

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA KLANČAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA KLANČAR

DOLOČANJE PRIVZEMA IN ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE IMATINIBA
V LEVKOCITIH BOLNIKOV S KRONIČNO MIELOIČNO LEVKEMIJO

DETERMINATION OF UPTAKE AND INTRACELLULAR CONCENTRATION OF
IMATINIB IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID
LEUKEMIA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Simonu Žaklju, mag. farm. za mentorstvo in vodenje pri nastajanju diplomskega dela. Iskreno se zahvaljujem za nesebično pomoč in nasvete pri izvedbi raziskovalnega dela Evi Kralj, mag. farm in tudi doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. ter ostalim sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so pripomogli pri izdelavi diplomske naloge.

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

IZJAVA

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

Anita Klančar

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO GRAFOV	III
KAZALO TABEL.....	IV
KAZALO SLIK.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 Imatinib.....	7
1.2 Prenos skozi biološke membrane	9
1.3 Rezistenca na imatinib.....	10
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 Materiali	14
3.1.1 Biološki material	14
3.1.2 Standardi.....	14
3.1.3 Reagenti in topila.....	14
3.1.4 Naprave in pribor.....	15
3.2 Priprava delovnih raztopin	16
3.2.1 Priprava 1x pufra PBS	16
3.2.2 Priprava matične raztopine za lizo eritrocitov (10x)	16
3.2.3 Priprava raztopine za lizo eritrocitov.....	16
3.2.4 Priprava internega standarda	17
3.2.5 Priprava 4,5 mM NH ₄ -formiata	17
3.3 METODE	17
3.3.1 Izolacija CD15+ celic z metodo pozitivne selekcije	17
3.3.2 Izolacija granulocitov in mononuklearnih celic	19
3.3.3 Inkubacija celic z imatinibom.....	22
3.3.4 Liza in ekstrakcija imatiniba iz Gr in MNC	23
3.3.5 Povezava med koncentracijo proteinov in številom celic	25

3.3.6 Ekstrakcija imatiniba iz plazemskih vzorcev	27
3.3.7 LC-MS/MS	28
3.3.8 Statistične metode.....	29
4. REZULTATI in RAZPRAVA	30
4.1 OPTIMIZACIJA METODE	30
4.1.1 Povezava med številom celic in koncentracijo proteinov	30
4.1.2 Primerjava lize in homogenizacije v homogenizatorju s kroglicami in s postopkom zamrzovanja in odtaljevanja	31
4.1.3 Primerjava uspešnosti ekstrakcije pri uporabi stresalnika z orbitalnim stresanjem in stresalnika Bullet Blender®.....	33
4.2 ŠTUDIJA NA VZORCIH BOLNIKOV S KML	36
4.2.1 Nivo plazemskih koncentracij glede na dnevni odmerek in vpliv na uspešnost terapije	36
4.2.2 Aktivni privzem IM v celice in aktivnost OCT1	41
4.2.3 Primerjava dnevnih odmerkov z aktivnostjo OCT1	46
4.2.4 Primerjava ICC IM v Gr s plazemsko koncentracijo IM	49
4.2.5 Vpliv aktivnosti OCT1 na ICC IM v Gr.....	51
5. SKLEP	56
5.1 OPTIMIZACIJA METODE	56
5.2 PREGLED DEJAVNIKOV, KI BI LAHKO BILI POVEZANI Z USPEŠNOSTJO TERAPIJE	56
LITERATURA	58

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena premica, pripravljena na Gr, za izračun koncentracije IM v lizatu celic	24
Graf 2: Umeritvena premica za izračun plazemskih koncentracij IM.....	27
Graf 3: Umeritvena premica za kvantifikacijo koncentracije proteinov na celični liniji K562	30
Graf 4: Odvisnost koncentracije proteinov od št. celic na celični liniji K562.....	31
Graf 5: Primerjava učinkovitosti lize in homogenizacije pri različnih kroglicah in dveh hitrostih - 4 oz. 8. Merili smo absorbanco v odvisnosti od števila celic	32
Graf 6: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji s starejšim postopkom	33
Graf 7: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji z modifikacijo v prvem koraku - stresanje pri hitrosti 8, 5 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili 1 min stresanja na Vortex® in 40 min stresanja na orbitalnem stresalniku).....	34
Graf 8: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji z modifikacijo v prvem koraku - stresanje pri hitrosti 8, 10 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili 1 min stresanja na Vortex® in 40 min stresanja na orbitalnem stresalniku).....	34
Graf 9: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po modificirani ekstrakciji, stresanje pri hitrosti 8, 5 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili tako stresanje na Vortex®, stresanje na orbitalnem stresalniku ter zadnje stresanje pred sušenjem na Speed Vac-u).....	35
Graf 10: Korelacija med vrednostjo plazemske koncentracije IM in dnevni odmerkom IM	37
Graf 11: Povezava med plazemsko koncentracijo IM in odmerkom IM/dan.....	38
Graf 12: Primerjava aritmetičnih sredin znotrajceličnih koncentracij IM v MNC in Gr pri inkubaciji celic z oz. brez kinina..	43
Graf 13: Povezava med aktivnostjo OCT1 v Gr in doseganjem MMR.....	45
Graf 14: Primerjava aktivnosti OCT1 v MNC in Gr pri bolnikih s KML.....	48
Graf 15: Povezava med aktivnostjo OCT1 in starostjo bolnikov	48
Graf 16: Primerjava ICC IM v Gr glede na plazemsko koncentracijo med bolniki, ki se na terapijo dobro odzivajo (skupina 1) in bolniki, ki se na terapijo slabo odzivajo (skupina 2).....	50
Graf 17: Odvisnost ICC IM v Gr od plazemskih koncentracij IM.....	51
Graf 18: Primerjava ICC IM v GR med <i>in vivo</i> in <i>in vitro</i> pogoji	54
Graf 19: Korelacija med <i>in vivo</i> privzemom IM v Gr in <i>in vitro</i> izmerjeno aktivnostjo OCT1	54

KAZALO TABEL

Tabela 1: Definicija različnih odzivov na zdravljenje.....	6
Tabela 2: Sestava matične raztopine za lizo Erc	16
Tabela 3: Vrsta kroglic, premer in hitrost pri kateri smo jih uporabili za lizo in homogenizacijo.....	24
Tabela 4: Navodila za pripravo standardnih raztopin za merjenje absorbance proteinov ...	26
Tabela 5: Statistična obdelava podatkov ANOVA za plazemsko koncentracijo IM [ng/mL] v odvisnosti od odmerka IM [mg]/dan	36
Tabela 6: Aktivni privzem IM [ng IM/200 000 celic] v MNC in Gr, določen po inkubaciji z oz. brez inhibitorja OCT1 pri posameznem bolniku	42
Tabela 7: Primerjava aritmetičnih sredin koncentracij IM v MNC in Gr ter aktivni privzem IM.	43
Tabela 8: Statistična obdelava podatkov: t test za povezavo med aktivnostjo OCT1 in doseganjem MMR	45
Tabela 9: Vrednosti OCT1 aktivnosti v MNC oz. Gr glede na dnevni odmerek IM	46
Tabela 10: Statistična obdelava podatkov ANOVA za aktivnost OCT1 v Gr pri različnih odmerkih IM/dan	47
Tabela 11: Statistična obdelava podatkov ANOVA za aktivnost OCT1 v MNC pri različnih odmerkih IM/dan	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Translokacija med kromosoma 9 in 22 – nastanek Philadelphia kromosoma	2
Slika 2: Pospešena delitev levkemične celice.....	3
Slika 3: Spreminjanje terapije KML z leti.....	5
Slika 4: Strukturna formula imatinib mezilata	7
Slika 5: Shema izolacije celic s pozitivno selekcijo preko magnetne kolone	18
Slika 6: Izolacija celic.....	21
Slika 7: Shema male inkubacijske plošče z dodanimi ustreznimi reagenti za inkubacijo...	22
Slika 8: Shema masnega spektrometra	28
Slika 9: Prikaz upadanja pravilnega jemanja zdravila s časom	40
Slika 10: Doseganje MMR glede na visoko oz. nizko aktivnost OCT1)	41
Slika 11: Vpliv izražanja prenašalcev na pojav celične smrti	52

POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli izmeriti privzem in znotrajcelično koncentracijo imatiniba v levkocitih pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML). Predhodno razvito metodo smo modificirali in s tem poenostavili ter skrajšali postopek. Dokazali smo, da lahko lizo in homogenizacijo celic s tekočim dušikom ter 40-minutno stresanje na orbitalnem stresalniku nadomestimo s homogenizacijo s steklenimi kroglicami in stresanjem na homogenizatorju Bullet Blender®. V nadaljevanju smo v skladu z že znanimi dejstvi o prehajanju imatiniba (IM) v celice merili znotrajcelično koncentracijo imatiniba in aktivnost prenašalca. Iz periferne krvi bolnikov s KML smo izolirali granulocite (Gr) in mononuklearne celice (MNC). Granulocite smo izolirali na dva različna načina. Granulocite, izolirane z metodo pozitivne selekcije z uporabo magnetno označenih protiteles proti CD15+ in magnetnih kolon, smo uporabili za meritev znotrajcelične koncentracije imatiniba (ICC IM) *in vivo*. Preostanek krvi smo uporabili za izolacijo MNC in Gr na gostotnogradientnem mediju. Tako izolirane celice smo inkubirali z imatinibom ter z oz. brez inhibitorja organskega kationskega prenašalca 1 (OCT1). Kot inhibitor smo uporabili kinin. Po inkubaciji smo izmerili ICC IM *in vitro* in izračunali aktivnost OCT1. Izolirali smo tudi plazmo in nato izmerili plazemske koncentracije IM.

Z raziskavo smo potrdili linearno povezavo med plazemsko koncentracijo IM in dnevnimi odmerki IM ter hkrati pokazali povprečno 22x višjo ICC IM v Gr glede na plazemsko koncentracijo IM. Po inkubaciji *in vitro* smo dokazali višjo aktivnost OCT1 v Gr glede na MNC, kar se ujema tudi z višjo ICC IM v Gr, zato smo nadaljnje raziskave izvedli le na Gr. Bolnike smo razdelili v 2 skupini. V prvi so bili bolniki, ki se na terapijo dobro odzivajo, v drugi pa bolniki, ki se na terapijo slabo odzivajo. Pokazali pa smo, da bolniki iz prve skupine v 61 % dosegajo nadpovprečno aktivnost OCT1, bolniki v drugi pa v 91 % podpovprečno aktivnost OCT1. Starost na aktivnost OCT1 ni vplivala signifikantno. ICC IM v Gr se med skupinama ni razlikovala signifikantno. Rezultati kažejo, da bolniki z nižjo aktivnostjo OCT1 potrebujejo višje dnevne odmerke IM za doseganje ustrezne ICC IM v Gr, in obratno, zato bi metoda, ki smo jo optimizirali, znatno pripomogla k hitrejšemu ugotavljanju ustreznega odmerka in doseganju hitrejših odzivov na terapijo.

Ključne besede: Imatinib, KML, OCT1

ABSTRACT

The aim of our research was to determine active uptake and intracellular concentration of imatinib in leukocytes of patients with chronic myeloid leukemia. First we have optimized a pre-developed method for determining the uptake of imatinib. Three steps of a method that was previously used to determinate active imatinib uptake on healthy volunteers were modified. Liquid nitrogen based cell lysis and homogenization was replaced by a Bullet Blender® homogenizer utilizing micro beads. In the light of known facts about the uptake of imatinib we studied several parameters, with potential influence on the uptake of imatinib, regarding the activity of OCT1 transporter. We isolated mononuclear cells and granulocytes. Granulocytes were isolated by two different procedures. With positive selection the particular cell type is magnetically labeled and retained within the column during the separation for subsequent measurement of the *in vivo* intracellular concentration of imatinib. Ficoll cell sorting was used to separate mononuclear cells and granulocytes in the rest of peripheral blood. Those cells were incubated with imatinib in the presence or absence of kinin, inhibitor of OCT1. All the plasma and cell lysate samples were later processed by liquid-liquid extraction and concentration of imatinib was determined by a LC-MS/MS method.

The determined OCT1 activity in granulocytes was higher compared to that determined in the mononuclear cells. The results confirmed a linear relationship between plasma concentration and daily dose of imatinib. The measured intracellular concentrations of imatinib in granulocytes were found to be 22-fold higher than those in the plasma. Patients were grouped to responders and sub-optimal responders according to their achievement of major molecular response or MMR > 3 and the necessary dose of imatinib. There was a statistically significant difference in OCT1 activity between patients, who responded well and those with a suboptimal response. 61 % of patients who achieved MMR \geq 4 had OCT1 activity higher than median while 91 % of patients with suboptimal response had granulocyte OCT1 activity lower than median. There was no difference in the intracellular concentration vs. blood plasma concentration ratio between the sub-optimal and good responders. The results of this work could offer a novel opportunity for the individualisation of imatinib therapy.

Keywords: Imatinib, CML, OCT1

SEZNAM OKRAJŠAV

BCA – bikinhoninska kislina (ang. *bicinchoninic acid*)

BSA – goveji serumski albumin (ang. *bovine serum albumin*)

CD15 – označevanje celične površinske molekule z monoklonskimi protitelesi

Erc – eritrociti

FISH – fluorescenčna in situ hibridizacija

GIT – gastrointestinalni trakt

Gr – granulociti

ICC – znotrajcelična koncentracija

IM – imatinib

INF α – interferon α

IUR – znotrajcelični privzem in zadrževanje (ang. *intracellular uptake and retention*)

KML – kronična mieloična levkemija

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo

MACS – z magnetom pogojeno ločevanje celic (ang. *magnetic-activated cell sorting*)

MMR – glavni molekularni odgovor (ang. *major molecular response*)

MNC – mononuklearne celice

MS – masna spektrometrija

OCT1 – organski kationski prenašalec 1 (ang. *organic cation transporter 1*)

PBS – izotonični fosfatni pufer

P-gp – P-glikoprotein

Ph – Philadelphia kromosom

RPMI – medij za gojenje celic K-562

RT-PCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času

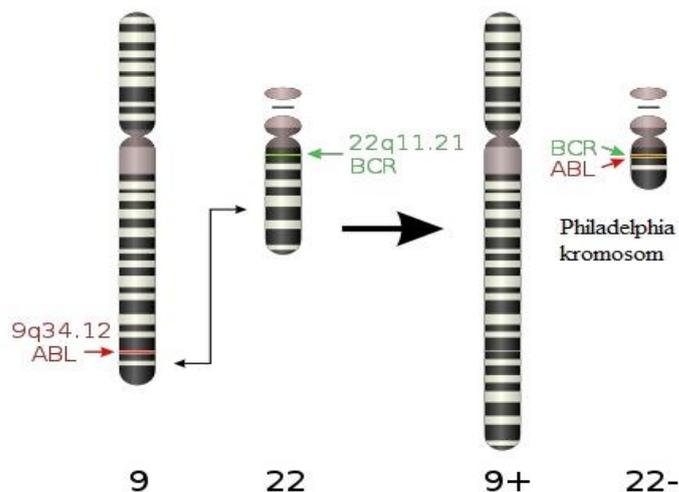
TKI – tirozin-kinazni inhibitor

1. UVOD

Pri človeku krvne celice nastajajo v krvotvornem (hematopoetskem) tkivu. Pri odraslih to predstavljata rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo. Pri zdravem človeku nastajajo eritrociti, granulociti, monociti in megakariociti samo v kostnem mozgu. Tu pa nastajajo tudi limfociti, ki dozoriijo v priželjcu. Kostni mozeg najdemo v vretencih, rebrih, lobanji, medenici, stegnenici in nadlahtnici. Osnovna matična celica je pluripotentna, ki se obnavlja z delitvijo ter s tem ohranja svoje lastnosti, hkrati pa omogoča nastanek multipotentnih matičnih celic. Slednje delimo na mieloične in limfatične. Iz mieloične multipotentne matične celice nastanejo usmerjene matične celice, iz katerih nastajajo eritrociti, levkociti in trombociti. Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano, saj poteka nenehno vzpostavljanje ravnotežja med nastajanjem in propadanjem krvnih celic. Ko je to ravnovesje porušeno, govorimo o bolezni krvotvornih matičnih celic. Običajno je pri pojavu bolezni okvarjena matična celica na eni od stopenj delitve celice. Poznamo poliklonske in klonske bolezni matičnih celic [1].

Levkemija je maligna bolezen belih krvnih celic oz. levkocitnih celic. Poznamo akutne in kronične oblike bolezni. Oboje spadajo med klonske oblike bolezni matičnih celic, torej so vse levkemične celice potomke ene same maligno spremenjene celice. Akutne levkemije so posledica pridobljene somatske mutacije, kar posledično privede do nenadzorovane rasti multipotentne matične celice. Celice se pospešeno delijo, niso pa več sposobne dozorevanja. Pri kroničnih oblikah levkemij se celice pospešeno delijo, a imajo še sposobnost dozorevanja in tudi sam potek bolezni je dolgotrajnejši in manj agresiven kot pri akutnih oblikah. Med slednje spada tudi kronična mieloična levkemija (KML). KML je maligna mieloproliferativna bolezen, pri kateri pride do klonalnega razrasta hematopoetskih matičnih celic. Razvije se iz ene same maligno spremenjene v granulocitno vrsto usmerjene matične celice. Celice se pospešeno in nenadzorovano razmnožujejo in imajo še ohranjeno sposobnost dozorevanja. Predstavlja 10 – 20 % vseh levkemij in je relativno redka, z incidenco 1 – 2 bolnika/100 000 prebivalcev na leto [2], umrljivost je 0,74/100 000 prebivalcev letno [3]. Bolezen običajno odkrijemo naključno, saj je 20 – 50 % bolnikov asimptomatskih in se bolezen odkrije šele pri pregledu krvne slike [4]. Analiza slovenske populacije je pokazala, da je bilo v letih med 2002 – 2007 odkritih 12 – 20 novih primerov na leto [2].

KML je prvi primer maligne bolezni, pri kateri je bila kot vzrok nastanka prepoznana genska nepravilnost. Za levkemične celice KML je značilna prisotnost kromosoma Philadelphia. Kromosom nastane kot posledica recipročne translokacije (dvojna zamenjava) med dvema odsekoma kromosomov 9 in 22. Kromosom 9 nosi zapis za ABL gen. Del tega kromosoma se odtrga in prenese na skrajšani kromosom 22, v bližino gena BCR. Tako nastaneta dva na novo sestavljena kromosoma, posebej dolg kromosom 9+ in posebej kratek kromosom 22-, ki ga imenujemo kromosom Philadelphia (Slika 1). Prvič se ga omenja leta 1960. Združenje dveh genov pripelje do fuzijskega (hibridnega) onkogenega BCR-ABL in nastanka fuzijske beljakovine Bcr-Abl, ki deluje kot konstitutivno aktivna citoplazemska tirozin kinaza. Posledica je pospešena in nenadzorovana delitev krvnih celic, zmanjšana diferenciacija in preprečevanje apoptoze, kar vodi do nastanka KML. Glede na mesto prekinitve na genu BCR (*break point region*) je onkogen dolg med 185 in 210 kilobaznih parov (kb). Skoraj vsi pacienti s KML imajo BCR-ABL onkogen dolg 210 kb [5], medtem ko so krajši značilni za akutne levkemije. Raziskava je pokazala, da daljši onkogeni kodirajo manj aktivne tirozin kinaze [6] [7].

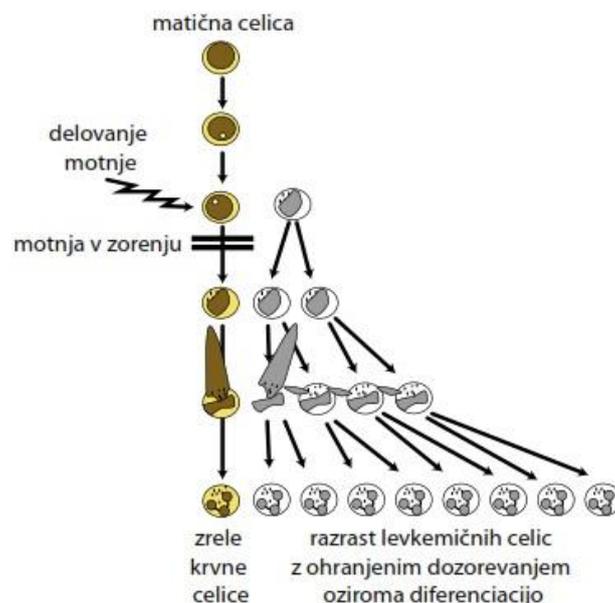


Slika 1: Translokacija med kromosomoma 9 in 22 – nastanek kromosoma Philadelphia

Hibridni gen BCR-ABL vpliva na mitogene signalne poti in poveča sposobnost delitve levkemičnih celic. Celice pridobijo odpornost proti celičnim mehanizmom, ki nadzorujejo delitev, ohranijo pa sposobnost diferenciacije (Slika 2). Tak gen najdemo pri 90 % bolnikov s KML, 5 % ima citogenetsko tiho mutacijo, preostalih 5 % bolnikov pa je BCR-ABL negativnih [7].

Natančen vzrok nastanka onkogenega še ni znan, možnih pa je več – izpostavljenost radioaktivnemu sevanju ali električnemu polju, ulcerativni kolitis, prekomerna teža, imunska neopornost, izpostavljenost pesticidom ali benzenu [8]. Edini dokazani vzrok je izpostavljenost radioaktivnemu sevanju. Študija je pokazala povečano pojavnost KML na območju Hirošime in Nagasakija 8 let po bombnem napadu, ki je povzročil povečano radioaktivno sevanje na tem območju [7].

Diagnozo KML postavi specialist hematolog na podlagi laboratorijskih in genetskih preiskav. Potrebno je preveriti celotno krvno sliko, vključno z diferencialno belo krvno sliko, kjer zaznamo povečano število levkocitov in morebitno prisotnost nezrelih granulocitov. Prevladujejo zreli nevtrofilni granulociti, od nezrelih oblik pa opazimo mielocite in lahko tudi preostale oblike do mieloblasta, vendar v manjšem obsegu. Za citološki in histološki pregled potrebujemo punkcijo in biopsijo kostnega mozga. Bolezen potrdimo z dokazom o prisotnosti Ph-kromosoma oz. fuzijskega proteina Bcr-Abl. Ph-kromosom lahko dokažemo že s standardno citogenetsko preiskavo kostnega mozga (kariotip). Pri bolnikih, kjer ne moremo dokazati Ph-kromosoma, lahko dokažemo gen BCR-ABL z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR), ki nam omogoča tudi kvantifikacijo prepisa ali s fluorescenčno hibridizacijo in situ (FISH) [4].



