

Medizinische Klinik I
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Lehnert

**Bestimmung von Calcineurininhibitoren aus
Trockenblutproben bei Patienten nach
Nierentransplantation**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
(Dr. rer. hum. biol.)
Der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Lars Wilhelm
aus Geesthacht

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. Martin Tegtmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.12.2012

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Meiner Familie

Meinen Eltern

und in Erinnerung an meinen Großvater Dr. med. Heinz Otto Wilhelm

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1. Nierentransplantation.....	1
1.2. Cyclosporin A.....	1
1.2.1. Entwicklung und chemische Eigenschaften.....	1
1.2.2. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.....	2
1.3. Tacrolimus.....	5
1.3.1. Entwicklung und chemische Eigenschaften.....	5
1.3.2. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.....	6
1.4. Therapeutisches Drug Monitoring.....	7
1.4.1. Grundlegende Anforderungen an das therapeutische Drug Monitoring der Calcineurininhibitoren.....	7
1.4.2. Analysenmethoden.....	8
1.4.2.1. Immunchemische Methoden.....	8
1.4.2.2. Chromatographische Methoden.....	9
1.4.2.3. Alternative Matrices.....	10
1.5. Fragestellung.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Material.....	13
2.2. Methoden.....	14
2.2.1. Immunchemische Methoden.....	14
2.2.1.1. Kalibratoren und Kontrollen.....	14
2.2.1.2. Probenvorbereitung.....	15
2.2.1.3. Durchführung der immunchemischen Analyse.....	15
2.2.2. Chromatographische Methoden.....	16
2.2.2.1. Kalibratoren und Kontrollen.....	16
2.2.2.2. Probenvorbereitung für venöses Blut.....	17
2.2.2.3. Probenvorbereitung für Trockenblutproben.....	19

2.2.2.4.	Chromatographische Trennung.....	20
2.2.2.5.	Massenspektrometrische Detektion.....	22
2.2.2.6.	Quantitative Auswertung.....	24
2.2.2.7.	Mathematische Grundlagen der Methodenv validation und Auswertung.....	24
2.2.3.	Klinische Studie.....	29
2.2.3.1.	Studiendesign und Ethik.....	29
2.2.3.2.	Kriterien zur Intervention.....	29
2.2.3.3.	Studienteilnehmer.....	30
2.2.3.4.	Fallzahlberechnung.....	30
2.2.3.5.	Auswertungsplan.....	31
2.2.3.6.	Auswertung der Studiendaten nach DIN 53804.....	32
2.2.3.7.	Bland-Altman Plot.....	34
2.2.3.8.	Normierung mit dem Hämatokrit	34
2.2.3.9.	Näherungsformel zur Berechnung der Kreatinin-Clearance.....	35
2.2.3.10.	Klassifizierung der Nierenfunktion.....	35
2.2.4.	Berechnung pharmakologischer Daten.....	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Optimierung der quantitativen Bestimmung von Cyclosporin A und Tacrolimus aus Trockenblutproben mittels LCMS.....	37
3.1.1.	Zusammensetzung des Extraktionsmittels.....	37
3.1.2.	Größe und Eigenschaft der ausgestanzten Trockenblutproben und Volumen des Extraktionsmittels.....	38
3.1.3.	Dauer der Extraktion.....	41
3.1.4.	Extraktionstemperatur.....	43
3.2.	Validation der LCMS-Analyse zur quantitativen Bestimmung von Cyclosporin A und Tacrolimus aus Trockenblutproben.....	44
3.2.1.	Prüfung auf Linearität.....	44

3.2.2. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.....	46
3.2.3. Genauigkeit.....	47
3.2.4. Robustheit.....	48
3.2.5. Selektivität.....	48
3.2.6. Stabilität.....	49
3.3. Auswertung der Studienergebnisse.....	51
3.3.1. Vitalparameter.....	51
3.3.2. Kreatinin-Clearance.....	54
3.3.3. Medikation.....	55
3.3.4. Prüfung auf Normalverteilung.....	58
3.3.5. Prüfung auf Gleichwertigkeit.....	61
3.3.6. Darstellung der Ergebnisse im Bland-Altman Plot.....	66
3.3.7. Passing-Bablok Regression.....	72
3.4. Darstellung der pharmakologischen Berechnungen.....	76
3.4.1. Berechnung der Eliminationshalbwertszeit aus C ₀ - und C ₂ -Spiegeln.....	77
3.4.2. Verhältnis von C ₀ - zu C ₂ -Spiegeln.....	78
3.4.3. Verhältnis der Dosis zu den C ₀ - zu C ₂ -Spiegeln.....	80
4. Diskussion.....	81
4.1. Methodenentwicklung und Validation.....	82
4.2. Bewertung der Ergebnisse der klinischen Studie.....	86
4.2.1. Bewertung der Studienergebnisse für Cyclosporin A.....	86
4.2.2. Bewertung der Studienergebnisse für Tacrolimus.....	90
4.2.3. Entnahme von Kapillarblut.....	90
4.3. Pharmakologische Beurteilung.....	92
4.4. Ausblick.....	93
5. Zusammenfassung.....	95

6. Literaturverzeichnis.....	96
7. Anhang.....	.VIII
Danksagung.....	VIII
Lebenslauf.....	IX
Beruflicher Werdegang.....	X
Mitgliedschaft in Fachgesellschaften.....	XI
Publikationen.....	XI
Vorträge.....	XII
Poster.....	XIII
In Vorbereitung.....	XIV
Patientenaufklärung.....	XV
Einverständniserklärung.....	XVII
Dokumentationsbogen.....	XVIII

a	Ordinatenabschnitt der Kalibrierfunktion 1./2. Ordnung
A	Alter
AcCN	Acetonitril
AUC ₀₋₄	Area under the curve (0 bis 4 Stunden nach Gabe)
b	Steigung der Kalibrierfunktion 1./2. Ordnung
BIAS	systematische Verzerrung
BA	Bland-Altman Plot
c	Regressionskoeffizient des quadratischen Gliedes der Kalibrierfunktion 2. Ordnung
C ₀ -Spiegel	Talspiegel (direkt vor der Gabe)
C ₂ -Spiegel	Peakspiegel (2 h nach Gabe)
C ₁₂ -Spiegel	Talspiegel (12 h nach Gabe)
CEDIA	Cloned Enzyme Donor Immunoassays
CI	Konfidenzintervall
Cl _{CG}	Kreatinin-Clearance (Cockcroft-Gault-Formel)
CMIA	Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay
CNI	Calcineurininhibitoren
Cyc	Cyclosporin A
CYP	Cytochrom P450
D _{abs.}	absolute Dosis
D _{rel.}	relative Dosis bezogen auf das Körpergewicht
DBS	Trockenblutprobe (engl. dried blood spot)
DS ²	Differenz der Varianzen
E1	Extraktionslösung
E2	Extraktionsbedingungen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	Kreatinin-Clearance (MDRD-Formel)
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
f	Freiheitsgrad
FKBP	FK binding protein
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
g	Gramm
G	Körpergewicht

h	Stunde
Hk	Hämatokrit
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O	<i>Aqua bidest.</i>
HPLC / LC	high-performance liquid chromatography
IC	Immunchemie
LC	liquid chromatography
IL-2, -3, -4	Interleukin-2, -3, -4
IS	Interner Standard
k	Faktor zur Berechnung der Bestimmungsgrenze
k _e	Eliminationskonstante
KB	Kapillarblut
kg	Kilogramm
l	Liter
LCMS	Liquidchromatography-Tandem-Massenspektrometrie
mbar	Millibar
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mol	Mol
MP	Mobile Phase
MW	Mittelwert
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
N	Anzahl
NFAT	nuclear factor of activated T-cell
ng	Nanogramm
NTx	Nierentransplantation
PB	Passing-Bablok Regression
Pgp	P-Glycoprotein
PropOH	2-Propanol
PW	Prüfwert zur Durchführung des F- bzw. t-Tests
Q	Quadratsumme

r	Korrelationskoeffizient
RM	Referenzmethode
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
S/N	<i>Signal to Noise</i>
SP	Speichel
$s_{y_{1/2}}$	Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 1./2. Ordnung
ST	Stabilität
t	Tabellenwert der t-Verteilung
Δt	Zeitintervall
t_{elim}	Eliminationshalbwertszeit
Tac	Tacrolimus
TDM	therapeutisches Drugmonitoring
VB	Vollblut
VM	Vergleichsmethode
Vol.-%	Volumenprozent
x	Konzentration bzw. Analysenergebnis
x_{NWG}	Nachweisgrenze
x_{EG}	Erfassungsgrenze
x_{BG}	Bestimmungsgrenze
y	Messwert

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Nierentransplantation

Die Nierentransplantation (NTx) ist neben der Dialyse die wichtigste Behandlungsmöglichkeit nach terminalem Nierenversagen [1]. Im Gegensatz zur Dialyse kann durch die NTx auch die endokrine Funktion des Organs wieder hergestellt werden. Eine erfolgreiche NTx führt zu einer Verbesserung der Lebensqualität des Patienten. Grundlage für ein gutes Langzeitergebnis ist eine intensive Nachsorge des transplantierten Patienten [2].

Die erste erfolgreiche NTx wurde am 23. Dezember 1954 von Joseph E. Murray in Boston (USA) als Lebendspende zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt [3-5]. Durch das isogene Transplantat konnte eine Abstoßung des Spenderorgans verhindert werden. Die ersten NTx verliefen zum großen Teil erfolgreich und konnten in einigen Fällen die Lebensqualität vollständig wieder herstellen [4]. Diverse Versuche mit allogenen Organen führten zu der Erkenntnis, dass immunologische Mechanismen Auslöser für die Abstoßung der Transplantate sein könnten. Um diesen Effekt zu beeinflussen, wurden Methoden zur Modulation der Immunantwort entwickelt. Zunächst erfolgte eine Immunsuppression durch Röntgenbestrahlung und Corticosteroide bis eine rein medikamentöse Behandlung mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin, später mit Azathioprin und polyklonalen Antikörpern, eingeführt wurde [5-8]. Die Einbeziehung der Blutgruppen und des humanen Leukozytenantigen (HLA)-Systems in die Organauswahl, sowie tiefere Einblicke in die Mechanismen des Immunsystems, führte zu einer besseren Selektion allogener Spender und einer Weiterentwicklung der medikamentösen Immunmodulation [5, 9, 10].

1.2. Cyclosporin A

1.2.1. Entwicklung und chemische Eigenschaften

Eine wesentliche Verbesserung des Transplantationserfolgs brachte die Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (Cyc) [11]. Cyc wurde 1971 aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum*, beheimatet in der Hardanger Vidde im Süden Norwegens, isoliert. Die immunmodulierenden Eigenschaften von Cyc wurden von Jean F. Borel 1972 in Tierversuchen nachgewiesen [5, 12, 13]. Die

chemische Struktur besteht aus elf cyclisch angeordneten Peptiden. Sieben Aminosäuren sind methyliert. Vier dieser Aminosäuren bilden Wasserstoffbrücken mit den Carbonylgruppen, so dass ein starres Peptidskelett entsteht. Die Aminosäure in Position 1 enthält neun Kohlenstoffatome und wurde erstmals in diesem Molekül identifiziert. Man nimmt an, dass diese Aminosäure hauptsächlich für die pharmakologische Aktivität des Moleküls verantwortlich ist [11, 14]. Die Strukturformel wird in Abbildung 1 dargestellt.

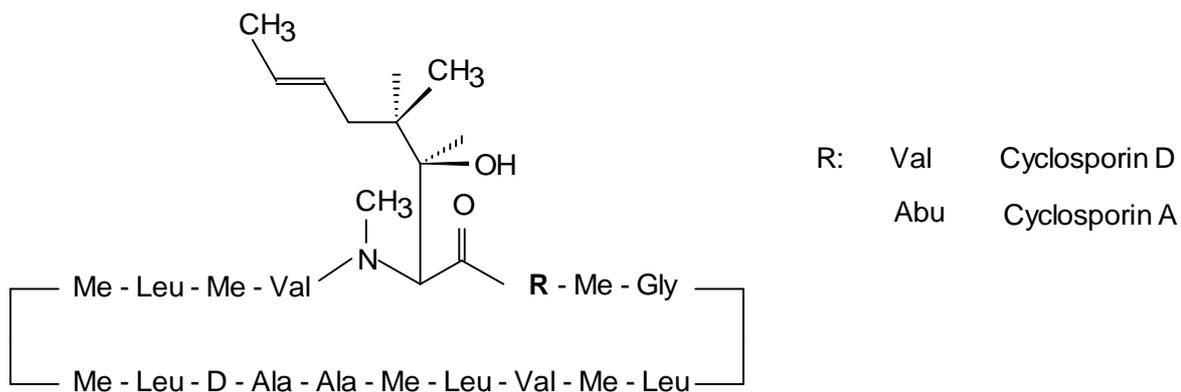


Abbildung 1: Strukturformel von Cyclosporin A und Cyclosporin D (interner Standard; IS)

Cyc zeigt stark lipophile Eigenschaften mit einem Octanol-Ringerlösung-Verteilungskoeffizienten von 991. Die Löslichkeit bei 25°C beträgt 0,04 mg/g in Wasser, 1,6 mg/g in n-Hexan und größer als 500 mg/g in Methanol, Ethanol oder Acetonitril [11]. Cyc ist eine unpolare Substanz mit der Summenformel $C_{44}H_{111}N_{11}O_{12}$ und einem Molekulargewicht von 1203 g/mol [15].

1.2.2. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Über 90% der Cyc-Dosis werden metabolisiert. Die Hauptstoffwechselwege sind Hydroxylierung und N-Demethylierung. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Gallenflüssigkeit. Etwa 6% der Dosis werden über den Urin ausgeschieden, 0,1% unmetabolisiert [11, 16]. Einige der Metaboliten sind pharmakologisch aktiv [17]. Die Eliminationshalbwertszeit liegt zwischen 6 und 27 h. Die Bioverfügbarkeit beträgt 10 bis 60% [11]. Das Verteilungsvolumen wurde mit 3,1 – 4,3 l/kg bestimmt [14].

Cyc bindet intrazellulär an das Immunophilin Cyclophilin. Der Cyclosporin A-Cyclophilin-Komplex inhibiert das Enzym Calcineurin und verhindert somit die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cell) [18]. Hierdurch wird dessen Aktivierung verhindert. Aktiviertes NFAT transloziert in den Zellkern und aktiviert dort wiederum Gene zur Expression zahlreicher Zytokine und Zelloberflächenrezeptoren wie IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α und γ -Interferon. Somit wird die Immunantwort moduliert und die Lymphozytenproliferation gehemmt [5, 11, 19-21].

Mit dieser immunsuppressiven Wirkung gehen jedoch einige unerwünschte Nebenwirkungen einher. Die Inhibition des Calcineurin-NFAT-Signalwegs ist nicht spezifisch für Immunzellen. Hierin liegt eine Ursache für toxische Effekte [18]. Bei dem Einsatz von Cyc zur Immunmodulation bei lebertransplantierten Patienten wurde eine Verschlechterung der Nierenfunktion beobachtet [22]. So zeigt die Behandlung mit Cyc neben nephrotoxischen auch neurotoxische Effekte [5, 23]. Eine akute Nephrotoxizität wird durch hämodynamische Effekte der Cyc-Medikation hervorgerufen, die unter anderem durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems und einer damit verbundenen Vasokonstriktion verursacht wird [18, 23]. Die zunächst reversiblen Veränderungen der Morphologie führen bei Chronifizierung zu irreversiblen Schädigungen des Nierenparenchyms [18, 23]. Die akute und chronische Nephrotoxizität kann die Funktion des transplantierten Organs signifikant beeinträchtigen [18]. Auch die Metaboliten tragen zur Nephrotoxizität bei [24]. Die möglichen neurotoxischen Effekte zeichnen sich durch das Auftreten von Tremor und Parästhesien bis hin zu Sehstörungen und epileptischen Anfällen aus [25]. Unter Cyc Therapie treten Hirsutismus und Hypertrichosen auf. Bei etwa 40-60% der Patienten tritt eine behandlungspflichtige Hypertonie auf [26]. Darüber hinaus kann die Behandlung zu einer Hypercholesterinämie führen. Dieser Effekt bedingt eine erhöhte Diabetogenität. Zum Teil werden hepatotoxische Effekte beobachtet. Durch die Immunsuppression steigt die Inzidenz opportunistischer bakterieller, viraler und mykotischer Infektionen [23]. Bei immunsupprimierten Patienten wird ein erhöhtes Auftreten von Malignomen beobachtet [2]. Viele der Nebenwirkungen sind dosisabhängig [5]. Diese unerwünschten Effekte erfordern häufig eine gezielte medikamentöse Behandlung. Hierbei sind sowohl pharmakokinetische als auch pharmakodynamische Wechselwirkungen zu berücksichtigen [27].

Erste klinischen Studien mit Cyc an nierentransplantierten Patienten von 1978 durch R. Calne zeigten neben einer verlängerten Vitalität des Transplantats trotz HLA-Missmatches auch einige der beschriebenen Nebenwirkungen [11, 12, 28]. Zum Anfang der NTx mit Immunsuppression durch Cyc stieg die Zwei-Jahres-Überlebensdauer des Transplantats von etwa 18% auf über 50%. Nach Optimierungen der Therapie und Kombination von Cyc mit Azathioprin und Prednison als Triple-Therapie konnte die Zwei-Jahres-Überlebensdauer des Transplantats in den 90er Jahren auf über 80% erhöht werden [5, 29]. Ein Problem bei der Einführung von Cyc zur Immunsuppression war zunächst die Resorption des Wirkstoffes [5, 29]. Auf Grund der hohen Lipophilität und der damit verbundenen geringen Wasserlöslichkeit resultieren starke Schwankungen in der Bioverfügbarkeit. Somit traten bei geringer Bioverfügbarkeit Abstoßungsreaktionen des Transplantats oder toxische Nebenwirkungen bei hoher Bioverfügbarkeit auf [11, 28]. Optimierungen der oralen Cyc-Formulierung führten zu einer Verringerung der inter- und intraindividuellen Schwankung der Blutkonzentrationen und weiterer pharmakokinetischer Parameter [30]. Mit der Einführung von Nachweismethoden konnte die Therapie weiter verbessert werden. Der schmale Konzentrationsbereich, in dem eine ausreichende Immunsuppression gewährleistet ist und gleichzeitig Nebenwirkungen so gering wie möglich gehalten werden, macht ein therapeutisches Drug Monitoring (TDM) erforderlich [18, 26, 31].

Die Pharmakokinetik von Cyc wird zu einem Großteil von den metabolisierenden Enzymen Cytochrom P450 (CYP) und dem Transportprotein P-Glycoprotein (Pgp) bestimmt. Für die Hydroxylierung und Demethylierung von Cyc zu seinen Metaboliten sind sowohl die Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 als auch zu einem geringeren Anteil das CYP3A7 verantwortlich [11, 18, 27, 32]. Alle beteiligten Enzyme unterliegen einer genetischen Variabilität, die durch single-nucleotide Polymorphismen verursacht wird [18, 33]. Diese Polymorphismen beeinflussen die Aktivität der Enzyme. Insbesondere für Pgp und CYP3A4 sind Wechselwirkungen mit Medikamenten und anderen Xenobiotika beschrieben, die signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität haben [5, 27, 34, 35]. Folgende CYP3A4-Inhibitoren können eine Erhöhung der Cyc-Konzentrationen und damit toxische Effekte bewirken: Ketoconazol, Fluconazol, Itraconazol, Myconazol, Clarithromycin, Erythrimycin, Fluvoxamin, Nefazodone, Sertralin, Losartan oder

Bergamottin (Grapefruitsaft). Auch eine Co-Medikation mit Sirolimus und Everolimus kann zu einem Anstieg der Konzentrationen im Blut führen [34]. Carbamazepin, Phenobarbital, Phenytoin, Rifampin, Modafinil, Sulfinpyrazon und Johanniskraut induzieren CYP3A4 und Pgp und können somit Abstoßungsreaktionen hervorrufen [27]. Pgp und CYP3A4 sind intestinal expremiert und haben so Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Cyc. CYP3A4 und CYP3A5 nehmen in der Leber am Fremdstoffmetabolismus teil. Die Aktivität dieser Enzyme hat einen erheblichen Einfluss auf die Eliminationshalbwertszeit von Cyc [18]. Die Clearance von Cyc zeigte keine relevante Beeinflussung durch Hämodialyse [36].

1.3. Tacrolimus

1.3.1. Entwicklung und chemische Eigenschaften

Toru Kino isolierte 1986 in dem Labor von Fujisawa Pharmaceutical Co. in Japan aus dem Pilz *Streptomyces tsukubaensis* aus einer Bodenprobe des Berges Tsubuka (bei Tokio) ein Makrolid-Lacton mit der Bezeichnung FK506 [37-39]. FK506 erhielt später auch die Bezeichnung Tacrolimus (Tac).

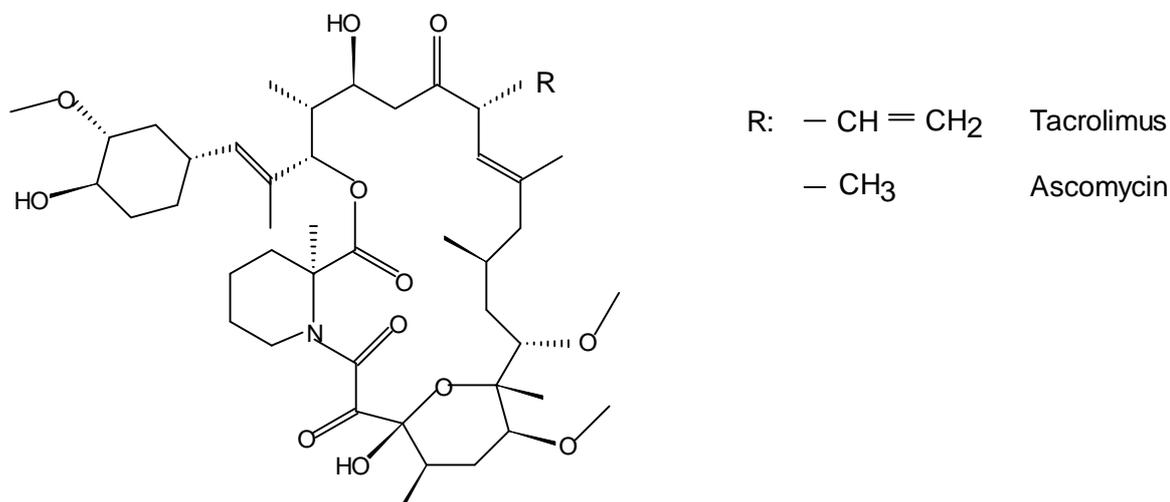


Abbildung 2: Strukturformeln von Tacrolimus (FK506) und Ascomycin (interner Standard; IS)

Mit der Summenformel C₄₄H₆₉NO₁₂ besitzt Tac ein Molekulgewicht von 803 g/mol [37, 40]. Das Molekül weist sich durch ein hemiketal-maskiertes α,β -Diketonamid in einem 23-gliedrigen Ring aus (Abb. 2) [40]. Tac ist stark lipophil und nahezu

unlöslich in Wasser [37, 41]. Der Wirkstoff ist gut löslich in Methanol, Ethanol, Propanol, Aceton, Ethylacetat, Chloroform, Methylenchlorid und Diethylether. Die Löslichkeit in Hexan und Petrolether ist gering. In kristalliner Form ist Tac für mehrere Monate stabil. In Lösung ist die Stabilität geringer [40].

1.3.2. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Die Bioverfügbarkeit von Tac schwankt bei organtransplantierten Patienten zwischen 4 und 89%. Sie kann durch die schlechte Löslichkeit im Mageninhalt, Nahrungsmittelaufnahme, veränderte Darmtätigkeit und den Metabolismus bzw. die Transportprozesse durch Pgp und CYP3A4 beeinflusst werden [32]. Die Peakkonzentration bei oraler Gabe liegt bei $2.0 \pm 1,6$ h [25]. Die Bindung an die Plasmaproteine α -1 saures Glykoprotein, Albumin, Lipoproteine und Globuline beträgt 75 bis 99% [25]. Das Verteilungsvolumen bezogen auf Vollblut liegt bei $1,67 \pm 1,02$ l/kg [25, 42]. Die Eliminationshalbwertszeit wurde mit $18.2 \pm 12,1$ h bestimmt [25, 42]. Die Clearance beträgt $0,071 \pm 0,034$ l/h/kg [25, 42]. In Studien an Ratten konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Dosis über Stuhl und Galle ausgeschieden werden. Weniger als 0,4% der Dosis werden unmetabolisiert über Urin, Gallenflüssigkeit und Stuhl ausgeschieden. Auch Tac bildet eine Vielzahl größtenteils pharmakologisch inaktiver Metaboliten [41].

Auch wenn die chemische Struktur sich sehr von der des Cyc unterscheidet, ähneln sich die Substanzen in ihren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften. Tac bindet intrazellulär an das Immunophilin FK binding protein (FKBP). Der Tac-FKBP-Komplex bindet seinerseits den calciumabhängigen Calcineurin-Calmodulin-Komplex. Auf diese Weise wird die Phosphataseaktivität des Komplexes inhibiert und komplementär zum Cyc die Cytokintranskription reduziert [26, 43]. Tac supprimiert das Immunsystem bei *in vitro* Versuchen bei hundertfach niedrigeren Konzentrationen als Cyc [37].

Die erste Behandlung mit Tac an leber-, nieren- und pankreastransplantierten Patienten erfolgte 1989 durch Thomas E. Starzl [44]. Bei der Behandlung mit Tac treten ähnliche Nebenwirkungen wie bei der Behandlung mit Cyc auf: Nephrotoxizität, Neurotoxizität, Hyperglykämie, Hypertension und Magen-Darbeschwerden [25, 27, 43]. Darüber hinaus wird eine erhöhte Inzidenz an Infektionen

und Malignomen beobachtet [40]. Im Gegensatz zur Cyc-Behandlung treten Hirsutismen und gingivale Hyperplasien seltener auf [25].

Auch die Pharmakokinetik von Tac unterliegt starken inter- und intraindividuellen Schwankungen [29]. Tac wird wie Cyc durch die Enzyme der Cytochrom P450 3A Subfamilie metabolisiert. In Studien an humanen Lebermikrosomen und in der Klinik konnten zahlreiche Pharmaka identifiziert werden, die den Metabolismus von Tac inhibieren: Bromocriptine, Corticosteron, Dexamthason, Diltiazem, Ergotamin, Cyc, Claritomyacin, Erythromycin, Fluconazol, Indinavir, Itraconazol, Ketoconazol, Nefazodon, Ritanovir, Clotrimazol, Felopidin, Omeprazol, Tamoxifen, Troleandomycin, Verapamil und Bergamottin (Grapefruitsaft) [25, 27, 34, 41, 45]. Für den Phase-I-Metabolismus sind im wesentlichen CYP3A4 und CYP3A5 verantwortlich [41]. Tac unterliegt zusätzlich einem Phase-II-Metabolismus über Uridinediphosphat-Glucuronyltransferase (UGT) zu weiteren glucuronierten Metaboliten. Wie Cyc ist Tac ein Substrat und Inhibitor des Transportproteins Pgp [27, 43]. Bei mit Inhibitoren für CYP3A4 und Pgp behandelten Patienten konnte ein signifikanter Anstieg der Tac-Konzentration nachgewiesen werden. Als Inhibitoren sind folgende Substanzen zu nennen: Rifampizin, Phenytoin, Phenobarbital und Johanniskraut [27, 41].

1.4. Therapeutisches Drug Monitoring

1.4.1. Grundlegende Anforderungen an das therapeutische Drug Monitoring der Calcineurininhibitoren

Die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik und die geringe therapeutische Breite erfordern ein engmaschiges therapeutisches Drug Monitoring (TDM) [21]. Die Verteilung von Cyc zwischen Blut und Plasma ist abhängig von Temperatur, Wirkstoffkonzentration, Hämatokrit und der Konzentration der Plasmalipoproteine [11]. Um eine ausreichende Korrelation zwischen dem pharmakodynamischen Effekt und der gemessenen Cyc-Konzentration zu erhalten, erfolgt die Bestimmung aus EDTA-Vollblut [32, 46]. Für Cyc C_0 -Spiegel werden bei NTx therapeutische Bereiche von 150 bis 225 ng/ml für die Initialtherapie und von 100 bis 150 ng/ml für die Erhaltungstherapie angegeben [39]. C_2 -Spiegel sind initial zwischen 1600 und 2000 ng/ml und mit 1200 bis 1400 ng/ml in der Erhaltungstherapie anzustreben. Auch für Tac wurde

die Bestimmung aus Vollblut als die Methode der Wahl ermittelt [29]. Die Absorption von Cyc steigt in den ersten zwei Wochen der Behandlung und stabilisiert sich zum Ende des ersten Behandlungsmonats [47]. Die Bestimmung des Cyc-Talspiegels (C_0) findet weit verbreitet Anwendung. Die C_0 -Spiegel zeigen nur eine schwache Korrelation mit dem area under the curve (0 bis 4 Stunden nach Gabe; AUC_{0-4}). Eine Peakspiegelbestimmung 2 Stunden nach Gabe (C_2) korreliert besser mit dem AUC [47, 48]. Bei Tac korreliert die C_0 -Konzentration mit dem AUC und ist ausreichend für das TDM [5, 42, 47, 49]. Die Tac-Konzentrationen sollten sich an der Abstoßungsgefahr des transplantierten Organs orientieren und zu Beginn der Behandlung höher eingestellt werden als im weiteren Verlauf der Behandlung [47]. Für die C_0 -Spiegel von Tac finden therapeutische Bereiche bei NTx-Patienten von initial 10 bis 15 ng/ml bzw. 5 bis 10 ng/ml in der Erhaltungstherapie Anwendung. Bei der Gabe von Tac mit Nahrungsmitteln konnte eine Verringerung der Bioverfügbarkeit im Mittel um 20% beobachtet werden [50]. Tac zeigt chronopharmakologische Effekte. Bei der Gabe am Morgen konnte eine signifikant höhere Absorptionsrate als bei abendlicher Gabe nachgewiesen werden, ohne jedoch den Behandlungseffekt signifikant zu beeinflussen [50, 51].

1.4.2. Analysenmethoden

1.4.2.1. Immunchemische Methoden

Zur quantitativen Bestimmung der Calcineurininhibitoren (CNI) werden sowohl immunchemische als auch chromatographische Methoden eingesetzt. Zum immunchemischen Nachweis stehen unterschiedliche Testdesigns zur Verfügung. Es kommen kommerzielle Radioimmunoassays (RIA), Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA), als auch Enzym-multiplied Immunoassays, Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassays (CMIA) und Cloned Enzyme Donor Immunoassays (CEDIA) zum Einsatz [29, 52-54]. Es besteht ein Konsens, dass eine selektive Bestimmung des Wirkstoffs erfolgen sollte [35, 46]. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper für den jeweiligen Wirkstoff variiert, da die Metabolite zum Teil eine Kreuzreaktion besitzen [17, 46, 55]. Steimer zeigte in einer Vergleichsstudie, dass die Abweichung der Immunoassay-Ergebnisse im Vergleich zu einer HPLC-Methode 9 bis 57% betrug [53]. Daraus folgt, dass die

Messwerte einer methodenspezifischen Bewertung bedürfen. In den meisten Fällen ist eine Proteinfällung mit entsprechenden Präzipitationsreagenzien erforderlich, bevor die Messung auf einem klinisch-chemischen Analyser durchgeführt werden kann. Die Analyse muss zeitnah durchgeführt werden. Die erforderlichen Geräte und das Personal sind in den meisten medizinischen Zentren verfügbar und die Immunoassays erfordern nur relativ geringe Investitionskosten. Die Analysengeräte können *online* an den Zentralrechner des Labors angeschlossen werden.

1.4.2.2. Chromatographische Methoden

Alternativ zu den immunchemischen Methoden kommen chromatographische Methoden zum Einsatz. Zunächst standen HPLC-Methoden mit UV-Detektion zur Verfügung. Diese benötigen zunächst eine Probenvorbereitung mit Proteinfällung und Festphasenextraktion. Anschließend werden die Analyten in das HPLC-System injiziert und chromatographisch getrennt. Der quantitative Nachweis erfolgt dann nach UV-Detektion an Hand der gemessenen Peakflächen/-höhen. Die HPLC bietet die Möglichkeit, neben dem Wirkstoff auch die Metaboliten nachzuweisen [56].

Eine Verbesserung der aufwändigen HPLC-Methoden brachte die Kopplung von Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) Ende der 90er Jahre. Die Selektivität und Sensitivität der zunächst eingesetzten Single-Quadrupol-Massenspektrometer wurden später durch den Einsatz von Triple-Quadrupol-Geräten weiter optimiert [57-60]. Bei der Kopplung mit der Flüssigchromatographie findet die Elektrospray-Ionisation (ESI) eine weit verbreitete Anwendung. Bei dieser Technik werden die Analyten mit der mobilen Phase durch eine Metallkapillare geleitet, an der eine Spannung angelegt ist. Analyten und Lösemittel treten in Aerosolen aus der Kapillare aus. Bei der Verdampfung der Lösemittel werden die Analyten ionisiert. Die Analytionen werden in einem Magnetfeld beschleunigt und in das Massenspektrometer geleitet. Auf Grund ihres Masse/Ladungsverhältnisses werden die Ionen im ersten Quadrupol extrahiert. Der zweite Quadrupol dient als Kollisionszelle und erzeugt charakteristische Fragmente der Analytionen. Ein oder mehrere der geladenen Fragmente werden im dritten Quadrupol selektiert. Diese sogenannten Tochterionen werden

anschließend mit einem Photomultiplier oder anderen Detektoren quantifiziert [59, 60]. Dieses ist eine Methode mit der die als Liquidchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LCMS) bezeichnete Technik betrieben werden kann. Heute hat die LCMS die Analyse mittels HPLC-UV weitestgehend abgelöst und stellt die Referenzmethode in der klinisch-chemischen Analytik der Immunsuppressiva dar [55]. Hierbei können auch mehrere Immunsuppressiva parallel quantitativ bestimmt werden [29, 61-67]. Der Einsatz kommerzieller Matrixreferenzmaterialien zur Kalibration und Kontrolle kann die Richtigkeit der Analysenergebnisse sicherstellen [68]. Die hohe Spezifität und Selektivität sowie die niedrigen Reagenzienkosten stehen jedoch einer relativ zeitaufwändigen Analytik mit hohen Investitions- und Personalkosten entgegen [55, 61]. Eine automatisierte, durch die Labor-EDV gesteuerte Bearbeitung ist nur begrenzt möglich.

1.4.2.3. Alternative Matrices

In den letzten Jahren wurden Methoden zum Nachweis von Immunsuppressiva aus alternativen Matrices publiziert. Hier sind vor allem Kapillarblut aus Fingerbeere oder Ohrläppchen [69-78], Trockenblut [72, 79-85] und Speichelflüssigkeit [86] zu nennen. Mendonza et al. publizierten eine LCMS-Methode aus Speichelflüssigkeit und zeigten einen Korrelationskoeffizienten zwischen Speichel und Vollblut von 0,695 [86]. Die Konzentrationen in Speichelflüssigkeit spiegeln die ungebundene Fraktion eines Pharmakons wieder. Diese unterliegt bei den Immunsuppressiva starken Schwankungen [11]. Darüber hinaus verläuft die Sezernierung in den Speichel selektiv. Bei der kapillaren Blutentnahme bietet die Fingerbeere im Gegenteil zum Ohrläppchen die Möglichkeit der eigenständigen Blutentnahme durch den Patienten. Darüber hinaus erleichtert diese Entnahmemethode die Bestimmung von C_2 -Spiegeln. Das Blut aus der Hautpunktion besteht aus einem Gemisch aus arteriellem, venösem und kapillarem Blut. Der Anteil an arteriellem Blut ist auf Grund des höheren Drucks in der arteriellen Blutbahn größer als der Anteil an venösem Blut [73].

In einer der ersten Methoden von Lampe et al. wurde Kapillarblut zum Nachweis von Cyc auf ein Filterpapier gegeben und so eine Trockenblutprobe (engl. dried blood spot, DBS) hergestellt [83]. Die Analyse von DBS wurde erstmals von Robert Guthrie 1963 eingeführt und ist bis heute in der Pränataldiagnostik im

Einsatz [87]. Cyc wurde dann mit Tris/Tween-Lösung von dem Filterpapier extrahiert und mittels RIA quantifiziert. Die Methode zeigte eine gute Korrelation mit der venösen Entnahme [83].

In weiteren Publikationen werden unterschiedliche Blutentnahmemethoden eingesetzt und Cyc oder Tac quantitativ analysiert. In einer Publikation wird die Analyse von Cyc und Kreatinin aus dem Kapillarblut beschrieben [71].

1.5. Fragestellung

Nach einer Organtransplantation muss eine lebenslange Immunsuppression erfolgen. Diese wird in der Regel mit den CNI Cyc oder Tac durchgeführt. Auf Grund der geringen therapeutischen Breite der Pharmaka ist eine regelmäßiges TDM erforderlich, um Nebenwirkungen zu verhindern und dennoch eine ausreichende Immunmodulation sicherzustellen. In der ambulanten Therapie ist die Bestimmung von C_0 -Spiegeln aus Gründen der Praktikabilität weit verbreitet. Bei Cyc korrelieren C_2 -Spiegel besser mit den pharmakodynamischen Effekten.

