

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

STANOVENIE IMUNOSUPRESÍVNYCH LIEČIV POMOCOUCO LC/MS-MS

MARTINA VALACHOVIČOVÁ^a, JANA PRÍBOJOVÁ^a
a CSILLA MIŠKANOVÁ^{a,b}

^a *Fakulta ošetrovateľstva a zdravotníckych odborných štúdií, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová 14, 833 01 Bratislava,* ^b *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava*
martina.valachovicova@szu.sk

Došlo 12.5.20, prijaté 9.11.20.

Kľúčové slová: imunosupresívne liečivá, cyklosporín, everolimus, takrolimus, sirolimus, LC/MS-MS

Úvod

Imunosupresíva predstavujú skupinu liečiv, ktorej hlavnou úlohou je potlačenie aktivity imunitného systému, ktorý vedie k poškodzovaniu vlastného tkaniva. Nachádzajú uplatnenie predovšetkým pri orgánových transplantáciách. Indikáciu liečby musia zvažovať a navrhovať špecialisti, nakoľko nie každý jednotlivec môže podstúpiť liečbu. Dôvodom sú väčšinou kontraindikácie, nežiaduce vedľajšie účinky vrátane imunologických, obličkových, alebo neurologických komplikácií, čo následne vyžaduje upravenie dávky alebo dočasné prerušenie liečby, niekedy aj jej ukončenie. Medzi najčastejšie používané imunosupresíva po orgánovej transplantácii patria cyklosporín, everolimus, takrolimus a sirolimus. Majú veľmi úzky terapeutický rozsah, preto monitorovanie týchto liečiv zohráva kľúčovú úlohu pre udržiavanie koncentrácií imunosupresív v krvi a v plazme, aby sa redukovalo riziko ich toxicity a rejekcie orgánov¹. Toto sledovanie koncentrácií je používané pre monitorovanie liečiv v rutínnej starostlivosti o pacienta. Imunosupresíva majú komplementárny mechanizmus účinku a interagujú synergicky, preto sú často v klinickej praxi kombinované.

Cyklosporín A (CycA) sa používa u niektorých foriem postihnutia obličiek, ale hlavne u tých pacientov, u ktorých nemožno z nejakého dôvodu podať iné imunosupresíva. U takto liečených pacientov treba pravidelne kontrolovať kreatinín a hodnoty krvného tlaku. Účinkuje ako inhibítor kalcineurína a spôsobuje proliferáciu lymfocytov následne po potlačení produkcie cytokínov. Takrolimus (TACR) je makrolidové antibiotikum, ale patrí tiež medzi kalcineurínové inhibítory. Tie sa po prechode bunkovou membránou lymfocytov viažu na špecifické vnútro-

bunkové proteíny – imunofilíny – a blokujú enzymatickú aktivitu kalcineurínu. Takto bránia transkripcii a produkcii interleukínu-2 (IL-2), ktorý je hlavným cytokínom spôsobujúcim proliferáciu T-lymfocytov, ktoré spúšťajú mechanizmy rejekcie. Sirolimus (SIR) a everolimus (EVER) sú štruktúrou veľmi podobné a majú rovnaké mechanizmy účinku. Podobne ako TACR, viažu sa na rovnaký proteín, ale nemajú vplyv na kalcineurín. Namiesto toho inhibujú proteínkinázu, ktorá je kritická pre cyklus progresie buniek. Hlavný rozdiel medzi SIR a EVER je v polčase rozpadu – SIR (60 h) má približne dvojnásobný v porovnaní s EVER (30 h). Podobne ako u TACR, aj monitorovanie koncentrácie SIR a EVER v plnej krvi je nevyhnutné kvôli ich významnej toxicite, veľkým intra-individuálnym rozdielom v biologickej dostupnosti a vylučovaní, ako aj kvôli možnosti interakcií liečivo – liečivo. Účinnosť v prevencii akútnej rejekcie koreluje s koncentraciami v krvi. Je preferovaná plná krv, nakoľko koncentrácia červených krviniek je 10 až 30× vyššia než v plazme. Pre SIR a TACR môže byť účinná terapeutická koncentrácia menšia ako 5 ng ml⁻¹, preto LC-MS/MS poskytuje špecifickejšie a presnejšie výsledky^{1,2}.

