Usporedba imunokemijske metode za određivanje koncentracije karbamazepina s metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom

Šolak, Zora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:067323

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Zora Šolak

USPOREDBA IMUNOKEMIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KARBAMAZEPINA S METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE S MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Zora Šolak

USPOREDBA IMUNOKEMIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KARBAMAZEPINA S METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE S MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek,

Diplomskom sveučilišnom studiju medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mentor rada: doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem, spec. med. biokemije

Rad ima 45 listova i 12 slika.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić, mag. med. biochem. spec. med. biokemije na suradnji, savjetima i svesrdnoj pomoći tijekom istraživanja i pisanja rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću, mag. med. biochem. spec. med. biokemije, pročelniku Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u kojem radim što mi je omogućio provođenje istraživanja na kojem se temelji ovaj rad.

Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac za organizaciju Diplomskog studija medicnsko laboratorijske dijagnostike radi unapređivanja i promicanja naše struke.

Zahvaljujem se Štefici Klisurić, bacc med. lab. diagn. i svim kolegicama s kojima radim na razumijevanju i suradnji tijekom studija.

Najznačajniju podršku i pomoć pružila mi je moja obitelj pa se njima, na kraju, najviše i zahvaljujem. Volim vas!

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
   1.1 Određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije ... 1
      1.1.1 Implikacije za praćenje koncentracije lijekova tijekom terapije ... 1
      1.1.2 Karakteristike lijekova kojima je potrebno praćenje koncentracije tijekom terapije ... 2
      1.1.3 Faktori koji utječu na koncentraciju lijeka ... 2
      1.1.4 Utjecaj bolesti na koncentraciju lijeka ... 5
   1.2 Terapijsko praćenje antiepileptika ... 6
   1.3 Karbamazepin ... 7
   1.4 Analitičke tehnike za određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije ... 8
      1.4.1 Imunokemijske analize ... 9
      1.4.2 Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom ... 9
   1.5 Predanalitička faza ... 10
      1.5.1 Uzorkovanje i uzorak za analizu ... 10
2. HIPOTEZA ... 12
3. CILJ ... 13
4. MATERIJALI I METODE ... 14
   4.1. Ustroj studije ... 14
   4.2. Ispitanici ... 14
      4.2.1. Prikupljanje uzoraka ... 14
   4.3. Analitičke metode ... 14
      4.3.1. LC-MS/MS ... 15
      4.3.2. Imunokemijska metoda ... 19
   4.4. Statističke metode ... 21
5. REZULTATI ... 22
6. RASPRAVA ... 26
7. ZAKLJUČAK ... 30
8. SAŽETAK ... 31
9. SUMMARY ... 33
10. LITERATURA ... 34
11. ŽIVOTOPIS ... 36

POPIS KRATICA

CLIA	engl. Chemiluminescence immunoassays Kemiluminiscentna imunokemijska metoda
CMIA	eng. Chemiluminescence microparticle immunoassays Kemiluminiscentna mikročestična imunokemijska metoda
DL	engl. Desolvation line Desolvacijska kapilara
EMIT	engl. Enzyme multiplied immunoassay technique Enzimom umnožena imunokemijska metoda
ESI	engl. Electrospray ionization Elektrosprej ionizacija
G6P	Glukoza-6-fosfat
G6PDH	Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
HPLC	engl. High performance liquid chromatography Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
KBCO	Klinički bolnički centar Osijek
LCMS	engl. Liquid chromatography-mass spectrometry Tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom
LC-MS/MS	engl. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom
m/z	Omjer masa/naboj
MRM	engl. Multiple Reaction Monitoring Praćenje višestrukih reakcija
MS	Masena spektrometrija
NaCl	Natrijev klorid
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
PETINIA	engl. Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay Česticama poboljšana turbidimetrijska inhibicijska imunokemijska metoda

Q	engl. Quadrupol, Kvadrupol
RI	Referentni interval
RLU	engl. Relative light unit Relativne svjetlosne jedinice
SD	Standardna devijacija
T4	Tiroksin
TDM	engl. Terapeutic drug monitoring Terapijski nadzor lijekova
Vacutainer SST	engl. Vacutainer Serum Separation Tubes Vacutainer tube za odvajanje seruma
V_d	Volumen distribucije
ZKLD	Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku

POPIS SLIKA

Slika 1: Strukturna formula karbamazepina 7
Slika 2: Strukturna formula karbamazepin-10,11-epoksida 7
Slika 3: Priprema uzorka za analizu LC-MS/MS metodom 15
Slika 4: Viali s pripremljenim standardima, kontrolama i uzorcima složeni u nosač 16
Slika 5: Ulaganje nosača uzoraka u autoinjektor uređaja LC-MS/MS 16
Slika 6: Uređaj LC-MS/MS-8040 Shimadzu 17
Slika 7: Uređaj za imunokemijske analize Architect i1000SR 19
Slika 8: Ulaganje reagensa u uređaj Arcihtect i1000SR 19
Slika 9: Grafički prikaz Passing-Bablok regresijske analize 21
Slika 10: Bland-Altmanov prikaz podataka o usporedbi mjerenja karbamazepina LCMS/MS i CMIA metodama 22
Slika 11: Udio karbamazepin-10,11-epoksida kod pacijenata s komedikacijom i pacijenata bez komedikacije 23
Slika 12: : Udio karbamazepin-10,11-epoksida kod pacijenata s komedikacijom lamotriginom i/ili valproičnom kiselinom i pacijenata koji su u terapiji uz karbamazepin primali neki drugi lijek 24

1. UVOD

Praćenje koncentracije lijekova tijekom terapije započelo je sedamdesetih godina prošlog stoljeća. Prva mjerenja provedena su za nekoliko vrsta antiepileptika. Tijekom vremena je nadzor nad koncentracijom lijekova postao prioritetan za lijekove koji imaju uzak terapijski raspon. Dakle, potrebno je postići dobru djelotvornost, a izbjeći toksičnost u uskom rasponu koncentracija. Mjerenje koncentracije lijekova danas je rutina u laboratorijskoj praksi bilo da se koriste imunokemijske metode ili sofisticiranije tehnike kao što su plinska ili tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (1).

1.1 Određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije

Određivanje koncentracije lijekova u svrhu terapijskog praćenja moguće je raditi jednokratnim mjerenjem koncentracije u serumu ili u više vremenskih točaka nakon primjene doze lijeka. Svrha terapijskog praćenja lijeka je individualizacija doze za postizanje maksimalnog učinka lijeka uz istovremeno minimalno štetno djelovanje. Terapijsko praćenje klinički je značajno kod lijekova koji imaju uzak terapijski prozor, poput raznih antikonvulziva, kardioaktivnih lijekova, teofilina, imunosupresiva, tricikličkih antidepresiva, antiretrovirusnih lijekova, određenih antibiotika i lijekova za maligne bolesti. Promijenjeni farmakokinetski parametri zamijećeni su kod brojnih lijekova uslijed raznih bolesnih stanja kao što su bolesti jetre, oštećenja bubrežne funkcije, kardiovaskularne bolesti, disfunkcije štitnjače i cistične fibroze. Kod trudnica je također promijenjena raspodjela lijeka. Terapijsko praćenje lijekova pomaže u otkrivanju promjena u raspodjeli lijeka i u prilagođavanju doze u cilju izbjegavanja neželjenih reakcija kod pacijenata, stoga ima i značajnu isplativost u zdravstvu (1, 2).

1.1.1 Implikacije za praćenje koncentracije lijekova tijekom terapije

Kada je terapijsko praćenje lijekova odgovarajuće, pacijenti su na dobitku kako medicinski tako i ekonomski. Prema navodima u literaturi skraćeno je bolničko liječenje zahvaljujući terapijskom praćenju lijekova, što značajno utječe na cijenu liječenja. Smanjenje toksičnog učinka uzrokovanog lijekovima dobrobit je za pacijenta, ali i smanjuje odgovornost kliničara. Brojne studije provedene su u svrhu ocjene učinkovitosti terapijskog praćenja lijekova u

smanjenju učestalosti toksičnog djelovanja lijekova. Autori su uglavnom zaključili da su pacijenti kojima je provedeno mjerenje koncentracije lijekova tijekom terapije imali manje neželjenih reakcija na lijekove od pacijenata kojima nadzor nije proveden. Druge studije pokazuju da određivanje koncentracije lijeka u serumu koje procjenjuju i prate klinički farmakolozi dovode do značajnih ušteda ukupnih troškova liječenja (1, 2).

1.1.2 Karakteristike lijekova kojima je potrebno praćenje koncentracije tijekom terapije

Lijekovi za koje je potrebno terapijsko praćenje imaju različite osobine:

1. Uzak terapijski raspon gdje je doza lijeka kojom se postiže terapijski učinak blizu koncentraciji koja može djelovati toksično.
2. Nejasno definirane kliničke parametre koji omogućavaju prilagođavanje doze.
3. Nepredvidivu povezanost između doze i kliničkog učinka: određena doza lijeka može postići očekivani farmakološki učinak kod jednog pacijenta dok kod drugog pacijenta ista takva doza može djelovati toksično.
4. Toksično djelovanje može dovesti do potrebe hospitalizacije pacijenta, do trajnog oštećenja organa pa čak i do smrti.
5. Postoji korelacija između serumske koncentracije lijeka i njegove učinkovitosti ili toksičnosti (1, 2).

1.1.3 Faktori koji utječu na koncentraciju lijeka

Koncentracija lijeka uvjetovana je apsorpcijom, distribucijom, metabolizmom i eliminacijom. Na to utječu brojni čimbenici kao što su genetski profil, godine, spol, težina, životne navike (npr. pušenje i alkohol), dijeta i sl. Kod novorođenčadi i starijih osoba lijekovi se metaboliziraju sporije nego kod ostalih. Različite bolesti kao i trudnoća također utječu na koncentraciju lijeka.

