

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR LABORATORINĖS MEDICINOS
KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

SIROLIMO IR TAKROLIMO KONCENTRACIJOS PACIENTŲ
KRAUJYJE PO INKSTŲ TRANSPLANTACIJOS NUSTATYMAS
DIDELIO EFEKTYVUMO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS
METODU

Magistrantė GIEDRĖ MISEVIČIENĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas

asist. Dalius Vitkus

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab. dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama gintis

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

TURINYS

1. Santrumpos	4
2. Įvadas	6
3. Tikslai ir uždaviniai	6
4. Literatūros apžvalga.....	7
4.1. Transplantacija.....	7
4.1.1. Transplantacijos istorija pasaulyje.....	7
4.1.2. Transplantacijos tipai	7
4.1.3. Transplantato atmetimo mechanizmas.....	8
4.2. Imunosupresija. Imunosupresiniai preparatai.....	9
4.2.1. Ciklosporinas ir takrolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis	9
4.2.2. Mikofenolinė rūgštis: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis	11
4.2.3. Sirolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis....	13
4.2.4. Everolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis.	15
4.3. Terapinė vaistų kontrolė	16
4.4. Sirolimo ir takrolimo koncentracijos nustatymo kraujyje metodai	18
4.4.1. Imuniniai metodai	18
4.4.2. Chromatografija: atskyrimo mechanizmas ir analičių detekcijos galimybės	20
4.4.3. Sirolimo ir takrolimo koncentracijų nustatymo metodų palyginimas	25
4.4.4. HPLC–MS taikymas sirolimo ir takrolimo koncentracijų nustatymui	26
5. Eksperimentinė dalis.....	28
5.1. Medžiagos ir tirpalai.....	28
5.2. Analizinė įranga.....	28
5.3. Rezultatų apdorojimas	29
5.4. Standartinių tirpalų ruošimas.....	29
5.5. Kraujo ekstrakcijos procedūra	30
6. Rezultatai ir jų aptarimas	31
6.1. Eliuavimo tipas: izokratinis ar gradientinis	32
6.2. Polinio tirpiklio – bidistiliuoto vandens parūgštinimas.....	36
6.3. Analizės tiesiškumo tyrimas ir paciento kraujo ekstrakto su žinoma sirolimo koncentracija analizė	40

6.4. Nėpolinio tirpiklio – metanolio hidrofobiškumo didinimas	45
6.5. Nėpolinio tirpiklio keitimas: iš metanolio į acetonitrilą.....	50
7. Išvados	51
8. Summary	52
9. Literatūros sąrašas.....	53

1. SANTRUMPOS

MHC – didysis audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*)

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenai (angl. *HLA – human leukocyte antigen*)

TCR – T limfocitų receptorius (angl. *T cell receptor*)

APL – antigeną pateikianti ląstelė (angl. *antigen presenting cell*)

CD – diferenciacijos grupė (angl. *cluster of differentiation*)

CsA – ciklosporinas A

FK-506 – takrolimas

FKBP-12 – takrolimą prijungiantis baltymas (angl. *FK-506 binding protein*)

NF-AT – aktyvuotų T ląstelių branduolių veiksnys (angl. *nuclear factor of activated T cells*)

IL – interleukinas

APLC – nuo antikūnų priklausoma ląstelių citotoksinė reakcija

TGFβ – transformuojantis augimo faktorius β (angl. *transforming growth factor β*)

TIMP-1 – metaloproteinazių audinių slopiklis-1 (angl. *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*)

MMF – mikofenoliato mofetilas

MPA – mikofenolinė rūgštis

IMP-DH – inozino monofosfato dehidrogenazė

mTOR – angl. *mammalian target of rapamycin*

MEIA – mikrodalelių fermentinė imunoanalizė (angl. *microparticle enzyme immunoassay*)

CEDIA – klonuoto fermento donoro imunoanalizė (angl. *cloned enzyme donor immunoassay*)

FPIA – fluorescencinės poliarizacijos imunoanalizė (angl. *fluorescence polarization immunoassay*)

EIA – imunofermentinė analizė (angl. *enzyme immunoassay*)

IBA – imunofilino prijungimo analizė (angl. *immunophilin-binding assay*)

RRA – radioreceptoriaus analizė (angl. *radioreceptor assay*)

ELISA – angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMIT – angl. *enzyme-multiplied immunoassay technique*

LC-MS – skysčių chromatografija su masių spektrometrija (angl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

t_R – sulaikymo trukmė (angl. *retention time*)

HETP – aukštis, lygiavertis teorinei lėkštelei (angl. *Height Equivalent to a Theoretical Plate*)

HPLC – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (angl. *high – performance liquid chromatography*)

ESI – elektros srauto jonizacija (angl. *electrospray ionization*)

APCI – atmosferos slėgio cheminė jonizacija (angl. *atmospheric pressure chemical ionization*)

cps – impulsų skaičius per sekundę (angl. *counts per second*)

THF – tetrahidrofuranas

2. ĮVADAS

Šiandien organų transplantacija yra rutininė klinikinė procedūra. Pagrindinė jos kliūtis – organų atmetimas, kuris vyksta dėl ląstelinio ir humoralinio imuninio atsako recipiento organizme, sukeliama specifinių donoro antigenų.

Vienas iš galimų šios problemos sprendimo būdų – imunosupresija. Tai yra imuninės sistemos slopinimas specialiais vaistais (imunosupresantais), antikūnais ir metabolizmo toksiniais. Tokia terapija pacientams privalo būti taikoma visą likusį gyvenimą. Dėl individualios farmakokinetikos ir farmakodinamikos turi būti nuolat sekama imunosupresantų koncentracija kraujyje, nes per maža gali būti neveiksminga ir neapsaugoti nuo organo atmetimo reakcijos, o per didelė gali būti toksiška ir sukelti įvairius šalutinius efektus. Nors rutininėje praktikoje terapinę imunitetą slopinančių vaistų kontrolė dažniau atliekama naudojant imuninius metodus, tačiau daug jautresnis bei specifiškesnis yra aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodas.

3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas: ištirti chromatografinės analizės sąlygas sirolimui ir takrolimui nustatyti HPLC-MS/MS metodu.

Uždaviniai:

1. Parinkti optimalų eliuavimo būdą.
2. Ištirti polinio eliuento protonizacijos įtaką analizės kokybei.
3. Ištirti analizės tiesiškumą.
4. Ištirti analizės kokybę, pakeitus polinio tirpiklio hidrofobiškumą.
5. Išbandyti acetonitrilą kaip nepolinį eliuentą.

4. LITERATŪROS APŽVALGA

4.1. Transplantacija

4.1.1. Transplantacijos istorija pasaulyje

Transplantacija – ląstelių, audinių ar organų, vadinamų transplantatais, perkėlimas iš vieno individo (donoro) kitam (recipientui).

Pirmosios žinios apie šią procedūrą pasiekia mus iš VIII a. pr.Kr. Tada Indijoje *Koomas* kastos puodžiai atvaizdavo savo dirbiniuose, kaip chirurgas Sustrata sukuria ir prisiūna pacientams naujas nosis iš odos lopinėlių. Po maždaug tūkstančio metų (IIa.) transplantacija buvo atliekama terapiniais tikslais Kinijoje, kai nesveikas vidaus organas buvo pakeistas sveiku. Tačiau nenurodoma, kokie buvo šių ir kitų iki XVIII a. atliktų operacijų rezultatai.

1749 m. gamtininkas ir fiziologas iš Prancūzijos Henri-Louis Duhamel du Monceau sėkmingai persodino organizmo dalis iš vienu gyvūnų kitiems. Po šio eksperimento sekė dar keli panašūs, o XIX a. atliktos pirmosios odos, raumenų, kaulų, akies ragenos persodinimo operacijos žmogui. XIX a. pabaigoje sukurti organų ir audinių konservavimo tirpalai leido toliau eksperimentuoti su gyvūnais ir ieškoti būdų, kai būtų galima pagelbėti žmonėms.

1954 m. JAV atlikta pirmoji sėkminga inksto transplantacija iš vieno identiško dvynio brolio kitam. Šis inkstas funkcionavo 8 metus. 1962 m. pirmą kartą persodintas negyvo donoro inkstas, kuris recipiento organizme funkcionavo 21 mėnesį. 1967 m. – pirmoji sėkminga kepenų persodinimo operacija, kurios rezultatas – 13 mėnesių funkcionuojančios kepenys, ir pirmoji širdies transplantacija Pietų Afrikos Respublikoje. Pastaroji laikoma sėkminga, nors persodinta širdis funkcionavo tik 18 dienų.

Naują puslapį transplantacijos istorijoje atvertė 1969 m. atrastas ciklosporinas, sintetinamas grybų. Įrodytos jo imunosupresinės savybės, susintetintas laboratorijoje ir 1983 m. lapkričio mėnesį atsirado prekyboje [1].

Lietuvoje pirmoji inkstų transplantacija atlikta Vilniuje 1970 m. vasario mėnesį, o pirmoji širdies transplantacija – 1987 m. Jas atliko profesorius A.Marcinkevičius.

4.1.2. Transplantacijos tipai

Priklausomai nuo donoro ir recipiento audinių antigeninių skirtumų, galimos transplantacijos formos:

- autologinė: donoras ir recipientas yra tas pats individas (pavyzdžiui, odos, poodžio ar raumenų transplantacija). Imuninis audinių atitikimas yra identiškas;
- izogeninė (arba singeninė): donoras ir recipientas yra genetiškai identiški (dvyniai). Imuninis audinių atitikimas yra identiškas;
- alogeninė: donoras ir recipientas yra tos pačios rūšies, bet genetiškai skirtingi individai. Imuninis audinių atitikimas yra dalinis;
- ksenogeninė: donoras ir recipientas priklauso skirtingoms rūšims. Imuninis audinių atitikimas yra minimalus.

Dar skiriami:

- ortotopinis organo persodinimas – tai donoro organo persodinimas į pašalintą ligonio organo vietą;
- heterotopinis organo persodinimas – kai persodinamas į kitą vietą [2].

4.1.3. Transplantato atmetimo mechanizmai

Labiausiai paplitusi alogeninė transplantacija: inkstų, širdies, kepenų, ragenos. Viena pagrindinių jos kliūčių – recipiento imuninis atsakas į persodintą audinį, dėl kurio yra galimas transplantato atmetimas.

MHC molekulės (didysis audinių suderinamumo kompleksas; žmogaus organizme jos dar vadinamos ŽLA molekulėmis) pateikia svetimų baltyminių antigenų peptidus T limfocitams tokia forma, kad šie sugeba juos atpažinti, ir taip inicijuojamas specifinis imuninis atsakas į šiuos antigenus. Daugelis T limfocitų per savo receptorių TCR, kurių kiekvienas yra specifiškas skirtingam svetimam peptidui, sujungtam su nuosavom MHC molekulėm, kryžmiškai reaguoja su alogeninėmis MHC molekulėmis. Kryžmiškai reaguojantieji TCR atpažįsta:

- peptidus, asocijuotus su alogeninėmis MHC molekulėmis;
- determinantes, kurias sudaro MHC molekulės dalies ir sujungto peptido aminorūgščių liekanos.

Alogeninės MHC molekulės pateikiamos recipiento T limfocitams dviem būdais:

- tiesioginiu: intaktinių MHC molekulių donoro antigeną pateikiančių ląstelių membranose atpažinimas recipiento T limfocitais;

- netiesioginiu: donoro MHC baltymai patenka į recipiento antigeną pateikiančias ląsteles (APL), ten vyksta jų skaidymas, imunogeniniai peptidai sujungiami su recipiento molekulėmis ir pateikiami T limfocitams.

Transplantato atmetimo mechanizmai:

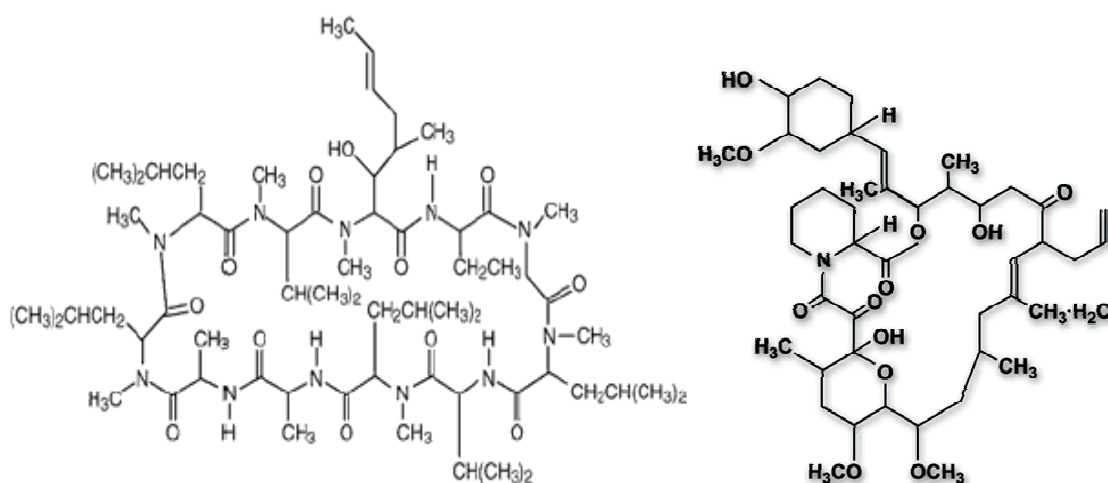
- aloreaktyvūs CD8⁺T efektoriai (citotoksiniai T limfocitai – CTL) tiesiogiai lizuoja transplantato endotelio ir parenchimos ląsteles;
- aloreaktyvūs CD4⁺T efektoriai transplantate sutelkia ir aktyvina makrofagus, sukeldami transplantato pažeidimą pagal lėtą padidėjusio jautrumo reakciją;
- aloantikūnai jungiasi prie endotelio ląstelių, aktyvina komplementą ir sukelia transplantato kraujagyslių pažeidimus.

Skiriami tokie transplantato atmetimo tipai:

- žaibiškas (hiperūmus) įvyksta dėl greitos transplantato kraujagyslių trombozės, kuri prasideda, sujungus šeimininko ir transplantato kraujagysles;
- ūminio metu imuninės reakcijos pažeidžia transplantato kraujagyslių endotelio ir parenchimos ląsteles (histologiškai matomas vaskulito vaizdas);
- lėtinis įvyksta dėl fibrozės ir normalios persodinto organo struktūros praradimo [2].

4.2. Imunosupresija. Imunosupresiniai preparatai

4.2.1. Ciklosporinas ir takrolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis



1 pav. Ciklosporinas ir takrolimas.

Ciklosporinas A (CsA) (1 pav., kairėje) yra lipofilinis ciklinis undekapeptidas, išskiriamas iš grybų *Tolypocladium inflatum gams*. Takrolimas (FK-506) (1 pav., dešinėje) – makromolekulinis junginys, sintetinamas *Streptomyces Tsukubaensis*. Tai imunitetą slopinantys vaistai, naudojami mažinti atmetimo reakcijai po organų persodinimo operacijų: ciklosporinas atrastas 1969 m., o takrolimas – 1987 m. Ciklosporinas padidina tikimybę išgyventi 3 metus po širdies persodinimo operacijos nuo 40% iki 70% [3][4].

Ciklosporinas ir takrolimas difunduoja į T ląstelę, citoplazmoje jungiasi prie imunofilino (cis-trans izomerazė): ciklosporinas – prie ciklofilino, takrolimas – prie FKBP 12. Vaisto-imunofilino kompleksas jungiasi prie kalcineurino (fosfatazė, kurios funkcija – defosforilinti aktyvuotų T ląstelių branduolių veiksnį NF-AT). Defosforilintas NF-AT būtų perkeliamas į branduolį ir ten aktyvuotų IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-2 bei IL-7 receptorių koduojančių genų promotorius. Esant ciklosporinui arba takrolimui citozolyje, NF-AT nepatenka į branduolį, nėra indukuojama šių genų transkripcija. Todėl T limfocitai neproliferuoja, nesintetina citokinių, aktyvuojančių makrofagus. Takrolimas *in vitro* slopina B limfocitų aktyvaciją. NK ląstelių funkcija ir nuo antikūnų priklausoma ląstelių citotoksinė reakcija (APLC) nėra slopinamos takrolimo bei ciklosporino [5].

Po inkstų transplantacijos takrolimas pirmą kartą taikytas imunitetui slopinti 1989m. Įrodyta, kad efektyvu skirti takrolimą pacientams, kuriems būdinga steroidų terapijai atspari atmetimo reakcija. Yra siūloma takrolimo terapiją taikyti atopiniam dermatitui gydyti [6]. Nors išgyvenamumas po transplantacijos praėjus trimis metams vartojant ir ciklosporiną, ir takrolimą buvo vienodas, tačiau takrolimas labiau sumažino organo atmetimo riziką [5].

Ciklosporinas ir takrolimas metabolizuojami kepenų ląstelių mikrosomose citochromo P-450 sistemos [3] [4]. Nustatyti apie 15 takrolimo ir daugiau nei 30 ciklosporino metabolitų. Kai kurie iš jų yra biologiškai aktyvūs bei gali būti toksiški [7].

Šių vaistų terapinis intervalas yra siauras; koncentracija virš šio intervalo yra toksiška. Ciklosporino terapinė koncentracija yra 100 – 350 ng/ml. Pageidaujama takrolimo terapinė koncentracija kraujyje: iškart po transplantacijos 10 – 15 ng/ml, praėjus dviems metams po transplantacijos 5 – 10 ng/ml [3][4].

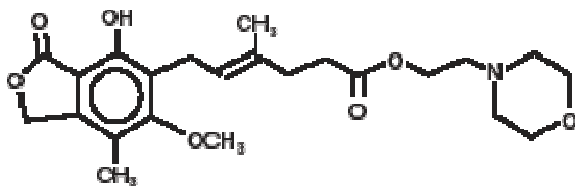
Abu šie preparatai pasižymi nefrotoksiškumu, tačiau ciklosporinas daug stipresniu. Kol kas dar nevisai aiškiu mechanizmu yra pažeidžiamos smulkiosios inkstų kraujagyslės. Tyrimai su gyvūnais parodė, kad takrolimas mažina TGF β ir TIMP-1 genų ekspresiją, o ciklosporinas didina trečio tipo kolageno ir mažina matrikso metaloproteinazių 2 ir 9 genų ekspresiją [8]. Takrolimas be to dar yra neurotoksiškas bei gali sukelti kardiomiopatijas, anemiją, chronišką diarėją, diabetą, alergijas ir limfoproliferacines ligas. Ciklosporinui

būdingas šalutinis poveikis – hipercholesterolemija, hipertenzija (nustatyta, kad vartojant takrolimą, hipertenzija atsiranda vėliau [9]), dantenu hiperplazija ir hirsutizmas [5], konvulsijos, tremorai, plaučių edema, padidėjusi limfomos rizika [5].

2001 m. VUL Santariškių klinikos kartu su Valstybiniu patologijos centru atliko ciklosporino nefrotoksiškumą tiriančią studiją, kurios metu buvo išanalizuota 30 pacientų po inkstų transplantacijos būklė. Tirti recipientai, kuriems prieš atliekant inkstų biopsiją buvo nustatyta ciklosporino koncentracija kraujyje. 17 tirtųjų biopstatų buvo nustatyta CsA sukeltų pažeidimų, likusiems – ne. Nustatyta koreliacija tarp transplantato biopstate rastų CsA nefrotoksiškumui būdingų požymių ir didesnių nei 200 ng/ml CsA kiekio recipiento kraujyje [10].

Atliekant ciklosporino terapinę kontrolę, kartu reikia sekti vaistų, sąveikaujančių su juo ir didinančių jo toksiškumą, koncentraciją. Tai yra tokie vaistai, kurie vartojami kartu su ciklosporinu slopinti imunitetui arba veikia kepenų metabolizmą [3]. Pavyzdžiui, fenobarbitalis, fenitoinas, rifampinas, karbamazepinas aktyvuoja citochromo P-450 fermentus, todėl mažėja ciklosporino koncentracija, o kai kurie antibiotikai (eritromicinas, klatrimicinas ir kt.) slopina citochromo P-450 sistemą, todėl ciklosporino koncentracija kraujyje išauga [4].