Eine Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere eignet sich zur selbständigen Blutentnahme durch den Patienten. Hierbei können spezielle Filterpapiere zur Gewinnung von DBS verwendet werden. Die Proben können nach Probenvorbereitung mittels LCMS analysiert werden. Der klinische Vorteil für den Patienten wäre, dass keine regelmäßige Vorstellung zu einer venösen Blutentnahme in einer Arztpraxis erfolgen muss. Durch die Methode könnte ein engmaschiges TDM auch von ambulanten Patienten ermöglicht werden, da die Kapillarblutproben auf Filterpapier vom Patienten selbst gewonnen und mit der Post an ein medizinisches Labor zur Analyse versendet werden können.

Ziel der Arbeit ist die Durchführung einer Studie zur Frage der Äquivalenz der Bestimmung der CNI aus DBS zu den Routineverfahren aus venösem Blut. In der Studie wurde die LCMS-Methode im Vergleich zu immunochemischen Methoden anhand von Proben immunsupprimierter Patienten aus DBS und aus venösem Blut charakterisiert. Es sollen C_0 - und C_2 -Spiegel in die Studie einbezogen werden, um einen breiten Konzentrationsbereich abzudecken. Als Referenzmethode soll eine *in house*-LCMS-Methode dienen.

Die Hauptzielgröße stellt die Korrelation zwischen der Bestimmung aus DBS und der im Vollblut dar. Hierbei soll sowohl die Richtigkeit als auch die Reproduzierbarkeit betrachtet werden. Es sollen Rückschlüsse zur Übertragbarkeit der therapeutischen Bereiche auf die Kapillarblutmethode gezogen werden. Als Nebenzielgrößen wird der Vergleich zwischen immunchemischen und chromatographischen Methoden erfasst und die Praktikabilität der eingesetzten Methoden beurteilt. Aus den C_0 - und C_2 -Spiegel sollen die Möglichkeiten für weitere pharmakologische Kenndaten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Acetonitril HPLC ultragradient	(Baker, Griesheim, Germany)
Ameisensäure	(Merck, Darmstadt, Germany)
Ammoniumacetat	(Merck, Darmstadt, Germany)
Architect Cyclosporin Reagenz Kit (1L75)	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Architect Tacrolimus Reagenz Kit (1L77)	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Architect System i2000 SR	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Ascomycin	(Recipe, München, Germany)
Cyclosporin D	(Recipe, München, Germany)
Eppendorfpipette 10 – 100 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipettenspitzen 100 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipette 100 – 1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipettenspitzen 1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Ethanol	(Merck, Darmstadt, Germany)
Waters Nova Pack C18 2,1 x 10 mm	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Autosampler Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Pumpe Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Säulenofen Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
Lochstanze 10 mm	(E-Top)
Lochstanze 5 mm	(E-Top)
Massenspektrometer Quattro Micro	(Waters, Eschborn, Germany)
Methanol LCMS Grade	(Baker, Griesheim, Germany)
Monovette EDTA 2 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Propanol, 2-	(Merck, Darmstadt, Germany)
Proteinsaver™ 903 Card	(Whatman, Maidstone, U. K.)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Reaktionsgefäß 2,0 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Safty Lanzetten 1,5 mm	(HTL-Strefa, Ozorkow, Poland)
Software MassLynx 4.1	(Waters, Eschborn, Germany)
Heizthermomixer MHR 23	(DITABIS, Pforzheim, Germany)
Transplant-Vorbehandlungsröhrchen	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Vortexer REAX 2000	(Heidolph, Schwabach, Germany)
96-Well-Microtiterplatten	(Waters, Eschborn, Germany)
Zentrifuge EBA12	(Hettich, Tuttlingen, Germany)
Zinksulfat-Heptahydrat	(Merck, Darmstadt, Germany)

2.2. Methoden

2.2.1. Immunchemische Methoden

2.2.1.1. Kalibratoren und Kontrollen

Zur Kalibration der immunchemischen Analyse wurden kommerzielle Standards in Matrix (*Abbott, Wiesbaden, Germany*) verwendet. Die Kalibration erfolgte in Doppelbestimmung.

Tabelle 1: Konzentration der Kalibratoren für Cyclosporin A und Tacrolimus für die immunchemische Bestimmung

Bezeichnung	Konzentration Cyc [ng/ml]	Konzentration Tac [ng/ml]
STANDARD CAL A	0	0
STANDARD CAL B	40	3
STANDARD CAL C	150	6
STANDARD CAL D	400	12
STANDARD CAL E	800	20
STANDARD CAL F	1500	30

Tabelle 2: Konzentration der Qualitätskontrollen für Cyclosporin A und Tacrolimus für die Immunchemie

Bezeichnung	Konzentration Cyc Sollwert (Kontrollbereich) [ng/ml]	Konzentration Tac Sollwert (Kontrollbereich) [ng/ml]
MCC 1	96,5 (77,2 – 116)	4,75 (3,80 – 5,70)
MCC 2	186 (149 – 224)	8,58 (6,86 – 10,3)
MCC 3	312 (250 – 375)	15,3 (12,2 - 18,4)

Die immunchemische Analytik von Tac und Cyc wurde mit dem kommerziellen Kalibratorset BIO-RAD Abbott Immunosuppressant-MCC Trilevel (*Bio-Rad, München, Germany*) durchgeführt.

2.2.1.2. Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung zur immunchemischen Bestimmung von Cyc und Tac entspricht den Standardarbeitsanweisungen SV – Cyclosporin (Stand: 15.07.2009; [88]) und SV – Tacrolimus (Stand: 12.11.2009; [89]) des Zentrallabors Bereich Klinische Chemie des UK S-H Campus Lübeck, mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Leif Dibbelt. Die Analysen wurden dort durch das Fachpersonal im Rahmen der Routineanalytik durchgeführt.

Lösungen:

Cyclosporin Whole Blood Solubilization Reagenz	<i>(Abbott, Wiesbaden, Germany)</i>
Cyclosporin Whole Blood Precipitations Reagenz	<i>(Abbott, Wiesbaden, Germany)</i>
Tacrolimus-Vollblut-Fällungsreagenz	<i>(Abbott, Wiesbaden, Germany)</i>

Probenvorbereitung Cyclosporin:

Zunächst wird das EDTA-Blut gründlich gemischt. Es werden dann 200 µl Probe mit 100 µl Cyclosporin Whole Blood Solubilization Reagenz und 400 µl Cyclosporin Whole Blood Precipitations Reagenz versetzt und auf dem Vortexer homogenisiert. Anschließend wird die Probe 4 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Transplant-Vorbehandlungsröhrchen überführt und 5-10 sec auf dem Vortexer gemischt. Die Probe wird daraufhin im Transplant-Vorbehandlungsröhrchen auf dem Architect System i2000 SR *(Abbott, Wiesbaden, Germany)* gemessen [88, 90].

Probenvorbereitung Tacrolimus:

Das EDTA-Blut wird zunächst homogenisiert. Im Anschluss werden 200 µl Probe mit 200 µl Tacrolimus-Vollblut-Fällungsreagenz versetzt und umgehend auf dem Vortexer gemischt. Es folgt eine Zentrifugation für 4 min. Der Überstand wird in die Transplant-Vorbehandlungsröhrchen überführt, 5 – 10 sec auf dem Vortexer gemischt und innerhalb von 30 min auf dem Architect System i2000 SR *(Abbott, Wiesbaden, Germany)* gemessen [89, 91].

2.2.1.3. Durchführung der immunchemischen Analyse

Zur quantitativen immunchemischen Analyse von Cyc und Tac aus EDTA-Vollblut wurden Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassays (CMIA) auf einem

Architect i2000 SR eingesetzt. Bei dem Test handelt es sich um einen Zwei-Schritt-Immunoassay. Im ersten Schritt werden die vorbereitete Probe, das Assay-verdünnungsmittel und die mit anti-Cyc/Tac beschichteten paramagnetischen Mikropartikel gemischt. In der Probe vorhandenes Cyc/Tac bindet an die markierten Mikropartikel. Nach einem Waschschrift wird akridiniummarkiertes Konjugat zugegeben und so ein Reaktionsgemisch hergestellt. Dieses wird nach einem weiteren Waschgang mit Trigger- und Pre-Trigger-Lösung versetzt. Die resultierende Lumineszenz ist im Messbereich proportional zur Konzentration der Analyten Cyc respektive Tac.

Der Messbereich der Methode liegt für Cyc zwischen 30 und 1500 ng/ml. Proben oberhalb von 1500 ng/ml werden verdünnt gemessen. Im Zentrallabor wurden für den Variationskoeffizienten Werte zwischen 4,52 und 8,51% und für die Unrichtigkeit 6,65 bis 12,13% ermittelt. Der Messbereich für Tac liegt zwischen 2 und 30 ng/ml. Messwerte über 30 ng/ml werden verdünnt wiederholt. Im Zentrallabor wurden Variationskoeffizienten zwischen 5,3 und 13,7% ermittelt [88-91].

2.2.2. Chromatographische Methoden

2.2.2.1. Kalibratoren und Kontrollen

Tabelle 3: Konzentration der Kalibratoren für Cyclosporin A und Tacrolimus für die Chromatographie (Charge 839)

Bezeichnung	Konzentration Cyc [ng/ml]	Konzentration Tac [ng/ml]
Level 0	0,0	0,00
Level 2	48,4	2,46
Level 3	92,4	5,03
Level 4	187,0	10,20
Level 5	472,0	20,50
Level 6	1345,0	39,70

Kalibratoren:

Zur Kalibration der chromatographischen Methode werden kommerzielle lyophilisierte Vollblutreagenzien (*Recipe, München, Germany*) verwendet. Diese wurden vor dem Einsatz mit 2 ml *Aqua bidest.* (H₂O) rekonstituiert. Die Haltbarkeit der rekonstituierten Lösungen beträgt bei -20°C mindestens 30 Tage.

Qualitätskontrollen:

Zur Qualitätskontrolle der chromatographischen Methode werden kommerzielle lyophilisierte Vollblutreagenzien (*Recipe, München, Germany; Invicon, München, Germany*) verwendet. Das Kontrollmaterial UTAK L3 wird für die Bestimmung aus dem Kapillarblut verwendet. Die Reagenzien werden vor dem Einsatz mit 2 ml H₂O rekonstituiert. Die Haltbarkeit der rekonstituierten Lösungen beträgt bei -20°C mindestens 30 Tage.

Tabelle 4: Konzentration der Qualitätskontrollen für Cyclosporin A und Tacrolimus für die Chromatographie

Bezeichnung	Charge	Konzentration Cyc Sollwert (Kontrollbereich) [ng/ml]	Konzentration Tac Sollwert (Kontrollbereich) [ng/ml]
Recipe L 1	8830	62,5 (46,9 – 78,1)	3,28 (2,30 – 4,26)
Recipe L 3	8832	258 (206 – 310)	13,3 (9,98 – 16,6)
UTAK L 3	3267	1173 (997 – 1349)	24,9 (21,2 – 28,6)

2.2.2.2. Probenvorbereitung für venöses Blut

Lösungen:

Arbeitslösung IS:

Zum Ansetzen der Arbeitslösung werden 25 µg Cyclosporin D mit 5 ml Methanol / H₂O 30 Vol.-% und 2 µg Ascomycin in 2,5 ml Methanol / H₂O 30 Vol.-% aufgelöst. Die Lösung enthält dann 5000 ng/ml Cyclosporin D und 800 ng/ml Ascomycin.

Herstellen der 0,2 M ZnSO₄-Lösung:

11 g Zinksulfat-Heptahydrat wird in einem 100 ml Messkolben eingewogen, in 34 ml H₂O gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

Präzipitationsreagenz:

Zur Herstellung des Präzipitationsreagenzes werden 9 ml 0,2 M ZnSO₄-Lösung mit 0,5 ml der Arbeitslösung Cyclosporin D sowie 0,5 ml der Arbeitslösung Ascomycin frisch hergestellt.

Durchführung:

Die Probenvorbereitung für die chromatographische Bestimmung der CNI aus venösem Blut entspricht der Routineanalytik des Medizinischen Versorgungszentrums (MVZ) Dr. Kramer und Kollegen (Laborärztliche Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Rationalisierung, LADR GmbH, Lauenburger Str. 67, 21502 Geesthacht). Die Methode wurde dort entwickelt und validiert.

200 µl EDTA-Blut, Kalibratoren oder Kontrollen werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend werden 500 µl Präzipitationsreagenz hinzugefügt. Diese Lösung enthält die ISs Cyclosporin D in einer Konzentration von 500 ng/ml und Ascomycin in einer Konzentration von 80 ng/ml. Dieses Gemisch wird dann für mindestens 10 sec gevortext. Daraufhin wird die Lösung 10 min bei 14000 rpm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wird sofort nach der Zentrifugation in Glasröhrchen überführt. Die aufgearbeitete Probe kann dann in die LCMS injiziert werden.

2.2.2.3. Probenvorbereitung für die Analyse aus Trockenblutproben

Lösungen:

Siehe 2.2.2.2

Durchführung:

Die Probenvorbereitung für die chromatographische Bestimmung der CNI aus Kapillarblut ist eine Weiterentwicklung der bestehenden Routinemethode aus venösem Blut. Im Rahmen der Weiterentwicklung wurden unterschiedliche Parameter variiert:

- Größe des ausgestanzten DBS
- Zusammensetzung und Volumen des Extraktionsmittels
- Dauer der Extraktion
- Extraktionstemperatur

Aus der Optimierung ergab sich die im Folgenden beschriebene Vorschrift zur Probenvorbereitung.

Zur Vorbereitung der Kalibratoren und Kontrollen wurden 50 µl der rekonstituierten Lösung auf ein Filterpapier gegeben. Dieses wurde für 2 h getrocknet, anschließend ausgestanzt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Die DBS wurden mit einer Lochstanze manuell ausgestanzt. Der Innendurchmesser betrug 10 mm. Der ausgestanzte DBS wurde dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 250 µl Präzipitationsreagenz hinzugefügt. Diese Lösung enthielt die internen Standards (IS) Cyclosporin D (Abb. 1) in einer Konzentration von 500 ng/ml und Ascomycin (Abb. 2) in einer Konzentration von 80 ng/ml. Die Lösung wurde dann für mindestens 10 sec gevortext. Die Proben wurden 20 min bei 40°C auf einem Thermomixer geschüttelt. Die Lösung wurde daraufhin 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation in eine 96-Well-Microtiterplatte überführt. Der aufgearbeitete Extrakt stand dann zur Injektion in die LCMS bereit.

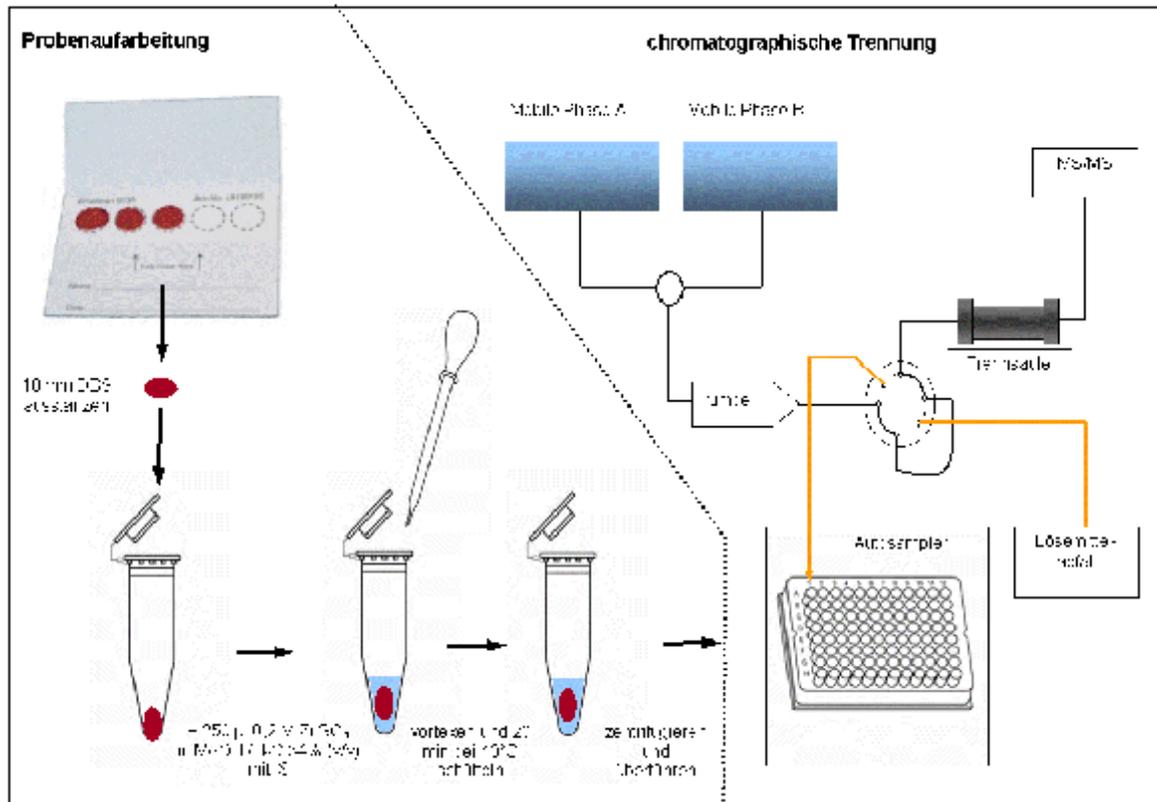


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung und chromatographischen Trennung

2.2.2.4. Chromatographische Trennung

Lösungen:

Mobile Phase (MP):

MP-A: 2 mM Ammoniumacetat / 0,1 Vol.-% Ameisensäure in H₂O

MP-B: 2 mM Ammoniumacetat / 0,1 Vol.-% Ameisensäure in Methanol

Durchführung:

Die chromatographische Analyse wurde auf einem Alliance System (Waters, Eschborn, Germany) durchgeführt. Zur Analyse wurde ein Gradient der Mobilien Phasen eingesetzt (Tab. 5). Als Stationäre Phase wurde eine Waters Nova Pack mit den Dimensionen 2,1 x 10 mm eingesetzt. Bei dieser Trennsäule handelt es sich um ein endgecapptes Silicamaterial mit C18-Gruppen. Die chromatographische Trennung entspricht für beide Methoden der in der Routine des MVZ Dr. Kramer und Kollegen validierten Methode. Die Retentionszeiten ergeben sich hiernach wie folgt:

Cyclosporin A	1,72 min
Cyclosporin D	1,74 min
Tacrolimus	1,53 min
Ascomycin	1,52 min

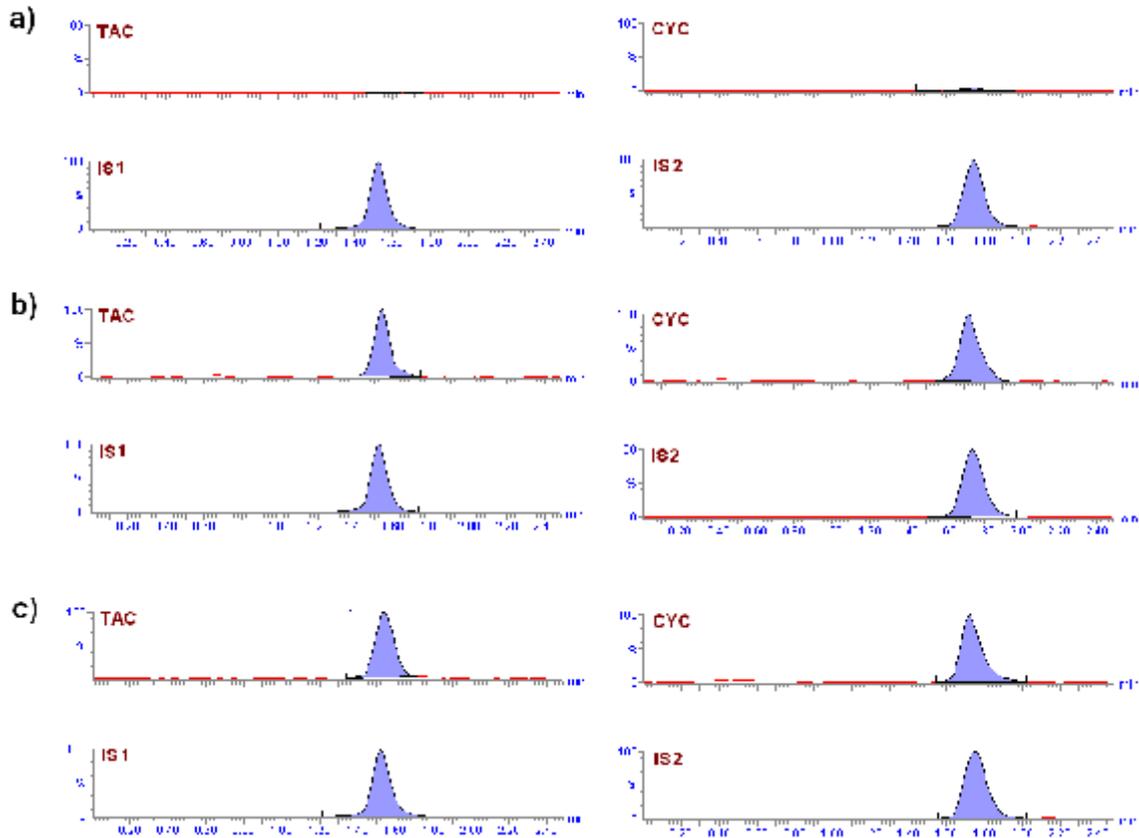


Abbildung 4: Chromatographische Trennung von Cyclosporin A, Tacrolimus, Ascomycin (IS 1) und Cyclosporin D (IS 2); a) negative Probe, b) Kalibrator Level 4 und c) Qualitätskontrolle RECIPE Level 3

Tabelle 5: Gradient der chromatographischen Trennung

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	50	50	0,5
0,3	0	100	0,5
1,0	50	50	0,5

Die weiteren Parameter wurden wie folgt festgelegt:

Säulentemperatur: 50°C

Injektionsvolumen: 30 µl

Probentemperatur: 10°C

Analysendauer: 2,5 min

2.2.2.5. Massenspektrometrische Detektion

Im Anschluss an die chromatographische Trennung erfolgte die Kopplung mit dem Tandem-Massenspektrometer. Zur quantitativen Detektion wurde ein Quattro Micro (*Waters, Eschborn, Germany*) mit einer Z-Spray Ionenquelle eingesetzt. Die Ionisierung erfolgte im ESI-positiv Mode. Für die Quantifizierung wurde das Multiple Reactant-Ion Monitoring (MRM) mit Argon als Kollisionsgas eingesetzt.

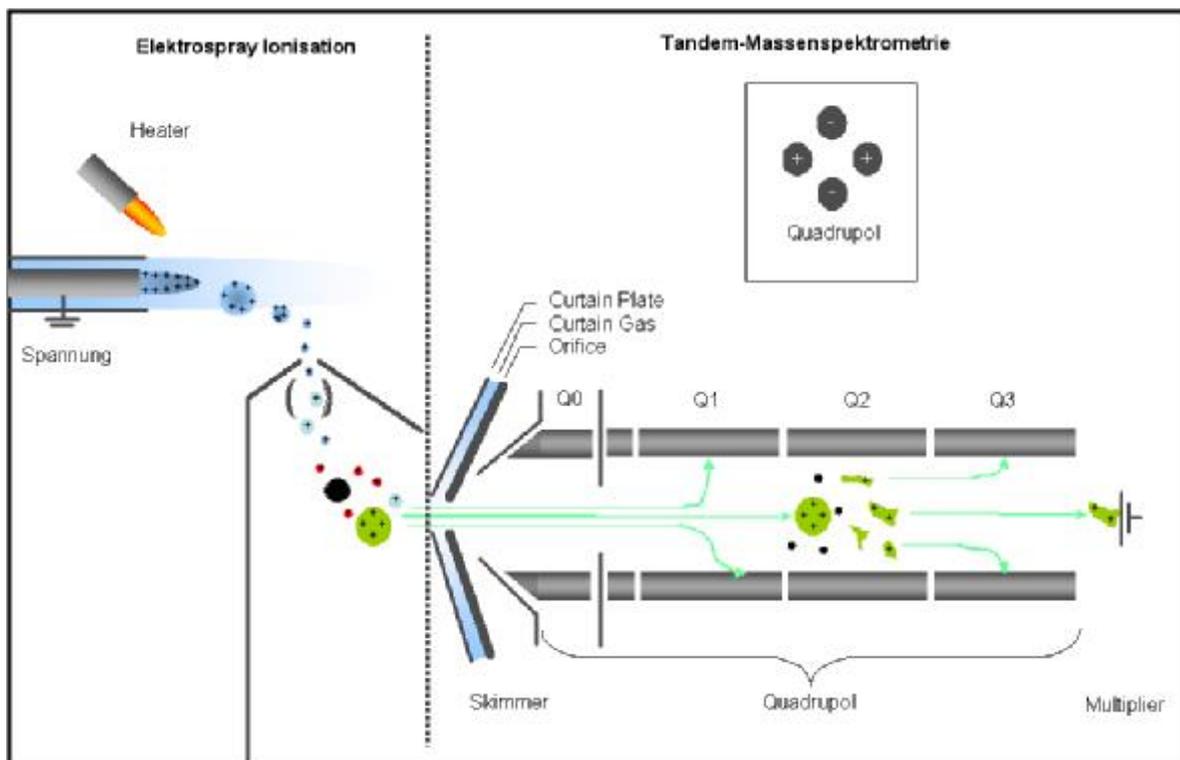


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Elektrospray Ionisation mit nachfolgender Tandem-Massenspektrometrie

Zum Tuning des Massenspektrometers wurden Lösungen der Analyten und der ISs in Mobiler Phase in die Ionenquelle des Massenspektrometers infundiert. Zur Optimierung des Mutterions im ersten Quadrupol (Q1) wurden die Ammoniumaddukte der Analyten und ISs verwendet. Als Tochterion im dritten Quadrupol (Q3) wurden die Massenübergänge mit der höchsten Intensität herangezogen. Die Optimierung erfolgte mit der MassLynx 4.1 Software.

MS-Tune Methode: immunquanttune.ipr / SUPRE_WATERS_NEU.ipr
cone gas flow: 30 l/h
desolvation gas flow: 900 l/h
nebuliser gas flow: max.
CID gas pressure: $2,4 - 2,6 \times 10^{-3}$ mbar Argon
Source temperature: 130°C
Desolvation temperature: 300°C

Nach Tuning der Analyten auf dem Massenspektrometer ergaben sich folgende Massenübergänge und Gerätekonfigurationen:

Tabelle 6: Massenübergänge und Gerätekonfigurationen

Analyt	Q1	Q3	Dwell [s]	Cone [V]	Coll [V]	Delay [sec]
Cyclosporin A	1219,7	1202,7	0,05	30	20	0,1
Tacrolimus	821,4	768,3	0,05	30	20	0,1
Ascomycin	809,5	756,4	0,03	30	20	0,1
Cyclosporin D	1233,6	1217,0	0,03	30	20	0,1

2.2.2.6. Quantitative Auswertung

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Peakfläche. Zur Normierung der Messwerte wurden die Peakflächen der Analyten auf den IS bezogen. Als IS für Cyc wurde Cyclosporin D und für Tac Ascomycin verwendet. Die ausgewählten ISs zeigen ähnliche chemische Eigenschaften wie ihre Analyten und wurden in der Literatur beschrieben [66]. Zur Quantifizierung wurden die 5 Kalibratoren ohne Einbeziehung des Nullpunktes einer linearen Regression mit der Formel $y = a + b \cdot x$ unterzogen.

2.2.2.7. Mathematische Grundlagen der Methodenvvalidation und Auswertung

Die Validation entspricht den Anforderungen in der klinischen Chemie und den Empfehlungen der Literatur [92-96].

Kalibrierung 1. Ordnung:

Bei der Verwendung einer Kalibration 1. Ordnung wird postuliert, dass sich das Messsignal proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe verhält. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung ohne Einbeziehung der Blankprobe [92]:

$$(1.1) \quad y = a + b \cdot x$$

Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurden die Messwerte y_a durch das Messsignal des IS y_{IS} normiert.

$$(1.2) \quad y = \frac{y_a}{y_{IS}}$$

$$(1.3) \quad x = \frac{x_a}{x_{IS}}$$

$$(1.4) \quad \frac{y_a}{y_{IS}} = a + b \cdot \frac{x_a}{x_{IS}}$$

In dieser Gleichung ist y das Messsignal zu einer Konzentration x. Die Variable b ist die Steigung der Kalibrationsgeraden und a der Achsenabschnitt. Die Berechnung der Steigung und des Achsenabschnitts erfolgte nach folgenden Gleichungen [92]:

$$(1.5) \quad b = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$(1.6) \quad a = \frac{1}{N} (\sum y_i - b \cdot \sum x_i) \quad N = \text{Anzahl der Kalibrationspunkte}$$

Der Korrelationskoeffizient r der Geradengleichung wurde nach der folgenden Formel berechnet [92]:

$$(1.7) \quad r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Prüfung auf Linearität:

Zur mathematischen Prüfung auf Linearität wurde der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt. Hierbei wurde die Reststandardabweichung einer Kalibrierfunktion 1. Ordnung s_{y_1} mit der einer Kalibrierfunktion 2. Ordnung s_{y_2} herangezogen. Aus den Reststandardabweichungen wurde die Differenz der Varianzen DS^2 berechnet und ein Prüfwert PW ermittelt [92].

Kalibrierfunktion 2. Ordnung:

$$(2.1) \quad y = a + b \cdot x + c \cdot x^2$$

$$(2.2) \quad a = \frac{1}{N} \cdot (\sum y_i - b \cdot \sum x_i - c \cdot \sum x_i^2)$$

$$(2.3) \quad b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$(2.4) \quad c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}}$$

$$(2.5) \quad Q_{xx} = \sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / N)$$

$$(2.6) \quad Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - ((\sum x_i) \cdot (\sum y_i) / N)$$

$$(2.7) \quad Q_{x^3} = \sum x_i^3 - ((\sum x_i) \cdot (\sum x_i^2) / N)$$

$$(2.8) \quad Q_{x^4} = \sum x_i^4 - ((\sum x_i^2)^2) / N$$

$$(2.9) \quad Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 y_i) - ((\sum y_i) \cdot (\sum x_i^2) / N)$$

Reststandardabweichung s_y :

$$(2.10) \quad s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - a - b \cdot x_i - c \cdot x_i^2)^2}{N - 3}}$$

Für die Kalibration 1. Ordnung gilt $c=0$.

Differenz der Varianzen DS^2 :

$$(2.11) \quad DS^2 = (N - 2) \cdot s_{y_1}^2 - (N - 3) \cdot s_{y_2}^2$$

Prüfwert PW :

$$(2.12) \quad PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad \text{Tabellenwert } F (f_1=1, f_2=N-3, P=99\%)$$

Wenn der Prüfwert PW kleiner oder gleich F ist, wird durch die Kalibrierfunktion 2. Ordnung keine signifikant bessere Anpassung erreicht und die Kalibrierfunktion kann als linear angesehen werden [92].

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze:

Als Maß für die Leistungsfähigkeit und Empfindlichkeit einer Analysenmethode wurde die Nachweisgrenze x_{NWG} herangezogen. x_{NWG} gibt die Konzentration an, bei der die Probe mit einer definierten Wahrscheinlichkeit substanzfrei ist. Hierbei können falsch positive Messwerte (α -Fehler) oder falsch negativ (β -Fehler) auftreten. Zur Berechnung von x_{NWG} stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Bei kalibrierfähigen Verfahren findet die Berechnung über die Kalibriergerade nach DIN 32645 weite Verbreitung. Hierbei erfolgt eine Kalibration mit mindestens $N=5$ Kalibrationspunkten im Bereich der zur erwartenden x_{NWG} . Aus dem Messwert y wird zunächst der kritische Wert y_c berechnet [92, 96].

Kritischer Wert:

$$(3.1) \quad y_c = a + \Delta a$$

$$(3.2) \quad \Delta a = s_y \cdot t_{f,a} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\sum x_i / N)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (f=N-1 \text{ Freiheitsgrade})$$

Durch Einsetzen von y_c in die Kalibriergeradenfunktion ergibt sich dann x_{NWG} wie folgt:

$$(3.3) \quad x_{NWG} = \frac{y - a}{b}$$

Die Erfassungsgrenze x_{EG} ergibt sich entsprechend der nachstehenden Formel:

$$(3.4) \quad x_{EG} = x_{NWG} + \frac{s_y}{b} \cdot t_{f,a} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\sum x_i / N)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (f=N-2 \text{ Freiheitsgrade})$$

Für die Berechnung der Bestimmungsgrenze x_{BG} wird der Faktor k mit einem Wert von 3 verwendet bei dem die maximale zulässige relative Ergebnisunsicherheit bei 33,3% liegt [92].

$$(3.5) \quad x_{BG} = k \cdot \frac{s_y}{b} \cdot t_{f,a} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\sum x_i / N)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (f=N-2 \text{ Freiheitsgrade})$$

Genauigkeit:

Zunächst erfolgt die Berechnung des systematischen Fehlers BIAS. Die Berechnung des BIAS erfolgt nach der Formel (4.1) mit μ als Sollwert des Kontrollmaterials und \bar{x} als Mittelwert der Messwerte. Der BIAS sollte unter 15% und im Bereich x_{BG} unter 20% liegen:

$$(4.1) \quad BIAS[\%] = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100\%$$

Die Wiederholpräzision RSD_r [%] gibt die Präzision eines Kontrollmaterials an, das unter Wiederholbedingungen mit derselben Methode im selben Labor von derselben Person mit denselben Gerätschaften erhalten wurde. Die Berechnung erfolgt nach der Formel (4.2):

$$(4.2) \quad RSD_r[\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$$(4.3) \quad s_r^2 = \frac{\sum_{t=1}^{N_t} \sum_{r=1}^{N_r} (x_{r,t} - \bar{x})^2}{N_r \cdot (N_t - 1)}$$

Hierbei stehen die Indices N_r für die Anzahl der Tage und N_t die Anzahl der Messungen eines Tages.

Zur Bestimmung der tagesverschiedenen Laborpräzision RSD_t [%] wird der Faktor Tag variiert. Die Berechnung erfolgt nach der Formel (4.4).

$$(4.4) \quad RSD_t[\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$$(4.5) \quad s_t^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_t} (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{N_t - 1} - \frac{s_r^2}{N_r}$$

RSD_t und RSD_r sollten unter 15% und im Bereich x_{BG} unter 20% liegen.

Zusätzlich zu den oben genannten separaten Akzeptanzkriterien für BIAS und Präzision sollte die Genauigkeit (Kombination BIAS und Präzision), ausgedrückt als sogenanntes 95% β -Toleranzintervall $\pm Lu$ [%], vollständig innerhalb eines Akzeptanzintervalls von $\pm 30\%$ liegen ($\pm 40\%$ nahe x_{BG}). Die Berechnung erfolgt nach der Formel (4.6) [95].

$$(4.6) \quad \pm Lu[\%] = BIAS[\%] \pm t_{f;0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{N_r \cdot N_t \cdot B}} \cdot RSD_t[\%]$$

$$(4.7) \quad B = \sqrt{\frac{\frac{s_t^2}{s_r^2} + 1}{N_t \cdot \frac{s_t^2}{s_r^2} + 1}}$$

$$(4.8) \quad f = \frac{\left(\frac{s_t^2}{s_r^2} + 1\right)^2}{\left(\frac{s_t^2}{s_r^2} + (1/N_t)\right)^2 / (N_r - 1) + (1 - (1/N_t)) / (N_t \cdot N_r)}$$

2.2.3. Klinische Studie

2.2.3.1. Studiendesign und Ethik

Um die Vergleichbarkeit der Methoden zu untersuchen, wurde eine klinische Studie bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck beantragt und genehmigt (Nr. 09-057). Bei der Studie handelte es sich um eine monozentrische Äquivalenzstudie. Der Prüfplan, die Probandeninformation und die Einverständniserklärungen (siehe Anhang) wurden gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki 2008 erstellt [97].

In die Studie sollten nierentransplantierte Patienten einbezogen werden, die mit Cyc oder Tac im interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, behandelt wurden. Für jede Behandlungsform wurde eine Gruppe gebildet, in die mindestens 31 Patienten einbezogen werden sollten. Diese Patienten sollten an 3 bis 5 Tagen innerhalb von 2 Wochen bei gleichbleibender medikamentöser Therapie sowohl Kapillarblut auf einem Filterpapier als auch venöses Blut entnommen werden. Es fanden jeweils zwei Blutentnahmen durch das medizinische Personal statt. Die erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (C_0 -Spiegel). Eine zweite Blutentnahme fand 2 h nach der Medikamenteneinnahme (C_2 -Spiegel) statt. Bei allen Proben wurden die Cyc- und Tac-Konzentrationen aus EDTA-Blut mittels CMIA und LCMS bestimmt. Die Bestimmung mittels CMIA wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt. Aus den DBS wurden die Konzentrationen mit der entwickelten LCMS-Methode gemessen. Die Analyse des EDTA-Bluts und des Kapillarblutes mittels LCMS wurde im MVZ Dr. Kramer und Kollegen durchgeführt. Zusätzlich zu der ersten Blutentnahme für die Medikamentenspiegel wurde eine venöse Probe zur Kreatininbestimmung im Rahmen der Routinediagnostik des Transplantationszentrums abgenommen. In einem anonymisierten Patientenbogen wurden die Vitalparameter (Blutdruck, Puls), Körpergewicht, Co-Medikationen und Angaben über mögliche Nebenwirkungen festgehalten.

