

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA ZUPANC

**OPTIMIZACIJA METOD ZA DOLOČANJE
ZNOTRAJCELIČNEGA PRIVZEMA IMATINIBA V
GRANULOCITE**

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA ZUPANC

**OPTIMIZACIJA METOD ZA DOLOČANJE
ZNOTRAJCELIČNEGA PRIVZEMA IMATINIBA V
GRANULOCITE**

**OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETERMINATION
OF INTRACELLULAR UPTAKE OF IMATINIB INTO
GRANULOCYTES**

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm. Pridobivanje biološkega materiala in izolacijo granulocitov smo izvajali na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Analizo vzorcev smo opravili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so pripomogli k nastanku magisterskega dela. Najbolj bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Simonu Žaklju, mag. farm in Evi Kralj, mag. farm, ki sta mi med izdelavo diplomskega dela svetovala in me usmerjala. Posebna zahvala gre tudi doc. dr Juriju Trontlu, mag.farm. in ge. Nevenki Lilik. Poleg tega bi se rada zahvalila staršem, sestri, bratu in sorodnikom, ki so mi v času študija stali ob strani ter fantu in prijateljem, ki so me v času izdelave diplomskega dela podpirali in skrbeli za razvedrilo v času pisanja magisterske naloge .

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

KAZALO

KAZALO	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
1 UVOD	1
1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA	1
1.2 ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE.....	3
1.3 IMATINIB	4
1.4 PRENAŠALCI IN PRENOS IMATINIBA SKOZI BIOLOŠKE MEMBRANE ..	6
1.5 SPREMLJANJE USPEŠNOSTI POTEKA ZDRAVLJENJA BOLNIKOV S KML 8	
1.6 SPREMLJANJE KONCENTRACIJE IMATINIBA V PLAZMI.....	8
1.7 KADAR TERAPIJA Z IMATINIBOM NI USPEŠNA	9
2 NAMEN DELA.....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL	12
3.2 STANDARDI	12
3.3 REAGENTI IN TOPILA	13
3.4 NAPRAVE IN PRIBOR	13
3.5 GOJENJE CELIC K562	15
3.6 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN	15
3.7 PRIPRAVA INKUBACIJSKIH RAZTOPIN	16
3.8 DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ PRI BOLNIKIH.....	17
3.9 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC IN GRANULOCITOVS FIKOLA IZ PERIFERNE KRVI ZDRAVIH PROSTOVOLJCEV	18

3.10	IZOLACIJA GRANULOCITOV S POZITIVNO SELEKCIJO PREKO MAGNETNIH KOLON IZ PERIFERNE KRVI BOLNIKOV	21
3.11	INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM.....	23
3.12	LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA	24
3.13	MERJENJE NA LC-MS/MS SISTEMU.....	25
3.14	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	USPEŠNOST INHIBICIJE OCT1 S PRAZOSINOM	27
4.2	PRIMERJAVA RAZLIČNIH INHIBITORJEV OCT1	30
4.3	RAZLIKE PRI DOLOČANJU IUR NA GRANULOCITIH Z DVEMA RAZLIČNIMA NAČINOMA INKUBACIJE	36
4.4	PONOVLJIVOST IN INTRAINDIVIDUALNA VARIABILNOST	40
5	SKLEP.....	41

POVZETEK

Diplomsko delo opisuje razvoj in uporabo metode za določanje aktivnosti prenašalca OCT1 ter *in vivo* znotrajcelične koncentracije imatiniba v granulocitih pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo. Metodo določanja aktivnosti OCT1 prenašalca, ki je po literaturnih podatkih ključni protein odgovoren tudi za privzem imatiniba v levkemične celice pri kronični mieloični levkemiji, smo najprej preizkusili na vzorcih periferne krvi zdravih prostovoljev in jo tako tudi optimizirali za uporabo na vzorcih bolnikov. S centrifugiranjem preko gostotno gradientnega medija fikola smo iz periferne krvi izolirali mononuklearne celice in granulocyte, jih inkubirali z imatinibom ali z imatinibom in OCT1 inhibitorjem, celice lizirali, nato pa imatinib iz lizata ekstrahirali, ga koncentrirali ter določili njegovo znotrajcelično koncentracijo s LC-MS/MS. S pomočjo koncentracije smo izračunali privzem imatiniba v granulocite, ki smo ga podali v $\mu\text{g imatiniba}/200\,000\text{ celic}$ in primerjali privzem brez in z uporabo inhibitorja. Najprej smo kot inhibitor OCT1 uporabljali prazosin v $50\ \mu\text{M}$ in $100\ \mu\text{M}$ koncentraciji, vendar nižja koncentracija ni signifikantno inhibirala aktivnosti OCT1 prenašalca, višja pa je bila toksična za celice, zato smo poiskali drug inhibitor. Na celični liniji K562 in granulocitih smo preiskusili več različnih spojin, ki po literaturnih podatkih inhibirajo OCT1. Za najprimernejšega se je izkazal kinin v $300\ \mu\text{M}$ koncentraciji, ki je najbolj inhibiral OCT1, poleg tega pa ohranil dobro vitalnost granulocitov. Ugotovili smo, da prazosin v toksični koncentraciji in kinin v subtoksični koncentraciji enakovredno zmanjšata privzem imatiniba v granulocite, zato smo predvidevali, da ima prenašalec OCT1 pomembno vlogo pri prenosu imatiniba v granulocite, vendar pa ga bolj specifično inhibiramo s kininom v $300\ \mu\text{M}$ koncentraciji kot pa s prazosinom v $100\ \mu\text{M}$ koncentraciji. Prav tako smo ugotovili, da so izgube celic med spiranjem po inkubaciji velike in zato pomembno vplivajo na končni rezultat, zato smo uvedli končno določanje koncentracije spranih celic, ki smo jo uporabili za korekcijo izračuna privzema imatiniba v granulocite.

Ključne besede: imatinib, znotrajcelična koncentracija, kronična mieloična levkemija, inhibicija OCT1 prenašalca

ABSTRACT

This thesis describes the development and application of a method for the determination of OCT1 transporter activity and *in vivo* intracellular concentration of imatinib in granulocytes in patients with chronic myelogenous leukemia. The method for the determination of OCT1 transporter, which is, according to several references, the key protein responsible for the uptake of imatinib into hematopoietic cells, was first tested on peripheral blood leukocytes of healthy volunteers and than optimized for application on samples obtained from patients. By centrifugation with Ficoll density gradient medium, mononuclear cells and granulocytes were isolated from peripheral blood, incubated with imatinib alone or a combination of imatinib and an OCT1 inhibitor, and lysed. Imatinib was then extracted from the cell lysate, after which its intracellular concentration was determined by LC-MS/MS method. Based on concentration values the uptake of imatinib in granulocytes was calculated and presented in ng of imatinib/200.000 cells. At first, 50 µM and 100 µM concentrations of prazosin were used as OCT1 inhibitors. However, the lower concentration did not inhibit the OCT1 transporter significantly, while the higher one was toxic for the cells, so we, consequently, looked for a different inhibitor. Several different compounds, which according to data in other references inhibit cation transporters, were tested on the K562 cell line and granulocytes. Quinine at 300 µM concentration proved to be the most effective inhibitor of all tested compounds and good viability of granulocytes was maintained throughout the experiment. It was determined that prazosine at a toxic concentration and quinine at a subtoxic concentration equivalently reduce the uptake of imatinib in granulocytes. This shows that OCT1 transporter is an important transporter for uptake of imatinib, however the inhibition by quinine at 300 µM concentration is more specific than inhibition by prazosine at 100 µM concentration. It was also established that during the post-incubation cell rinsing procedures many cells are lost, which has a significant effect on the final result. To control this problem, the determination of final cells' concentration was introduced and that concentration was applied for the calculation of the uptake of imatinib in granulocytes.

Key words: imatinib, intracellular concentration, chronic myelogenous leukemia, inhibition of OCT1 transporter

SEZNAM OKRAJŠAV

ABCB1 (ABC – ang. *ATP binding cassette*, B1 podvrsta prenašalca) – vrsta prenašalca, ki ima vezavno mesto za ATP (adenozin trifosfat), drugo ime za P-glikoprotein oz. MDR protein (ang. *multidrug resistant protein*)

ABCG2 (ABC – ang. *ATP binding cassette*, G2 podvrsta prenašalca) – vrsta prenašalca, ki ima vezavno mesto za ATP (adenozin trifosfat), drugo ime za BCRP (ang. *breast cancer resistant protein*)

BCRP (ang. *breast cancer resistant protein*) – protein, ki povzroča rezistenco pri zdravljenju raka dojk

D8-imatinib – 8-krat devteriran imatinib, interni standard

DMSO – dimetil sulfoksid

FISH (ang. *fluorescence in situ hybridisation*) – fluorescenčna hibridizacija in situ

HLA (ang. *human leukocyte antigen*) – človeški levkocitni antigen

IM – imatinib

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

IRIS (ang. *international randomized study of interferon and ST1571*) – mednarodna randomizirana študija za primerjavo interferona α in imatiniba

K562 – levkemična celična linija

KML – kronična mieloična levkemija

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti skopljena z masnim detektorjem

rpm (ang. *revolutions per minute*) – št. obratov na minuto

MACS (ang. *magnetic cell sorting*) – magnetno ločevanje delcev

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

mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) – obveščevalna ribonukleinska kislina

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

PBS (phosphate buffered saline) – izotonični fosfatni pufer

PDGFR (ang. *platelet-derived growth factor receptor*) – iz trombocitov izhajajoči rastni faktor

Ph kromosom – Philadelphia kromosom

PKMC – presaditev krvotvornih matičnih celic

PRA prazosin

qRT-PCR (ang. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*) – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo z obratnim prepisovanjem

RPMI – medij, ki se uporablja za gojenje levkocitov

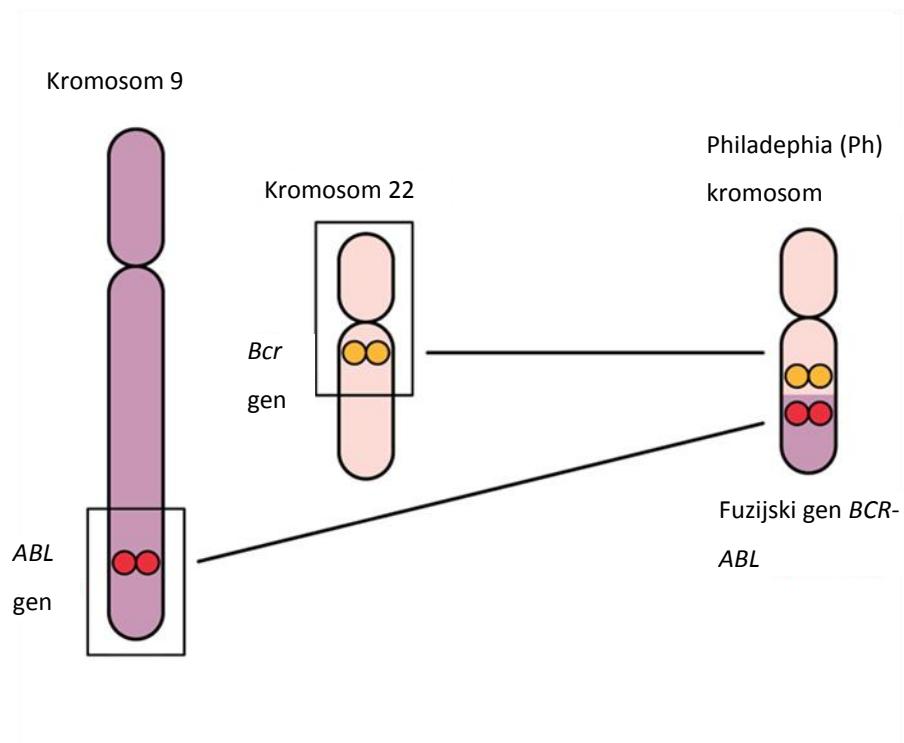
SLC (ang. *solute carriers*) – prenašalci topljencev

UGT (ang. *uridine diphosphate glucuronyltransferase*) – uridin difosfkat glukuronil transferaza

1 UVOD

1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

KML je redka bolezen s pojavnostjo 1-2 primera/100 000 prebivalcev vsako leto in je najpogostejša pri starejših osebah, saj je povprečna starost ob diagnozi 65 let. Moški zbolijo pogosteje kot ženske. Gre za bolezen krvotvorne matične celice, za katero je značilen Philadelphia (Ph) kromosom, ki nastane z recipročno translokacijo med kromosomom 9 in kromosomom 22, pri kateri se združita gen *ABL* iz kromosoma 9 in gen *BCR* iz kromosoma 22 (slika 1). Rezultat je dolg kromosom 9 in zelo kratek kromosom 22 (Ph kromosom), ki vsebuje *BCR-ABL* fuzijski gen. Pri tem nastane beljakovina z lastnostmi tirozin kinaze, ki poveča proliferacijo (razrast) matičnih celic, moti diferenciacijo (dozorevanje) in preprečuje apoptozo. Molekularna patogeneza je dobro poznana, vzrok translokacije pa ni znan. Predvidevajo, da jo povzroča ionizirajoče sevanje, saj so po odvrženih atomskih bombah v Hirošimi in Nagasakiju opazili povečano pojavnost bolezni [1], [2].



Slika 1: Nastanek translokacije med kromosomom 9 (gen *ABL*) in iz kromosomom 22 (gen *BCR*). (Vir: [3]).

Bolezen sta prvič opisala dva zdravnika leta 1845, delovala sta ločeno in se nista strinjala, ali je bolezen infekcijska ali ne. 1960 pa sta dva raziskovalca iz Philadelphie odkrila nenavadno majhen kromosom, ki je bil prisoten v levkemičnih celicah in ga poimenovala Ph (Philadelphia) kromosom. To je bilo prvič, da je bila kromosomska nepravilnost povezana z maligno boleznijo. 1973 je bila dokazana recipročna translokacija, sedem let kasneje pa fuzijski gen *BCR-ABL* [4].

Za potrditev diagnoze KML potrebujemo celotno krvno sliko, punkcijo in biopsijo kostnega mozga za citološki in histološki pregled ter dokaz o prisotnosti Ph kromosoma ali njegovega produkta, zlitega gena *BCR-ABL*. Ph kromosom dokažemo s standardno citogenetsko preiskavo (kariotip) v vzorcu kostnega mozga. Zliti gen *BCR-ABL* dokažemo v vzorcu periferne krvi ali kostnega mozga s potrditvijo za ta gen značilnega mRNA prepisa z obratnim prepisovanjem in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR), ki je najbolj občutljiva metoda, ali s fluorescenčno hibridizacijo *in situ* (FISH). FISH uporabimo, kadar želimo dokazati prisotnost zlitega gena *BCR-ABL* in ga s kariotipom ne moremo dokazati ali pa ugotoviti translokacije ali delecije. Med zdravljenjem lahko ocenimo delež Ph pozitivnih celic in ugotovimo dodatne nepravilnosti v Ph pozitivnih ali Ph negativnih celicah. S FISH lahko zaznamo 5 % primerov KML, ki jih kariotip ne zazna, pri tem ni potrebno gojiti celic ali jih analizirati v metafazi. HLA-tipizacija (tipizacija človeškega levkocitnega antiga) bolnika in svojcev je smiselna pri bolnikih, mlajših od 65 let [4, 5].