Slika 2: Pospešena delitev levkemične celice (povzeto po [9])

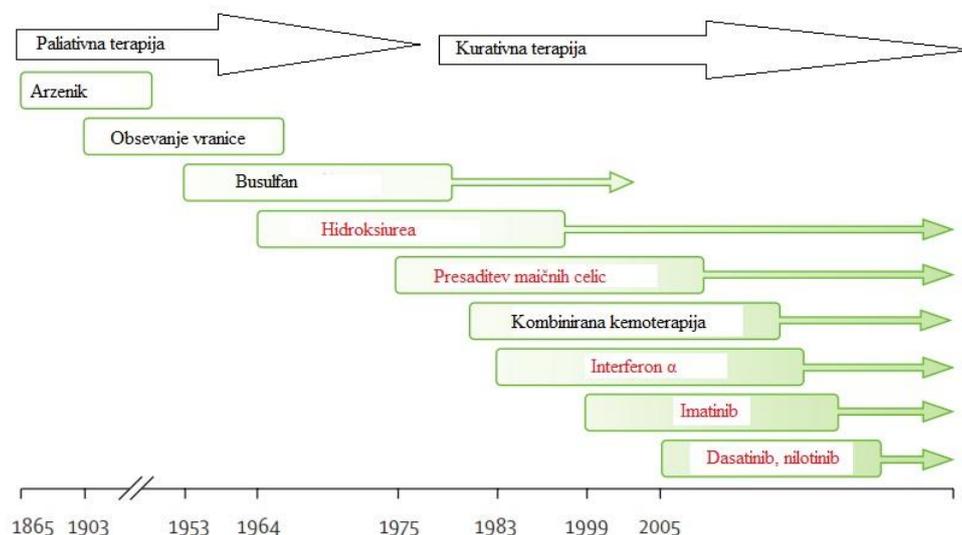
Naravni potek bolezni traja 3 – 5 let in ga delimo na tri faze KML: kronično obdobje, pospešeno obdobje in blastna preobrazba. V prvem obdobju, kroničnem obdobju, narašča število levkemičnih celic. Celice v tem obdobju ohranijo sposobnost razvoja in diferenciacije. V tej fazi je odkritih kar 85 % primerov KML. Bolnikom, katerim odkrijejo KML v kroničnem obdobju, lahko napredovanje bolezni dobro nadzorujemo. Za pospešeno obdobje je značilno, da nevtrofilni granulociti postopoma izgubijo sposobnost diferenciacije, kar posledično vodi do pojava 15 – 29 % blastov in vsaj 20% bazofilnih granulocitov. Število levkocitov vseskozi postopoma narašča. Za blastno preobrazbo (blastna kriza) pa opredelimo obdobje, ko je prisotnih najmanj 30 % blastov in je stanje podobno kot pri akutni levkemiji [2] [7].

Zdravljenje KML se je skozi leta spreminjalo (Slika 3). Sprva so uporabljali konvencionalne kemoterapevtike, hidroksiureo in busulfan, ki so predvsem zmanjševali število levkemičnih celic, niso pa upočasnili napredovanja do blastne krize. Kasneje so uporabljali transplantacijo matičnih celic, ki so jo kombinirali z uporabo kemoterapevtikov kot sta busulfan in ciklofosfamid. Uspešnost presaditve pa je starostno pogojena. Uspešna je pri mlajših od 40 let in predvsem pri bolnikih v kronični fazi. Med vsemi bolniki s KML jih je le 15 – 20 % primernih za presaditev. Sam postopek je zapleten in ima visoko incidenco umrljivosti, zato ga je kmalu nadomestilo zdravljenje z interferonom α v kombinaciji z antimetabolitom citarabinom. 20 – 30 % bolnikov je z omenjeno terapijo doseglo popoln citogenetski odgovor, glavni omejitveni dejavnik pa je bila toksičnost [6].

Z odkritjem inhibitorjev tirozin kinaz (TKI) se je zdravljenje KML bistveno spremenilo in uporaba TKI je uspešnost zdravljenja izboljšala. Imatinib (STI571) je bil prvi TKI, ki se je začel uporabljati v klinični praksi, v Evropi registriran leta 2001 in še danes predstavlja zdravilo prvega izbora za zdravljenje KML. Standardna oblika zdravljenja bolnikov v kronični fazi bolezni je 400 mg IM/dan. Izjema pa so otroci, ki imajo ustreznega darovalca matičnih celic in odrasli z enojajčnim dvojčkom, ki so primerni za presaditev matičnih celic. Študije kažejo, da bolniki sicer dosežejo citogenetski odgovor hitreje pri odmerku 800 mg/dan, vendar tako dozo zdravila slabše prenašajo, ni pa še jasnih rezultatov kako višji odmerek vpliva na dobo preživetja. Pri bolnikih, katerim se bolezen diagnosticira v pospešenem obdobju ali blastni krizi, in tudi pri bolnikih, ki se ne odzivajo na terapijo z imatinibom ali pa razvijejo rezistenco, se odločimo za zdravljenje KML s TKI druge generacije, kamor spadata dasatinib (BMS-354825) in nilotinib (AMN107). V Sloveniji se

je v zadnjem času nilotinib že uveljavil v klinični praksi poleg imatiniba. Oba uvrščamo v prvi izbor zdravil za zdravljenje KML. Dasatinib se zaenkrat v prvo linijo zdravil za zdravljenje KML uvršča le v ZDA. Tako nilotinib kot dasatinib sta aktivna proti znanim mutacijam, ki povzročajo rezistenco na IM, z izjemo mutacije T315I [4] [10].

Dosedanje raziskave so pokazale, da pacienti, ki hitro dosežejo glavni molekularni odgovor (MMR ang.: *major molecular response*), lahko dosežejo tudi popolni citogenetski odgovor in posledično počasnejše napredovanje bolezni [11]. Z uporabo IM v klinični praksi se je zviševala tudi povprečna doba preživetja. Danes je doba preživetja kar 8,9 let pri bolnikih, katerim se KML diagnosticira v kroničnem obdobju, pri bolnikih v pospešenem obdobju 4,8 let in 6 mesecev za bolnike v blastni krizi. Pred letom 1983 je bila doba preživetja 8 let dosežena le pri 15 % bolnikov, med leti 1983-2000 pri 42 – 65 % bolnikov, po letu 2001 pa kar pri 87 % bolnikov. V preteklosti je bila doba preživetja izrazito nižja pri starejših bolnikih, danes pa je razlika med mlajšimi in starejšimi bolniki v dobi preživetja znatno manjša. Prav tako pa je terapija s TKI zmanjšala vpliv ostalih prognostičnih dejavnikov (spol, splenomegalija, anemija ...), ki so v preteklosti ključno vplivale na potek KML [12].



Slika 3: Spreminjanje terapije KML z leti (povzeto po [10])

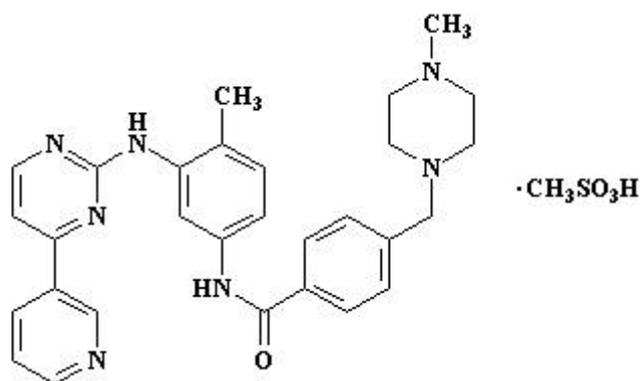
Uspešnost zdravljenja bolezni lahko razdelimo glede na doseganje različnih odzivov (Tabela 1). Na podlagi krvne slike ocenimo hematološki odgovor na terapijo, z določanjem preostalih Ph+ metastaz opredelimo citogenetski odgovor. Z RT-PCR pa ocenimo stopnjo zmanjšanja prepisa BCR-ABL v vzorcu krvi ali kostnem mozgu, ter s tem opredelimo stopnjo doseganja molekularnega odgovora na terapijo [2].

Tabela 1: Definicija različnih odzivov na zdravljenje (povzeto po [2] [10])

STOPNJA ODZIVA NA ZDRAVLJENJE	DEFINICIJA
Hematološki odgovor	
Popoln	< 10 x 10 ⁹ /L levkocitov < kot 5% bazofilnih granulocitov Brez nezrelih granulocitov Neotipljiva vranica
Citogenetski odgovor	
Popoln	Ph+ odsoten (0%)
Delni	Ph+ prisoten (1-35%)
Molekularni odgovor	
Popoln	Prepis BCR-ABL ni določljiv
Glavni	Prepis določljiv (razmerje med prepisom BCR-ABL in kontrolo < 0,1%)

1.1 Imatinib

Imatinib je 2-fenilaminopirimidinski selektivni inhibitor Bcr-Abl tirozin kinaze (znan kot Glivec v Evropi in Gleevec v ZDA). Uporablja se ga v terapiji KML, gastrointestinalnega stromalnega tumorja (GIST) in metastaz z izraženim c-KIT receptorjem [13]. Njegovo delovanje ni povsem specifično, saj zavira še c-KIT kinazo in iz trombocitov izhajajoči rastni faktor (PDGRF ang.: *platelet derived growth factor*). Struktura je predstavljena na Sliki 4 [14].



Slika 4: Strukturna formula imatinib mezilata

Tirozin kinaze so encimi vključeni v signalne poti, ki regulirajo rast, diferenciacijo, metabolizem, adhezijo in apoptozo. Nepravilno delovanje omenjenih encimov vodi do patogeneze proliferativnih bolezni, kamor spada tudi KML. V primeru KML, fuzijski protein Bcr-Abl deluje kot konstitutivno delujoča tirozin kinaza, ki aktivira številne signalne poti, ki regulirajo hematopoezo. S tem se pospeši proliferacija in poveča zmožnost preživetja levkemičnih celic [15].

Odkritje imatiniba je prineslo velik preobrat v poteku terapije in v prognozi. Zdravljenje z imatinibom je bilo odobreno na podlagi randomizirane raziskave IRIS (ang.: *International Randomized IFN vs. STI571 study*). V raziskavi so primerjali zdravljenje bolnikov s KML v kroničnem obdobju z imatinibom (400 mg/dan) in interferonom α (INF α) v kombinaciji s citarabinom. Študija je pokazala, da bolniki, zdravljeni z IM, dosegajo signifikantno boljše rezultate na molekularnem, citogenetskem in hematološkem nivoju odgovora na terapijo. Kar 75 % bolnikov zdravljenih z IM je doseglo popoln citogenetski odgovor, medtem ko so zdravljeni z INF α v kombinaciji s citarabinom dosegli popoln citogenetski

odgovor le v 15 %. Po tej raziskavi je imatinib postal zdravilo prvega izbora (400 mg/dan) za bolnike v kronični fazi [15]. Učinkovit je tudi pri bolnikih v pospešenem obdobju, vendar je trajanje zadovoljivega učinka inhibicije praviloma kratkotrajno z visoko možnostjo napredovanja v blastno krizo [16] [17].

Imatinib inhibira delovanje fuzijskega proteina Bcr-Abl s tirozin kinazno aktivnostjo. Kompetitivno inhibira vezavo ATP v ATP-vezavni žep na omenjenemu encimu, s čimer prepreči avtofosforilacijo in ima antiproliferativni učinek [18]. Dokazano je bilo, da je pri večini bolnikov s KML v levkemičnih celicah povečano izražanje fuzijskega proteina, kar je tudi osnova za selektivno tarčno zdravljenje. Študija je pokazala, da IM pri koncentraciji 1 $\mu\text{mol/L}$ selektivno inhibira encim v levkemičnih celicah, ne da bi prizadel normalne celice [15].

Večina bolnikov terapijo z IM dobro prenaša, kljub temu pa se lahko pojavijo neželeni učinki, ki pa so relativno redki. Običajno se pri standardnem odmerku 400 mg/dan izrazijo v blagi obliki, pri višjih odmerkih pa so lahko bolj izraziti in tudi pogostejši. Pogosteje se pojavijo v pospešenem obdobju bolezni in v blastni krizi, kar je tudi povezano z višjimi dnevnimi odmerki IM v tem obdobju. Pojav neželenih učinkov le redko vodi do prekinitve terapije, lahko pa je potrebno znižanje odmerka z namenom preprečevanja le-teh. V grobem neželene učinke delimo na hematološke in nehematološke. Med slednje spadajo zastajanje tekočine in pojav edemov (pojavi se pri 50 % bolnikov, manjše zaplete odpravijo kar z uporabo diuretikov), vpliv na GIT – slabost, bruhanje, abdominalna bolečina, diareja, kar se pojavi predvsem pri jemanju IM na prazen želodec. Ker je bilo dokazano, da se absorpcija IM s hrano ne spremeni, se priporoča, da se zaužije med ali neposredno po večjem obroku, kar prepreči negativni vpliv na GIT. Pojavijo se lahko tudi spremembe kože kot so alergijski izpuščaji, razjede in pigmentacijske spremembe. Poročali so tudi o bolečinah v kosteh in mišicah, artralgiiji in toksičnem vplivu na jetra, ki se pojavi zelo redko. Med hematološke neželene učinke pa uvrščamo pojave povezane z mielosupresijo in vpliv na krvno sliko. Pojavita se nevtropenija in trombocitopenija, ki pa sta pogostejši v pospešenem obdobju in blastni krizi. Sta posledici vedno manjšega števila zdravih (Ph negativnih) celic, ki lahko vzdržujejo normalno hematopoezo, kar potrjuje tudi dejstvo, da se krvna slika popravi pri bolnikih, ki dosežejo popoln citogenetski odgovor. Vodilno načelo pri načrtovanju terapije mora biti ujemanje agresivnosti bolezni z ustrežno agresivno terapijo [7]. Študija, ki je raziskovala povezavo med pojavom neželenih učinkov

odvisno od dnevnega odmerka IM, je pokazala, da je pojav nehematoloških neželenih učinkov primerljiv pri odmerku 400 oz. 800 mg IM dnevno. Hematološki pa so bili pri višjem odmerku statistično signifikantno povečani. Anemijo, trombocitopenijo in nevtropenijo so uravnavali z dodatkom eritropoetina. Toksičnost IM se je zmanjšala z uvedbo nižjega dnevnega odmerka [19].

1.2 Prenos skozi biološke membrane

Plazemska koncentracija vpliva na učinek IM. Na plazemsko koncentracijo IM vplivajo številni dejavniki (genski polimorfizem, vplivi okolja, prisotnost bolezni in sočasno jemanje drugih zdravil) [20]. Absorpcija IM je zelo dobra, učinkovina ima 98 % biološko uporabnost [7]. Povprečna plazemska koncentracija IM je bila pri bolnikih odzivnih na IM signifikantno višja kot pri tistih, ki se na terapijo ne odzivajo [20]. Vemo, da je za ugoden klinični rezultat najpomembnejši prenos IM v levkemične celice in tudi zadostna znotrajcelična koncentracija IM, kar je tesno povezano s plazemsko koncentracijo.

Glavni prenašalci, ki vplivajo na ICC IM, spadajo v skupini SLC (ang.: *solute carriers*) ter ABC (ang.: *ATP binding cassette*) kamor sodita Bcrp (ABCG2) in P-glikoprotein (ABCB1). Skupina SLC je odgovorna za vstopanje učinkovin v celico, ABC pa za izločanje. Individualne razlike v terapiji so posledica različnega izražanja in delovanja omenjenih receptorjev [21]. V skupino SLC prenašalcev spada OCT1 (SLC22A1), katerega delovanje smo preučevali v naši študiji. OCT1 je prenašalec sestavljen iz 556 aminokislin in oblikovan v 12 transmembranskih domen. Uravnava prenos majhnih (60 – 350 Da), hidrofilnih in pri fiziološkem pH pozitivno nabitih molekul skozi membrane [22]. Deluje kot črpalka, ki za prenos preko membrane uporablja elektrokemijski gradient protonov.

Vpliv in delovanje OCT1 je bilo dolgo neraziskano področje. Ob uvedbi IM v terapijo bolnikov s KML je bila namreč plazemska koncentracija IM ključni parameter za spremljanje terapije [20]. Kasneje so razvili metode, ki so omogočale raziskovanje vpliva in aktivnosti OCT1. Raziskovalci so aktivnost OCT1 opredelili kot razlika ICC učinkovine z oz. brez inhibitorja omenjenega prenašalca (IUR ang.: *intracellular uptake and retention*). Vpliv OCT1 so preučevali z uporabo različnih inhibitorjev in merjenjem IUR. Uporabili so verapamil, amantadin, prokainamid in prazosin v različnih koncentracijah in

ugotovili, da inhibicija prenašalca signifikantno zmanjša aktivni vstop IM v celico [5] [23]. Dokazali so, da tudi temperatura (T) bistveno vpliva na privzem učinkovine v celico. Privzem IM v celice je bil večji pri višji T [23]. Nadaljnje raziskave so bile usmerjene v iskanje povezanosti aktivnosti OCT1 in uspešnostjo terapije. White in sodelavci so dokazali, da bolniki z visoko OCT1 aktivnostjo v MNC 85 % dosežejo MMR, medtem ko tisti z nizko aktivnostjo dosežejo MMR le v 45 %, kar nakazuje, da je aktivnost OCT1 ključna za aktivni privzem učinkovine v levkemične celice. Rezultati raziskave bi lahko bistveno pripomogli pri načrtovanju individualizirane terapije [24], zato smo želeli omenjeno povezavo preveriti tudi na slovenski populaciji bolnikov s KML. Wang in sodelavci so svoja raziskovanja usmerili v izražanje mRNA OCT1. Dokazali so povezavo med visokim nivojem mRNA in doseganjem citogenetskega odgovora [25]. O povezanosti med mRNA in OCT1 so mnenja deljena, saj je skupina avstralskih raziskovalcev, White in sodelavci, to hipotezo ovrgla [26]. Študija TIDEL (ang.: *Trial of Imatinib Dose Escalation in chronic myeloid Leukemia*) je pokazala, da imajo pacienti z visoko aktivnostjo OCT1 večjo možnost preživetja brez zapletov (EFS ang.: *event-free survival*), primerjalno na bolnike z nizko aktivnostjo. Z dodatno raziskavo so podatke iz študije TIDEL še razširili. Skupino bolnikov z nizkim tveganjem za napredovanje bolezni so razdelili na bolnike z nizko OCT1 oz. visoko OCT1 aktivnostjo in preučil EFS. Ugotovili so, da imajo bolniki z nizko OCT1 aktivnostjo 60 % EFS, z visoko pa kar 92 % EFS, s čimer so dokazali, da se tudi bolniki z nizkim tveganjem za hitro napredovanje bolezni med seboj signifikantno razlikujejo glede na aktivnost OCT1 [26]. Študija, kjer so preučevali korelacijo med aktivnostjo OCT1 in dnevnim odmerkom IM je pokazala, da so bolniki z visoko aktivnostjo OCT1 dosegli MMR ne glede na odmerek, medtem ko je bil MMR pogojen z odmerkom pri nizki aktivnosti OCT1 [27].

1.3 Rezistenca na imatinib

Z leti uporabe se je izkazalo, da IM ni popolno zdravilo, kljub dobrim odzivom na terapijo. Opazili so, da se nekateri bolniki na IM ne odzivajo pozitivno oz. se pri nekaterih razvije neodzivnost (rezistenca) po določenem času zdravljenja. Rezistenco lahko delimo na primarno in sekundarno. O primarni govorimo, ko bolnik ni sposoben doseči hematološkega in citogenetskega odziva, o sekundarni pa, ko se neodzivnost pojavi po daljšem času terapije z IM. Kar 60 % bolnikov, sprva odzivnih na IM, v blastni krizi doživi

ponovitev (relaps) bolezni, kar lahko razložimo z razrastom selekcioniranih rezistentnih klonov. Vplive za neodzivnost lahko iščemo v delovanju oz. izražanju prenašalnih proteinov, odgovornih za privzem in odstranjevanje učinkovine, in tudi v mutacijah na hibridnem genu BCR-ABL. Če se terapija prične že v kronični fazi, se sekundarna rezistenca pojavi bistveno redkeje.

Študija, ki so jo izvedli Crossman in sodelavci, je pokazala, da je izražanje OCT1 med bolniki variabilno, vendar ne statistično različno od zdravih prostovoljcev. Sklepali so, da je pri bolnikih, ki so imeli nižje izražanje OCT1, doseganje popolnega citogenetskega odgovora manj verjetno zaradi nezadostne ICC IM [28]. Raziskovalci pa si niso enotni o povezanosti med izražanjem OCT1 in uspešnosti na terapijo. White in sodelavci so v svoji študiji ovrgli hipotezo o korelaciji med izražanjem OCT1 in doseganjem MMR [24]. Preučevali so tudi vpliv izražanja ABC prenašalcev, kateri vplivajo na izločanje IM iz celice. Izkazalo se je, da je bilo pred začetkom terapije izražanje teh receptorjev enako pri bolnikih, ki se na zdravljenje odzivajo kot tudi pri tistih, ki se na zdravljenje ne odzivajo in tudi pri zdravih prostovoljcih. Izražanje teh receptorjev se tudi po začetku terapije ni bistveno spremenilo in na splošno ni vplivalo na ICC IM [28]. Tudi o vplivu ABC prenašalcev so mnenja deljena. Študija, ki so jo izvedli Mahon s sodelavci, je pokazala, da je eden ključnih dejavnikov pri razvoju rezistence prekomerno izražanje MDR1 (ang. *multidrug resistance gene*, ABCB1), ki kodira P-glikoprotein (P-gp), le-ta pa je odgovoren za črpanje protitumornih učinkovin iz celic oz. zmanjševanje akumulacije znotraj celic in posledično za neodzivnost na učinkovino. Raziskava na celični liniji s povečanim izražanjem gena MDR1 (K562/DOX), je pokazala, da so celice manj odzivne na IM, kar pa se spremeni z dodatkom inhibitorja P-gp, verapamila [29]. Na podlagi tega lahko sklepamo, da na uspešnost terapije oz. odzivnost bolnikov na IM vpliva izražanje OCT1 in tudi ABC prenašalcev, vendar bi bile potrebne dodatne raziskave, ki bi opredelile razmerje med prenašalci, ki omogočajo vstop v celico oz. izločanje učinkovine iz celic.

