



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TAM KANDA SİKLOSPORİN A DÜZEYİ ÖLÇÜMÜNDE SIVI
KROMATOĞRAFI SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRE
YÖNTEMİNİN, ANTİKOR BAĞLI MANYETİK İMMUNASSAY
YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. MURAT AR
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

DİYARBAKIR-2014



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TAM KANDA SİKLOSPORİN A DÜZEYİ ÖLÇÜMÜNDE SIVI
KROMATOĞRAFİ SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRE
YÖNTEMİNİN, ANTİKOR BAĞLI MANYETİK İMMUNASSAY
YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. MURAT AR
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

Prof. Dr. LEVENT ERDİNÇ
(TEZ DANIŞMANI)

DİYARBAKIR-2014

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgisi, tecrübesi, iş ve eğitim disiplini, hoşgörüsü ve saygınlığı ile örnek aldığım, bilgi birikimini ve desteğini bizden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Levent ERDİNÇ'e sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Eğitimimiz boyunca bize verdiği katkılardan dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nuriye METE olmak üzere Sayın Doç. Dr. Osman EVLİYAOĞLU'na Anabilim Dalımızdaki tüm öğretim üyelerine ve ayrıca uzmanlık eğitimini bölümümüzde tamamlayan Uzm. Dr. Cemal POLAT'a teşekkür ederim.

Asistanlık süresince birlikte olduğumuz, asistan arkadaşlarım Dr. Cahit TEKİN, Dr. Rahile ARSLAN, Dr. Seyyit KUŞ ve Dr. İsmail GASER'e ve birlikte çalıştığım tüm teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her türlü desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Tuba AR'a, bana verdiği yaşama sevinci ve pozitif enerjiden dolayı sevgili kızım Zeynep Nisa AR'a teşekkürlerimi sunarım. Yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle, dostluklarıyla her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamda her türlü destek ve bilgi donanımını benden esirgemeyen Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal SULA'ya ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. İlyas YOLBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Murat AR

ÖZET

Siklosporin A (CsA) 11 amino asit içeren halkasal yapıda bir polipeptittir ve güçlü bir immünsüpresif ilaçtır. Organ ve kemik iliği transplantasyonu sonrası red reaksiyonunun önlenmesinde kullanılır. Ayrıca otoimmün hastalıklar ile graft-versus-host hastalığı tedavisinde de kullanılır. Siklosporin A etkinlik ve toksisite arasında dar bir terapötik aralık sergiler. Siklosporin A renal, hepatik ve immünolojik komplikasyonlara neden olabilir ve bunlardan bazıları ciddi yan etkilere sahiptir. Böbrek yetmezliği ve lenfoma gibi artmış malignite riski önemli yan etkilere sahiptir. Ek olarak, CsA'nın bireyler ve etnik gruplar arasındaki farmakodinamik ve farmakokinetik çeşitliliği geniştir. Siklosporin A kan düzeyi izlenimi bu yüzden zorunlu bir gerekliliktir.

Biyolojik numunelerde CsA ilaç düzeyi izlemi için immünassay, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kombine edilmiş ultraviyole dedektör (HPLC-UV) ve HPLC ile kombine edilmiş kütle dedektör (LC/MS/MS) gibi analitik teknikler mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı kan CsA ilaç düzeyinin belirlenmesinde kullanılan bir immünassay yöntem olan antibody conjugate magnetic immünassay (ACMIA) yöntemini immünsüpresif ilaç izlenimi için daha sensitif ve daha selektif bir metot olan sıvı kromatografi-tandem mass spektrometre (LC/MS/MS) ile karşılaştırmaktır. Çeşitli hastalıklardan dolayı CsA ilacı kullanan 50 hasta çalışmaya dahil edildi. Her hastadan 2 tam kan tüpü alındı ve ACMIA ile LC/MS/MS yöntemi ile analiz edildi. Çalışmada iki yöntem arasında korelasyon katsayısı 0.857 olarak bulundu. Regresyon analizinde ise iki yöntem arasındaki denklemde [LC/MS/MS metodu (x) ve ACMIA (y) eksenini] eğim 1.437 kesim noktası 25.66 ve R^2 0.735 olarak bulundu. İki yöntem arasında sistematik bir hata bulundu ve genel olarak LC/MS/MS yönteminin ACMIA yöntemine göre %42 oranında daha düşük okuma yaptığı gözlemlendi. Tandem mass spektrometre yöntemi çeşitli immünsüpresif ilaçları birlikte analiz edebilmektedir ve bu durum ilaç izlemi için gereken maliyeti düşürmektedir. Tandem mass spektrometre yöntemi daha önce kullanılan immünassay yöntemine göre immünsüpresif ilaçlar için daha sensitif, daha selektif ve daha geniş bir lineer aralığa sahiptir. Sonuç olarak bu yöntem tam kanda immünsüpresif ilaç düzeyi izlemi için immünassay yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Siklosporin A, sıvı kromatografi-tandem mass spektrometre, antikor bağlı manyetik immünassay, terapötik ilaç düzeyi izlemi

ABSTRACT

Cyclosporine A (CsA) is a cyclic endecapeptide and a potent immunosuppressive drug. It is used as an immunosuppressant to prevent rejection of transplant organs and bone marrow. Cyclosporine A is also used for the treatment of autoimmune diseases and graft-versus-host disease. Cyclosporine A exhibits a narrow therapeutic range between efficacy and toxicity. Cyclosporine A may cause numerous side effects including renal, hepatic and immunological complications and some of them are serious. Renal dysfunction and increased risk of developing malignant diseases such as lymphoma are some of the serious side effects. In addition, the inter-individual and intra-individual pharmacodynamics and pharmacokinetic variability of CsA is large. Therefore constant monitoring of the CsA concentration is mandatory.

Several analytical methods are available for the determination of CsA in biological specimen for therapeutic drug monitoring purpose, such as immunoassays, liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (HPLC-UV) and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS/MS).

The aim of this study is to compare an immunoassay method, antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA), with a more sensitive and selective method, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) for CsA determination. 50 volunteers using CsA drug due to various diseases included in this study. Two whole blood samples were drawn from each subject included in this study and analyzed with ACMIA and LC/MS/MS methods. In this comparative study, a correlation ($r=0.857$) was found between two methods. Regression analysis [LC/MS/MS method (x) and ACMIA (y)] yielded a slope of 1.437, an intercept of 25.66, and R^2 0.735. There was a systematic deviation between LC/MS/MS and ACMIA (42% lower than ACMIA). It is possible to detect several immunosuppressants simultaneously, thus significantly lowering the cost of analysis. LC/MS/MS method is more sensitive, more selective and have a larger linear range for immunosuppressant drugs than the previously used immunoassay method. In conclusion, this method may be preferred to immunoassays for the routine clinical measurement of immunosuppressive drug concentrations in whole blood.

Key Words: Cyclosporine A, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, antibody conjugate magnetic immunoassay, therapeutic drug monitoring

İÇİNDEKİLER

SAYFA

DIŞ KAPAK	i
BOŞ SAYFA	ii
İÇ KAPAK SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siklosporin A	3
2.1.1. Siklosporin A'nın yapısı	3
2.1.2. Siklosporin A'nın tedavi amaçlı kullanım alanları.....	5
2.1.3. Siklosporin A'nın etki mekanizması	5
2.1.4. Siklosporin A'nın vücutta dağılımı ve farmakokinetiği	7
2.1.5. Siklosporin A ve ilaç etkileşimleri.....	10
2.1.6. Siklosporin A toksisitesi.....	11
2.2. Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi.....	13
2.3. Siklosporin A Örnek Alım Zamanı	15
2.4. Tam Kanda Siklosporin A Düzeyi Ölçümü	15
2.4.1. Antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA) yöntemi	18
2.4.2. LC/MS/MS yöntemi.....	18
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.1. Gereçler.....	19
3.1.2. Kimyasal Maddeler	20
3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	20
3.3. Yöntemler.....	21

3.3.1. Antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA) yöntemi	21
3.3.2. LC/MS/MS yöntemi.....	23
3.3. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. Metod Karşılaştırma Deneyi	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	35
BOŞ SAYFA	40
ARKA DIŞ KAPAK.....	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

α :	Alfa
β :	Beta
Ab- β -gal:	Antikor β -galaktosidaz
ACMIA:	Antibody Conjugate Magnetic İmmunoassay
AO:	Aritmetik Ortalama
C ₀ :	Doz-öncesi İlaç Konsantrasyonu
C ₂ :	Doz-sonrası 2. Saatteki İlaç Konsantrasyonu
CEDIA:	Cloned Enzyme Donor İmmunoassay
CLIA:	Chemiluminescence İmmunoassay
CPR:	Klorofenol Kırmızı
CPRG:	Klorofenol Kırmızı β -d-galaktopiranosid
CsA:	Siklosporin A
CsA-C ₁ O ₂ :	Kromdioksit bağlı Siklosporin A
CsD:	Siklosporin D
CYP 3A:	Sitokrom P-450 3A
DM:	Diyabetes Mellitus
DÜTF:	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMIT:	Enzyme Multiplied İmmunoassay Technology
ESI:	Elektrospray İyonizasyon
FPIA:	Fluorescent Polarization İmmunoassay
GIT:	Gastrointestinal Tract
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV:	HPLC ile Kombine Edilmiş Ultraviyole Dedektör
IL-2:	İnterlökin-2
İA:	İmmunassay
LC/MS/MS:	HPLC ile Kombine Edilmiş Kütle Dedektör
Maks:	Maksimum
MEIA:	Microparticle Enzyme İmmunoassay
Min:	Minimum
MRM:	Multiple Reaction Monitoring
NFAT:	Aktive T Nükleer Faktör
r:	Korelasyon Katsayısı
R ² :	Belirleme Katsayısı
RIA:	Radioimmunoassay
SD:	Standart Sapma
TGF- β :	Transforming Growth Factor beta
TİDİ:	Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi
TNF- α :	Tümör Nekroz Faktörü alfa

TABLÖLAR DİZİNİ

SAYFA

Tablo 1.	Siklosporin A metabolitlerinin yöntemlere göre çapraz reaksiyon yüzdesi	17
Tablo 2.	Flex® reaktif kartuşu içeriği	21
Tablo 3.	Kromatografi için kullanılan mobil fazların akış şeması	24
Tablo 4.	LC/MS/MS ve ACMIA yöntemleriyle çalışılan tam kan örneklerine ait veriler	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.	Siklosporin A'nın kimyasal yapısı	4
Şekil 2.	Kalsinörin Yolağı	6
Şekil 3.	Siklosporin A'nın etki mekanizması	7
Şekil 4.	Siklosporin A'nın vücut içinde dağılımı ve eliminasyonu	8
Şekil 5.	Siklosporin A metabolizması sonrası oluşan metabolitler	10
Şekil 6.	Antibody conjugate magnetic immunassay yöntemi	22
Şekil 7.	Sıvı kromatografi ve kütle spektrometre blok diyagramı	23
Şekil 8.	Siklosporin A için HPLC kromatogramı.....	25
Şekil 9.	Siklosporin A 1224.7/112.8 MRM modu için kütle spektrumu.....	25
Şekil 10.	Sıralı kütle spektrumu için MRM modu çalışma şeması	26
Şekil 11.	Siklosporin A sonuçlarının LC/MS/MS ve ACMIA yöntemleri arasındaki dağılımı.....	28
Şekil 12.	Siklosporin A sonuçlarının referans metod (LC/MS/MS) ile ACMIA yöntemi arasındaki uyumu gösteren Bland-Altman Analizi grafiği.....	29

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Siklosporin A (CsA) 11 amino asit içeren fungal kaynaklı halkasal yapıda bir polipeptittir. Moleküler ağırlığı 1202.6 dalton olup potent bir immünsüpresiftir (1). Siklosporin A organ transplantasyonlarında allograftların red reaksiyonunun önlenmesinde, graft-versus-host reaksiyonu gelişiminin önlenmesinde ve tedavisinde ayrıca bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (2). Siklosporin A dar terapötik aralık sergiler ve bazı toksik etkiler gösterebilmektedir. İmmünolojik, hepatik, renal ve nörolojik komplikasyonlar neden olabileceği bazı yan etkilerdir. Non-Hodgkin lenfoma gibi malignite riski CsA kullanımına bağlı oluşabilecek önemli bir yan etkidir. Ek olarak, aktif ilacın kan düzeyleri bireyler ve etnik gruplar arasında önemli değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, CsA kan konsantrasyonu terapötik ilaç düzeyi izlemi (TİDİ) ile dikkatli bir şekilde takip edilmelidir (3, 4).

İmmünsüpresif ilaçların terapötik ilaç düzeyi izlemi 1980'lerin başında CsA'nın tanınmasından sonra başlamıştır. İmmünsüpresif ilaçların yan etkilerini ve red riskini azaltmak için gerekli olan kan ve/veya plazma ilaç seviyesini terapötik ilaç düzeyi izlemi ile korumak gerekir ve bu hasta bakımının önemli bir parçasıdır (5).

Hasta tedavisinde etkili dozajın sağlanması için biyolojik numune ilaç konsantrasyonunu doğru ve kesin bir şekilde ölçmek gerekmektedir. Klinik laboratuvarların bu performans kriterlerini sağlayabilecek en uygun analitik metodla çalışmaları bir ihtiyaçtır. Biyolojik numunelerde immünsüpresan ilaç izlenimi için herbiri belirli avantaj ve sınırlamalara sahip birkaç analitik teknik mevcuttur. Bu teknikler immünassay (İA), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kombine edilmiş ultraviyole dedektör (HPLC-UV) ve HPLC ile kombine edilmiş kütle dedektör (LC/MS/MS) gibi yöntemleri içermektedir.

