

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KUKENBERGER (roj. ZUPANČIČ)

VPLIV NEKATERIH DEJAVNIKOV NA PRIVZEM IMATINIBA V
LEVKOCITE

Ljubljana, 2013

Nina Kukenberger, roj. Zupančič: Vpliv nekaterih dejavnikov na privzem imatiniba v levkocite

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KUKENBERGER (roj. ZUPANČIČ)

VPLIV NEKATERIH DEJAVNIKOV NA PRIVZEM IMATINIBA V
LEVKOCITE

The influence of several factors on the imatinib uptake and retention in the
leukocytes

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm. Praktične meritve smo izvajali v Specializiranem hematološkem laboratoriju v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, Njegoševa 4, 1000 Ljubljana ter na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Simonu Žaklju, mag. farm., delovni mentorici Evi Kralj, mag. farm., asist. dr. Juretu Trontlju, mag. farm., tehnični sodelavki Nevenki Lilik, Neži Zupanc, zaposlenim v Specializiranem hematološkem laboratoriju, še posebej doc. dr. Tadeju Pajiču, Anici Mihajlović, Vanji Strbad, Nejcju Lamovšku, Špeli Žula, Urški Ribič in ostalim za pomoč ter nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Hvala vsem prostovoljcem, ki so darovali svojo kri v znanstvene namene.

Zahvaljujem se tudi svojemu možu, staršem, bratoma in sestri ter ostali družini in prijateljem za podporo, razumevanje in pomoč.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

Nina Kukenberger

Ljubljana, september 2013

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Član magistrske komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	7
KAZALO TABEL	8
POVZETEK	9
ABSTRACT	11
SEZNAM OKRAJŠAV	13
1 UVOD	14
1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA	14
1.2 ZDRAVLJENJE KML	14
1.2.1 IMATINIB	16
2 NAMEN DELA	20
3 MATERIALI	21
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL	21
3.2 STANDARDI	21
3.3 REAGENTI IN TOPILA	21
3.4 NAPRAVE IN PRIBOR	22
4 METODE	24
4.1 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN	24
Priprava 1x pufra PBS	24
Priprava matične raztopine za lizo eritrocitov (10x)	24
Priprava raztopine za lizo eritrocitov	24
Priprava 4,5 mM vodne raztopine NH ₄ -formiata	24

Priprava internega standarda.....	24
Priprava inkubacijskih raztopin	24
Priprava vzorcev za umeritvene krivulje	26
4.2 IZOLACIJA PBMC IN GRAN.....	26
4.3 INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM	28
4.4 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA.....	28
4.5 ANALIZA Z LC-MS/MS	29
4.6 IZOLACIJA GRANULOCITOV S CD15 POZITIVNO SELEKCIJO	30
4.7 DOLOČITEV IZGUB IMATINIBA MED PONOVNO »IZOLACIJO« PREDHODNO INKUBIRANIH GRANULOCITOV S CD15 ⁺ SELEKCIJO	30
4.8 IZOLACIJA GRANULOCITOV BOLNIKOV S KML.....	31
4.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	31
5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
5.1 PRIVZEM IMATINIBA	34
5.2 PRIVZEM N-DESMETIL IMATINIBA	37
5.3 PRIMERJAVA MED PRIVZEMOM IMATINIBA IN N-DESMETIL IMATINIBA	38
5.4 VPLIV SPECIFIČNE INHIBICIJE PRENAŠALCEV BCRP, P-gp IN OCT1 NA IUR IMATINIBA	39
5.4.1 Vpliv inhibicije BCRP in P-gp.....	40
5.4.2 Vpliv inhibicije OCT1	41
5.5 VPLIV DEJAVNIKOV NA IUR PRI PROSTOVOLJCIH	43
5.5.1 Vpliv starosti	43
5.5.2 Vpliv spola	44

5.6 DOLOČITEV IZGUB IMATINIBA MED PONOVNO »IZOLACIJO« PREDHODNO INKUBIRANIH GRANULOCITOV S CD15 ⁺ SELEKCIJO	45
5.7 IZOLACIJA GRANULOCITOV ZA NAMEN DOLOČANJA ZNOTRAJCELIČIH KONCENTRACIJ PRI BOLNIKI S KML NA TERAPIJI Z IMATINIBOM	46
6 SKLEP	48
7 LITERATURA	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Imatinib mezialat	17
Slika 2: NDI.....	17
Slika 3: Raztopina Ficoll-a in periferne krvi pred centrifugiranjem.....	27
Slika 4: Vzorec po centrifugiranju.....	27
Slika 5: D8-imatinib.....	29
Slika 6: Primerjava privzema IM v celice brez ali z inhibitorjem OCT1 prazosinom in aktivnosti OCT1 s štejetjem celic in brez štetja celic.	35
Slika 7: Primerjava privzema IM brez inhibitorja ter v prisotnosti PR 50 in PR 100.	36
Slika 8: Privzem IM v prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev, s štejetjem celic.	36
Slika 9: Privzem NDI v granulocite brez in z inhibitorjem OCT1, n=3.	37
Slika 10: Primerjava privzema IM in NDI v granulocite, brez in z inhibitorjem OCT1.	38
Slika 11: Privzem IM v GRAN prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev prenašalcev.	39
Slika 12: Ko 143	40
Slika 13: PSC 833	41
Slika 14: Prazosin	41
Slika 15: Kinin.....	41
Slika 16: Prikaz števila, starosti in izvedbe poskusa za vse prostovoljce.	43
Slika 17: Spol prostovoljcev, prikaz izvedbe poskusa – brez ali s štejetjem celic.	44
Slika 18: Privzem IM brez ali z inhibitorjem, primerjava med moškimi in ženskami, s štejetjem celic.	44

KAZALO TABEL

Tabela I: Privzem IM [ng IM/200 000 celic] v celice z ali brez prazosina ter aktivnost OCT1 – ugotavljanje signifikantosti med prostovoljci brez ali s štejem celic.	34
Tabela II: Privzem IM v prisotnosti 2 različnih inhibitorjev.....	36
Tabela III: Primerjava privzema IM in NDI v granulocite v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT1.....	38
Tabela IV: Privzem IM v GRAN v prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev prenašalcev OCT1, BCRP, P-gp..	39
Tabela V: Privzem IM v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja, primerjava med moškimi in ženskami.	45
Tabela VI: Izguba IM (%) predhodno inkubiranih granulocitov med izolacijo s CD15 ⁺ selekcijo.....	45
Tabela VII: Bolniki s KML na terapiji z IM.	46

POVZETEK

Izhodišča: Imatinib je zdravilna učinkovina za zdravljenje kronične mieloične levkemije (KML). Imatinib se v levkemične celice in iz njih prenaša z različnimi prenašalci. Aktivnost prenašalcev in s tem privzem imatiniba v tarčne celice vplivajo na uspešnost zdravljenja KML z imatinibom.

Namen dela: V nalogi želimo preizkusiti in po potrebi optimizirati metodo za določanje privzema imatiniba v mononuklearne celice (PBMC) in granulocite (GRAN) zdravih prostovoljcev, da bo primerna tudi za določanje privzema imatiniba v PBMC in GRAN pri bolnikih s KML.

Metode: Z inhibitorji prenašalcev organskega kationskega prenašalca 1 (OCT1), P-glikoproteina (P-gp) in BCRP smo proučevali njihov vpliv na privzem imatiniba v GRAN in (PBMC) zdravih prostovoljcev (n=48). Vsebnost znotrajceličnih koncentracij imatiniba smo merili z LC-MS/MS po ustrezni pripravi vzorcev.

Rezultati: Ugotovili smo nižji privzem imatiniba v prisotnosti inhibitorja prenašalca OCT1, česar pa nismo dokazali v prisotnosti inhibitorjev prenašalcev P-gp in BCRP. Merili smo tudi privzem imatinibovega aktivnega metabolita, *N*-desmetil imatiniba, v granulocite zdravih prostovoljcev in ugotovili, da se ne razlikuje od privzema imatiniba. Spol prostovoljcev ni signifikantno vplival na privzem imatiniba. Z izolacijo granulocitov s CD15 pozitivno selekcijo smo pridobili celice z minimalnimi izgubami učinkovine za nadaljnje določanje njene znotrajcelične koncentracije pri bolnikih zdravljenih z imatinibom. Pri teh bolnikih smo določili še plazemsko koncentracijo imatiniba in izračunali njeno razmerje z znotrajcelično koncentracijo.

Zaključki: Razvili smo dovolj hitro in v kombinaciji z ustrezno pripravo vzorcev dovolj občutljivo metodo, s katero bomo lahko na relativno majhnem vzorcu periferne bolnikove krvi (6 ml) določili privzem imatiniba v levkemične celice. Z rezultati smo naredili korak naprej pri razvijanju metode, ki bo primerna za optimizacijo in tudi za napoved uspešnosti zdravljenja KML z imatinibom v klinični praksi.

Nina Kukenberger, roj. Zupančič: Vpliv nekaterih dejavnikov na privzem imatiniba v levkocite

Ključne besede: imatinib, kronična mieloična levkemija, OCT1, znotrajcelična koncentracija, aktivni privzem, LC-MS/MS

ABSTRACT

Background: Imatinib is a Bcr-Abl1 tyrosine kinase inhibitor and is used primarily for the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). Its transport into and out of the leukemic cells is mediated by several uptake and efflux transporters. The transporter activity and imatinib uptake into the target cells influence the treatment success.

Aim: A method for the determination of imatinib uptake into mononuclear cells (PBMCs) and granulocytes should be tested and if necessary, optimized on healthy volunteers so that it can be used on patients with CML in further research.

Methods: We measured IM uptake and retention in the granulocytes and PBMCs of peripheral blood from healthy volunteers (n=48) in the presence and absence of OCT1, P-gp and BCRP inhibitors. Imatinib intracellular concentration was measured with LC-MS/MS method after a suitable sample preparation.

Results: Imatinib uptake was significantly lower in the presence of OCT1 inhibitor, however P-gp and BCRP were not observed to influence imatinib efflux from either type of cells. The uptake of N-desmethyl imatinib (NDI), an active metabolite of IM, into granulocytes of healthy volunteers was not significantly different than the uptake of the parent drug. Volunteers' gender had no impact on IM transport into the cells. Granulocytes obtained with CD15 positive selection from CML patients treated with IM, were isolated from peripheral blood with no significant drug loss and thus proved to be appropriate for the determination of intracellular concentration. We also measured imatinib plasma concentration in the same patients and compared both values.

Conclusions: A sufficiently rapid and sensitive method including the appropriate sample preparation procedures was developed to allow measurements of the intracellular drug concentration even with cells obtained from only 6 ml of whole blood. We have made significant progress in the development of a clinically useful method for possible prediction of CML therapy success with imatinib.

Nina Kukenberger, roj. Zupančič: Vpliv nekaterih dejavnikov na privzem imatiniba v levkocite

Key words: imatinib, chronic myelogenous leukemia, OCT1, intracellular concentration, active uptake, LC-MS/MS

SEZNAM OKRAJŠAV

GRAN - granulociti

IM – imatinib

IUR – privzem IM, angl. imatinib uptake and retention

KIN - kinin

KML – kronična mieloična levkemija

NDI – N-desmetil imatinib

OCT1 – organski kationski prenašalec 1

PBMC – periferne mononuklearne celice

PR 100 – prazosin v koncentraciji 100 μM

PR 50 – prazosin v koncentraciji 50 μM

1 UVOD

1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

Kronična mieloična levkemija (KML) je mieloproliferativna bolezen, pri kateri je zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične celice. Bolezen je pridobljena. Vzrokov ne poznamo, edini doslej znani dejavnik tveganja je obsevanje z ionizirajočimi žarki. Zaradi dvojne zamenjave (recipročne translokacije) DNA med kromosoma 9 in 22: (t(9;22) (q34;q11)) nastane kromosom Philadelphia z genom *bcr-abl*. Produkt tega gena je beljakovina z lastnostmi tirozin-kinaze, ki povzroči nenadzorovano celično delitev matičnih celic in s tem nastanek levkemičnega klona (1).

Večino bolnikov odkrijemo v kroničnem obdobju bolezni, značilni znaki, ki niso nujno prisotni, so utrujenost, hujšanje, potenje in splenomegalija, v krvni sliki pa levkocitoza s prevladovanjem zrelih nevtrofilnih granulocitov. Kronično obdobje preko pospešenega obdobja preide v blastno krizo oz. preobrazbo s sliko akutne levkemije. Za diagnozo KML je ključna prisotnost kromosoma Philadelphia, ki ga najdemo v levkemičnih celicah pri citogenetskem pregledu kostnega mozga (kariogramu). Pri 5 % tistih, pri katerih kromosoma ne moremo dokazati, lahko dokažemo zlit gen *bcr-abl* z metodo fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH) ali z metodo obratnega prepisovanja in verižne reakcije s polimerazo (PCR v realnem času) (2).

1.2 ZDRAVLJENJE KML

Pri zdravljenju KML želimo zmanjšati število rakavih celic in s tem znake bolezni; doseči želimo remisijo (3). Prva izbira pri zdravljenju KML po evropskih priporočilih je imatinib, zaviralec tirozin-kinaze prve generacije. Ameriške smernice NCCN (t. j. *National Comprehensive Cancer Network*) za prvo izbiro poleg imatiniba priporočajo tudi zaviralca tirozin-kinaze druge generacije – nilotinib in dasatinib (2). V Sloveniji leto in pol za prvo zdravljenje KML uporabljamo nilotinib pri novoodkritih bolnikih. Tisti bolniki, ki so dosegli dober molekularno genetični odziv, so ostali na imatinibu, tisti, ki imatiniba niso prenašali ali ni bil učinkovit, pa prejemajo dasatinib (30). Inhibitorji tirozin-kinaze omogočajo dober nadzor bolezni, ozdravitve pa za zdaj še ne (1). Možna terapevtska

pristopa sta še alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic in paliativno zdravljenje s kemoterapevtiki.

Nilotinib in dasatinib sta močnejša zaviralca *in vitro* kot imatinib, učinkovita sta tudi pri večini mutacij kinazne domene Bcr-Abl, zaradi katerih se bolniki na imatinib ne odzivajo. Do sedaj še ni dovolj podatkov ali v primerjavi z imatinibom tudi podaljšata preživetje (2). Nilotinib in dasatinib sta učinkovita v kroničnem in napredovalem obdobju KML. Običajni odmerek za zdravljenje z nilotinibom je 400 mg/12 h, z dasatinibom pa 100 mg dnevno (4).

Edino možnost ozdravitve KML predstavlja alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic (presaditev, pri kateri potrebujemo darovalca), vendar je smrtnost pri tem postopku 15 – 30 % (2). Presaditev je možna v kroničnem obdobju pri bolnikih, mlajših od 55 let, ki imajo ustreznega darovalca kostnega mozga. Vseeno lahko pride do ponovitve bolezni (3).

V primeru neodzivnosti na zaviralce tirozin-kinaz oziroma pri bolnikih, ki niso primerni za presaditev krvotvornih matičnih celic, uporabljamo busulfan, hidroksisečnino in interferon alfa s citozinom arabinozidom ali brez njega (2). Busulfan je alkilirajoči citostatik, s katerim lahko dosežemo remisijo. Pri dolgotrajnem zdravljenju povzroča pljučno fibrozo in večjo pigmentacijo kože. Povprečno preživetje bolnikov je 45 mesecev. Hidroksisečnina je zaviralec encima ribonukleozid-reduktaza in z njo prav tako lahko dosežemo remisijo. Povprečno preživetje bolnikov je 60 mesecev. Z interferonom alfa lahko zmanjšamo klon celic, ki imajo prisoten kromosom Philadelphia. Tudi ta zdravilna učinkovina ima številne neželene učinke: povišano telesno temperaturo, znojenje, utrujenost, glavobol (3).

Klinično preizkušajo nekatere nove učinkovine: bosutinib in ponatinib (zaviralca tirozin-kinaze Bcr-Abl) ter aurora kinazne zaviralce (2).

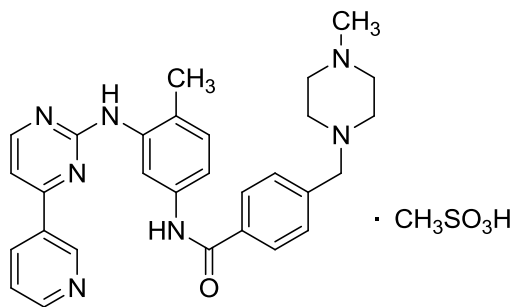
Uspešnost zdravljenja KML ocenjujemo na več nivojih: kontroliramo krvno sliko (hematološki odgovor), določamo preostale aktivne metafaze kromosoma Philadelphia (citogenetski odgovor) in določamo stopnjo prepisa *bcr-abl* s kvantitativnim PCR v realnem času (molekularni odgovor) v vzorcu periferne krvi ali kostnega mozga (4).

1.2.1 IMATINIB

Imatinib – IM (Glivec, Gleevec, STI-571 (1)) je derivat 2-fenilaminopirimidina (6). Po ATC klasifikaciji ga uvrščamo med zaviralce protein-tirozin-kinaze, L01XE01 in je usmerjena molekularna zdravilna učinkovina proti proteinu, ki nastaja kot posledica izmenjave genov med kromosomoma 9 in 21 ter posledično oblikovanja novega, Bcr-Abl onkogenega. Tega onkoproteina v zdravih celicah ni. IM ovira vezavno mesto za ATP na Abl, zato ne pride do prenosa fosfatnih skupin in sledeče fosforilacije tirozinskih ostankov na substratnih proteinih. S tem se prepreči rakasta preobrazba celic (3). Zavira tudi avtofosforilacijo nekaterih drugih receptorjev – PDGFR, KIT receptorja, Abl sorodnih tirozin-kinaz (7). Najpogostejši neželeni učinki so slabost, bruhanje, zadrževanje tekočine v telesu in kožne spremembe (3). Najresnejši neželeni učinek je mielosupresija (8). V kroničnem obdobju KML je standarden odmerek IM 400 mg dnevno. Bolnike, ki jih odkrijemo v napredovalem obdobju KML, pričnemo zdraviti z višjimi odmerki IM, tj. 600-800 mg dnevno. Ob napredovanju bolezni v pospešeno obdobje oz. blastno krizo bolnika zdravimo z inhibitorjem tirozin-kinaze druge generacije ali pa izvedemo, če je to mogoče, alogenično presaditev krvotvornih matičnih celic.

Pri zdravljenju z IM so opazili primarno in sekundarno rezistenco levkemičnih celic na učinkovino. O primarni rezistenci govorimo, če želenega odziva na zdravljenje nikoli ne dosežemo, o sekundarni pa, če se bolezen po določenem času kljub že doseženi remisiji povrne. Najpomembnejša dobro raziskana dejavnika pri pojavu rezistence sta klonska evolucija in pojav točkovnih mutacij, ki ju največkrat zasledimo pri bolnikih v pospešenem poteku bolezni ali v blastni krizi (4).

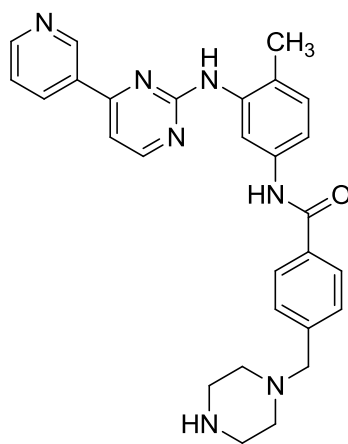
Učinkovina je v tabletah ali kapsulah v obliki imatinib mezilata. Imatinib mezilat (Slika 1) je v klinični uporabi od leta 1998. Uporabljamo ga za zdravljenje KML, akutne limfoblastne levkemije, nekaterih gastrointestinalnih tumorjev in še nekaterih drugih rakavih bolezni (9).



Slika 1: Imatinib mezilat

IM se po peroralni aplikaciji v obliki kapsul ali tablet hitro in skoraj v celoti absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Hrana ima na absorpcijo zanemarljiv vpliv, lahko pa z jemanjem tega zdravila med obrokom zmanjšamo tveganje draženja prebavil (9). Najvišjo plazemsko koncentracijo dosežemo v 2-4 h po aplikaciji (10).

Po intravenski infuziji 100 mg IM v 1 h je povprečni volumen distribucije (V_d) 435 L. Razpolovni čas ($t_{1/2}$) IM znaša približno 22 h. Glavni metabolit IM je *N*-desmetil imatinib (NDI) (Slika 2), ki nastaja v jetih z encimom CYP450 3A4 (11). NDI ima večji volumen distribucije (1017-3260 L) in daljšo razpolovno dobo (40-74 h) kot IM (10).



Slika 2: NDI

In vitro so ugotovili, da se IM v 95 % veže na plazemske proteine, predvsem na α_1 -kislil glikoprotein in albumin. Njegov glavni metabolit NDI se veže podobno. IM se v glavnem presnavlja s citokromi P450 3A4, 3A5 in 2C8. IM in NDI se pretežno izločata iz telesa z blatom, v manjši meri pa tudi z urinom (10).

Spremljanje uspešnosti zdravljenja z IM

Citogenetske preiskave: ob pojavu bolezni, nato vsakih 6 mesecev do popolnega citogenetskega odgovora, pozneje na 12 mesecev.

FISH (fluorescenčna hibridizacija in situ): pred zdravljenjem.

PCR v realnem času: najpomembnejša preiskava za spremljanje uspešnosti zdravljenja z IM. Določimo vrednost razmerja *bcr-abl*/kontrolni gen (*abl*) vsake 3 mesece. Vrednost 1 % ali manj običajno pomeni popoln citogenetski odgovor (4).

Prenos IM skozi biološke bariere

Imatinib je substrat za nekatere ABC prenašalce (ang. *ATP-binding cassette transporters*; prenašalci z ATP-vezavno domeno), med katere spadata tudi P-glikoprotein (*ABCB1*, *MDR1*) in BCRP (*ABCG2*, ang. *breast cancer resistance protein*). Ti proteini prenašajo učinkovino iz celice (12). P-gp in BCRP sta membranska glikoproteina (13). Izražena sta v mnogih tkivih, vključno z jetri, tankim črevesom, ledvicami, posteljico in krvno-možgansko pregrado (12). BCRP je poltransporter, kar pomeni, da je za aktivni transport potreben dimer (13). IM v visokih koncentracijah tudi zavira ABC prenašalce (12). IM je hkrati modulator in substrat P-gp prenašalcev (14). Rezultati poskusov ali je IM substrat BCRP ali ni, so si nasprotujoči (15). Švicarski znanstveniki so ugotovili, da se IM prenaša z obema prenašalcema, vendar ima IM *in vitro* višjo afiniteto za prenos s P-gp kot za prenos z BCRP, ob tem pa moramo upoštevati tudi dejstvo, da se P-gp močneje izraža v sluznici tankega črevesja kot BCRP (16).

Organski kationski prenašalci (OCT, ang. *organic cation transporter*) skrbijo za prenos endogenih in eksogenih substratov, ki jim je skupna kationska oblika pri fiziološkem pH. Prenos z OCT1 skozi biološke bariere poteka večinoma le v notranjost celic (17). OCT1 je prisoten predvsem na bazolateralni strani hepatocitov in je s tem odgovoren za prenos učinkovin iz krvne plazme v jetra. Prav tako sodeluje pri privzemu učinkovin v levkemične celice (15). Izražanje oz. predvsem aktivnost prenašalca OCT1 naj bi po najnovejših študijah vplivala na zdravljenje KML z IM.

Aktivnost OCT1 je definirana kot razlika v privzemu [^{14}C]-IM brez in v prisotnosti inhibitorja OCT1 prazosina (6). Če so k perifernim mononuklearnim celicam bolnika s KML pred začetkom terapije z IM dodali inhibitor prazosin, se je zvišala koncentracija IM, ki je bil potreben za učinek. Izkazalo se je, da je aktivnost OCT1 pomembna le pri zrelejših stopnjah blastov, ne pa tudi pri nezrelih $\text{CD}34^+$ celicah (12). Aktivnost OCT1 torej vpliva na doseganje popolnega citogenetskega odgovora, na verjetnost napredovanja bolezni ter na podaljšanje preživetja bolnikov s KML (18).

2 NAMEN DELA

V nalogi želimo preizkusiti in po potrebi optimizirati metodo za določanje privzema imatiniba v mononuklearne celice in granulocite zdravih prostovoljcev, da bo primerna tudi za določanje privzema imatiniba v mononuklearne celice in granulocite pri bolnikih s KML.

Na zadostnem številu prostovoljcev je potrebno preveriti primerljivost rezultatov s tistimi v referenčni literaturi in raziskati vzroke za morebitna odstopanja naših meritev. V primeru, da bodo vzroki za odstopanja v uporabljenih metodah, bomo le-te poskusili ustrezno izboljšati in ponovno preveriti njihovo ustreznost.

Ugotoviti je potrebno, kakšen je najmanjši možen volumen vzorca krvi, s katerim bi še lahko zanesljivo določali znotrajcelične koncentracije imatiniba in njegov aktivni privzem.

Preverili bomo vpliv spola na privzem IM in vpliv starosti. Spol najverjetneje ne vpliva na privzem IM in s tem uspešnost zdravljenja z IM, starost pa bi lahko bila pomembnejši dejavnik. Primerjali bomo tudi vpliv specifične inhibicije različnih prenašalcev, s katerimi se IM prenaša v in iz celic, na celokupni privzem IM v celice. Preverili bomo, kakšen je privzem aktivnega metabolita *N*-desmetil imatiniba v celice ter vpliv specifične inhibicije prenašalcev, ki so odgovorni tudi za prenos metabolita v celice in iz njih. Privzem IM in NDI bomo primerjali med sabo, da bomo ugotovili, ali obstajajo kakšne bistvene razlike med sicer strukturno zelo sorodnima spojinama.

Določili bomo tudi % izgube učinkovine iz granulocitov med izolacijo s CD15⁺ selekcijo v primerjavi s spiranjem s PBS pri zdravih prostovoljcih. S tem bomo ocenili primernost te metode za določanje znotrajcelične koncentracije IM v granulocitih pri bolnikih s KML, ki se zdravijo z IM.

Pri bolnikih s KML, ki se zdravijo z IM, bomo izolirali granulocite in izmerili znotrajcelično koncentracijo IM. Izmerili bomo tudi plazemsko koncentracijo IM, da bomo lahko ugotovili, ali se učinkovina *in vivo* koncentrira v granulocitih.

3 MATERIALI

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Poskuse smo izvajali na granulocitih in mononuklearnih celicah (PBMC), ki smo jih izolirali iz periferne krvi zdravih prostovoljcev ter na granulocitih bolnikov s KML, ki so na terapiji z IM. Kri smo odvzeli v Dnevni bolnišnici Oddelka za hematologijo, Njegoševa 4, 1000 Ljubljana. Uporabo bioloških vzorcev je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko (št. 77/1/07). Prostovoljci in bolniki so bili ustno in pisno seznanjeni z namenom raziskave ter so podpisali pisni pristanek.

3.2 STANDARDI

Imatinib, $C_{29}H_{31}N_7O$, $M=493,6$ g/mol (imatinib mezilat) (Sequoia Research Products, Oxford, Velika Britanija)

[2H_8]-imatinib, $C_{29}H_{23}D_8N_7O_4$, $M=501,66$ g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

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

Prazosin, $C_{19}H_{21}N_5O_4$, $M=383,40$ g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Kinin, $C_{20}H_{24}N_2O_2$, $M=324,42$ g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

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

Ko 143, $C_{26}H_{35}N_3O_5$, $M=469,57$ g/mol (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija)

3.3 REAGENTI IN TOPILA

Prečiščena voda

Etanol 96 %, C_2H_6O , $M=46,07$ g/mol (Kefo, Ljubljana, Slovenija)

10x PBS (*Phosphate-buffered saline*, fosfatni pufer) (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, CA, ZDA)

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

Nina Kukenberger, roj. Zupančič: Vpliv nekaterih dejavnikov na privzem imatiniba v levkocite

DMSO, C₂H₆OS, M=78,13 g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

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

Amonijev formiat, CH₅NO₂, M=63,06 g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

n-heksan 95 %, C₆H₁₄, M=86,18 g/mol (Pancreac Química, Barcelona, Španija)

Etil acetat (Reag. Ph. Eur.), C₄H₈O₂, M=88,10 g/mol (Pancreac Química, Barcelona, Španija)

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

Auto MACS Running Buffer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Nemčija)

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

3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

Hematološki analizator Beckman Coulter LH750 (Beckman Coulter, Inc, Brea, ZDA).

Viale z zataljenim insertom 350 µl (Cronus, Gloucester, Velika Britanija)

Polavtomatska pipeta Eppendorf 20-200 µl (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Polavtomatska pipeta Eppendorf 100-1000 µl (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Orbitalni stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Orbitalni stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

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

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

Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

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

Nina Kukenberger, roj. Zupančič: Vpliv nekaterih dejavnikov na privzem imatiniba v levkocite

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

Inkubator Sanyo MCO-15AC (Sanyo, Osaka, Japonska)

Centrifugirke TPP, 15 ml in 50 ml (TPP, Švica)

Plastične epruvete ali mikrocentrifugirke, 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

Sušilnik SpeedVac (Savant SC110A, Hicksville, ZDA)

Hladilnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

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

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

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Plošče za gojenje (TPP, Trasadingen, Švica)

LC-MS/MS, sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke zmogljivosti (UHPLC) Agilent Infinity 1290 in masnega detektorja Agilent 6460 Triple quadrupole (Agilent, Palo Alto, ZDA), kolona Kinetex 50x2,1 mm C18 z 2,6 µm delci (Phenomenex, Torrance, ZDA), ionski izvor ESI JetStream v pozitivnem načinu ionizacije

Ostali pribor: čaše, bučke, erlenmajerice, spatule, tehtiči, nastavki za pipete.

4 METODE

4.1 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN

Priprava 1x pufra PBS

Pripravili smo ga z redčenjem 10x pufra PBS. 100 ml 10x PBS smo nalili v sterilno bučko (1000 ml) in dopolnili do oznake s prečiščeno deionizirano vodo. Premešali smo z obračanjem. Preverili smo pH s pH metrom, biti je moral 7.1, v nasprotnem primeru smo pH uravnali s HCl ali z NaOH. Puffer smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Priprava matične raztopine za lizo eritrocitov (10x)

Zatehtali smo 82,6 g NH_4Cl , 10,0 g KHCO_3 in 0,37 g EDTA, vse prenesli v bučko (1000 ml) in dopolnili do oznake s prečiščeno deionizirano vodo. Matično raztopino smo do nadaljnje uporabe shranjevali v hladilniku pri 4 °C.

Priprava raztopine za lizo eritrocitov

Pripravili smo jo z redčenjem matične raztopine za lizo eritrocitov. 100 ml matične raztopine smo nalili v merilni valj, jo prenesli v bučko (1000 ml) in dodali prečiščeno deionizirano vodo do oznake. Premešali smo z obračanjem. Do uporabe smo jo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Priprava 4,5 mM vodne raztopine NH_4 -formiata

Zatehtali smo 14,19 mg trdnega amonijevega formiata in ga kvantitativno raztopili v 50 ml prečiščene vode.

Priprava internega standarda

Osnovno raztopino [$^2\text{H}_8$]-imatiniba v metanolu ($c=1$ mg/ml) smo redčili z enakim topilom do končne koncentracije 0,667 mg/l.

Priprava inkubacijskih raztopin

Vsak poskus smo izvajali v treh ponovitvah. V ploščico za inkubacijo smo napipetirali suspenzijo 3 000 000 celic ter 300 μl raztopine zdravilne učinkovine (IM), njenega

aktivnega metabolita (NDI) ali zdravilne učinkovine z dodanim inhibitorjem OCT1 prazosinom (PR 50, PR 100). Če smo kot inhibitor uporabili kinin (KIN), PSC 833 ali Ko 143, smo k 300 μ l raztopine učinkovine dodali še 50 μ l koncentrirane raztopine inhibitorja. Dodali smo tudi medij za inkubacijo do skupno 5 ml. Končna koncentracija IM (NDI) v raztopini za inkubacijo je bila tako 2 μ M, prazosina 50 oz. 100 μ M, kinina 300 μ M, PSC 833 in Ko 143 pa 10 μ M.

Imatinib (N-desmetil imatinib)

Natehtali smo 58,97 mg imatiniba mezilata (47,69 mg NDI) in ga raztopili v 10 ml etanola (osnovna raztopina s koncentracijo 10 mM). Iz osnovne raztopine smo vsak dan pripravljali končne raztopine tako, da smo 0,292 ml osnovne raztopine redčili z 50-odstotnim etanolom do 5 ml (raztopina 1, $c=0,583$ mM) in nato 1 ml raztopine 1 do 5 ml z 50-odstotnim etanolom (raztopina 2, $c=0,1167$ mM). 1,432 ml raztopine 2 smo redčili do 5 ml z medijem RPMI. Tako smo dobili raztopino s koncentracijo 0,0334 mM, ki smo jo pozneje lahko dodali v inkubacijsko zmes.

Prazosin

Natehtali smo 15,3 mg PR in ga raztopili v 5 ml 50-odstotnega etanola s pomočjo ultrazvoka.

Raztopino IM (NDI) in PR smo pripravili z mešanjem 4 ml osnovne raztopine PR in 1 ml raztopine 1 (0,538 mM) IM (NDI). 300 μ l te mešanice smo dali v 5 ml inkubacijskega medija.

PSC 833

1 mg PSC 833 smo raztopili v 0,823 ml. K suspenziji celic v mediju RPMI (5 ml) smo dodali 50 μ l pripravljene raztopine PSC 833.

Kinin

Natehtali smo 11,9 mg kinina in ga raztopili v 1 ml etanola. 50 μ l te raztopine smo dodali v 5 ml inkubacijske zmesi, tako da je bila koncentracija kinina v raztopini 300 μ M.

Ko 143

5 mg Ko 143 smo raztopili v 10,65 ml DMSO ($c=1$ mM) in nato 50 μ l te raztopine dodali v 5 ml inkubacijske zmesi. Končna koncentracija inhibitorja pri inkubaciji je bila 10 μ M.

Priprava vzorcev za umeritvene krivulje

Imatinib

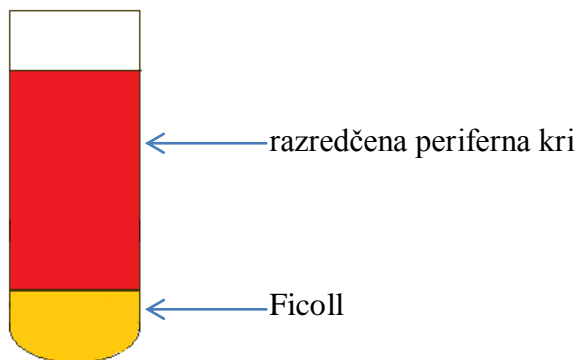
IM smo raztopili v metanolu do koncentracije 1 mg/ml. Tako dobljeno raztopino smo 10-krat redčili z 50-odstotnim etanolom in nato še 10-krat z 50-odstotnim etanolom. Iz te raztopine smo nato z redčenjem z 20-odstotnim etanolom pripravili delovne raztopine IM. Delovne raztopine smo dodajali lizatu celic do koncentracij 10, 50, 100, 200, 500, 700, 1000, 2000 ng/mL imatiniba, ki smo jih uporabili kot standarde pri izdelavi umeritvene krivulje. V vse vzorce za pripravo umeritvene krivulje smo dodali tudi 50 μ l internega standarda s koncentracijo 0,667 mg/l.

N-desmetil imatinib

NDI smo raztopili v metanolu do koncentracije 1 mg/ml, raztopino 10-krat redčili z 50-odstotnim etanolom in nato še 10-krat z 50-odstotnim etanolom. Z redčenjem tako pripravljene raztopine z 20-odstotnim etanolom smo nato dobili delovne raztopine NDI. Delovne raztopine smo dodajali lizatu celic do koncentracij 10, 50, 100, 200, 500, 700, 1000, 2000 ng/mL NDI, ki smo jih uporabili kot standarde pri izdelavi umeritvene krivulje. Tudi tu smo v standarde dodali 50 μ l internega standarda s koncentracijo 0,667 mg/ml.

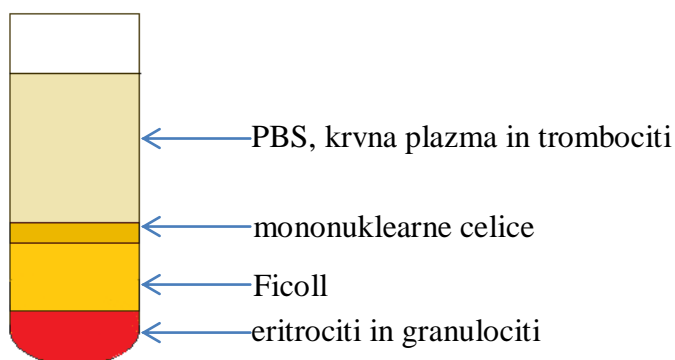
4.2 IZOLACIJA PBMC IN GRAN

Približno 40 ml periferne krvi, odvzete v epruvete Vacutainer z antikoagulantom litijevim heparinom, smo redčili s fosfatnim pufrom (PBS), segretim na sobno temperaturo, v razmerju 1:1. V epruveto Falcon (15 ml) smo z injekcijsko brizgo odmerili 2,5 ml gostotno gradientnega medija Ficoll-PaqueTM PLUS in nanj previdno nanесли 10 ml redčenega vzorca krvi (Slika 3).



Slika 3: Rastopina Ficoll-a in periferne krvi pred centrifugiranjem.

Kri smo centrifugirali 22 min pri 2200 vrtljajih/min (800 x g) brez zavore. Pri centrifugiranju so se eritrociti in granulociti zaradi večje specifične gostote posedli na dno epruvete pod plast Ficolla. Nad bistro plastjo Ficolla se je nahajala plast PBMC (mononuklearne celice periferne krvi), nad to plastjo, v supernatantu, pa so bili PBS, plazma in trombociti (Slika 4).



Slika 4: Vzorec po centrifugiranju.

Zgornjo plast (PBS, krvna plazma in trombociti) smo odpipetirali do približno 1 cm nad plastjo PBMC in zavrgli. Zatem smo odpipetirali najprej plast PBMC v Falcon epruveto (15 ml) in nato granulocite z eritrociti v večjo Falcon epruveto (50 ml). Supenzijo PBMC smo dopolnili do 14 ml s PBS, centrifugirali 7 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g), odlili supernatant, ponovno dopolnili s PBS do oznake in centrifugirali. Po odlitju supernatanta smo usedlino resuspendirali v približno 3 ml PBS. Sledilo je štetje celic s pretočno citometrijo – celice smo predhodno 3-krat redčili s PBS.

Epruveto z granulociti smo dopolnili do 45 ml s pufrom za lizo eritrocitov. Sledila je 10-minutna inkubacija pri sobni temperaturi, vmes smo epruveto nekajkrat obrnili. Centrifugirali smo 10 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g). Supernatant smo odlili in dopolnili s pufrom za lizo eritrocitov do 25 ml ter zopet inkubirali 10 min pri sobni temperaturi z obračanjem in nato centrifugirali 10 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g). Po odlitju supernatanta smo suspenzijo celic prenesli v Falcon epruveto (15 ml) in dopolnili s PBS do 14 ml, centrifugirali 7 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g) in nato po odlitju supernatanta celice resuspendirali v približno 4 ml PBS. Za štetje celic s pretočno citometrijo smo suspenzijo 3-krat redčili.

4.3 INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM

Na ploščice za inkubacijo smo nanесли 4 ml medija RPMI, 300 μ l 0,0334 mM imatiniba, suspenzijo 3 000 000 predhodno izoliranih celic in dopolnili z medijem do 5 ml. Končna koncentracija IM v inkubacijski zmesi je tako vedno bila 2,0 μ M. Trem inkubacijskim zmesem smo dodali koncentrirano raztopino prazosina do končne koncentracije 50 μ M inhibitorja, trem koncentrirano raztopino prazosina do koncentracije 100 μ M inhibitorja, tri inkubacijske zmesi pa smo pustili brez inhibitorja. Inkubirali smo 2 h v kontrolirani atmosferi s 95 % O₂ in 5 % CO₂ pri 37 °C. Nato smo celice prenesli v Falcon epruveto (15 ml), jih dopolnili s PBS do 14 ml in centrifugirali 5 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g). Postopek spiranja smo ponovili 2-krat. V nadaljevanju smo poskuse priredili tako, da smo celice inkubirali v T-25 ploščah za gojenje celic. Odpipetirali smo 10 ml medija, 900 μ l IM, 9 000 000 celic in dopolnili do 15 ml z medijem. V tri inkubacijske zmesi smo dodali še 150 μ l prazosina (do končne koncentracije 100 μ M), v tri 150 μ l inhibitorja OCT1 kinina (do končne koncentracije 300 μ M), tri inkubacijske zmesi pa smo pustili brez inhibitorja. Po inkubaciji smo zmes prenesli v Falcon epruveto (15 ml), centrifugirali 5 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g), nato pa še 2-krat sprali s PBS in centrifugirali. Celice smo resuspendirali v približno 1,2 ml PBS, jih prešteli s pretočno citometrijo in nato po 300 μ l suspenzije razdelili v tri epice (2 ml).

4.4 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA

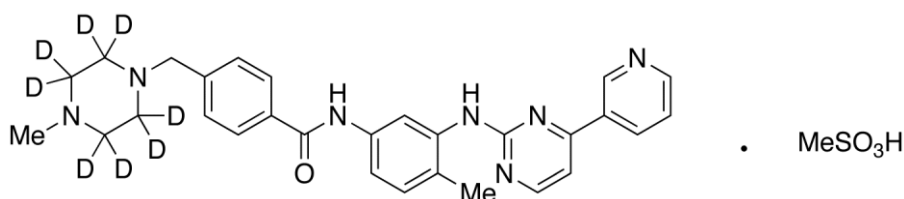
Celice smo lizirali tako, da smo epico izmenično 3-krat zamrznili v tekočem dušiku in odtalili. Nato smo dodali 50 μ l internega standarda [²H₈]-imatiniba, 200 μ l 0,2 M NaOH

ter 1 ml mešanice heksan:etil acetat (30:70). Vsako epico smo 1 min stresali na orbitalnem stresalniku Vibromix 10 pri najvišji hitrosti. Epice smo nato stresali še na orbitalnem stresalniku Vibromix 403 EVT 40 min pri 200 vrtljajih/min. Sledilo je 5 min centrifugiranje na 10000 vrtljajih/min (9300 x g) pri 5 °C. 800 µl organske faze (zgornja plast) z ekstrahiranim IM smo odpipetirali v epico (2 ml) s pritrjenim zamaškom ter sušili organsko fazo na TurboVap-u približno 15 min pri 40 °C. Suhi ostanek smo rekonstituirali z 250 µl mešanice MeOH:NH₄-formiat (50:50) ter posamezne epruvetke stresali 1 min na Vibromix-u 10. 200 µl dobljene raztopine smo prenesli v vialo z zataljenim insertom ter sušili na Speedvac-u (nastavitve: *high dry ratio, non volatile*) do suhega.

4.5 ANALIZA Z LC-MS/MS

Suhi ostanek smo rekonstituirali s 40 µl pufru MeOH:NH₄ formiat (20:80) ter ponovno stresali vsako epruvetko 1 min na Vibromix-u 10. Vsebnost IM v ekstraktu smo določili z LC-MS/MS aparatom, ki je sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke ločljivosti (UHPLC) in tandemskega masnega detektorja. Vbrizgali smo 1 µL vzorca. Kolono Kinetex 50x2,1 mm C18 z 2,6 µm delci smo gradientno spirali pri 50 °C z mobilno fazo, sestavljeno iz 0,1 % metanojske kisline in 98 % acetonitrila z gradientom od 10 % do 50 % v 1 min. Uporabili smo ionski izvor JetStream[®] v pozitivnem načinu ionizacije. Za kvantifikacijo IM, [²H₈]-IM in NDI smo uporabili multirezidualno analizo s spremljanjem masnih prehodov m/z 494→394 in 502→394. Retencijski čas analitov je bil 1,2 min, celotni čas analize enega vzorca pa 2,6 min.

Kot interni standard smo uporabili [²H₈]-IM (devteriran imatinib (Slika 5)), ki ima na piperazinskem obroču 8 devterijev namesto vodika.



Slika 5: D8-imatinib (21)

Zaradi skoraj enake strukture kot IM ima [²H₈]-IM zelo podobno obnašanje pri ekstrakciji in kromatografski ločbi. Poleg fizikalno-kemijskih lastnosti imata tudi enak retencijski čas.

4.6 IZOLACIJA GRANULOCITOV S CD15 POZITIVNO SELEKCIJO

Granulocite smo izolirali tudi z magnetnim označevanjem in pozitivno selekcijo na koloni. Uporabili smo magnetno označena protitelesa, usmerjena proti 3-fukozil-*N*-acetillaktozaminu. Ta antigen (CD15) je izražen na nevtrofilcih in eozinofilcih, ne pa na bazofilcih in limfocitih (22). Vzorcju 4 ml polne krvi smo dodali 150 µl raztopine magnetno označenih protiteles proti CD15 (CD15 MicroBeads), dobro premešali in inkubirali 15 min v hladilniku pri 2-8 °C. Nato smo kri centrifugirali pri 1700 vrtljajih/min (470 x g) 10 min brez zavore. Medtem smo na Whole Blood kolono, ki smo jo vstavili v MidiMACS magnet, nanegli 3 ml pufra za spiranje autoMACS Running Buffer, s katerim smo omočili kolono. Eluat smo zavrgli. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant (plazmo in trombocite) ter celice resuspendirali s pufrom za spiranje do prvotnega volumna krvi. Celično suspenzijo smo nato nanegli na kolono. Neoznačene celice, ki so stekle skozi kolono, smo zavrgli. Kolono smo 3-krat sprali s 3 ml pufra za spiranje, eluat pa smo zavrgli. Kolono smo nato odstranili iz magneta in jo položili na čisto Falcon epruveto (15 ml), dodali 5 ml pufra za elucijo ter kolono sprali s pritiskom na bat. Izolirane granulocite smo pridobili s 5 min centrifugiranjem pri 2000 vrtljajih/min (660 x g). Po centrifugiranju smo ves supernatant odstranili, celice pa resuspendirali v približno 1 ml PBS, en alikvot prešteli s pretočno citometrijo in suspenzijo razdelili po 300 µl v tri epipe (2 ml).

4.7 DOLOČITEV IZGUB IMATINIBA MED PONOVNO »IZOLACIJO« PREDHODNO INKUBIRANIH GRANULOCITOV S CD15⁺ SELEKCIJO

5 ml periferne krvi, odvzete v epruveto Vacutainer z antikoagulantom heparinom, smo redčili s 5 ml PBS in granulocite izolirali po postopku 4.2. Suspenzijo 24 000 000 predhodno izoliranih granulocitov smo inkubirali v T-75 ploščah za gojenje celic v 30 ml medija RPMI in koncentracijo IM 1000 µg/l. Inkubacija je potekala v kontrolirani atmosferi s 95 % O₂ in 5 % CO₂ pri 37 °C. Po 2 h smo celično suspenzijo prenesli v Falcon epruveto (50 ml) in centrifugirali 5 min pri 1700 vrtljajih/min (470 x g). Približno 25 ml supernatanta smo zavrgli, v preostalem smo resuspendirali usedlino celic in nato suspenzijo razdelili v dve Falcon epruveti (15 ml). Suspenzijo celic v prvi epruveti smo 2-krat sprali z 14 ml hladnega PBS in 5 min centrifugiranjem pri 1700 vrtljajih/min (470 x g). Granulocite v drugi Falcon epruveti smo nanegli na Whole Blood kolono in jih

izolirali s CD15⁺ izolacijo po postopku opisanem v poglavju 4.6. Po končani izolaciji smo prešteli celice, prav tako po spiranju. V epice smo prenesli tri alikvote po približno 3 000 000 celic. Celice smo nato lizirali po postopku 4.4 in izmerili koncentracijo IM po postopku 4.5.

4.8 IZOLACIJA GRANULOCITOV BOLNIKOV S KML

Bolnikom s KML na terapiji z IM smo odvzeli 6 ml periferne krvi v Vacutainer epruveto z antikoagulantom EDTA. 2 ml polne krvi smo centrifugirali 10 min pri 2000 vrtljajih/min (660 x g) in tako dobili 1 ml plazme. Plazmo smo shranili pri -20 °C za določanje plazemske koncentracije IM. Iz preostalih 4 ml polne krvi smo po postopku 4.6 izolirali granulocite, koncentracijo IM pa smo določili po postopkih 4.4 in 4.5.

4.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate meritev smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel 2010. Rezultati so podani kot povprečna vrednost ± SEM (ang. *standard error of the mean*, standardna napaka povprečja). Kjer smo primerjali med sabo 2 skupini, smo varianci testirali s F-testom. Glede na rezultat F-testa smo se odločili kateri Studentov t-test bomo uporabili. Pogoji za različnost varianc je bil $p < 0,05$ ($\alpha = 0,05$). Ko sta bili varianci različni ($f < \alpha$), smo uporabili dvovzorčni t-test z neenako varianco in z dvostransko porazdelitvijo. Ko sta bili enaki ($f > \alpha$), smo uporabili dvovzorčni t-test z enako varianco in z dvostransko porazdelitvijo.

Vsebnost IM smo podali v ng IM/200 000 celic kot rezultate navajajo v literaturi. Izračunali smo jo na podlagi umeritvene krivulje, s katero smo dobili enačbo premice:

$$y = 0,0088 \text{ (ml/ng)} \times c - 0,051, R^2=0,9988.$$

c ... koncentracija standardov (ng/ml)

Končno koncentracijo IM (c_{IM}) smo izračunali po naslednjih dveh enačbah:

$$c' = \frac{y - 0,051}{0,0088 \text{ (ml/ng)}}$$

$$c_{IM} \text{ (ng/200 000 celic)} = \frac{c' \times 0,3 \text{ ml} \times 200 \text{ 000}}{a \text{ (200 000 celic)}}$$

y ... količnik odzivov IM/[²H₈]-IM

c' ... koncentracija IM v 0,3 ml vzorca (ng/ml)

c_{IM} ... končna koncentracija IM (ng/200 000 celic)

a ... št. celic v 0,3 ml vzorca

Vsebnost NDI smo računali z enačbo premice: $y = 0,0006 \text{ (ml/ng)} \times c - 0,0183$,

$R^2 = 0,9998$, rezultati so podani kot ng NDI/200 000 celic.

c ... koncentracija standardov (ng/ml)

Končno koncentracijo NDI v celicah smo izračunali po naslednjih dveh enačbah:

$$c' = \frac{y - 0,0183}{0,0006 \text{ (ml/ng)}}$$

$$c_{NDI} = \frac{c' \times 0,3 \text{ ml} \times 200 \text{ 000}}{b \text{ (200 000 celic)}}$$

y ... količnik odzivov NDI/[²H₈]-IM

c' ... koncentracija NDI v 0,3 ml vzorca (ng/ml)

c_{NDI} ... končna koncentracija NDI (ng/200 000 celic)

b ... št. celic v 0,3 ml vzorca

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

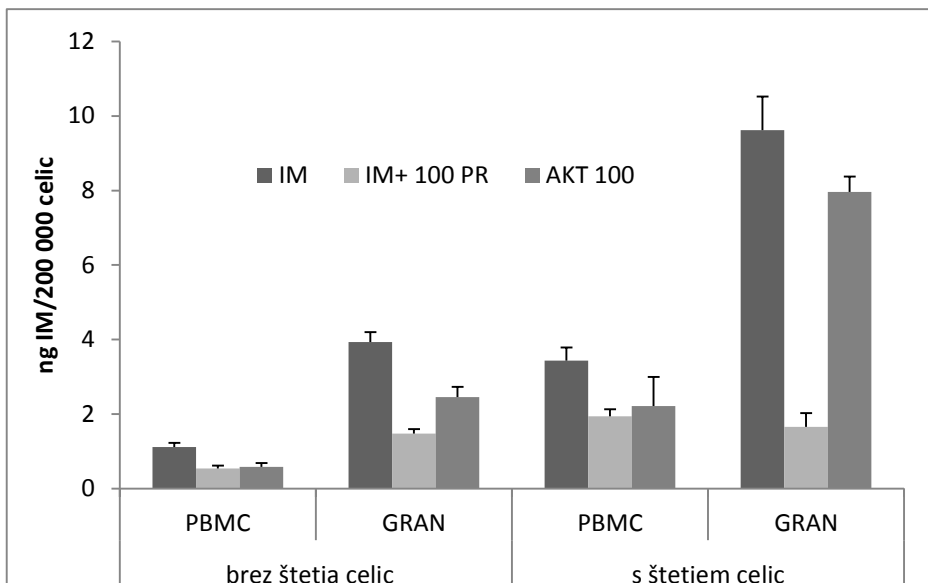
5.1 PRIVZEM IMATINIBA

Poskuse smo izvajali na PBMC in GRAN po postopkih 4.2-4.6 z dvema inhibitorjema prenašalca OCT1, ki je najverjetneje v največji meri odgovoren za privzem IM v celice. Med praktičnim delom smo naredili nekaj izboljšav: iz ploščic za inkubacijo smo prešli na plošče T25, po inkubaciji in spiranju pa smo prešteli celice s hematološkim analizatorjem. Prej smo namreč predpostavili, da smo po inkubaciji iz ploščic za inkubacijo prenesli 3 000 000 celic v epruvete Falcon (15 ml), kar pa v večini primerov verjetno ni držalo, saj na osnovi opravljenih meritev sumimo, da so celice ostajale na stenah plošč za inkubacijo in smo tako izmerili prenizko koncentracijo IM v celicah glede na prve meritve.

Privzem IM v celice je bistveno večji v granulocitih kot v PBMC tako brez štetja celic kot s štetjem celic po inkubaciji (Slika 6). Prav tako so bistvene razlike v primerjavi rezultatov s štetjem celic oz. brez štetja (Tabela I). V nadaljevanju smo zato upoštevali le rezultate z dodatnim štetjem celic po inkubaciji.

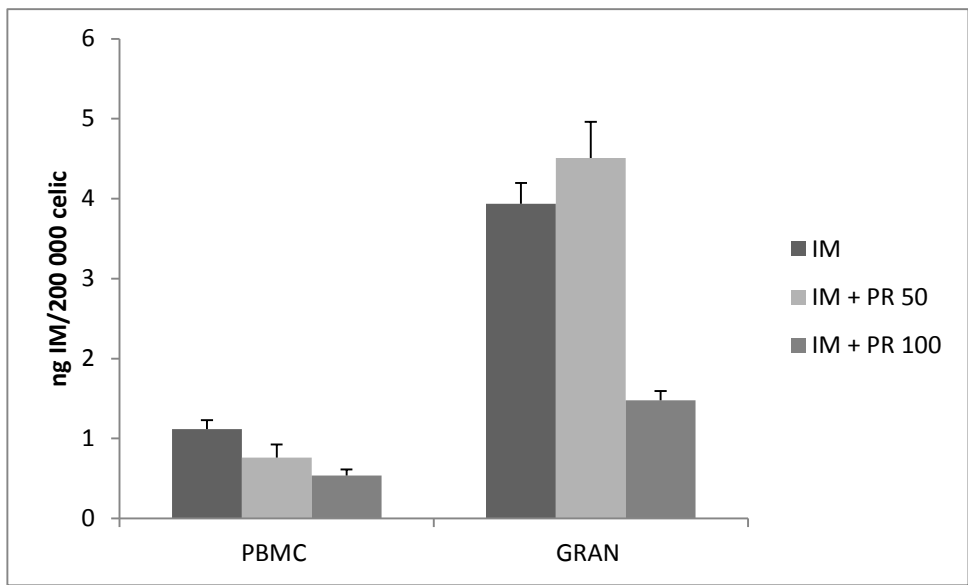
Tabela I: Privzem IM [ng IM/200 000 celic] v celice z ali brez prazosina ter aktivnost OCT1 – ugotavljanje signifikantosti med prostovoljci brez ali s štetjem celic. Sign. – razlika je signifikantna (statistično značilna); Nsign. – razlika je nesignifikantna.

$\alpha=0,05$		brez štetja celic [ng IM/200 000 celic]	s štetjem celic [ng IM/200 000 celic]	t-test	
PBMC	2 μ M imatinib	1,12 \pm 0,11 (n=32)	3,44 \pm 0,35 (n=16)	6,47E-06	Sign.
	2 μ M imatinib + 100 μ M prazosin	0,54 \pm 0,08 (n=32)	1,94 \pm 0,19 (n=5)	6,20E-08	Sign.
	OCT1 aktivnost (PR 100)	0,58 \pm 0,11 (n=32)	1,48 \pm 0,34 (n=5)	5,56E-02	Nsign.
GRAN	2 μ M imatinib	3,94 \pm 0,26 (n=32)	9,62 \pm 0,90 (n=15)	1,39E-05	Sign.
	2 μ M imatinib + 100 μ M prazosin	1,48 \pm 0,11 (n=32)	1,66 \pm 0,37 (n=4)	6,06E-01	Nsign.
	OCT1 aktivnost (PR 100)	2,46 \pm 0,27 (n=32)	7,96 \pm 0,41 (n=4)	4,40E-08	Sign.



Slika 6: Primerjava privzema IM v celice brez ali z inhibitorjem OCT1 prazosinom in aktivnosti OCT1 s štetjem celic in brez štetja celic. IM – 2 μ M imatinib; IM + 100 PR – 2 μ M imatinib + 100 μ M prazosin; AKT 100 – aktivnost OCT1, izračunana kot IM – IM + 100 PR; PBMC – periferne mononuklearne celice; GRAN – granulociti.

Pri prvih poskusih smo uporabljali inhibitor prazosin v dveh različnih koncentracijah - 50 μ M in 100 μ M, ki smo ju pripravili po postopku 4.1. White in sodelavci so uporabljali prazosin v koncentraciji 100 μ M (23). Ker se je med našim delom izkazalo, da je prazosin precej toksičen za celice, smo s koncentracijo 50 μ M želeli preveriti, ali pride do primerljive inhibicije OCT1 kot pri 100 μ M. Pri prostovoljcih, pri katerih smo preizkušali hkrati PR 50 in PR 100 še nismo uvedli štetja celic po inkubaciji. Pri PBMC nismo dokazali statistične razlike v inhibiciji OCT1 med PR 50 in PR 100, pri GRAN pa je ta razlika signifikantna (Slika 7), saj inhibicija s PR 50 pri GRAN ni bila zadostna. Razlika med referenčno vrednostjo in inhibicijo PR 50 pri PBMC je očitno premajhna, poleg tega pa je tudi zanesljivost rezultatov brez dodatnega štetja celic preslaba za meritve tako majhnih razlik. Ta rezultat kaže na pomembno izboljšavo našega postopka z uvedbo štetja celic po inkubaciji.

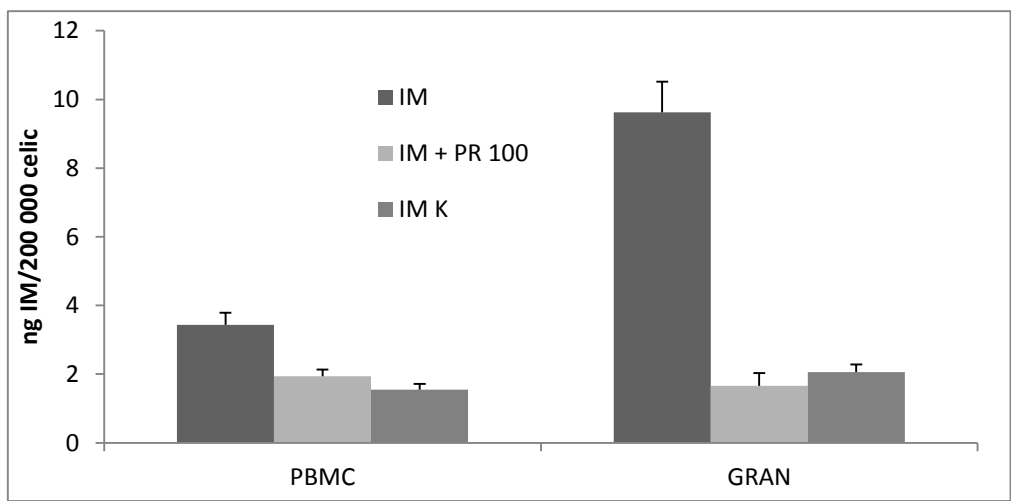


Slika 7: Primerjava privzema IM brez inhibitorja ter v prisotnosti PR 50 in PR 100. IM - imatinib 2 μ M, IM + PR 50 – imatinib 2 μ M + prazosin 50 μ M, IM + PR 100 – imatinib 2 μ M + prazosin 100 μ M, brez štetja celic.

Zaradi toksičnosti prazosina smo se odločili za dodatne poskuse oz. za uvedbo drugega OCT1 inhibitorja kinina (Slika 8). Ta se je izkazal za manj toksičnega kot 100 μ M prazosin, obenem pa za enako učinkovitega (Tabela II). Pripravili smo ga po postopku 4.1.

Tabela II: Privzem IM v prisotnosti 2 različnih inhibitorjev. S štetjem celic. PR 100 - 100 μ M prazosin, KIN – 100 μ M kinin, Sign. – razlika je signifikantna (statistično značilna); Nsign. – razlika je nesignifikantna.

$\alpha=0,05$	PR 100 [ng IM/200 000 celic]	KIN [ng IM/200 000 celic]	t test	
PBMC	1,94 \pm 0,19 (n=5)	1,55 \pm 0,17 (n=16)	0,24	Nsign.
GRAN	1,66 \pm 0,37 (n=4)	2,06 \pm 0,23 (n=15)	0,42	Nsign.

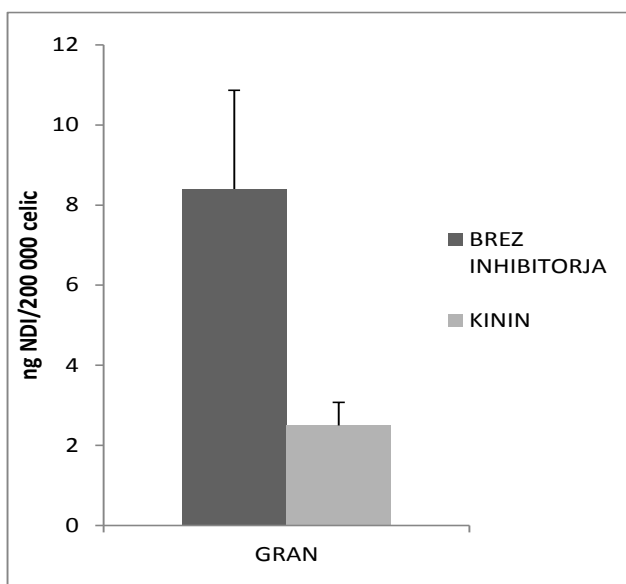


Slika 8: Privzem IM v prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev, s štetjem celic. IM – 2 μ M imatinib, IM + PR 100 – 2 μ M imatinib + 100 μ M prazosin, IM K – 2 μ M imatinib + 100 μ M kinin.

Povprečje privzema IM z ali brez inhibitorja 100 μ M prazosina pri vseh prostovoljcih je nižje kot so ga ugotovili D. White in sodelavci pri poskusu z radioaktivno označenim IM pri novoodkritih bolnikih s KML. Privzem IM v PBMC brez prazosina je pri njihovih poskusih znašal povprečno 24,35 ng/200 000 celic, v prisotnosti prazosina pa 8,57 ng/200 000 celic (17). Če upoštevamo samo rezultate prostovoljcev, ki smo jim prešteli celice tudi po inkubaciji in količino privzetega IM podali glede na izmerjeno število celic, so rezultati bolj primerljivi, a še vedno so vrednosti drugačne. To je verjetno posledica drugačne sestave frakcije PBMC zdravih prostovoljcev kot jo imajo bolniki s KML. Le ti imajo v plasti PBMC poleg limfocitov in monocitov pred zdravljenjem prisotne še nezrele oblike granulocitov (mielociti, metamielociti), ki so tarča IM, in s tem višjo koncentracijo IM v plasti PBMC (18).

5.2 PRIVZEM N-DESMETIL IMATINIBA

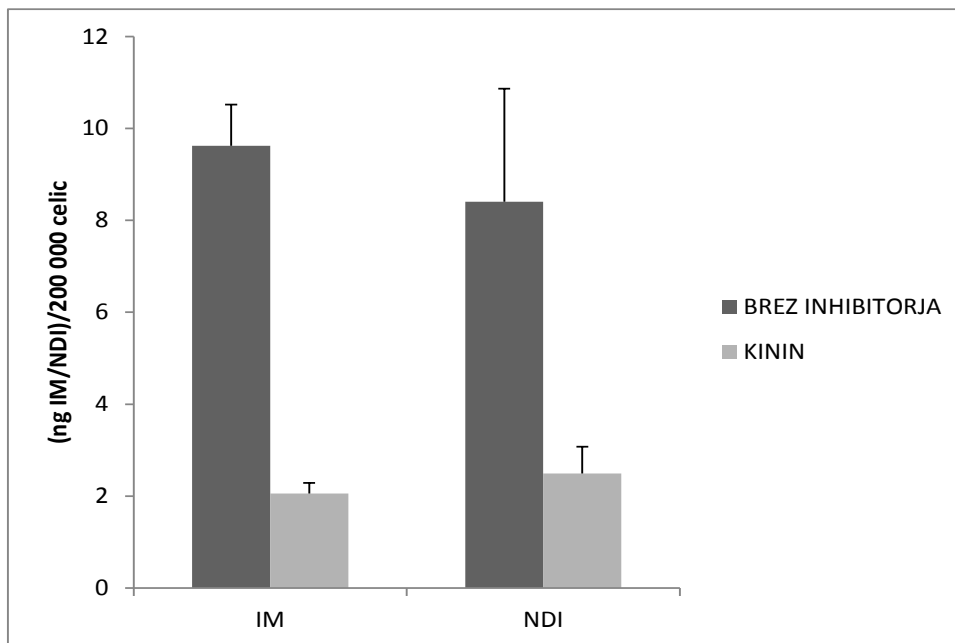
V naših poskusih smo določali tudi privzem glavnega metabolita IM NDI v GRAN po postopkih 4.1.-4.6 (Slika 9). NDI in vitro izkazuje podobno aktivnost kot IM (24).



Slika 9: Privzem NDI v granulocite brez in z inhibitorjem OCT1, n=3.

Privzem NDI v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT1 kinina se statistično ne razlikuje (Slika 9). Poskus smo izvedli le na 3 prostovoljcih, kar je ob precejšnjih razlikah med posamezniki žal premalo za zanesljivo statistično obdelavo, na sliki 10 pa je morebitna razlika, ki je posledica inhibicije OCT1, že vidna.

5.3 PRIMERJAVA MED PRIVZEMOM IMATINIBA IN N-DESMETIL IMATINIBA



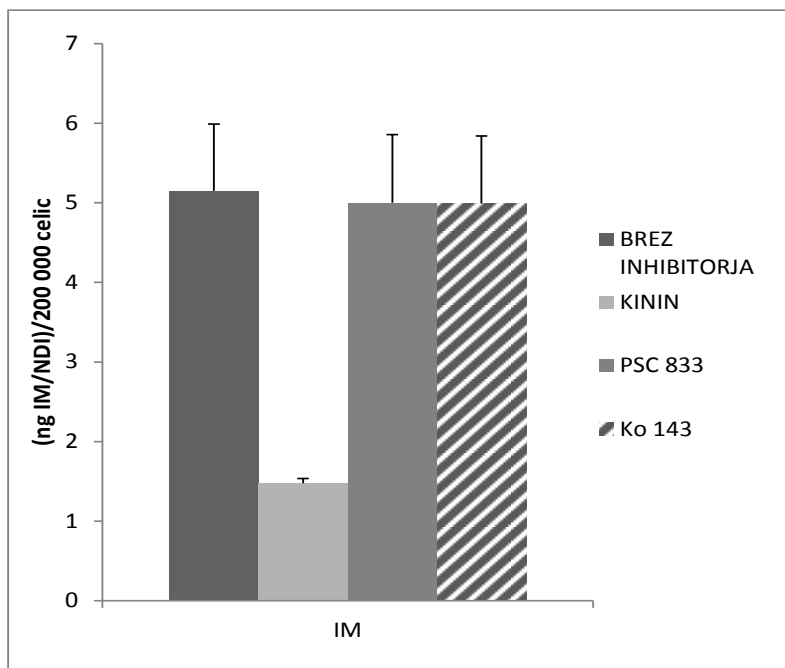
Slika 10: Primerjava privzema IM in NDI v granulocite, brez in z inhibitorjem OCT1. IM: n=15, NDI: n=3.

Primerjali smo privzem IM in NDI v granulocite v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT1 kinina (Slika 10). Privzem IM in privzem NDI brez inhibitorja se v našem primeru statistično ne razlikujeta, prav tako se ne razlikujeta bistveno privzema v prisotnosti kinina kot inhibitorja OCT1 (Tabela III). Rezultati se razlikujejo od ugotovitev nemških raziskovalcev, saj tam poročajo o večjem privzemu NDI v celično linijo HL-60 v primerjavi z IM (27), seveda pa ni presenetljivo, da so rezultati pridobljeni na celični liniji nekoliko drugačni. Podobne primerjave, narejene na granulocitih, v razpoložljivi literaturi nismo zasledili.

Tabela III: Primerjava privzema IM in NDI v granulocite v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja OCT1.

$\alpha=0,05$	privzem IM [ng IM/200 000 celic]	privzem NDI [ng NDI/200 000 celic]	t test	
BREZ INHIBITORJA	9,62 ± 0,90 (n=15)	8,40 ± 2,46 (n=3)	0,60	Nsign.
KININ	2,06 ± 0,23 (n=15)	2,50 ± 0,58 (n=3)	0,45	Nsign.

5.4 VPLIV SPECIFIČNE INHIBICIJE PRENAŠALCEV BCRP, P-gp IN OCT1 NA IUR IMATINIBA



Slika 11: Privzem IM v GRAN prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev prenašalcev. Po inkubaciji nismo prešteli celic, n=5.

Privzem IM v prisotnosti inhibitorjev prenašalcev OCT1, BCRP in P-gp smo določali le na GRAN petih prostovoljcev (Slika 11). Število izoliranih PBMC je bilo prenizko za izvajanje teh poskusov oz. bi potrebni volumni odvzete krvi presegli etično sprejemljive in za to raziskavo odobrene vrednosti. Privzem IM v granulocite v prisotnosti inhibitorjev BCRP in P-gp se od privzema IM brez inhibitorja ni statistično razlikoval, se pa je razlikoval privzem v prisotnosti kinina v primerjavi z ostalima inhibitorjema in v primerjavi s samim IM (Tabela IV).

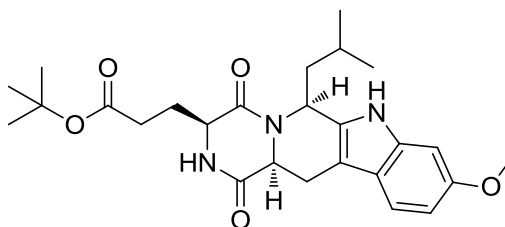
Tabela IV: Privzem IM v GRAN v prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev prenašalcev OCT1, BCRP, P-gp. Brez štetja celic po inkubaciji, n=5.

$\alpha=0,05$	PRIVZEM IM [ng IM/200 000 celic]	t test			
		BREZ INHIBITORJA	KININ	PSC 833	Ko 143
BREZ INHIBITORJA	5,15 ± 0,84	/	0,01 (Sign.)	0,90 (Nsign.)	0,90 (Nsign.)
KININ	1,47 ± 0,06	0,01 (Sign.)	/	0,01 (Sign.)	0,01 (Sign.)
PSC 833	5,00 ± 0,85	0,90 (Nsign.)	0,01 (Sign.)	/	0,99 (Nsign.)
Ko 143	4,99 ± 0,85	0,90 (Nsign.)	0,01 (Sign.)	0,99 (Nsign.)	/

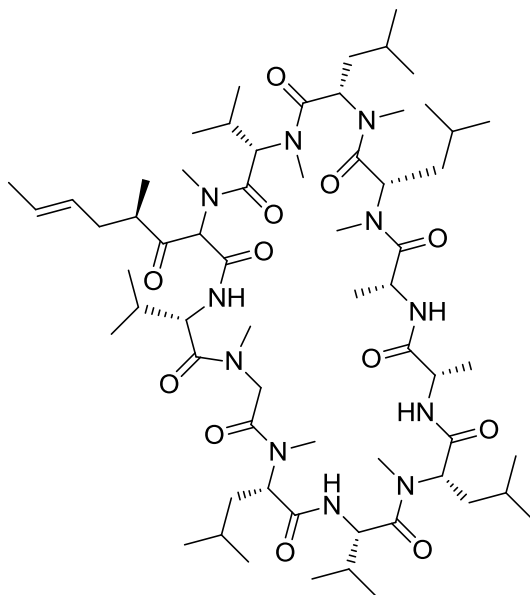
Možna razlaga za tak rezultat je, da IM ni substrat za P-gp in BCRP ali pa odsotnost aktivnosti P-gp in BCRP na membrani granulocitov.

5.4.1 Vpliv inhibicije BCRP in P-gp

BCRP je prenašalec, ki naj bi bil odgovoren za izločanje IM iz celic in s tem manjši privzem IM. Kot inhibitor BCRP smo pri petih prostovoljcih uporabili Ko143 (Slika 12) (13). PSC 833 je inhibitor P-gp (Slika 13) (13). Je neimunosupresivni analog ciklosporina (17). Na celični liniji so H. Burger in sodelavci ugotovili povečan privzem IM v prisotnosti inhibitorja BCRP (28). Podobno so ugotovili D. White in sodelavci pri inhibiciji P-gp - povečan privzem IM v prisotnosti inhibitorja P-gp na celični liniji, pri pacientih pa statistične razlike ni bilo (17). V našem primeru, ko smo preučevali privzem IM v prisotnosti/odsotnosti inhibitorjev na prostovoljcih, se privzem IM ni povečal v prisotnosti nobenega od inhibitorjev. Razlogov je lahko več. Možno je, da je aktivno izločanje manj pomembno kot aktivni privzem. Švicarski raziskovalci so ugotovili, da pri inhibiciji enega od prenašalcev sledi kompenzacija z drugimi (16). Če torej inhibiramo na primer BCRP, njegov delež prevzamejo drugi prenašalci, odgovorni za izločanje. V našem primeru bi lahko tak kompenzatorni odnos obstajal med aktivnima transportoma IM s P-gp in z BCRP. K. Eechoute in sodelavci pa so ugotovili, da IM že sam inhibira ABC prenašalce, med njimi tudi BCRP in zato aktivno izločanje učinkovine iz celic v bistvenem obsegu ni možno (12).



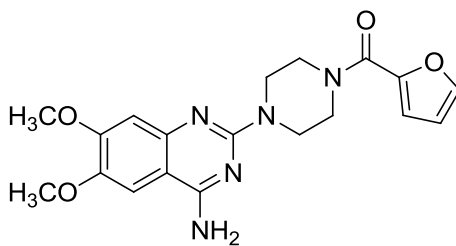
Slika 12: Ko 143



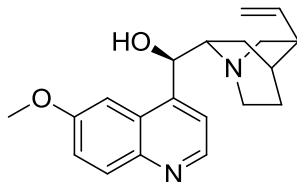
Slika 13: PSC 833

5.4.2 Vpliv inhibicije OCT1

OCT1 aktivnost smo izračunali kot razliko v privzemu IM (IUR, angl. imatinib uptake and retention) z in brez inhibitorja OCT1. Uporabljali smo 2 inhibitorja – prazosin (Slika 14) in kinin (Slika 15), privzem IM pa smo določali v GRAN in v PBMC. Tako na GRAN kot PBMC je vidna statistična razlika v privzemu IM v prisotnosti oz. odsotnosti kinina (Slika 8).



Slika 14: Prazosin



Slika 15: Kinin

Tudi iz rezultatov vseh prostovoljcev je vidna visoka aktivnost OCT1, prav tako je razlika statistično pomembna pri petih prostovoljcih, pri katerih še nismo šteli celic po inkubaciji in pri katerih smo na GRAN uporabili inhibitorje različnih prenašalcev – kinin, PSC 833 in Ko 143 (Tabela IV).

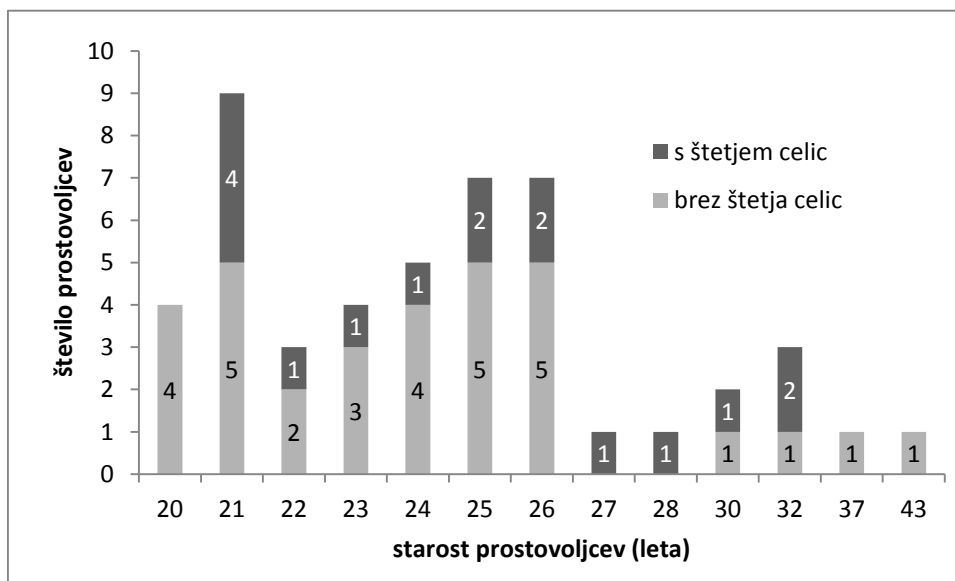
Bolniki in zdravi prostovoljci se zaradi različne sestave frakcij periferne krvi – zdravi prostovoljci imajo v frakciji PBMC predvsem limfocite in v manjši meri monocite, v frakciji granulocitov pa prevladujejo nevtrofilci – razlikujejo tudi v aktivnosti OCT1. Aktivnost OCT1 je namreč v različnih tipih celic različna: največja je v nevtrofilcih, precej nižja v monocitih in najnižja v limfocitih (25). Zaradi teh dejstev so naši rezultati na zdravih prostovoljcih pričakovani – visoka aktivnost OCT1 in s tem velik privzem IM v granulocitih in mnogo manjša aktivnost in privzem v PBMC (Tabela I, Slika 6).

D.White in sodelavci so ugotovili, da bolniki s KML, ki imajo pred terapijo določeno večjo aktivnost prenašalca OCT1 v PBMC plasti, v večji meri dosežejo glavni molekularni odgovor (MMR) v 60-ih mesecih v primerjavi z bolniki, ki imajo nizko aktivnost OCT1. Majhna aktivnost OCT1 je povezana z manjšim preživetjem in večjo verjetnostjo za mutacije kinazne domene. Te razlike so statistično značilne pri bolnikih na terapiji z manj kot 600 mg IM dnevno v prvih 12-ih mesecih, pri odmerkih višjih od 600 mg dnevno pa niso statistično značilne (23).

Z merjenjem aktivnosti OCT1 pri bolnikih s KML pred začetkom zdravljenja lahko predvidimo dolgoročno nevarnost rezistence in transformacije pri zdravljenju z IM. Pri nizki aktivnosti OCT1 lahko tako že takoj povečamo začetni odmerek in s tem izboljšamo prognozo zdravljenja. Z merjenjem aktivnosti OCT1 individualiziramo zdravljenje z IM in s tem povečamo možnost molekulskega odgovora in izboljšamo izide zdravljenja (23).

5.5 VPLIV DEJAVNIKOV NA IUR PRI PROSTOVOLJCIH

5.5.1 Vpliv starosti



Slika 16: Prikaz števila, starosti in izvedbe poskusa za vse prostovoljce.

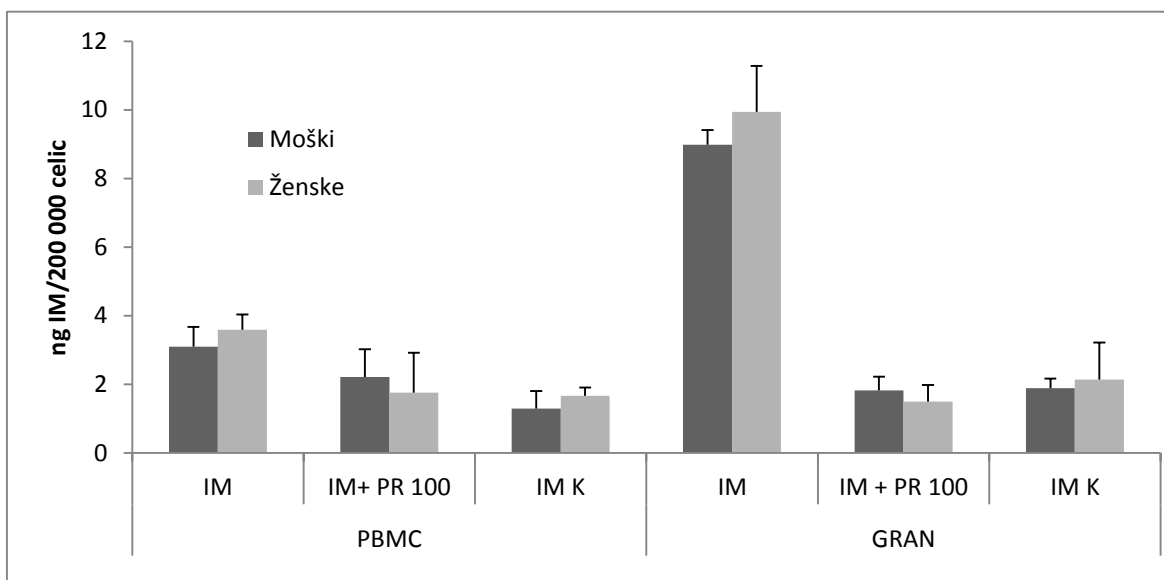
Želeli smo preveriti tudi vpliv starosti na privzem IM. Predpostavili smo, da se s starostjo manjša privzem IM. V prvem delu poskusov smo metodo še optimirali, večina prostovoljcev pa je bila študentov (Slika 16), zato smo v nadaljevanju opustili jasnejše definiranje vpliva starosti. Tako naš vzorec prostovoljcev žal ni bil dovolj velik in starostno raznolik, da bi lahko preverili povezavo.

5.5.2 Vpliv spola



Slika 17: Spol prostovoljcev, prikaz izvedbe poskusa – brez ali s štetjem celic.

Naša predpostavka je bila, da spol ne vpliva statistično značilno na privzem IM, kar so potrdili tudi rezultati meritev (Tabela V, Slika 18). Menimo, da smo za to primerjavo imeli dovolj veliko število prostovoljcev in prostovoljk (Slika 17), prav homogenost njihovih starosti pa v tem primeru pripomore k zanesljivosti rezultatov.



Slika 18: Privzem IM brez ali z inhibitorjem, primerjava med moškimi in ženskami, s štetjem celic. IM – 2 μ M imatinib, IM + PR 100 – 2 μ M imatinib + 100 μ M prazosin, IM K – 2 μ M imatinib + 100 μ M kinin.

Tabela V: Privzem IM v prisotnosti/odsotnosti inhibitorja, primerjava med moškimi in ženskami.

$\alpha=0,05$		PRIVZEM IM [ng IM/200 000 celic]		t test	
		MOŠKI	ŽENSKE		
PBMC	BREZ INHIBITORJA	3,10 ± 0,58	3,59 ± 0,45	0,53	Nsign.
	PR 100	2,22 ± 0,44	1,76 ± 0,12	0,30	Nsign.
	KININ	1,30 ± 0,11	1,67 ± 0,23	0,17	Nsign.
GRAN	BREZ INHIBITORJA	8,98 ± 0,43	9,94 ± 1,34	0,51	Nsign.
	PR 100	1,82 ± 0,24	1,50 ± 0,84	0,75	Nsign.
	KININ	1,89 ± 0,23	2,14 ± 0,33	0,62	Nsign.

5.6 DOLOČITEV IZGUB IMATINIBA MED PONOVNO »IZOLACIJO« PREDHODNO INKUBIRANIH GRANULOCITOV S CD15⁺ SELEKCIJO

Preveriti smo želeli kolikšen delež IM izgubimo iz celic med postopkom izolacije granulocitov s CD15⁺ selekcijo. Celice smo izolirali po postopku 4.7 in jih inkubirali v mediju z IM. Kot referenčno koncentracijo smo uporabili koncentracijo IM v granulocitih po spiranju. Nato smo izvedli ponovno izolacijo s CD15⁺ po postopku v poglavju 4.7 in izolirane celice ponovno sprali.

Tabela VI: Izguba IM (%) predhodno inkubiranih granulocitov med izolacijo s CD15⁺ selekcijo. SPIRANJE – koncentracija IM v granulocitih po spiranju, CD15⁺ - koncentracija IM v granulocitih po spiranju, ki mu je sledila izolacija s CD15⁺, % IZGUBE – (CD15⁺ - SPIRANJE)/SPIRANJE*100).

	SPIRANJE [ng IM/200 000 celic]	CD15 ⁺ [ng IM/200 000 celic]	% IZGUBE
P1	4,4	4,2	-3,1
P2	9,1	9,3	1,5
P3	4,5	4,2	-5,3
P4	21,8	20,2	-7,6
P5	19,5	18,4	-5,4

Pri štirih prostovoljcih smo opazili, da pride med izolacijo s CD15⁺ do izgube učinkovine, pri enem prostovoljcu pa tega nismo uspeli dokazati (Tabela VI). Pri dodatni izolaciji s CD15⁺ povprečno izgubimo 5,3 % IM. Na podlagi tega poskusa lahko predvidevamo, da izgube med CD15 izolacijo niso velike in da je torej metoda primerna za določanje znotrajcelične koncentracije IM v granulocitih pri bolnikih s KML na terapiji z IM. Gre za razmeroma pomembno odkritje, saj do sedaj meritve znotrajceličnih koncentracij v granulocitih bolnikov niso bile možne. Z našo metodo, s katero relativno hitro izoliramo

granulocite ter zanjo potrebujemo malo vzorca, ki bi ga pri bolnikih lahko pridobili med rutinskimi pregledi, tako lahko precej točno določimo znotrajcelične koncentracije IM pri bolnikih na terapiji z IM. S tem lahko bolje spremljamo uspešnost zdravljenja KML z IM, saj plazemska koncentracija verjetno pogosto ne sovпада z znotrajcelično koncentracijo zaradi vpliva različnih prenašalcev.

5.7 IZOLACIJA GRANULOCITOV ZA NAMEN DOLOČANJA ZNOTRAJCELIČIH KONCENTRACIJ PRI BOLNIKI S KML NA TERAPIJI Z IMATINIBOM

Granulocite smo pridobili po postopku 4.8. Za izračun koncentracije IM v granulocitih in izračun plazemske koncentracije smo uporabili umeritveno krivuljo v celičnem lizatu, narejeno za potrebe validacije metode (52) in volumen granulocitov 334 fl (31).

Tabela VII: Bolniki s KML na terapiji z IM. IC - znotrajcelična koncentracija IM v GRAN [ng/ml], PLAZMA - plazemska koncentracija IM [ng/ml].

bolnik	IC [ng/ml]	PLAZMA [ng/ml]	IC/PLAZMA
1	23611,6	2336,7	10,1
2	75771,8	2677,8	28,3
3	11452,9	973,3	11,8
4	44692,7	2031,3	22,0
5	48279,2	1829,1	26,4
6	4813,7	454,3	10,6
7	56102,5	3403,7	16,5
8	10829,6	850,8	12,7
9	56322,1	1613,4	34,9
10	34371,5	1963,0	17,5
11	10937,7	1571,9	7,0
12	3507,5	332,6	10,5
13	22382,4	1560,8	14,3
povprečje	31005,8 ± 6472,4	1661,4 ± 242,2	17,1 ± 2,3

Iz rezultatov v Tabeli VII vidimo, da je koncentracija IM v granulocitih v povprečju 17-krat višja od koncentracije IM v plazmi, rezultati pa so zelo različni pri vsakem bolniku posebej. Za to je verjetno odgovoren aktivni prenos IM v granulocite s prenašalcem OCT1 in različna izraženost prenašalca pri bolnikih. Granulociti sicer niso tarčne celice, so pa pri zdravih prostovoljcih in že zdravljenih bolnikih s KML zelo podobne ter verjetno najboljše odražajo lastnosti tarčnih celic, ker tudi te nastanejo iz multipotentnih matičnih celic

mieloične vrste. Nizka plazemska koncentracija velikokrat pomeni nizko znotrajcelično koncentracijo IM, obratno pa ne velja zaradi vpliva prenašalcev na privzem IM v tarčne celice.

6 SKLEP

Imatinib je zdravilna učinkovina za zdravljenje kronične mieloične levkemije. Za njegov prenos skozi membrano levkemične celice so odgovorni različni prenašalci. Z inhibitorji teh prenašalcev smo merili njihov vpliv na privzem IM v granulocite in PBMC zdravih prostovoljcev. Ugotovili smo,

1. da je privzem IM v prisotnosti inhibitorja OCT1 statistično pomembno nižji kot v odsotnosti inhibitorja, česar pa nismo dokazali v prisotnosti inhibitorjev P-gp in BCRP,
2. da se privzem aktivnega metabolita imatiniba, N-desmetil imatiniba, v granulocite zdravih prostovoljcev statistično ne razlikuje od privzema IM, za zanesljivejši dokaz vpliva OCT1 prenašalcev na privzem NDI pa bi bilo potrebno raziskavo razširiti z večjim številom prostovoljcev,
3. da spol prostovoljcev ne vpliva na privzem imatiniba, medtem ko je bila starost prostovoljcev preveč homogena, da bi lahko zaključili karkoli.

Metodo za *in vitro* določanje privzema IM v levkocite z OCT1 prenašalci smo izpopolnili do te mere, da jo je možno naprej preizkusiti na vzorcih, pridobljenih pri bolnikih s KML, pri tem pa potrebujemo le 6 ml periferne krvi. Uvedli smo inkubacijo celic z IM v večjih ploščah T25 in štetje celic po inkubaciji ter spiranju. Zaradi toksičnosti prazosina smo ga za inhibicijo OCT1 zamenjali s kininom. S tem smo zmanjšali izgube učinkovine in celic med inkubacijo in izolacijo ter dosegli višje in s tem bolj primerljive rezultate z referenčno literaturo.

V poskusu, kjer smo merili delež izgub IM v granulocitih zdravih prostovoljcev med izolacijo s CD15⁺ selekcijo, nismo dokazali pomembnejše izgube učinkovine. Postopek selekcije s CD15⁺ je tako po našem mnenju primeren za merjenje koncentracije IM v granulocitih bolnikov na terapiji z IM. Granulocite trinajstih bolnikov smo izolirali in izmerili znotrajcelično koncentracijo IM, koncentracijo IM v plazmi ter razmerje med njima. Referenčnih vrednosti v literaturi ni. Z merjenjem koncentracije IM v granulocitih bi morda lahko napovedali odziv bolnikov s KML na zdravljenje z IM in se v primeru slabšega odziva odločili za povišanje odmerka IM oz. za zamenjavo zdravila s katerim

izmed novejših inhibitorjev tirozin-kinaz. Seveda bo potrebno opraviti še raziskavo, v kateri bi ugotovili povezavo med znotrajceličnimi koncentracijami IM v granulocitih in uspešnostjo terapije.

Izpopolnjena metoda je dovolj hitra in v kombinaciji z ustrežno pripravo vzorcev dovolj občutljiva, da bomo lahko na relativno majhnem vzorcu periferne bolnikove krvi določili privzem imatiniba v levkemične celice. Z rezultati smo naredili korak naprej pri razvijanju metode s katero bomo lahko optimirali in, upamo, celo napovedali uspešnost zdravljenja KML z imatinibom v klinični praksi.

7 LITERATURA

1. Andoljšek D: Bolezni krvi in krvotvornih organov iz Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2011: 1312-5.
2. Bokal U, Južnič Šetina T. Kronična mieloična levkemija. Onkologija/pregledi 2012; XVI (1): 10-3.
3. Glaser M. Kronične levkemije. Med Razgl 2005; 44: 33-41.
4. Preložnik Zupan I, Pajič T. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. Zdrav Vestn 2008; 77: I-5-10.
5. Imatinib. <http://www.drugfuture.com/chemdata/imatinib.html>. Dostop: 3-1-2013.
6. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. Blood 2007; 110: 4064-72.
7. Grat M, Vučkovič J. Naše izkušnje pri zdravljenju kronične mieloične levkemije z imatinib mesilatom. Zdrav Vestn 2004; 73: Suppl. I:31-3.
8. Borštnar S. Klinični vidik uporabe sodobnih zdravil pri zdravljenju rakavih bolezni. Farm Vestn 2009; 60: 67-72.
9. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Glivec 50 mg trde kapsule. http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000406/WC500022207.pdf. Dostop: 18-12-2012.
10. Di Gion P, Kanefendt F et al. Clinical Pharmacokinetics of Tyrosine kinase Inhibitors. Clin Pharmacokinet 2011; 50 (9): 551-603.
11. Hu S, Franke RM, Filipski KK et al. Interaction of Imatinib with Human Organic Ion Carriers. Clin Cancer Res 2008; 14(10): 3141-8.
12. Eechoute K, Sparreboom A, Burger H et al. Drug Transporters and Imatinib Treatment: Implications for Clinical Practice. Clin Cancer Res 2011; 17(3): 406-15.
13. Özvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. Drug Resistance Updates 2005; 8: 15-26.

14. Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H. Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 824-8.
15. Scholler J, Levêque D. Molecular pharmacokinetic determinants of anticancer kinase inhibitors in humans. *Oncol Rev* 2011; 5: 77-92.
16. Graber-Maier A, Gutmann H, Drewe J. A New Intestinal Cell Culture Model To Discriminate the Relative Contribution of P-gp and BCRP on Transport of Substrates Such as Imatinib. *Mol Pharmaceutics* 2010; 7(5): 1618-28.
17. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J 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: 697-705.
18. Kralj E, Žakelj S, Trontelj J et al. Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML. *Zdrav Vestn* 2012; 81 supl 2: II-188-96.
19. Protokol za izolacijo granulocitov in perifernih mononuklearnih celic iz polne krvi.
20. Mlejnek P, Novak O, Dolezel P. A non-radioactive assay for precise determination of intracellular levels of imatinib and its main metabolite in Bcr-Abl positive cells. *Talanta* 2011; 83: 1466-71.
21. Imatinib mesilat. [http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=G407002&CAS=&Chemical_Name=Gleevec-d8%20\(Imatinib-d8\)&Mol_Formula=C30H27D8N7O4S&Synonym%.](http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=G407002&CAS=&Chemical_Name=Gleevec-d8%20(Imatinib-d8)&Mol_Formula=C30H27D8N7O4S&Synonym%.) Dostop: 11-1-2013.
22. Navodilo za uporabo Whole Blood CD15 MicroBeads, št. 130-091-058. MACS Miltenyi Biotec, Nemčija.
23. White DL, Dang P, Engler J, Frede A 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. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2761-7.
24. Delbaldo C, Chatelut E et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Imatinib and Its Main Metabolite in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20): 6073-8.
25. Engler JR, Zannettino ACW, Balley CG, Rasko JEJ, Hughes TP, White DL. OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* 2011; 96(2): 213-20.

26. http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=274496#.UQY_KB2CC5I. Dostop: 28-1-2013.
27. le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S, Bonin Mv, Leopold T et al. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53(4): 313-23.
28. Burger H, van Tol H et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004; 104: 2940–2.
29. Kralj E, Žakelj S, Trontelj J et al. Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes. *Eur J Pharm Sci* 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.026>. Dostop: 15-7-2013.
30. Prof. dr. Peter Černelč, dr. med., Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo. Osebna komunikacija, avgust 2013.
31. Farowski F, Cornely OA, Vehreschild JJ et al. Intracellular concentrations of posaconazole in different compartments of peripheral blood. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(7): 2928-31.