2.2.3.2. Kriterien zur Intervention

Im Rahmen der Studie waren keine studienbedingten weiterführenden Interventionen zu erwarten. Die venöse Blutentnahme zur Bestimmung der Immun-

suppressivaspiegel und des Kreatinins erfolgte unabhängig von der Studie im Rahmen der Routinediagnostik des Transplantationszentrums. Zusätzlich erfolgte nach ärztlicher Aufklärung und Einwilligung des Patienten die nahezu schmerzlose und nicht mit Nebenwirkungen verbundene Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere nach ausreichender Hautdesinfektion.

2.2.3.3. Studienteilnehmer

Einschlusskriterien

In die Studie sollten nierentransplantierte Patienten einbezogen werden, die mit Cyc oder Tac im Interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck behandelt wurden. Die Behandlung der Patienten mit dem Immunsuppressivum sollte sich im *steady state* mit relativ stabilen Blutspiegeln befinden. Es wurden nur volljährige Patienten, die selbstständig ihr Einverständnis geben konnten, eingeschlossen.

Ausschlusskriterien

Ein Wechsel des Immunsuppressivums aus klinischen Gründen während der Studienphase wurde als Ausschlusskriterium definiert.

2.2.3.4. Fallzahlberechnung

Die Planung und Teile der Auswertung der Studie erfolgten mit fachlicher Beratung durch Herrn Dr. rer. pol. Reinhard Vonthein, Institut für Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck.

Zur Schätzung der Fallzahl wurden die Variationskoeffizienten der Referenzmethoden mit 5% und die der Kapillarblutbestimmung mittels LCMS mit 10% herangezogen. Für die Studienplanung wurde angenommen, dass die Konzentrationen der Immunsuppressiva für beide Messzeitpunkte und Blutentnahmearten Normalverteilt sind.

Mit 31 Werten liegt das Verhältnis von oberer Konfidenzintervallgrenze zur Punktschätzung des Verhältnisses der Standardabweichungen mit einer Güte von 80% zwischen der Wurzel aus 2 und der Wurzel aus 3. Die Abschätzung stellt eine untere Grenze dar, so dass im Fall von fehlenden Werten mehr Messungen und

Patienten einbezogen werden müssen. Eine detaillierte Beschreibung der tatsächlich in der Studie einbezogenen Anzahl von Patienten unter Berücksichtigung der Gruppen erfolgt im Zusammenhang mit der Auswertung der Studienergebnisse (siehe 3.3).

2.2.3.5. Auswertungsplan

Ziel war der Nachweis der Äquivalenz der Analysenmethoden. Hierzu sollte das 95%-Konfidenzintervall für die MW-Differenz der Werte im Bereich $\log(95\%)$ bis $\log(105\%)$ liegen. Als Grundlage für die Auswertung wurde die DIN 53804 für statistische Auswertung paarweise verbundener Stichproben herangezogen [98].

Nur Messungen zum gleichen Zeitpunkt am gleichen Tag und Patienten wurden zur Äquivalenzanalyse herangezogen. Nur Patienten mit mindestens 12 Messwerten (3 Tage x 2 Zeitpunkte x 2 Analysen) wurden in die statistische Auswertung nach DIN 53804 einbezogen. Die geplanten aber nicht ausgewerteten Messungen und Patienten wurden dokumentiert. In Untergruppenanalysen wurden die verschiedenen zum Einsatz gelangten Immunsuppressiva und Messzeitpunkte getrennt betrachtet (Tab. 7).

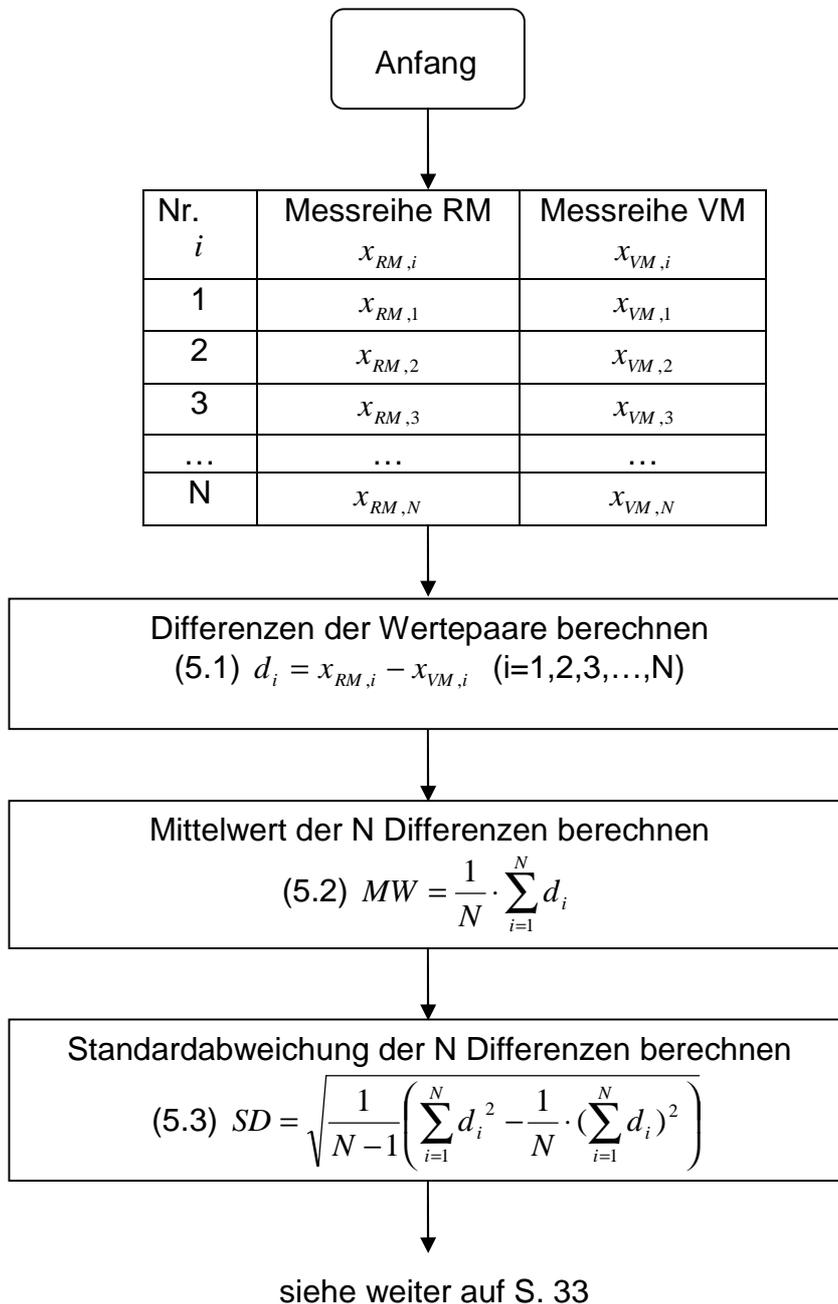
Es erfolgte eine Analyse der Daten im Normal Plot, Bland-Altman Plot und einer Passing-Bablok Regression. Hierbei wurden die Medikationen, Methoden und Messzeitpunkte unabhängig untersucht.

Tabelle 7: Codierung der Studiengruppen nach Medikation, Entnahmezeitpunkt, Versuchsmethode und Referenzmethode

Ebene:	0	1	2		
VM:			IC	DBS	DBS
RM:			LCMS venös	LCMS venös	IC
Bezeichnung	Cyc	Cyc-C ₀	Cyc-IC ₀	Cyc-DBS ₀	Cyc-ICDBS ₀
		Cyc-C ₂	Cyc-IC ₂	Cyc-DBS ₂	Cyc-ICDBS ₂
	Tac	Tac-C ₀	Tac-IC ₀	Tac-DBS ₀	Tac-ICDBS ₀
		Tac-C ₂	Tac-IC ₂	Tac-DBS ₂	Tac-ICDBS ₂

2.2.3.6. Auswertung der Studiendaten nach DIN 53804

Die Auswertung der Studiendaten nach DIN 53804 erfolgte entsprechend nachfolgendem Flussdiagramm (Abb. 6). Die mathematischen Grundlagen sind in dem Flussdiagramm enthalten [98].



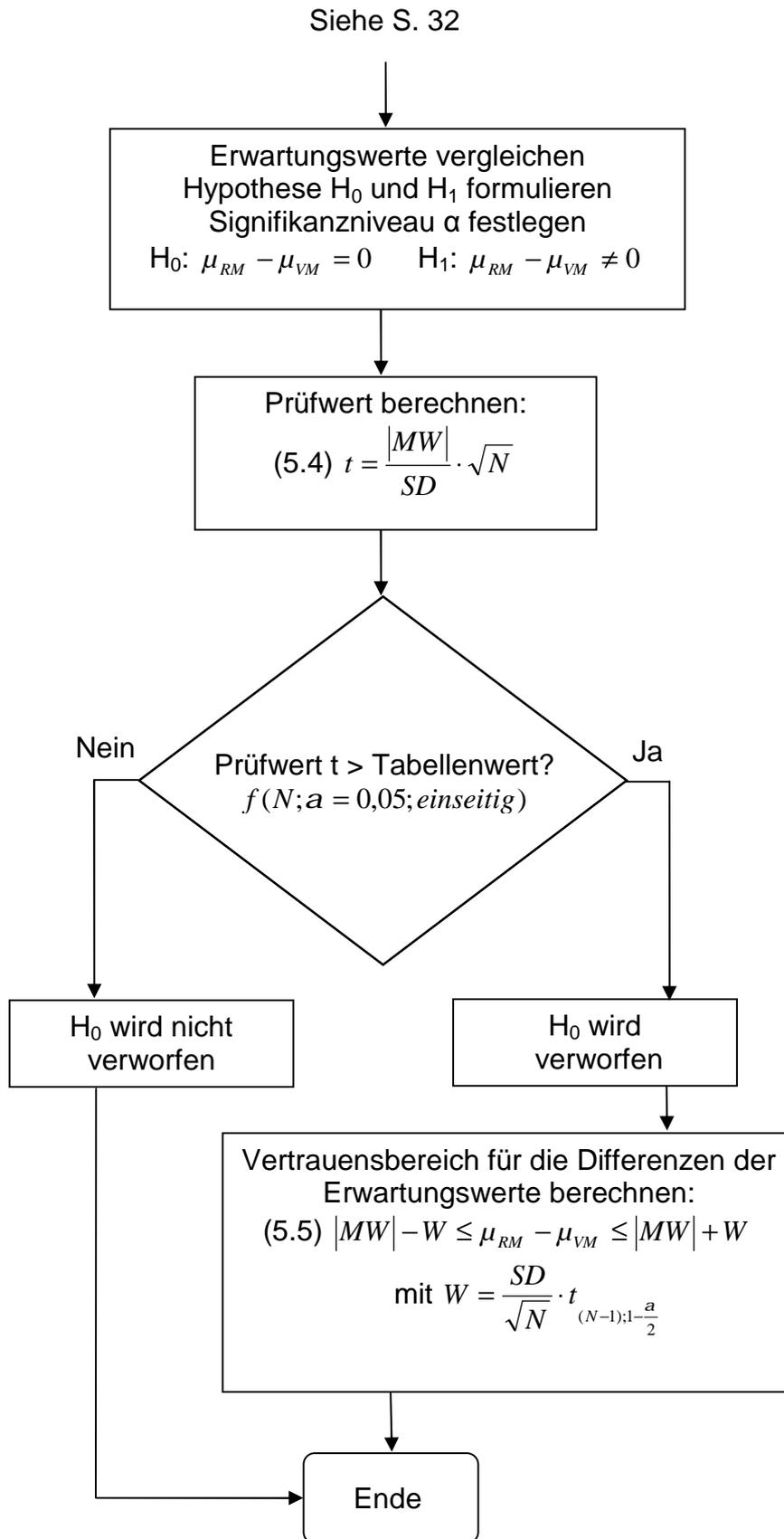


Abbildung 6 (S.32/33): Schematische Darstellung der Auswertung der Studienergebnisse nach DIN 53804

2.2.3.7. Bland-Altman Plot

Zur graphischen Auswertung wurden Bland-Altman Plots erstellt. In der Darstellung wird auf der X-Achse der MW eines Wertepaars der Referenz- und Vergleichsmethode abgebildet. Die Y-Achse zeigt die Differenz des Wertepaars [99]. Aus den berechneten Differenzen einer Studiengruppe wurde der MW und die SD ermittelt. In dem Diagramm wird der MW und ein Kontrollbereich des $\pm 1,96$ fachen SD dargestellt .

$$(6.1) \quad d_{\log i} = x_{RM,i} - x_{VM,i} \quad (i=1,2,3,\dots,n)$$

$$(6.2) \quad MW_i = 0,5 \cdot (x_{RM,i} + x_{VM,i}) \quad (i=1,2,3,\dots,n)$$

Die Berechnung des MW und SD erfolgte nach den Formeln (5.2) und (5.3). Die Berechnung des Kontrollbereichs erfolgte dann entsprechend nachfolgender Formel:

$$(6.3) \quad k_{O/U} = MW \pm 1,96 \cdot SD$$

Die Analyse eines Methodenvergleichs mittels Bland-Altman Plot ist der Auswertung mit einer linearen Regression und dem Korrelationskoeffizienten überlegen und in klinischen Studien etabliert [100].

2.2.3.8. Normierung mit dem Hämatokrit

Zur Normierung der Messwerte der LCMS-Analyse aus DBS wurde ein Faktor F_{Hk} aus dem Quotient der Hämatokritwerte der venösen Blutprobe des Patienten (Hk_i) und des Kalibrators (Hk_k) berechnet und mit den Messwerten der LCMS aus den DBS multipliziert:

$$(6.4) \quad F_{Hk} = \frac{Hk_i}{Hk_k}$$

$$(6.5) \quad Hk_k = \frac{\text{Fläche}_k - \text{Achsenabschnitt}(a)}{\text{Steigung}(b)}$$

2.2.3.9. Näherungsformel zur Berechnung der Kreatinin-Clearance

Zur Berechnung der Kreatinin-Clearance wurden die Näherungsformel nach Cockcroft-Gault (Cl_{CG}) und die MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) - Formel ($eGFR$) verwendet. In die Berechnung fließen Alter (A) in Jahren, Gewicht (G) in kg, Serumkreatinin (S_{Cr}) in mg/dl und das Geschlecht ein [101].

$$(7.1) \quad Cl_{CG} = \frac{(140 - A) \cdot G}{72 \cdot S_{Cr} \cdot 0,0113} \quad \text{Geschlecht männlich}$$

$$(7.2) \quad Cl_{CG} = \frac{(140 - A) \cdot G}{72 \cdot S_{Cr} \cdot 0,0113} \cdot 0,85 \quad \text{Geschlecht weiblich}$$

$$(7.3) \quad eGFR = 186 \cdot S_{Cr}^{-1,154} \cdot A^{-0,203} \quad \text{Geschlecht männlich}$$

$$(7.4) \quad eGFR = 186 \cdot S_{Cr}^{-1,154} \cdot A^{-0,203} \cdot 0,742 \quad \text{Geschlecht weiblich}$$

Die Cl_{CG} wird in ml/min angegeben. Die $eGFR$ wird in der Einheit ml/min/1,73m² dargestellt. Die MDRD-Formel kann nur bis zu glomerulären Filtrationsraten von 60 ml/min verwendet werden.

2.2.3.10. Klassifizierung der Nierenfunktion

Zur Klassifizierung der Nierenfunktionsleistung wurde die Empfehlung der Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) zu Grunde gelegt (Tab. 8). Hierbei wird der Grad der Nierenschädigung an Hand der Kreatinin-Clearance beurteilt [101].

Tabelle 8: Stadien der chronischen Nierenerkrankungen gemäß KDOQI (engl. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)

Einteilung	Clearance [ml/min]	Bewertung
Stadium I	> 90	normale oder erhöhte GFR
Stadium II	60 - 89	geringgradiger Funktionsverlust
Stadium III	30 – 59	mittelgradiger Funktionsverlust
Stadium IV	15 – 29	schwerer Funktionsverlust
Stadium V	<15	terminales Nierenversagen

2.2.4. Berechnung pharmakokinetischer Daten

Zur Beurteilung der Elimination wurde zunächst das Verhältnis Q_c von C_0 - zu C_2 - Spiegel berechnet.

$$(8.1) \quad Q_c = \frac{C_0}{C_2}$$

Zur Berechnung der Eliminationshalbwertszeit (t_{elim}) können die Konzentrationen zu den Entnahmezeitpunkten C_0 und C_2 herangezogen werden. Für ein Ein-Kompartiment-Modell gelten folgende Gleichungen mit Δt als Zeitintervall und k_e als Eliminationskonstante [102]:

$$(8.2) \quad C_{(t)} = C_{(0)} \cdot e^{-k_e \cdot \Delta t}$$

$$(8.3) \quad t_{elim} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

Durch Umformung der Gleichung 8.2 und Einsetzen der Gleichung 8.3 in Gleichung 8.2 ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der Eliminationshalbwertszeit t_{elim} . Hierbei wird der C_2 -Spiegel gleich $C_{(0)}$ und der C_0 -Spiegel gleich $C_{(t)}$ gesetzt. Das Dosierungsintervall beträgt 12 h. Somit ist Δt gleich 12 h – 2 h = 10 h.

$$(8.4) \quad t_{elim} = \frac{\ln 2 \cdot \Delta t}{\ln C_{(0)} - \ln C_{(t)}} \quad \text{mit } C_{(t)} = C_0 \text{ und } C_{(0)} = C_2$$

Zur Berechnung der relativen Dosis D_{rel} zum Körpergewicht wurde ein Quotient aus der absoluten Dosis D_{abs} und dem Körpergewicht M gebildet:

$$(8.5) \quad D_{rel} = \frac{D_{abs}}{M}$$

Aus D_{rel} und der gemessenen Konzentration wurde der Quotient Q_{DC} gebildet.

$$(8.6) \quad Q_{DC} = \frac{C_i}{D_{rel}}$$

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der quantitativen Bestimmung von Cyclosporin A und Tacrolimus aus Tockenblutproben mittels LCMS

3.1.1. Zusammensetzung des Extraktionsmittels

Zunächst wurde eine Optimierung des Extraktionsmittels durchgeführt. Es wurden Lösemittel ausgewählt in denen Tac und Cyc löslich sind. Hierzu zählen Methanol (MeOH), Acetonitril (AcCN), Ethanol (EtOH) und 2-Propanol (PropOH). Darüber hinaus wurde *Aqua bidest.* (H₂O) und ein Zusatz von 0,2 M ZnSO₄ in das Experiment mit einbezogen. Zusätzlich zu den reinen Lösemitteln wurden folgende Lösemittelgemische untersucht: Methanol / H₂O 50 Vol.-%, Methanol / H₂O 75 Vol.-%, Acetonitril / H₂O 50 Vol.-%, Ethanol / H₂O 50 Vol.-%, 2-Propanol / H₂O 50 Vol.-% und Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄.

Zur Extraktion wurden 50 µl des Vollblutkalibrators Level 5 auf das Filterpapier aufgetragen und für 2 h getrocknet. Aus der Filterpapierkarte wurde ein 10 mm großer DBS ausgestanzt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion dienten jeweils 250 µl der vorbereiteten Extraktionslösungen. Die Proben wurden anschließend gevortext, 20 min bei 40°C in einem Thermomixer geschüttelt und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Extrakte wurden dann optisch auf den Anteil extrahierter Matrixbestandteile geprüft und anschließend mittels LCMS quantitativ analysiert. Für jedes Extraktionsmittel erfolgte eine Doppelbestimmung.

Zum Teil ergaben sich für die Extraktionsmittel nach optischer Beurteilung starke Matrixbelastungen. Bei zwei Extrakten konnte auf Grund der hohen Matrixbelastung keine Messung mittels LCMS durchgeführt werden. Die Extraktionsausbeuten wurden anhand der Peakflächen der Analyten bestimmt und ein Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Die relative Extraktionsausbeute wurde auf die maximale mittlere Ausbeute jedes Analyten bezogen. Die maximale Extraktionsausbeute für Tac und Cyc konnte für Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄ ermittelt werden. In diesen Extrakten ergab sich zusätzlich eine geringe optische Matrixbelastung. Die Extraktionsausbeuten der anderen Lösemittel und Gemische lagen zwischen 0 und 71% (Abb. 7). Hierfür kann sowohl die Löslichkeit der Analyten als auch der Einfluss der extrahierten Matrix auf die Ionisierung in der LCMS verantwortlich gemacht werden. Für weitere Optimierungsversuche

wurde somit das Extraktionsmittel Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄ verwendet.

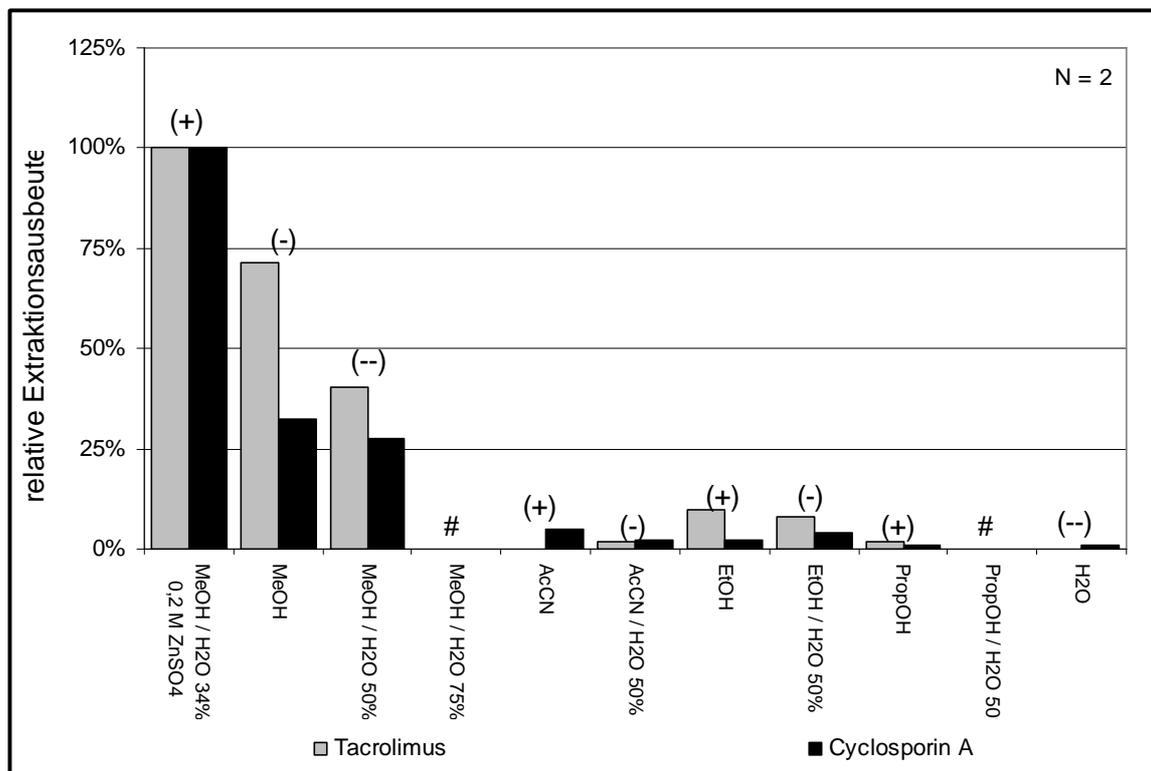


Abbildung 7: Optimierung des Extraktionsmittels anhand von DBS eines kommerziellen Kalibrators mit 20,5 ng/ml Tacrolimus und 472 ng/ml Cyclosporin A. Die relative Extraktionsausbeute ist bezogen auf die Peakflächen des Lösemittels Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen (+) – keine optische Matrixbelastung; (-) – geringe optische Matrixbelastung; (--) – starke Matrixbelastung, Extrakte noch messbar; # - starke Matrixbelastung, Extrakte nicht mehr messbar.

3.1.1.1. Größe und Eigenschaft der ausgestanzten Trockenblutprobe und Volumen des Extraktionsmittels

Im Rahmen der Optimierung wurden unterschiedlich große DBS untersucht. Hierzu dienten zwei Stanzen mit einem Durchmesser von 10 mm bzw. 5 mm. Es wurden 5 Ansätze in Doppelbestimmung für die LCMS-Analyse aufgearbeitet. Bei zwei Ansätzen wurde der 10 mm DBS mit einer Fläche von 78,5 mm² mit 250 µl (entsprechend 0,314 mm²/µl) und 500 µl der Extraktionslösung versetzt (entsprechend 0,157 mm²/µl). Bei zwei Ansätzen wurden 5 mm DBS mit einer Fläche von 19,6 mm² mit 250 µl (entsprechend 0,079 mm²/µl) und 150 µl (entsprechend 0,131 mm²/µl) versetzt. In einem Versuchsansatz wurden drei 5

mm DBS mit einer Gesamtfläche von 58,9 mm² mit 250 µl (entsprechend 0,236 mm²/µl) der Extraktionslösung aufgearbeitet (Abb. 8).

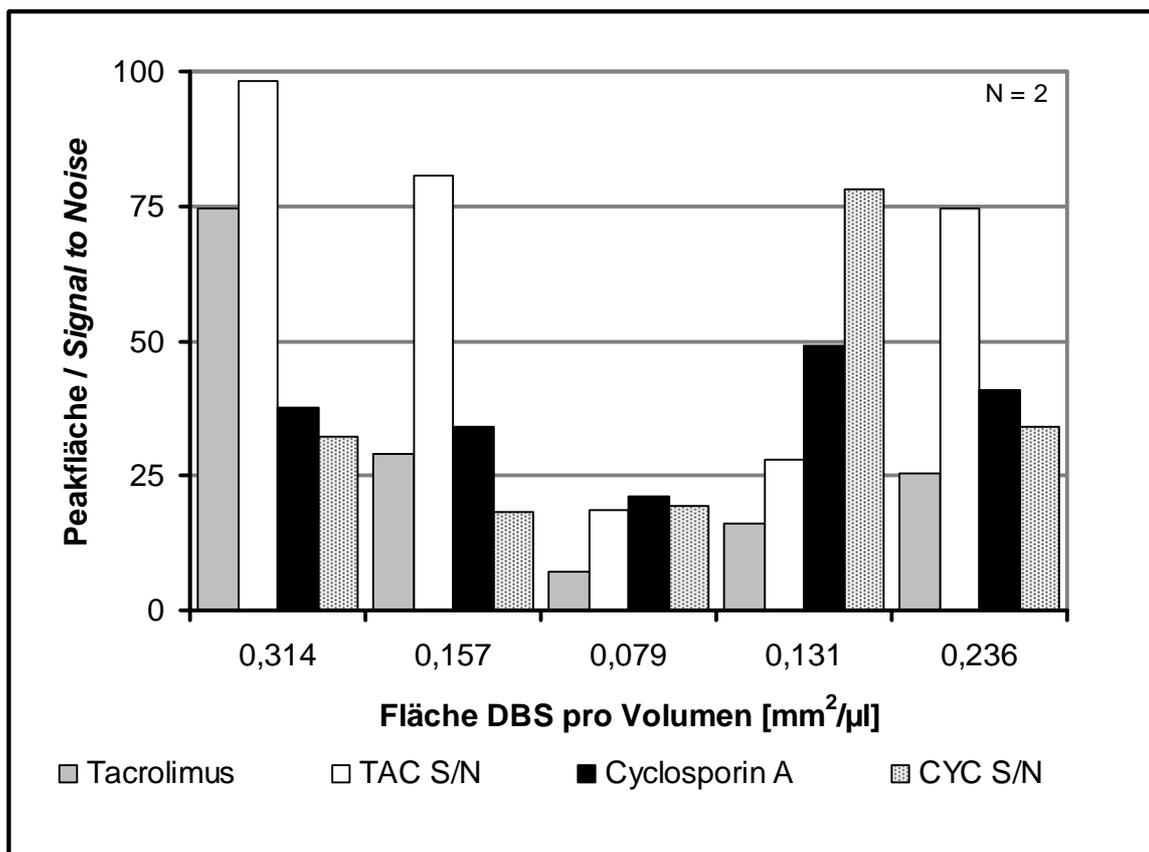


Abbildung 8: Abhängigkeit der Peakfläche der Analyten Tacrolimus und Cyclosporin A und des *Signal to Noise* von der Größe des ausgestanzten DBS und des Volumens des Extraktionsmittels. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen

Der Versuchsansatz mit dem 10 mm DBS in 250 µl (entsprechend 0,314 mm²/µl) Extraktionslösung ergab die größte Peakfläche und das beste *Signal to Noise* Verhältnis (S/N) für Tac. Die Streuung der Peakflächen für Cyc war geringer. Für Cyc konnten die höchsten Flächen und *Signal to Noise* Werte für den Ansatz mit 5 mm DBS in 150 µl Extraktionslösung erzielt werden (entsprechend 0,131 mm²/µl). Die Handhabung der 10 mm Spots war praktikabler als die der 5 mm Spots. Das Volumen des Extraktionsmittels musste so gewählt sein, dass eine ausreichende Befüllung der 96-Well-Plats für die LCMS-Analyse gegeben war. Für Tac sind die Anforderungen an die Empfindlichkeit höher als für Cyc. Somit war der Ansatz mit einem 10 mm DBS in 250 µl Extraktionsmittel der beste Kompromiss.

Ein Einflußfaktor auf die Beschaffenheit des DBS ist der Hämatokrit (Hk) der Blutprobe. Zur Untersuchung dieses Faktors wurden 50 µl von 5 Proben mit einem Hk zwischen 0,22 und 0,54 l/l in Doppelbestimmung auf das Filterpapier aufgetragen. Nach 2 h Trocknung bei Raumtemperatur wurde die Fläche aus dem Mittelwert des vertikalen und horizontalen Durchmessers des Spots berechnet.

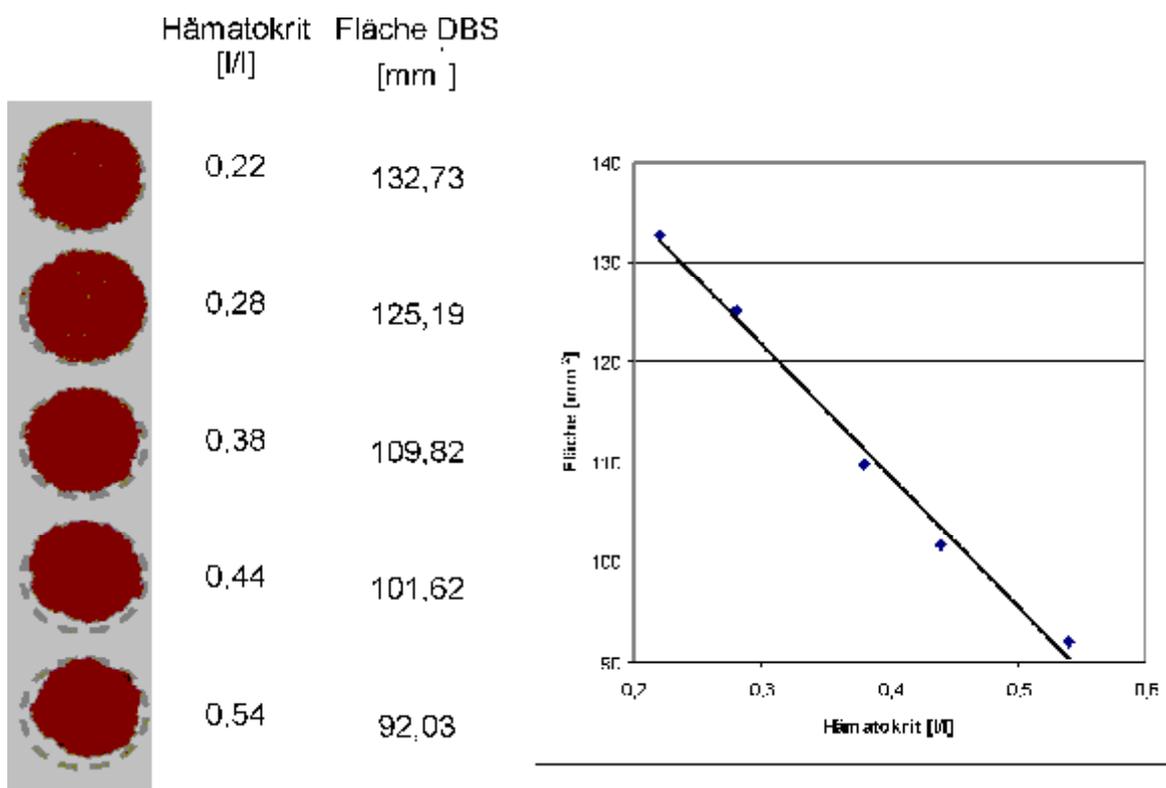


Abbildung 9: Abhängigkeit der Fläche des DBS auf der Filterkarte vom Hämatokrit.

Die Fläche verhielt sich antiproportional zum Hk. Bei einer Fläche 92,03 bis 132,73 mm² ergab sich ein Variationskoeffizient von 18% (Abb. 9). Nach linearer Regression ergab sich die Geradengleichung wie folgt:

$$y = -130,93 \cdot x + 160,99 \quad r=0,9918$$

Aus dieser Gleichung ergab sich für die lyophilisierten Kalibratoren und Kontrollen bei einem Durchmesser des Spots von 12 mm ein theoretischer Hämatokrit Hk_k von 0,37 l/l.

Die Homogenität des DBS kann durch die Affinität von Analyt und Matrix zu dem Filterpapier beeinflusst werden. Bei einer hohen Affinität der Analyten zum Filterpapier kann ein Effekt wie in der Dünnschichtchromatographie auftreten. Dieser Effekt ist an Hand von schwarzen und grünen Farbpunkten von Permanentmarkerfilzstiften, die mit Ethylacetat auf dem Filterpapier eluiert wurden, visualisiert (Abb. 10). Hierbei zeigte sich, dass sich der schwarze Farbpunkt nur zu einem geringen Teil über den Spot verteilt hat. Bei Grün könnte eine Trennung von Gelb und Blau beobachtet werden. Dieser Effekt ist ebenfalls bei der Verteilung von Cyc und Tac auf dem Filterpapier zu erwarten.



Abbildung 10: Einfluss der Affinität von Substanzen auf die Homogenität des DBS

3.1.2. Dauer der Extraktion

Bei der Ermittlung der optimalen Extraktionszeit wurden DBS des Vollblutkalibrators Level 5 verwendet. Diese wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 250 µl Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄ versetzt. Das Extraktionsmittel enthielt als IS Ascomycin in einer Konzentration von 80 ng/ml und Cyclosporin D in einer Konzentration von 500 ng/ml. Die Proben wurden anschließend gevortext und für 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min bei 40°C auf einem Thermomixer extrahiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm wurden die

Extrakte umgehend in eine Mikrotiterplatte zur Messung mittels LCMS überführt. Für jede Extraktionszeit erfolgte eine Doppelbestimmung.

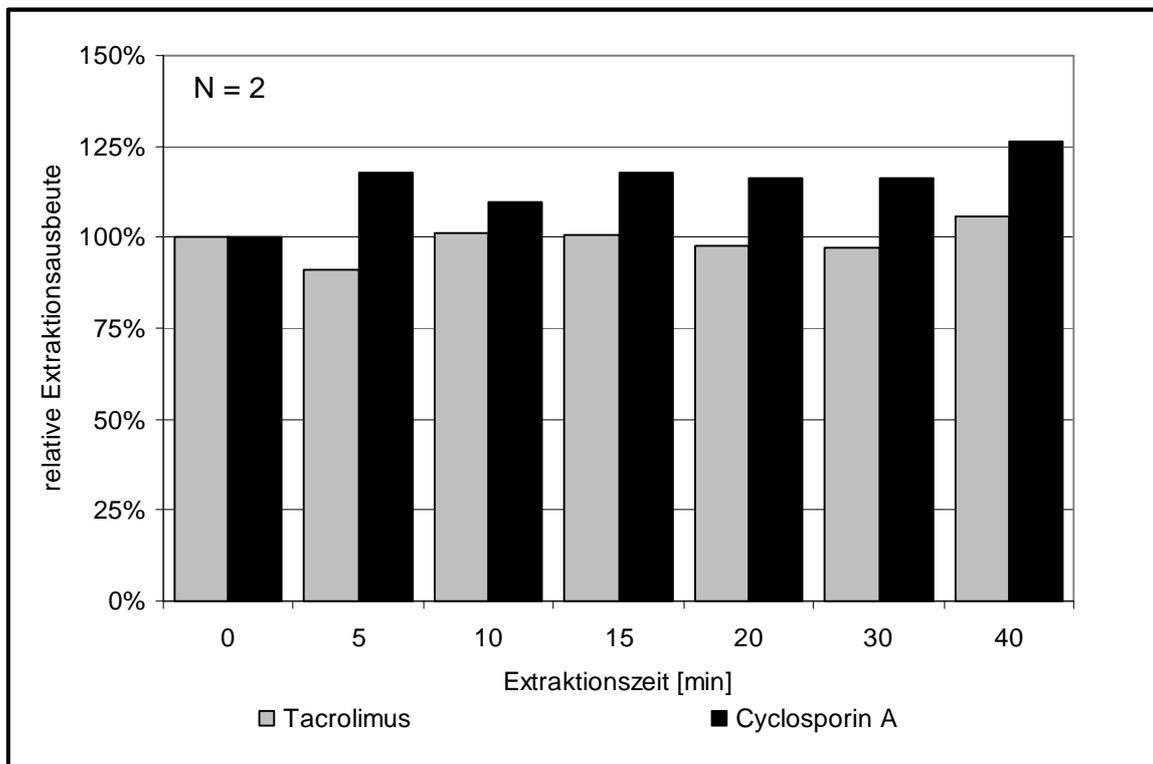


Abbildung 11: Optimierung der Extraktionszeit anhand von DBS eines kommerziellen Vollblutkalibrators mit 20,5 ng/ml Tacrolimus und 472 ng/ml Cyclosporin A. Die relative Extraktionsausbeute ist bezogen auf das Peakflächenverhältnis Analyt/IS zur Extraktionszeit 0 min. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 2 unabhängigen Versuchen.