4.2.2. Mikofenolinė rūgštis: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis



2 pav. Mikofenoliato mofetilas.

Mikofenoliato mofetilas (MMF) (2 pav.) – efektyvus imunitetą slopinantis vaistas. Mikofenolinė rūgštis išskirta iš *Penicillium spp.* kultūros 1913 m. 1940 m. parodytos šios medžiagos antibakterinės ir antigrybinės savybės, 1968 m. – antivėžinės. Maždaug tuo metu buvo numanomos ir imunosupresinės savybės, tačiau tyrimai su pelėmis neleido to įrodyti, nes pelės pasižymi ypač greita mikofenolinės rūgšties apykaita. Vėliau buvo sukurtas esterinis provaistis – MMF, kuris oficialiai pradėtas taikyti paskutiniaisiais XX a. metais [3][4].

Po absorbcijos plazmoje, kepenyse ir inkstuose MMF yra hidrolizuojamas esterazių iki aktyvios formos – mikofenoliato (MPA). MPA metabolizuoja uridino difosfato gliukuroniltransferazės, kurios yra labai svarbios MPA detoksikacijai [11]. Didžioji susidariusio gliukuronido dalis yra sekretuojama į tulžį, kur vėl paverčiama į aktyvų MPA ir gražinama į kepenis, likusi pašalinama su šlapimu.

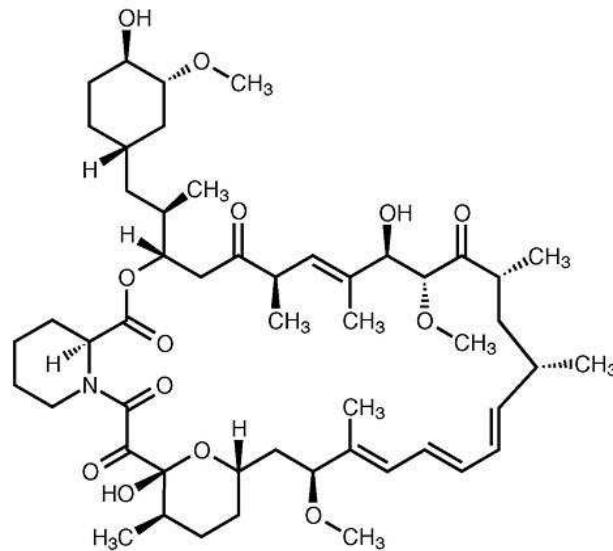
MPA yra mažai toksiškas, gali būti vartojamas profilaktiškai. Dažnai vartojamas kartu su ciklosporinu (arba takrolimu) ir steroidais: tokiu atveju reikia mažesnės šių imunosupresantų koncentracijos, o tai reiškia mažesnę šalutinio poveikio riziką.

MPA yra selektyvus grįžtamasis nekonkurentinis inozino monofosfato dehidrogenazės (IMP-DH) slopiklis. IMP-DH yra svarbiausias fermentas guanino nukleotidų sintezei *de novo*. MPA turi kelis specifiškumo laipsnius IMP-DH izoformoms, randamoms T ir B limfocituose. Proliferuojančiuose limfocituose šis purinų sintezės būdas yra vienintelis. Esant MPA slopinama DNR replikacija bei T ir B ląstelių proliferacija, kurią sukeltų atsakas į mitogeninę ar alospecifinę stimuliaciją. Taip pat nevyksta fibroblastų, endotelio ląstelių ir arterijų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija. *In vitro* parodyta, kad MPA slopina ląstelių glikoproteinų manozilinimą bei fukozilinimą. Tai sumažina leukocitų bei monocitų susitelkimą ir jungimąsi prie endotelio uždegimo ir transplantų atmetimo metu [3][4].

Yra nustatyta aiški koreliacija tarp transplantato atmetimo ir per mažos MPA koncentracijos kraujyje. Pastebėti šie nepageidaujami reiškiniai: virškinamojo trakto pažeidimai, leukopenija ir oportunistinės infekcijos. Mielotoksiškumo mechanizmas dar nėra supastas, nes MPA, selektyviai slopindamas purinų sintezę *de novo*, veikia tik proliferuojančius limfocitus. Dažnai pasitaiko diarėja, vėmimas [5].

Siūloma MMF terapinė koncentracija 25 – 50 ng/ml [3] [4].

4.2.3. Sirolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis



3 pav. Sirolimas.

Sirolimas (rapamicinas, rapamunas) (3 pav.) – makrociklinis laktonas, produkuojamas *Streptomyces hygroscopicus*. Atrastas XX a. 8-ame dešimtmetyje kaip priešgrybinis agentas, tačiau nebuvo taikomas kaip antibiotikas dėl jo imunosupresinių savybių. Pastebėjus, kad sirolimo struktūra labai panaši į takrolimo struktūrą, pradėta tyrinėti sirolimo imunosupresinį veikimą eksperimentinėse transplantacijose ir nuo 1999 m. sirolimas pradėtas taikyti oficialioje praktikoje. Manoma, kad jis veikia sinergiškai kartu su ciklosporinu arba takrolimu [4].

Ląstelėje sirolimas jungiasi su imunofilinu FKBP 12. Susidaręs kompleksas neveikia kalcineurino, tačiau jungiasi prie mTOR – svabios reguliacinės serino-treonino kinazės ir slopina ją. mTOR fosforilina baltymus, kurie dalyvauja signalo perdavime iš augimo faktoriaus receptorių į branduolį ir yra svarbūs ląstelės augimo ciklo reguliacijai. Sirolimo-FKBP 12 komplekso jungimasis prie mTOR, todėl neaktyvuojama specialių iRNR transliacija, nuo ciklinų priklausomos kinazės, reikalingos koordinuotai DNR sintezei, bei slopinama specialių ribosominių baltymų sintezė. Tai slopina citokinų (pvz.: IL-2) sukiamą T ląstelių aktyvaciją ir proliferaciją, antikūnų produkciją ir stabdo ląstelių augimo ciklą nuo G1 iki S fazės [12]. Be to sirolimas inhibuoja šiuos ciklosporinui atsparius procesus: imunoglobulinų sintezę B limfocituose, APLC ir NK ląstelių funkciją [5].

Neseniai nustatyta, kad mTOR dalyvauja ląstelės apoptozės reguliacijoje. Todėl sirolimas gali būti vartojamas vėžiui gydyti: jei auglio ląstelės nėra sirolimui atsparios, t.y.

nesintetina antiapoptotinių baltymų, sirolimo blokuojama mTOR ne tik slopintų vėžinių ląstelių augimo ciklą, bet ir indukuotų jų apoptozę [13]. Eksperimentai *in vitro* parodė, kad sirolimas slopina hepatoceliulinės karcinomos ląstelių augimą sukeldamas apoptozę, kurią patvirtino pakitusi šių ląstelių morfologija. Nustatyta, kad taip vyksta dėl to, kad šis preparatas aktyvuoja kaspazę-3 ir pažeidžia mitochondrijų membraninį potencialą. Be to, sirolimas slopina antiapoptotinio baltymo Bcl-2 ir aktyvino apoptotinio baltymo Bcl-xl poveikį [14]. Dėl savo priešvėžinių savybių sirolimas galėtų būti vartojamas pacientų, kuriems kepenų transplantacija atlikta dėl hepatoceliulinės karcinomos [13], arba tais atvejais, kai po hepatoceliulinės karcinomos gydymo yra likę vėžinių ląstelių [14].

Sirolimas slopina aortos lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir migraciją. Tai procesai, kurie po širdies transplantacijos sukelia aterosklerotinių plokštelių formavimąsi ir kraujagyslių susiaurėjimą [15].

Sirolimą metabolizuoja citochromo P-450 sistema ir P-glikoproteinas (ilgas membraninis baltymas žarnyno epitelio ląstelių sienelėje, kuris veikia kaip vaistų pompa, dažniausiai pašalindamas vaistus iš ląstelės) [12]. Daugiausiai kepenyse vyksta sirolimo *O*-demetilimas ir hidroksilinimas. Nustatyta apie 10 galimų jo metabolitų. Daugiau nei 90% patekusio į organizmą sirolimo nemetabolizuojama, o kraujyje randamas aktyvios formos [13]. Kadangi šis preparatas yra labai mažai tirpus, apie 95% viso jo kraujyje esančio kiekio randama eritrocituose. Manoma, kad sirolimo metabolitų imunitetą slopinantis aktyvumas atitinka tik 10% paties sirolimo aktyvumo [16].

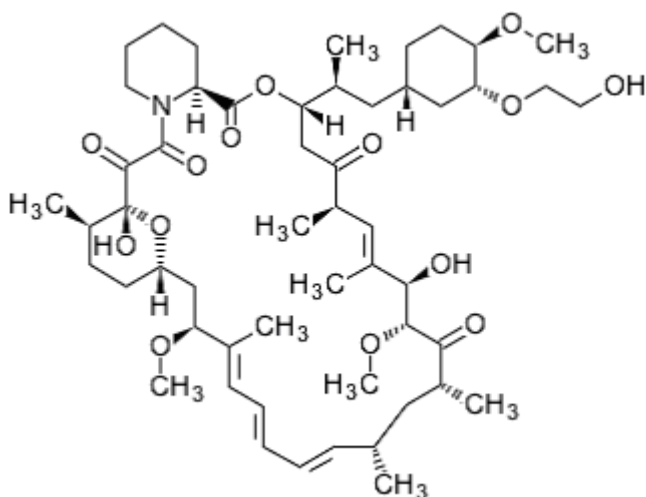
Sirolimo terapinis intervalas 5 – 15 ng/ml [4]. Pastebėta, kad koncentracija kraujyje daugiau nei 15 ng/ml yra toksiška [17]. Galimi šalutiniai poveikiai yra šie: galvos skausmas, pykinimas, vėmimas, gliukozės koncentracijos pokyčiai kraujyje, padidėjusi infekcijų rizika, trombocitopenija ir leukocitopenija. Pastarieji du yra siejami su trumpalaikiu sirolimo vartojimu. Su ilgalaikiu sirolimo vartojimu yra siejama hipertrigliceridemija [5]. Taip pat nurodoma, kad gali atsirasti anemija, hipokalemija, hipertenzija, bėrimas, nusilpusi kepenų funkcija [18]. Tyrimai su gyvūnais (žiurkėmis, šunimis, beždžionėmis) parodė ir kitų nepageidaujamų reiškinių: tai – miokardo infarktai, hipermagnezemia, smulkiųjų kraujagyslių pažeidimai, virškinamojo trakto intoksikacija. [5]

Pasaulinė sirolimo vartojimo patirtis parodė, kad jis sumažino transplantato atmetimo per 6 mėn. po operacijos riziką. Skirtingai nei ciklosporinas sirolimas nesukėlė inkstų pažeidimo. Buvo tirta sirolimo bei kitų imunosupresantų sąveika: nustatyta, kad sirolimas sinergistiškai veikia kartu su ciklosporinu ir kortikosteroidais. Skiriant šiuos

preparatus tinkamu santykiu, galima pasiekti norimą efektą ir sumažinti CsA bei kortikosteroidų šalutinio poveikio riziką [18].

2005 m. VUL Santariškių klinikų Nefrologijos ir urologijos centras atliko tyrimą, kurio tikslas – įvertinti sirolimo efektyvumą gydant pacientus po inkstų transplantacijos ir palyginti jų būklę su ciklosporiną vartojusių pacientų būkle. Nuo 2002 m. iki 2005 m. sirolimu gydyti 26 pacientai: pusei jų sirolimas buvo skirtas iškart po operacijos, likusiems – po vidutiniškai 18 mėn. Nustatyta, kad ūminės inksto atmetimo reakcijos per pirmus tris mėnesius yra retesnės pirmojoje grupėje. Nepastebėta jokio nefrotoksiškumo požymių. Todėl teigiama, kad ciklosporino nepageidaujamo poveikio eliminavimui galima skirti pakaitinę sirolimo terapiją [19].

4.2.4. Everolimas: vartojimo patirtis, veikimo mechanizmas ir šalutinis poveikis



4 pav. Everolimas.

Sirolimo analogas everolimas [40-*O*-(2-hidroksietil)-rapamicinas] (4 pav.) dar mažai taikomas terapijoje. Everolimo ir sirolimo veikimo mechanizmas yra toks pat. Everolimas poliškesnis už sirolimą [20], todėl ne taip plačiai pasiskirsto audiniuose, nesiimplantuoja kraujagyslių intimoje, todėl imunosupresiniam efektui pasiekti reikia mažesnės koncentracijos.

Kitas everolimo privalumas lyginant su sirolimu yra jo antiproliferacinis poveikis kraujagyslių endoteliui bei transplantato lygiesiems raumenims. Buvo atlikta tyrimų, kurie parodė, kad everolimas pacientams po širdies transplantacijų sumažino vaskulopatijų atsiradimą arba kraujagyslės intima buvo daug mažiau išvešėjusi nei pacientų, vartojusių

kitus imunosupresinius preparatus. Be to, sumažėjo citomegaloviruso infekcijų dažnis. Kitų infekcijų dažnis svyravo priklausomai nuo paskirtos everolimo koncentracijos: esant didelei everolimo koncentracijai (3 ng/ml) infekcijų dažnis buvo didesnis, nei vartojusių kitus preparatus. Todėl everolimas gali būti taikomas norint išvengti vėlyvo transplantato atmetimo ar net recipiento mirties, kuriuos sukelia vaskulopatijos [21].

Siūloma everolimą taikyti ne tik potransplantaciniams pacientams, bet ir sergantiems koronarų ligomis intimos hiperplazijos prevencijai. Buvo sukurti ir išbandyti su gyvūnais bei žmonėmis everolimu padengti biodegraduojamo polimero stentai. Gauti daug žadantys rezultatai, liudijantys šio metodo saugumą, tinkamumą ir efektyvumą slopinant intimos proliferaciją [20].

4.3. Terapinė vaistų kontrolė

Terapinė vaistų kontrolė pradėta taikyti apie 1970 m. sekant epilepsija sergančių asmenų fenitoino koncentraciją kraujyje. Skiriama preparato dozė tapo parenkama nebe pagal paciento kūno masę, o pagal koncentraciją kraujyje.

Terapinė vaisto kontrolė yra paremta šiomis disciplinomis: farmakokinetika, farmakodinamika, chemine analize. Uždaviniai:

- apibrėžti problemą;
- tinkamai paimti ėminį;
- pasirinkti geriausią analizės metodą;
- standartizuoti analizę;
- paruošti mėginį;
- kompetetingai atlikti analizę;
- gebėti interpretuoti rezultatus.

Nors terapinė vaistų kontrolė atliekama gana seniai, yra likę neišspręstų problemų. Visų pirma tai – labai tikslių ir atrankių analizės metodų sukūrimas ir tobulinimas. Antra – vaisto metabolitai: reikia metodų, galinčių juos atskirti nuo bendro analizės rezultato, bei sugebėti tinkamai interpretuoti metabolitų koncentracijas vaisto koncentracijos kontekste. Ateityje tyrimai turėtų būti nukreipti į tai, kad būtų išaiškintas vaisto metabolitų vaidmuo organizme: ar jie toksiški, ar veikia analogiškai vaistui, ar pasižymi kitokiu biologiniu veikimu, ar tiesiog tapę tirpiaisiais šalinami iš organizmo. Trečioji problema –

farmakodinamika. Yra nemažai vaistų, kurių poveikis mažai susijęs su jų koncentracija organizmo skysčiuose, todėl reikia kitų terapinės vaisto kontrolės metodų [22].

Daugeliui vaistų yra nustatytas ryšys tarp vaisto poveikio ir jo koncentracijos plazmoje. Tam, kad būtų pasiektas norimas poveikis, turi būti tam tikra vaisto koncentracija toje vietoje, kurioje jo molekulė sąveikauja su receptoriais (ląstelės membrana ar kita ląstelės dalimi). Žinoma, kad vaistų jų efektyvumą geriau atspindi jų koncentracija kraujo plazmoje nei suvartota dozė. Vaistai būna perdozuojami arba jų skiriama nepakankamai. Dėl šių priežasčių yra atliekama terapinė vaistų koncentracijos kontrolė.

Svarbiausi atrankos kriterijai vaistų koncentracijai kraujyje nustatyti:

- stiprus toksiškumas;
- siauras terapinis intervalas;
- ilgalaikis gydymas;
- dideli individualūs farmakokinetikos skirtumai.

Tyrimo svarba:

- galimas perdozavimas;
- nepakankamas terapinis poveikis;
- galima vaistų tarpusavio sąveika;
- didelė farmakokinetikos įvairovė tarp individų;
- stiprus pašalinis poveikis [23].

Nustatant ir interpretuojant vaistų koncentracijos tyrimo rezultatus, svarbu žinoti konkretaus preparato farmakokinetiką. Farmakokinetika kiekybiškai aprašo vaisto kelią organizmo viduje. Vaisto koncentracijos pokytį laike įvertina LADME sistema:

- L (angl. *liberation*) – vaisto atpalaidavimas iš dozės formos;
- A (angl. *absorption*) – absorbcija – vaisto molekulės patekimas į apytakos sistemą;
- D (angl. *distribution*) – pasiskirstymas organizmo skysčiuose;
- M (angl. *metabolism*) – metabolizmas;
- E (angl. *elimination*) – šalinimas.

Pradinės vaisto apykaitos organizme metu vyrauja absorbcija ir pasiskirstymas po įvairius organizmo kompartmentus. Šios fazės metu vaisto koncentracija serume ir audiniuose greitai kinta ir ji nekoreliuoja su koncentracija vaisto veikimo vietoje. O pusiausvyros stadijoje vyrauja eliminacijos procesai. Šios fazės metu vaisto koncentracija kraujo serume pakankamai gerai atspindi koncentraciją veikimo vietoje. Pusiausvyros

būseną paprastai pasiekama vartojant tą pačią dozę ilgiau nei 5 pusinės eliminacijos periodai.

Daugeliui vaistų būdinga tiesinė kinetika. Tai reiškia, kad kiekvieną kartą tam tikras vaistinės medžiagos kiekis yra eliminuojamas iš organizmo per tam tikrą laiką. Vaisto koncentracija kraujyje taip pat kinta tiesiškai. Kai kuriems vaistams būdinga netiesinė kinetika. Per laiko vienetą tik tam tikras pastovus vaisto kiekis yra eliminuojamas nepriklausomai nuo jo koncentracijos kraujyje ir vaisto koncentracija kinta netiesiškai. Didėjant dozei, pusinės eliminacijos laikas ilgėja. Michaelio-Menten kinetika: vaisto produktyvumas priklauso nuo jį metabolizuojančių fermentų kinetinių savybių arba aktyvaus transporto sistemų.

Neužtenka nustatyti vaisto koncentraciją kraujyje ar plazmoje, kad būtų galima tiksliai įvertinti vaisto efektyvumą. Daug sudėtingesnis uždavinys yra farmakodinaminė kontrolė: tiesiogiai tiriamas vaisto veikimas, pvz.: imunosupresantų atveju galėtų būti tiriama citokinų ekspresija, imunoglobulinų koncentracija, slopinamų fermentų aktyvumas ir pan. [2][25][26].

