

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STANOVENÍ GANCIKLOVIRU U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI PLIC

Bc. FILIP HRACH

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. BARBORA SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. EVA KLAPKOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Velice rád bych poděkoval své školitelce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za cenné rady, připomínky, formální úpravu práce a vstřícnost. Velké poděkování směřuje ke konzultantce doc. Ing. Evě Klapkové, Ph.D. za odborné, teoretické i praktické rady a za čas, který mi při řešení diplomové práce věnovala a také Ing. Kateřině Dunovské, Ph.D. a PharmDr. Elišce Dvořáčkové, Ph.D. za praktické rady, pomoc a podporu. Dále bych rád poděkoval celému Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol za umožnění měření této diplomové práce na pracovišti.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům za psychickou a finanční podporu v době mých studií.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 12.5.2023

Bc. Filip Hrach

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Filip Hrach

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení gancikloviru u pacientů po transplantaci plic

Ganciklovir je nukleosidový analog, který je široce využíván pro léčbu infekcí způsobených herpetickými viry včetně cytomegaloviru. Pacientům po transplantaci plic je vždy profylakticky podáván valganciklovir (proléčivo gancikloviru), aby se předešlo cytomegalovirové infekci. Cílem diplomové práce bylo zavést spolehlivou, citlivou a rychlou analytickou metodu pro stanovení gancikloviru a tuto metodu validovat. Dále stanovit hodnoty gancikloviru u pacientů po transplantaci plic. Posledním cílem bylo zhodnotit význam terapeutického monitorování gancikloviru. Pro stanovení gancikloviru byla zavedena metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byly stanoveny validační parametry nezbytné pro bioanalytické metody. Všechny validační parametry splnily podmínky úspěšné validace.

Při perorálním podání antivirotika je využíván valganciklovir a při intravenózním podání ganciklovir. Pacienti po transplantaci plic dostávají profylakticky perorálně 900 mg/den valgancikloviru. Po profylaxi je intravenózně podáván ganciklovir. V této diplomové práci byla koncentrace gancikloviru měřena těsně před podáním léčiva, po třech hodinách od podání a následně po pěti hodinách od podání.

Ganciklovir byl stanovován celkem u 20 pacientů. Z celkového počtu 20 pacientů dostávalo 13 pacientů ganciklovir nebo valganciklovir profylakticky a 7 pacientům byl podáván ganciklovir k léčbě cytomegalovirové infekce. Naše výsledky ukázaly, že z celkového počtu pacientů 18 (90 %) pacientů nedosáhlo spodní meze terapeutického rozmezí, pouze 1 (5 %) pacient byl v terapeutickém rozmezí a 1 (5 %) pacient byl předávkován. Terapeutické monitorování léčiv je nezbytné u pacientů po transplantaci plic, jelikož při překročení terapeutického rozmezí může GCV působit toxicky. Naopak při nedosažení minimální hodnoty nemusí být léčba účinná či může vzniknout rezistence k GCV.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Filip Hrach

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: doc. Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of ganciclovir in lung transplant recipients

Ganciclovir is a nucleoside analogue that is widely used for the treatment of infections caused by herpes viruses, including cytomegalovirus. Patients after lung transplantation are always given valganciclovir (ganciclovir prodrug) prophylactically to prevent cytomegalovirus infection. The aim of this thesis was to establish a reliable, sensitive and rapid analytical method for the determination of ganciclovir and to validate this method. Furthermore, to determine ganciclovir levels in patients after lung transplantation. The final objective was to evaluate the importance of therapeutic monitoring of ganciclovir. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was established for the determination of ganciclovir. Validation parameters necessary for bioanalytical methods have been established. All validation parameters met the conditions for successful validation. Valganciclovir is used for oral administration of antiviral drugs and ganciclovir for intravenous administration. Patients after lung transplantation receive prophylactic oral valganciclovir 900 mg/day. After prophylaxis, ganciclovir is administered intravenously. In this thesis, ganciclovir concentrations were measured just prior to drug administration, three hours after, and then five hours after administration. Ganciclovir was determined in a total of 20 patients. Of the 20 patients, 13 patients received ganciclovir or valganciclovir prophylactically and 7 patients received ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus infection. Results showed that of the total number of patients, 18 (90 %) patients did not reach the lower limit of the therapeutic range, only 1 (5 %) patient was in the therapeutic range, and 1 (5 %) patient was overdosed. Therapeutic drug monitoring is necessary in all patients after lung transplantation, because GCV may be toxic if the therapeutic range is exceeded. However, if the minimum level is not reached, treatment may not be effective or resistance to GCV may develop.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. Ganciklovir	9
2.1 Charakteristika gancikloviru	9
2.2 Farmakodynamické vlastnosti.....	10
2.3 Farmakokinetické vlastnosti a indikace	10
2.4 Nežádoucí účinky a rezistence	12
3. Cytomegalovirová infekce.....	12
3.1 Popis viru	12
3.2 Epidemiologie a patogeneze	14
3.2.1 Přenos a latence CMV.....	14
3.2.2 Infekce v těhotenství	15
3.2.3 Vrozená a novorozenecká infekce.....	15
3.2.4 Infekce po transplantaci pevných orgánů.....	16
3.3 Léčba infekce	18
4. Transplantace plic	19
4.1 Historie.....	19
4.2 Současnost a budoucnost transplantací	19
4.3 Dárcovství a odběr plic	21
4.4 Předtransplantační infekce a profylaxe	22
4.4.1 Antibakteriální profylaxe	22
4.4.2 Antifungální profylaxe	23
5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
5.1 Princip metody	24
5.2 Popis systému HPLC.....	24
5.2.1 Detektory v HPLC.....	26
6. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.....	29
6.1 Popis metody.....	29
6.2 Iontové zdroje	29
6.3 Hmotnostní analyzátoary a detektory	32
6.4 Aplikace LC-MS/MS v klinických laboratořích	35
7. Metody stanovení gancikloviru	36
8. Experimentální část	40
8.1 Materiál a přístroje.....	40
8.1.1 Přístroje	40
8.1.2 Materiál	40

8.1.3	Reagencie pro LC-MS/MS.....	41
8.1.4	Soubor pacientů.....	41
8.2	Metody a příprava vzorků pro LC-MS/MS.....	41
8.2.1	Příprava mobilní fáze	41
8.2.2	Příprava zásobních roztoků	42
8.2.3	Příprava vzorků pro analýzu	42
8.2.4	Analýza vzorků	42
9.	Výsledky	44
9.1	Validace LC-MS/MS metody	44
9.1.1	Kalibrace	44
9.1.2	Opakovatelnost.....	45
9.1.3	Reprodukovatelnost.....	46
9.1.4	Robustnost.....	47
9.1.5	Pravdivost.....	50
9.1.6	Mez detekce a mez kvantifikace	51
9.1.7	Matricový efekt	51
9.1.8	Výtěžnost metody.....	52
9.2	Stanovení gancikloviru u patientských vzorků metodou LC-MS/MS.....	52
10.	Diskuze	61
11.	Závěr	66
12.	Seznam zkratk	67
13.	Seznam obrázků.....	70
14.	Seznam tabulek.....	71
15.	Literatura.....	72

1. ÚVOD

Cytomegalovirová infekce u pacientů po transplantaci plic je jednou z častých potransplantačních komplikací. Lékem volby k léčbě cytomegalovirové infekce je lék zvaný ganciklovir. Tento proléčivový nukleosidový analog vykazuje antivirovou aktivitu a podává se pacientům společně s valganciklovirem, avšak způsob podání těchto léčiv se liší. Ganciklovir je podáván pacientům intravenózně a valganciklovir je podáván perorálně. Ganciklovir má širokou antivirovou aktivitu proti herpetickým virům, a proto je nejen podáván k léčbě cytomegaloviru, ale také proti herpetickým virům *Herpes simplex virus 1* (HSV-1), *Herpes simplex virus 2* (HSV-2). Mezi viry citlivé ke gancikloviru patří také virus Epstein-Barrové, či virus lidské imunodeficiency (HIV). Obě tato antivirotika mohou způsobovat několik nežádoucích účinků především myelotoxicitu, která se projevuje leukocytopenií, trombocytopenií a neutropenií, a proto je důležité pravidelně sledovat funkce ledvin u léčených pacientů. V diplomové práci jsou shrnuty farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti gancikloviru, nežádoucí účinky a také rezistence. Dále je popisována transplantace plic společně s profylaxí. Závěrem teoretické části je popisována vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

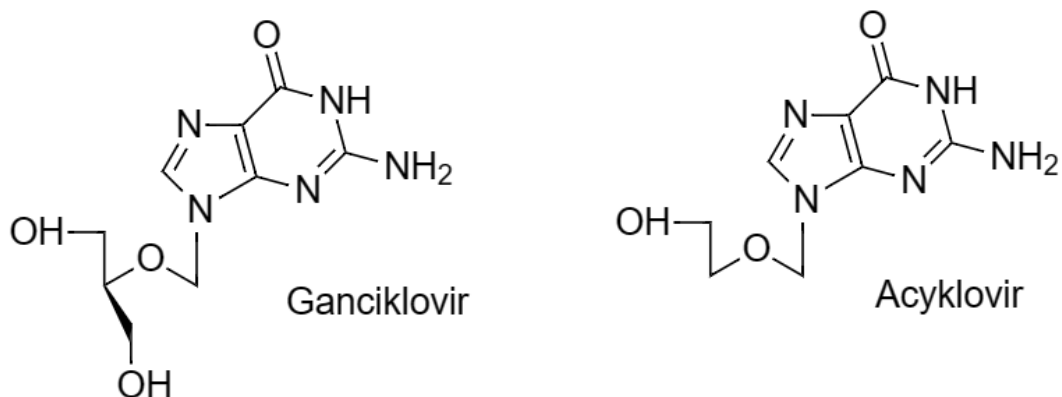
V praktické části diplomové práce byla popsána metoda pro stanovení gancikloviru pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí u pacientů po transplantaci plic. Pro zavedení metody je důležité, aby metoda splňovala validační parametry. Pro validaci metody byla měřena kalibrace, opakovatelnost, reprodukovatelnost, robustnost, mez detekce, mez kvantifikace, pravdivost a také byl změřen matricový efekt. Po validaci metody byly měřeny koncentrace gancikloviru v patientských vzorcích a vyhodnocena potřeba terapeutického monitorování hladin tohoto léku.

2. GANCIKLOVIR

2.1 Charakteristika gancikloviru

Ganciklovir (GCV) je proléčivový nukleosidový analog, který vykazuje antivirovou aktivitu. Toto virostatikum bylo vyvinuto v 70. letech 20. století jako antivirová léčba a v současnosti se klinicky používá především k léčbě cytomegalovirové infekce. GCV patří do skupiny antivirotik společně s hojně používaným acyklovirem, který je známý jako relativně bezpečný lék s malým množstvím nežádoucích účinků, jako jsou například flebitida a zánět v místě vpichu intravenózního podání léčiva. Ganciklovir je mnohem toxičtější v porovnání s acyklovirem, a proto se využívá zejména při těžkých cytomegalovirových infekcích. Od acykloviru se odlišuje tím, že má hydroxymethylovou skupinu v poloze 3' acyklického postranního řetězce. Má 8 - 20krát větší *in vitro* aktivitu proti lidskému cytomegaloviru a je stejně aktivní jako acyklovir proti *Herpes simplex virus 1* (HSV-1) a *Herpes simplex virus 2* (HSV-2). Dalšími viry citlivými ke gancikloviru jsou např. virus Epstein-Barrové (EBV) a virus lidské imunodeficiency (HIV) (Yorulmaz et al., 2016; Paintsil et al., 2009; Matthews et al., 1988).

K prevenci cytomegalovirové infekce u příjemců transplantovaných solidních orgánů se využívá společně s ganciklovirem také valganciklovir. Toto esterové proléčivo gancikloviru bylo vyvinuto k překonání špatné perorální biologické dostupnosti GCV. Vysoká biologická dostupnost GCV po podání valgancicloviru souvisí s rozpoznáním prekursoru jako substrátu intestinálním peptidovým přenašečem PEPT1. Valganciklovir je následně snadno hydrolyzován esterovou hydrolázou aminokyselin na ganciklovir (Perrottet, et al. 2009).



Obrázek 1: Strukturální vzorec gancikloviru a acykloviru (Vytvořeno v programu ChemDraw)

2.2 Farmakodynamické vlastnosti

Primárním mechanismem účinku GCV je inhibice replikace virové DNA ganciklovirem-5'-trifosfátem (ganciklovir-TP). Inhibice zahrnuje selektivní a silnou inhibici virové DNA polymerázy. Antivirová aktivita gancikloviru vyžaduje intracelulární fosforylaci a aktivaci virovou kinázou UL97 a DNA polymerázou UL54. Ganciklovir monofosfát je poté fosforylován na trifosfátovou formu buněčnými kinázami. Těmito enzymy jsou deoxyguanosinkináza, guanylátkináza a fosfoglycerátkináza. V této formě inhibuje cytomegalovirovou DNA polymerázu. Do mechanismu účinku mohou být zapojeny i jiné enzymy metabolizující nukleotidy. Selektivita a aktivita jsou také zesíleny stádáním gancikloviru-TP v buňkách infikovaných cytomegalovirem (CMV). Jakmile se ganciklovir-TP vytvoří, je velmi stabilní a v infikovaných buňkách přetrvává několik dní. Intracelulární poločas ($t_{1/2}$) GCV je 16,5 hodiny (Märtson et al., 2022; Matthews et al., 1988).

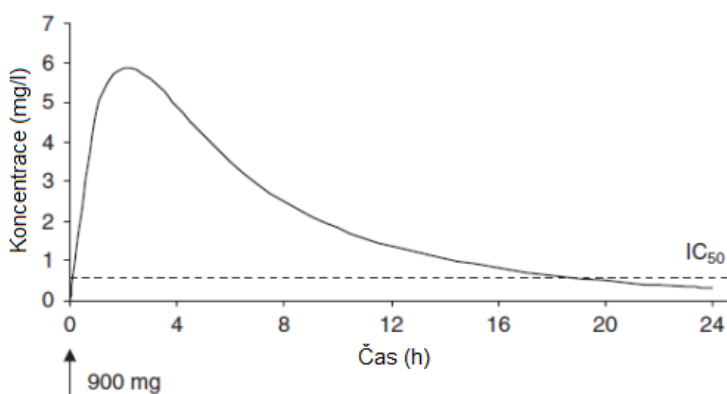
2.3 Farmakokinetické vlastnosti a indikace

Valganciklovir i ganciklovir vykazují vysokou farmakokinetickou interindividuální variabilitu. Dávkování těchto antivirotik je různé u každého jedince, je to dáno tělesnou hmotností pacienta a také rozdíly v hodnotách clearance kreatininu v séru (Padullés et al. 2016). Farmakokinetická analýza léčiva se stanoví dle farmakokinetických parametrů tzn. maximální koncentrace (C_{max}), biologický poločas ($t_{1/2}$), distribuční objem (V_d), distribuční objem na kilogram tělesné hmotnosti (V_d/kg) a následným vypočítáním plochy pod křivkou (AUC). Nejdůležitějším

parametrem, který popisuje biologickou dostupnost je právě AUC. Plocha pod křivkou je přímo úměrná celkové koncentraci stanovovaného léčiva v organismu. AUC je poté srovnatelná pro různé typy identického léčiva (Tyree et al., 2012).

Ganciklovir je antivirotikum, které má širokou aktivitu proti herpetickým virům i cytomegaloviru, a proto je indikován k léčbě herpesvirové infekce u imunokompromitovaných pacientů, profylaxi a také u příjemců transplantovaných plic, u nichž je cytomegalovirová infekce spojena s předčasným odmítnutím štěpu (Dvořáčková et al., 2022).

Zlatým standardem prevence a léčby onemocnění (lidského cytomegaloviru) HCMV u pacientů po transplantacích solidních orgánů je intravenózní (i.v.) podání gancikloviru nebo perorální podání valgancikloviru v dávkách, které by měly být upraveny podle funkce ledvin. Dávkování 5 mg/kg denně při intravenózní aplikaci, které se považuje za standard, poté odpovídá 3000 mg/den GCV podaného orální formou ve třech dávkách po 1000 mg. Při i.v. aplikaci antivirotika je dosahováno biologické dostupnosti kolem 40 – 50 %, při orálním podání GCV dosahuje biologická dostupnost pouze 5 %. Z tohoto důvodu byl syntetizován valganciklovir pro orální použití. Biologická dostupnost valgancikloviru při orálním použití dosahuje až 60 %. Dávkování GCV 5 mg/kg denně poté zhruba odpovídá denní dávce 900 mg valgancikloviru. Poddávkování antivirotik může vést k nízké či nedostatečné klinické účinnosti a k vytvoření rezistence. Nadměrné dávky gancikloviru mohou být naopak toxické (Padullés et al., 2016; Perrottet et al., 2009).



Obrázek 2: Farmakokinetický profil GCV při orálním podání 900 mg valgancikloviru (Převzato a upraveno z Perrottet et al., 2009).

2.4 Nežádoucí účinky a rezistence

Léčba ganciklovirem a valganciklovirem je velmi účinná a specifická, avšak s sebou přináší i řadu vedlejších účinků. Nejzávažnějšími nežádoucími účinky jsou především myelosuprese, neutropenie a trombocytopenie, které mají za následek častější rozvoj infekcí, především mykotických a bakteriálních.

Poněvadž se tato antivirotika nepodávají ve své účinné formě, je nutné, aby nejprve byla metabolizována infikovanou buňkou. Důležitým enzymem je virová thymidinkináza, která konvertuje tato léčiva na monofosforylovanou formu. V genu pro tento enzym, může vzniknout mutace, která je zodpovědná za vznik rezistence na GCV a je schopna zkomplikovat léčbu pacienta (Patel et al., 2014).

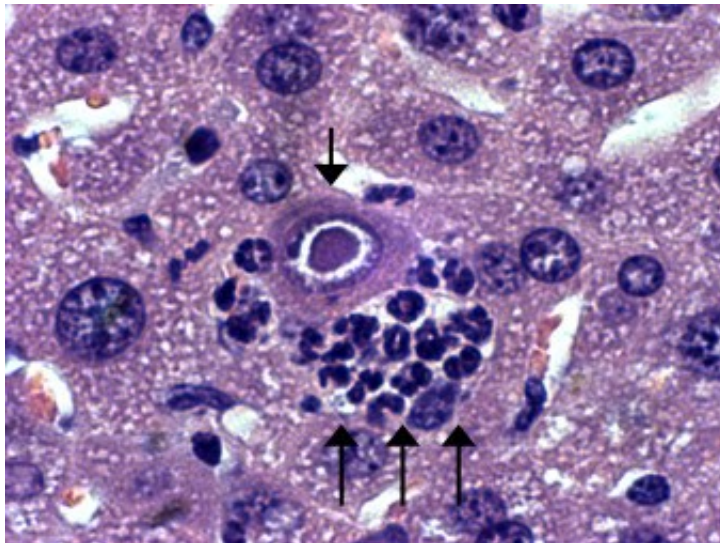
Infekce cytomegalovirem rezistentním na ganciklovir (ganR-CMV) je hlášena stále častěji u příjemců transplantátu solidního orgánu. Vzdávající incidence rezistencí je spojována s použitím silnější imunosupresivní léčby a s delší expozicí antivirotiky. Výskyt ganR-CMV souvisí s typem transplantovaného orgánu, sérostatem CMV příjemce a dárce, nižšími dávkami nebo delším trváním profylaxe ganciklovirem. Značný vliv má samozřejmě i vysoká virová zátěž CMV a intenzivnější imunosuprese. Rezistence se pojí i s prodloužením hospitalizace a vyšší mortalitou (Fisher et al., 2017, Minceš, et al., 2014).

3. CYTOMEGALOVIROVÁ INFEKCE

3.1 Popis viru

Lidský cytomegalovirus (HCMV, nebo také lidský herpesvirus-5, HHV-5) patří do rodiny virů známých jako herpesviry, čeleď *Herpesviridae*. Podčeleď se nazývá *Betaherpesviridae* a rod *Cytomegalovirus*. Má největší genom ze všech lidských herpesvirů. Průměrná velikost genomu je 230 tisíc párů bází a obsahuje průměrně 165 genů (Emery, 2012). Virion se skládá z dvouvláknového lineárního DNA jádra v ikosahedrální nukleokapsidě obalené proteinovým tegumentem. Tyto složky jsou uzavřeny v lipidové dvojvrstvě, která obsahuje velké množství virových glykoproteinů. Zralé viriony mají průměr od 200 do 300 nm (Mocarski et al., 2007). HCMV je široce rozšířený virus, který se u pacientů může projevovat asymptomaticky, ale může vyvolat až těžké dysfunkce koncových orgánů u imunokomprimovaných pacientů s vrozeným

onemocněním HCMV (Zheng et al., 2019). Promořenost populace se v různých částech světa liší v závislosti na sociálních a ekonomických podmínkách. S narůstajícím věkem se séroprevalence v populaci zvyšuje (Walker et al., 2007).



Obrázek 3: Cytomegalické inkluzní tělo (Zdroj: Louten, 2016).