Nezdravljeni bolezen poteka v treh fazah. Med začetnim **kroničnim obdobjem** se poveča razrast levkocitov, vendar celice ohranijo sposobnost diferenciacije in normalno delujejo. Simptomi so blagi ali pa jih sploh ni, velikokrat določijo KML pri rutinskem odvzemuh krvi, ko bolniki pridejo na pregled zaradi drugih težav. Po približno petih letih bolezen napreduje v **pospešeno obdobje**, pri katerem je prisotnih več nezrelih celic v krvi, pojavijo se značilni simptomi (nočno znojenje, vročina, hujšanje, tiščanje v trebuhu zaradi povečane vranice, anemija) in odziv na zdravljenje je slabši kot v kroničnem obdobju. Pospešeno obdobje lahko traja od nekaj tednov do nekaj let ali pa ga sploh ni, ker bolezen hitro napreduje v **blastno preobrazbo**. V tem obdobju je stanje podobno akutni levkemiji, prevladujejo nezrele celice in čas preživetja je kratek [4, 5].

1.2 ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE

Nezdravljeni bolniki v povprečju živijo še 2 ali 3 leta od postavljene diagnoze. Zdravljenje lahko spremljamo na treh nivojih. **Popolni hematološki odgovor** je dosežen, kadar je krvna slika normalna in ni prisotnih simptomov in znakov bolezni. **Popolni citogenetski odgovor** pomeni, da s klasično citogenetiko ne moremo dokazati Ph pozitivnih metafaz. Kadar jih dokažemo manj kot 35 %, govorimo o **glavnem citogenetskem odgovoru** [4]. **Glavni molekularni odgovor (MMR)** dosežemo, kadar je ekspresija *BCR-ABL* za ≥ 3 -log zmanjšana glede na začetno standardno vrednost. Standarnda vrednost je mediana razmerij med *BCR-ABL_I* in *ABL_I*, dobljenih na vzrocu še nezdravljenih bolnikov v kroničnem obdobju KML. Po prenovljenih smernicah ustreza MMR zmanjšanju razmerja med *BCR-ABL_I* in *ABL_I* na 0,1% [6]. **Popolni molekularni odgovor** pa pomeni, da z RT-PCR ne moremo določiti ekspresije *BCR-ABL* gena [4].

Najprej so KML zdravili s Fowlerjevo raztopino, ki je vsebovala arzen, potem pa z obsevanjem. Prva sintetična učinkovina je bila busulfan, ki je alkirajoče sredstvo in se še vedno uporablja pri pripravah na presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC). Obsevanje in busulfan sta bolj pri pomogla k izboljšanju kakovosti življenja. Prva učinkovina, ki je podaljševala življenje, je bila hidroksiurea, potem pa se je uporabljala tudi citarabin, ampak nobena od teh učinkovin ni povzročila popolnega citogenskega odgovora [4, 7].

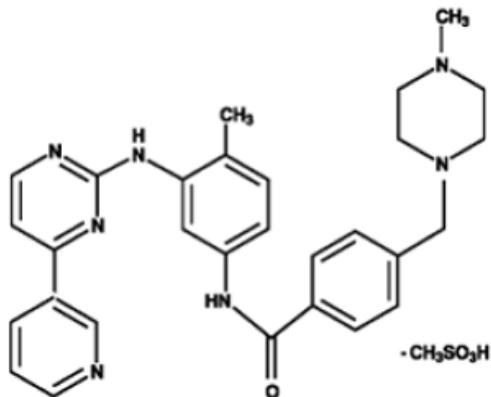
Leta 1980 se je v terapiji pojavil rekombinantni interferon α , ki je za razliko od prej omenjenih učinkovin pri tretjini bolnikov povzročil trajen citogenski odgovor. Uporabljala se je v kombinaciji s citarabinom, vendar so kasneje ugotovili, da kombinacija ne podaljšuje življenja. Meta analize so pokazale, da več kot 80 % bolnikov z nizkim tveganjem za ponovitev bolezni živi vsaj še 10 let po začetku zdravljenja z interferonom α [1].

PKMC (presaditev krvotvornih matičnih celic) je edino zdravljenje, ki lahko popolnoma pozdravi KML, vendar je smiselna le pri bolnikih, ki imajo ustrezne darovalce s skladnim antigenom glavnega histokompatibilnega kompleksa HLA antigenskega sistema in so v dovolj dobrem zdravstvenem stanju, da prenesejo kemoterapijo in obsevanje celotnega telesa. Zdravljenje je agresivno in ima lahko številne zaplete. Smrtnost je 20 - 30 %. Visoka umrljivost je posledica reakcije presadka proti gostitelju in različnih

oportunističnih okužb [8]. PKMC se priporoča pri otrocih s HLA sorodnim darovalcem in pri odraslih z identičnim dvojčkom, pri ostalih pa zaradi možnih zapletov ne uporablja v terapiji prvega izbora [5].

1.3 IMATINIB

Imatinib je majhna molekula (slika 2), ki so jo odkrili z virtualnim rešetanjem kemijskih knjižnic, kjer so iskali inhibitorje tirozin kinaze in spada v razred 2-fenilaminopirimidinov [4]. Njegovo prvo ime je bilo ST1571 [9]. Od leta 2001 je imatinib mesilat registriran v Evropi pod imenom Glivec® in je prvi sintezi inhibitor tirozin kinaze z delovanjem na Bcr-Abl fuzijski protein. Njegovo delovanje ni povsem specifično, saj zavira tudi delovanje receptorja faktorja matičnih celic (stem cell factor), c-KIT kinazo in iz trombocitov izhajajočega rastnega faktorja (PDGFR). Deluje tako, da zasede mesta vezave ATP na molekulah tirozin kinaze in prepreči fosforilacijo substratov, vpletenih v uravnavanje celične delitve, kar ima za posledico blokado maligne proliferacije [8]. Bolj ugoden izid zdravljenja z imatinibom v primerjavi z interferonom α je dokazala mednardona randomizirana študija, ki je primerjala obe učinkovini [7]. To odkritje je močno spremenilo potek zdravljenja in na podlagi IRIS [9] (angl. *the international randomized study of interferon and ST1571*) študije je imatinib v odmerku 400 mg/dan postal zdravilo prvega izbora za zdravljenje KML v kroničnem obdobju. V pospešenem obdobju in blastni preobrazbi je priporočen odmerek 600-800 mg/dan [1].



Slika 2: Struktura imatiniba (Vir: [9]).

Čeprav večina bolnikov dosega dobre rezultate pri zdravljenju KML z imatinibom, jih 20 % ne doseže popolnega citogenetskega odgovora, nekateri pa imajo nevzdržne neželene učinke ali pa se razvije rezistenca. Točkaste mutacije zmanjšajo afiniteto imatiniba do ATP vezavnega mesta na Bcr-Abl proteinu in s tem povzročijo rezistenco. Z razvojem druge generacije inhibitorjev tirozin kinaze (dasatinib, nilotinib), ki so bolj učinkoviti od imatiniba, možnost rezistence lahko zmanjšamo ali preprečimo [10]. Neželeni učinki so redki in blagi, večinoma se pojavijo v pospešenem obdobju ali blastni preobrazbi. Kažejo se kot edemi, zastajanje tekočine v telesu, slabost, kožni izpuščaj in bolečine v kosteh, hematološki pa kot nevtropenia, trombocitopenija in mielosupresija [4].

FARMAKOKINETIKA IMATINIBA

SPROŠČANJE: Imatinib je štirivalenta baza, ki ima štiri pKa vrednosti med 1,52 in 8,07. Dobro je open v vodnih raztopinah pri pH manjšem od 5,5. Z naraščanjem pH-ja pa se topnost zmanjšuje. V polarnih topilih je dobro open, v nepolarnih pa slabo. Hidroliza amida ne poteče niti po enourni izpostavitvi v umetnem želodčnem soku pri pH = 1,2 in temperaturi 37° C [11].

ABSORPCIJA: Pri peroralni aplikaciji se imatinib hitro in skoraj popolnoma absorbira iz GIT, biološka uporabnost je 98,8 %. Maksimalno koncentracijo v plazmi doseže po dveh do štirih urah. Zaužitje hrane na absorpcijo ne vpliva signifikantno [11].

DISTRIBUCIJA: *In vitro* študije so pokazale, da je imatinib približno 95 % vezan na plazemske proteine, največ na albumin in α_1 -kisli glikoprotein. Volumen distribucije je 435 L. Razpolovni čas je približno 22 ur. Glavni aktivni metabolit N-desmetil imatinib (CGP74588) ima volumen distribucije od 1017 do 3260 L in razpolovni čas od 40 do 74 ur. Meritve koncentracij v cerebrospinalni tekočini so pokazale, da imatinib in njegov metabolit v zelo majhnem obsegu prehajata krvnomožgansko pregrado, koncentracija je bila kar 40 do 100-krat nižja kot v plazmi. Vzrok za slabo prehajanje bi lahko bila prenašalca ABCB1 in ABCG2. Na nekaj primerih nosečnic in doječih mater so ugotovili, da imatinib prehaja placento in se nahaja v materinem mleku. Zaradi nezadostne količine podatkov, varnost uporabe med nosečnostjo ni potrjena, se pa dojenje v času terapije močno odsvetuje [12].

METABOLIZEM: Imatinib se metabolizira v jetrih z N-demetiliranjem, oksidacijo piperazina, N-oksidacijo piperazina in piridina, benzilno hidroksilacijo in oksidativnim deaminiranjem, s kasnejšo oksidacijo v karboksilno kislino. Pri reakciji metabolizma druge faze pa poteče glukuronidacija z UGT (uridin difosfat glukuronozil transferazo).

Imatinib se metabolizira s pomočjo citokorma P450, v glavnem s CYP3A4 in CYP3A5, ostali citokromi pa imajo manjši vpliv. Glavni spojini v krvi, urinu in blatu sta imatinib in njegov glavni metabolit N-desmetil imatinib, poznamo pa še vsaj 14 različnih metabolitov [12].

ELIMINACIJA: Imatinib in njegovi metaboliti se izločajo predvsem z blatom. V študiji, pri kateri so ^{14}C imatinib aplicirali zdravim prostovoljcem, se je 81 % odmerka izločilo v sedmih dneh, od tega je bilo 68 % odmerka izločenega v blato, 13 % pa v urin. Na izločanje lahko vpliva enterohepatična cirkulacija [12].

1.4 PRENAŠALCI IN PRENOS IMATINIBA SKOZI BIOLOŠKE MEMBRANE

Glavni prenašalec za privzem imatiniba v tarčo, *BCR-ABL* pozitivno levkemično celico, je organski kationski prenašalec **OCT1** (ang. *Organic cation transporter*; SLC22A1), ki spada med SLC prenašalce (ang. *solute carriers*; prenašalci topljencev). Le-ti uporabljajo elektrokemijski gradient ionov, da prenesejo substrate skozi membrane. Thomas in kolegi so bili prvi, ki so dokazali, da inhibicija OCT1 v levkocitih, izoliranih iz periferne krvi šestih bolnikov s KML, močno zmanjša znotrajcelični privzem imatiniba [13].

Znotrajcelični privzem in zadrževanje imatiniba (ang. *intracellular uptake and retention; IUR*) v mononuklearnih celicah je močno povezan z občutljivostjo celic za imatinib. IUR je definiran kot ng privzetega imatiniba/200000 celic [14].

Aktivnost OCT1 na tumorski celici, ki se izrazi kot razlika med IUR imatiniba brez in v prisotnosti inhibitorja OCT1 [14], pa po mnenju White in sodelavcev pomembno določa celo izid terapije z imatinibom. Kot inhibitor OCT1 so avstralski raziskovalci uporabili prazosin, ki pri koncentraciji 100 μM inhibira OCT1 in v manjši meri OCT3. Narejen je bil še paralelni poskus s prokainamidom, ki pri enaki koncentraciji inhibira OCT1 in OCT2, ne pa OCT3. Z obema inhibitorjema so dobili podobne rezultate aktivnosti OCT1, kar kaže na to, da je aktivni transport imatiniba odvisen le od prenašalca OCT1. Kadar sta IUR brez in z inhibitorjem enaka ali je IUR z inhibitorjem večji od IUR brez inhibitorja, potem ima

OCT1 zanemarljivo aktivnost [15]. Ostali znani inhibitorji OCT1 so še atropin, kinin in kinidin [16]. V študiji na bolnikih s KML, kjer so primerjali izide zdravljenja pri bolnikih z nizko in visoko OCT1 aktivnostjo, so pokazali, da pri odmerku 400 mg imatiniba/dan signifikantno večji delež bolnikov z visoko OCT1 aktivnostjo doseže glavni molekularni odgovor v 24 mesecih. Pri odmerku 800 mg/dan razlika ni bila signifikantna. Bolniki z nizko OCT1 aktivnostjo imajo torej večje tveganje za neuspešno terapijo z imatinibom 400 mg/dan, zato je pri njih izid zdravljenja močno odvisen od odmerka zdravila. Tem bolnikom je potrebno povišati odmerek ob spremljanju plazemskih koncentracij imatiniba ali pa uporabiti inhibitorje tirozin kinaze druge generacije [17].

Celični prenašalci so pomembni tudi zaradi odstranjevanja učinkovine iz celice. Po navajanju raziskave avtorja Eechoute in sodelavcev naj bi bil imatinib substrat za ABC (ang. *ATP binding cassette*) prenašalce, kot sta **ABCB1**, ki je bolj znan kot P-glikoprotein ali MDR1 (ang. *multidrug resistant protein*) in **ABCG2**, oziroma BCRP (ang. *breast cancer resistance protein*). Ti prenašalci uporabljajo hidrolizo ATP in fosforilacijo prenašalca kot vir energije za aktivni prenos substratov skozi biološke membrane. ABCB1 in ABCG2 se nahajata v jetrih, črevesu, ledvicah, placenti in na krvnomožganski barieri. Glavna naloga teh prenašalcev je obramba pred vstopom ksenobiotikov [14].

ABCB1 s svojim aktivnim transportom preprečuje imatinibu dostop do tarče Bcr-Abl. Raziskave kažejo, da se ti prenašalci močneje izražajo pri bolnikih v pospešenem obdobju ali blastni preobrazbi [18]. Večina protitumornih učinkovin je substrat za ABCB1, zato rakave celice, ki izražajo dovolj tega prenašalca, lahko postanejo odporne na učinkovino, tako da zdravljenje ni uspešno. Nekaj časa so raziskovali terapijo protitumornih učinkovin skupaj z inhibitorji ABCB1, rezultati so bili najprej dobri, dokler niso začeli s kliničnimi študijami. Inhibitorji prve generacije so bili preveč toksični in študije so bile pomanjkljivo zasnovane. Tudi inhibitorji druge generacije niso bili primerni, zato se ti inhibitorji niso nikoli uporabljali v terapiji [19].