4.4. Sirolimo ir takrolimo koncentracijos nustatymo kraujyje metodai

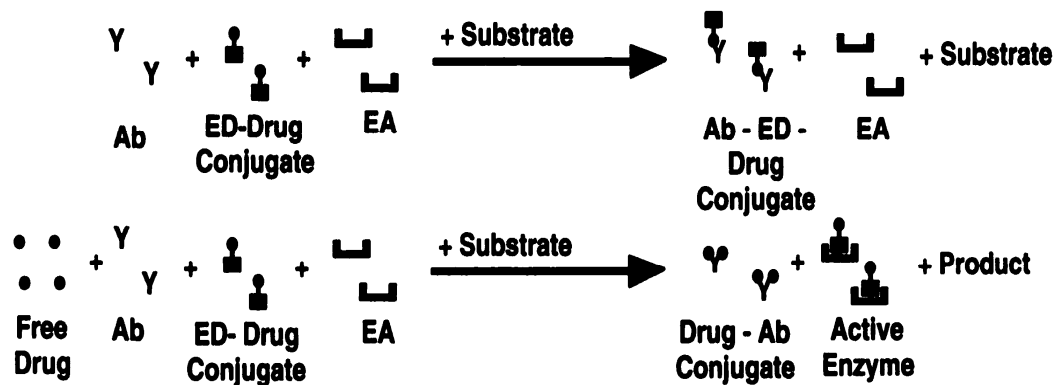
4.4.1. Imuniniai metodai

Klinikinėje laboratorijoje sirolimo koncentracija pacientų kraujyje gali būti nustatoma dviejų tipų metodais: aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (analitės detekcijai yra tinkama tiek ultravioletinės šviesos spektroskopija, tiek masių spektrometrija) ir imuniniais analizės metodais (mikrodalelių fermentinė imunoanalizė (MEIA), klonuoto fermento donoro imunoanalizė (CEDIA), fluorescencinės poliarizacijos imunoanalizė (FPIA), imunofermentinė analizė (EIA) ir imunofilino prijungimo analizė (IBA arba radioaktyviai žymėto receptoriaus analizė (RRA)) [27].

Dažniausiai klinikinėse laboratorijose sirolimo koncentracijai kraujyje nustatyti taikomas MEIA metodas. Jo esmė – mėginyje esančio sirolimo ir sirolimo-fermento konjugato konkurencija dėl susijungimo su antigenais padengtomis mikrodalelėmis. Susidaro „antigeno-antikūno“ ir „antigeno-antikūno-fermento“ kompleksai. Po to vykstančios fermentinės reakcijos metu susidaro fluorescuojantis produktas, kurio fluorescencijos stipris atvirkščiai proporcingas sirolimo koncentracijai [14][15]. Lyginant MEIA metodą su chromatografiniais metodais, nustatyta, kad MEIA metodu išmatuotos sirolimo koncentracijos labiau varijuoja, yra stipriau įtakojamos hematokrito, dėl antikūnų

nepakankamo specifiškumo, gaunamos didesnės koncentracijos, tačiau klinikinių laboratorijų poreikius tai tenkina. Be to, analizė greitesnė bei pigesnė [27].

Kitas imunofermentinės analizės metodas, rečiau nei MEIA taikomas sirolimo koncentracijai kraujyje nustatyti, yra CEDIA (5 pav.). Naudojamas fermento donoras ir fermento akceptorius (rekombinantinės DNR produktai), kurie gali suformuoti aktyvų tetramerinį fermentą β -galaktozidazę. Donoro-analitės konjugatas jungiasi su antikūnu, nesuformuojama aktyvi β -galaktozidazė ir substratas galaktopiranozidas nepaverčiamas į spalvotą produktą. Jei mėginyje yra analizės (vaisto arba vaisto metabolito), analizė konkuruoja su donoro-analitės konjugatu dėl susirišimo su antikūnu. Suformuojamas aktyvus fermentas, kuris verčia substratą spalvotu produktu (5 pav.) [28]. Lyginant CEDIA metodą su MEIA, nustatyta, kad CEDIA jautrumas mažesnis, o rezultatų atkuriamumas blogesnis [29].



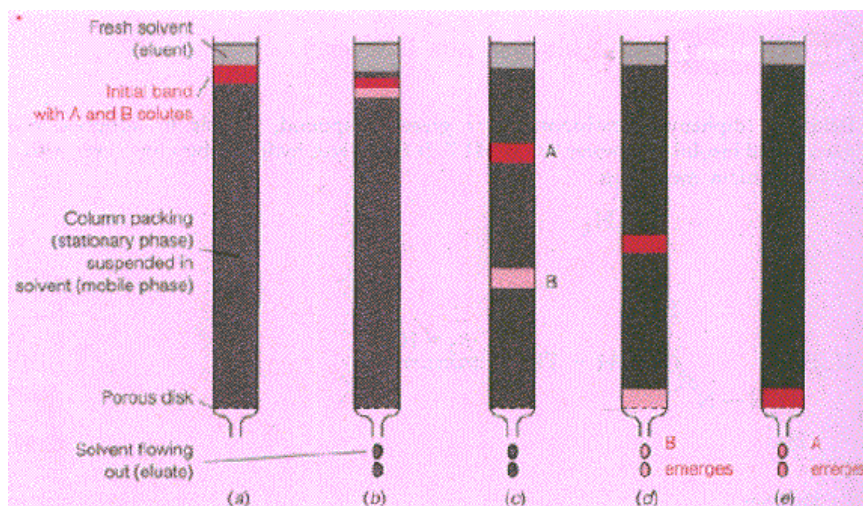
5 pav. CEDIA metodo schema.

RRA (IBA) analizė pagrįsta tuo, kad hidrofobinis imunosupresantas, lengvai patenka į ląstelę per membraną ir ten iškart jungiasi su specialiu baltymu – imunofilinu. Analizėje dažniausia naudojami 14, 37 ir 52kDa imunofilinai. Papildomai naudojamas reagentas – tričiu žymėtas imunosupresantas, kuris po imunofilino inkubacijos su analite dedamas į reakcijos mišinį ir ten jungiasi prie laisvų imunofilino molekulių. Fotosinciliatoriumi detektuojamas signalas yra atvirkščiai proporcingas analizės koncentracijai mėginyje. Metodo pranašumas – trumpas mėginio paruošimo ir analizės laikas. Teigiama, kad specifiškumas šiuo atveju yra didesnis nei MEIA metodo. Be to, RRA metodas geriau atspindi sirolimo aktyvią, o ne bendrą koncentraciją [30][31].

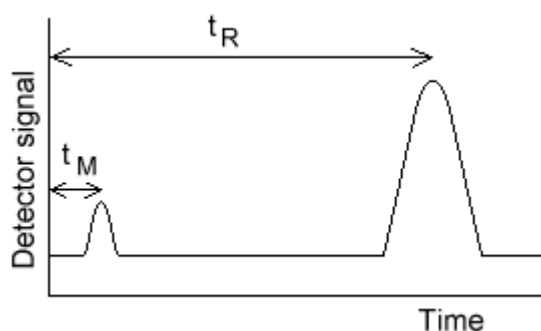
Takrolimo koncentracijai nustatyti pasaulio klinikinėse laboratorijose taikomi tokie patys metodai: imunoanalizė (ELISA, MEIA, EMIT – enzyme-multiplied immunoassay technique) ir cheminiai metodai (LC-MS; LC-MS/MS) [32].

4.4.2. Chromatografija: atskyrimo mechanizmas ir analičių detekcijos galimybės

Chromatografija – fizikocheminis analizės metodas, naudojamas mišinių sudarantiems junginiams atskirti ir analizuoti. Mišinio komponentų atskyrimas pagrįstas skirtingais masių mainų greičiais tarp mobiliosios ir stacionariosios fazių. Per kolonėlę, pripildytą nejudančio sorbento (stacionariosios fazės), leidžiamas dujų, garų ar tirpalo srautas (mobilioji fazė). Dėl skirtingų mišinio sudedamųjų dalių savybių mišinys suskaidomas (6 pav.) ir toliau analizuojamas. Metodas yra paprastas, atrankus ir gana spartus. Derinant chromatografiją su įvairiais detekcijos būdais galima valdyti analizės jautrumą ir atrankumą.



6 pav. Chromatografinis analizuojamojo medžiagų mišinio atskyrimas.



7 pav. Chromatogramos schema.

Fiksuojant detektoriumi iš kolonėlės ištekantį srauto sudėties kitimą, gaunama chromatograma (7 pav.). Jos parametrai yra vadinami sulaikymo parametrais:

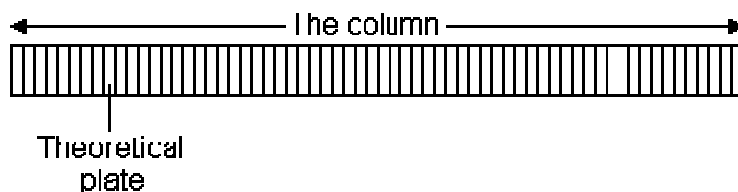
- sulaikymo trukmė t_R – laikas nuo medžiagos įleidimo į sorbento sluoksnį momento iki užfiksuojama medžiagos didžiausia koncentracija ištekamčiame judančios fazės sraute;
- sulaikymo tūris V_R – per šį laiką perėjęs judančios fazės tūris per sorbento sluoksnį;
- nesisorbuojančio komponento sulaikymo tūris ir trukmė žymimi t_M ir V_M .

Chromatografinės analizės metu mišinio komponentai, judėdami išilgai sorbento sluoksnio, pasiskirsto tarp judančios ir nejudančios fazių. Medžiagos zona išplinta. Kuo labiau išplinta dvi gretimos komponentų zonos, tuo sunkiau juos atskirti. Zonų išplitimą aiškina chromatografinio atskyrimo teorijos.

- Teorinių lėkštelių teorija – chromatografinė kolonėlė padalijama į daugybę nuoseklių hipotetinių dalių – „lėkštelių“ (8 pav.). Eliuentui nešant chromatografuojamą junginį per lėkštelę baigtinėmis porcijomis, kiekvienoje jų tarp mobiliosios ir stacionariosios fazių nusistovi pusiausvyra. Chromatografinio vyksmo efektyvumą atspindi aukštis H , lygiavertis teorinei lėkštelei, t.y. sorbento sluoksnio ilgis, kuriame nusistovi pusiausvyra tarp medžiagos, esančios mobiliojoje ir stacionariojoje fazėse. Tačiau ši teorija nepaaiškina realių vyksmų kolonėlėje, neįvertina difuzijos įtakos;

$$HETP = L / N$$

- HETP – aukštis, lygiavertis teorinei lėkštelei
- L – kolonėlės ilgis;
- N – teorinių lėkštelių skaičius.



8 pav. Teorinės lėkštelės.

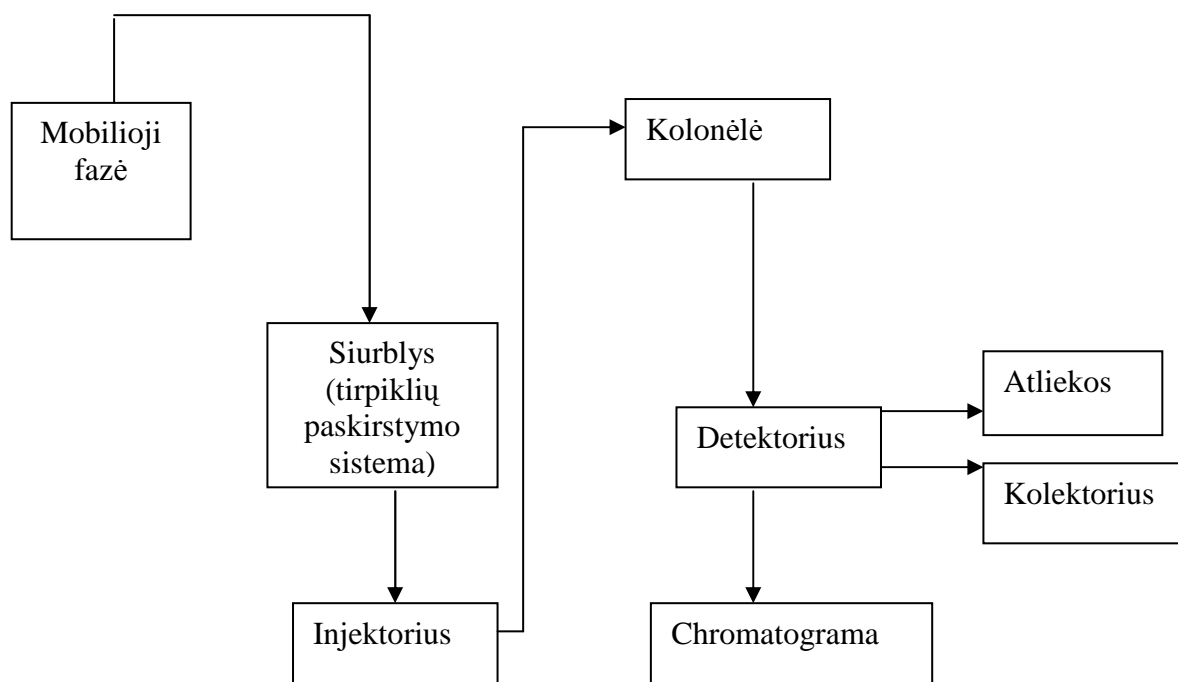
- kinetinė chromatografijos teorija aiškina mobiliosios fazės netolygumo, difuzijos ir nepusiausvyrojo medžiagos pasiskirstymo tarp fazių įtaką zonos išplitimui.

$$HETP = A + B / u + C u$$

u – vidutinis linijinis mobiliosios fazės judėjimo greitis. Kiti parametrai:

- A – Edžio (Eddy) difuzija. Įvertina tai, kad tirpinio molekulės, per sorbentą nešamos mobiliosios fazės, atsitiktinai „pasirenka“ bet kokį kelią. Ir dėl to chromatogramoje gausime zonų išsiplėtimą.
- B – išilginė difuzija. Analitės koncentracija juostos centre yra didesnė nei kraštuose. Difuzija vyksta iš centro į kraštus. Tai taip pat sukelia smailės išsiplėtimą. Didinant mobiliosios fazės judėjimo kolonėle greitį šią problemą galima sumažinti.
- C – pasipriešinimas masių mainams. Reikia laiko, kad analizė atsidurtų pusiausvyroje tarp mobiliosios ir stacionariosios fazių. Jei mobilioji fazė juda greitai ir analizė yra afiniška stacionariajai fazei, tai analizė mobiliojoje fazėje išeis pirmiau nei analizė stacionariojoje fazėje. Dėl to gaunamas zonos išsiplėtimas.

Šiuolaikinė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (HPLC) – plačiai paplitusi chromatografijos rūšis, kurioje naudojama skysta mobilioji fazė ir labai susmulkinta stacionarioji fazė – sorbentas, sudarytas iš silikagelio granulių, kurių skersmuo 1,7-10 μ m. Metodas pranašesnis už dujų chromatografiją, nes galima analizuoti aukštos virimo temperatūros ir napatvarius junginius, o įprastos skysčių chromatografijos trūkumas yra tas, kad eliuentas teka lėtai ir dėl to negreitai atskiriami mišinio komponentai. Greitesnei analizei pasiekti padidintas slėgis iki 0,5-100 MPa.



9 pav. HPLC chromatografo principinė schema.

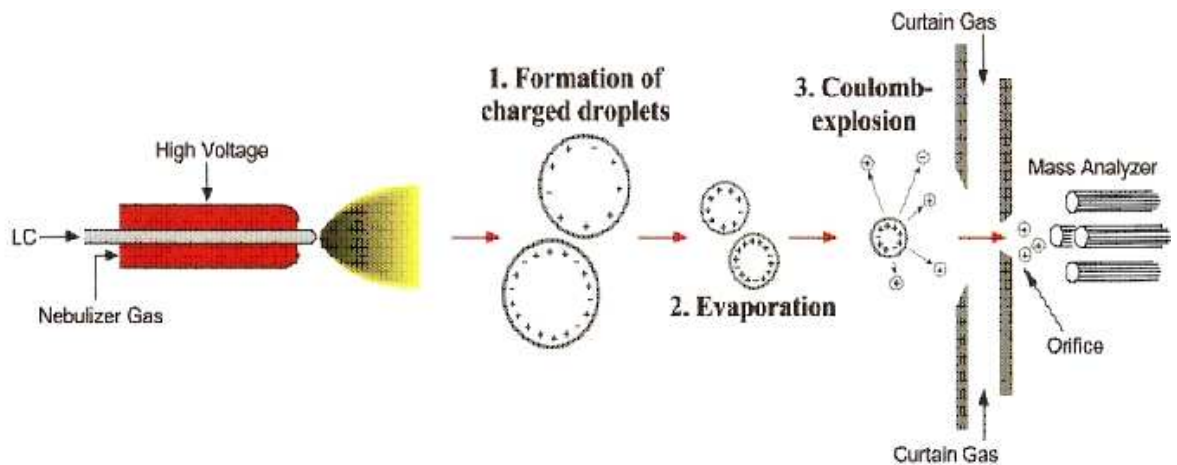
Chromatografuojant galima keisti mobiliosios fazės sudėtį, t.y. keisti eliuentą sudarančių tirpiklių santykį. Tai leidžia atskirti įvairaus poliškumo mišinius. Didelis slėgis sudaromas ir tirpikliai į laipsniško eliuavimo įrenginį tiekiami įvairių tipų siurbliais. Skysčio srauto ir slėgio svyravimai yra nepageidaujami, tačiau, kai kuriamas gradientas maišant skirtingo klampumo ir spūdimumo skysčius, neišvengiami. Prieš darbo pradžią rekomenduojama tirpiklį degazuoti. Bandinys į chromatografinę kolonėlę įleidžiamas per šešių kanalų vožtuvą su kilpiniu dozatoriumi. Kolonėlės yra 1-6mm skersmens ir 20-250mm ilgio plieniniai vamzdeliai, užpildyti sorbentu. Ištekėjusios iš kolonėlės ir pratekėjusios pro detektorius analizuojamųjų medžiagų frakcijos surenkamos į specialius indus, kad būtų galima toliau tirti, jei detektorius nėra destruktinis (pvz.: masių spektrometras) (9 pav.) [33][34].

Svarbi šiuolaikinių HPLC prietaisų dalis – detektorius. Dažniausiai naudojami šie optinių signalų registravimo įrenginiai: UV/VIS spindulių spektroskopas ir masių spektrometras.

UV/VIS spindulių spektroskopija pagrįsta tiriamojo junginio absorbcija 200-800nm bangos ilgio elektromagnetine spinduliuote. Sužadinas molekules π elektronas, kuriam po to grįžtant į energetiškai palankiausią lygmenį išspinduliuojamas energijos kvantas. Registruojama absorbcija, reikalinga π elektronui sužadinti, ir taip gaunamas spektras, kuriame vaizduojama šviesos spindulio absorbcijos (optinio tankio) priklausomybė nuo bangos ilgio [35].

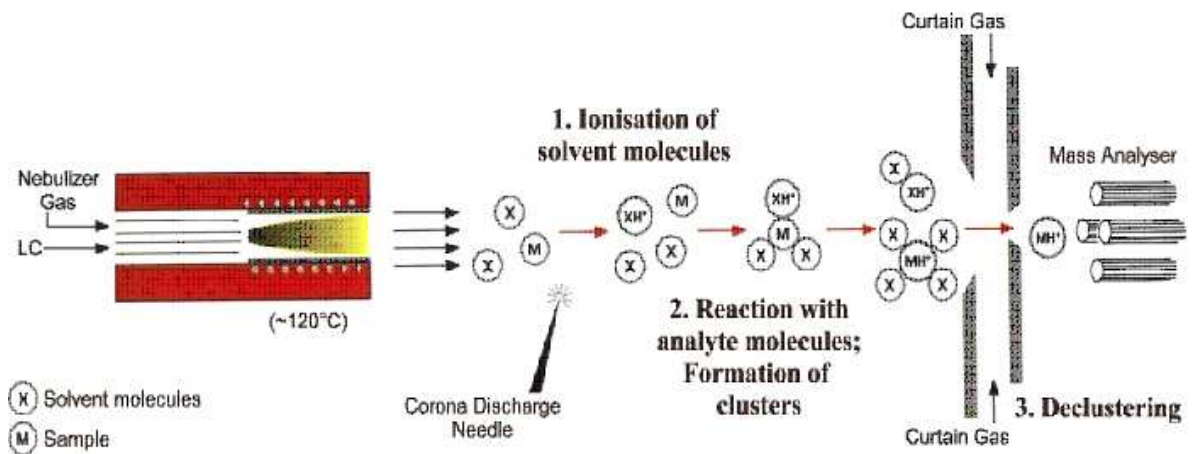
Masių spektrometrija pagrįsta įkrautos dalelės judėjimu magnetiniame ar elektriniame lauke. Detektuojamas signalas – medžiagos dalelės masės ir krūvio santykis. Pirmasis analizės etapas – dalelės jonizacija. Tai gali būti atliekama daugeliu įvairių metodų, tačiau klinikinėse laboratorijose naudojamuose masių spektrofotometruose taikomi du.