Medzi najčastejšie využívané metódy na stanovenie imunosupresív patria imunochemické metódy a kvapalínová chromatografia (LC) v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS) alebo tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS). V rutinných laboratóriách sa používajú imunochemické metódy pre kvantifikáciu imunosupresív. Sú založené na väzbe analytov so špecifickými väzbovými proteínmi (protilátkami) a na následnom meraní signálu vzniknutého pri danej interakcii. Tieto metódy majú veľa limitácií. Rôzne endogénne metabolity analytov majú podobné štruktúrne rozlíšenie ako samotný analyt a môžu interagovať s protilátkou. Existujú tiež molekuly štruktúrne odlišné od analytov, ktoré ale poskytujú porovnateľné rozlíšenie ako analyt. Tieto molekuly sa vo všeobecnosti nazývajú krížové reaktanty. Ich prítomnosť vo vzorke môže spôsobiť falošne vyššie alebo nižšie výsledky analýzy. Ďalšie zložky vo vzorke, ako napríklad bilirubín, hemoglobín alebo lipidy môžu zasahovať do analýzy interferovaním so vzniknutým signálom a poskytovať nesprávne výsledky. Ľudské protilátky vo vzorke, akými sú heterofilné protilátky alebo rôzne ľudské anti-živočíšne protilátky, môžu tiež spôsobiť interferencie. Je veľmi dôležité eliminovať vplyv týchto interferencií a pristúpiť k výberu takej metódy, ktorá odstráni tieto problémy^{3,4}. Analýzy využitím LC-MS/MS sa vyznačujú vysokou selektivitou a citlivosťou. Okrem toho, táto metóda je schopná stanoviť široké spektrum látok bez použitia derivatizácie a s minimálnou úpravou vzorky, umožňuje simultánne stanovenie viacerých liečiv, zároveň rozlíšenie pôvodnej látky od jej metabolitov a okrem toho má ekonomicky úspornejšie prevádzkové náklady v porovnaní s imunochemickými metódami. Vzhľadom k vyššie uvede-

ným výhodám, LC-MS/MS sa stáva všeobecne akceptovanou metódou stanovenia koncentrácií imunosupresív, poskytuje rýchle a presné stanovenie s minimálnym vplyvom interferentov, ktoré sú prítomné v prípade imunochemického stanovenia^{5–8}.

Experimentálna časť

Použité chemikálie

Pre prípravu mobilných fáz boli použité chemikálie: voda, acetonitril, octan amónny, heptahydrát síranu zinočnatého (všetky LC-MS čistoty od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko), metanol HPLC čistoty od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Štandardy everolimus (EVER), sirolimus (SIR), takrolimus (TACR) a značené štandardy cyklosporín A-d4, everolimus-d4, sirolimus-d4, tacrolimus-d4 boli zakúpené od firmy Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada). Štandard cyklosporín A (CycA) sa zakúpil od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko).

Pre kontrolu a overenie správnosti nameraných hodnôt boli používané kontrolné vzorky plnej krvi od firmy Chromsystems (Mníchov, Nemecko).

Odber vzoriek krvi

Vzorky krvi boli zbierané od 1600 pacientov po transplantácii obličiek vo veku 24–72 rokov do odberových skúmaviek s EDTA v urologickej ambulancii SZU v Bratislave. Všetky vyšetrenia sa uskutočnili v súlade so zásadami Helsinskej deklarácie. Štúdia bola schválená etickou komisiou SZU v Bratislave. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas.

Príprava roztokov a vzoriek

Zásobné roztoky značených štandardov (1 mg ml⁻¹) a imunosupresívnych liečiv (1 mg ml⁻¹) boli uskladňované v metanole pri –80 °C.

Pre účely validácie boli pripravené sady kalibračných roztokov s koncentraciami v rozmedzí 2,50–40,00 ng ml⁻¹ pre TACR a SIR; 1,50–25,00 ng ml⁻¹ pre EVER a 30,00 až 750,00 ng ml⁻¹ pre CycA pridaním zásobných roztokov štandardov analytov do plnej krvi.

Na vyhodnotenie analýzy reálnych vzoriek boli použité komerčne dostupné kity kalibračných štandardov v plnej krvi a kontrolných vzoriek kvality od firmy Chromsystems. Boli použité pre zostrojenie kalibračných čiar v rozmedzí koncentrácií 43,3–1695 ng ml⁻¹ (43,3, 127,00, 290,00, 464,00, 738,00 a 1695,00) pre CycA; v rozmedzí 2,4–38,7 ng ml⁻¹ (2,40, 5,80, 10,70, 15,40, 21,50 a 38,70) pre EVER; v rozmedzí 2,60–42,60 ng ml⁻¹ (2,60, 6,50, 11,80, 17,50, 26,00 a 42,60) pre SIR; v rozmedzí 2,5–39,6 ng ml⁻¹ (2,50, 6,00, 11,10, 16,30, 22,90 a 39,60) pre TACR. Kalibračné čiary sú znázornené na obr. 1–4. Kalibračné štandardy ako aj kontrolné vzorky

kvality boli uskladnené pri –80 °C a boli stabilné 3 mesiace.