İmmünassay yöntemler CsA ilaç düzeyini ölçmek için klinik laboratuvarlarda en çok kullanılan yöntemdir. Ancak CsA düzeyi doğruluk ve özgünlüğü için konsensus belgelerinde önerilen kriterleri tam olarak yerine getiremediğine dair endişeler bulunmaktadır. Buna karşılık LC/MS/MS yöntemi CsA ölçümü için yüksek doğruluk ve özgünlük gösteren bir yöntemdir. Böylece CsA düzeyi daha doğru bir şekilde ölçülmektedir (6).

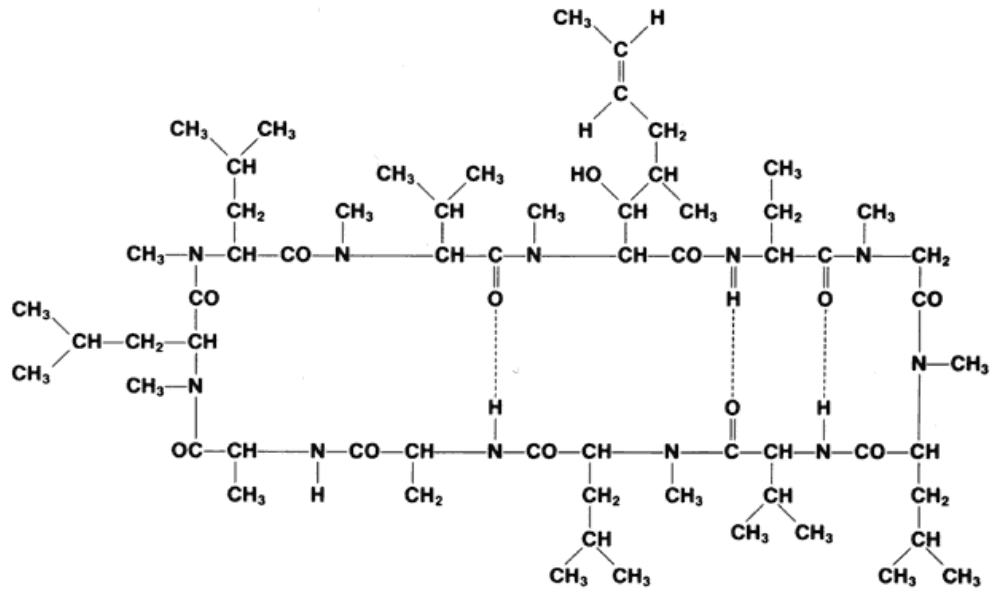
Bu alışmamızda CsA ilaç tedavisi alan kişilerin tam kan CsA ilaç düzeyini immunassay yöntemi ve immünsüpresan ilaç düzeyi ölçümünde altın standart yöntem olarak kabul edilen LC/MS/MS yöntemi ile ölçmeyi ve karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

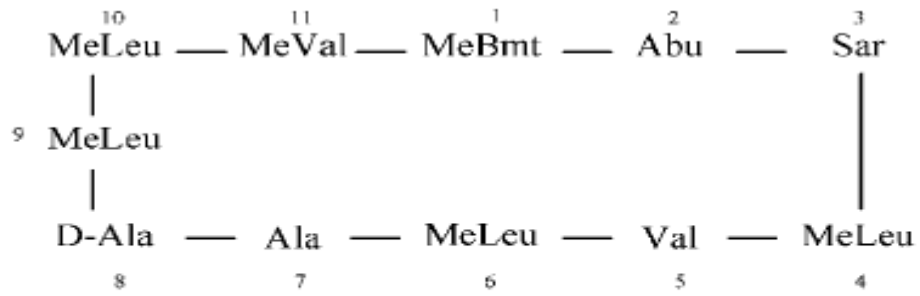
2.1. Siklosporin A

2.1.1. Siklosporin A'nın yapısı

Siklosporin A Norveç'in güneyinde yer alan Harganger Vidda bölgesinde bulunan *Tolypocladium Inflatum* Gams isimli fungustan elde edilen güçlü immünsüpresif aktiviteye sahip halkasal yapıda bir polipeptiddir. 11 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 1202.6 daltondur (1). CsA'nın kimyasal yapısının kendine has özellikleri bulunmaktadır. Yapısında iki sıradışı aminoasit bulunmaktadır. Bunlar birinci sıradaki 3-hidroksi-4-metil-2-metilamino-6-oktonoik asit (MeBmt) ve ikinci sıradaki α -aminobutirik asittir. Onbir aminoasitten yedisi metillenmiş halde bulunmaktadır ve sekizinci sıradaki alanin aminoasidi D konfigürasyonuna (D-Ala) sahiptir (7). Borel ve arkadaşları tarafından 1972 yılında İsviçre'de bulunan Sandoz laboratuvarında keşfedilmiştir. Başlangıçta yeni bir antifungal ilaç için araştırma yapılırken keşfedilmiştir ve birçok immünolojik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu özellikleri CsA'yı böbrek ve diğer solid organ transplantasyonu sonrası immünsüpresif etki için ilgi çekici bir ajan yapmıştır (8).



A



B

Şekil 1. A: Siklosporin A'nın kimyasal yapısı; $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ (9) **B:** Siklosporin A'nın yapısında bulunan aminoasitler (7).

2.1.2. Siklosporin A'nın tedavi amaçlı kullanım alanları

Siklosporin A'nın allograft organ nakli alıcısında akut reddin bastırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Böbrek, kalp, karaciğer, pankreas ve kemik iliği transplantasyonlarında kullanılmak üzere onaylanmıştır. Ayrıca kemik iliği transplantasyonu sonrası gözlenebilen graft-versus-host reaksiyonunun önlenmesi ve gelişmişse tedavisinde ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Otoimmün hastalık grubunda üveit, diyabetes mellitus, multipl skleroz, psöriazis ve romatoid artrit sayılabilir (2, 10).

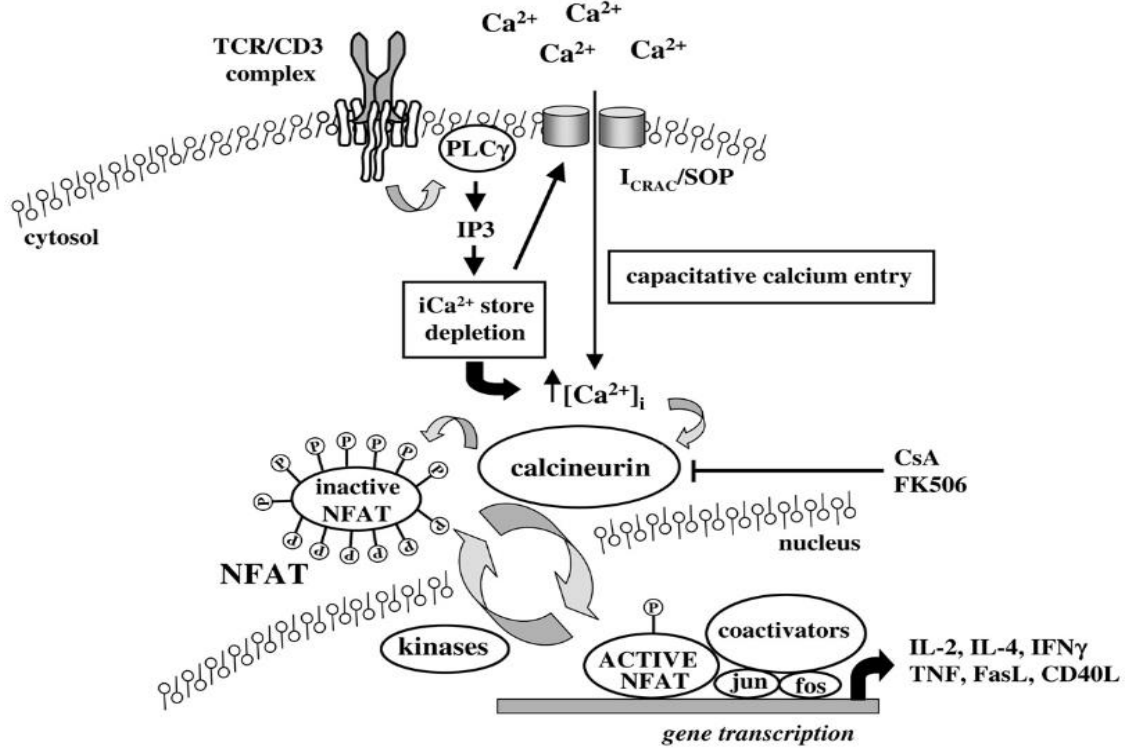
Romatoid artritte metotreksata yanıt vermeyen ciddi olgularda kullanılabilir. Siklosporin metotreksat ile birlikte kullanılabilir ancak bu durumda her iki ilacın da kan düzeyi çok dikkatli bir şekilde izlenmelidir. Psöriazis, atopik dermatit ve nefrotik sendrom olgularında da tedaviye yanıtızsızlık durumunda CsA kullanılmaktadır (9).

Siklosporin A başta glukokortikoidler olmak üzere azatioprin, mikofenolat mofetil ve sirolimus gibi diğer immünsüpresif ilaçlar ile birlikte kullanılabilir. Kullanılacak siklosporin dozu yapılan organ transplantasyonu ve tedavi protokolündeki diğer ilaç dozlarına göre değişim gösterebilmektedir (9).

2.1.3. Siklosporin A'nın etki mekanizması

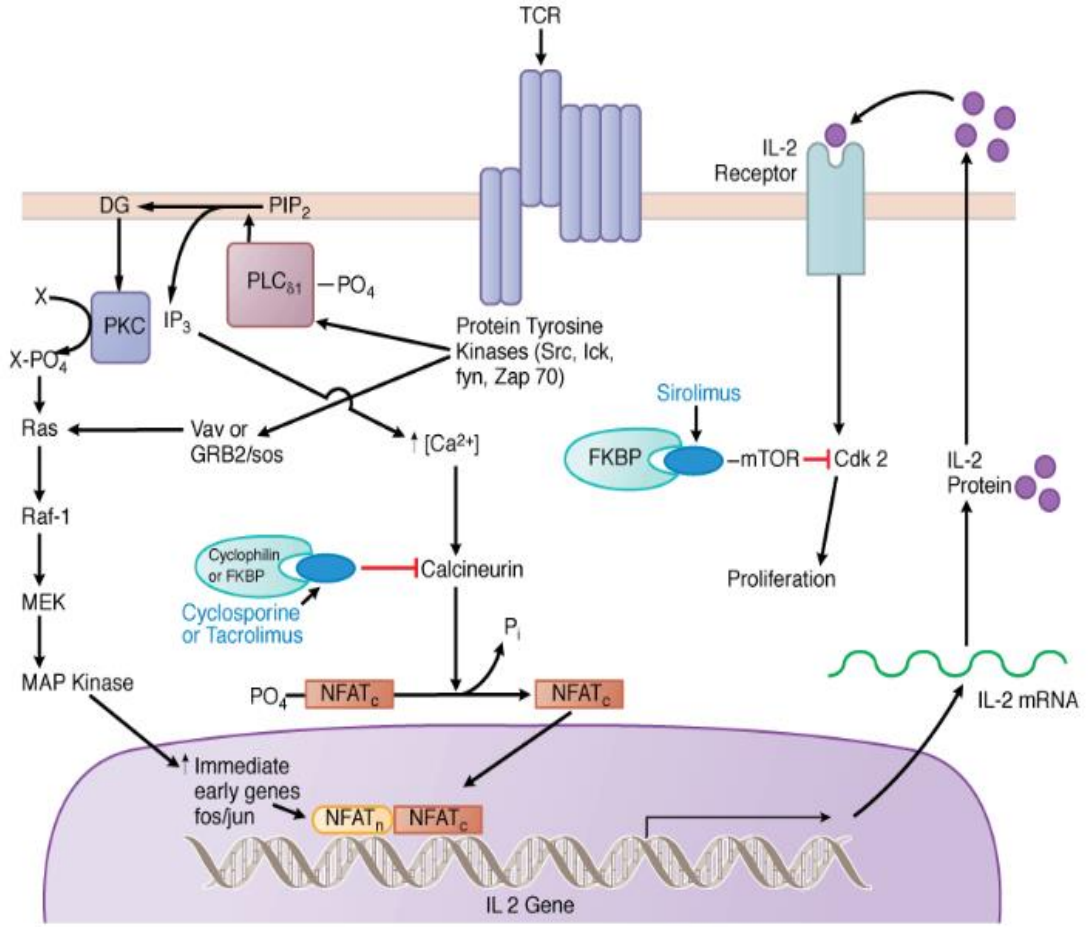
Siklosporin A bir kalsinörin inhibitörü olarak kabul edilir ancak gerçekte çok yönlü bir mekanizma ile T lenfositlerin aktivasyonunu bloke ederek immünsüpresyon sağlar (11). CsA hücre zarlarını kolayca geçebilecek lipofilik yapıda bir peptiddir. Siklosporin A lenfosit membranını serbest bir şekilde geçer ve sitoplazmada farmakolojik olarak aktif bir kompleks oluşturacağı siklofilin ile etkileşir. Bu kompleks serin/treonin spesifik bir protein fosfataz olan kalsinörine bağlanır ve aktive T nükleer faktör (nuclear factor of activated T, NFAT)'ün stoplazmik komponentinin Ca^{+2} bağımlı defosforilasyonunu inhibe eder. NFAT'nin stoplazmik komponenti defosforile olduğunda çekirdeğe geçer ve çekirdekte NFAT'nin nükleer komponenti ile kompleks oluşturur. Bu kompleks T hücrelerinin

aktivasyonu için gerekli olan interlökin-2 (IL-2) ve diğer lenfokinlerin oluşumu için gen uyarımı yapar (Şekil 2).