Pro všechny lidské herpetické viry jsou dány 4 společné znaky:

- **Velký počet proteinů**, které jsou kódovány virem. Tyto proteiny se účastní syntézy a metabolismu nukleových kyselin, zpracování proteinů a ovlivňování imunitního systému hostitelů.
- V jádře hostitelské buňky probíhá **syntéza nových virových DNA** a výstavba kapsid.
- Virová proliferace, která je spojena se **vznikem virových partikulí** je doprovázena zničením infikované buňky.
- Všechny herpetické viry jsou schopny zůstat v latentním stavu v hostitelských buňkách. Ve většině případů se DNA nachází v jádře hostitelských buněk v podobě uzavřených kruhových molekul. Vir v období latence exprimuje pouze část genů. Nicméně **latentní genomy si schopnost reaktivace a následné replikace zachovávají**. Následkem reaktivace je vir schopný vyvolat onemocnění (Roizman and Pellett, 2001).

3.2 Epidemiologie a patogeneze

Pozitivita CMV IgG protilátek svědčí o prodělané infekci a protilátky se nacházejí přibližně u 60 % dospělých ve vyspělých zemích a 100 % v rozvojových zemích. Cytomegalovirová infekce může postihnout plod, novorozence, batole, dítě nebo dospělého člověka. Obecně platí, že lidé narození do špatných sociálně-ekonomických podmínek získávají HCMV dříve než ostatní. To znamená, že značný počet jedinců zůstává neinfikovaný, dokud nezíská primární infekci. Při pozitivitě CMV IgM protilátek u dosud IgG séronegativních jedinců mluvíme o tzv. primoinfekci. Ve srovnání s EBV primoinfekcí CMV primoinfekce nastává okolo 33. roku života. Příznaky onemocnění CMV jsou podobné mononukleóze tzn. febrilie, myelosuprese a tonzilitida. Při infekci cytomegalovirem dochází téměř u 70 % pacientů ke zvýšení koncentrace alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) v séru. K postižení jiných orgánů dochází zřídka, ale může dojít k postižení gastrointestinálního traktu. Nejčastěji dochází k CMV kolitidě u pacientů s idiopatickým střevním zánětem, encefalitidě u pacientů po transplantaci krvetvorných kmenových buněk nebo retinitidě u pozitivních HIV pacientů. Při pozitivitě CMV protilátek typu IgG (anti-CMV) je u pacienta diagnostikována latentní infekce. Při tomto typu infekce nedochází k postižení jater ani jiného orgánu, avšak může představovat riziko pro tzv. reaktivaci infekce. Ke vzplanutí latentní infekce může dojít u zdravých osob, ale nejvyšší riziko reaktivace je u pacientů po orgánových transplantacích (Griffiths et al., 2015; Chmelová et al., 2017).

3.2.1 Přenos a latence CMV

Lidský cytomegalovirus může být přenášen slinami, transplacentárně, pohlavním stykem, transfúzemi, kojením, transplantací pevných orgánů nebo transplantací krvetvorných kmenových buněk. Séroprevalence HCMV v imunokompetentním hostiteli je obvykle asymptomatická. Jak již bylo zmíněno, vir vytváří celoživotní latenci v hostiteli a může se periodicky reaktivovat. Mechanismus, kterým vir je schopen se reaktivovat, není zcela objasněn. Odhaduje se, že během latence je virový genom HCMV přenášen z mononukleárních buněk periferní krve nebo kostní dřeně mobilizované faktorem stimulujícím kolonie granulocytů s přibližně 2 až 13 kopiemi genomu na infikovanou buňku. Přesné místo pro latenci nebylo definitivně určeno,

avšak domníváme se, že se nachází v buňkách myeloidní linie (Crough et al., 2009; Sinclair et al., 2006).

3.2.2 Infekce v těhotenství

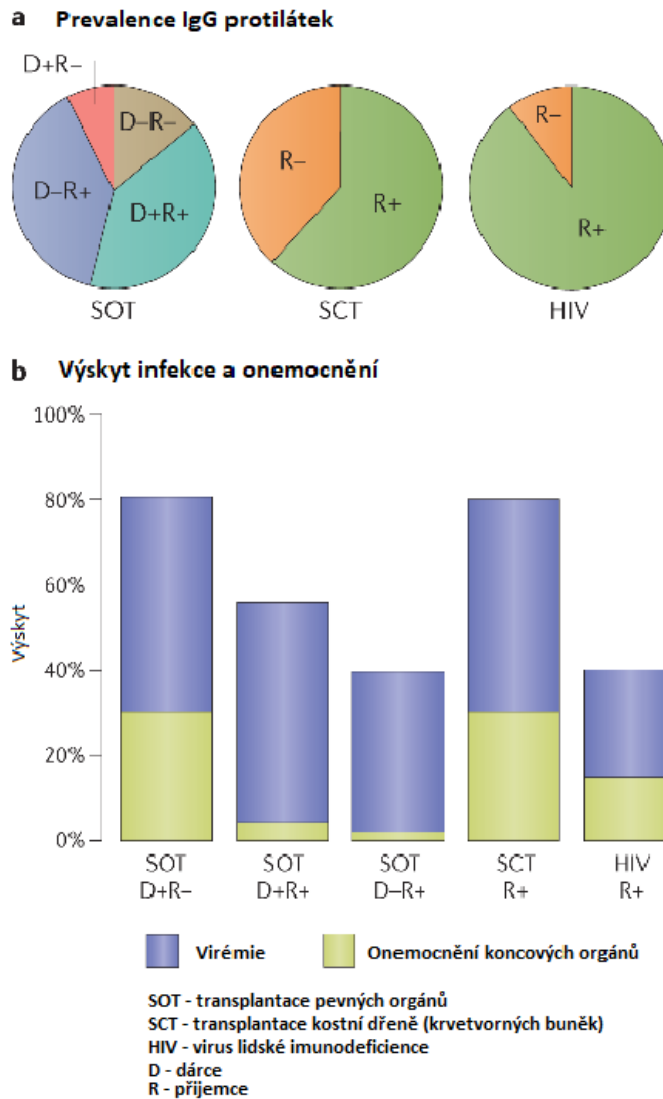
Přibližně 2 % těhotných séronegativních žen mají sérokonvertovanou infekci v době porodu. Pro tyto ženy jsou hlavním zdrojem HCMV malé děti, především batolata, jejichž sliny a moč obsahují vysoké hladiny lidského cytomegaloviru. Ženy s primární infekcí během těhotenství přenášejí virus přes placentu, a to způsobuje intrauterinní infekci. Tento případ obvykle není rozpoznán až do porodu, protože příznaky matky nemusí být natolik vážné, aby žena vyhledala lékařskou pomoc. Matky si mohou zažádat o diagnostiku intrauterinní infekce amniocentézou a testování plodové vody na HCMV DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Během těhotenství může být plod infikován také reaktivací latentní mateřské infekce nebo reinfekce matky novým kmenem HCMV. Pro diagnostiku těchto latentních infekcí neexistují žádné diagnostické testy a matky nemají žádné příznaky, které by hlásily (Revello et al., 2011; de Vries et al., 2013).

3.2.3 Vrozená a novorozenecká infekce

Lidská cytomegalovirová vrozená infekce způsobuje závažnou morbiditu a mortalitu u novorozenců a je hlavní infekční příčinou hluchoty. Vrozená infekce HCMV má za následek také neurovývojové abnormality u dětí. Četnost vrozené infekce vyplývající z primární infekce matky během těhotenství nebo reaktivace latentní infekce u séropozitivní matky v době těhotenství je přibližně 0,64 %. Samozřejmě se výskyt vrozené infekce u rozdílných studovaných populací může lišit. Séronegativní matky, které se nakazí v těhotenství, mohou porodit dítě až s 40% rizikem vrozené infekce. Nejzávažnější onemocnění novorozence nastává tehdy, pokud se primární infekce u séronegativní matky vyskytne během prvního trimestru. Při reaktivaci infekce HCMV během těhotenství je riziko vrozené infekce nižší, poněvadž již existující mateřské protilátky proti cytomegaloviru mají ochrannou roli proti intrauterinnímu přenosu. Novorozenci mohou vykazovat příznaky jako jsou intrauterinní růstová retardace, hepatitida se žloutenkou, trombocytopenie s petechiemi, hepatosplenomegalie, pneumotitida a také závažné poškození centrálního nervového systému (Kenneson and Cannon, 2007, Crough and Khanna, 2009).

3.2.4 Infekce po transplantaci pevných orgánů

Zcela první případy transplantace pevných orgánů (SOT) byly komplikovány HCMV pneumotitidou s vysokou mortalitou. Průkopníci v transplantaci orgánů zkusili snížit dávky imunosupresivních léků, avšak s rizikem, že může dojít k rejekci štěpu. Vyvážení potřeby imunosuprese a potřeby imunitní kontroly velmi těžilo z vývoje méně toxických imunosupresivních léků spojených s HCMV, a to antivirovým ganciklovirem a jeho prekurzorem valganciklovirem. Problém poškození koncových orgánů (EOD) však stále přetrvával. U pacientů se stále objevovaly pneumonitidy bez jakýchkoliv předchozích příznaků. U mnoha pacientů se objevila horečka, avšak tento příznak je po transplantaci tak častý, že není specifický pro infekci HCMV. Klinicky se akutní HCMV infekce u imunokomprimovaného pacienta po transplantaci pevných orgánů může projevit jako syndrom charakterizovaný leukopenií, horečkou, malátností, atralgií či maskulární vyrážkou. Lidský cytomegalovirus byl histopatologicky detekován nejen v plicích, ale i v jiných orgánech, a to zejména v gastrointestinálním traktu u pacientů s gastritidou, ezofagitidou nebo kolitidou. Pacienti, kteří si stěžovali na poruchy vidění, byli také vyšetřeni a HCMV byl rozpoznán i v oku. Všechny tyto stavy označujeme jako „onemocnění koncových orgánů se špatným výsledkem.“ Klíčem k pokroku v léčbě HCMV u SOT bylo definování přirozeného průběhu infekce. Tehdy se ukázalo, že infekce tímto virem předchází EOD a že předtím, než dojde k EOD, dochází k nárůstu vysoké virové zátěže. Tato skutečnost poskytla příležitost k léčbě aktivní infekce dříve, než způsobila EOD. Léčba aktivní infekce před poškozením orgánů se nazývá preemptivní terapie (PET). Série studií prokázala, že nejvyšší virová zátěž v moči u pacientů s transplantací ledvin byla zjištěna u pozitivního dárce a negativního příjemce (D⁺R⁻). Tento případ znamená, že dárce je infikován HCMV, avšak recipient nemá žádné protilátky proti tomuto viru (Griffiths et al., 2021).



Obrázek 4: Prevalence protilátek proti lidskému cytomegaloviru a incidence infekce u imunokompromitovaných jedinců (Převzato a upraveno z Griffiths et al., 2021).

Na obrázku 4 (Obrázek 4) vidíme, jak může prevalence IgG protilátek před transplantací seskupit SOT do čtyř podskupin. Po transplantaci pevných orgánů se primární infekce vyskytuje v 80 % případů transplantace D^+R^- . V podskupině dárce negativní a příjemce pozitivní (D^-R^+) pouze 40 % příjemců reaktivuje latentní HCMV po transplantaci. To ukazuje, že již existující přirozená imunita proti HCMV poskytuje ochranu proti exogenním a endogenním zdrojům viru. Prevalence předchozí infekce HCMV je vysoká u jedinců s virem lidského imunodeficitu (HIV) přibližně 40 % a 80 % u jedinců, kteří čekají na transplantaci hematopoetických kmenových buněk.

Vůbec nejvíce komplikovanou skupinou pro studium je podskupina dárce pozitivní a příjemce pozitivní (D^+R^+), to znamená, že dárce i příjemce jsou infikováni lidským cytomegalovirem. Podskupina D^+R^+ je ohrožena buď reaktivací, nebo reinfekcí a má

fenotyp s rizikem 55% virémie. Pokud předpokládáme, že riziko reaktivace skupiny D^+R^+ je stejné jako u podskupiny D^-R^+ , musí se míra reinfekce blížit 15 %. V případě, kdy dva příjemci transplantace ledvin (R^+ a R^-) dostali ledviny od stejných séropozitivních dárců, sekvenování prokázalo reinfekci tam, kde štěp pocházel od dárce infikovaného HCMV (Griffits, et al., 2021).

3.3 Léčba infekce

Jediným licencovaným lékem dostatečně účinným k léčbě aktivní infekce HCMV je ganciklovir. Antivirotikum bylo licencováno roku 1989, ačkoli perorální léčivo valganciklovir, které dodává stejnou účinnou látku, bylo licencováno v roce 2011. Je zřejmé, že v této oblasti by bylo potřeba více licencovaných léčiv, která jsou bezpečná a zároveň účinná proti HCMV. Jedním z důležitých výsledků klinických studií patogeneze HCMV je poskytnutí pádných důkazů, že stanovení virové zátěže je robustní náhradou pro měření EOD, a tedy požadavkem pro PET (Natori et al., 2018).

Léčba je založena na podávání intravenózního gancikloviru a perorálního valgancikloviru, je důležité podávat správné dávky, protože oba tyto léky by měly být upraveny dle funkce ledvin. Jak bylo řečeno, nežádoucími účinky léčiv je myelotoxicita, zejména leukocytopenie, neutropenie a trombocytopenie. Valganciklovir byl prokázán jako non-inferiorní k intravenóznímu gancikloviru u ne život ohrožujícího CMV onemocnění. V těchto případech se doporučuje režim dávkování 900 mg dvakrát denně. U závažného a invazivního onemocnění je vhodnější podávat intravenózní ganciklovir v dávce 5 mg/kg každých 12 hodin. Snížením intenzity imunosuprese lze zvýšit účinnost antivirové léčby (Nosotti et al., 2018).

Byly provedeny tři studie antivirových léčiv, které byly podávány profylakticky, z důvodu, zda mohou kontrolovat HCMV virémii. Prvním lékem byl maribavir, který snižuje schopnost viru rozkládat jadernou membránu potřebnou k tomu, aby nově vzniklé viriony mohly uniknout z jádra infikované buňky. Primárním cílovým bodem studie bylo snížení EOD. Antivirotikum nedokázalo snížit EOD, poněvadž byla zvolena nejnižší dávka léku místo nejvyšší netoxické dávky (Marty et al., 2019). Ve druhé studii byl použit brincidofovir, který podobně jako ganciklovir inhibuje virem kódovanou DNA polymerázu. Při této studii byla povolena preemptivní terapie jako primární cílový bod, ale po ukončení profylaxe zde byla navíc zahrnuta eliminace léčiva. Brincidofovir zpočátku potlačoval potřebu PET, avšak tento rozdíl se poté časem snižoval. Důvodem

byl přebytek reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) v lékové větvi studie (Marty et al., 2017). V této části studie byly použity steroidy, které vyvolaly HCMV virémií. Třetím lékem letermovirem, se zabývala poslední studie. Letermovir inhibuje komplex terminázy, který přebírá nově nasyntetizovanou HCMV DNA ve formě konkatemerů. Ty jsou pak rozstříhány na délky genomů a jsou zabudovány do vznikajících virionů. Tento lék významně snížil preemptivní terapii, a proto byl licencován k použití (Marty et al., 2019; Marty et al., 2017).

4. TRANSPLANTACE PLIC

4.1 Historie

V roce 1963 se uskutečnila první transplantace plic od dárce s nebijícím srdcem. Pacient byl přivezen na urgentní příjem v šoku z masivního infarktu myokardu. Veškerá snaha o resuscitaci selhala, a proto rodina umožnila darování levé plíce k transplantaci. James D. Hardy vedl svůj transplantační tým a transplantace levé plíce byla úspěšná. Plicní štěp pracoval správně po dobu osmnácti dní. Imunosuprese v této době byla založena na podávání azathioprinu a prednisonu a také zahrnovala ozáření mediastinu. Avšak pacient po 18 dnech zemřel na akutní selhání a infekci ledvin. Při pitvě se zjistilo, že plíce byly v dobrém stavu, správně ventilovány a nevykazovaly žádné známky odmítnutí. Cévní anastomózy byly zřetelné (Nosotti, et al., 2018).

4.2 Současnost a budoucnost transplantací

V posledním desetiletí zůstal počet transplantací poměrně stabilní, oproti dřívějšímu exponenciálnímu nárůstu. Souviselo to především s omezenou dostupností vhodných orgánů k transplantaci, a proto jsou nyní častěji využíváni dárce s rozšířenými kritérii, oproti standardním kritériím.

Celkový počet dárců plic lze zvýšit těmito způsoby:

- a) Živé transplantace
- b) Plíce z dárcovství po oběhové smrti dárců (DCD)
- c) *Ex vivo* hodnocení a rekondice dříve nevhodných dárcovských plic

První transplantace plic žijících dárců (LDLLT) byla úspěšně zavedena koncem roku 1990 Vaughnem Starnesem na Stanfordské univerzitě. Při této transplantaci byl odebrán horní lalok matky pro její 12letou dceru, která trpěla bronchopulmonální dysplazií. Dalším pacientem byla tříletá dívka s Eisenmengerovým syndromem. Transplantoval se pravý jednalok pomocí středního laloku od otce a uzavřel se defekt komorového septa. Bohužel dívka zemřela na primární dysfunkci štěpu. Po této neúspěšné zkušenosti se přešlo na bilaterální LDLLT. Avšak malý objem dvou transplantovaných laloků byl cílen k provedení tohoto postupu jen u dětí. Dříve byl tento postup aplikován pouze u pacientů s cystickou fibrózou. Nyní se tento postup uznává u pacientů s obstrukčním, infekčním, restriktivním a hypertenzním plicním onemocněním, a to jak u dětí, tak dospělých. V současné době jsou výsledky LDLLT stejné, ne-li lepší než konvenční transplantace kadaverických plic (Somers et al., 2015).

Jak již bylo dříve zmíněno, první plicní transplantace byla provedena roku 1963, Jamesem Hardym. Dárce zemřel po infarktu myokardu, a proto byly plíce vystaveny období teplé ischémie před lokálním ochlazením. Praxe používání orgánů od dárců umírajících na kardiocirkulační zástavu byla do značné míry opuštěna. Po mezinárodním workshopu v nizozemském Maastrichtu byly uznány jednotlivé kategorie DCD na základě tzv. Maastrichtské klasifikace v roce 1990. Většina hlášených transplantací plic DCD v současné době pochází ze skupin, které jsou získávány od dárců s těžkým poškozením mozku po vysazení podpory životních funkcí (Ruttens et al., 2017).

Časné pokusy o perfuzi plic byly komplikovány tvorbou edému a následným zhoršením plicních funkcí. Důležitým milníkem byl vývoj Steenova roztoku. Tento pufrovaný perfuzát s vysokou koncentrací albuminu, vytváří ideální koloidní osmotický tlak asi 30 mm Hg. Roztok umožňuje udržovat fyziologické perfuzní tlaky a průtok v plicích bez vzniku tkáňového edému či dehydratace. V dnešní době se *ex vivo* plicní perfuze (EVLP) stává standardní technikou pro lepší hodnocení plic od dárců s rozšířenými kritérii a od dárců po kardiocirkulační zástavě. Prospektivní klinické studie se v současnosti věnují výsledkům u příjemců plic EVLP. Pokud se výsledky studií ukáží jako příznivé, může se metoda EVLP stát konzervativní metodou pro standardní plicní transplantace, poněvadž se zkrátí ischemická perioda a proces transplantace se stane lépe plánovaným (Venuta et al., 2017; Sanchez et al., 2012; Warnecke et al., 2016).

4.3 *Dárcovství a odběr plic*

Transplantace plic při multiorgánovém odběru u pacientů s bijícím srdcem je uskutečnitelná pouze v 15–20 % případů. Kontraindikací je častá plicní infekce, která postihuje dlouhodobě intubované pacienty. Dalšími komplikacemi odběru plic dárce jsou například poškození hrudníku u polytraumatizovaných pacientů nebo iatrogenní poškození v průběhu intenzivní péče. Obecně vhodné plíce k transplantaci jsou plíce, které jsou funkčně zachovalé, odpovídají velikosti hrudníku příjemce a jsou kompatibilní v systému AB0. Nejvhodnějším dárce plic je pacient, u kterého byla prokázána smrt mozku a splňuje tato specifická kritéria pro odběr plic:

- dárce mladší 60 let
- kompatibilita v AB0 systému
- rentgen (RTG) plic bez patologického nálezu
- „size matching“ – porovnání rentgenových snímků plic dárce a příjemce (Lischke et al., 2011)



Obrázek 5: Hodnocení horizontální a vertikální velikosti plic na RTG snímku (Zdroj: Lischke et al., 2011).

Na obrázku 5 (Obrázek 5) lze vidět měření vertikální a horizontální velikosti plic, kde vertikální velikost plic je měřena od vrcholu plíce k vrcholu bránice, zatímco u horizontální velikosti plic je velikost měřena v úrovni vrcholů bránice. Dalšími potřebnými a posuzovanými parametry jsou např. anamnéza plicních onemocnění, výška a hmotnost dárce, vyšetření sputa u dlouhodobě ventilovaných pacientů, oxygenace, centrální žilní tlak či plicní kapilární tlak (Lischke et al., 2011).