Zur Ermittlung der relativen Extraktionsausbeute wurden die Peakflächen der Analyten und der ISs ausgewertet und ins Verhältnis gesetzt. Aus den Doppelbestimmungen wurde der MW berechnet. Die so ermittelte absolute Extraktionsausbeute wurde auf den Messzeitpunkt 0 min normiert und in Prozent angegeben (Abb. 11). Die relativen Extraktionsausbeuten lagen für Tac zwischen 91 und 106%. Für Cyc konnten entsprechende Ausbeuten zwischen 100 und 126% ermittelt werden. Bei keiner Probe wurde eine auffällige optische Matrixbelastungen festgestellt. Der Einfluss der Extraktionszeit zeigte sich als relativ gering. Somit wurde für die verwendete Methode eine Extraktionszeit von 20 min verwendet, um eine optimale Extraktion für beide Analyten bei einem vertretbaren Zeitaufwand für die Probenaufarbeitung zu gewährleisten.

3.1.3. Extraktionstemperatur

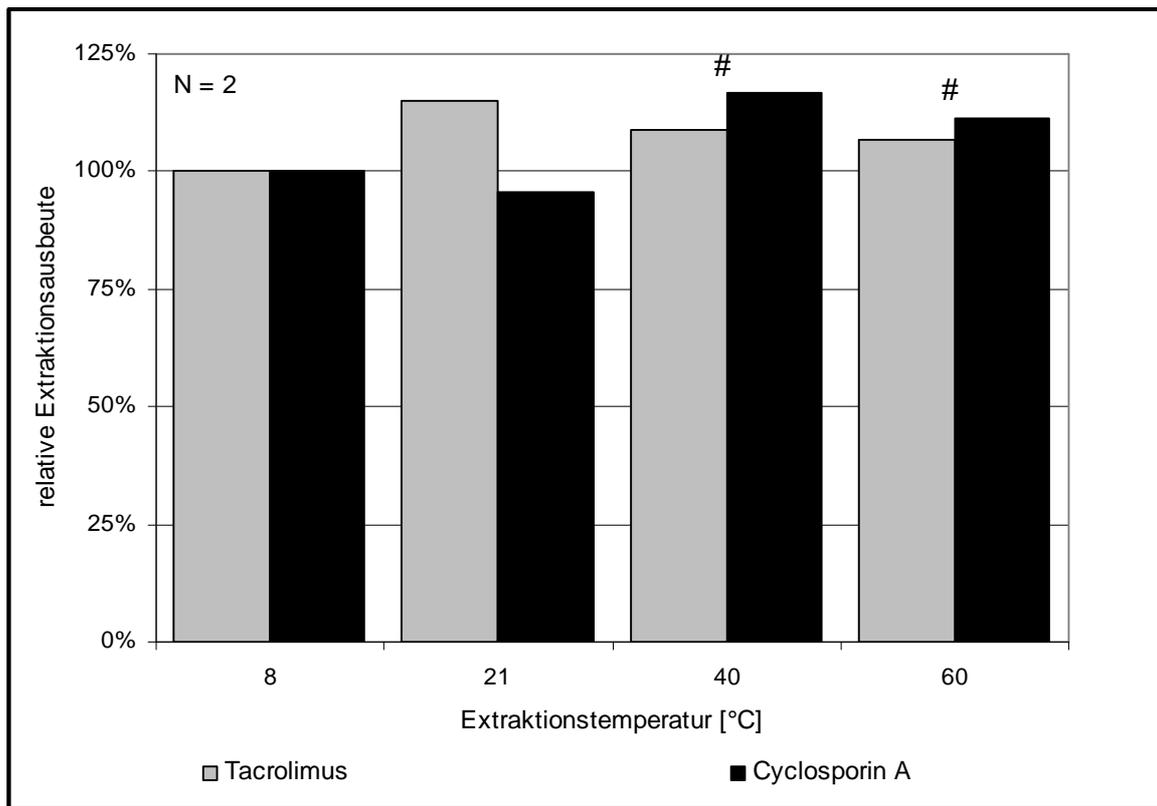


Abbildung 12: Optimierung der Extraktionstemperatur anhand von DBS eines kommerziellen Vollblutkalibrators mit 20,5 ng/ml Tacrolimus und 472 ng/ml Cyclosporin A. Die relative Extraktionsausbeute ist bezogen auf das Peakflächenverhältnis Analyt/IS bei einer Extraktionstemperatur von 8°C. # - Extraktion unter kontinuierlicher Durchmischung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 2 unabhängigen Versuchen.

Bei der Bestimmung der optimalen Extraktionstemperatur wurden DBS des Vollblutkalibrators Level 5 verwendet. Zur Extraktion wurden 250 µl Methanol / H₂O 34 Vol.-% mit 0,2 M ZnSO₄ mit den ISs Cyclosporin D in einer Konzentration von 500 ng/ml und Ascomycin mit einer Konzentration von 80 ng/ml verwendet. Nach Zugabe des Extraktionsmittels wurden die Proben auf einem Vortexer gemischt und bei 8, 21, 40 und 60 °C inkubiert. Die Inkubation bei 40 und 60°C fand auf einem Thermomixer statt. Bei 8 und 21°C wurden die Proben aus technischen Gründen nicht geschüttelt. Zu jeder Temperatur wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 20 minütiger Inkubation wurden die Proben 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und umgehend in die Mikrotiterplatten zur Messung mittels LCMS überführt.

Die Ermittlung der relativen Extraktionsausbeute erfolgte in der gleichen Vorgehensweise wie bei der Optimierung der Extraktionszeit. Die Normierung fand auf die Mittelwerte der Analysen bei 8°C statt. Für Tac ergaben sich relative Extraktionsausbeuten zwischen 100 und 115%. Bei Cyc lagen die Werte zwischen 96 und 117% (Abb. 12). Der Einfluss der Extraktionstemperatur auf die relative Extraktionsausbeute war somit relativ gering. Bei 40°C und kontinuierlicher Durchmischung zeigten sich für beide Analyten hohe Ausbeuten. Eine Erhöhung der Temperatur auf 60°C führte zu keiner weiteren Verbesserung der Extraktionsausbeute.

3.2. Validation der LCMS-Analyse zur quantitativen Bestimmung von Cyclosporin A und Tacrolimus aus Trockenblutproben

3.2.1. Prüfung auf Linearität

Zur Prüfung auf Linearität der Methode wurden mehrere Proben mit Konzentrationen über den Kalibrationsbereich gemessen. Hierfür wurden neben den Kalibratoren L2 bis L6 einige Verdünnungen der Kalibratoren mittels einer kommerziellen Negativprobe untersucht. Die Konzentrationen für Tac lagen zwischen 1,34 und 39,7 ng/ml. Der Konzentrationsbereich für Cyc lag zwischen 24,9 und 1345 ng/ml. Jeweils 50 µl der homogenisierten Kalibratoren und deren Verdünnungen wurden auf das Filterpapier aufgetragen und für 2 h getrocknet. Die Probenvorbereitung wurde im Weiteren gemäß der beschriebenen Methode für DBS durchgeführt.

Nach der LCMS-Analyse erfolgte die Prüfung auf Linearität nach Mandel an Hand der beschriebenen Formeln (siehe 2.2.2.7). Die Berechnung erfolgte in dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2003. Die Berechnungen wurden an Hand von Rechenbeispielen aus der Literatur validiert [92].

Tabelle 9: Daten zur Prüfung auf Linearität nach Mandel.

	Cyclosporin A	Tacrolimus
N	22	23
<i>Kalibration 1. Ordnung</i>		
Achsenabschnitt a	0,04881	$-5,68 \cdot 10^{-6}$
Steigung b	0,00034	0,00014
Korrelationskoeffizient r	0,99795	0,99911
<i>Kalibration 2. Ordnung</i>		
Achsenabschnitt a	0,04548	$-3,467 \cdot 10^{-5}$
Steigung b	0,00037	0,00015
Steigung c	$-2,8149 \cdot 10^{-8}$	$-1,7432 \cdot 10^{-7}$
Reststandardabweichung s_{y_1}	0,0085222	$7,5032 \cdot 10^{-5}$
Reststandardabweichung s_{y_2}	0,0786345	$7,29163 \cdot 10^{-5}$
Varianz der Differenzen DS^2	0,0002777	$1,118899 \cdot 10^{-8}$
Prüfwert PW	4,49	2,23
Tabellenwert f (f1=1,f2=N-3,P=99%)	8,18	8,10

Für beide Analyten konnte ein Prüfwert PW niedriger als der Tabellenwert f nachgewiesen werden. Somit konnte für Tac ein linearer Bereich von 1,34 bis 39,7 ng/ml und für Cyc von 24,9 bis 1345 ng/ml belegt werden. Damit ist die Methode über den gesamten Kalibrationsbereich linear, da die Kalibrierfunktion 2. Ordnung keine signifikant bessere Anpassung ergab [92].

3.2.2. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Zur Bestimmung der Grenzwerte mit der Kalibriergeradenfunktion nach DIN 32645 wurden die kommerziellen Vollblutkalibratoren L1 bis L6 mit einer Negativprobe verdünnt, so dass ausreichend Messpunkte im Bereich der zu erwartenden Nachweisgrenze x_{NWG} zur Verfügung standen. Diese Proben wurden homogenisiert, auf das Filterpapier aufgetragen und entsprechend der entwickelten Methode zur Analyse in der LCMS aufgearbeitet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Office Excel 2003 (Tab. 10). Die Berechnungen wurden an Hand von Rechenbeispielen aus der Literatur validiert [92].

Tabelle 10: Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645

	Cyclosporin A	Tacrolimus
N	8	8
Achsenabschnitt a	0,048117	$-3,27 \cdot 10^{-5}$
Steigung b	0,00033	0,00015
Reststandardabweichung s_{y_1}	0,00074	0,00002
kritischer Wert y_c	0,05087	$4,21 \cdot 10^{-5}$
Nachweisgrenze x_{NWG}	8,21	0,49
Erfassungsgrenze x_{EG}	16,42	0,98
Bestimmungsgrenze x_{BG}	27,33	1,63

Die berechneten Werte für x_{NWG} und x_{BG} liegen sowohl unterhalb der therapeutischen Bereiche wie auch der unteren Qualitätskontrolle mit 62,5 ng/ml für Cyc und 3,28 ng/ml für Tac.

3.2.3. Genauigkeit

Zur Bestimmung der Genauigkeit der Methode wurden die 3 Level der Qualitätskontrollen an mindestens 8 Tagen in Doppelbestimmung analysiert. Für jede Kontrolle wurden Berechnungen für den MW, BIAS, RSD_t , RSD_r und das β -Toleranzintervall $\pm Lu$ durchgeführt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Die Berechnungen wurden an Hand von Rechenbeispielen aus der Literatur validiert [92]. Darüber hinaus erfolgte eine Bewertung in Anlehnung an die Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh).

Tabelle 11: Untersuchung der Genauigkeit der Bestimmung von Cyclosporin A und Tacrolimus an Hand von Wiederholbestimmungen von 3 kommerziellen Qualitätskontrollen an mehreren Tagen. Fortsetzung S. 48

Level 1	Cyclosporin A	Tacrolimus	Bewertung
Sollwert	62,5 ng/ml	3,28 ng/ml	
Mittelwert \bar{x}	63,73 ng/ml	3,30 ng/ml	
Richtigkeit BIAS	1,97%	0,61%	<20%
Laborpräzision RSD_t	9,58%	16,17%	<20%
Wiederholpräzision RSD_r	9,57%	8,66%	<20%
β -Toleranzintervall $\pm Lu$	-20,9 – 24,9%	-37,8 – 39,0%	<40%
Level 2	Cyclosporin A	Tacrolimus	Bewertung
Sollwert	258 ng/ml	13,30 ng/ml	
Mittelwert \bar{x}	244,19 ng/ml	13,52 ng/ml	
Richtigkeit BIAS	5,35%	1,62%	<15%
Laborpräzision RSD_t	8,40%	11,38%	<15%
Wiederholpräzision RSD_r	8,89%	11,24%	<15%
β -Toleranzintervall $\pm Lu$	-14,8 – 25,5%	-25,6 – 28,8%	<30%

Tabelle 11: Fortsetzung von S. 47

Level 3	Cyclosporin A	Tacrolimus	Bewertung
Sollwert	1173 ng/ml	24,90 ng/ml	
Mittelwert \bar{x}	1290 ng/ml	22,98 ng/ml	
Richtigkeit BIAS	9,94%	7,72%	<15%
Laborpräzision RSD_t	12,13%	9,09%	<15%
Wiederholpräzision RSD_r	11,40%	8,74%	<15%
β -Toleranzintervall $\pm Lu$	-18,8 – 38,6%	-14,1 – 29,6%	<40 / 30%

Alle erhaltenen Werte für Richtigkeit und Präzision der Methode lagen unterhalb der von der GTFCh vorgeschlagenen Streuung von 15 bzw. 20%. Lediglich für das β -Toleranzintervall von Cyc wurde der Bereich für die hohe Kontrolle außerhalb der vorgegebenen 30% Abweichung bestimmt. Da sich diese Kontrolle im oberen linearen Bereich befindet, war hier auch eine erhöhte Streuung zu erwarten. Der Wert lag mit 38,6% innerhalb der Vorgabe für Kontrollen am Rand des Messbereichs.

3.2.4. Robustheit

Zur Untersuchung der Robustheit der Methode wurden unterschiedliche Parameter variiert. Die Dauer der Extraktion und die Extraktionstemperatur (Abb. 11 und 12) zeigten keinen wesentlichen Einfluss auf die Wiederfindung und folglich das Analyseergebnis. Eine veränderte Zusammensetzung des Lösemittels (Abb. 7) hatte jedoch einen erheblichen Einfluss auf dasselbe. Dies war jedoch durch den veränderten optischen Eindruck des Extrakts zu erkennen und somit unproblematisch.

3.2.5. Selektivität

In der zur Analyse der DBS entwickelten Methode zeigten sich keine interferierenden Peaks bei der Analyse von Negativproben. Im Rahmen der klinischen Studie wurden Negativproben von Patienten gemessen, die eine für nieren-

transplantierte Patienten typische Medikation erhielten. Für die Tac-Gruppe wurden 4 weitere Immunsuppressiva, ein Statin, 7 Antihypertensiva, 3 Antikoagulanzen, ein Virustatikum, ein Antimykotikum, 7 Antibiotika, ein Protonenpumpenhemmer, ein Sulfonylharnstoff, ein Vitamin, 3 Analgetika, 2 Diuretika, ein Urikostatikum, 3 Thyreostatika, 2 Sedativa/Hypnotika und 5 weitere Pharmaka untersucht. In der Cyc-Gruppe wurden 5 Immunsuppressiva, ein Statin, 7 Antihypertensiva, 2 Antikoagulanzen, 2 Virustatika, ein Antimykotikum, 10 Antibiotika, ein Protonenpumpenhemmer, 2 Vitamine, 3 Analgetika, 2 Diuretika, ein Urikostatikum, 2 Thyreostatika, 2 Sedativa/Hypnotika und 13 weitere Pharmaka auf mögliche Interferenzen untersucht. Für keines dieser Pharmaka konnten interferierende Peaks in der chromatographischen Trennung detektiert werden.

3.2.6. Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität der Analyten auf dem Filterpapier wurden Mischungen mehrerer Patientenproben hergestellt. Von diesen homogenisierten EDTA-Blutproben wurden je 50 µl auf die Filterpapierkarten aufgetragen. Für eine zweite Messreihe wurde die homogenisierte EDTA-Blutprobe in eine Natriumfluorid- / Kaliumoxalat-Monovette (*Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany*) überführt, um die Enzymaktivität der Probe als Einflussparameter auf die Stabilität zu unterdrücken. Auch von dieser Probe wurden 50 µl auf eine Filterpapierkarte aufgetragen. Die DBS wurden für 2 h getrocknet und dann ausgestanzt. Der 10 mm große DBS wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur und bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden nach dem im Versuchsplan festgelegten Zeitschema in einen Tiefkühlschrank bei -21°C umgelagert. Alle Proben einer Versuchsserie wurden in einer Analysenserie gemessen um die Homogenität der Messwerte zu gewährleisten. Zu jedem Messwert erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Probenaufarbeitung für das LCMS erfolgte entsprechend der entwickelten Methode für DBS.

Zur Auswertung der Analysenserie wurden die Peakflächen der Analyten und ISs auf die der Kalibratoren bezogen. Nach linearer Kalibration wurden die Konzentrationen der Analyten berechnet. Zur Berechnung der relativen Wiederfindung wurde der erste Messpunkt + 2 h als 100% definiert. Für Cyc wurde in diesem Versuch der Zeitraum 0 bis 96 h und für Tac der Zeitraum 0 bis 81 h

untersucht (Abb. 13). Für Cyc ergaben sich relative Wiederfindungen zwischen 92 und 97%. Für Tac lagen die relativen Wiederfindungen zwischen 95 und 103%.

In einem weiteren Versuch wurde die Stabilität anhand der Qualitätskontrolle L2 (*Recipe, München, Germany*) über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. In diesem Versuch ergab sich eine relative Wiederfindung für Tac von 102% bei Raumtemperatur respektive von 75% bei +4°C. Die relativen Wiederfindungen betragen nach der gleichen Zeit für Cyc 94% bei Raumtemperatur und 89% bei +4°C.

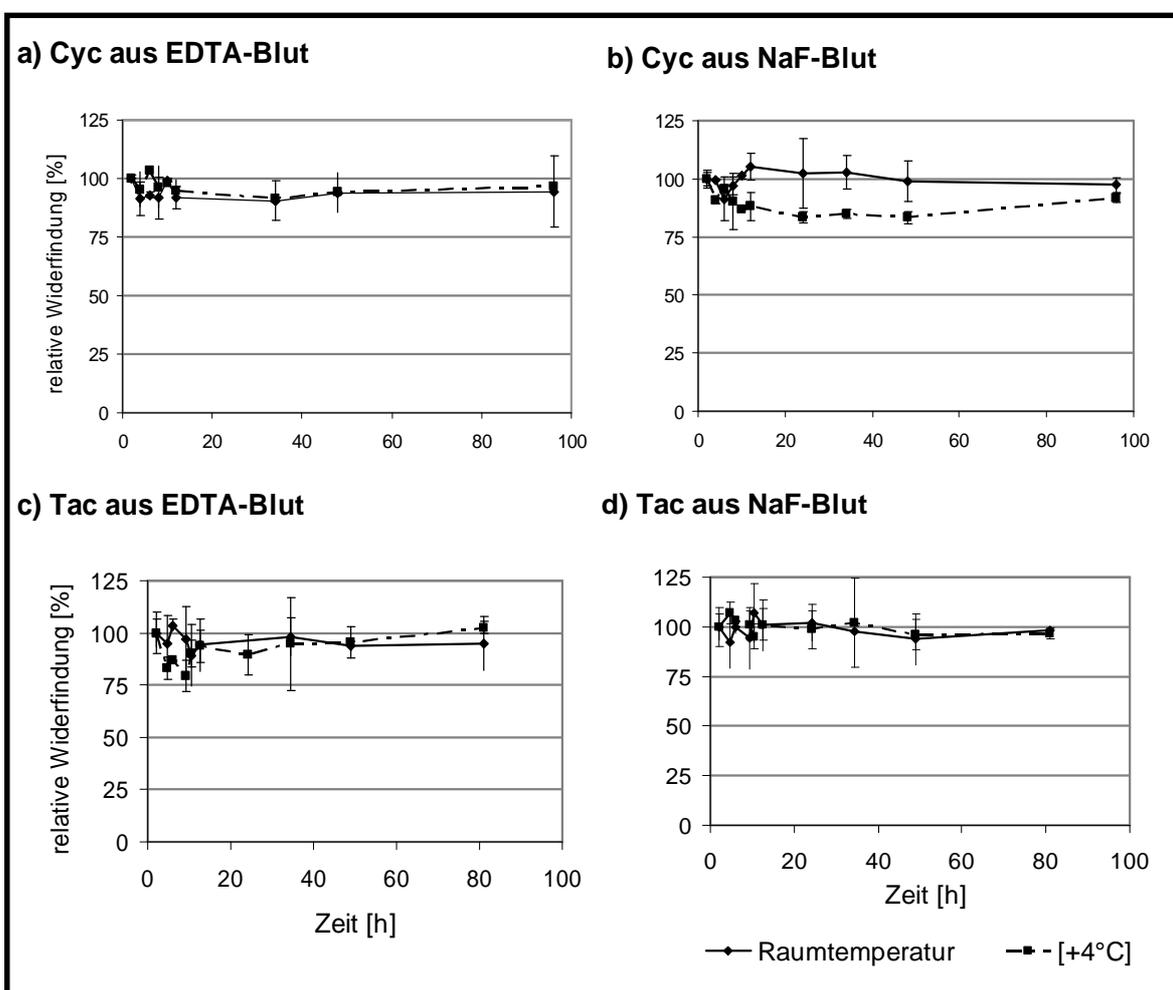


Abbildung 13: Stabilität von Cyclosporin A und Tacrolimus bei Raumtemperatur und bei 4°C. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 2 unabhängigen Untersuchungen pro Untersuchungszeitpunkt. a) Cyclosporin A aus EDTA-Blut, b) Cyclosporin A aus Natriumfluorid (NaF) / Kaliumoxalat-Blut, c) Tacrolimus aus EDTA-Blut, d) Tacrolimus aus Natriumfluorid (NaF) / Kaliumoxalat-Blut.

3.3. Auswertung der Studienergebnisse

Die Studie an nierentransplantierten Patienten am Interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, wurde im Zeitraum vom 05.11.2009 bis 16.06.2011 durchgeführt. Es konnten insgesamt 68 Patienten in die Studie einbezogen werden. Die Patienten teilten sich mit je 34 Patienten auf die Cyc- und die Tac-Gruppe auf. In der Cyc-Gruppe konnten bei 32 Patienten die geforderten 3 Peak- und Talspiegel gewonnen werden. In 2 Fällen konnten nur 2 Probennahmen durchgeführt werden. Bei den Patienten mit Tac-Behandlung wurden in 33 Fällen die geforderten 3 Probennahmen erreicht. In einem Fall konnten nur 2 Probennahmen durchgeführt werden. In 5 der 32 Fälle konnten 4 Probennahmen erfolgen.

In der Cyc-Gruppe wurden die Proben innerhalb von 3 bis 12 Tagen gewonnen (MW $6,26 \pm 1,96$ Tage). Das Alter der Studienteilnehmer lag zwischen 26 und 74 Jahren mit einem Median von 62 Jahren (MW 56 ± 14 Jahre). 10 Studienteilnehmer waren weiblich (29%), 24 (71%) der Studienteilnehmer waren männlich.

Bei der Tac-Gruppe erfolgte die Probennahme innerhalb von 2 bis 14 Tagen (MW $6,15 \pm 2,73$ Tage). In der Studiengruppe lag das Alter zwischen 20 und 75 Jahren mit einem Median von 49 Jahren (MW 49 ± 13 Jahre). Die Anzahl der weiblichen Studienteilnehmer betrug 14 (41%). Der Anteil der männlichen Teilnehmer lag mit 20 Personen bei 59%.

3.3.1. Vitalparameter

Die Vitalparameter Körpergewicht, Blutdruck und Puls sowie das Ergebnis der Kreatininbestimmung wurden auf Dokumentationsbögen übermittelt. Die Auswertung erfolgte für die Gruppen Cyc- und Tac-Medikation separat.

Körpergewicht:

Das Körpergewicht der Cyc-Gruppe lag zwischen 56 und 109,6 kg (MW $82,2 \pm 13,31$ kg). Die Änderung des Körpergewichts der Studienteilnehmer über die Zeit der Studienteilnahme betrug -3,1 bis 8,6 kg mit einem MW von $0,69 \pm 1,69$ kg. Bei 74% der Studienteilnehmer blieb das Körpergewicht über die Zeit der Studie konstant (<1 kg). Für die Tac-Gruppe wurde ein Körpergewicht zwischen 41,6 bis

109,9 kg (MW 74,58 ± 14,85 kg) festgestellt. Für die Änderung des Körpergewichts der Studienteilnehmer der Tac-Gruppe ergaben sich Werte zwischen -9,5 bis 3,6 kg mit einem MW von -0,76 ± 2,49 kg. In der Tac-Gruppe zeigte sich bei 67% der Studienteilnehmer keine Veränderung des Körpergewichts. Bei einem Studienteilnehmer lagen keine Angaben zum Körpergewicht vor.

Blutdruck:

Der systolische Blutdruck in der Cyc-Gruppe betrug zwischen 110 und 220 mm Hg (MW 143,34 ± 18,19 mm Hg). 48% der Messwerte lagen oberhalb einem Wert von 140 mm Hg als Obergrenze für eine isolierte systemische Hypertonie [103]. Kein Messwert lag unterhalb von 90 mm Hg. Die Messwerte des diastolischen Blutdrucks lagen im Bereich von 45 bis 130 mm Hg (MW 80,31 ± 12,89 mm Hg). In 17% der Fälle wurde ein Wert oberhalb von 90 mm Hg ermittelt. 1% der Messwerte lagen unter 50 mm Hg. In der Cyc-Gruppe wurden 100 Blutdruckmessungen dokumentiert.

In der Gruppe der Studienteilnehmer mit einer Tac-Medikation lag der systolische Blutdruck zwischen 85 und 185 mm Hg (MW 145,64 ± 18,38 mm Hg). Bei 60% der Studienteilnehmer dieser Gruppe wurde ein Messwert oberhalb von 140 mm Hg gemessen. 1% der Patientenwerte des systolischen Blutdrucks lagen unter 90 mm Hg. Der diastolische Blutdruck der Tac-Gruppe streute im Bereich 32 bis 110 mm Hg (MW 83,13 ± 13,96 mm Hg). 25% der diastolischen Messwerte überschritten den Grenzwert von 90 mm Hg. In 2% der Fälle wurde der diastolische Blutdruck unter 50 mm Hg ermittelt. Zur Auswertung der Tac-Gruppe lagen 106 Blutdruckmesswerte vor.

Puls:

Für die Cyc-Gruppe lagen 95 Pulsmessungen vor. Hierbei wurde lediglich die Frequenz und nicht der Rhythmus dokumentiert. In 5 Fällen wurde keine Pulsfrequenz auf dem Dokumentationsbogen aufgeführt. Die Messwerte lagen in dem Bereich von 48 bis 131 min⁻¹ (MW 73,99 ± 12,30 min⁻¹). In 1% der Fälle wurde ein Messwert oberhalb von 100 min⁻¹ gemessen. 2% der Pulsmessungen ergaben einen Wert unter 50 min⁻¹.

In der Tac-Gruppe standen für alle 106 Probennahmen Pulsmesswerte zur Verfügung. In dieser Gruppe konnten Messwerte zwischen 49 und 124 min⁻¹ (MW

$75,39 \pm 12,33 \text{ min}^{-1}$). 2% der Pulsmessungen hatten einen Wert über 100 min^{-1} . In 1% wurde ein Wert unter 50 min^{-1} gemessen.

Hämatokrit:

Die Hämatokritbestimmung aus venösem Blut wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie standen für die Cyc-Gruppe 98 Hämatokritwerte der Studienteilnehmer zur Verfügung. Die Messwerte lagen zwischen 0,21 und 0,35 l/l (MW $0,28 \pm 0,04 \text{ l/l}$). Somit lagen alle Werte unterhalb des Normbereichs von 0,42 bis 0,5 l/l für Männer und 0,37 bis 0,45 l/l für Frauen. Für die Tac-Gruppe lagen 92 Hämatokritwerte vor. In dieser Gruppe wurden Werte in dem Bereich von 0,18 l/l bis 0,42 l/l (MW $0,3 \pm 0,06 \text{ l/l}$) ermittelt. In dieser Gruppe lagen 4 Messwerte innerhalb des Normbereichs. Diese Verschiebung ist auf den erhöhten Wasseranteil bei verminderter Nierenleistung der Patienten zurückzuführen.

Kreatinin im Serum:

Die Kreatininbestimmung erfolgte im Rahmen der Routineanalytik im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, und wurde durch das Transplantationszentrum auf dem Dokumentationsbogen zu jeder Probenahme übermittelt. Für die Gruppe mit Cyc-Medikation ergaben sich Werte im Konzentrationsbereich von 48 bis $902 \mu\text{mol/l}$ (MW $288,0 \pm 214,5 \mu\text{mol/l}$). 90% der Werte lagen oberhalb eines Wertes von $106 \mu\text{mol/l}$. Kein Patient dieser Gruppe zeigte eine Serumkreatininkonzentration unter $44 \mu\text{mol/l}$. Über den Zeitraum der Studienteilnahme wurden Differenzen zwischen dem letzten und dem ersten Tag der Teilnahme jedes Patienten berechnet. Hierbei ergaben sich Differenzen zwischen $-589,6$ und $122,5 \mu\text{mol/l}$ (MW $-125,9 \pm 160,3 \mu\text{mol/l}$).

Die Kreatininkonzentrationen für die Tac-Gruppe lagen in einem Bereich von 56 und $1068 \mu\text{mol/l}$ (MW $273,4 \pm 235,8 \mu\text{mol/l}$). In dieser Gruppe lagen 80% der Kreatininwerte oberhalb von $106 \mu\text{mol/l}$. Kein Messwert lag unter dem Normbereich von $44 \mu\text{mol/l}$. Auch für die Tac-Gruppe wurden die Differenzen zwischen dem letzten und ersten Kreatininwert berechnet. Die Differenzen lagen in einem Bereich von -676 und $323 \mu\text{mol/l}$ (MW $-73,5 \pm 204,9 \mu\text{mol/l}$). Für die Berechnungen in dieser Gruppe standen 104 Messwerte zur Verfügung. In zwei Fällen wurde kein Kreatininwert dokumentiert.

3.3.2. Kreatinin-Clearance

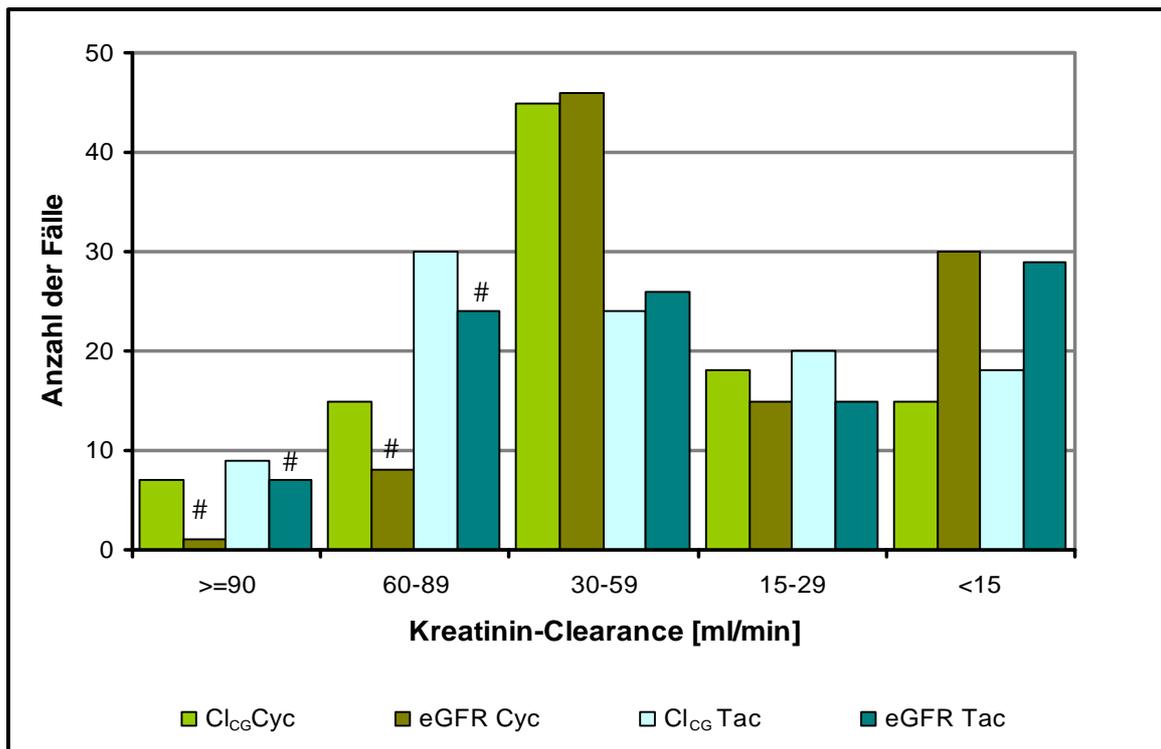


Abbildung 14: Verteilung der Kreatinin-Clearance für die Gruppen Cyclosporin A und Tacrolimus nach Berechnung über Cockcroft-Gault-Näherung Cl_{CG} und die MDRD-Formel $eGFR$. # - Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, dass die MDRD-Formel nicht zur genaueren Beschreibung und Diskriminierung der glomerulären Filtrationsrate >60 ml/min verwendet werden kann.

Zur Berechnung der Kreatinin-Clearance standen in der Cyc-Gruppe für 100 und in der Tac-Gruppe für 101 Probennahmen ausreichend Daten zur Verfügung. Für die Cl_{CG} ergaben sich Werte zwischen 8,4 und 117 ml/min. Der MW lag bei $42,6 \pm 25,5$ ml/min. Die $eGFR$ lag in dieser Gruppe in einem Bereich zwischen 5,5 und 121 ml/min/ $1,73m^2$. Der MW lag mit $32,8 \pm 21,4$ ml/min/ $1,73m^2$ etwas niedriger als bei der Cl_{CG} .

Für die Gruppe mit Tac-Medikation ergaben sich Cl_{CG} -Werte von 9,2 bis 116 (MW $47,5 \pm 29,0$ ml/min). Auch in dieser Gruppe lagen die Werte für die $eGFR$ mit 5,2 bis $106,1$ ml/min/ $1,73m^2$ etwas niedriger als bei der Cl_{CG} (MW $40,6 \pm 28,4$ ml/min/ $1,73m^2$).

Ein Großteil der Patienten ist diesen Berechnungen nach dem Stadium III (mittelgradiger Verlust der Nierenfunktion) zuzuordnen. Je nach Berechnungsmodell sind 33 bis 59 der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Messung in das

Stadium V einzuteilen. Die MDRD-Formel bezieht sich auf eine Körperoberfläche von $1,73 \text{ m}^2$. Die Konstitution fließt nicht in die Berechnung der MDRD-Formel ein. In dem Entscheidungsbereich über $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ lagen nur wenige Studienteilnehmer, so dass die Ungenauigkeit in diesem Bereich keinen großen Einfluss auf die Werte des Patientenpools haben.

3.3.3. Medikation

Auf dem Dokumentationsbogen wurden sowohl Angaben zur CNI-Medikation als auch zu weiteren, im Verlaufe der Studie verabreichten Medikamenten festgehalten.

Cyc-Medikation:

Für die Gruppe der Patienten mit einer Cyc-Medikation lagen 100 Angaben zur Auswertung vor. Die Cyc-Tagesdosis lag zwischen 100 und 700 mg/Tag (MW $338,5 \pm 111,9 \text{ mg/Tag}$). Bei einer Korrektur der Dosierungsangaben durch das Körpergewicht wurden Werte im Bereich von 1,26 bis $9,10 \text{ mg/kg*Tag}$ berechnet (MW $4,17 \pm 1,37 \text{ mg/kg*Tag}$). Bei 71% der Patienten fand eine Dosisanpassung im Verlauf der Studie statt. Hierbei wurde die Dosierung um bis zu $3,09 \text{ mg/kg*Tag}$ verändert.

Bei den Patienten der Cyc-Gruppe wurden zur Unterstützung der Immunsuppression bei 96% der Probanden Mycophenolat-Mofetil gegeben. Die Konzentrationen lagen zwischen 1000 und 4000 mg/Tag (MW $1975 \pm 906 \text{ mg/Tag}$). Bei 94% der Proben wurde eine Medikation mit Methylprednisolon angegeben. Die täglichen Dosen lagen zwischen 6 und 125 mg (MW $22,51 \pm 21,99 \text{ mg/Tag}$).