Kada se lijek uzima oralnim putem, postoji nekoliko faza o kojima ovisi koncentracija lijeka:

1. Oslobađanje lijeka iz doze (tablete, kapsule i sl.)
2. Apsorpcija lijeka u cirkulaciju
3. Distribucija lijeka iz cirkulacije u tkiva

4. Metabolizam, tj. kemijska transformacija u aktivne i inaktivne metabolite (uglavnom pomoću enzima iz obitelji citokroma P-450)
5. Eliminacija lijeka iz organizma renalnim, bilijarnim ili pulmonalnim putem (1).

Oslobađanje lijeka kod oralne primjene ovisi o formulaciji. Naime, neki lijekovi se oslobađaju odmah u cijelosti, dok drugi imaju produženo otpuštanje. U tom slučaju kod pacijenta se produžuje djelovanje, a smanjuje štetan učinak jer je koncentracija lijeka niža. Utjecaj hrane na bioraspoloživost lijeka značajniji je kod jednokratnog cjelovitog otpuštanja, međutim nije zanemariv niti kod kontroliranog produženog otpuštanja. Lijekovi su formulirani tako da ih želučana kiselina ne degradira, nego da nepromijenjeni dospiju u tanko crijevo na mjesto apsorpcije (1, 2).

Apsorpcija ovisi kako o formulaciji lijeka tako i o načinu primjene. Uobičajena je oralna primjena terapije, međutim u posebnim okolnostima (mučnina, povraćanje, konvulzije) potrebno je lijek primijeniti na drugačiji način. Jedan od pogodnih načina je rektalna primjena za brojne vrste lijekova: antikonvulzive, analgetike kao i antibakterijske lijekove te lijekove protiv povraćanja. Apsorpcija je kod rektalne primjene nešto niža u odnosu na oralnu zbog manje apsorpcijske površine. Unatoč tome za neke lijekove je rektalna apsorpcija veća u odnosu na oralnu primjenu istog lijeka zbog izbjegavanja prvog prolaska kroz jetru te tako i učinkovitija. Intravenskom primjenom lijek dospijeva direktno u cirkulaciju te se odmah postiže visoka koncentracija i aktivnost. Intramuskularnom primjenom izbjegava se prvi prolazak kroz jetru čime se postiže visoka bioraspoloživost. Transdermalna aplikacija lijeka je jednostavna za primjenu, ali se postiže slaba sistemska apsorpcija zbog ograničenog prodiranja kroz snažne kožne barijere. Sublingvalnom primjenom se na jednostavan način brzom apsorpcijom postižu i brzi efekti (1, 2).

Ulaskom u cirkulaciju, lijek se distribuira u razna tkiva. Volumen distribucije (V_d) je farmakokinetički pojam koji opisuje raspodjelu lijeka u organizmu, a izražava kvocijent između doze lijeka i njegove koncentracije u serumu. Obično vrlo mali dio primijenjene doze lijeka dospije u ciljno tkivo, a i tada se samo dio lijeka veže na specifične receptore kako bi mogao farmakološki djelovati. Lijekovi za liječenje centralnog nervnog sustava moraju proći krvno-moždanu barijeru, stoga njihova struktura mora biti prilagođena. Takvi lijekovi ili moraju imati lipofilnu strukturu kako bi barijeru prošli pasivnom difuzijom ili barijeru prolaze aktivnim transportom (1, 2).

1. UVOD

Metabolizam ili kemijska transformacija lijeka prije eliminacije odvija se u svim tkivima uključujući i krv, ali najznačajniji dio metaboličkih aktivnosti događa se u jetri. Strukturnom modifikacijom (oksidacija, redukcija, hidroliza) ili konjugacijom (glukuronidacija, sulfatacija, acetilacija) lipofilne slabo polarne molekule transformiraju se u hidrofilne polarnije molekule kako bi se mogle izlučiti renalnim putem. Značajnu ulogu u tim procesima imaju enzimi, osobito oni iz skupine citokroma P-450. Poluživot lijeka je pojam koji opisuje vrijeme potrebno da se koncentracija lijeka u serumu smanji za polovicu (tj. 50%) što znači da se pola primijenjene doze izmetaboliziralo (1, 2).

Osnovni put eliminacije lijekova i njihovih metabolita je renalni. Poremećaj renalne funkcije stoga može dovesti do nagomilavanja lijekova i njihovih metabolita u cirkulaciji te do štetnog djelovanja. To je osobito važno kod lijekova koji imaju aktivne metabolite kao što je na primjer karbamazepin. Lijekovi se mogu eliminirati i bilijarnim putem ovisno o svojoj kemijskoj strukturi, polarnosti i molekularnoj težini aktivnim transportom kroz membrane jetrenih stanica. U gastrointestinalnom traktu lijekovi i njihovi metaboliti mogu biti reapsorbirani. Konjugirani oblici mogu biti hidrolizirani pomoću bakterija prisutnih u crijevima, pri čemu se može osloboditi izvorni oblik lijeka te se vratiti u cirkulaciju. Enterohepatička cirkulacija može produljiti djelovanje lijeka, a kolestatski poremećaj zbog nakupljanja može dovesti i do njegovog toksičnog djelovanja (1, 2).

Na koncentraciju lijeka u cirkulaciji utječu i genetski faktori. Dok kod jednog pacijenta određena doza postiže željeni učinak, kod drugoga ta ista doza može pokazati samo neznatno djelovanje. To može biti posljedica renalne ili jetrene bolesti, ali također i nasljednog enzimatskog deficita ili pretjerane ekspresije. U kemijskoj transformaciji lijekova sudjeluju uglavnom enzimi iz skupine citokroma P-450. Ti enzimi pokazuju značajne varijabilnosti kod različitih osoba. Geni koji ih kodiraju podložni su polimorfizmima, dakle njihova ekspresija posljedično može utjecati na koncentraciju lijeka. Osobe kod kojih je smanjena enzimska aktivnost su takozvani „spori metabolizatori“, stoga neka standardna doza lijeka na njih može djelovati toksično zbog nakupljanja lijeka. Suprotno tome, povećana enzimska aktivnost uzrokovat će ubrzani metabolizam. Takve osobe su „brzi metabolizatori“ i njima su potrebne veće doze za postizanje zadovoljavajućeg terapijskog učinka (1, 2).

Biološke razlike između muškaraca i žena također imaju utjecaj na koncentraciju lijeka u serumu. Muškarci imaju obično veće tijelo od žena što znači veći V_d. S druge strane, žene imaju više masnog tkiva u kojem se zadržavaju lipofilni lijekovi. Sporije pražnjenje želuca

kod žena može odgoditi djelovanje primijenjene doze lijeka. Razlike u pH vrijednosti u želucu kod muškaraca i žena također mogu utjecati na oslobađanje lijeka iz doze. Metabolizam lijekova u jetri (strukturna modifikacija, a potom konjugacija) kod muškaraca je brži što rezultira smanjenjem koncentracije lijeka u kraćem vremenu. Žene obično doživljavaju više nuspojava na lijekove od muškaraca. Pored svih razlika kod spolova, može se reći da su neki faktori koji utječu na koncentraciju lijeka jednaki za oba spola kao što je primjerice djelovanje određenih izoenzima citokroma (1, 2).

Već odavno je ustanovljen utjecaj prehrane na apsorpciju i metabolizam mnogih lijekova, dok kombinacija lijekova i alkohola može biti i fatalna. Naime, relativno niske doze lijekova zbog interakcije s alkoholom mogu dovesti do predoziranja. Moguća su dva tipa interakcije alkohola s lijekovima: farmakokinetička kada alkohol ometa metabolizam nekog lijeka u jetri te farmakodinamička kada alkohol pojačava djelovanje nekog lijeka. Pušenje duhanskih proizvoda također ima utjecaj na koncentraciju lijekova. Osim nikotina, duhanski dim sadrži brojne spojevi koji mogu djelovati na enzime iz skupine citokroma P-450 i na taj način utjecati na metabolizam lijekova (1, 2).

1.1.4 Utjecaj bolesti na koncentraciju lijeka

Jetra je glavni organ u kojem se odvija biološka transformacija lijekova, stoga svaka bolest jetre ima utjecaj na te procese. Čak i blaža bolest jetre uzrokuje nepredvidivo djelovanje lijeka u organizmu te promijenjenu eliminaciju. U bolesnim stanjima mijenja se aktivnost jetrenih enzima skupine citokroma P-450 kao i ekspresija gena (npr. kod hepatocelularnog karcinoma). Usporena eliminacija lijeka i njegovih metabolita može dovesti do nakupljanja te toksičnog učinka. Hepatitis C kao kronično oboljenje jetre umanjuje djelovanje imunosupresiva kod transplantiranih osoba u odnosu na osobe koje nemaju hepatitis. Kako se u jetri sintetiziraju albumini i drugi serumski proteini, a mnogi se lijekovi u cirkulaciji vežu na njih, oštećenje jetre dovodi do smanjene sinteze te posljedično do otežanog transporta lijeka na ciljno mjesto. Budući da su slobodne frakcije lijeka odgovorne za farmakološku aktivnost i toksičnost, posebnu pozornost terapijskog praćenja koncentracije lijekova u serumu treba obratiti u osoba koje imaju oboljenje jetre (1).

Renalne bolesti uzrokuju poremećaj eliminacije lijekova i njihovih metabolita putem bubrega. Eliminacija je u proporcionalnom odnosu s glomerularnom filtracijom, a klirens kreatinina i

serumski cistatin C su dobri markeri za to. Posebno oprezno treba pristupati propisivanju lijekova starijim osobama jer je moguće da je kod njih prisutna neprepoznata renalna bolest. Naime, serumska razina kreatinina mijenja se tek kada je glomerularna filtracija smanjena za 50% i više. Oko polovice starijih pacijenata ima normalnu razinu serumskog kreatinina, a snižen klirens kreatinina, stoga bi iz opreza za starije pacijente bilo dobro ordinirati lijekove sa širim terapijskim prozorom. Kod renalnih bolesti dolazi do kompeticije između uremičnih toksina i lijekova koji se trebaju vezati na proteine za raspoložive albumine što također utječe na koncentraciju i aktivnost lijekova (1).

