AB.pdf) (10.8.2012).
- [23] [http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer\\_en/680/MACS\\_Technology\\_Flyer.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf) (10.8.2012).
- [24] Thiel A., Scheffold A., Radbruch A.: Immunomagnetic cell sorting—pushing the limits. *Immunotechnology* 1998; 4 (2); 89-96.
- [25] [http://www.miltenyibiotec.com/en/LP\\_MACS\\_Cytokines.aspx](http://www.miltenyibiotec.com/en/LP_MACS_Cytokines.aspx) (3.8.2011).
- [26] A. B. English D.: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *Journal of immunological methods* 1974; 5; 249-52.
- [27] [http://sfiles.crg.es/protocols/cellculture/img/neubauer.jpg/image\\_view\\_fullscreen](http://sfiles.crg.es/protocols/cellculture/img/neubauer.jpg/image_view_fullscreen) (10.8.2012).
- [28] <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html> (10.8.2012).
- [29] [http://www.medicalisotopes.com/display\\_product.php?catnum=13434&cat\\_id=168&alpha=R&caller=ABC&start=&end=](http://www.medicalisotopes.com/display_product.php?catnum=13434&cat_id=168&alpha=R&caller=ABC&start=&end=) (3.8.2012).
- [30] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7317> (10.8.2012).
- [31] Sato E., Suzuki T., Hoshi N., Sugino T., Hasegawa H: Sodium azide induces necrotic cell death in rat squamous cell carcinoma SCC131. *Medical Molecular Morphology* 2008; 41(4); 211-220.

- [32] Huang L.: ATP-dependent transport of rosuvastatin in membrane vesicles expressing breast cancer resistance protein. *Drug metabolism and disposition* 2006; 34(5); 738-742.
- [33] Engler J.R. Zannettino A.. Bailey C.G., Rasko J., Hughes T.P., White D.L.: OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* 2011; 96(2); 213-220.
- [34] Altenberg G.A., Vanoye C.G., Horton J.K., Reuss L.: Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: Evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91; 4654-57.