

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra lékařských a biologických věd

**Stanovení cyklosporinu A a takrolimu
v biologickém materiálu**

(bakalářská práce)

Jihlava, 2009

Michal Kohoutek

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji ing. Šárce Coufalové za pomoc při vytváření grafů, dodání a objasnění podkladů ke zhodnocení kontrolních cyklů.

1	ABSTRAKT	4
1.1	Cíl.....	4
1.2	Hlavní poznatky.....	4
1.3	Závěry.....	4
2	ABSTRACT	5
2.1	Background.....	5
2.2	Main Findings.....	5
2.3	Conclusions	5
3	ÚVOD	6
4	DŮVODY POUŽITÍ IMUNOSUPRESIV	6
5	TAKROLIMUS	7
5.1	Historie	7
5.2	Struktura a vlastnosti.....	7
5.3	Použití a osud v organismu	8
5.3.1	Absorpce.....	9
5.3.2	Distribuce	9
5.3.3	Metabolizmus	9
5.3.4	Exkrece.....	9
5.4	Vedlejší účinky a interference.....	9
5.5	Mechanismus účinku	10
6	CYKLOSPORIN A	10
6.1	Historie	10
6.2	Struktura a vlastnosti.....	11
6.3	Použití a osud v organismu	11
6.3.1	Absorpce.....	12
6.3.2	Distribuce	12
6.3.3	Metabolizmus	12
6.3.4	Exkrece.....	12
6.4	Vedlejší účinky a interference.....	13
6.5	Mechanismus účinku	13

7	INSTRUMENTACE	13
7.1	Abbott IMx.....	13
7.1.1	Metodika.....	14
7.1.2	Optické měření	15
7.2	Abbott Axsym	16
7.2.1	Metodika.....	16
7.2.2	Optické měření	18
8	RUTINNÍ STANOVENÍ V KLINICKÉ LABORATOŘI.....	19
8.1	Zavedení metody a validace	19
8.1.1	Statistické zpracování validačních měření	19
8.2	Vnitřní kontrola kvality	22
8.2.1	Statistické zpracování vnitřních kontrol kvality.....	22
8.3	Externí kontrola kvality.....	23
8.3.1	Výsledky externích kontrol kvality	23
8.4	Odběr, zasílání a skladování materiálu.....	24
9	ZÁVĚR	24
10	POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE	25

1 ABSTRAKT

Michal Kohoutek

Stanovení cyklosporinu A a takrolimu v biologickém materiálu

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalýtika, kombinovaná forma

1.1 Cíl

Cílem této práce je pomocí tištěných i elektronických podkladů nastínit medicínské důvody používání dvou imunosupresivních léků takrolimu a cyklosporinu A, jejich historii a farmakologické vlastnosti.

V praktické části pak práce ukazuje podstatu instrumentálních metod používaných v biochemické laboratoři v Nemocnici Jihlava od listopadu 2007 ke stanovení koncentrací léčiv v plné krvi a pomocí grafů a tabulek hodnotí kontrolní mechanismy laboratorního procesu.

1.2 Hlavní poznatky

Cyklosporin A, izolovaný poprvé v roce 1970 a takrolimus, objevený roku 1984, jsou látky původem z půdních hub. Používají se zejména v transplantační medicíně k prevenci orgánové rejekce. Mechanismus účinku spočívá v blokování exprese genu pro interleukin – 2. Ten slouží lymfocytům jako růstový a proliferační faktor a bez jeho aktivity dojde k potlačení imunitní odpovědi.

Ke stanovení hladin imunosupresiv používá naše laboratoř dva automatické analyzátory firmy Abbott, jejichž metody jsou založeny na reakci analytu se specifickou protilátkou a detekci fluorescenční emise (MEIA), respektive její polarizaci (FPIA).

1.3 Závěry

Z hodnocení srovnávacích měření mezi našimi zaváděnými metodami a fotometrickou detekcí, používanou v IKEM, z výsledků pravidelných měření

vnitřních a externích kontrol kvality vyplývá, že metody jsou stabilní a použitelné pro rutinní sledování hladin v patientských vzorcích.

2 ABSTRACT

2.1 Background

Aim of this work applying printed and electronic backgrounds is to sketch medical reasons for use of two immunosuppressants – tacrolimus and cyclosporine, as well as their history and pharmacological attributes.

At practical part shows work basements of instrumental methods used in biochemical laboratory of Jihlava hospital for drug concentrations measurement in patients' whole blood samples since November 2007.

With the use of plots and tables work also evaluates quality assurance of laboratory process.

2.2 Main Findings

Cyclosporine A isolated first in 1970 and tacrolimus, discovered in 1984, are substances of fungal origin. They are used mainly in transplantation medicine to prevent organ rejection.

Mode of action consists of interleukin – 2 gene expression inhibition. IL-2 serves to lymphocytes as a growth and proliferation factor. Without its activity immune response gets suppressed.

For immunosuppressants concentrations determination our laboratory uses two automatical Abbott analyzers. The methods used are based on analyte and specific antibody reaction and fluorescent emission detection (MEIA) or fluorescent polarization detection, respectively (FPIA).

2.3 Conclusions

Our newly introduced methods were compared with photometric technique used in laboratory of Institute of Clinical and Experimental Medicine in Prague. From method comparison and regular internal and external quality

control measurement flows fact, that fluorescence is a stable and applicable system for routine drug concentration monitoring of patient samples.

3 ÚVOD

Touto prací si kladu za cíl pomocí dostupných zdrojů objasnit důvody používání léků potlačujících fyziologickou imunitní odpověď, konkrétně takrolimu a cyklosporinu A, popsat stručně jejich historii, farmakologické parametry, nežádoucí účinky, interference a mechanismus účinku.

V další kapitole rozebírám pomocí schémat a názorných ilustrací metodiku stanovení těchto imunosupresiv a instrumentální principy měření na automatických analyzátořech firmy Abbott používaných Oddělením klinické biochemie, mikrobiologie a imunologie (OKBMI) Nemocnice Jihlava.

Na závěr zmiňuji postupy v rutinní diagnostice prováděné klinickou laboratoří, sběr, transport a uložení vzorků, systém vnitřních a externích kontrol kvality a validaci metody při zavádění do praxe pomocí porovnání s výsledky získanými jinou metodou v biochemické laboratoři Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM).

Zdrojem pro sepsání této práce mi byly tištěné publikace z oboru imunologie, webové stránky firem tyto léky vyrábějící jakož i internetová encyklopedie. Další informace jsem čerpal z příbalových letáků diagnostických souprav, podklady pro schémata a ilustrace v kapitole Instrumentace pochází z uživatelských příruček k analyzátořům. Grafy byly vytvořeny programem Analyse-it pro MS Excel.

4 DŮVODY POUŽITÍ IMUNOSUPRESIV

Při transplantacích jsou nejčastěji přenášeny tkáně či orgány jiného jedince (alotransplantace). Genetická rozmanitost v rámci druhu způsobuje, že každý jedinec je nositelem jiné sady povrchových glykoproteinů buněk hlavního histokompatibilního systému (MHC). U člověka jsou tyto antigeny nazývány HLA (human leukocyte antigens).

I při maximální možné shodě v HLA systému dárce a příjemce však existuje variabilita ve vedlejších histokompatibilních antigenech a tyto antigenní rozdíly po přenosu tkáně vyvolávají imunitní reakci namířenou proti cizím buňkám s cílem jejich zničení a tedy odmítnutí (rejekci) štěpu. Při transplantaci kostní dřeně rovněž může dojít k reakci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD), kdy přenesené imunokompetentní buňky napadají tkáně příjemce. (Hořejší, Bartůňková, 2002)

Jelikož na správné funkci přeneseného orgánu závisí život příjemce, je nutné imunitní odpověď potlačit, k čemuž slouží imunosupresivní léčba. Vzhledem k úzkému terapeutickému oknu (nízké dávky jsou neúčinné, vysoké toxické) imunosupresiv je důležité průběžné laboratorní sledování jejich hladiny v krvi léčených osob.

5 TAKROLIMUS

5.1 Historie

Takrolimus byl poprvé izolován v roce 1984 T. Kinem, H. Hatanakou a M. Hashimotem z aktinomycety *Streptomyces tsukubaensis* nalezených ve vzorcích půdy ze svahu japonské hory Tsukuba. Jako imunosupresivum byl americkým úřadem Food and Drug Administration (FDA) schválen k používání v roce 1994.