Nový způsob pro zachování a přehodnocení plic dárce je metoda *ex vivo* plicní perfuze (EVLP). Při této metodě je orgán uložen do fyziologického roztoku v podmínkách *ex vivo*. Ve fyziologickém roztoku se orgán může dále vyšetřovat a také léčit před vlastní transplantací. Tato metoda může v klinické praxi představovat výrazné snížení mortality (Lischke et al., 2011). Fakultní nemocnice v Motole patří mezi šest největších transplantačních center v Evropě a je jediným centrem s mezinárodním programem, které poskytuje taktéž transplantace pacientů pro Slovenskou republiku. V roce 2022 lékaři uskutečnili 54 transplantací plic.

4.4 Předtransplantační infekce a profylaxe

Před transplantací je nutné identifikovat kolonizaci dýchacích cest pacienta společně s vyšetřením dřívějších infekčních onemocnění. Všechny tyto informace jsou obvykle zaznamenány u pacientů s cystickou fibrózou, poněvadž jsou neustále kontrolovány. Pacienti, kteří mají jiné indikace k transplantaci, by měli být pečlivě vyšetřeni na infekční onemocnění. V období zařazení pacienta do seznamu čekatelů je doporučený široký panel laboratorních testů. Do tohoto panelu patří sérologické testy na CMV, EBV, viry hepatitidy (HBV) a (HCV), virus herpes simplex (HSV), virus lidské imunodeficiencie (HIV), varicella-zoster virus (VZV) a na syfilis způsobený spirochétou *Treponema pallidum*. Dalším vyšetřením, které je doporučováno, je bronchoalveolární laváž (BAL), která nám poskytne informace o bronchiální mikrobiotě. Po vyšetření BAL, lze zavést antibiotickou terapii, která může být nasazena před i po transplantaci (Nosotti et al., 2018).

4.4.1 Antibakteriální profylaxe

Aby se zabránilo infekcím po transplantaci plic, klade se důraz na pravidla asepse. Je nutné, aby došlo k pečlivé přípravě pokožky s produkty obsahujícími jodofory nebo chlorhexidin glukonát ve vodném roztoku nebo roztoku na bázi alkoholu. Sterilní závěsy by neměly být přeskupovány poté, co jsou umístěny. Sterilní roušky by měly být vyměněny po několika hodinách operace. U příjemců s vysokou bakteriální zátěží je vhodné promýt pleurální dutinu a průdušnici roztokem jodoforů nebo antibiotickým roztokem před transplantací štěpu. Přiměřená doba podávání perioperačních antibiotik během operace není přesně určena. Neexistují přesné pokyny, ani standardní léčba týkající se výběru antibiotika při transplantaci plic, ale doporučuje se pravidelná

profylaxe všem příjemcům. Pacientům, kterým je implantován štěp bez dokumentované bakteriální kolonizace, je prvním lékem volby ceftazimid. Podávání tohoto antibiotika by mělo začít těsně před transplantací. Za současného sledování funkce ledvin bychom měli podávat ceftazimid po dobu 48-72 hodin. Při alergii na betalaktamová antibiotika lze využít jako alternativu levofloxacin. K pokrytí grampozitivních bakterií se podává ceftazimid ve spojení s vankomycinem (Nash et al., 2010; Smibert et al., 2016).

4.4.2 Antifungální profylaxe

Příjemci plicních štěpů mají vyšší riziko plísňových infekcí než příjemci jiných pevných orgánů. *Aspergillus* je nejčastěji se vyskytujícím patogenem při transplantaci plic, zatímco *Candida* je patogen, který se vyskytuje u jiných transplantací pevných orgánů. Je důležité věnovat pozornost i jiným houbám, které jsou schopny také vyvolat závažné infekce jako jsou mucormycety, *Cryptococcus*, *Fusarium* nebo *Scedosporium*. Aspergilóza je jednou z nejobávanějších infekčních komplikací po transplantaci plic. Infekce se většinou rozvine do jednoho roku, avšak může postihnout pacienty až po třech letech od transplantace. Toto onemocnění se může vyvinout až k ulcerózní tracheobronchitidě, které řadíme mezi nejzávažnější komplikace zákroku. Antifungální profylaxe je dobře popsána u transplantace jater, avšak stále chybí optimální strategie této profylaxe u transplantace plic. Následkem toho jsou v transplantačních centrech různé profylaktické strategie pro snížení plísňových infekcí. V roce 2016 bylo publikováno asi sedm studií, které dospěly k závěru, že univerzální antifungální profylaxe ve srovnání s cílenou nebo žádnou profylaxí snižuje výskyt plísňových infekcí u pacientů po transplantaci plic. Nejracionálnější strategií profylaxe je podávání vorikonazolu a posakonazolu, nicméně je důležité, aby byla sledována hepatotoxicita a léková interakce. Profylaktická doba je samozřejmě mezi transplantačními centry heterogenní a pohybuje se mezi 6 a 12 měsíci. Ve Fakultní nemocnici v Motole je tato doba 9 měsíců. (Pilarczyk et al., 2016; Nosotti et al., 2018).

5. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

Chromatografie patří do skupiny analytických separačních metod. Tyto metody umožňují separaci, identifikaci a čištění složek směsi pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. V současné době se tyto techniky řadí mezi nejpoužívanější a například

v oborech laboratorní diagnostiky jsou zcela nenahraditelné pro analýzu látek v oblasti léků, toxikologie a dědičných metabolických poruch (Coskun, 2016; Nováková et al., 2013).

5.1 Princip metody

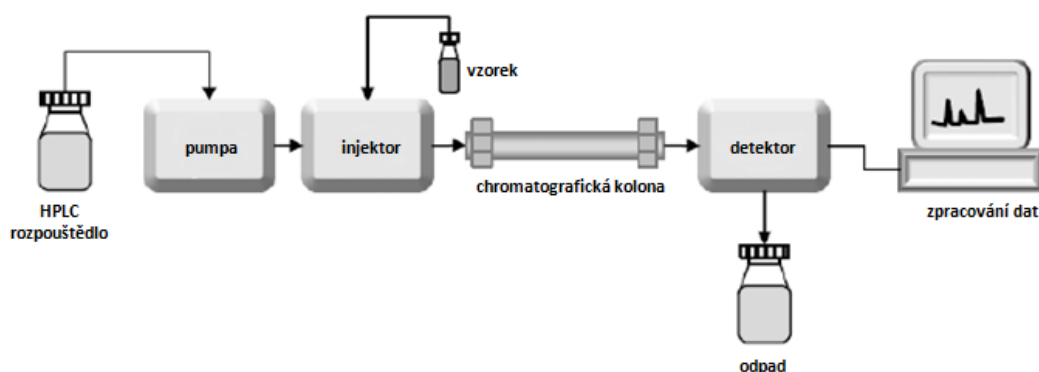
Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC – High performance liquid chromatography) můžeme charakterizovat jako separační metodu, která je založena na rovnovážné distribuci analytů mezi vzájemně nemísitelnými fázemi. Stacionární fáze (SF) je nepohyblivá fáze, která je nejčastěji zakotvená na nosiči uvnitř chromatografické kolony. V běžném typu kapalinové chromatografie je SF ve formě kolony naplněné velmi malými porézními částicemi s velikostí 1,7-10,0 μm nebo porézního monolitického materiálu. Mobilní fáze (MF) je kapalina (nejčastěji směs rozpouštědel), která se pohybuje přes kolonu čerpadlem za vysokého tlaku. Při HPLC je vzorek v kapalně formě vstřikován do mobilní fáze jako malý objem na hlavu chromatografické kolony. Při průchodu vzorku přes analytickou kolonu dochází k separaci jednotlivých složek vzorku, které jsou poté spolu s MF unášeny do detektoru (Moldoveanu et al., 2022).

5.2 Popis systému HPLC

Základní kapalinový chromatograf se skládá z několika částí:

- zásobník s mobilní fází a degaser (odplyňovač)
- vysokotlaké čerpadlo
- autosampler
- termostatovaná chromatografická kolona
- jeden nebo více detektorů
- řídicí jednotka a jednotka pro zpracování dat

V moderních HPLC přístrojích je celý systém řízen počítačovým systémem. Je důležité, že mohou být volitelně zahrnuty i další součásti aparatury, jako je chladič systém pro autosampler, sběrač frakcí a přepínání kolony pro zpětný tok (Moldoveanu et al., 2017).



Obrázek 6: Jednoduché schéma konfigurace pro systém HPLC (Převzato a upraveno z: Moldoveanu et al., 2017).

Mobilní fáze v kapalinové v HPLC se může skládat až ze 4 roztoků, které jsou v degaseru odplyněny, následně smíchány a čerpány vysokotlakým čerpadlem. Během tohoto procesu je využíváno izokratické eluce, které je docíleno konstantním složením MF v průběhu měření. Další možností je použití gradientové eluce, jejímž cílem je zvýšení eluční síly, které je dosaženo změnou MF během separace. Izokratická eluce dovoluje využití širšího spektra detektorů a zajišťuje stabilní linii chromatogramu. Gradientová eluce umožňuje získat užší a ostřejší píky v chromatogramu, a tím je zajištěna vyšší citlivost měření (Cibiček et al., 2014).

V nástřikovém zařízení neboli autosampleru, kterým dále mobilní fáze prochází, dochází pomocí smyčky o určitém objemu (obvykle 10 až 100 μ l) a vícecestného ventilu k vnášení vzorku do toku mobilní fáze (Cibiček et al., 2014).

Samotný separační proces následně probíhá na termostátované chromatografické koloně, která bývá opatřena předkolonou či filtrem. Dle typu separovaných sloučenin se vybírá uspořádání HPLC metody, které bývá buď na reverzních fázích (RP – reversed-phase) nebo na normálních fázích (NP – normal-phase). Kapalinová chromatografie na normálních fázích má polaritu mobilní fáze menší než polaritu fáze stacionární, kterou bývá oxid křemičitý, přičemž MF je tvořena nepolárním rozpouštědlem (nejčastěji hexan či heptan). Tento typ uspořádání se používá jen zřídka, poněvadž separuje polární látky, které představují v biomedicínských oborech jen úzkou část analytů. Nejvíce využívaná je kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-LC – Reversed-phase

liquid chromatography) z důvodu separace méně polárních a nepolárních látek, mezi které právě patří většina bioanalytů včetně léčiv a drog. Uspořádání RP-LC se vyznačuje vysokou variabilitou. Stacionární fáze je navázána na povrchu nosiče, kterým bývá nejčastěji silikagel nebo jiný pevný materiál. SF je tvořena nepolárními alifatickými skupinami např. oktadecylovým uhlíkovým řetězcem (-C18) a je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mimo jiné mohou být jako SF použity porézní polymerní materiály a také monolitické materiály. U monolitických kolon se setkáváme se SF v podobě monobloku o definované velikosti pórů. Velký vliv na separaci má také velikost částic. Ta ovlivňuje zejména vířivou difúzi, která se objevuje, když malé proudy kapaliny protékají různými kanálky v koloně. Tento jev je běžný u porézních částic. Tři hlavní typy částic jsou: porézní částice, povrchově porézní částice (core-shell) a částice pelikulární. Nejběžnějším a nejčastějším typem stacionární fáze v HPLC jsou porézní částice. Mobilní fáze představují směsi vody nebo pufru s obsahem polárních organických rozpouštědel, jako je metanol či acetonitril. V průběhu RP-LC se jako první eluují vysoce polární látky. S klesající polaritou látek se začínají uplatňovat interakce se SF, což je obvykle spojeno s přibývajícím retencí těchto látek v koloně. Chromatografická kolona musí být odolná vůči vysokým tlakům (řádově i desítky MPa) a chemickému působení mobilní fáze. Následně separované analyty s MF míří do detektoru (Gilar et al., 2021; Moldoveanu and David, 2022; Cibiček et al., 2014).

5.2.1 Detektory v HPLC

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsou nejvíce využívány detektory absorpční fotometrické (měřící prošlé světlo – UV/VIS), dále pak fluorescenční detektory (měřící sekundární záření po absorpci primárního elektromagnetického záření), elektrochemické (měřící vzniklý proud při průchodu oxidované či redukované formy látky) nebo refraktometrické detektory. Mimo uvedené detektory se velmi často používá spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Nováková et al., 2013; Cibiček et al., 2014).

- Absorpční fotometrické detektory (UV/VIS)

Tento typ detektoru je v současnosti nejběžnějším HPLC detektorem, poněvadž mnoho analytů absorbuje záření v UV nebo viditelné oblasti od 190 do 800 nm. Koncentrace vzorku (kvantita) je dána Lambert – Beerovým zákonem podle rovnice,

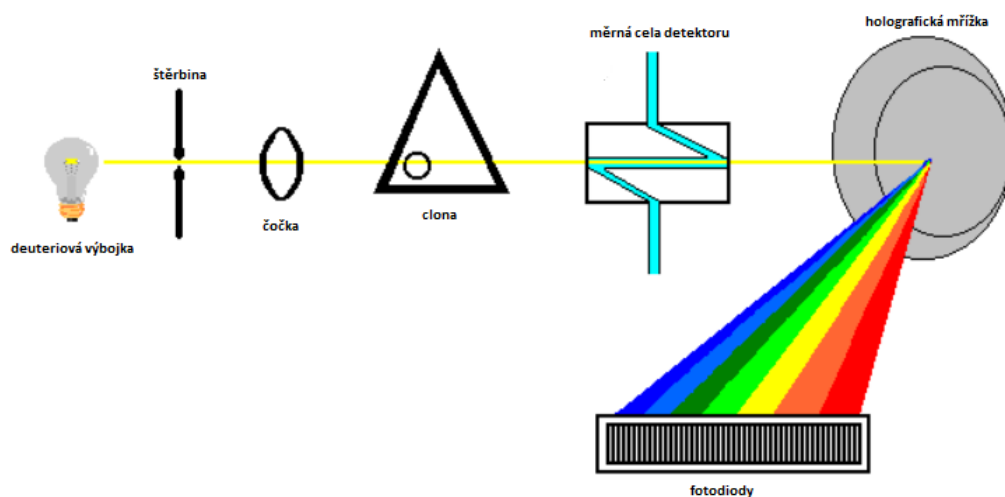
kdy měřenou veličinou při průchodu světelného paprsku vzorkem je absorbance. Absorbance je bezrozměrná veličina a je přímo úměrná koncentraci absorbující látky (Nováková et al., 2013; Cibiček et al., 2014; Swartz, 2010).

Podle konstrukčního uspořádání se UV/VIS detektory rozdělují na tři typy:

Detektory s fixní vlnovou délkou – jsou to levné a jednoduché detektory, které se v současnosti používají jen omezeně. Zdrojem záření je rtuťová výbojka a nejčastěji používaná vlnová délka je 254 nm.

Detektory s měnitelnou (nastavitelnou) vlnovou délkou – vlnovou délku lze měnit v průběhu analýzy, nejčastěji od 190 do 700 nm. Nastavitelná vlnová délka je výhodou při separaci více látek.

Detektory s diodovým polem (PDA – Photodiode Array, DAD – Diode Array detector) – umožňují během analýzy zaznamenávat celé spektrum v reálném čase a měřit při různých vlnových délkách. Tyto detektory ve spojení s počítačem umožňují porovnávat snímaná spektra se spektry v knihovně softwaru počítače (Nováková et al., 2013).



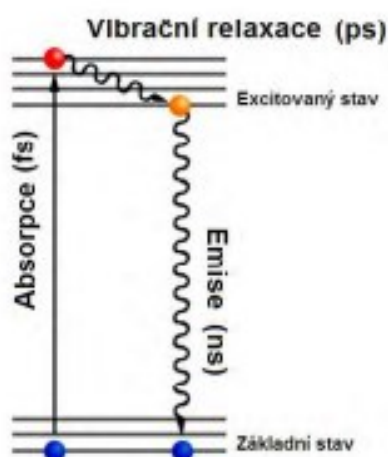
Obrázek 7: Schéma detektoru s diodovým polem (Převzato a upraveno z: Nováková et al., 2013).

- Elektrochemické detektory (ECD)

Elektrochemické detektory jsou jedny z nejcitlivějších a nejselektivnějších dostupných HPLC detektorů pro analyty, které lze oxidovat či redukovat. ECD pro HPLC se obvykle skládají ze třech samostatných elektrod, a to pracovní, pomocné a referenční (srovnávací). Na elektrodu pracovní je vložen konstantní potenciál. Pracovní elektroda může být vyrobena ze skelného uhlíku, vláken uhlíku, grafitové pasty, diamantu, zlata, stříbra nebo platiny. ECD pracují buď na amperometrickém principu (měří se proud při konstantním elektrodovém potenciálu) nebo coulometrickém principu, kdy dochází k úplné elektrolyze (Nováková et al., 2013; Cvačka, 2010; Swartz, 2010)

- Fluorimetrické detektory (FLD)

Princípem fluorimetrických detektorů je měření sekundárního (emisního) záření, které látka (analyt) vyzáří po předchozí absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Molekuly látek díky absorbovanému elektromagnetickému záření přechází do vyšších vibračních hladin. Tyto detektory se vyznačují vysokou citlivostí (detekce až femtomolárních koncentrací analytu). Zdrojem excitačního záření může být rtuťová či xenonová výbojka (Nováková et al., 2013; Swartz, 2010, Cvačka, 2010).



Obrázek 8: Schéma principu fluorimetrického detektoru (Převzato a upraveno z Cvačka, 2010).

6. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

6.1 *Popis metody*

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) je v současnosti přijímána jako preferovaná metoda pro kvantitativní i kvalitativní měření malých endogenních metabolitů v biologických materiálech, především v moči, plazmě, séru, plné krvi nebo tkáňových extraktech. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií patří mezi špičkové instrumentální techniky. Silné stránky kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) jsou především vysoká analytická specifita, rychlost analýzy a zejména se jedná o extrémně citlivou metodu, která je založena na vzájemném působení nabitých částic s magnetickým nebo elektrickým polem ve vakuu (Cibiček et al., 2014; Friedecký et al., 2012).

Významným zlepšením LC-MS bylo zvýšení separační schopnosti dosažené tandemovou hmotností spektrometrií (MS/MS). Dva hmotnostní analyzátoři v sérii ohromně zvýšily výkon MS, především pro objasnění molekulární struktury, přesnou kvantifikaci a selektivní a specifickou analýzu molekul, čímž se stala používanější pro biomedicínské aplikace. Základní princip LC-MS/MS je založen na převedení molekul analytu na pozitivně nebo negativně nabitě ionty, s jejich následnou analýzou. Ionty jsou vytvářeny během procesu ionizace na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a následně jsou kvantitativně a kvalitativně vyhodnoceny detektorem. Grafem LC-MS/MS je hmotnostní spektrum, které znázorňuje závislost četnosti iontů na základě jejich m/z (Keevil, 2013; Kelvin et al., 2013; Cibiček et al., 2014).

6.2 *Iontové zdroje*

Ke vzniku iontů v plynné fázi dochází v iontovém zdroji, který je nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru. Analyty, které vstupují do iontového zdroje spolu s MF a matricí, jsou rozštěpeny na kladně nebo záporně nabitě ionty. Tyto ionty mohou být molekulární, aduktované nebo se může jednat o fragmenty ionizované molekuly. V dnešní době existuje mnoho iontových zdrojů a množství dodané energie v průběhu ionizace nám rozděluje iontové zdroje na dvě hlavní skupiny, a to ionizační techniky měkké a tvrdé (Friedecký and Lemr, 2012).

- Elektronová ionizace (EI)

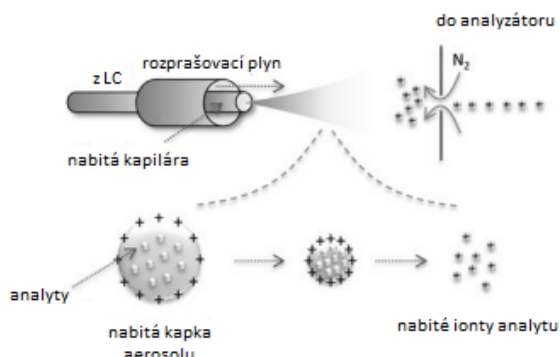
Při elektronové ionizaci, která se řadí mezi tvrdé ionizační techniky, dochází k předávání energie letících elektronů molekulám analytů. Nejčastěji získáme kladný radikál molekuly s vlastním bohatým fragmentačním spektrem. Často se u elektronové ionizace využívá knihovny spekter, které tvoří součást vyhodnocení a interpretace. Knihovny spekter jsou univerzální pro instrumentální techniky různých firem (Friedecký et al., 2012).

Na rozdíl od tvrdých ionizačních technik nám měkké ionizační techniky většinou poskytují molekulární ionty, eventuálně adukty se složkami MF. Mezi tyto techniky můžeme zařadit např. ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI). U analytů lze provést také maticí asistovanou laserovou desorpci (MALDI) a mnoho dalších (Maciel et al., 2022; Friedecký, et al., 2012).