Poleg prenašalcev odgovornih za vstop ali izločanje, pa lahko vzroke za pojav rezistence iščemo tudi na genskem nivoju izražanja BCR-ABL. Študije so pokazale, da sta mutaciji na poziciji T315 in Y253 največkrat najdeni pri bolnikih (v 30 – 90 %), ki se na IM ne odzivajo [30]. Sprememba v aminokislinskih ostankih vodi do nezmožnosti vezave IM v ATP-žep in posledično ne pride do prekinitve proliferacije levkemičnih celic. Take točkovne mutacije so značilne predvsem za sekundarno rezistenco. Pri neodzivnih bolnikih

so dokazali tudi amplifikacijo gena BCR-ABL in s tem povečano izražanje fuzijskega proteina Bcr-Abl in večjo tirozin kinazno aktivnost le-tega, kar so dokazali predvsem pri bolnikih v blastni krizi. Bolniki, katerim so dokazali amplifikacijo gena, so primerni kandidati za povečanje odmerka IM oz. zamenjavo terapije s TKI druge generacije [31]. Pojav rezistence je lahko povezan tudi s povečano vezavo IM na α 1-kisli glikoprotein in albumin, preko katerih je regulirana koncentracija proste učinkovine v plazmi [32]. Vsi naštetih dejavniki posredno vplivajo na koncentracijo učinkovine na mestu delovanja, ki pa lahko vpliva na razvoj rezistence.

2. NAMEN DELA

Najprej bomo optimizirali predhodno razvito metodo za kvantitativno določanje aktivnosti OCT1. Osredotočili se bomo na samo pripravo vzorcev za ekstrakcijo IM iz celic, izoliranih iz periferne krvi bolnikov s KML. Stara metoda vključuje lizo celic s tekočim dušikom, kar bomo nadomestili z uporabo steklenih kroglic in homogenizatorja Bullet Blender®. Uspešnost lize in homogenizacije izvedene s staro in z novo metodo bomo primerjali z merjenjem absorbance proteinov pri $\lambda=595$ nm. Z omenjenim homogenizatorjem bomo nadomestili tudi stresanje na orbitalnem stresalniku pri naslednji stopnji priprave – ekstrakciji. Predvidevamo, da bomo lahko bistveno skrajšali in poenostavili postopek priprave vzorcev.

V nadaljevanju bomo uporabili periferno kri bolnikov s KML in izolirali Gr, MNC in plazmo. Poleg plazemske koncentracije IM bomo izmerili tudi ICC IM, za kar bomo Gr izolirali z metodo pozitivne selekcije z uporabo magnetno označenih CD15 protiteles in magnetne kolone. V preostanku krvi bomo z gostotno gradientnim medijem izolirali Gr in MNC. Izolirane celice bomo inkubirali z oz. brez inhibitorja OCT1, kinina. Izmerili bomo ICC IM po inkubacijah z oz. brez inhibitorja v obeh populacijah celic in izračunali razliko, ki ustreza aktivnemu privzemu (AP) oz. aktivnosti OCT1 prenašalcev. Ta aktivnost naj bi bila ključna pri privzemu imatiniba v levkemične celice pri KML, mi pa bomo preverili, ali tudi določena z novo metodo in na slovenski populaciji bolnikov korelira z uspešnostjo zdravljenja podobno kot je dokazano za avstralsko populacijo bolnikov. V skladu z literaturnimi podatki je znotrajcelična koncentracija imatiniba zelo verjetno odvisna od aktivnega privzema v celice z različnimi prenašalci [5], kar želimo tudi preveriti. Preverili bomo povezave med odmerkom, plazemsko koncentracijo in ICC IM ter vpliv starosti bolnikov na aktivnost OCT1. Pridobljene podatke o aktivnosti OCT1 ter o znotrajceličnih koncentracijah v Gr bomo primerjali z uspešnostjo terapije po oceni hematologa, ki bo oblikovana na osnovi vseh razpoložljivih podatkov o bolniku. Morebitna povezanost med uspešnostjo terapije in izmerjenimi parametri bi v prihodnosti lahko pripomogla pri načrtovanju terapije in zgodnjem določanju ustreznega odmerka imatiniba.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material

Celična linija K562 (American Type Culture Collection, Manassas, ZDA, ATCC št. CCL-243™)

Periferna kri bolnikov s KML, odvzeta na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani

3.1.2 Standardi

d8-imatinib – $C_{29}H_{23}d_8N_7O_4$, $M = 501,66$ g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

Imatinib – $C_{29}H_{32}N_7O$, $M = 493,60$ g/mol (Imatinib mesylate); (Sequoia research products ltd, Pangbourne, Velika Britanija)

3.1.3 Reagenti in topila

Ultračista voda, pridelana z Milli Q – Advantage A 10 (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)

Etanol, C_2H_5OH , 96 %, $M = 46,07$ g/mol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)

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

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

Amonijev formiat, NH_4HCO_2 , $M = 63,06$ g/mol (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Etilacetat, $CH_3COOCH_2CH_3$, $M = 88,10$ g/mol (Panreac, Barcelona, Španija)

Acetonitril, CH_3CN , $M = 41,05$ g/mol (MS-grade, J.T. Baker, Deventer Nizozemska)

Heksan, C_6H_{14} , $M = 85,18$ g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

PBS (sestava: $NaCl$, KCl , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija)

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

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

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

MACS® BSA Stock Solution (raztopina 90 % PBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} , 10 % BSA), (Macs Teterow, Nemčija)

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

Medij RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640 + L-glutamin (Gibco® Life technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)

Komplet za določanje proteinov (Pierce BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, ZDA)

3.1.4 Naprave in pribor

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

TurboVap LV (Caliper, Hopkinton, Massachusetts, ZDA)

Elektromagnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Homogenizator Bullet Blender® (Next advance, New York, ZDA)

Ločevalni magnet MidiMACS LS s stojalom (Macs, Teterow, Nemčija)

Inkubacijske plošče Corning Corstar® (Corning incorporated, Corning, New York, ZDA)

Plošče za gojenje (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica)

Centrifuga Centric 322a (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

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

Centrivac VR1 (Heraeus instruments, Danska)

Polavtomatske pipete 20-200 µL, 200-1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Mikrocentrifugirke (1,5 in 2,0 mL) (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

LC-MS/MS naprava (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)

Steklene kroglice (Glass beads, Next advance, New York, ZDA)

Epruvete z antikoagulantom (Vacutainer®, Plymouth, VB)

3.2 Priprava delovnih raztopin

3.2.1 Priprava 1x pufra PBS

1x puffer PBS smo pripravili iz 10x pufra PBS tako, da smo slednjega redčili v razmerju 1 : 10. Najprej smo nalili 100 mL 10x pufra PBS v sterilno 1000-mililitrsko bučko in dodali 900 ml sterilne redestilirane vode (Ambion) do oznake. Mešanico smo premešali z obračanjem in nato s pH metrom preverili pH pufra ter ga po potrebi uravnali z NaOH ali HCl do vrednosti 7,1. Nato smo raztopino filtrirali preko vakumsko-filtracijskega sistema z vodno črpalko v dve 500-mililitrski sterilni steklenici in ju do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri +4°C.

3.2.2 Priprava matične raztopine za lizo eritrocitov (10x)

Najprej smo natehtali soli (Tabela 2) in jih prenesli v 1000-mililitrsko bučko ter dopolnili do oznake s sterilno, redestilirano vodo (Ambion). Raztopino smo filtrirali preko filtracijsko-vakumskega sistema z vodno črpalko v dve 500-mililitrski bučki in ju označili z »Matična raztopina za lizo Erc (10x)« ter ju do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri +4°C.

Tabela 2: Sestava matične raztopine za lizo Erc

SOL	MASA (g)
NH ₄ Cl	82,60
KHCO ₃	10,00
EDTA	0,37

3.2.3 Priprava raztopine za lizo eritrocitov

Raztopino za lizo eritrocitov smo pripravili z redčenjem v razmerju 1 : 10 iz matične raztopine za lizo eritrocitov (10x). 100 mL osnovne raztopine smo prenesli v 1000-mililitrsko bučko, dodali sterilno, redestilirano vodo do oznake in premešali z obračanjem. Raztopino smo filtrirali preko vakumsko-filtracijskega sistema z vodno črpalko v dve 500-mililitrski sterilni steklenici, ju označili z »Raztopina za lizo Erc« in ju do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri +4°C.

3.2.4 Priprava internega standarda

Kot interni standard za LC-MS/MS analizo smo uporabili d8-imatinib. Pripravili smo ga iz osnovne raztopine s koncentracijo 2 g/L z redčenjem s prečiščeno vodo (0,1875 mL/5 mL H₂O)

3.2.5 Priprava 4,5 mM NH₄-formiata

Raztopino smo pripravili iz kristalov NH₄-formiata (M=63,06 g/mol). Natehtali smo 14,19 mg soli, jo kvantitativno prenesli v 50-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Izračun:

$$\begin{aligned} m(\text{NH}_4\text{HCOO}) &= c[\text{mol/L}] \times M [\text{g/mol}] \times V [\text{mL}] = 4,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 63,06 \text{ g/mol} \times 50 \text{ mL} \\ &= 14,19 \text{ mg/50 mL H}_2\text{O} \end{aligned}$$

3.3 METODE

3.3.1 Izolacija CD15+ celic z metodo pozitivne selekcije

V raziskavo smo vključili bolnike s kronično mieloično levkemijo, ki se zdravijo z imatinibom. Študijo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko. Bolniki prejemajo različne odmerke po presoji hematologa glede na odzivnost in učinkovitost zdravljenja, raziskava pa na potek terapije ne vpliva. Iz periferne krvi bolnikov s KML, ki je bila odvzeta na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, in se zdravijo z imatinibom, smo najprej izolirali CD15+ celice (večino teh predstavljajo nevtrofilni granulociti) [33] z metodo pozitivne selekcije in v njih po ustrezni pripravi s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) določili znotrajcelične koncentracije imatiniba (ICC IM).

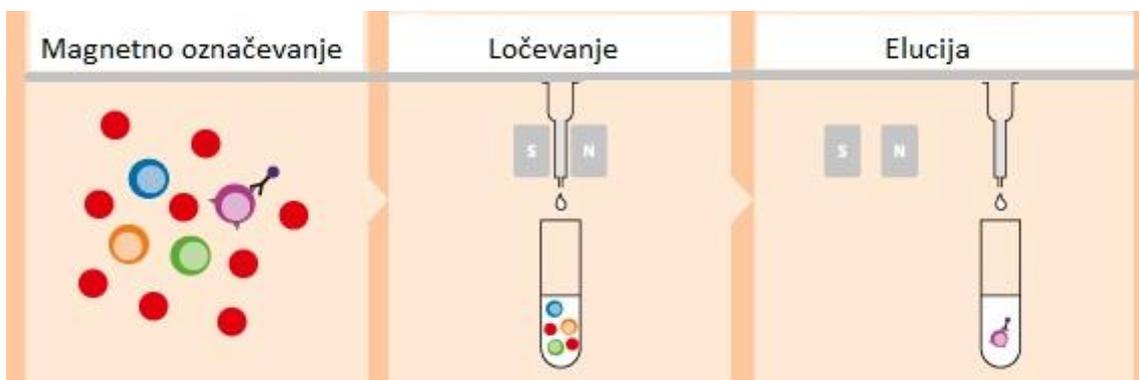
Izolacijo CD15+ smo izvedli prek magnetnih kolon s pozitivno selekcijo. Pozitivno selekcijo razložimo kot postopek, kjer določen antigen, ki ga želimo določiti na tarčnih celicah, s protitelesi magnetno označimo. Molekule s tako označenimi antigeni se zadržijo v koloni, medtem ko ostale neoznačene molekule potujejo skozi kolono nemoteno (Slika 5) [34].

Kri odvzeto v epruvete Vacutainer s heparinom kot antikoagulantom (zelen zamašek), smo inkubirali z magnetnimi mikrokroglicami MicroBeads. Le-te imajo na svoji površini pripeto protitelo proti antigenu 3-fukozil-N-acetil-laktozamin (CD15). Pri vzorcih kostnega mozga je bila nujna predhodna filtracija skozi 30 µm najlonski filter, da smo preprečili zamašitev kolone s kostnimi ostanki. Omenjeni antigen CD15 se nahaja le na granulocitnih celicah, kar omogoča ločevanje granulocitov od limfocitov in monocitov, saj ti dve vrsti levkocitov ne izražata antigena CD15 in se posledično ne zadržita v koloni [35] [36].

K 1 mL polne krvi smo dodali 50 µL reagenta CD15 MicroBeads (pri večjem alikvotu krvi smo dodali ustrezno večjo količino reagenta). Suspenzijo smo premešali in inkubirali 15 min v hladilniku pri 2 – 8°C (pri sobni T bi se čas inkubacije zmanjšal, na ledu pa podaljšal). Celice smo sprali z 2 – 5 mL pufra za separacijo, kar ustreza 1 mL polne krvi (autoMACS Running Buffer) in centrifugirali pri 1700 obratih/min. Supernatant smo odstranili do 1 – 2 mm nad plastjo celic, celice pa resuspendirali z dodatkom separacijskega pufra do končnega volumna 1 mL.

Po ustrezni pripravi celic je sledilo ločevanje s pomočjo MidiMACS separatorja, ki smo ga pripeli na MidiMACS stojalo. V separator smo vpeli Whole Blood kolono in podstavili zbirno epruveto. Na kolono smo nanесли 3 mL pufra za spiranje, pustili, da je stekel skozi kolono in eluat zavrgli. Po spiranju smo na kolono nanесли celično suspenzijo in kolono še 3x sprali s 3 mL pufra za spiranje. Pred vsakim nanosom pufra smo počakali, da je bil rezervoar kolone prazen. Celoten eluat smo zavrgli, saj je vseboval neoznačene celice.

Kolono smo odstranili iz separatorja in podstavili novo epruveto. Na kolono smo odpipetirali 5 mL pufra za elucijo, ki smo ga predhodno ogreli na sobno T, nanjo namestili bat in jo sprali s hitrim in močnim potiskom na bat kolone.



Slika 5: Shema izolacije celic s pozitivno selekcijo preko magnetne kolone (povzeto [37])

3.3.2 Izolacija granulocitov in mononuklearnih celic

Iz preostanka odvzete periferne krvi bolnikov s KML smo izolirali frakciji mononuklearnih celic (MNC) in granulocitov (Gr). Izolirali smo ju s centrifugiranjem z gostotno gradientnim medijem Ficoll Pack. Shema izolacije je predstavljena na Sliki 6. Pred začetkom postopka smo vse potrebne reagente in tudi vzorce segreli na sobno temperaturo. Kri je bila odvzeta v ambulanti na hematološkem oddelku na Polikliniki v epruveto Vacutainer s K₂EDTA/K₃EDTA (vijoličen zamašek) ali Li-heparinom (zelen zamašek) kot antikoagulantom. Kri smo redčili v razmerju 1 : 1 z raztopino 1x PBS.

V 15-mililitrske epruvete Falcon smo najprej vbrizgali 2 mL fikola (Ficoll-Paque™ PLUS) s pomočjo igle in brizge in nato počasi ob steni epruvete pipetirali razredčene vzorce krvi, da sta plasti fikola in krvi ostali ostro ločeni in je bila meja jasno vidna. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali 22 min pri 2200 obratov/min (RPM ang.: *revolutions per minute*) brez zavore v centrifugi z nihajočim rotorjem (Centric 322A). Med centrifugiranjem so se celice razporedile glede na specifično gostoto, celice z večjo specifično gostoto (eritrociti in granulociti) so se posedle na dno pod plast fikola, nad plastjo fikola pa ostale celice z nižjo specifično gostoto (mononuklearne celice). Nad plastjo MNC so se nahajali PBS, krvna plazma, trombociti in maščobe. Le-to plast smo previdno odpipetirali in tako odstranili supernatant do približno 1 cm nad slojem MNC. Plast mononuklearnih celic smo prenesli v novo 15-mililitrsko epruveto. Na dnu je ostala plast z eritrociti in granulociti.

3.3.2.1 Izolacija mononuklearnih celic

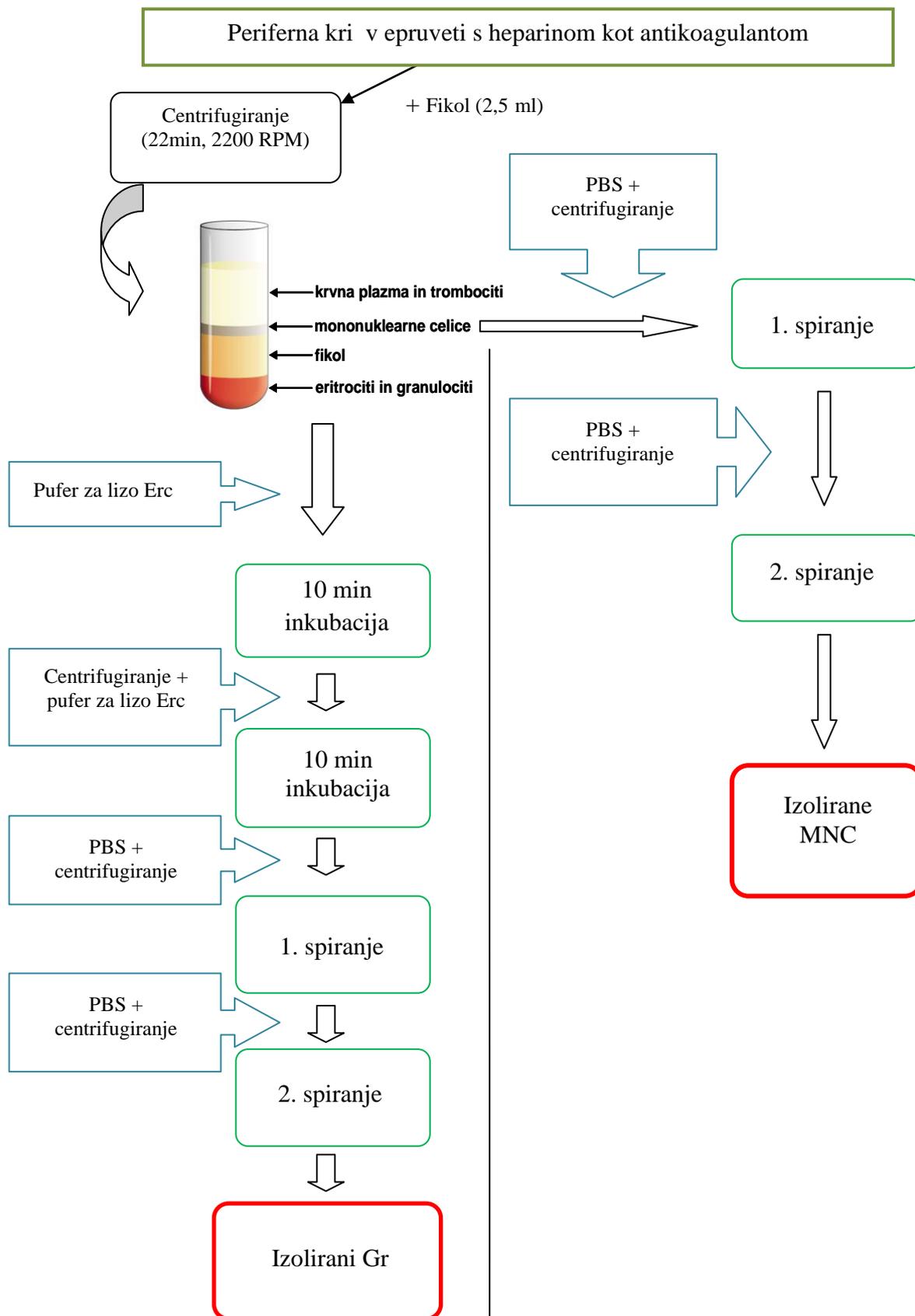
Sloj mononuklearnih celic smo previdno odpipetirali in prenesli v novo 15-mililitrsko epruveto in pri tem pazili, da smo prenesli čim manj fikola. Fikol je namreč toksičen za celice in bi nam lahko bistveno znižal število izoliranih celic. Vzorec z MNC smo dopolnili do 14 mL s hladnim 1x pufrom PBS, premešali z obračanjem in centrifugirali v hlajeni centrifugi 10 min pri 1700 obratih/min in 4°C. Supernatant smo previdno odlili in ponovili postopek, dopolnili do 14 mL s hladnim 1x pufrom PBS in centrifugirali pri enakih pogojih. Odstranili smo supernatant, celice resuspedirali v 1 mL 1x pufra PBS ter število celic prešteli s hematološkim analizatorjem. Za merjenje smo vzorec 3 x redčili. Preostanek suspenzije smo razdelili v 3 alikvote po 300 µL v 2-mililitrske epruvete in jih zamrznili do nadaljnje analize.

3.2.2.2 Izolacija granulocitov

Iz preostanka vsebine epruvet smo odstranili ves ficol. Plast, ki je ostala na dnu, je vsebovala eritrocite in granulocite. Prenesli smo jih v 50-mililitrsko centrifugirko (po eno za vsak izhodni vzorec), 15-mililitrske centrifugirke sprali z nekaj mL (3-5mL) pufra za lizo Erc, to raztopino dodali v 50-mililitrsko centrifugirko in vzorec dopolnili do 45 ml s pufrom za lizo Erc. Vzorce smo premešali z obračanjem in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo vzorce nekajkrat premešali z obračanjem, pomembno pa je bilo, da časa inkubacije nismo prekoračili.

Po lizi eritrocitov smo vzorce centrifugirali 5 min pri 1600 obratih/min, da so se granulociti posedli na dno epruvete. Supernatant smo odlili in preostanek celic raztopili v preostali tekočini, ponovno dodali pufer za lizo Erc do 25 mL in ponovili postopek inkubacije pri sobni temperaturi ter centrifugirali pri enakih pogojih.

Supernatant smo odlili, oborino raztopili v preostali tekočini in jih prenesli v novo 15-mililitrsko centrifugirko, dodali 1x pufer PBS do 14 mL, premešali z obračanjem, centrifugirali 5 min pri 1600 obratih/min ter odlili supernatant. Oborino smo resuspendirali in ponovili postopek, dodali 1x pufer PBS do 14 mL, premešali in centrifugirali pri enakih pogojih. Odstranili smo supernatant, celice resuspendirali v 1x pufu PBS ter število celic prešteli s hematološkim analizatorjem. Za merjenje smo vzorec 3 x redčili. Preostanek suspenzije smo razdelili v 3 alikvote po 300 μ L v 2-mililitrske epice in jih zamrznili do nadaljnje analize.

