



BIULETYN  
Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2020, 5, 40-49  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## ZASTOSOWANIE METOD ANALITYCZNYCH W OZNACZANIU AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY INOZYNOMONOFOSFORANOWEJ (IMPDH) PODCZAS TERAPII IMMUNOSUPRESYJNEJ

Arkadiusz Kocur\*, Dorota Marszałek, Tomasz Pawiński

Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

\*autor korespondujący, tel: + 48 22 57 20 635, e-mail: [arkadiusz.kocur@wum.edu.pl](mailto:arkadiusz.kocur@wum.edu.pl)

Otrzymany 18.05.2020, zaakceptowany 14.12.2020, zamieszczony 30.12.2020

### STRESZCZENIE

Dehydrogenaza inozynomonofosforanowa (IMPDH) pełni kluczową rolę w syntezie i metabolizmie nukleotydów purynowych w szlaku *de novo*, szczególnie w komórkach limfocytów typu B i T. Wyróżniamy dwie izoformy tego enzymu (IMPDH I i IMPDH II) kodowane przez różne geny, zlokalizowane na dwóch różnych chromosomach, przy czym druga izoforma dominuje w szybko proliferujących komórkach limfocytarnych. Z tego powodu kliniczne znaczenie tego enzymu jest istotne zarówno w terapii immunosupresyjnej, jak i przeciwnowotworowej. Szeroko stosowane w przeszczepieniowych schematach lekowych preparaty zawierające w swoim składzie mykofenolany (ester morfolinoetylowy oraz sól sodową kwasu mykofenolowego) są silnymi, niekompetycyjnymi i odwracalnymi inhibitorami IMPDH. Zauważono, że terapia tego typu preparatami wymaga monitorowania ich stężenia we krwi ze względu na wąski przedział terapeutycznych stężeń ich aktywnego metabolitu – kwasu mykofenolowego. Przedmiotem poniższego przeglądu literaturowego są metody oznaczania aktywności IMPDH, której to poziomy posiadają korelację z wartościami stężenia kwasu mykofenolowego w osoczu krwi w ramach modelu PK/PD (farmakokinetyczno-farmakodynamicznego). W pracy dokonano porównania metod opracowanych w okresie ostatnich 25 lat pod kątem ich użyteczności oraz szybkości wykonania oznaczenia w laboratorium diagnostycznym. Szczególną uwagę poświęcono metodom wykorzystującym analizę chromatograficzną, ze względu na jej specyficzność i uznanie jej za „złoty standard” w pomiarze aktywności omawianego biomarkera.

**SŁOWA KLUCZOWE:** IMPDH, chromatografia HPLC, terapia immunosupresyjna, kwas mykofenolowy, model PK/PD.

### ABSTRACT

USE OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR INOSINE DEHYDROGENASE ACTIVITY DETERMINATION (IMPDH) IN IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) plays a key role in the *de novo* pathway synthesis and metabolism of the purine nucleotides, especially in the B and T lymphocyte cells. There are two isoforms of this enzyme (IMPDH I and IMPDH II) encoded by different genes, located on two different chromosomes. The IMPDH II isoform is dominant over the IMPDH I in rapidly proliferating lymphocytic cells. For that reason, the clinical significance of IMPDH is most important according to the immunosuppressive and anticancer therapy. The widely used immunosuppressant agents in post-transplantation therapy are mycophenolates (morpholinoethyl ester of mycophenolic acid and mycophenolate sodium) which are strong, non-competitive and reversible inhibitors of IMPDH. It should be noted that concentration of that agents must be monitored in the blood, due to narrow therapeutic range. The following literature review presents methods which may be used in determination of IMPDH activity and should be associated with the PK/PD (pharmacokinetic-pharmacodynamic) models. The work compares the methods developed over the last 25 years in terms of their usefulness and speed of performance for the determination in diagnostic laboratory. Special attention has been paid using chromatographic methods due to its specificity and recognizing it as “gold standard” in measurement of IMPDH activity as biomarkers.