1. Elektros srauto jonizacija (ESI): analizės tirpalas, veikiant stipriam elektros laukui, išpurškiamas pro kapiliarą. Ten susidaro įkrauti lašeliai, kuriems garuojant, krūvis susitelkia lašelio paviršiuje, tada padidinamas elektrinis laukas ir jonai yra emituojami (10 pav.). Paprastai spektre matomi kvazimolekuliniai jonai (dažniausiai $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, gali būti $[M+X]^\pm$, kur X – bet kokie atomai ar atomų grupės), fragmentuotų jonų yra mažai arba visai nėra. Galimi daugiakrūviai jonai. Šis jonizacijos būdas labiausiai tinka analizuoti iki 1000Da dydžio molekules.



10 pav. ESI schema.

2. Atmosferos slėgio cheminė jonizacija (APCI): garuojant tirpikliui elektriškai įkrautuose analizės tirpalo lašeliuose, analizės jonai, jungiasi su neutraliomis tirpiklio molekulėmis (11 pav.). Sukuriami kvazimolekuliniai jonai ($[M+X]^\pm$), metodas tinka mažesniems nei 1000Da junginiams analizuoti.



11 pav. APCI schema.

Vėliau šiais jonizacijos metodais sukurta dalelė greitinant elektriniu lauku skrieja į analizatorių, kur signalas stiprinamas ir detektuojamas.

Gautame spektre yra matomos smailės, kurių padėtis abscisių ašyje rodo dalelės masės/krūvio santykį, o projekcija į ordinačių ašį atitinka tos dalelės kiekį mėginyje[36].

4.4.3. Sirolimo ir takrolimo koncentracijų nustatymo metodų palyginimas

Pasaulio klinikinėse ir mokslinėse laboratorijose yra įdiegti ir taikomi abiejų grupių metodai: imuniniai ir chromatografiniai. Jų taikymo patirtis bei atskiri palyginamieji tyrimai atskleidė nemažai trūkumų ir privalumų.

Pagrindiniai imuninių metodų trūkumai:

- antigenas, prie kurio jungiasi tiriamoji medžiaga, nepakankamai specifiškas (rezultatų tikslumui turi įtakos sirolimo metabolitai bei endogeninės ir egzogeninės medžiagos) [17][22];
- nepakankamas analizės atrankumas [17];
- didelės paklaidos mažų sirolimo koncentracijų srityje, nes endogeniniai junginiai gali sąlygoti nustatomą koncentraciją [16] [17];
- mažas nustatomų sirolimo koncentracijų intervalas 0,0 – 30 ng/ml [17];
- naudojami daug brangesni reagentai nei chromatografiniuose methoduose [22][27].

Pagrindiniai chromatografinių metodų trūkumai:

- sudėtingas ir ilgai trunkantis mėginio paruošimas [37][38];
- dažnai naudojamos pavojingos medžiagos ir tirpikliai;

- brangesnė įranga ir jos išlaikymas [22];
- didelė analizės trukmė [37][38].

Imuniniai metodai rutininėje praktikoje taikomi plačiau nei chromatografiniai, nors jų specifiškumas ir jautrumas nėra aukšti. Dėl nepakankamo specifiškumo tyrimai šiais metodais negali suteikti informacijos apie imunosupresantų farmakokinetiką: pavyzdžiui, jau yra identifikuoti bent 8 takrolimo metabolitai. Trys iš jų *O*-demetilinti takrolimo dariniai gali būti toksiški, todėl ypač svarbu nustatyti kiekvieno jų koncentraciją atskirai. Šiuos metabolitus atskirti (tai padaryti yra sudėtinga dėl tokios pat molekulinės masės bei vienodų kvazimolekulinių jonų) galima naudojant LC-MS/MS metodą; mažiausia statistiškai patikimai nustatoma koncentracija yra 0,2ng/ml [37]. Tačiau chromatografiniai metodai taip pat turi trūkumų. Tai yra ilgas ir sudėtingas ėminio (šiuo atveju, paciento kraujo) ekstrakcijos procesas ir didelė viso tyrimo trukmė, kai reikia analizuoti daug mėginių [27]

4.4.4. HPLC – MS taikymas sirolimo ir takrolimo koncentracijų nustatymui

Nors sirolimo bei takrolimo koncentracijų nustatymas chromatografijos metodu nėra palitęs rutininių tyrimų laboratorijose, tačiau tai daug jautresnis, specifiškesnis metodas nei imunoanalizė, be to, suteikia galimybę patikimai nustatyti koncentracijas plačiame intervale. Yra aprašyta nemažai tyrimo metodikų, kaip nustatomos šių imunosupresantų bei jų metabolitų koncentracijos. Pagrindiniai šios analizės etapai, galintys šiek tiek skirtis tarpusavyje priklausomai nuo naudojamos aparatūros ypatumų, yra šie:

- 1) standartinių tirpalų kalibracinei kreivei sudaryti paruošimas; juose turi būti parinkta konkreti tiriamosios medžiagos koncentracija, konkreti vidinio etalono (tai gali būti tiriamojo imunosupresanto acetilinti [39][44], demetoksilinti dariniai [38][39][40][46], askomicinas [37][41][43][45] ar kiti chemine struktūra į analitę panašūs junginiai [41][43][47]) koncentracija;
- 2) mėginio paruošimas: mėginys šiuo atveju yra kraujo (su EDTA) ekstraktas, kurio du pagrindiniai etapai yra:
 - baltymų išsodinimas naudojant ZnSO₄ tirpalą bei metanolį (arba acetoną) [37][38][39][40][41][42][43][44][46]; tai galima padaryti pridėjus tik druskos rūgšties tirpalo [45];

- organinės fazės atskyrimas, kuris galimas tokiais būdais:
 - kelis kartus inkubuojant acetonitrile arba metanolyje, tarp inkubacijų centrifuguojant ir džiovinant po azotu [38][45] arba vakuume [43];
 - kietosios fazės ekstrakcija [39][40];
 - *online*-kietosios fazės ekstrakcija [37][42][44];
- 3) chromatografo ir masių spektrometro paruošimas, jų analitinių parametrų parinkimas:
- mobiliosios fazės judėjimo greitis: 0,2-0,9ml/min;
 - mobiliosios fazės sudėtis – elientai:
 - nepoliniai tirpikliai: metanolis [37][38][40][41][42][43][44][45][46][47], acetonitrilas [38][45];
 - poliniai tirpikliai: bidistiliuotas vanduo [38][42][45], bidistiliuotas vanduo su skruzdžių rūgštimi [44] ir natrio formiatu [39], amonio acetato buferinis tirpalas [40][43][46][47], amonio formiato buferinis tirpalas [41];
- 4) analizės atlikimas ir gautų rezultatų apdorojimas: chromatogramoje intensyviausios smailės yra sukuriamos:
- analitės ir natrio jonų aduktų $[M+Na]^+$ [39][41][42][45];
 - analitės ir amonio jonų aduktų $[M+NH_4]^+$ [37][40][43][44][46];
 - deprotonizuoti analitės jonai $[M-H]^-$ [47].

5. EKSPERIMENTINĖ DALIS

5.1. Medžiagos ir tirpalai

Ekperimentuose naudotos medžiagos:

- mobiliosioms fazėms ruošti naudota:
 - metanolis (SIGMA, HPLC, Vokietija);
 - acetonitrilas (SIGMA, HPLC, Vokietija);
 - bidistiliuotas vanduo (gamintas LDC Biochemijos laboratorijoje);
 - acto rūgštis (99%, RIEDEL de haën, Vokietija);
 - skruzdžių rūgštis (98%, ROTH, Vokietija);
 - tetrahidrofuranas (Sharlau Chemie, HPLC, Ispanija);
- etaloniniams analičių tirpalams naudota:
 - sirolimas (>99%, LC Laboratories, JAV);
 - takrolimas (>99%, LC Laboratories, JAV);
 - vidinis standartas – askomicinas (95,5%, CALBIOCHEM, Kanada).

5.2. Analizinė įranga

Mėginiams ruošti ir analizuoti naudota:

- analizinės svarstyklės (SBC 31, Vokietija);
- automatinės pipetės (10-100, 100-1000 ir 500-5000µl; Eppendorf Research, Vokietija);
- šaldanti centrifuga (Janetzki K24, Vokietija);
- modulinis aukšto efektyvumo skysčių 10A_{VP} serijos chromatografas (Shimadzu, Japonija), susidedantis iš:
 - keturių kanalų žemo slėgio gradiento formavimo siurblio LC-10AD_{VP};
 - tirpiklių degazatoriaus FCV-10AL_{VP};
 - automatinio injektoriaus SIL-10AD_{VP};
 - kolonėlės termostato CTO-10A_{VP};
 - kintamo bangos ilgio dviejų kanalų UV/VIS detektoriaus SPD-10AV_{VP};
 - sistemos kontrolerio SCL-10A_{VP};
- masių spektrometras 3200 Q TRAP (Applied Biosystems, Kanada).

Chromatografinių sąlygų ir masių spektrofotometro parametrai nustatyti programa Analyst Software.

5.3. Rezultatų apdorojimas

Ekspirimentų rezultatai gauti chromatogramas apdorojant Analyst Software programa. Čia jie pateikiami lentelėse ir paveiksluose, nubraižytuose naudojant MS Word ir Excel programas. Duomenų statistikos (standartinis nuokrypis, koreliacijos koeficientas) apskaičiuotos naudojant MS Excel programą. Mandelio testas atliktas pasinaudojant dispersinės analizės (ANOVA), taip pat atliktos Excel programa, rezultatais pritaikius formulę dydžiui F apskaičiuoti:

$$F = \frac{SS_{ties} - SS_{kvad}}{MS_{kvad}}$$

SS_{ties} – nulinės hipotezės (priklausomybė tiesinė) kvadratinių nuokrypių suma,

SS_{kvad} – alternatyvios hipotezės (priklausomybė kvadratinė) kvadratinių nuokrypių suma,

MS_{kvad} – alternatyvios hipotezės (priklausomybė kvadratinė) vidutinis kvadratinis nuokrypis,

Pastarasis kiekvienos analitės atveju lyginamas su F kritiniu, kuris paskaičiuojams naudojant Excel programoje esančia formule $\text{finv}(1-p;n;k)$, kur p – patikimumo lygmuo (šiam darbe naudotas $p=0,95$), n ir k – laisvės laipsnių skaičius: n – tikrinamos lygties eilė, k – atliktų eksperimentų skaičius, atėmus pakartojimų skaičių.

Kai apskaičiuotas dydis F yra mažesnis už F_{krit} , tada teisinga nulinė hipotezė (šio eksperimento atveju H_0 – priklausomybė tiesinė).

5.4. Standartinių tirpalų ruošimas

Analizinėmis svarstyklėmis atsverta po $10 \pm 0,1$ mg sirolimo ir takrolimo. Abi medžiagos atskirai ištirpintos 10 ml acetonitrilo. Naudojant šiuos tirpalus, paruoštas abiejų analizių bendras apytiksliai $10 \mu\text{g/ml}$ koncentracijos tirpalas (A). Pastarasis viso darbo metu buvo laikomas -20°C temperatūroje.

Analizinėmis svarstyklėmis atsverta $1 \pm 0,1$ mg askomicino, jis ištirpintas 10ml acetonitrilo. Gautas $100 \mu\text{g/ml}$ tirpalas (B), kuris papildomai praskiestas bidistiliuotu vandeniu iki apytiksliai $10 \mu\text{g/ml}$. Jis viso darbo metu buvo laikomas -20°C .

Iš tirpalų (A) ir (B) buvo ruošiami mėginiai. Chromatografinių sąlygų tyrimui naudoti apytiksliai $1 \mu\text{g/ml}$ tirpalai, analizės tiesiškumui tirti naudoti 2, 4, 8, 32, 64ng/ml analičių ir askomicino tirpalai.

5.5. Kraujo ekstrakcijos procedūra

Į $700 \mu\text{l}$ EDTA antikoagulioto kraujo pridėta $100 \mu\text{l}$ 70ng/ml koncentracijos askomicino tirpalo (pagamintas iš tirpalo (B), skiedžiant acetonitrilu) ir $600 \mu\text{l}$ acetonitrilo. Gautas mišinys centrifuguotas 10 min 4000aps/min , po to supernatantas centrifuguotas 15min 7000aps/min .

Kalibracijai paruošti tirpalai, kuriuose sirolimo ir takrolimo koncentracija 2, 10, 20ng/ml .

6. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo atlikti eksperimentai, kuriuose tiriamos chromatografinės sąlygos, reikalingos imunosupresantų sirolimo ir takrolimo koncentracijoms pacientų kraujyje po inkstų transplantacijos nustatyti. Keičiant įvairius analizės parametrus buvo ieškoma optimalių sąlygų, kurioms esant analizės kokybė tenkintų klinikinės laboratorijos poreikius.

Be sirolimo ir takrolimo svarbus analizuojamo tirpalo komponentas – vidinis etalonas. Jis yra reikalingas analizės kontrolei. Vidinis etalonas, parinkus konkrečią koncentraciją, yra dedamas į mėginį, kad būtų galima kontroliuoti analizę. Šiame darbe buvo pasirinkta vidiniu etalonu naudoti askomiciną. Tai – makrolidų grupės junginys, kaip ir tiriamieji imunosupresantai, todėl tikėtina, kad pasižymi panašiomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis. Be to, literatūros šaltiniuose nurodoma, kad askomicinas sėkmingai naudojamas vidiniu etalonu daugelyje laboratorijų. Eksperimentuose buvo tikslinga paanalizuoti ir šio junginio chromatografinius parametrus, nes yra svarbu, kad ne tik analičių, bet ir vidinio etalono detektuojamas signalas priklausytų tiesiškai nuo jo koncentracijos mėginyje. Ši analizė taip pat buvo prasminga todėl, kad ateityje tiriant kraujo ekstraktus, būtų galima naudoti optimalią askomicino koncentraciją, kuriai esant būtų patikimai detektuojamas signalas.

Etaloniniams analičių tirpalams ruošti buvo naudotas komercinis sirolimo izomerų mišinys. Tinkamai parinkus chromatografines sąlygas, galima chromatogramoje gauti atskiras šių izomerų smailes. Čia iškyla klausimas, į kurį atsakyti bus galima tik pradėjus analizuoti pacientų kraujo ekstraktus: ar mums naudinga turėti atskiras smailes chromatogramoje. Dabar mums nėra žinoma, kokios formos sirolimas egzistuoja *in vivo*; galbūt metabolizmo metu susidaro kažkurio izomero vyraujantis kiekis, kurį nustačius galima patikimai interpretuoti bendrą sirolimo koncentraciją pacientų kraujyje ir vertinti potransplantacinę imunosupresinę būklę. Tačiau tada dėl šių skirtingų sirolimo būsenų *in vivo* ir *in vitro* kalibracija taptų sudėtingesnė. O jei sirolimo izomerizacijos lygis nėra reikšmingas farmakokinetiniu požiūriu, tai mums daug naudingiau neatskirti izomerų, o gauti vieną simetrišką chromatogramos smailę. Ši problema nėra akcentuojama literatūroje.

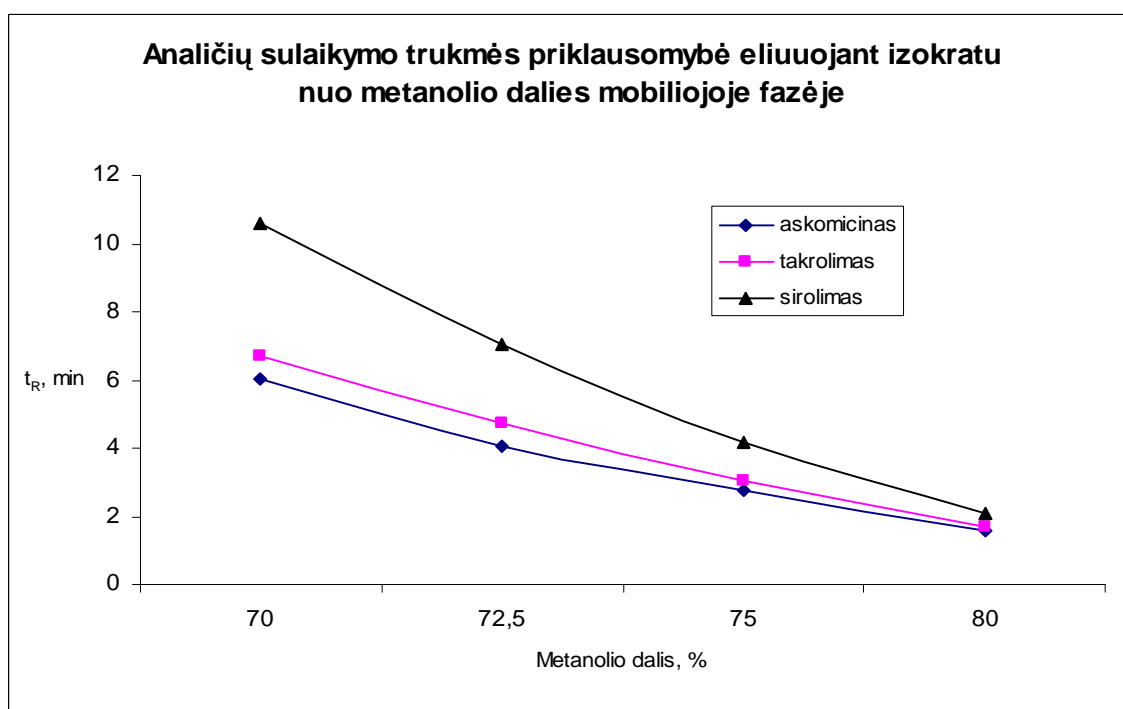
Svarbi chromatografo dalis – kolonėlė. Buvo pasirinkta YMC-Pack pro C18 RS kolonėlė. Ji yra užpildyta sorbentu, kurį sudarančios dalelės paviršiuje turi 18 anglies atomų angliavandenilines grupes. Tai reikalinga analizuojant labai hidrofobiškus didelių molekulių junginius: makrolidus, steroidus ir pan. Be to, ieškota universalesnės

chromatografinės kolonėlės, kuri tiktų ne tik imunosupresantų, bet ir kitiems laboratorijoje nustatomiems junginiams analizuoti.

Tiriant standartinius analičių tirpalus, masių spektrofotometru buvo detektuojami analičių ir natrio jonų aduktai $[M+Na]^+$.