- Elektrosprejová ionizace (ESI)

Ionizace elektrosprejem je jednou z typických a nejčastěji využívaných měkkých ionizačních technik. Zprvu je rozpuštěný analyt čerpán přes vodivou kapiláru rozprašovače. Rychlost průtoků se zde pohybuje od několika nl/min do rozmezí ml/min. Elektrické pole je vytvořeno aplikací rozdílu napětí mezi kapilárou rozprašovače a hmotnostním spektrometrem (MS). V kapiláře rozprašovače dochází k důležitému procesu, kdy silné elektrické pole vede k oddělení náboje elektroforetickou migrací v kapalině. V pozitivním iontovém módu jsou kationty urychlovány směrem ke vstupu MS, zatímco anionty jsou přitahovány k vnitřní stěně kapiláry a mohou být oxidovány. V negativním iontovém módu je tato skutečnost obrácená. Jakmile kapalný vzorek opustí kapiláru rozprašovače, je protipůsobící účinek povrchového napětí rozpouštědla na jedné straně a přitažlivá síla elektrického pole pro ionty v roztoku na druhé straně odpovědný za vytvoření kužele. Koaxiálně proudící zmlžující plyn podporuje tvorbu tohoto aerosolu. Celý proces je velmi často podporován nebulizérem, plynovým pláštěm, inertním plynem, jako je dusík, který obklopuje oblak ESI a tím snižuje vliv povrchového napětí. Odpařování rozpouštědla suchým plynem, má za následek smršťování kapiček. Povrchový náboj se postupně zvyšuje, dokud coulombovské odpudivé síly mezi stejně nabitými ionty nepřesáhnou kohezní mezimolekulární síly, kde se povrchové napětí rovná coulombovskému odpuzování a dojde ke štěpení

kapiček. Proces odpařování a štěpení se poté několikrát opakuje, dokud jednotlivé kapičky nemají poloměr několika nanometrů (Kiontke et al., 2018).



Obrázek 9: Elektrosprejová ionizace (Převzato a upraveno z Friedecký et al., 2012)

- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Druhou nejdůležitější ionizační metodou, pokud jde o vazbu LC-MS je tzv. chemická ionizace za atmosférického tlaku. Tato technika ionizace probíhá v plynné fázi, při které jsou analyty ionizovány podobně jako u chemické ionizace, s tím rozdílem, že ionizace probíhá za atmosférického nikoli za sníženého tlaku. Při začátcích APCI byl v ionizačním zdroji použit radioizotop niklu (^{63}Ni), ale brzy byl tento izotop nahrazen korónovým výbojem, poněvadž poskytuje srovnatelná spektra se zlepšeným dynamickým rozsahem, snadnější použití, výrobu, údržbu a likvidaci. Některé studie popisují i použití doutnavého výboje. APCI se používá především pro malé molekuly, které nejsou dostatečně polární pro elektrosprejovou ionizaci. Na rozdíl od kapiláry rozprašovače v ESI je zde použit pneumatický nebulizér a pomocný plyn. Rozpouštědlo společně s analytem se odpařují v ohřívači v blízkosti jehly korónového výboje. Na jehlu je přiveden vysoký potenciál okolo 3-5 kV. Výboj působí jako zdroj elektronů, zatímco na elektrodě je vytvářeno silné elektrické pole, ionizace a výsledná záře. Nadbytečná energie se uvolňuje nárazy s dusíkem, což z APCI dělá měkkou ionizační techniku (Kiontke et al., 2018; Foltz et al., 2017).

- Desorpční ionizace laserem za pomoci matrice (MALDI)

Ionizační technika MALDI - (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) se mnohdy využívá k analýze proteinů a ostatních makromolekul. Před ionizací je vzorek

smíchán s organickou kyselinou, která snadno absorbuje energii laseru a následně se vysuší. Samotná ionizace se vyznačuje krátkým intenzivním pulzem laseru, který desorbuje a také zahřeje matrici společně s analyty. Matrice, která je ionizována následně předá náboj analytu (Friedecký et al., 2012).

6.3 Hmotnostní analyzátory a detektory

K rozlišení iontů na základě jejich poměru hmotnosti k náboji dochází v hmotnostním analyzátoru. Ionty nejčastěji dopadají na detektor a vytvářejí signál, který je zaznamenán. Výstupem je hmotnostní spektrum relativního množství iontů proti jejich m/z . Existuje široká škála různých provedení analyzátorů. Několik analyzátorů je schopno společně s rozlišováním iontů dle m/z také zachytit a ukládat jednotlivé ionty. Mezi nejběžnější a nejvíce používané typy analyzátorů v komerční výrobě patří především kvadrupólové, iontové pasti, průletové analyzátory (TOF) a Fourierovy transformační analyzátory (iontový cyklotron a Orbitrap), společně s kombinacemi nebo hybridy těchto analyzátorů. Neexistuje jediný hmotnostní analyzátor, který by byl vhodný pro všechny aplikace, velká většina laboratoří používá různé MS, které využívají různé analyzátory (Haag, 2016).

- Kvadrupól

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je jedním z nejpoužívanějších typů analyzátorů. Jeho využití je především u stolních MS, a to díky jejich ceně, odolnosti a spolehlivosti. Kvadrupól je složen ze čtyř válcových tyčí, které jsou vzájemně rovnoběžné. Tyče, které jsou naproti sobě, jsou elektricky spojeny a je zde aplikován vysokofrekvenční potenciál. Kombinace vysokofrekvenčního potenciálu společně se stejnosměrným proudem způsobí, že ionty při průchodu kvadrupólem oscilují. Ionty se stabilní trajektorií oscilací projdou, zatímco ty, které jsou nestabilní, se srazí s tyčemi. Pomocí změny stejnosměrného proudu a vysokofrekvenčního potenciálu mohou být ionty různých m/z skenovány (Haag, 2016).

- Trojitý kvadrupól

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií a často využívá jako analyzátor trojitý kvadrupól, jde tedy o tandemové uspořádání kvadrupólů. Tento analyzátor je díky své vysoké citlivosti, robustnosti specifitě i cenové dostupnosti velmi populární. Principem jsou dva kvadrupóly, které pracují jako hmotností

analyzátořy. Mezi nimi se nachází tzv. kolizní cela (Q2), kde pomocí vysokého tlaku a urychlení iontů elektrickým polem dojde ke srážce iontů, letících z prvního kvadrupólu, s atomy či molekulami kolizního plynu. Jakmile dojde ke srážce iontů, jejich vnitřní energie rapidně vzrůstá, a tím dochází k fragmentaci jednotlivých iontů na specifické produktové ionty, které se dostávají do druhého kvadrupólu. Celý tento děj se nazývá kolizně indukovaná disociace (CID). Trojitý kvadrupól může fungovat v následujících režimech: (Friedecký et al., 2012)

Sken produktových iontů

V prvním kvadrupólu (Q1) je propuštěn iont s definovanou m/z , který je následně v kolizní cele fragmentován. Třetí kvadrupól (Q3) pracuje na principu skenu definovaného rozsahu m/z . Fragmety jsou následně detekovány v detektoru. V tomto režimu dosáhneme veškeré informace o fragmentaci iontu. Sken produktových iontů se obecně používá pro identifikaci látek.

Sken prekurzorových iontů

Tento režim je opačný ve srovnání se skenem produktových iontů. Q1 zde skenuje ionty dle jejich m/z , a proto pouští do cely postupně ionty se zvyšující se hodnotou m/z , kde jsou fragmentovány. Třetí kvadrupól je nastaven tak, aby po celou dobu propouštěl pouze specifický fragment, který je poté detekován. Sken prekurzorových iontů se využívá pro analýzu molekul se stejnou funkční skupinou.

Sken neutrální ztráty

Při tomto režimu Q1 a Q3 skenují ionty s konstantní diferencí m/z , která reprezentuje neutrální fragment vzniklý v kolizní cele. Režim slouží ke sledování molekul se stejnou strukturní částí. Využití má také v oblasti derivatizace.

Sledování rozpadu iontu

Výběr iontu prekurzoru je uskutečněn prvním kvadrupólem. Tento iont je v kolizní cele za podmínek optimální kolizní energie pro nejintenzivnější produkt fragmentován. Produkt je zvolen pomocí Q3. Mezi výhody tohoto režimu patří vysoká citlivost, selektivita a také rychlost měření hmotnostního přechodu. Mód je také znám jako „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) a je využíván pro kvantifikaci (Friedecký et al., 2012).

- Iontová past

Dalším typem hmotnostního analyzátoru je iontová past. Tento typ analyzátoru je modifikací kvadrupólu. Do 21. století byla nejběžnější 3D iontová past. Avšak v poslední době se 2D lineární iontová past stala více využívanou kvůli jejím četným výhodám. Iontové 3D pasti se skládají ze dvou hyperbolických elektrodových desek, které jsou umístěny naproti sobě. Mezi těmito deskami jsou hyperbolické prstencové elektrody. Podobně jako u kvadrupólu jsou ionty zachyceny mezi elektrodami. Ionty různých m/z jsou vyhazovány z pasti změnou vysokofrekvenčního potenciálu. Tyto ionty jsou poté detekovány na detektoru. Lineární 2D pasti jsou ekvivalentní kvadrupólům, avšak na každý konec kvadrupólu je aplikován potenciál, aby došlo k zachycení iontů v samotném kvadrupólu. Hmotnostní spektrometry využívající iontové pasti jsou známé pro svou zlepšenou citlivost (Link et al., 1999).

- Průletové analyzátory (TOF – Time of flight)

Nejjednodušší forma TOF analyzátoru se skládá z letové trubice a urychlovací mřížky, jejímž principem je urychlování iontů ze zdroje ionizace do MS detektoru. Urychlené ionty procházejí oblastí bez pole letové trubice, kde jsou odděleny na základě jejich m/z . Čím větší je hmotnost iontů, tím pomalejší je drift letovou trubicí. Jakmile iont narazí na detektor, hmotnostní spektrometr určí dobu, za kterou iont proletěl trubicí. Doba driftu letovou trubicí je úměrná m/z iontu. Analyzátory doby letu mohou dosáhnout nejširšího hmotnostního rozsahu ze všech hmotnostních analyzátorů, a to díky své vysoké účinnosti přenosu iontů. Tento typ analyzátorů je hojně využíván pro pozorování jednotlivě nabitých biomolekul s vysokou hmotností, jako jsou proteiny (Thiede et al., 2005).

- Orbitrap

Hmotnostní analyzátor orbitrap se skládá ze třech hlavních částí. První částí je vnitřní vřetenová elektroda pokrytá dvěma dutými vnějšími konkávními elektrodami proti sobě. Další částí jsou dvě vnější elektrody, které jsou odděleny tenkým kroužkem z dielektrického materiálu. Mezi vnitřní a vnější elektrodou je aplikován napěťový potenciál, který mezi nimi vytváří elektrické pole. V analyzátoru vstupují ionty otvorem jednou z vnějších elektrod. Vstup iontů je tangenciální k vnitřní elektrodě. Při určitém potenciálu se budou ionty mezi vnitřní a vnější elektrodou nepřetržitě točit kolem elektrody vnitřní. Ionty budou oscilovat tam a zpět podél osy vnitřní elektrody. Tento

signál je následně digitalizován a transformován z časové oblasti do frekvenční oblasti. Frekvence ve směru osy jsou úměrné m/z iontů (Zubarev et al., 2013).

- Detektory v hmotnostní spektrometrii

Ionty, které byly vybrány hmotnostním analyzátozem, jsou detektorem zaznamenány a signál je poté převeden do digitálního formátu. Detektory lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou detektory, které detekují všechny ionty bez ohledu na velikost m/z . Principem této skupiny detektorů je přímé měření elektrického proudu, který vznikl při srážce. Tento elektrický proud je poté zesilován násobičem. Nejčastěji se používá elektronový násobič, kde jsou elektrony amplifikovány pomocí sady dynod. Druhá skupina detektorů je schopna zaznamenávat ionty ve vztahu k velikosti m/z . Do této skupiny patří např. iontově cyklotronová rezonance. Ionty jsou detekovány jako proudový obraz všech přítomných iontů s různými velikostmi m/z , pomocí indukce proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátozem (Friedecký et al., 2012).

6.4 Aplikace LC-MS/MS v klinických laboratořích

Hmotnostní spektrometrie se dříve často používala v tandemu s plynovou chromatografií, avšak její použití bylo omezeno na detekci malých těkavých molekul, jako jsou mastné kyseliny, organické kyseliny, aminokyseliny, monosacharidy, prostaglandiny, žlučové kyseliny a steroidy. Spojení LC-MS/MS umožňuje analyzovat molekuly s vyšší molekulovou hmotností nebo extrémně polární molekuly. Obecně je LC-MS/MS vysoce atraktivní jako metoda pro hodnocení cílových analytů tam, kde nelze vytvořit specifické testovací protilátky pro použití v imunoanalýze (IA), kde několik příbuzných sloučenin má být kvantifikováno současně a v případech kvantifikování mateřské sloučeniny spolu s jejími aktivními metabolity.

LC-MS/MS lze aplikovat u terapeutického monitorování léků (TDM) v krvi pacientů, monitorování antivirotik, drogového screeningu, endokrinologických využití při stanovení steroidů, stanovení glukokortikoidů, mineralokortikoidů, pohlavních hormonů a dalších (Kelvin and Bonnie, 2013).

7. METODY STANOVENÍ GANCIKLOVIRU

Autoři Ärlemalm et al., 2022 ve své práci stanovovali acyklovir v séru a jeho hlavní metabolity 9 - karboxymethoxymethylguanin, ganciklovir a penciklovir pomocí LC-MS/MS. Samostatné sérum bylo uchováváno při -20 °C. Při přípravě vzorků se použilo 150 µl roztoku deuterovaného vnitřního standardu, který se přidal k 50 µl vzorku séra. Dále následovalo promíchání a centrifugace při 15 000 g po dobu 5 minut při 10 °C. Následně bylo 100 µl supernatantu přeneseno na 96jamkovou destičku a zředěno 100 µl 1% kyseliny mravenčí. Analýza byla provedena na systému Acquity. Systém se skládal ze zásobníků s mobilní fází, automatického vzorkovače a MS s elektrosprejovým rozhraním pracujícím v režimu kladných iontů. Chromatografická separace byla prováděna za použití bifenylové kolony při 40 °C s předkolonou. Analyty a interní standardy byly detekovány pomocí MRM (Multiple reaction monitoring). Ve studii bylo testováno několik bifenylových a fenylových SF v kombinaci s methanolem nebo acetonitrilem. Experiment ukázal, že bifenylová SF poskytla změny v selektivitě vzhledem k oktadecylu (C18) s metanolovou fází, avšak s fází na bázi acetonitrilu se bifenyl choval podobněji jako C18. Studie popisuje LC-MS/MS jako vyvinutou a ověřenou metodu pro rychlou kvantifikaci acykloviru, gancikloviru a ostatních metabolitů. Výhodou je malá spotřeba séra a precipitace proteinů s 1% kyselinou mravenčí v methanolu vede k vysokému extrakčnímu výtěžku, minimalizaci variací testu a matricovým efektům. Pomocí kolony s bifenylovou SF bylo dosaženo optimální chromatografické separace, selektivity a tvaru píků. Závěrem se LC-MS/MS metoda ukázala jako citlivá, specifická a přesná pro stanovení gancikloviru, acykloviru, pencikloviru a 9 – karboxymethoxymethylguaninu.

Märtson et al., 2018 popisují metodu LC-MS/MS pro stanovení gancikloviru a acykloviru s použitím deuterovaného interního standardu. K přípravě vzorku byla použita precipitace proteinů, poněvadž autoři ji popisují jako účinnější ve srovnání s extrakcí na pevné fázi (SPE). Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu SRM a ionizace elektrosprejem byla v pozitivním režimu. Plná krev od pacientů byla centrifugována po dobu 5 minut při 3000 g. Následně bylo odebráno 0,5 ml séra, které bylo skladováno při -20 °C. K 10 µl séra bylo přidáno 500 µl precipitačního roztoku obsahujícího izotopově značené interní standardy. Obě antivirotika predikovala nízkou hladinu koncentrace v séru 16 mg/l a maximální koncentraci 18 mg/l. Horní hranice

byla vysoká, poněvadž byly měřeny koncentrace, které mohou být vyšší než 10 mg/l. Pro farmakokinetické modelování ke stanovení správné dávky pro konkrétního pacienta se stanovují navíc i minimální koncentrace. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 0,1 až 20 mg/l. Retenční čas pro GCV byl 1,1 min a pro acyklovir 1,35 min. Tato metoda díky velmi krátké přípravě vzorku a krátké analýze je vhodná v běžné klinické praxi.

Autoři Pigliasco et al., 2021 ve své publikaci uvádí metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení acykloviru a gancikloviru. Autoři použili dvě různé přípravy vzorků. Prvním typem přípravy vzorků byla precipitace proteinů a druhou byla extrakce ze suché kapky plazmy (DPS – dried plasma spot). Výhodou DPS metody oproti metodě suché kapky krve (DBS – dried blood spot) je překonání zkreslení hematokritu a výsledky pocházející z této metody odběru vzorků lze použít do klinické praxe. Výsledky extrakčních testů pro ganciklovir byly 98 % a pro acyklovir 90 % s CV <15 %. Kolona Acquity UPLC BEH C18 umožňovala dobrou separační účinnost a dobrý tvar píku. Retenční čas pro ganciklovir byl 1,05 min a pro acyklovir 1,28 min. Během analýzy nebyly detekovány žádné interferující píky. Spodní limit kvantifikace (LLOQ – lower limit of quantification) byl 0,013 mg/l pro acyklovir i ganciklovir. V celém koncentračním rozmezí bylo dosaženo linearity mezi plochou píku analytu a odpovídající koncentrací. Autoři práce zmiňují, že použili k hodnocení gancikloviru metodu DPS, poněvadž do této doby byla pouze jen jedna studie aplikována do klinické praxe. Použití DPS by mohlo představovat užitečný nástroj pro usnadnění skladování vzorků a jejich odesílání do laboratoří. Účinnost celé metody umožnila rychlou specifickou kvantifikaci acykloviru a gancikloviru s vysokou přesností. Výhodou je nízká spotřeba vzorku (50 µl). Tento aspekt je zvláště důležitý v novorozeneckém a pediatrickém prostředí.

Billat et al., 2015 pomocí LC-MS/MS kvantifikovali intracelulární koncentrace gancikloviru a jeho fosforylovaných forem. Cílem bylo vyvinout LC-MS/MS metodu pro analýzu GCV a jeho derivátů v lidských buňkách a otestovat celý postup u pacientů, kterým byl GCV podáván v rámci léčby. Nejdříve došlo k izolaci periferních krevních mononukleárních buněk (PBMC) z plné krve. Buňky byly dvakrát promyty a následně byly suspendovány v 1 ml fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem. Buňky byly skladovány při teplotě -20 °C. Standardní roztoky gancikloviru trifosfátu (GCV-TP) a GCV byly připraveny v ultra čisté vodě (UPW) na objem 1 mg/l. K přípravě vzorků

byla použita extrakce na pevné fázi (SPE). Následně byly sestaveny kalibrační křivky. Pro intracelulární GCV byla linearita metody vyhodnocena až do 50 mg/l sestavením kalibračních křivek zahrnující různé koncentrace. Mez detekce (LOD) byla definována jako nejnižší koncentrace léčiva, která dává poměr signálu k šumu >3:1. V systému LC-MS/MS byl použit trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí. Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním iontovém módu s použitím SRM. Pacienti byli klasifikováni s ohledem na podanou dávku a odhadovanou clearance kreatininu. U všech pacientů byly zjištěny všechny formy GCV, což dokazuje, že tento postup je schopen zkoumat expozici různým formám GCV v plazmě a v krevních buňkách. Intracelulární profily GCV, ganciklovir monofosfátu (GCV-MP) a GCV-TP poskytly hodnoty času maximální koncentrace (T_{max}) $2,5 \pm 1,0$, $3,4 \pm 1,3$ a $3,1 \pm 1,1$ h. Tyto hodnoty vypovídají o zpoždění až 2 h oproti GCV v plazmě. Je třeba poznamenat, že na této variabilitě kumulace GCV v buňkách a případně i cytotoxicity se mohou podílet některé genetické odchylky v transportérech GCV. Autoři dospěli k závěru, že tento postup bude pilířem klinických studií zkoumajících roli těchto různých biomarkerů spolu s genetickými odchylkami v transportérech GCV při výskytu toxicity.

CÍLE PRÁCE

- **Vývoj a optimalizace metody pro stanovení gancikloviru v séru pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí**
- **Validace metody pro stanovení gancikloviru**
- **Stanovení gancikloviru v séru u pacientů po transplantaci plic**
- **Zhodnocení významu terapeutického monitorování gancikloviru u pacientů po transplantaci plic**

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Materiál a přístroje

8.1.1 Přístroje

- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II s trojitým kvadrupólem 6495 Triple Quad (Agilent Technologies, USA)



Obrázek 10: LC sestava Agilent 1290 Infinity II s trojitým kvadrupólem Agilent 6495 (Agilent Technologies, USA)

- Centrifuga - Centrifuge 5417R (Eppendorf)
- Centrifuga MPW – 260R (Med. Instruments)
- Centrifuga Abbott (Unimed)
- Vortex (Velp Scientifica)
- Výrobek superčisté vody (TKA Smart2Pure, Německo)
- Analytické váhy (Adventurer™Pro)

8.1.2 Materiál

- Automatické pipety BIOHIT (Thermo Scientific)
- Špičky k pipetám
- Skleněné pipety
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, zkumavky)

- Vialky
- Skleněné inserty
- Mikrozukmavky typu Eppendorf
- Stojany
- Kolona – Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μ m, 3,0 x 50 mm (Agilent Technologies, USA)

8.1.3 Reagencie pro LC-MS/MS

- Acetonitril pro LC-MS/MS (Honeywell)
- Metanol pro LC-MS/MS (Honeywell)
- Kyselina octová (Penta)
- Kyselina mravenčí (Honeywell)
- Octan amonný pro LC-MS (Merck)
- Kyselina trifluoroctová (Merck)
- ganciklovir (TRC Canada)
- ganciklovir-d5 (interní standard) (TRC Canada)

8.1.4 Soubor pacientů

V této diplomové práci byla koncentrace gancikloviru stanovována u 20 pacientů. Pacienti dostávali intravenózně ganciklovir nebo perorálně valganciklovir pro profylaxi, preemptivní terapii nebo terapii proti CMV. Jak již bylo řečeno, je vhodné podávat i.v. ganciklovir v dávce 5 mg/kg každých 12 hodin. Každý pacient má několik odběrů a sleduje se koncentrace gancikloviru v krvi před dávkou – odběr označený jako C_0 , po 3 hodinách značený jako C_3 a následně po 5 hodinách odběr značený jako C_5 . V určitých výjimkách se můžou provádět odběry v odlišných časech např. pro zachycení absorpční fáze.

