

<https://helda.helsinki.fi>

Immunosuppressiivisten lääkeaineiden analytiikka nestekromatografiatandem- massaspektrometrialla

Becker, Anna

2017

Becker , A & Itkonen , O 2017 , ' Immunosuppressiivisten lääkeaineiden analytiikka
nestekromatografiatandem- massaspektrometrialla ' , Kliin lab : kliinisen laboratorioalan
julkaisu : SKKY:n jäsenlehti. , Vuosikerta. 34 , Nro 3 , Sivut 49-51 . <
<http://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/3.2017%20Kliinlab%20.pdf> >

<http://hdl.handle.net/10138/224560>

publishedVersion

Downloaded from Helda, University of Helsinki institutional repository.

This is an electronic reprint of the original article.

This reprint may differ from the original in pagination and typographic detail.

Please cite the original version.

Immunosuppressiivisten lääkeaineiden analytiikka nestekromatografia-tandem-massaspektrometrialla

Anna Becker ja Outi Itkonen

Johdanto

Vuosi 2016 oli elinluovutuksissa ja – siirroissa ennätysvuosi: elimiä saatiin 132 luovuttajalta ja tehtiin yhteensä 399 elinsiirtoa (HUS intranet). Eniten siirrettiin munuaisia (262 kpl) ja maksoja (61 kpl), mutta myös haiman-, sydämen- ja keuhkonsiirtoja tehtiin. Eliministö ja/tai siirre hylkivät toisiaan (graft versus host, host versus graft). Hyljintäreaktioita on kolmea eri tyyppiä. Hyperakuutti hyljintä (minuuteissa) perustuu HLA-antigeeneihin ja on estettävissä sopivuuskokein. Akuutti hyljintä (3 vrk – 3 kk) on T-soluvälitteinen ja hoidetaan hyljinnänestolääkityksellä. Krooninen hyljintä on pidemmällä aikavälillä ilmenevä reaktio, jonka mekanismit ovat epäselviä ja jossa hoitona on uusi siirre.

Elinsiirron jälkeen potilas siis tarvitsee immunosuppressiohoitoa ja käytettyjen lääkeaineiden pitoisuuksien seuranta läpi loppuelämän. Liian alhainen hyljinnänestolääkitys johtaa siirteen hyljintään, kun taas liian suurina pitoisuuksina potilas altistuu munuais-, maksa-, sydän- ja/tai haimavaurioille, tulehduksille tai saattaa kehittää anemian, verenpainetta, trombosytopeniaa tai tällä on kohonnut syöpäalttius. Siksi hyljinnänestolääkityksen monitorointi ja käytettyjen mittausten menetelmien korkea laatu on ensiarvoisen tärkeää. Kautta aikojen Suomessa on tehty noin 4500 elinsiirtoa, joten monitoroitavaa riittää! Yksin HUSLABissa tehdään yli 30.000 siklosporiini A- ja takrolimuusimääritystä vuodessa.