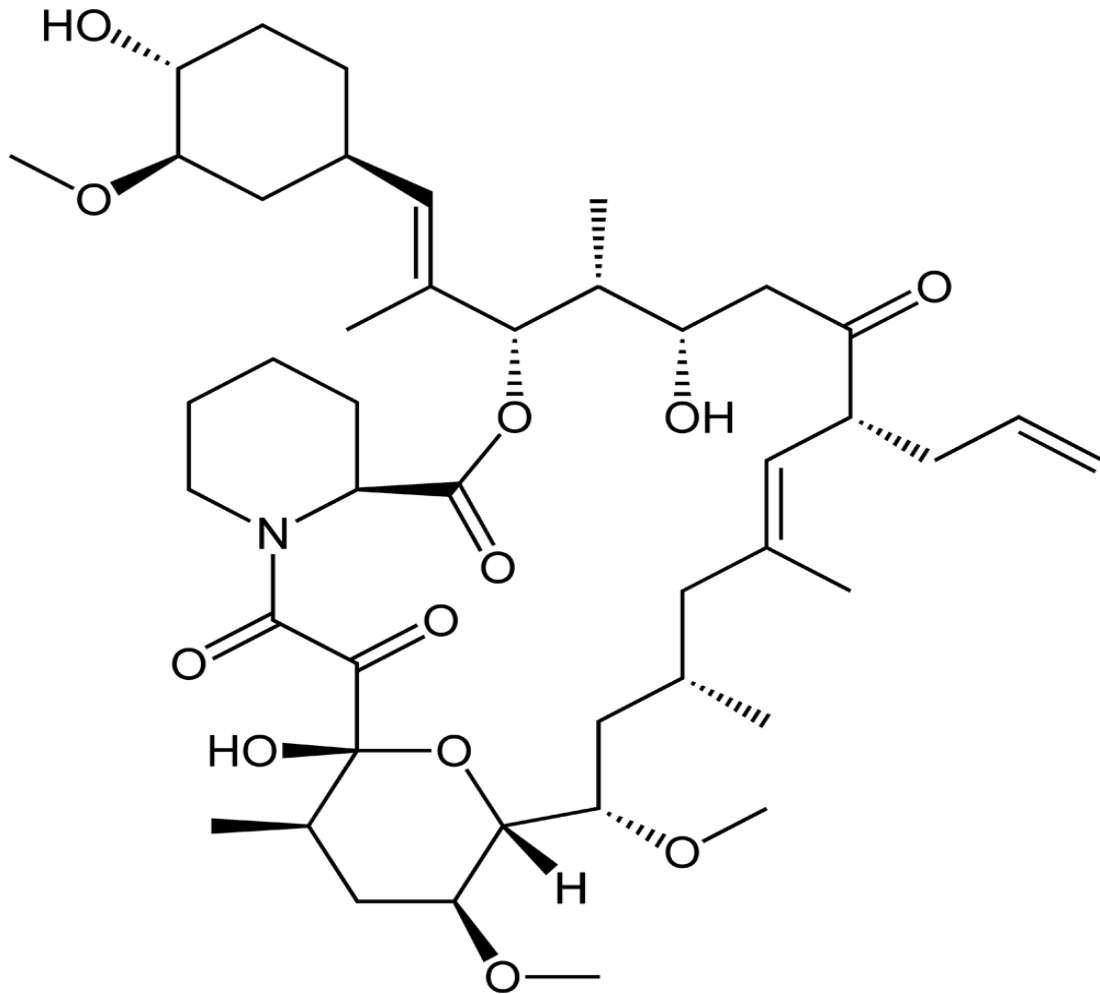
Někdy je rovněž nazýván FK 506 podle katalogového čísla firmy Fermentek, která látku vyrábí. (web Wikipedia - tacrolimus)

5.2 Struktura a vlastnosti

Takrolimus je makrolidový lakton o molekulové hmotnosti 822 a sumárním vzorci $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$.

Je to bílý, krystalický prášek nerozpustný ve vodě, částečně rozpustný v hexanu. rozpouští se v metanolu, etanolu, dietyléteru, chloroformu nebo acetonu.

Teplota tání je 127 – 130 °C (web Fermentek)



obr. 1. Molekula takrolimu (zdroj:Wikipedia)

5.3 Použití a osud v organismu

Lék se podává intravenózně nebo perorálně, jako prevence orgánové rejekce po transplantaci jater nebo ledvin. Působí obdobným mechanismem jako starší cyklosporin, ale v koncentracích cca 100x menších. Optimální terapeutické rozmezí koncentrace v plné krvi není přesně definované, ale ve 12-hodinovém minimu v období krátce po transplantaci se obvykle nachází v rozsahu 5 – 20 ng/ml.

5.3.1 Absorpce

Absorpce v gastrointestinálním traktu je proměnlivá a nepravidelná. Takrolimus se váže na plazmatické proteiny, zejména albumin a alfa-1-kyselý glykoprotein a rovněž na erytrocyty.

Vstřebávání léčiva je větší při lačnění, tučná strava snižuje maximální koncentraci až o 77%, strava bohatá na sacharidy snižuje C_{\max} o 65%.

Rovněž doba jídla ovlivňuje hladinu takrolimu: při aplikaci bezprostředně po jídle snižuje se C_{\max} o 71%, 1,5 hodiny po jídle je snížení 63%.

5.3.2 Distribuce

V důsledku rozdílné distribuce v plazmě a v plné krvi je pro stanovení hladiny léčiva vhodnější plná krev. Studie určily, že poměr koncentrací v plné krvi v porovnání s plazmou závisí na faktorech jako hematokrit, teplota v době separace plazmy či koncentraci plazmatických proteinů a pohybuje se v intervalu 12 – 67, průměrně 35.

5.3.3 Metabolizmus

Takrolimus je metabolizován zejména v játrech a v mikrozomech tenkého střeva působením cytochromu P-450. Doposud bylo identifikováno jeho 9 různých metabolitů vznikajících demetylací a hydroxylací.

5.3.4 Exkrece

Exkrece se děje zejména fekální cestou, asi 2% močí. Biologický poločas in vivo je 48 hodin. Clearance takrolimu je přibližně 2,8 ml/min/kg.

5.4 Vedlejší účinky a interference

Takrolimus vykazuje vážné vedlejší účinky, z nichž nejvýznamnější je nefrotoxicita. Mezi další patří hyperkalemie, neurotoxicita, hypertenze, insomnie a nauzea.

Koncentraci takrolimu v krvi zvyšuje paralelní užívání např. blokátorů vápníkových kanálů (nicardipin, verapamil), antimykotik (fluconazol,

ketokonazol), makrolidových antibiotik (claritromycin, erytromycin) a dalších léků. Naopak přítomnost antikonvulsiv (fenobarbital, carbamazepin), antibiotik (rifampicin, caspofungin) nebo příbuzného imunosupresiva sirolimu koncentraci snižuje. (IMx System, 2005; web Astellas)

5.5 Mechanismus účinku

Takrolimus se v buňce váže na proteiny FKBP (FK506 Binding Proteins), jejichž pentamerní komplexy s takrolimem, kalmodulinem, vápenatými ionty a kalcineuriny A a B inhibují fosfatázu kalcineurin. Tento enzym defosforyluje transkripční faktor NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), čímž umožní jeho přestup z cytoplazmy do jádra, kde se váže na promotor genu pro interleukin-2 (IL-2). Je-li kalcineurin inhibován, nedojde k zahájení produkce IL-2 nezbytného k proliferaci T lymfocytů.

Navíc léčivo tlumí aktivitu některých kináz, které také zprostředkovávají buněčné signály. Zablokování těchto signálů vede k nedostatečné aktivaci T lymfocytů. (Ferenčík a kol., 2005)