Príprava mobilných fáz na UPLC-MS analýzu

Pre sledovanie vplyvu rôznych mobilných fáz (vodnej a organickej zložky) na ionizáciu analytov boli použité nasledovné roztoky: mravčia kyselina a octová kyselina s koncentraciou 5, 10, 15, 20 mmol l⁻¹; octan amónny a mravčan amónny s koncentraciou 5 a 10 mmol l⁻¹ a organické rozpúšťadlá acetonitril a metanol. Za optimálne zloženie mobilnej fázy pro gradientovú elúciu bolo zvolené 10 mmol l⁻¹ octanu amónneho ako vodná zložka a acetonitril ako organická zložka. Použitý gradient je opísaný nižšie. Pri tomto zložení mobilnej fázy boli dosiahnuté najvyššie intenzity signálov pre všetky sledované analyty.

Príprava vzoriek

Ako zrážacie činidlo bola použitá zmes 0,3 M ZnSO₄ a metanolu (30:70, v/v), ktorá bola pripravená vždy čerstvá. Do mikroskúmaviek sa pridalo 50 µl vzorky (kalibračný štandard, kontrolná vzorka alebo reálne vzorky krvi), 20 µl interného štandardu (zmes deutérovaných štandardov Cyc A-d4, EVER-d4, TACR-d3, SIR-d4) a 100 µl zrážacieho činidla. Vzorka bola intenzívne premiešaná asi 30 s a centrifugovaná 10 min pri 14 000 otáčkach. Supernatant (5 µl) bol dávkovaný do HPLC systému na analýzu.

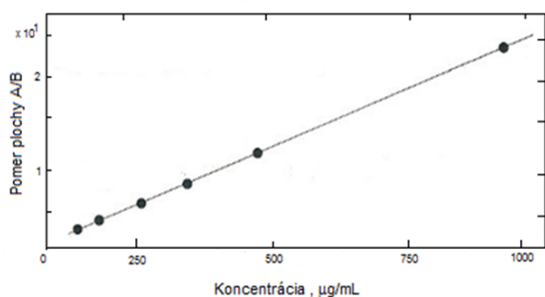
Prístrojové vybavenie

Na zavedenie metodického postupu bol použitý systém, ktorý kombinoval ultraúčinnú kvapalinovú chromatografiu (UPLC) s hmotnostnou spektrometriou (MS). UPLC časť (HP 1260) pozostávala z nasledujúcich častí: binárne pumpy (G1312B), termostatovaný dávkovač (G1367E), termostat (G1330B), odplyňovač (G4225A), termostat na kolóny (G1316c) (Agilent Technologies, USA). MS časť pozostávala z iónového zdroja (G1978B, multimódový zdroj pre trojitý kvadrupól typu 6410), trojitého kvadrupólového analyzátoru QqQ (G6460A 100 (ESI) (Agilent 6460 TripleQuad, Technologies, USA). Na spracovanie a vyhodnotenie údajov bol použitý softvér MassHunter Optimizer (Agilent).

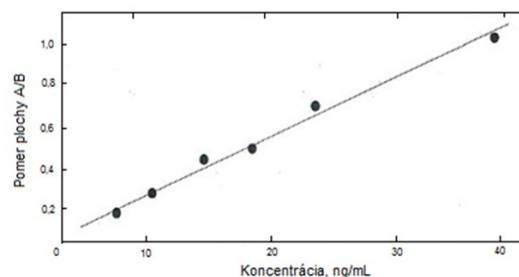
Experimentálne podmienky

Hmotnostne-spektrometrické merania boli uskutočnené v pozitívnom ionizačnom móde. Napätie na ESI kapiláre bolo +4 kV. Reakčným a kolíznym plynom bol vysokočistý dusík, (99,99 %) s prietokom 7 l min⁻¹ a teplotou 325 °C.

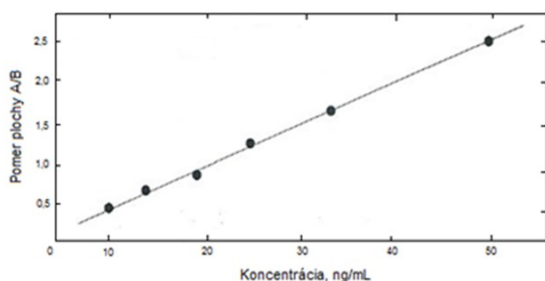
Pracovalo sa v tzv. MRM móde (MRM – multiple reaction monitoring), ktorý dovoľuje sledovať prechody iónu prekurzora na produktové ióny, pričom na kvantifikáciu jednotlivých analytov bol použitý najintenzívnejší prechod. MRM prechody sú uvedené v tab. I.