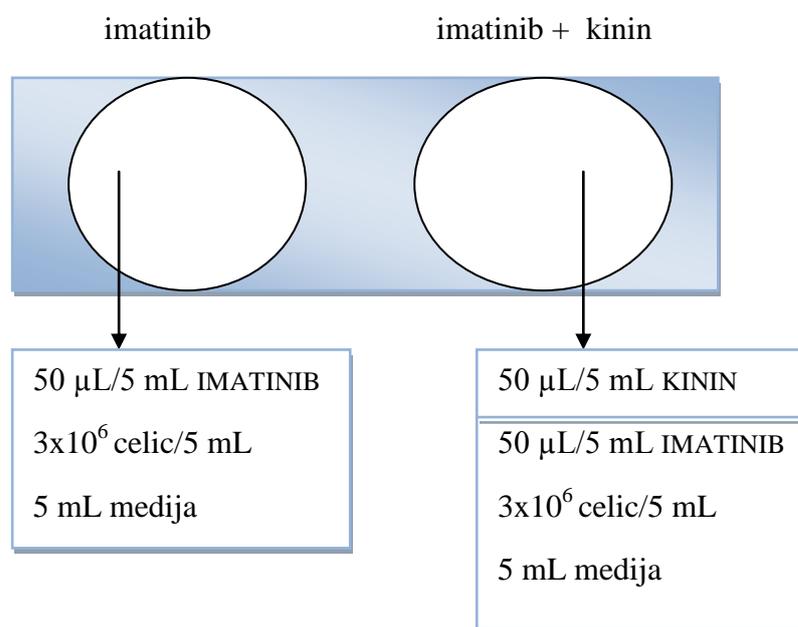


Slika 6: Izolacija celic

3.3.3 Inkubacija celic z imatinibom

Po izolaciji celic, tako Gr kot MNC, smo takoj izvedli poskus inkubacije celic z imatinibom v prisotnosti oz. odsotnosti kinina, inhibitorja OCT1, z namenom ugotavljanja znotrajcelične koncentracije imatiniba ter določanja aktivnosti OCT1 (Slika 7).

Koncentracija celic za inkubacijo je bila $3 \times 10^6/5\text{mL}$ (glede na koncentracijo izoliranih celic, smo prilagajali velikost inkubacijske plošče in dodali ustrezno količino posameznih reagentov).



Slika 7: Shema male inkubacijske plošče z dodanimi ustreznimi reagenti za inkubacijo

Celice smo 2 uri inkubirali v mediju Gibco® (Cell culture media RPMI 1640) v nadzorovanih pogojih pri 37°C, 5 % CO₂ in 95 % O₂ v vlažni atmosferi. Po inkubaciji smo medij s celicami prenesli v sterilne 15-mililitrske centrifugirke in centrifugirali 5 min pri 1600 obratih/min. Supernatant smo odlili, oborino pa raztopili v preostanku tekočine. Sledilo je ponovno spiranje, centrifugirko smo dopolnili do 14 mL z 1x PBS, premešali in centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo previdno odlili, del celic 3 x redčili in prešteli s hematološkim analizatorjem. Preostanek celic smo razdelili po 300 µL v posamezno epico in jih zamrznili pri -20°C do nadaljnje analize.

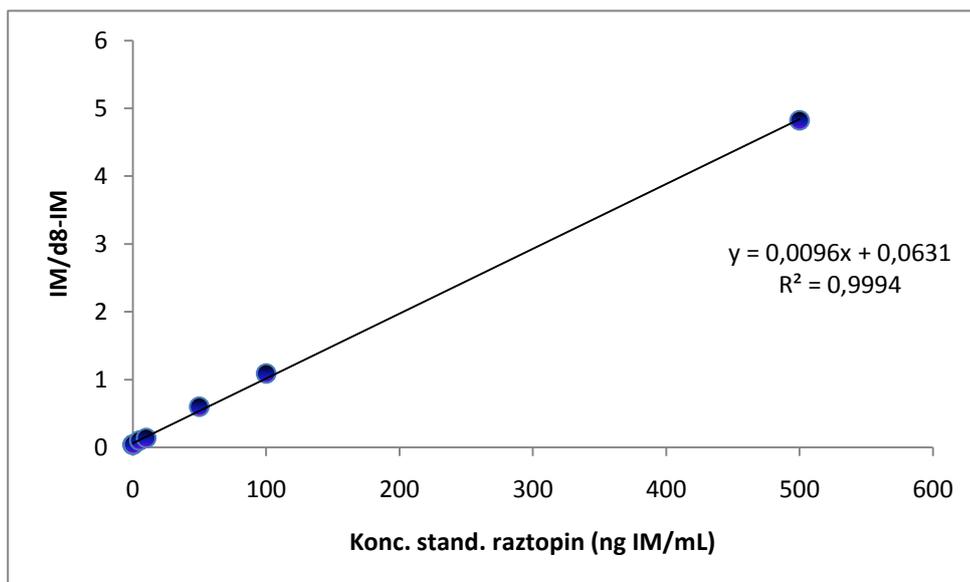
3.3.4 Liza in ekstrakcija imatiniba iz Gr in MNC

Izolirane celice, mononuklearne celice in granulocite, smo do nadaljnje analize hranili na temperaturi -20°C in jih kasneje pred lizo odtalili. Sledili smo navodilom za lizo in ekstrakcijo imatiniba pri delu z vzorci z zdravimi prostovoljci [38]. Lizo celic smo izvedli s tekočim dušikom. Suspenzijo celic smo izmenično potopili v tekoči dušik (zamrznitev) in nato v toplo vodo (odtalitev). Postopek smo ponovili 3x [39].

Po končani lizi smo izvedli stopenjsko ekstrakcijo imatiniba. Vzorcem v 2-mililitrskih epicah smo dodali 50 μL internega standarda d8-imatinib ($5\mu\text{g/L}$), 200 μL 0,2 M NaOH in 1 mL organskega topila (heksan : etilacetat = 30 : 70). Tako pripravljene vzorce smo posamezno stresali na Vortex® 1 min in jih nato v vodoravnem položaju stresali še 40 min pri 200 obratih/min na orbitalnem stresalniku. Po končanem stresanju smo epice centrifugirali 5 min pri 10 000 obratih/min v predhodno ohlajeni centrifugi na 5°C . V čiste in označene epice smo odpipetirali 800 μL organske faze in topilo odparili na Turbo Vap-u pri 45°C do suhega preostanka (15 min). Posušen ostanek smo rekonstituirali v 250 μL mešanice (4,5 mM NH_4 -formiat : MeOH = 50 : 50). Vzorce smo ponovno stresali na Vortex® 1 min 200 μL rekonstituiranega ekstrakta prenesli v inserte in sušili na Speed Vac-u do suhega (2 uri pri 45°C). Posušen ostanek smo rekonstituirali v 40 μL organske mešanice (4,5 mM NH_4 -formiat : MeOH = 80 : 20). Inserte smo prenesli v vialo in s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) izmerili odziv IM/d8-IM in z umeritveno premico $y=0,0096x+0,0631$, $R^2=0,9994$ izračunali koncentracijo imatiniba v lizatu celic (Graf 1). Znotrajcelično koncentracijo imatiniba smo preračunali z uporabljenim literaturnim podatkom o volumnu Gr ($V(\text{granulocitne celice}) = 334 \text{ fL}$) [40]. Maso IM (ng) v 1 milijonu (10^6) granulocitih smo delili z volumnom 1 milijona granulocitov v mL.

Primer izračuna:

$$\text{ICC IM} = m \text{ IM v } 10^6 \text{ celicah [ng]} / (334 \times 10^{-15} \times 10^6 \times 1000 \text{ mL})$$



Graf 1: Umeritvena premica, pripravljena na Gr, za izračun koncentracije IM v lizatu celic

Da bi poenostavili postopek smo na celični liniji K562 izvedli modifikacijo lize celic. Namesto lize s tekočim dušikom, smo za lizo uporabili steklene kroglice in homogenizator Bullet Blender® ter preverjali uspešnost lize in homogenizacije z merjenjem absorbance proteinov pri $\lambda=595$ nm, z metodo, opisano v poglavju 3.3.5. Celicam smo dodali po enako količino steklenih ali jeklenih kroglic različnega premera (priložena spatula) in stresali pri hitrosti 4 oz. 8 na homogenizatorju Bullet Blender® (Tabela 3).

Tabela 3: Vrsta kroglic, premer in hitrost pri kateri smo jih uporabili za lizo in homogenizacijo

Kroglice	Premer (mm)	Hitrost
Steklene	0,1	4
Steklene	0,1	8
Steklene	0,5	4
Steklene	0,5	8
Jeklene	0,2	4
Jeklene	0,2	8

Pri starejšem postopku ekstrakcije, ki je opisan na začetku poglavja, smo vzorce vorteksirali 1 min in potem stresali na orbitalnem stresalniku 40 min pri 200 RPM v vodoravnem položaju. V sklopu diplomske naloge nas je zanimalo, po kolikšnem času stresanja na homogenizatorju Bullet Blender® bi dobili primerljive rezultate z rezultati po orbitalnem stresanju, hkrati pa smo preverjali tudi ali lahko 1 min vorteksiranja, po

rekonstituciji v 250 μ L organske mešanice 4,5 mM NH_4 -formiat : MeOH = 50 : 50, nadomestimo s stresanjem na homogenizatorju Bullet Blender®.

Celice celične linije K562 (9×10^6 celic/mL) smo razdelili v 3 različne koncentracije (30, 150, 1000 μ L) v 2 x po 6 paralelk. Prvo paralelko smo pripravili po predpisanem postopku in nam je služila za primerjavo. Naslednje pa smo stresali na Bullet Blender® po 5, 10, 15, 20 oz. 30 minut. Prvi sklop smo ekstrahirali po klasičnem postopku, drugi sklop pa smo namesto vorteksiranja po rekonstituciji ponovno stresali na Bullet Blender® 5, 10, 15, 20 oz. 30 minut in dokončali ekstrakcijo. Med obema postopkoma smo izvedli primerjavo, saj bi nam postopek z Bullet Blender® skrajšal čas ekstrakcije.

3.3.5 Povezava med koncentracijo proteinov in številom celic

Pri zgoraj opisani metodi lize in ekstrakcije IM smo koncentracije celic določali na podlagi štetja celic. Da bi zagotovili večjo ponovljivost in zanesljivost rezultatov, smo želeli dodatno preveriti ali koncentracija proteinov linearno narašča s številom celic. Preko določanja koncentracije proteinov bi namreč lahko sklepali na koncentracijo celic brez predhodnega štetja. Poskus smo najprej izvedli na celični liniji K562 in ga potem preizkusili tudi na Gr in MNC.

Po kultivaciji celic celične linije K562 smo celice prešteli (9×10^6 /mL) in jih resuspendirali v epice na način, da smo pridobili različne koncentracije celic (1×10^6 /mL, $1,5 \times 10^6$ /mL, 3×10^6 /mL, 5×10^6 /mL, 7×10^6 /mL, 9×10^6 /mL).

Koncentracijo proteinov smo določili po postopku, ki ga predpisuje proizvajalec reagenta Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Najprej smo pripravili standardne raztopine. Osnovno raztopino BSA (2 mg/mL) smo redčili po navodilih prikazanih v Tabeli 4. Kot topilo smo uporabili enako topilo kot za pripravo vzorcev – PBS.

Tabela 4: Navodila za pripravo standardnih raztopin za merjenje absorbanca proteinov

Viala	Topilo (μL)	Volumen in vir BSA (μL)	Končna konc. BSA (μg/mL)
A	0	300 Stock	2000
B	125	375 Stock	1500
C	325	325 Stock	1000
D	175	175 iz viale B	750
E	325	325 iz viale C	500
F	325	325 iz viale E	250
G	325	325 iz viale F	125
H	400	100 iz viale G	25
I	400	0	0 (slepa)

Nato smo pripravili še delovni reagent. V kompletu za merjenje absorbanca proteinov smo dobili reagent A in reagent B. Delovni reagent smo pripravili tako, da smo reagent A in reagent B zmešali v razmerju 50 : 1. Tako pripravljena raztopina je stabilna v zaprti posodi pri sobni temperaturi.

Za posamezen vzorec potrebujemo 200 μL tako pripravljenega reagenta.

Metoda opisana v kompletu Pierce™ BCA Protein Assay Kit za kvantifikacijo proteinov temelji na kolorimetrični reakciji. V prisotnosti proteinov oz. bolj natančno peptidnih vezi poteče redukcija Cu^{2+} iona v Cu^+ ion (alkalni medij) – biuretska reakcija. Več bakrovih ionov se reducira, več jih je na voljo za tvorbo kelata med enim Cu^+ ionom in dvema molekulama BCA (ang.: *bicinchoninic acid*), bolj intenzivno obarvan je kompleks. Za nastanek vijoličnega kompleksa so odgovorne predvsem aminokislina tirozin, triptofan, cistin in cistein. Linearno območje je med 20 – 2000 μg/mL [41].

V mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali 25 μL standardnih raztopin oz. vzorcev, dodali 200 μL delovnega reagenta in stresali na stresalniku 40 minut pri sobni temperaturi. Nato smo izmerili absorbanco pri $\lambda=595$ nm. Ker so bile izmerjene vrednosti A nad vrednostmi standardnih raztopin, smo z razredčenimi vzorci – 10 μL vzorca in 15 μL PBS ponovili meritev vrednosti absorbanca.

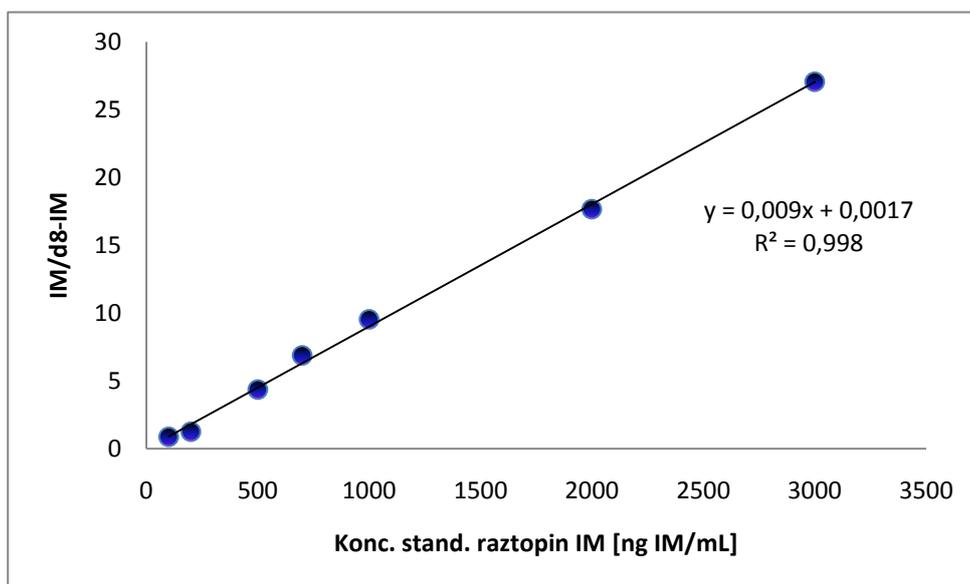
Enak postopek smo preizkusili tudi na granulocitnih in mononuklearnih celicah.

3.3.6 Ekstrakcija imatiniba iz plazemskih vzorcev

Krvno plazmo smo pridobili iz periferne krvi bolnikov s KML, ki se zdravijo z imatinibom. Zanimala nas je koncentracija imatiniba v plazmi, da bi lahko to primerjali z odmerkom in aktivnim privzemom imatiniba v celice in sklepali o vplivu na učinkovitost zdravljenja.

Najprej smo pripravili standardne raztopine z znanimi koncentracijami imatiniba, ki smo jih potem uporabili za pripravo umeritvene krivulje in izračun koncentracij imatiniba v plazmi.

V 200 μ L plazme (2 paralelki) smo dodali 50 μ L internega standarda, 20 μ L 0,2 M NaOH in 1 mL organskega topila heksan : etilacetat v razmerju 30 : 70. Tako pripravljene vzorce smo brez dodatka kroglic za homogeniziranje celic stresali na homogenizatorju Bullet Blender® 10 min pri hitrosti 8. Sledilo je hladno centrifugiranje pri 10 000 RPM 5 min pri 5°C. V nove, čiste in označene epice smo odpipetirali 800 μ L organske faze. Vzorce smo sušili 15 min pri 45 °C (Turbo Vap). Posušen ostanek smo rekonstituirali v 250 μ L organske mešanice 4,5 mM NH₄-formiat : MeOH v razmerju 50 : 50. Vzorce smo vorteksirali in jih napipetirali na mikrotitrsko ploščo in z LC-MS/MS izmerili odziv IM/d8-IM in z umeritveno premico (Graf 2) izračunali koncentracije IM v plazemskih vzorcih.

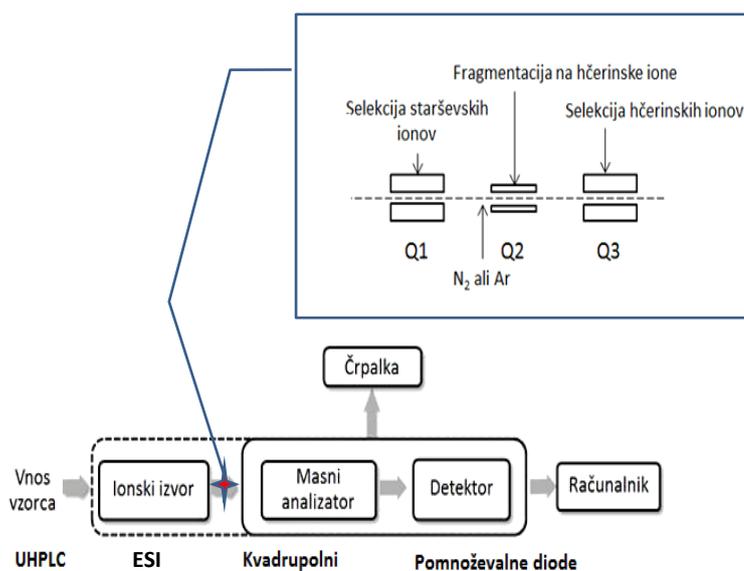


Graf 2: Umeritvena premica za izračun plazemskih koncentracij IM

3.3.7 LC-MS/MS

Za analizo vzorcev, ki smo jih pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.4 in 3.3.5, smo uporabili metodo tekočinske kromatografije sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Metoda združuje sposobnost ločevanja s tekočinsko kromatografijo in zmožnost analize z masno spektrometrijo. Metoda je izjemno selektivna, občutljiva in omogoča hitro analizo vzorcev, zato je običajno uporabljena v bioanalitiki. Z masno spektrometrijo lahko dosegamo zelo nizke meje detekcije, celo do koncentracij 1 ng/mL [42] [43].

Po končani ekstrakciji smo vsebnost imatiniba določili z LC-MS/MS aparaturo (Slika 8), ki je sestavljena iz tekočinskega kromatografa ultra visoke zmogljivosti (UHPLC ang. ultra high-performance liquid chromatography) Agilent Infinity 1290 in masnega detektorja Agilent 6460 (Agilent, Palo Alto, ZDA). Volumen injiciranja je bil 1 μ L, sledila je gradientna elucija na koloni Kinetex 50 \times 2.1 mm C18 z 2,6 μ m delci (Phenomenex, Torrance, ZDA) pri 50°C z mobilno fazo (sestava: A = 0,1% mravljinčne kisline in B = 98% acetonitril) z gradientom 10 – 50 % (delež komponente B) v 1,0 min. Uporabili smo ionski izvor JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije. Kvantifikacija imatiniba in d8-imatiniba je bila izvedena z multirezidualno analizo (MRM ang.: *multiple reaction monitoring*) s spremljanjem masnih prehodov: za imatinib m/z 494 \rightarrow 394 in za d8-imatinib m/z 502 \rightarrow 394 [43].



Slika 8: Shema masnega spektrometra (povzeto po [43])

3.3.8 Statistične metode

Podatke pridobljene v naši raziskavi, ki so predstavljeni v poglavju 4 smo statistično ovrednotili v programu Microsoft Excel 2007. Pri obravnavi nas je zanimalo, ali so med podatki statistične razlike, oz. so le-te zanemarljive.

Podatke smo vrednotili s Studentovim t-testom in ANOVA testom, glede na število parametrov, ki so nas zanimali.

Ko smo med seboj primerjali samo 2 parametra, smo najprej podatke vrednotili z F-testom, da smo ugotovili enakost oz. neenakost varianc. Če se je izkazalo, da imamo enakost varianc smo v nadaljevanju s Studentovim t-testom za enake variance preverjali statistično značilno razliko med dvema sklopoma podatkov. Če pa se je izkazalo, da so variance značilne, smo v nadaljevanju uporabili Studentov t-test za različne variance. Kot kriterij za značilnost razlike smo uporabili $\alpha = 0,05$ oz. $p < 0,05$.

Ko smo dokazali, da je t_{exp} manjši od t_{tab} in hkrati $p > \alpha$, smo potrdili enakost oz. statistično nesignifikantno razliko med posameznima parametroma. Signifikantne razlike smo potrdili, ko je bil t_{exp} večji od t_{tab} in zato $p < \alpha$.

Ko smo med seboj primerjali več parametrov in smo iskali med njimi statistično signifikantne razlike, smo uporabili test analiza varianc oz. ANOVA test [44].