Vloga prenašalca **ABCG2** pri prenosu imatiniba ni povsem razjasnjena, saj nekatere študije navajajo, da je imatinib substrat, nekatere pa, da je samo inhibitor prenašalca ABCG2. Jordanides in sodelavci [20] so dokazali, da imatinib inhibira ABCG2, ampak ni njegov substrat na CD34⁺ celični liniji. Po drugi strani pa Burger in sodelavci poročajo, da imatinib je substrat za omenjeni prenašalec in da le-ta igra pomembno vlogo pri prenosu

imatiniba iz celice in povzročanju rezistence. BCRP je odgovoren za rezistenco tudi pri zdravljenju z drugimi citostatiki, kot je topotekan [21].

1.5 SPREMLJANJE USPEŠNOSTI POTEKA ZDRAVLJENJA BOLNIKOV S KML

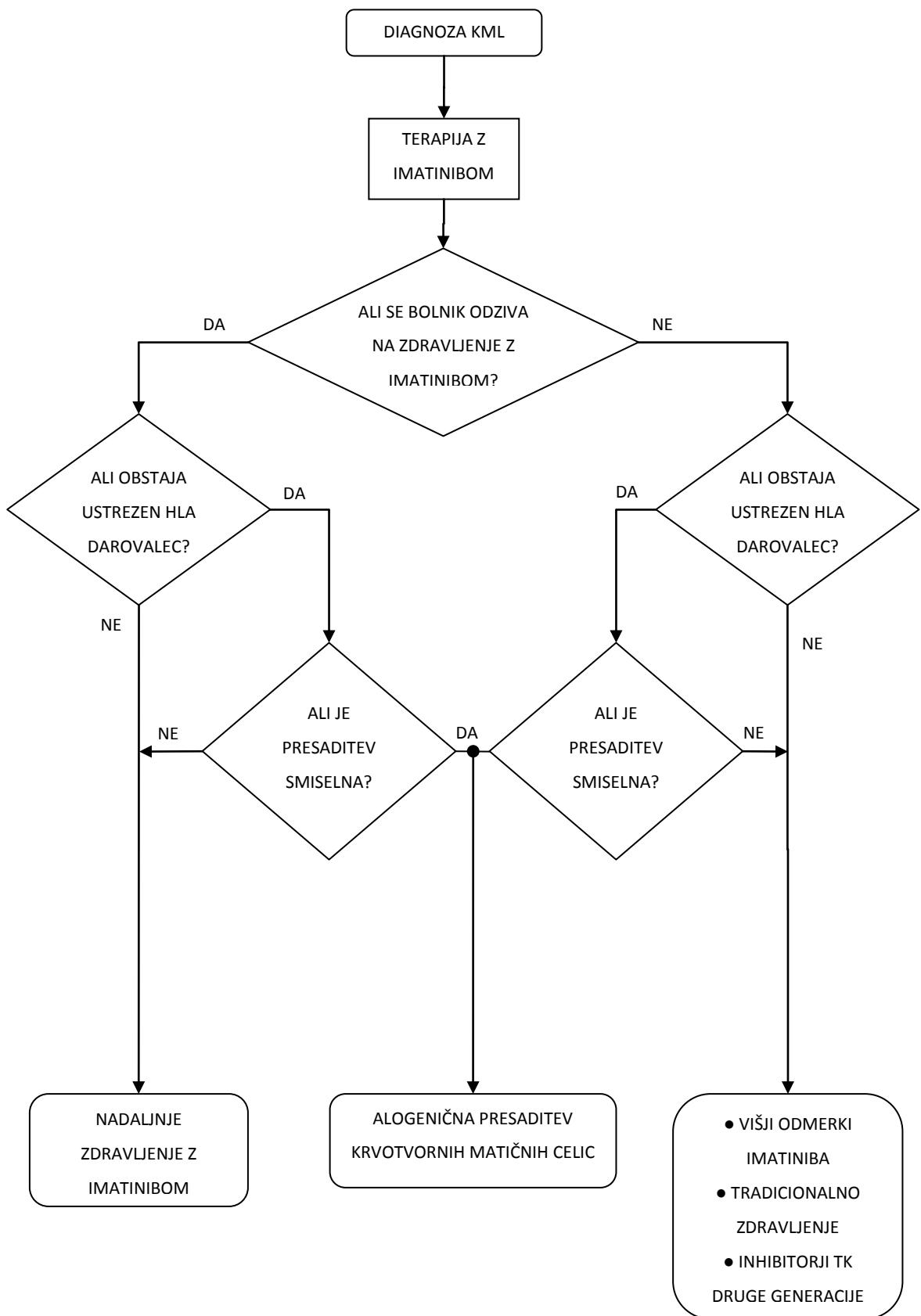
Spremljanje poteka zdravljenja je zelo pomembno, saj potek lahko spremojamo glede na dosežen odgovor bolnika. Najpomembnejša preiskava, s katero se določi število kopij prepisa *BCR-ABL*, je kvantitativna RT-PCR (ang. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*). Izvajati jo jo potrebno vsake tri mesece, dokler bolnik ne doseže glavnega molekularnega odgovora, potem se preiskava izvaja manj pogosto, vendar je potrebno redno spremeljanje. Citogenetske preiskave, s katerimi določamo kariotip na vzorcu kostnega mozga, ponavljamo vsakih šest mesecev, dokler bolnik ne doseže popolnega citogenetskega odgovora. Ko ga bolnik doseže, je potrebno določati kariotip vsako leto ali pa o porastu izražanja gena *BCR-ABL*, ki ga določimo s kvantitativno RT-PCR. Krvno sliko je potrebno spremljati na dva tedna, dokler bolnik ne doseže popolnega hematološkega odgovora. Kadar zdravljenje ni uspešno oziroma odgovor na zdravljenje ni zadovoljiv, je smiselna določitev mutacij v kinazni domeni *BCR-ABL* [5, 22].

1.6 SPREMLJANJE KONCENTRACIJE IMATINIBA V PLAZMI

Spremljanje koncentracije imatiniba v plazmi je smiselno, kadar se bolnik na zdravljenje ne odziva po pričakovanjih, če so prisotni hudi neželeni učinki ali interakcije z drugimi zdravili, oziroma obstaja verjetnost, da bolnik zdravila ne jemlje [23]. V študiji na bolnikih so Picard in sodelavci ugotovili, da je variabilnost med plazemskimi koncentracijami velika, ker nanjo vpliva veliko različnih dejavnikov, kot so genski polimorfizem, vplivi okolja, prisotne druge bolezni in sočasna uporaba drugih zdravil. Bolniki, ki so dosegli MMR, so imeli značilno višje plazemske koncentracije kot bolniki, ki ga niso dosegli. Mejna koncentracija, ki je potrebna, da bolnik lahko doseže MMR, je 1002 ng/mL. Kadar je koncentracija nižja, je priporočljivo odkriti vzrok in ga odpraviti. Največkrat je potrebno povečati odmerek imatiniba, vendar pa se pri višjih odmerkih lahko pojavijo ali stopnjujejo neželeni učinki [24].

1.7 KADAR TERAPIJA Z IMATINIBOM NI USPEŠNA

Imatinib je zdravilo prvega izbora za zdravljenje KML, vendar je potrebno ob rezistenci spremeniti terapijo. Primarna rezistenca pomeni, da nikoli ne dosežemo želenih odgovorov. Popolnega hematološkega odgovora v 3 - 6 mesecih ne doseže 2 - 4% bolnikov, popolnega citogenskega odgovora v 6 - 18 mesecih ne doseže 15 - 25 %. Nekateri bolniki sprva dosežejo ustrezni odgovor na zdravljenje, nato pa ga po določenem času izgubijo. Takšnih bolnikov je približno 4 % in takrat govorimo o sekundarni rezistenči [5]. Najpogostejša vzroka tovrstne rezistence sta klonska evolucija in pojav točkastih mutacij. Mutacije najpogosteje odkrijemo v napredovanih obdobjih bolezni. Kadar bolnik ne doseže želenega odziva na zdravljenje, povečanje odmerka pa je zaradi neželenih učinkov neprimerno, se hematologi odločijo za že poznane, starejše metode, v zadnjem času pa tudi za inhibitorje tirozin kinaze druge generacije, med katere sodita nilotinib in dasatinib. Oba imata močnejši učinek od imatiniba in vsak od njiju je aktiven pri nekaterih znanih mutacijah *BCR-ABL*, tako da sta skupaj aktivna proti vsem znanim mutacijam razen mutaciji, kjer gre za zamenjavo treonina za izolevcin na mestu 315 (T315I) AK zaporedja beljakovine Bcr-Abl [1]. V postopku raziskovanja pa so tudi inhibitorji tirozin kinaze tretje generacije (inhibitorji aurora), ki so aktivni tudi pri tej mutaciji [5]. Potek zdravljenja z imatinibom, oziroma v primeru, da je terapija neuspešna, je prikazan na sliki 3. Novejše smernice, ki se prav v času izdelave tega diplomskega dela postopoma uveljavljajo, omogočajo tudi uporabo nilotiniba v prvi liniji terapije KML v Evropi, v ZDA pa podoben status dobiva še dasatinib [25].



Slika 3: Potek zdravljenja KML (Vir: [1, 5]).

2 NAMEN DELA

Imatinib je zdravilo prvega izbora za zdravljenje KML. Ker je njegovo mesto delovanja v levkemični celici in v literaturi nismo zasledili merjenja znotrajceličnih koncentracij, želimo razviti metodo, ki bi to merjenje omogočila, da bi imeli boljši vpogled na mesto delovanja učinkovine, ki se nahaja znotraj celice. Metodo bomo preizkusili in izboljšali pri zdravih prostovoljcih, da bi jo kasneje uporabili pri bolnikih.

Kulture levkemičnih celic K562 in levkocite izolirane iz krvi zdravih prostovoljcev bomo inkubirali z imatinibom in z znanim inhibitorjem OCT1 prazosinom, nato bomo primerjali koncentracije imatiniba v celicah po inkubaciji brez in z uporabo inhibitorja ter poskušali ugotoviti, kako prisotnost inhibitorja vpliva na privzem imatiniba. Rezultate pridobljene na KML celični liniji K562 in granulocitih izoliranih iz polne krvi zdravih prostovoljcev bomo med seboj primerjali.

Na osnovi predhodnih rezultatov, pridobljenih na Fakulteti za farmacijo predvidevamo, da prazosin morda ni najbolj primeren inhibitor za meritve aktivnega privzema imatiniba, zato bomo preverili njegovo sposobnost inhibicije, potem pa testirali serijo različnih inhibitorjev prenašalca OCT1. Na osnovi razpoložljivih literarnih podatkov bomo kot možne kandidate testirali atropin, prokainamid, kinin in kinidin. Med njimi bomo izbrali najprimernejšega v najbolj primerni koncentraciji in ga vpeljali v nov postopek meritev aktivnega privzema. To pomeni, da potrebujemo inhibitor, ki v izbrani koncentraciji specifično in dovolj močno inhibira OCT1 prenašalec, hkrati pa pri tej koncentraciji ni toksičen in zagotovi dobro vitalnost celic med potekom poskusa. Primerjali bomo tudi inhibicijo s prazosinom in z inhibitrojem, ki ga bomo izbrali za najprimernejšega.

Imatinib deluje na Bcr-Abl1 v levkemični celici, za katero sklepamo, da je podobna predvsem granulocitom v periferni krvi. Preverili bomo, če med postopkom, ki je rezultat dosedanjega dela raziskovalcev Fakultete za farmacijo in Kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana, prihaja do izgub celic ali same učinkovine. Če bo potrebno, bomo postopek poskušali modificirati in odpraviti morebitne pomanjkljivosti, ki bi jih opazili med potekom raziskave.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Prostovoljcem so v hematološki ambulanti poliklinike v Ljubljani (Njegoševa 4, 1000 Ljubljana) vzeli 40 mL krvi v štiri 10 mL epruvete Vacutainer, ki so vsebovale antikoagulant litijev heparinat ter 10 mL krvi v Vacutainer, ki je vseboval antikoagulant EDTA. Za izolacijo granulocitov smo uporabili 40 mL krvi z litijevim heparinatom. Študijo je odobrila Komisija za medicinsko etiko, prostovoljci pa so pred odvzemom krvi podpisali informativni pristanek k študiji.

Uporabljali pa smo tudi linijo celic K562 (American type culture collection, Manass, ZDA, ATCC številka: CCL-243TM). To je celična linija pridobljena iz levkemičnih celic 53-letne ženske obolele za KML.

3.2 STANDARDI

D8-imatinib: $C_{29}H_{23}D_8N_7O$, M = 501,66 g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

imatinib: $C_{29}H_{31}N_7O$, M = 493,60 g/mol (Sequoia research products, Ltd, Pangbourne, Združeno kraljestvo) v obliki imatinib mesilata (sol metansulfonske kisline CH_3SO_3H , M = 589,7 g/mol)

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

prazosin: $C_{19}H_{21}N_5O_4$, M = 383,40 g/mol (prazosinijev klorid, M = 419,87 g/mol, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

kinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$, M = 324,42 g/mol (Kininijev klorid, M = 396,92 g/mol, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

kinidin $C_{20}H_{24}N_2O_2$, M = 324,42 g/mol (Kinidinijev klorid, M = 396,92 g/mol, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

prokainamid $C_{13}H_{21}N_3O$, M = 235,33 g/mol (Prokainijev klorid, M = 271,79 g/mol, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

atropin $C_{17}H_{23}NO_3$, M = 289,37 g/mol (Atropinijev sulfat, M = 676,82 g/mol) Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

PSC 833: $C_{63}H_{111}N_{11}O_{12}$, M=1214,62 g/mol (Tocris, Bristol, Združeno kraljestvo)

KO 143: $C_{26}H_{35}N_3O_5$, M=468,57 g/mol (Tocris, Bristol, Združeno kraljestvo)

3.3 REAGENTI IN TOPILA

prečiščena voda

etanol, C_2H_6O , M = 46,07 g/mol

PBS (Phosphate-buffered saline, fosfatni pufer), sestava: NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , K_2HPO_4

fetalni goveji serum (FBS) (Gibco, Velika Britanija)

DMSO, C_2H_6OS

MACS Whole Blood CD15 Micro Beads (Miltenyi Bioetc GmbH, Bergish Gladbach, Nemčija)

Auto MACS Running Buffer

amonijev formiat, CH_5NO_2 , M=63,06 g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

n-heksan 95 %, C_6H_{14} , M=86,18 g/mol (Pancreac Química, Barcelona, Španija)

etilacetat (Reag. Ph. Eur.), $C_4H_8O_2$, M=88,10 g/mol (Pancreac Química, Barcelona, Španija)

Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska)

RPMI medij 1640 (1x) (Gibco, Velika Britanija)

3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

plastične epruvete ali mikrocentrifugirke 2,0 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

Kgw izotherm posoda za tekoči dušik Type 30/4-32C (Kgw izotherm, Karlsruhe, Nemčija)

hematološki analizator Beckman Coulter LH750 (Beckman Coulter, Inc, Brea, ZDA)

polavtomatska pipeta Eppendorf 20-200 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

polavtomatska pipeta Eppendorf 100-1000 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

vortex stresalnik Vibromix 10,(Tehnica, Železniki, Slovenija)

stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehnica, Železniki, Slovenija)

sušilnik TurboVap LV (Caliper, Massachusetts, Združene države Amerike)

centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

centrifuga Centric 322A (Tehnica, Železniki, Slovenija)

centrifuga Centric 400R (Tehnica, Železniki, Slovenija)

hladilnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

zamrzovalnik -70 °C (Sanyo Electric Biomedical, Japonska)

tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Turbovap LV (Caliper, Hopkinton, Massachusets, ZDA)

ločevalni magnet MidiMACS Multistand (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemčija)

ločevalna kolona MACS Whole Blood Column Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemčija)

inkubacijske plošče Corning Costar® (Corning incorporated, Corning, New York, ZDA)

serološke pipete Coning Costar® 5, 10 in 15 mL (Corning incorporatedl, Corning, New York, ZDA)

plošče za gojenje T25 (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica)

inkubator Sanyo MCO-15AC

centrifugirke TPP, 15 mL in 50 mL (TPP, Švica)

viale z zataljenim insertom 350 µL (Cronus, Gloucester, Velika Britanija)

pokrovčki za viale z zataljenim insertom (Cronus, Gloucester, Velika Britanija)

sušilnik SpeedVac (Savant SC110A, Hicksville, ZDA)

LC-MS/MS, sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke zmogljivosti (UHPLC) Agilent Infinity 1290 in masnega detektorja Agilent 6460 (Agilent, Palo Alto, ZDA), kolona Kinetex 50 x 2,1 mm C18 z 2,6 µm delci (Phenomenex, Torrance, ZDA), ionski izvor JetStream v pozitivnem načinu ionizacije

drug inventar: čaše, bučke, erlenmajarice, spatule, tehtiči, nastavki za pipete

3.5 GOJENJE CELIC K562

V medij Iscove's Modified Dulbecco's Medium smo dodali 10 % fetalnega govejega seruma (FBS) in 100 UE/mL penicilina pri 37 °C ob prisotnosti 95 % O₂, 5 % CO₂ in vlage. Gostota celic ob nasajanju na plošče T-75 s plinsko prepustnim zamaškom je bila 2 x 10⁵ celic/mL, zamenjava medija z vnovičnim nastajanjem je potekala vsak drugi dan. Inkubacija celic za določanje privzema imatiniba je potekala v RPMI 1640 mediju z dodatkom 10 % FBS s koncentracijo 6 x 10⁵ celic/mL.