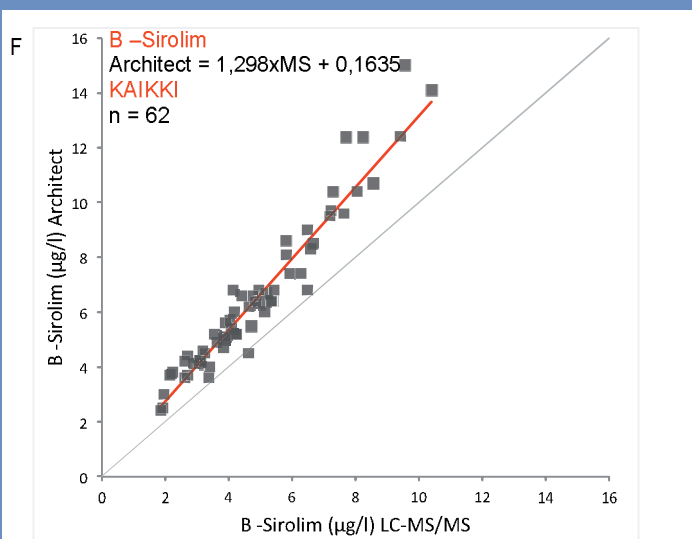
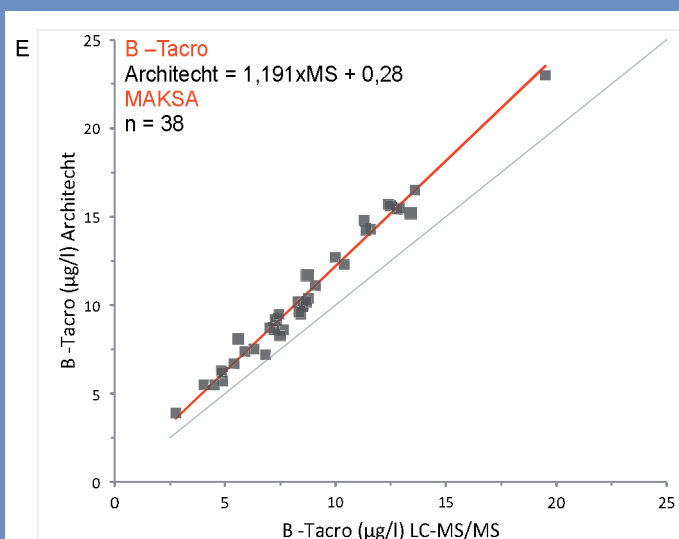
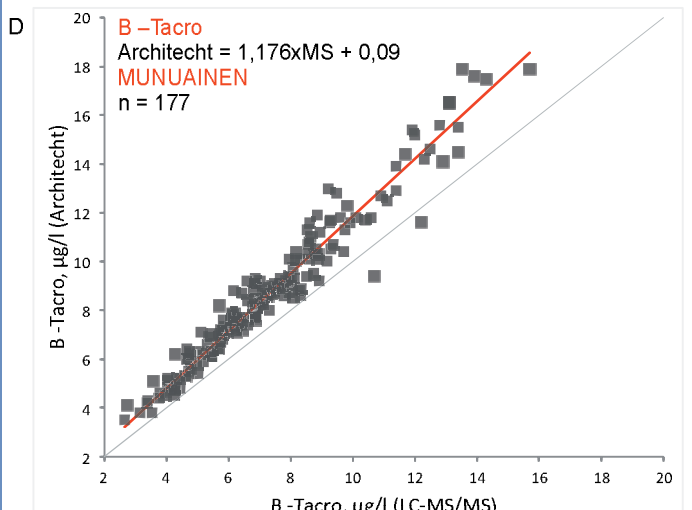
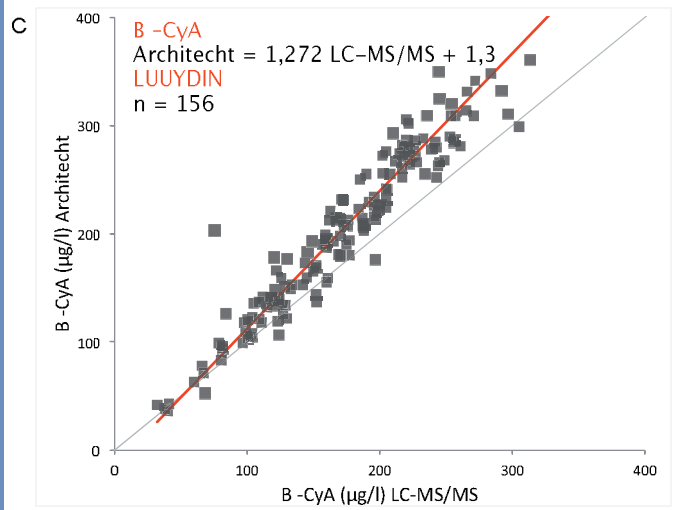
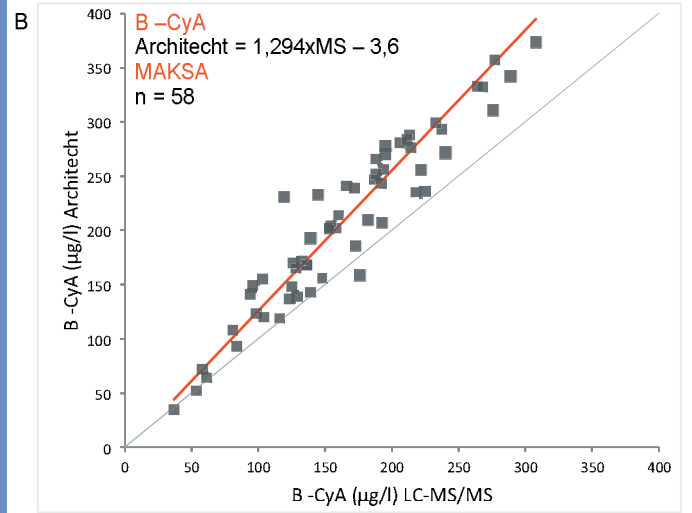
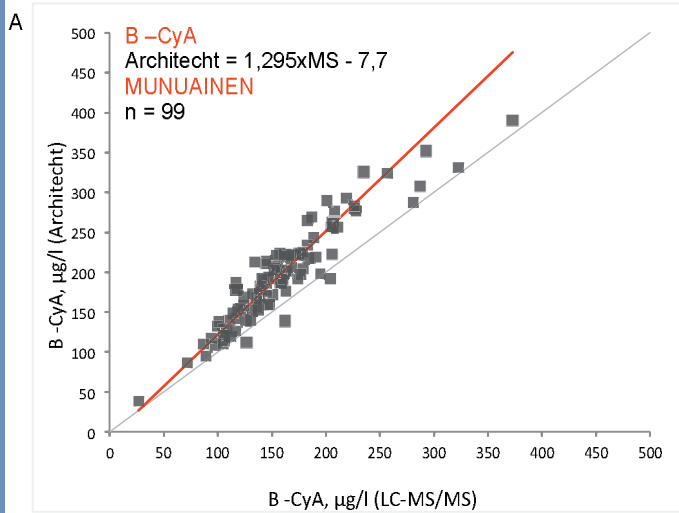
Ensimmäiset menetelmät immunosuppressiivisten lääkeaineiden mittaamiseksi perustuivat immunologiaan. Myöhemmin niiden heikompi selektiivisyys ja tarkkuus voitiin osoittaa vertaamalla kromatografisiin menetelmiin. Nykyään määritysmenetelmä perustuu enenevässä määrin nestekromatografia-tandem-massaspektrometriaan (LC-MS/MS). Kansainvälisissä siklosporiini A:n ja takrolimuusin ulkoisen laadunarvioinnin ohjelmissa yli 40% laboratorion on ilmoittanut menetelmäkseen LC-MS/MS. Sirolimuusin kohdalla osuus on jo yli 70%. Laadunarviointikierrosten tuloksista on nähtävissä, että immunometriaan perustuvien määritysmenetelmien tulostaso on korkeampi kuin LC-MS/MS:aan perustuvien ja että erityisesti joidenkin siklosporiini A -menetelmien variaatio on korkeahko verrattuna LC-MS/MS:aan.