Aus der Dokumentation wurde eine Aufstellung der gesamten Medikation der Patienten an den Studientagen erstellt. Es wurden insgesamt 41 weitere Medikamente während der Studie verabreicht. Die Häufigkeit der Medikationen wurde in Prozent bezogen auf die Anzahl der Entnahmen berechnet:

Ergebnisse

<u>Immunsuppressiva:</u>	Mycophenolat-Mofetil (96%), Methylprednisolon (94%), Tacrolimus (1%; CNI-Umstellung), Leflunomid (2%)
<u>Statine:</u>	Paravastatin (94%)
<u>Antihypertensiva:</u>	Metoprolol (46%), Valsartan (40%), Amlodipin (54%), Moxonidin (13%), Bisoprolol (28%), Minoxidil (4%), Nebivolol (3%)
<u>Antikoagulanzen:</u>	Deltaparin (73%), Acetylsalicylsäure (20%), Phenprocoumon (1%)
<u>Virustatika:</u>	Valgancyclovir (33%)
<u>Antimykotika:</u>	Amphotericin B (58%)
<u>Antibiotika:</u>	Sulfamethoxazol (28%), Ceftriaxon (3%), Sulbactam (1%), Ampicillin (1%), Metronidazol (3%), Ciprofloxacin (1%), Amoxicillin (1%)
<u>Protonenpumpenhemmer:</u>	Pantoprazol (95%)
<u>Sulfonylharnstoff:</u>	Gliquidon (4%)
<u>Vitamin:</u>	Calcitriol (88%)
<u>Analgetika:</u>	Tramadol (5%), Metamizol (3%), Tilidin (1%)
<u>Diuretika:</u>	Torasemid (12%), Furosemid (4%)
<u>Urikostatika:</u>	Allopurinol (6%)
<u>Thyreostatika:</u>	Thyroxin (12%), Cinacalcet (9%), Thiamazol (4%)
<u>Sedativa/Hypnotika:</u>	Zopiclon (3%), Lorazepam (1%)
<u>sonstige:</u>	Sevelamer (2%), Tamsulosin (6%), Doxazosin (2%), Levodopa (7%), Benserazid (7%)

Bei folgenden dieser Medikamente liegt eine Wechselwirkung mit dem für den Cyc-Stoffwechsel relevanten Enzymen CYP3A4, -5 und -7 vor.

CYP3A4/-5/-7-Substrat: Amlodipin, Zopiclon, Tacrolimus

CYP3A4/-5/-7-Hemmer: Ciprofloxacin

CYP3A4/-5/-7-Induktor: Methylprednisolon

Tac-Medikation:

In der Tac-Gruppe lagen 106 Angaben zur Medikation vor. Die täglichen Tac-Dosen lagen im Bereich 1 bis 22 mg/Tag (MW 7,85 ± 3,99 mg/Tag). Die Dosisangaben wurden auf das Körpergewicht bezogen. Hierfür fehlten bei einem Patienten die Angaben zum Körpergewicht, so dass nur 103 Werte einbezogen werden konnten. Die korrigierten Dosierungen lagen in einem Bereich von 0,014 bis 0,313 mg/kg*Tag (MW 0,111 ± 0,063 mg/kg*Tag). Bei 94% der Studienteilnehmer wurde eine Dosisanpassung innerhalb der Studienteilnahme durchgeführt. Hierbei wurden die Dosierungen um bis zu 0,160 mg/kg*Tag geändert.

In 84% der Fälle wurde die Tac-Medikation mit Mycophenolat-Mofetil kombiniert. Die Dosierungen lagen in dem Bereich 1000 bis 4000 mg/Tag (MW 1967 ± 862 mg/Tag). Bei 87,7% wurde eine Medikation mit Methylprednisolon vorgenommen. Die Dosierungen des Cortikosteroids lagen zwischen 2 und 528 mg/Tag (MW 42,34 ± 89,42 mg/Tag).

Aus der Patientendokumentation wurde eine Aufstellung der Co-Medikation der Gruppe mit Tac-Medikation erstellt. Es wurden insgesamt 51 weitere Medikamente verordnet. Die Prozentangaben beziehen sich wiederum auf die Gesamtzahl der Probennahmen in der Gruppe.

<u>Immunsuppressiva:</u>	Mycophenolat-Mofetil (84%), Methylprednisolon (88%), Everolimus (1%), Basiliximab (1%), Azathioprin (1%)
<u>Statine:</u>	Pravastatin (83%)
<u>Antihypertensiva:</u>	Metoprolol (47%), Valsartan (29%), Amlodipin (64%), Moxonidin (17%), Bisoprolol (22%), Minoxidil (2%), Nebivolol (9%)
<u>Antikoagulanzen:</u>	Dalteparin (64%), Acetylsalicylsäure (13%)
<u>Virustatika:</u>	Valgancyclovir (22%), Aciclovir (1%)
<u>Antimykotika:</u>	Amphotericin B (47%)
<u>Antibiotika:</u>	Sulfamethoxazol (22%), Metronidazol (8%), Ciprofloxacin (6%), Piperacillin (2%), Tazobactam (2%), Vancomycin (2%), Cefpodoxim (6%), Clarithromycin (2%), Clindamycin (2%), Sultamicillin (2%)
<u>Protonenpumpenhemmer:</u>	Pantoprazol (93%)
<u>Vitamin:</u>	Calcitriol (77%), Colecalciferol (3%)
<u>Analgetika:</u>	Tramadol (1%), Metamizol (5%), Oxycodon (2%)

<u>Diuretika:</u>	Torasemid (9%), Furosemid (4%)
<u>Urikostatika:</u>	Allopurinol (2%)
<u>Thyreostatika:</u>	Thyroxin (9%), Cinacalcet (9%)
<u>Sedativa/Hypnotika:</u>	Zopiclon (3%), Zolpidem (2%)
<u>sonstige:</u>	Tamsulosin (9%), Doxazosin (2%), Mirtazapin (3%), Digitoxin (3%), Citalopram (2%), Metformin (2%), Tropium (3%), Metoclopramid (7%), Amiodaron (3%), Doxepin (1%), Timolol (3%), Pregabalin (3%), Carbamazepin (2%)

Bei folgenden dieser Medikamente liegt eine Wechselwirkung mit dem für den Tac-Stoffwechsel relevanten Enzymen CYP3A4, -5 und -7 vor.

CYP3A4/-5/-7-Substrat: Amlodipin, Zopiclon, Zolpidem, Clarithromycin, Everolimus

CYP3A4/-5/-7-Hemmer: Clarithromycin, Ciprofloxacin, Amiodaron

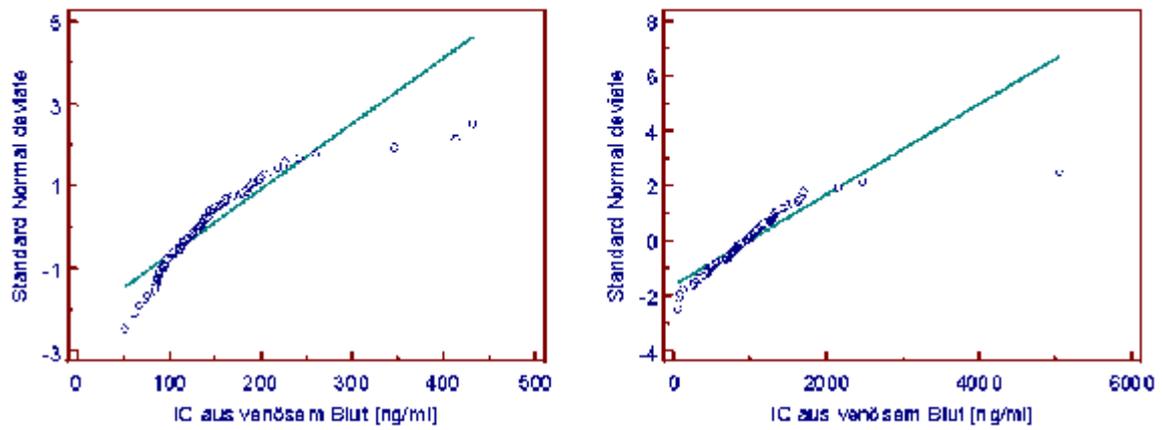
CYP3A4/-5/-7-Induktor: Methylprednisolon, Carbamazepin

3.3.4. Prüfung auf Normalverteilung

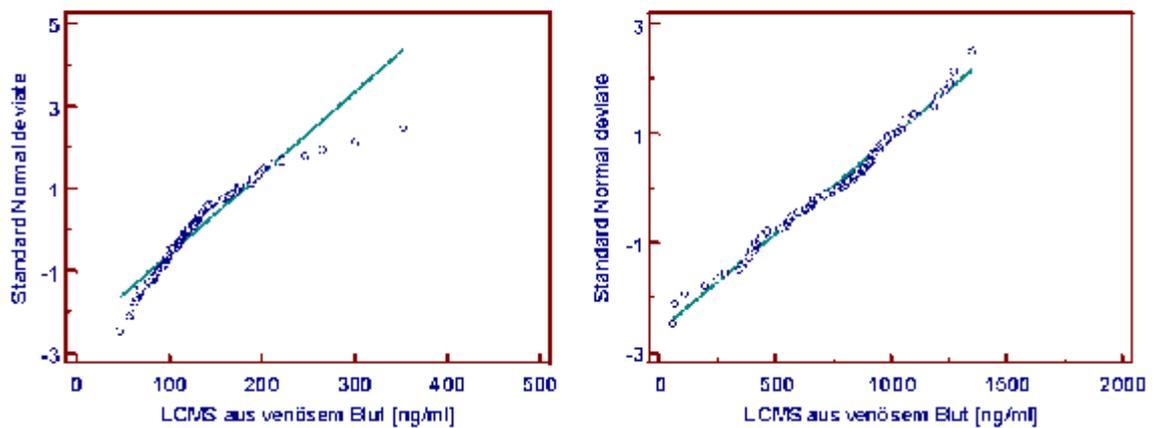
Zur grafischen Beurteilung der Normalverteilung wurden die Daten als Normal Plot dargestellt. Hierbei wird auf der X-Achse des Diagramms die Konzentration dargestellt. Die Y-Achse gibt die Abweichung von der Normalverteilung wieder. Die Gerade in dem Diagramm stellt die Normalverteilung da. Somit befinden sich normalverteilte Daten in der Nähe der Geraden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MedCalc Version 12.1.4 (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgien*).

Die grafische Darstellung zeigt eine Normalverteilung der Untergruppen für die Cyc- und Tac-Medikation.

a) Cyclosporin A, Immunchemie, Tal- und Peakspiegel



b) Cyclosporin A, LCMS aus venösem Blut, Tal- und Peakspiegel



c) Cyclosporin A, LCMS aus DBS, Tal- und Peakspiegel

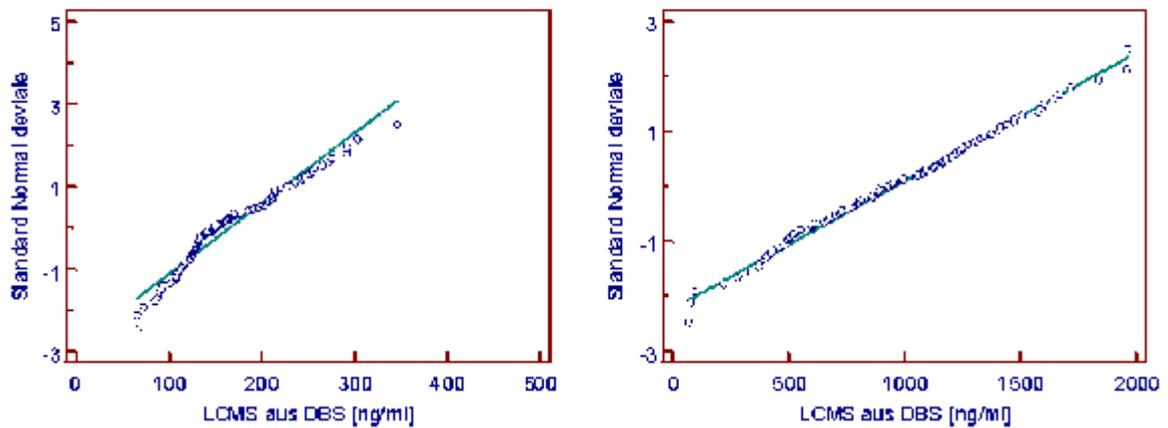
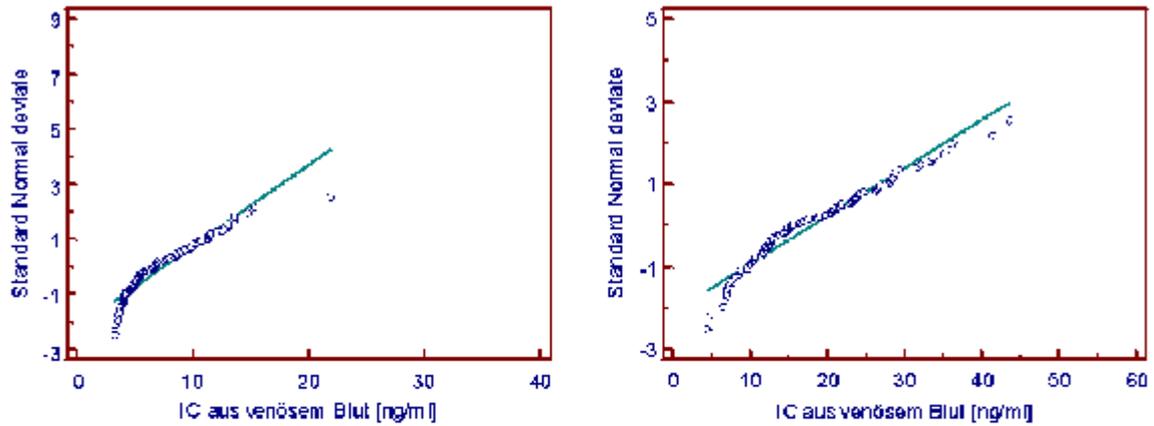
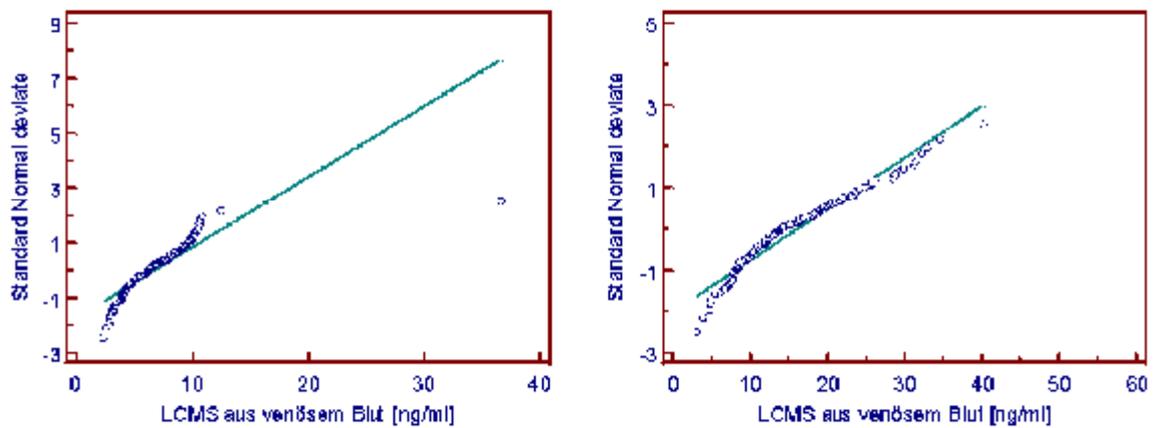


Abbildung 15: Normal Plot für Cyclosporin A. a) Immunchemie, Tal- und Peakspiegel, b) LCMS aus venösem Blut, Tal- und Peakspiegel, c) LCMS aus DBS, Tal- und Peakspiegel.

a) Tacrolimus, Immunchemie, Tal- und Peakspiegel



b) Tacrolimus, LCMS aus venösem Blut, Tal- und Peakspiegel



c) Tacrolimus, LCMS aus DBS, Tal- und Peakspiegel

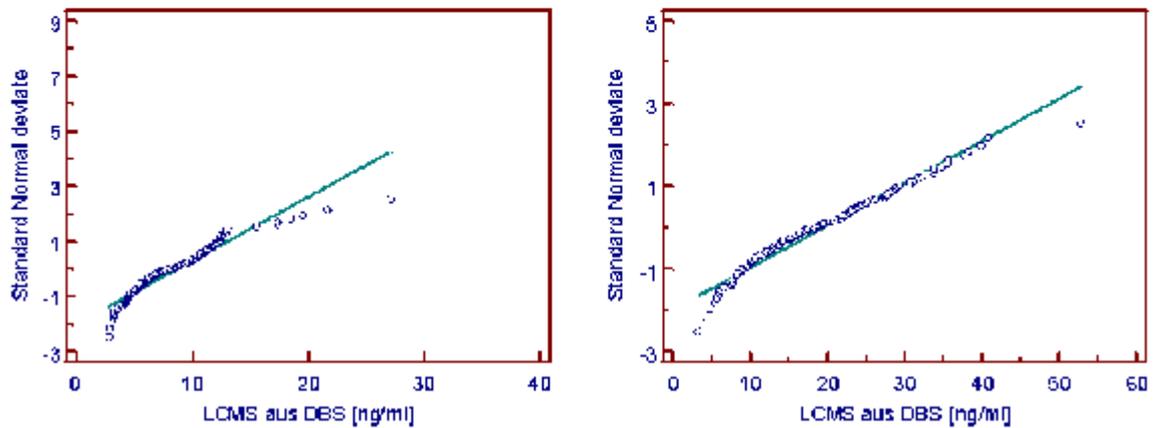


Abbildung 16: Normal Plot für Tacrolimus. a) Immunchemie, Tal- und Peakspiegel, b) LCMS aus venösem Blut, Tal- und Peakspiegel, c) LCMS aus DBS, Tal- und Peakspiegel.

3.3.5. Prüfung auf Gleichwertigkeit

Die Prüfung auf Gleichwertigkeit der Referenz- und Vergleichsmethoden erfolgte nach DIN 53804. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Die Gruppen wurden unabhängig voneinander untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12 und 13 dargestellt. Zusätzlich zu den Rohdaten wurden die Werte der Cyc- und Tac-DBS Gruppe mit dem Hämatokrit normalisiert (Formel 6.4).

Cyclosporin A:

Für die Berechnung wurden alle Werte einbezogen, auch wenn die C_0 - und C_2 -Spiegel nicht an drei Tagen mit beiden Methoden bestimmt werden konnten. Je Studiengruppe konnten zwischen 95 und 98 Wertepaare von 34 Patienten einbezogen werden. Die Differenzen der Mittelwerte lagen zwischen -240,5 ng/ml (Cyc-IC₂) und 30,7 ng/ml (Cyc-ICDBS₂). Die Standardabweichung der Differenzen ergaben Werte von 39,1 ng/ml (Cyc-DBS₀) bis 463,0 ng/ml (Cyc-IC₂).

Tabelle 12: Prüfung auf Gleichwertigkeit nach DIN 53804 für die Bestimmung von Cyclosporin A für die Studiengruppen Cyc-DBS (LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut; a), Cyc-IC (Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut; b), Cyc-ICDBS (LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut; c) und Cyc-DBS Hk (LCMS aus DBS nach Hämatokritkorrektur versus LCMS aus venösem Blut; d) je für C_0 - und C_2 -Spiegel. Fortsetzung der Tabelle auf S. 62 und 63.

a	Cyc-DBS ₀	Cyc-DBS ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-34,4 ng/ml	-212,4 ng/ml
SD der Differenzen s_d	39,1 ng/ml	240,06 ng/ml
Anzahl der Wertepaare N	98	96
Prüfwert t	8,713	8,669
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,985	1,988
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	34,30 – 34,55 ng/ml	211,64 – 213,18 ng/ml

Tabelle 12: Fortsetzung von S. 61

b	Cyc-IC ₀	Cyc-IC ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-12,6 ng/ml	-240,5 ng/ml
SD der Differenzen s_d	45,3 ng/ml	463,0 ng/ml
Anzahl der Wertepaare N	97	96
Prüfwert t	2,750	5,090
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,985	1,985
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	12,50 – 12,78 ng/ml	239,05 – 242,02 ng/ml

c	Cyc-ICDBS ₀	Cyc-ICDBS ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-22,5	30,7
SD der Differenzen s_d	53,3	378,7
Anzahl der Wertepaare N	96	97
Prüfwert t	4,136	0,800
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,985	1,985
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	22,32 – 22,66	keine Abweichung

Tabelle 12: Fortsetzung von S. 61/62

d	Cyc-DBS ₀ Hk	Cyc-DBS ₂ Hk
MW der Differenzen \bar{d}	4,5	22,6
SD der Differenzen s_d	39,17	196,91
Anzahl der Wertepaare N	96	95
Prüfwert t	1,128	1,119
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,985	1,986
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	keine Abweichung	keine Abweichung

Für die Gruppen Cyc-DBS₀, Cyc-DBS₂, Cyc-IC₀, Cyc-IC₂ und Cyc-ICDBS₀ lag der Prüfwert über dem Tabellenwert f . Somit ist für diese Gruppen mit einer konstant-systematischen Abweichung der Methoden auszugehen. Daraufhin wurde der Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte berechnet. Für die Gruppe Cyc-ICDBS₂ lag der Prüfwert unterhalb des Tabellenwerts f . Somit ist für diese Gruppe eine Äquivalenz der Methoden nachgewiesen.

Nach Normierung der Messwerte aus den DBS mit dem Hämatokrit (siehe 2.2.3.8) konnte eine Gleichwertigkeit der Methode mit der Referenzmethode LCMS aus DBS nachgewiesen werden.

Tacrolimus:

Für die Berechnung wurden alle Werte einbezogen, auch wenn die C₀- und C₂-Spiegel nicht an drei Tagen mit beiden Methoden bestimmt werden konnten. Je Studiengruppe wurden zwischen 88 und 106 Wertepaare von 34 Patienten einbezogen. Die Differenzen der Mittelwerte lagen zwischen -3,34 ng/ml (Tac-DBS₂) und 0,406 ng/ml (Tac-IC₀). Die Standardabweichung der Differenzen ergaben Werte von 2,38 ng/ml (Tac-IC₀) bis 8,6 ng/ml (Tac-IC₂).

Tabelle 13: Prüfung auf Gleichwertigkeit nach DIN 53804 für die Bestimmung von Tacrolimus für die Studiengruppen Tac-DBS (LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut; a), Tac-IC (Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut; b), Tac-ICDBS (LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut; c) und Tac-DBS Hk (LCMS aus DBS nach Hämatokritkorrektur versus LCMS aus venösem Blut; d) je für C_0 - und C_2 -Spiegel. Fortsetzung der Tabelle auf S. 65.

a	Tac-DBS ₀	Tac-DBS ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-1,88 ng/ml	-3,34 ng/ml
SD der Differenzen s_d	3,07 ng/ml	6,77 ng/ml
Anzahl der Wertepaare N	101	106
Prüfwert t	6,168	5,068
Tabellenwert $f(n; \alpha = 0,05; \text{einseitig})$	1,984	1,983
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	1,874 – 1,893 ng/ml	3,314 – 3,355 ng/ml

b	Tac-IC ₀	Tac-IC ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-0,71 ng/ml	-1,85 ng/ml
SD der Differenzen s_d	2,38 ng/ml	8,60 ng/ml
Anzahl der Wertepaare N	101	106
Prüfwert t	3,012	3,928
Tabellenwert $f(n; \alpha = 0,05; \text{einseitig})$	1,984	1,983
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	0,706 – 0,721 ng/ml	1,831 – 1,860 ng/ml

Tabelle 13: Fortsetzung von S. 64

c	Tac-ICDBS ₀	Tac-ICDBS ₂
MW der Differenzen \bar{d}	-1,17	-1,49
SD der Differenzen s_d	2,46	5,88
Anzahl der Wertepaare N	101	106
Prüfwert t	4,778	2,608
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,984	1,983
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	1,163 – 1,178	1,471 – 1,507

d	Tac-DBS ₀ Hk	Tac-DBS ₂ Hk
MW der Differenzen \bar{d}	0,406	0,140
SD der Differenzen s_d	3,27	7,18
Anzahl der Wertepaare N	88	92
Prüfwert t	1,165	1,186
Tabellenwert $f(n; a = 0,05; einseitig)$	1,988	1,986
Vertrauensbereich für die Differenzen der Erwartungswerte	keine Abweichung	keine Abweichung

Die Prüfwerte für alle Gruppen lagen über den Tabellenwerten f . Somit ist für alle drei Methoden von einer konstant-systematischen Abweichung auszugehen. Es folgte die Berechnung des Vertrauensbereichs für die Differenzen der Erwartungswerte.

Nach Normierung der Werte auf den Hämatokrit (siehe 2.2.3.8) konnte eine Gleichwertigkeit der Bestimmung von Tac aus DBS mittels LCMS zur Referenzmethode LCMS aus venösem Blut nachgewiesen werden.

3.3.6. Darstellung der Ergebnisse im Bland-Altman Plot

Zur grafischen Beurteilung der Methodenvergleiche wurde eine Darstellung nach Bland-Altman erstellt. Hierbei werden auf der X-Achse die Mittelwerte der korrespondierenden Messwerte von Referenz- und Vergleichsmethode dargestellt. Auf der Y-Achse erfolgt die Darstellung der prozentualen Differenzen der Messwerte der Referenz- und Vergleichsmethode. Darüber hinaus werden der Mittelwert aller Differenzen und der Bereich der $\pm 1,96$ fachen SD grafisch dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MedCalc Version 12.1.4 (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgien*).

Cyclosporin A:

Zur grafischen Darstellung im Bland-Altman Plot wurden Werte von 34 Patienten mit Cyc-Medikation einbezogen, entsprechend der Prüfung auf Gleichwertigkeit.

Tabelle 14: Mittelwerte (MW) der Differenzen, Standardabweichungen (SD) der Differenzen und $\pm 1,96$ fache Standardabweichungen zur grafischen Darstellung der Bland-Altman Plots für die Analyse von Cyclosporin A in Abb. 17.

Gruppe	Anzahl der Fälle	MW der Differenzen	SD der Differenzen	$\pm 1,96$ fache SD
Cyc-DBS ₀	98	-23,3%	26,0%	-74,2 – 27,7%
Cyc-DBS ₂	96	-21,4%	21,5%	-63,7 – 20,8%
Cyc-IC ₀	97	-8,0%	23,9%	54,9 – 38,7%
Cyc-IC ₂	96	-20,6%	29,0%	-77,5 – 36,3%
Cyc-ICDBS ₀	96	-15,7%	28,8%	-72,1 – 40,8%
Cyc-ICDBS ₂	97	-0,2%	28,3%	-55,6 – 55,3%
Cyc-DBS ₀ Hk	96	4,7%	-29,0%	-52,1 – 61,4%
Cyc-DBS ₂ Hk	95	7,3%	24,0%	-39,7 – 54,4%

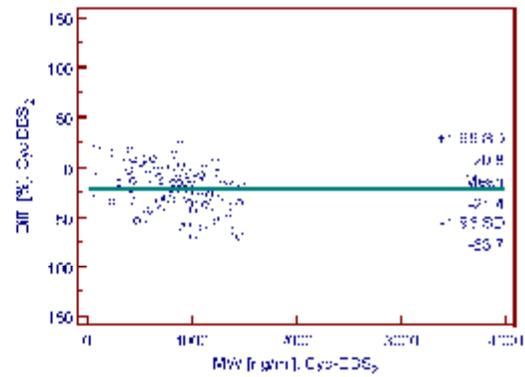
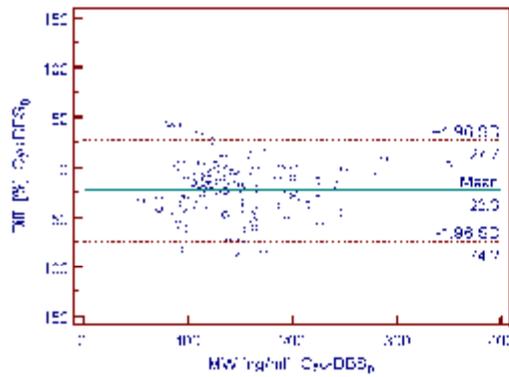
In der Analyse der C_0 -Spiegel für die LCMS-Analyse der DBS gegenüber der Bestimmung aus venösem Blut (Cyc-DBS₀) lagen 3 Werte oberhalb der 1,96fachen SD. 3 Wertepaare lagen unterhalb der Standardabweichung. Für die Gruppe Cyc-DBS₂ lagen 2 Werte oberhalb und 2 Wertepaare unterhalb des Kontrollbereichs.

Bei der Analyse der C_0 -Spiegel mit Immunchemie (IC) versus LCMS-Analyse aus venösem Blut (Cyc-IC₀) befanden sich keine Werte unterhalb der 1,96fachen SD. 3 Werte befanden sich außerhalb des Bereichs. Bei der Gruppe Cyc-IC₂ stellten 2 Wertepaare oberhalb und 1 Wert unterhalb des Bereichs der 1,96fachen SD dar.

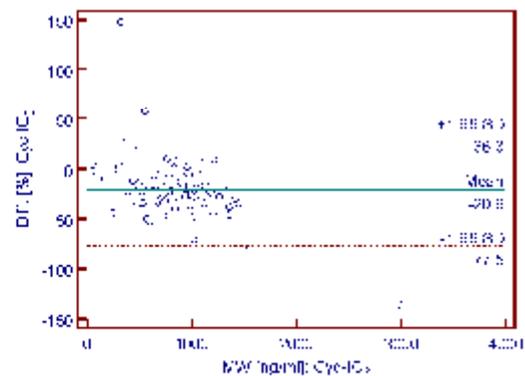
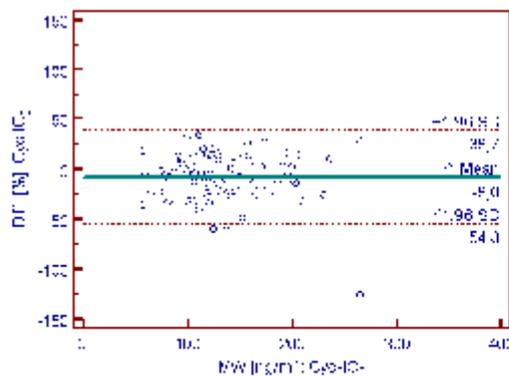
Die Analyse der C_0 -Spiegel für die IC und die LCMS aus DBS (Cyc-ICDBS₀) zeigten 4 Proben Werte oberhalb des Kontrollbereichs. Ein Wert lag unterhalb dieses Bereichs. Für die C_2 -Spiegel (Cyc-ICDBS₂) zeigten je 2 Messwerte Differenzen oberhalb und unterhalb der 1,96fachen SD.

Die Bland-Altman Plots für die C_0 -Spiegel der Hk normierten LCMS-Analysen aus den DBS und LCMS aus venösem Blut (Cyc-DBS₀Hk) zeigten 2 Werte oberhalb und 4 Werte unterhalb des Kontrollbereichs. Bei den Peakspiegeln (Cyc-DBS₂Hk) lagen 2 Werte oberhalb und 3 Werte unterhalb der 1,96fachen SD (Abb. 17).

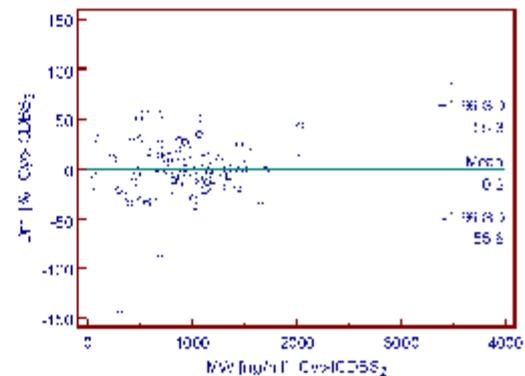
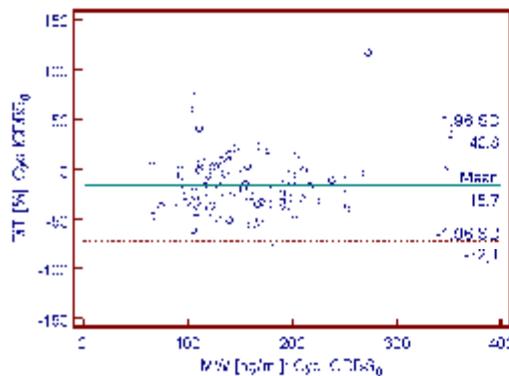
a) Cyclosporin A: LCMS (DBS) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



b) Cyclosporin A: IC (venös) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



c) Cyclosporin A: LCMS (DBS) vs IC (venös), Tal- und Peakspiegel



d) Cyclosporin A: LCMS (DBS) Hk normiert vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel

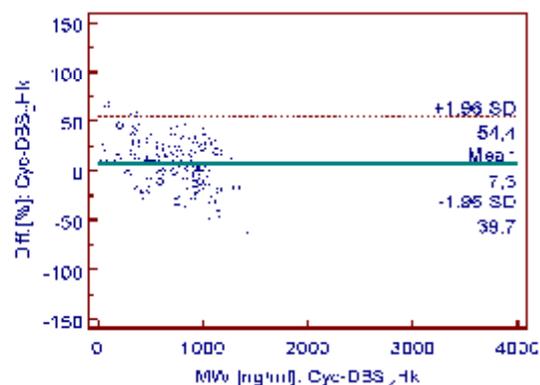
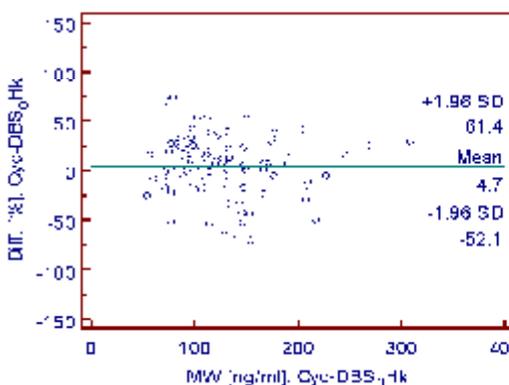


Abbildung 17 (siehe S. 68): Bland-Altman Plot für die Analyse von Cyclosporin A mit Mittelwert (durchgezogene Linie) und 1,96fache Standardabweichung (gestrichelte Linie). a) Cyc-DBS₀ und Cyc-DBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b) Cyc-IC₀ und Cyc-IC₂ für die Methoden Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut, c) Cyc-ICDBS₀ und Cyc-ICDBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut, d) Cyc-DBS₀Hk und Cyc-DBS₂Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut.

Die prozentualen Differenzen der Mittelwerte lagen mit Werten zwischen -23,3% (Cyc-DBS₀) und 7,3% (Cyc-DBS₂Hk) für alle Gruppen ohne Normierung im negativen Bereich. Die Standardabweichungen der Differenzen lagen mit Werten zwischen 21,5% (Cyc-DBS₂) und 29% (Cyc-IC₂, Cyc-DBS₀Hk) in einer vergleichbaren Größenordnung (Tab. 14).

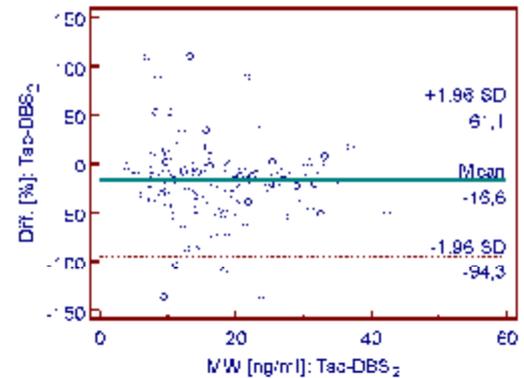
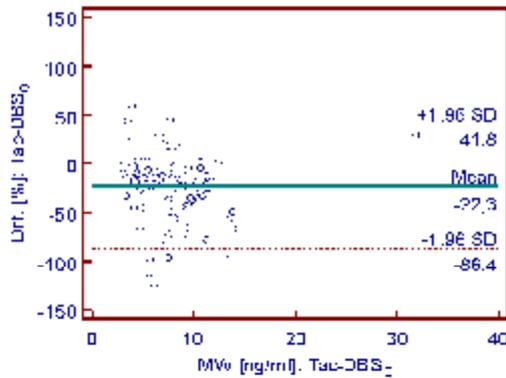
Tacrolimus:

Zur grafischen Darstellung im Bland-Altman Plot wurden Werte von 34 Patienten mit Tac-Medikation einbezogen, entsprechend der Prüfung auf Gleichwertigkeit.

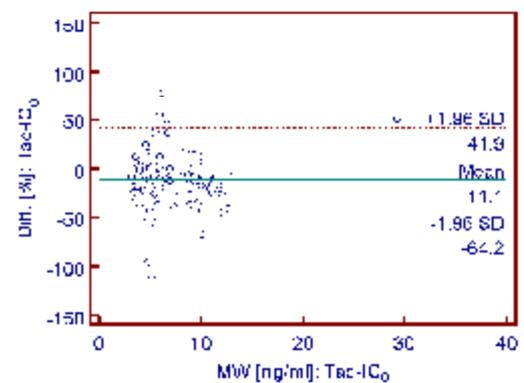
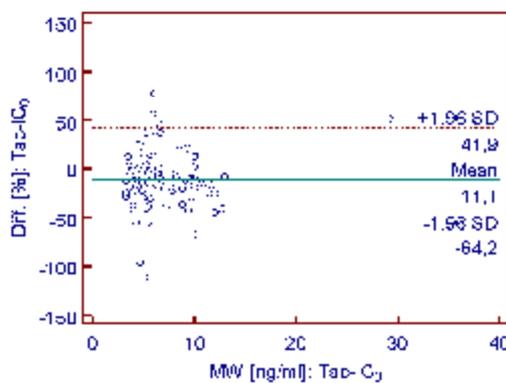
Tabelle 15: Mittelwerte (MW) der Differenzen, Standardabweichungen (SD) der Differenzen und $\pm 1,96$ fache Standardabweichungen zur grafischen Darstellung der Bland-Altman Plots für die Analyse von Tacrolimus in Abb. 18.