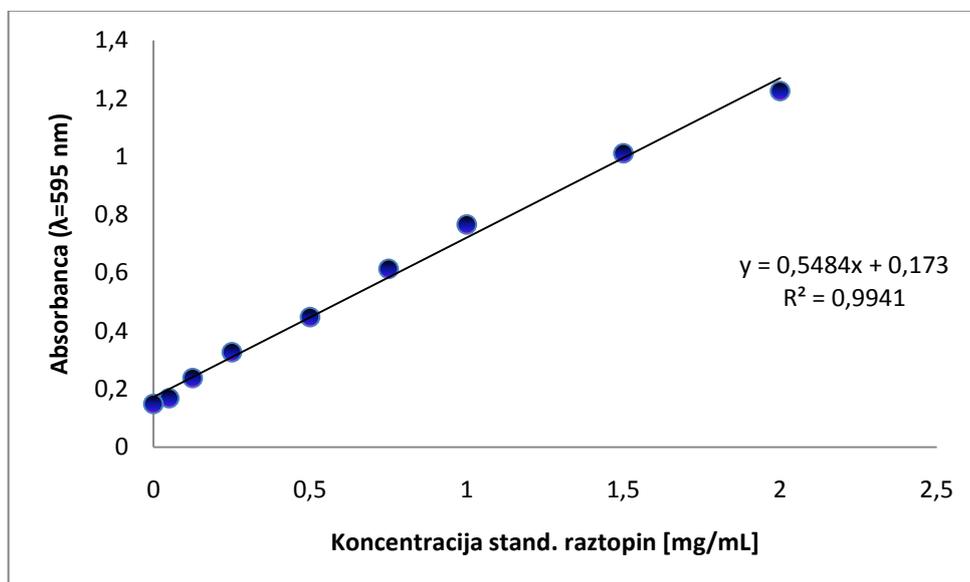
4. REZULTATI in RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA METODE

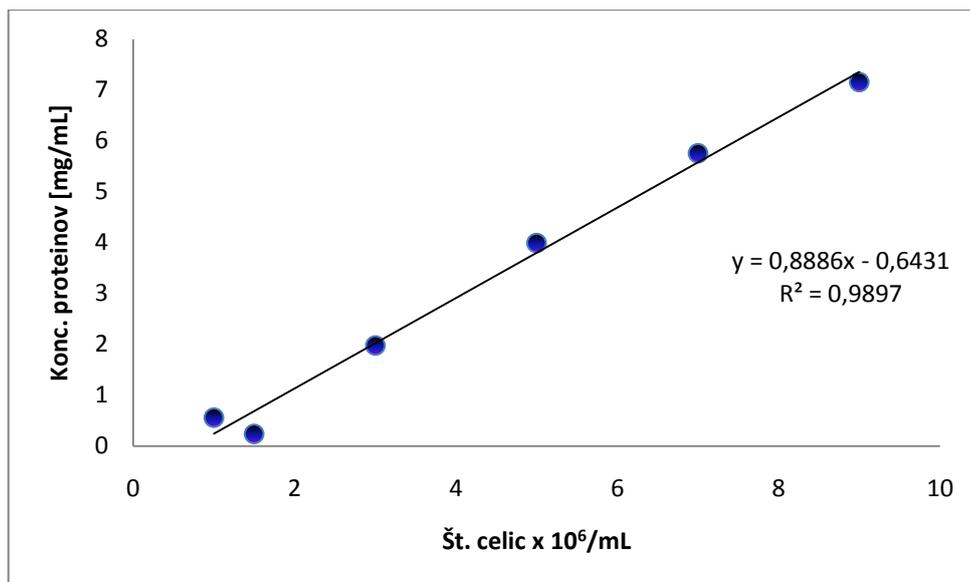
4.1.1 Povezava med številom celic in koncentracijo proteinov

Metoda, ki je bila preizkušena na zdravih prostovoljcih, predpisuje določanje koncentracije celic s štetjem. Da bi zagotovili večjo ponovljivost in zanesljivost rezultatov, smo želeli dokazati linearno odvisnost med številom celic in koncentracijo proteinov, kar bi nam služilo kot dodatna kontrola koncentracije celic pri analizi vzorcev.

Najprej smo izmerili absorbanco A ($\lambda=595$ nm) standardnim raztopinam in narisali umeritveno premico (Graf 3). Nato smo izmerili A vzorcem in izračunali koncentracijo proteinov. Ugotovili smo, da koncentracija proteinov narašča linearno ($R^2=0,9897$) s koncentracijo celic (Graf 4). Ugotovitev pa je veljala le za celično linijo K562, saj pri prenosu metode na Gr in MNC nismo dobili linearne odvisnosti med koncentracijo proteinov in številom celic. Za prenos postopka na Gr oz. MNC bi bile potrebne dodatne raziskave in optimizacija postopka za določanje koncentracije proteinov, kar pa ni bilo del te naloge. Metoda tu dopušča možnosti za dodaten razvoj v prihodnosti.



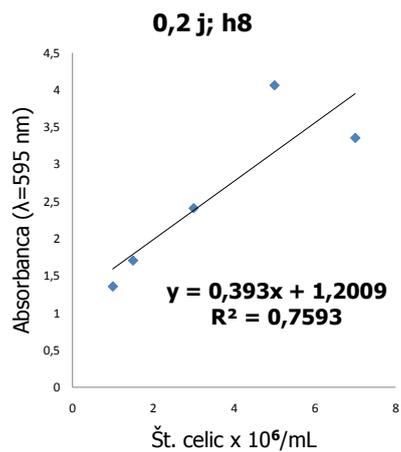
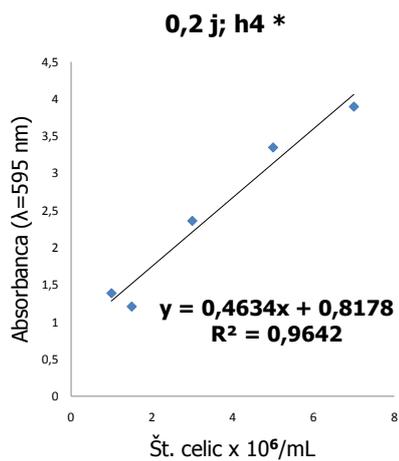
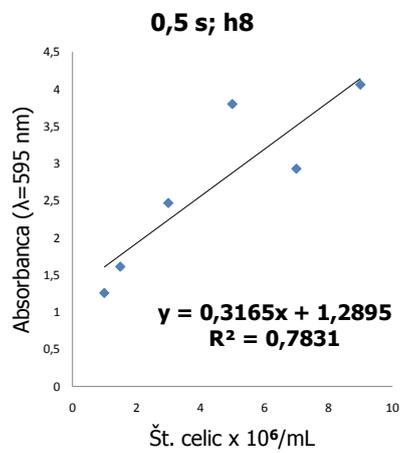
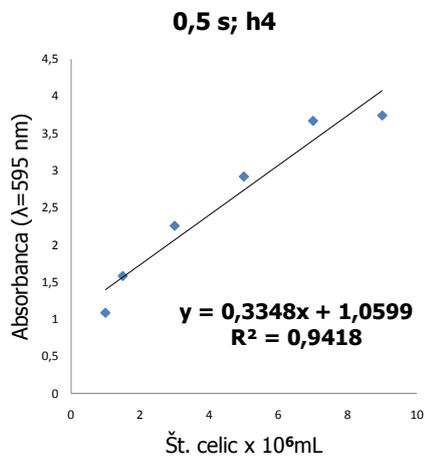
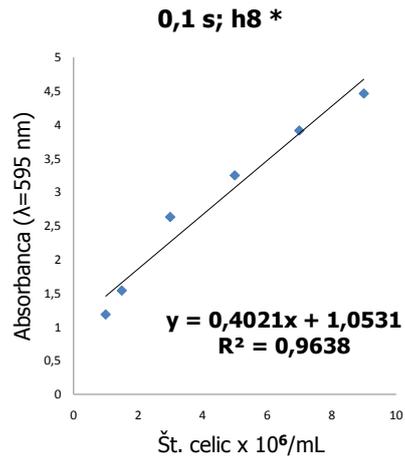
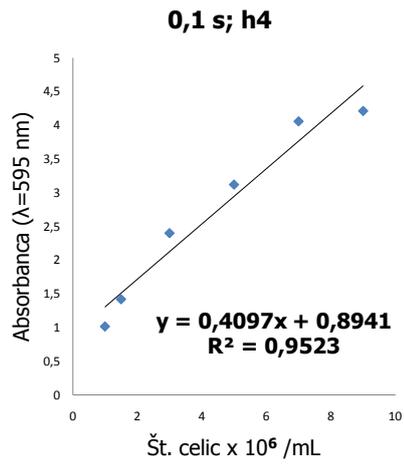
Graf 3: Umeritvena premica za določanje koncentracije proteinov na celični liniji K562



Graf 4: Odvisnost koncentracije proteinov od št. celic na celični liniji K562

4.1.2 Primerjava lize in homogenizacije v homogenizatorju s kroglicami in s postopkom zamrzovanja in odtaljevanja

Vzorci smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.4. Rezultate, ki smo jih dobili po lizi celic z izmeničnim zamrzovanjem in odtaljevanjem, smo primerjali z rezultati, ki smo jih izmerili po stresanju v homogenizatorju s kroglicami. Opazovali smo odvisnost med številom celic in izmerjeno absorbanco proteinov pri $\lambda=595\text{nm}$. Najbolj linearno povezanost med omenjenima parametroma (Graf 5) smo dobili s steklenimi kroglicami premera 0,1 mm pri hitrosti stresanja 8 ter z jeklenimi kroglicami premera 0,2 mm pri hitrosti stresanja 4. Odločili smo se za steklene kroglice, saj so manjše in bolj primerne za lizo in homogenizacijo celic, medtem ko so večje bolj primerne za homogenizacijo tkiv [45]. Lizo in homogenizacijo nadaljnjih vzorcev smo izvajali z modificirano metodo.



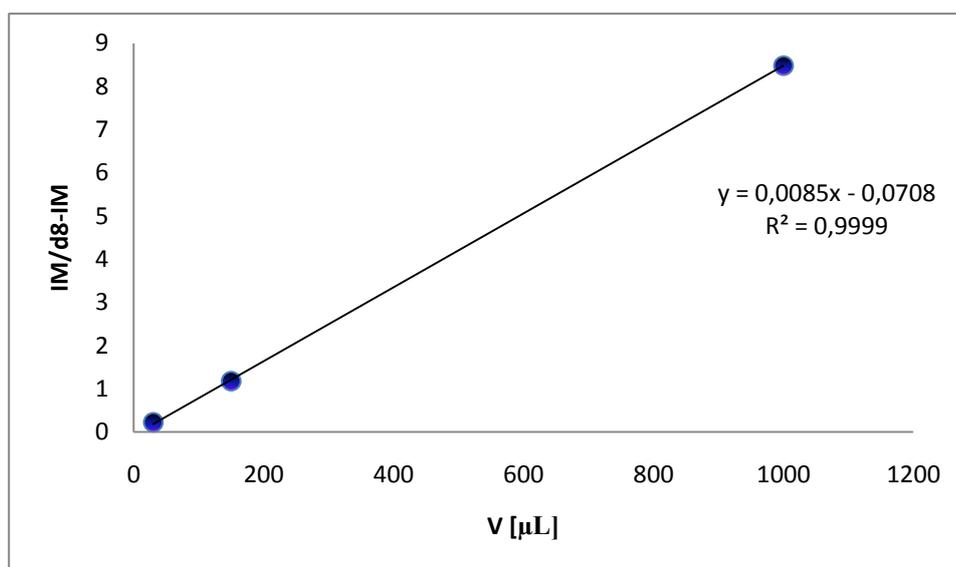
Graf 5: Primerjava učinkovitosti lize in homogenizacije pri različnih kroglicah in dveh hitrostih - 4 oz. 8. Merili smo absorbanco v odvisnosti od števila celic. h-hitrost, s-steklene kroglice, j-jeklene kroglice, * -primerne metode

4.1.3 Primerjava uspešnosti ekstrakcije pri uporabi stresalnika z orbitalnim stresanjem in stresalnika Bullet Blender®

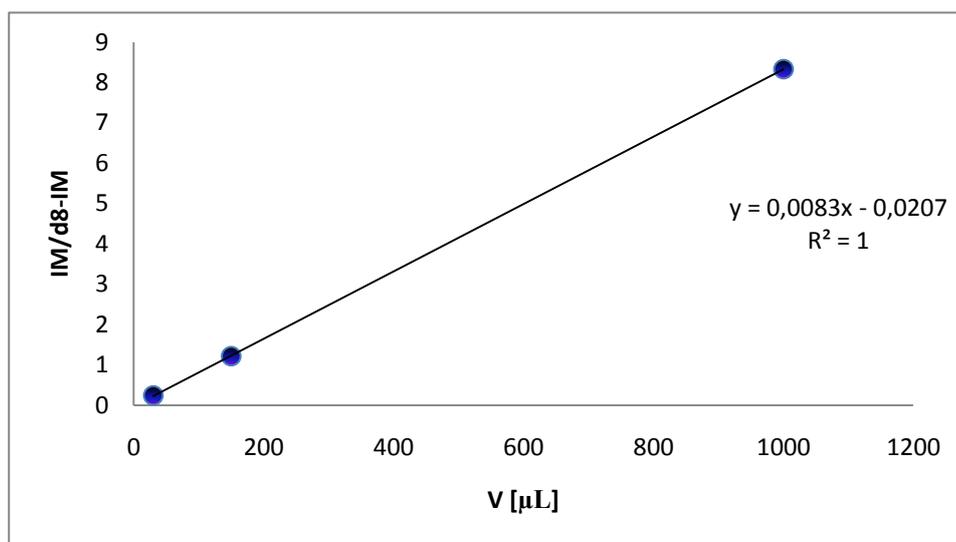
Primerjava med starejšim postopkom stopenjske ekstrakcije in modificiranim postopkom je pokazala, da je odziv na LC-MS/MS med postopkoma primerljiv.

Ugotovili smo, da lahko 1-minutno stresanje na Vortex® in 40-minutno stresanje na orbitalnem stresalniku, kar označimo kot modifikacijo metode v prvem koraku stopenjske ekstrakcije, nadomestimo s stresanjem na Bullet Blender®. Prav tako pa lahko s stresanjem na homogenizatorju Bullet Blender® nadomestimo 1 minuto stresanja na Vortex® po rekonstituciji z 4,5 mM NH₄-formiat : MeOH = 50 : 50.

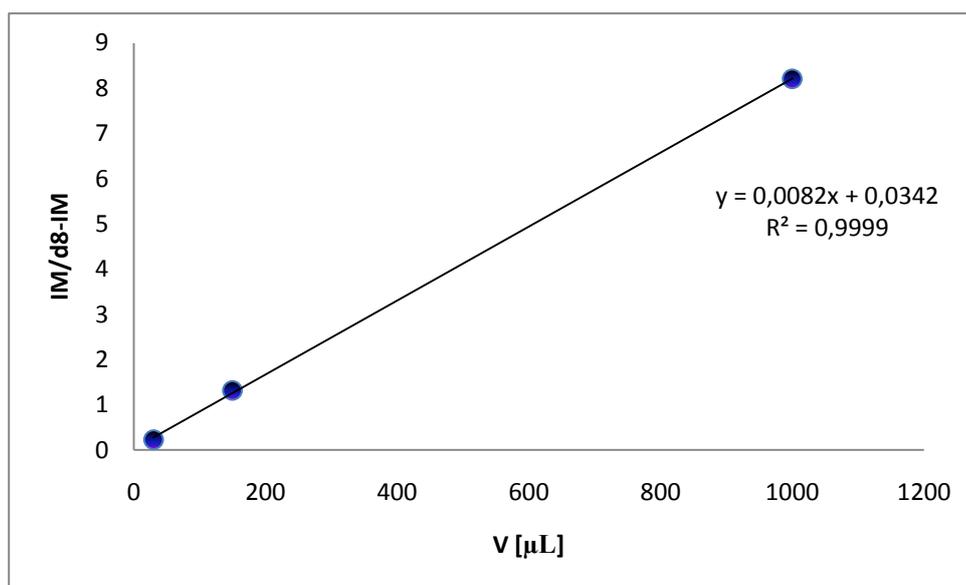
Najprej smo primerjali samo starejši postopek ekstrakcije (Graf 6) in postopek, kjer smo 1 minuto vorteksiranja in 40 minut stresanja na orbitalnem stresalniku z epicami v vodoravni legi, nadomestili s stresanjem na homogenizatorju Bullet Blender®. Zanimalo nas je, kako dolgo bi morali stresati na homogenizatorju Bullet Blender®, da bi dobili primerljive rezultate. Najboljše ujemanje smo dobili že po 5 minutnem stresanju na homogenizatorju Bullet Blender® pri hitrosti 8 (Graf 7). Da pa bi zagotovili še večjo zanesljivost, smo se vseeno odločili za 10 minutno stresanje pri hitrosti 8, kjer smo dobili ravno tako primerljive rezultate (Graf 8).



Graf 6: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji s starejšim postopkom

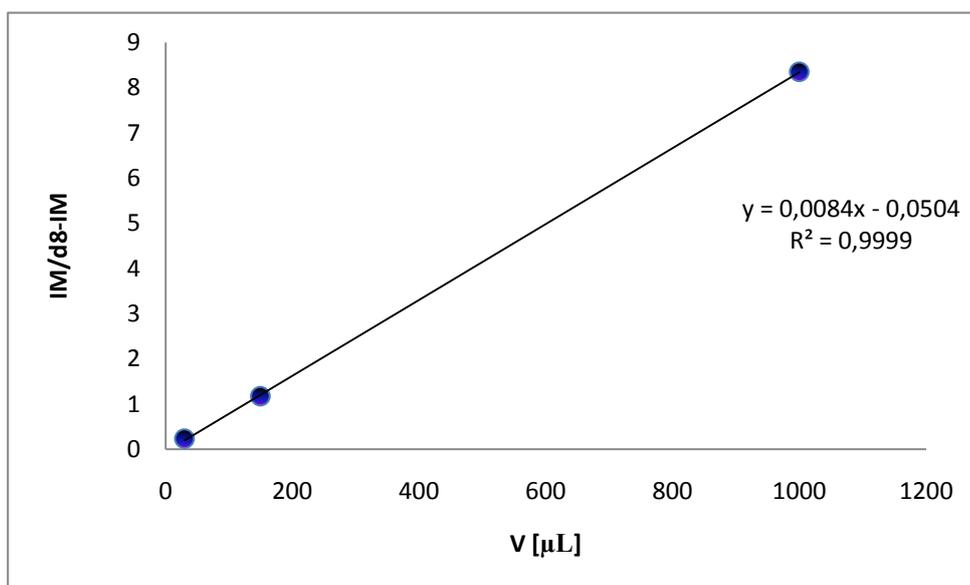


Graf 7: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji z modifikacijo v prvem koraku - stresanje pri hitrosti 8, 5 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili 1 min stresanja na Vortex® in 40 min stresanja na orbitalnem stresalniku)



Graf 8: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po ekstrakciji z modifikacijo v prvem koraku - stresanje pri hitrosti 8, 10 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili 1 min stresanja na Vortex® in 40 min stresanja na orbitalnem stresalniku)

Starejši postopek v nadaljevanju ekstrakcije predpisuje 1 minuto stresanja na Vortex® po rekonstituciji s 4,5 mM NH₄-formiat : MeOH = 50 : 50. Preverili smo primerljivost rezultatov, če stresanje nadomestimo s stresanjem na Bullet Blender®. Vzorce smo v koraku pred sušenjem na Speed Vac-u razdelili v 2 skupini. Prvo smo stresali na Vortex® 1 minuto, drugo skupino pa smo stresali na Bullet Blender® in ugotavljali pogoje, ki bi vodili do primerljivih rezultatov. Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS je bil primerljiv pri hitrosti 8 po 5 minutah (Graf 9).



Graf 9: Odziv IM/d8-IM na LC-MS/MS po modificirani ekstrakciji, stresanje pri hitrosti 8, 5 min (s stresanjem na Bullet Blender® smo nadomestili tako stresanje na Vortex®, stresanje na orbitalnem stresalniku ter zadnje stresanje pred sušenjem na Speed Vac-u)

S pridobljenimi rezultati smo dokazali primerljivost starejšega postopka ekstrakcije in modificiranega postopka. Na podlagi tega poskusa smo se odločili, da bomo ekstrakcijo vzorcev bolnikov izvajali z modificirano metodo, kjer za stresanje uporabimo homogenizator Bullet Blender®. Optimizacija je oblikovala metodo, ki je hitrejša, zagotavlja pa tudi bolj ponovljivo homogenizacijo in zato lahko predpostavimo večjo zanesljivost metode oz. rezultatov.

4.2 ŠTUDIJA NA VZORCIH BOLNIKOV S KML

4.2.1 Nivo plazemskih koncentracij glede na dnevni odmerek in vpliv na uspešnost terapije

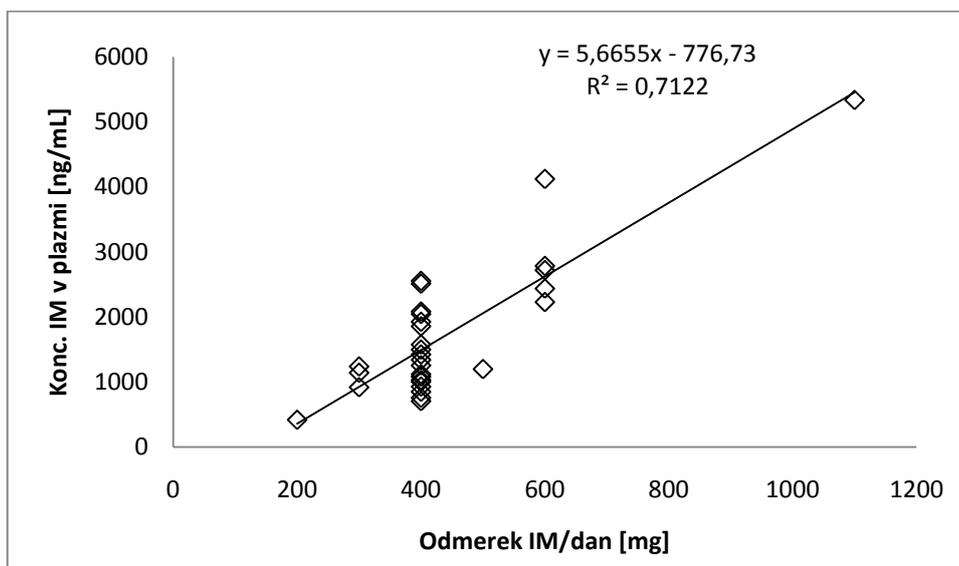
V raziskavi smo med drugim želeli preveriti odvisnost plazemskih koncentracij od dnevnega odmerka imatiniba in interindividualno ponovljivost plazemskih koncentracij. Seveda je bila koncentracija v plazmi odvisna od odmerka IM, potrdili smo tudi statistično signifikantne razlike (Tabela 5) med plazemskimi koncentracijami glede na odmerek ($p < 0,05$), vendar smo opazili veliko variabilnost, kar nam je onemogočilo enoznačno sklepanje na nivo plazemske koncentracije glede na odmerek, ki ga bolnik prejema dnevno (Graf 10). Opazili smo izjemno variabilnost med bolniki, kar potrди našo domnevo, da je pri terapiji z imatinibom potreben individualni pristop in bi bilo koristno spremljanje posameznega bolnika tudi glede na farmakokinetične parametre in ne le glede na odziv na terapijo.