6 CYKLOSPORIN A

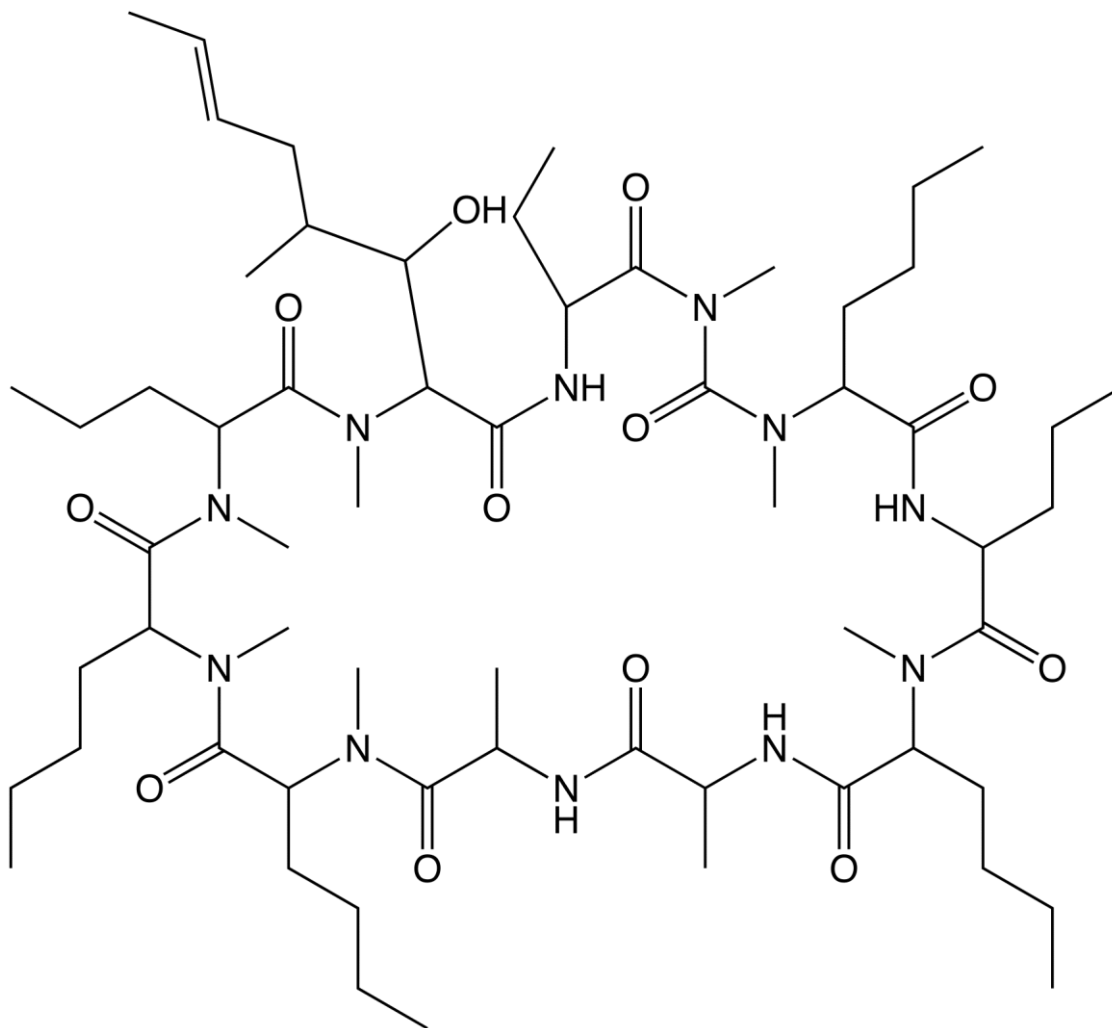
6.1 Historie

Substanci izoloval B. Thiele ze švýcarské firmy Sandoz (dnes Novartis) v roce 1970 ze vzorků půd z Wisconsinu v USA a z Norska. Zdrojem je houba *Tolypocladium inflatum*. Původně byl cyklosporin zamýšlen jako antimykotikum, ale výzkum v této oblasti byl pro neuspokojivé výsledky zastaven. V roce 1976 však J.F. Borel ze Sandozu objevil jeho imunosupresivní účinky a ještě tentýž rok začaly klinické zkoušky, které vedly v roce 1983 ke schválení cyklosporinu k použití v prevenci orgánové rejekce. (web World-of-fungi)

6.2 Struktura a vlastnosti

Cyklosporin je cyklický peptid složený z 11 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 1202 a sumární vzorec $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$.

Nerozpouští se v hexanu a ve vodě, rozpustný je v organických rozpouštědlech. (web Wikipedia - cyclosporin)



obr. 2. Molekula cyklosporinu A (zdroj:Wikipedia)

6.3 Použití a osud v organismu

Cyklosporin jako imunosupresivum pro perorální nebo intravenózní použití značně zvýšil přežívání pacientů po transplantacích srdce, ledvin, kůže, pankreatu, kostní dřeně, jater nebo střeva.

Biologická dostupnost během léčby vzrůstá, proto musí být orální dávky snižovány, aby se v krvi udržela stálá hladina léčiva. K tomu slouží průběžné monitorování koncentrace v krvi a eliminuje se tak neúčinnost při poddávkování nebo toxicita při překročení příjmu léku.

Očekávané hodnoty léčiva v plné krvi jsou silně variabilní a musejí být určeny individuálně pro každého pacienta. Naše oddělení má limit normálních hodnot nastaven na 100 – 250 ng/ml.

6.3.1 Absorpce

Rovněž u této látky je variabilní a nepředpověditelná absorpce, při orálním použití neúplná a stejně jako u takrolimu je pro stanovení nejvhodnější plná krev.

Maximální koncentrace dosahuje cyklosporin 1,5 – 2 hodiny po podání. Tučná strava zkonsumovaná půl hodiny před podáním léku sníží C_{max} o 33%.

6.3.2 Distribuce

Distribuce v organismu je přibližně v poměrech 33– 47% plazma, 4 – 9% leukocyty, 5–12% granulocyty a 41–58% erytrocyty. Při vysokých koncentracích je vazebná kapacita krevních buněk satureována.

6.3.3 Metabolismus

Cyklosporin je metabolizován v játrech cytochromem P-450 a bylo rozpoznáno více než 30 metabolitů vznikajících demetylací a oxidací. Některé z metabolitů vykazují imunosupresivní a toxické účinky, avšak nižší, než mateřská látka.

6.3.4 Exkrece

Exkrece probíhá převážně žlučí, 6% pak močí. Asi 0,1% látky odchází s močí nezměněno. Cyklosporin je vylučován mateřským mlékem. Biologický poločas je přibližně 8,4 hodiny (5 – 18 hod) a clearance 5 – 7 ml/min/kg.

6.4 Vedlejší účinky a interference

Primární vedlejší účinky léku jsou nefrotoxicita a hepatotoxicita, dále pak průjem, nevolnost, zvracení, hirsutismus, třes a hypertenze.

Spousta léků postihuje krevní koncentrace cyklosporinu, ať už indukci metabolismu, interferencí nebo ovlivněním absorpce. Mezi takové léky patří např. verapamil, erytromycin, claritromycin, ketokonazol, metylprednisolon (zvyšují koncentraci cyklosporinu), carbamazepin, fenobarbital, rifampicin nebo fenytoin (koncentraci snižují). (Axsym System, 2008; web Novartis)

6.5 Mechanismus účinku

Reverzibilní inhibicí postihuje imunokompetentní buňky v G₀ a G₁ fázi buněčného cyklu. Cyklosporin se váže na nitrobuněčné proteinové receptory ze skupiny imunofilinů, které se účastní přenosu buněčných signálů. Komplex cyklosporin – imunofilin rovněž inhibuje kalcineurin a tvorbu IL-2. Nepostihuje fagocytózu. (Ferenčík a kol., 2005)

Interleukin – 2 je protein o molekulové hmotnosti 15,4 kDa skládající se ze 133 aminokyselin. Slouží T_H1 a T_C lymfocytům jako autokrinní růstový a proliferační faktor. T_H1 lymfocyty navozují aktivaci makrofágů a produkcí IL-2 stimuluje dělení efektorových T_C lymfocytů. Cytotoxické lymfocyty se přímo účastní na likvidaci cizorodých buněk a tím rozhodují o nepřijetí transplantátu. (Hořejší, Bartůňková, 2002; Stites, Terr, 1994)

7 INSTRUMENTACE

Pro stanovení imunosupresiv používá Oddělení klinické biochemie, mikrobiologie a imunologie Nemocnice Jihlava dvou analyzátorů firmy Abbott – IMx na takrolimus a Axsym na cyklosporin.

7.1 Abbott IMx

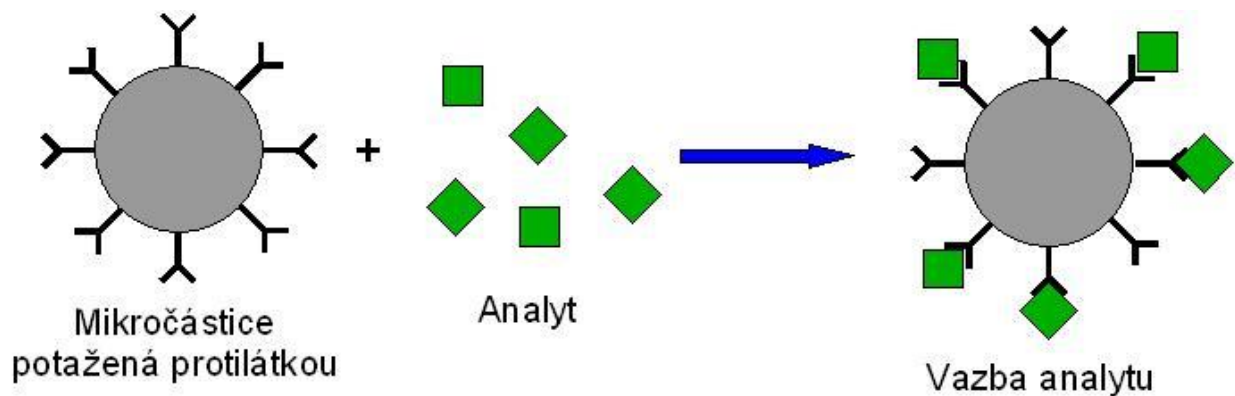
Takrolimus je stanovován metodou imunoenzymatického vyšetření na mikročásticích – MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay).