Gruppe	Anzahl der Fälle	MW der Differenzen	SD der Differenzen	$\pm 1,96$ fache SD
Tac-DBS ₀	101	-22,3%	32,7%	-86,4 – 41,8%
Tac-DBS ₂	106	-16,6%	39,6%	-94,3 – 61,1%
Tac-IC ₀	101	-11,1%	27,1%	-64,2 – 41,9%
Tac-IC ₂	106	-11,7%	30,5%	-71,5 – 48,1%
Tac-ICDBS ₀	101	-11,5%	28,4%	-67,2 – 44,2%
Tac-ICDBS ₂	106	-5,2%	35,4%	-74,6 – 64,1%
Tac-DBS ₀ Hk	88	-0,5%	38,7%	-76,4 – 75,3%
Tac-DBS ₂ Hk	92	3,9%	43,3%	-80,1 – 88,7%

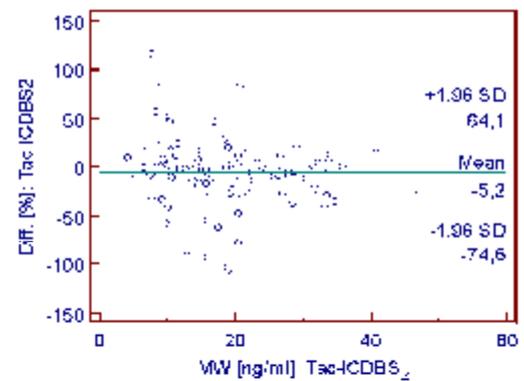
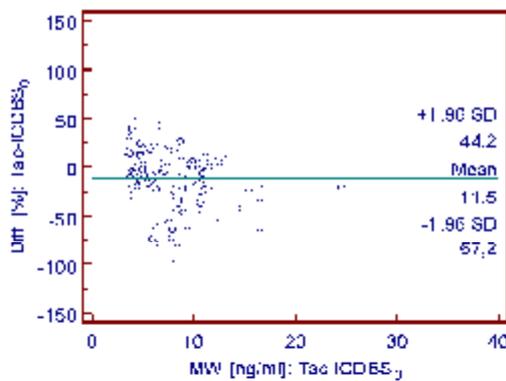
a) Tacrolimus: LCMS (DBS) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



b) Tacrolimus: IC (venös) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



c) Tacrolimus: LCMS (DBS) vs IC (venös), Tal- und Peakspiegel



d) Tacrolimus: LCMS (DBS)Hk normiert vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel

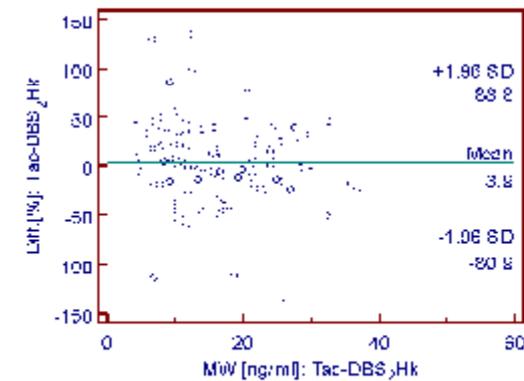
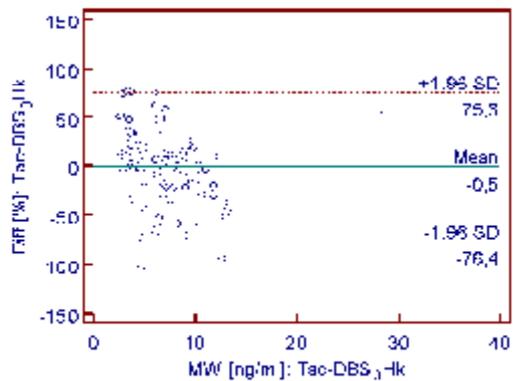


Abbildung 18 (siehe S. 70): Bland-Altman Plot für die Analyse von Tacrolimus mit Mittelwert (durchgezogene Linie) und 1,96fache Standardabweichung (gestrichelte Linie). a) Tac-DBS₀ und Tac-DBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b) Tac-IC₀ und Tac-IC₂ für die Methoden Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut, c) Tac-ICDBS₀ und Tac-ICDBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut, d) Tac-DBS₀Hk und Tac-DBS₂Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut.

Der Vergleich der LCMS-Methode aus DBS mit der LCMS-Methode aus venösem Blut zeigten für die Gruppe Tac-DBS₀ 3 Wertepaare oberhalb des Kontrollbereichs. 5 Wertepaare lagen unterhalb dieses Bereichs. In der Gruppe Tac-DBS₂ kamen je 4 Wertepaare oberhalb und unterhalb des Kontrollbereichs $1,96 \cdot SD$ zur Darstellung.

Bei der Auswertung des Methodenvergleichs Immunchemie (IC) versus LCMS aus venösem Blut für die C₀-Spiegel (Tac-IC₀) lagen 4 Wertepaare oberhalb und 3 unterhalb des Kontrollbereichs $1,96 \cdot SD$. In der Gruppe Tac-IC₂ lagen 5 Wertepaare oberhalb und 3 unterhalb des Kontrollbereichs.

Die Analysen der C₀-Spiegel für die IC und die LCMS aus DBS (Tac-ICDBS₀) zeigten einen Wert oberhalb des Kontrollbereichs. 5 Werte lagen unterhalb dieses Bereichs. Für die C₂-Spiegel (Tac-ICDBS₂) zeigten 4 Messwerte Differenzen oberhalb und 5 unterhalb der $1,96$ fachen SD.

Für den Vergleich der Hk normierten Werte der LCMS-Analyse aus DBS mit der LCMS aus venösem Blut (Tac-DBS₀Hk) befanden sich je 2 Differenzen oberhalb und unterhalb des Kontrollbereichs. Für Tac-DBS₂Hk lagen je 3 Wertepaare ober- und unterhalb der $1,96$ fachen SD (Abb. 18).

Die prozentualen Differenzen der Mittelwerte lagen mit Werten zwischen -22,3% (Tac-DBS₀) und 3,9% (Tac-DBS₂Hk) für alle nicht normierten Gruppen im negativen Bereich. Die Standardabweichungen der Differenzen zeigten mit Werten zwischen 27,1% (Tac-IC₀) und 43,3% (Tac-DBS₂Hk) eine höhere Streuung als bei der Cyc-Medikation (Tab. 15).

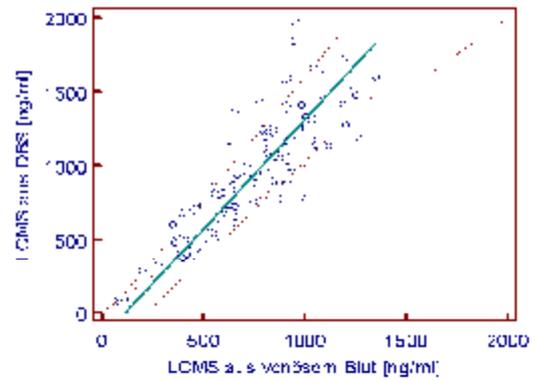
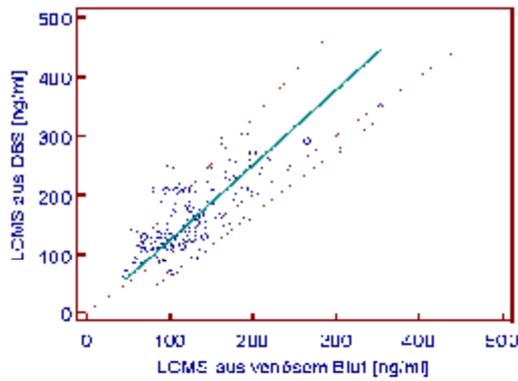
3.3.7. Passing-Bablok Regression

Zur weiteren grafischen Auswertung wurden die Wertepaare in einem X-/Y-Diagramm dargestellt. Auf der X-Achse wird die Referenzmethode dargestellt. Die Werte der Vergleichsmethode werden auf der Y-Achse abgebildet. Zur Orientierung wurde die Ideallinie $Y=X$ eingefügt. Die Werte wurden einer Passing-Bablok Regression mit dem Programm MedCalc Version 12.1.4 (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgien*) durchgeführt. In der Grafik wird die Geradengleichung und das 95% Konfidenzintervall (CI) dargestellt.

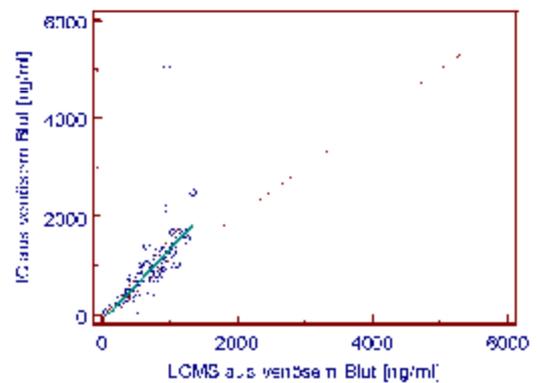
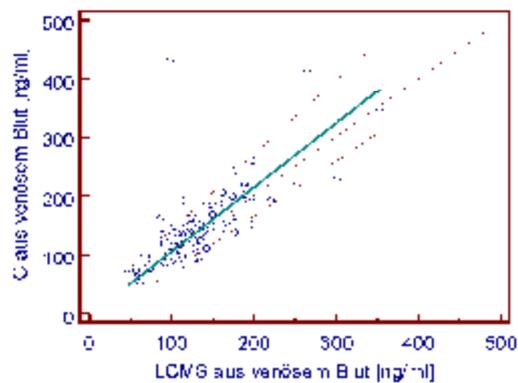
Tabelle 16: Achsenabschnitt (a) und Steigung (b) sowie das 95% Konfidenzintervall (CI) zur grafischen Darstellung der Passing-Bablok Regression für die Analyse von Cyclosporin A in Abb. 19.

Gruppe	Anzahl der Fälle	Achsenabschnitt a ($\pm 95\%$ CI)	Steigung b ($\pm 95\%$ CI)
Cyc-DBS ₀	98	-3,36 (-43,3 – 19,8)	1,270 (1,058 – 1,554)
Cyc-DBS ₂	96	-173 (-294 – -56,5)	1,481 (1,318 – 1,657)
Cyc-IC ₀	97	-3,74 (-22,8 – 14,2)	1,091 (0,940 – 1,276)
Cyc-IC ₂	95	-122 (-222 – -45,3)	1,447 (1,333 – 1,591)
Cyc-ICDBS ₀	96	-2,19 (-33,3 – 23,9)	1,227 (1,027 – 1,470)
Cyc-ICDBS ₂	97	4,40 (-88,5 – 78,7)	1,006 (0,917 – 1,107)
Cyc-DBS ₀ Hk	96	-18,5 (-45,2 – 7,2)	1,068 (0,870 – 1,273)
Cyc-DBS ₂ Hk	95	-124 (-221 - -38,7)	1,124 (0,978 – 1,287)

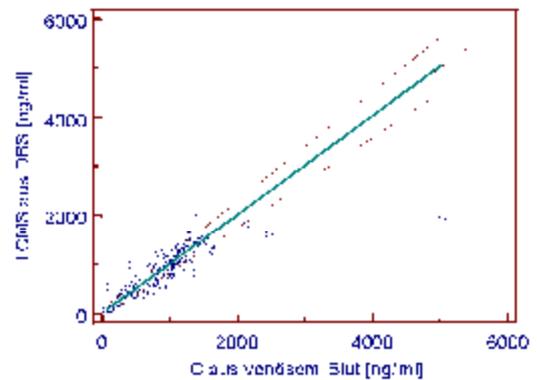
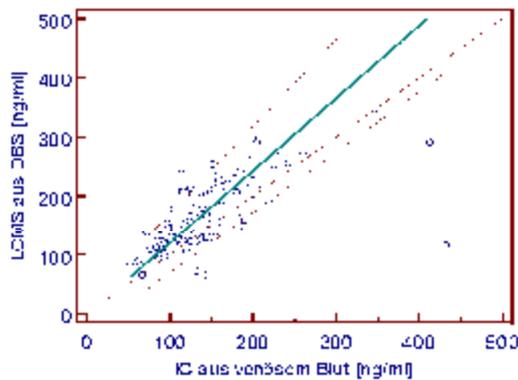
a) Cyclosporin A: LCMS (DBS) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



b) Cyclosporin A: IC (venös) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



c) Cyclosporin A: LCMS (DBS) vs IC (venös), Tal- und Peakspiegel



d) Cyclosporin A: LCMS (DBS) Hk normiert vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel

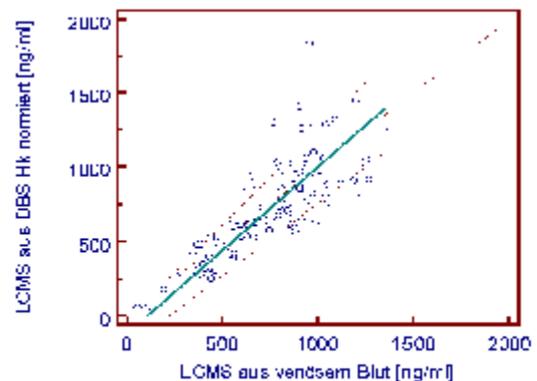
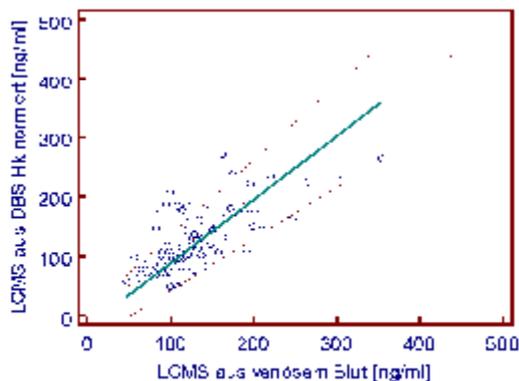


Abbildung 19 (siehe S. 73): Passing-Bablok Regression für die Analyse von Cyclosporin A. a) Cyc-DBS₀ und Cyc-DBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b) Cyc-IC₀ und Cyc-IC₂ für die Methoden Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut, c) Cyc-ICDBS₀ und Cyc-ICDBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut, d) Cyc-DBS₀Hk und Cyc-DBS₂Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut.

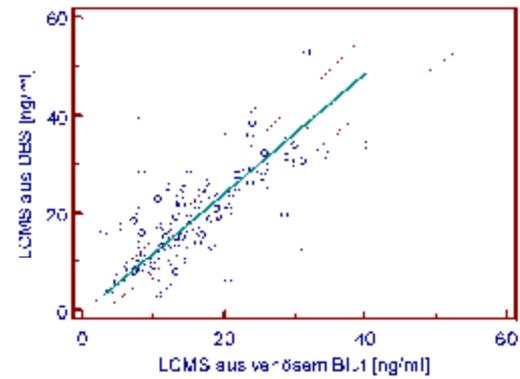
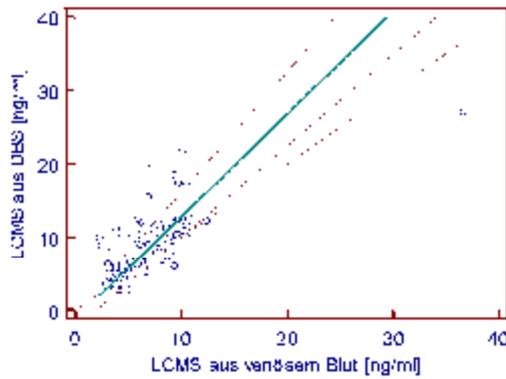
Die für den Achsenabschnitt (a) ermittelten Werte lagen zwischen -173 (Cyc-DBS₂) und 4,40 für die Gruppe Cyc-ICDBS₂. Die Steigung (b) lag für die Cyc-Medikation zwischen 1,006 (Cyc-ICDBS₂) und 1,481 (Cyc-DBS₂). Somit zeigten die Gruppen Cyc-ICDBS₂ und Cyc-IC₀ die beste Korrelation zur jeweiligen Referenzmethode (Abb. 19, Tab. 16).

Tacrolimus:

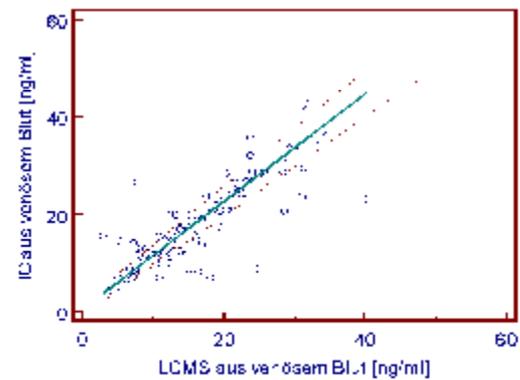
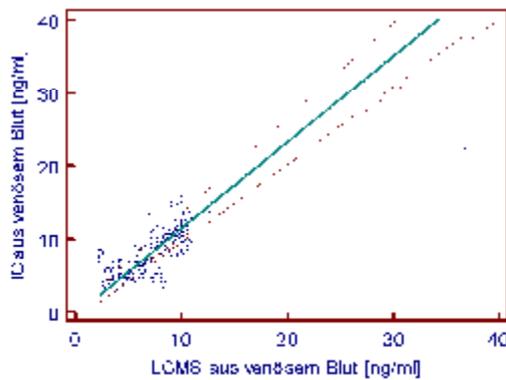
Tabelle 17: Achsenabschnitt (a) und Steigung (b) sowie das 95% Konfidenzintervall (CI) zur grafischen Darstellung der Passing-Bablok Regression für die Analyse von Tacrolimus in Abb. 20.

Gruppe	Anzahl der Fälle	Achsenabschnitt a (±95% CI)	Steigung b (±95% CI)
Tac-DBS ₀	101	-1,28 (-2,49 – -0,30)	1,402 (1,246 – 1,640)
Tac-DBS ₂	106	-0,77 (-3,43 – 0,61)	1,230 (1,106 – 1,390)
Tac-IC ₀	101	-0,42 (-1,15 – 0,35)	1,178 (1,063 – 1,304)
Tac-IC ₂	106	0,40 (-0,90 – 1,75)	1,104 (1,021 – 1,194)
Tac-ICDBS ₀	101	-0,95 (-2,05 – -0,03)	1,240 (1,072 – 1,411)
Tac-ICDBS ₂	106	-1,69 (-3,62 – 0,05)	1,148 (1,036 – 1,299)
Tac-DBS ₀ Hk	88	-2,69 (-4,43 - -1,20)	1,482 (1,236 – 1,778)
Tac-DBS ₂ Hk	92	-1,40 (-3,92 – 0,71)	1,079 (0,907 – 1,293)

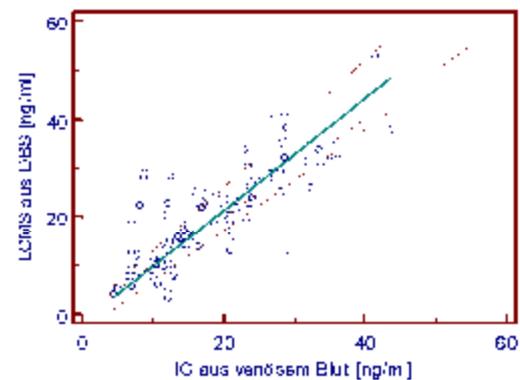
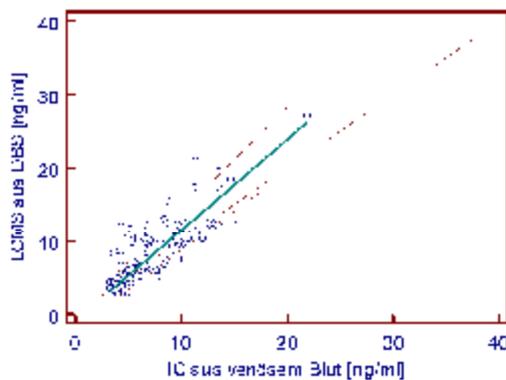
a) Tacrolimus: LCMS (DBS) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



b) Tacrolimus: IC (venös) vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel



c) Tacrolimus: LCMS (DBS) vs IC (venös), Tal- und Peakspiegel



d) Tacrolimus: LCMS (DBS) Hk normiert vs LCMS (venös), Tal- und Peakspiegel

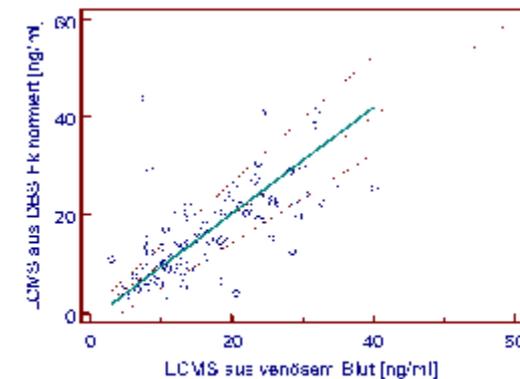
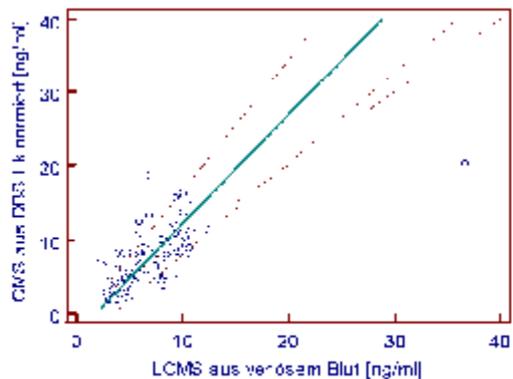


Abbildung 20 (siehe S. 75): Passing-Bablok Regression für die Analyse von Tacrolimus. a) Tac-DBS₀ und Tac-DBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b) Tac-IC₀ und Tac-IC₂ für die Methoden Immunchemie versus LCMS aus venösem Blut, c) Tac-ICDBS₀ und Tac-ICDBS₂ für die Methoden LCMS aus DBS versus Immunchemie aus venösem Blut d) Tac-DBS₀Hk und Tac-DBS₂Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut.

Für die Berechnung des Achsenabschnitts (a) lagen die Werte zwischen -2,69 (Tac-DBS₀Hk) und 0,40 für die Gruppe Tac-IC₂. Die Steigung (b) zeigte Werte zwischen 1,079 (Tac-DBS₂Hk) und 1,482 (Tac-DBS₀Hk). Die Tac-Gruppen zeigten eine geringere Korrelation zur jeweiligen Referenzmethode als bei der Cyc-Medikation (Abb. 20, Tab. 17).

3.4. Darstellung der pharmakologischen Berechnungen

Im Rahmen der Studie wurden C₀- und C₂-Spiegel gemessen. Die pharmakologische Beurteilung der Messwerte erfolgt in der Routine über therapeutische Bereiche. Zur Analyse der Daten wurden die Spiegel der Referenzmethode mittels LCMS aus venösem Blut verwendet.

Für die Gruppe Cyc standen 96 Wertepaare der LCMS-Analyse aus venösem zur Verfügung. In der Gruppe Cyc-C₀ lag der MW der Messwerte bei 127,7 ± 45,3 ng/ml mit einem Bereich von 46,4 bis 301,5 ng/ml. 25 (26%) der Cyc-C₀-Spiegel lagen unterhalb des therapeutischen Bereichs von 100 ng/ml. Bei 3 (3%) der Probanden wurden Messwerte oberhalb von 225 ng/ml gemessen.

Die Cyc-C₂-Werte ergaben einen MW von 740,7 ± 285,0 ng/ml (Bereich: 57,8 bis 1350,0 ng/ml). 5 (5%) der Messwerte der Gruppe Cyc-C₂ lagen unterhalb des therapeutischen Bereichs von 1200 ng/ml. Der höchste Messwert der Cyc-C₂-Gruppe lag mit 1350 ng/ml innerhalb des therapeutischen Bereichs.

In der Gruppe der Patienten mit Tac-Medikation lagen 104 Wertepaare vor. In der Tac-C₀-Gruppe wurde ein MW von 6,8 ± 3,8 ng/ml berechnet (Bereich: 2,3 bis 36,6 ng/ml). 35 (34%) der Werte aus der Gruppe Tac-C₀ lagen unter dem therapeutischen Bereichs von 5 ng/ml. In der Gruppe lag 1 (1%) Wert oberhalb des therapeutischen Bereichs von 15 ng/ml.

Für die Gruppe Tac-C₂ lagen keine therapeutischen Bereiche aus der Literatur vor. Hier lag der MW bei $16,3 \pm 8,0$ ng/ml (Bereich: 3,0 bis 40,2 ng/ml).

Die Messwerte der LCMS-Analyse aus DBS lagen, wie aus den Daten des Methodenvergleichs zu erwarten, höher als bei der Messung aus venösem Blut (Abb. 21).

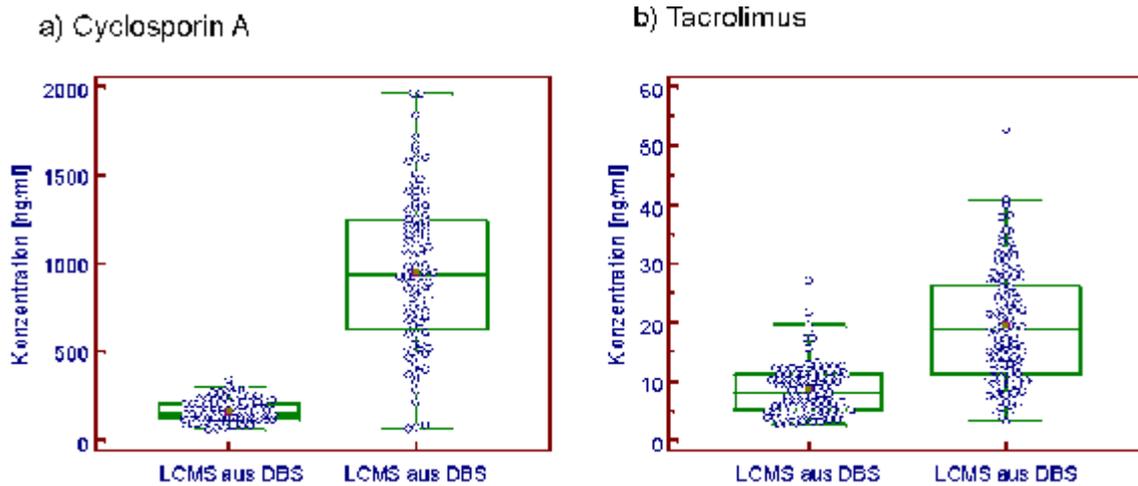


Abbildung 21: Box-Plots zur Verteilung der mittels LCMS aus den DBS gemessenen Konzentrationen für Cyclosporin A (a) und Tacrolimus (b).

3.4.1. Berechnung der Eliminationshalbwertszeit aus C₀- und C₂-Spiegeln

Therapeutische Bereiche geben Grenzwerte für ein Pharmakon an, innerhalb derer zum einen eine erwünschte Wirkung zu erwarten ist und zum anderen unerwünschte Wirkungen nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auftreten [104]. Die Bewertung bezieht sich auf einen Messzeitpunkt. Insbesondere bei Pharmaka, die eine große Streuung in ihrer Pharmakokinetik aufweisen, kann an Hand eines einzelnen Messpunktes nicht ausgeschlossen werden, dass die Konzentration im Therapieverlauf außerhalb des therapeutischen Bereichs liegt. Insbesondere Patienten mit einer kurzen Eliminationshalbwertszeit (t_{elim}) weisen hohe C₂-Spiegel bei normalen C₀-Spiegeln auf. Aus den vorliegenden Messwerten wurde t_{elim} berechnet (siehe 2.2.4). Hierbei wurde postuliert, dass die Pharmaka einem Ein-Kompartiment-Modell unterliegen. Die C₀-Spiegel wurden vor dem C₂-Spiegel entnommen. Um die t_{elim} berechnen zu können, wurde postuliert, dass der C₀-

Spiegel dem Messwert am Ende des Wirkungsintervalls nach Gabe im *Steady state* entspricht (C_{12} -Spiegel).

In der Gruppe Cyc standen 96 Wertepaare zur Verfügung. Bei 3 Wertepaaren lag der C_0 -Spiegel über dem C_2 -Spiegel. Diese Werte wurden ausgeschlossen. Die auf diese Weise berechnete t_{elim} lag für Cyc bei $4,3 \pm 1,5$ h mit einem Bereich von 2,6 bis 11,1 h.

Bei den Teilnehmern mit Tac-Medikation standen 104 Wertepaare zur Verfügung. Bei 4 Wertepaaren wurde ein C_0 -Spiegel gemessen, der größer oder gleich dem C_2 -Spiegel war. Auch diese Werte wurden aus der Berechnung ausgeschlossen. In der Tac-Gruppe lag der MW für t_{elim} bei $14,4 \pm 20,7$ h mit einem Bereich von 3,7 bis 128,9 h.

3.4.2. Verhältnis von C_0 - zu C_2 -Spiegeln

Die Berechnung des Verhältnis von C_0 - zu C_2 -Spiegeln Q_c bietet die Möglichkeit einer mathematisch einfacheren Näherung an die t_{elim} . Darüber hinaus kann Q_c Aufschluss über die Resorption des Pharmakons bieten. In diesem Fall ist bei vergleichbarer Bioverfügbarkeit eine gute Korrelation zur relativen Dosis D_{rel} zu erwarten.

Für Cyc wurde ein MW für Q_c von $0,220 \pm 0,201$ mit einem Bereich von 0,1 bis 1,5 berechnet. Für die Korrelation zu D_{rel} wurde einer Geradengleichung von

$$Q_c(\text{Cyc}) = -0,05 * D_{rel} + 0,424 \quad (r=-0,3299)$$

berechnet. Die Berechnung der Geradengleichung zu t_{elim} ergab folgende Funktion (Abb. 22):

$$Q_c(\text{Cyc}) = 0,074 * t_{elim} - 0,033 \quad (r=0,9879)$$

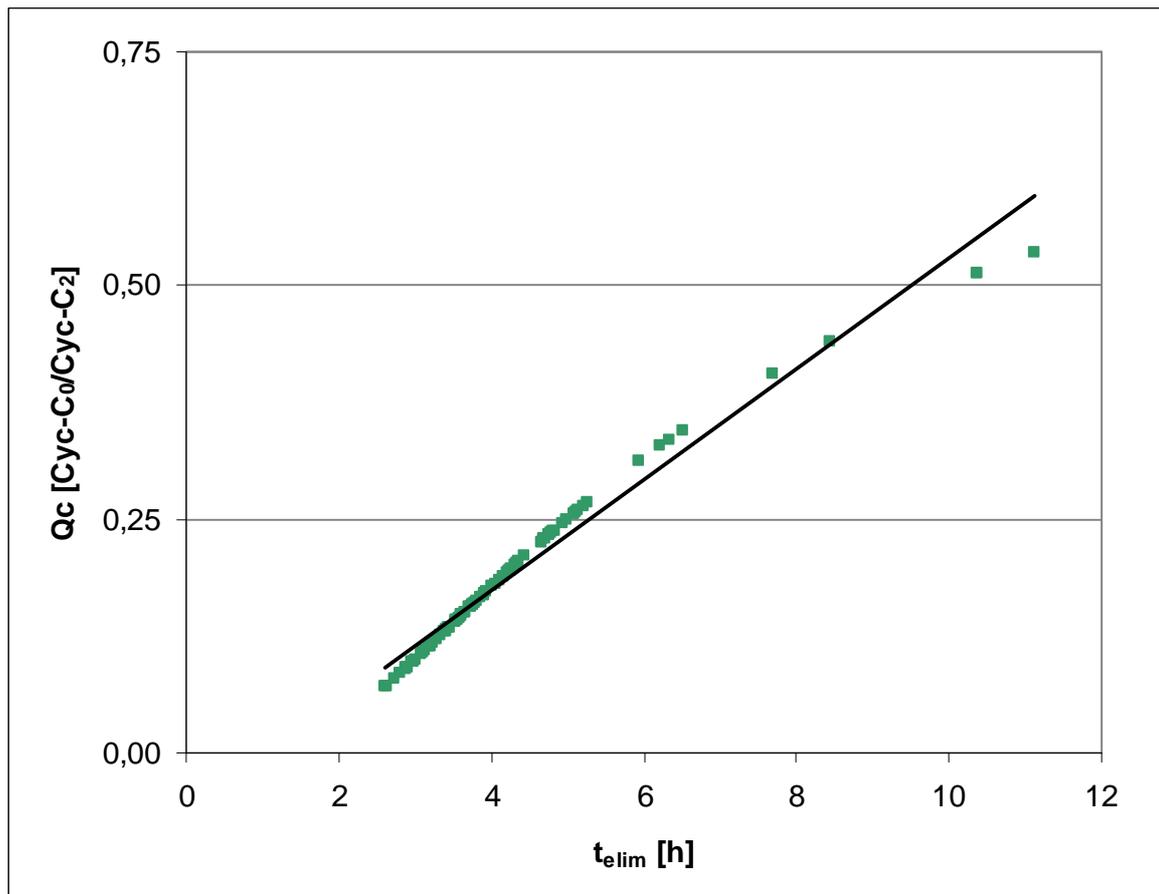


Abbildung 22: Darstellung der berechneten t_{elim} zum Verhältnis von C_0 - zu C_2 -Spiegeln für Cyclosporin mit linearer Korrelation der Werte.

In der Gruppe der Patienten mit Tac-Medikation ergab sich ein MW für Q_c von $0,490 \pm 0,311$ (Bereich: 0,2 bis 2,7). Die Berechnung der Geradengleichung ergab folgende Funktion:

$$Q_c(\text{Tac}) = -1,45 * D_{rel} + 0,652 \quad (r=-0,2939)$$

Für die Proportionalität von Q_c zu t_{elim} wurde die Geradengleichung wie folgt ermittelt (Abb. 23):

$$Q_c(\text{Tac}) = 0,009 * t_{elim} + 0,38 \quad (r=0,7732)$$

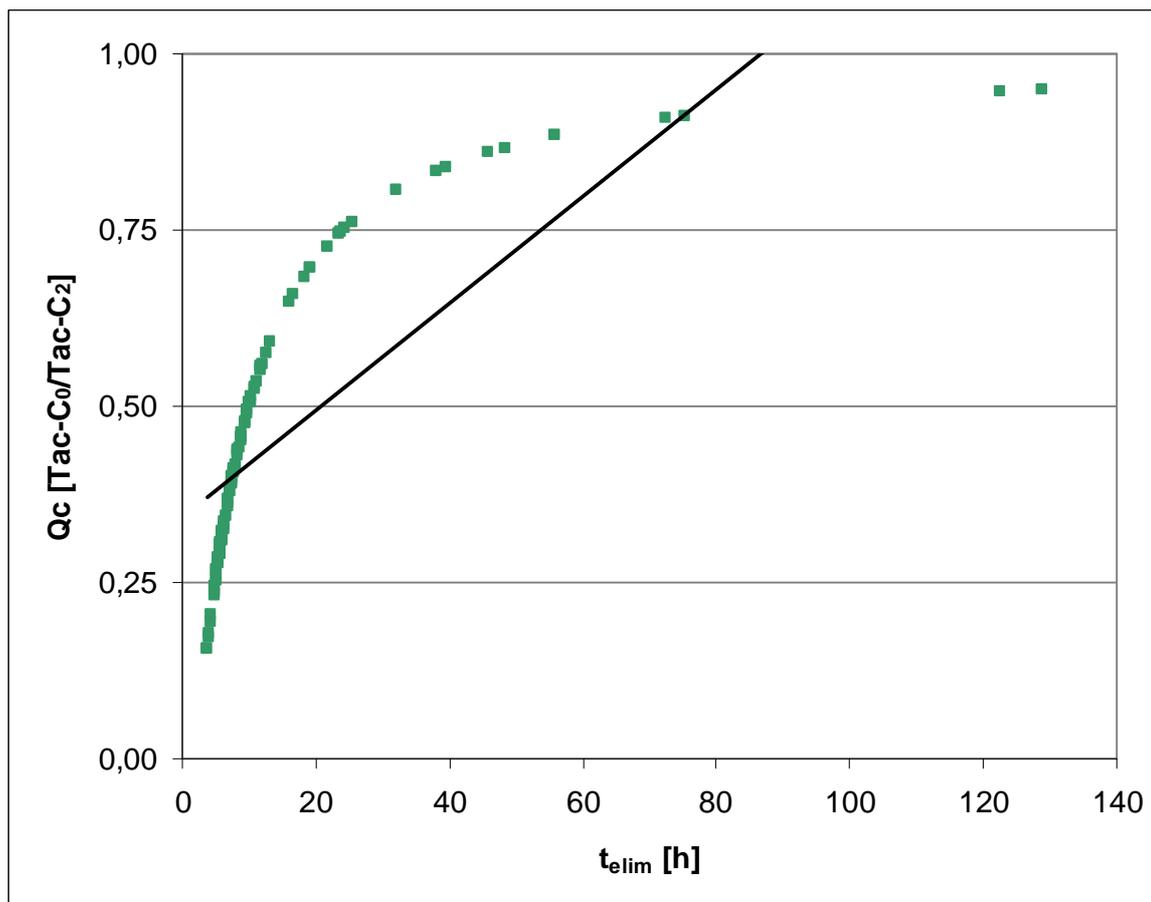


Abbildung 23: Darstellung der berechneten t_{elim} zum Verhältnis von C_0 - zu C_2 -Spiegeln für Tacrolimus mit linearer Korrelation der Werte.