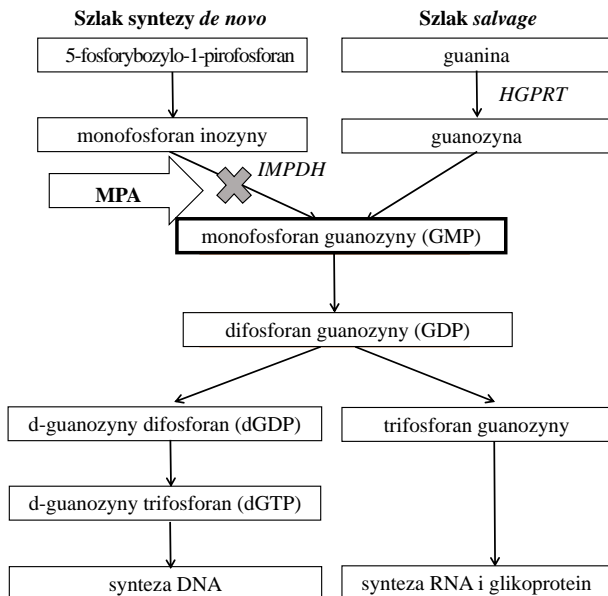
**KEYWORDS:** IMPDH, HPLC, immunosuppressive therapy, mycophenolic acid, PK/PD-model.

### 1. Wstęp

Dehydrogenaza inozynomonofosforanowa (*EC 1.1.1.205*, IMPDH) jest enzymem powszechnie występującym w komórkach silnie proliferujących, również w tych zmienionych nowotworowo. Enzym ten jest odpowiedzialny za syntezę nukleotydów purynowych w szlaku *de novo*, szczególnie w komórkach limfocytów typu B i T. Limfocyty tego typu, w przeciwieństwie do innych komórek, są wysoce zależne od tego

procesu, ponieważ nie mogą wykorzystywać innych, alternatywnych szlaków ratunkowych służących do syntezy nukleotydów, takich jak np. szlak *salvage*. Szlak ten alternatywnie wykorzystuje przemianę guaniny do guanozyny przy pomocy fosforybozylotransferazy hipoksantynowo - guaninowej (HGPRT) [1-3]. Na poziomie molekularnym IMPDH jest katalizatorem reakcji utleniania polegającej na wprowadzaniu atomu tlenu z cząsteczki wody do pierścienia purynowego

monofosforanu inozyny (IMP), w wyniku czego powstaje monofosforan ksantozyny. Reakcji tej towarzyszy reakcja redukcji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego ( $\text{NAD}^+$ ) do jego zredukowanej formy, czyli NADH [2,4]. Jedną z szerzej poznanych cząsteczek powodujących inhibicję IMPDH jest kwas mykofenolowy (MPA) (ryc. 1) [3].



Ryc. 1. Schematyczne ujęcie szlaków syntezy nukleotydów: *de novo* i ratunkowego *salvage* [3].

Kwas mykofenolowy (MPA) jest jedną z najczęściej stosowanych substancji aktywnie czynnych w aktualnie obowiązujących schematach immunosupresyjnych w transplantologii. Obecnie w leczeniu stosuje się pro-leki: ester MPA, czyli mykofenolan mofetylu (MMF) lub sól sodową MPA (EC-MPS). Po doustnym podaniu, a następnie wchłonięciu do krwioobiegu dochodzi do hydrolizy pro-leków pod wpływem esteraż i uwolnienia MPA. Na poziomie molekularnym jest on selektywnym, niekompetycyjnym i odwracalnym inhibitorem IMPDH, ponieważ wiąże się z jego kofaktorem, czyli  $\text{NAD}^+$ . To z kolei uniemożliwia przekształcenie monofosforanu inozyny (IMP) przez monofosforan ksantozyny (XMP) do monofosforanu guanozyny (GMP) (ryc. 1). W konsekwencji tych przemian biochemicznych namnażanie i czynność limfocytów T zostaje zahamowana [3,4]. Dodatkowo ograniczona jest chemotaksja, adhezja, migracja i tworzenie komórek w czasie odpowiedzi immunologicznej, a całość tych procesów składa się na osiągnięcie oczekiwanej immunosupresji podczas terapii preparatami uwalniającymi kwas mykofenolowy [3,4].

