

Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML

Determination of imatinib intracellular uptake in leukocytes as a prognostic factor in CML therapy

Eva Kralj,¹ Simon Žakelj,¹ Jurij Trontelj,¹ Katja Berginc,¹ Tadej Pajič,² Irena Preložnik Zupan,² Peter Černelč,² Barbara Ostanek,³ Helena Podgornik,² Janja Marc,³ Albin Kristl¹

¹ Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

³ Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

Korespondenca/

Correspondence:

prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana
e-mail: albin.kristl@ffa.uni-lj.si

tel.: 01/4769503
fax: 01/4258031

Ključne besede:

imatinib, kronična mieloična levkemija, OCT1, aktivni privzem, LC-MS/MS metoda

Key words:

imatinib, chronic myelogenous leukemia, OCT1, active uptake, LC-MS/MS method

Izvleček

Izhodišča: Imatinib je prvo usmerjeno zdravlilo pri zdravljenju kronične mieloične levkemije (KML). Odziv bolnikov na zdravljenje z imatinibom je odvisen tudi od vstopa učinkovine v tarčno celico z organskim kationskim prenašalcem 1 (OCT1). Na osnovi privzema radioaktivno označenega imatiniba v mononuklearne (MNC) celice bolnikov pred začetkom zdravljenja je že bila dokazana povezava med aktivnostjo OCT1 prenašalcev in uspešnostjo zdravljenja. Domneva se, da bi določanje aktivnosti OCT1 pri bolnikih s KML lahko prispevalo k napovedi uspešnosti zdravljenja z imatinibom.

Metode: MNC in granulocite (Gran) zdravega prostovoljca smo pred ali po ločevanju na Ficoll-u inkubirali v raztopini imatiniba s prazosinom oz. brez. Celice smo lizirali s tekočim dušikom, nato pa iz lizata z mešanico organskih topil ekstrahirali imatinib. Vsebnost učinkovine v ekstraktu smo določili z metodo LC-MS/MS.

Rezultati: Največji privzem imatiniba smo izmerili v predhodno ločenih Gran, v katerih je bila znotrajcelična koncentracija imatiniba skoraj 10-krat večja kot v ostalih vrstah celic. Ob dodatku prazosina (inhibitor OCT1) so bile znotrajcelične koncentracije imatiniba statistično značilno nižje tako v MNC ($1,49 \pm 0,11$ vs. $17,8 \pm 1,6$ mg/L) kot tudi v Gran ($96,2 \pm 2,2$ vs. $191,2 \pm 7,7$ mg/L), inkubiranih z učinkovino po ločevanju na Ficoll-u. Absolutna aktivnost OCT1 je bila največja v Gran ($6,27 \pm 0,66$ ng imatiniba/200000 celic).

Zaključki: Razvili smo postopek za določanje privzema imatiniba v levkocite, ki ne temelji na uporabi radioaktivno označenih spojin. Z njim želimo preveriti povezanost aktivnosti OCT1 z uspehom zdravljenja z imatinibom tudi na slovenski populaciji bolnikov s KML.

Abstract

Background: Imatinib is the first target therapy for chronic myelogenous leukemia (CML). Response to imatinib treatment also depends on the uptake of the drug into the target cell by organic cation transporter 1 (OCT1). OCT1 activity determined by the uptake of ¹⁴C-imatinib (IUR) in isolated mononuclear cells (MNC) has already been linked with treatment response. It has been proposed that the OCT1 activity determination could provide a valuable tool for the prediction of treatment success in patients with CML.

Methods: MNC and granulocytes (Gran) of a healthy volunteer were incubated with imatinib in the presence or absence of prazosin before and after Ficoll cell sorting. The cells were lysed with liquid nitrogen and extracted with organic solvents. The intracellular concentration (c_i) of imatinib was determined by LC-MS/MS method.

Results: We measured the highest IUR in Gran isolated prior to incubation with imatinib. There the c_i was 10-fold higher than in other cells. With prazosin, significantly lower imatinib c_i were observed in MNC (1.49 ± 0.11 vs. 17.8 ± 1.6 mg/L) and Gran (96.2 ± 2.2 vs. 191.2 ± 7.7 mg/L) incubated after cell sorting. We measured the highest absolute OCT1 activity in Gran (6.27 ± 0.66 ng imatinib/200000 cells).

Conclusions: We developed a procedure for the measurement of imatinib uptake into the white blood cells, which is not based on the use of radioactively labelled compounds. By means of this test, we also hope to determine the correlation of OCT1 activity with treatment success in the population of Slovenian CML patients.