7.1.1 Metodika

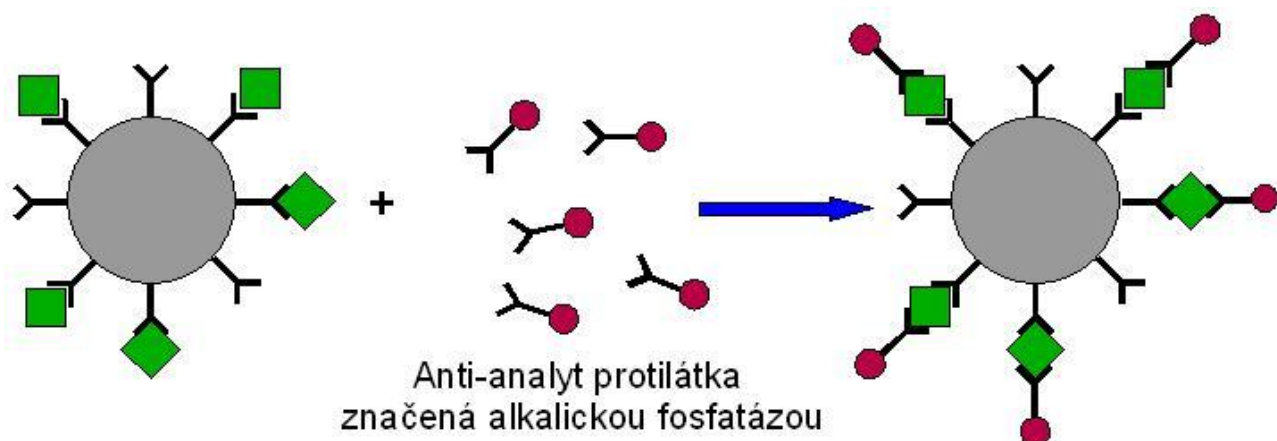
Tato technika používá submikronové částice potažené protilátkou proti stanovovanému analytu, který ze vzorku v inkubační cele specificky vychytávají. Po inkubaci systém alikvotní část vzniklých imunokomplexů automaticky přenesse do reakční cely, kde se váží na inertní matrix ze skleněných vláken. Nenávázané složky jsou z reakční cely vymyty. Poté je přidán konjugát další specifické protilátky proti analytu, tentokrát značené alkalickou fosfatázou. Ten se sendvičově váže na zachycený analyt. Další promytí odstraní nenávázaný konjugát.

K umožnění detekce se k matrix přidá fluorogenní substrát, kterým je 4-metylbelliferylfosfát (MUP). Alkalická fosfatáza konjugátu katalyzuje hydrolýzu MUP na fluorescenční produkt 4-metylbelliferon (MU). Vzniklý produkt emituje fluorescenční světlo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

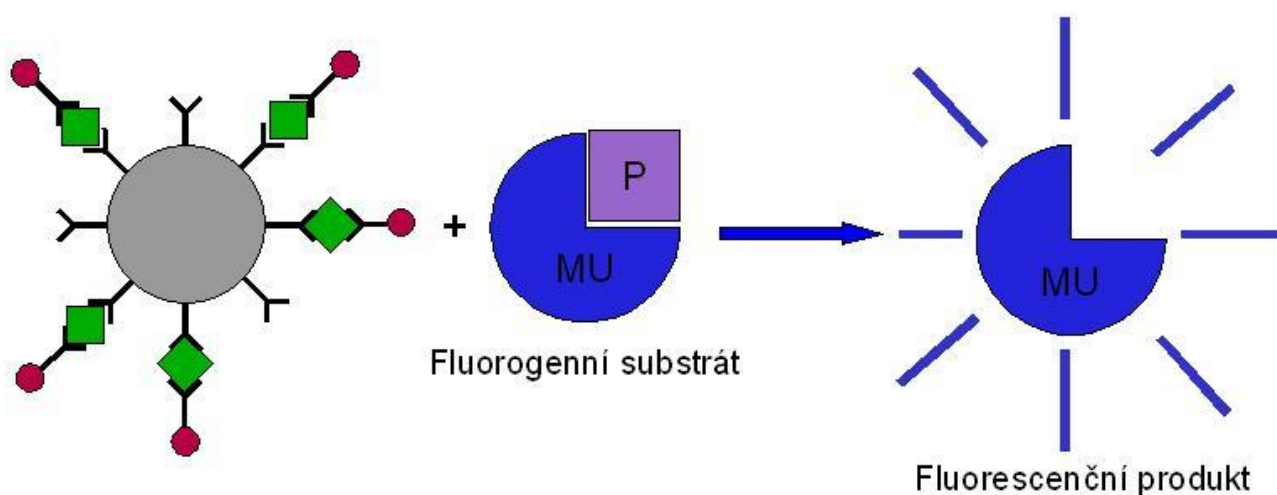
U imunoanalýzy může docházet k nespecifickým zkříženým reakcím s metabolity takrolimu, při cholestáze nebo jiném narušení odbourávání se metabolity mohou kumulovat. Metoda je omezena koncentrací 30 ng/ml a v takovém případě je třeba vzorek ředit.