3.6 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN

1x pufer PBS

V 1000 mL bučko smo dodali 100 mL 10 x pufra PBS (10x redčenje) in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in mešali z obračanjem. Preverili smo pH, ki je moral biti 7,1. Raztopino smo označili in shranili v hladilniku pri 4 °C.

Matična raztopina za lizo eritrocitov

Natehtali smo 82,6 g NH₄Cl, 10,0 g KHCO₃, 0,37 g EDTA in jih prenesli v 1000 mL bučko. S sterilno, destilirano vodo smo dopolnili do oznake in filtrirali preko vakuumsko-filtracijskega sistema z vodno črpalko filtrirali v dve steklenički po 500 mL. Raztopino smo označili in shranili v hladilniku pri 4 °C.

Raztopina za lizo eritrocitov

V 1000 mL bučko smo dodali 100 mL matične raztopine za lizo eritrocitov in s sterilno, destilirano vodo dopolnili do oznake in mešali z obračanjem. Raztopino smo prelili v plastično posodo, označili in shranili v hladilniku pri 4 °C.

Interni standard D8-imatinib

Osnovno raztopino ($c = 2 \text{ mg/L}$) smo trikrat redčili s prečiščeno vodo do koncentracije D8-imatiniba $0,666 \text{ mg/L}$.

3.7 PRIPRAVA INKUBACIJSKIH RAZTOPIN

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

IMATINIB: natehtali smo $58,97 \text{ mg}$ imatiniba mesilata in ga raztopili v 10 mL etanola. To je bila osnovna 10 mM raztopina IM, ki smo jo shranili v hladilniku in iz katere smo pripravljali sveže raztopine pred vsakim poskusom. $0,292 \text{ mL}$ osnovne raztopine smo nadalje redčili s 50% etanolom do 5 mL ($c = 0,583 \text{ mM}$). 1 mL te raztopine smo redčili s 50% etanolom do 5 mL ($c = 0,1166 \text{ mM}$). $1,432 \text{ mL}$ te raztopine pa smo redčili v 5 mL hrnilnega medija (RPMI) in dobili raztopino ($c = 0,0333 \text{ mM}$), ki smo jo dodajali celičnemu vzorcu. $300 \mu\text{L}$ te raztopine smo dodali celicam do končnega volumena 5 mL in koncentracije $0,002 \text{ mM}$ tik pred inkubacijo.

PRAZOSIN: natehtali smo $15,3 \text{ mg}$ prazosinjevega klorida in ga raztopili v 5 mL 50% etanola. Tako smo dobili osnovno $7,29 \text{ mM}$ raztopino PRA. To smo dali na ultrazvok za 15 min , saj se drugače PRA ni raztopil v celoti. Mešanico IM in PRA v želenih koncentracijah smo pripravili tako, da smo zmešali 4 mL $7,29 \text{ mM}$ PRA in 1 mL $0,583 \text{ M}$ IM. $300 \mu\text{L}$ te raztopine smo dodali celicam tik pred inkubacijo.

KININ: Osnovno raztopino smo pripravili z raztopljanjem $11,9 \text{ mg}$ kininijevega klorida v 1 mL etanola. V inkubacijsko raztopino (5 mL) smo dodali $50 \mu\text{L}$, da smo dobili koncentracijo $300 \mu\text{M}$.

KINIDIN: Osnovno raztopino kinidina smo pripravili z raztplavljanjem 7,578 mg kinidina v 1 mL etanola. 50 µL osnovne raztopine smo dali v inkubacijsko raztopino (5mL), da smo dobili koncentracijo 200 µM.

PROKAINAMID: Osnovno raztopino smo pripravili z raztplavljanjem 27,179 mg prokainamida v 1 mL etanolu. Vzeli smo 50 µL osnovne raztopine in jo dali v inkubacijsko raztopino (5mL), da smo dobili koncentracijo 1000 µM.

ATROPIN: Osnovno raztopino smo pripravili z raztplavljanjem 14,42 mg atropina v 1 mL etanola. Enako kot pri prejšnjih inhibitorjih smo dodali 50 µL v osnovno raztopino in koncentracija je bila 200 µM.

Raztopina 4,5 mM NH₄-formiata

Natehtali smo 28,38 mg trdnega amonijevega formiata in ga kvantitativno raztopili v 100 mL vode.

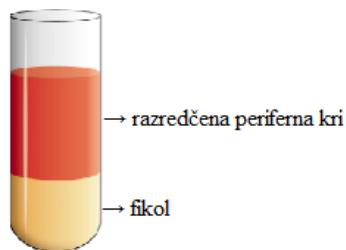
3.8 DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ PRI BOLNIKIH

Plazmo smo pridobili s centrifugiranjem polne krvi 10 min pri 1700 rpm (660g – g predstavlja gravitacijski pospešek) brez uporabe zavore. Po centrifugiranju je spodnja plast predstavljala celično suspenzijo, zgornja pa plazmo, ki smo jo takoj zamrznili, kasneje pa ekstrahirali in analizirali vsebnost imatiniba, pri čemer smo izpustili koncentriranje na Speedvacu. Največkrat smo pridobivanje bolnikove plazme združili s postopkom izolacije granulocitov prek magnetnih kolon, kjer po dodatku magnetnih delcev in inkubiranju ter centrifugiranju pri enakih pogojih, dobimo celično suspenzijo, ki jo uporabimo v postopku izolacije granulocitov, plazmo pa uporabimo za določitev koncentracije z metodo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS).

3.9 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC IN GRANULOCITOV PREKO FIKOLA IZ PERIFERNE KRVI ZDRAVIH PROSTOVOLJCEV

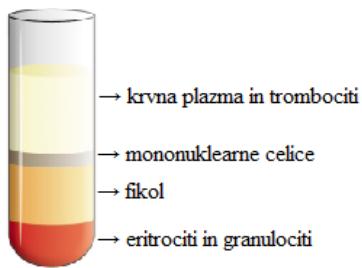
Pri tej metodi (slika 6) je pomembno, da so reagenti in vzorci segreti na sobno temperaturo. Periferno kri je odvzela medicinska sestra v hematološki ambulanti Poliklinike v Ljubljani. Vzorec krvi smo odvzeli v štiri 10 mL epruvete Vacutainer z litijevim heparinom (zelen zamašek, 10 mL), ki smo ga potem razredčili v razmerju 1:1 z raztopino 1 x PBS.

V 15 mL plastične epruvete Falcon smo z iglo in brizgo vbrizgali 2,5 mL fikola (Ficoll-PaqueTM PLUS). To je sterilni medij, testiran na endotoksine (< 0,12EU/mL), ki na podlagi gostote loči limfocite od drugih komponent periferne krvi. Na fikol smo nato previdno nanesli s PBS redčeno kri, tako da se plasti med sabo nista zmešali in je ostala meja med obema plastema ostra (slika 4).



Slika 4: Vzorec fikola in periferne krvi pred centrifugiranjem (Vir: [26]).

Tako napolnjene epruvete smo zaprli in centrifugirali 22 min pri 2200 obratih/min (rpm) v centrifugi Centric 322A (Tehnica), brez uporabe zavore. Eritrociti v stiku s fikolom tvorijo skupke, ki se posedejo na dno epruvete. Granulocitom pa se zaradi stika z rahlo hipertoničnim fikolom poveča gostota in se prav tako posedejo na dno pod plast fikola. Mononuklearne celice tvorijo vmesno plast med fikolom in zgornjo plastjo, ki jo sestavlja krvna plazma, trombociti, maščobe in PBS (slika 5).



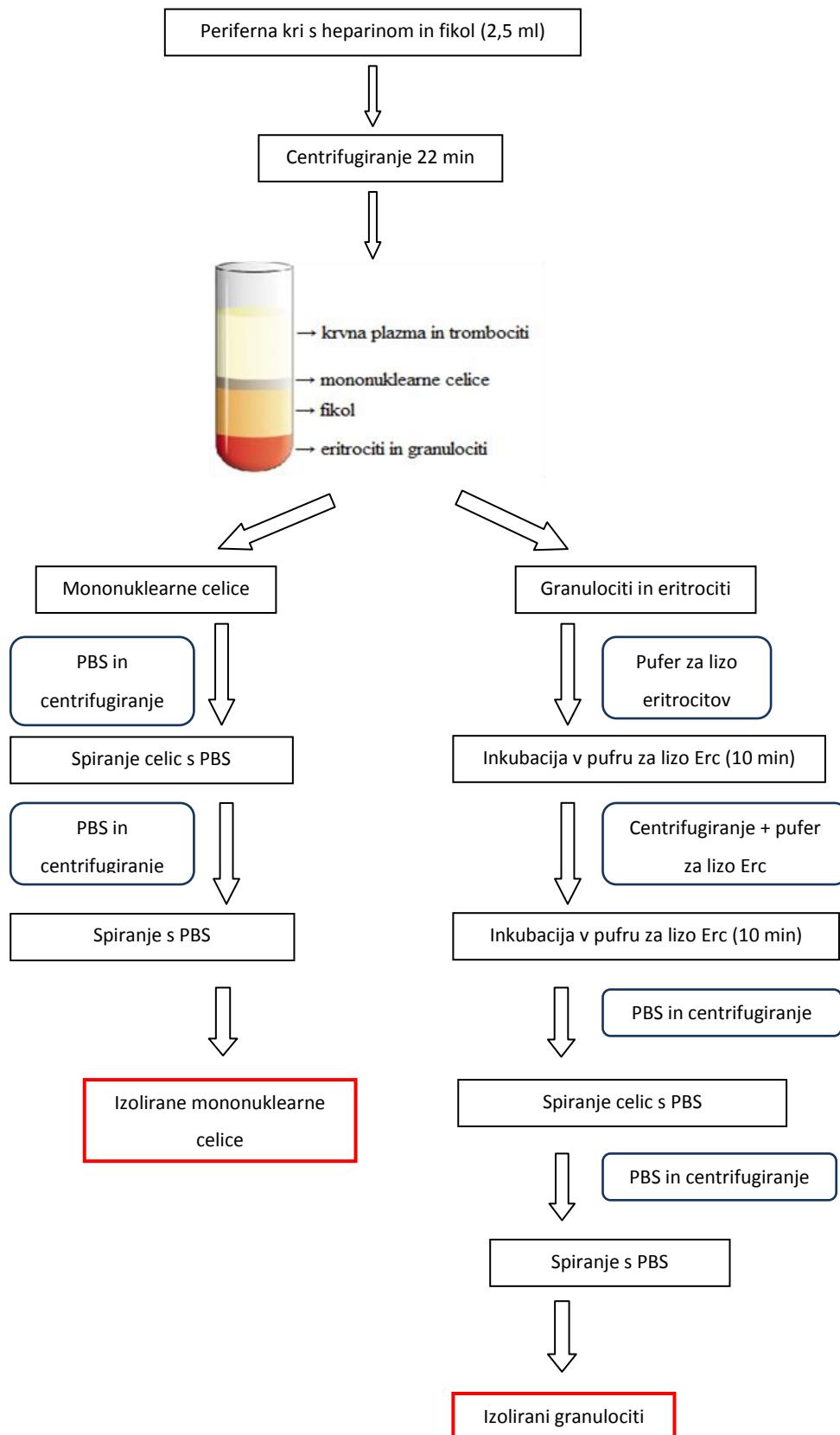
Slika 5: Ločene plasti periferne krvi po centrifugiranju (Vir: [26]).

MONONUKLEARNE CELICE → S pipeto smo odstranili zgornje plasti in previdno prenesli plasti mononuklearnih celic v novo 15 mL epruveto. Pazili smo, da nismo zraven zajeli fikola in da smo prenesli čim več mononuklearnih celic. Potem smo epruveto do 14 mL dopolnili z 1x PBS pufom, premešali, jo zaprli in centrifugirali v hladnjem 7 min pri 1700 obratih/min. Nato smo supernatant odlili, epruvete ponovno dopolnili do 14 mL s PBS, premešali in centrifugirali pri enakih pogojih. Ponovno smo odlili supernatant in oborino resuspendirali z malo PBS ter 50 µL prenesli v epice (2 mL) za štetje celic, večino pa shranili v hladilniku za kasnejšo inkubacijo.

GRANULOCITI → Iz epruvet, iz katerih smo odstranili plast razredčene plazme in mononuklearne celice, smo odstranili še preostali fikol. Spodnjo plast, sestavljeno iz eritrocitov in granulocitov, smo prenesli v 50 mL Falcon epruveto ter dopolnili do 45 mL z raztopino za lizo eritrocitov in dobro zaprli. Vzorec smo premešali z obračanjem, inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in vmes spet nekajkrat premešali z obračanjem. Nato smo vzorec centrifugirali 10 minut pri 1700 rpm. Granulociti so se posedli na dno epruvete, supernatant pa smo odlili in ponovno dolili raztopino za lizo eritrocitov do 30 mL ter inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 1700 rpm ter potem odlili supernatant.