Şekil 2. Kalsinörin yolağı (12)

Kalsinörinin enzimatik aktivitesi siklosporin/siklofilin kompleksi ile fiziksel etkileşimi sonrası inhibe edilmiş olur. Böylece NFAT'nin stoplazmik komponentinin defosforilasyonu gerçekleşemez. Defosforile olmamış stoplazmik NFAT çekirdeğe geçemez, gen transkripsiyonu gerçekleşmez. Siklosporin A tarafından gerçekleştirilen bu inhibisyon sonrası IL-2, interlökin-3, interlökin-4 ve interlökin-12 gibi sitokinlerin; tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar medyatörlerin yanısıra granülosit ve/veya makrofaj koloni stimüle edici faktör gibi büyüme faktörlerinin gen ekspresyonu baskılanmaktadır (Şekil 3). Böylece T lenfosit spesifik antijenik uyarıya cevapta başarısız olmuş olur. Siklosporin A ayrıca T hücrelerinin çoğalmasını ve sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu sağlayan IL-2'nin güçlü bir inhibitörü olan transforming growth factor β (TGF- β)'nin ekspresyonunu artırır (2, 9, 13).



Şekil 3. Siklosporin A'nın etki mekanizması (9)

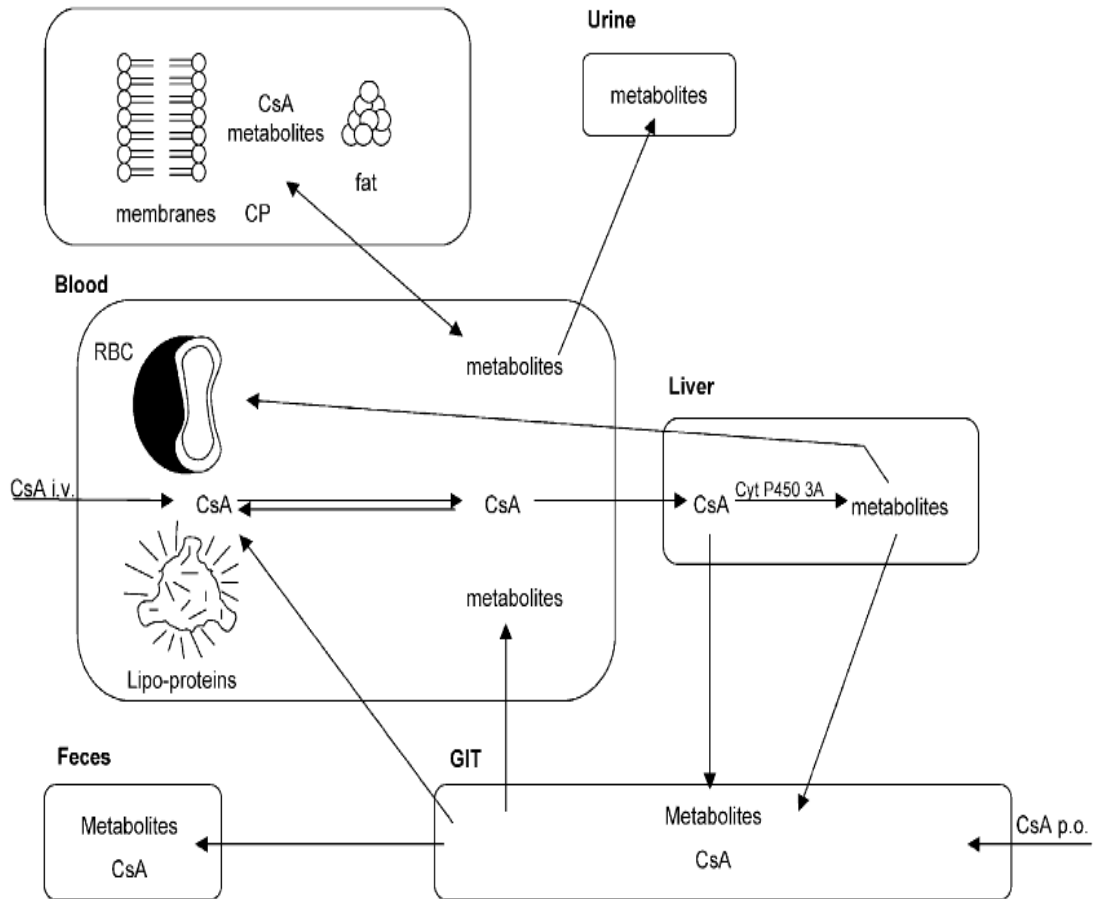
2.1.4. Siklosporin A'nın vücutta dağılımı ve farmakokinetiği

Siklosporin A intravenöz veya oral olarak tatbik edilebilir. Siklosporinin oral olarak kullanılabilen modifiye (Gengraf, Neoral) ve non-modifiye (Sandimmune) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Modifiye edilmiş mikroemülsiyon şeklindeki form (Neoral) Emilimi arttırmak için geliştirilmiştir ve kullanım için Amerika Birleşik Devlet'lerinde Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından 1995 yılında onaylanmıştır. Modifiye form Sandimmune ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir biyoyararlanıma sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte tüm formülasyonların yetersiz ve değişken bir emilim özelliği gösterdiği ve %5-60 aralığında ortalaması %30 olan bir biyoyararlanım gösterdiği kabul edilmektedir. Neoral ve Sandimmune biyoeşdeğer ilaçlar olmadığına göre bir

doktor denetiminde olmadan ve kan ilaç konsantrasyonu izlenimi yapılmadan birbirinin yerine kullanılamaz (2, 9).

İlaç oral verildikten sonra en yüksek konsantrasyona non-modifiye formda 2-6 saat sonra, modifiye formda ise 1-2 saat sonra erişilir. Non-modifiye form uygulandığında bazen uygulamadan 5 veya 6 saat sonra ikinci bir pik elde edilir. İlacın gıda ile birlikte uygulanması emilimi hem geciktirir hem de azaltır.

Siklosporin A yaygın olarak vasküler kompartman dışında dağılır. Kanda CsA özellikle eritrosit içinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Plazmada yüksek derecede (~%90) proteinlere bağlıdır. Özellikle lipoproteinler olmak üzere albümin ve globülin gibi proteinlere bağlanır. Ayrıca yüksek dağılım hacmine sahip olduğu bilinmektedir. Dağılım hacminin solid organ transplant alıcılarında intravenöz uygulanım sonrası 3-5 litre/kg kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (2, 9, 14).



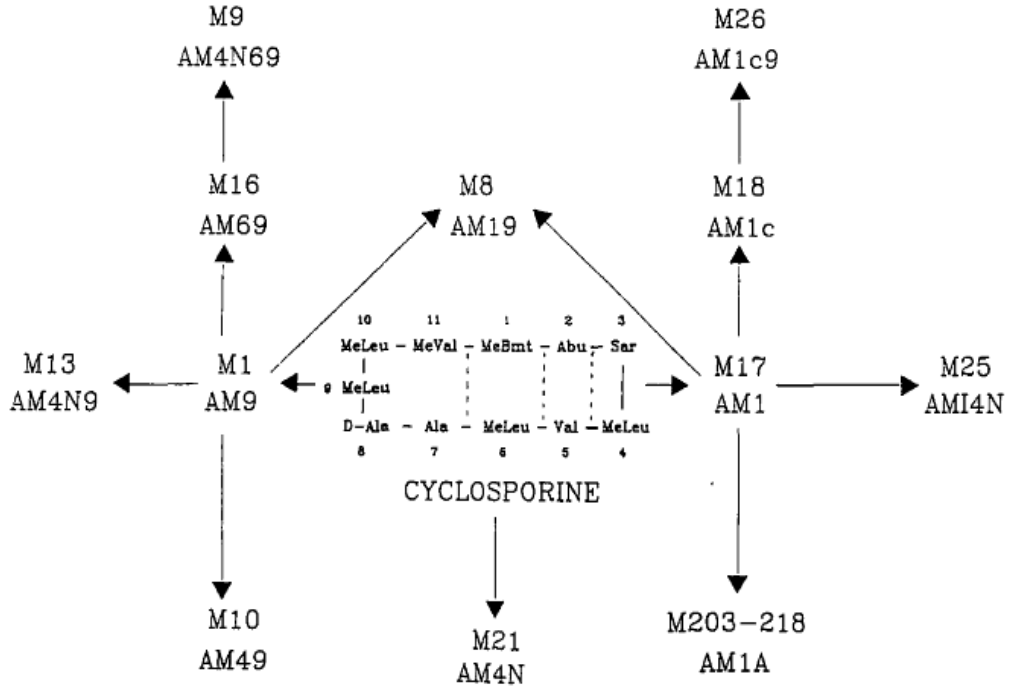
Şekil 4. Siklosporin A'nın vücut içinde dağılımı ve eliminasyonu (7)

Siklosporin A yaygın olarak karaciğerde sitokrom P-450 3A (CYP3A) enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir (15). Ayrıca düşük oranda gastrointestinal sistem ve böbreklerde de metabolize olmaktadır. Sadece %0.1'i idrarla değişmeden atılır. Siklosporin A'nın kan, safra, idrar ve feçes gibi biyolojik numunelerde en az 25 metaboliti tanımlanmıştır. CsA metabolizması sonrası oluşan metabolitlerin çoğu inaktif durumdadır. Metabolitlerin hepsi ana ilaca kıyasla hem daha düşük biyolojik aktivitede hem de daha düşük toksik etkiye sahiptir (9). CsA metabolizması sonrası oluşan ana metabolitler olan AM1, AM9 ve AM4N bugüne kadar tespit edilen en aktif metabolitlerdir. AM1 en etkin olan metabolit olmasına rağmen ana ilacın %10-20'si kadar immünsüpresif etkiye sahiptir (15).

Siklosporin A ve metabolitleri sadece %6'sı idrarla olmak üzere esas olarak safra yolu ile atılır. İdrarla atılımı az olduğundan dolayı diyaliz ve böbrek yetmezliği gibi durumlarda genel olarak doz ayarlanmasına gereksinim yoktur. Ancak karaciğer disfonksiyonu olan durumlarda mutlaka doz ayarlanması yapılmalıdır (9).

Sitokrom P-450 3A'nın değişken sentezlenmesi ve ince bağırsakta bulunan P-glikoprotein olarak adlandırılan çoklu ilaç dışı akış pompası kombinasyonu oral uygulama sonrası siklosporin emilimi için doğal bir bariyer gibi çalışmaktadır. Bu kombinasyonun hastalar arası biyoyararlanımın çok değişken olmasını açıklayabileceği düşünülmektedir.

İlacın yarı ömrü uygulanan formulasyona ve hastaya göre değişkenlik göstermektedir. Modifiye form 5-18 saatlik, nonmodifiye form ise 10-27 saatlik bir yarı ömre sahiptir (2).



Şekil 5. Siklosporin A metabolizması sonucu oluşan metabolitler (15)

2.1.5. Siklosporin A ve ilaç etkileşimleri

Siklosporin A sık kullanılan birçok ilaç ile etkileşim gösterebilir. Mikrozoal enzim sistemini, özellikle de CYP3A mikrozoal enzim sistemi etkileyen herhangi bir ilaç CsA kan ilaç düzeyini değişik şekillerde etkileyebilir. CYP3A mikrozoal enzim sistemini inhibe edecek ilaç kullanımı CsA kan ilaç düzeyinin artmasına neden olacaktır. Bu ilaçlara kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, nikardipin), antifungal ajanlar (flukonazol, ketokonazol) ve antibiyotik (eritromisin) gibi ilaçlar örnek olarak gösterilebilir.

Tam tersine CYP3A enzim sistemini aktive edecek ilaç kullanımı ise CsA kan ilaç düzeyinin azalmasına neden olacaktır. Bu ilaçlara da antikonvülsan (fenobarbital, fenitoin) ve bazı antibiyotikler (rifampin, nafsilin) örnek olarak gösterilebilir. Bunun sonucunda gerekli tedavi dozunun sağlanamaması veya toksik etki gösterecek dozun ortaya çıkması gibi bir durum meydana gelebilir. Bu nedenle

bu ilaçlarla birlikte kullanımı durumunda siklosporin A'nın kan ilaç düzeyi dikkatli bir şekilde takip edilmelidir (9).

2.1.6. Siklosporin A toksisitesi

Siklosporin A sahip olduğu immünsüpresif özellikleri ile çeşitli immünolojik hastalığı olan bireylerde veya organ transplantasyonu yapılan hastalarda yaşam kalitesi ve hayatta kalma süresinde artma gibi çok önemli etkiler göstermiştir. Buna rağmen CsA böbrek disfonksiyonu, hipertansiyon, tremor ve dişeti hipertrofisi gibi yan etkilere neden olmaktadır. Bu yan etkilerin böbrek, karaciğer, pankreas, kalp ve sinir sistemi gibi çeşitli dokularda histopatolojik değişikliklere neden olduğu kanıtlanmıştır (7, 16, 17). Ayrıca CsA kullanımının hiperkalemi, artmış malignite riski ve diyabetes mellitus (DM) gibi yan etkilere neden olduğu düşünülmektedir (18, 19).

Kalsinörin inhibitörleri (CsA, Takrolimus) ile DM gelişimi arasında ilişki olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CsA kullanan olgularda pankreasın langerhans adacıklarında β -hücrelerinin hacmi azalırken insülin üretimi ve salgılanması inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Bazı çalışmalarda takrolimus kullanan post-transplant olgularında hiperglisemi ve DM gelişme riskinin CsA kullanan hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (7, 18-20).

Gerhard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada transplant hastalarında immünsüpresyon için CsA ve azatiopirin kombinasyonu uygulandığında non-hodgkin lenfoma riskinin arttığını belirtmişlerdir. Ancak CsA tek başına uygulandığında lenfoma riskinde herhangi bir artışın görülmediğini de belirtmişlerdir (4).

Siklosporin A tedavisi ile birlikte hipertansiyon görülme sıklığı yüksektir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ilacın uygulanmasından sonraki günlerde hastalarda sistemik vasküler dirençte artış gösterilmiştir (21). CsA uygulanması sonrası oluşan hipertansiyon bozulmuş sirkadiyen ritim ve fizyolojik olarak görülen gece kan basıncındaki düşmenin olmaması ile karakterizedir. Hastalar gece baş ağrısı ve sık idrara çıkma şikayetleri tarif etmişlerdir. Retina kanamaları ve merkezi sinir sistemi belirtilerinin eşlik ettiği hipertansiyon en sık gece vakitlerinde kayıt edilmiştir (22).