obr.3. Vazba analytu na mikročástice



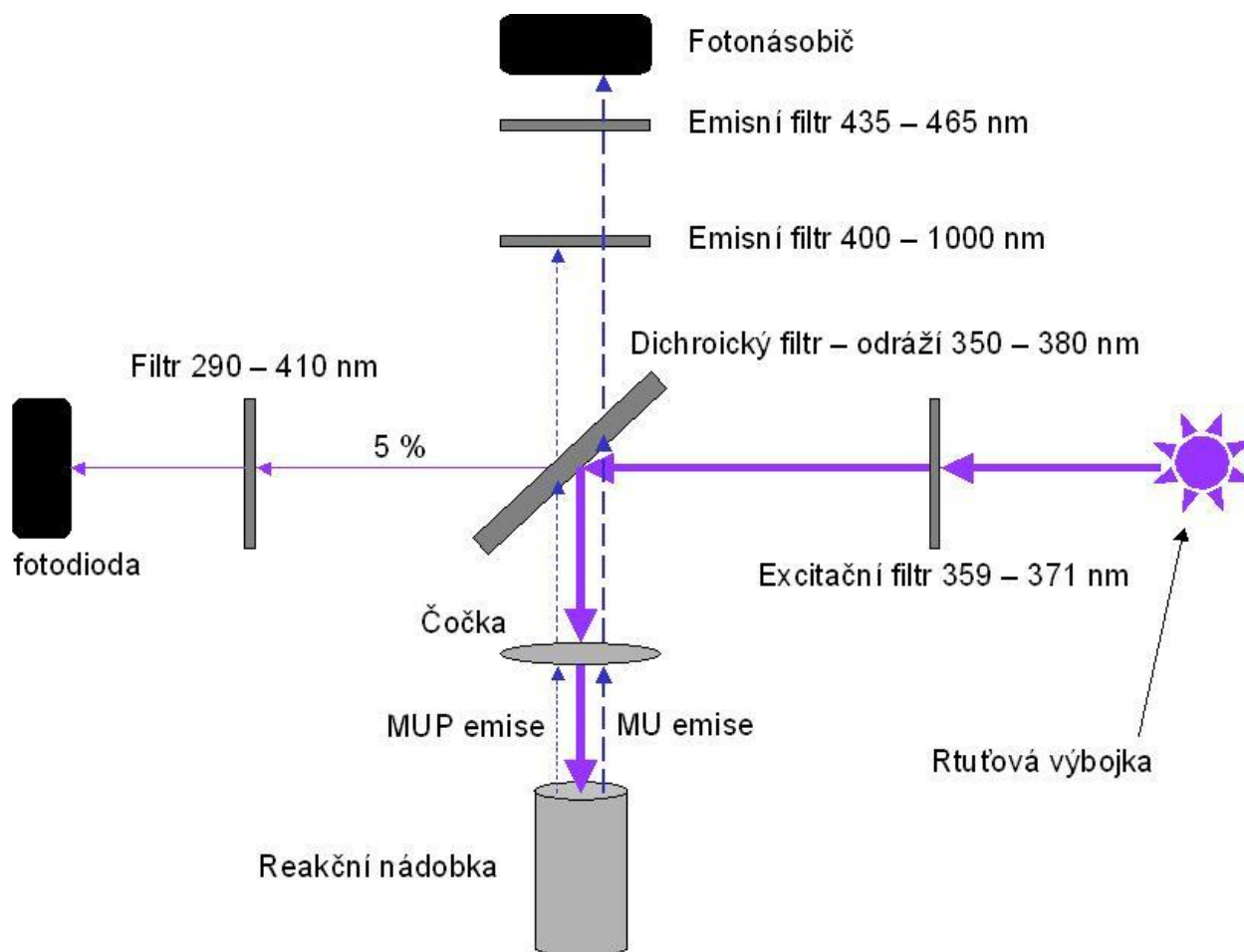
obr.4. Vazba konjugátu na komplex



obr.5. Enzymatická hydrolýza substrátu

7.1.2 Optické měření

Světelný zdroj fluorometru používá rtuťovou výbojku, jejíž záření je selektováno excitačním filtrem propouštějícím světlo o vlnové délce 359 - 371 nm. Excitační záření je nasměrováno do reakční cely, kde je absorbováno fluorogenním substrátem. MU po návratu z excitovaného stavu emituje záření o vlnové délce 448 nm. Jelikož i MUP emituje, a to při 387 nm, prochází vyzářené světlo emisním filtrem propouštějícím vlnové délky 435 – 465 nm. Tak je zajištěno, že se do fotonásobiče detektoru dostane jen záření defosforylovaného substrátu. (Abbott IMx, 1994)



obr.6. MEIA optika

7.2 Abbott Axsym

Ke stanovení cyklosporinu se v přístroji Axsym používá metoda fluorescenční polarizace – FPIA (Fluorescent Polarization Immunoassay).

7.2.1 Metodika

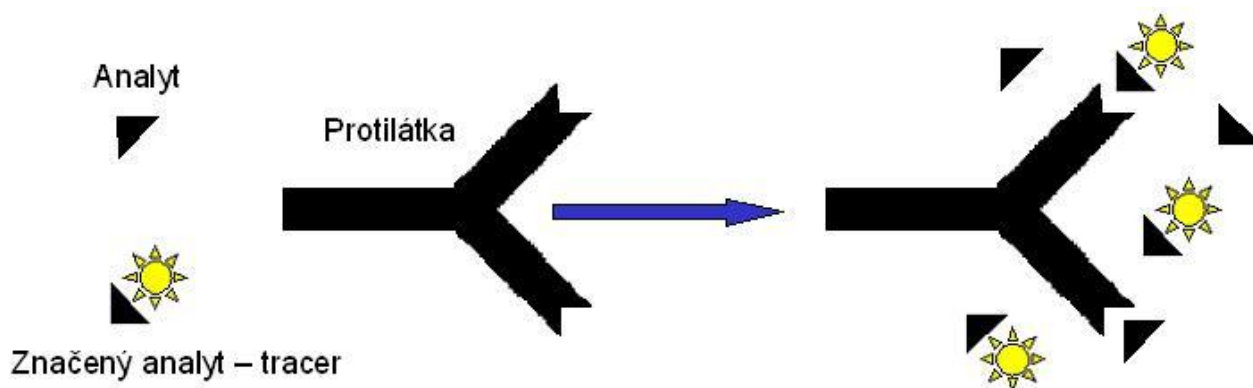
Technika je založena na bázi kompetitivní vazby proteinu a využívá skutečnosti že rychlost rotace molekuly v kapalině klesá s její velikostí – nenávaný analyt rotuje rychleji než jeho komplex s protilátkou. Průměrná hodnota polarizace emitované fluorescence je nepřímo úměrná rychlosti rotace značené molekuly.

Reakční směs obsahuje specifickou protilátku proti analytu, analyt značený fluorescenční molekulou (tracer) a vzorek. Analyt přítomný ve vzorku soutěží o limitovaný počet vazebných míst na protilátce s tracerem.

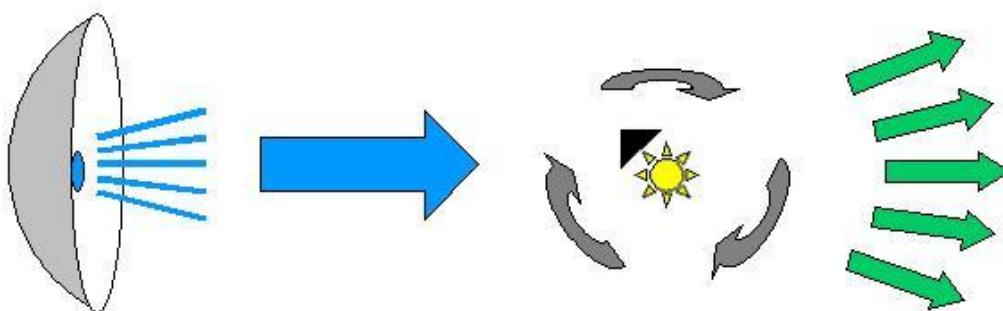
Při vysoké koncentraci hledané látky se naváže jen malá část značených molekul, které rotují rychle a po excitaci polarizovaným světlem vyzařují do všech směrů – polarizace se sníží.

Není-li analyt ve vzorku přítomen, většina značené látky se vyváže do komplexu s protilátkou, jehož rotace je dostatečně zpomalena a fluorescence je emitována v jedné rovině.

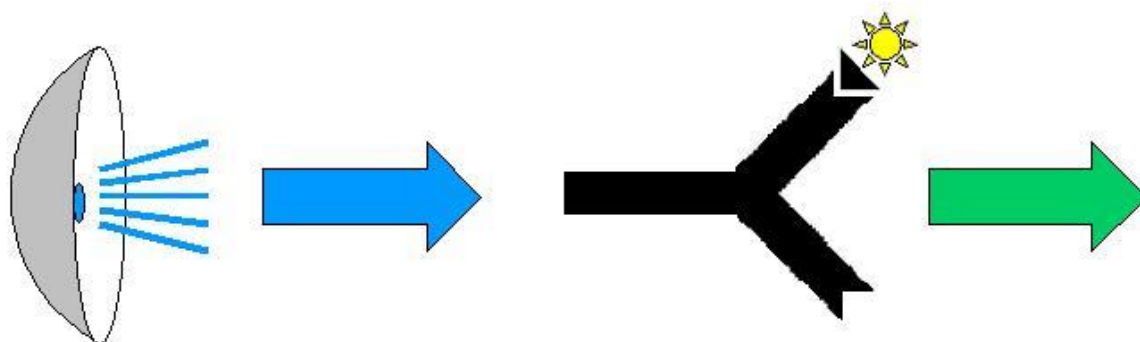
Rozsah metody daný linearitou kalibrace je do 800 ng/ml. Při dosažení vyšších hodnot v důsledku interferencí s léky zvyšujícími koncentrace cyklosporinu nebo vysokou hladinou jeho metabolitů je nutné vzorek ředit nebo konfrontovat se specifitějším vyšetřením pomocí HPLC.



obr.7. Kompetice analytu a traceru o vazebná místa na protilátce



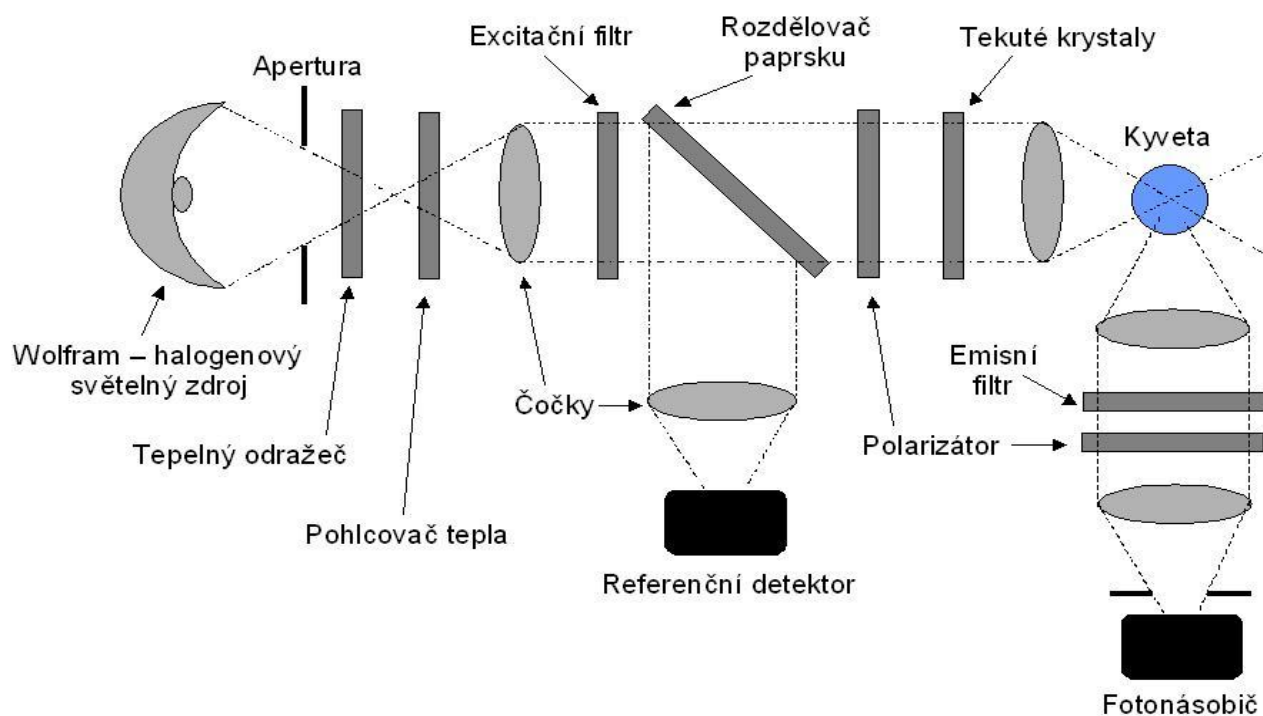
obr.8. Snížená polarizace v důsledku rychlé rotace emitující molekuly