W organizmie człowieka występują dwie izoformy (IMPDH I i IMPDH II), kodowane przez dwa różne geny, zlokalizowane na różnych chromosomach, odpowiednio: siódmym i trzecim. Pierwszą izoformę tego enzymu znaleźć można w różnych komórkach, również limfocytach, które są celem terapii immunosupresyjnej. Drugi typ enzymu występuje w komórkach stymulowanych do namnażania – w aktywowanych limfocytach izoforma II IMPDH przeważa nad izoformą I [5-7]. Obydwie izoformy charakteryzują się podobnym powinowactwem do substratów, a także kinetyką katalizowanych reakcji, w tym podobną  $K_m$  (stała Michaelisa-Menten). Należy zaznaczyć jednak, że IMPDH typu II jest od 3,9 do 5,0-krotnie bardziej wrażliwa na kwas mykofenolowy niż forma

I, a ogólna aktywność IMPDH podczas terapii ulega zmniejszeniu w limfocytach, a zwiększeniu w czerwonych krwinkach. Dodatkowo, zaobserwowano, że w przypadku limfocytów, ekspresja mRNA nie zmienia się nawet po długotrwałej ekspozycji na MPA [7].

## 2. Celowość pomiaru aktywności IMPDH w terapii immunosupresyjnej

Pomiar aktywności IMPDH pozwala na optymalizację leczenia immunosupresyjnego za pomocą preparatów zawierających MPA, gdyż enzym ten jest uważany coraz częściej jako potencjalny biomarker farmakodynamiczny ekspozycji na MPA. Oznaczenie jego aktywności pozwala na skuteczniejszą farmakoterapię, a w konsekwencji pozwala na uzyskanie lepszego efektu klinicznego. Badania wykazały, że pomiar aktywności IMPDH przed rozpoczęciem terapii immunosupresyjnej z użyciem MMF, w pierwszym miesiącu, po pół roku i po roku, może być niezwykle użytecznym narzędziem w optymalizacji dawkowania leku. Dodatkowo, ze względu na dużą zmienność osobniczą i odmiany polimorficzne tego enzymu, wynik pomiaru aktywności IMPDH (wraz z oznaczonym stężeniem MPA we krwi) może stanowić użyteczne narzędzie do obserwacji adherencji pacjenta i dobraniu zindywidualizowanego schematu dawkowania leku [6,7,8].

Jak donoszą wytyczne KDIGO (ang. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) i potwierdza to szereg badań, pomiar stężenia MPA we krwi zgodnie z przyjętymi procedurami w terapii monitorowanej stężeniem leku (ang. *Therapeutic Drug Monitoring, TDM*) jest w dalszym ciągu kwestionowany przez niektórych badaczy. W szczególności ze względu na słabą korelację parametrów farmakokinetycznych, a mianowicie  $C_0$  z całkowitym AUC (pole powierzchni pod krzywą stężenie leku we krwi-czas), co w konsekwencji może dawać sprzeczne wyniki [8,9]. Podczas stosowania MPA w terapii immunosupresyjnej monitorowanie losów tego leku jest istotne, ponieważ takie działanie pozwala na zminimalizowanie liczby epizodów ostrego odrzucenia przeszczepionego narządu [9,10]. W związku z tym, zindywidualizowany pomiar aktywności IMPDH wydaje się być dobrą alternatywą, tym bardziej, że maksimum hamowania tego enzymu dobrze koreluje ze stężeniem maksymalnym MPA we krwi ( $C_{max}$ ) [10]. Dodatkowo pomimo występowania dwóch izoform tego enzymu (IMPDH I i II) i dużej zmienności międzyosobniczej, IMPDH wykazuje niewielką zmienność wewnątrzosobniczą, nawet po przewlekłej ekspozycji na MPA [8,10]. Oznacza to, że pod wpływem MPA nie dochodzi do zmian na poziomie molekularnym w ekspresji genów kodujących ten enzym [9,10]. Obserwacje kliniczne prowadzone przez szereg lat mówią jednoznacznie, że obniżony poziom IMPDH u biorców może powodować konieczność obniżenia podawanej dawki MMF ze względu na szereg działań niepożądanych. Z drugiej strony ostre i przewlekłe odrzucenie przeszczepionego narządu obserwowano u pacjentów z osobniczo zwiększoną aktywnością IMPDH, co jednoznacznie wymusza potrzebę podwyższenia stosowanej dawki leku [9,10].