Bolesti štitnjače također dovode do promjena u koncentraciji i aktivnosti lijekova. Jedan od hormona štitnjače, tiroksin (T4), potencijalni je aktivator enzima iz skupine citokroma P-450. Kod hipotireoze dolazi do inhibicije oksidativnog metabolizma u jetri za mnoge lijekove što uzrokuje povećanje njihove koncentracije u serumu. Povećanje koncentracije nekih lijekova rezultat je nedovoljne eliminacije zbog smanjene aktivnosti enzima citokroma P-450 kod hipotireoze. To je osobito važno za lijekove iz skupine imunosupresiva kod transplatiranih osoba (1).

Kod srčane bolesti dolazi do poremećaja u cirkulaciji u smislu smanjene perfuzije raznih organa, disbalansa elektrolita i vode kao i peristaltike crijeva. Sve to se odražava na apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lijekova. Lijekove koji se metaboliziraju u jetri, a zbog smanjenog protoka krvi imaju usporenu eliminaciju te se mogu nagomilavati i produženo djelovati, potrebno je primijeniti u manjoj dozi kako bi se izbjegao neželjeni učinak. Terapijsko praćenje koncentracije lijekova u takvim okolnostima ima veliki značaj (1).

Iako trudnoća nije bolest, treba naglasiti da su sve faze prolaska lijeka kroz organizam fiziološki drugačije nego kod žena koje nisu trudne. Veliki broj trudnica u nekoj fazi ili kroz cijeli period trudnoće moraju koristiti neke lijekove. Glavni cilj je izbjeći štetan učinak na fetus. Tijekom trudnoće potreban je terapijski nadzor nad koncentracijom lijekova kako bi se doza prilagodila novim okolnostima (1).

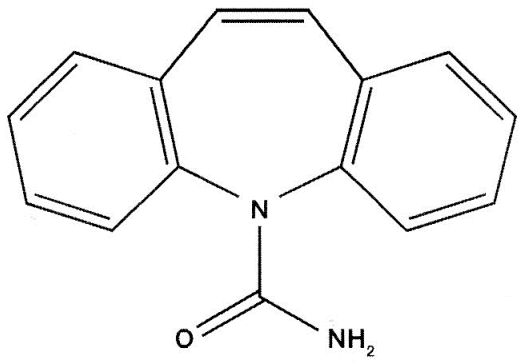
1.2 Terapijsko praćenje antiepileptika

Antiepileptici koji se koriste u liječenju epilepsije spadaju u skupinu lijekova čiju je koncentraciju u serumu nužno nadzirati. To uključuje karbamazepin, fenitoin, etosuksimid, primidon, fenobarbital i valproičnu kiselinu. Nadzor je potreban zato što su to lijekovi koji se

ne koriste u standardnim dozama, nego je važan individualiziran pristup svakom pacijentu. Osim toga, ti su lijekovi skloni toksičnom djelovanju (uzak terapijski raspon), interakciji s drugim lijekovima, a i u trudnoći je potrebna prilagodba doziranja (2, 3). Fenitoin, karbamazepin i valproična kiselina se snažno vežu za serumske proteine. Koncentracija slobodne frakcije lijeka može se predvidjeti uobičajenim mjerenjem ukupne koncentracije lijeka (slobodne frakcije i frakcije vezane na proteine), osim kod različitih bolesnih stanja (uremija, bolesti jetre). Terapijsko praćenje osobito je važno za starije i teško bolesne pacijente, trudnice i pacijente sa sniženom koncentracijom albumina (1).

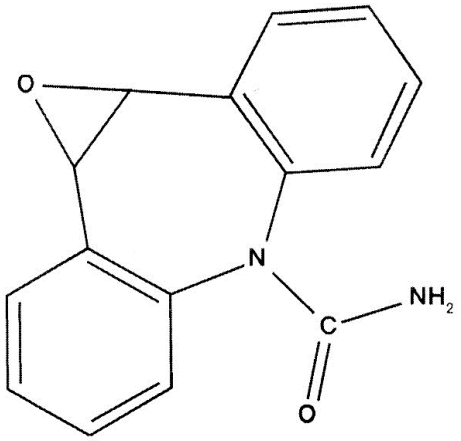
1.3 Karbamazepin

Karbamazepin se ubraja u prvu skupinu antiepileptika, a koristi se u terapiji toničko-kloničnih napadaja te trigeminalne neuralgije. Njegova primjena je odobrena 1974. godine, a od 1979. godine i za djecu iznad 6 godina. Kao u većine antiepileptika, učinkovitost mu bolje korelira s koncentracijom u serumu, nego s dozom lijeka, stoga je rutinsko terapijsko praćenje koncentracije karbamazepina ključno za pacijente. Može se koristiti i u kombinaciji s drugim antiepilepticima kod pacijenata s višestrukim tipovima napadaja.



Slika 1: Strukturna formula karbamazepina

Karbamazepin se brzo apsorbira iz probavnog trakta. Najznačajniji proces u metabolizmu karbamazepina je epoksidacija na 10,11-mjestu u karbamazepin-10,11-epoksid, aktivni metabolit sličnih antiepileptičkih svojstava kao karbamazepin. To je ujedno i glavni metabolit koji ima klinički značajne implikacije u terapijskom praćenju karbamazepina.



Slika 2: Strukturna formula karbamazepin-10,11-epoksida

On čini 15 – 20% ukupne koncentracije karbamazepina, međutim, taj se udio bitno može promijeniti u slučaju renalne bolesti ili u slučaju kada pacijent koristi još i valproičnu kiselinu ili lamotrigin. U takvim okolnostima koncentracija karbamazepin-10,11,-epoksida može znatno porasti. Primjerice, nađeno je da se kod djece taj metabolit nakuplja pa je prisutan u koncentracijama jednakim karbamazepinu (4). Takvim pacijentima bi bilo klinički korisno uz mjerenje koncentracije karbamazepina izmjeriti i koncentraciju karbamazepin-10,11,-epoksida (1). Budući da je odnos između primijenjene doze i koncentracije lijeka u serumu znatno ovisan o intraindividualnim i interindividualnim varijabilnostima, interakciji s drugim lijekovima (inhibicija ili indukcija drugih antiepileptika) te općenito o svim farmakokinetičkim karakteristikama neophodan je terapijski nadzor. Antiepileptici se koriste obično dulji period ili čak doživotno što je također važno u individualnom pristupu određivanja doze (5).

1.4 Analitičke tehnike za određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije

Za mjerenje koncentracije karbamazepina u serumu ili plazmi u većini kliničkih laboratorija danas se koriste imunokemijske metode. Te su metode podložne interferencijama zbog križne reaktivnosti između metabolita karbamazepina. Osim toga, imunokemijskim metodama nije moguće izmjeriti aktivni metabolit koji može imati značajne implikacije kako na terapijski tako i na toksični učinak. Točna kvantifikacija karbamazepina i njegovih metabolita je ograničena na kromatografske tehnike. Kromatografske tehnike poput tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. Liquid

chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) su specifične te imaju mogućnost mjeriti kako sam lijek tako i koncentraciju metabolita. Takva tehnologija, međutim, nije prikladna za hitno određivanje koncentracije lijekova što je često neophodno u svakodnevnoj rutinskoj praksi (6).

1.4.1 Imunokemijske analize

Imunokemijske metode su jednostavne, brze, robusne i osjetljive te ih je u većini slučajeva jednostavno postaviti na automatske analizatore u kliničkom laboratoriju. Uglavnom nije potrebna posebna priprema uzorka te je dovoljna relativno mala količina uzorka za analizu. Reagensi su smješteni u analizator, a kalibracijska krivulja je pohranjena u sistemu. Imunokemijske tehnike su brojne i mogu se podijeliti prema različitim kriterijima. Princip se temelji na vezanju specifičnog protutijela na lijek nakon čega se detekcija stvorenog kompleksa utvrđuje uporabom različitih obilježivača koji omogućuju mjerenje mjernog signala odgovarajućom tehnikom (7).

Unatoč tome što su brze i jednostavne, imunokemijske tehnike imaju i svoje nedostatke. Osnovni nedostatak je podložnost interferencijama, tj. postoji mogućnost prisustva tvari u biološkom uzorku ili reagensu koje mogu uzrokovati promjenu izmjerene vrijednosti u odnosu na pravu vrijednost. Interferencije se mogu podijeliti u tri osnovne skupine: prozonski učinak, križnu reaktivnost i učinak matriksa. Prozonski učinak nastaje uslijed nepovoljnog odnosa količine antigena i protutijela što može dovesti do lažno nižih rezultata. Križna reaktivnost nastaje osobito u kompetitivnim metodama kada tvari strukturno slične antigenu vežu protutijela (najčešće kod određivanja koncentracije hormona i lijekova) ili kada su prisutna heterofilna protutijela (7).

1.4.2 Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom

LC-MS/MS je separacijska tehnika koja se temelji na razdvajanju analita prema određenim fizikalnim ili kemijskim svojstvima (veličina, naboj, afinitet molekula) kao odraz različite distribucije između mobilne faze i stacionarne faze. Dolaskom u maseni spektrometar, ciljni analit se prevodi u ionizirano stanje obično elektrosprej ionizacijom (engl. Electrospray

ionization, ESI). Dakle polarne i termički nestabilne molekule velike molakularne mase prevode se u plinovito stanje. Molekule zatim prolaze kroz kvadrupol gdje se separiraju na temelju omjera mase i naboja (m/z). U tom kvadrupolu se izabiru ioni prekursori koji se potom uslijed kolizije s molekulama plina u drugom kvadrupolu fragmentiraju pri čemu nastaju produkt ioni. Konačno se u trećem kvadrupolu ioni nastali fragmentacijom ponovno separiraju temeljem omjera m/z. Na kraju cijeloga sklopa je detektor koji kvantificira dobivene analite. Cijeli proces se odvija u kontroliranim uvjetima (vrsta stacionarne i mobilne faze, temperatura, vakuum...) koji su definirani pri postavljanju metode i dakako pomoću računala. Masena spektrometrija je moćna tehnika za identifikaciju nepoznatih ili kvantifikaciju poznatih sastojaka u uzorku. LC-MS/MS se odlikuje visokom specifičnošću, osjetljivošću, visokom protočnošću te mogućnošću istovremene analize više srodnih analita. Ključna je također i velika baza podataka pomoću koje se mogu dobiveni analiti identificirati (8).