3.4.3. Verhältnis der relativen Dosis zu den C_0 - und C_2 -Spiegeln

Über die in 2.2.4 und 3.4.1 sowie 3.4.2 beschriebenen pharmakologischen Berechnungen und Darstellungen wurde das Verhältnis der relativen Dosis des Pharmakons zu den C_0 - (Q_{DC0}) und C_2 -Spiegeln (Q_{DC2}) untersucht (siehe 2.2.4; Formel 8.6).

Für das Verhältnis Q_{DC0} ergab sich in der Cyc-Gruppe ein MW von $33,7 \pm 14,0$. Das Verhältnis Q_{DC2} lieferte einen MW von 186 ± 70 . Die Korrelation von C_0 -Spiegel zu D_{rel} ist mit $r=0,2495$ relativ gering. Für die C_2 -Spiegel ergab sich ein etwas höherer Korrelationskoeffizient mit $r=0,5230$.

Die Berechnungen von Q_{DC0} für die Patientengruppe mit Tac-Medikation ergab einen MW von 89 ± 79 . Der MW für Q_{DC2} lag bei 189 ± 118 . Die Korrelation von C_0 -Spiegel zu D_{rel} war mit $r=0,0550$ gering. Für die C_2 -Spiegel war die Korrelation mit $r=0,4834$ etwas höher.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten analytischen und konzeptionellen Weiterentwicklungen des TDMs von CNIs bei NTx-Patienten sollen zu einer Erhöhung des Therapieerfolgs und der Lebensqualität der Patienten beitragen. Insbesondere auf Grund der hohen inter- und intraindividuellen Variabilität in der Resorption und Elimination der CNIs besteht die Hoffnung so auch die Lebenserwartung des Transplantats verlängern zu können. Die CNIs zeigen eine geringe therapeutische Breite, da Abstoßungsreaktionen bei Unterdosierungen und toxische Effekte bei hohen Konzentrationen unter anderem die Lebenserwartung des Transplantats beeinträchtigen [105]. Die therapeutischen Bereiche stehen in Abhängigkeit von dem transplantierten Organ, dem Zeitpunkt der Probennahme, der Medikation mit anderen Immunsuppressiva und der patientenspezifischen Pharmakokinetik des CNIs.

Im TDM werden in der Praxis Methoden mit unterschiedlicher Selektivität, Präzision und Richtigkeit eingesetzt. Dieses wurde von Holt et al. an methodenspezifischen Abweichungen vom Zielwert von Ringversuchen gezeigt [39, 106]. Die Analyse aus venösem Blut entspricht zur Zeit der gängigen Praxis. Korrelation zu Referenzmethoden und Praktikabilität von Methoden zur quantitativen Bestimmung von CNIs aus Kapillarblut oder DBS wurden in verschiedenen Arbeiten seit 1987 untersucht [83], finden zur Zeit in der Praxis jedoch nur selten Anwendung. In der Literatur wurden Methoden zum Nachweis einzelner Immunsuppressiva aus Kapillarblut oder DBS publiziert (Tab. 18, S. 88, 89). Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zum Nachweis von CNIs aus DBS stellt eine Weiterentwicklung der in der Literatur beschriebenen Methoden dar. Bei geringem Aufwand für die Probenaufarbeitung und kurzen Analysenzeiten kann sie effektiv im TDM eingesetzt werden. In der Arbeit werden Untersuchungen zur Methodenoptimierung und Validation dargestellt. Im Rahmen einer klinischen Studie fand ein Methodenvergleich mit herkömmlichen Methoden statt. In diesem Zusammenhang konnte auch die Praxistauglichkeit für das stationäre Umfeld nachgewiesen werden. Die kapillare Blutentnahme wurde dabei durch medizinisches Personal durchgeführt. Die Messwerte der LCMS-Analyse aus DBS wurde durch einen Korrekturfaktor mittels des Hämatokrit normiert und erneut mit der Referenzmethode verglichen.

4.1. Methodenentwicklung und Validation

Bei der Methodenentwicklung wurde der Fokus auf die Extraktion der Analyten aus den DBS gelegt. Die absolute Wiederfindung der Analyten nach Extraktion von der Filterkarte erfordert einen hohen experimentellen Aufwand, somit wurde die relative Extraktionsausbeute als Beurteilungskriterium herangezogen. Die variierten Parameter waren die Zusammensetzung des Extraktionsmittels, der Extraktionstemperatur respektive Extraktionsdauer und das Verhältnis des Extraktionsmittels zu der Größe des DBS. Ziel war es, eine maximale Reproduzierbarkeit unter Berücksichtigung der therapeutischen Bereiche bei hoher Selektivität mit einer ökonomischen Vorgehensweise zu erreichen.

Die Zusammensetzung des Extraktionsmittels zeigte einen großen Einfluss auf die relative Extraktionsausbeute (Abb. 7). Der Erhöhung des hydrophilen Anteils des Extraktionsmittels führte zu einer stärkeren Matrixbelastung der Extrakte wohingegen die Extraktionsausbeute bei Verwendung lipophiler Komponenten geringer war. Methanol zeigte höhere Wiederfindungen als Acetonitril. Leichtle et al. extrahierten mit Methanol ohne Zugabe von ZnSO_4 [72]. Keevil et al. verwendeten Acetonitril anstatt Methanol, nachdem eine ZnSO_4 -Lösung mit einer Konzentration von 0,4 mol/l vorgelegt wurde [71]. Die Analyse erfolgte direkt aus Kapillarblut, das mit EDTA-beschichteten Kapillaren entnommen wurde. Wilhelm et al. konnten mit einer Extraktion mit Methanol und Wasser (1:1) eine Wiederfindung der Analyten von dem Filterpapier von 97% belegen [84]. In unseren Versuchen konnte durch Zugabe einer wässrigen ZnSO_4 -Lösung die Extraktionsausbeute weiter erhöht werden. Hoogtanders et al. verwendeten eine Mischung aus Methanol und Acetonitril für den Nachweis von Tac aus DBS [80]. In dieser Arbeit wurden die einzelnen Reagenzien gemischt und in einem Arbeitsschritt zu der Probe gegeben. Diese effiziente Vorgehensweise verringert auch die Gefahr von Handhabungsfehlern.

Bei der Optimierung des Volumens des Extraktionsmittels und der Größe des ausgestanzten DBS wurden die Höhe des Messsignals und das *Signal to Noise* als Bewertungskriterium herangezogen. Für den Autosampler ist ein Mindestvolumen von 100 μl erforderlich. Da die Probe auf der Filterkarte im Gegensatz zur flüssigen EDTA-Blutprobe nicht homogen verteilt ist, sollte eine repräsentative Stichprobe entnommen werden. Größere Durchmesser erhöhen die Repräsentation

tivität der Probennahme. Es ist darauf zu achten, dass der Fläche der Spots und der Stanzdurchmesser so gewählt ist, dass ein Großteil der aufgegebenen Probe der Analyse zugeführt wird. Auf Grund des niedrigen therapeutischen Bereichs von Tac wurde hier eine höhere Empfindlichkeit gefordert. Um einen DBS mit einer Größe von mehr als 10 mm zu erhalten, müssen mindestens 50 µl Blut auf das Filterpapier aufgetragen werden. In allen Studienproben standen ausreichend große Spots auf dem Filterpapier zur Verfügung. Bei Verwendung empfindlicherer LCMS-Systeme können geringere Durchmesser des DBS Anwendung finden bei gegebenenfalls weniger repräsentativen Stichproben respektive geringerer Reproduzierbarkeit. Der Einsatz von mechanischen Stanzen kann sowohl die Handhabung erleichtern als auch exaktere Durchmesser des DBS sicherstellen.

Die Untersuchung von Blutproben mit unterschiedlichem Hämatokrit (0,22 bis 0,54 l/l) konnte eine lineare antiproportionale Beziehung zur Fläche des DBS (132,73 bis 92,03 mm²) belegen (Abb. 9). Diese Beobachtung legt einen relevanten Einfluss des Hämatokrit auf die Konzentration der Analyten auf dem Filterpapier nahe.

Die Extraktionszeit hatte nur einen geringen Einfluss auf die Ausbeute der Analyten (Abb. 11). Bei einer Extraktionsdauer von 20 min war eine nahezu vollständige Extraktion der Analyten bei vertretbarem Zeitaufwand sichergestellt. Eine Extraktionsdauer von 60 min, wie bei Hoogtanders et al., scheint nicht erforderlich [80]. Die Variation der Extraktionstemperatur zeigte ebenfalls einen geringen Effekt (Abb. 12). Hinchliffe et al. führten eine methanolische Extraktion bei 80°C im Ultraschallbad durch [85]. Für die Methode wurden diejenigen Bedingungen gewählt, die standardisierbar sind, im Labor reproduzierbar eingehalten werden können und eine Robustheit der Methode sicherstellen. Die Versuche zeigen jedoch auch, dass hier noch Optimierungspotential besteht.

Der Messbereich der Methode wurde im Rahmen der Studie in der Praxis geprüft. Der lineare Bereich für Cyc deckt den therapeutischen Bereich bis 1400 ng/ml weitestgehend ab. In 16 Studienproben lagen die Werte oberhalb des linearen Bereichs (bis 1964 ng/ml). Für Tac wurden 3 Werte ermittelt, die oberhalb des linearen Bereichs lagen (bis 52,8 ng/ml). Für die gemessenen C₂-Spiegel liegen keine therapeutischen Bereiche vor. Eine Verdünnung von Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs erfolgte auf Grund des geringen Proben-

volumens nicht. Diese Werte wurden durch Extrapolation über den Kalibrationsbereich hinaus berechnet. Die untere Messbereichsgrenze stellt die Bestimmungsgrenze x_{BG} der Methode dar, da erst ab diesem Wert eine quantitative Bestimmung mit einer ausreichenden Präzision und Reproduzierbarkeit erfolgen kann. In der Studie wurde bei keinem der Tac- oder Cyc-Patienten Werte unterhalb der x_{BG} nachgewiesen. Bei allen Studienteilnehmern konnte das verabreichte CNI nachgewiesen werden. Somit konnte für die Methode eine ausreichende Empfindlichkeit und Linearität nachgewiesen werden. Keevil et al. konnten an Hand gespikter Proben für Cyc eine Linearität bis 5000 ng/ml zeigen [71]. Durch die Verwendung von *in-house* Kalibratoren mit höheren Konzentrationen kann der Messbereich der Methode experimentell erweitert werden.

Bei der Untersuchung der Genauigkeit der Analysenmethode konnten für fast alle Konzentrationen eine ausreichende Präzision und Richtigkeit ermittelt werden. Für den Level 3 bei Cyc wurde ein β -Toleranzintervall größer als 30% berechnet. Dieses kann darauf zurückzuführen sein, dass die Konzentrationen der verwendeten kommerziellen Kalibratoren nicht äquidistant über den Messbereich verteilt sind. Da die Konzentration des obersten Kalibrators mehr als doppelt so hoch wie die des nächst kleineren ist, haben Streuungen der Messwerte dieses Kalibrators einen erheblichen Einfluss auf die Berechnung der Kalibrationsgeraden. Eine Verwendung einer Kalibration mit äquidistanten Konzentrationsintervallen ist daher anzustreben.

Bei Verwendung von *in-house* Kalibratoren können Löslichkeit der Analyten und Adsorptionseffekte die Richtigkeit beeinflussen. Zur Zeit stehen keine geeigneten kommerziellen Kalibratoren zur Verfügung. Keevil et al. zeigten in ihrer Studie für Cyc ähnliche Variationskoeffizienten im Interassay mit 6 bis 7% wie in der vorliegenden Arbeit [71]. Hinchliffe et al. zeigten, dass kommerzielle Kalibratoren ein anderes Fließverhalten auf der Filterkarte aufweisen. Vollblutkalibratoren sind vergleichbar mit den Patientenproben [85].

Die Selektivität wurde im Rahmen der in der Studie erhobenen Daten zur Medikation und durch eine Literaturrecherche belegt. Störsignale durch verabreichte Pharmaka konnten bei der Analyse der Proben aus der klinischen Studie nicht beobachtet werden. Auf diese Weise wurden über 50 Co-Medikationen *in vivo* auf Interferenzen in der beschriebenen Methode untersucht.

In der Studie von Keevil et al. wurden auf gleiche Weise Interferenzen in der Methode an Hand von Patientenproben unter Angabe der Medikation untersucht [71]. Wie in unserer Studie konnten keine interferierenden Peaks nachgewiesen werden.

Darüber hinaus zeigt eine Literaturrecherche von 1720 Xenobiotika auf isobare Massenübergänge, dass nur Rifampicin das gleiche Masse zu Ladungsverhältnis wie Tac besitzt. Die Tochterionen des Rifampicins interferieren jedoch nicht mit denen des Tac [107, 108]. Es konnten keine Interferenzen mit anderen Xenobiotika nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft macht chromatographisch-massenspektrometrische Methoden zu Referenzmethoden respektive Goldstandards [29]. Von immunchemischen Methoden kann verfahrensbedingt eine derartig hohe Selektivität nicht erwartet werden.

Ein wesentlicher Vorteil der hier vorgestellten Methode ist die Versendung von Filterkarten statt Blutproben in das untersuchende Labor. Filterkarten sind im Gegensatz zu Blutproben in Röhrchen bruchstabil und nicht infektiös. Somit ergeben sich aber auch Anforderungen an die Stabilität der Analyten auf der Filterkarte. In einer Studie von Leichtle et al. wurde die Stabilität von Cyc in 18 EDTA-stabilisierten DBS über einen Zeitraum von 24 h bei 8°C und 20°C untersucht. Es wurde ein signifikanter Abfall der Cyc-Konzentrationen nachgewiesen [72]. In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse nicht beobachtet werden. Sowohl in EDTA- als auch in Natriumfluorid-stabilisierten DBS bei 4°C respektive Raumtemperatur konnte kein relevanter Verlust der Analyten über einen Zeitraum von 81 h (Tac) respektive 96 h (Cyc) nachgewiesen werden (Abb. 13). Auch in einem weiteren Ansatz mit auf Filterpapier aufgetragenen kommerziellen Kalibratoren zeigten sich nur geringe Verluste der Analyten über einem Zeitraum von 14 Tagen. Somit konnte eine Stabilität der CNIs in den DBS belegt werden, die einen Probenversand innerhalb von Tagen erlaubt. Keevil et al. fanden für Cyc eine akzeptable Stabilität bei Raumtemperatur [71]. Cheung et al. verglichen Tac-Spiegel aus DBS nach Aufbewahrung über einen Zeitraum von 16 – 78 Tagen. An Hand der hohen Korrelation der Messung aus DBS und venösem Blut wurde auf ausreichende Stabilität des CNIs geschlossen [79]. Diese Daten korrelieren mit den hier dargestellten Ergebnissen und anderen Studien [80, 85].

4.2. Bewertung der Ergebnisse der klinischen Studie

Zur statistischen Bewertung der Analyseergebnisse standen gemäß der Fallzahlberechnung ausreichend Patienten gemäß den Einschlusskriterien zur Verfügung. Nur in wenigen Fällen waren die Angaben auf dem Dokumentationsbogen nicht vollständig. Die Vitalparameter wurden statistisch ausgewertet. Aus den Angaben wurde die glomeruläre Filtrationsrate (Cl_{CG} und $eGFR$) berechnet. Hierbei zeigte sich bei einem Großteil der Probanden eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion (Abb. 14). Einschränkend muss für die $eGFR$ mittels MDRD-Formel hinzugefügt werden, dass diese Formel für chronisch Nierenkranke mit stabil eingeschränkter glomerulärer Filtrationsleistung validiert wurde. Viele der in dieser Studie untersuchten Patienten wurden allerdings direkt im Anschluss an eine Nierentransplantation eingeschlossen, so dass nicht prinzipiell eine bereits stabile Nierenfunktion angenommen werden kann. Dies kommt auch durch die teilweise Entwicklung der Patienten-spezifischen Kreatinin-Sequenzen zum Ausdruck.

Die Hämatokritwerte der Studienteilnehmer zeigten für die Cyc-Gruppe einem Mittelwert von 0,28 l/l und für die Tac-Gruppe von 0,3 l/l unterhalb des Normbereichs. Die geringeren Hämatokritwerte der nierentransplantierten Patienten beruhen sich in der eingeschränkten Nierenleistung in diesem Patientenkollektiv, mit oftmals hieraus resultierender renaler Anämie. Es erfolgte keine weitere Beurteilung der Nierenfunktion und Vitalparameter auf Grund der kurzen Studiendauer von unter 14 Tagen.

Wie in anderen Studien wurde neben einem Methodenvergleich über eine Regression nach Passing und Bablok auch die Darstellung im Bland-Altman Plot durchgeführt. Darüber hinaus fand eine Prüfung auf Methodenäquivalenz nach DIN 53804 statt.

4.2.1. Bewertung der Studienergebnisse für Cyclosporin A

Keevil et al. zeigten in einer Vergleichsstudie mit Cyc-Patienten zwischen Kapillarblut und venösem Blut eine gute Korrelation beider Methoden. Die Steigung der Geradengleichung der linearen Korrelation zeigte einen Wert von 0,99. Im Bland-Altman Plot lag der Mittelwert der Differenzen wie in der vorliegenden Studie im negativen Bereich. Die Patientenzahlen waren geringer als in der vorliegenden Studie. C_2 -Spiegel wurden nicht einbezogen [71]. Für die Gruppe Cyc C_0 -Spiegel

sind die SD und der MW der Differenzen vergleichbar mit den Ergebnissen aus dieser Studie.

Leichtle et al. untersuchten Cyc-Konzentrationen aus venösem Blut, DBS und EDTA-stabilisiertem Kapillarblut an leber- und nierentransplantierten Patienten. Es wurden sowohl C_0 - als auch C_2 -Spiegel gemessen. Die mittleren Konzentrationen der einzelnen Methoden unterschieden sich signifikant. In DBS wurde in allen Gruppen höhere Konzentrationen gemessen [72]. Auch in vorliegender Studie lagen die Spiegel für Cyc aus DBS etwas höher als aus venösem Blut mittels LCMS, wie an dem negativen MW der Differenzen im Bland-Altman Plot von -23,3% und -21,4% für C_0 - und C_2 -Spiegel gezeigt wurde (Abb. 17, Tab. 14). Dieser Befund steht in einem gewissen Widerspruch zu der geringen Stabilität für Cyc, die von Leichtle et al. beobachtet wurde, da bei Instabilität mit niedrigeren Konzentrationen in den DBS zu rechnen wäre. In EDTA-stabilisiertem Kapillarblut wurden niedrigere Konzentrationen als aus DBS beobachtet. Somit ist zu vermuten, dass der Effekt nicht auf höhere Konzentrationen im Kapillarblut zurückzuführen ist. Die schwächere Korrelation kann auf das geringe Injektionsvolumen der DBS-Methode zurückzuführen sein. Hier spielen Faktoren wie eine geringere Empfindlichkeit und damit Reproduzierbarkeit aber auch eine mögliche Inhomogenität des DBS sowie die Repräsentativität der Probennahme eine Rolle. Auch der Hämatokrit kann die Viskosität des Blutes und damit die Verteilung auf der Filterkarte beeinflussen [109].

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der klinischen Studie nach DIN 53804 für die Patienten mit Cyc-Medikation konnte nur für die Methoden Immunchemie versus DBS aus C_2 -Spiegeln eine Methodenäquivalenz nachgewiesen werden. Eine Äquivalenz der DBS-Methode zur Referenzmethode lag nicht vor, da in diesen Gruppen der Prüfwert über dem Tabellenwert lag und somit die Vertrauensbereiche für die Differenzen der Erwartungswerte berechnet wurden. Die Auswertung der Bland-Altman Plots der einzelnen Studiengruppen zeigten vergleichbare MW und SD (Tab. 14).

Tabelle 18: Literaturübersicht für die Analyse von Tacrolimus und Cyclosporin A aus alternativen Matrices: Dried Blood Spot (DBS), Kapillarblut (KB) und Speichel (SP). E1 – Extraktionslösung; E2 – Extraktionsbedingungen; ST – Stabilität; BA - Bland-Altman Plot; PB - Passing-Bablok Regression. Fortsetzung der Tabelle auf S. 89.

Analyt	Matrix	Extraktion	Methode	Bemerkung	Literatur
Tac	KB		LCMS IC	N = 172 [VB]=[KB]-0,58 ng/ml	Accrot et al. (2006) [69]
Tac	DBS KB	Ø 7,5 mm DBS	LCMS	AUC: limited sampling strategy (C ₂ , C ₄) ST: bis 78 Tage BA: 11% (-14,1% – 36,1%) PB: [VB] = 0,95 [DBS] - 0,39 (R ² =0,96)	Cheung et al. (2007) [79]
Tac	DBS	Ø 7,5 mm DBS	LCMS	ST: Tage bei RT BA: <15% (N=26)	Hoogtanders et al. (2007) [81]
Tac	DBS	IS: Ascomycin Ø 7,5 mm DBS E1: Methanol / Acetonitril 40:10 E2: 60 min	LCMS	ST: Tage bei RT N=24 BA: -0,71% ± 14% (2 SD) PB: [DBS]=1,0545[VB]-0,29	Hoogtanders et al. (2007) [80]
Tac	KB		LCMS IC	N=172 BA: [KB] > [VB] Regression: R ² =0,8451	Webb et al. (2005) [77]
Tac	KB		LCMS	N=65 BA: 0,114 ± 0,0797 µg/l (2 SD) PB: [DBS]=1,02[VB]-0,06	Keevil et al. (2009) [70]
Tac Cyc	DBS	IS: Ascomycin, Cyc-d12 Ø 6 mm DBS E1: Methanol E2: 30 min 80°C Ultraschall	LCMS	ST: 14 Tage RT N=150 BA Cyc: -4,9 (-82,7 – 52,8) µg/l BA Tac: -0,4 (-2,8 – 2,0) µg/l PB Cyc: [DBS]=1,02[VB]+0,99 PB Tac: [DBS]=0,97[VB]-0,16	Hinchliffe et al. (2012) [85]
Cyc Kreatinin	KB		LCMS	PB: [DBS]=0,99[VB]-4,2 (R=0,98)	Keevil et al. (2002) [63]
Cyc	DBS	Ø 10 mm DBS E1: Tris/Tween Lösung E2: 5 min Ultraschall	IC		Lampe et al. (1987) [83]
Cyc	DBS KB	Ø 4 mm DBS E1: Methanol E2: 20 min	LCMS	ST (DBS): < 24 h (8°C, 20°C) Median: [DBS] > [KB] > [VB]	Leichtle et al. (2010) [72]
Cyc	SP		LCMS	N=15 Regression: R=0,695	Mendonza et al. (2004) [86]
Cyc	KB		LCMS	N=102 BA: 2,6% ± 9,5% PB: [KB]=1,1878[VB]-22,42 (R ² =0,8691)	Merton et al. (2000) [73]
Cyc	KB		IC	N=40 BA: < 0 ng/ml	Pettersen et al. (1999) [74]
Cyc	KB		IC	N=18 Regression: [KB]=0,774[VB]-2,798 (R=0,92)	Profumo et al. (1995) [75]

Tabelle 18: Fortsetzung von S. 88.

Analyt	Matrix	Extraktion	Methode	Bemerkung	Literatur
Cyc	KB		LCMS	BA: -9,5 µg/l Regression: R ² =0,96	Webb et al. (2007) [76]
Cyc	DBS	IS: Cyclosporin D Ø 8 mm DBS E1: Wasser / Methanol 1:1 E2: 15 min RT + 15 min Ultraschall	LCMS	ST: 17 Tage (gekühlt) Einfluß Hk (0,2 – 0,72 l/l): -12% bis 14% Wiederfindung: 97%	Wilhelm et al. (2009) [84]
Cyc	KB	IS: Cyclosporin D	LCMS	N=225 ST: 5 Tage (RT, 37°C)	Yonan (2006) [78]

Auch in anderen Studien wurden relativ höhere Cyc-Konzentrationen in Kapillarblutproben als in venösem Blut nachgewiesen [66, 74, 75]. In einer Studie mit Kindern in einem Alter von 11,7 (\pm 3,6) Jahren konnten klinisch nicht relevante aber signifikant höhere Cyc-Konzentrationen (MW: -9,5 µg/l) im venösen Blut als im Kapillarblut nachgewiesen werden [76]. Diese Differenzen können auf die Mischung aus venösem, arteriellem und kapillarem Blut und die möglicherweise unterschiedlichen Konzentrationen der CNIs in diesen Kompartimenten zurückzuführen sein.

Dies könnte durch die Verwendung eines Korrekturfaktors zwischen Kapillarblut und den Konzentrationen im venösen Blut ausgeglichen werden. In diesem Sinne wurde in der vorliegenden Arbeit ein Faktor aus dem Hämatokrit der Kalibratoren und der Patientenproben eingeführt (siehe 2.2.3.8). Dieser Faktor liegt für die Cyc-Patienten zwischen 0,55 und 0,95 (MW: 0,76 \pm 0,1). Die korrigierten Cyc-Konzentrationen aus den DBS zeigen im Bland-Altman Plot eine Differenz der Mittelwerte von 4,7% und 7,3% für C₀- und C₂-Spiegel. Die Prüfung auf Gleichwertigkeit der Methoden LCMS aus venösem Blut mit den korrigierten DBS-Werten nach DIN 53804 zeigt eine Äquivalenz der Methoden. Alternativ kann die Verwendung von Vollblutkalibratoren zu einer Methodenäquivalenz führen [85].

Methodische Effekte wie Ionensuppression, Absorptionseffekte bei der Probenahme und Probenvorbereitung sowie die verwendeten Kalibratoren oder Referenzmaterialien können zusätzlich zum Hämatokrit einen systematischen Fehler hervorrufen.

4.2.2. Bewertung der Studienergebnisse für Tacrolimus

Cheung et al. untersuchten den Tac-Spiegel von 106 Patienten. Im Bland-Altman Plot zeigte sich, dass die Analyse aus den DBS um 11% höhere Messwerte lieferte als solche aus venösem Blut [79]. Hoogtanders et al. ermittelte im Methodenvergleich DBS versus LCMS aus venösem Blut keinen signifikanten Unterschied der Methoden. Eine Abweichung der Methoden von unter 15% wurde als akzeptabel bewertet. Die DBS-Konzentrationen waren höher als im venösen Blut [80, 81]. Acott et al. zeigten eine gute Korrelation zwischen der Analyse aus Kapillarblut mit LCMS und venösem Blut mittels Immunchemie [69].

Für den Methodenvergleich nach DIN 53804 in der vorliegenden Studie bei der Gruppe mit Tac-Medikation lagen die Tabellenwerte über dem Prüfwert. Sie zeigen somit keine Äquivalenz der Methoden. Die SD der Differenzen im Bland-Altman Plot zeigen ähnliche Tendenzen wie die der Cyc-Gruppe. Die Differenzen der MW liegen für die Gruppe Tac-DBS₀ und Tac-DBS₂ bei -22,3% und -16,6% (Abb. 18, Tab. 15). Die Standardabweichung zwischen den Methoden Immunchemie und LCMS aus venösem Blut ist geringer als aus DBS im Vergleich zur Referenzmethode. Dieser Befund wird durch die Regression nach Passing und Bablok mit einer Steigung von 1,402 und 1,230 bestätigt (Abb. 20, Tab. 17). Der Vergleich Immunchemie zur Referenzmethode zeigt ebenfalls mit einer Steigung über 1 eine geringere Korrelation zur Referenzmethode. Die Werte liegen bei 1,178 für Tac-IC₀ und 1,104 für Tac-IC₂.

Auch für die Bestimmung von Tac wurde eine Korrektur der Messwerte über den Hämatokrit vorgenommen. Mit den korrigierten Werten ergibt die Prüfung auf Gleichwertigkeit nach DIN 53804 wie in der Cyc-Gruppe eine Äquivalenz der Methoden. Die Mittelwerte der Differenzen im Bland-Altman Plot beträgt -0,5% und 3,9% für die Gruppen Tac-DBS₀Hk und Tac-DBS₂Hk.

4.2.3. Entnahme von Kapillarblut

Eine Befragung von Teilnehmern der Studie von Leichtle et al. zur Probennahme ergab, dass 91% der Patienten in der Lage waren, sich selbst Kapillarblut zu entnehmen. 61% bevorzugten die Entnahme von Kapillarblut vor der venösen Blutentnahme. 65% der Patienten zogen die Kapillarblutentnahme auf einer Filterkarte vor. Die Entnahme von EDTA-stabilisiertem Kapillarblut wurde nur von 18% bevor-

zugt [72]. Die Probennahme aus der Fingerbeere ist aus Gründen der Handhabbarkeit besser für die selbständige Probennahme durch den Patienten geeignet. Da die Analyseergebnisse aus dem Ohrläppchen und aus der Fingerbeere keine Differenzen der Cyc-Konzentrationen zeigten, spricht dieser Vorgehensweise nichts entgegen [73].

Die allgemein übliche Entnahme von Kapillarblut bei der vergleichsweise großen Gruppe von Diabetikern zeigt die gute Handhabbarkeit. Yonan et al. zeigten, dass 6% der selbst abgenommenen Kapillarblutproben von 52 Patienten nach Herztransplantation für die LCMS-Analyse ungeeignet waren [78]. Dieses kann rechtzeitig beim Probeneingang erkannt werden und Rücksprache mit dem Patienten erfolgen. Insofern kann die Fehlerrate noch deutlich reduziert werden. Eine Schulung der Patienten zur selbständigen Blutentnahme kann die Fehlerrate zudem noch weiter verringern. In der vorliegenden Studie erfolgte die kapilläre und venöse Blutentnahme durch medizinisches Fachpersonal unter stationären Bedingungen.

Eine Optimierung der Therapie von Transplantierten kann dadurch erfolgen, dass die CNI-Spiegel ambulanter Patienten bei Routineuntersuchungen bereits im Vorfeld des Behandlungstermins dem Untersucher vorliegen. Insbesondere für die Behandlung mit Cyc könnte die einfachere Bestimmung von C_2 -Spiegeln mittels im häuslichen Umfeld gewonnener Kapillarblutproben den Therapieerfolg erhöhen, da diese besser mit dem AUC und damit dem pharmakodynamischen Effekt korrelieren. Aktuell wird in der Routine ein C_2 -Spiegel aus venösem Blut nur selten bestimmt. Üblich ist lediglich die Bestimmung des C_0 -Spiegels. Eine Einhaltung des Probenahmezeitpunktes (± 15 min) erfordert allerdings eine hohe Compliance der Patienten, um Messfehler zu vermeiden [72]. Allerdings zeigt gerade auch die Routine der venösen Blutentnahme in Praxis, dass diese Zeitvorgabe bei gleichzeitiger Versorgung mehrerer Patienten kaum eingehalten werden kann. Die individuelle, vom Patienten durchgeführte kapilläre Blutentnahme, könnte somit auch hierbei einen Vorteil bieten. Die Kapillarblutentnahme ist zudem auch bei Kindern geeignet [69].

4.3. Pharmakologische Beurteilung

Nach pharmakologischer Beurteilung zeigte ein erheblicher Anteil der Spiegel in der vorliegenden Studie Werte außerhalb des therapeutischen Bereichs (Cyc-C₀ 29%; Tac-C₀ 35%). Ein Großteil der Messwerte lag unterhalb des therapeutischen Bereichs (Cyc-C₀ 26%; Tac-C₀ 34%). Die Dosisanpassungen, die während der Studie dokumentiert wurden, erlauben den Rückschluss, dass sich nicht alle Patienten im *Steady state* befanden. Einige der als Co-Medikation verabreichten Pharmaka interferieren an den CYP-Isoenzymen, die für die Resorption und Elimination der CNIs verantwortlich sind. Ciprofloxacin, Amiodaron und Clarithromycin sind Inhibitoren der CYP3A-Isoenzyme. Methylprednisolon und Carbamazepin hingegen induzieren den Metabolismus. Die Messwerte des TDMS der Immunsuppressiva sollten auch in dieser Hinsicht bewertet werden.

Der AUC zeigt die höchste Korrelation zu den pharmakodynamischen Effekten [110]. Die Berechnung erfordert jedoch 8 – 12 Messpunkte [110]. Reduzierte Probennahmestrategien erleichtern die Bestimmung des AUCs, so dass dieser beispielsweise an Hand von C₂- und C₄-Spiegeln berechnet werden kann. Durch reduzierte Probennahmestrategien ergibt sich die Möglichkeit, NTx-Patienten engmaschiger zu monitoren. Vorteile bieten beispielsweise die mögliche Bestimmung von C₀- und C₂-Spiegeln für die individuelle pharmakologische Beurteilung. Dies könnte auch zur Berechnung einer auf den einzelnen Patienten bezogenen Eliminationshalbwertszeit t_{elim} führen.

Die Berechnung der t_{elim} ergaben niedrigere Werte als in der Literatur beschrieben. Dieses kann auf die Näherung durch das Ein-Kompartiment-Modell, Dosisanpassungen sowie den Bezug auf das Dosierungsintervall von 12 h zurückzuführen sein. Eine mögliche Fehlerquelle steckt zudem in der artifizialen Annahme, der C₀- entspräche dem C₁₂-Spiegel. Dazu kann nicht in jedem Fall sichergestellt werden, dass die Resorption innerhalb der ersten 2 h nach Gabe vollständig abgeschlossen ist. In diesen Fällen ergibt sich eine falsch niedrige t_{elim} . Bei Einbeziehung dieser Aspekte wäre eine Probennahme 4 h und 12 h nach Gabe anzustreben. Die AUC deckt zusätzlich zur Elimination auch die Absorption des Pharmakons ab und wäre somit der t_{elim} vorzuziehen, bei jedoch erheblich höherem Messaufwand. Auffällige t_{elim} können Indizien für Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka oder genetischen Faktoren liefern. Bei niedrigen t_{elim} können

durch eine Verkürzung des Medikationsintervalls Spiegel innerhalb des therapeutischen Bereichs erreicht werden.

Das Verhältnis der C_0 - und C_2 -Spiegel zu t_{elim} zeigte für Cyc einen guten Korrelationskoeffizienten (Abb. 22). Dies ist bei Tac nicht gegeben, da t_{elim} in einem größeren Bereich streut und die Funktion nicht näherungsweise linear darstellt (3,7 – 128,9 h) (Abb. 23). Für das korrigierte Körpergewicht D_{rel} konnte nur eine schwache Korrelation zu Q_c und den C_0 - und C_2 -Spiegeln beobachtet werden. Insbesondere die schwache Korrelation von D_{rel} zu den C_2 -Spiegeln unterstreicht die inter- und intraindividuellen Schwankungen in der Resorption der CNIs.

4.4. Ausblick

Zukünftig könnte die Therapieüberwachung bei CNI-Medikation unter Einbeziehung einer selbständigen Probennahme des Patienten erfolgen, ohne jedoch den Datenfluss zum behandelnden Arzt zu behindern. Gleichzeitig könnten engmaschiger Daten erhoben werden, ohne unzumutbaren Aufwand für den Patienten und stark erhöhten logistischen Aufwand in den medizinischen Einrichtungen.

Die Analytik könnte auf weitere Parameter ausgedehnt werden. Hierbei wären vor allem Kreatinin und Cystatin C sowie weitere Immunsuppressiva wie Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus und Everolimus zu nennen. Durch die Einbeziehung von Kreatinin und/oder Cystatin C in die chromatographische Analyse könnten nephrotoxische Effekte auch bei ambulanten Patienten rechtzeitig ohne zusätzlichen Aufwand erkannt werden.

Durch die Verwendung deuterierter interner Standards könnte die Präzision der Analysenmethode erhöht werden. Das Problem der Homogenisierung des IS mit der DBS-Probe bleibt jedoch persistent. Mechanische Stanzen stellen eine Standardisierung der Größe des DBS sicher und erhöhen so die Präzision. Digitalfotos der Filterkarte böten zusätzlich Möglichkeiten der Qualitätskontrolle und Dokumentation. Weitere Automatisierungsschritte wären denkbar. Durch neue cellulosefreie Filterpapiere könnte die Wiederfindung aus dem DBS verbessert werden. DBS haben gegenüber der Entnahme mit EDTA-beschichteten Kapillaren den Vorteil der geringeren Infektiösität. Mögliche Lufteinschlüsse in der Kapillare können zu Volumenfehlern führen. Absorptionseffekte können sowohl auf Filter-

karten als auch in Polyethylen- oder Glaskapillaren einen Einfluss haben. Weitere Untersuchungen zu Matrixeffekten, Wiederfindung und Homogenität der DBS könnten weitere Verbesserungen mit sich bringen. Eine Probenvorbereitung in Form von Säulenschaltung oder Festphasenextraktion könnte Matrixeffekte minimieren und somit die Präzision verbessern. Eine Kalibration über einen breiteren Konzentrationsbereich mit äquidistanten Konzentrationsintervallen wäre eine einfache und effektive Maßnahme. Hierzu wären die Hersteller solcher Referenzmaterialien gefordert. Vollblutkalibratoren müssen im Labor aus analytfreien Patientenproben hergestellt werden.