## 3. Podział metod oznaczania aktywności IMPDH

Po raz pierwszy IMPDH zidentyfikowano w 1957 roku jako enzym w komórkach bakterii szczepu *Aerobacter aerogenes*. Przy użyciu znakowanych radioizotopowo wzorców ksantyn, Magasanik i in. dzięki zastosowaniu rozdzielania elektroforetycznego i badania gęstości optycznej, odkryli kluczową rolę

tego enzymu w konwersji IMP, poprzez XMP, do GMP. Jednocześnie ustalono także, że jony amonowe i potasowe stymulują działanie IMPDH, co zostało wykorzystane w późniejszych pracach nad badaniem aktywności tego enzymu w komórkach organizmów wyższych [11].

Kolejno opracowane na przestrzeni pół wieku metody pomiaru aktywności IMPDH można podzielić na radiochemiczne, instrumentalne oraz te wywodzące się z genetyki molekularnej. Wśród metod instrumentalnych największą popularnością cieszą się metody chromatograficzne, szczególnie wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), ze względu na relatywnie uproszczoną procedurę, szybkość i łatwą dostępność sprzętu w laboratoriach diagnostycznych. Dlatego w niniejszym opracowaniu to właśnie metodom chromatograficznym poświęcono szczególną uwagę.

#### 4. Metody radiochemiczne

Opracowanie nowych metod tego typu było wymuszone przez fakt, iż metoda opracowana przez Magasanik'a i in. nie była przydatna w badaniu poziomu aktywności IMPDH w komórkach zwierzęcych [11]. W testach tych wykorzystywano radioizotopowe substancje wzorcowe w celu radiochemicznego pomiaru aktywności IMPDH. Oparty był on na rozdziale powstałego XMP od znakowanego IMP metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i badaniu intensywności radioaktywnej plam powstałych po rozdzielaniu chromatograficznym. Mieszanina buforowa zastosowana do reakcji enzymatycznej przeprowadzanej podczas tego badania zawierała również, oprócz buforu Tris i jonów potasowych,  $\text{NAD}^+$  i znakowany izotopowo monofosforan inozyliny ( $^{14}\text{C}$ -IMP). Kolejne zespoły badawcze przeprowadziły optymalizację powyższej metody. Proffitt i in. poprzez modyfikację składników mieszaniny inkubacyjnej do reakcji *in vitro* umożliwili prowadzenie pomiaru aktywności IMPDH w supernatantach tkanek [12]. Dodatkowo zaobserwowali liniową zależność stężenia wytworzonego XMP od czasu trwania reakcji enzymatycznej.

Kolejne modyfikacje dokonywane w metodach analitycznych poprawiły czułość metody i przyspieszyły czas analizy. I tak w 1985 roku Ikegami i in. zamienili metodę rozdziału TLC na elektroforezę [13]. Prace nad testami tego typu dodatkowo przyczyniły się do poprawienia metod przygotowania materiału biologicznego. Jak już wspomniano, pierwsze metody radiochemiczne były ograniczone do badania homogenatów narządów, co uniemożliwiało użycie tych metod w praktyce klinicznej. Kolejne modyfikacje wprowadzane przez badaczy umożliwiły pomiar aktywności IMPDH we krwi pochodzącej od pacjenta, oczywiście po odpowiednio przeprowadzanej izolacji konkretnych komórek spośród których pierwszymi były eryocyty. Na początku lat 90. XX wieku zespół Balzarini'ego i in. opracował stosunkowo prosty i szybki test radiochemiczny pozwalający na bezpośredni pomiar aktywności IMPDH w limfocytach krwi obwodowej. Początkowo, po wprowadzeniu do leczenia MMF, był on stosowany w monitorowaniu poziomu immunosupresji po podaniu pierwszej dawki leku [14].