Ayrıca bu hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin önemli bir belirleyicisi olan sol ventrikül hipertrofisi de gözlenmiştir (23).

Siklosporin A ile tedavi edilen transplant hastalarında fungal ve bakteriyel enfeksiyon riski diğer immünsüpresif tedavi rejimleri uygulanan hastalara göre daha düşük bulunmuştur. Bu durumun daha düşük steroid kullanımına ilişkin olduğu düşünülmektedir. Ancak bu hastalarda daha yüksek viral enfeksiyon (özellikle herpes simpleks, herpes zoster ve sitomegalovirüs) ve pnömosistis karini pnömonisi riski bulunmaktadır (7).

Böbrek disfonksiyonu CsA tedavisinin ana komplikasyonudur. Nefrotoksisite tedavinin kesilmesi veya modifikasyonu için önemli bir göstergedir. CsA'nın nefrotoksik potansiyeli ilk olarak Sir Roy Calne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ifade edilmiştir. CsA'nın nefrotoksik etkisi akut ve kronik etki olarak ikiye ayrılabilir. Akut olarak CsA böbrek kan akımı azalması, afferent arteriol vazokonstriksiyonu, glomerüler filtrasyon hızında azalma ve renal vasküler dirençte artma gibi etkilere neden olabilir. Bu etkilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte CsA'nın vazoaktif faktörlerin salınması ve transkripsiyonel düzenlemeyle bu etkilere neden olduğu düşünülmektedir. Kronik olarak CsA'nın renin-anjiyotensin-aldosteron eksenini inhibe etme, TGF- β gibi profibrotik faktörlerle ilgili genleri aktive etme ve böbreğin hipoksiye en duyarlı bölgelerinde göreceli bir iskemi oluşturma gibi etkileri vardır (2, 7, 9). Kısa süreli CsA tedavisi ile oluşan nefropati geri-dönüşümlü olmakla birlikte, uzun süreli CsA kullanımı sonucu oluşan vazokonstriksiyon akut tübüler skleroz ve interstisyumda geri-dönüşümsüz tübüler lezyonlara neden olabilir. Sonuç olarak bu kronik ve geri-dönüşümsüz nefrotoksisiteye sebep olabilir (24).

Siklosporin A'nın dar terapötik aralık sergilemesi ve görülen yan etkilere ek olarak aktif ilacın kan düzeyi bireyler ve farklı etnik gruplar arasında önemli derecede değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle CsA tedavisi uygulanan hastalarda başarı elde edilmesi için optimal immünsüpresif tedavi uygulanmalıdır. Bunun için de CsA kan ilaç düzeyi TİDİ ile dikkatli bir şekilde izlenmelidir (3).

2.2. Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi

Geçmişten günümüze yeni bir ilaç geliştirilmekteki amaç tedavi etkinliği yüksek olan ve bunun yanında toksik etkisi en az olan ilacı doktorların hizmetine sunmak olmuştur. Bir ilacın terapötik ve toksik etkisinin uygulanan doz ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Bazı ilaçlarda klinik gözlem ve deneylere dayanılarak elde edilen standart doz uygulaması herhangi bir sorun oluşturmaz. Ancak kalp hastalıkları, astım, bakteriyel enfeksiyonlar, transplantasyon uygulanması gibi immüsupresyonun gerektiği durumlar ve psikiyatrik olgularda kullanılan ilaçlarda toksik etkinin gelişimini önlemek için her hasta için dozun bireyselleştirilmesi gerekmektedir. Bu yönüyle TİDİ hastanın klinik izlemi açısından oldukça önemlidir (25).

Multidisipliner klinik bir aktivite olan Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi hastanın en iyi cevap verdiği ilaç ve dozunun seçimini kolaylaştırır ve tedavi uyum ve etkinliğinin değerlendirilmesine olanak sağlar. TİDİ ayrıca ilaç-ilaç etkileşimleri tespitini kolaylaştırır ve ilaca bağlı toksisitenin belirlenmesi için bir temel oluşturur. TİDİ multidisipliner bir yaklaşım gerektirir ve tedaviyi uygulayan hekim, klinik laborant, klinik farmakolog, eczacı ve kan örneklerinin alımında rol alan hemşire gibi personelin bu süreçte görev alması gerekmektedir. İlaç düzeyi izlemi ilk olarak yaklaşık 40 sene önce yapılmaya başlanmış ve o yıllarda ölçümler daha çok araştırma amaçlı olarak yapılmıştır. ‘Biyolojik sıvıların içindeki ilaç konsantrasyonu ile ilacın etkisi arasında bir ilişki varsa, biyolojik sıvıların ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesi hasta bakımı için yararlı olacaktır’ ilkesi gereği 1970’li yıllarda TİDİ klinik laboratuvarlarda yer almaya başlamış ve hasta takibinde önemli bir yer edinmiştir (2, 25).

İlaçların eliminasyon ve/veya metabolizmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Buna bağlı olarak dolaşımdaki ilaç konsantrasyonu ve etkisi kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bu nedenle özellikle bazı ilaç veya ilaç gruplarının dolaşımdaki konsantrasyonunun dikkatli bir şekilde izlenmesi hasta takibi açısından büyük önem arz etmektedir. Aksi takdirde kardiyak rahatsızlık, aritmi, organ yetmezliği ve organ reddi gibi ciddi komplikasyonların ortaya çıkması muhtemeldir (25).

Terapötik ilaç düzeyi izlemi bir ilacın numune alma anındaki farmakokinetik durumunu açıklar. Farmakokinetik spesifik bir ilacın biyolojik sistemlerde belirli bir ilaç konsantrasyonu oluşumunda rol alan emilim, dağılım ve eliminasyon gibi parametrelerle verilen ilaç dozu arasındaki ilişkiyi inceleyen bilimdir. Aynı doz ilacın farklı bireylerde değişik ilaç konsantrasyonuna neden olmasında ilacın farmakokinetik özellikleri önemli rol almaktadır. Bununla birlikte analiz sonucu elde edilen değer tek başına değerlendirilmemelidir. Tedavi edilen hastalık, ilaçla tedaviye başlama zamanı, hastanın tıbbi durumu, ilacın dozu, ilacın hangi aralıklarla verildiği, hastanın kullandığı diğer ilaçlar, hastanın cinsiyeti, ağırlığı ve boyu gibi özelliklerle birlikte değerlendirilmelidir. Sonuç olarak daha önceden değinildiği gibi TİDİ multidisipliner yaklaşım gerektiren bir süreçtir (2, 25).

Klinikte kullanılan bazı ilaçlar için etkinlik için bireyler arası varyasyon bulunmasına rağmen, bu ilaçların neden olduğu yan etkiler biyokimyasal ve klinik olarak gözlemlenebilmektedir. İlacın farmakokinetik özellikleri yanında ilaç konsantrasyonuna etki edebilecek diğer parametreleri de kapsayacak ve tedavi etkinliğini gösterecek bir klinik parametre (vücut sıcaklığı, kan basıncı, ağrı, kardiyak ritim vb.) veya biyokimyasal parametre (kolesterol, kan şekeri vb.) doğrudan değerlendirilebiliyorsa ilaç izlenimi etkinliği azalmaktadır. Ancak özellikle psikiyatrik vakalarda ve immünsüpresyon gerektirecek olgularda kullanılan ilaçların yan etkilerini önceden tahmin ettirebilecek bir klinik veya biyokimyasal parametre bulunmamaktadır. Bu durum bu tür ilaçların ilaç kan düzeyinin izlemine vazgeçilmez kılmaktadır (26).

Terapötik ilaç düzeyi izleminin etkili olabilmesi için konsantrasyonu ölçülecek ilacın uygun numunede çalışılması ve elde edilen değer doğru bir şekilde yorumlanması gerekir. Bunun yanında son dozun alınma zamanı ve başka ilaç kullanılıp kullanılmadığı gibi bilgiler de yorumlama için yardımcı olacaktır. Bu nedenle sonuçların farmakokinetik anlamda da değerlendirilebilmesi için ilaç kullanım dozu programı ile birlikte rapor edilmesi gerekmektedir (2). CsA ilaç düzeyi belirlemek için en ideal numune tam kan numunesidir. İn vitro yapılan çalışmalarda eritrosit içindeki ilaç konsantrasyonu sıcaklığa bağlı olarak değişir bu nedenle CsA ilaç düzeyi ölçümü için plazma örneği kullanılması önerilmemektedir (2, 27).

2.3. Siklosporin A Örnek Alım Zamanı

Farklı farmakokinetik yaklaşımların değerlendirilmesi alınan ilaç dozu ile klinik etkinlik ve toksisite arasındaki ilişkinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Böylece organ nakli gibi uzun süreli tedavi gerektiren durumlarda tedavinin bireye göre ayarlanmasına yardımcı olacaktır. İlaç maruziyetinin bir belirteci olan konsantrasyon zaman eğrisi altında kalan alanı (AUC) tahmin etmek için en uygun farmakokinetik parametrelerin bulunması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Rutin TİDİ'nde yararlı olması için kullanılacak farmakokinetik parametrenin aşağıdaki kriterleri yerine getirmesi gerekmektedir:

1. Kolay bir şekilde belirlenmelidir.
2. Kısa sürede elde edilmelidir.
3. Düşük maliyetli olmalıdır.
4. Konsantrasyon zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) (ilaca maruz kalma) ile yeterli bir korelasyon göstermelidir.
5. Klinik sonuç (ilacın yan etkileri, akut rejeksiyon) ile ilgili olmalıdır.

İmmünsüpresan ilaçların bireye göre doz ayarlanmasında doz-öncesi ilaç konsantrasyonu (C_0) rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak doz-öncesi seviyelerin her zaman toplam ilaç maruziyetini doğru yansıtmadığı ile ilgili şüpheler bulunmaktadır. Emilim aşamasında ilaç seviyesine bakılmasının daha güvenilir bir ilaç maruziyeti göstergesi olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı CsA'nın mikroemülsiyon formu olan Neoral için doz alımı sonrası 2. saatteki konsantrasyona (C_2) da bakılması önerilmektedir. Buna rağmen C_2 anındaki sonuç birey hastanede iken bakıldığı için ondan önceki ilaç kullanımına uyumunu tam olarak yansıtmaz. Bunun için C_0 anındaki sonuç hasta uyumunu daha iyi yansıtmaktadır. Sonuç olarak immünsüpresan ilaç kullanan bireylerde hem C_0 hem de C_2 anındaki konsantrasyon birlikte değerlendirilmelidir (28).

2.4. Tam Kanda Siklosporin A Düzeyi Ölçümü

İmmünsüpresan ilaçlar için TİDİ 1980'li yılların başında siklosporin A'nın keşfinden sonra başlamıştır. İmmünsüpresan ilaçların TİDİ yan etkileri ve doku ret

riskini azaltmak için gereken ilaç düzeyini sağlamakta önemli bir araçtır. Bu yüzden hasta bakımında önemli bir yer tutmaktadır. Siklosporin A'nın biyolojik numunelerde izlemi için herbiri belirli avantaj ve kısıtlamalara sahip farklı analitik yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler **immunassay** ve **sıvı-kromatografi** bazlı yöntemlerdir. Sıvı-kromatografi bazlı yöntemler HPLC/UV, LC/MS ve LC/MS/MS gibi yöntemlerdir (2, 3, 6).

İmmunassay yöntemler klinik laboratuvarlarda CsA ilaç düzeyi ölçümü için en sık kullanılan analitik yöntemler olmasına rağmen LC/MS/MS **altın standart yöntem** olarak kabul görmektedir. İmmünsüpresan ilaç düzeyi ölçümünde kullanılan immunoassay yöntemler antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA), microparticle enzyme immunoassay (MEIA), enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT), fluorescent polarization immunoassay (FPIA), cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA), chemiluminescence immunoassay (CLIA) ve radyoimmunoassay (RIA) gibi yöntemleri kapsamaktadır (3, 29-32). İmmünassay yöntemler yüksek verimli bir analiz için tam otomatize hale getirilebilir. Sıvı kromatografi bazlı yöntemler ile karşılaştırıldığında yüksek maliyet gerektiren cihazlar gerektirmez ve daha kısa sürede sonuç verme gibi avantajları vardır. Bu avantajlara rağmen günümüzde kullanılan immunoassay yöntemlerin konsensüs belgelerinde CsA için önerilen doğruluk ve spesifite gibi performans kriterlerini tam karşılayamadıkları gibi endişeler artmaktadır. Bunun en önemli nedeni yöntem için kullanılan antikorlar ile CsA metabolizması sonrası oluşan 30'a yakın metabolit arasında spesifik olmayan çapraz reaksiyonların gelişmesidir (6). İA yöntemler ile ilgili diğer bir dezavantaj ise yüksek düzey CsA ölçümünü sağlayacak gerekli lineer aralığa sahip olmamalarıdır (33).

Tablo 1. Siklosporin A metabolitlerinin yöntemlere göre çapraz reaksiyon yüzdesi (32)

İmmunassay	Siklosporin metaboliti çapraz reaksiyon yüzdesi ¹ (%)			
	AM1	AM4N	AM9	AM19
ACMIA	0	<7	<4	<2
CMIA	0	<4	<3	<2
CEDIA Plus	8	30	18	2
Syva EMIT 2000	≤5	8-13	≤4	0
FPIA	6-12	≤6	14-27	≤4

¹ CEDIA Plus yönteminde 500 µg/L AM1 metaboliti ile çalışılmıştır. Diğer yöntemlerde 1000 µg/L metabolit konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

ACMIA: Antibody conjugated magnetic immunoassay, CMIA: Chemiluminescent microparticle immunoassay, CEDIA: Cloned enzyme donor immunoassay, EMIT: Enzyme-multiplied immunoassay technique, FPIA: Fluorescence polarization immunoassay.

Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometre (LC/MS/MS) yönteminin uygulanması için gereken araçların maliyetinin azalıyor olması dolayısıyla diğer yöntemlere göre sahip olduğu teknolojinin avantajıyla klinik laboratuvarlarda kullanımı giderek popülerlik kazanmaktadır. LC/MS/MS günümüzde kullanılan tüm immünsüpresanlar için yüksek spesifite ve sensitivite sağlamaktadır. Buna ek olarak LC-Tandem Mass Spektrometrenin aynı numunede bulunan çeşitli analitleri aynı anda ve metabolitleri ile birlikte ölçme gibi önemli bir avantajı bulunmaktadır (3).

Siklosporin A ilaç düzeyi izlemi üzerine yapılan birçok panelde siklosporin ölçümü yapan analitik metodun ana bileşiğe özgü olması gerektiği belirtilmektedir. LC/MS/MS metodu siklosporin ana bileşiğe özgü bir analitik yöntemdir ve günümüzde immunassay yöntemlerin validasyonu için **referans yöntem** olarak kabul edilir (32).

Yüksek seçiciliğe ek olarak, LC/MS/MS immunassay yöntemlere göre daha düşük konsantrasyonlardaki ilaç miktarını saptama avantajına da sahiptir. Böylece

düşük konsantrasyonlarda kalsinörin inhibitörü uygulaması gerektiren durumlarda tedavi ve takip sırasında daha tutarlı ve hassas sonuçlar elde edilmiş olur. Ayrıca geniş lineer aralığa sahip olmasından dolayı immunassay yöntemlerin düşük lineer aralık dezavantajından kaynaklanan dilüe etme durumu da ortadan kalkmaktadır. Analiz çalışma öncesi gereken katı faz ekstraksiyonu gibi işlemler yapıldıktan sonra 2-4 dakika gibi kısa sürede tamamlanır. Tandem kütle spektrometresinin sahip olduğu yüksek özgüllükten dolayı terapötik aralıkların uygun şekilde adapte edilmesi gerektiğini belirtmek gerekir. Örnek olarak sirolimus için yapılan bir çalışmada immunassay ile elde edilen sonuç LC/MS/MS ile elde edilen sonuçtan ortalama %25 gibi daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (16).

2.4.1. Antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA) yöntemi

Antibody conjugate magnetic immunoassay metodu tam kanda CsA ilaç konsantrasyonunun kantitatif olarak ölçülmesi için geliştirilmiş **tam otomatize** bir immunassay yöntemidir.

2.4.2. LC/MS/MS yöntemi

Bu yöntem CsA ilaç konsantrasyonunun tam kanda ekstraksiyonundan sonra kantitatif olarak ölçülmesini sağlamaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Acil Laboratuvarı İlaç Düzeyi İzleme Birimi'nde yürütüldü. Çalışmaya çeşitli hastalıklardan dolayı CsA ilacı kullanan 50 gönüllü hasta alındı. Gönüllülerden Nisan 2013-Haziran 2013 tarihleri arasında örnekler toplandı. Gönüllülere çalışma hakkında bilgi verilip Bilgilendirme ve Olur Formu imzalatıldı ve çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar No: 209/ 25.04.2013). Çalışmamızda İlaç Düzeyi İzleme Birimine immünsüpresan ilaç düzeyi izlemi için yeni kurulan ve referans yöntem olarak kabul edilen LC/MS/MS yöntemi ACMIA yöntemi ile karşılaştırıldı.

3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Gereçler

- SIEMENS Dimension® RxL Max™ Integrated Chemistry System (Newark, DE 19714 USA)
- DGU-20A_{3R} DEGASSING UNIT (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- LC-20AD prominence LIQUID CHROMATOGRAPH A (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- LC-20AD prominence LIQUID CHROMATOGRAPH B (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- SIL-20AC HT prominence AUTO SAMPLER (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- FCV-20AH₂ VALVE UNIT (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- CTO-10AS VP COLUMN OVEN (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- LCMS-8030 LIQUID CHROMATOGRAPH MASS SPECTROMETER (SHİMADZU CORPORATION, JAPAN)
- NM32LA Nitrogen Generator (PEAK SCIENTIFIC, SCOTLAND)
- EDWARDS Vacuum Pump (Czech Republic)
- Argon Gazı Tüpü (Ankaragaz, Ankara/Türkiye)

- NF-048 Santrifüj Cihazı (Nüve, Ankara/Türkiye)
- Wisemix® VM-10 vortex mixer (Korea)
- Tranferpette® S 10-100 µL (Germany)
- Transferpette® S 100-1000 µL (Germany)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- EUREKA SRL Immunosuppressants by LC/MS Reagent M1 Mobile Phase Ready To Use (500mL) (Chiaravelle, ITALY)
- EUREKA SRL Immunosuppressants by LC/MS Reagent M2 Mobile Phase Ready To Use (500mL) (Chiaravelle, ITALY)
- EUREKA SRL Immunosuppressants by LC/MS Reagent A (Deproteinization Solution + Internal Standard) (Chiaravelle, ITALY)
- ClinChek® Controls Whole Blood Control, Lyophilized, for Immunosuppressants, Level I, II (Munich, GERMANY)
- ClinCal® Calibrators Whole Blood Calibrators, Lyophilized, for Immunosuppressants, Level I, II, III (Munich, GERMANY)

3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Hastaneleri'nde tedavisi ve/veya takibi yapılan CsA ilacı kullanan hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan bireyler arasında herhangi bir ayırım yapılmadı. DÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Acil Laboratuvarı İlaç Düzeyi İzleme Birimi'ne yönlendirilen çeşitli hastalıklardan dolayı CsA ilacı kullanan 50 birey çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalardan CsA ilaç düzeyi izlemi için belirtilen literatür bilgileri doğrultusunda **tam kan örnekleri** alındı. Gönüllülerin herbirinden iki adet EDTA'lı (Etilen diamini tetraasetik asit) tam kan tüplerine, her biri 2 mL olacak şekilde tam kan örnekleri alındı. Numunelerden biri doz-öncesi ilaç konsantrasyonunun (C_0) izlenmesi için ilaç kullanımından önce diğeri de doz-alımı sonrası 2. Saatteki ilaç konsantrasyonunun (C_2) izlenmesi için ilaç alımından sonraki 2. saatte alınmıştır.

Numunelerin beklemesinden kaynaklanabilecek hataları önlemek için alınan örnekler her iki yöntem ile bekletilmeden çalışıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA) yöntemi

Tam otomatize Dimension® (Siemens Healthcare Diagnostics) CsA metodu antibody conjugate magnetic immunoassay (ACMIA) yöntemini kullanmaktadır. Yöntem CsA için 25-500 ng/mL lineer aralıkta ölçüm yapabilmektedir. Analiz özel bir Flex® reaktif kartuşu kullanılarak gerçekleştirilir. Özel Flex® kartuşu ön-işlem reaktifi, CsA'ya karşı geliştirilmiş antikor β -galaktosidaz konjugatı (Ab- β -gal), kromdioksit parçacıklarına bağlanmış CsA (CsA-CrO₂), substrat olarak klorofenol kırmızı β -d-galaktopiranosid (CPRG) ve tablet şeklinde olan CsA-CrO₂ ve CPRG'nin hidrasyonu için gereken dilüentten oluşur. Kit içeriği tablo H'da belirtilmiştir.

Tablo 2. Flex® reaktif kartuşu içeriği.

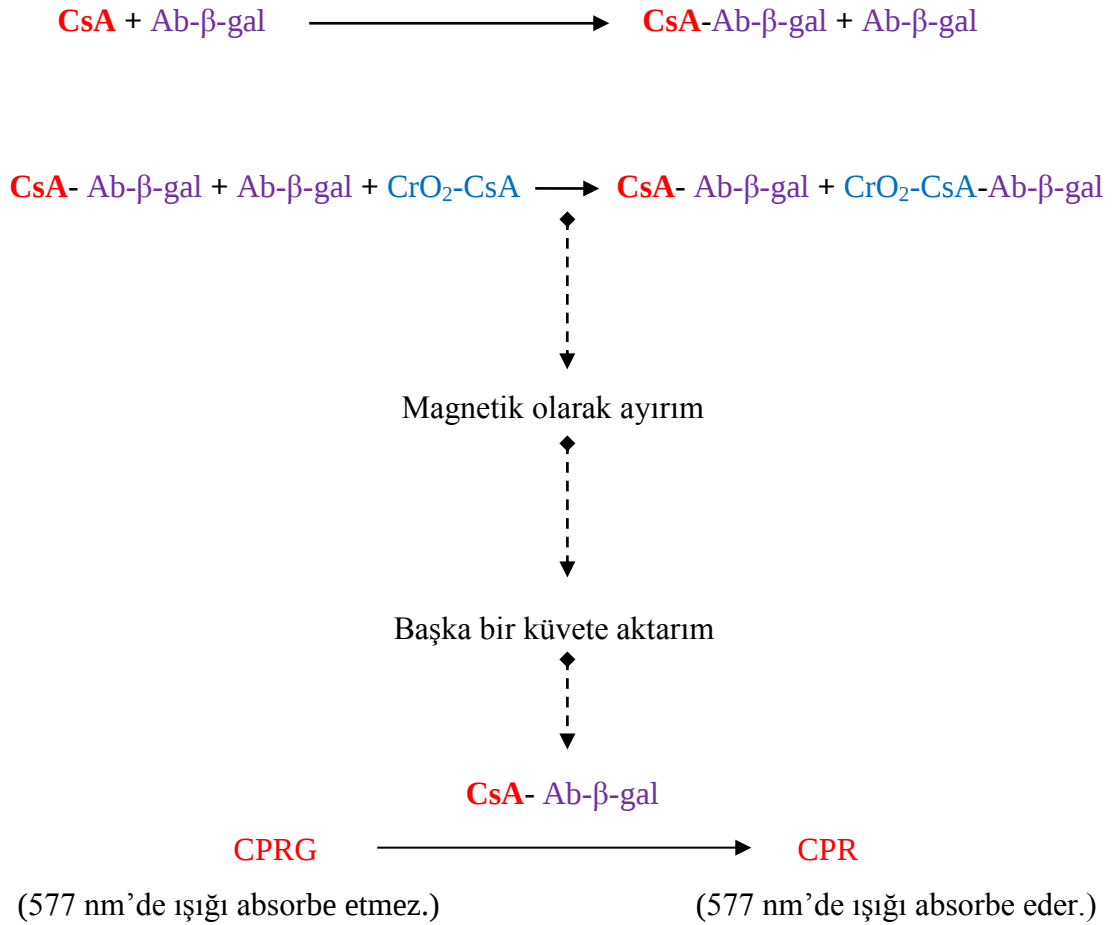
Form	İçerik	Konsantrasyon ^x	Kaynak
Sıvı	Ab- β -galaktosidaz	^y	Fare, monoklonal
Tablet	CsA- CrO ₂	3.4 mg/tablet	
Tablet	CPRG	9.3 mg/tablet	
Sıvı	Substrat Dilüenti		
Sıvı	Ön-işlem Reaktifi		

^x. Üretimde tablette belirtilen nominal değer.

^y. Antikor konsantrasyonu ve konjugat aktivitesi bir lottan diğerine değişim gösterir.

Siklosporin A analizinin gerçekleştirilmesi analiz edilecek tam kan örneğini içeren bir numune kabı ve CsA Flex® kartuşu cihaza uygun şekilde yerleştirilir. Cihazda tam kan örneği karıştırılır ve lizise uğratılır. Daha sonra bu kan örneği konjuge edilmiş antikor (Ab- β -gal) içeren reaktif ile karıştırılır. İşlem sonrası örnekte bulunan CsA reaktif içindeki konjuge edilmiş antikora bağlanır. CsA

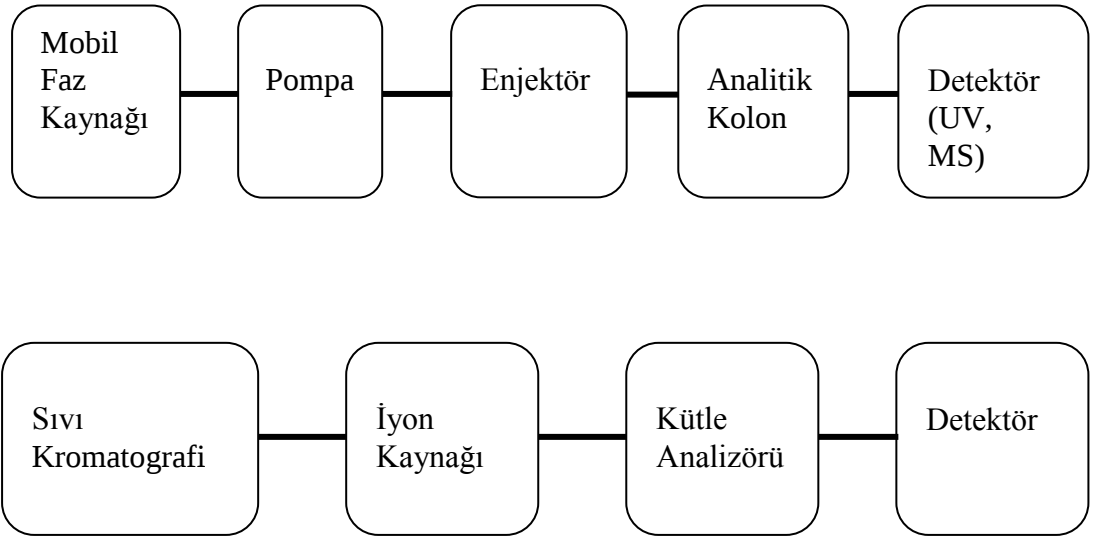
bağlanmış magnetik parçacıklar (CsA-CrO₂) ortamda bulunan bağlanmamış antikor-enzim kompleksine bağlanır. Reaksiyon karışımı daha sonra magnetik olarak ayrılır. Ayırım sonrası CsA-antikor-enzim (CsA-Ab-β-gal) kompleksini içeren süpernatant başka bir küvete aktarılır ve orada substrat (klorofenol kırmızı β-d-galaktopiranosid (CPRG)) ile karıştırılır. β-galaktosidaz enzimi CPRG'nin ışığı maksimum 577 nm dalga boyunda absorbe eden klorofenol kırmızısı (CPR)'ye hidrolizini katalize eder (Şekil 6). CPR oluşumuna bağlı olarak 577 nm'deki absorbansta oluşan değişim direkt olarak örnekteki CsA konsantrasyonu ile orantılıdır ve bikromatik (577, 700 nm) ölçüm tekniği kullanılarak ölçülür.