8.2 *Metody a příprava vzorků pro LC-MS/MS*

8.2.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se skládala z MF A a z MF B. Na LC-MS/MS sestavě byl použit gradient mobilních fází. Mobilní fáze A byla tvořena 50 μ l kyseliny mravenčí a 100 μ l fluoridu amonného a následným doplněním do 500 ml destilovanou vodou. Jako

mobilní fáze B byl použit 100% LC-MS/MS metanol. Pro oplach jehly byl použit 10% isopropanol.

8.2.2 Příprava zásobních roztoků

Analytický standard gancikloviru byl dodán firmou HPST (TRC Canada). Ganciklovir v podobě prášku byl kvantitativně rozpuštěn v metanolu a připraven v koncentraci 500 mg/l. Interní standard – izotopově značený GCV-d5 od firmy HPST (TRC Canada) byl kvantitativně rozpuštěn v 5% kyselině trichloroctové (TCA) na výslednou koncentraci 50 µg/l.

8.2.3 Příprava vzorků pro analýzu

K přípravě vzorku k analýze bylo použito 10 µl séra (kontroly, kalibrátoru) a následně bylo přidáno 500 µl vnitřního standardu (GCV-d5) o koncentraci 50 µg/l. Směs byla protřepána na vortexu (Velp Scientifica) po dobu 30 sekund. Promíchané vzorky byly vloženy do chlazené centrifugy – Centrifuge 5417R a byly centrifugovány po dobu 10 minut při 32467 g. Po centrifugaci se z každého vzorku alikvotovalo 50 µl supernatantu do tmavých vialek. K 50 µl supernatantu bylo přidáno 950 µl 5% roztoku kyseliny trichloroctové. Připravený vzorek o objemu 1 ml byl opět krátce promíchán a následně nastříkovan na kolonu.

8.2.4 Analýza vzorků

Chromatografická analýza probíhala na koloně Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 µm, 3,0 x 50 mm (Agilent Technologies, USA). Vyhodnocení dat bylo prováděno pomocí programu MassHunter, verze 10.1.67 (Agilent Technologies, USA). Pro kvantifikaci byl využíván MRM mód. Před každou analýzou bylo zkontrolováno nastavení celé metody v programu Data Acquisition. Před zahájením měření byl analyzátor promyt mobilními fázemi s průtokem 5 ml/min. Teplota kolony při analýze byla 35 °C a byl použit gradient mobilních fází, který je uveden v tabulce 1 (Tabulka 1). Pro detekci gancikloviru a vnitřního standardu byly zvoleny MRM přechody uvedené v tabulce 2 (Tabulka 2).

Tabulka 1: Gradient mobilních fází

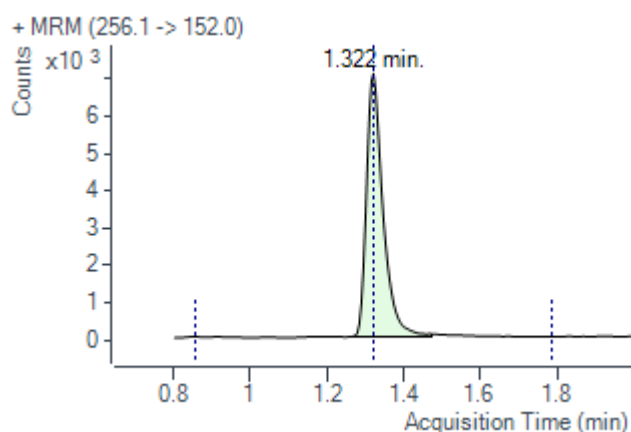
Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)	Průtok (ml/min)
0	95	5	0,4
2	80	20	0,4
2,1	0	100	0,5
3	0	100	0,6

Tabulka 2: MRM přechody gancikloviru a interního standardu

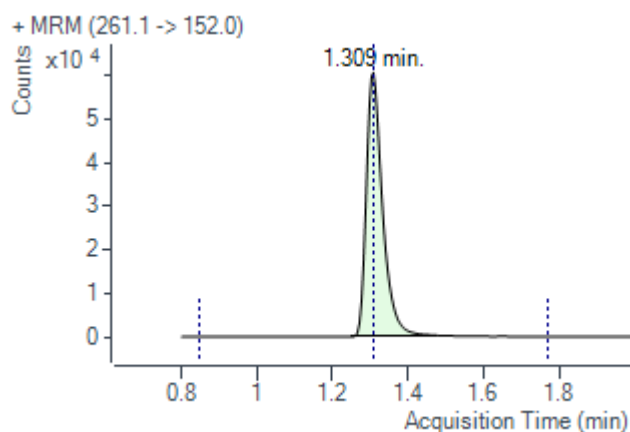
Analyt	Kvantifikační přechod (m/z)	Konfirmační přechod (m/z)
ganciklovir	256,1 → 152	256,1 → 135
ganciklovir-d5	261,1 → 152	

Průtok MF byl nastaven na 0,4 ml/min, objem vzorku nástřiku na kolonu byl 0,5 μ l a teplota v autosampleru byla 4 °C. Retenční čas gancikloviru byl 1,30 min. Retenční čas 1,29 min odpovídal internímu standardu GCV-d5. Analýza jednoho vzorku trvala 4,5 min.

Na obrázku 11 (Obrázek 11) je uveden chromatogram gancikloviru, na obrázku 12 (Obrázek 12) lze vidět chromatogram deuterizovaného gancikloviru-d5.



Obrázek 11: Chromatogram gancikloviru



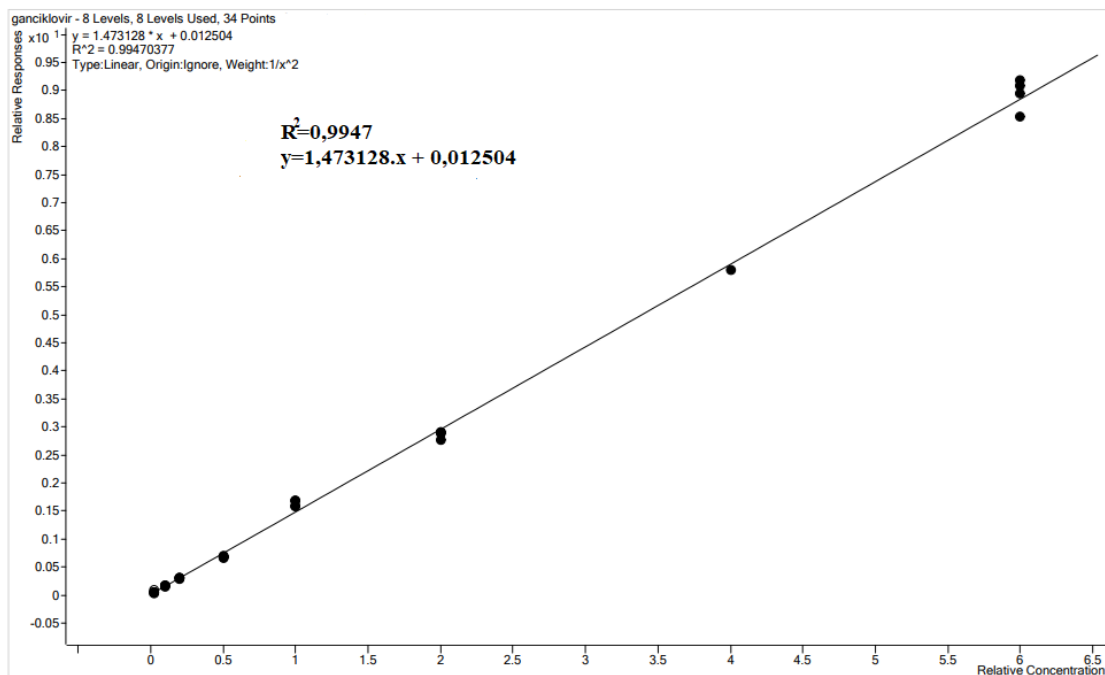
Obrázek 12: Chromatogram gancikloviru-d5

9. VÝSLEDKY

9.1 Validace LC-MS/MS metody

9.1.1 Kalibrace

Pro kalibraci metody byla připravena osmi bodová kalibrace gancikloviru. Zásobní standard gancikloviru měl koncentraci 500 mg/l. Ze zásobního standardu bylo připraveno osm kalibračních bodů o koncentracích: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 1,0; 20,0; 30,0 mg/l. Každý kalibrační bod byl připraven v tripletu ze zásobního roztoku GCV o koncentraci 500 mg/l. Výpočet koncentrace gancikloviru byl odvozen z rovnice regrese $y = 1,4731 \cdot x - 0,0125$, kde v této rovnici y představuje poměr plochy píku stanovovaného analytu ku internímu standardu a x představuje koncentraci stanovované látky. Hodnota regresního koeficientu pro GCV je 0,9947. Kalibrační křivku společně s rovnicí regrese a regresním koeficientem lze vidět na obrázku 13 (Obrázek 13).



Obrázek 13: Kalibrační křivka GCV

9.1.2 Opakovatelnost

Definici opakovatelnosti můžeme vyjádřit, těsnost shody mezi jednotlivými měřeními sériemi vzorků za splnění podmínek opakovatelnosti (tzn. příprava vzorků jednou osobou ve stejný den, využívání stejných reagensů a měření na stejném přístroji) (Kruve et al., 2015). Pro měření opakovatelnosti v této diplomové práci bylo testováno pět různých koncentrací: 0,1; 0,5; 1,5; 5,0; 20,0 mg/l. Koncentrace byly připraveny ze zásobního roztoku GCV o koncentraci 500 mg/l. Každá hladina byla připravena v sérii deseti vzorků a každý vzorek byl dvakrát nastříknut na kolonu. Z výsledků byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV) a vychýlení (bias). Směrodatná odchylka je definována jako míra rozptylu hodnot střední hodnoty na empiricky zjištěné řadě čísel. Platí vztah, že čím je směrodatná odchylka nižší, tím je měření preciznější. Variační koeficient definujeme jako podíl směrodatné odchylky a průměru hodnot měření. Aby byly splněny podmínky validace metody, neměl by variační koeficient přesáhnout 15 %. Při nejnižší koncentraci 0,1 mg/l bylo dosaženo variačního koeficientu 7,78 %, při koncentraci 0,5 mg/l byl CV 2,23 %, koncentraci 1,5 mg/l odpovídal CV 1,30 %, při koncentraci 5,0 byl vypočítán CV 1,59 % a u nejvyšší koncentrace 20 mg/l dosahoval variační koeficient 1,79 %. V tabulce 3 (Tabulka 3) můžeme vidět jednotlivé výsledky opakovatelnosti. Hodnoty variačních koeficientů

splňují podmínky úspěšné validace metody (FDA, 2018). Bias je hodnota odhadu systematické chyby měření.

Tabulka 3: Opakovatelnost měření

Vzorek	Koncentrace gancikloviru				
	c=0,1 mg/l	c=0,5 mg/l	c=1,5 mg/l	c=5,0 mg/l	c=20,0 mg/l
1	0,12	0,51	1,51	5,35	19,25
2	0,12	0,51	1,55	5,37	19,68
3	0,12	0,5	1,51	5,18	20,22
4	0,12	0,49	1,52	5,24	20,15
5	0,1	0,5	1,5	5,23	19,19
6	0,1	0,5	1,47	5,23	19,29
7	0,11	0,53	1,5	5,47	19,46
8	0,11	0,52	1,5	5,36	19,69
9	0,1	0,51	1,51	5,36	19,87
10	0,12	0,52	1,49	5,28	19,93
Průměr	0,11	0,51	1,51	5,31	19,67
Sm. odchylka (SD)	0,01	0,01	0,02	0,08	0,35
CV (%)	7,78	2,23	1,30	1,59	1,79
Bias (%)	10,00	2,00	0,67	6,20	1,65

9.1.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je vyjádřena jako přesnost a udává těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření za podmínek reprodukovatelnosti. Aby byla splněna podmínka reprodukovatelnosti musí být analyzován stejný analyt ve vzorcích téhož materiálu stejnou metodou, nicméně zahrnuje nedodržení alespoň jedné z podmínek opakovatelnosti – dne měření, místa měření, analyzátoru či osoby měření (Nováková et al., 2013). Reprodukovatelnost byla měřena v sérii 10 vzorků připravených ze zásobního roztoku GCV obdobně jako při opakovatelnosti měření. Jednotlivé koncentrace gancikloviru zůstaly stejné tzn. 0,1; 0,5; 1,5; 5,0; 20,0 mg/l. Všechny vzorky od každé koncentrace byly připraveny v jeden den a následně byly uloženy v mikrozkuvkách typu Eppendorf do mrazícího boxu při teplotě -80 °C. Každý den byl jeden vzorek od každé koncentrace změřen stejnou osobou na stejném analyzátoru. Obdobně jako u opakovatelnosti měření byl vypočítán průměr, směrodatná

odchylka, variační koeficient a bias. Výsledky reprodukovatelnosti lze vidět v tabulce 4 (Tabulka 4).

Tabulka 4: Reprodukovatelnost měření

Vzorek	Koncentrace gancikloviru				
	c=0,1 mg/l	c=0,5 mg/l	c=1,5 mg/l	c=5,0 mg/l	c=20,0 mg/l
1	0,11	0,53	1,51	5,38	18,88
2	0,10	0,51	1,5	5,32	18,77
3	0,08	0,50	1,5	5,35	19,94
4	0,09	0,51	1,47	5,3	20,08
5	0,09	0,50	1,56	5,57	19,19
6	0,09	0,51	1,59	5,51	20,27
7	0,11	0,53	1,5	5,47	20,54
8	0,10	0,54	1,49	4,90	19,93
9	0,10	0,60	1,60	5,10	19,90
10	0,11	0,63	1,52	4,85	20,78
Průměr	0,10	0,54	1,52	5,28	19,83
Sm. odchylka (SD)	0,01	0,04	0,04	0,23	0,64
CV (%)	8,22	7,84	2,74	4,45	3,24
Bias (%)	2,90	7,20	1,60	5,50	0,86

9.1.4 Robustnost

Pojem robustnost označuje schopnost analytické metody poskytovat shodné výsledky při malých odchylkách parametrů metody (např. složení mobilní fáze, teplota kolony, stáří kolony, teplota skladování vzorků) a charakterizovat její spolehlivost při běžném používání. Robustnost metody nám také udává míru kapacity metody k poskytování shodných výsledků při změně podmínek v postupu přípravy či uchování vzorku (Kruve et al., 2015).

V této práci byl testován vliv různých teplot při skladování vzorku a opakované rozmrazování. Vzorky pro měření robustnosti byly připraveny ze směsného séra pacientů a robustnost byla měřena na dvou koncentračních hladinách a to 0,5 mg/l a 5,0 mg/l. Vzorek byl nejprve změřen pro stanovení počáteční hodnoty koncentrace gancikloviru v tzv. 0. den a následně rozpipetován po 10 µl do mikrozkušavek typu

Eppendorf. Robustnost byla sledována při pěti různých typech skladování. Prvním typem bylo skladování připravených vzorků při laboratorní teplotě. Měření probíhalo 1., 2., 3. den a následně 7. den skladování. Druhým typem skladování bylo skladování vzorků v lednici při teplotě cca 4 °C. Tento typ skladování se používá rutinně pro skladování patientských vzorků po dobu 1 týdne. Vzorky byly opět skladovány po dobu sedmi dnů a měřilo se ve stejné dny jako v prvním případě. Třetím typem skladování vzorků bylo skladování v mrazícím boxu při teplotě cca -20 °C. Měření vzorků probíhalo 1., 2., 3. a následně 4. týden. Dalším typem skladování bylo skladování vzorků v hlubokomrazícím boxu při teplotě cca -80 °C. Robustnost v tomto případě byla měřena po dobu čtyř měsíců a vzorky pro stanovení robustnosti byly měřeny každý měsíc. Posledním typem stanovení robustnosti bylo opakované rozmrazování připravených vzorků gancikloviru 0,5 mg/l a 5,0 mg/l skladovaných při -80 °C. Pro toto testování bylo připraveno 500 µl vzorku od každé koncentrace a vloženo do hlubokomrazícího boxu. Po rozmrazení byly vzorky změřeny a opět vloženy do hlubokomrazícího boxu. Tento proces se opakoval čtyřikrát. Všechny typy skladování vzorků jsou přehledně popsány v následujících tabulkách a obdobně jako při opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření byly vypočítány průměry, směrodatné odchylky, variační koeficienty a bias. Všechna naměřená data jsou uvedena v tabulkách 5, 6, 7, 8 a 9. (Tabulka 5, Tabulka 6, Tabulka 7, Tabulka 8, Tabulka 9). U všech měření byla vypočítána procentuální změna k původní koncentraci naměřené v den 0.

V tabulce 5 (Tabulka 5) můžeme vidět změnu hodnot GCV při skladování vzorku při laboratorní teplotě po dobu 7 dnů. U nízké koncentrace byla naměřena v 0. den hodnota 0,47 mg/l. Po dobu skladování nebyly zaznamenány významné rozdílné hodnoty v jednotlivých dnech. U vysoké koncentrace GCV byla v 0. den hodnota 5,16 mg/l. Po dobu skladování se koncentrace GCV téměř nezměnila. Při tomto typu skladování byla maximální změna koncentrace o 11 %.

Tabulka 5: Skladování vzorků při laboratorní teplotě

Skladování při laboratorní teplotě									
	0. den	1. den	2. den	3. den	7. den	Průměr	SD	CV (%)	Bias (%)
kontrola 0,5 mg/l	0,47	0,48	0,49	0,52	0,49	0,49	0,02	3,41	2,00
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	102	104	111	104	-	-	-	-
kontrola 5,0 mg/l	5,16	5,25	5,25	5,25	5,19	5,22	0,04	0,71	4,38
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	102	102	102	101	-	-	-	-

V tabulce 6 (Tabulka 6) lze vidět výsledky měření při skladování v lednici při teplotě cca 4 °C. V tomto případě jsme získali velice podobné hodnoty jako u skladování vzorků při laboratorní teplotě. Maximální změna koncentrace GCV byla o 9 %.

Tabulka 6: Skladování vzorků při teplotě cca 4 °C

Skladování při 4 °C									
	0. den	1. den	2. den	3. den	7. den	Průměr	SD	CV (%)	Bias (%)
kontrola 0,5 mg/l	0,47	0,46	0,47	0,51	0,50	0,48	0,02	4,14	3,76
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	98	100	109	106	-	-	-	-
kontrola 5,0 mg/l	5,16	5,17	5,17	5,23	5,25	5,2	0,04	0,71	3,91
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	100	100	101	102	-	-	-	-

Výsledky skladování vzorků v mrazáku při teplotě cca -20 °C lze vidět v tabulce 7 (Tabulka 7). Měření vzorků při tomto typu skladování probíhalo jednou týdně po dobu 4 týdnů. U vysoké koncentrace si lze povšimnout, že po týdnu skladování došlo k poklesu koncentrace GCV o 6 %, avšak po třech týdnech skladování se koncentrace naopak zvýšila o 2 %. Pravděpodobně mohlo dojít k chybě při pipetování. Maximální změna koncentrace u nízké hladiny byla 9 %.

Tabulka 7: Skladování vzorků při teplotě cca -20 °C

Skladování při -20 °C									
	0. den	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	Průměr	SD	CV (%)	Bias (%)
kontrola 0,5 mg/l	0,47	0,49	0,51	0,51	0,47	0,49	0,02	4,15	1,60
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	104	109	109	100	-	-	-	-
kontrola 5,0 mg/l	5,16	4,86	5,03	5,23	5,00	5,06	0,13	2,55	1,12
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	94	97	101	97	-	-	-	-

Koncentrace při skladování vzorků v hlubokomrazícím boxu při teplotě cca -80 °C můžeme vidět v tabulce 8 (Tabulka 8). Koncentrace GCV po dobu 4 měsíců byly nejstabilnější. Při tomto skladování došlo k nejmenší změně koncentrace a to o 6 % u kontroly 0,5 mg/l. U vysoké koncentrace 5 mg/l nabývala maximální změna

koncentrace pouhé 2 %. Z výsledků měření lze říci, že GCV je nejstabilnější při skladování při teplotě -80 °C.