LC-MS/MS tehnika osobito je važna za terapijsko praćenje koncentracije lijekova. U jednom analitičkom postupku moguće je izmjeriti više različitih lijekova kao i njihovih aktivnih metabolita što je vrlo značajno za individualno doziranje terapije (8). Međutim, i ova tehnika ima svoje nedostatke. Najvažniji među njima je interferencija koja nastaje kao posljedica ionske supresije, a koja utječe na rezultat mjerenja i rezoluciju pikova. Drugi važan nedostatak je neprikladnost takve tehnologije za hitnu dijagnostiku. Uzorak za analizu je potrebno prethodno pripremiti dugotrajnim postupkom, cijena instrumentacije je visoka, a za njeno rukovanje potreban je visokoeducirani kadar.

1.5 Predanalitička faza

Predanalitička faza u prikupljanju i pripremi uzoraka za analizu jednako je bitna kao i analitička faza. Za interpretaciju nalaza najvažnija je informacija o vremenu uzorkovanja i vremenu uzimanja zadnje doze lijeka. Uz to uzorak mora biti sakupljen u ispravnu epruvetu i pohranjen na propisani način.

1.5.1 Uzorkovanje i uzorak za analizu

Jedan od ključnih faktora pri terapijskom praćenju koncentracije lijekova je vrijeme uzorkovanja. Uzorak za mjerenje koncentracije lijeka trebao bi se uzimati 30-60 minuta prije primjene sljedeće doze jer je tada koncentracija lijeka u cirkulaciji najniža. Mjerenje je moguće raditi u više točaka kako bi se ustanovilo kada se postiže najveća koncentracija (1).

U sklopu predanalitike pri terapijskom praćenju koncentracije lijekova potrebno je voditi računa o vrsti uzorka za analizu te o vrsti epruveta u koje se uzorkuje. Za većinu kemijskih analiza najčešće se koristi uzorak seruma ili heparinizirane plazme pa se ti uzorci koriste i u terapijskom praćenju lijekova. U novije vrijeme staklene epruvete zamijenjene su plastičnima zbog sigurnosnih razloga. Neke epruvete sadrže gel koji nakon centrifugiranja uzorka razdvaja serum od stanica. U prvim generacijama takvih epruveta ustanovljeno je da gel adsorbira neke od lijekova koji su pod nadzorom (npr. fenitoin i karbamazepin) u nepredvidivoj količini pa je preporuka da se krv uzorkuje u epruvete bez ikakvih aditiva. Za terapijsko praćenje koncentracije lijekova bilo bi vrlo dobro koristiti epruvete s tamnoplavim čepom kako bi se izbjegla zabuna kod nelaboratorijskog osoblja koje sudjeluje u prikupljanju uzoraka (1).

Uzorci seruma, plazme ili pune krvi nakon uzorkovanja i dalje su podložni biološkim promjenama (promjena pH, enzimska aktivnost i slično), stoga je potrebno voditi računa o uvjetima pohrane uzoraka do trenutka analize (1). Određeno je vrijeme moguće uzorke pohraniti u hladnjak na 4 ^{o}C, ako je riječ o duljem periodu, najbolje je zamrznuti ih na -20 ^{o}C. U svakom slučaju treba se pridržavati upute proizvođača reagensa koji se koristi za analizu o uvjetima pohrane uzoraka.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da je kemiluminiscentna mikročestična imunokemijska metoda (engl. Chemiluminescence microparticle immunoassays, CMIA) za određivanje koncentracije karbamazepina na instrumentu Arhitect i1000SR usporediva s LC-MS/MS metodom te da se njome može pouzdano pratiti terapija karbamazepinom.

3. CILJ

Cilj rada bio je usporediti imunokemijsku metodu (CMIA) za određivanje koncentracije karbamazepina s metodom LC-MS/MS.

Specifični ciljevi:

1. Usporediti vrijednosti koncentracije karbamazepina dvjema metodama: imunokemijskom (CMIA) i kromatografskom (LC-MS/MS)
2. Utvrditi koliki je prosječni udio epoksida kod pacijenata
3. Procijeniti u kojoj mjeri komedikacija i renalna insuficijencija utječu na koncentraciju epoksida.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Presječno istraživanje.

4.2. Ispitanici

U istraživanju su sudjelovali ispitanici zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku (ZKLD) Kliničkog bolničkog centra Osijek (KBCO) radi određivanja koncentracije karbamazepina. Tijekom uzorkovanja pacijenti su dali informaciju o mogućoj komedikaciji. Uz njih su obrađeni i uzorci seruma pacijenata iz suradnih ustanova kojima je zatraženo terapijsko praćenje karbamazepina. Prikupljanje je provedeno od početka studenog 2016. do početka prosinca 2017. godine. Od ukupno 59 ispitanika, petero ih je isključeno iz istraživanja jer su imali koncentracije karbamazepina ispod granice osjetljivosti testa (dva pacijenta nisu uzimala terapiju, a tri su zaprimljena s krivim zahtjevom budući da su bili na terapiji okskarbamazepinom).

4.2.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorkovanje je provedeno natašte između 7:00 i 9:30 sati, prije uzimanja sljedeće doze lijeka. Uzorkovana je venska krv u epruvetu od 6 mL s aktivatorom zgrušavanja (BD Vacutainer SST, Ref 368815). Nakon 30-minutnog stajanja, krv je centrifugirana 10 minuta na 3500 okretaja po minuti, a potom je serum odvojen od stanica. Uzorak seruma je podijeljen u dva dijela: alikvot za analizu LC-MS/MS metodom koji je pohranjen u hladnjak pri temperaturi od 2 do 8 ^{o}C do analize koja je napravljena unutar 7 dana te alikvot za imunokemijsku analizu koji je pohranjen na -20 ^{o}C.

4.3. Analitičke metode

Koncentracija karbamazepina izmjerena je prvo kromatografskom metodom na LC-MS/MS-8040 instrumentu (Shimadzu, Kyoto, Japan) a potom imunokemijskom CMIA metodom na Arhitect i1000SR instrumentu.

4.3.1. LC-MS/MS

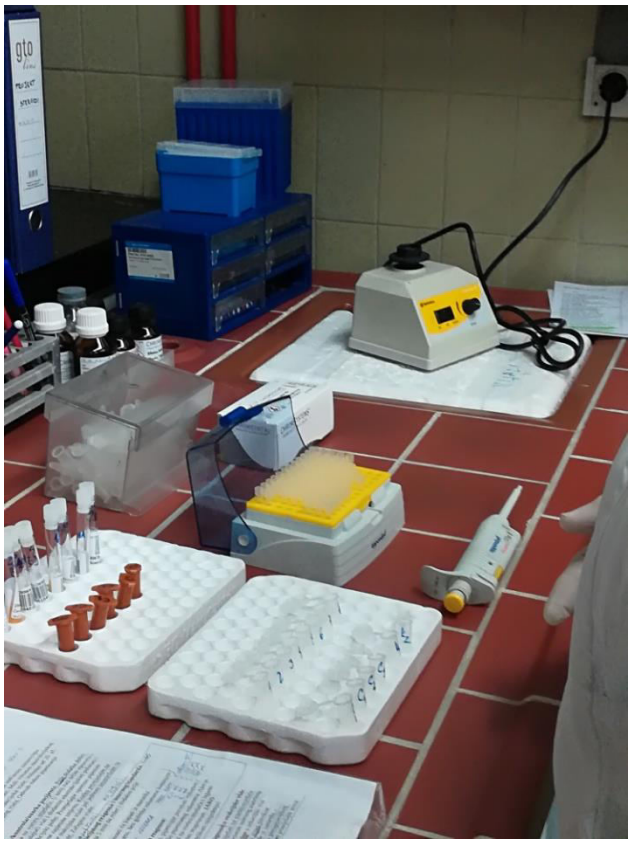
Za određivanje koncentracije karbamazepina i njegovih metabolita karbamazepin-10,11-epoksida i karbamazepin-diola iz uzorka seruma korišten je kit „MassTox TDM Parameter Set Antiepileptic Drugs and Metabolites in Serum/Plazma“ (Chromsystems, Gräfelfing, Njemačka). Kit se koristi za određivanje koncentracije i terapijsko praćenje 26 antiepileptika i njihovih metabolita LC-MS/MS tehnologijom. Predviđen je za 200 analiza, a sadrži ekstrakcijski pufer, precipitacijski reagens, diluent 1, diluent 2 te komplet liofiliziranih kalibratora u četiri koncentracijske razine (3Plus1 Multilevel Plasma Calibrator Set Antiepileptic Drugs), kontrole u dvije koncentracijske razine (MassCheck Antiepileptic Drugs Plasma Controls) te interni standard (Internal Standard Mix Antiepileptic Drugs) (9). Izvan osnovnog seta reagensa za analizu se koriste analitička kolona (MassTox TDM Master Column Series A), mobilne faze 1 i 2 (MassTox TDM Mobile Phase) i otopina za ispiranje (MassTox TDM Series A Rinsing solution).

Matriks kalibratori i kontrole su liofilizati proizvedeni odvagom antiepileptika u humanu smjesu plazme. Prema uputama proizvođača, liofilizirani kalibratori zamrznuti na -18 ^{o}C stabilni su do isteka roka trajanja. Prije upotrebe potrebno ih je otopiti s 1,0 ml redestilirane vode i ostaviti na sobnoj temperaturi 10-15 minuta kako bi se stabilizirali. Otopljeni kalibratori mogu se koristiti do 2 dana pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 ^{o}C, a u slučaju duljeg stajanja, potrebno ih je alikvotirati te zamrznuti na -18 ^{o}C. Tako spremljeni kalibratori stabilni su do 3 mjeseca (10). Na isti se način postupa i s kontrolama. Prije upotrebe kalibratore i kontrole treba odmrznuti te homogenizirati na roleru pri sobnoj temperaturi najmanje 1 sat (11, 12). Deuterirani interni standard (analit kod kojeg je jedan ili više atoma vodika zamijenjeno deuterijem) osigurava reproducibilnost kvantifikacije analita, a nalazi se u obliku otopine spremne za upotrebu. Čuva se na temperaturi od -18 ^{o}C (moguće ga je više puta odmrzavati i ponovo smrzavati), pri kojoj je stabilan do isteka roka trajanja (13).