Tabela 5: Statistična obdelava podatkov ANOVA za plazemsko koncentracijo IM [ng/mL] v odvisnosti od odmerka IM [mg]/dan

Odmerek [mg]	Št. bolnikov	Povp. c (IM) v plazmi	Varianca	F exp	F tab	p
200	1	417	-	14,26	2,62	1,58E-06
300	3	1099	26895			
400	19	1448	324988			
500	1	1197	-			
600	5	2857	548747			
1100	1	5335	-			

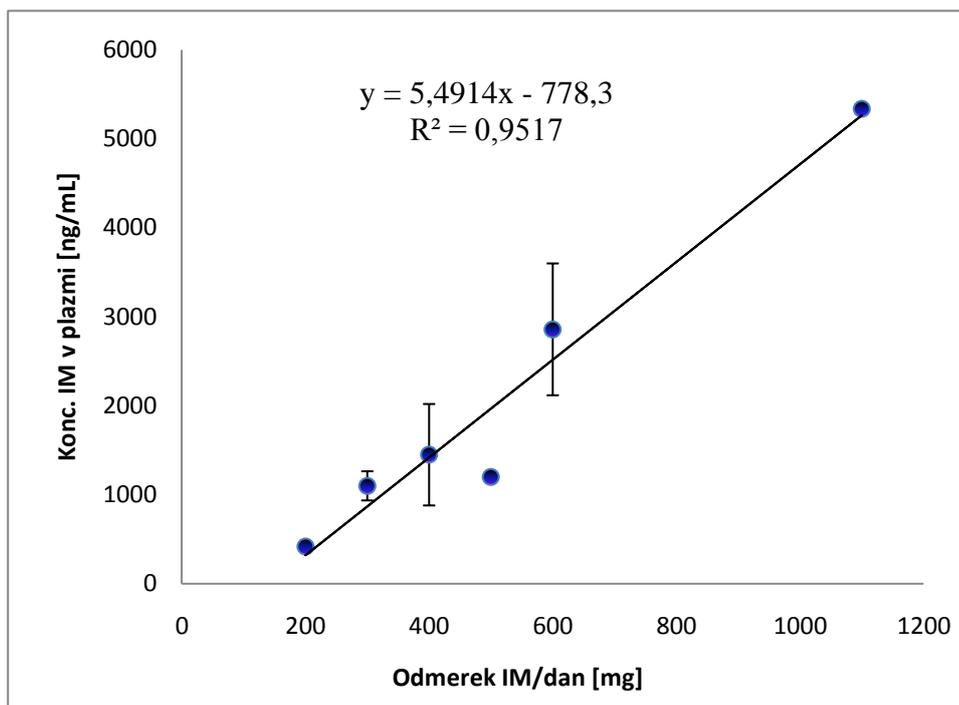
Znano je, da je imatinib dobro topen v vodi in se po *per os* aplikaciji dobro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (GIT). Večina učinkovine se absorbira v tankem črevesu. Maksimalno plazemsko koncentracijo doseže v 1 – 3,3 ure. Biološka uporabnost (BU) je 98 % in ni odvisna od prisotnosti hrane. Eliminacijski razpolovni čas je 18 h, kar je tudi razlog, da se lahko dozira samo 1x dnevno oz. 2x ob nastopu stranskih učinkov, ki so sicer redki [9]. Na Grafu 10 vidimo razpršenost podatkov, kar lahko razložimo tudi z absorpcijo, distribucijo, metabolizmom in eliminacijo. ADME lastnosti so visoko variabilni med posamezniki, kar ključno vpliva na razpršenost podatkov [20]. Imatinib se presnavlja z encimi iz družine P450, predvsem z Cyp3A4 in Cyp3A5, v manjšem obsegu pa tudi z drugimi encimi kot so Cyp2D6, Cyp2C9, Cyp2C19, kar zagotovo vpliva na koncentracijo

v plazmi, ne pa tudi nujno na učinkovitost terapije, saj je glavni presnovni produkt N-desmetil imatinib prav tako učinkovit pri inhibiciji tirozin kinaz [18] [21]. Drugi dejavniki, ki lahko še vplivajo na plazemske koncentracije IM, so prisotnost drugih bolezni in interakcije z zdravili ob sočasni uporabi [20].



Graf 10: Korelacija med vrednostjo plazemske koncentracije IM in dnevnim odmerkom IM

Na vzorcih bolnikov (n=30) smo preverili proporcionalnost odvisnosti plazemskih koncentracij od dnevnih odmerkov (Graf 11). Kljub temu da populacijsko povprečje plazemskih koncentracij nakazuje na proporcionalno odvisnost ($R^2=0,9517$), smo opazili veliko variabilnost med posamezniki, kar se ujema z rezultati, ki so jih pridobili Peng in sodelavci v raziskavi, kjer so spremljali plazemsko koncentracijo (AUC) v okviru 24 ur. Dokazali so, da plazemska koncentracija narašča proporcionalno z odmerki med 25 mg in 1000 mg IM/dan ter velike razlike med bolniki, za kar sklepajo, da je ključna presnova z encimom Cyp3A4 [46]. Sklepamo lahko, da je plazemska koncentracija odvisna od številnih dejavnikov, ki skupaj z odmerki vplivajo na koncentracijo IM v plazmi.



Graf 11: Povezava med plazemsko koncentracijo IM in odmerkom IM/dan (razpršenost podatkom smo prikazali s SD)

V nadaljevanju raziskave je sodelovalo 35 bolnikov, ki smo jih po posvetu s hematologom, razdelili na 2 skupini. V prvo skupino (n=24) smo uvrstili bolnike, ki se na terapijo dobro odzivajo, v drugo pa bolnike (n=11), ki so na terapijo slabo odzivni. Glavni kriterij delitve je bilo doseganje vsaj 4-logaritemskega zmanjšanja prepisa gena BCR-ABL, določeno z metodo RT-PCR, v 18 mesecih po začetku terapije. Skupini se med seboj nista bistveno razlikovali v povprečni starosti, spolu in trajanju terapije. Začetni odmerek je bil 400 mg. Bolnikom so med samim potekom terapije prilagajali odmerek z namenom doseganja optimalnega odziva na zdravljenje. Preverili smo povezavo med plazemskimi koncentracijami (c_{\min}) in uspešnostjo terapije. Plazemska koncentracija se je med skupinama statistično neznčilno razlikovala ($p > 0,05$). Skupina bolnikov, ki so na terapijo dobro odzivni, je v povprečju dosegala minimalno plazemsko koncentracijo $c_{\min}=1526 \pm 850$ ng/mL, skupina bolnikov, ki so na terapijo slabo odzivni pa $c_{\min}=2310 \pm 1258$ ng/mL. Višja minimalna plazemska koncentracija pri drugi skupini je posledica prejemanja višjih dnevnih odmerkov IM, ki so bili določeni s strani hematologa na podlagi nedoseganja ustreznega molekularnega odgovora. Znotraj posamezne skupine smo preverili še doseganja MMR, ki je eden od parametrov, ki ga lahko uporabimo pri spremljanju uspešnosti terapije. V prvi skupini, v kateri se bolniki na terapijo dobro

odzivajo, so MMR dosegli vsi bolniki. V skupini slabo odzivnih bolnikov pa so MMR dosegli 3 bolniki (27 %). Le-te bolnike smo kljub doseganju MMR uvrstili v skupino slabo odzivnih, ker je bilo izmerjeno le 3-log zmanjšanje prepisa gena BCR-ABL s RT-PCR ali 4-log ob hkratnem povišanju odmerka iz 400 mg IM na 600 mg IM. Preostali bolniki kljub višjim odmerkom (600 mg ali več) MMR niso dosegli.

Izmed vseh obravnavanih bolnikov je MMR v 18 mesecih ali prej doseglo 27 bolnikov (77 %), 8 bolnikov MMR ni doseglo (23 %). Povprečna c_{\min} pri bolnikih, ki so dosegli MMR je 1526 ± 630 ng/mL, pri bolnikih, ki MMR niso dosegli, pa 2005 ± 710 ng/mL. Bolniki so prejeli odmerke IM od 200 do 600 mg dnevno in se niso bistveno razlikovali med skupinama. Za lažjo primerjavo smo plazemske koncentracije preračunali glede na odmerek. Pri bolnikih, ki so MMR dosegli, je bila povprečna vrednost kvocienta med koncentracijo IM v plazmi in odmerkom [(ng/mL)/mg] IM $3,61 \pm 1,46$, pri bolnikih, ki MMR niso dosegli pa $4,16 \pm 1,03$. Razlika med povprečnima kvocientoma koncentracije IM in odmerka med bolniki, ki so dosegli MMR in tistim, ki ga niso, ni bila signifikantna ($p > 0,05$). Sklepamo lahko, da imajo bolniki dobro nadzorovano terapijo s prilagajanjem odmerkov, ki zagotavljajo ustrezne plazemske koncentracije IM. Pri primerjavi smo izpustili bolnika, ki prejema dnevno kar 1100 mg IM in kljub visokemu odmerku v 18 mesecih ni dosegel MMR. Pri vseh obravnavanih bolnikih je bil v 3 mesecih ali prej po začetku terapije dosežen hematološki ter popoln citogenetski odgovor.

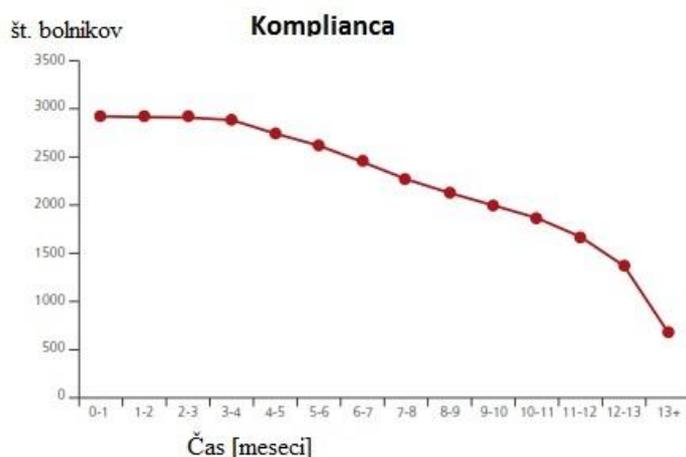
Podatki pridobljeni v naši raziskavi zaradi predhodno prilagojenega odmerjanja imatiniba niso neposredno primerljivi z ugotovitvami, ki jih je pridobil Picard s sodelavci v svoji raziskavi. Dokazali so povezavo med c_{\min} in doseganjem MMR. c_{\min} je bila signifikantno večja pri bolnikih, ki so dosegli MMR ($1452,1 \pm 649,1$ ng/mL) primerjalno na bolnike, ki MMR niso dosegli ($869,3 \pm 427,4$ ng/mL). Razlika v dnevni odmerku med obema skupinama bolnikov ni bila signifikantna. Obratno situacijo glede na literaturne podatke lahko pojasnimo z dejstvom, da so bolnikom, ki smo jih vključili v našo raziskavo, zaradi slabe odzivnosti na terapijo že predhodno povečevali odmerek.

Študije dokazujejo, da je pri odmerku 400 mg IM/dan minimalna še učinkovita koncentracija IM v plazmi $1 \mu\text{g/mL}$ [9]. Picard in sodelavci so izmerili koncentracije pri 68 bolnikih s KML in ugotovili, da je c_{\min} pri bolnikih z dnevni odmerkom 400 mg IM, $1,058 \pm 0,557 \mu\text{g/mL}$ (razpršenost podana s SD), kar smo primerjali s podatki iz naše raziskave [20]. Ugotovili smo, da je plazemska koncentracija IM (c_{\min}) pri slovenskih

bolnikih, ki prejemajo 400 mg IM/dan, $1,448 \pm 0,570 \mu\text{g/mL}$, kar je nekoliko višje od okvira vrednosti, ki jih je kvantitativno opredelila raziskovalna skupina pod vodstvom Picarda. Z našo raziskavo smo pokazali, da dovolj visoka koncentracija IM v plazmi ni zadosten dejavnik za zagotavljanje uspešne terapije. Rezultati kažejo, da se nekateri bolniki s koncentracijami v plazmi nad omenjeno minimalno učinkovito koncentracijo vseeno na terapijo slabo odzivajo.

Pri odmerkih IM, ki v plazmi ne zagotovijo dovolj visoke koncentracije učinkovine, je pogostejši pojav rezistence. Raziskave kažejo, da je pri bolnikih, ki kažejo znake sekundarne rezistence, smiselno preveriti plazemske koncentracije IM in ustrezno povečati odmerek, v kolikor se pri bolniku ne pojavijo neželeni učinki [20]. Študija, v kateri so bolniki prejemali 400 mg IM 2x dnevno, je pokazala statistično signifikantne razlike pri doseganju popolnega citogenetskega odgovora (kohortna skupina z odmerkom 2x 400 IM mg/dan je popoln citogenetski odgovor dosegla v 90 %, kontrolna skupina z odmerkom 1x 400 IM mg/dan pa v 74 %). Še večja razlika se je pokazala pri doseganju MMR (kohortna skupina je dosegla MMR v 63 %, kontrolna pa le v 38%). Izidi kontrolne skupine se ujemajo z izidi iz študije IRIS [19].

Zanimivo je tudi dejstvo, kako se sodelovanje bolnikov v terapiji zmanjšuje glede na število mesecev jemanja zdravila, kar povzroča slabši odziv na terapijo, saj v plazmi ni zagotovljena minimalna priporočena koncentracija učinkovine (Slika 9).



Slika 9: Prikaz upadanja pravilnega jemanja zdravila s časom (povzeto po [9])

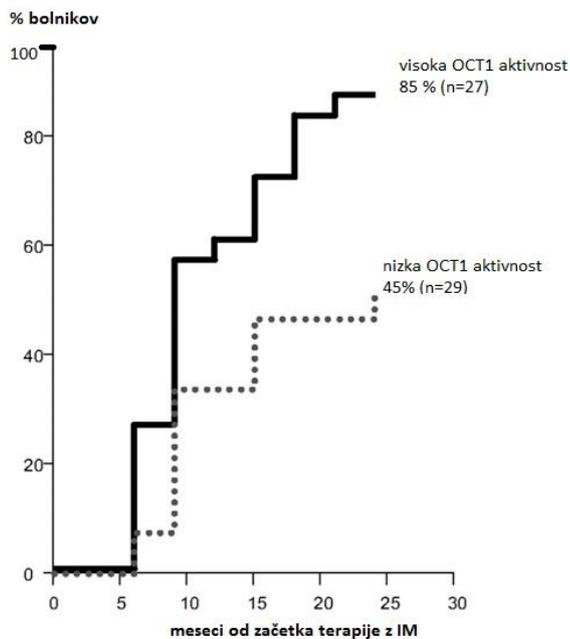
4.2.2 Aktivni privzem IM v celice in aktivnost OCT1

Del naše raziskave je bil tudi določiti aktivni privzem IM v celice *in vitro* in celično koncentracijo IM po inkubaciji v dveh celičnih frakcijah. Celice smo izolirali iz periferne krvi bolnikov s KML. Aktivni privzem IM smo določili v granulocitih in mononuklearnih celicah z inkubacijo z imatinibom v prisotnosti oz. odsotnosti kinina (K) - inhibitorja OCT1, da bi določili pri kateri celični frakciji odziv na zdravljenje najbolj sovпада z aktivnostjo OCT1. Razliko v znotrajcelični koncentraciji v prisotnosti oz. odsotnosti kinina smo poimenovali aktivnost OCT1 (Tabela 6).

Primer izračuna :

$$\text{ICC-IM (ng IM/200 000 celic)} - \text{ICC-IM+K (ng IM/200 000 celic)} = \text{aktivnost OCT1}$$

White in sodelavci so v svoji raziskavi dokazali, da bolniki, pri katerih je bila izmerjena višja aktivnost OCT1, dosegajo MMR v večjem procentu kot pri bolnikih z nižjo aktivnostjo, kar tudi prikazuje Slika 10 [24]. To smo želeli preveriti tudi mi pri slovenski populaciji bolnikov.



Slika 10: Doseganje MMR glede na visoko oz. nizko aktivnost OCT1 (povzeto po [24])

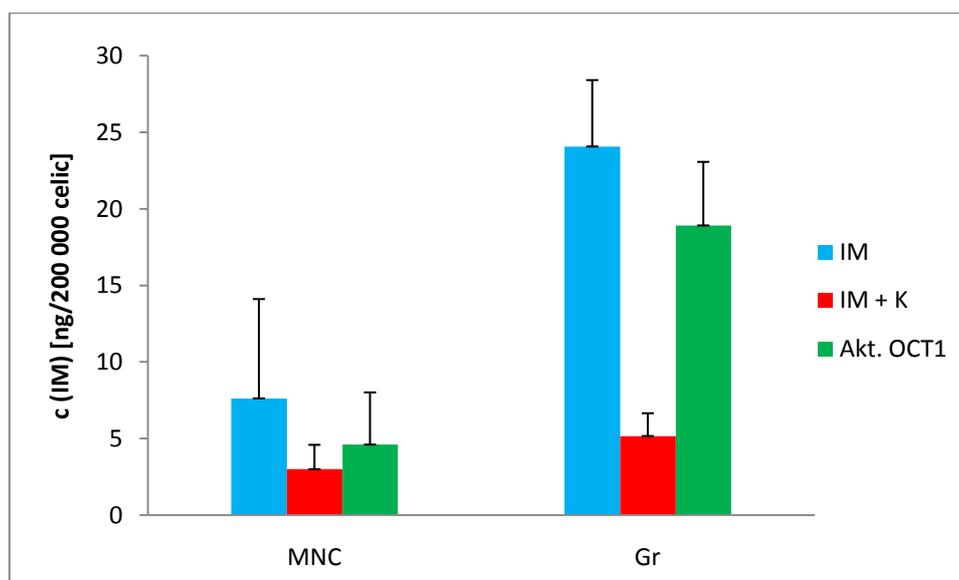
Tabela 6: Aktivni privzem IM [ng IM/200 000 celic] v MNC in Gr, določen po inkubaciji z oz. brez inhibitorja OCT1 pri posameznem bolniku. MNC-mononuklearne celice, Gr-granulociti, IM-imatinib, K-kinin, Akt. OCT1 aktivnost OCT1.

Bolnik	MNC			Gr		
	IM	IM + K	Akt. OCT1	IM	IM + K	Akt. OCT1
B1	11,42	2,47	8,95	28,92	6,26	22,66
B2	11,72	2,78	8,95	24,08	6,00	18,08
B7	4,99	2,66	2,33	31,59	7,30	24,29
B8	7,64	2,05	5,59	30,14	7,30	22,84
B9	14,90	3,41	11,49	27,21	6,09	21,12
B10	8,45	/	/	26,30	6,16	20,14
B14	9,33	3,32	6,01	24,17	5,81	18,36
B15	4,10	2,01	2,09	23,44	6,43	17,01
B18	11,34	2,35	8,99	27,54	5,17	22,37
B19	5,37	2,18	3,19	28,18	3,32	24,87
B25	4,72	1,66	3,07	23,06	6,77	16,30
B26	4,92	1,98	2,93	22,57	4,78	17,79
B29	12,76	2,64	10,13	20,90	3,91	16,99
B30	4,97	2,82	2,15	18,79	3,71	15,08
B31	4,71	2,61	2,10	22,44	2,63	19,81
B32	8,61	1,71	6,90	35,02	5,50	29,52
B33	8,23	2,04	6,19	23,73	4,30	19,42
B36	10,42	2,32	8,10	26,70	3,37	23,33
B39	5,41	4,75	0,66	34,64	5,42	29,22
B41	15,87	4,08	11,79	26,57	5,72	20,85
B43	8,92	2,71	6,21	23,00	2,90	20,10
B44	6,70	3,74	2,96	23,05	3,78	19,27
B46	6,62	4,66	1,96	22,96	4,56	18,40
B47	2,55	1,57	0,98	18,95	4,95	14,00
B16	5,76	3,24	2,52	20,55	5,59	14,97
B17	4,30	2,53	1,77	20,78	5,83	14,95
B37	8,93	2,82	6,11	20,63	3,07	17,56
B4	10,38	4,18	6,20	21,26	7,06	14,20
B5	6,90	10,39	0	23,69	9,42	14,27
B6	7,09	3,65	3,44	21,98	5,80	16,18
B12	5,78	2,46	3,32	18,78	4,78	14,00
B27	4,88	1,45	3,43	20,36	4,80	15,57
B40	9,55	4,18	5,37	24,04	3,38	20,66
B48	3,97	1,25	2,72	16,98	3,91	13,08
B53	4,47	3,16	1,31	19,49	4,79	14,70

Aritmetični sredini izmerjenih vrednosti koncentracij IM v MNC in Gr smo primerjali in podatke zbrali v spodnji tabeli. Tabela 7 prikazuje aritmetične sredine (AS), standardno napako (SD) in aktivnost OCT1.

Tabela 7: Primerjava aritmetičnih sredin koncentracij IM v MNC in Gr ter aktivni privzem IM. AS-aritmetična sredina, SD-standardna deviacija, MNC-mononuklearne celice, Gr-granulociti, Akt. OCT1-aktivnost OCT1, IM-imatinib, K-kinin.