obr.9. Zvýšení polarizace při zpomalené rotaci emitujícího komplexu

7.2.2 Optické měření

System FPIA měří orientaci polarizace vycházející z reakční nádoby. Zdrojem světla je wolfram – halogenová žárovka. Excitační záření prochází přes filtr umožňující průchod modrému světlu vlnové délky 485 nm, které je následně polarizováno filtrem z tekutých krystalů. Modré polarizované záření je směřováno přes reakční kyvetu, kde excituje fluorofor značeného analytu. Ten po návratu do základního stavu emituje zelené světlo o vlnové délce 525 – 550 nm, které prochází emisním a polarizačním filtrem a vstupuje do fotonásobiče detektoru. (Abbott Axsym, 2004)



obr.10. FPIA optika

8 RUTINNÍ STANOVENÍ V KLINICKÉ LABORATOŘI

8.1 Zavedení metody a validace

Metody pro stanovení imunosupresiv jsme na OKBMI v Nemocnici Jihlava zaváděli v listopadu 2007. Před tímto datem jsme žádaná vyšetření zasílali do biochemické laboratoře Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Po instalaci a zprovoznění přístrojů, kalibracích a zaškolení laborantů odbornými pracovníky firmy jsme v následujících několika týdnech měřili vzorky novou metodou na OKBMI a zároveň duplicitně získávali hodnoty koncentrací zasíláním téhož materiálu do IKEM.

Pražské pracoviště pro stanovení imunosupresiv používá metody firmy Siemens Emit 2000. Metoda je založena na kompetici analytu ze vzorku s analytem značeným rekombinantní glukózo-6-fosfát dehydrogenázou o vazebná místa na specifické myši monoklonální protilátce. Nenavázaný enzym konvertuje NAD na NADH, jehož absorbance je detekována fotometricky. (Emit 2000, 2008)

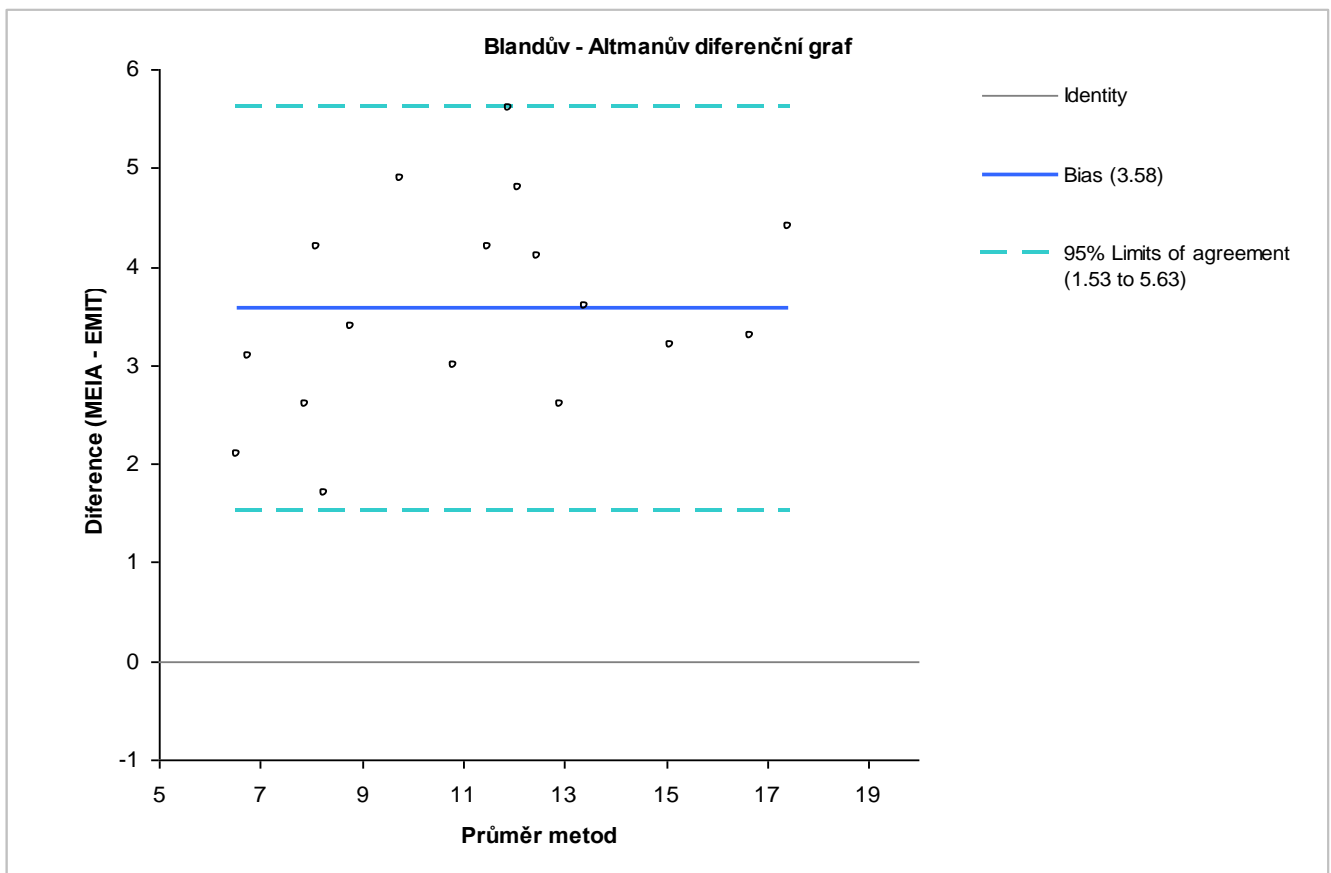
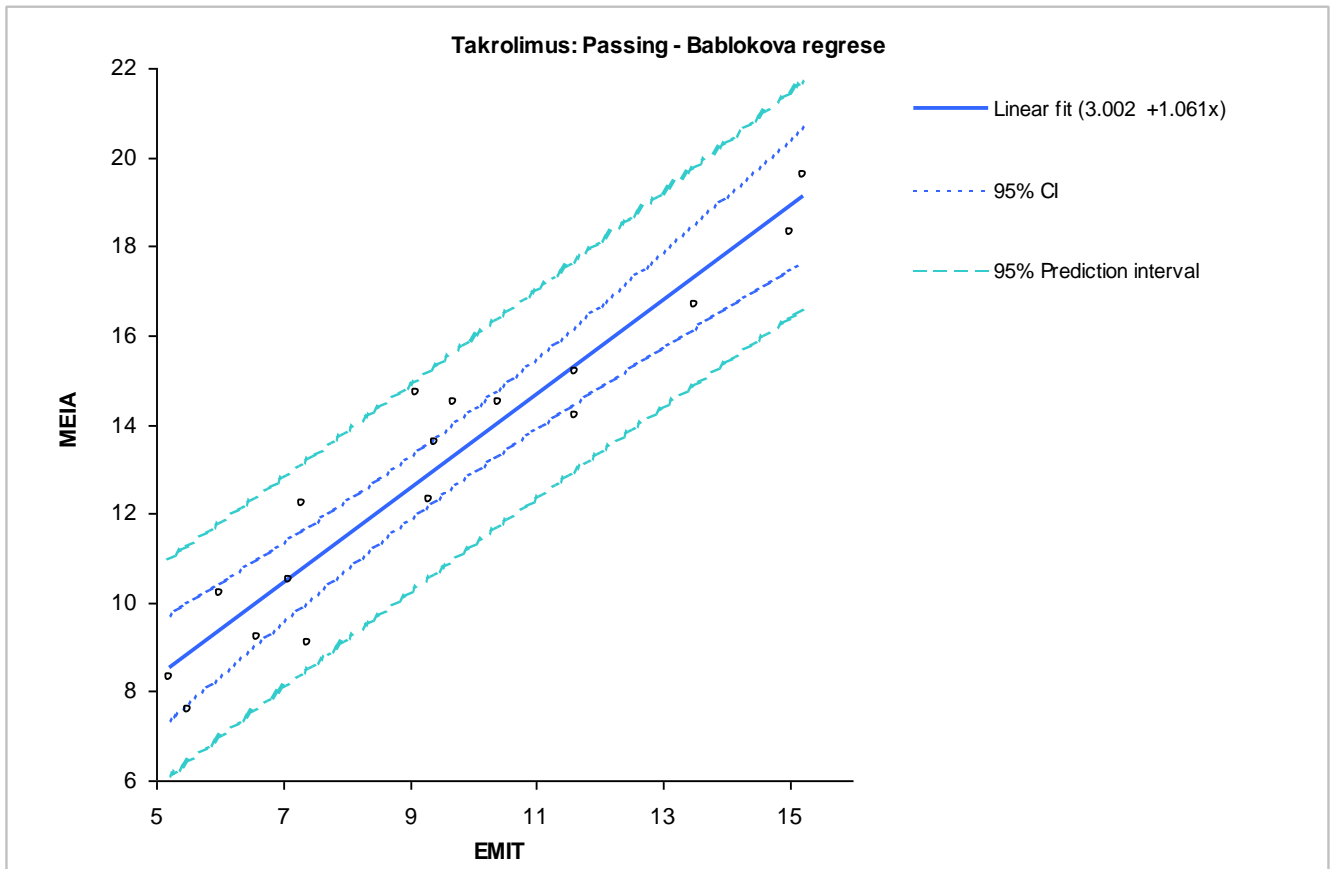
8.1.1 Statistické zpracování validačních měření