Svi biološki uzorci prije analize LC-MS/MS tehnologijom moraju biti odgovarajuće pripremljeni.

Priprema uzoraka odvija se prema uputi proizvođača reagensa u nekoliko koraka:

1. U sve odgovarajuće označene reakcijske viale pipetira se 25 µL ekstrakcijskog pufera (četiri viala za standarde 0,1,2 i 3, dva viala za kontrole 1 i 2 i odgovarajući broj viala za uzorke seruma pacijenata).



Slika 3: Priprema uzorka za analizu LC-MS/MS metodom

2. Doda se 50 µL dobro promiješanih (na vortexu) kalibratora, kontrola i uzoraka u pripadajuće viale.
3. Doda se 250 µL mješavine precipitacijskog reagensa i internog standarda u sve viale. Priprema smjese precipitacijskog reagensa i internog standarda: 800 µL internog standarda doda se u 12,0 mL precipitacijskog pufera. Volumen se u istom omjeru može smanjiti ili povećati ovisno o broju uzoraka. Smjesu je potrebno na vortex-mješaču promiješati 5 minuta te opet kratko prije svakog dodavanja u viale. Precipitacijski reagens sadrži organska otapala, jako je viskozan i potrebno je brzo pipetiranje kako se ne bi dio volumena izgubio pri prenošenju u viale.
4. Sadržaj svih viala miješa se 40 sekundi na vortex-mješaču te stoji na sobnoj temperaturi 10 minuta.
5. Centrifugira se 5 minuta na 15000 g.
6. U nove označene viale pipetira se 400 µL smjese diluenta 1 i diluenta 2 (omjer 1:1), doda se po 100 µL supernatanta kalibratora, kontrola i uzoraka. Odgovarajućim čepom

zatvori se svaki vial te dobro promiješa na vortex-mješaču i uzorci su spremni za analizator (14).

Slika 4: Viali s pripremljenim standardima, kontrolama i uzorcima složeni u nosač

Slika 5: Ulaganje nosača uzoraka u autoinjektor uređaja LC-MS/MS

Analitički sustav LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od NEXERA X2 HPLC-a (engl. High performance liquid chromatography, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) spregnutog s masenim spektrometrom (MS). HPLC služi za parcijalnu separaciju, a MS za kvantitativnu detekciju analita. Osnovni uvjeti rada su propisani od strane proizvođača kita (ovisno o vrsti analita), međutim, postavke metoda svaki laboratorij može i treba prilagoditi svojim uvjetima rada i prostora.

HPLC za određivanje koncentracije karbamazepina ima zadane sljedeće postavke:

1. Volumen injektiranja uzorka od 1 µL
2. Duljina trajanja pojedine analize od 3,5 minute

3. Protok od 0,6 mL/min
4. Temperatura pećnice oko 25 ^{o}C (sobna temperatura) (14).

Nakon pripreme analitičkog sustava za rad koja podrazumijeva ispiranje i kondicioniranje kapilara i kolone, učita se metoda za analizu karbamazepina te se pripremljeni viali s uzorcima slože u nosač autoinjektora i pokrene se postupak. Između uzoraka provodi se ispiranje sustava kapilara i kolone otopinom za ispiranje.

Slika 6: Uređaj LC-MS/MS-8040 Shimadzu

Prolaskom uzorka kroz analitičku kolonu HPLC-a dolazi do parcijalne separacije analita koji dalje kroz kapilaru ulaze u ionizacijsku jedinicu MS-a, gdje se ESI tehnikom provodi ionizacija pri atmosferskom tlaku. Tu se pod utjecajem visokog napona odvija ionizacija pri čemu se molekule analita od interesa negativno ili pozitivno nabijaju. Karbamazepin se ionizira u pozitivnom modu pod naponom od +2kV. Struja dušika (protok 2 L/min) oblaže ESI kapilaru pri čemu se uzorak raspršuje u sitne kapljice, tj. nastaje sprej u obliku stošca. Unutar svake kapljice nalazi se puno molekula istog naboja koje se međusobno odbijaju i kapljica se raspršuje. Sprej se usmjerava prema DL kapilari (engl. desolvation line, desolvacijska kapilara) koja je zagrijana na temperaturu od 250°C. Pri tako visokoj temperaturi mobilna faza ispari. Iza DL kapilare nalaze se 3 vakuumske komore sa sustavom leća i oktapola koji usmjeravaju ione prema prvom kvadrupolu. U četvrtoj vakuumskoj

komori je prvi kvadrupol (Q1). Kvadrupol čine 4 paralelne elektrode postavljene na jednakoj udaljenosti jedna od druge, a dvije i dvije nasuprot su istog naboja (dvije su pozitivno i dvije negativno nabijene). Kada se ioni nađu u električnom polju kvadrupola, analit od intreresa se selektira pomoću odgovarajućeg napona na kvadrupolu pri čemu se propuštaju samo ioni određene mase. Preko zadanog napona Q1 selektira ionizirane cijele molekule karbamazepina, tzv. prekusor ione. Prekursor ioni usmjeravaju se u kolizijsku ćeliju gdje se bombardiraju argonom pri čemu dolazi do raspada na fragmente. Kako se kod iona kidaju najslabije veze, prekursor ioni cijepaju se uvijek na karakteristične fragmente tj. produkt ione. Produkt ioni iz kolizijske ćelije usmjeravaju se prema trećem kvadrupolu (Q3). Tu se opet na temelju odgovarajućeg napona selektiraju produkt ioni koji su karakteristični za analit od interesa. Selektirani ioni udaraju potom u detektor gdje se signal umnožava te pomoću softverske podrške kvantificira (15).

Takav način detekcije je tzv. MRM (engl. Multiple Reaction Monitoring, praćenje višestrukih reakcija) i najselektivniji je mod. Prekursor ion selektiran na Q1 i nekoliko produkt iona koji daju najjači signal na Q3 odlikuju se vrlo visokom specifičnošću kod detekcije analita. Ostali fragmenti, kao ni interferirajuće supstance, ne detektiraju se. Rezultati takve analize odlikuju se vrlo visokom analitičkom osjetljivošću i selektivnošću (14).

4.3.2. Imunokemijska metoda

Imunokemijsko određivanje koncentracije karbamazepina provedeno je na instrumentu Architect i1000SR (Abbott Diagnostics, Lake Forest, USA) s reagensima iste tvrtke jednostupanjskom CMIA metodom s fleksibilnim testnim protokolima.

U testu se reakcijska smjesa dobiva miješanjem uzorka, paramagnetskih mikročestica obloženih protutijelima na karbamazepin i konjugata karbamazepina obilježenog akridinom. Mikročestice obilježene protutijelima na karbamazepin vežu se s karbamazepinom iz uzorka i konjugatom karbamazepina obilježenog akridinom. Nakon ispiranja u reakcijsku se smjesu dodaju predaktivacijska (Pre-Trigger) i aktivacijska (Trigger) otopina. To aktivira kemiluminiscentnu reakciju koja se mjeri i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU, engl. relative light unit). Količina karbamazepina u uzorku obrnuto je proporcionalna vrijednosti RLU izmjerenoj ARHITECT i System optikom (16).

Slika 7: Uređaj za imunokemijske analize Architect i1000SR

Reagensi su spremni za uporabu, potrebno ih je skladištiti na temperaturi od 2 do 8 ^{o}C (ne smrzavati niti držati na temperaturi višoj od 32 ^{o}C), a nakon otvaranja stabilni su 28 dana. Osim reagenasa iz seta za provođenje imunokemijske analize, potrebno je imati kalibratore za karbamazepin, te kontrolni materijal (16).

Za imunokemijsku analizu tom metodom nije potrebna posebna priprema uzorka, nego se koristi nativan serum.

Slika 8: Ulaganje reagensa u uređaj Arcihtect i1000SR

4.4. Statističke metode

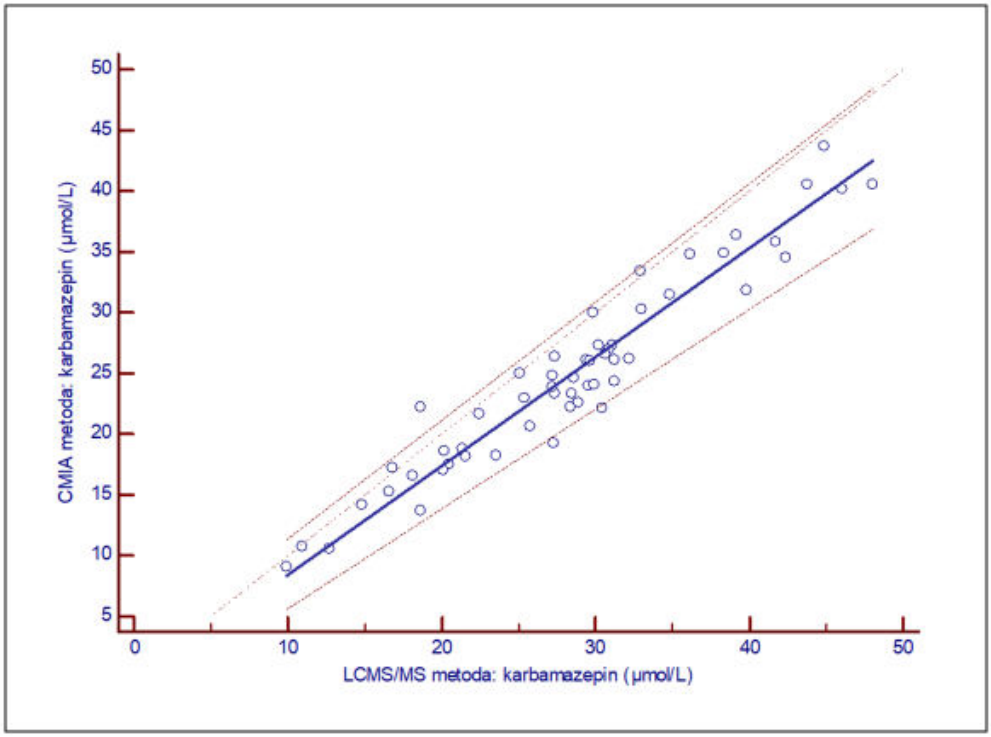
Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc (MedCalc Spftware, Mariakerke, Belgium). Za prikaz podataka korištena je deskriptivna statistika (srednja vrijednost i standardne devijacije kod normalne raspodjele i medijan i interkvartilni raspon kod nenormalne raspodjele). Za obradu i prikaz podataka dobivenih dvjema analitičkim metodama korišteni su Passing-Bablok regresijska analiza i Blandov i Altmanov prikaz podataka. Korelacija mjerenja ispitana je Pearsonovim koeficijentom korelacije. $P<0,05$ predstavljala je razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

Ispitanici su bili prosječne dobi 30 godina (10-74) te su jednako bila zastupljena oba spola (27 ženskog i 27 muškog spola). Istraživanjem je uspoređeno 54 rezultata mjerenja koncentracije karbamazepina dobivenih primjenom dviju analitičkih metoda: LCMS/MS i CMIA. Kolmorogov-Smirnovljevim testom utvrđena je normalnost raspodjele podataka.
Izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije dobivena je izvrsna međusobna povezanost mjerenja (r=0,960; P<0,001; 95%CI 0,932-0,977).

Rezultati Passing-Bablok regresijske analize rezultata mjerenja dobivenih LCMS/MS i CMIA metodama rezultiraju jednadžbom pravca: y=−0,52(95%CI -2,59 - 1,57)+0,89(95%CI 0,82 - 0,98)x iz koje je vidljivo da postoji proporcionalna razlika među izmjerenim vrijednostima.

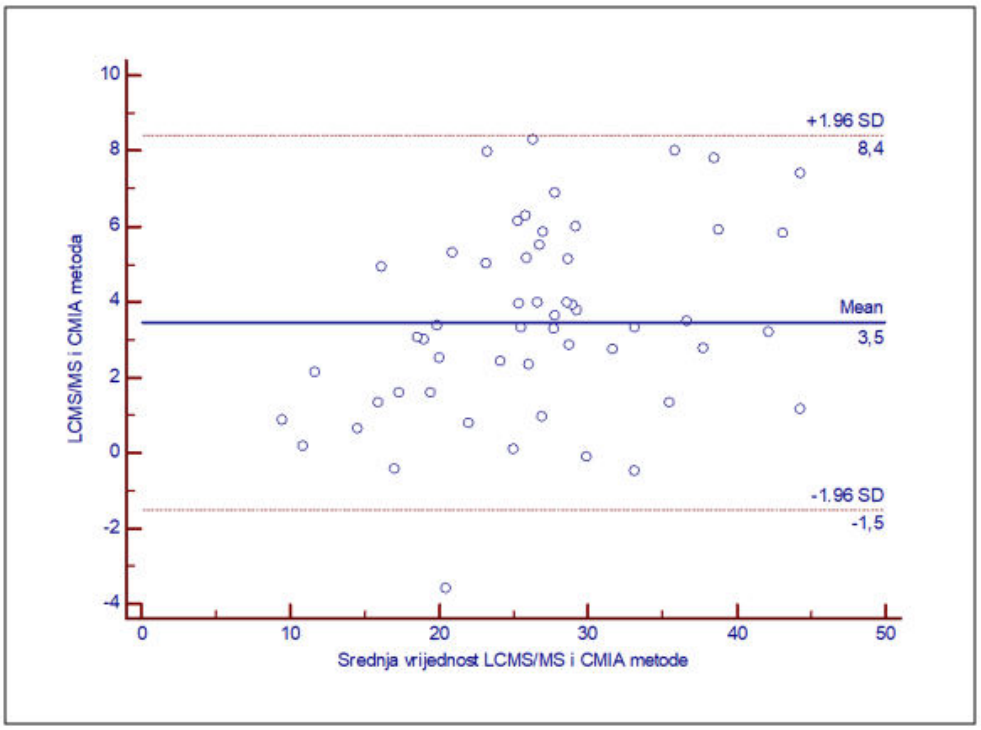
Rezultat Cusum testa pokazuje da nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,92).



Slika 9: Grafički prikaz Passing-Bablok regresijske analize

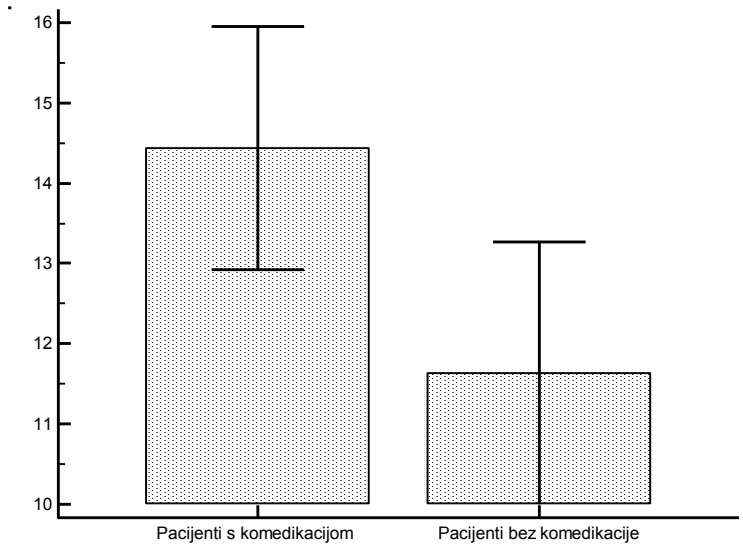
Na slici 9 vidljive su točke koje predstavljaju mjerenja, regresijski pravac (puna crta), granice pouzdanosti regresijskog pravca (isprekidana crta) te idealan pravac y=x (sitno isprekidana crta).

Na Bland-Altmanovom prikazu podataka označena je srednja vrijednost razlike u mjerenjima (3,5) te standardna devijacija razlike u mjerenjima. U tom prikazu podataka svi rezultati mjerenja, osim jednog, nalaze se unutar raspona ±1,96 SD. Rasipanje podataka je podjednako u svim mjernim područjima. Srednja razlika između dvaju mjerenja je 3,5 ±1,41µmol/L. Rezultati koncentracija karbamazepina izmjereni LC-MS/MS metodom prosječno su viši od rezultata dobivenih CMIA metodom.



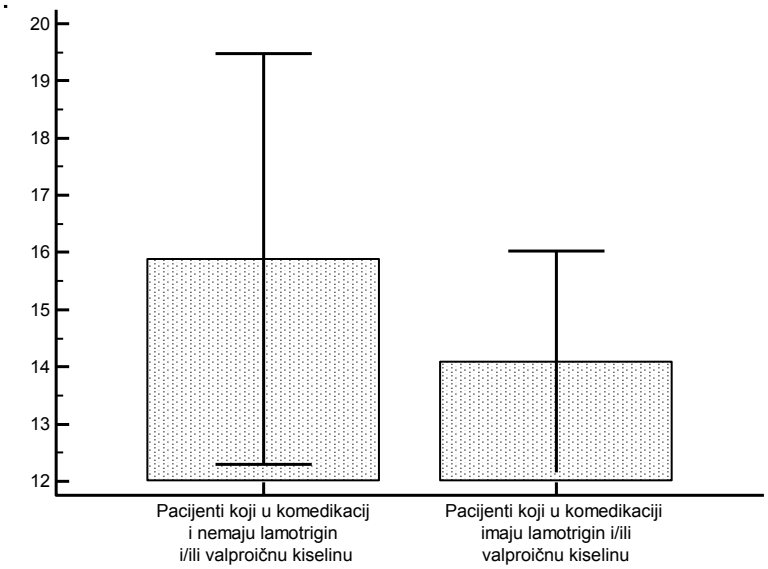
Slika 10: Bland-Altmanov prikaz podataka o usporedbi mjerenja karbamazepina LCMS/MS i CMIA metodama

Prosječni udio karbamazepin-10,11-epoksida iznosio je 13% (6,1 do 24%). Od ukupno 54 pacijenta, 35 ih je uz karbamazepin imalo komedikaciju s jednim ili više lijekova. Šest pacijenata je imalo u terapiji valproičnu kiselinu, osam lamotrigin, a dva su imala oba lijeka kao komedikaciju uz karbamazepin. Prosječni udio karbamazepin-10,11-epoksida kod pacijenata s bilo kakvom komedikacijom iznosio je 14%, dok je za pacijente koji su imali u terapiji samo karbamazepin bio 12%. Studentovim t-testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrijednostima između tih dviju skupina (P=0,020; 95%CI –5,14 - –0,46) (Slika 11).



Slika 11: Udio karbamazepin-10,11-epoksida kod pacijenata s komedikacijom i pacijenata bez komedikacije

Međutim, nije nađena statistički značajna razlika među prosječnim vrijednostima udjela karbamazepin-10,11-epoksida među pacijentima koji su imali u komedikaciji lamotrigin i/ili valproičnu kiselinu i onih koji su imali u komedikaciji druge lijekove (16% vs 14%; P=0,307 95% CI -5,31 – 1,74)(Slika 12).



Slika 12: Udio karbamazepin-10,11-epoksida kod pacijenata s komedikacijom lamotriginom i/ili valproičnom kiselinom i pacijenata koji su u terapiji uz karbamazepin primali neki drugi lijek

Bubrežna funkcija pacijenata procijenjena je mjerenjem koncentracije kreatinina u serumu. Samo su dva pacijenta imala umjereno povećane vrijednosti koncentracije kreatinina: pacijent 143 µmol/L (RI do 104) i pacijentica 95 µmol/L (RI do 90), a njihove vrijednosti karbamazepin-10,11-epoksida bile su 6% i 15%.

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju uspoređivale su se vrijednosti koncentracija karbamazepina izmjerene imunokemijskom CMIA metodom i kromatografskom LC-MS/MS metodom. Karbamazepin kao lijek iz prve skupine antiepileptika koristi se u terapiji toničko-kloničnih napadaja te trigeminalne neuralgije. Učinkovitost mu bolje korelira s koncentracijom u serumu nego s dozom lijeka, a terapijski mu je raspon uzak, stoga je nužno terapijsko praćenje njegove koncentracije. Može se koristiti i u kombinaciji s drugim antiepilepticima kod pacijenata s višestrukim tipovima napadaja (1, 2). Karbamazepin se u organizmu kemijski transformira u više različitih metabolita. Jedan od njih je karbamazepin-10,11-epoxid za koji se pokazalo da ima antikonvulzivna svojstva, dakle ima ključnu ulogu kod primjene karbamazepina (17). Prisutnost karbamazepin-10,11-epoksida ima veliki značaj u terapijskom nadzoru karbamazepina, međutim ograničenje se odnosi na mogućnost određivanja njegove koncentracije. Još uvijek se to može učiniti samo kromatografskim tehnikama, dok se kod imunokemijskih metoda može samo matematički izračunati prosječni udio dobiven iskustveno za svaku određenu imunokemijsku metodu (6). Na farmakokinetiku lijeka utječu brojni individualni faktori vezani za stanja kao što su bolesti jetre, oštećenja bubrežne funkcije i slično (1, 2). Individualizacija doze je značajna zbog postizanja poželjnog učinka lijeka uz minimalno štetno djelovanje. Odgovarajuće terapijsko praćenje lijeka višestruko je korisno za pacijente (skraćeno bolničko liječenje, manja cijena liječenja, smanjenje toksičnog učinka uzrokovanog lijekovima...).

Tehnike kojima se mjerila koncentracija karbamazepina u ovom istraživanju, imunokemijska i kromatografska, imaju svoje prednosti i nedostatke. Imunokemijske metode su jednostavne, brze i osjetljive te ih je uglavnom jednostavno postaviti na automatske analizatore u većini medicinsko-biokemijskih laboratorija, a nalazi koncentracija uglavnom su dostupni tijekom 24 sata. Uzorak seruma koji je uzet na adekvatan način i u prikladno vrijeme nije potrebno posebno pripremati, a mala količina dovoljna je za analizu. Nedostatak imunokemijskih analiza su moguće interferencije i nemogućnost određivanja koncentracije karbamazepin-10,11-epoksida, aktivnog metabolita samog lijeka. LC-MS/MS je sofisticirana separacijska tehnika koja pomoću tzv. MRM načina detekcije analita omogućuje rezultate koji se odlikuju vrlo visokom analitičkom osjetljivošću i selektivnošću. Ovom tehnikom moguće je odrediti kako koncentraciju karbamazepina tako i karbamazepin-10,11-epoksida te nekih drugih

metabolita (8). Dakako i ova tehnika ima svoje nedostatke poput interferencije u vidu ionske supresije, nemogućnosti promptnog dobivanja nalaza, potrebe za složenom pripremom uzorka, potrebe za visoko educiranim kadrom i konačno same cijene instrumenta.

Karbamazepin-10,11-epoxid čini oko 15 – 20% ukupne koncentracije karbamazepina (1), međutim njegova se koncentracija može znatno promijeniti u slučaju renalnog poremećaja ili kada pacijent koristi komedikaciju, naročito valproičnu kiselinu i/ili lamotrigin. Kombinacija karbamazepina i valproične kiseline može dovesti do koncentracije karbamazepin-10,11-epoxida koja djeluje toksično pa čak i fatalno. Russell i suradnici proučavali su 2015. godine smrtni slučaj mlađe ženske osobe. Ustanovljeno je da je smrt nastupila kao posljedica kombinirane intoksikacije karbamazepinom, karbamazepin-10,11-epoxidom i topiramatom, dok je renalna funkcija bila uredna (18).

U ovom istraživanju ustanovljeno je da je prosječni udio karbamazepin-10,11-epoksida bio 13% (6,4 – 24,4%). Povišene koncentracije karbamazepin-10,11-epoxida (>20%) izmjerene su kod 6 pacijenata od kojih je 5 pacijenata bilo s komedikacijom. Renalna funkcija svih 6 pacijenata bila je uredna (kreatinin u serumu unutar RI).

Kod imunokemijskih metoda za mjerenje koncentracije karbamazepina postoji mogućnost križne reaktivnosti s karbamazepin-10,11-epoksidom. Chen i Khayam-Bashi su svojim istraživanjem pokazali da je križna reaktivnost s karbamazepin-10,11-epoksidom korištenjem kita za karbamazepin VITROS (Ortho-ClinicalDiagnostics, Rochester, NY) 0%, za razliku od kita za Dade Dimension (Dade Behring, Deerfild, IL) kod kojeg je križna reaktivnost 94%. Parant i suradnici dokazali su visoku križnu reaktivnost s karbamazepin-10,11-epoksidom metodom PETINIA (engl. particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay, česticama poboljšana turbidimetrijska inhibicijska imunokemijska metoda; Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfild, IL), dok je kod EMIT 2000 (engl. Enzyme multiplied immunoassay technique, enzimom umnožena imunokemijska metoda) imunokemijske metode za karbamazepin bila sasvim neznatna (6). Može se dakle reći da su imunokemijske metode vrlo korisne u mjerenju koncentracije karbamazepina, međutim treba ih pažljivo odabrati kako bi rezultati analize bili što pouzdaniji.

Passing-Bablok regresijska analiza rezultata mjerenja dobivenih u ovom istraživanju LCMS/MS i CMIA metodama pokazala je da postoji proporcionalna razlika među izmjerenim vrijednostima. Rezultat Cusum testa pokazao je da nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,92). Na Bland-Altmanovom prikazu podataka svi rezultati mjerenja se ne

nalaze unutar raspona ±1,96SD, a rasipanje podataka je podjednako u svim mjernim područjima te je srednja razlika između dvaju mjerenja 3,5 ±1,41μmol/L. Rezultati koncentracija karbamazepina izmjereni LCMS/MS metodom prosječno su bili viši od rezultata dobivenih CMIA metodom što pokazuje da pri korištenju te imunokemijske metode nije došlo do križne reaktivnosti s epoksidom tijekom mjerenja koncentracije karbamazepina. Pacijenti s komedikacijom imali su prosječni udio karbamazepin-10,11-epoksida od 14%, a pacijenti bez komedikacije 12%, što pokazuje da primjena komedikacije nije značajno utjecala na udio aktivnog metabolita.

Slično istraživanje proveli su Leite i suradnici u Brazilu 2008. godine. Uspoređivali su ukupnu koncentraciju karbamazepina i karbamazepin-10,11-epoxida izmjerenu HPLC metodom (komponente i softver ChemStation iz Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) s koncentracijom karbamazepina izmjerenom CLIA (eng. Chemiluminescence immunoassays, kemiluminiscentna imunokemijska metoda) metodom na uređaju Immulite (Los Angeles, CA, USA). Uzorak je bio serum, a obrađeno ih je 75. Pearsonov koeficijent korelacije pokazao je da su mjerenja HPLC metodom značajno viša od imunokemijske metode što bi moglo utjecati na određivanje individualne doze lijeka. Bland-Altmanov dijagram pokazao je srednju vrijednost razlike u mjerenjima od 1,07 te su se svi rezultati mjerenja nalazili unutar ±1,73SD (19).

Velika prednost LCMS/MS metode u odnosu na imunokemijsku je mogućnost istovremenog analiziranja više različitih antiepileptika koji se koriste u komedikaciji što u konačnici snižava cijenu tih analiza (20). Kitom korištenim u našim mjerenjima moguće je istovremeno izmjeriti koncentraciju 26 antiepileptika i njihovih metabolita, međutim metodom za karbamazepin istovremeno se mogao izmjeriti samo još oksakarbamazepin te njihovi metaboliti. Budući da se istovremeno ne primjenjuje terapija s oba lijeka, multipleksing u ovom slučaju nema svoju praktičnu primjenu.

Konačno, temeljem provedenog istraživanja može se zaključiti da se CMIA metoda na instrumentu Architect i1000SR pokazala pouzdanom za rutinsko određivanje koncentracije karbamazepina uz pretpostavku da je koncentracija aktivnog metabolita u očekivanim granicama. Kako se rezultat analize ovom metodom može dobiti jednostavno i brzo tijekom 24 sata, što je važno u hitnim stanjima, metoda se čini prikladnom za rutinsku dijagnostiku. Svakako treba naglasiti da uspoređivane metode nisu podudarne te da se ne mogu koristiti

naizmjenično. Dakle, važno je odlučiti se kojom će se metodom pratiti pacijent te potom koristiti samo izabranu metodu.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Koncentracije karbamazepina izmjerene imunokemijskom (CMIA) i kromatografskom (LC-MS/MS) metodom nisu podudarne te se ne mogu koristiti naizmjenično
2. Rezultati koncentracija karbamazepina izmjerenih LCMS/MS metodom prosječno su viši od rezultata izmjerenih CMIA metodom
3. Prosječni udio epoksida kod pacijenata bio je 13% (6,1 do 24%)
4. Koncentracija karbamazepin-10,11-epoksida nešto je viša kod pacijenata koji su imali komedikaciju lamotriginom i/ili valproičnom kiselinom, kao i nekim drugim antiepilepticima, ali ne u klinički značajnoj koncentraciji koja bi mogla imati potencijalno toksičan učinak.