HUSLABin LC-MS/MS – menetelmä

HUSLAB on siirtynyt LC-MS/MS – menetelmään veren siklosporiini A:n, takrolimuusin ja sirolimuusin määrittämisessä 1.5.2017 alkaen (B –CyA-MS (21262) B –Siklosporiini A, massaspektrometrinen; B –TacroMS (21622) B –Takrolimuusi, massaspektrometrinen; B –SiroMS (21623) B –Sirolimuusi, massaspektrometrinen). Yksi ja sama menetelmä mittaa kaikkia kolmea lääkeainetta samalla kertaa. Menetelmä perustuu kokoverinäytteen solujen hajottamiseen ja proteiinien saostamiseen sinkkisulfaatti-metanoliseoksella isotoopileimatun sisäisen standardin kanssa. Kromatografia perustuu propyylyisyano-kytkettyyn kiinteään faasiin (XSelect HSS CN, Waters) erittäin korkean paineen nestekromatografilla (Thermo Fisher Ultimate) vesimetanoligradientilla. Yhden kromatografian kesto on 3,2 min. Näytteensyöttäjänä on moniajo- eli multiplexing-laitteisto Transcend II (Thermo Fisher), joka injisoi näytettä vuorotellen kahteen eri kolonniin 1,6 minuutin välein. Moniajolaite ohjaa kummastakin kolonnista eluenttia vuorotellen yhdelle MS-laitteelle vain sen 36 sekuntia, jolloin tutkittavat lääkeaineet eluovutuvat kolonnista. MS-laitteena on AB Sciexin API4000-sarjan kolmoiskvadrupolilaitte. Lääkeaineiden detektio perustuu valittujen ionien monitorointiin (MRM). HUSLABissa on käytössä kaksi identtistä laitteistoa, joilla kummallakin pystytään analysoimaan näytteitä 1,6 minuutin välein. HUSLABin moniajolaitteet ovat ensimmäiset laatuaan Suomessa. Pohjoismaissa ja muualla maailmassa niistä sen sijaan on jo runsaasti hyviä kokemuksia. Menetelmässä käytetään kaupallisia kalibraattoreita ja laadunohjausnäytteitä (Chromsystems) ja näytteiden pitoisuus lasketaan vertaamalla analyytin ja sisäisen standardin suhdetta vakiokuvaajaan. Menetelmä kattaa hyvin mittausalueeltaan kliinisen käyttötärpeen ja on toistettava (Taulukko 1) ja spesifinen.