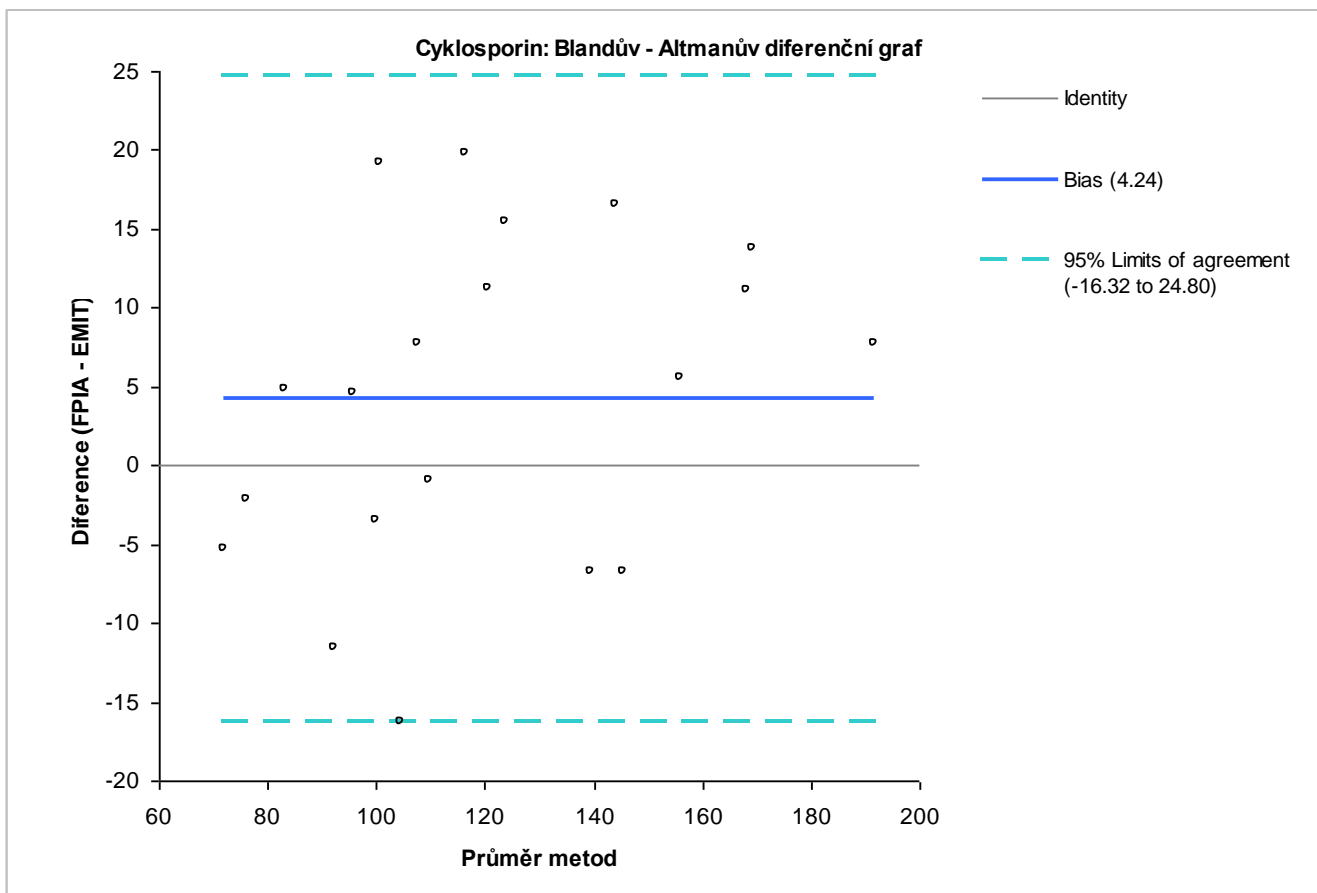
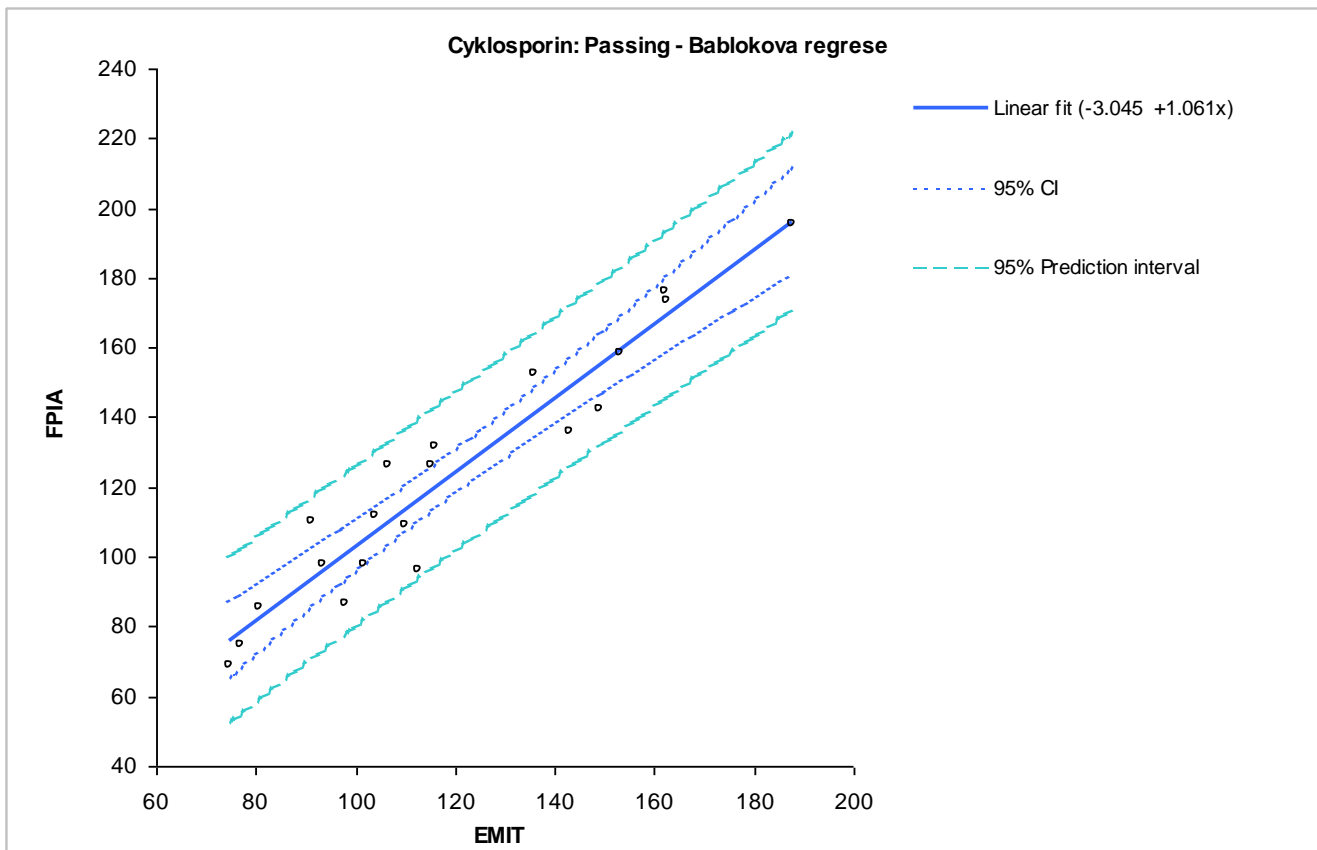
Statistické porovnání obou metod pomocí Passing – Bablokovy regrese a Altmanova – Blandova diferenčního grafu pro obě léčiva.