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81 supl 2: II-188–96

Prispelo: 24. feb. 2012,
Sprejeto: 21. apr. 2012

Uvod

Imatinib (Glivec, Gleevec, STI571) predstavlja prelomnico v zdravljenju kronične mieloične levkemije (KML) in raka na splošno. Je prvo zdravilo, načrtno razvito na osnovi natančnega poznavanja mehanizmov delovanja levkemične celice in usmerjeno proti točno določeni tarči – encimu bcr-abl s tirozinkinazno aktivnostjo. Z inhibicijo tega konstitutivno aktivnega encima imatinib prepreči nekontrolirano delitev in zorenje celice in s tem zavre razrast levkemičnega klona.¹⁻³

Prva mednarodna raziskava IRIS (ang. International Randomized IFN vs STI571 study) je potrdila pomembno večjo učinkovitost in varnost zdravljenja KML z imatinibom, v primerjavi z dotlej uveljavljenim zdravljenjem z interferonom alfa (IF-alfa) in citarabinom.⁴ Po 18 mesecih zdravljenja je popolni citogenetski odgovor (odsotnost Ph kromosoma v delečih se celicah kostnega mozga) doseglo kar 76,2 % bolnikov, zdravljenih z imatinibom, z IF-alfa in citarabinom pa le 14,5 %.⁴ Bolniki so zdravilo dobro prenašali, zmanjšala pa se je tudi verjetnost napredovanja bolezni v pospešeno obdobje ali blastno preobrazbo bolezni.⁵

Po 10- in večletnih izkušnjah zdravljenja z imatinibom vemo, da določen delež (20–35 %) bolnikov zelenega odgovora na zdravljenje ne doseže ali pa ga med zdravljenjem izgubi. Govorimo o primarni in sekundarni oz. pridobljeni odpornosti.^{6,7} Za primarno odpornost na zdravljenje z imatinibom so v prvi vrsti odgovorne povečana ekspresija in mutacije v genu za tirozinsko kinazo bcr-abl,⁸ ki preprečujejo vezavo učinkovine v aktivno mesto encima, pogosto pa je razlog tudi njena nezadostna inhibicija, ki je posledica prenizke koncentracije učinkovine v plazmi⁹ in posledično tudi na mestu delovanja.^{10,11} Razlog za sekundarno odpornost je po drugi strani reaktivacija signalnih poti BCR-ABL1, ki so prav tako posledica mutacij, nemalokrat pa je vzrok tudi spremenjen prenos učinkovine na mesto delovanja.^{16,18}

Že dolgo je znano, da so za odpornost rakavih celic na citostatike lahko odgovorni proteini, ki črpajo učinkovino iz celice in tako zmanjšujejo njeno znotrajcelično kon-

centracijo, še preden bi bila ta dovolj visoka, da bi celico ubila. Omenjeni pojav poznamo pod imenom »Multi-drug resistance« ali MDR in pomeni lastnost rakavih celic, da število ali aktivnost prenašalcev za odstranjevanje učinkovine še povečajo in tako postanejo odporne na večji spekter citostatičnih učinkovin. Največja skupina MDR prenašalcev so prenašalci ABC (ang. ATP binding cassette). Mnoge študije so potrdile, da je imatinib substrat P-glikoproteina,¹²⁻²⁰ in da se bodisi kot substrat ali pa kot inhibitor veže tudi na prenašalec BCRP (angl. Breast cancer resistance protein),²⁰⁻²⁵ vendar pa njun pomen za odpornost levkemičnih celic na imatinib ni bil nesporno dokazan.¹²⁻¹⁴

V zadnjem času se vse pogosteje pojavljajo domneve, da so vzrok MDR lahko tudi prenašalci, odgovorni za privzem učinkovine v rakavo celico. Leta 2004 je britanska raziskovalna skupina prvič opisala vlogo organskega kationskega prenašalca 1 (OCT1) pri vstopu imatiniba v tarčno celico.¹⁷ Gre za prenašalec iz velike družine polispecifičnih organskih kationskih prenašalcev, ki jih najdemo v jetrih, ledvicah in v črevesju, torej organih, ključnih za odstranjevanje številnih endogenih organskih kationov kot tudi širokega spektra učinkovin in toksinov. Spojine, ki so pri fiziološkem pH pozitivno nabite, prenaša v elektrogenerni smeri (v notranjost celice).²⁶ Odkriti so bili številni polimorfizmi, ki vplivajo na aktivnost OCT1.²⁷ Zato so sklepali, da je OCT1 lahko omejujoči dejavnik pri učinkovitosti zdravljenja z imatinibom.

Crossman in sodelavci²⁴ so prvič vpliv prenašalca OCT1 na privzem imatiniba v MNC (mononuklearne celice) preverili na manjšem številu bolnikov s KML. Ugotovili so, da je izražanje OCT1 pri bolnikih variabilno, vendar ne drugačno kot pri zdravih. Znotraj skupine bolnikov pa je bilo izražanje mRNA OCT1 osemkrat višje pri bolnikih, ki so se na zdravljenje z imatinibom odzvali, od izražanja mRNA OCT1 pri neodzivnih bolnikih. Sklepali so, da bolniki, ki nimajo zadostnega izražanja prenašalcev za privzem imatiniba v tarčne celice, tudi najverjetneje ne dosežejo citogenetskega odgovora in uspeha zdravljenja.