Mimo tego, że metody radiochemiczne są w stanie w sposób dość czuły i specyficzny wykryć produkty reakcji enzymatycznej m. in. we krwi, w obecności różnych substancji pochodzenia biologicznego, są one uważane za zbyt skomplikowane i drogie. Niemniej jednak, badania nad metodami tego typu przyczyniły się do stworzenia nowych testów opartych na chromatografii czy genetyce molekularnej.

#### 5. Metody spektrofotometryczne

Opracowane kolejno metody spektrofotometryczne, pomimo tego, że nie oparte ściśle na pomiarze radioaktywności, nie okazały się dokładniejsze, a wręcz przeciwnie – aby uzyskać dokładny wynik pobrane próbki materiału biologicznego musiały mieć dużą objętość. Niemniej jednak opracowanie tych metod przyczyniło się do potwierdzenia, że bufor do inkubacji materiału biologicznego powinien być wzbogacony w sól potasową o odpowiednim stężeniu, ponieważ jony  $\text{K}^+$  stymulują enzym IMPDH bezpośrednio wchodząc z nim w interakcję. W związku z brakiem możliwości pobierania dużych ilości materiału biologicznego, chociażby ze względów etycznych, zaniechano dalszego rozwoju tych testów na rzecz metod rozdzielczych [15].

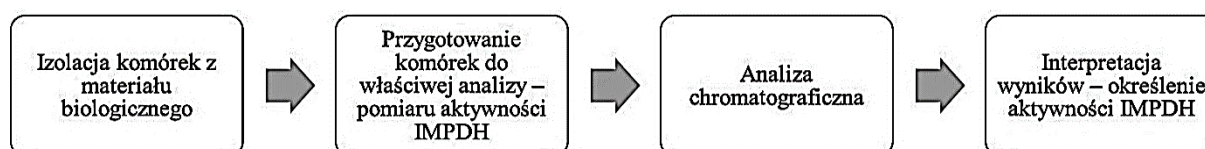
#### 6. Metody chromatograficzne

Przełomowe badania Montero i in. z 1995, doprowadziły do opracowania czulszego nieradioaktywnego testu opartego na analizie chromatograficznej HPLC. Badania te zbiegły się w czasie z wprowadzeniem na rynek pierwszego, oryginalnego preparatu zawierającego MPA w postaci estru (MMF), o nazwie *CellCept*<sup>®</sup> firmy Roche [16].

Każda z dotąd opisanych i zwalidowanych metod pomiaru aktywności IMPDH, opartego na HPLC, składała się z czterech głównych, kolejno po sobie następujących i powiązanych etapów (ryc. 2.), które zostały dokładniej omówione w dalszej części tekstu.

##### 6.1. Izolacja komórek z materiału biologicznego

Najczęściej wykorzystywanym do pomiaru aktywności IMPDH materiałem biologicznym są limfocyty uzyskiwane z krwi pełnej. Tylko metoda opracowana przez zespół Montero i in. zakłada wykorzystanie erytrocytów do reakcji enzymatycznej *in vitro*. Nie jest to najlepszy materiał do analizy, ponieważ pomimo stosunkowo łatwej izolacji komórki te mogą sztucznie podnosić aktywność IMPDH [16]. Dość dobrą metodą dla najczęściej izolowanych limfocytów (w podanych opracowaniach), jest wirowanie w gradiencie gęstości, z wykorzystaniem odpowiedniego odczynnika - najczęściej jest to *Ficoll Paque*<sup>®</sup>. Pozwala on na specyficzną izolację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMK), które są ściśle powiązane z immunosupresją [18]. Innym, specyficznym rodzajem izolacji jest metoda z użyciem ku lek paramagnetycznych pokrytych przeciwciałami, przedstawiona przez Vethego i in. w dwóch publikacjach [18,19].