Ovim je istraživanjem potvrđeno da je imunokemijska metoda tvrtke Abbott za automatizirani analizator Architect i1000SR pouzdana za rutinsko terapijsko praćenje koncentracije karbamazepina uz pretpostavku da je koncentracija karbamazepin-10,11-epoksida u očekivanim granicama. LCMS/MS metoda ima prednost zbog mogućnosti istovremenog mjerenja koncentracije karbamazepina, karbamazepin-10,11-epoksida te nekih drugih metabolita i lijekova iz iste skupine. Nedostatci vezani za cijenu uređaja, potrebu za visoko educiranim kadrom te duljim vremenskom rokom potrebnim za dobivanje nalaza ne čine je pogodnom za terapijsko praćenje gdje je često potrebno hitno određivanje koncentracije karbamazepina.

8. SAŽETAK

Uvod:

Karbamazepin je antiepileptik s uskim terapijskim rasponom pa je nužno njegovo terapijsko praćenje. Metabolizira se u aktivni metabolit karbamazepin-10,11-epoksid, koji ima antiepileptična svojstva slična karbamazepinu. Na koncentraciju lijeka i metabolita utječu brojni čimbenici, među kojima su najvažniji komedikacija lamotriginom i/ili valproičnom kiselinom te renalna insuficijencija. Za mjerenje koncentracije karbamazepina koriste se imunokemijske ili kromatografske tehnike.

Cilj istraživanja:

Cilj rada bio je usporediti CMIA metodu za određivanje koncentracije karbamazepina s metodom LC-MS/MS.

Ispitanici i metode:

Istraživanjem je uspoređeno 54 rezultata mjerenja koncentracije karbamazepina pacijenata zaprimljenih u ZKLD KBCO. Prosječna dob ispitanika bila je 30 godina te su jednako bila zastupljena oba spola. Venska krv uzorkovana im je natašte, prije uzimanja sljedeće doze lijeka, u epruvetu s aktivatorom zgrušavanja, a dobiveni serum je analiziran kromatografskom metodom na LCMS/MS-8040 instrumentu (Shimadzu, Kyoto, Japan) te CMIA metodom na Arhitect i1000SR instrumentu (Abbott Laboratories, Lake Forest, SAD).

Rezultati:

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc. Kolmorogov-Smirnovljevim testom utvrđena je normalnost raspodjele podataka. Pearsonov koeficijent korelacije pokazao je izvrsnu međusobnu povezanost mjerenja ($r=0,960$; $P<0,001$; 95%CI 0,932-0,977). Passing-Bablok regresijska analiza vrijednosti mjerenja dobivenih LCMS/MS i CMIA metodama rezultirale su jednadžbom pravca: $y=-0,52$(95%CI -2,59 - 1,57)$+0,89$(95%CI 0,82 - 0,98)x iz koje je vidljivo da postoji proporcionalna razlika među izmjerenim vrijednostima. Rezultat Cusum testa pokazuje da nema značajnog odstupanja od linearnosti ($P=0,92$). Srednja razlika dvaju mjerenja iznosila je 3,5 ±1,41 μmol/L. Prosječni udio karbamazepin-10,11-epoksida iznosio je 13 % (6,1 do 24 %).

Zaključak:

CMIA metoda na instrumentu Architect i1000SR pokazala se pouzdanom i prikladnom za rutinsko određivanje koncentracije karbamazepina. Uspoređivane metode nisu podudarne i ne mogu se koristiti naizmjenično, nego se treba odlučiti kojom će se metodom pratiti pacijent.

Ključne riječi: CMIA, karbamazepin, karbamazepin-10,11-epoksid, LC-MS/MS, terapijski nadzor lijekova

9. SUMMARY

Comparison of immunochemistry method for determination of carbamazepine concentration with liquid chromatography tandem mass spectrometry method

Introduction:

Carbamazepine is an anti-epileptic drug with a small therapeutic window therefore therapeutic drug monitoring is necessary. It metabolizes into the active metabolite carbamazepine-10,11-epoxide that has anti-epileptic properties similar to those of carbamazepine. Many factors affect the concentration of the drug and metabolite; the most significant include valproate-lamotrigine co-medication and renal insufficiency. The concentration of carbamazepine is measured using immunochemical or chromatographic techniques.

Research objective:

The objective of this research is to present a comparison of the CMIA method for determining carbamazepine concentrations with the LC-MS/MS method.

Research subjects and methods:

The research conducted a comparison of 54 results of carbamazepine concentration measurement of patients admitted to the Institute of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital. The average age of the subjects was 30 years; both sexes equally represented. Venous blood samples were taken in fasting state, before taking the next dose of the drug, using a tube containing a clot activator and subsequently analyzed using the chromatographic technique on the instrument LCMS/MS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) and also the CMIA method on the instrument Arhitect i1000SR (Abbott Laboratories, Lake Forest, USA).

Results:

The results were analyzed using the statistical software MedCalc. The Kolmogorov-Smirnov test revealed a normal distribution of data. The Pearson correlation coefficient showed excellent association between measurements (r=0,960; P<0,001; 95%CI 0,932-0,977). The Passing-Bablok regression method of analysis applied to the measurement results obtained with the LCMS/MS and CMIA methods determined this linear equation: y=−0,52(95%CI -

2,59 - 1,57)+0,89(95%CI 0,82 - 0,98)x which shows proportional differences between the measured values. The results of the Cusum test show no significant deviation from linearity (P=0,92). The mean difference between the two measurements was 3,5 ±1,41 µmol/L. The average level of carbamazepine-10,11-epoxide was 13 % (6,1 do 24 %).

Conclusion:

The CMIA method performed on the Architect i1000SR is shown to be reliable and suitable for routine determination of carbamazepine concentration. The compared methods do not coincide and cannot be used interchangeably, the method of choice should be used consistently in monitoring the patient.

Key words: CMIA, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, LC-MS/MS, therapeutic drug monitoring

10. LITERATURA

1. Dasgupta A. Handbook of Drug Monitoring Methods. Therapeutics and Drugs of Abuse. Humana Perss, Totowa, New Jersey, 2008. In.

2. Burtis CA, Bruns DE. Tietz. Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Seventh edition, Copyright 2015 by Sunders, an inprint of Elsevier Inc. In.

3. Nwobodo NN. Therapeutic drug monitoring: An overview of commonly monitored drugs. International Jurnal of Pharmacy and Pharmacology ISSN:2326-7267, 2014. In.

4. Ding J, Zhang Y, Jiao Z, Wang Y. The effect of poor compliance on the pharmacokinetics of carbamazepine and its epoxide metabolite using Monte Carlo simulation. Acta Pharmacologica Sinica, 2012. In.

5. Tuchila C, Baconi DL, Pirvu CD, Balalau DO, Vlasceanu AM, Stan M i sur.Therapeutic drug monitoring and methods of quantitation for carbamazepine. J Mind Med Sci. 2017; 4(2): 100-114. In.

6. McMillin GA, Juenke JM, Tso G, Dasgupta A. Estimation of Carbamazepine and Carbamazepine-10,11—Epoxide Concentrations in Plasma Using Mathematical Equations Generated With Two Carbamazepine Immunoassays. Am J Clin Pahol 2010; 133:728-736. In.

7. Dodig S. Imunokemija. Medicinska naklada, Zagreb, 2015.

8. Leung KS, Fong BM. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has it time come? Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. In.

9. ChromSystems diagnostics by HPLC and LC-MS/MS. Instruction Manual for the LC-MS/MS Analysis of MassTox TDM Series A PARAMETER Set, Antiepileptic Drugs and Metabolites in Serum/Plasma, Order Number 92921, 2013..

10. ChromSystems diagnostics by HPLC and LC-MS/MS. 3PLUS1 Multilevel Plasma Calibrator Set MassTox Antiepileptic Drugs, Oreder number. 92025, 2017..

11. ChromSystems diagnostics by HPLC and LC-MS/MS. MassCheck Antiepileptic Drugs Plasma Control Level I, Order Number 0250, 2017..

12. ChromSystems diagnostics by HPLC and LC-MS/MS. MassCheck Antiepileptic Drugs Plasma Control Level II, Order Number 0251, 2017..

13. ChromSystems diagnostics by HPLC and LC-MS/MS. Internal Standard Mix MassTox

Antiepileptic Drugs, Order Number 92546, 2016..

14. ChromSystems. Instruction Manual for the LC-MS/MS Analysis of MassTox TDM Series A BASIC Kit A, Order number 92111, 2014..

15. High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS–8040, Instruction Manual. Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan. 225-14193C, 2012..

16. Abbott Clinical Chemistry, CARBAMAZEPINE, package insert. ABBOTT LABORATORIES, Abbott park, IL 60064, USA, 2007..

17. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY. 12th Edition. Copyright 2012 by The McGraw-Hill Companies.

18. Russel JL, Spiller HA, Baker DD. Case Report Markedly Elevated Carbamazepine-10,11-epoxide / Carbamazepine Ratio in a Fatal Carbamazepine Ingestion. Hindawi Publishing Corporation, Case Reports in Medicine, Volume 2015, Article ID 369707, 4 pages..

19. Leite CE, Petersen GO, Lunardelli A, Thiesen FV. A HPLC method for the determination of carbamazepie and carbamazepine-10,11-epoxide and its comparison with chemiluminescent immunoassay. Clin Chem Lam Med 2009; 47(4):458-463. In.

20. Adaway JE,Keevil BG, Owen LJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. Annals of Clinical Biochemistry, 2015; Vol. 52(1) 18-38. In.

11. ŽIVOTOPIS

Zora Šolak

Datum i mjesto rođenja:

11. 07.1963. Subotica, R. Srbija

Kućna adresa:

Vukovarska 76, 31000 Osijek

Telefon: 098 908 7224

e-mail: zora963@gmail.com

Obrazovanje:

Sanitarno laboratorijski stručni radnik

Školski centar „Ruđer Bošković“, Osijek, 1978 - 1982. godine,

Sveučilišna prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike,

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, 2011. – 2014. godine,

Zaposlenje:

Od 1983. godine do danas zaposlenica KBC-a Osijek, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku. Radila na Odjelu za hematologiju 20 godina, a potom na Odjelu za imunologiju.

Telefon na poslu: 031 / 511 - 637