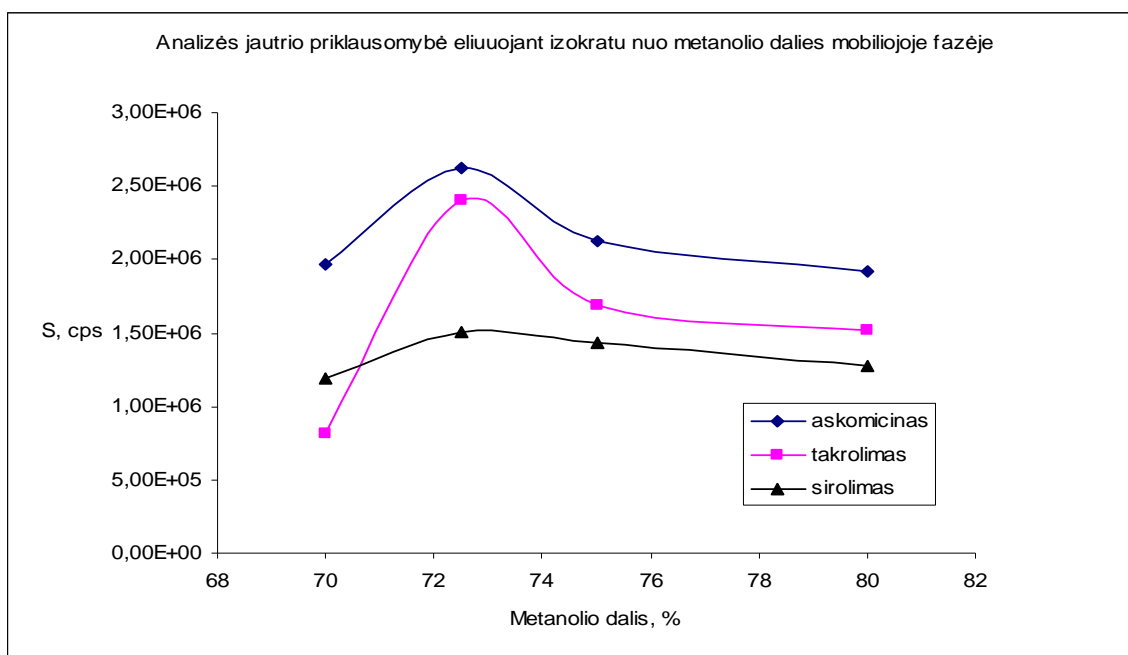
6.1. Eliuavimo tipas: izokratinis ar gradientinis

Eliuavimui naudojami du tirpikliai: polinis – dejonizuotas vanduo su priedais (šiuo atveju, tai yra acto rūgštis) ir nepolinis – metanolis. Jie gali būti pateikiami dvejopai: izokratu, t.y. tam tikru pastoviu santykiu, arba gradientu, t.y. sudarius specialią laiko programą, kai tirpiklių santykis kinta laike. Buvo atlikti eksperimentai, siekiant nustatyti, kuriuo atveju ir kokiam tirpiklių santykiui esant gaunamas geriausias analičių atskyrimas, siauriausios smailės chromatogramoje bei mažiausia analičių sulaikymo trukmė.



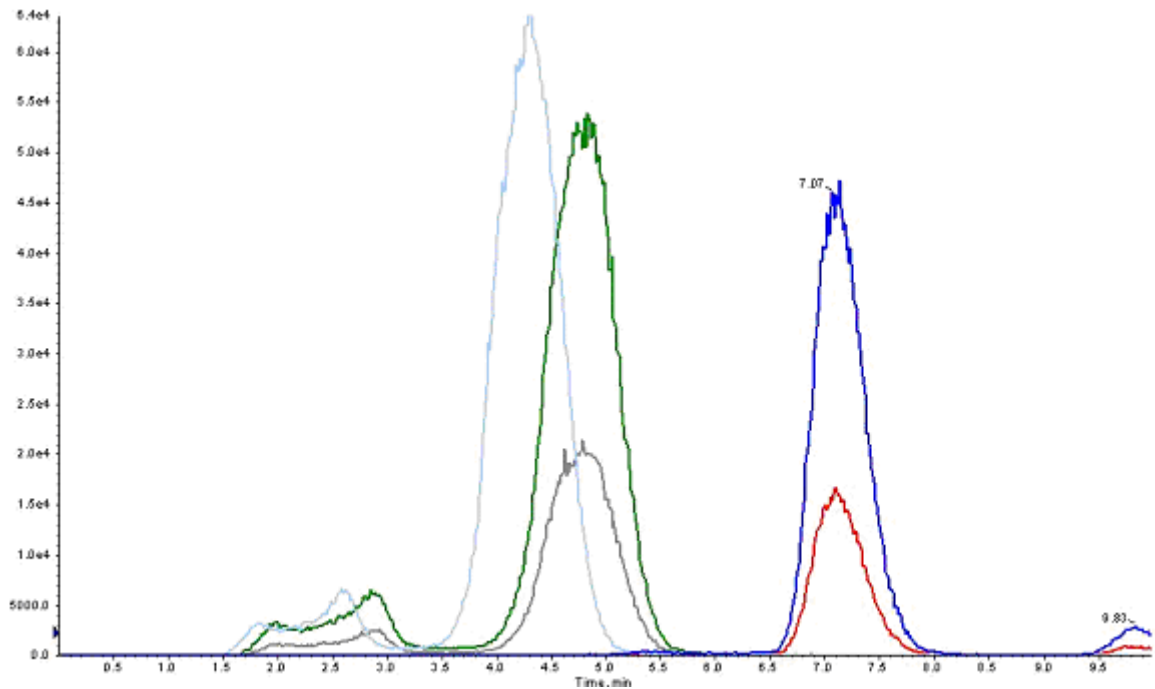
10 pav. Analčių sulaikymo trukmės priklausomybė eliuuojant izokratu nuo metanolio dalies mobiliojoje fazėje.

10 pav. pateiktuose rezultatuose matome, kad didinant metanolio procentinę dalį mobiliojoje fazėje, mažėja analčių sulaikymo trukmė. Tai rutiniams tyrimams klinikinėje laboratorijoje yra labai pravartu, ypač, norint tirti didelę mėginių seriją. Tačiau, trumpėjant t_R , prastėja analčių atskyrimas chromatogramoje.

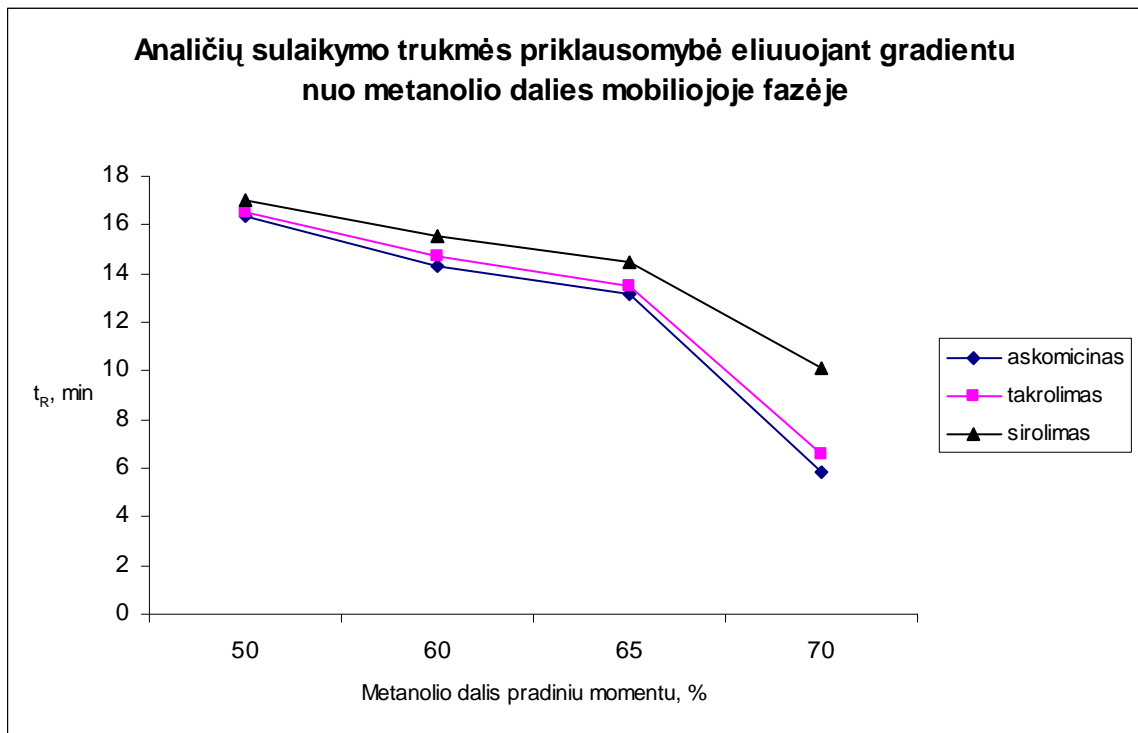


11 pav. Analizės jautrio priklausomybė eliuuojant izokratu nuo metanolio dalies mobiliojoje fazėje.

11 pav. pateikiama analizės jautrio, kurį rodo chromatogramos smailių plotai, išreikšti detektuojamų impulsų skaičiumi per sekundę (cps), priklausomybė nuo metanolio procentinės dalies mobiliojoje fazėje. Išsiskiria eksperimento, kurio atlikimo metode naudojama mobilioji fazė su 72,5% metanolio, analizės jautris: askomicino ir takrolimo jis žymiai didesnis nei kitais atvejais (vidutiniškai padidėjo atitinkamai 23,5% ir 44,3%), sirolimo analizės jautris ne taip žymiai padidėjo (vidutiniškai 13,8%). 10 ir 11 pav. pateikti eksperimentų rezultatai akivaizdžiai rodo, kad optimaliausias chromatografinis analičių atskyrimas yra atliekant izokratinę eliuaciją, kai mobiliojoje fazėje yra 72,5% metanolio. Šiomis sąlygomis gauta chromatograma pateikiama 12 pav. Šio eliuavimo būdo trūkumas – išplitusios analičių zonos (smailės plotis vidutiniškai 1,5min), kurios neigiamai įtakoja analizės jautrumą. Tačiau literatūroje aprašytais metodais analizuojant imunosupresantus kartais gaunamos dar platesnės smailės ir tai laikoma tenkinančiu parametru.



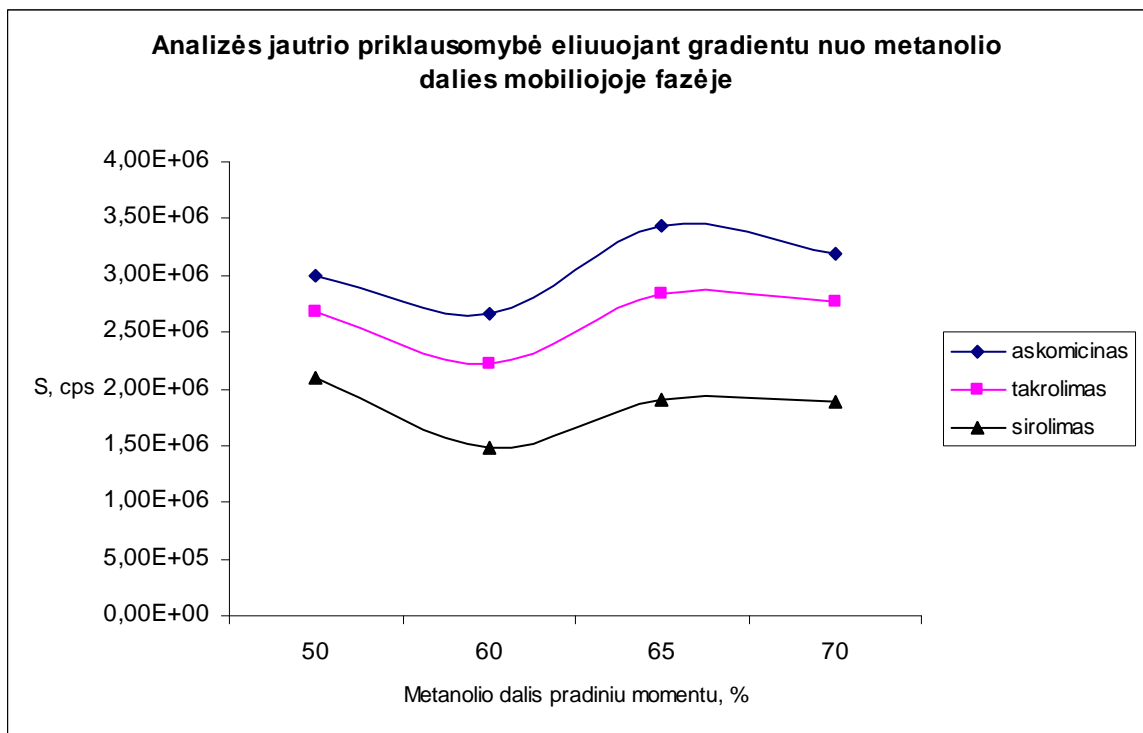
12 pav. Chromatograma, gauta mėginį eliuojant izokratu mobiliąja faze, kurią sudaro 72,5% metanolio ir 27,5% 0,2% acto rūgšties tirpalo (žydra smailė yra askomicino signalas, žalia – takrolimo ir mėlyna – sirolimo).



13 pav. Analičių sulaikymo trukmės eliuojant gradientu nuo metanolio dalies mobilijoje fazėje.

13 pav. pateiktuose rezultatuose matome, kad didinant metanolio procentinę dalį mobilijoje fazėje pradiniu gradientinio eliuavimo momentu, taip pat mažėja analičių

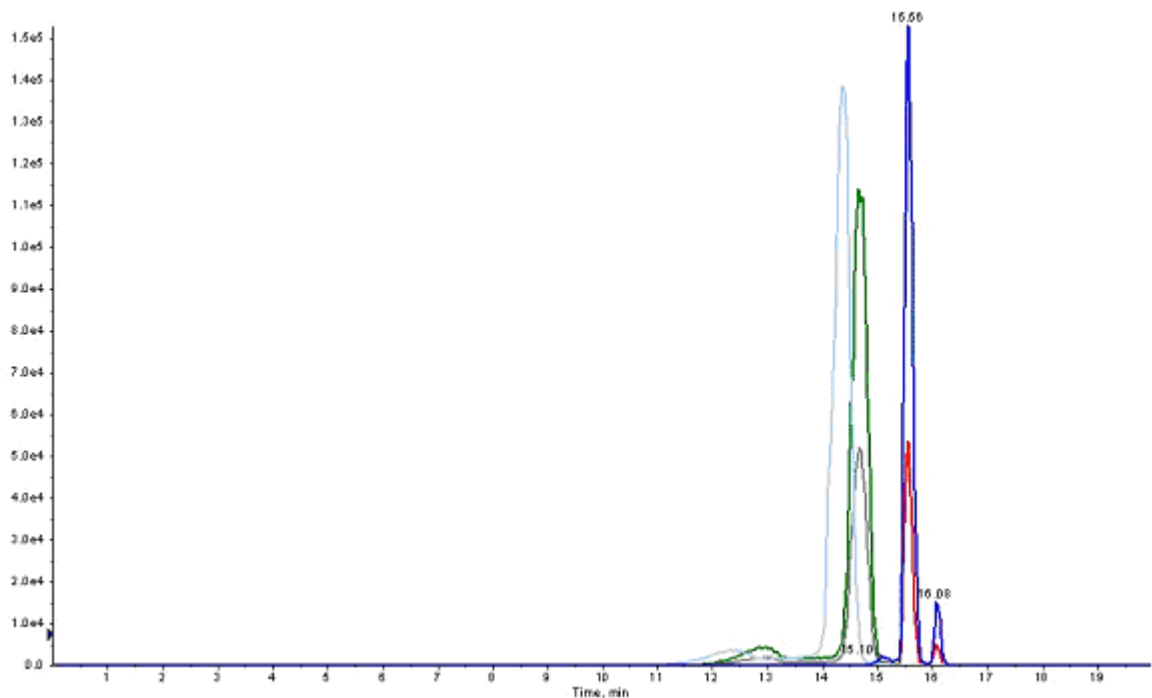
sulaikymo laikas. Priešingai nei izokratinės eliuacijos atveju, trumpėjant t_R , gerėja analičių atskyrimas chromatogramoje. Optimaliausiais laikytini tie metodai, kurių pradiniu momentu metanolio dalis mobiliojoje fazėje yra atitinkamai 60% ir 65%. Pakartotinai atlikus eksperimentus šiais metodais, gautas geresnis sulaikymo trukmių pakartojamumas, esant 60% metanolio: analičių sulaikymo trukmių standartinis nuokrypis yra 0,01-0,02, kai esant 65% metanolio – 0,25-0,8. Tačiau gradientinė eliuacija pasižymi viena rutininei praktikai nepalankia savybe – po kiekvienos injekcijos, kolonėlę reikia lygsvarinti, t.y. kelias minutes leisti tirpiklius pradiniu santykiu. Tai žymiai pailgina bendrą analizės trukmę.



14 pav. Analizės jautrio priklausomybė eliuojant gradientu nuo metanolio dalies mobiliojoje fazėje.

14 pav. pateikiama analizės jautrio priklausomybė nuo metanolio procentinės dalies mobiliojoje fazėje. Galima daryti išvadą, kad metanolio procentinė dalis pradiniu gradientinio eliuavimo momentu nedaro reikšmingos įtakos analizės jautrumui.

15 pav. pateikiamoje chromatogramoje, gautoje mėginį eliuojant gradientiniu būdu, kai metanolio dalis mobiliojoje fazėje pradiniu momentu yra 60%, matome, kad smailių zonos daug siauresnės.



15 pav. Chromatograma, gauta mėginį eliuojant gradientu mobiliąja faze, kurioje pradinio momentu yra 60% metanolio (žydra smailė yra askomicino signalas, žalia – takrolimo ir mėlyna – sirolimo).

1 lentelė. Gradientinio eliuavimo, kurį naudojant gauta 15pav. pateikta chromatograma, laiko programa.

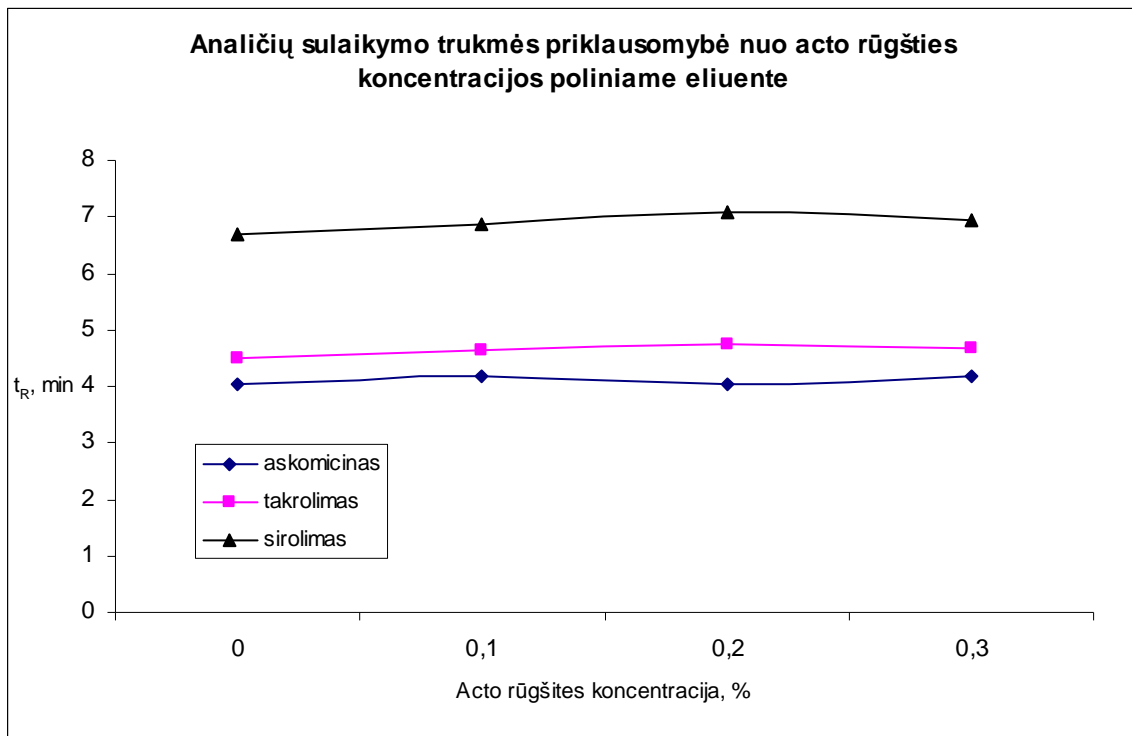
Laikas, min	Metanolio dalis mobilijoje fazėje, %	0,2% acto rūgšties tirpalo dalis mobilijoje fazėje, %
0,1	60	40
1	60	40
12	99	1
14	99	1
15	60	40
25	60	40

Buvo išbandyti abu chromatografijoje taikomi eliuacijos būdai. Rezultatai rodo, kad optimaliausias yra izokratinis: tiek analiziniams parametrais (analičių atskyrimas bei analizės jautris), tiek tinkamumu rutininiams tyrimams klinikinėje laboratorijoje (analizės trukmė, kurią lemia analičių sulaikymo trukmės bei preanalizinis kolonėlės paruošimas).