Velikost analyzovaných souborů je $n=17$ pro takrolimus a $n=20$ pro cyklosporin.

Z grafů a tabulek kontrol kvality vyplývá, že obě metody ve srovnání s fotometrickým systémem EMIT, provozovaným v IKEM, jsou stabilní a plně použitelné pro rutinní analýzu patientských vzorků. Posun úrovně bias ve srovnání MEIA/EMIT je způsoben rozdílnou technikou stanovení.

Koncentrace všech porovnávaných vzorků se nacházejí uvnitř oblasti vymezené 95% intervalem spolehlivosti.





8.2 Vnitřní kontrola kvality

Firma Abbott dodává k reagenčním soupravám obou imunosupresiv kontrolní sety obsahující 3 hladiny hledané látky, označené jako Low, Medium a High. Při každé sérii vzorků se měří jedna z kontrol, vždy postupně v řadě L, M a H, stejná hladina je tedy použita znovu po třech týdnech.

Kontroly mají výrobcem určený rozsah akceptovatelných hodnot. Nevejde-li se změřená hodnota kontroly do vymezeného rozsahu, je třeba připravit nový kontrolní vzorek a měření opakovat. Pokud se dostane i druhé měření mimo meze, musí se metoda nakalibrovat.

8.2.1 Statistické zpracování vnitřních kontrol kvality

Takrolimus: vnitřní kontrola kvality 1/08-3/09			
hladina	L	M	H
refer. hodnota	5	11	22
rozmezí ref. h.	(3 - 7)	(7,7-14,3)	(15,4-28,6)
n	22	21	21
střední hodnota	5,01	10,47	20,85
SD	0,56	1,66	2,53
CV (%)	11,2	15,8	11,6
bias	0,3	-4,8	-0,7
komb. nejistota (%)	11,4	16,9	11,9

Cyklosporin A: vnitřní kontrola kvality 1/08-3/09			
hladina	L	M	H
refer. hodnota	70	300	600
rozmezí ref. h.	(51-89)	(250-350)	(465-735)
n	24	22	22
střední hodnota	73,69	321,64	646,08
SD	8,1	26,9	62,19
CV (%)	11	8,4	9,6
bias	5,3	7,2	7,7
komb. nejistota (%)	12,4	11,2	12,5

Všechny hladiny kontrol měřených v daném období se nacházejí uvnitř referenčního rozmezí stanoveného výrobcem.

8.3 Externí kontrola kvality

Cyklus externích kontrol kvality probíhá 2x ročně. Kontrolní vzorky na objednání zasílá Referenční institut pro bioanalytiku (RfB) Německé společnosti pro klinickou chemii a laboratorní medicínu (DGKL) se sídlem v Bonnu.

Institut rovněž zasílá certifikát akreditující pracoviště k provozu metody. Certifikát má platnost jeden rok a je v elektronické podobě vyvěšen na webových stránkách oddělení. Pokud naměřené hodnoty externí kontroly nesplní požadavky RfB, musí laboratoř objednat nové vzorky a cyklus opakovat.

8.3.1 Výsledky externích kontrol kvality

EHK cyklosporin - březen 2008				
vzorek	A	B	C	D
cílová hodnota	136	170	158	303
refer. rozmezí	95-177	119-221	110-206	212-394
naměřená hodnota	127	174	178	304
rozdíl (D/D _{max})	-0,22	0,07	0,41	0,01

EHK cyklosporin - říjen 2008				
vzorek	A	B	C	D
cílová hodnota	111	214	224	270
refer. rozmezí	78-145	149-279	156-292	189-351
naměřená hodnota	102	201	216	246
rozdíl (D/D _{max})	-0,27	-0,2	-0,12	-0,3

EHK takrolimus - březen 2008			EHK takrolimus - říjen 2008		
vzorek	A	B	vzorek	A	B
cílová hodnota	14,9	15	cílová hodnota	10,3	15,9
refer. rozmezí	10,4-19,4	10,5-19,5	refer. rozmezí	7,21-13,4	11,1-20,7
naměřená hodnota	15,9	16,6	naměřená hodnota	10,5	18
rozdíl (D/D _{max})	0,22	0,35	rozdíl (D/D _{max})	0,06	0,43

D je rozdíl mezi cílovou a naměřenou hodnotou, D_{max} je polovina referenčního rozmezí, limit pro splnění požadavků RfB je $D/D_{max} < 1$.

8.4 Odběr, zasílání a skladování materiálu

Odběr plné krve pro analýzu provádí ambulance ošetřujícího lékaře do protisrážlivého roztoku K₂EDTA, což bývají nejčastěji zkumavky systému Vacutainer firmy Becton – Dickinson. Vzhledem k biologickému poločasu v řádu několika hodin je nutné k zajištění objektivit odběr provádět vždy ve stejném intervalu po podání léku.

Odebrané vzorky do laboratoře dopravuje buď sestra odborné ambulance nebo personál nemocničního sanitářského servisu. Materiál laboratoř přijímá na základě shody identifikačních údajů na zkumavce a na platné žádance o vyšetření.

Měření imunosupresiv provádíme na OKBMI v rutinním režimu jednou týdně ve stanovený den, a to z důvodů nevelkého množství požadovaných vyšetření. Za rok 2008 jsme vyšetřili 224x hladinu takrolimu a 282x cyklosporin, čili v průměru 5 vzorků každého léčiva týdně.

Vyžadují-li to okolnosti, například častější sledování koncentrací v časně fázi imunosupresivní léčby v prvních týdnech po transplantaci, je možné stanovení provádět kdykoli na vyžádání.

Vzorky došlé ve dny, kdy se neměří, skladujeme v lednici při 2 – 8 °C ve zvláštním stojanu pro tento účel určenému. Doba skladování vzorků před analýzou doporučená výrobcem diagnostických souprav je 14 dní pro takrolimus a 28 dní pro cyklosporin při 2 – 8 °C. Vzorky zmrazené při –20 °C je možné uchovávat měsíce.

9 ZÁVĚR

Tato práce obsahuje základní informace o objevech a vlastnostech dvou léků potlačujících imunitu, významného terapeutického nástroje umožňujícího zajistit přežívání pacientů po orgánové transplantaci.

Rovněž popisuje principy stanovení a instrumentální techniky zavedené a používané v jedné z klinických laboratoř, rozebírá a pomocí grafů a tabulek hodnotí vnitřní i externí kontrolní mechanismy a jejich úspěšné plnění naším pracovištěm.

10 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

Abbott Axsym, *Uživatelská příručka svazek II*, Abbott Park IL, Abbott Diagnostics, 2004, strany 3-7 – 3-9, 3-32

Abbott IMx, *IMx Operation manual*, Abbott Park IL, Abbott diagnostics, 1994, strany 3-1 – 3-4, 3-8

Axsym System, *Cyclosporine*, příbalový leták, Longford, Abbott, 2008

Emit 2000, *Tacrolimus Assay*, příbalový leták, Siemens, Newark, 2008

Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mařha, V., *Imunitní systém*, Praha, Grada publishing, 2005, strany 204-205

Hořejší, V., Bartůňková, J., *Základy imunologie – 2. vydání*, Praha, Triton, 2002, strany 91, 121-123, 129, 172-173, 176-177, 222

IMx System, *Tacrolimus II*, příbalový leták, Wiesbaden, Abbott, 2005

Stites, D. P, Terr, A. I., *Základní a klinická imunologie*, Praha, Victoria publishing, 1994, strany 65-67, 84-86

web Astellas, <http://www.astellas.us/docs/prograf.pdf>

web Fermentek, <http://www.fermentek.co.il/FK506.htm>

web Novartis, <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/neoral.pdf>

web Wikipedia - cyclosporin, <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclosporin>

web Wikipedia - tacrolimus, <http://en.wikipedia.org/wiki/Tacrolimus>

web World-of-fungi, http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/Harriet_Upton/Harriet_Upton.htm