O podobnih rezultatih so poročali tudi Wang s sodelavci.³² V raziskavi na 70 bolnikih so potrdili, da raven izražanja OCT1 prenašalca bistveno vpliva na doseganje popolnega citogenetskega odgovora, verjetnost napredovanja bolezni in podaljšanje preživetja bolnikov s KML ter je zato pomembni kazalec pri napovedovanju kliničnega odgovora na zdravljenje z imatinibom.

Nadaljnje raziskave opisane povezave OCT1 izražanja z doseganjem odziva na zdravljenje z imatinibom niso potrdile.^{27,29,30} Zato je skupina avstralskih raziskovalcev razvila test za merjenje aktivnosti OCT1 v krvi bolnikov s KML (IUR assay- ang. imatinib uptake and retention assay), ki bi neposredno napovedoval učinkovitost privzema imatiniba v levkemične celice. Proučevali so privzem radioaktivno označenega imatiniba v celice bolnikov s KML brez ali v prisotnosti znanega inhibitorja OCT1 prazosina.²⁸ Pri 132 bolnikih so potrdili veliko variabilnost aktivnosti OCT1 (razpon 1–31,2 ng imatiniba/200000 celic) in korelacijo visoke aktivnosti OCT1 z doseganjem molekularnega odgovora, počasnejšim napredovanjem bolezni in daljšim preživetjem. S primerjavo skupin bolnikov, ki sta bili zdravljeni z različnimi odmerki zdravila (manj kot 600 mg oz. 600 mg ali več na dan), so pokazali, da bolniki z visoko aktivnostjo OCT1 dosežejo molekularni odgovor ne glede na odmerek zdravila, medtem ko je bil odziv na zdravljenje pri bolnikih z nizko aktivnostjo OCT1 močno odvisen od odmerka imatiniba. Še več, s povečanjem odmerka zdravila na 800 mg so tudi bolniki z nizko aktivnostjo OCT1 dosegli enak odgovor kot tisti z visoko aktivnostjo OCT1.^{29,31}

Vpliv prenašalca OCT1 na privzem imatiniba v celico so raziskovali tudi na CD34+ matičnih celicah.³⁴ Te celice so manj dovzete za apoptozo, povzročeno z imatinibom in so zato verjetno razlog, da s tem zdravilom KML ne moremo povsem pozdraviti.^{35,36} Tudi rezultati testa IUR na celicah bolnikov s KML so pokazali, da sta tako aktivnost kot tudi raven izražanja OCT1 bistveno nižja pri nezrelih CD34+ celicah v primerjavi z zreliimi CD34- celicami. To lahko pomeni, da je nižja dejavnost prenašalcev OCT1 v nezrelih celicah odgovorna za manjše kopičenje ima-

tiniba v teh celicah in s tem za ohranjanje levkemičnega klon.³⁴

Domnevamo, da igra aktivnost OCT1 pomembno vlogo pri napovedovanju uspešnosti zdravljenja KML z imatinibom. Zato smo v našem laboratoriju razvili postopek za določanje privzema imatiniba v tarčne celice bolnikov s KML, ki ne temelji na uporabi radioaktivno označenih spojin in je zato prenosljiv tudi v hematološki laboratorij.

Materiali in metode

Kemijske spojine

Raztopino za inkubacijo celic smo pripravili z imatinib mezilatom (Sequoia Research Products, Oxford, Velika Britanija) in prazosinom (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija). Kot interni standard pri analizi z metodo LC-MS/MS smo uporabili D8- imatinib (AlsaChim, Strasbourg, Francija).