Inkubacija	c (IM) [ng/200 000 celic]			
	AS	SD	Akt. OCT1	SD
MNC (IM)	7,62	6,49	4,60	3,41
MNC (IM+K)	2,99	1,59		
Gr (IM)	24,07	4,34	18,91	4,15
Gr (IM+K)	5,16	1,49		



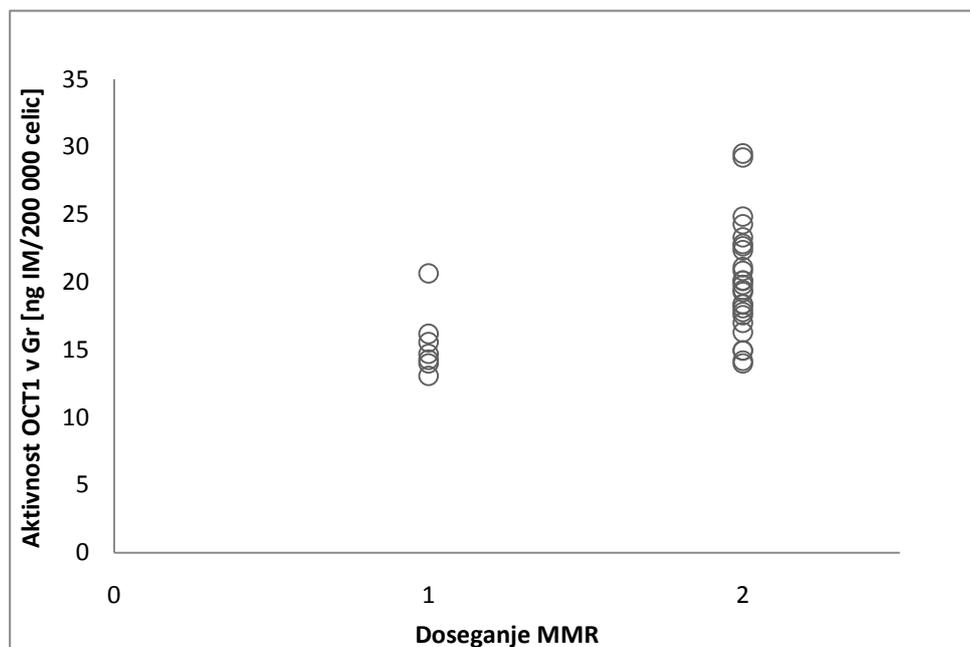
Graf 12: Primerjava aritmetičnih sredin znotrajceličnih koncentracij IM v MNC in Gr pri inkubaciji celic z oz. brez kinina. IM-imatinib, MNC-mononuklearne celice, Gr-granulociti, K-kinin, Akt. OCT1-aktivnost OCT1, (razpršenost podatkov smo prikazali s SD)

Ugotovili smo, da je povprečna ICC IM v Gr večja od povprečne ICC IM v MNC (Graf 12), hkrati pa smo dokazali statistično signifikantno razliko med aktivnim privzemom v Gr in MNC ($p < 0,05$). Boljši privzem in s tem višjo aktivnost OCT1 smo opazili v granulocitih s povprečno vrednostjo 18,91 ng IM/200 000 celic (interval 13,8 – 29,5 ng IM/200 000). V MNC je bila povprečna aktivnost OCT1 4,6 ng IM/200 000 celic (interval

0,98 – 11,79 ng IM/200 000 celic). Sklepamo lahko, da so granulociti bolj primerne celice za *in vitro* določanje aktivnosti OCT1, ki je tudi v literaturi predstavljena kot edini zanesljivi napovedni dejavnik dolgoročnega učinka terapije [47].

Želeli smo tudi preveriti, ali sama aktivnost OCT1, kot smo jo izmerili na slovenski populaciji bolnikov, vpliva na uspešnost terapije. Vsi bolniki, ki so bili vključeni v raziskavo, so bolniki v remisiji. Bolnike smo razdelili v 2 skupini. V skupino bolnikov, ki se po oceni hematologov dobro odzivajo na terapijo in skupino bolnikov, ki se na terapijo odzivajo slabše. Znotraj posamezne skupine smo ugotavljali, kako aktivnost OCT1 v granulocitih in mononuklearnih celicah sovpada z uspešnostjo terapije. Med skupinama odzivnih in neodzivnih na terapijo smo dokazali statistično signifikantno razliko aktivnosti OCT1 ($p < 0,01$). Povprečna vrednost aktivnosti OCT1 pri skupini dobro odzivnih bolnikov je 20,5 ng IM/200 000 granulocitov, pri skupini bolnikov, ki so slabše odzivni pa le 15,5 ng IM/200 000 granulocitov. Če na podatke pogledamo še nekoliko drugače, vidimo, da smo kar pri 61 % bolnikov znotraj prve skupine dokazali višjo aktivnost OCT1 od povprečne aktivnosti OCT1 v granulocitih. Pri skupini neodzivnih bolnikov pa smo dokazali, da ima kar 91 % vključenih bolnikov podpovprečno aktivnost OCT1 v granulocitih. V nadaljevanju smo preverili še aktivnost OCT1 v MNC. Povprečna vrednost v skupini na terapijo odzivnih bolnikov je bila 4,6 ng IM/200 00 mononuklearnih celic, leta pa se ni statistično signifikantno razlikovala od povprečne vrednosti v skupini s slabo odzivnimi bolniki. Delež bolnikov s podpovprečno oz. nadpovprečno aktivnostjo OCT1 v MNC v obeh skupinah je bil skoraj enak in se ni statistično razlikoval med skupinama.

V naši raziskavi smo preverili tudi ali sama aktivnost OCT1 v Gr ključno vpliva na doseganje MMR. Bolnike smo razvrstili v 2 skupini. Prva skupina (1) MMR ni dosegla, druga skupina (2) pa je MMR dosegla. Obe skupini smo opazovali znotraj časovnega intervala 18 mesecev (Graf 13).



Graf 13: Povezava med aktivnostjo OCT1 v Gr in doseganjem MMR. 1-niso dosegli MMR, 2-so dosegli MMR

Tabela 8: Statistična obdelava podatkov: t test za povezavo med aktivnostjo OCT1 in doseganjem MMR

	Skupina 1	Skupina 2
Povprečje	15,49	19,87
Varianca	6,22	16,88
Studentov t-test	p=0,003	
Sig. / Nsig.	Sig.	

Statistična obdelava pridobljenih podatkov s Studentovim t-testom je pokazala, da aktivnost OCT1 statistično signifikantno vpliva na doseganje MMR. Bolniki iz skupine 2 imajo signifikantno večjo aktivnost OCT1, kar tudi vpliva na doseganje MMR (Tabela 8).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo, da je AP imatiniba v Gr povezan z aktivnostjo OCT1 tudi pri slovenski populaciji bolnikov. Za oceno doseganja MMR, oz. učinkovitost terapije pri bolnikih, bi lahko uporabili določanje aktivnosti OCT1 kot napovedni dejavnik učinkovitosti zdravljenja z imatinibom, hkrati pa upoštevali ADME lastnosti imatiniba. Zavedati se moramo, da aktivnost OCT1 ni edini dejavnik, ki bi ga lahko upoštevali pri načrtovanju terapije, je pa zagotovo eden ključnih in bi ga bilo v prihodnosti verjetno smiselno vključiti v obravnavanje bolnikov s KML.

Dokazali smo, da imajo bolniki, ki so bili po oceni hematologa na osnovi vseh razpoložljivih podatkov vključeni v skupino bolnikov z dobrim odzivom na terapijo, višjo

povprečno vrednost OCT1 aktivnost v granulocitih, pri MNC pa za enako skupino tega ne moremo trditi. Naši rezultati se ujemajo z literaturnimi podatki, ki navajajo, da bolniki, pri katerih je bila izmerjena višja OCT1 aktivnost, dosežejo MMR v 18 mesecih ali prej ter se na terapijo pozitivno odzivajo, v večjem procentu primerjalno na bolnike z nižjo aktivnostjo OCT1. Predhodne raziskave na zdravih prostovoljcih z uporabo enake metode so prav tako pokazale, da je izražanje OCT1 pri Gr višje oz. je omenjeni prenašalec bolj aktiven [39]. Engler in sodelavci so prav tako opazovali aktivnost OCT1 pri bolnikih s KML v različnih fazah bolezni primerjalno z zdravimi prostovoljci in ugotovili, da je aktivnost OCT1 v MNC največja pri bolnikih tik po diagnozi 12,8 ng/200 000 celic, pri bolnikih v remisiji je 6,2 ng/200 000 celic in najnižja pri zdravih prostovoljcih 3,4 ng/200 000 celic [48]. Vidimo, da je povprečna aktivnost OCT1 v MNC pri bolnikih, ki smo jih vse vključili v našo raziskavo v obdobju remisije nekoliko nižja, ključno pa je dejstvo, da je OCT1 aktivnost v Gr izrazito višja od aktivnosti OCT1 v MNC v vseh obdobjih KML, s čimer lahko dodatno potrdimo, da so granulociti bolj primerne celice za določanje OCT1.

Pri bolnikih s KML v krvni sliki opazimo nezrele granulocite, ki v krvi običajno niso prisotni, in so tudi tarča delovanja imatiniba [38]. Na podlagi tega dejstva in rezultatov raziskave, ki so pokazali, da je aktivnost OCT1 večja pri granulocitih, sklepamo, da bi lahko bili granulociti primernejše celice za analizo aktivnosti OCT1 pri bolnikih s KML, ki so že daljši čas zdravljeni z imatinibom.

4.2.3 Primerjava dnevni odmerkov z aktivnostjo OCT1

V naši raziskavi je sodelovalo 31 bolnikov s KML v fazi remisije, ki prejemajo različne odmerke IM. Bolnike smo razdelili v 4 skupine glede na dnevni odmerek IM, ki ga prejemajo. Iz periferne krvi smo izolirali MNC in Gr, ter določili OCT1 aktivnost v posamezni skupini celic. Podatki so zbrani v Tabeli 9.

Tabela 9: Vrednosti OCT1 aktivnosti v MNC oz. Gr glede na dnevni odmerek IM

Odmerek pri MMR	300 mg	400 mg	600 mg	1100 mg
Št. bolnikov	1	22	7	1
OCT1 akt. v MNC	0,63	4,72	5,45	4,87
OCT1 akt. v Gr	29,20	19,49	16,88	14,27

Tabela 10: Statistična obdelava podatkov ANOVA za aktivnost OCT1 v Gr pri različnih odmerkih IM/dan

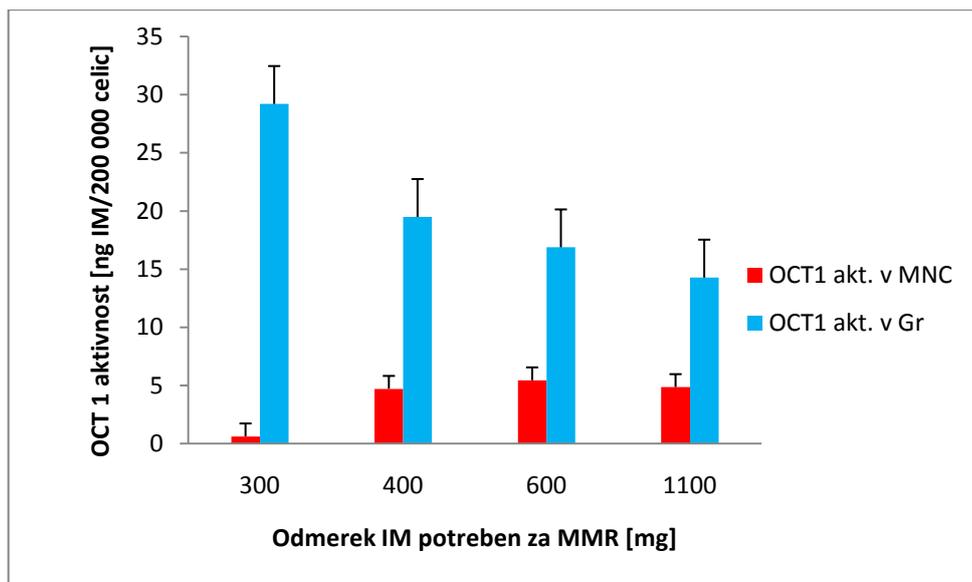
Odmerek [mg]	Povprečje	Varianca	F exp	F tab	p
300	29,20	-	3,66	2,96	0,025
400	19,49	17,60			
600	16,88	5,24			
1100	14,27	-			

Tabela 11: Statistična obdelava podatkov ANOVA za aktivnost OCT1 v MNC pri različnih odmerkih IM/dan

Odmerek [mg]	Povprečje	Varianca	F exp	F tab	p
300	0,63	-	0,73	2,96	0,54
400	4,72	9,30			
600	5,45	8,15			
1100	4,87	-			

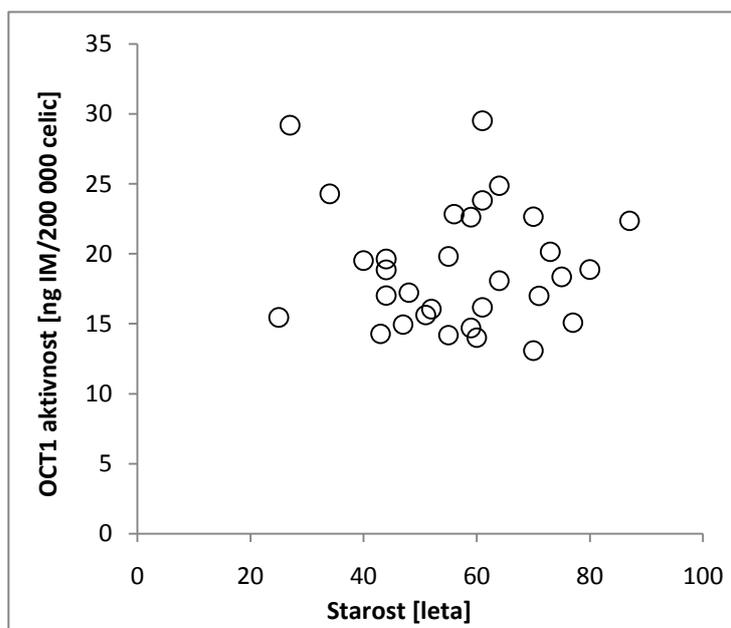
Pridobljene podatke smo statistično ovrednotili (Tabela 10, 11) in ugotovili, da se aktivnost OCT1 v Gr signifikantno razlikuje med odmerki ($p < 0,05$), medtem ko v MNC signifikantne razlike ne potrdimo ($p > 0,05$). Skladno z literaturnimi podatki in našimi pričakovanji smo opazili v Gr manjšo aktivnost OCT1 pri bolnikih, ki morajo za vzdrževanje ustreznega odgovora prejemati višje odmerke in večjo aktivnost OCT1 pri bolnikih, ki prejemajo nižje odmerke. Pri MNC tega trenda ne opazimo (Graf 14). Ker zreli Gr dejansko niso tarča delovanja IM, se moramo zavedati, da gre za nadomestno populacijo celic, ki je dovolj preprosto dostopna za izvedbo meritev, hkrati pa se aktivnost OCT1 v teh celicah očitno dobro ujema z aktivnostjo OCT1 v tarčnih levkemičnih celicah.

Izsledki naše raziskave bi lahko pripomogli k zgodnejši individualizaciji terapije pri na novo odkritih primerih bolnikov s KML, saj bi z *in vitro* izmerjeno aktivnostjo OCT1 lahko hitreje določili okvirni ustrezni odmerek, s čimer bi lahko skrajšali čas potreben za doseg MMR in se izognili morebitnih stranskim učinkom oz. nezadostnim odmerkom. Tudi pri bolnikih, ki se že zdravijo, vendar ne dosegajo optimalnega učinka, bi s tako raziskavo lahko potrdili potrebo po povečanem odmerku. Podobno je dokazala tudi White s sodelavci, da so bolniki z izmerjeno višjo aktivnostjo OCT1 dosegli MMR neodvisno od odmerka, medtem ko je bilo doseganje MMR pri bolnikih z nizko aktivnostjo pogojeno z dnevnim odmerkom IM [27].



Graf 14: Primerjava aktivnosti OCT1 v MNC in Gr pri bolnikih s KML (razpršenost podatkov smo prikazali s SD)

Na podlagi zgoraj navedenih podatkov o večji aktivnosti OCT1 v Gr in obratno sorazmerni povezavi med aktivnostjo OCT1 in odmerkom smo se odločili, da bomo nadaljnje raziskave delali le na celicah Gr. Zanimala nas je korelacija med starostjo in aktivnostjo OCT1 in morebitno zmanjševanje aktivnosti OCT1 z leti, kar bi tudi lahko pripomoglo pri načrtovanju terapije. Na populaciji bolnikov, ki smo jih vključili v raziskavo, smo ugotovili, da ni povezave med aktivnostjo OCT1 in starostjo bolnikov (Graf 15) ter posledično ne moremo sklepati o vplivu starosti na višino odmerka za doseganje MMR.

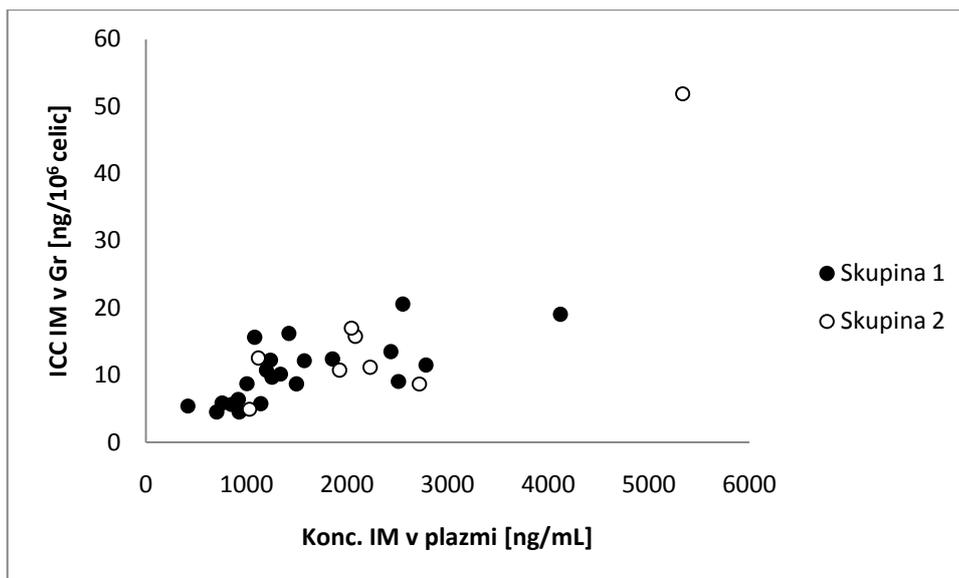


Graf 15: Povezava med aktivnostjo OCT1 in starostjo bolnikov

4.2.4 Primerjava ICC IM v Gr s plazemsko koncentracijo IM

Privzem oz. vstop učinkovine v tarčno celico in ustrezna znotrajcelična koncentracija sta pogoj za ugoden klinični rezultat oz. uspešno terapijo. V naši raziskavi smo želeli preveriti povezavo med ICC IM in plazemskimi koncentracijami ter sklepati o aktivnosti OCT1. Za lažjo primerjavo koncentracij IM v plazmi in ICC IM v Gr smo preračunali koncentracijo imatiniba s pomočjo literaturnih podatkov o volumnih posameznih tipov celic - volumen Gr je 334 fL [40]. Z našo raziskavo smo ugotovili, da znotrajcelična koncentracija IM v Gr narašča s plazemsko koncentracijo, vendar opazimo visoko variabilnost med bolniki. Variabilnost je najverjetneje posledica aktivnih procesov, ki sodelujejo pri vstopu IM v celico. Sklepamo lahko, da IM ne vstopa v celico samo z aktivnim prenosom, temveč tudi z olajšano in čisto difuzijo, kar potrdimo z zanesljivim trendom naraščanja koncentracije IM v Gr s plazemsko koncentracijo (Graf 16). Kljub variabilnosti lahko sklepamo, da bi vrednosti plazemske koncentracije lahko uporabili kot dober napovedni dejavnik za znotrajcelično koncentracijo IM v Gr.

V nadaljevanju smo bolnike zopet razdelili v dve že omenjeni skupini dobro odzivnih (skupina 1) in na terapijo slabo odzivnih bolnikov (skupina 2). Ugotovili smo statistično nesignifikantno razliko koncentracij IM v Gr med skupinama (Graf 16), kar lahko razloži dejstvo, da zreli granulociti niso prvotna tarča delovanja IM, saj le-ta usmerjeno deluje na levkemične celice z Bcr-Abl tirozinsko kinazo. Koncentracija IM v Gr pri bolnikih z neoptimalnim odzivom na zdravljenje je bila 11,5 ng IM/10⁶ celic, pri bolnikih, ki se na terapijo dobro odzivajo pa 10,0 ng IM/10⁶ celic. Vrednosti so odraz dejstva, da bolniki, ki se na terapijo slabše odzivajo, dobivajo višje dnevne odmerke IM in s tem dosežejo ustrezno plazemsko koncentracijo.

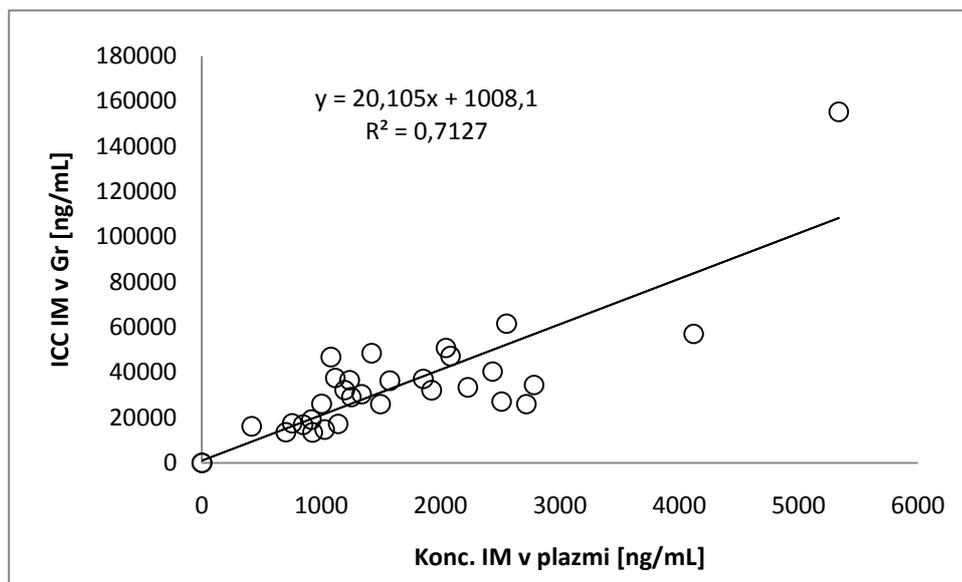


Graf 16: Primerjava ICC IM v Gr glede na plazemsko koncentracijo med bolniki, ki se na terapijo dobro odzivajo (skupina 1) in bolniki, ki se na terapijo slabo odzivajo (skupina 2)

Iz naklona regresijske premice na Grafu 17 lahko tudi vidimo, da je ICC v Gr povprečno 22x večja od koncentracije IM v plazmi, kar pa je najverjetneje predvsem posledica aktivnega transporta IM v celice, s katerim Gr kopičijo učinkovino v znotrajceličnem prostoru. Transport IM skozi membrano prek OCT1 je aktivni proces, ki za prenos molekul potrebuje energijo, saj poteka v smeri večje koncentracije molekul. Vir energije pri tem aktivnem prenosu predstavlja gradient protonov, ki omogoča antiport z IM. Ker je znotrajcelična koncentracija protonov višja, glede na okolico, se protoni prenašajo iz celice in s tem omogočajo prehod IM v celico [49]. Na razliko v koncentraciji IM v plazmi in ICC v Gr pa lahko vpliva tudi sama vezava IM na proteine, ki se razlikuje med plazemskimi in znotrajceličnimi proteini [50]. Povečana ICC IM v Gr je lahko tudi posledica dejstva, da je IM sicer res substrat, vendar hkrati tudi inhibitor celičnih prenašalcev, odgovornih za izločanje učinkovine. Dokazali so, da ICC IM višja od 0,8 μM popolnoma inhibira delovanje Bcrp prenašalcev in s tem prepreči izločanje učinkovine iz celic s tem prenašalcem, kar bi lahko prispevalo k povečani akumulaciji IM v celici [51].