Tabulka 8: Skladování vzorků při teplotě -80 °C

Skladování při -80 °C									
	0. den	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	Průměr	SD	CV (%)	Bias (%)
kontrola 0,5 mg/l	0,47	0,46	0,50	0,48	0,49	0,48	0,01	2,95	4,00
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	98	106	102	104	-	-	-	-
kontrola 5,0 mg/l	5,16	5,14	5,17	5,19	5,25	5,18	0,04	0,73	3,64
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	100	101	101	102	-	-	-	-

V tabulce 9 (Tabulka 9) můžeme vidět vliv opakovaného rozmrazování na stabilitu gancikloviru ve vzorku. Při opakovaném rozmrazování došlo k poklesu u vysoké koncentrace o 6 %. Nízká koncentrace byla stabilní a nejvyšší pokles koncentrace byl 2 %.

Tabulka 9: Stabilita vzorku při opakovaném rozmrazování

Stabilita vzorku při opakovaném rozmrazování									
	0. den	1x	2x	3x	4x	Průměr	SD	CV (%)	Bias (%)
kontrola 0,5 mg/l	0,47	0,51	0,48	0,46	0,49	0,48	0,02	3,57	3,60
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	109	102	98	104	-	-	-	-
kontrola 5,0 mg/l	5,16	4,99	5,07	5,13	4,84	5,04	0,11	2,28	0,76
konc. vztažená k pův. hodn. (%)	100	97	98	99	94	-	-	-	-

9.1.5 Pravdivost

Pravdivost měření nám ukazuje těsnost shody mezi průměrem replikovaných naměřených hodnot a skutečnou hodnotou měřené veličiny. V praxi se pravdivost vyhodnocuje ze série vzorků a místo skutečné hodnoty se používají referenční hodnoty. Mírou pravdivosti je bias, který odhaduje hodnotu systematické chyby (Kruve et al., 2015). Bias byl vypočítán pro opakovatelnost a reprodukovatelnost všech jednotlivých koncentrací a lze ho vidět v tabulce 3 a 4 (Tabulka 3 a Tabulka 4).

9.1.6 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD – limit of detection) je definována jako nejnižší množství nebo nejnižší koncentrace měřeného analytu ve vzorku, které může být spolehlivě detekováno analytickou metodou a jehož analytický signál je významně odlišitelný od šumu. Mez kvantifikace (LOQ – limit of quantification) definuje nejnižší koncentraci analytu, při které je přesnost a správnost měření taková, že dovoluje kvantitativní hodnocení (Kruve et al., 2015; Nováková et al., 2013).

V této diplomové práci byla mez detekce stanovována postupným ředěním nejnižšího kalibračního bodu 0,1 mg/l, který lze považovat za limit detekce dle pravidel FDA pro validaci bioanalytických metod, pokud odezva analytu k šumu bude nejméně pětkrát vyšší než odezva vzorku bez analytu (šumu). Postupným ředěním koncentrace 0,1 mg/l byla stanovena mez detekce pro ganciklovir jako hodnota 0,025 mg/l s dostatečným rozlišením poměru signálu k šumu.

9.1.7 Matricový efekt

Při stanovení léků a jejich metabolitů pomocí metody LC-MS mají velký význam matricové efekty (ME – matrix effects). Lze je vyjádřit jako změny účinnosti ionizace zapříčiněné přítomností látky vycházející z kolony společně s analyzovanou látkou. Popisované ME jsou výsledkem soupeření netěkavých složek matrice a analytu. Existuje mnoho mechanismů, způsobujících matricové efekty, avšak ne všechny jsou objasněny. Hlavní příčinou ovlivnění mechanismu ionizace je samotný princip ionizace. Při ionizaci dochází ke změně vlastnosti kapky přítomností těkavých a netěkavých látek a následně se změní účinnost vytváření kapky či její vypařování. Výsledkem je právě změněné množství iontů v plynné fázi. Ionizace může být jak potlačena, tak zvýšena. Obě tyto možnosti matricový efekt zahrnuje. Potlačení ionizace může být způsobeno zkříženou reakcí mezi metabolity, stanovovanou látkou či vnitřním standardem. Naopak zvýšení ionizace může být způsobeno fragmentací metabolitů ve zdroji nebo také velmi silnou vazbou látky na biologickou matici. Tyto procesy mají za následek snížení či zvýšení odezvy. Matricové efekty můžeme pozorovat především u APCI a ESI, avšak elektrosprejová ionizace je vůči ME citlivější než chemická ionizace za atmosférického tlaku. Důležité je poukázat, že některé složky mobilní fáze mohou také vytvářet matricový efekt jako např. (kyselina trifluoroctová, přídavky směsi kyseliny propionové a isopropanolu za kolonou a v neposlední řadě také přidání kyseliny octové a kyseliny

propionové k MF, která obsahuje TCA). Největší matricový efekt vykazuje precipitace proteinů pomocí acetonitrilu u LC-MS/MS s ESI. Příčinou je neselektivní precipitace proteinů, a proto je biologický materiál nedostatečně „přečištěn“ (Klapková et al. 2011).

Matricový efekt (ME) lze vypočítat dle následující rovnice:

$$ME(\%) = \frac{A(\text{matriční standard})}{A(\text{rozpouštědlový standard})}$$

Rozpouštědlový standard – určitá koncentrace standardu v rozpouštědle

Matriční standard – příprava vzorku v „blankové“ matrici a poté „naspikování“ až po úpravě na stejnou koncentraci jako v rozpouštědle (Trufelli et al., 2011)

Výsledky matricového efektu se pohybovaly v rozmezí hodnot 101,1 – 106,5 %.

9.1.8 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody u separačních metod se získává změřením vyextrahovaných vzorků a změřením vyextrahovaných blanků, kde je analyt přidán až po extrakci (matriční standard) (FDA, 2018; Trufelli et al., 2011).

Výtěžnost extrakce lze vypočítat pomocí rovnice:

$$REC(\%) = \frac{A(\text{normálně připravený vzorek})}{A(\text{matriční standard})}$$

REC – výtěžnost (recovery) (Trufelli et al., 2011)

Námi stanovená výtěžnost metody byla 96,1 – 102,6 %. Tyto výsledky splňují podmínky úspěšné validace metody.

9.2 Stanovení gancikloviru u patientských vzorků metodou LC-MS/MS

V této diplomové práci byly stanovovány koncentrace GCV u dvaceti pacientů. Soubor pacientů se skládal z dvaceti dospělých pacientů, kteří podstoupili transplantaci plic. Třinácti pacientům (65 %) byl valganciklovir podáván profylakticky a sedmi pacientům (35 %) byl GCV nebo valganciklovir podáván za účelem léčby CMV. U dospělých pacientů byl ganciklovir podáván intravenózně v dávce 5 mg/kg každých 12 hodin. U intravenózního podávání gancikloviru se provádějí odběry vždy před podáním a poté za 3 a 5 hodin po podání léčiva označené jako C₀, C₃ a C₅.

U perorálního podávání valgancikloviru se provádějí odběry různě, vždy před podáním, avšak poté např. za 4 a 6 hodin po podání antivirotika. Profylaktická dávka byla 900 mg/den. U pacientů byly kontrolovány v pravidelných intervalech jaterní enzymy a renální parametry (odhadovaná glomerulární filtrace) a na základě změny renálních parametrů byla provedena redukce dávky gancikloviru/valgancikloviru. Pro naše výpočty byl kalkulován body mass index (BMI). Všichni zařazení pacienti byli současně léčeni imunosupresivy (takrolimus, prednison a mofetil-mykofenolát). Všichni pacienti dostávali profylakticky cotrimoxazol. U pacientů je nutné také určit CMV status (D+/R+, D-/R-, D+/R-, D-/R+). V tabulce 10 (Tabulka 10) můžeme vidět přehled měřených pacientů.

Tabulka 10: Přehled transplantovaných pacientů

Pacient	CMV status	Výška (cm)	Hmotnost (kg)	Lék/ odběr v čase	Naměřená koncentrace [mg/l]	eGFR [ml/s 1,73 m ²]
1	D ⁺ /R ⁺	182	68	valganciklovir/C0	0,59	0,94
				valganciklovir/C3	0,94	
				valganciklovir/C5	0,79	
2	D ⁻ /R ⁺	181	98	valganciklovir/C0	0,27	1,63
				valganciklovir/C3	2,75	
				valganciklovir/C5	1,90	
3	D ⁺ /R ⁺	180	85	valganciklovir/C0	1,07	1,55
				valganciklovir/C3	3,20	
				valganciklovir/C4	2,95	
4	D ⁺ /R ⁻	178	47	valganciklovir/C0	1,20	1,22
				valganciklovir/C3	5,53	
				valganciklovir/C5	3,40	
5	D ⁻ /R ⁻	183	97	valganciklovir/C2	0,50	1,66
				valganciklovir/C4	1,90	
				valganciklovir/C22	3,00	
6	D ⁺ /R ⁺	158	73	valganciklovir/C0	0,48	1,08
				valganciklovir/C3	5,31	
				valganciklovir/C5	2,55	
7	D ⁺ /R ⁺	170	90	valganciklovir/C0	2,50	0,55
				valganciklovir/C3	4,69	
				valganciklovir/C5	5,70	
8	D ⁺ /R ⁺	166	62	valganciklovir/C0	0,62	1,67
				valganciklovir/C3	2,01	
				valganciklovir/C5	3,50	
9	D ⁺ /R ⁺	160	60	valganciklovir/C0	1,45	2,30
				valganciklovir/C4	6,05	

				valganciklovir/C6	3,30	
10	D ⁺ /R ⁺	170	80,5	valganciklovir/C0	0,59	0,73
				valganciklovir/C3	2,46	
				valganciklovir/C5	1,80	
11	-	91	14	valganciklovir/C0	0,93	-
				valganciklovir/C3	0,64	
				valganciklovir/C5	1,40	
				valganciklovir/C7	0,81	
11a	-	91	14	valganciklovir/C0	1,40	-
				valganciklovir/C3	1,43	
				valganciklovir/C5	3,51	
				valganciklovir/C7	1,71	
11b	-	91	14	valganciklovir/C0	0,66	-
				valganciklovir/C3	0,67	
				valganciklovir/C5	2,00	
				valganciklovir/C7	0,90	
12	D ⁺ /R ⁺	183	93	ganciklovir/C0	1,25	1,2
				ganciklovir/C3	1,37	
				ganciklovir/C5	3,62	
13	-	180	85	valganciklovir/C0	0,66	-
				valganciklovir/C3	1,53	
14	D ⁺ /R ⁻	187	74	valganciklovir/C0	1,67	0,98
				valganciklovir/C4	3,22	
				valganciklovir/C6	2,98	
15	D ⁺ /R ⁺	176	91	valganciklovir/C0	0,56	0,89
				valganciklovir/C4	2,55	
				valganciklovir/C6	1,09	
16	D ⁺ /R ⁺	173	91	valganciklovir/C0	0,00	0,99
				valganciklovir/C4	2,70	
				valganciklovir/C6	1,35	
17	D ⁺ /R ⁺	175	79	ganciklovir/C0	0,19	0,55
				ganciklovir/C3	1,13	
				ganciklovir/C5	1,18	
18	-	168	69	valganciklovir/C0	6,08	0,36
				valganciklovir/C3	8,84	
				valganciklovir/C5	8,39	
19	-	179	65	ganciklovir/C0	0,84	1,79
				ganciklovir/C3	0,46	
				ganciklovir/C5	7,26	
20	D ⁺ /R ⁻	175	55	ganciklovir/C0	0,26	2,2
				ganciklovir/C3	1,05	
				ganciklovir/C5	0,64	

V tabulce 10 (Tabulka 10) je uvedeno několik základních informací. U každého pacienta je nutné znát CMV status – z důvodu nastavení délky profylaxe CMV. Pacienti, kteří mají CMV status D^+/R^+ , D^-/R^- nebo D^-/R^+ mají stejnou minimální délku profylaxe a to 3 měsíce. Avšak pokud bude mít pacient status D^+/R^- , je délka profylaxe minimálně 9 měsíců event. déle. Důvodem je, že při této kombinaci je dárce štěpu pozitivní na CMV, avšak příjemce orgánu nemá vytvořené žádné protilátky proti CMV, a proto má mnohem větší šanci na replikaci viru v těle. Stručný přehled profylaxe a léčby pacientů po transplantaci plic lze vidět v tabulce 11 (Tabulka 11). V přehledu pacientů můžeme vidět také hmotnost a výšku všech pacientů, podání gancikloviru nebo valgancikloviru a odběry v jednotlivých časech, naměřenou koncentraci léčiva v mg/l a také glomerulární filtraci pro kontrolu renálních funkcí ledvin. Pacient označený jako 11a, 11b je pacient 11, ale měřený v jiné dny.

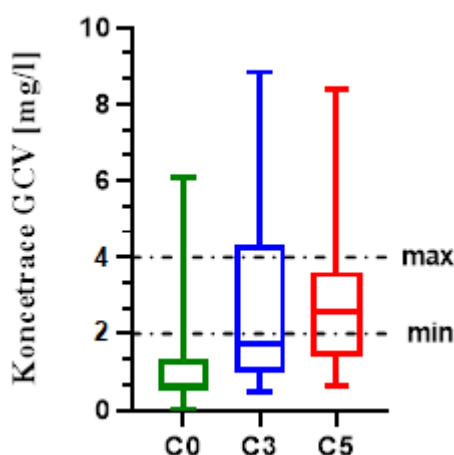
Tabulka 11: Schéma profylaxe a léčby u pacientů po transplantaci plic

Min. délka profylaxe dle CMV statusu	CMV mismatch (D^+/R^-)	9-12 měsíců
	ostatní match (D^-/R^+ ; D^-/R^- ; D^+/R^+)	3 měsíce
Indukční profylaxe	Ganciklovir i.v.	od Tx do 14. dne po operaci
Udržovací profylaxe	Valganciklovir p.o.	od 14. dne po operaci, pokud je možný způsob podání per os
Terapie CMV	Valganciklovir p.o.	virová nálož nad 100 kopií/10.000ge
	Ganciklovir i.v.	virová nálož nad 1000 kopií/10.000ge

- Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno pomocí softwaru GraphPad Prism version 9.0.0. (121). Pro ověření normality dat byl použit Shapiro-Wilkův test. Z Shapiro-Wilkova testu, kde byly hodnoty p-value (<0,0001; 0,0084 a 0,0380) pro koncentrace v časech C_0 , C_3 a C_5 uvedené v následujícím pořadí, je zřejmé, že data nemají normální rozdělení. Pro všechna zpracovaná data byly vytvořené krabicové grafy. Tyto grafy znázorňují rozsah měření tzn. minimální a maximální naměřenou hodnotu v určitých časech, hodnoty mediánů a mezikvartilových rozsahů. U některých grafů je znázorněno terapeutické rozmezí.

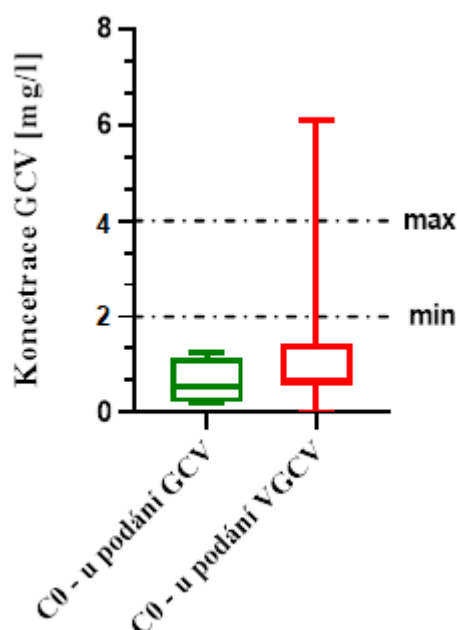
Na obrázku 14 (Obrázek 14) lze vidět graf pro koncentrace GCV u obou podaných forem v časech těsně před podáním léčiva (C_0), po třech hodinách od podání (C_3) a po pěti hodinách po podání (C_5). Z obrázku si lze povšimnout, že nejnižší koncentrace byly naměřeny vždy těsně před podáním léčiva, zatímco nejvyšší koncentrace GCV dle mediánu byly naměřeny po 5 hodinách po podání antivirotika. Je to dáno tím, že po 5 hodinách po podání léčiva bylo dosaženo nejvyšší hodnoty píku. Terapeutické rozmezí koncentrace GCV v čase C_0 je 2-4 mg/l. U jednoho (5 %) pacienta bylo dosaženo minimální hodnoty terapeutického rozmezí. Hladinu GCV nad terapeutické rozmezí měl také jeden (5 %) pacient a u zbývajících 18 (90 %) pacientů nebylo dosaženo spodní hranice terapeutického rozmezí GCV. Maximální dosažené hladiny GCV v časech C_0 , C_3 a C_5 náleží jednomu pacientovi.



Obrázek 14: Krabicový graf koncentrací GCV v časech C_0 , C_3 a C_5 , vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 , vyznačené mediány a IQR

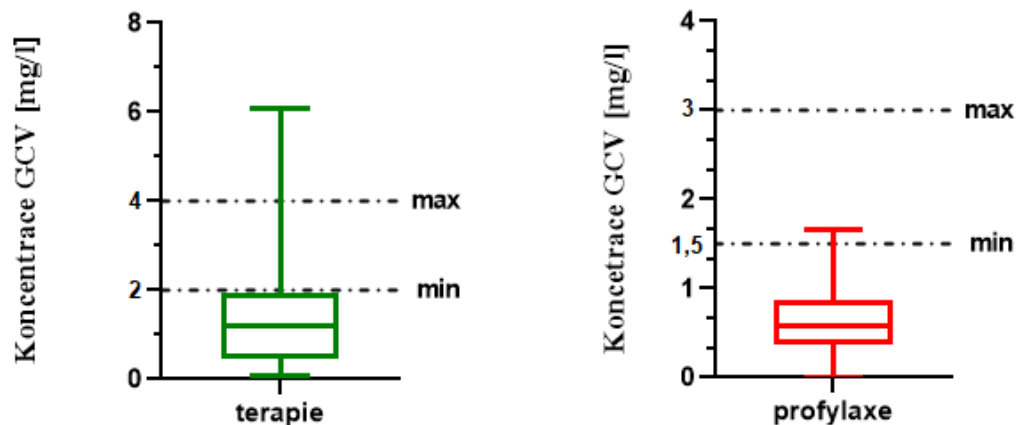
Krabicový graf, který je znázorněn na obrázku 15 (Obrázek 15), porovnává koncentrace gancikloviru v čase C_0 u podání GCV a u podání valgancikloviru. Terapeutické rozmezí GCV je 2-4 mg/l. Toto terapeutické rozmezí je znázorněno v grafu tečkovanou čarou. Z grafu lze vyčíst, že všichni sledovaní pacienti, kterým byl podáván ganciklovir, měli koncentraci léčiva pod referenčním rozmezím tzn., že byli poddávkováni. Z celkového počtu 20 pacientů dostávalo 16 pacientů valganciklovir. U podání valgancikloviru nebylo dosaženo minimální hodnoty terapeutického rozmezí u 14 (88 %) pacientů. V terapeutickém rozmezí byl jeden (6 %) pacient a nad terapeutické rozmezí byl zbývajících jeden (6 %) pacient. Dávkování je nutné přizpůsobit morfologii pacienta a místu infekce. Z grafu lze říct, že je velmi důležité monitorovat koncentraci GCV, poněvadž u nízkých hladin GCV hrozí riziko vzniku rezistence nebo selhání

terapie či profylaxe. Z Mann-Whitneyho testu, kde byla hodnota p-value 0,0941 pro podání GCV a VGCV v čase C_0 , je zřejmé, že data nejsou od sebe signifikantně odlišná.



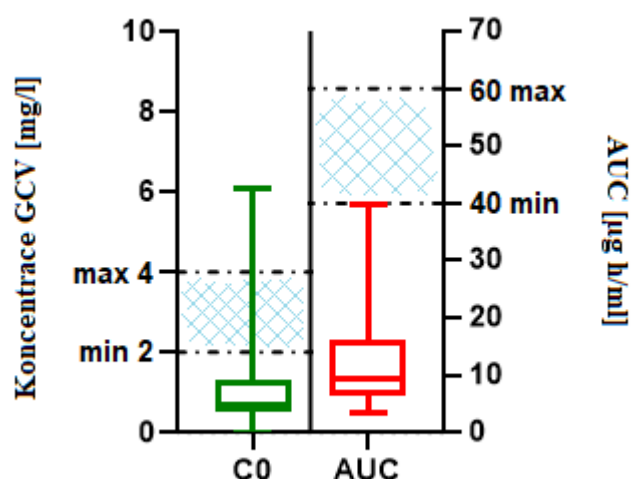
Obrázek 15: Porovnání koncentrací GCV u podání GCV a VGCV v čase C_0 , vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 , vyznačené mediány a IQR

Obrázek 16 znázorňuje porovnání pacientů, kterým byla antivirotika podávána profylakticky nebo terapeuticky. Jak již bylo řečeno, referenční rozmezí u terapie odpovídá 2-4 mg/l, zatímco referenční rozmezí u profylaxe odpovídá koncentraci 1,5-3 mg/l (Ritchie et al., 2019). Ze všech 20 pacientů byl třinácti pacientům (65 %) podáván VGCV profylakticky a 7 pacientů (35 %) dostávalo GCV či VGCV k léčbě cytomegalovirové infekce. Na prvním grafu je znázorněno terapeutické rozmezí pro terapii, zatímco na druhém grafu je znázorněno terapeutické rozmezí pro profylaxi. Jak si lze povšimnout, mediány u obou skupin pacientů jsou menší než terapeutická rozmezí léčiva.