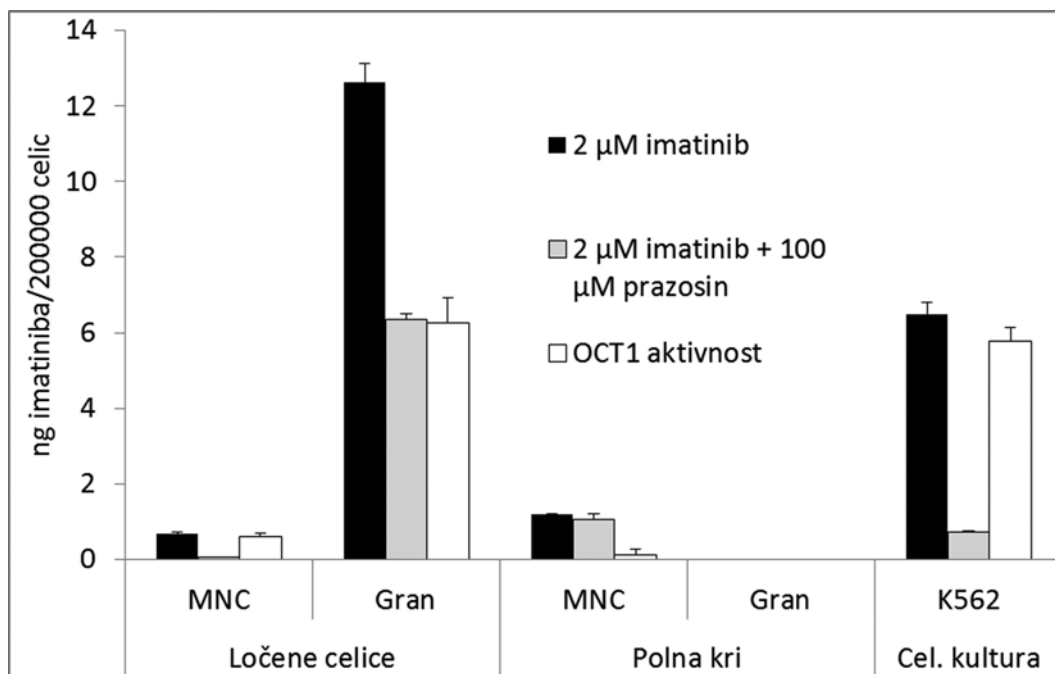
Celična kultura

Celice levkemične linije K-562 (American Type Culture Collection, Manassas, ZDA) so bile gojene v mediju Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies B.V., Nizozemska) z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (ang. FBS) (Gibco®) in 100 UE/mL penicilina pri 37 °C v prisotnosti 5-odstotnega CO₂ in vlage. Gostota celic ob nasajanju na plošče T-75 s plinsko prepustnim zamaškom (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemčija) je bila 2×10^5 celic/mL, zamenjava medija s ponovnim nasajanjem je potekala vsak drugi dan. Inkubacija celic za določanje privzema imatiniba je potekala v RPMI 1640 mediju (Gibco®) z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma in koncentracijo 6×10^5 celic/mL.

Osamitev celic periferne krvi

Za določanje privzema imatiniba v mononuklearne celice (MNC) in granulocite (Gran) smo zdravemu prostovoljcu vzeli 40 mL periferne krvi v epruvete z natrijevim heparinom. Celice smo na posamezne frakcije ločili s centrifugiranjem s PBS (ang. Phosphate Buffered Saline) redčene krvi preko gostotno gradientnega medija Ficoll Pack

Slika 1: Privzem imatiniba v MNC, Gran in K562 celice z inhibitorjem prazosina ali brez. Aktivnost OCT1 je določena kot razlika v privzemu imatiniba pred in po dodatku inhibitorja.



plus (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Po centrifugiranju je plast nad Ficoll-om predstavljala MNC, iz plasti pod Ficoll-om pa smo po lizi eritrocitov pridobili Gran. Obe vrsti celic smo po osamitvi dvakrat spirali s PBS in jih po zadnjem centrifugiranju prešteli s hematološkim analizatorjem Beckman Coulter LH750 (Beckman Coulter, Inc, Brea, ZDA). Uporabo bioloških vzorcev za razvoj analize metode je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 77/1/07).

Inkubacija izoliranih MNC in Gran ter polne krvi v prisotnosti imatiniba in prazosina

Za poskus z ločenimi celicami smo v devet T-25 ploščic za gojenje celic odpipetirali RPMI 1640 medij s FBS in ustrezen volumen celic do končne koncentracije 600000 celic/mL. Trem inkubacijskim zmesem smo dodali koncentrirano raztopino imatiniba (33,3 μM), trem ploščicam pa koncentrirano raztopino imatiniba (33,3 μM) in prazosina (1,67 mM) do končnih koncentracij 2 μM in 100 μM v enakem vrstnem redu. Koncentracijo imatiniba smo privzeli iz literature in sledi dejanski povprečni vrednosti plazemske koncentracije učinkovine pri bolnikih s KML.^{9,29} V treh T-25 (kontrolnih) ploščicah inkubacijska raztopina ni vsebovala niti

imatiniba niti prazosina. Celice smo inkubirali pri 37 °C 2 uri. Po inkubaciji smo celice dvakrat sprali s hladnim PBS pufrom in jih zamrznili na -20 °C za nadaljnjo analizo.

Poskus s polno krvjo smo izvedli tako, da smo kri najprej redčili z medijem RPMI 1640 v razmerju 1:3, nato pa le-to razdelili v dve T-75 ploščici za gojenje celic. Redčeni krvi smo dodali še koncentrirano raztopino imatiniba oz. imatiniba in prazosina do končnih koncentracij 2 μM imatiniba in 100 μM prazosina, nato pa vse skupaj inkubirali pri 37 °C 2 uri. Iz inkubirane krvi smo po opisanih postopkih osamili MNC in Gran. Ločene celice smo prešteli na hematološkem analizatorju in jih v alikvotih po 3×10^6 celic shranili na -20 °C za nadaljnjo analizo.