Zur Korrektur der Messwerte aus den DBS an Hand des Hämatokrit müssen weitere Studien folgen. Eine Analyse dieses Einflussfaktors direkt aus den DBS und nicht wie in dieser Studie durchgeführt aus dem venösen Blut ist anzustreben. Hierbei können direkte photometrische Messungen des Spots oder die Analyse des Hämoglobins zielführend sein.

Durch die einfachere Probennahme im Rahmen der kapillären Bestimmung kann zukünftig ein engmaschigeres Monitoring neue Beurteilungsmöglichkeiten eröffnen. Für die Bestimmung von t_{elim} ist jedoch die klinische Relevanz in weiteren Studien zu belegen. Diese Kenndaten können in Einzelfällen Aufschluss über Komplikationen in der Therapie geben.

5. Zusammenfassung

Das therapeutische Drug Monitoring von Calcineurininhibitoren stellt einen wichtigen Faktor zur erfolgreichen Behandlung nierentransplantierte Patienten dar. In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte eine validierte Analyse von Calcineurininhibitoren aus Trockenblutproben vorgestellt werden, die zur selbständigen Blutentnahme durch den Patienten geeignet ist. Die Methode zur quantitativen Bestimmung aus Trockenblut wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Die Extraktion der Calcineurininhibitoren aus Trockenblutproben wurde optimiert. Die anschließende Methodvalidation beinhaltete die Bestimmung der Messbereichsgrenzen, Genauigkeit, Robustheit, Selektivität und Stabilität der Analyten in Trockenblutproben. Die Ergebnisse zeigten die Eignung der Methode für die Routine. Die Validationsdaten gewährleisteten die Abdeckung des gesamten therapeutischen Bereichs. Co-Medikationen zeigten keine Interferenzen. Die Stabilität der Analyten wurde über 14 Tage belegt.

Die Methode wurde in einer klinischen Studie mit herkömmlichen Routinemethoden aus venösem Blut mittels Liquidchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie und mit einem Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay verglichen. Als Probanden dienten je Medikation 34 Patienten mit insgesamt 589 Cyclosporin A- und 622 Tacrolimus-Messungen. Vitalparameter wurden dokumentiert und statistisch ausgewertet. Die Messwerte wurden zur Berechnung pharmakologischer Kenndaten herangezogen.

Zum Methodenvergleich wurden Analysen nach Bland-Altman, Passing-Bablok sowie nach DIN 53804 durchgeführt. Die Messwerte der Vergleichsmethoden waren für beide Analyten um 8% bis 23,3% höher als die der Referenzmethode. Diese Ergebnisse sind mit Angaben aus der Literatur vergleichbar. Eine Normierung durch den Hämatokrit ergab Differenzen zwischen -0,5% und 7,3% und führte zu einer Methodenäquivalenz mit der Referenzmethode.

Die Bestimmung von Calcineurininhibitoren aus Trockenblutproben korreliert mit der in dieser Arbeit verwendeten immunchemischen Vergleichsmethode. Ihre besonderen Vorzüge liegen in der einfachen Handhabung mit hoher Effizienz für Arzt und Patient. Die Blutentnahme könnte vom Patienten selbst im häuslichen Umfeld durchgeführt werden und damit gleichzeitig medizinisches Personal entlasten. Dies sollte in weiteren klinischen Studien verifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Yu S F, Wu L H, Zheng S S: Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5, 337-44 (2006)
2. Schrem H, Barg-Hock H, Strassburg C P, Schwarz A, Klempnauer J: Aftercare for patients with transplanted organs. *Dtsch Arztebl Int* 106, 148-56 (2009)
3. Merrill J P, Murray J E, Harrison J H, Guild W R: Successful homo-transplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160, 277-82 (1956)
4. Murray J E, Merrill J P, Harrison J H: Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* 148, 343-59 (1958)
5. Taylor A L, Watson C J, Bradley J A: Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 23-46 (2005)
6. Murray J E, Tilney N L, Wilson R E: Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Ann Surg* 184, 565-73 (1976)
7. Murray J E, Merrill J P, Dammin G J, Dealy J B, Jr., Alexandre G W, Harrison J H: Kidney transplantation in modified recipients. *Ann Surg* 156, 337-55 (1962)
8. Murray J E, Sheil A G, Moseley R, Knight P, McGavic J D, Dammin G J: Analysis of Mechanism of Immunosuppressive Drugs in Renal Homotransplantation. *Ann Surg* 160, 449-73 (1964)
9. Starzl T E, Porter K A, Halgrimson C G, Husberg B S, Penn I, Putnam C W: A decade followup in early cases of renal homotransplantation. *Ann Surg* 180, 606-16 (1974)
10. Terasaki P I, Vredevoe D L, Porter K A, Mickey M R, Marchioro T L, Faris T D, Herrmann T J, Starzl T E: Serotyping for homotransplantation. V. Evaluation of a matching scheme. *Transplantation* 4, 688-99 (1966)

11. Akhlaghi F, Trull A K: Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 41, 615-37 (2002)
12. Heusler K, Pletscher A: The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly* 131, 299-302 (2001)
13. Borel J F, Feurer C, Magnee C, Stahelin H: Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 32, 1017-25 (1977)
14. Baselt R C: *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 5. Aufl. Chemical Toxicology Institute, Foster City, CA (2000)
15. M. Dreyfuss E H, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache und H. Tscherter: Cyclosporin A and C. *Applied Microbiology and Biotechnology* 3, 125-133 (1976)
16. Scanlon L, Baloh R, Gridelli B, Rao K M, Shaw B, Starzl T, Sanghvi A: Determination of cyclosporine concentration in bile. *Transplantation* 41, 657-9 (1986)
17. Shaw L M: Cyclosporine metabolites: are they active? *Clin Chem* 36, 187 (1990)
18. Krejci K, Tichy T, Bachleda P, Zadrazil J: Calcineurin inhibitor-induced renal allograft nephrotoxicity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154, 297-306 (2010)
19. Loh C, Shaw K T, Carew J, Viola J P, Luo C, Perrino B A, Rao A: Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 271, 10884-91 (1996)
20. Shaw K T, Ho A M, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan P G: Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11205-9 (1995)
21. Shaw L M: Advances in cyclosporine pharmacology, measurement, and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 35, 1299-308 (1989)

22. Iwatsuki S, Esquivel C O, Klintmalm G B, Gordon R D, Shaw B W, Jr., Starzl T E: Nephrotoxicity of cyclosporine in liver transplantation. *Transplant Proc* 17, 191-5 (1985)
23. Shaw L M, Kaplan B, Kaufman D: Toxic effects of immunosuppressive drugs: mechanisms and strategies for controlling them. *Clin Chem* 42, 1316-21 (1996)
24. Roby K A, Shaw L M: Effects of cyclosporine and its metabolites in the isolated perfused rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 4, 168-77 (1993)
25. Jacobson P, Uberti J, Davis W, Ratanatharathorn V: Tacrolimus: a new agent for the prevention of graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 22, 217-25 (1998)
26. Chow F S, Jusko W J: Immunosuppressive interactions among calcium channel antagonists and selected corticosteroids and macrolides using human whole blood lymphocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 413-21 (2004)
27. Fireman M, DiMartini A F, Armstrong S C, Cozza K L: Immunosuppressants. *Psychosomatics* 45, 354-60 (2004)
28. Calne R Y, White D J, Thiru S, Evans D B, McMaster P, Dunn D C, Craddock G N, Pentlow B D, Rolles K: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2, 1323-7 (1978)
29. Johnston A, Holt D W: Immunosuppressant drugs--the role of therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 52 Suppl 1, 61S-73S (2001)
30. Aspeslet L J, LeGatt D F, Murphy G, Yatscoff R W: Effect of assay methodology on pharmacokinetic differences between cyclosporine Neoral and Sandimmune formulations. *Clin Chem* 43, 104-8 (1997)
31. Schiff J, Cole E, Cantarovich M: Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 374-84 (2007)
32. Shaw L M: Cyclosporine monitoring. *Clin Chem* 35, 5-6 (1989)
33. Moreton M, Fredericks S, McKeown D A, Shiferaw E W, MacPhee I A, Johnston A, Holt D W: CYP3A5 genotype does not influence the blood

- concentration of tacrolimus measured with the Abbott immunoassay. *Clin Chem* 51, 2214-5 (2005)
34. Kuypers D R: Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring. *Ann Transplant* 13, 11-8 (2008)
35. Shaw L M, Yatscoff R W, Bowers L D, Freeman D J, Jeffery J R, Keown P A, McGilveray I J, Rosano T G, Wong P Y: Canadian Consensus Meeting on cyclosporine monitoring: report of the consensus panel. *Clin Chem* 36, 1841-6 (1990)
36. Venkataramanan R, Ptachcinski R J, Burckart G J, Yang S L, Starzl T E, Van Theil D H: The clearance of cyclosporine by hemodialysis. *J Clin Pharmacol* 24, 528-31 (1984)
37. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al.: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40, 1256-65 (1987)
38. Kawashima H, Fujino Y, Mochizuki M: Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1265-71 (1988)
39. Land W: *Ciclosporin in der Transplantationsmedizin*. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)
40. Wallemacq P E, Reding R: FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin Chem* 39, 2219-28 (1993)
41. Iwasaki K: Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 22, 328-35 (2007)
42. Boswell G W, Bekersky I, Fay J, Wingard J, Antin J, Weisdorf D, Maher R, Fitzsimmons W, Nash R: Tacrolimus pharmacokinetics in BMT patients. *Bone Marrow Transplant* 21, 23-8 (1998)
43. Lindenfeld J, Miller G G, Shakar S F, Zolty R, Lowes B D, Wolfel E E, Mestroni L, Page R L, 2nd, Kobashigawa J: *Drug therapy in the heart*

- transplant recipient: part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 110, 3858-65 (2004)
44. Starzl T E, Todo S, Fung J, Demetris A J, Venkataramman R, Jain A: FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 2, 1000-4 (1989)
45. Christians U, Schmidt G, Bader A, Lampen A, Schottmann R, Linck A, Sewing K F: Identification of drugs inhibiting the in vitro metabolism of tacrolimus by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 41, 187-90 (1996)
46. Kahan B D, Shaw L M, Holt D, Grevel J, Johnston A: Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 36, 1510-6 (1990)
47. Kasiske B L, Zeier M G, Chapman J R, Craig J C, Ekberg H, Garvey C A, Green M D, Jha V, Josephson M A, Kiberd B A, Kreis H A, McDonald R A, Newmann J M, Obrador G T, Vincenti F G, Cheung M, Earley A, Raman G, Abariga S, Wagner M, Balk E M: KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 77, 299-311 (2009)
48. Naesens M, Kuypers D R, Sarwal M: Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 4, 481-508 (2009)
49. Shenoy S, Hardinger K L, Crippin J, Korenblat K, Lisker-Melman M, Lowell J A, Chapman W: A randomized, prospective, pharmacoeconomic trial of neoral 2-hour postdose concentration monitoring versus tacrolimus trough concentration monitoring in de novo liver transplant recipients. *Liver Transpl* 14, 173-80 (2008)
50. Musuamba F T, Mourad M, Haufroid V, Delattre I K, Verbeeck R K, Wallemacq P: Time of drug administration, CYP3A5 and ABCB1 genotypes, and analytical method influence tacrolimus pharmacokinetics: a population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 31, 734-42 (2009)
51. Tada H, Satoh S, Iinuma M, Shimoda N, Murakami M, Hayase Y, Kato T, Suzuki T: Chronopharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: occurrence of acute rejection. *J Clin Pharmacol* 43, 859-65 (2003)

52. Cogill J L, Taylor P J, Westley I S, Morris R G, Lynch S V, Johnson A G: Evaluation of the tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay (MEIA II) in liver and renal transplant recipients. *Clin Chem* 44, 1942-6 (1998)
53. Steimer W: Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 45, 371-81 (1999)
54. McBride J H, Kim S S, Rodgerson D O, Reyes A F, Ota M K: Measurement of cyclosporine by liquid chromatography and three immunoassays in blood from liver, cardiac, and renal transplant recipients. *Clin Chem* 38, 2300-6 (1992)
55. Rentsch K M: Monitoring of immunosuppressant drugs. *Ther Umsch* 65, 545-50 (2008)
56. Lensmeyer G L, Wiebe D A, Carlson I H: Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. 1: Purification of analytical standards and optimization of the assay. *Clin Chem* 33, 1841-50 (1987)
57. Maurer H H: Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713, 3-25 (1998)
58. Maurer H H: Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 388, 1315-25 (2007)
59. Peters F: Method validation using LCMS. In: Poletini A: *Applications of LC-MS in Toxicology*. 71-96, Pharmaceutical Press (2006)
60. Willoughby R, Sheenhan E, Mitrovich S: *A Global View of LC/MS*. Global View Publishing, Pittsburgh (1998)
61. Korecka M, Shaw L M: Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice. *Ann Transplant* 14, 61-72 (2009)
62. Wang S, Magill J E, Vicente F B: A fast and simple high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for simultaneous measurement of whole blood tacrolimus and sirolimus. *Arch Pathol Lab Med* 129, 661-5 (2005)

63. Keevil B G, Tierney D P, Cooper D P, Morris M R: Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine analysis of cyclosporin A over an extended concentration range. *Clin Chem* 48, 69-76 (2002)
64. Annesley T M, Clayton L: Simple extraction protocol for analysis of immunosuppressant drugs in whole blood. *Clin Chem* 50, 1845-8 (2004)
65. Ceglarek U, Casetta B, Lembcke J, Baumann S, Fiedler G M, Thiery J: Inclusion of MPA and in a rapid multi-drug LC-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 373, 168-71 (2006)
66. Ceglarek U, Lembcke J, Fiedler G M, Werner M, Witzigmann H, Hauss J P, Thiery J: Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 346, 181-90 (2004)
67. Streit F, Armstrong V W, Oellerich M: Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. *Clin Chem* 48, 955-8 (2002)
68. Annesley T M: Application of commercial calibrators for the analysis of immunosuppressant drugs in whole blood. *Clin Chem* 51, 457-60 (2005)
69. Acott P D: Home fingerprick sampling for immunosuppressant drug monitoring in pediatric renal transplant patients. *Nat Clin Pract Nephrol* 2, 304-5 (2006)
70. Keevil B G, Fildes J, Baynes A, Yonan N: Liquid chromatography-mass spectrometry measurement of tacrolimus in finger-prick samples compared with venous whole blood samples. *Ann Clin Biochem* 46, 144-5 (2009)
71. Keevil B G, Tierney D P, Cooper D P, Morris M R, Machaal A, Yonan N: Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring. *Ther Drug Monit* 24, 757-67 (2002)

72. Leichtle A B, Ceglarek U, Witzigmann H, Gabel G, Thiery J, Fiedler G M: Potential of dried blood self-sampling for cyclosporine c(2) monitoring in transplant outpatients. *J Transplant* 2010, 201918 (2010)
73. Merton G, Jones K, Lee M, Johnston A, Holt D W: Accuracy of cyclosporin measurements made in capillary blood samples obtained by skin puncture. *Ther Drug Monit* 22, 594-8 (2000)
74. Pettersen M D, Driscoll D J, Moyer T P, Dearani J A, McGregor C G: Measurement of blood serum cyclosporine levels using capillary "fingerstick" sampling: a validation study. *Transpl Int* 12, 429-32 (1999)
75. Profumo R J, Foy T M, Kane R E: Correlation between venous and capillary blood samples for cyclosporine monitoring in pediatric liver transplant patients. *Clin Transplant* 9, 424-6 (1995)
76. Webb N J, Coulthard M G, Trompeter R S, Fitzpatrick M M, Stephens S, Dudley J, Maxwell H, Waller S, Smith G C, Watson A R, Hughes D A, Keevil B G, Ellis J S: Correlation between finger-prick and venous ciclosporin levels: association with gingival overgrowth and hypertrichosis. *Pediatr Nephrol* 22, 2111-8 (2007)
77. Webb N J, Roberts D, Preziosi R, Keevil B G: Fingerprick blood samples can be used to accurately measure tacrolimus levels by tandem mass spectrometry. *Pediatr Transplant* 9, 729-33 (2005)
78. Yonan N, Martyszczuk R, Machaal A, Baynes A, Keevil B G: Monitoring of cyclosporine levels in transplant recipients using self-administered fingerprick sampling. *Clin Transplant* 20, 221-5 (2006)
79. Cheung C Y, van der Heijden J, Hoogtanders K, Christiaans M, Liu Y L, Chan Y H, Choi K S, van de Plas A, Shek C C, Chau K F, Li C S, van Hooff J, Stolk L: Dried blood spot measurement: application in tacrolimus monitoring using limited sampling strategy and abbreviated AUC estimation. *Transpl Int* 21, 140-5 (2008)
80. Hoogtanders K, van der Heijden J, Christiaans M, Edelbroek P, van Hooff J P, Stolk L M: Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method. *J Pharm Biomed Anal* 44, 658-64 (2007)

81. Hoogtanders K, van der Heijden J, Christiaans M, van de Plas A, van Hooff J, Stolk L: Dried blood spot measurement of tacrolimus is promising for patient monitoring. *Transplantation* 83, 237-8 (2007)
82. Keevil B G: The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 44, 110-8 (2011)
83. Lampe D, Scholz D, Prumke H J, Blank W, Huller H: Capillary blood, dried on filter paper, as sample for monitoring cyclosporin A concentrations. *Clin Chem* 33, 1643-4 (1987)
84. Wilhelm A J, den Burger J C, Vos R M, Chahbouni A, Sinjewel A: Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 1595-8 (2009)
85. Hinchliffe E, Adaway J E, Keevil B G: Simultaneous measurement of cyclosporin A and tacrolimus from dried blood spots by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 883-884, 102-7 (2012)
86. Mendonza A, Gohh R, Akhlaghi F: Determination of cyclosporine in saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 26, 569-75 (2004)
87. Mathias D, Gebhard J, Wilhelm L, Schmidt-Gayk H, Mathias I: 26 years of external quality controls for the screening of congenital metabolic disorders in newborns--a summary of the results. *Clin Lab* 54, 103-8 (2008)
88. Schröder G: Standardarbeitsanweisung Cyclosporin - UK S-H Campus Lübeck. (2009. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Leif Dibbelt.)
89. Schröder G: Standardarbeitsanweisung Tacrolimus - UK S-H Campus Lübeck. (2009. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Leif Dibbelt.)
90. Abbott-Laboratories: Architect System - Cyclosporine. (2010)
91. Abbott-Laboratories: Architect System - Tacrolimus. (2010)
92. Funk W, Dammann V, Donnevert G: Qualitätsicherung in der analytischen Chemie. 2. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005)

93. Kolb M, Bahr A, Hippich S, Schulz W: Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms. Acta Hydrochim. Hydrobiol 21, 308-11 (1993)
94. Peters F T, Drummer O H, Musshoff F: Validation of new methods. Forensic Sci Int 165, 216-24 (2007)
95. Peters F T, Paul L D, Mußhoff F, Aebi B, Auwärter V, Kraemer T, Skopp G: Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. ToxChem und KrimTech 76, 185-209 (2009)
96. DIN 32645 - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. (1994)
97. Weltärztebund: Deklaration von Helsinki. <http://www.aerzteblatt.de/v4/plus/down.asp?typ=PDF&id=5324> (Tag des Zugriffs: 28.11.2011) (2008)
98. DIN 53804 Teil 1: Statistische Auswertung. (1990)
99. Bland J M, Altman D G: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1, 307-10 (1986)
100. Dewitte K, Fierens C, Stockl D, Thienpont L M: Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. Clin Chem 48, 799-801; author reply 801-2 (2002)
101. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/toc.htm (Tag des Zugriffs: 21.07.2011).)
102. Greim H, Deml E: Toxikologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1996)
103. Herold G: Innere Medizin 2012. Herold, Köln (2011)
104. Haen E, Greiner C, Bader W, Wittmann M: [Expanding therapeutic reference ranges using dose-related reference ranges]. Nervenarzt 79, 558-66 (2008)
105. Kahan B D, Welsh M, Urbauer D L, Mosheim M B, Beusterien K M, Wood M R, Schoenberg L P, Dicesare J, Katz S M, Van Buren C T: Low intraindividual variability of cyclosporin A exposure reduces chronic rejection incidence and health care costs. J Am Soc Nephrol 11, 1122-31 (2000)

106. Holt W, A. Johnston, B. D. Kahan, R. G. Morris, M. Oellerich and L. M. Shaw: New approaches to cyclosporin monitoring raise further concerns about analytical techniques. *Clin Chem* 46, 872-874 (2000)
107. Schröfel S, Güssregen B, Werle A, Nauck M, Arndt T: Selective Reaction Monitoring (SRM) Daten von Xenobiotika für Aufbau und Validierung von LC/MS-Analysen - Teil 2. *ToxChem und KrimTech* 77, 117-137 (2010)
108. Güssregen B, Schröfel S, Nauck M, Arndt T: Selective Reaction Monitoring (SRM) Daten von Xenobiotika für Aufbau und Validierung von LC/MS-Analysen - Teil 1. *ToxChem und KrimTech* 75, 149-174 (2008)
109. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova K A, Muhl A, Heinze G, Sperl W, Bodamer O A: Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 373, 27-31 (2006)
110. Wallemacq P, Armstrong V W, Brunet M, Haufroid V, Holt D W, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber L T, Westley I S, Mourad M: Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 31, 139-52 (2009)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Jan Kramer für die Vergabe dieses spannenden und aktuellen Themas, seiner Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für seine Hilfsbereitschaft und zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, sowie für die Korrektur des Manuskripts.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Hendrik Lehnert, dem Direktor der Medizinischen Klinik I, Prof. Dr. Jürgen Steinhoff und Dr. Martin Nitschke für die Möglichkeit, die Studie am Transplantationszentrum der Universitätsklinik Schleswig-Holstein Campus Lübeck durchführen zu können. Frau J. Schlieter danke ich für ihr Engagement bei der Durchführung der Probennahme und der gewissenhaften Datenerhebung. Für die Durchführung der immunchemischen Analysen aus dem Vollblut danke ich Prof. Dr. med Michael Seyfarth, Dr. rer. nat. Leif Dibbelt und den Mitarbeitern des Labors der klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck.

Für die Unterstützung bei der statistischen Planung und Auswertung der Studientdaten danke ich Herrn Dr. Reinhard Vonthein vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

Ein besonderer Dank richtet sich an Herrn Dr. Detlef Kramer für die Möglichkeit im MVZ Dr. Kramer und Kollegen die chromatographischen Analysen durchzuführen, den Zuspruch und das Vertrauen sowie die Unterstützung die Arbeit neben meinen Routinetätigkeiten zu erstellen. Ich danke auch Herrn Martin Einhaus und seinem Team für die nette Atmosphäre und stete Bereitschaft zur Unterstützung bei dem experimentellen Teil der Arbeit. Meinen Kollegen Herrn Jenckel, Herrn Schwarz und Frau Dr. Hebenbrock danke ich für die angeregte und konstruktive Diskussion. Darüber hinaus danke ich Stefan Jenckel und Dr. Svantje Hebenbrock für die Korrektur und Durchsicht des Manuskripts.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner ganzen Familie, vor allem meiner Frau Sonja und meinen Kindern Greta und Finn sowie meinen Eltern, die mir den Rückhalt durch ihre persönliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gaben.

Allen vielen Dank!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Wilhelm
Vorname	Lars
Geburtsdatum	30.08.1969
Geburtsort	Geesthacht



Schulbildung

1976 – 1980	Oberstadtgrundschule Geesthacht
1980 – 1989	Otto-Hahn Gymnasium Geesthacht
1989	Abitur

Studium

02/1990 - 08/1995	Studiengang: Chemieingenieurwesen Schwerpunkt: Biotechnologie Fachhochschule Lübeck Fachbereich: Angewandte Naturwissenschaften
Diplomarbeit	Möglichkeiten der Serumspiegelbestimmung von Methadon
09/2003 - 04/2005	Postgradualstudium: Toxikologie und Umweltschutz Universität Leipzig Medizinische Fakultät
Diplomarbeit	Methadon in der Substitutionsbehandlung Opiatabhängiger
seit 04/2009	Promotion an der Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang

06/1995 - 09/1999	Anstellung als Chemieingenieur Abteilung: Toxikologie Dres. Kramer & Partner, Geesthacht
Aufgabenbereiche	<ul style="list-style-type: none">○ Entwicklung neuer Analysemethoden zum Nachweis von Drogen und Pharmaka○ Entwicklung von Analysemethoden zum Nachweis dopingrelevanter Stoffe im Pferd○ Einführung eines toxikologischen Notfalllabors (24 h), Analytik und Beratung von niedergelassenen und klinisch tätigen Ärzten
seit 09/1999	Leiter der Abteilung Toxikologie Labor Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht
Verantwortungsbereiche	<ul style="list-style-type: none">○ klinische Toxikologie○ forensische Toxikologie○ forensische Alkoholologie○ Lebensmitteltoxikologie○ Dopinganalytik (veterinärmedizinisch)○ Forschung und Entwicklung in diesen Bereichen○ Labororganisation Toxikologie○ toxikologische Befundinterpretation und Beratung der niedergelassenen und klinisch tätigen Ärzte○ Außendarstellung des Verantwortungsbereichs
seit 01/2003	Leiter Forschung und Entwicklung GLAD mbH
Aufgabenschwerpunkte	<ul style="list-style-type: none">○ Entwicklung neuer Analysemethoden zur Bestimmung von Laktat in Speichel- und Blutproben in der Sportmedizin

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften

seit 1999	Deutschen Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)
seit 2004	Deutschen Gesellschaft für Suchtmedizin (DGS)
seit 2007	Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin (DGVM)

Publikationen

Wilhelm L, Opper C: Kombination der quantitativen Bestimmung von Cannabis, Opiaten, Cocain und Metaboliten im Serum, GIT Labor-Fachzeitschrift 45, 54-6 (2001)

Wilhelm L: Kapitel V: Drogen- und Medikamentenscreening, aus Luppä, P.B. et al. POCT – Patientennahe Labordiagnostik (1. Auflage), Springer Verlag (2008)

Mathias D, Gebhard J, **Wilhelm L**, Schmidt-Gayk H, Mathias I: 26 Years of external Quality Controls for the Screening of Congenital Metabolic Disorders in Newborns – a Summary of the Results, Clin Lab 54, 103-108 (2008)

Wilhelm L, Jenckel S, Junker R: Handhabung von Teststreifen zur Bestimmung von Drogen und Medikamenten bei klinisch-toxikologischen Fragestellungen, J Lab Med 32, 168-74 (2008)

Moroni R, Blomstedt P, **Wilhelm L**, Reinikainen T, Sippola E, Corander J: Statistical modelling of measurement errors in gas chromatography analyses of blood alcohol, Forensic Sci Int 202, 71-4 (2010)

Kriikku P, **Wilhelm L**, Schwarz O, Rintatalo J: New designer drug of abuse: 3,4-Methylenedioxypropylvaleron (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland, Forensic Sci Int 210, 195-200 (2011)

Kriikku P, **Wilhelm L**, Schwarz O, Rintatalo J, Ojanperä I, Vuori E, Hurme J, Kramer J: Methylenedioxypropylvaleronone (MDPV) in Finland, ToxChem und KrimTech 78, 293 – 6 (2011)

Wilhelm L, Jenckel S, Kriikku P, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J: Phenazepam – a new drug of abuse in Finland – findings from apprehended drivers, ToxChem und KrimTech 78, 302 – 5 (2011)

Wilhelm L: Kapitel V: Drogen- und Medikamentenscreening, aus Luppä, P.B. et al. POCT – Patientennahe Labordiagnostik (2. überarbeitete Auflage), Springer Verlag (2011)

Kriikku P, **Wilhelm L**, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J, Ojanperä I: Phenazepam abuse in Finland: Findings from apprehended drivers, post-mortem cases and police confiscations, Forensic Sci Int (angenommen Feb. 2012)

Vorträge

Wilhelm L: Toxikologische Labordiagnostik - bei Behandlung abhängiger Patienten -, Qualitätszirkel und Arbeitskreis substituierender Ärzte, Tübingen (2007)

Wilhelm L: klinische Toxikologie: Diagnostik bei Suchterkrankungen Drogen-, Medikamenten- und Alkoholmissbrauch, Fortbildung Suchtmedizin, Freiburg (2008)

Wilhelm L: klinische Toxikologie: Diagnostik bei Suchterkrankungen Drogen-, Medikamenten- und Alkoholmissbrauch, Fortbildung Suchtmedizin, Rasstadt (2008)

Wilhelm L, Schwarz O: Einsatzmöglichkeiten für LC-MS/MS-Methoden in der klinischen Toxikologie, LC-MS Tage, Münster (2008)

Meier M, **Wilhelm L:** Alte Medikamente neu gemessen: CNI for ever!, 30 Jahre Nierentransplantation, Lübeck (2010)

Wilhelm L: Diagnostik bei Suchterkrankungen: Drogenanalytik - Schwerpunkt Arbeitsmedizin, Hannover (2010)

Wilhelm L: Diagnostik bei Suchterkrankungen: Drogenscreening - Was ist sinnvoll? // Ausschluß von Manipulation -, Fortbildung Suchtmedizin, Freiburg (2010)

Wilhelm L: Immunchemische Methoden in der Drogenanalytik, 6. GTFCh-Fachtagung für Technische Assistenten/innen, Hamburg (2011)

Wilhelm L: Neue Trends in der Drogenanalytik, Fortbildungsveranstaltung Suchtmedizin, Hamburg (2011)

Wilhelm L: Betäubungsmittel / Drogen: analytischer und klinischer Hintergrund, Fortbildung Labormedizin MVZ Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht (2011)

Wilhelm L. Forensische und klinische Aspekte der Alkoholanalytik, Fortbildung Labormedizin MVZ Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht (2011)

Wilhelm L: Bestimmung von Calcineurininhibitoren aus Trockenblutproben bei Patienten nach Nierentransplantation, Fortbildung Labormedizin MVZ Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht (2012)

Wilhelm L: Labormethoden in der Suchtmedizin, Qualitätszirkel Suchtmedizin, Braunschweig (2012)

Poster

Kortea E, **Wilhelm L**, Kiehn K. Schnelle Bestimmung von Benzodiazepinen aus Urin nach Festphasenextraktion mit Disk-Technologie - Einsatz einer neuen GC/MS Säule mit extrem niedrigem Säulenbluten, XIII. GTFCh-Symposium, Mosbach (2003)

Kriikku P, Rintatalo J, **Wilhelm L**, Schwarz O: New designer drug of abuse: 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland, International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, Oslo (2010)

Kriikku P, **Wilhelm L**, Schwarz O, Rintatalo J, Ojanperä I, Vuori E, Hurme J, Kramer J: Methylenedioxypropylvalerone (MDPV) in Finland, XVII. GTFCh-Symposium, Mosbach (2011)

Wilhelm L, Jenckel S, Kriikku P, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J: Phenazepam – a new drug of abuse in Finland – findings from apprehended drivers, XVII. GTFCh-Symposium, Mosbach (2011)

Kriikku P, **Wilhelm L**, Ojanperä I, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J: Phenazepam in Finland, Joint meeting of SOFT and TIAFT, San Francisco (2011)

Wilhelm L, Jenckel S, Behr A, Hebenbrock S, Schwarz O, Kriikku P, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J: DAISY – Nachweis der neuen Designerdroge 2-DPMP bei finnischen Verkehrsteilnehmern, 7. Gemeinsame Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie (DGVP) und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin (DGVM), Potsdam (2011)

Wilhelm L, Meier M, Lehnert H, Nitschke M, Kramer J: Ein modernes Laborverfahren ermöglicht die Patienten-gesteuerte Kapillarblutentnahme zur Wirkspiegelbestimmung von Immunsuppressiva, 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden (2011)

In Vorbereitung

Kriikku P, **Wilhelm L**, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J, Ojanperä I: New designer stimulant desoxypipradol (2-DPMP): findings from apprehended drivers in Finland, Forensic Sci. Int.



Interdisziplinäres
Transplantationszentrum

Medizinische Klinik I

Direktor Prof. Dr. med. H. Lehnert

OA Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer
OA Dr. med. Martin Nitschke
Tel.: +49 451 500 3297

Aufklärungsbogen zur Studie „Quantitative Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren mittels LC-MS/MS aus Trockenblutproben bei Patienten nach Organtransplantation“

Liebe Patientin, Lieber Patient,

sie sind nierentransplantiert und erhalten eine Immunsuppression mit Cyclosporin (Sandimmun) oder Tacrolimus (Prograf). Um Abstoßungsreaktionen und Nebenwirkungen dieser Medikamente möglichst zu vermeiden, sind routinemäßige Blutspiegelbestimmungen der Konzentration sehr wichtig. Hierzu wird Ihnen aus einer oberflächlichen Hautvene eine geringe Menge Blut abgenommen, wie Sie es im Rahmen von sonstigen Blutentnahmen zur Kontrolle z.B. des Blutbildes gewöhnt sind.

Im Rahmen einer Studie möchten wir zusätzlich zu Routineverfahren eine moderne Labormethode (LC-MS/MS) zur Bestimmung der Immunsuppressiva-Blutspiegel anwenden und hiermit Erfahrungen im Vergleich zu der in der Routine eingesetzten Methode sammeln.

Der Vorteil dieses neuen Verfahrens ist, dass auch Kapillarblut zur Analyse verwendet werden kann. Es ist vorstellbar, dass ein Tropfen Blut, aufgefangen auf einem Blatt Filterpapier ausreicht, um eine Konzentrationsbestimmung des Medikaments vorzunehmen. Auch dies wollen wir im Rahmen der Studie testen. Daher ist es notwendig, dass zusätzlich zur herkömmlichen Blutentnahme aus der Armvene mit einer sehr kleinen Lanzette ein Stich in Ihre Fingerbeere erfolgt und so etwas Kapillarblut gewonnen wird. Dieses Vorgehen der Kapillarblutgewinnung könnte Ihnen von der Bestimmung des Blutzuckers her bekannt sein. Der Stich in die Fingerbeere ist nicht schmerzhaft und auch nicht mit einem weiteren Risiko für Sie verbunden. Die langfristige Vorstellung ist, dass Patienten selbstständig zu Hause einen Blutstropfen aus der Fingerbeere gewinnen und ihn auf einem Filterpapier mit der Post in ein Labor zur Analyse einsenden können. Unnötige Fahrten zum Arzt und Wartezeiten könnten so unter Umständen unterbleiben.

Die Lagerung des Materials zwischen den Untersuchungen erfolgt bei Niedrigtemperatur.

Die Nutzung Ihres Blutes zu Forschungszwecken ist nicht mit einem erhöhten Risiko für Sie verbunden.

Weiterhin möchten wir Sie darauf hinweisen, dass die Studie anonymisiert durchgeführt wird. Dies bedeutet, dass die Herkunft Ihres Blutes für Dritte nicht ersichtlich ist und auch die Ergebnisse anonymisiert dokumentiert werden. Das entnommene Blut wird ausschließlich für den dargestellten Versuch verwendet und verbleibt in einem zertifizierten und akkreditierten Labor des Studienleiters. Eine Weitergabe an Dritte außerhalb der Universität zu Lübeck ist nicht



vorgesehen. Sämtliches Material wird nach Beendigung der Studie verworfen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck. Spätere Kontakte zu Ihnen aufgrund der Ergebnisse bzw. für weitere Untersuchungen sind nicht vorgesehen.

Falls Sie weitere Fragen zu unserer Studie haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung. Zudem möchten wir Sie darauf hinweisen, dass Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studie zurücktreten können.

Mit freundlichen Grüßen

Lübeck, den 11.03.2009

Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer, Dr. med. Martin Nitschke

Medizinische Klinik I, Interdisziplinäres Transplantationszentrum, UKS-H, Campus Lübeck



Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Interdisziplinäres
Transplantationszentrum

Medizinische Klinik I

Direktor Prof. Dr. med. H. Lehnert

OA Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer

OA Dr. med. Martin Nitschke

Tel.: +49 451 500 3297

Einverständniserklärung zur Forschungsstudie „Quantitative Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren mittels LC-MS/MS aus Trockenblutproben bei Patienten nach Organtransplantation“

(Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer, Dr. med. M. Nitschke)

Name: _____

Geburtsdatum: _____

Ich bin damit einverstanden, dass von mir entnommenes Blut aus der Armvene bzw. Aus der Fingerbeere zu Forschungszwecken verwendet wird. Mit Hilfe meines Blutes sollen Untersuchungen zur Erforschung einer neuen Labormethode unternommen werden. Über die Zielsetzung und Risiken bin ich am _____ von _____ aufgeklärt worden.

Unterschrift aufklärender Arzt

Unterschrift Patient

Ort, Datum



Interdisziplinäres
Transplantationszentrum

Medizinische Klinik I

Direktor Prof. Dr. med. H. Lehnert

OA Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer

OA Dr. med. M. Nitschke

Tel.: +49 451 500 3297

Dokumentationsbogen zur Forschungsstudie „Quantitative Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren mittels LC-MS/MS aus Trockenblutproben bei Patienten nach Organtransplantation“
(Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer, Dr. med. M. Nitschke)

Datum: _____

Patientennummer: _____

Vitalparameter

Blutdruck: / Puls:

Medikation

CNI: _____ Dosis: _____

Co-Medikation:

Angaben über mögliche CNI-Nebenwirkungen: