

Možnosti stanovení cyklosporinu A v terapeutickém monitorování léků

Ilona Peřinová, Hana Brozmanová, Petra Halvová, Milan Grundmann

Ústav klinické farmakologie FN Ostrava a Fakulty zdravotnických studií Ostravské univerzity, Ostrava

Cyklosporin A (CyA) je lék s úzkým terapeutickým rozmezím u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita, která má za následek rozdílnou odpověď na terapii. V klinické praxi neexistují imunologické testy, kterými by bylo možno účinnost imunosuprese cyklosporinem sledovat, a proto se monitorování CyA omezuje na stanovení jeho koncentrací v krvi. Pro terapeutické monitorování (TDM) cyklosporinu A se používají především metody imunoanalytické, metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS, popř. LC-MS/MS). Výhodou imunoanalytických metod je analýza velkého množství vzorků během krátkého času a snadná ovladatelnost přístrojů. Jejich nevýhodou jsou zkřížené reakce s metabolity CyA. HPLC metody se považují za referenční metody stanovení CyA. Vyžadují však časově náročné extrakční postupy přípravy vzorků, které jsou důležité pro dobrou separaci. HPLC metody jsou také používány k měření CyA společně s jeho metabolity. V tom případě je celkový čas analýzy až několik desítek minut. Metody LC-MS a LC-MS/MS jsou selektivní, velmi citlivé a specifické. Výhodou těchto metod oproti klasické HPLC je zejména v případě LC-MS/MS rychlá průchodnost vzorků a možnost stanovení CyA s metabolity nebo s dalšími imunosupresivy v jedné analýze. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a nutnost odborné obsluhy.

Klíčová slova: cyklosporin A, TDM, imunoanalytické metody, HPLC-UV, LC-MS, LC-MS/MS.

Possibilities of cyclosporine A determination in therapeutic drug monitoring

Cyclosporine A (CyA) is a drug with narrow therapeutic range and high interindividual variability. No immunologic tests are known to verify immunosuppressive effect of cyclosporine in clinical practice and that's why CyA monitoring is limited mainly to determine its concentration in blood. Immunoanalytic methods, high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) are regularly used to determine CyA concentration in therapeutic drug monitoring (TDM). Immunoanalytic methods can analyze a lot of samples in short time and they are easy practicability, but the disadvantage is crossed reactions with CyA metabolites. HPLC methods are considered to be referential for CyA determination, but they require time-consuming extraction procedures important for successful separation. The analysis may take even tens of minutes. HPLC methods are also used to determine CyA together with its metabolites. LC-MS and LC-MS/MS methods are selective, very sensitive and specific. The advantage of these methods especially in the case of LC-MS/MS is high sample throughput and the possibility to determine CyA simultaneously with its metabolites or other immunosuppressives in one analysis. On the other hand the initial instrumentation cost and a requirements of skilful staff are limitations of these methods.

Key words: cyclosporine A, TDM, immunoanalytic methods, HPLC-UV, LC-MS, LC-MS/MS.

Klin Farmakol Farm 2010; 24(2): 93–97

Úvod

Cyklosporin A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) je cyklický undekapeptid se strukturou cyclo-[MeBmt- α -Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal]. Cyklosporin A (CyA) je imunosupresivní látka, která selektivně zasahuje do imunitního systému. Inhibicí aktivace T-lymfocytů cyklosporin zabraňuje produkci některých lymfokinů nezbytných pro imunitní odpověď na cizorodý nebo organismu vlastní antigen (1, 2). CyA se používá nejen v transplantologii a při léčení vybraných autoimunitních poruch, ale jeho uplatnění se rozšiřuje i na řadu onemocnění vyvolaných nebo provázených poruchami imunity. Indikace CyA zasahují do oborů revmatologie, gastroenterologie, hematologie, nefrologie, diabetologie, oftalmologie a dermatologie (2, 3). Nejčastěji uváděné nežádoucí účinky CyA jsou nefrotoxicita, poruchy funkce gastrointestinálního

traktu, hepatotoxicita, kožní a slizniční projevy (hirsutismus, hypertrichóza, hyperplazie gingiv), neurotoxicita, hypertenze a určitý vliv diabetogenní (4). Cyklosporin A je metabolizován enzymatickým systémem cytochromu P450 3A. Dnes je známo asi 30 metabolitů CyA (5). Širšímu klinickému sledování hladin cyklosporinových metabolitů brání omezená dostupnost jejich standardů, které se obvykle získávají z moče pacientů (6, 7). Některé metabolity byly připraveny rovněž synteticky nebo semisynteticky. U člověka se v nejvyšších koncentracích nacházejí primární metabolity AM1, AM9, AM4N a sekundární metabolit AM1c. Zejména koncentrace AM1 v některých případech přesahuje i několikanásobně koncentraci CyA. Nejvýznamnějšími a nejvíce prostudovanými metabolity z hlediska toxicity a klinického účinku jsou primární metabolity AM1 a AM9 a AM4N (8, 9). Imunosupresivní

vlastnosti metabolitů jsou nižší než u molekuly CyA. Primární metabolity, které mají nejméně změněnou molekulu, jsou imunosupresivně nejaktivnější, zvláště AM1. O vlivu metabolitů na celkový účinek a toxicitu CyA se stále diskutuje (10).

CyA je lék s úzkým terapeutickým rozmezím u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita, která má za následek rozdílnou odpověď na terapii. V klinické praxi neexistují imunologické testy, kterými by bylo možno účinnost imunosuprese cyklosporinem sledovat, a proto se monitorování CyA omezuje na stanovení jeho koncentrací v krvi. Zjistilo se, že monitorování CyA pomocí údočních hladin (through level) je nepřesné (11, 12), a proto se v poslední době výzkum soustřeďuje na sledování celkové expozice CyA, vyjádřené jako AUC, protože lépe koreluje s klinickým stavem a rizikem rejekce. Pro

výpočet AUC se používá metoda omezeného počtu odběrů, sparse sampling (13, 14, 15, 16, 17, 18). Spolehlivé i praktické je také stanovení hodnoty C_{max} , maximální dosažené koncentrace CyA, nebo C_z , tedy koncentrace ve druhé hodině po podání CyA (19, 20, 21, 22, 23). Terapeutické monitorování (TDM) CyA sleduje klinický stav pacienta při imunosupresi a může zahrnovat farmakokinetické, ale i farmakodynamické údaje založené na kvantitativní analýze CyA. Dnešním trendem v transplantologii je minimalizovat používání steroidů a redukovat expozici kalcineurinových inhibitorů (CyA a takrolimu) čímž se snižují jejich nežádoucí účinky a zlepšuje se imunosupresivní účinek. Cyklosporin A, popř. takrolimus, se používá v kombinaci se sirolimem, everolimem nebo kyselinou mykofenolovou. Koncentrační rozmezí jednotlivých imunosupresiv jsou velmi rozdílná.

Pro TDM cyklosporinu A se používají především metody imunoanalytické, metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS).

Imunoanalytické metody stanovení cyklosporinu A

Pro účely TDM CyA jsou v laboratorní praxi využívány různé varianty kompetitivních imunoanalytických metod. Jejich principem je soutěž (tedy kompetice) o omezené množství vazebných míst specifické protilátky. Během reakce mezi sebou soutěží na jedné straně cyklosporin A přítomný v analyzovaném vzorku a na straně druhé vhodným způsobem označený cyklosporin A (radioizotopem, enzymem, fluoresceinem apod.), který je do reakce přidáván jako indikátor pro kvantifikaci jejího průběhu.

S ohledem na postupný vývoj těchto metod byly ke značení používány nejdříve radioizotopy (tritium ^3H nebo ^{125}I), později pak především enzymy, s využitím jejich následné reakce s odpovídajícím substrátem a fotometrické nebo fluorimetrické detekce. Vývoj těchto metod se odehrával také ve vztahu k používaným specifickým protilátkám, což mělo samozřejmě vliv na vlastní specifitu stanovení. Ta je právě v případě monitorování hladin léků v krvi, vzhledem k přítomnosti řady jejich metabolitů, významným problémem. V posledních letech byly zavedeny do rutinní praxe specifické monoklonální protilátky s malou zkříženou reakcí s metabolity CyA. Tyto protilátky se připravují in vitro hybridizací.

Imunoanalytické metody jsou z hlediska instrumentálního provedení poměrně jednoduché

a nezávislé na proměnných parametrech přístrojové techniky. S postupem času byly zejména neizotopové varianty těchto metod automatizovány s možností jejich zpracování nejen na imunoanalýzátorech (metoda FPIA), ale také na běžných biochemických analyzátoch (metody EMIT, CEDIA). Automatizované imunoanalýzy umožňují získání výsledků rychleji než u manuálních radioizotopových metod. V případě metod FPIA (24, 25, 26, 27, 28) je koncentrace analytu ve vzorku nepřímo úměrná intenzitě polarizované fluorescence a tohoto principu se využívá k měření koncentrace CyA. Před analýzou je nutno vzorek upravit pomocí dodaných činidel. Úprava vzorku spočívá v lýze krevních elementů (především erytrocytů), precipitaci proteinů a převedení CyA do organického roztoku, čímž se minimalizuje vliv endogenních proteinů a dalších sloučenin na měření fluorescence. Principem metody EMIT je kompetitivní homogenní imunoanalýza, ve které CyA ve vzorku a CyA konjugovaný s bakteriální glukozo-6-fosfát dehydrogenázou soutěží o vazebná místa na specifické monoklonální myší protilátce v roztoku (29, 30, 31, 32). Koncentrace CyA ve vzorku je přímo úměrná enzymové aktivitě konjugátu, kterou lze detekovat spektrofotometricky. Zkřížené reakce metody EMIT (33) jsou nejníže mezi automatizovanými imunoanalýzami a dosahují úrovně izotopových technik. Určitou nevýhodou je malá přesnost v oblasti nízkých koncentrací a malý rozsah kalibrace. Tato skutečnost je nevýhodná zejména při sledování farmakokinetiky CyA. Metoda CEDIA je rovněž homogenní kompetitivní enzymoimunoanalýza. Množství CyA ve vzorku je přímo úměrné reziduální enzymové aktivitě. Metoda nevyžaduje extrakci vzorku, ale pouze lýzu krevních elementů bez centrifugace. Vzorek nesrážlivé krve může být přímo zpracován na analyzátoru.

Některé parametry specifických imunoanalytických metod jsou shrnuty v publikaci autorů Šafarčík, a kol. (33).

HPLC metoda stanovení cyklosporinu A

Stanovení CyA v biologických tekutinách pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) umožňuje přesné měření parentní látky, proto je považována za referenční metodu. Metoda HPLC dovoluje na rozdíl od imunoanalytických metod stanovit společně s CyA i jeho metabolity. HPLC metody využívají principu separace látek na základě distribuce mezi pevnou (stacionární) fází zakotvenou na koloně a pohyblivou (mobilní) fází kolonou protékající. Změny ve složení eluátu vycháze-

jícího z analytické kolony registrují detektory. Nejčastěji používaným je UV/VIS detektor. Dalším možným zařízením pro detekci je hmotnostní spektrometr, o němž se zmíníme níže.

Bylo popsáno velké množství chromatografických metod stanovení cyklosporinu A (17, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44) a pro všechny je společné, že vyžadují náročnou přípravu vzorků, která je podmínkou pro spolehlivé monitorování. Příprava vzorků spočívá v přečištění biologických tekutin od balastních látek, které brání identifikaci analyzované látky. Extrakční postupy jsou založeny na principech extrakce v kapalně (liquid-liquid extraction), extrakce na kolonkách (liquid-solid extraction) a extrakce prováděná na zařízeních spojených přímo s HPLC přístrojem (column-switching techniques a automatic sample clean-up). Tyto složité pracovní postupy jsou důležité vzhledem k používané krátké vlnové délce UV záření (200–220 nm), při které může mnoho látek při analýze interferovat. Protože především mnohonásobnými extrakčními postupy dochází ke ztrátám účinné látky, analýza CyA se provádí výlučně pomocí vnitřního standardu (IS). Vnitřní standard musí být látka podobných vlastností, která se přidává ke každému kalibračnímu i analyzovanému vzorku. Vyhodnocuje se vždy poměr sledovaného analytu a vnitřního standardu. Jako vnitřní standard se nejčastěji používají cyklosporiny D a C (CyD, CyC) při stanovení parentní látky a CyD při současné analýze metabolitů. Po přečištění biologických tekutin, které předchází vlastní chromatografické analýze, je dalším krokem k dobré separaci látky a získání spolehlivých výsledků pečlivý výběr analytické kolony a její teploty, mobilní fáze a gradientové nebo izokratické eluce.

Jednotlivé metody stanovení samotného cyklosporinu A nebo CyA s jeho metabolity se liší použitými extrakčními činidly (diethyleter, methanol, hexan atd.), složením mobilní fáze (acetonitril/voda, voda/methanol/acetonitril, methanol/voda, acetonitril/fosfátový pufr atd.), stacionární fází (C18 nebo CN-kolony), teplotou (50–80 °C) a rychlostí průtoku mobilní fáze (0,25–1 ml/min). Přehledné porovnání nejobvyklejších HPLC analýz stanovení CyA je uvedeno v publikaci autorů Komzáková, a kol. (45).

Stanovení cyklosporinu A metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) v TDM je v České republice novou technikou. Protože hmotnostní spektrometrie je založena na produkci, rozlišení a detekci ion-

tů v plynné fázi, byla dříve hmotnostní detekce využívána pouze v kombinaci s plynovou chromatografií. Až začátkem 80. let 20. století vývoj ionizace za atmosférického tlaku (elektrosprej a chemická ionizace) umožnil spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. V současné době se nejvíce používá 3 typů hmotnostních analyzátorů. Kvadrupólu, iontové pasti a analyzátoru doby průletu. Pro kvantitativní analýzu léčiv se volí kapalinová chromatografie s jednoduchým (LC-MS) nebo trojitým kvadrupólem (LC-MS/MS). LC-MS metody jsou velmi rychlé, ale podobně jako HPLC-UV vyžadují náročnou předúpravu vzorků vzhledem k rušivým vlivům matrice. Pracuje se výhradně s vnitřním standardem. Používají se buď stabilní značené izotopy, které jsou však značně drahé a/nebo látky strukturně podobné cyklosporinu A, převážně CyD nebo askomycin pro analýzu dalších imunosupresiv. Je možné analyzovat látky se stejným retenčním časem, a to na základě poměru hmotnosti/náboji (m/z), což výrazně zkracuje čas analýzy ve srovnání s klasickou HPLC-UV metodou. Výhodou LC-MS metod je selektivní detekce, která dovoluje při vhodném zpracování vzorků pracovat se složitými směsmi i velmi podobných látek jakými jsou např. metabolity cyklosporinu A (46). LC-MS metody jsou robustní, velmi přesné a vysoce citlivé. Mohou simultánně měřit několik látek v širokém rozmezí koncentrací, čehož se s velkou výhodou, finanční i časovou, využívá při stanovení CyA s dalšími imunosupresivy (47, 48, 49, 50, 51). U metod LC-MS/MS se citlivost a specifita analýzy ještě zvyšuje. Kromě analýzy parentní látky se zde analyzují také její specifické fragmenty, které vznikají v druhé části MS zařízení, jenž funguje jako kolizní cela. Vzhledem k vysoké specifičnosti LC-MS/MS lze přípravu vzorku a chromatografickou separaci redukovat na minimum (52, 53, 54, 55, 56, 57).

Publikované metody stanovení CyA metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí jsou podobné, liší se např. v objemu a přípravě vzorku, použitím vnitřního standardu, složením a průtokem mobilní fáze, typu kolony nebo nastavení MS detektoru. Většina prezentovaných metod vychází z analýzy předem upraveného analytu. Existují však také metody, které využívají on-line extrakce v podobě dvojdimenzionální chromatografie nebo techniky přepínání kolon (48, 49, 50, 56, 57). Velmi jednoduchou a rychlou LC-MS/MS metodou pro simultánní stanovení cyklosporinu A a takrolimu publikoval Salm, a kol. (58). Stanovení se provádí ze 100 μ l plné krve, která se upraví precipitací proteinů síranem zinečnatým a následně acetonitrilem. Jako vnitřní standard se používá askomycin a cyklosporin D. Analýza

jednoho vzorku trvá 1,5 minuty. Detekce probíhá v negativním modu za využití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Jedna z nejnovějších prací (59) popisuje LC-MS/MS metodu stanovení 4 základních imunosupresiv, CyA, takrolimu, sirolimu a everolimu. Příprava vzorku 200 μ l plné krve vyžaduje pouze precipitaci proteinů a doba analýzy jednoho vzorku je 2,6 minut. K ionizaci dochází pomocí elektrospreje (ESI) a ionty jsou detekovány v pozitivním modu. LC-MS metody mohou být dobře využity i tam, kde je limitováno množství vzorku, např. u biopsií nebo u vzorků krve od pediatrických pacientů (52, 60). Výhodné je využití této metody v případě měření velmi nízkých koncentrací, jako např. stanovení CyA nebo CyA s jeho hlavními metabolity AM1, AM4N a AM9 v lymfocytech (61, 62, 63, 64, 65).

Diskuze

V TDM cyklosporinu A existuje snaha o měření individuálního stavu imunosuprese u jednotlivého pacienta, protože dosud neexistuje jednoduchá metoda, schopná měřit farmakodynamický účinek imunosuprese. Monitorování CyA je založeno na stanovení jeho koncentrací v krvi. Pro TDM CyA se používají metody imunoanalytické a metody chromatografické, HPLC-UV nebo LC-MS, popř. LC-MS/MS. Pro posouzení toho, kterou metodu použít, je třeba vzít v úvahu základní požadavky, které by měla metoda splňovat a také to, jestli metoda bude sloužit ke stanovení samotného CyA, CyA s jeho metabolity nebo CyA s dalšími imunosupresivy. Dobrá klinická metoda by měla být přesná, citlivá, selektivní, reprodukovatelná, automatizovatelná a mít co nejvyšší průchodnost vzorků.

Pomocí imunoanalytických stanovení je možné zejména rychle zpracování velkých sérií vzorků. Vzhledem k rychlosti a jednoduchosti provedení jsou současné imunoanalytické metody stanovení CyA využívány jak pro rutinní monitorování úrodních hladin, tak pro měření farmakokinetických profilů (66, 67, 68, 69). Při monitorování C_{max} , AUC a sparse sampling, kde jsou dosahovány často vysoké koncentrace CyA, je nutno některé vzorky s maximálními koncentracemi ředit, protože kalibrační závislosti většiny imunoanalytických metod nejsou nastaveny na tak vysoké hodnoty. Kritické srovnání jednotlivých imunoanalytických metod bylo pospáno v řadě publikací (30, 70, 71, 72, 73, 74, 75). Obecně lze říci, že všechny imunoanalytické metody nadhodnocují výsledky koncentrací CyA především v důsledku zkřížených reakcí s jednotlivými metabolity CyA, které jsou přítomny v krvi. Zkřížené reakce specifických imuno metod jsou pro jed-

notlivé metabolity obvykle na úrovni procent, výjimečně 10 % (33) až 23 % (76). Radioizotopové metody je výhodné použít zvláště při sériovém zpracování velkého počtu vzorků, kdy zejména vyniknou ekonomické výhody tohoto postupu. Automatizované neizotopové imunoanalýzy, které jsou co se týče nákladů někde mezi RIA a HPLC metodami, se zejména od začátku 90. let používají nejčastěji.

Základní referenční metodou pro stanovení CyA je dobře validovaná robustní metoda HPLC, která je schopna měřit přesně a specificky CyA. HPLC dokáže spolu s parentní látkou stanovit také většinu metabolitů, především metabolity primární. HPLC-UV metody na stanovení CyA vyžadují takovou přípravu vzorku před vlastním stanovením, která zahrnuje precipitaci proteinů a až několika stupňové extrakční čištění. CyA je eluován z kolony při vysokých teplotách, což klade také zvýšené nároky na kvalitu používaných analytických kolon. Složení a rychlost mobilní fáze se mění podle toho, zda chceme měřit koncentraci samostatného CyA, a/nebo CyA a jeho hlavních metabolitů. Zatímco analýza parentní látky je poměrně rychlá, při současném měření metabolitů se používají mobilní fáze s menším obsahem organické složky, což vede k prodloužení doby eluce a tím i doby analýzy až na desítky minut.

Zlatým standardem v TDM CyA se v současnosti stává kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Metody LC-MS, popř. LC-MS/MS jsou přesné, vysoce citlivé a specifické. Dovolují stanovit velké množství podobných látek v širokém koncentračním rozmezí v jedné analýze. Velmi efektivní jak časově, tak finančně je simultánní stanovení imunosupresiv pomocí LC-MS nebo LC-MS/MS. Ze zkušeností některých autorů (54, 77) vyplývá, že náhrada imunoanalýzy za LC-MS/MS metodu v TDM imunosupresiv vede až k 50% snížení nákladů a času na analýzu. Simultánní analýza 4 imunosupresiv, cyklosporinu A, takrolimu, sirolimu a everolimu, trvá 4 minuty. Podobně podle Poquette, a kol. (78) je cena za 1 simultánní LC-MS analýzu (CyA s takrolimem a sirolimem) významně nižší než v případě analýzy cyklosporinu A nebo takrolimu prováděné imunoanalytickou metodou.

I přes prozatimní nevýhody, což je vysoká pořizovací cena přístrojů a nutnost odborné obsluhy, se LC-MS, eventuálně LC-MS/MS, začínají stávat metodou volby v terapeutickém monitorování imunosupresiv.

Poděkování:

Tato publikace byla podporována grantem IGA MZ 1A/8655-5.

Literatura

1. Bowers LD, Mathews SE. Investigation of mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. *J. Chromatogr.* 1985; 333: 231–238.
2. Martinek V, Matoušovic K, Špatenka J. Objev a užití cyklosporinu v klinické praxi. *Prakt. lékař.* 2002; 82(1): 14–20.
3. Kučera M, Kalouš R, Kratochvíl P. Rozšířená indikace cyklosporinu A. *Ref. Výb. Revm.* 2000; 40(4): 227–280.
4. Nouza K. Cyklosporin a tacrolimus (FK 506); líc a rub mince. *Medicína* 1999; 9(6): 22–23.
5. Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effect of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1991; 39(6): 1255–1266.
6. Brooks CA, Cramer SM, Rosano TG. Preparative chromatographic purification of cyclosporine metabolites. *Clin. Chem.* 1993; 39: 457–466.
7. Copeland KR, Yatscoff RW. The isolation, structural characterization, and immunosuppressive activity of cyclosporin G (NVa2-cyclosporine) metabolites. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13(4): 281–288.
8. Sadeg N, Pham-Huy Ch, Rucay P, Righenzi S, Halle-Pannenko O, Claude JR, et al. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* 1993; 15(2): 163–177.
9. Sadeg N, Pham-Huy C, Martin C, Warnet JM, Claude JR. In vitro comparative study on nephrotoxicity of cyclosporine A, its metabolites M1, M17, M21, and its analogues cyclosporine C and D in suspensions of rabbit renal cortical cells. *Drug Chem. Toxicol.* 1994; 17(2): 93–113.
10. Komzáková I, Šafářčík K, Brozmanová H, Grundmann M. Terapeutické monitorování cyklosporinu A. *Čes slov Farm.* 2002; 51: 159–167.
11. Blick KE, Melouk SH, Fry HD, Gillum RL. A validation study of selected methods routinely used for measurement of cyclosporine. *Clin. Chem.* 1990; 36: 670–674.
12. Grundmann M, Perinova I, Brozmanova H, Koristkova B, Šafářčík K. Significant discrepancy in cyclosporin A post-dose concentrations when analyzed with specific RIA and HPLC method. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010; 48: 87–92.
13. Akhlaghi F, Steel L, Price C, Wallwork J, Trull A. Cyclosporine (CyA) concentration at time 2 hours post dose correlates with rejection and renal function after lung transplantation (Ltx). *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 462.
14. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroid: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14: 436–441.
15. Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Schottmann R, Thiesemann C, Strohmeier S, et al. Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of kidney graft patients in relation to liver function. *Eu. J Clin Pharmacol.* 1991; 40: 465–469.
16. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cuups TR, Ballow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Int Med.* 1993; 119: 1198–1208.
17. Brozmanová H, Grundmann M, Šafářčík K, Jegorov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B* 2000; 749: 93–100.
18. Kořistková B, Grundmann M, Peřinová I, Brozmanová H, Šafářčík K. Validation of sparse sampling strategies for estimation cyclosporine A area under the concentration-time curve when analyzed with specific RIA and HPLC method. *Ther Drug Monit.* 2010; (in print).
19. Amante AJ, Kahan BD. Abbreviated area-under-the-curve strategy for monitoring cyclosporine microemulsion therapy in immediate posttransplant period. *Clin Chem.* 1996; 42: 1294–1296.
20. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interaction. *Clin Pharmacokinet.* 1997; 32: 210–258.
21. Brossat B, Straczek J, Heulin MH, Herbeuval X, Belleville F, Nabet P, et al. Liquid chromatographic determination of cyclosporin A in serum with use of solid phase extraction. Comparison between high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay levels in clinical investigations. *J Chromatogr.* 1987; 413: 141–150.
22. David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 100–114.
23. Dumont RJ, Ensom MHH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 38: 427–447.
24. Kyne F, Maguire S, O Broin S, McGing P, Wright E. Abbot Tdx selective assay overestimates cyclosporin in whole blood. *Clin Chem.* 1991; 37: 1658.
25. Rogers LC, Smith FA, Jamero A. Evaluation of the Abbott Tdx monoclonal cyclosporin A assay in pediatric cardiac transplant patients. *Clin Chem.* 1991; 37: 1014.
26. Taylor PJ, Salm P, Norris RL, Ravenscroft PJ, Pond SM. Comparison of high-performance liquid chromatography and monoclonal fluorescence polarization immunoassay for the determination of whole-blood cyclosporin A in liver and heart transplant patients. *Ther Drug Monit.* 1994; 16: 526–530.
27. Wallenmacq PE, Alexandre K. Evaluation of the new AxSYM cyclosporine assay comparison with TDx monoclonal whole blood and Emit cyclosporine assay. *Clin Chem.* 1999; 45: 432–435.
28. Yatscoff RW, Copeland KR, Faraci CJ. Abbott Tdx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporine in whole blood. *Clin Chem.* 1990; 36: 1969–1973.
29. Dasgupta A, Saldana S, Desai M. Analytical performance of EMIT cyclosporine assay evaluated. *Clin Chem.* 1991; 37: 2130–2133.
30. Holt DW, Johnston A, Kahan BD, Morris RG, Oellerich M, Shaw LM. New approaches to cyclosporine monitoring raise further concerns about analytical techniques. *Clin Chem.* 2000; 46: 872–874.
31. Duscil LJ, Hackett LP, Chiswell GM, Ilett KF. Comparison of cyclosporine measurement in whole blood by high – performance liquid chromatography, monoclonal fluorescence polarization immunoassay and monoclonal enzyme – multiplied immunoassay. *Ther Drug Monit.* 1992; 14: 327–332.
32. Schumann G, Petersen D, Hoyer PF, Wonigeit K. Eur J Clin Chem Clin Biochem. Monitoring cyclosporin A (cyclosporin, INN) concentrations in whole blood: evaluation of the EMIT assay in comparison with HPLC and RIA. 1993; 31: 381–388.
33. Šafářčík K, Komzáková I, Bartoš V, Grundmann M. Imunoanalytické metody stanovení cyklosporinu A. *Čes slov Farm.* 2002; 51: 112–120.
34. Jindal RM, Pescovity MD, Cummings OW, Book B, Lumeng L, Milgrom ML, et al. Persistence of cyclosporine after withdrawal of the drug in a patient with chronic liver transplant rejection. *Transplantation.* 1996; 61: 1657–1658.
35. Oka K, Hosoda K, Hirano T, Sakuri E, Kozaki M. Determination of cyclosporin A in the serum of kidney transplant patients by rapid-flow fractionation and normal-phase high-performance liquid chromatography. *J of Chromatogr.* 1989; 490: 145–154.
36. Kohlhaw M, Baraldo M, Galla F, Marzocchi V, Pea F. Association of very high blood levels of cyclosporin metabolites with clinical complications after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2232.
37. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, et al. Lake Louise consensus conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit.* 1995; 17: 642–654.
38. Shah AK, Sawchuk RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. *Clin Chem.* 1988; 34: 1467–1471.
39. Svinarov DA, Dimova MN. Cyclosporin A in blood. *Liq Chromatography* 1991; 14: 1683.
40. Christians U, Schlitt HJ, Bleck JS, Schiebel HM, Kovnatzki R, Mauer G, et al. Measurement of cyclosporine and 18 metabolites in blood, bile, and urine by high-performance liquid chromatography. *Transpl Proc.* 1988; 20: 609–613.
41. Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effect of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1991; 39: 1255–1266.
42. Holt DW, Johnston A, Roberts NB, Tredger JM, Trull AK. Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of Association of Clinical Biochemists task force. *Ann Clin Biochem.* 1994; 31: 424–427.
43. Lensmeyer G L, Wiebe D A, Carlson HI. Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. Purification of analytical standards and optimization of the assay. *Clin Chem.* 1987; 33: 1841–1850.
44. Annesley T, Matz K, Balogh L, Clayton L, Giachero D. Liquid-chromatographic analysis for cyclosporine with use of microbore column and small sample volume. *Clin Chem.* 1986; 32: 1407–1409.
45. Komzáková I, Brozmanová H, Šafářčík K, Grundmann M. Stanovení cyklosporinu A metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). *Čes slov Farm.* 2002; 51: 107–111.
46. Koseki N, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AM4N and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(5): 733–740.
47. Vidal C, Kirchner GI, Vunsch G, Sewing KF. Automated simultaneous quantification of the immunosuppressants 40-O- (2-hydroxyethyl) rapamycin and cyclosporine in blood with electrospray-mass spectrometry detection. *Clin Chem.* 1998; 44: 1275–1282.
48. Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF, et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 748: 41–53.
49. Kirchner GI, Vidal C, Jacobsen W, Franzke A, Hallensleben K, Christians U, et al. Simultaneous on line extraction analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 721: 285–294.
50. Deters M, Kirchner G, Resch K, Kaever V. Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 285–292.
51. Seger C, Tentschert K, Stöggel W, Griesmacher A, Ramsay SL. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc.* 2009; 4(4): 526–534.
52. Taylor PJ, Jones CE, Martin PT, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Microscale high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 705: 289–294.
53. Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, Morris MR. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine analysis of cyclosporine A over an extended concentration range. *Clin Chem.* 2002; 48: 69–76.
54. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus everolimus, tacrolimus, and cyclosporine A in whole blood. *Clin Chem.* 2002; 48: 955–958.
55. Bogusz MJ, Enazi EA, Hassan H, Abdel-Jawaat J, Ruwaily JA, Tufai MA. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850: 471–480.

56. Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2001; 34: 285–290.
57. Koal T, Deters M, Casetta B, Kaever V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 805: 215–222.
58. Salm P, Taylor PJ, Rooney F. A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method using a novel atmospheric pressure chemical ionization approach for the rapid simultaneous measurement of tacrolimus and cyclosporine in whole blood. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 292–300.
59. 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. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 116–125.
60. Whitman DA, Abbott V, Fregien K, Bowers LD. Recent advances in high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: detection of cyclosporine and metabolites in kidney and liver tissue. *Ther Drug Monit.* 1993; 15: 552–556.
61. Brozmanová H, Komzárková I, Grundmann M. Determination of Cyclosporine A and Primary Metabolites in Blood and Lymphocytes by LC/MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 506.
62. Komzárková I, Grundmann M, Dědochová J, Maršálková P, Martínek A, Brozmanová H. Comparison of Blood and Lymphocytes Levels of Cyclosporine A and its Metabolites AM1, AM9 and AM4N in Early Phase after Renal Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 531.
63. Grundmann M, Brozmanová H, Dědochová J, Komzárková I, Martínek A, Maršálková P. Comparison of Blood and Lymphocytes Levels of Cyclosporine A and its Metabolites AM1, AM9 and AM4N in Stable Renal Transplant Patients. *The Drug Monit.* 2007; 29: 531.
64. Falck P, Guldseth H, Asberg A, Midtvedt K, Reubsæet JL. Determination of cyclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B.* 2007; 852: 345–352.
65. Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clin Biochem.* 2008; 41(10): 910–913.
66. Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, et al. Peak cyclosporine levels (C_{max}) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of Neoral and Sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation.* 1999; 67: 1133–1137.
67. Lindholm A, Kahan BD. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 1993; 54: 205–218.
68. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999; 68: 55–62.
69. Mahalati K, Lawen J, Kiberd B, Belitsky P. Is 3-hour cyclosporine blood level superior to trough level in early post-renal transplantation period? *Urology* 2000; 163: 34–41.
70. Bierer BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ. Cyclosporin A and FK 506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5: 763–773.
71. Bowers LD, Mathews SE. Investigation of mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. *J Chromatogr.* 1985; 333: 231–238.
72. Brooks CA, Cramer SM, Rosano TG. Preparative chromatographic purification of cyclosporine metabolites. *Clin Chem.* 1993; 39: 457–466.
73. Holt DW, Marwaha G, Jones K, Johnston A. Quality assurance programmes for immunosuppressive drugs. Cyclosporine and beyond. *Ther Drug Monit.* 1993; 15: 472–477.
74. Chan GL, Weinstein SS, LeFor WW, Spoto E, Kahana L, Shires DL. Relative performance of specific and nonspecific fluorescence polarization immunoassay for cyclosporine in transplant patients. *Ther Drug Monit.* 1992; 14: 42–47.
75. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther.* 1993; 57: 291–345.
76. Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Hochstrasser D, Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 857(1): 92–99.
77. Oellerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: Recent developments. *Ther Drug Monit.* 2006; 28: 720–725.
78. Poquette MA, Lensmeyer GL, Doran TC. Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in routine clinical laboratory for monitoring sirolimus, tacrolimus, and cyclosporine. *Ther Drug Monit.* 2005; 27: 144–150.

Mgr. Ilona Peřinová, Ph.D.

Ústav klinické farmakologie FNO

17. listopadu 1 790,

708 52 Ostrava-Poruba

ilona.perinova@fnspo.cz