Liza celic in ekstrakcija imatiniba

Za določitev znotrajcelične koncentracije oz. vsebnosti imatiniba v ločenih celicah smo uporabili ekstrakcijo z organskimi topili in tekočinski kromatograf, sklopljen z masnim detektorjem, kot je opisano v nadaljevanju.

Inkubirane celice smo lizirali s tekočim dušikom in sicer tako, da smo vsak vzorec izmenično trikrat zamrznili in odtalili. Imatinib smo iz naalkaljenega celičnega lizata po dodatku internega standarda D8-imatiniba ekstrahirali z zmesjo etilacetata in he-

ksana. Po ločitvi ter sušenju organske faze v sušilniku TurboVap (Zymark, Hopkinton, ZDA) smo posušen vzorec rekonstituirali v zmesi 50-odstotne vodne raztopine HN-4Cl (4,5 mM) in 50-odstotnega metanola in po dodatnem koncentriranju vzorca v centrifugi pod znižanim tlakom SpeedVac (Savant SC110A, Hicksville, ZDA) vsebnost imatiniba v ekstraktu določili z LC-MS/MS aparatom, sestavljenim iz tekočinskega kromatografa ultra visoke zmogljivosti (UHPLC) Agilent Infinity 1290 in masnega detektorja Agilent 6460 (Agilent, Palo Alto, ZDA). Prostornina vbrizgavanja je bila 1 μL , sledilo je gradientno izpiranje kolone Kinetex 50×2.1 mm C18 z 2,6 μm delci (Phenomenex, Torrance, ZDA) pri 50 °C z mobilno fazo, sestavljeno iz 0,1 % mravljinčne kisline in 98 % acetonitrila z gradientom od 10 % do 50 % v 1,0 min. Uporabljen je bil ionski izvor JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije. Za kvantifikacijo imatiniba in imatiniba D-8 smo uporabili multirezidualno analizo s spremljanjem masnih prehodov m/z 494→394 in m/z 502→394, v enakem vrstnem redu. Retencijski čas za oba analita je bil 1,2 min, celotni čas analize enega vzorca pa je bil 2,6 min. Ocenjena meja določitve za imatinib na osnovi zahteve za razmerje signal/šum 1:10 je bila pri 154,8 ng/L v ekstraktu, kar ustreza 6,2 pg imatiniba na 200.000 celic.

Rezultati

Vsebnost imatiniba smo podali v $\text{ng(IM)}/200000$ celic zaradi lažje primerjave rezultatov z že objavljenimi podatki v

literaturi. Koncentracijo imatiniba v celicah smo izračunali s pomočjo literaturnih vrednosti volumnov posameznih tipov celic. Tako smo predpostavljali, da je volumen MNC 190 fL, Gran 360 fL in celic K-562 2030 fL.⁴⁰⁻⁴² Aktivnost OCT1 se izrazi kot razlika v privzemu imatiniba brez dodatka inhibitorja OCT1 prazosina ali ob dodatku.

Rezultati kažejo, da je bil privzem imatiniba največji v Gran, ki so bili najprej izolirani iz krvi, nato pa inkubirani z imatinibom, in v katerih smo izmerili skoraj 10-krat večje koncentracije imatiniba kot v ostalih vrstah celic (Tabela 1). Nekoliko manjši je bil izmerjen prehod učinkovine v MNC, inkubirane z imatinibom v polni krvi, znotrajcelični koncentraciji imatiniba v K562 celicah in MNC inkubiranih po izolaciji pa sta bili približno enaki. V Gran, izoliranih po inkubaciji polne krvi, je bila vsebnost imatiniba pod mejo določljivosti (Slika 1 in Tabela 1).

Dodatek prazosina je tudi v našem poskusu pomembno vplival na prenos imatiniba v celico (Slika 1). V vseh primerih, z izjemo vzorca Gran, izoliranih iz polne krvi po inkubaciji z imatinibom, ko ponovno vsebnosti spojine zaradi očitno prenizke vrednosti nismo mogli določiti, smo namreč po dodatku prazosina izmerili bistveno nižje znotrajcelične koncentracije imatiniba. Razlika je bila statistično značilna ($p < 0,05$) za vzorce MNC in Gran, ki so bili inkubirani z imatinibom po predhodni ločitvi na Ficoll-u ter pri celicah K-562. Pri MNC, izoliranih po inkubaciji polne krvi, razlika ni bila statistično značilna.