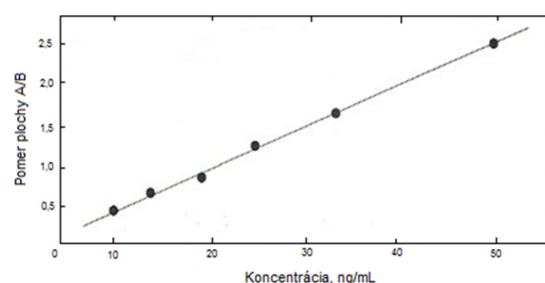
Obr. 1. Kalibračná krivka v plnej krvi pre cyklosporín A v rozsahu koncentrácií 100–1000 ng ml⁻¹, A – plocha štandardu; B – plocha izotopicky značeného štandardu



Obr. 2. Kalibračná krivka v plnej krvi pre everolimus v rozsahu koncentrácií 6–40 ng ml⁻¹, A – plocha štandardu; B – plocha izotopicky značeného štandardu



Obr. 3. Kalibračná krivka v plnej krvi pre sirolimus v rozsahu koncentrácií 10–50 ng ml⁻¹, A – plocha štandardu; B – plocha izotopicky značeného štandardu



Obr. 4. Kalibračná krivka v plnej krvi pre takrolimus v rozsahu koncentrácií 10–50 ng ml⁻¹, A – plocha štandardu; B – plocha izotopicky značeného štandardu

UPLC podmienky stanovenia imunosupresívnych liečiv

Na chromatografickú separáciu analytov bola použitá UPLC kolóna Acquity HSS C18 (50 × 2,1 mm, 1,8 µm, Waters, MA, USA) a predkolóna Acquity HSS (5 × 2,1 mm, 1,8 µm Waters, MA, USA). Mobilná fáza

pozostávala z 10 mmol l⁻¹ octanu amónneho vo vode, pH 4,0 (A) a organickej zložky acetonitrilu (B). Priebeh gradientu bol nasledovný: 0–0,5 min 20 % B (ventil prepnutý do odpadu); 0,51–3,1 min – 98 % B (ventil prepnutý do MS); 3,11–5,0 min 20 % B (ventil prepnutý do odpadu). Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml min⁻¹ a dávkovaný objem vzorky bol 5 µl. Teplota kolóny bola 60 °C.

Tabuľka I

MRM prechody jednotlivých imunosupresív

Imunosupresíva	Prekurzor ión [m/z]	Produkt ión [m/z]	Fragmentor [V]	Kolízna energia [eV]
Cyclosporín A, CycA	1219,9	1202,8	175	12
Everolimus, EVER	975,5	908,4	170	18
Sirolimus, SIR	931,5	864,5	180	18
Takrolimus, TACR	821,5	768,5	170	16
Cyc A-d4	1206,7	1188,9	250	45
Everolimus-d4	979,5	912,5	170	18
Sirolimus-d4	934,5	864,3	180	18
Takrolimus-d3	824,5	771,5	150	9

Výsledky a diskusia

Vo všeobecnosti, validovaná analytická metóda znamená, že poskytuje spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky^{9,10}, pričom sú definované a overiteľné parametre a hlavné operačné podmienky. Použitá metóda bola validovaná vzhľadom na linearitu, presnosť, správnosť, výťažnosť, medzu detekcie a medzu stanovenia¹¹. Validačné parametre sú uvedené v tab. II.

Linearita

Kalibračné čiary boli zostrojené v rozmedzí koncentrácií 100–1000 ng ml⁻¹ pre CycA; 10–50 ng ml⁻¹ pre SIR a TACR a 6–40 ng ml⁻¹ pre EVER v plnej krvi (viď obr. 1–4). Parametre kalibračných čiar dosiahli nasledovné hodnoty: $y = 2,09x - 0,14$ ($r^2 > 0,99$) pre CycA; $y = 0,68x + 0,04$ ($r^2 > 0,99$) pre SIR; $y = 0,74x + 0,01$ ($r^2 > 0,99$) pre TACR a $y = 0,32x + 0,03$ ($r^2 > 0,99$) pre EVER. Kalibračné čiary boli zostrojené pomocou deutérovaných štandardov a poukazujú na dobrú linearitu vo vyš-

šie uvedenom koncentračnom rozsahu (korelačné koeficienty boli vyššie ako 0,99 pre všetky analyty).

Presnosť a správnosť

Vnútrodnová presnosť a správnosť boli namerané opakovanou analýzou ($n=4$) kalibračných štandardov na troch koncentračných úrovniach analytov v plnej krvi (viď tab. II). Medzidňová presnosť a správnosť boli stanovené analýzou kalibračných štandardov počas štyroch rôznych dní v týždni. Príslušné hodnoty koeficientov variácie CV% (pre presnosť) a relatívnej chyby RE% (pre správnosť) boli vyjadrené ako odhady štandardných a absolútnych odchýlok vypočítaných pre súbory s počtom vzoriek menších než sedem.

Opakovateľnosť plochy píku

Relatívne chyby (vypočítané ako odhad relatívnej štandardnej odchylky) boli vypočítané z 20 dávkovaní analytov v „spikovanej“ vzorke plnej krvi pre dve koncen-

Tabuľka II
Validačné parametre pre LC-MS/MS systém

Parametre	Cyklosporín A	Everolimus	Sirolimus	Takrolimus
Koncentrácia, ng ml ⁻¹	100,00–1000,00	6,00–40,00	10,00–50,00	10,00–50,00
Vnútrodnové analýzy ^a				
RE, %	2,17–3,56	2,83–4,62	3,56–7,01	2,18–6,91
CV, %	4,01–7,16	5,31–7,15	6,02–8,15	2,05–4,32
Medzidňové analýzy ^b				
RE, %	2,95–5,67	5,31–10,88	6,14–7,49	4,53–4,71
CV, %	4,01–6,11	7,14–12,81	7,64–8,84	5,51–6,21
Opakovateľnosť				
RE, %				
– retenčného času ^c	0,011	0,008	0,008	0,005
– plochy píku ^d				
C2, ng ml ⁻¹	2,17	10,54	9,87	6,91
C3, ng ml ⁻¹	1,95	6,24	7,21	4,15
Linearita y	-0,14	0,03	0,04	0,009
– smernica/	2,09	0,32	0,68	0,74
– korelačný koeficient	0,9998	0,9897	0,9983	0,9988
LOD, ng ml ⁻¹	0,4	0,5	0,7	0,5
LOQ, ng ml ⁻¹	1,35	2,20	1,42	1,26
Výťažnosť, %	80,9	88,0	83,7	91,5

^a Vnútrodnová presnosť a správnosť metódy bola vyhodnotená opakovanou analýzou ($n=4$) kalibračného štandardu v krvi.

^b Medzidňové parametre boli stanovené analýzou kalibračných štandardov 4 rôzne dni v týždni. ^c Relatívne chyby (RE) (vyjadrené ako odhad relatívnej štandardnej odchylky) boli vypočítané z 20 nástrekov vzoriek štandardov a vzoriek blanku krvi na koncentračnej úrovni 127 ng ml⁻¹ pre cyklosporín, 2,40 ng ml⁻¹ pre everolimus, 2,60 ng ml⁻¹ pre sirolimus a 2,50 ng ml⁻¹ pre takrolimus. ^d RE hodnoty boli vypočítané z 20 nástrekov blankovej vzorky krvi spikovanej štandardmi na 2 rôznych koncentračných úrovniach C2 a C3, C2 – 290 ng ml⁻¹ pre cyklosporín, 5,80 ng ml⁻¹ pre everolimus, 6,50 ng ml⁻¹ pre sirolimus a 6,00 ng ml⁻¹ pre takrolimus, C3 – 738 ng ml⁻¹ pre cyklosporín, 21,50 ng ml⁻¹ pre everolimus, 26,00 ng ml⁻¹ pre sirolimus a 22,90 ng ml⁻¹ pre takrolimus

tračné úrovne C2 (290 ng ml⁻¹ pre CycA, 5,80 ng ml⁻¹ pre EVER, 6,50 ng ml⁻¹ pre SIR a 6,00 ng ml⁻¹ pre TACR) a C3 (738 ng ml⁻¹ pre CycA, 21,50 ng ml⁻¹ pre EVER, 26,00 ng ml⁻¹ pre SIR a 22,90 ng ml⁻¹ pre TACR).

Opakovateľnosť retenčného času

Bola stanovená z 20 dávkovaní štandardu a blankovej vzorky plnej krvi pre koncentráciu 127 ng ml⁻¹ pre CycA, 2,40 ng ml⁻¹ pre EVER, 2,60 ng ml⁻¹ pre SIR a 2,50 ng ml⁻¹ pre TACR.

Stanovenie medze detekcie (LOD) a medze stanovenia (LOQ)

Medza detekcie pre extrahovanú plnú krv bola vypočítaná z pomeru signál:šum (S/N=3) analytického signálu píku (plocha píku) k maximálnim zmenám požadovanej odozvy počas analýzy ($n=10$) vzorky blanku plnej krvi a signálu vzorky krvi spikovanej so známou koncentráciou analytu (FDA, 2001)¹².

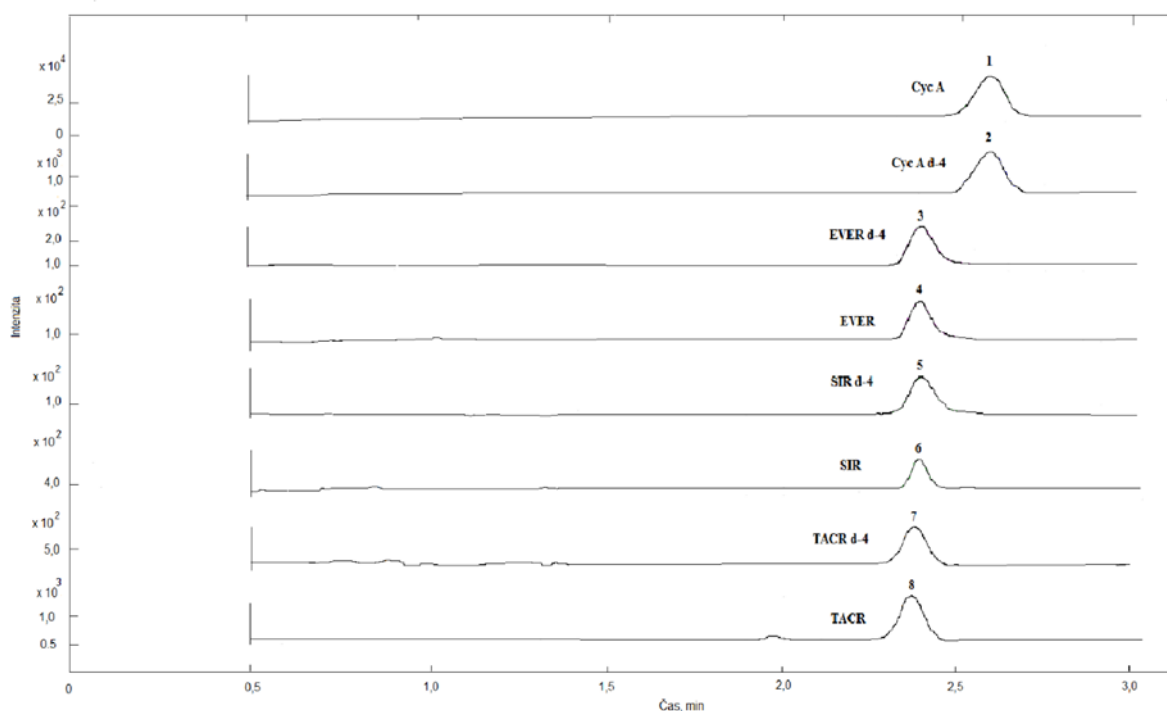
Medza stanovenia bola stanovená ako koncentrácia najnižšieho kalibračného štandardu (pri pomere odozvy plochy píku voči šumu nulovej línie S/N=10).

Výtťažnosť analytov

Výtťažnosti analytov CycA, EVER, SIR a TACR boli stanovené pre tri rôzne koncentračné úrovne kalibračných štandardov v plnej krvi (viď tab. II). Výtťažnosti extrakcie boli vypočítané porovnaním plochy píkov v extrahovanej vzorke krvi s prídavkom štandardu so štandardným roztokom s rovnakou koncentráciou analytov v blankovej vzorke krvi pred extrakciou.

Optimalizácia podmienok spojenia HPLC-MS/MS

Boli porovnávané rôzne prídavky do vodnej zložky mobilnej fázy, a to: mravčan amónny, mravčan sodný, octan amónny, octan sodný v kombinácii s acetonitrilom alebo metanolom ako organickou zložkou mobilnej fázy. Selektivita bola vyhodnotená porovnaním pomeru hmotnosti a náboja protónovanej molekuly $[M+H]^+$, sodných $[M+Na]^+$ a amónnych $[M+NH_4]^+$ aduktov pre hlavné metabolity prítomné v ľudskej krvi s analytmi a izotopicky značenými štandardmi. CycA, SIR, TACR a EVER tvoria adukty s kationmi mobilnej fázy. Vzhľadom na štruktúru imunopresívnych liečiv boli v najväčšom zastúpení $[M+NH_4]^+$ ióny s relatívne nízkou stabilitou pre všetky sledované analyty a boli vybrané pre kvantifikáciu.



Obr. 5. Reprezentatívny chromatogram kalibračných štandardov extrahovaných z plnej krvi. Koncentrácie boli nasledovné: 46,4 ng ml⁻¹ pre cyklosporín A (1), 15,4 ng ml⁻¹ pre everolimus (4), 17,5 ng ml⁻¹ pre sirolimus (6) a 16,3 ng ml⁻¹ pre takrolimus (8). Koncentrácie deutérovaných štandardov boli 11,76 ng ml⁻¹ pre everolimus-d4 (3), sirolimus d-4 (5) a takrolimus d-4 (7) a 117,6 ng ml⁻¹ pre cyklosporín A d-4 (2). Podmienky: C18 analytická kolóna a predkolóna; mobilná fáza 10 mmol l⁻¹ octan amónny, pH 4,0 a acetonitril pri prietoku 0,8 ml min⁻¹

Pri použití ionizácie elektrosprejom v spojení s HPLC-MS na analýzu látok v komplexných biologických maticiach sa stretávame s vplyvom maticových efektov, ktoré môžu ovplyvňovať kvalitu ako aj kvantitu stanovenia¹². Pri tomto type analýz väčšinou dochádza k potlačeniu alebo zvýšeniu intenzity signálu oproti roztku štandardu. Preto je pri vývoji HPLC-MS metódy dôležité klásť dôraz na elimináciu maticových efektov. Jedným z najčastejších spôsobov je používanie izotopicky značeného štandardu, ktorý najlepšie spĺňa požiadavky kladené na spoľahlivosť analýzy. Niekoľko atómov je nahradených ich stabilnými izotopmi, ako sú ²H (D), ¹³C, ¹⁵N alebo ¹⁷O. Takýto vnútorný štandard má totožnú štruktúru s analytom a mali by sa počas analýzy správať rovnako a podliehať rovnakým vplyvom matrice.

Analýza vzoriek plnej krvi od pacientov

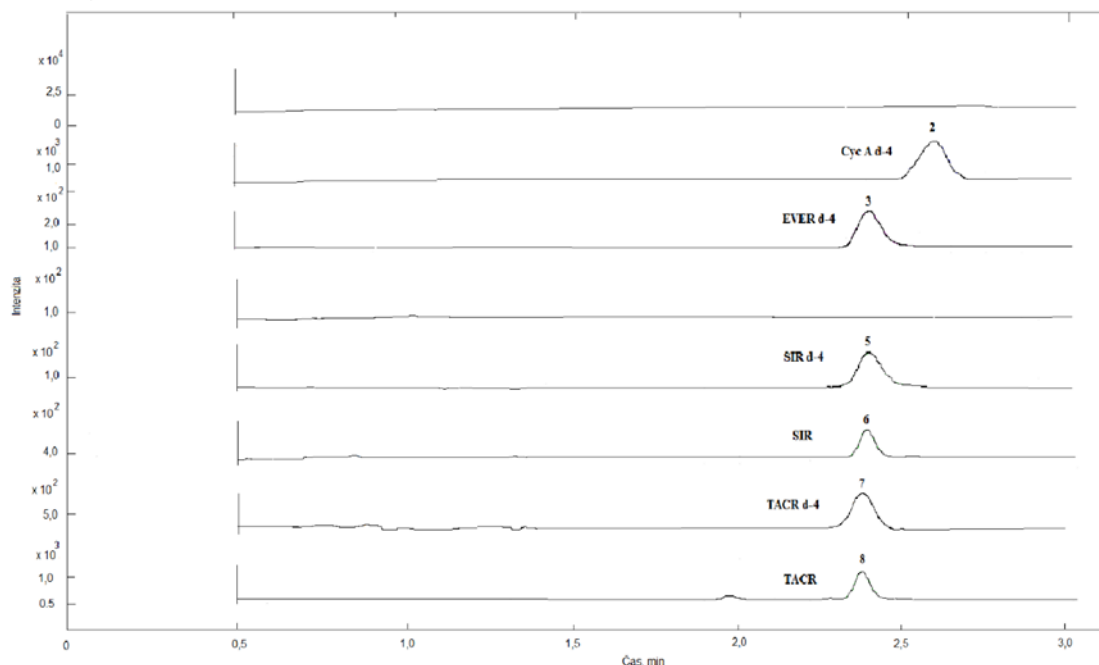
Každý pacient po transplantácii musí byť nastavený čo najvhodnejšie na imunosupresívnu liečbu, aby sa zabránilo odmietnutiu orgánu. Stanovenie u pacienta na prítomnosť imunosupresívnych liečiv sa opakuje 15 až 20× za rok, aby bola pacientovi nastavená optimálna dávka imunosupresívneho liečiva pre zabezpečenie terapeutického účinnosti a minimalizovania toxicity. Imunosupresívne liečivá majú komplementárny mechanizmus účinku a v klinickej praxi sú často kombinované, preto súčasné stanovenie týchto liečiv je veľmi potrebné pre rutinnú prax.

V prípade LC-MS/MS analýzy reálnych vzoriek od pacientov boli namerané hodnoty imunosupresívnych liečiv vždy porovnávané s kontrolnými vzorkami plnej krvi od firmy Chromsystems. Všetky namerané hodnoty koncentrácií imunosupresívnych liečiv boli v tolerančnom rozmedzí uvedenom v príbalovej informácii k uvedeným kontrolným vzorkám, čo dokazuje správne nastavenie LC-MS/MS metódy.

V predloženej štúdii, imunosupresívna liečba spočívala v podávaní TACR ($n=735$); CycA ($n=565$); SIR ($n=245$), TACR a EVER ($n=7$); TACR a SIR ($n=5$) a CycA a EVER ($n=4$). Akceptovateľné terapeutické hodnoty imunosupresívnych liečiv sú podľa autorov Garga a spol.¹³ nasledovné: CycA (50,00–400,00 ng ml⁻¹), pre TACR a SIR (5,00–20,00 ng ml⁻¹) a EVER (3,00–8,00 ng ml⁻¹). Prekročenie dávky imunosupresívneho liečiva môže mať toxický účinok pre organizmus a spôsobiť až smrť.

Dosiahnuté koncentrácie imunosupresívnych liečiv boli nasledovné: 87,79–221,24 ng ml⁻¹ pre CycA, 4,97–18,98 ng ml⁻¹ pre TACR, 4,39–18,17 ng ml⁻¹ pre SIR a 3,07–7,79 ng ml⁻¹ pre EVER. Úplná separácia analytov nebola potrebná vzhľadom na citlivý a selektívny hmotnostný detektor pracujúci v MRM režime. Celkový čas analýzy bol 5 minút.

Na obr. 5 je znázornený chromatogram kalibračných štandardov extrahovaných z plnej krvi. Retenčné časy pre jednotlivé analyty boli 2,701 min pre CycA a CycA d-4; 2,544 min pre SIR a SIR d-4; 2,542 min pre EVER a EVER d-4 a 2,501 min pre TACR a TACR d-4.



Obr. 6. Chromatogram plnej krvi od pacienta po transplantovaní obličky s podanou kombináciou imunosupresívnych liečiv takrolimusu a sirolimusu. Koncentrácie vo vzorke boli 6,25 ng ml⁻¹ pre takrolimus a 6,12 ng ml⁻¹ pre sirolimus

Na obr. 6 je chromatogram získaný z reálnej vzorky krvi pacienta po transplantácii obličiek po absolvovaní terapie s kombináciou TACR a SIR. Koncentrácie vo vzorke boli 6,25 ng ml⁻¹ pre TACR a 6,12 ng ml⁻¹ pre SIR.

Záver

Monitorovanie liečiv zohráva kľúčovú úlohu pre udržanie koncentrácií imunosupresív v úzkom terapeutickom rozsahu v krvi a v plazme, aby sa zabránilo rejekcii obličiek. Cieľom štúdie bolo vyvinúť a validovať LC/MS-MS metódu pre jej ďalšie použitie v rutínnej praxi. Metóda bola použitá na 1600 vzorkách bez zmeny selektivity a citlivosti a nebol pozorovaný pokles účinnosti kolóny alebo chvostovanie pík. V metóde sa používala jednoduchá metóda zrážania pre úpravu vzorky plnej krvi, ktorá sa javí ako spoľahlivá a použiteľná pre rutinnú klinickú prax.

LITERATÚRA

- Freudenberger K., Hilbig U., Gauglitz G.: *TrAC Trends Anal. Chem.* 79, 257 (2015).
- Mika A., Stepnowski P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127, 207 (2016).
- Sallustio B. C., Noll B. D., Morris R. G.: *Clin. Biochem.* 44, 231 (2011).
- Tszyrsznic W., Borowiec A., Pawłowska E., Jazwiec R., Zochowska D., Bartłomiejczyk I., Zegarska J., Paczek L., Dadlez M.: *J. Chromatogr. B* 928, 9 (2013).
- Meinitzer A., Gartner G., Pilz S., Stettin M.: *Ther. Drug Monit.* 32, 61 (2010).
- Taylor P. J., Tai C. T., Franklin M. E., Pillans P. I.: *Clin. Biochem.* 44, 14 (2011).
- Adaway J. E., Keevil B. G.: *J. Chromatogr. B* 883–884, 33 (2012).
- Marinova M., Artusi C. A., Brugnolo L., Antonelli G., Zaninotto M., Plebani M.: *Clin. Biochem.* 46, 1723 (2013).
- Buchwald A., Winkler K., Epting T.: *Clin. Pharmacol.* 12, 2 (2012).
- van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S., Smolders I., Michotte Y.: *J. Chromatogr. B* 877, 2198 (2009).
- Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M.: *Anal. Chem.* 75, 3019 (2003).
- FDA. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, (2001). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM07107.pdf>, stiahnuté 11. 5. 2020.
- Garg U., Munar A., Frazee C. C.: *Methods Mol. Biol.* 902, 167 (2012).

M. Valachovičová^a, J. Příbojová^a, and C. Mišľanová^{ab}
^aFaculty of Nursing and Professional Health Studies, Slovak Medical University in Bratislava, ^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava): **The Determination of Immunosuppressive Drugs by LC/MS-MS**

In Slovakia, approximately 200 kidneys are transplanted annually. Each patient-recipient must be adjusted to the most appropriate immunosuppressive treatment to eliminate renal rejection. The high-performance liquid chromatography connected to tandem mass spectrometry was validated for the determination of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in the whole blood. For the determination, C18 analytical column with a gradient of 10 mmol/L ammonium acetate, pH 4.0 and acetonitrile was used. A simple protein precipitation with zinc sulphate: methanol was used for the pretreatment of whole blood. The method provides reliable and reproducible results and it can be introduced to routine clinical practice.

Keywords: LC-MS/MS, immunosuppressive drugs, cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, everolimus