Oborino smo raztoplili v 2 mL PBS in celice prenesli v 15 mL Falkon epruveto. Epruveto smo s PBS dopolnili do 14 mL in dobro premešali z obračanjem. Centrifugirali smo 7 min pri 1700 rpm in po koncu previdno odlili supernatant. Če je bila usedlina zelo rdeče barve, kar je kazalo na prisotnost eritrocitov, smo centrifugirali še enkrat, drugače pa smo oborino resuspendirali v 2 mL PBS. 50 µL vzorca smo prenesi v epice (2mL) za štetje celic, večino pa shranili v hladilniku do inkubacije.

POSTOPEK IZOLACIJE PREKO FIKOLA



Slika 6: Potek izolacije levkocitov preko fikola (Vir: [26]).

3.10 IZOLACIJA GRANULOCITOV S POZITIVNO SELEKCIJO PREKO MAGNETNIH KOLON IZ PERIFERNE KRVI BOLNIKOV

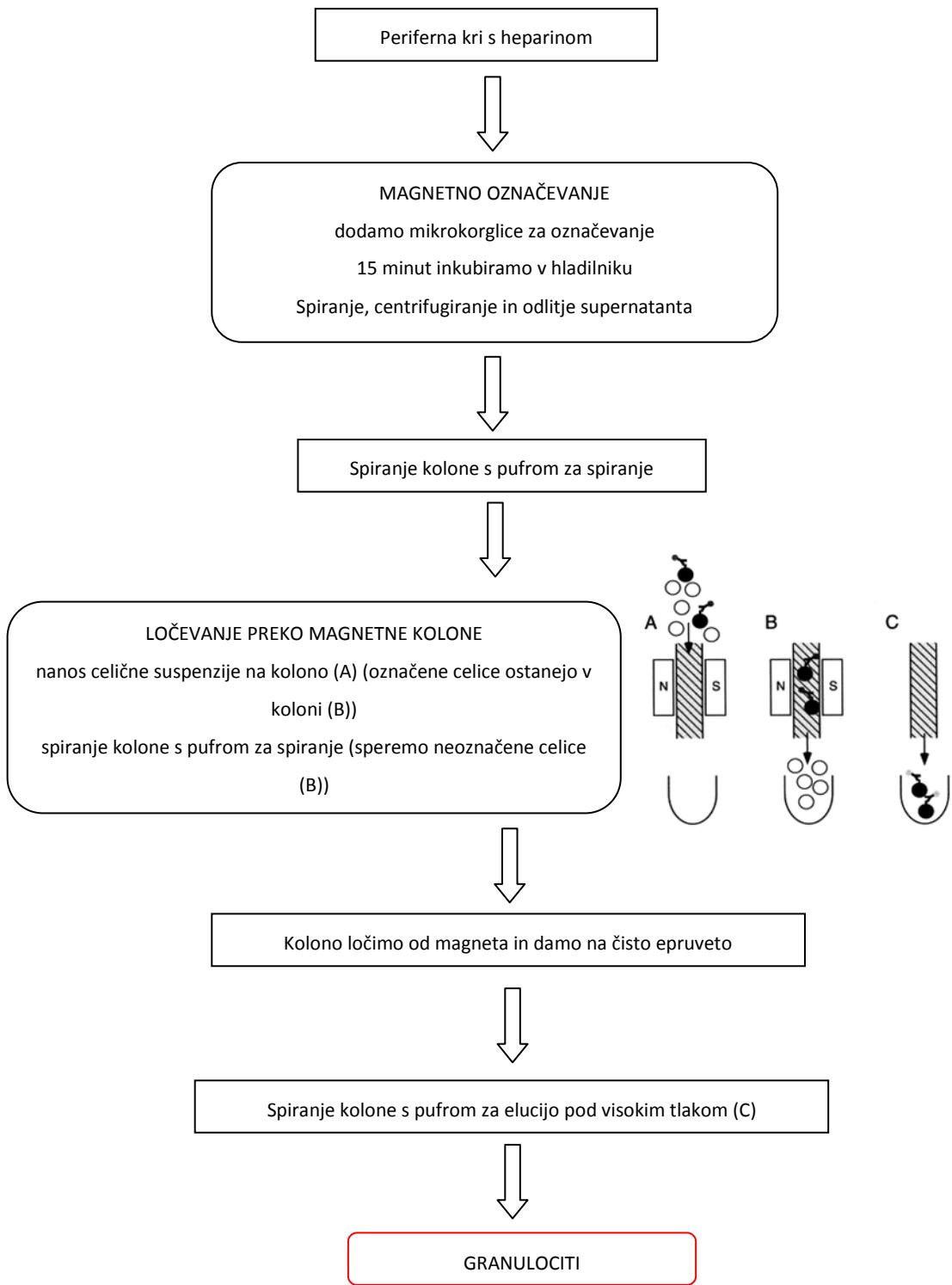
Ločevanje celic (slika 7) poteka po principu pozitivne selekcije in sicer tako, da CD15 pozitivne celice označimo z magnetnimi delci (Microbeads) označenimi s protitelesi, ki se vežejo na CD15 antigen, ki se nahaja na površini granulocitov. Suspežijo tako označenih celic nanesemo na kolono, ki se nahaja v magnetnem polju in zadrži magnetno označene celice, neoznačene pa gredo skozi kot negativna frakcija. Ko odstranimo kolono iz magnetnega polja, speremo iz kolone želene magnetno označene CD15 pozitivne celice, ki jih imenujemo pozitivna frakcija. Za razliko od izolacije granulocitov preko fikola ni potrebno ločevanje na podlagi gradientnega medija, centrifugiranje in liza eritrocitov. Mikrokroglice prepoznaajo strukturo 3-fukozil-N-acetillaktozamina (CD15 antigen), ki je izražen na nevtrofilcih in eozinofilcih, ne pa na bazofilcih in limfocitih [27].

Praktično smo postopek izolacije celic izvedli tako, da smo trem mL polne krvi dodali 100 µL reagenta MACS Whole Blood CD15, ki vsebuje s protitelesi označene magnetne delce in dobro premešali. Kri smo inkubirali v hladilniku (2-8 °C) 15 minut, nato pa jo centrifugirali pri 4 °C 10 min pri 1700 rpm brez uporabe zavore. Dobili smo dve faz; zgoraj je bila plazma, spodaj pa celična suspenzija.

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

Kolono smo nato odstranili iz MACS magneta in jo položili na novo, čisto epruveto. S pipeto smo na kolono nanesli 5 mL pufra za elucijo, z močnim pritiskom na bat pa smo sprali granulocite s kolone. Po centrifugiranju sprane suspenzije celic 7 min pri 1700 rpm smo odstranili supernatnat. Vsi reagenti uporabljeni v tem postopku so bili ohlajeni na 4 °C.

POSTOPEK IZOLACIJE PREKO MAGNETNIH KOLON



Slika 7: Izolacija granulocitov preko magnetnih kolon (Vir: [27]).

3.11 INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM

Granulociti

1. NAČIN

Izolirane celice smo uporabili za nadaljnjo inkubacijo z imatinibom. Volumen inkubacijske zmesi v inkubacijskih ploščah je bil 5 mL in inkubacijska raztopina je bila sestavljena iz 3 milijonov izoliranih granulocitov, imatiniba oziroma imatiniba in inhibitorja v inkubacijskem mediju. Vsako inkubacijo smo izvedli v treh paralelkah.

Inkubacija je potekala v inkubatorju pri stalni temperaturi 37 °C, 95 % O₂, 5 % CO₂ in je trajala dve uri. Medij je bil RPMI 1650 z 10 % fetalnim govejim serumom. Medij s celicami (5 mL) smo prenesli v 15 mL Falcon epruvete ter dopolnili s hladnim 1 x PBS. Centrifugirali smo 5 min pri 1000 rpm. Supernatant smo previdno odlili, ponovno dopolnili s PBS, centrifugirali pri enakih pogojih in odlili čim več supernatanta ter pazili, da pri tem nismo izgubili celic. Dodali smo malo PBS, celice prenesli v epice in jih shranili v zamrzovalniku do postopka lize in ekstrakcije. Celice smo prešteli samo na začetku, torej pred inkubacijo.

2. NAČIN

Celice smo inkubirali v ploščah za gojenje T25. Volumen inkubacijske zmesi je bil 15 mL, število inkubiranih granulocitov je bilo devet milijonov. Ker je bil volumen inkubacijske zmesi trikrat večji, kot pri prvem načinu, smo dodali trikrat več imatiniba in inhibitorja, da je bila končna koncentracija enaka kot pri prvem načinu. Inkubacija in centrifugiranje sta potekala pri enakih pogojih. Na koncu smo spranim celicam določili koncentracijo in 300 µL suspenzije razdelili v tri 2 mL epice ter prešteli celice. Za razliko od prvega načina, kjer smo celice prešteli samo na začetku, smo jih pri drugem načinu tudi na koncu, izmerjene izgube celic pa smo upoštevali pri izračunu aktivnega privzema.

KML celična linija K-562

K-562 je levkemična celična linija na osnovi celic, ki so bile izolirane iz plevralnega izliva 53-letne ženske s KML v fazi blastne preobrazbe. Maligne hematopoetske celice spontano diferencirajo v predhodnike eritrocitov, granulocitov in monocitov. Celice imajo pozitiven

Ph kromosom, imajo malo imunoglobulinov in začnejo aktivno proliferirati takoj, ko pripravimo njihovo suspenzijo v ustreznom mediju [28].

Celice smo gojili v mediju Iscove's Modified Dulbecco's Medium z dodatkom 10 % FBS in 100 UE/mL penicilina pri 37 °C v prisotnosti 95 % O₂, 5 % CO₂ in vlage, da so se namnožile do želene koncentracije 800 000 celic/1mL medija. Potem pa smo jih v poskusih inkubirali enako kot granulocite.

3.12 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA

Najprej smo epice s celicami vzeli iz zamrzovalnika in jih potopili v toplo vodo, da se je vsebina odtalila. Z zamrzovanjem v tekočem dušiku in odmrzovanjem v topli vodi smo povzročili lizo celic. To smo ponovili dvakrat.

V epice smo dodali 50 µL internega standarda¹ D8-imatiniba, 200 µL 0,2 M NaOH in 1 mL organske faze, sestavljenje iz heksana in etilacetata v razmerju 30 : 70.

Kot interni standard je bil uporabljen D₈-imatinib, ker ima strukturo zelo podobno imatinibu. Razlika je le v tem, da ima na osmih mestih namesto vodika devterij, zato se pri ekstrakciji in kromatografski ločbi obnaša zelo podobno kot imatinib, masni detektor pa ga lahko loči od imatiniba.

Vsako epico smo vorteksirali 1 minuto, nato smo vse epice dali na orbitalni stresalnik, kjer smo jih stresali še 40 min pri 200 obratih/min. Po stresanju smo epice centrifugirali 5 min pri 5 °C pri 10000 rpm s centrifugo Eppendorf 5415 R. Pri tem se je organska faza ločila od vodne in 800 µL organske faze smo prenesli v nove epice, ki smo jih prenesli na TurboVap in posušili pri 40 °C do suhega ostanka. Sušenje je trajalo približno 15 min.

Suh ostanek smo rekonstituirali z 250 µL mešanice metanol : NH₄-formiat (4,5 nM) v razmerju 50 : 50, vsako epico smo spet vorteksirali 1 min ter 200 µL prenesli v viale z zataljenim insertom. Viale smo prenesli na Speedvac, kjer smo do suhega ostanka sušili približno 120 min.

¹ Interni standard je znana spojina, ki jo v znani koncentraciji dodamo preiskovani spojini, pri čemer imata obe spojini podoben odziv. Kot rezultat analize uporabimo razmerje preiskovane spojine in internega standarda, da zmanjšamo vpliv izgube preiskovane spojine med pripravo ali ostale spremembe med analizo [30].

Suhemu ostanku smo dodali 40 µL pufra metanol : NH₄-formiat (4,5 nM) v razmerju 20 : 80 ter dobro premešali z vorteksiranjem po 1 min ter analizirali na sistemu tekočinske kromatografije in masne spektrometrije (LC-MS/MS).

3.13 MERJENJE NA LC-MS/MS SISTEMU

Določanje vsebnosti imatiniba v ekstraktu smo določili z LC-MS/MS aparatom, ki je sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke ločljivosti (UHPLC) in tandemmskega masnega detektorja. Volumen vbrizganega vzorca je bil 1 µL. Uporabili smo kolono Kinetex 50 x 2,1 mm C18 z 2,6 µm delci. Za separacijo smo uporabili gradientno spiranje z mobilno fazo A (vodna faza), ki je vsebovala 0,1 % metanojske kisline v Mili-Q vodi in mobilno fazo B (organska faza) 98 % acetonitril z gradientom od 10 % do 50 % v 1 min. Temperatura kolone med analizo je bila 50 °C. Retencijski čas za imatinib in D8-imatinib je znašal 1,2 min, medtem ko je znašal čas celotne analize vključno z reekvilibracijo kolone 2,6 min. Uporabljen je bil ionski izvor JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije. Masni detektor je deloval v pozitivnem načinu multirezidualne analize (MRM), in sicer smo za kvantifikacijo imatiniba spremljali masni prehod m/z 494,1→394,0, za kvantifikacijo D8-imatiniba pa m/z 502→394, pri čemer je bila resolucija obeh kvadrupolov nastavljena na 2,5 enote.

3.14 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

F-test in t-test

Podatke, ki smo jih pridobili iz meritev, smo statistično ovrednotili v programu Microsoft® Excel 2007. Uporabili smo *F*-test in Studentov *t*-test. Z *F*-testom ugotavljamo, če sta varianci dveh vzorcev enaki ali različni. Če sta bili varianci dveh vzorcev enaki, smo v nadaljevanju uporabili *t*-test za enake variance. Če pa sta bili varianci različni, smo v nadaljevanju uporabili *t*-test za neenake variance. Kadar smo primerjali parne podatke, smo uporabili parni *t*-test. S *t*-testom pa smo preverili, če so razlike primerjanih parametrov statistično značilne. Za značilnost razlike smo uporabili kriterij, da je $p < \alpha$, kjer je α kritična vrednost ($\alpha = 0,05$). Tak način analize smo izvedli, kjer smo za eno meritev rezultat dobili iz vsaj treh paralelk [29].

ANALIZA VARIANCE

Analiza variance se uporablja pri primerjavi vzorcev iz različnih populacij s podobnimi variancami. Temelji na porazdelitvi *F*.

Izračunamo *F*vrednost s kritično vrednostjo F_{krit} . Če je $F > F_{\text{krit}}$ zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno, da vzorci izhajajo iz populacij z različnimi povprečji. Če pa je $F < F_{\text{krit}}$ pa izhajajo vzorci iz populacije z enakimi povprečji.

Pri nadaljnji analizi rezultatov s pomeni standardno deviacijo, \bar{x} aritmetično sredino vzorca p verjetnost statističnega testa, SSTR vsoto kvadratov odklonov med skupinami vzorcev, SSE vsoto kvadratov odklonov znotraj skupin vzorcev in SST celotno vsoto kvadratičnih odstopanj [29].