Kliininen validointi

Kliinisessä validoinnissa käytettiin HUS:in elinsiirtoja tekevien osastojen ja elinsiirtopotilaita hoitavien poliklinikkojen potilasnäytteitä. Validoinnissa käytettiin



Kuva 1. Abbott Architect – analysaattorilla ja LC-MS/MS – menetelmällä määritetyt pitoisuudet potilasnäytteillä. Passing-Bablok-analyysit siklosporiini A (A, B, C), takrolimuusi (D, E) ja sirolimuusi (F) – tuloksista munuaisen- (A, D), maksan- (B, E), luuytimen-siirto- (C) ja kaikista (F) potilaista.

Taulukko 1. Immunosuppressiivisten lääkeaineiden LC-MS/MS – menetelmän analyttisen validoinnin tuloksia. LOD, detektioraja; LOQ, kvantitointiraja.

Ominaisuus	B -CyA-MS	B -TacroMS	B -SiroMS
Lineaarisuus (µg/l)	3 - 1840	1,1 - 42,3	0,3 - 49
Kokonaisvariaatio	<5%	<11%	<9%
Alin vastattava (µg/l)	25	2,2	2,3

näytteitä munuaisen-, maksan- ja luuytimensiirtopotilaista. Näytemuotona on EDTA-veri.

Vertailumenetelminä käytettiin Abbott Diagnostics Division:in tarvittavia reagenssikittejä, kalibraattoreita ja laadunohjausnäytteitä Architect i2000SR analysaattorilla HUSLABin Virologian osastolla. Analyysi suoritettiin reagenssivalmistajan ohjeiden mukaan, B –CyA kuitenkin rinnakkaismäärityksenä. Vertailumenetelmä on kemiluminometrinen mikropartikkeli-immunomenetelmä (CMIA).

Kaikkien kolmen tutkitun hyljinnänestolääkkeen pitoisuudet ovat korkeampia CMIA – menetelmällä verrattuna LC-MS/MS menetelmään. Eri elinsiirtoryhmien väliset erot ovat pieniä. Sen sijaan eri potilaiden näytteissä ero saattaa olla merkittävä (Kuva 1). Elinsiirtopotilaiden näytteissä B –CyA tulostaso oli keskimäärin 27% - 30% tai 24 - 42 µg/l korkeampi CMIA:lla kuin LC-MS/MS –menetelmällä. Vastaavat erot B –Tacro – pitoisuuksissa olivat 18% - 19% tai 1,5 – 1,9 µg/l ja B –Sirolim –pitoisuuksissa 30% tai 1,7 µg/l. Erot menetelmien tulostasoissa johtuvat todennäköisesti immunomenetelmien vasta-aineiden ristireaktiosta lääkeaineen metaboliitteja kohtaan, tunnetusta kyvettimuovista johtuvasta variaatiosta tai muista immunomenetelmiä häiritsevistä tekijöistä.

Lopuksi

HUSLABissa on 1.5.2017 alkaen käytössä spesifinen, herkkä ja tarkka määritysmenetelmä verinäytteen sik-

losporiini A:n, takrolimuusin ja sirolimuusin mittaamiseksi. Analyysjä tehdään päivittäin vuoden jokaisena päivänä. Klo 13 mennessä laboratorioon saapuneet näytteet analysoidaan saman päivän aikana, sen jälkeen saapuneet seuraavan aamupäivän aikana. LC-MS/MS- ja CMIA-menetelmien välisestä keskimääräisestä tulostason erosta huolimatta yksittäisen potilaan näytteestä mitattu ero voi olla olematon tai merkittävä. Tästä syystä HUSin elinsiirtopotilaita hoitavat kliinikot ovat kevään aikana saaneet potilasvastauksia molemmilla menetelmillä, jotta uusiin menetelmiin siirtymisen sujuisi potilasturvallisuutta vaarantamatta. Vaikka menetelmävaihdoksessa tulostason muutos aiheuttaa hoitaville lääkäreille epämukavuutta, niin tärkeintä kuitenkin on, että uusien menetelmien käyttöönoton myötä siklosporiini A-, takrolimuusi- ja sirolimuusitulosten oikeellisuus paranee.

Anna Becker, FM

Tutkija

HUSLAB Erikoiskemian laboratorio

anna.becker@hus.fi

Outi Itkonen, FT, dos.

Prosessivastaava

HUSLAB Erikoiskemian laboratorio

outi.itkonen@hus.fi



Kuva Henrik Alfthan