Obrázek 16: Porovnání koncentrací GCV u terapeutického a profylaktického podání léčiva u pacientů po transplantaci plic, vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí a pro referenční rozmezí profylaxe (1,5-3 mg/l)

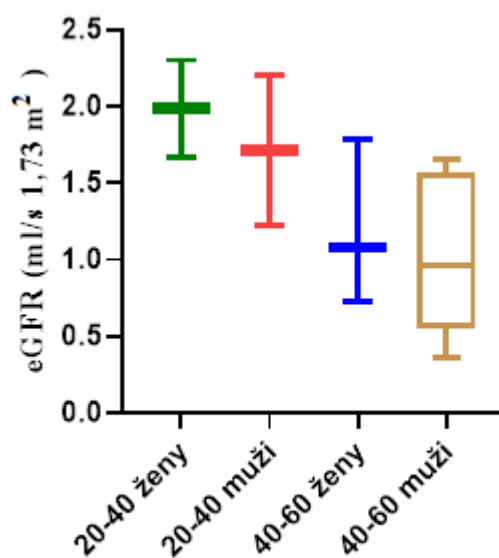
Obrázek 17 znázorňuje porovnání měřených koncentrací gancikloviru před dávkou a plochy pod křivkou AUC. Čárkované čáry u C_0 znázorňují terapeutické rozmezí koncentrace GCV, které je 2-4 mg/l. Čárkované čáry u AUC vyznačují terapeutické rozmezí 40-60 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$. Plochy pod křivkou byly vypočítány dle času odběru k odpovídající naměřené koncentraci. Lze vidět, že rozsah měření dosahuje pouze spodní hranice terapeutického rozmezí a to 40 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$. Muž ve skupině 40-60 let byl jediný, který téměř dosáhl minimální koncentrace terapeutického rozmezí AUC, a to 39,61 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, pacient měl sníženou glomerulární filtraci 0,36 ml/s 1,73 m². Tento pacient měl během jednoho měsíce dvakrát upravené dávkování valgancikloviru. Pacient měl indikovanou dávku 900 mg/den, přesněji 450 mg ráno a 450 mg večer. Po dvanácti dnech byla dávka upravena na 450 mg/den. Za 14 dní byla dávka opět upravena na 900 mg/den.



Obrázek 17: Porovnání koncentrace GCV v čase C_0 a ploch pod křivkou, vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 a terapeutické rozmezí (40-60 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) pro AUC

Na obrázku 18 (Obrázek 18) můžeme vidět krabicový graf s minimální a maximální naměřenou hodnotu glomerulární filtrace a mediány. V této diplomové práci bylo nejvíce mužů ve věku 40-60 let. U pacientů, kterým je podáván ganciklovir či valganciklovir je důležité sledovat jejich glomerulární filtraci, jelikož u vysokých hladin těchto antivirotik hrozí nefrotoxicita. Referenční rozmezí glomerulární filtrace ve věku 0-20 let je 1,4-2,2 ml/s 1,73 m² bez rozdílu pohlaví. Referenční rozmezí eGFR u mužů mezi 20-40 rokem života by mělo být 1,78-2,56 ml/s 1,73 m² u žen ve stejném věkovém rozpětí 1,81-2,37 ml/s 1,73 m². Mezi 40-60 rokem života eGFR u mužů by měla být 1,25-2,45 ml/s 1,73 m². U žen ve věku 40-60 let by měla být glomerulární filtrace 1,00-2,00 ml/s 1,73 m² (Kittnar et al., 2011). Většina pacientů měla fyziologickou glomerulární filtraci, avšak u čtyř pacientů byla glomerulární filtrace snížena. Jeden pacient ze skupiny mužů 20-40 let měl sníženou glomerulární filtraci a to 1,22 ml/s 1,73 m². Ve skupině mužů 40-60 let byli tři pacienti, kteří měli glomerulární filtraci sníženu a to 0,55, 0,55 a 0,36 ml/s 1,73 m². Bohužel u těchto pacientů nebyla nalezena potřebná data, zda byla dávka upravena na základě eGFR. Je nutné říci, že mezi těmito třemi pacienty jsou velké rozdíly v naměřených koncentracích GCV. První pacient se sníženou eGFR 0,55 ml/s 1,73 m² měl naměřenou koncentraci v čase C_0 2,50 mg/l. Tato koncentrace odpovídá terapeutickému rozmezí. Druhý pacient s glomerulární filtrací také 0,55 ml/s 1,73 m² měl však koncentraci GCV v čase C_0 0,19 mg/l. Tento pacient

nedosáhl minimální hodnoty terapeutického rozmezí. Poslednímu pacientovi se sníženou glomerulární filtrací 0,36 ml/s 1,73 m² byla naměřena koncentrace GCV v čase C₀ 6,08 mg/l. U tohoto pacienta bylo překročeno terapeutické rozmezí v čase C₀ tzn., že byl předávkovaný. U těchto pacientů je nezbytné pravidelně provádět terapeutické monitorování léčiv (TDM).



Obrázek 18: Krabicový graf eGFR u pacientů po transplantaci plic

V tabulce 12 (Tabulka 12) můžeme vidět popisnou statistiku koncentrací GCV/VGCV v časech C₀, C₃, C₅ a také plochy pod křivkou (AUC). Byly vyhodnoceny minimální, maximální a průměrné hodnoty koncentrace GCV/VGCV v jednotlivých časech a AUC, dále medián a mezikvartilový rozsah (IQR).

Tabulka 12: Statistika koncentrací GCV/VGCV v časech C₀, C₃, C₅ a AUC

<i>Parametr</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Průměr</i>	<i>Medián</i>	<i>IQR</i>
<i>C₀ (mg/l)</i>	0	6,08	1,05	0,66	0,37
<i>C₃(mg/l)</i>	0,64	8,84	2,74	2,13	1,80
<i>C₅ (mg/l)</i>	0,74	8,39	2,76	2,00	0,55
<i>AUC (μg.h/ml)</i>	3,29	39,61	12,1	9,09	7,18

10. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout rychlou, jednoduchou, citlivou a robustní analytickou metodu pro stanovení koncentrace gancikloviru v séru pacientů po transplantaci plic.

Při vývoji metody byly testovány různé druhy mobilních fází. Nejdříve byly testovány dvě mobilní fáze, a to MF A, která byla tvořena 95 ml vody a 5 ml pufru, který se skládal z kyseliny octové, octanu amonného a kyseliny trifluorocetové. Mobilní fáze B byla tvořena 95 ml acetonitrilu a 5 ml stejného pufru jako v MF A. Kyselina trifluorocetová je silná karboxylová kyselina, která je využívána v organické chemii, avšak působí agresivně při použití ionizace elektrosprejem v negativním nastavení, proto byly testovány jiné druhy mobilních fází. Billat et al. 2015 použili mobilní fázi A, která se skládala z mravenčanu amonného 2 mmol/l a mobilní fázi B, která byla tvořena acetonitrilem a mravenčnanem amonným v poměru 9:1. V této práci se nakonec osvědčilo toto složení mobilní fáze. Mobilní fáze A tvořená kyselinou mravenčí, fluoridem amonným a vodou (0,02 % NH_4F , 0,01 % HCOOH , 99,97 % H_2O), zatímco mobilní fáze B byla tvořena 100% metanolem. Billat et al. 2015 použili pro svoji analýzu kolonu Waters Atlantis HILIC Silica 5 μm (2,1 x 150 mm) udržovanou při teplotě 30 °C. V této práci byla použita kolona Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μm , 3,0 x 50 mm (Agilent Technologies, USA) udržována při teplotě 35 °C. V práci byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu stejně jako v Billat et al. 2015 s použitím MRM. Odlišné mobilní fáze představují autoři Ärlemalm et al. 2021, kteří použili jednoduché mobilní fáze. Mobilní fáze A se skládala pouze z 10 mmol/l octanu amonného a mobilní fáze B se skládala ze 100% metanolu. Oproti této diplomové práci, byla chromatografická separace provedena při 40 °C s použitím bifenylové kolony a doba analýzy trvala 3 min.

Značnou výhodou zavedené analytické metody je malá spotřeba vzorku. Při proteinové precipitaci se přidá pouze 10 μl patientského séra k izotopově značenému vnitřnímu standardu rozpuštěnému v 5% kyselině trichlorocetové. Ärlemalm et al. 2021 u své metody přidávají 50 μl patientského séra ke 150 μl vnitřního standardu. Ärlemalm et al. 2021 zvalidovali metodu s mezí detekce 0,001 mg/l v této diplomové práci se podařilo dosáhnout LOD 0,025 mg/l postupným ředěním nejnižšího kalibračního bodu 0,1 mg/l. My jsme testovali stabilitu vzorku při různých typech

skladování. Ärlemalm et al. 2021 požadovali měření stability vzorku v případě, pokud odchylka mezi čerstvě připravenými vzorky a vzorky skladovanými po dobu 6 měsíců byla ≥ 15 %. V této práci po dobu 4 měsíců při teplotě cca -80 °C byla zjištěna maximální změna koncentrace 9 %. Pigliasco et al., 2021 ve své publikaci uvádí změnu koncentrace od původní hodnoty ± 15 %. Naše výsledky ukazují maximální změnu koncentrace od původní hodnoty ≤ 10 %.

V této diplomové práci bylo pro měření koncentrace gancikloviru v séru pacientů po transplantaci plic zahrnuto 20 pacientů. Abdul et al. 2020 uvádí, že TDM u pacientů po transplantacích lze provádět několika různými způsoby, avšak nejčastěji se vyhodnocují koncentrace GCV pomocí C_{\min} – surogát AUC plochy pod křivkou. Stanovování AUC je v běžné praxi značně nepraktické a časově náročné, proto se volí C_{\min} . Abdul et al. 2020 ve své studii navrhli optimalizovaný plán odběru vzorků, protože C_{\min} poskytuje určitou informaci o clearance léčiva, avšak pro stanovení distribučního objemu léčiva je vyžadováno častější odebrání vzorků. Proto k popisu farmakokinetiky gancikloviru použili 1 až 3 časové body pro odběr vzorků. Odběr vzorků v různých časových intervalech popisují jako snadno proveditelný a tyto body mohou poskytnout přesné odhady expozice léku a mohou být použiti k predikci AUC. Ve svých výsledcích Abdul et al. 2020 uvádí, že ganciklovir vykazuje nízký distribuční objem 0,7 l/kg a je převážně vylučován ledvinami. Farmakokinetiku popisují jako předvídatelnou, avšak s minimální nevysvětlitelnou interindividuální variabilitou mezi pacienty u příjemců solidních orgánů. Abdul et al. 2020 neprokázali žádný vztah mezi expozicemi GCV a klinickou účinností a toxicitou. U pacientů v jejich studii se prokázala antivirová aktivita GCV s hodnotami $\geq 40-60$ $\mu\text{g.h/ml}$. Pro ganciklovir nepopsali žádné jasně definované prahy toxicity, ale vyšší hodnoty C_{\min} a AUC popisují jako zvýšené riziko neurologické, a hematologické toxicity. V této práci byly stanovovány koncentrace GCV v různých časech. Vždy byla měřena koncentrace GCV těsně před podáním léku, a to v čase C_0 , následně po třech hodinách od podání v čase C_3 a poté po pěti hodinách od podání v čase C_5 . Z těchto koncentrací byly vyhodnoceny plochy pod křivkou a společně s C_0 , C_3 a C_5 zahrnuty do výsledků. Klinické cíle farmakokinetiky a farmakodynamiky pro účinnost terapie či profylaxe ganciklovirem či valganciklovirem dle Abdul et al. 2021 by měly dosahovat AUC 40-60 $\mu\text{g.h/ml}$. U pacientů v této diplomové práci bylo pouze v jednom případě dosaženo spodní hranice terapeutického rozmezí AUC a to 40 $\mu\text{g.h/ml}$. Z výsledků lze říci, že ostatní pacienti

měli koncentraci GCV pod terapeutickým rozmezím a pokud by nedošlo ke zvýšení koncentrace GCV mohlo by dojít ke vzniku lékové rezistence anebo by nemusela být léčba účinná.

Autoři Märtsen et al. 2021 zahrnuli do své studie 95 pacientů na základě těchto kritérií: věk ≥ 18 let, pacient musel být po transplantaci solidního orgánu či kmenových buněk a musel dostávat ganciklovir či valganciklovir jako profylaxi nebo léčbu. Transplantaci kmenových buněk podstoupilo 31 pacientů a transplantaci solidních orgánů (ledviny, plíce, játra, srdce, tenké střevo či více orgánů) podstoupilo 64 pacientů. V rámci rutinní péče bylo provedeno u všech pacientů TDM. Po dobu své studie celkově naměřili 450 sérových koncentrací. V této práci bylo zahrnuto 20 pacientů a všichni pacienti byli po transplantaci plic. V diplomové práci byly zaznamenány a statisticky vyhodnoceny pouze některé stěžejní informace. Märtsen et al. 2021 kromě výšky, váhy, BMI, typu transplantace a glomerulární filtrace sledovali u pacientů např. laboratorní hodnoty jako krevní obraz, diferenciální rozpočet bílých krvinek, celkový bilirubin, alkalickou fosfatázu či gamaglutamyltransferázu. V článku uvádějí, že v případě potřeby zaznamenávali také nežádoucí účinky (neutropenii, průjem, anémii) a příčinu smrti. Märtsen et al. 2021 použili ke stanovení koncentrace GCV metodu LC-MS/MS stejně jako v této diplomové práci. Ve své studii uvádějí, že příprava vzorku se skládala z 500 μl precipitačního činidla a 100 μl patientského séra. Z naší metody je zřejmé, že 10 μl séra je dostatečným objemem k zajištění velmi dobré citlivosti metody. V naší práci bylo po precipitaci proteinů alikvotováno 50 μl supernatantu. K supernatantu bylo přidáno 950 μl 5% kyseliny trichloroctové. Následně bylo do systému LC-MS/MS nastříknuto 0,5 μl vzorku, zatímco Märtsen et al. 2021 po proteinové precipitaci nastříkovali do systému supernatant o objemu 0,2 μl . Märtsen et al. 2021 do své studie zařadili 95 pacientů. Profylakticky byl GCV podáván 47 (49 %) pacientům a k léčbě CMV infekce byl podáván 48 (51 %) pacientům. V publikaci Märtsen et al. 2021 z výsledných 390 koncentrací farmakolog poskytl radu s úpravou dávky v 369 případech (95 %). Lékaři akceptovali změnu úpravy dávky pouze u 62 % pacientů. Do výsledků studie bylo zahrnuto 85 pacientů, kterým dávka nebyla změněna, z toho 46 pacientům byl podáván GCV profylakticky a 39 pacientům byl podáván GCV k léčbě CMV infekce. Dle koncentrace C_{\min} a AUC ve výsledcích uvádějí, že podání GCV profylakticky u pacientů beze změny dávky bylo 31 (67 %) pacientů poddávkových, 11 (34 %) pacientů v terapeutickém rozmezí a 4 (9 %) pacienti byli

předávkování. U léčby CMV infekce ganciklovirem bylo 19 (49 %) pacientů poddávkovaných, 14 (36 %) pacientů v terapeutickém rozmezí a 6 (15 %) pacientů předávkovaných. V této diplomové práci bylo celkově získaných 20 koncentrací GCV v čase C_0 . Dle našich výsledků bylo 18 pacientů poddávkovaných (90 %), 1 pacient byl v terapeutickém rozmezí (5 %) a následně 1 (5 %) pacient byl předávkován.

Standardní dávkování gancikloviru pro léčbu cytomegalovirové infekce je 900 mg každých 12 hodin pro perorální valganciklovir a dávka 5 mg/kg každých 12 hodin pro i.v. podání gancikloviru. Jak již bylo řečeno, v případě selhání ledvin, by mělo být dávkování upraveno dle funkce ledvin, aby se předešlo závažným nežádoucím účinkům léčiva. Vyšší koncentrace GCV mohou být spojeny se zvýšeným rizikem toxicity, z důvodu vyšší expozice. Kromě nežádoucích účinků, jako je např. myelosuprese či neurotoxicita, může léčbu CMV ovlivnit již zmiňovaná rezistence na antivirová léčiva. Rezistence na GCV je způsobena mutacemi v genech UL97 kinázy a UL54 polymerázy. U rezistence se také můžeme setkat s rizikem získané rezistence, které je zvýšené u pacientů s vysokou virovou zátěží, tzn. $>100\,000$ kopií/ml krve. Adekvátní léčba CMV je velmi důležitá a je potřeba se vyhnout nízkým sérovým koncentracím GCV, které vedou k selhání léčby (Märtson et al., 2019). Naše výsledky ukázaly, že v časech C_0 byla téměř pokaždé naměřena koncentrace GCV mimo terapeutické rozmezí u pacientů po transplantaci plic, a proto je důležité sledování koncentrací C_0 a plochy pod křivkou, aby nedocházelo k selhání terapie či vzniku rezistence.

Duval et al. 2021 publikovali článek, ve kterém popisují farmakokinetiku GCV u pediatrických pacientů. Obvykle se monitorování expozice gancikloviru provádí měření minimální koncentrace označované jako C_0 . Vzhledem ke specifčnosti pediatrické farmakokinetiky nemusí být měření minimální koncentrace relevantní náhradou expozice GCV, a proto vhodnějším biomarkerem může být AUC. Plocha pod křivkou, měření koncentrace v závislosti na čase, je považována za nejlepší náhradní ukazatel expozice léčiva. Ve studii je pro zdůraznění důležitosti AUC uveden případ čtyřletého chlapce s Embergerovým syndromem. Pacient v červnu 2020 podstoupil alogenní haploidentickou transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT). Po transplantaci pacient dostával řadu imunosupresiv, antimykotik a dalších léčiv. Třicet čtyři dny po transplantaci byla pacientovi diagnostikována CMV infekce. Byl nasazen intravenózní GCV 5 mg/kg každých 12 hodin. Po třech týdnech léčby se virová zátěž nesnížila. U pacienta bylo podezření na nízkou expozici léčiva a virologickou rezistenci.

Minimální koncentrace GCV byly subterapeutické ($<0,5 \mu\text{g/l}$) a analýza mutací v genech UL97 a UL54 byla negativní. Selhání léčby bylo pravděpodobně způsobeno nízkou expozicí léku. Pacientova renální clearance kreatininu byla rychlá, a proto bylo rozhodnuto upravit dávkování GCV řízené AUC. Dávka byla zvýšena na 10 mg/kg každých 12 hodin. AUC byla hodnocena pomocí pěti odběrů vzorků: před dávkou a poté 1, 2, 4 a 6 hodin po dávce. Minimální koncentrace C_0 byly stále pod terapeutickou hodnotou, zatímco maximální koncentrace byly vysoké a $\text{AUC}_{0-12 \text{ h}}$ se blížila k $50 \mu\text{g.h/ml}$. Terapeutické rozmezí AUC je $40-60 \mu\text{g.h/ml}$. Přibližně po šesti dnech se virová zátěž snížila a po padesáti dvou dnech byla virová zátěž nedetekovatelná. Tato publikace zdůrazňuje, že TDM GCV má velký význam pro zlepšení účinnosti léčby infekce CMV. Je důležité uvést, že po úpravě dávkování se C_0 změnila minimálně, avšak bylo dosaženo terapeutické AUC. A právě to je podstatné, poněvadž by dávka GCV byla pravděpodobně zvýšena nad 10 mg/kg a mohlo by dojít k toxickým účinkům léku a následné pancytopenii.

11. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly stanovovány hodnoty gancikloviru u pacientů po transplantaci plic pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny čtyři cíle, a to vyvinout a optimalizovat metodu pro stanovení GCV v séru pomocí LC-MS/MS, validovat metodu pro stanovení gancikloviru v séru. Dále stanovit koncentrace gancikloviru v séru u pacientů po transplantaci plic a zhodnotit význam terapeutického monitorování GCV.

Podařilo se vyvinout rychlou, citlivou, spolehlivou a robustní analytickou metodu pro stanovení GCV v séru, metoda byla úspěšně validována a všechny validační parametry splnily podmínky úspěšné validace, které jsou definovány dle validace bioanalytických metod. Následně probíhalo stanovení gancikloviru u pacientů po transplantaci plic. Tento cíl byl úspěšně splněn stanovením GCV u dvaceti pacientů po transplantaci plic. Posledním cílem bylo zhodnocení významu terapeutického monitorování gancikloviru.

Celkově bylo vybráno 20 pacientů, kteří transplantaci plic podstoupili. Stanovování hladin gancikloviru probíhalo jako terapeutické monitorování léčiv, a to v časech před dávkou, tři hodiny po dávce a pět hodin po dávce. Tyto časy byly označeny jako C_0 , C_3 a C_5 . Dle koncentrace GCV v čase C_0 bylo u pacientů vyhodnocováno, zda byla dávka vysoká, nízká či zda bylo dosaženo terapeutického rozmezí. Z výsledků bylo zjištěno, že 18 (90 %) pacientů bylo poddávkováno. V terapeutickém rozmezí byl 1 (5 %) pacient a u 1 (5 %) pacienta došlo k překročení terapeutického rozmezí.