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 USPEŠNOST INHIBICIJE OCT1 S PRAZOSINOM

Želeli smo raziskati vlogo prenašalca OCT 1 pri prenosu imatiniba v granulocite. Kot inhibitor smo enako kot v prispevku Whita in sodelavcev [15] uporabili prazosin. Poizkus smo opravili z izoliranimi granulociti iz periferne krvi 21 prostovoljcev in naredili tri paralelke pri vsakem prostovoljcu. Rezultate treh prostovoljcev smo izločili iz obravnave zaradi napake med postopkom pridobivanja. V inkubacijsko zmes, v kateri so bili medij in izolirani granulociti prostovoljcev, smo dodali samo imatinib ali pa imatinib in prazosin v dveh različnih koncentracijah ($50 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$). Koncentracije znotrajceličnega imatiniba smo določili tako, da smo celice lizirali in analizirali na LC-MS/MS. V tabeli I so prikazane povprečne vrednosti IUR, pri inkubaciji imatiniba ter inkubaciji imatiniba in prazosina v dveh različnih koncentracijah. Pri vseh nadaljnjih rezultatih, kjer je poleg aritmetične sredine podana tudi standardna deviacija, je bila povprečna vrednost računana iz treh paralek. Kadar pa med delom nismo uspeli pridobiti vseh treh paralek, ampak samo dve ali eno, je podana samo aritmetična sredina.

Tabela I: IUR IM ter IM in prazosina v dveh različnih koncentracijah.

Oznaka	IM [ng IM/200000 celic]	IM + PRA 50 [ng IM/200000 celic]	IM + PRA 100 [ng IM/200000 celic]
P1	4,5 ± 0,2	0,9 ± 0,04	0,4 ± 0,01
P2	3,8 ± 0,3	9,7 ± 0,7	3,8 ± 0,3
P3	3,5 ± 0,2	4,3 ± 0,3	2,1 ± 0,1
P4	3,1 ± 0,1	4,0	1,6 ± 0,4
P5	3,5 ± 0,2	7,5	2,0 ± 0,2
P6	3,1 ± 0,1	6,5	1,2
P7	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1
P8	3,7 ± 0,3	5,5 ± 0,2	2,3 ± 0,5
P9	2,8 ± 0,6	3,7	1,0 ± 0,2
P10	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,5	1,6 ± 0,2
P11	3,7 ± 0,04	4,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2
P12	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1
P13	4,6 ± 0,1	4,8 ± 0,6	1,7
P14	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2
P15	4,5 ± 0,5	5,6 ± 0,6	2,0 ± 0,3
P17	2,7 ± 0,4	3,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
P18	3,4 ± 0,3	3,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2
P19	4,3 ± 0,2	4,0	1,8
P20	3,4 ± 0,4	3,7 ± 0,1	1,7
P21	3,2 ± 0,4	4,3 ± 0,3	1,1 ± 0,5
\bar{x}	3,6	4,6	1,6
s	0,5	1,7	0,7

Iz tabele je razvidno, da prazosin v 100 µM koncentraciji veliko bolj inhibira privzem imatiniba v granulocite kot prazosin v 50 µM koncentraciji. Rezultate smo v tabeli II statistično obdelali in ugotovili, da nižja koncentracija prazosina ne inhibira privzema imatiniba statistično značilno, čeprav je $p < 0,05$, vendar pa so vrednosti IUR pri uporabi nižje koncentracije prazosina večinoma večje kot pri uporabi samega imatiniba, kar pomeni, da gre za prenizko koncentracijo, da bi lahko povzročila inhibicijo. V nasprotnem primeru pa višja koncentracija statistično značilno inhibira privzem imatiniba v granulocite, ker je $p < 0,05$, vrednosti IUR pa so manjše kot pri samem imatinibu.

Tabela II: Pari t-test za ugotavljanje razlik med privzemom IM brez in z uporabo prazosina v dveh različnih koncentracijah.

	\bar{X}	s	p	signifikantnost	inhibicija
IM	3,6	0,5			
IM + PRA 50	4,6	1,7	0,03	DA (višji IUR)	NE
IM + PRA 100	1,6	0,7	1,50E-09	DA (nižji IUR)	DA

Granulocite smo najprej obarvali s triptanskim modrilom in nato pogledali pod mikroskopom. Ugotovili smo, da je bila pri nižji koncentraciji celic vitalnost dobra, kar pomeni da citoplazma granulocitov ni bila obarvana modro, ker granulociti niso prepuščali barvila. Pri višji koncentraciji pa celice niso ostale žive, ker je bila citoplazma obarvana modro in to predstavlja dokaz, da je prazosin pri 100 μM koncentraciji toksičen za granulocite. Ta ugotovitev je zelo presenetljiva, saj se prazosin v podobni literaturi veliko uporablja. White in sodelavci [15], Thomas in sodelavci [13] ter ostali, ki so kot inhibitor OCT1 uporabljali prazosin, niso opazili, da bi bil prazosin lahko toksičen za granulocite. Predvidevali smo, da toksičnega vpliva prazosina niso opazili, ker so uporabljali veliko manjše število celic kot mi. Inhibicijo privzema imatiniba v granulocite pa so vseeno opazili in verjetno ta inhibicija ni bila specifična, ampak se je zaradi slabe vitalnosti granulocitov zmanjšala oziroma popolnoma ustavila aktivnost vseh prenašalcev. Za specifično inhibicijo OCT1 pa je pomembno, da inhibiramo samo prenalec OCT1. Ker smo ocenili, da s prazosinom pri koncentraciji, ki povzroči statistično značilno inhibicijo OCT1, celice ne ostanejo žive, smo poiskali drug inhibitor, ki učinkovito inhibira prenalec OCT1, poleg tega pa ne zmanjša vitalnosti granulocitov.

4.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH INHIBITORJEV OCT1

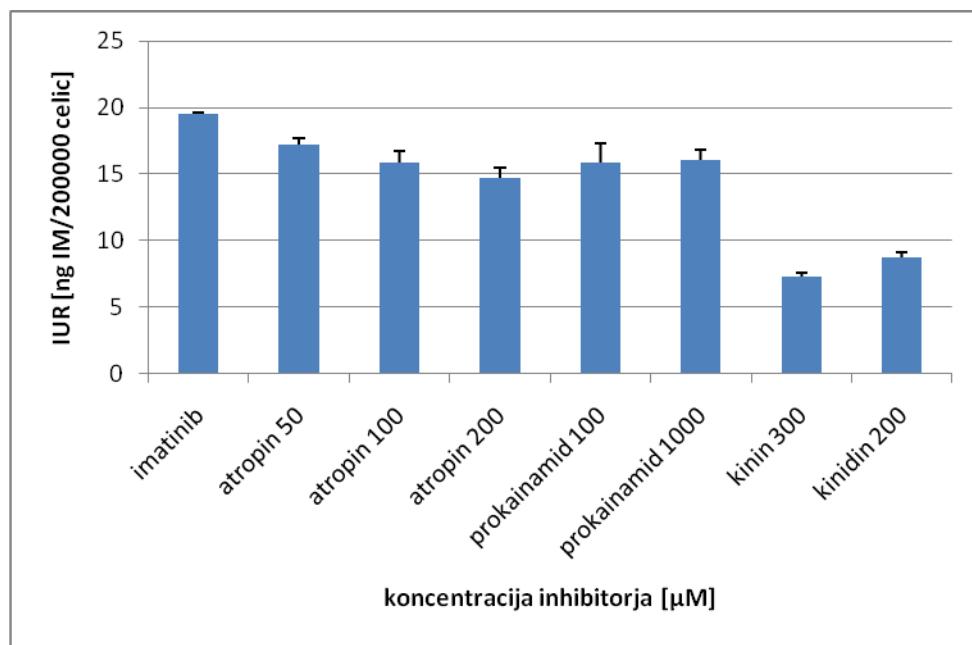
PRIMERJAVA RAZLIČNIH INHIBITORJEV PRENAŠALCA OCT1

Prvi način, po katerem smo preiskusili uspešnost različnih inhibitorjev, je bil na celični liniji K562. Celice smo najprej gojili, jih inkubirali, lizirali in naredili ekstrakcijo, ter analizirali ekstrakt. Drugi model, na katerem smo tudi preizkusili različne inhibitorje, so bili izolirani granulociti enega zdravega prostovoljca, ki smo jih inkubirali z učinkovino in različnimi inhibitorji, lizirali in naredili ekstrakcijo ter analizirali ekstrakt.

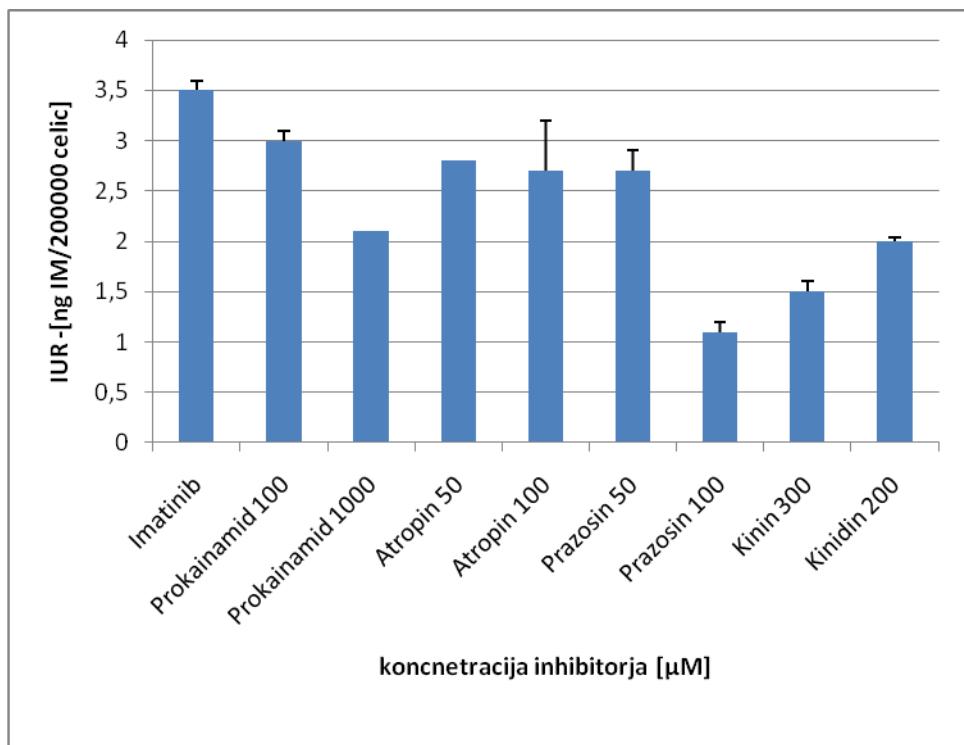
Na celicah K562 in granulocitih enega zdravega prostovoljca smo pokazali, kateri inhibitor najbolj inhibira privzem imatiniba v granulocite (tabela III). Nižja kot je vrednost IUR ob sočasni uporabi imatiniba in inhibitorja, močnejši je inhibitor. V obeh primerih je od vseh testiranih inhibitorjev, najbolj zmanjšal privzem imatiniba inhibitor kinin, ki smo ga uporabili v $300 \mu\text{M}$ koncentraciji. Pod mikroskopom smo preverili tudi vitalnost granulocitov in ugotovili, da celice ostanejo žive. Tem kriterijem bi lahko zadostil tudi kakšen drug inhibitor, ki ga nismo testirali, vendar zaradi dobrih rezultatov kinina nadaljnje testiranje inhibitorjev OCT1 ni bilo potrebno. Na sliki 8 in sliki 9 so prikazani enaki rezultati kot v tabeli III, le da v obliki stolpičnega diagraama. Granulociti zdravega prostovoljca so bili inkubirani po drugem načinu, ki se razlikuje od načina pridobivanja v poglavju 4.1. Podrobnejši opis obeh načinov inkubacije je opisan v poglavju 3.11 in v naslednjih poglavjih.

Tabela III: IUR v odvisnosti od koncentracij različnih inhibitorjev na celični liniji K562 in granulocitih

	IUR-K562 [ng IM/200000 celic]	IUR-granulociti [ng IM/200000 celic]
Imatinib(brez inhibitorja)	19,6	$3,5 \pm 0,1$
Prokainamid 100	$15,9 \pm 1,4$	$3,0 \pm 0,1$
Prokainamid 1000	$16,0 \pm 0,9$	2,1
Atropin 50	$18,3 \pm 0,5$	2,8
Atropin 100	$15,9 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,5$
<u>Kinin 300</u>	<u>$7,3 \pm 0,3$</u>	<u>$1,5 \pm 0,1$</u>
Kinidin 200	$8,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,04$



Slika 8: Primerjava IUR imatiniba brez inhibitorja in imatiniba in različnih inhibitorjev na celični liniji K562.



Slika 9: Primerjava IUR imatiniba brez inhibitorja in imatiniba in različnih inhibitorjev OCT1 na granulocitih zdravega prostovoljca.

Celice K562 so levkemične celice, ki imajo pozitiven Ph kromosom in so dober model za raziskave aktivnega transporta preko OCT1 prenašalca. Granulociti zdravega prostovoljca se od celic K562 razlikujejo, saj nimajo Ph kromosoma, vendar pa ni znano, da bi maligna sprememba celice vplivala na aktivnost prenašalca OCT1. To lahko sklepamo tudi iz rezultatov na sliki 8 in sliki 9, saj nam oba modela pokažeta, da kinin najbolj inhibira prenašalec OCT1. Tudi za vpliv ostalih inhibitorjev dobimo podobne rezultate na obeh modelih.

Na sliki 9 je na grafu za primerjavo z ostalimi inhibitorji prikazan tudi prazosin. Kinin v 300 μM koncentraciji in prazosin v 100 μM koncentraciji imata zelo podobne vrednosti IUR. Predvidevali smo, da je specifična inhibicija prenašalca OCT1 primerljiva z nespecifično inhibicijo vseh prenašalcev. Primerjavo inhibicije s prazosinom in kininom smo opravili še na granulocitih večjega števila prostovoljcev, da bi dokončno potrdili smiselnost zamenjave inhibitorja, saj je uporaba specifičnega inhibitorja eden od ključnih parametrov celotnega postopka določanja aktivnega privzema imatiniba.