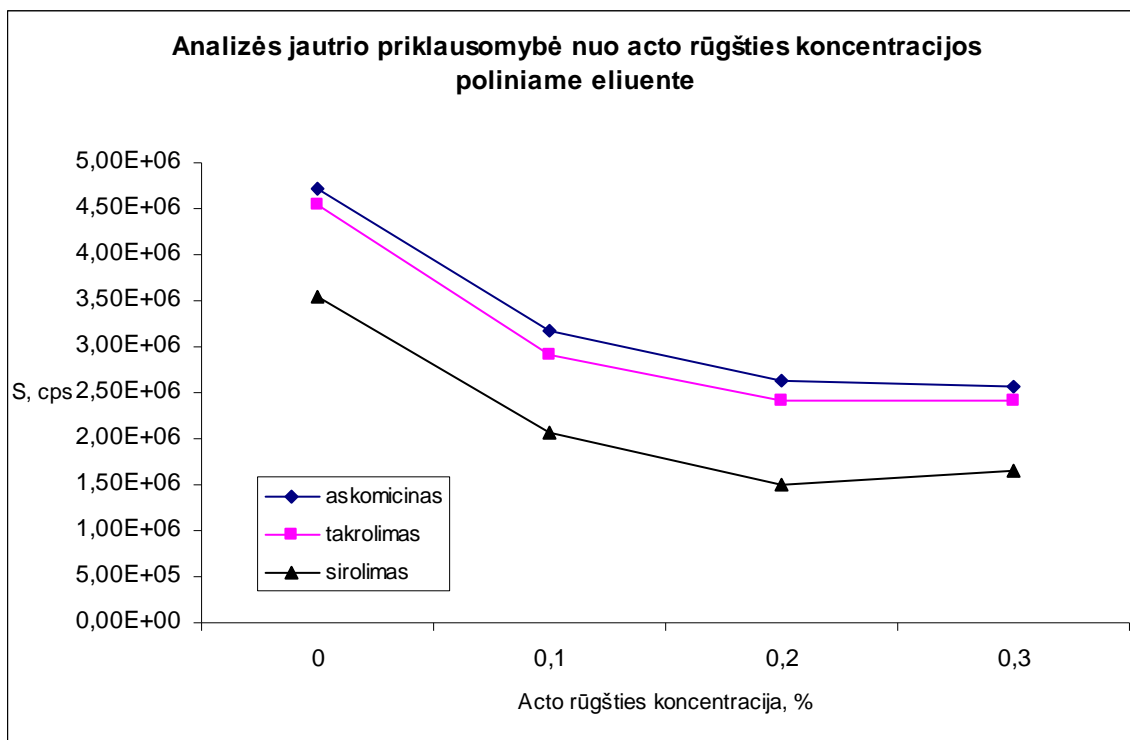
6.2. Polinio tirpiklio – bidistiliuoto vandens parūgštinimas

Literatūroje nurodoma, kad polinis eliuentas imunosupresantų koncentracijai nustatyti chromatografiniu metodu yra parenkamas toks, kad pH būtų žemesnis nei 7. Padidinta vandenilio jonų koncentracija yra reikalinga geresniam analičių atskyrimui

tarpusavyje ir nuo kitų mišinio (kraujo ekstrakto) komponentų, kurie, šiuo atveju, gali trukdyti analizei. Dažnai naudojami buferiniai tirpalai, kad būtų pasiektas ir išlaikytas konkretus pH. Šiame darbe buvo išbandytos dviejų organinių rūgščių (skruzdžių ir acto) įtaka chromatografiniam atskyrimui. Taikytas metodas, kuris ankstesniame eksperimente davė geriausius rezultatus – izokratinis eliuavimas, kai metanolio procentinė dalis mobilijoje fazėje 72,5%.

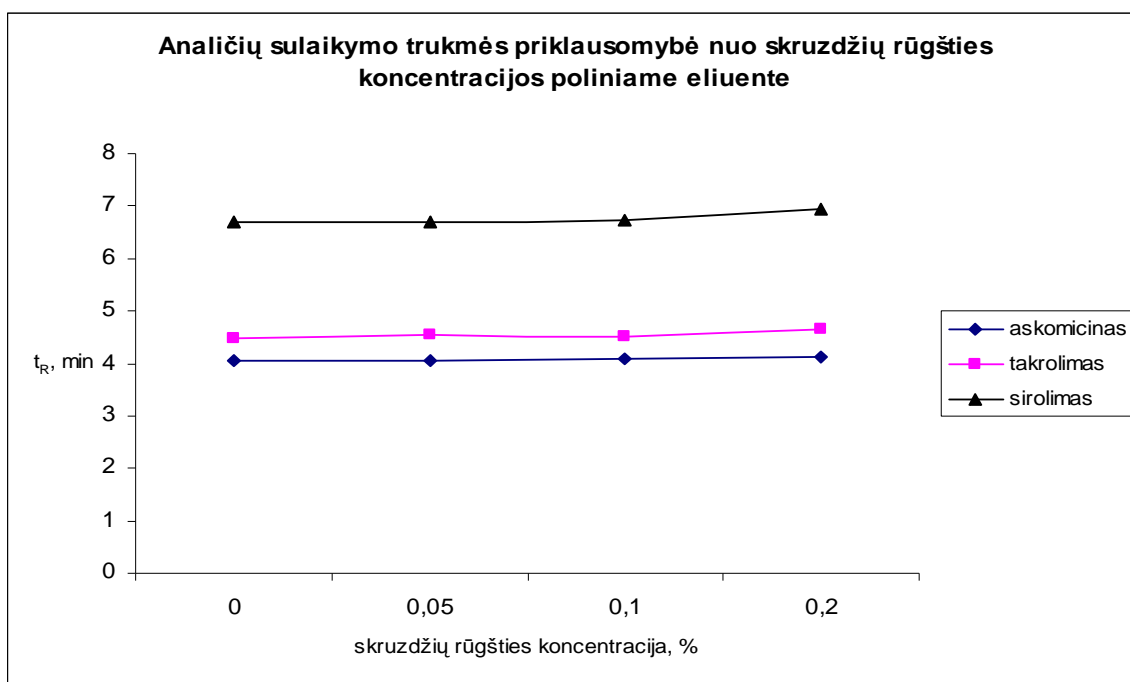


16 pav. Analičių sulaikymo trukmės priklausomybė nuo acto rūgšties koncentracijos poliniame eliuente.

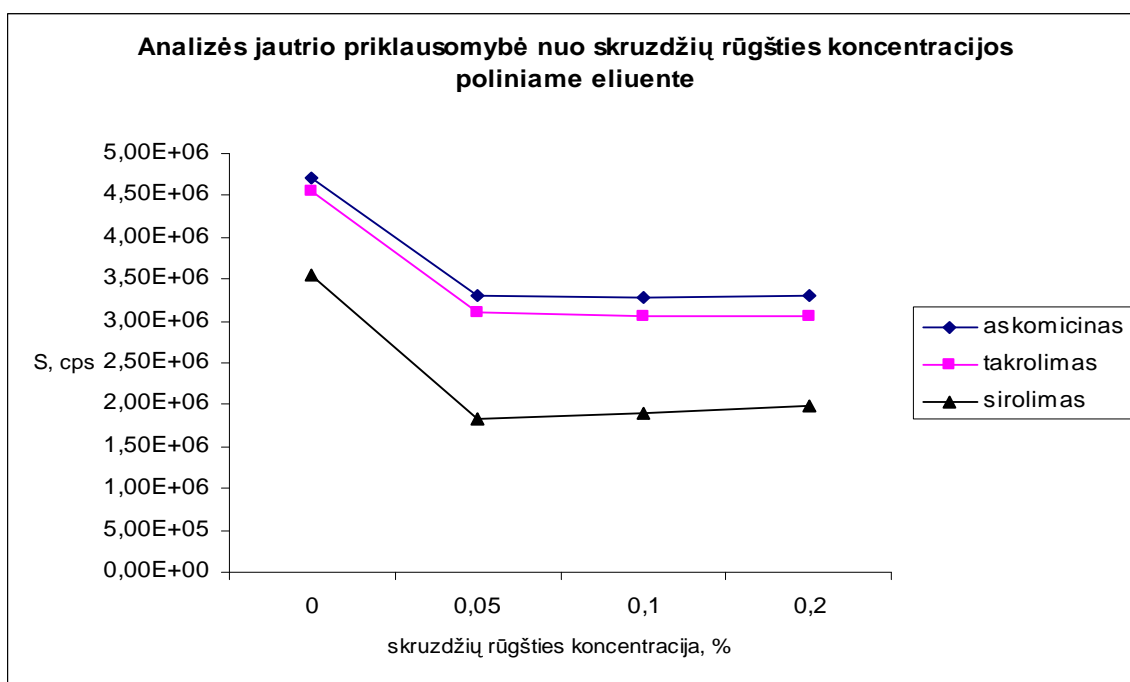


17 pav. Analizės jautrio priklausomybė nuo acto rūgšties koncentracijos poliniame eliuente.

16 pav. pateikti eksperimento rezultatai rodo, kad reikšmingos įtakos acto rūgšties koncentracija analičių sulaikymo trukmėms neturi. 17 pav. pateikta analizės jautrio priklausomybė nuo acto rūgšties koncentracijos eliuente. Akivaizdu, kad jautris nesant eliuente rūgšties yra didesnis visų analičių atveju: askomicino vidutiniškai 37%, takrolimo – 39,7%, sirolimo – 45,5%. O keičiama acto rūgšties koncentracija tokios ryškios įtakos neturi.



18 pav. Analičių sulaikymo trukmės priklausomybė nuo skruzdžių rūgšties koncentracijos poliniame eliuente.



19 pav. Analizės jautrio priklausomybė nuo skruzdžių rūgšties koncentracijos poliniame eliuente.

18 pav. pateikti eksperimento rezultatai rodo, kad reikšmingos įtakos skruzdžių rūgšties koncentracija analičių sulaikymo trukmėms neturi. 19 pav. pateikta analizės jautrio priklausomybė nuo skruzdžių rūgšties koncentracijos eliuente. Rezultatai panašūs į prieš tai aprašyto eksperimento su acto rūgštimi rezultatus: analizės jautris nesant eliuente rūgšties

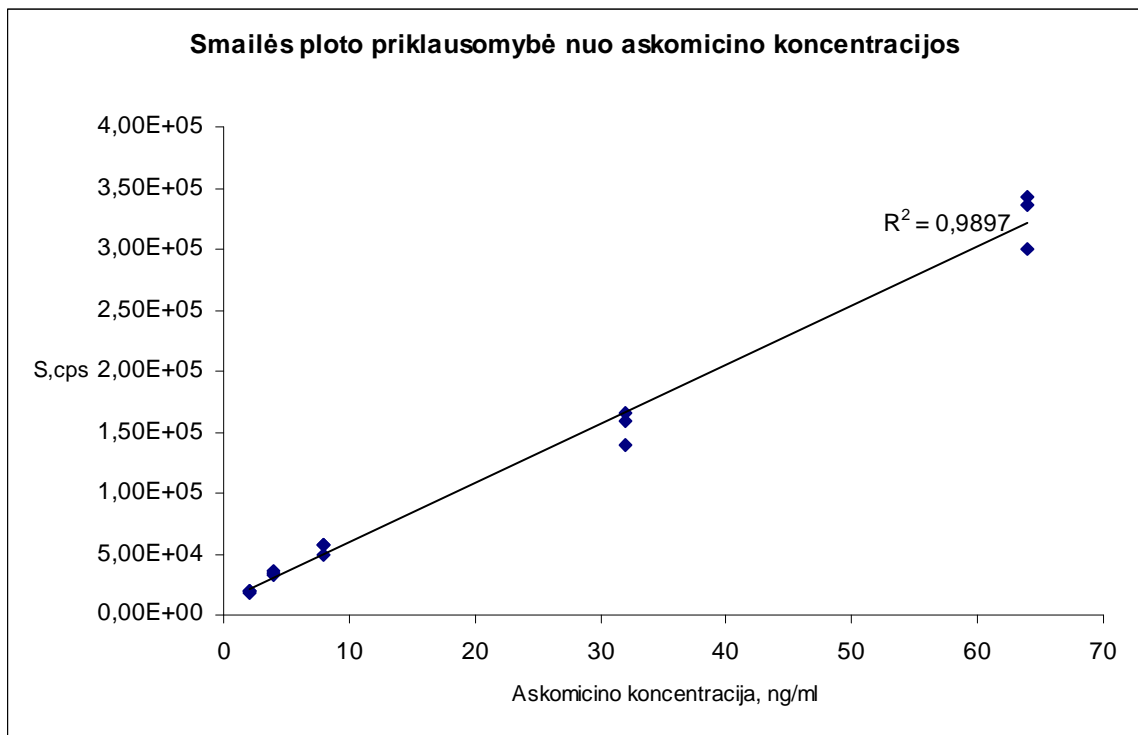
yra didesnis visų analičių atveju: askomicino vidutiniškai 30%, takrolimo – 32,5%, sirolimo – 46,4%. O keičiama skruzdžių rūgšties koncentracija žymios įtakos neturi.

Lyginant šių organinių rūgščių poveikį analizės rezultatams, galima pastebėti nedidelius skirtumus: naudojant skruzdžių rūgštį, gaunamos šiek tiek mažesnės analičių sulaikymo trukmės bei didesni chromatogramos smailių plotai. Atrodytų, kad rūgštis į bidistiliuotą vandenį apskritai neverta dėti, tačiau reikia nepamiršti, kad chromatografinės sąlygos yra atidirbinėjamos su etaloniniais analičių tirpalais, tačiau vėlesniame darbe jos turės būti optimalios tiriant kraujo ekstraktą – įvairių junginių mišinį, kurio sudedamųjų dalių protonizacija gali būti reikalinga kokybiškai jas atskirti. Todėl nuspręsta kituose eksperimentuose poliniu eluentu naudoti 0,1% skruzdžių rūgšties tirpalą.

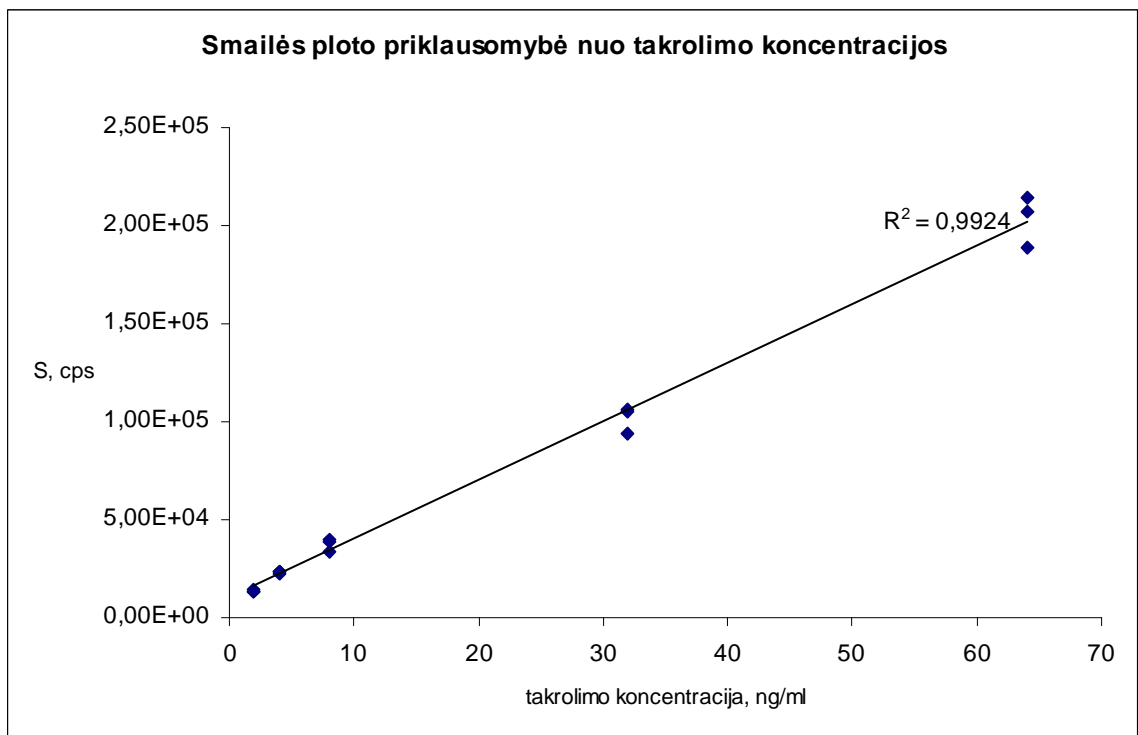
Tačiau šis polinio tirpiklio protonizacijos tyrimas parodė, kad izokratinis eliuavimo būdas turi trūkumų: išplitusios analičių zonos (dideli smailių plotai) rodo, kad gali būti nepakankamas analizės jautrumas. Todėl eliuavimo būdas buvo pakeistas gradientiniu kitame eksperimente.

6.3. Analizės tiesiškumo tyrimas ir paciento kraujo ekstrakto su žinoma sirolimo koncentracija analizė

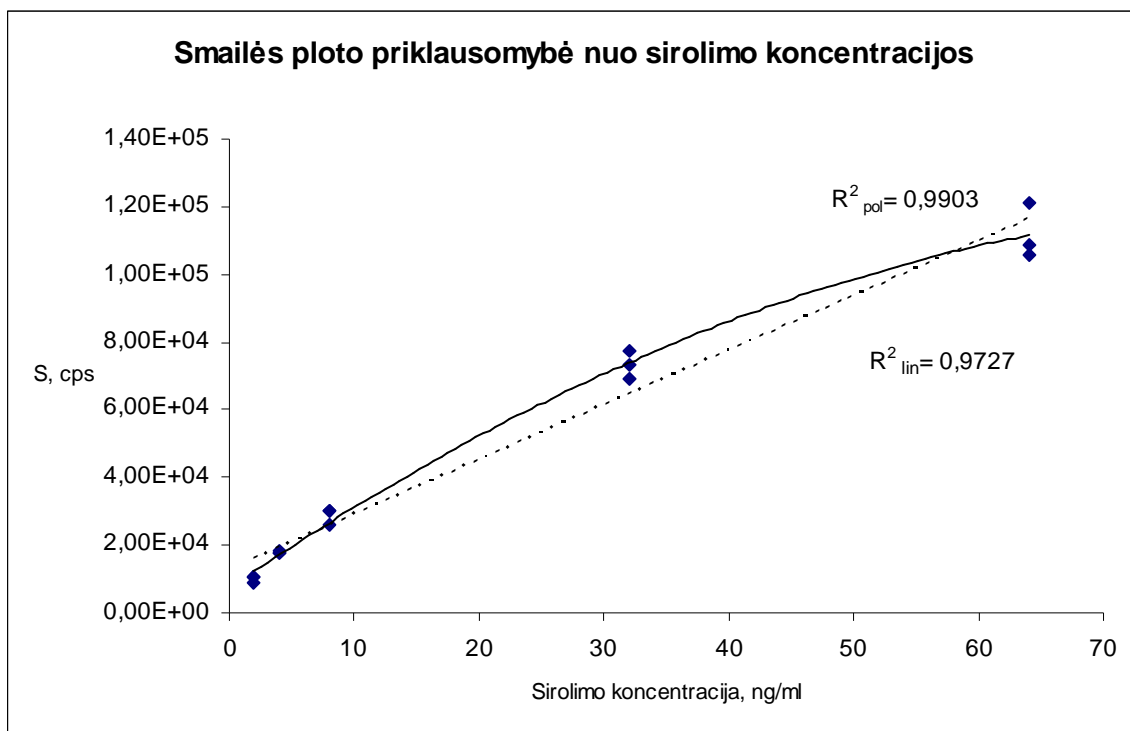
Anksčiau aprašytų eksperimentų rezultatai parodė, kad optimaliausias eliuavimas – sudarant gradientą, kai pradiniu chromatografinio vyksmo momentu metanolio procentinė dalis mobiliojoje fazėje yra 60%, o eliuavimo eigoje pakyla iki 99%. Todėl tikslinga paanalizuoti seriją skirtingų analičių koncentracijų mėginius, nes iki tol buvo analizuojami tos pačios 1µg/ml koncentracijos mėginiai. Buvo tirti mėginiai, kuriuose analičių koncentracijos 2-64ng/ml koncentracijos. Šis koncentracijų intervalas optimaliai atspindi terapinės sirolimo ir takrolimo kontrolės poreikius rutininėje praktikoje: jame yra ne tik pageidaujamos šių medikamentų koncentracijos pacientų kraujyje, bet ir kitos neretai nustatomos koncentracijos klinikinėse laboratorijose.



20 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo askomicino koncentracijos.

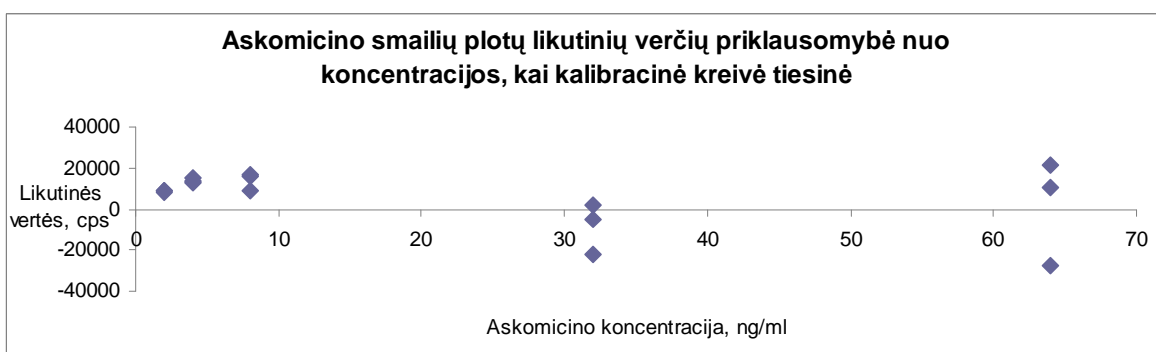


21 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo takrolimo koncentracijos.

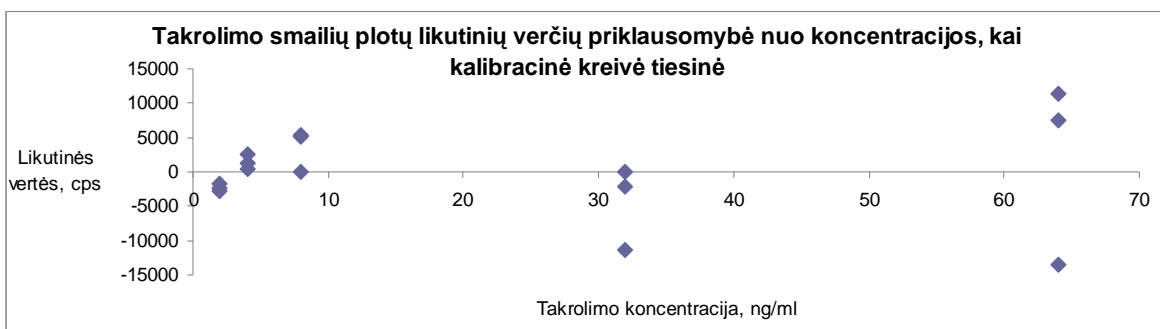


22 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo sirolimo koncentracijos.

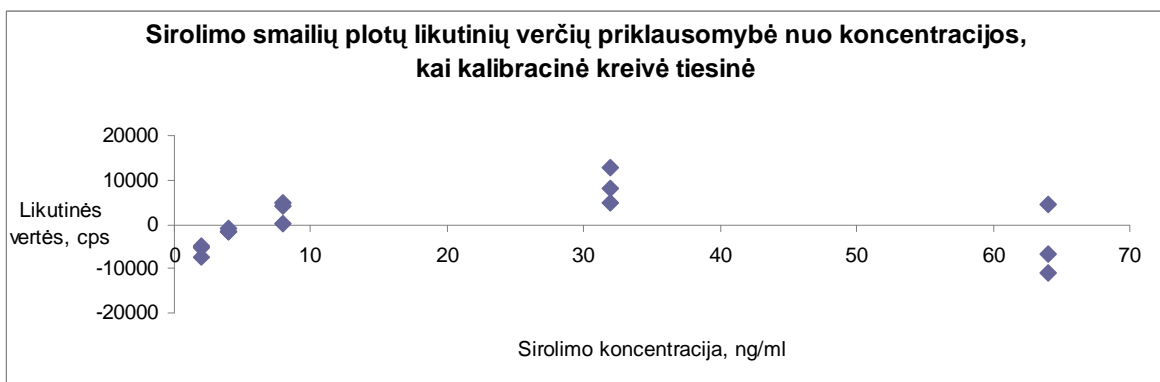
20, 21 ir 22 pav. vaizduoja analičių smailės plotų priklausomybę nuo analitės koncentracijos mėginyje. Išanalizuota mėginių serija parodė, kad askomicino ir takrolimo (20pav. ir 21pav.) smailių plotai chromatogramose didėja tiesiškai didėjant jų koncentracijai (koreliacijos koeficientai atitinkamai $r^2=0,9897$ ir $r^2=0,9924$). Tačiau sirolimo (22 pav.) smailės ploto priklausomybė nuo jo koncentracijos mėginyje ne tiesinė ($r^2=0,9727$), o kvadratinė ($r^2=0,9903$).



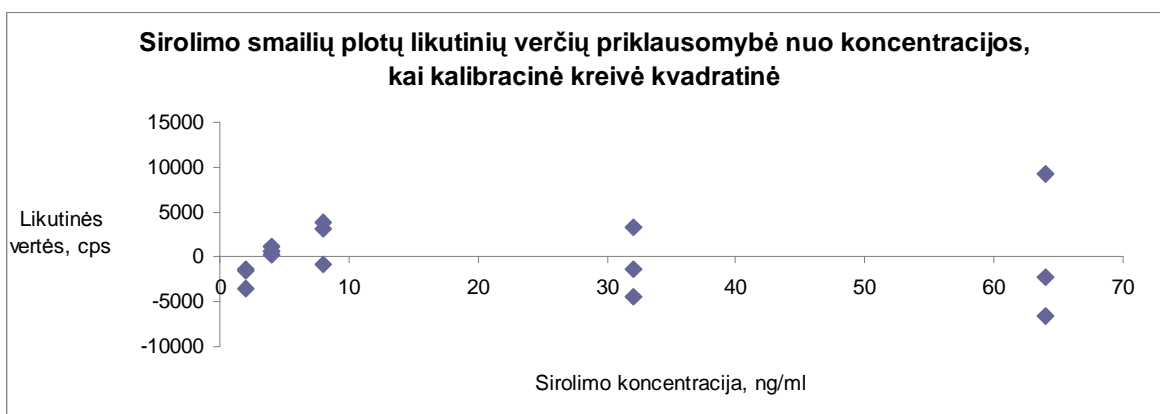
23 pav. Askomicino likutinių verčių analizė, kai tyrimo rezultatams aprašyti taikoma tiesinė lygtis.



24 pav. Takrolimo likutinių verčių analizė, kai tyrimo rezultatams aprašyti taikoma tiesinė lygtis.



25 pav. Sirolimo likutinių verčių analizė, kai tyrimo rezultatams aprašyti taikoma tiesinė lygtis.



26 pav. Sirolimo likutinių verčių analizė, kai tyrimo rezultatams aprašyti taikoma kvadratinė lygtis.

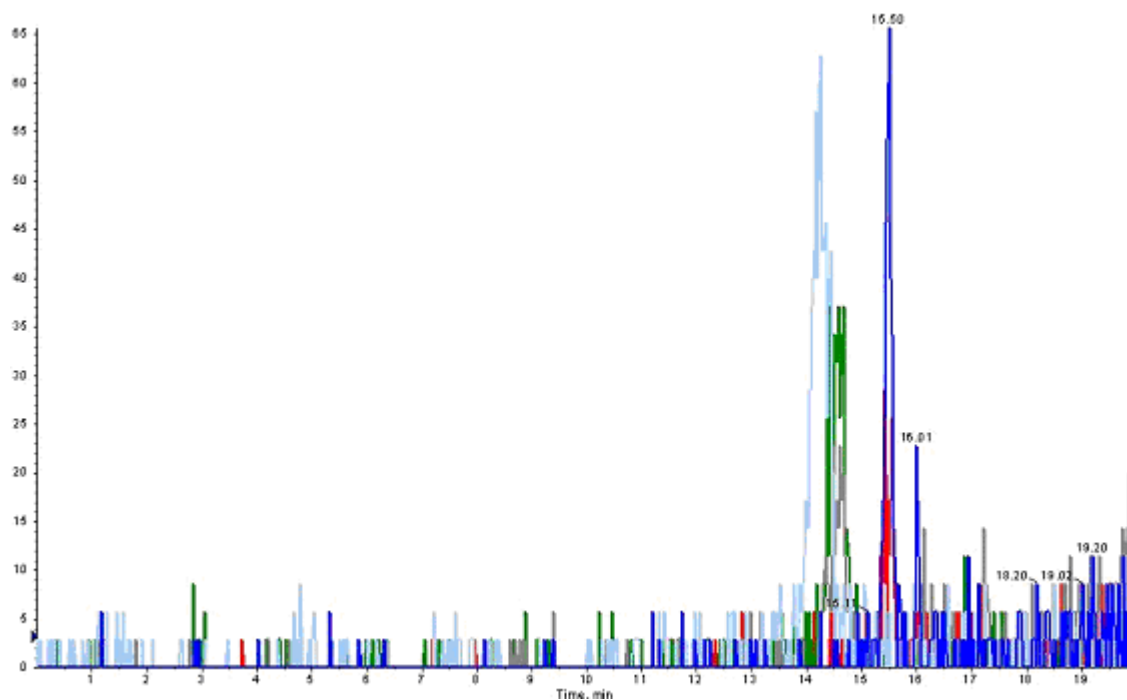
Apskaičiavus kiekvieno gauto dydžio likutines vertes, kai kalibracinė kreivė priskirta tiesinei, o sirolimo atveju, dar ir kvadratinei funkcijai, nubrėžtos likutinių verčių priklausomybės nuo analizės koncentracijos taškinės diagramos. 23, 24 ir 26 pav. taškai gana tolygiai išsibarstę apie horizontalią ašį, teigiamų ir neigiamų likutinių verčių skaičius apytiksliai lygus. Tai reiškia, kad kalibracinei kreivei priskirta teisinga funkcija. O 25 pav.

matome, kad teisė pabandyta išvesti per taškus, kuriems aprašyti labiau tiktų kvadratinė funkcija.

Papildomai atliktas statistinis Mandelio testas tik patvirtino linijiškumo neatitikimą tarp analičių: askomicino atveju $F=0,036$, takrolimo – $F=0,892$, o sirolimo – $F=22,284$ (kai $F_{krit}=4,747$). Tai galėtų būti dėl analičių cheminės struktūros skirtumų, sąlygojančių skirtingą jų sąveiką su kolonėlę užpildančiu sorbentu, eliuentais bei skirtingą jonizaciją masių spektrometre, tačiau tiksliai paaiškinti sunku. Akivaizdu, kad iki šio eksperimento optimaliomis laikytos chromatografinės sąlygos nėra visiškai tinkamos rutininei analizei.

Anksčiau minėtas gradientinio eliuavimo būdas buvo taikytas realiems pacientų, vartojančių sirolimą, kraujo mėginiams tirti. VULSK LDC Biochemijos laboratorijoje MEIA metodu buvo nustatytos sirolimo koncentracija šiuose mėginiuose. Kraujo ekstrakcijai taikyta 5.5 skyriuje aprašyta procedūra. MEIA metodu nustatytos sirolimo koncentracijos buvo 8-9 kartus didesnės, nei šiame eksperimente nustatytos sirolimo koncentracijos HPLC-MS/MS metodu. Toks ryškus neatitikimas galėjo atsirasti dėl kelių priežasčių: pirma – netinkamos chromatografinės sąlygos, dėl kurių dalis analitės lieka kolonėlėje, antra – netinkama kraujo ekstrakcijos procedūra, kai didelė dalis sirolimo lieka eritrocitų paviršiuje ir nepatenka į mėginį.

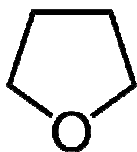
Todėl papildomai atliktas eksperimentas: paleistas mėginys su $1\mu\text{g/ml}$ analičių koncentracija ir iškart po to mėginys, kuriame tik dejonizuotas vanduo. Vandens mėginio chromatogramoje (27 pav.) registruotos smailės, kurių t_R sutapo su etaloninio tirpalo analitinių smailių t_R : $S_{askomicino}=1123\text{cps}$, $S_{takrolimo}=725\text{cps}$, $S_{sirolimo}=568\text{cps}$. Vadinasi, kolonėlėje lieka nedidelis kiekis analičių ir visa chromatografinė sistema yra nepusiausvira. Analizuojant mėginių seriją, šis analizės trūkumas gali sąlygoti dideles paklaidas.



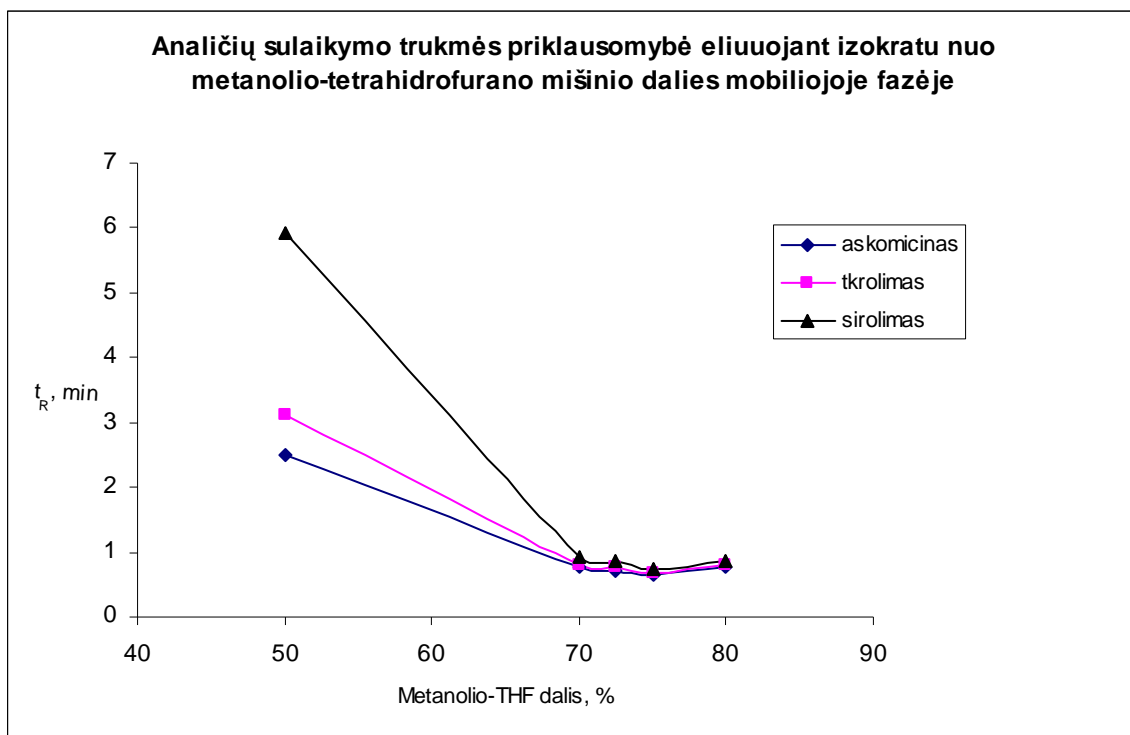
27 pav. Vandens chromatograma, gauta analizuojant vandens mėginį iškart po analičių standartinio tirpalo.

6.4. Nėpolinio tirpiklio – metanolio hidrofobiškumo didinimas

Norint papildomai optimizuoti chromatografinės analizės sąlygas, buvo nuspręsta padidinti nėpolinės mobiliosios fazės hidrofobiškumą. Tai pabandyta padaryti į metanolį pridedant tetrahidrofurano (THF) (28 pav.) santykiu 1:1. Išbandyti abu eliuacijos būdai (izokratinis ir gradientinis) siekiant nustatyti optimaliausią chromatografiniam analičių atskyrimui ir patogiausią rutininei praktikai.

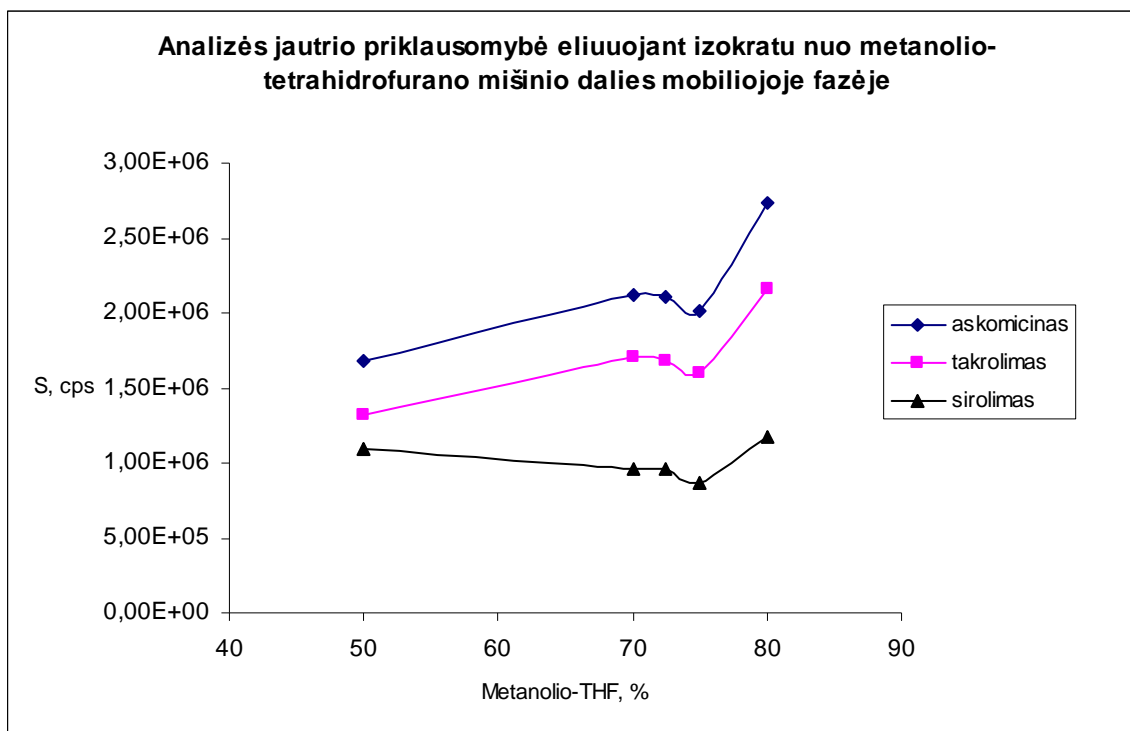


28 pav. Tetrahidrofuranas.