Tabela 1: Privzem (IUR [ng imatiniba/200000 celic]) in znotrajcelična koncentracija (c_i) imatiniba v različnih vrstah celic (MNC – mononuklearne celice, Gran – granulociti, K-562 – linija KML celic) z ali brez prazosina (inhibitor OCT1); aktivnost OCT1 [ng imatiniba/200000 celic]- razlika v privzemu imatiniba pred in po dodatku prazosina.

	2 μM imatinib		2 μM imatinib + 100 μM prazosin		aktivnost OCT1
	IUR	c_i [mg/L]	IUR	c_i [mg/L]	
MNC (ločene celice)	0,68 ± 0,06	17,8 ± 1,6	0,06 ± 0,00	1,49 ± 0,11	0,62 ± 0,06
Gran (ločene celice)	12,62 ± 0,51	191,2 ± 7,7	6,35 ± 0,15	96,2 ± 2,2	6,27 ± 0,66
MNC (polna kri)	1,19 ± 0,01	31,4 ± 0,3	1,06 ± 0,13	27,9 ± 3,6	0,13 ± 0,14
K-562	6,50 ± 0,31	16,0 ± 0,8	0,72 ± 0,04	1,78 ± 0,09	5,78 ± 0,35

Razpravljanje

Aktivnost prenašalcev OCT1 pomembno vpliva na prehod imatiniba v levkemične celice KML in s tem na mesto delovanja. Podatek o aktivnosti privzema imatiniba v MNC bi tako lahko koristil kot dopolnilno merilo v postopku izbire optimalnega zdravila za zdravljenje KML. Test, ki so ga razvili D. White in sodelavci, temelji na uporabi radioaktivno označenega imatiniba, in je kot tak zelo draga preiskava in uporaben le v redkih ustrezno opremljenih laboratorijih. Zato smo želeli razviti postopek določanja aktivnosti OCT1 v levkocitih, ki bi bil uporaben v hematološkem laboratoriju, bi dosegal ustrezno občutljivost in zanj ne bi potrebovali radioaktivno označenih reagentov.

Privzem imatiniba smo določali v MNC in Gran, da bi tako določili, v kateri celični frakciji aktivnost OCT1 najbolj sovпада z odzivom na zdravljenje. Prav tako smo postopek osamitve celic izvedli na dva različna načina: z inkubacijo prej ločenih celic, povzeto po D. White s sodelavci, in inkubacijo polne krvi z naknadnim ločevanjem celic. Čeprav slednji način sicer bolje posnema dejanski privzem imatiniba v celice med zdravljenjem, se je ta postopek izkazal za neustreznega. V Gran namreč imatiniba praktično nismo izmerili, poskus na ločenih celicah pa je pokazal, da spojina v te celice vendarle prehaja in to celo bolje kot v MNC. Menimo, da je razlog lažnih negativnih rezultatov v dolgotrajnem postopku osamitve celic po inkubaciji imatiniba v polni krvi. Med postopkom osamitve so namreč celice vrste Gran dalj časa izpostavljene velikim prostorninam pufrov za lizo eritrocitov in spiranje (MNC so podvrženi le spiranju), ves ta čas pa lahko učinkovina nemoteno prehaja iz celic s pasivno difuzijo, tako da jo do konca osamitve skoraj v celoti izgubimo. Našo domnevo smo potrdili z izpostavitvijo v raztopini imatiniba inkubiranih celic K-562 enakemu načinu osamitve in sprotim merjenjem vsebnosti učinkovine v celicah. Ugotovili smo, da se v simuliranem postopku osamitve in spiranja Gran imatinib skoraj popolnoma izloči iz celic K-562. Če je bila takoj po inkubaciji celic koncentracija imatiniba v celičnem lizatu 104 µg/L,

smo po ločitvi celic na Ficoll-u v njihovem lizatu določili le še 39 µg/L, po spiranju pa je ta vrednost padla pod mejo določljivosti. Upad vsebnosti imatiniba v celičnem lizatu je deloma tudi posledica izgub celic med postopkom (to smo zaznali z upadom koncentracije proteinov v celičnem lizatu), del učinkovine pa se gotovo izgubi tudi z izpostavitvijo celic velikim volumnom različnih pufrov. Naši rezultati se ujema tudi s trditvami, ki so jih objavili Mlejnek in sodelavci.³⁸ Ti so uhajanje imatiniba iz K-562 celic po *in vitro* poskusih morali omejiti s filtracijo celic skozi silikonsko olje, kar pa žal ni prenosljivo na osamitev Gran. Težave z izgubljanjem spojine iz celic med njihovo osamitvijo sicer kažejo tudi na to, da bo določitev znotrajceličnih koncentracij imatiniba pri bolnikih z že vzpostavljeno znotrajcelično koncentracijo imatiniba zelo zahtevna in bo zato v primeru takšnega določanja potrebna dodatna optimizacija postopka. Predvidevamo pa, da bi meritve znotrajceličnih koncentracij imatiniba pri bolnikih, ki so že zdravljeni z imatinibom, sicer lahko nudile boljše oporo pri spremljanju uspešnosti zdravljenja oz. iskanju možnega vzroka neodzivnosti na zdravljenje, kot meritve plazemskih koncentracij te učinkovine.