Ryc. 2. Etapy składowe pełnej analizy chromatograficznej i pomiaru aktywności IMPDH [16,17].

Metoda ta pozwala na izolację komórek limfocytów T poprzez łączenie się z glikoproteiną CD4 znajdującą się na powierzchni tych komórek. Zastępuje ona na szczególną uwagę, ze względu na dobrą wydajność izolacji i niewielkie ryzyko zniszczenia komórek, z drugiej strony jest to wciąż metoda bardzo kosztowna [19]

## 6.2. Reakcja enzymatyczna

Jest to najistotniejsza część całego pomiaru aktywności IMPDH ze względu na to, że produkt tej reakcji w każdym przypadku będzie analizowany w kolejnym etapie za pomocą metod chromatograficznych.

W każdej zestawionej w tym przeglądzie metodzie bufor do inkubacji zawiera substrat do reakcji enzymatycznej – IMP, przenośniki wodorów uczestniczące w reakcji –  $\text{NAD}^+$ . W większości metod bufor inkubacyjny wzbogacano solą potasową – jak już wcześniej wspomniano jony te są istotne z punktu widzenia działania enzymu [15]. W części opracowań roztwór zawierał również PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem) albo buforujący układ soli fosforanowych ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ), który pozwala na utrzymanie określonego, stałego pH w trakcie inkubacji komórek. Dodatek EDTA w metodach opracowanych przez Albrechta i in. oraz Vethego i in. wiąże jony, które mogłyby spowolnić reakcję enzymatyczną, działając jako inhibitor w ramach modulacji allosterycznej [18-20]. Dodanie zaś buforu TRIS w ww. metodach pozwala na zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych i wstępną lizę komórek. Warto dodać, że bufor ten stosowany jest wymiennie z PBS i układem soli fosforanowych ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ). Jedynie w metodzie opracowanej przez Albrechta i in. do buforu dodano również allopurinol celem uniknięcia niepożądanego procesu utlenienia nukleotydów ksantynowych (XMP) [20].

Istotnym parametrem mającym wpływ na ilość i jakość wytworzonego podczas reakcji enzymatycznej produktu jest czas trwania procesu i temperatura układu reakcyjnego. Dobierając warunki prowadzenia reakcji z udziałem enzymów należy pamiętać, aby temperatura panująca podczas inkubacji nie była zbyt wysoka, ze względu na fakt, że enzymy są substancjami białkowymi mogącymi ulegać denaturacji. Każdy enzym charakteryzuje się optymalną temperaturą, w której jego aktywność jest największa. W przypadku IMPDH wszystkie opracowane jak dotąd metody zakładają stosowanie temperatury  $37^\circ\text{C}$ , co zapewnia odpowiednią korelację warunków *in vivo* i *in vitro* [16,20-28]. Większość badaczy prowadziła reakcję enzymatyczną przez 2 lub 2,5 godziny, pozwalającą osiągnąć najwyższą efektywność tego procesu, a pik chromatograficzny odpowiadający analitowi miał największą powierzchnię. Jedynie Beringer i in. zastosowali w swojej metodzie o wiele dłuższy, bo aż 24-godzinny czas inkubacji. Ze względów oczywistych taki okres czasu nie może być zastosowany w warunkach laboratoryjnych. Jak udowodniono w badaniach przeprowadzonych przez Glander i in. czas 120/150 min jest najbardziej optymalny dla reakcji enzymatycznych tego typu [5,21,22].

Reakcja enzymatyczna wymaga zakończenia w odpowiednim punkcie czasowym, identycznym dla każdej próbki. W związku z tym, do terminacji tej reakcji używa się odczynników strącających białka, które jednocześnie nie mogą powodować degradacji analitu. Najpopularniejszym w analizowanych metodach postępowania odczynnikiem tego typu jest kwas nadchlorowy w odpowiednim stężeniu [19-22,26]. Należy jednak pamiętać, że użycie odczynników silnie zmieniających pH próbki analitycznej wymaga dodania odczyn-

nika neutralizującego nadmiar kwasowej lub zasadowej substancji. Najczęściej stosowany był węglan potasu lub roztwory wodne innych soli wykazujących zasadowy charakter. W metodach opracowanych przez Laverdiere'a i in., Liu i in. oraz Weißbarth'a i in., gdzie do zakończenia reakcji enzymatycznej wykorzystywano acetonitryl czy metanol, nie jest konieczne dodawanie substancji neutralizujących ze względu na to, że te rozpuszczalniki organiczne nie powodują zmian pH po dodaniu do analizowanej próbki [24,27,28].