29 pav. Analičių sulaikymo trukmės priklausomybė eliuojant izokratu nuo metanolio-tetrahidrofurano mišinio dalies mobiliuoje fazėje.

29 pav. pateikti eksperimento rezultatai rodo, kad tirpiklio hidrofobiškumo padidėjimas žymiai sumažino analičių sulaikymo trukmes: kai metanolio-THF mišinio dalis mobiliuoje fazėje yra 70-80%, tai visoms trimis analitėms atskirti užtenka vienos minutės. Tačiau analičių zonos dengia viena kitą – jos nėra atskirtos. O sumažinus metanolio-THF mišinio dalį iki 50%, analizės laikas pailgėja ir atskyrimas akivaizdžiai pagerėja.



30 pav. Analizės jautrio priklausomybė eliuuojant izokratu nuo metanolio-tetrahidrofurano mišinio dalies mobilijoje fazėje.

30 pav. vaizduojama smailių plotų priklausomybė nuo metanolio-THF mišinio dalies mobilijoje fazėje. Didžiausiu analiziniu jautriu pasižymi eliuavimas, kai nepolinio tirpiklio dalis mobilijoje fazėje yra 80%: askomicino smailės plotas padidėjo vidutiniškai 38,3%, takrolimo – 37,5%, o sirolimo – 19,6%. O eliuojant mobiliąja faze, kurioje yra 50% metanolio-THF mišinio, sumažėjo analizės jautris askomicino vidutiniškai 24,8%, takrolimo – 26,3%, o sirolimo padidėjo vidutiniškai 10,8%.

Eliuojant mėginius mažesniu mobiliosios fazės judėjimo greičiu (kai metanolio-THF mišinio dalis eluente 50-60%), gautos labai plačios smailės ir prastas analičių atskyrimas chromatogramoje.

Šalia to, kad šiuose eksperimentuose tiriant analizinius parametrus gauti dviprasmiški rezultatai, išbandytos chromatografinės sąlygos netinka dėl fizikinių priežasčių. Pakeitus nepolinio tirpiklio hidrofobiškumą, žymiai padidėjo slėgis kolonėlėje. Šiomis sąlygomis dirbant jis pakilo iki vidutiniškai 270bar, kai ankstesnėmis sąlygomis dirbant buvo 170bar. Nors leistinas slėgis dirbant su šia aparatūra yra 0-400bar, tačiau yra didelė rizika, kad esant tokiems slėgiams gali būti pažeistas kolonėlę užpildantis sorbentas.

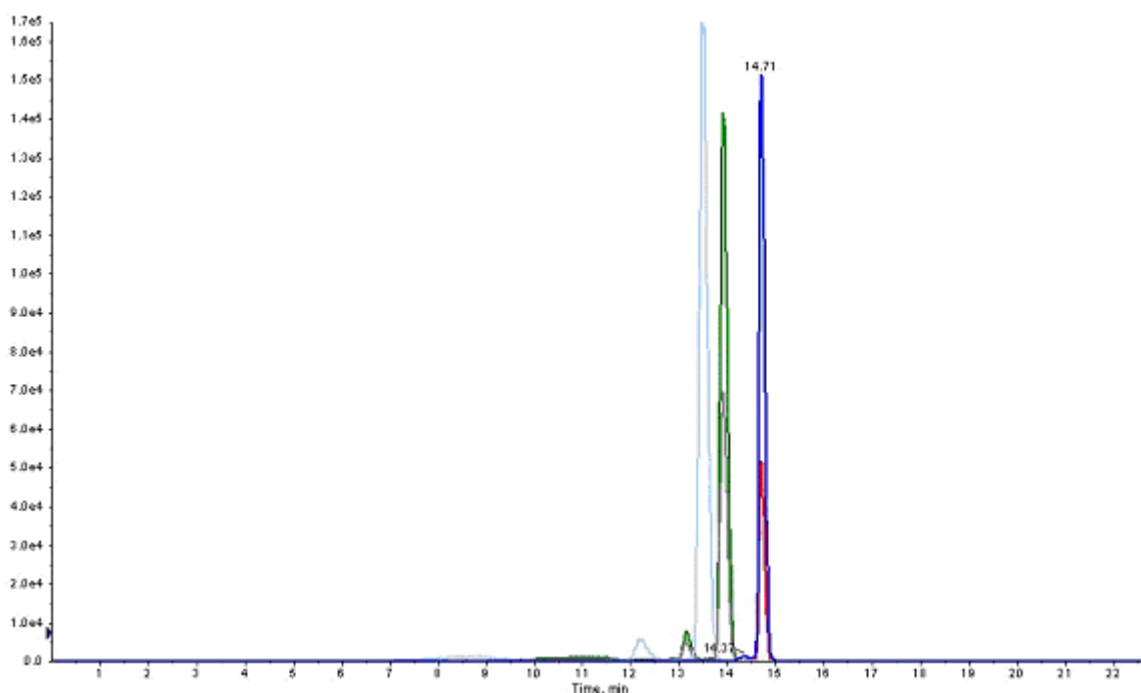
Tiriant gradientinę eliuaciją, buvo išanalizuotos chromatografinės sąlygos, esant įvairių dydžių nepolinio tirpiklio dalims pradiniu momentu ir keičiant mobiliosios fazės

judėjimo greitį, tikintis gauti geresnį analičių atskyrimą chromatogramoje ir mažesnes sulaikymo trukmes. Rezultatai pateikiami 1 lentelėje.

2 lentelė. Analizės parametrai esant gradientinei eliuacijai, kai nepoliniu tirpikliu naudojamas metanolio-THF mišinys.

Metanolio-THF dalis, pradiniu eliuacijos momentu, %	Mobiliosios fazės judėjimo greitis, ml/min	askomicinas		Takrolimas		sirolimas	
		t _R , min	S, cps	t _R , min	S, cps	t _R , min	S, cps
70	0,5	12,93	1,51E+06	13,12	1,22E+06	13,65	9,37E+05
60	0,5	12,39	1,35E+06	12,93	1,05E+06	14,43	8,29E+05
60	0,65	10,32	1,25E+06	10,81	1,01E+06	11,94	5,64E+05
60	0,4	13,48	1,76E+06	13,92	1,36E+06	14,71	1,13E+06
60	0,3	3,49	2,30E+06	3,82	8,95E+04	4,89	1,62E+06
50	0,3	9,28	2,18E+06	10,41	1,62E+06	14,64	1,49E+06

Galima pastebėti tendenciją, kad mažinant nepolinio tirpiklio procentinę dalį eliuente pradiniu momentu ir mobiliosios fazės judėjimo greitį, pasiekiamas didžiausias jautris ir analičių atskyrimas chromatogramoje. Optimaliausia chromatografinė analizė ir atskyrimas gaunamas eliuuojant mobiliąja faze, kurioje pradiniu momentu metanolio-THF mišinio dalis yra 60%, o mobiliosios fazės srauto judėjimo greitis 0,4ml/min (2 lentelė, ketvirta eilutė) pateikiama 31 pav. Labiausiai iš konteksto iškreinta chromatograma, kuri gauta tiriamąjį tirpalą eliuojant 0,3ml/min greičiu, kai metanolio-THF mišinio dalis pradiniu momentu yra 60% (2 lentelė, penkta eilutė). Analčių sulaikymo trukmės labai mažos, askomicino ir sirolimo smailių plotai dideli, o takrolimo – priešingai, pernelyg mažas. Be to, gautos labai plačios smailės. Tai puikiai iliustruoja tinkamo kolonėlės lygsvarinimo būtinybę – papildomą uždavinį (kliūtį) šiame darbe.



32 pav. Chromatograma, gauta mėginį eliuojant gradientu mobiliąja faze, kurioje pradiniu momentu yra 60% metanolio-THF mišinio, kai srauto tekėjimo greitis 0,4ml/min (žydra smailė yra askomicino signalas, žalia – takrolimo ir mėlyna – sirolimo).

3 lentelė. Gradientinio eliuavimo, kurį naudojant gauta 32pav. pateikta chromatograma, laiko programa.

Laikas, min	Metanolio-THF mišinio dalis mobiliojoje fazėje, %	0,1% skruzdžių rūgšties tirpalo dalis mobiliojoje fazėje, %
0,1	60	40
1	60	40
8	95	5
9	95	5
10	60	40
20	60	40

Po kiekvienos aprašytų chromatografinių sąlygų analičių standartinio tirpalo injekcijos buvo atliekama tuščio mėginio (t.y. dejonizuoto vandens) injekcija. Gauti mums nelabai palankūs rezultatai: chromatogramose matomos nedidelės analičių smailės, kai kuriais atvejais ne visų trijų, o tik sirolimo. Galime daryti išvadą, kad chromatografinės sąlygos mobiliojoje fazėje naudojant metanolio-THF mišinį tiek izokratinio, tiek gradientinio eliuavimo būdais tiriamosioms analitėms nėra idealios, tačiau optimalesnės nei anksčiau aprašyti eliuavimo metodai.

6.5. Nėpolinio tirpiklio keitimas: iš metanolio – į acetnitrilą

Literatūroje nurodoma, kad nėpoliniu tirpikliu mobiliojoje fazėje gali būti naudojamas acetnitrilas. Nors jo poliškumo indeksas yra didesnis nei metanolio (acetnitrilo 5,8, o metanolio 5,1, kai vandens 10,2), tačiau kai kuriose pasaulio laboratorijose analizuojant makrolidų grupės junginius eliuavimui sėkmingai naudojamas acetnitrilas. Toks eliuavimas buvo išbandytas ir šiame darbe: izokratiniu bei gradientiniu metodais ir keičiant srauto judėjimo greitį. Visais atvejais gautos sunkiai interpretuojamos chromatogramos: nors analičių sulaikymo trukmės kai kuriom sąlygom nedidelės, tačiau smailės plačios, atskyrimas blogas. Smailės nesimetriškos, netaisyklingų viršūnių, todėl jas būtų sudėtinga pritaikyti kiekybinei analizei, net ir suintegravus. Tikriausiai taip atsitinka dėl analizei naudojamos kolonėlės ypatybių.

7. IŠVADOS

Ištirtos chromatografinės sąlygos, reikalingos imunopresantams analizuoti HPLC–MS/MS metodu.

1. Buvo išbandyti abu eliuavimo būdai (izokratinis ir gradientinis), mobiliosios fazės sudėtinėmis dalimis parinkus tirpiklius, remiantis literatūros duomenimis: metanolį ir vandeninį 0,2% acto rūgšties tirpalą. Gauti analizės chromatografiniai parametrai, esant izokratiniam eliuavimui, yra patenkinami, tačiau tolesni eksperimentai parodė gradientinio eliuavimo pranašumus.
2. Išbandytas varijuojantis polinio tirpiklio parūgštinimas skruzdžių bei acto rūgštimis. Gauti rezultatai rodo, kad eliuento protonizacija analizės kokybei reikšmės neturi. Tačiau remiantis literatūros duomenimis nuspręsta palikti 0,1% skruzdžių rūgšties koncentraciją kraujo ekstraktų analizei.
3. Taikant gradientinį eliuavimo būdą, buvo ištirtas analizės tiesiškumas: analizės jautrio priklausomybė nuo analizės koncentracijos mėginyje yra tiesinė tik vidinio etalono – askomicino ir takrolimo atvejais, o sirolimo atveju ši priklausomybė yra kvadratinė. Nustatyta, kad tai lemia chromatografinės sistemos nepusiausvyrumas esant naudotai mobiliajai fazei.
4. Gauti geri analizės rezultatai, padidinus nepolinio eliuento hidrofobiškumą, pridedant į jį tetrahidrofurano (ypač esant gradientiniam eliuavimui).
5. Pakeitus metanolį acetonitrilu, gauti nepalankūs rezultatai.

8. SUMMARY

Measurement of Sirolimus and Tacrolimus in Patients Blood after Renal Transplantation by High-Performance Liquid Chromatography

This study presents optimization of sirolimus and tacrolimus measurement in patients blood after renal transplantation by high-performance liquid chromatography with mass-spectrometry detection. In experiments with standart solutions of sirolimus and tacrolimus, using ascomycin as internal standart, chromatographical conditions were tested: type of eluation (isocratical and gradiental), properties of eluents (variable acidity of polar solvent and hydrophobity of nonpolar solvent), linearity of analysis. Patient blood extraction procedure was also tested. Sirolimus concentrations measured by HPLC-MS/MS method were 8-9 times lower as received by MEIA method. Both types of eluation were not sufficient for routine analysis in clinical laboratory, when eluents methanol and 0,2% acetic acid solvent were used. Gradiental eluation seamed to be better, but linearity analysis of sample series showed, that chromatographical system was not well-balanced. Methanol was changed to acetonitrile, but separation and retention time of analytes were even worse. Best results were obtained using mixture of methanol and tetrahydrofuran as nonpolar eluent.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. www.transweb.org/reference/timeline/800bc.htm
2. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas: Šviesa, 2001; p. 312-9.
3. www.thedrugmonitor.com
4. Lindenfeld J, Miller G, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL, Kobashigawa J. Drug Therapy in the Heart Transplant Recipient. Part II: Immunosuppressive drugs. *Circulation*. 2004; 110: 3858-65.
5. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer Immunosuppressive Drugs: A Review. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1366-80.
6. Chen Y, Hirabayashi H, Akhtar S, Pelzer M, Kobayashi M. Simultaneous determination of three isomeric metabolites of tacrolimus (FK506) in human whole blood and plasma using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chrom B*; 830: 330-41.
7. Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressive drugs: mechanisms and strategies for controlling them. *Clin Chem*. 1996; 42: 1316-21.
8. Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Tacrolimus has less fibrogenic potencial than cyclosporin in a model of renal ischaemia – reperfusion injury. *British J Surgery*. 2000; 87: 1563-8.
9. Canzanello VJ, Textor SC, Taler SJ, Schwartz LL, Porayko MK, Wiesner RH, Krom RAF. Late Hypertension After Liver Transplantation: A Comparison of Cyclosporine and Tacrolimus (FK 506). *Liver Transplantation and Surgery*. 1998; 4: 328-34.
10. Rainienė T, Papinigienė L, Laurinavičius A. Nefrotoksinis Ciklosporino A poveikis po inkstų persodinimo. *Medicina*. 2003, 39(1): 161-5.
11. Tian H, Ou J, Strom SC, Venkataramanan R. Pharmacokinetics of tacrolimus and mycophenolic acid are altered, but recover at different times during hepatic regeneration in rats. *DMD*. 2005; 33: 329-35.
12. Zimmerman JJ. Exposure-Response Relationships and Drug Interactions of Sirolimus. *AAPS J*. 2004; 6: e 28.
13. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Onc*. 2005; 16: 525-37.

14. Zhang JF, Liu JJ, Lu MQ, Cai CJ, Yang Y, Li H, Xu C, Chen GH. Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transplant Immunology*. 2007; 17: 162-8.
15. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman JB, Marks AR. Rapamycin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *JCI*. 1996; 98: 2277-83.
16. Abbot Diagnostics. Sirolimus REF 5C91-21 ABBL035/R6. Package insert.
17. Paul Salm P, Taylor PJ, Pillans PI. Analytical Performance of Microparticle Enzyme Immunoassay and HPLC-Tandem Mass Spectrometry in the Determination of Sirolimus in Whole Blood. *Clin Chem*. 1999; 45: 2278-80.
18. <http://www.vapbm.org>
19. Ašakienė E, Rainienė T, Dainys B. Pirmoji sirolimo (Rapamune®) vartojimo po inkstų persodinimo patirtis Lietuvoje. *Medicina*. 2005; 41 (1): 93-100.
20. Storger H, Grube E, Hofmann M, Schwarz F, Haase J. Clinical experiences using everolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease. *J interventional cardiology*. 2004; 17: 387-90.
21. Eisen HJ, Tuzcu M, Dorent R. Everolimus for the Prevention of Allograft Rejection and Vasculopathy in Cardiac-Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2003;349:847-58.
22. Bowers LD. Analytical goals in Therapeutic drug monitoring. *Clin Chem*. 1997; 44: 375-80.
23. Lothar T, editor. *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main, Germany: TH-Books Verlagsgesellschaft. 1998; p. 1073-91.
24. Johnston A, Holt DW. *Immunosuppressant drugs – the role of the therapeutic drug monitoring*. Blackwell Science. 2001; 52: 61-73.
25. Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL. Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem*. 1998; 44: 428-32.
26. Yatscoff RW. Laboratory support for transplantation. *Clin Chem*. 1994; 40: 2166-73
27. Pini LA, Gallesi D, Brovia D, Bertolini A, Pinetti D, Ruggieri V, Pisa S, Poppi B, Castellana CN. Switching From HPLC/UV to MEIA for Whole Blood Sirolimus Quantitation: Comparison of Methods. *J Clin Lab Analysis*. 2006; 20: 239-44.
28. Armbruster DA, Hubster EC, Kaufman MS, Ramon MK. Cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) for drugs-of-abuse screening. *Clin Chem*. 1995; 41: 92-8.

29. Colantonio DA, Borden KK, Clarke W. Comparison of the CEDIA® and MEIA® assays for the measurement of sirolimus in organ transplant recipients. *Clin Biochem.* 2007; 40: 680-7.
30. Goodyear N, Napoli KL, Murthy JN, Kahan BD, Soldin SJ. Radioreceptor assay for Sirolimus in Patients with decreased Plateled Counts. *Clin Biochem.* 1997; 7: 539-43.
31. Goodyear N, Napoli KL, Murthy JN, Kahan BD, Soldin SJ. Radioreceptor Assay for Sirolimus. *Clin Biochem.* 1996; 5: 457-60.
32. Oellerich M, Armstrong VW, Schu E, Shaw LM. Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine and Tacrolimus. *Clin Biochem.* 1998; 5: 309-16.
33. Mickevičius D. Cheminės analizės metodai. II dalis. Vilnius: Žiburys, 1998, p. 256-64.
34. Skoog DA, West DM, Holler FDY. *Fundamentals of analytical Chemistry.* USA, 1996, p. 660-84, 701-24.
35. <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>
36. Ginkel LA, Ruiter A. LC-MS – a powerful tool in residue analysis of veterinary drugs. Proceedings for Conference, EURORESIDUE IV 2000, May 8-10, Veldhoven, Netherlands, p. 2063-71.
37. Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chrom B.* 2004; 805: 215-22.
38. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F. Assessment of sirolimus concentrations in whole blood by highperformance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chrom B.* 2002; 774: 187-94.
39. Christians U, Jacobsena W, Serkovaa N, Beneta LZ, Vidal C, Sewing K, Manns MP, Kirchner GI. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chrom B.* 2000; 748: 41-53.
40. Taylor PJ, Johnson AG. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by highperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chrom B.* 1998; 718: 251-7.
41. Bogusz MJ, Enazi EA, Hassan H, Abdel-Jawaad J, Ruwaily JA, Tufail MA. Simultaneous LC–MS–MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure. *J Chrom B.* 2007; 850: 471-80.

42. Kirchner GI, Vidala C, Jacobsenc W, Franzkeb A, Hallensleben K, Christians U, Sewing KF. Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and ciclosporin in blood by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chrom B.* 1999; 721: 285-94.
43. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in Whole Blood. *Clin Chem.* 2002; 6: 955-8.
44. Streit F, Christians U, Schiebel HM, Napoli KL, Ludger E, Linck A, Kahan BD, Sewing KF. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem.* 1996; 9: 1417-25.
45. Khoschorur GA. Simultaneous Measurement of Sirolimus and Everolimus in Whole Blood by HPLC with Ultraviolet Detection. *Clin Chem.* 2005; 9: 1721-4.
46. Taylor PJ, Johnson AG. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high–performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chrom B.* 1998; 718: 251-7.
47. Ramakrishna NVS, Vishwottam KN, Puran S, Manoj S, Santosh M, Wishu S, Koteswara M, Chidambara J, Gopinadh B, Sumatha B. Liquid chromatography–negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of tacrolimus in human plasma and its bioanalytical applications. *J Chrom B.* 2004; 805: 13-20.