Şekil 6: Antibody conjugate magnetic immunassay yöntemi

3.3.2. LC/MS/MS yöntemi

Bu yöntem CsA ilacının tam kanda basit bir deproteinizasyon işleminden sonra kantitatif olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Yöntem CsA için 1-50000 ng/mL lineer aralıkta ölçüm yapabilmektedir. Sistem 6 bağlantı noktalı 2 yollu valf ünitesi (FCV-20AH₂ Valve Unit (Shimadzu Corporation-JAPAN)) ile donatılmış Shimadzu LC-20AD prominence sıvı kromatografi cihazı ile üçlü kuadrupole sahip Shimadzu LC/MS-8030 kütle spektrometre cihazlarından oluşmaktadır. Analiz öncesi örnek işleminin ardından kromatografik olarak ayırımı yapılan analit yapısına uygun olarak elektriksel olarak yüklü hale getirilir ve kütle spektrometrede kütle/yük (mass/charge ratio (m/z)) oranına göre ölçümü yapılır (Şekil 7).



Şekil 7: Sıvı kromatografi ve kütle spektrometre blok diyagramı (2)

Örnek hazırlama işlemi sırasında ilk olarak deproteinizasyon işlemi için çinko sülfat ve ayrıca CsA için internal standart olan siklosporin D (CsD)'yi içeren Reagent A ile Reagent Ascy isimli reaktiflerden bir solüsyon elde edildi. CsA ilaç düzeyi baktığımız kütle spektrometre cihazında aynı zamanda sirolimus, everolimus ve takrolimus gibi diğer immünsüpresif ilaç düzeyi de çalışılmaktadır. Askomisin cihazımızda bu ilaçlar için internal standart olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle

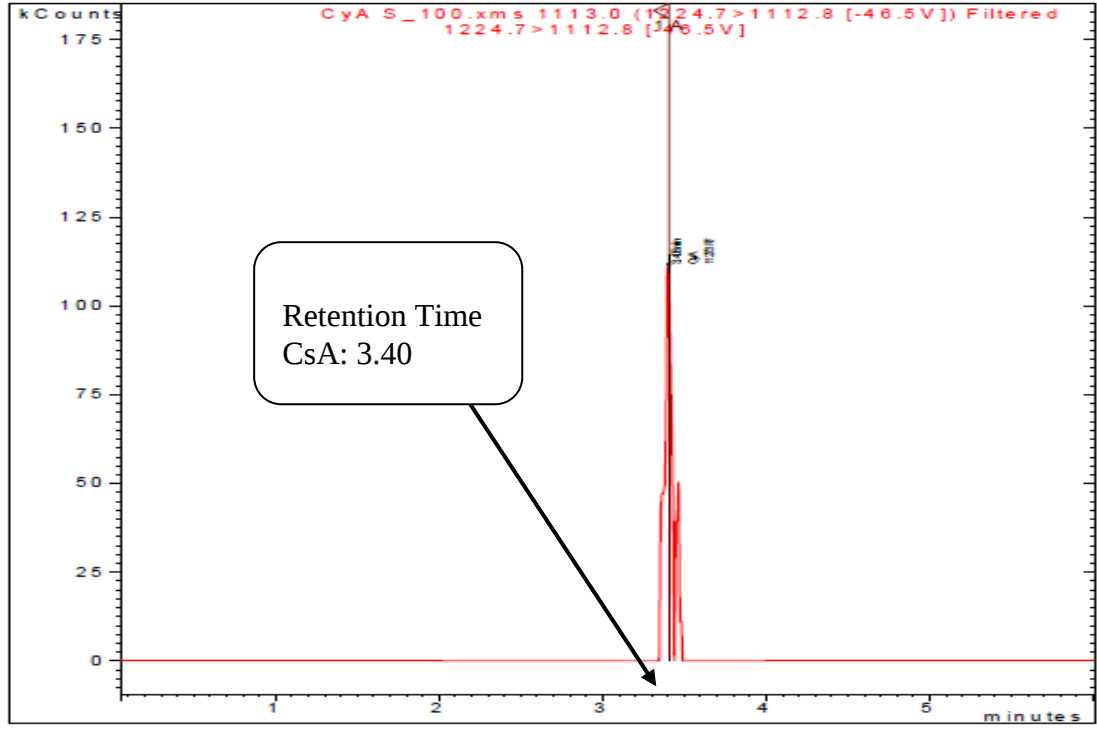
askomisin içeren Reagent Ascy reaktifi kullanıldı. Reagent A reaktifinden 2.5 mL Reagent Ascy reaktifinden 50 µL alınarak solüsyon hazırlandı ve 5 sn süre ile vorteks ile karıştırıldı. Bu işlem sonrasında her hasta için önceden alınmış EDTA'lı tam kan örneğinden 100 µL ile hazırlanmış solüsyondan 300 µL ependorf tüpüne aktarıldı ve 30 sn süre ile vorteks ile karıştırıldı. İşlem sonrası karışım 5 dk süre ile oda sıcaklığında bekletildi ve bu süre sonunda tekrar 10 sn süre ile vorteks ile karıştırıldı. Sonra örnek 14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edildi. Ependorf tüplerinin üzerinde kalan süpernatanttan 100 µL insertlere aktarıldı. Ve bu insertler viallere konularak cihaza enjeksiyon için verildi.

Ayrırma işlemi için Shimadzu FCV-20AH₂ Valve Unit ile donatılmış Shimadzu LC-20AD prominence sıvı kromatografi ünitesi ile Chromolith® Flash RP-18e 25x4.6 mm kolonu ve Agilent Pursuit XRs Ultra 2.8 (µm) 30x20 mm kolonları kullanıldı. Mobil faz için iki farklı eluent kullanıldı. Mobil faz A olarak formik asit ve metanol içeren Reagent M1 ve mobil faz B olarak metanol içeren Reagent M2 kullanıldı. Kolonun sıcaklığı 70 °C'de sabit tutuldu. Akış hızı kit prospektusunda belirtildiği gibi solid faz kolonu için 500 µL/dk analitik kolon için de 400 µL/dk olarak belirlendi ve her numune için 50 µL örnek enjekte edildi.

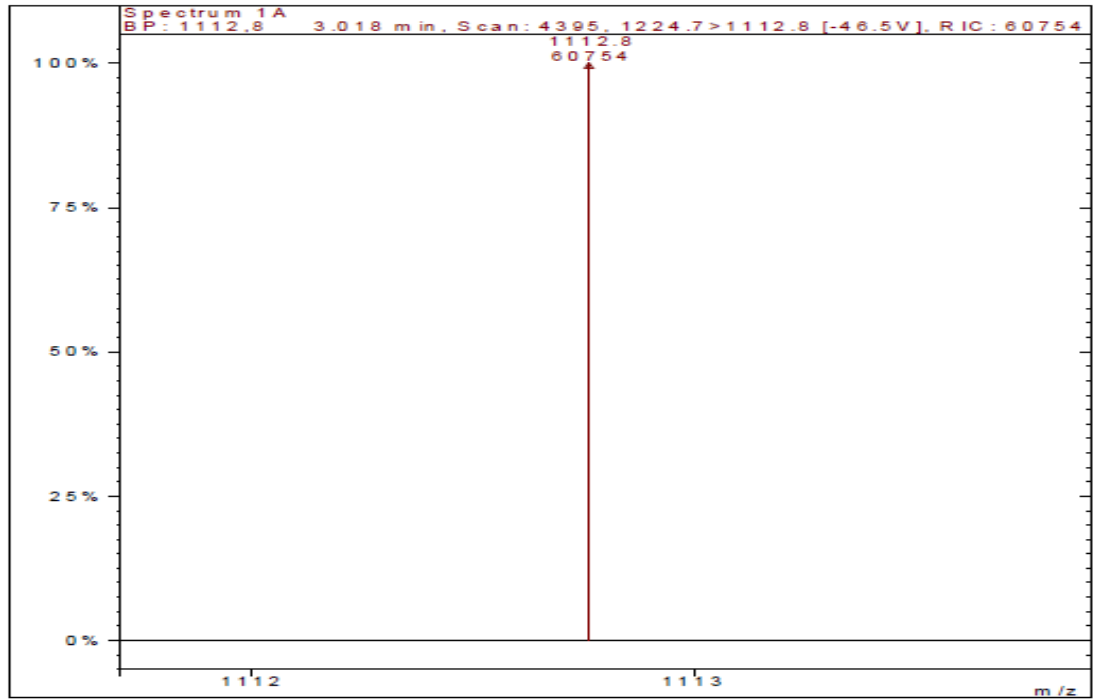
Tablo 3. Kromatografi için kullanılan mobil fazların akış şeması

Zaman (Dakika)	% A	% B
0-1.5	25	75
1.5-3.5	55	45
3.5-5.0	20	80

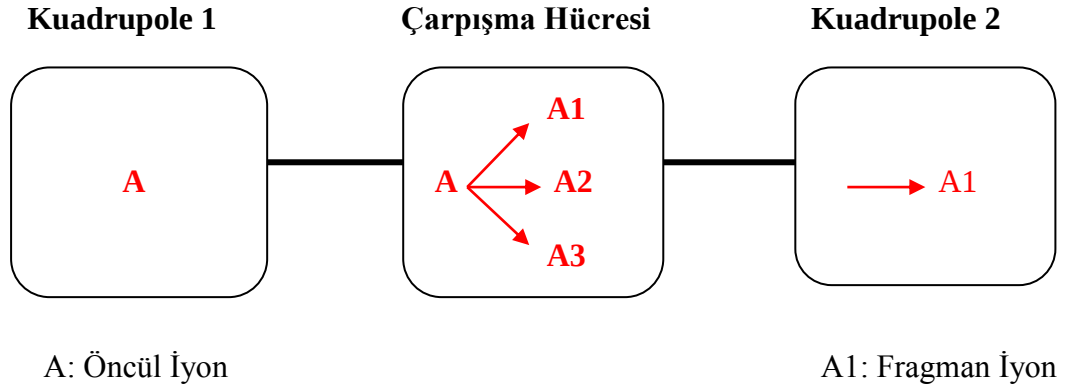
Kromatografik ayırma işlemi sonrası Shimadzu LC-8030 triple quadrupole kütle analizörü 4.5 kV voltajında ve 200 °C sıcaklığında çalışan elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynaklı bir pozitif modda kullanıldı. Analitlerin tespiti için multiple reaction monitoring (MRM) modu kullanıldı. CsA için 1219.7/1202.8 m/z [CsA için ana iyon 1224.7 (Na⁺) ve 1219.7 (NH₄⁺) olabilir] ve internal standardı CsD için 1233.7/1216.8 m/z MRM modu kullanıldı.



Şekil 8: Siklosporin A için HPLC kromatogramı



Şekil 9: Siklosporin A 1224.7/112.8 MRM modu için kütle spektrumu



Şekil 10. Sıralı kütle spektrumu için MRM modu çalışma şeması (2)

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 versiyon, Microsoft Office Excel 2010 ve MedCalc istatistik programı (Deneme Sürümü) kullanıldı. Elde edilen verilerin tanımlanmasında aritmetik ortalama (AO) standart sapma (SD), minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. İki yöntem arasındaki uyumu değerlendirmek için Pearson Korelasyon analizi, Lineer Regresyon analizi ve Bland-Altman testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Metot Karşılaştırma Deneyi

İki yöntemle elde edilen CsA ölçüm sonuçlarının istatistiksel analizi yapıldı. Tandem mass spektrometre ile elde edilen tam kan CsA değerleri 2.72 ng/mL ile 301.22 ng/mL (ortalama 85.73 ± 75.09 ng/mL) arasında değişmekte iken, ACMIA yöntemi ile elde edilen tam kan CsA değerleri 24.00 ng/mL ile 558.70 ng/mL (ortalama 148.81 ± 125.82 ng/mL) arasında bulundu. Her iki yöntemle elde edilen CsA değerlerine ilişkin aritmetik ortalama (AO), standart sapma (SD), minimum (min) ve maksimum (maks) değerleri Tablo-Z’de gösterilmiştir.

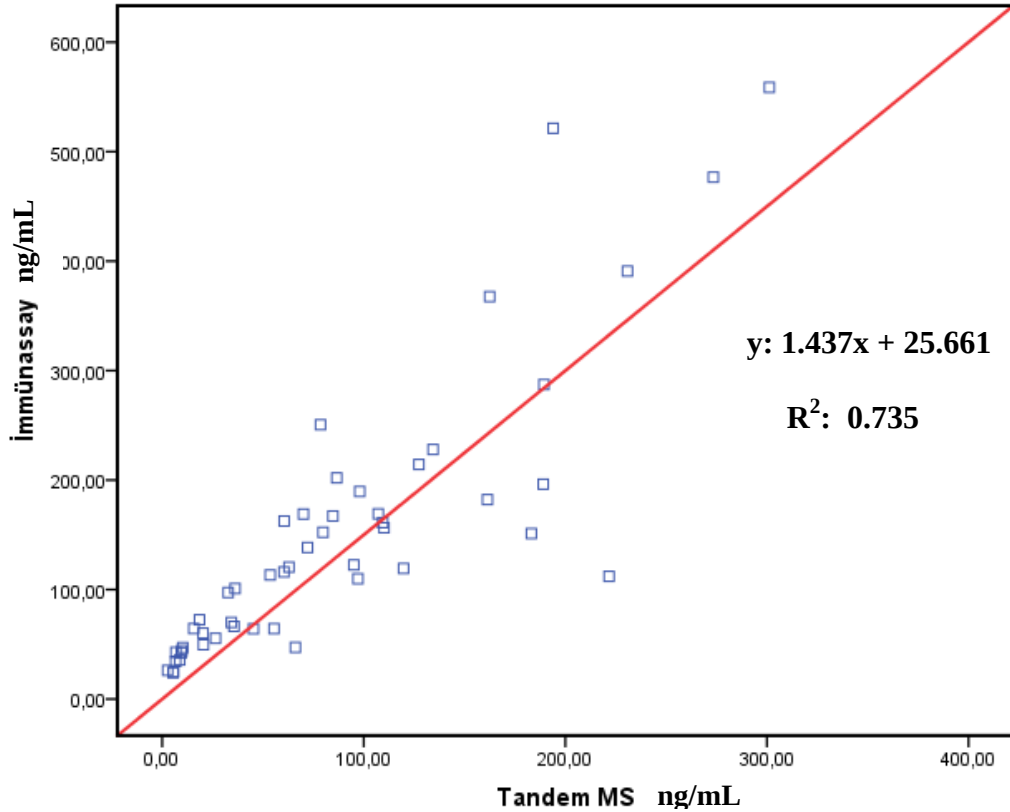
Tablo 4. LC/MS/MS ve ACMIA yöntemleriyle çalışılan tam kan örneklerine ait veriler.

YÖNTEM	Örnek sayısı	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma	Min-Maks Değerler
LC/MS/MS	50	85.73	75.09	2.72 - 301.22
İmmunassay (ACMIA)	50	148.81	125.82	24.00 - 558.70

LC/MS/MS ve ACMIA yöntemi ile elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Her iki yöntem ile elde edilen verilerin de normal dağılıma uygun olduğu gözlemlendi ($p>0.05$). Verilerin normal dağılıma uygunluğu gözlemlendikten sonra iki yöntem arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için Pearson korelasyon ve lineer regresyon analizi yapıldı.

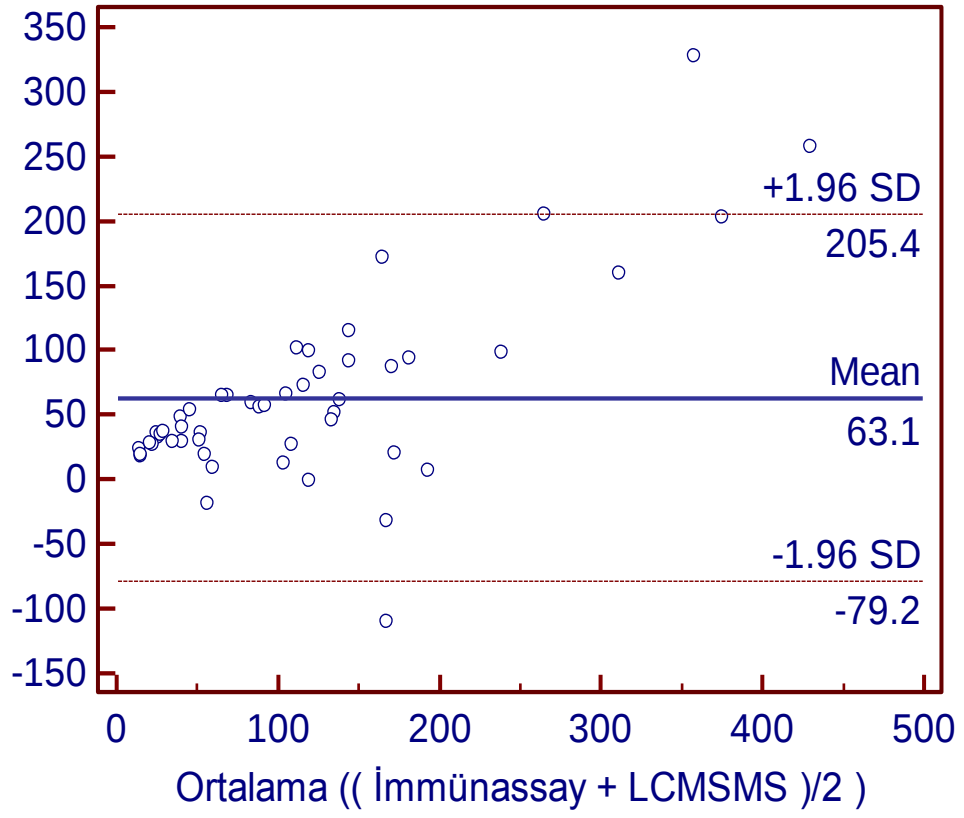
Antibody conjugate magnetic immunassay yöntemiyle elde edilen değerler Y eksenine, LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen değerler X eksenine yerleştirilerek lineer regresyon grafiği çizilerek regresyon analizi yapıldı. Analiz sonucunda korelasyon katsayısı (r) 0.857 belirleme katsayısı (R^2) 0.735 bulundu

(p=0.01). Elde edilen sonuca göre iki yöntem arasında pozitif yönde kuvvetli bir korelasyon olduğu gözlemlendi. Analizden elde edilen lineer regresyon denklemi ($y=ax+b$) $ACMIA=1.437 \times LC/MS/MS+25.661$ olarak elde edildi. Bu denkleme göre eğrinin eğimi (a) 1.437 ve y eksenini kesişim noktası (b) 25.661 olarak bulundu. İki yöntem arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği ve denklemi Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. Siklosporin A sonuçlarının LC/MS/MS ve ACMIA yöntemleri arasındaki dağılımı.

İki metot arasındaki uyumun incelenmesi için ayrıca Bland-Altman analizi uygulandı. Metot karşılaştırma verilerinin saçılım grafiği Bland ve Altman’ın önerilerine göre görsel olarak izlendi. İki yöntemden elde edilen verilerin farkı ($ACMIA - LC/MS/MS$) Y eksenine, verilerin ortalaması $[(ACMIA + LC/MS/MS)/2]$ da X eksenine yerleştirilerek Bland-Altman analizi uygulandı. İki yöntem arasındaki uyumu görsel olarak gösteren Bland-Altman grafiği Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Siklosporin A sonuçlarının referans metot (LC/MS/MS) ile ACMIA yöntemi arasındaki uyumu gösteren Bland-Altman Analizi grafiği.

5. TARTIŞMA

Siklosporin A ve diğer immünsüpresif ilaçlar (takrolimus, sirolimus, mikofenolat mofetil) gibi kritik konsantrasyona sahip ilaçların klinik laboratuvarlar tarafından monitörizasyonu hasta tedavisinin bireyselleştirilmesinin önemli bir yönünü oluşturmaktadır ve klinisyenlerin ana hedeflerinden biridir. İmmunsupresan ilaçların subterapötik dozlardaki konsantrasyonlarında organ reddi riski ve supratherapötik dozlarda da ciddi yan etkileri bulunmaktadır. CsA'nın hipertansiyon, tremor, diş eti hipertrofisi, diyabet, böbrek disfonksiyonu ve malignensi gibi ciddi yan etkileri bulunmaktadır (7, 17-20). Sonuç olarak CsA ve diğer immünsüpresan ilaçların terapötik etkisinin optimize ve yan etkilerinin minimize edilmesi için ilaç düzeyi izlemi yapılması gerekmektedir. Siklosporin için ilk ilaç düzeyi izlenmesi yaklaşık 20 sene önce organ nakillerine destek amaçlı yapıldı. Geçtiğimiz 15 yıl boyunca uluslararası boyutta (Uluslararası Terapötik İlaç İzleme ve Klinik Toksikoloji Derneği (IATDMCT)'nin özel çabası dahil) laboratuvarlara CsA ölçümünde rehberlik edecek en iyi yaklaşımın bulunması için önemli çabalar gösterilmiştir (34-37).

İmmunassay yöntemler laboratuvarlarda CsA ölçümü için en çok kullanılan analitik yöntemlerdir. Ancak İA yöntemler ana bileşiğin metabolizması sonrası oluşan metabolitlerle gösterdikleri çapraz reaksiyon sonucu ilaç düzeyini yüksek ölçmekte ve bu nedenle CsA ölçümü için konsensus belgelerinde belirtilen doğruluk ve spesifite gibi önemli performans kriterlerini karşılayamamaktadır. CsA ölçümü için ortaya konulan ortak görüş ölçümü yapan analitik metodun ana bileşiğe özgü olması gerektiğidir. LC/MS/MS metodu CsA ana bileşiğe özgü bir yöntemdir ve İA yöntemlerin metod validasyonu için referans yöntem olarak kabul görmektedir (6, 32).

Aurelie ve arkadaşları böbrek transplantasyonu yapılmış hastalar üzerinde yaptığı çalışmada mikofenolik asit için LC/MS/MS yöntemi ile bir İA yöntem olan EMIT yöntemi arasında güçlü bir korelasyon ($R^2:0.894$) bulmuşlardır. Buna rağmen regresyon denklemindeki eğimin (eğim: 1.094) EMIT metodu ile elde edilen sonucun daha yüksek olduğunu doğrular şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır (38).

Remco ve arkadaşları yaptığı çalışmada CsA ölçümü için FPIA ve LC/MS/MS yöntemini karşılaştırmışlardır. İki yöntem arasında kuvvetli bir korelasyon (R^2 : 0.9642) bulmuşlardır. FPIA yöntem ile LC/MS/MS yöntemi arasında sistematik bir sapma olduğunu bulmuşlardır ve LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen sonuçların FPIA yöntemle elde edilen sonuçlardan %17 daha düşük olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada Remco ve arkadaşları everolimus için FPIA yöntemle LC/MS/MS yöntemini karşılaştırmışlardır. İki yöntem arasında yine aynı şekilde kuvvetli bir korelasyon (R^2 : 0.9663) bulmuşlardır. Ancak LC/MS/MS ile elde edilen sonuçlar diğer yöntemle göre %30 daha düşük bulunmuştur (39). Napoli tarafından yapılan bir çalışmada da LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen sonuçlar FPIA yöntemle elde edilen sonuçlardan ortalama %12 daha az bulunmuştur (40). Johnston ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CsA ilaç düzeyi ölçümünde EMIT ve FPIA yöntemlerini LC/MS/MS yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada CsA için doz öncesi (C_0) ve ilaç alımı sonrası 2. saatte baktıkları ilaç konsantrasyonlarını (C_2) ayrı ayrı karşılaştırmışlardır. LC/MS/MS yöntemi ile karşılaştırdıklarında C_0 düzeyini için EMIT'in ortalama %17, FPIA yönteminin ise ortalama %31 düzeyinde daha yüksek sonuç elde ettiğini saptamışlardır. C_2 düzeyi için ise iki immünassay yöntem ile LC/MS/MS yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını saptamışlardır (41). Keevil ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada yukarıda sonuçları belirtilen çalışmalara benzer şekilde sonuçlar bulmuşlardır. LC/MS/MS yöntemi ile EMIT yöntemini karşılaştıran Keevil ve arkadaşları EMIT yönteminin CsA metabolizması sonucu oluşan metabolitlerle çapraz reaksiyonu sonucu LC/MS/MS yönteminden daha yüksek okuduğu sonucunu bulmuşlardır (42). Lee tarafından 3400 kişiden fazla sayıda hasta üzerinde yapılan çalışmada beklendiği gibi CLIA yöntemi ile çalışılarak elde edilen verilerin çoğu tandem kütle spektrometresi ile elde edilen verilerden daha yüksek bulunmuştur. Çalışmasında tandem kütle spektrometresi ile elde edilen değerlerin CLIA yöntemi ile elde edilen değerlerden ortalama %18 daha düşük olduğunu bulmuştur. Bu durumun immünassay yöntemdeki antikörlerin metabolitlerle olan çapraz reaksiyonu ve bireyler arasındaki metabolik farklılıklardan kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Bu nedenlerin iki yöntem arasındaki korelasyon çalışmasını zorlaştırdığını da ayrıca ifade etmiştir (43).

Çalışmamızda CsA ilacı kullanan 50 hastadan aldığımız numuneleri ACMIA ve LC/MS/MS yöntemleri ile ayrı ayrı çalıştık ve aralarındaki ilişkiyi bulmayı amaçladık. Elde edilen veriler istatistik olarak değerlendirildiğinde Pearson Korelasyon katsayısı (r) 0.857 olarak bulundu. Bu analize göre r değeri -1 ile +1 arasında bir değer almaktadır. +1 değerine yaklaştıkça iki yöntem arasında çok kuvvetli bir uyum olduğu söylenebilir. Yöntemlerden birinde elde edilen sonuç artarken diğeri de artmaktadır demektir. $r=0$ değeri iki yöntem arasında doğrusal bir uyum olmadığını belirtmektedir. Çalışmamızda elde edilen değer pozitif yönde 0.857 olarak bulunmuştur ve iki yöntem arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Diğer çalışmalarda elde edilen uyuma benzer bir uyum sonucu elde ettik ancak diğer çalışmalarda daha yüksek korelasyon katsayısı mevcuttu. Bunun çalışmaya dahil edilen hastaların daha homojen olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Örneğin diğer çalışmalarda sadece böbrek transplantasyonu ya da sadece kalp transplantasyonu yapılmış hastalar çalışmaya dahil edilmiş dolayısıyla daha homojen bir çalışma grubu seçilmiştir. Çalışmamıza ise nefrotik sendrom gibi düşük dozda CsA ilaç tedavisi alan hastalar ile organ transplantasyonu gibi yüksek dozda ve agresif CsA ilaç tedavisi alan farklı hasta grupları dahil edildi. Bu nedenle verilerimizden yüksek bir dağılım genişliği elde ettik. Yaptığımız diğer analizlerde kuvvetli bir uyum olmadığını saptadığımızdan dolayı elde ettiğimiz kuvvetli korelasyon sonucunun yüksek dağılım genişliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda lineer regresyon analizi sonucu elde edilen Belirleme Katsayısı (R^2) değerini 0.735 olarak bulduk. LC/MS/MS yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçların ACMIA yöntemi ile elde edilen sonuçlardan %42 daha düşük olduğunu gözlemledik. R^2 değer olarak 0 ile 1 arası bir değer almaktadır. Genel olarak R^2 değeri sıfıra yakınsa, uyum iyiliği olmadığı kabul edilir. Değer 1'e yaklaştıkça uyum ilığı uygun olduğu söylenebilir. İmmünsüpresan ilaçlar için yapılan diğer çalışmalarda R^2 değeri daha yüksek bulunmuş ve karşılaştırılan immünassay yöntem ile tandem mass spektrometre arasında daha kuvvetli bir uyum iyiliği sonucu ortaya çıkmıştır ve araştırmacılar maliyet gibi etkenler göz önüne alınarak iki yöntemin birbiri yerine kullanılabileceği sonucunu çıkarmışlardır (38, 39). Çalışmamızda elde edilen R^2 değerine göre iki yöntem arasındaki uyum çok yüksek değildir ve iki yöntemin birbiri yerine kullanılmasının uygun olmadığını düşünmekteyiz. Ancak daha önce de

belirttiğimiz gibi bunun çalışmaya alınan hastaların tam olarak homojen olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Korelasyon analizi ve regresyon analizinin iki yöntem arasındaki uyumu belirlemede yetersiz kaldığı bazı yazarlar tarafından belirtilmektedir. İki istatistiksel yöntemin de dağılım genişliğinden etkilendiği ve bu nedenle karşılaştırılan iki yöntem arasındaki uyumu tam olarak tayin edemediği düşünülmektedir. Bu nedenle iki yönteme alternatif olarak Bland-Altman analizi yapılması önerilmektedir (44). Bundan dolayı biz de çalışmamızda iki yöntem arasındaki uyum iyiliğinin tespitinde ayrıca Bland-Altman analizini de uyguladık. Bu analizde yöntemler arasındaki farklara karşı ortalamaların saçılım grafiği çizilir. İki analitik metod arasındaki farka ait ortalama ($\bar{d}$) ve standart sapma (S_d) hesaplanarak analitik metodlar arasındaki uyum sınırları incelenebilir. Eğer yöntemler arasındaki farklar normal dağılım sergiliyorsa farkların sıfırın etrafında rastgele dağılması ve %95'nin $\bar{d}-2S_d$ ile $\bar{d}+2S_d$ arasında yer alması beklenir. Belirtilen sınırlar içerisinde bulunan farklılıklar klinik olarak önemli olmayabilir ve böyle bir durumda karşılaştırılan iki analitik yöntem birbirinin yerine kullanılabilir. İki yöntem arasında uyum arttıkça güven sınırları daralma göstermektedir ve saçılım grafiği dairesel şekil almaktadır. Keevil ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada LC/MS/MS yöntemi ile EMIT yöntemi için verilen Bland-Altman grafiğinde verilerin farkının sıfıra yakın olduğu ve güven sınırlarının bizim çalışmamıza göre daha dar bir bant aralığında olduğu görülmektedir (42). Lee'nin yaptığı çalışmada da LC/MS/MS ile CLIA yöntemleri için verilen Bland-Altman saçılım grafiğinde farkların sıfıra yakın dağılım gösterdiği ve güven sınırlarının dar bir bantta yer aldığı görülmektedir (43). Çalışmamızda verilerin farkları ortalaması sıfırdan belirgin derecede farklı bulundu. Ayrıca güven sınırları oldukça geniş bir bant aralığında dağılım gösterdi. Elde edilen saçılım grafiği yorumlandığında karşılaştırma yaptığımız iki yöntem arasında sistematik orantısız bir hata olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda laboratuvarımızda CsA ve diğer immünsüpresan ilaç düzeyi ölçümünde kullandığımız bir immunassay yöntem olan ACMIA metodu ile immünsüpresan ilaç düzeyi ölçümü için referans yöntem olan LC/MS/MS yöntemi arasındaki uyumu incelemek için metod karşılaştırma çalışması yaptık. LC/MS/MS metodu pahalı teknik gereçler gerektirdiğinden dolayı ülkemiz dahil birçok dünya ülkesinde CsA ve diğer immünsüpresan ilaçların ölçümünde genellikle immunassay yöntemler kullanılmaktaydı. Ancak immunassay yöntemlerde kullanılan antikorların ilaçların metabolizması esnasında ortaya çıkan metabolitlerle oluşturduğu çapraz reaksiyon ilacın normal konsantrasyonundan daha yüksek sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır. Özellikle organ transplantasyonu gibi önemli girişimler yapılan hastalarda bu sonuçlar tedavinin uygun şekilde yapılmasını zorlaştırmaktadır. Tandem kütle spektrometresi ana bileşiğe özgü bir analitik metod olduğundan analiz sonrası elde edilen veri ilacın gerçek konsantrasyonunu yansıtır ve tedavinin düzenlenmesini kolaylaştırır.

İki yöntem arasında yaptığımız karşılaştırma çalışmasında yöntemlerin birbiri ile kuvvetli korelasyon gösterdiği ancak yapılan lineer regresyon analizi ve Bland-Altman saçılım grafiğinde iki yöntem arasında güçlü bir uyum olmadığını sonucunu elde ettik. Sonuçlarımız bu konuda yapılan diğer çalışmalarla benzerlik gösterdi. LC/MS/MS metodu CsA ilacını doğru ve güvenilir bir şekilde ölçebilmektedir. Ayrıca birçok analiti birlikte analiz etmesinden dolayı uygun maliyette ölçmektedir. Bu nedenle Tandem kütle spektrometresi metodunun laboratuvarlarda kullanımının yaygınlaştırılması önerilmektedir. Ancak bu yöntemle yapılan ölçümler iyi bir deneyim gerektirdiğinden dolayı bu konuda yeterli eğitimin sağlanması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Kahan BD. Cyclosporine: A Revolution in Transplant. Transplantation Proceedings. 1999;(Suppl 1/2A):14-15.
2. Christine LH, Gwendolyn A. McMillin, Thomas P. Moyer. Therapeutic Drugs and Their Management. Ed: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. pp. 1092-1094, Elsevier Saunders, USA, 2012.
3. Yang Z, Wang S. Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. 2008;336:98-103.
4. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. Lancet. 1993;342:1514-1516.
5. Shaw LM, Holt DW, Keown P, Venkataramanan R, Yatscoff RW. Current Opinions on Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. Clinical Therapeutics. 1999;21:1632-1652.
6. Yang Z, Peng Y, Wang S. Immunosuppressants: Pharmacokinetics, methods of monitoring and role of high performance liquid chromatography/mass spectrometry. Clinical and Applied Immunology Reviews. 2005; 5: 405-430.
7. Rezzani R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 2004;39:85-128.
8. Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. Immunology. 1976;31(4):631-641.
9. Krensky AM, Strom TB, Bluestone JA. Immunomodulators: Immunosuppressive Agents, Tolerogens, and Immunostimulants. Ed: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. pp. 1466-1469, McGraw-Hill Companies, USA, 2001.
10. Shaw LM, Bowers L, Demers L, Freeman D, Moyer T, Sanghvi A, et al. Critical Issues in Cyclosporine Monitoring: Report of the Task Force on Cyclosporine Monitoring. Clinical Chemistry. 1987;33(7): 1269-1288.

11. Pette M, Pette DF, Muraro PA, Martin R, McFarland HF. In vitro modulation of human, autoreactive MBP-specific CD4⁺ T-cell clones by cyclosporin A. *Journal of Neuroimmunology*. 1997;76:91-99.
12. Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Research*. 2002;4(suppl 3):197-211.
13. Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. Cyclosporine Nephrotoxicity. *Transplantation Proceedings*. 2004;36(suppl 2):229-233.
14. Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: A Review. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Transplantation*. Volume 2012, Article ID 230386, 7 pages.
15. Yatscoff RW, Rosano TG, Bowers LD. The Clinical Significance of Cyclosporine Metabolites. *Clinical Biochemistry*. 1991;24:23-35.
16. Burke JF, Pirsch JD, Ramos EL, Salomon DR, Stablein DM, Van Buren DH, et al. Long-Term Efficacy and Safety of Cyclosporine in Renal-Transplant Recipients. *The New England Journal of Medicine*. 1994;331:358-363.
17. Ayanoglou CM, Lesty C. Cyclosporin A induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. *Journal of Periodontal Research*. 1999;34:7-15.
18. Smith JM, Nemeth TL, McDonald RA. Current immunosuppressive agents in pediatric renal transplantation: Efficacy, side-effects and utilization. *Pediatric Transplantation*. 2004;8:445-453.
19. Guerra G, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in kidney transplantation. *European Society for Organ Transplantation*. 2007;20:813-827.
20. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, et al. Results of an International, Randomized Trial Comparing Glucose Metabolism Disorders and Outcome with Cyclosporine Versus Tacrolimus. *American Journal of Transplantation*. 2007;7:1506-1514.
21. Taler SJ, Textor SC, Canzanello VJ, Schwartz L. Cyclosporin-Induced Hypertension. *Drug Safety*. 1999;20(5):437-449.

22. Reeves RA, Shapiro AP, Thompson ME, Johnsen AM. Loss of nocturnal decline in blood pressure after cardiac transplantation. *Circulation*. 1986;73:401-408.
23. Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, Boldrini F, Porcellati C. Circadian Blood Pressure Changes and Left Ventricular Hypertrophy in Essential Hypertension. *Circulation*. 1990;81:528-536.
24. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Current Opinion in Critical Care*. 2001;7:384-389.
25. Çavun S. Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi. XVII. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu. s. 1-9. Lefkoşa/KIBRIS, 28 Mayıs 2010.
26. Ergün H. Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde ve Terapötik Alan Dışı İlaç/Madde Analizlerinde Gereksinim Duyulan Temel Farmakokinetik Bilgi ve Bu Bilginin Terapötik İlaç Düzeyi Pratiğine Uyarlanması. XVII. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu. s. 10-18. Lefkoşa/KIBRIS, 28 Mayıs 2010.
27. Sketris I, Yatscoff R, Keown P, Canafax DM, First MR, Holt DW, et al. Optimizing the Use of Cyclosporine in Renal Transplantation. *Clinical Biochemistry*. 1995;28(3):195-211.
28. Oellerich M, Armstrong VW. The Role of Therapeutic Drug Monitoring in individualizing Immunosuppressive Drug Therapy: Recent Developments. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006;28:720-725.
29. Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Simultaneous quantification of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 2008;41:728-735.
30. Chung JW, An D, Song J, Chung HJ, Park HI, Lee W, et al. Performance Evaluation of Affinity Column Mediated Immunometric Assay for Tacrolimus. *Korean J. Lab. Med*. 2009;29:415-422.
31. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A. Consensus Document: Hawk's Cay Meeting on Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine. *Clinical Chemistry*. 1990;36(8):1510-1516.

32. Kelly AK, Butch AW. Immunosuppressive Drug Monitoring. Limitations of Immunoassays and the Application of Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Ed: Dasgupta A. Therapeutic Drug Monitoring. Newer Drugs and Biomarkers. pp. 323-347. Academic Press. USA. 2012.
33. Morris RG. Immunosuppressants Drug Monitoring: Is the Laboratory Meeting Clinical Expectations? *Ann Pharmacother.* 2005;39:119-127.
34. Morris RG, Ilett KF, Tett SE, Ray JE, Fullinlaw RO, Cooke R, et al. Cyclosporin Monitoring in Australia: 2002 Update of Consensus Guidelines. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2002;24:677-688.
35. Johnston A, Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *J. Clin. Pharmacol.* 1999;47:339-350.
36. Benet LZ. Relevance of Pharmacokinetics in Narrow Therapeutic Index Drugs. *Transplantation Proceedings.* 1999;31:1642-1644.
37. Sukhpreet PT. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants: An overview. *Indian J. Pharmacol.* 2007;39(2):66-70.
38. Premaud A, Rousseau A, Meur YL, Lachatre G, Marquet P. Comparison of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with a Commercial Enzyme-Multiplied Immunoassay for the Determination of Plasma MPA in Renal Transplant Recipients and Consequences for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2004;26:609-619.
39. Koster RA, Dijkers ECF, Uges DRA. Robust, High-Throughput LC/MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine, Tacrolimus, Everolimus, and Sirolimus in Whole Blood. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2009;31:116-125.
40. Napoli KL. 12-Hour Area Under the Curve Cyclosporine Concentrations Determined by a Validated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Procedure Compared with Fluorescence Polarization Immunoassay Reveals Sirolimus Effect on Cyclosporine Pharmacokinetics. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2006;28:726-736.
41. Johnston A, Chusney G, Schütz E, Oellerich M, Lee TD, et al. Monitoring Cyclosporin in Blood: Between-Assay Differences at Trough and 2 Hours Post-dose (C_2). *Therapeutic Drug Monitoring.* 2003;25:167-173.

42. Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, Morris MR. Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Routine Analysis of Cyclosporin A Over an Extended Concentration Range. *Clinical Chemistry*. 2002;48(1):69-76.
43. Yong WL. Comparison between ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and a chemiluminescence immunoassay in the determination of cyclosporin A and tacrolimus levels in whole blood. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;6:1535-1539.
44. Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S. Klinik araştırmalarda iki ölçüm tekniğinin uyumunu incelemeye kullanılan istatistiksel yöntemler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2003;56(1):1-6.