PRIMERJAVA INHIBICIJE PRIVZEMA IMATINIBA S 100 μM

PRAZOSINOM IN 300 μM KININOM

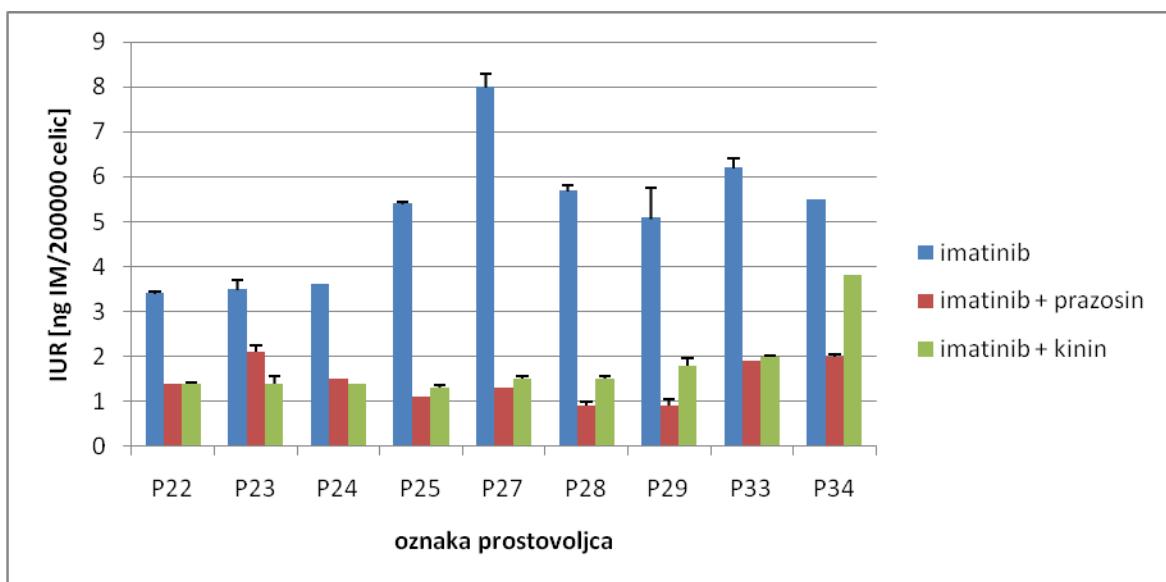
Pri prostovoljcih od P22 do P34 smo določili IUR z uporabo obeh inhibitorjev. V tabeli IV in na sliki 10 so prikazane vrednosti IUR, če uporabimo različna inhibitorja; 100 μM prazosin in 300 μM kinin. Pri treh prostovoljcih nam med poskusom ni uspelo dobiti rezultatov, zato smo jih izločili iz obdelave. Iz tabele V je razvidno, da med IUR vrednostmi pri uporabi dveh inhibitorjev ni statistično pomembnih razlik, ker je $p > 0,05$. Kot smo ugotovili v prejšnjem poglavju, je inhibicija, kadar uporabljamо kot inhibitor 100 μM prazosin, nespecifična. To pomeni, da zaradi zelo slabe vitalnosti celic inhibiramo vse prenašalce. Ker dobimo pri inhibiciji aktivnega privzema vseh prenašalcev statistično enake vrednsoti IUR kot če inhibiramo samo prenašalec OCT1, lahko sklepamo, da OCT1 igra pomembno vlogo pri privzemu imatiniba v granulocite. Ker pa kinin pri 300 μM koncentraciji bolj specifično inhibira OCT1 kot prazosin v 100 μM koncnetraciji, je bolj primeren inhibitor OCT1.

Tabela IV: IUR pri uporabi imatiniba brez inhibitorja in imatiniba ter dveh različnih inhibitorjev (100 µM prazosina in 300 µM kinina).

	IUR IM [ng IM/200000 celic]	IUR IM+ PRA 100 [ng IM/200000 celic]	IUR IM + KIN 100 [ng IM/200000 celic]
P22	3,4 ± 0,1	1,4	1,4 ± 0,04
P23	3,5 ± 0,4	2,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
P24	3,6	1,5	1,4
P25	5,4 ± 0,1	1,1	1,3 ± 0,1
P27	8,0 ± 0,6	1,3	1,5 ± 0,1
P28	5,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1
P29	5,1 ± 1,3	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3
P33	6,2 ± 0,4	1,9	2,0 ± 0,01
P34	5,5	2,0 ± 0,1	4,9
\bar{x}	5,2	1,5	1,5
s	1,5	0,5	1,1

Tabela V: Parni t-test za primerjavo IUR pri uporabi imatiniba in dveh različnih inhibitorjih (100 µM prazosina in 300 µM kinina).

	\bar{x}	s	p	signifikantnost
PRA 100	1,5	0,5	0,20	NE
KIN 300	1,5	1,5		



Slika 10: IUR pri prostovoljcih pri uporabi samega imatiniba, imatiniba in prazosina v 100 µM koncentraciji ter imatiniba in kinina v 300 µM koncentraciji.

PRIMERJAVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ INHIBITORJEV

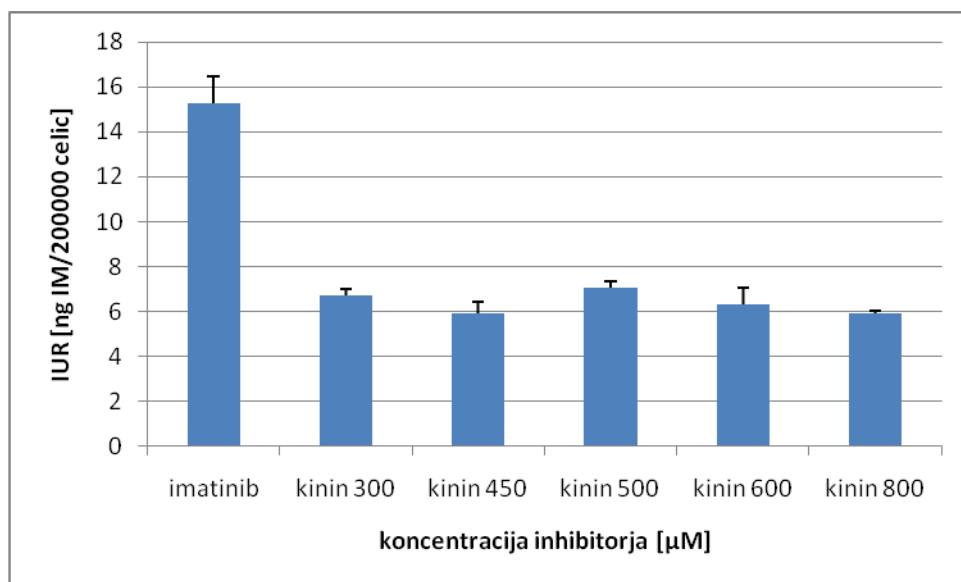
PRENAŠALCA OCT1

Želeli smo ugotoviti, če s spremjanjem koncentracije inhibitorjev vplivamo na uspešnost njihove inhibicije prenašalca OCT1. Vrednosti IUR pri različnih koncentracijah smo določili na celični liniji K562, kot je opisano pri primerjavi različnih inhibitorjev OCT1. Med seboj smo primerjali različne koncentracije kinina in atropina.

Iz tabele VI in iz grafa na sliki 11 je razvidno, da različne koncentracije kinina različno inhibirajo OCT1 prenašalec. Želeli smo ugotoviti optimalno koncentracijo inhibitorja, da bi jo lahko uporabljali v nadalnjih raziskavah.

Tabela VI: IUR na celični liniji K562 pri različnih koncentracijah kinina.

	IUR [ng/200 000 celic]
IM(brez inhibitorja)	15,2 ± 1,2
KININ 300	6,7 ± 0,3
KININ 450	5,9 ± 0,5
KININ 500	7,1 ± 0,3
KININ 600	6,3 ± 0,8
KININ 800	5,9 ± 0,1



Slika 11: IUR na celični liniji K562 v odvisnosti od različnih koncentracij kinina in primerjava z IUR imatiniba brez inhibitorja.

Ker nas je zanimalo, če so razlike v povprečjih IUR (tabela VII) pri uporabi različnih koncentracij kinina signifikantne, smo naredili enosmerni ANOVA test, ki je prikazan v tabeli VIII. Želeli smo izvedeti, katera koncentracija kinina dovolj inhibira OCT1, pri čemer inhibitor še ne vpliva na živost celic. Vrednost $p > 0,05$, zato lahko pri 5 % tveganju trdimo, da se IUR pri testiranih koncentracijah kinina medsebojno statistično značilno ne razlikuje, se pa razlikuje od referenčne vrednosti. To je prikazano v tabeli IX, saj je $p < 0,05$, zato lahko trdimo, da kinin pri omenjeni koncentraciji značilno zmanjša privzem imatiniba v granulocite. Inhibicija OCT1 je bila pri testiranih koncentracijah statistično enaka. Za nadaljnjo analizo bi torej lahko vzeli katerokoli od testiranih koncentracij, vendar pa je smiselno vzeti najmanjšo zaradi možnega vpliva inhibitorja na živost celic.

Tabela VII: IUR pri različnih koncentracijah kinina na celični liniji K562.

	IUR [ng/200 000 celic]		
KIN 300	1,66	1,67	1,55
KIN 450	1,51	1,52	1,31
KIN 500	1,72	1,63	1,77
KIN 600	1,49	1,38	1,72

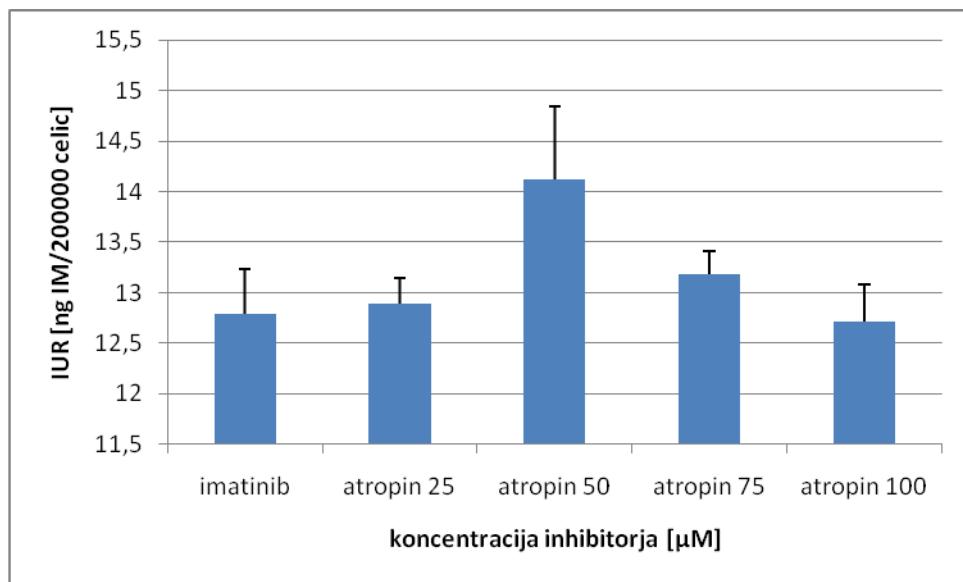
Tabela VIII: Test ANOVA za primerjavo IUR pri različnih koncentracijah kinina.

	Vsota kvadratov	Stopnja prostosti	Varianca	F	p	F _{krit}
SSTr	0,1160	3	0,0387	2,8752	0,10327	4,0662
SSE	0,1076	8	0,0135			
SST	0,2236					

Tabela IX: *t*-test za primerjavo IUR imatiniba brez uporabe inhibitorja in z uporabo kinina v 300 µM koncentraciji.

	\bar{X}	s	p	signifikantnost	inhibicija
IM	15,3	1,2			
IM + KIN 300	6,7	0,3	2,70E-04	DA	DA

Na sliki 12 je prikazano, da so vrednosti IUR pri uporabi inhibitorja atropina pri vseh koncentracijah večje ali enake IUR imatiniba. To pomeni, da atropin v našem primeru v nobeni od testiranih koncentracij ne inhibira OCT1 prenašalca.



Slika 12: IUR na celični liniji K562 v odvisnosti od koncentracij atropina in primerjava z IUR imatiniba brez uporabe inhibitorja.

4.3 RAZLIKE PRI DOLOČANJU IUR NA GRANULOCITIH Z DVEMA RAZLIČNIMA NAČINOMA INKUBACIJE

Najprej smo inkubacijo izvajali po prvem načinu, kjer smo imeli težave pri kvantitativnem prenosu raztopine iz inkubacijske plošče s šestimi vdolbinami v Falcon epruvete, saj so celice ostajale v plošči. Kljub večkratnemu spiranju posodice z inkubacijsko raztopino smo na tem mestu očitno izgubili precej celic. Zaradi izgub smo naredili inkubacijo po drugem načinu, kjer smo namesto inkubacijskih plošč uporabili T25 plošče. Poleg tega smo povečali volumen inkubacijske raztopine, koncentracije imatiniba in inhibitorjev pa so ostale enake. Pri prvem načinu smo celice prešteli samo na začetku, pri drugem pa na začetku inkubacije in potem še na koncu. Razlike prikazuje tabela X.

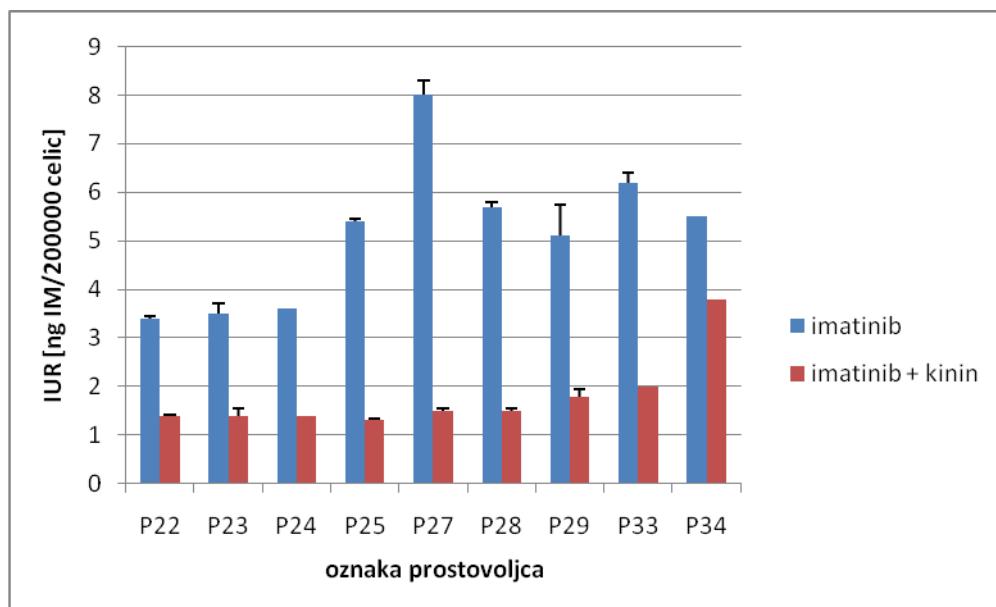
Tabela X: Prikaz razlik med dvema načinoma inkubacije.

	PRVI NAČIN	DRUGI NAČIN
VOLUMEN	5 mL	15 mL
VSEBNIK	inkubacijske plošče	T25 plošče
ŠTETJE GRANULOCITOV	na začetku	na začetku in na koncu

Po prvem načinu smo inkubirali granulocite 21 prostovoljcev, kjer je bil kot inhibitor uporabljen prazosin, ki nespecifično inhibira prenašalce. Rezultatov od teh prostovoljcev pri obeh načinih nismo vključili v primerjavo dveh načinov inkubacije. Po prvem načinu smo s kininom inhibirali privzem v granulocite devetim prostovoljcem, po drugem načinu pa dvanajstim prostovoljcem. Vrednosti IUR so prikazane v tabeli XI in XII ter na sliki 13 in sliki 14.

Tabela XI: IUR imatiniba ter imatiniba in kinina po prvem načinu inkubacije.

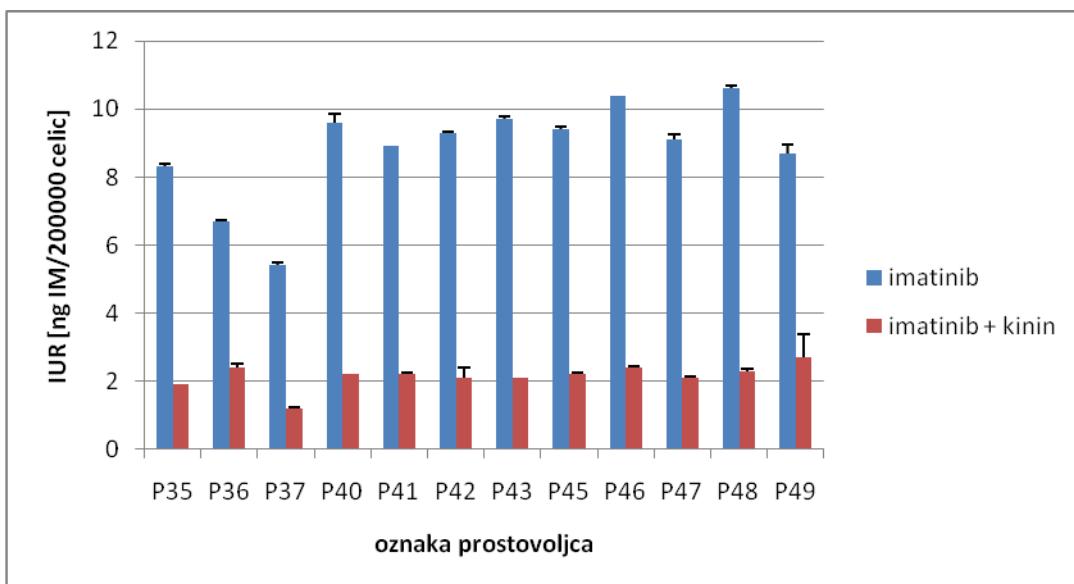
	IUR IM [ng IM/200000 celic]	IUR IM +KIN 300 [ng IM/200000 celic]
P22	$3,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,04$
P23	$3,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$
P24	3,6	1,4
P25	$5,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
P27	$8,0 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,1$
P28	$5,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$
P29	$5,1 \pm 1,3$	$1,8 \pm 0,3$
P33	$6,2 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,01$
P34	5,5	4,9
\bar{x}	5,2	1,5
s	1,5	1,1



Slika 13: IUR imatiniba ter imatiniba in kinina po prvem načinu inkubacije.

Tabela XII: IUR imatiniba ter imatiniba in kinina po drugem načinu inkubacije.

	IUR IM [ng IM/200000 celic]	IUR IM+KIN 300 [ng IM/200000 celic]
P35	8,3 ± 0,2	1,9 ± 0,03
P36	6,7 ± 0,1	2,4 ± 0,2
P37	5,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1
P40	9,6 ± 0,5	2,2 ± 0,03
P41	8,9 ± 0,02	2,2 ± 0,1
P42	9,3 ± 0,1	2,1 ± 0,6
P43	9,7 ± 0,2	2,1 ± 0,04
P45	9,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
P46	10,4	2,4 ± 0,1
P47	9,1 ± 0,3	2,1 ± 0,1
P48	10,6 ± 0,2	2,3 ± 0,1
P49	8,7 ± 0,5	2,7 ± 1,4
\bar{X}	8,8	2,2
s	1,4	0,3



Slika 14: IUR imatiniba ter imatiniba in kinina po drugem načinu inkubacije.

Izračunali smo tudi povprečno vrednost izgub celic v inkubacijskih raztopinah pri 15 prostovoljcih (P35-P49) in sicer smo računali izgube v inkubacijski raztopini imatiniba ter imatiniba in kinina. Povprečna izguba celic v inkubacijskih raztopinah imatiniba ter imatiniba in kinina pri 15 prostovoljcih je bila 30 %.

Iz tabele XIII je razvidno, da so med prvim in drugim načinom inkubacije prisotne signifikantne razlike v IUR, kar pomeni, da izgube celic vplivajo na vrednosti IUR in je zelo pomembno, da se jim v največji možni meri izognemo.

Tabela XIII: *t*-test za prikaz razlik med prvim in drugim načiom inkubacije.

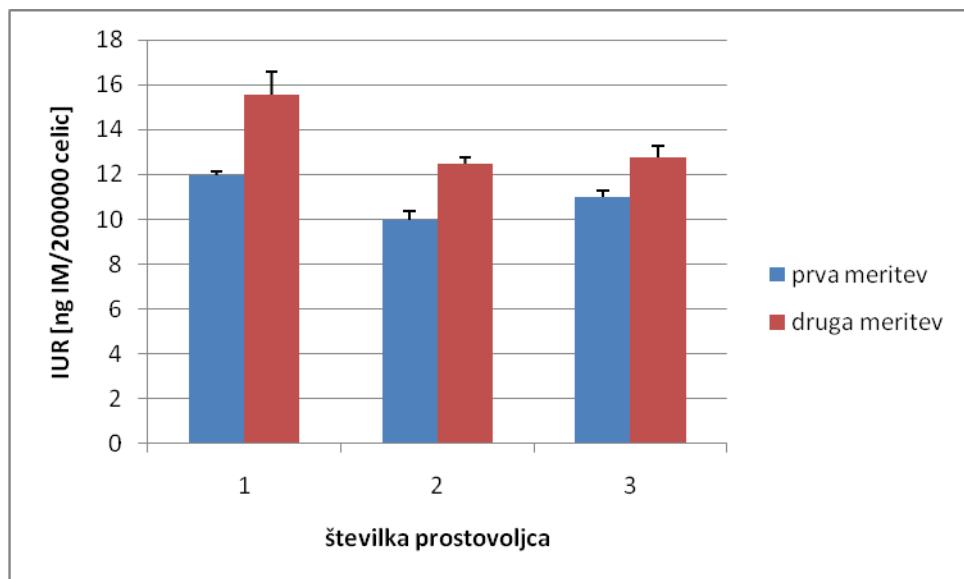
	\bar{x}	<i>s</i>	<i>p</i>	signifikantnost
IM-1.način	5,2	1,5		
IM-2.način	8,8	2,2	0,00002	DA

Izgube celic so torej pomemben dejavnik, ki vpliva na vrednost IUR. Glede na več kot 30 % nižjo vrednost IUR pri prvem načinu inkubacije lahko predpostavljamo, da so bile izgube celic še večje. Vzroki za izgube celic so lahko različni. Pomemben vzrok je izguba celic pri vezavi na plastiko vsebnika oz. različnih vsebnikov katerim je izpostavljena v času izolacije. Temu se ne moremo povsem izogniti, vseeno pa smo z drugim načinom inkubacije zmanjšali izgube, ker smo uporabili večji volumen inkubacijske suspenzije, ki ima s plastičnim vsebnikom manjšo stično površino in manjšo možnost vezave celic na plastiko. Poleg tega je pri večjem volumnu štetje celic enostavnejše in prihaja do manj

napak, hkrati pa pri prenosu celične suspenzije v epruvete pri večjem volumnu zmanjšamo izgube zaradi prenosa.

4.4 PONOVLJIVOST IN INTRAINDIVIDUALNA VARIABILNOST

Pri ugotavljanju intraindividualne variabilnosti smo trem prostovoljcem kri ponovno odvzeli po nekaj tednih. Naš prvotni namen je bil preveriti, če je metoda ponovljiva, vendar pa smo vmes metodo izpopolnili in ugotavljanje ponovljivosti pri dveh meritvah, ki so bile pridobljene po dveh različnih načinih inkubacije, ni bilo mogoče. Zato je razumljivo, da na sliki 15 vidimo različne vrednosti IUR pri istem prostovoljcu in po različnih metodah inkubacije granuloctiov. V prejšnjem poglavju smo pokazali, da pri drugem načinu inkubacije prihaja do manj izgub kot pri prvem in to potrjujejo tudi rezultati na sliki 15. Treba pa je poudariti, da je bila meritev izvedena samo pri treh prostovoljcih in zato na podlagi teh rezultatov ne moremo narediti zaključkov. Če bi želeli ugotoviti, kakšna je ponovljivost metode, bi bilo potrebno isto metodo ponovno preizkusiti na večjem številu prostovoljcev z enako metodo inkubacije oz. pridobivanja granulocitov.



Slika 15: IUR pri istem prostovoljcu, ki so bile drugič izmerjene po nekaj tednih.

5 SKLEP

V diplomskem delu smo ugotovili,

- da prazosin pri 50 μM koncentraciji ni učinkovit inhibitor prenašalca OCT1, ampak je inhibicija značilna pri 100 μM koncentraciji, vendar pa je pri tej koncentraciji toksičen za granulocite in ga je smiselno v nadalnjih raziskavah nadomestiti s primernejšim inhibitorjem.
- da se je v primerjavi sposobnosti inhibicije OCT1 prenašalca za najbolj učinkovitega izkazal kinin v 300 μM koncentraciji. (Primerjali smo inhibitorje atropin v 50 in 100 μM koncentraciji, prokainamid v 100 in 1000 μM koncentraciji in kinidin v 200 μM koncentraciji). Poleg tega pa različne koncentracije kinina v intervalu med 300 in 600 μM signifikantno ne vplivajo na inhibicijo OCT1 prenašalca.
- da atropin pri koncentracijah od 25 do 100 μM ni učinkovit inhibitor OCT1 prenašalca.
- da imata inhibitorja kinin v 300 μM koncentraciji in prazosin v 100 μM koncentraciji statistično enake vrednosti IUR, to pomeni, da je OCT1 pomemben prenašalec za privzem imatiniba v granulocite in da je kljub podobnim vrednostim IUR bolj specifična inhibicija OCT1 prenašalca s 300 μM kininom kot s 100 μM prazosinom.
- da verjetno pri obeh načinih inkubacije prihaja do izgub celic, vendar je bolj primeren način tisti, ki izgube celic upošteva, te pa so bile z optimiziranim postopkom inkubacije tudi zmanjšane.
- da s pridobljenimi rezultati nismo mogli ugotoviti kakšna je intraindividualna variabilnost pri prostovoljcih, smo pa pokazali, da med dvema načinoma inkubacije prihaja do razlik v vrednostih IUR in da višje vrednosti dobimo pri drugem načinu inkubacije.

LITERATURA

- [1] Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M: Chronic myeloid leukaemia, Lancet, vol. 370, 342-350, 2007.
- [2] Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Peter Č, Koželj M, *et al.*: Interna medicina, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, Slovenija, 2011.
- [3] Macmillan - cancer support,
<http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Leukaemiacchronicmyeloid/AboutCML/WhatisCML.aspx>, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [4] Deininger MW , Druker BJ : Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib, Pharmacological reviews, vol. 55, 401-423, 2003.
- [5] Preložnik Zupan I, Pajič T: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije, Zdravniški Vestnik, vol. 77, I-5-10, 2008.
- [6] Mlakar J, Preložnik Zupan I, Kralj E, Trontelj J, Lusa L, *et al.*: Koncentracija imatiniba v plazmi - nov laboratorijski podatek pri spremljanju zdravljenja slovenskih bolnikov s kronično mieloično levkemijo, Zdravniški vestnik, vol. 80, 163-170, 2011.
- [7] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, *et al.*: Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, Blood, vol. 108, št. 6, 1809-1820, 2006.
- [8] Glaser M, Grmek-Zemljič T, Borin P: Naše izkušnje pri zdravljenju kronične mieloične levkemije z imatinib mesilatom, Zdravniški vestnik, vol. 73, 207-210, 2007.
- [9] Larson RA , Druker BJ , Guilhot F, O'Brien SG , Riviere GJ , *et al.*: Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety study in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS, Blood, vol. 111, št. 9, 4022-4028, 2008.

- [10] D'Avolio A, Simiele M, De Francia S, Ariando A, Baietto L, *et al.*: HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 59, 109-116, 2012.
- [11] Peng B, Lloyd P, Schran H: Clinical Pharmacokinetics of Imatinib, Clinical Pharmacokinetics, vol. 44, št. 9, 879-894, 2005.
- [12] Di Gion P, Kanefendt F, Lindauer A, Scheffer M, Doroshyenko O, *et al.*: Clinical Pharmacokinetics of Tyrosine Kinase Inhibitors, Clinical Pharmacokinetics, vol. 50, št. 9, 551-603, 2011.
- [13] Thomas J, Wang L, E. CR , Pirmohamed M: Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance, Blood journal, vol. 104, 3739-3745, 2004.
- [14] Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, Franke RM , Schiavon G, *et al.*: Drug Transporters and Imatinib Treatment: Implications for Clinical Practice, Clinical Cancer Research, vol. 17, št. 3, 406-415, 2011.
- [15] White DL , Saunders VA , Dang P, Engler J, Venables A, *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, vol. 110, št. 12, 4064-4072, 2007.
- [16] Solvo biotechnology - The transporter company,
<http://www.solvobiotech.com/transporters/oct1>, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [17] White DL , Radich J, Soverini S, Saunders VA , Frede AK , *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, vol. 97, št. 6, 907-914, 2012.
- [18] Engler JR , Zannettion AC , Bailey CG , Rasko JE , Hughes TP , *et al.*: OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL, Haematologica, vol. 96, št. 2, 213-220, 2011.

- [19] Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B: The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox), Drug Discovery Today, vol. 13, št. 9-10, 379-393, 2008.
- [20] Jordanides NE , Jorgensen HG , Holyoake TL , Mountford JC : Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate, Blood, vol. 108, 1370-1373, 26 6 2006.
- [21] Burger H, van Tol H, Boersma AW , Brok M, Wiemer EA , *et al.*: Imatinib mesylate (ST1571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump, Blood, vol. 104, št. 9, 2940-2942, 2004.
- [22] Baccarani M, Pileri S, Steegmann J, Muller M, Soverini S, *et al.*: Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Annals of oncology , vol. 23, št. 7, vii72-vii77, 2010.
- [23] European treatment and outcome study,
http://www.eutos.org/content/path_to_cure/index_eng.html, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [24] Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, *et al.*: Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, Blood, vol. 109, št. 8, 3496-3499, 2007.
- [25] Baccarani M, Deininger MW R G : European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, Blood, vol. 122, št. 6, 872-884 , 2013.
- [26] Ecole supérieure de Biotechnologie Strasbourg, http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/2eme-annee/purification_prot/PDF/18115269AB.pdf, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [27] Miltenyi Biotec,
<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001100/IM0001158.a.shx>, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.

- [28] Sigma-Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/89121407?lang=en®ion=SI>,
zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [29] Hayter A: Probability and Statistics for Engineers and Scientists, 4 ured., Brooks/Cole, Boston, MA, ZDA, 2012.
- [30] RxList - The Internet Drug Index, <http://www.rxlist.com/gleevec-drug.htm>, zadnjič obiskano: 26.6. 2013.
- [31] The Univeristy of Adelaide - Departement of Chemistry,
<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/int-std.htm>, zadnjič obiskano: 26. 6. 2013.
- [32] Thiel A, Scheffold A, Radbruch A: Immunomagnetic cell sorting - pushing the limits, Immunotechonology, vol. 4, 89-96, 1998.