Imatinib je sicer dokazano substrat vsaj treh prenašalcev. Vstop IM v celico poteka z OCT1 iz družine SLC. Za izločanje pa sta odgovorna P-gp in Bcrp iz družine ABC prenašalcev [21]. Vpliv OCT1 (hkrati tudi OCT2, ker so predvidevali, da je imatinib tudi substrat za OCT2) so dokazali tudi z mišmi z izbitima genoma za omenjena prenašalca

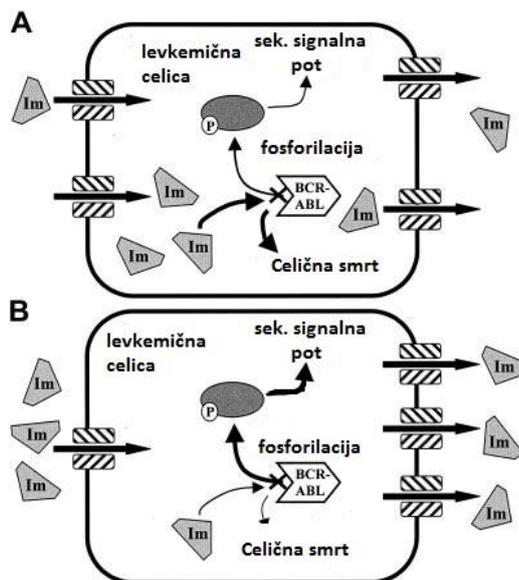
(OCT 1/2^{-/-}). Opazovali so plazemsko koncentracijo, ki je bila pri miših z izbitima genoma višja (učinkovina se je zadrževala v plazmi, ker OCT1 ni bil izražen) kot pri divjem tipu (učinkovina je normalno prehajala preko OCT1), Vd pa nižji. Razlika med obema skupinama miši se je ob dodatku inhibitorja OCT1 izničila [32].



Graf 17: Odvisnost ICC IM v Gr od plazemskih koncentracij IM

4.2.5 Vpliv aktivnosti OCT1 na ICC IM v Gr

Mnoge raziskave vključno z našo so pokazale, da je aktivnost OCT1 lahko eden od dejavnikov, ki vplivajo na bolnikov odziv na terapijo in njegova zmanjšana aktivnost oz. neaktivnost je lahko tudi eden od vzrokov za nedoseganje uspešnega odziva ali rezistence. Na ICC pa lahko vplivajo tudi drugi prenašalci, ki lahko črpajo učinkovino iz celice, predvsem njihovo izražanje ter aktivnost [23].



Slika 11: Vpliv izražanja prenašalcev na pojav celične smrti (prirejeno po [23])

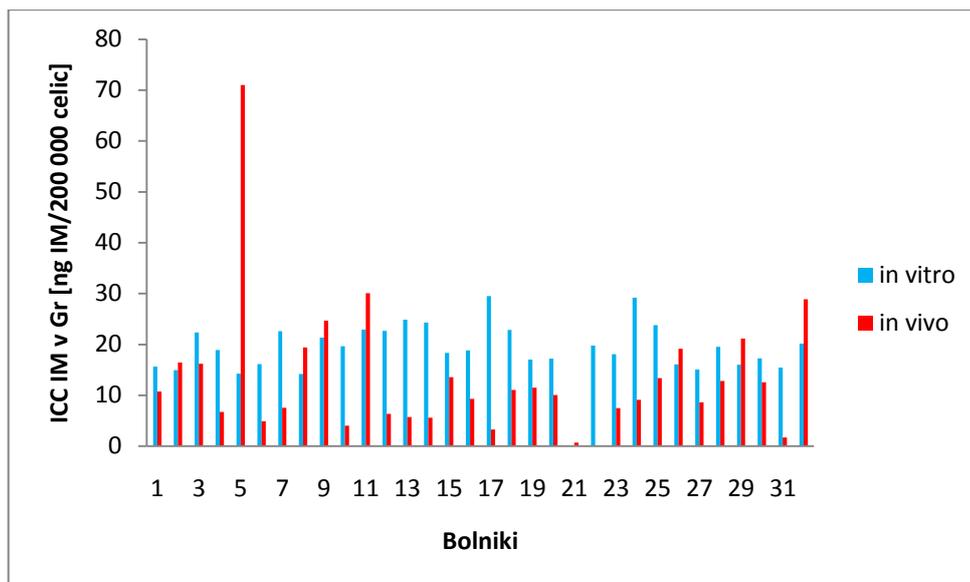
Pri normalnem izražanju prenašalcev za vstop in izstop učinkovine (Slika 11, primer A) je koncentracija imatiniba v celici dovolj visoka, da IM z vezavo v aktivno mesto Bcr-Abl fuzijskega proteina prepreči fosforilacijo, kar vodi do celične smrti. Pri zmanjšanem izražanju prenašalcev za privzem imatiniba (družina SLC, kamor spada tudi OCT1) oz. pri prekomernem izražanju prenašalcev za izločanje (družina ABC) je znotrajcelična koncentracija lahko prenizka (Slika 11, primer B) in ne pride do popolne inhibicije fosforilacije, kar omogoča, da celica preživi preko sekundarne signalne poti [23].

Osredotočili smo se na OCT1 prenašalec, ki omogoča prenos učinkovine skozi membrano v celico [21]. Predhodne raziskave niso enotne o vplivu OCT1 na prehod učinkovine v celice. Hu in sodelavci so na različnih celičnih linijah dokazali, da privzem imatiniba ni nujno odvisen od aktivnosti OCT1 [52], medtem ko so v istem času Wang in sodelavci dokazali povezavo med povečanim izražanjem OCT1 in povečanim privzемом učinkovine v celice ter doseganjem popolnega citogenetskega odgovora [25].

V naši raziskavi smo zajeli vzorec 35 bolnikov in preučili korelacijo med aktivnostjo OCT1, ki smo jo določili *in vitro* na izoliranih granulocitnih celicah in ICC IM v Gr, glede na dnevni odmerek IM, ki smo jo določili *in vivo* iz periferne krvi bolnikov s KML, ki se zdravijo z imatinibom. Ugotovili smo, da je znotrajcelična koncentracija IM v Gr povprečno 180 krat višja (povprečna ICC IM v Gr $360 \pm 65 \mu\text{g/mL}$; interval 254 – 524 $\mu\text{g/mL}$) od same koncentracije v zunajceličnem mediju (2 $\mu\text{g/mL}$), kar nakazuje na

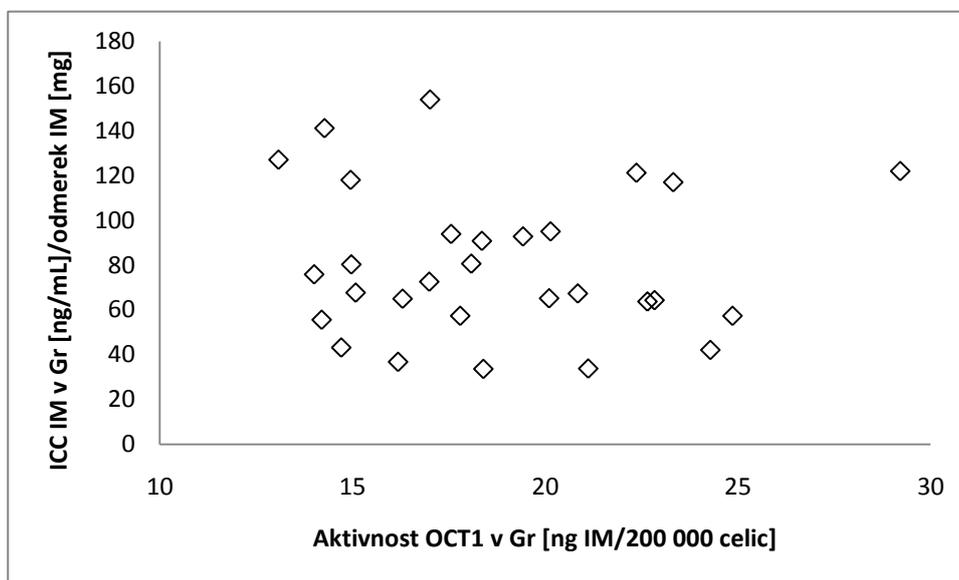
ogromen privzem IM v celico. Na podlagi tega dejstva lahko sklepamo, da bi lahko že manjše spremembe koncentracije IM v plazmi zelo vplivale na samo znotrajcelično koncentracijo, zato je pomembno, da se odmerke in plazemske koncentracije skrbno načrtuje.

V nadaljevanju smo primerjali določeno ICC IM v Gr pri *in vivo* stanju in izmerjeno ICC v Gr pri *in vitro* modelu. Ugotovili smo, da ICC v Gr *in vivo* ni enaka ICC v Gr po inkubaciji z imatinibom *in vitro* in opazili tudi veliko intervariabilnost. Na Grafu 18 vidimo, da ima 26 bolnikov *in vitro* izmerjeno večjo ICC IM v Gr, štirje bolniki imajo večjo ICC IM v Gr *in vivo*, pri 5 bolnikih pa meritev zaradi tehničnih težav ni bila mogoča. Sklepamo lahko, da ne moremo enostavno prenesti pridobljenih ugotovitev iz *in vitro* modela na izoliranih celicah na *in vivo* pogoje pri bolnikih. Razlike najverjetneje povzročajo različni pogoji, ki so jim celice izpostavljene - fiziološki pogoji v krvi posameznikov se razlikujejo od standardiziranih pogojev ustvarjenih *in vitro* z medijem za inkubacijo celic z IM. Eden možnih razlogov za razliko med ICC IM v Gr *in vivo* in *in vitro* je porazdelitev IM v telesu oz. volumen distribucije (Vd), ki za imatinib znaša 435 L zaradi visoke afinitete do tkiv in vezave na plazemske proteine, predvsem na α 1-kisli glikoprotein in albumin [21]. Veže se ga 95% in le 5% ostane prostega v plazmi, ki predstavlja frakcijo, ki lahko prehaja v celice, medtem ko je pri *in vitro* pogojih v mediju koncentracija prisotnih proteinov nižja [18]. V literaturi zasledimo, da je pri bolnikih s KML zaznati povečano koncentracijo α 1-gp, kar bi lahko dodatno pojasnilo zmanjšano ICC IM v Gr pri *in vivo*, vendar so mnenja deljena, saj različne raziskave niso enoznačno potrdile povečane koncentracije α 1-gp pri bolnikih s KML. Raziskave tudi dokazujejo, da naj bi se sama koncentracija α 1-gp ob vzpostavitvi terapije z IM in dosega stabilnega stanja znižala na normalno vrednost [50]. Na vezavo na proteine naj bi vplivala tudi starost in spol, le-ta dejavnika pa sta pri *in vitro* pogojih izključena [15].



Graf 18: Primerjava ICC IM v Gr med *in vivo* in *in vitro* pogoji

Da bi izničili vpliv odmerka in posledično plazemskih koncentracij na ICC IM v Gr smo vrednosti ICC IM v Gr preračunali na mg IM/dan ter preverili povezavo med ICC v Gr glede na odmerek posameznega bolnika in aktivnostjo OCT1. Med primerjanima parametroma nismo opazili korelacije (Graf 19).



Graf 19: Korelacija med *in vivo* privzecom IM v Gr in *in vitro* izmerjeno aktivnostjo OCT1

S pomočjo metode, ki je bila predhodno razvita in v tej diplomski nalogi optimizirana, bi lahko omogočili predpisovanje ustreznega odmerka že ob samem začetku terapije. Določanje aktivnosti OCT1 bi lahko uporabili kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja z imatinibom, morda pa tudi kot pomoč pri izboru terapije z imatinibom oz. s TKI druge generacije kot sta dasatinib in nilotinib. Na ta način bi lažje izbrali ustrezno terapijo za posameznega bolnika in prej določili ustrezni odmerek za doseganje MMR ter tako izboljšali učinkovitost zdravljenja.

5. SKLEP

5.1 OPTIMIZACIJA METODE

Preverjali smo linearno odvisnost med koncentracijo proteinov in številom celic, kar bi nam služilo kot dodatna kontrola pri določanju koncentracij celic. Linearno odvisnost smo dokazali le pri celični liniji K562, medtem ko pri prenosu metode na Gr in MNC odvisnost ni bila linearna.

Primerjava med postopkom lize celic K562 s tekočim dušikom in modificirano metodo, kjer smo za lizo in homogenizacijo celic namesto tekočega dušika uporabili steklene kroglice premera 0,2 mm in hitrost stresanja 8 na homogenizatorju Bullet Blender®, je pokazala, da so rezultati povsem primerljivi. Dokazali smo, da lahko tudi postopek ekstrakcije skrajšamo in poenostavimo z uporabo homogenizatorja Bullet Blender® namesto stresanja posamičnih epic na orbitalnem stresalniku oz. na Vortex®. V nadaljevanju smo pri analizi vzorcev bolnikov s KML uporabili optimizirano metodo.

5.2 PREGLED DEJAVNIKOV, KI BI LAHKO BILI POVEZANI Z USPEŠNOSTJO TERAPIJE

Z raziskavo smo potrdili linearno povezavo med plazemsko koncentracijo in odmerki med 200 mg in 1100 mg IM/dan, vendar se kaže tudi velika variabilnost med bolniki. Plazemska koncentracija, normirana glede na dnevni odmerek IM, se ne razlikuje signifikantno med skupinama dobro odzivnih in slabo odzivnih bolnikov.

Z inhibicijo s kininom smo dokazali višjo aktivnost OCT1 v Gr glede na MNC, kar se ujema tudi z višjo vrednostjo ICC IM v Gr glede na MNC. Aktivnost OCT1 v Gr se statistično signifikantno razlikuje med bolniki, ki se na zdravljenje dobro odzivajo in tistimi, ki so slabo odzivni na terapijo, kar potrdimo tudi s pozitivno korelacijo med aktivnostjo OCT1 in doseganjem MMR. Če na podatke pogledamo še na način, ki je primerljiv tistemu v referenčni literaturi, lahko navedemo, da ima 61 % bolnikov znotraj skupine dobro odzivnih višjo aktivnost OCT1 od povprečne, medtem ko ima kar 91 % vključenih slabo odzivnih bolnikov podpovprečno aktivnost OCT1 v Gr.

Pokazali smo, da je pri bolnikih s KML aktivnost OCT1 v Gr obratno sorazmerna odmerku, ki ga bolniki potrebujejo za doseganje ustreznega odgovora. Tega za aktivnost OCT1 v MNC ne moremo potrditi. Ugotovili smo tudi, da starost bolnikov ne vpliva na aktivnost OCT1.

Z raziskavo smo potrdili, da ICC IM v Gr narašča s plazemsko koncentracijo, vendar opazimo veliko intervariabilnost. ICC v Gr je nekajkrat višja od koncentracije IM v plazmi, kar najverjetneje nakazuje na aktivni transport IM v celice. Dokazali smo, da imajo bolniki, ki se na terapijo slabše odzivajo, sicer res statistično nesignifikantno različno ICC IM v Gr glede na dobro odzivne bolnike, vendar imajo tudi višje plazemske koncentracije IM, kar je posledica višjih dnevnih odmerkov IM. Sklepamo lahko da spremljanje ICC IM z namenom optimizacije terapije ne bi bilo bolj koristno od mnogo preprostejšega spremljanja plazemskih koncentracij.

Ugotovili smo, da je pri *in vivo* stanju ICC IM v Gr povprečno 22x višja od koncentracije IM v plazmi. Pri *in vitro* modelu pa je izmerjena ICC IM v Gr po inkubaciji z IM povprečno 180x višja od koncentracije IM v inkubacijskem mediju. Enostaven prenos lastnosti z *in vitro* modela na sklepanje o *in vivo* stanju ni mogoč, lahko pa opazimo tako pri *in vivo* stanju kot pri *in vitro* modelu visok faktor koncentracije, čeprav je ta zelo odvisen od pogojev v katerih privzem IM poteka.

LITERATURA

1. Košnik, M., *Interna medicina*, F. Mrevlje, et al., Editors. 2011. p. 1243-1389.
2. Bokal, U. and T. Južnič Šetina, *Kronična mieloična levkemija*. Onkologija, 2012. **XVI/št.1**: p. 10-13.
3. Simonsson, B., et al., *ESMO Minimum Clinical Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of chronic myelogenous leukemia (CML)*. Ann Oncol, 2005. **16 Suppl 1**: p. i52-3.
4. Preložnik Zupan, I. and T. Pajič, *Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloiočne levkemije*. Zdravniški vestnik, 2008. **77**: p. 5-10.
5. White, D.L., et al., *OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib*. Blood, 2006. **108**(2): p. 697-704.
6. Sawyers, C.L., *Chronic Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(17): p. 1330-1340.
7. Deininger, M.W. and B.J. Druker, *Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(3): p. 401-23.
8. Splet, <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/cml/about/chronic-myeloid-leukaemia-risks-and-causes>. Citirano 16. 6. 2013.
9. Novartis, *Imatinib blood level testing; A new initiative in the era of targeted therapy for Ph+ CML*. 2007: p. 2-10.
10. Hehlmann, R., et al., *Chronic myeloid leukaemia*. Lancet, 2007. **370**(9584): p. 342-50.
11. Breccia, M. and G. Alimena, *The significance of early, major and stable molecular responses in chronic myeloid leukemia in the imatinib era*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **79**(2): p. 135-43.
12. Kantarjian, H., et al., *Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience*. Blood, 2012. **119**(9): p. 1981-7.
13. Gschwind, H.P., et al., *Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(10): p. 1503-12.
14. Glaser, M., T. Grmek-Zemljič, and P. Borin, *Naše izkušnje pri zdravljenju kronične mieloične levkemije z imatinib mesilatom*. Zdravniški vestnik, 2004. **73**: p. 207-210.
15. Peng, B., P. Lloyd, and H. Schran, *Clinical pharmacokinetics of imatinib*. Clin Pharmacokinet, 2005. **44**(9): p. 879-94.
16. Hughes, T.P., et al., *Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and ST1571 (IRIS)*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3758-65.
17. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia: reversing the chronic phase*. J Clin Oncol, 2010. **28**(3): p. 363-5.
18. Di Gion, P., et al., *Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles*. Clin Pharmacokinet, 2011. **50**(9): p. 551-603.
19. Kantarjian, H., et al., *High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia*. Blood, 2004. **103**(8): p. 2873-8.
20. Picard, S., et al., *Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3496-9.
21. Eechoute, K., et al., *Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(3): p. 406-15.

22. Jonker, J.W. and A.H. Schinkel, *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(1): p. 2-9.
23. Thomas, J., et al., *Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3739-45.
24. White, D.L., 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**(12): p. 4064-72.
25. Wang, L., et al., *Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(2): p. 258-64.
26. White, D.L. and T.P. Hughes, *Classification of patients with chronic myeloid leukemia on basis of BCR-ABL transcript level at 3 months fails to identify patients with low organic cation transporter-1 activity destined to have poor imatinib response*. J Clin Oncol, 2012. **30**(10): p. 1144-5; author reply 1145-6.
27. White, D.L., et al., *Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomized to high-dose imatinib achieve better responses and have lower failure rates than those randomized to standard-dose imatinib*. Haematologica, 2012. **97**(6): p. 907-14.
28. Crossman, L.C., et al., *hOCT 1 and resistance to imatinib*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1133-4; author reply 1134.
29. Mahon, F.X., et al., *MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2368-73.
30. La Rosee, P., et al., *Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571)*. Cancer Res, 2002. **62**(24): p. 7149-53.
31. Melo, J.V. and C. Chuah, *Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia*. Cancer Lett, 2007. **249**(2): p. 121-32.
32. Oostendorp, R.L., et al., *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**(1): p. 31-40.
33. Vozelj, M., *Temelji imunologije*. Ljubljana, 2000, DZS.
34. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
35. Gadhoum, S.Z. and R. Sackstein, *CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(12): p. 751-7.
36. Cruse, J.M., et al., *Diminished CD10, CD13, and CD15 expression in a differentiated granulocyte population in CML*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(2): p. 274-6.
37. Splet, <https://www.miltenyibiotec.com/en/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/Whole-Blood-MicroBeads.aspx>. Citirano 12. 6. 2013.
38. Kralj, E., et al., *Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML*. Zdravniški vestnik, 2012. **81** supl 2: p. 188-196.
39. Gomezelj, R., *Razvoj analizne metode za določanje aktivnega transpora imtiniba in N-desmetil imatiniba v levkocitih bolnikov s kronično mieloično levkemijo*. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2012: p. 57-59.
40. Ting-Beall, H.P., D. Needham, and R.M. Hochmuth, *Volume and osmotic properties of human neutrophils*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2774-80.
41. Splet, <http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>. Citirano 6.6.2013.
42. Zhang, Y., et al., *LC-MS-MS Determination of Imatinib and N-Desmethyl Imatinib in Human Plasma*. J Chromatogr Sci, 2013.

43. Hansen, S.H., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. 2012: p. 231-259.
44. Adamič, Š., *Temelji biostatistike*. Ljubljana, 1989, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.
45. Splet, <http://www.nextadvance.com/api/index.cfm/products.info/c/422/Bullet-Blender-Beads#/Bead> Citirano 6.6.2013.
46. Peng, B., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 935-42.
47. White, D.L., et al., *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. **10**: p. 2761-2767.
48. Engler, J.R., et al., *OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL*. Haematologica, 2011. **96**(2): p. 213-20.
49. Boyer, R., *Temelji biokemije*. 2005: p. 228-237.
50. Widmer, N., et al., *Population pharmacokinetics of imatinib and the role of alpha-acid glycoprotein*. Br J Clin Pharmacol, 2006. **62**(1): p. 97-112.
51. Brendel, C., et al., *Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells*. Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1267-75.
52. Hu, S., et al., *Interaction of imatinib with human organic ion carriers*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(10): p. 3141-8.