Výsledky prokázaly, že TDM je nezbytné u všech pacientů po transplantaci plic, pro nastavení individualizované optimální farmakoterapie, jelikož při překročení terapeutického rozmezí GCV (2-4 mg/l) může dojít k myelosupresi, nefrotoxicitě, neurotoxicitě či gastrointestinálním poruchám. Naopak při nedosažení minimální hodnoty terapeutického rozmezí nemusí být léčba účinná či může vzniknout rezistence ke GCV.

12. SEZNAM ZKRATEK

ALT	alaninaminotransferáza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
AST	aspartátaminotransferáza
AUC	plocha pod křivkou
BAL	bronchoalveolární laváž
BMI	body mass index
C18	oktadecyl
CID	kolizně indukovaná disociace
C _{max}	maximální koncentrace
CV	variační koeficient
D ⁺ R ⁻	pozitivní dárce, negativní příjemce
D ⁺ R ⁺	pozitivní dárce i příjemce
DAD	detektor s diodovým polem
DCD	plice z dárce po oběhové smrti dárce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPS	suchá kapka plazmy
D ⁻ R ⁻	negativní dárce i příjemce
D ⁻ R ⁺	negativní dárce, pozitivní příjemce
EBV	virus Epstein-Barrové
ECD	elektrochemický detektor
eGFR	glomerulární filtrace
EI	elektronová ionizace
EOD	poškození koncových orgánů

ESI	elektrosprejová ionizace
EVLP	ex vivo plicní perfuze
FLD	fluorimetrický detektor
ganR-CMV	cytomegalovirus rezistentní na ganciklovir
GCV	ganciklovir
GCV-TP	ganciklovir trifosfát
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli
HBV	virus hepatitidy B
HCMV	lidský cytomegalovirus
HCV	virus hepatitidy C
HHV-5	lidský herpes virus-5
HIV	Virus lidské imunodeficiency
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSV-1	herpes simplex virus 1
HSV-2	herpes simplex virus 2
i.v.	intravenózní podání
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IQR	mezikvartilový rozsah
IS	vnitřní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDLLT	transplantace plic žijících dárců
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce
ME	matricové efekty

MF	mobilní fáze
MRM	monitorování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometr
p.o.	perorální podání
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
PEPT1	Intestinální peptidový přenašeč
PET	preemptivní terapie
Q1	první kvadrupól
Q2	druhý kvadrupól (kolizní cela)
Q3	třetí kvadrupól
RTG	rentgen
SCT	transplantace krvetvorných buněk
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
SOT	transplantace pevných orgánů
SPE	extrakce na pevné fázi
$T_{1/2}$	poločas rozpadu
TCA	kyselina trichloroctová
TDM	terapeutické monitorování léčiv
TOF	průletový analyzátor
UPW	ultra čistá voda
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné světlo
V_d	distribuční objem
V_d/kg	distribuční objem na kilogram tělesné hmotnosti
VZV	varicella-zoster virus

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturální vzorec gancikloviru a acykloviru (Vytvořeno v programu ChemDraw)..	10
Obrázek 2: Farmakokinetický profil GCV při orálním podání 900 mg valgancikloviru (Převzato a upraveno z Perrottet et al., 2009).	11
Obrázek 3: Cytomegalické inkluzní tělo (Zdroj: Louten, 2016).	13
Obrázek 4: Prevalence protilátek proti lidskému cytomegaloviru a incidence infekce u imunokompromitovaných jedinců (Převzato a upraveno z Griffiths et al., 2021).	17
Obrázek 5: Hodnocení horizontální a vertikální velikosti plic na RTG snímku (Zdroj: Lischke et al., 2011).	21
Obrázek 6: Jednoduché schéma konfigurace pro systém HPLC (Převzato a upraveno z: Moldoveanu et al., 2017).	25
Obrázek 7: Schéma detektoru s diodovým polem (Převzato a upraveno z: Nováková et al., 2013).	27
Obrázek 8: Schéma principu fluorimetrického detektoru (Převzato a upraveno z Cvačka, 2010).	28
Obrázek 9: Elektrosprejová ionizace (Převzato a upraveno z Friedecký et al., 2012)	31
Obrázek 10: LC sestava Agilent 1290 Infinity II s trojitým kvadrupólem Agilent 6495 (Agilent Technologies, USA)	40
Obrázek 11: Chromatogram gancikloviru	43
Obrázek 12: Chromatogram gancikloviru-d5	44
Obrázek 13: Kalibrační křivka GCV	45
Obrázek 14: Krabicový graf koncentrací GCV v časech C_0 , C_3 a C_5 , vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 , vyznačené mediány a IQR	56
Obrázek 15: Porovnání koncentrací GCV u podání GCV a VGCV v čase C_0 , vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 , vyznačené mediány a IQR	57
Obrázek 16: Porovnání koncentrací GCV u terapeutického a profylaktického podání léčiva u pacientů po transplantaci plic, vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí a pro referenční rozmezí profylaxe (1,5- 3 mg/l)	58
Obrázek 17: Porovnání koncentrace GCV v čase C_0 a ploch pod křivkou, vyznačené minimum a maximum (2-4 mg/l) pro terapeutické rozmezí v čase C_0 a terapeutické rozmezí (40-60 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) pro AUC	59
Obrázek 18: Krabicový graf eGFR u pacientů po transplantaci plic	60

14. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Gradient mobilních fází	43
Tabulka 2: MRM přechody gancikloviru a interního standardu	43
Tabulka 3: Opakovatelnost měření	46
Tabulka 4: Reprodukovatelnost měření	47
Tabulka 5: Skladování vzorků při laboratorní teplotě.....	48
Tabulka 6: Skladování vzorků při teplotě cca 4 °C.....	49
Tabulka 7: Skladování vzorků při teplotě cca -20 °C	49
Tabulka 8: Skladování vzorků při teplotě -80 °C.....	50
Tabulka 9: Stabilita vzorku při opakovaném rozmrazování	50
Tabulka 10: Přehled transplantovaných pacientů.....	53
Tabulka 11: Schéma profylaxe a léčby u pacientů po transplantaci plic	55
Tabulka 12: Statistika koncentrací GCV/VGCV v časech C ₀ , C ₃ , C ₅ a AUC.....	60

15. LITERATURA

- Billat P.A., Sauvage F.L., Picard N., Tafzi N., Alain S., Essig M., Marquet P., Saint-Marcoux F. Liquid chromatography tandem mass spectrometry quantitation of intracellular concentrations of ganciclovir and its phosphorylated forms. *Anal Bioanal Chem.* 2015 May;407(12):3449-56. doi: 10.1007/s00216-015-8554-0. Epub 2015 Feb 22. PMID: 25701963.
- Božović A., Kulasingam V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins. *Clin Biochem.* 2013 Apr;46(6):444-55. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.09.024. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23041077.
- Cibiček N., Vacek J. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul.* 2016 Nov 11;3(2):156-160. doi: 10.14744/nci.2016.32757. PMID: 28058406; PMCID: PMC5206469.
- Crough T., Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):76-98, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00034-08. PMID: 19136435; PMCID: PMC2620639.
- Cvačka J. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Presentation presented at: [Vysokoučinná kapalinová chromatografie, Přírodovědecká fakulta UK; 2010 Nov 24; Prague, Czechia.]
- de Vries JJ., van Zwet E.W., Dekker F.W., Kroes A.C., Verkerk P.H., Vossen A.C. The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection: a population-based prediction model. *Rev Med Virol.* 2013 Jul;23(4):241-9. doi: 10.1002/rmv.1744. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23559569.
- Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klin. Biochem. Metab.* 2011, 1, 36-44.

- Duval X., Lemaitre F., Pertuisel S., Probert J., Gandemer V., Verdier M.C., Tron C. The need for area under the curve measurements in the field of ganciclovir therapeutic drug monitoring in children: a case report. *BMC Infect Dis.* 2021 Nov 8;21(1):1143. doi: 10.1186/s12879-021-06828-8. PMID: 34749667; PMCID: PMC8573890.
- Dvořáčková E., Šíma M., Petrus J., Klapková E., Hubáček P., Pozniak J., Havlín J., Lischke R., Slanař O. Ganciclovir Pharmacokinetics and Individualized Dosing Based on Covariate in Lung Transplant Recipients. *Pharmaceutics* **2022**, 14, 408. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020408>
- Emery, Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control, *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 105, Issue 5, May 2012, Pages 401–405, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcr262>
- Fanali S., Haddad P.R., Poole C., Riekkola L.-M. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, second ed, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2017.
- Fisher C. E., Knudsen J. L., Lease E. D., Jerome K. L., Rakita R. M., Limave M. B. A. P. Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 65, Issue 1, 1 July 2017, Pages 57–63, <https://doi.org/10.1093/cid/cix259>
- Foltz R.L., Andrenyak D.M., Crouch D.J. “Forensic Science, Applications of Mass Spectrometry,” in *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, J. C. Lindon, G. E. Tranter, and D. W. Koppenaal, Eds., pp. 707–711, Elsevier AP Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, 2017.
- Gilar M., DeLano M., Gritti F. Mitigation of analyte loss on metal surfaces in liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2021 Aug 2;1650:462247. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462247. Epub 2021 May 19. PMID: 34087520.
- Griffiths P., Baraniak I., Reeves M. (2015), The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J. Pathol.*, 235: 288-297. <https://doi.org/10.1002/path.4437>

- Griffiths P., Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol* 19, 759–773 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00582-z>
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2018. <https://www.fda.gov/...nce/s/ucm368107.pdf>
- Haag A.M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol.* 2016;919:157-169. doi: 10.1007/978-3-319-41448-5_7. PMID: 27975216.
- Haidar G., Boeckh M., Singh N. Cytomegalovirus Infection in Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation: State of the Evidence. *J Infect Dis.* 2020 Mar 5;221(Suppl 1):S23-S31. doi: 10.1093/infdis/jiz454. PMID: 32134486; PMCID: PMC7057778.
- Holzbecher Z., Churáček J. *Analytická chemie*, vyd. Praha: SNTL, 1987, ISBN 04–612-87
- Horvatits T., Kitzberger R., Drolz A., Zauner C., Jäger W., Böhmendorfer M., Kraff S., Fritsch A., Thalhammer F., Fuhrmann V., Schenk P. Pharmacokinetics of ganciclovir during continuous venovenous hemodiafiltration in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):94-101. doi: 10.1128/AAC.00892-13. Epub 2013 Oct 21. PMID: 24145543; PMCID: PMC3910760.
- Chmelová K., Fraňková S., Šperl J. *Gastroenterologie a hepatologie* 2017;71(6): 517-523 Klinika hepatogastroenterologie, Transplantcentrum, IKEM, Praha
- Keevil B.G. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013 Oct;27(5):663-74. doi: 10.1016/j.beem.2013.05.015. Epub 2013 Jul 10. PMID: 24094637.
- Kenneson A., Cannon M.J. 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.*17:253-276.
- Kiontke A., Bilig S., Birkemeyer C. "Response in Ambient Low Temperature Plasma Ionization Compared to Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization for Mass Spectrometry", *International Journal of*

Analytical, Chemistry, vol. 2018, Article, ID 5647536, 18 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5647536>

- Kiser T.H., Fish D.N., Zamora M.R. Evaluation of valganciclovir pharmacokinetics in lung transplant recipients, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 31, Issue 2, 2012, Pages 159-166, ISSN 1053-2498, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.11.016>.
- Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.-L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, *Anal. Chim. Acta* 2015, 870, 29-44.
- Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.-L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I.: Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II, *Anal. Chim. Acta* 2015, 870, 8-28.
- Leung K.S.Y., Fong, B.M.W. LC–MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come?. *Anal Bioanal Chem* **406**, 2289–2301 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7542-5>
- Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R., Garvik B.M., Yates J.R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1999 Jul;17(7):676-82. doi: 10.1038/10890. PMID: 10404161.
- Lischke R., Simonek J., Pozniak J., Schützner J., Pafko P. Transplantace plic [Lung transplantation]. *Rozhl Chir.* 2011 Nov;90(11):612-20. Czech. PMID: 22442870.
- Maciel E.V.S., Pereira dos Santos N.G., Vargas M.D.A., Lanças F.M. Electron ionization mass spectrometry: Quovadis?. *Electrophoresis.* 2022; 43: 15871600. <https://doi.org/10.1002/elps.202100392>
- Märtson A.G., Edwina A.E., Kim H.Y., Knoester M., Touw D.J., Sturkenboom M.G.G., Alffenaar J.C. Therapeutic Drug Monitoring of Ganciclovir: Where Are We? *The Drug Monit.* 2022 Feb 1;44(1):138147. doi: 10.1097/FTD.00000000000000925. PMID: 34610621; PMCID: PMC8746890.
- Märtson A.G., Touw D., Damman K., Bakker M., Oude Lansink-Hartgring A., van der Werf T., Knoester M., Alffenaar J.C. Ganciclovir Therapeutic Drug Monitoring: A Case Series. *Ther Drug Monit.* 2019 Apr;41(2):107-110. doi:

10.1097/FTD.0000000000000598. Erratum in: *Ther Drug Monit.* 2019 Jun;41(3):408. PMID: 30883503; PMCID: PMC6426343.

- Marty F. M, Winston J. D., Chemaly R. F., Mullane K.M. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of oral brincidofovir for cytomegalovirus prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **25**, 369–381 (2019).
- Marty F. M. et al. Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2433–2444 (2017).
- Matthews T., Boehme R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir, *Reviews of Infectious Diseases*, Volume 10, Issue Supplement_3, July-August 1988, https://doi.org/10.1093/clinids/10.Supplement_3.S490
- Minces L.R., Nguyen M.H., Mitsani D., Shields R.K., Kwak E.J., Silveira F.P., Abdel-Massih R., Pilewski J.M., Crespo M.M., Bermudez C., Bhama J.K., Toyoda Y., Clancy C.J. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections among lung transplant recipients are associated with poor outcomes despite treatment with foscarnet-containing regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):128-35. doi: 10.1128/AAC.00561-13. Epub 2013 Oct 21. PMID: 24145525; PMCID: PMC3910731.
- Mocarski E. S., Shank T., and Pass R.F. 2007. Cytomegaloviruses, p. 2701-2772. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Moldoveanu S.C.; David V. *Selection of the HPLC method in chemical analysis*. Elsevier, 2016.
- Moldoveanu S.C.; David V. *Essentials in modern HPLC separations*. Elsevier, 2022.
- Nash E.F., Coonar A., Kremer R., Tullis E., Hutcheon M., Singer L.G., Keshavjee S., Chaparro C. Survival of *Burkholderia cepacia* sepsis following lung transplantation in recipients with cystic fibrosis. *Transpl Infect Dis.* 2010 Dec;12(6):551-4. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00525.x. PMID: 20553438.

- Natori Y. et al. Use of viral load as a surrogate marker in clinical studies of cytomegalovirus in solid organ transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 617–631 (2018).
- Nosotti M., Tarsia P., Morlacchi L.C. Infections after lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2018 Jun;10(6):3849-3868. doi: 10.21037/jtd.2018.05.204. PMID: 30069386;PMCID:PMC6051843.
- Nováková L., Douša M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- Nováková L., Douša M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- Painsil E., Cheng Y-CH. Antiviral Agents, Editor(s): Moselio Schaechter, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Academic Press, 2009, Pages 223-257, ISBN 9780123739445, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00178-4>.
- Patel S.J., Kuten S.A., Knight R.J., Hong D.M., Gaber A.O. Resolution of Mild Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Disease with Reduced-Dose Cidofovir and CMV-Hyperimmune Globulin. *J Transplant.* 2014;2014:342319. doi: 10.1155/2014/342319. Epub 2014 Jun 1. PMID: 24991428; PMCID: PMC4058803.
- Perrottet N., Decosterd L.A., Meylan P., Pascual M., Biollaz J., Buclin T. Valganciclovir in adults solid organ transplant recipients. *Clinical Pharmacokinetics* **48(6)**, 399-418 (2009).
- Pigliasco F., Cafaro A., Simeoli R., Barco S., Magnasco A., Faraci M., Tripodi G., Goffredo B.M., Cangemi G. A UHPLC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Aciclovir and Ganciclovir in Plasma and Dried Plasma Spots. *Biomedicines.* 2021 Oct 2;9(10):1379. doi: 10.3390/biomedicines9101379. PMID: 34680495; PMCID: PMC8533239.
- Pilarczyk K., Haake N., Heckmann J., Carstens H., Haneya A., Cremer J., Jakob H., Pizanis N., Kamler M. Is universal antifungal prophylaxis mandatory in adults after lung transplantation? A review and meta-analysis of observational

studies. *Clin Transplant*. 2016 Dec;30(12):1522-1531. doi: 10.1111/ctr.12854. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27653443.

- Pitt J.J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Review*. 2009, 30(1), 19–34. ISSN 0159-8090. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>
- Revello M.G., Fabbri E., Furione M., Zavattoni M., Lilleri D., Tassis B., Quarenghi A., Cena C., Arossa A., Montanari L., Rognoni V., Spinillo A., Gerna G. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol*. 2011 Apr;50(4):303-7. doi: 10.1016/j.jcv.2010.12.012. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21277825.
- Ritchie B.M., Barreto J.N., Barreto E.F., Crow S.A., Dierkhising R.A., Jannetto P.J., Tosh P.K., Razonable R.R. Relationship of Ganciclovir Therapeutic Drug Monitoring with Clinical Efficacy and Patient Safety. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3):e01855-18. doi: 10.1128/AAC.01855-18. PMID: 30602515; PMCID: PMC6395929.
- Ruttens D., Martens A., Ordies S., Verleden S.E., Neyrinck A.P., Vos R., Boada M.C., Vanaudenaerde B.M., Verleden G.M., Van Raemdonck D. Short- and Long-term Outcomes After Lung Transplantation From Circulatory-Dead Donors: A Single-Center Experience. *Transplantation*. 2017 Nov;101(11):2691-2694. doi: 10.1097/TP.0000000000001678. PMID: 28207629.
- Sanchez P.G., Bittle G.J., Burdorf L., Pierson R.N. 3rd, Griffith B.P. State of art: clinical ex vivo lung perfusion: rationale, current status, and future directions. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Apr;31(4):339-48. doi: 10.1016/j.healun.2012.01.866. PMID: 22423980.
- Schiavon M., Falcoz P.E., Santelmo N., Massard G. Does the use of extended criteria donors influence early and long-term results of lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 Feb;14(2):183-7. doi: 10.1093/icvts/ivr079. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22159257; PMCID: PMC3279974.

- Sinclair J., Sissons P. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 87:1763-1779.
- Smibert O., Snell G.I., Bills H., Westall G.P., Morrissey C.O. Mycobacterium abscessus Complex - a Particular Challenge in the Setting of Lung Transplantation. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(3):325-33. doi: 10.1586/14787210.2016.1138856. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26732819.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, third ed., Wiley, Hoboken, 2010
- Somers J., Ruttens D., Verleden S.E., Cox B., Stanzi A., Vandermeulen E., Vos R., Vanaudenaerde B.M., Verleden G.M., Van Veer H., Coosemans W., Decaluwe H., Naftoux P., De Leyn P., Van Raemdonck D.E.. A decade of extended-criteria lung donors in a single center: was it justified? *Transpl Int.* 2015 Feb;28(2):170-9. doi: 10.1111/tri.12470. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25266074.
- Thiede B., Höhenwarter W., Krah A., Mattow J., Schmid M., Schmidt F., Jungblut P.R. Peptide mass fingerprinting. *Methods.* 2005 Mar;35(3):237-47. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.08.015. Epub 2005 Jan 12. PMID: 15722220.
- Trufelli H., Palma P., Famigliani G., Cappiello A. (2011), An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 30: 491-509. <https://doi.org/10.1002/mas.20298>
- Venuta F., Van Raemdonck D. History of lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017 Dec;9(12):5458-5471. doi: 10.21037/jtd.2017.11.84. PMID: 29312756; PMCID: PMC5757055.
- Walker C.M., van Burik J.-A. H., For T.E.D. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, vol. 13, no. 9, s. 1106-1115
- Warnecke G., Van Raemdonck D., Kukreja J., Mid and long-term clinical results of OCS Lung Inspire International trial. *J Heart Lung Transplant* 2016;35:S15-16. 10.1016/j.healun.2016.01.042

- Yorulmaz A., Sahin E.B., Sener M., Kulcu C. S. Acyclovir-induced bullous reaction in a patient with metastatic breast cancer. *Cutan Ocul Toxicol.* 2017 Mar;36(1):85-87. doi: 10.3109/15569527.2016.1140180. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26911608.
- Zheng Q.Y, Huynh K.T., van Zuylen W.J., Craig M.E., Rawlinson W.D. Cytomegalovirus infection in day care centres: A systematic review and meta-analysis of prevalence of infection in children. *Rev Med Virol.* 2019 Jan;29(1):e2011. doi: 10.1002/rmv.2011. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30306730.
- Zubarev R.A., Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013 Jun 4;85(11):5288-96. doi: 10.1021/ac4001223. Epub 2013 May 13. PMID: 23590404.