Rezultati, pridobljeni z inkubacijo prej osamljenih celic, se dobro ujema z že opisanimi v literaturi.^{28,33} Prazosin kot inhibitor OCT1 pomembno zmanjša privzem imatiniba v oba tipa celic (MNC, Gran) kot tudi v celice K-562. IUR pri MNC je bil sicer nekoliko nižji kot opisan v literaturi (povprečni vrednosti IUR brez prazosina 24,35 ng (IM)/200000 celic in s prazosinom 8,57 ng (IM)/ 200000 celic²⁸), kar pa pripisujemo dejstvu, da je šlo v našem primeru za kri zdravega prostovoljca, ki ima drugačno sestavo frakcije MNC kot kri bolnika s KML. Pri bolniku pred zdravljenjem namreč v tej plasti poleg monocitov in limfocitov, ki so sicer prisotne pri zdravem človeku, zasledimo tudi nezrele oblike granulocitov (mielociti, metamielociti), ki so hkrati tudi tarča delovanja imatiniba. Predpostavljamo, da je prav vstop imatiniba v te celice ključen za njegovo učinkovitost v terapiji KML, posledica pa je korelacija aktivnosti OCT1 frakcije MNC z uspehom zdravljenja z imatinibom.

Ker smo z opisanim poskusom pokazali, da z ustrezno pripravo vzorcev in občutljivo metodo LC-MS-MS lahko dosežemo dovolj dobro občutljivost celo za določanje privzema imatiniba v frakcijo MNC celic zdravega prostovoljca, bo metoda dovolj občutljiva tudi za določitev IUR pri bolnikih s KML pred začetkom zdravljenja.

Aktivnost OCT1 v različnih tipih celic bolnikov s KML in zdravih prostovoljcev je preučevala tudi avstralska skupina raziskovalcev.³⁹ Ugotovili so, da je aktivnost OCT1 največja v nevtrofilcih, precej nižja v monocitih in najnižja v limfocitih. Opisane ugotovitve dodatno pojasnjujejo naše rezultate. Ker je frakcija MNC pri zdravem prostovoljcu sestavljena predvsem iz limfocitov in v manjši meri tudi iz monocitov, smo v tej frakciji izmerili bistveno nižje vrednosti IUR kot tudi nižjo aktivnost OCT1 v primerjavi s frakcijo Gran, v kateri prevladujejo (> 90 %) nevtrofilci (aktivnost OCT1 6,27 vs. 0,62 ng(IM)/ 20000 celic). Naši rezultati se torej dobro ujemajo z ugotovitvijo D. White s sodelavci, ki so največjo aktivnost OCT1 izmerili v MNC bolnikov pred zdravljenjem, nekoliko nižjo pri bolnikih s KML v remisiji in najnižjo pri zdravih prostovoljcih.³⁹

Znotrajcelične koncentracije imatiniba v vseh vrstah celic, ki so od deset do stokrat višje v primerjavi s koncentracijo imatiniba v inkubacijski raztopini, potrjujejo, da privzem imatiniba poteka z aktivnim prenosom, ki ga v veliki meri, pa vendar ne v celoti, lahko pojasnimo z aktivnostjo OCT1 prenašalca. Raziskovalci D. White predpostavljajo, da je možna vpletenost dodatnega, še neznanega prenašalca za privzem učinkovine.²⁸ Vsekakor pa je, kot navajajo tudi Hu s sodelavci,³³ znotrajcelična koncentracija imatiniba rezultat tako privzema kot odstranjevanja učinkovine z različnimi prenašalci, ki prenašajo učinkovino v obe smeri in jo zato le delno lahko pojasnimo z aktivnostjo enega samega prenašalca.

Na osnovi naših rezultatov smo lahko opredelili postopek določanja IUR vrednosti tudi za celice vzorca krvi bolnika pred začetkom zdravljenja z imatinibom. Bolniku bomo vzeli 15 mL krvi v epruveto z natrijevim heparinom, celice ločili na Ficoll-u po opisanem postopku in obe frakciji (MNC in

Gran) inkubirali v raztopini imatiniba s prazosinom oz. brez. Po inkubaciji bomo celice hitro sprali s hladnim pufrom PBS, jih prešteli s hematološkim analizatorjem in znano število celic lizirali s tekočim dušikom. V lizatu bomo po ekstrakciji določili koncentracijo imatiniba z LC-MS/MS metodo.

Sklepi

Razvili smo postopek za neposredno določanje privzema (IUR) imatiniba v enojedrne celice, granulocite in celice K-562, ki bi ga bilo mogoče, vsaj do priprave stabilnih vzorcev za analizo, izvajati tudi v specializiranem hematološkem laboratoriju. Rezultati IUR, pridobljeni z našim postopkom, se ujemajo s podatki iz literature in tako še dodatno potrjujejo vlogo prenašalca OCT1 pri prenosu imatiniba v celico.

Z razvitim postopkom želimo v prihodnosti preveriti tudi korelacijo aktivnosti OCT1 z uspehom zdravljenja z imatinibom na slovenski populaciji bolnikov. Če bi dejansko potrdili napovedno vrednost testa IUR, bi se omenjen postopek lahko vpeljal v diagnostiko bolnikov z novo odkrito KML. V začetni fazi predvidena neodzivnost bolnikov na imatinib bi upravičila zdravljenje s tirozinkinaznimi inhibitorji druge generacije, kot sta nilotinib in dasatinib. Za ti dve učinkovini namreč velja, da njun prehod v celice ni odvisen od prenašalca OCT1, kar pomeni, da bi tudi bolniki z nizko aktivnostjo OCT1 z njima najverjetneje dosegli boljši uspeh zdravljenja.

Literatura

- Kalidas M, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 2001; 286: 895–8.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z. The biology of Chronic Myeloid leukemia. *NEJM* 1999; 341: 164–72.
- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukemia. *Nature Reviews* 2005; 5: 172–83.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *NEJM* 2003; 348: 994–1004.
- Hochhaus A, Drucker BJ, Larson RA, O'Brien SG, Gathmann I, Guilhot F. IRIS 6-year follow-up: sustained survival and declining annual rate of transformation in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2007; 110. Abstract.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of Primary and Secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control* 2009; 16: 122–31.
- Mauro MJ. Defining and managing imatinib resistance. *Haematology* 2006; 1: 219–25.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876–80.
- Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 109(8): 3496–99.
- Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Drucker BJ, Talpaz M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol.* 2004; 22(5): 935–42.
- le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S, Bonin M, Leopold T, Baskaynak G et al. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53(4): 313–23.
- Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood* 2003; 102: 4499–503.
- Zong Y, Zhou S, Sorrentino BP. Loss of P-glycoprotein expression in hematopoietic stem cells does not improve responses to imatinib in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1590–96.
- Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlägel U, von Bonin M. et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* 2004; 18: 401–8.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; 101: 2368–73.
- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96: 1070–9.
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004; 104: 3739–45.
- Rumpold H, Wolf AM, Gruenewald K, Gastl G, Gunsilius E, Wolf D. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp Hematol* 2005; 33: 767–75.
- Ozvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of multidrug transporters. *Drug Resistance Updates.* 2005; 8: 15–26.
- Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruin EA, Guetens G et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 747–52.
- Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Várady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Váradi A et al. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 1485–95.
- Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH et al. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res* 2005; 65: 2577–82.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res* 2004; 64: 2333–7.
- Crossman LC, Drucker BJ, Deininger MW. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005; 106(3): 1133–4
- Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 201: 105–67.
- Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, et al. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 591–5.
- Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zhang L, Reddy NG, Jabbour EJ, et al. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27 (22): 3642–9.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino AC, Cambareri 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: 697–704.
29. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: Higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007; 110: 4064–72.
 30. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, 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. *JCO* 2010; 28: 2761–7.
 31. White DL, Radich J, Soverini S, Saunders VA, Frede A, Dang P, et al. Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomised to high-dose imatinib achieve better responses, and lower failure rates, than those randomized to standard-dose. *Haematologica* 2011. Early release paper.
 32. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol* 2008; 83: 258–64.
 33. Hu S, Franke RM, Filipinski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn et al. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3141–8.
 34. Engler JR, Frede A, Saunders VA, Zannettino AC, Hughes TP, White DL. Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity. *Leukemia* 2010; 24: 765–70.
 35. Komarova NL, Wodarz D. Effect of cellular quiescence on the success of targeted CML therapy. *PLoS ONE* 2007; 2(10): e990.
 36. Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 2002; 99(1): 319–25.
 37. Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 2003; 101(12): 4701–07.
 38. 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.
 39. Engler JR, Zannettino ACW, Bailey 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): 213–19.
 40. Chapman EH, Kurec AS, Davey FR. Cell volumes of normal and malignant mononuclear cells. *J Clin Pathol* 1981; 34: 1083–90.
 41. Ting-Beall HP, Needham D and Hochmuth RM. Volume and osmotic properties of human neutrophils. *Blood* 1993; 81: 2774–80.
 42. Ferret E, Evrard C, Foucal A, Gervais P. Volume changes of isolated human K562 leukemia cells induced by electric field pulses. *Biotechnol Bioeng* 2000; 67(5): 520–8.