Należy również pamiętać o tym, że do przeprowadzania reakcji enzymatycznej konieczne jest uzyskanie lizatu komórkowego. Żeby komórki mogły pękać i uwalniać zawartość wewnątrzkomórkową, część badaczy stosowała ultradźwięki, inni zaś poddawali komórki głębokiemu mrożeniu w temperaturze minimum  $-20^\circ\text{C}$  [21-27]. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej otrzymany supernatant może zostać bezpośrednio poddany oznaczeniu chromatograficznemu.

## 6.3. Analiza chromatograficzna

Metody chromatograficzne są dość popularne w monitorowaniu leków we krwi, stąd szczególną uwagę poświęcono właśnie ich roli w oznaczaniu aktywności IMPDH. Podczas analizy tego typu analitem jest zawsze produkt reakcji enzymatycznej, tj. XMP oraz niekiedy AMP, ale tylko w przypadku, gdy jest stosowany jako czynnik normalizujący aktywność enzymu (patrz rozdział 6.4).

W analizowanych publikacjach wykorzystywano chromatografię jonowymienną (LC-IE), wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z detekcją spektrofotometryczną w świetle UV lub z wykorzystaniem detektora diodowego (DAD). Najczęściej stosowano detekcję spektrofotometryczną przy określonej, charakterystycznej dla analitu długości fali (tabela 2.) [15,19-25,27]. Wykorzystanie detektora diodowego umożliwiło przeprowadzenie jednoczesnego oznaczenia przy co najmniej dwóch różnych wartościach analitycznej długości fali, co może być niezwykle korzystne przy jednoczesnym oznaczaniu XMP i AMP [25]. Najnowsze metody zakładają użycie detektora masowego (MS/MS), co pozwala nie tylko na znaczące skrócenie czasu analizy, ale również zwiększa czułość samej metody analitycznej [17-18,24,26,28]. Duże znaczenie w przypadku tego rodzaju detekcji mają tzw. przejścia MRM (ang. *Multiple Reaction Monitoring*, tryb monitorowania reakcji następczych), które pozwalają na potwierdzenie tożsamości i oznaczenie stężenia danego analitu za pomocą detekcji MS. W przypadku oznaczeń tego typu wybierano następujące przejścia MRM służące oznaczeniu analitów:  $365,1 > 97,2$  dla XMP oraz  $348,1 > 136,2$  dla AMP [24,26,28].

Obecnie, w oznaczeniach ilościowych w trakcie których wykorzystywana jest detekcja MS, zaleca się korzystanie ze stabilnych substancji wzorcowych i standardów wewnętrznych (IS, ang. *internal standard*) znakowanych izotopowo. Głównym celem ich stosowania jest kompensacja efektów matrycowych, które są znaczącym problemem analitycznym w oznaczeniach tego typu. W piśmiennictwie omawianym w pracy, stosowany był znakowany izotopowo wzorzec XMP ( $[^{13}\text{C}_{10}\text{-XMP}]$ ) oraz wzorzec AMP ( $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_5\text{-AMP}]$ ), a anality były oznaczane przy następujących przejściach MRM:  $365,1 > 97,1$  (XMP),  $348,1 > 136,1$  (AMP),  $375,2 > 102,1$  ( $[^{13}\text{C}_{10}\text{-XMP}]$ ),  $363,2 > 146,1$  ( $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_5\text{-AMP}]$ ) [24, 26, 28]. Jednakże nie we wszystkich metodach korzystających z tego rodzaju detekcji zastosowano tego typu substancje wzorcowe. Stosowano zarówno czyste wzorce XMP i AMP, jak również ich

analogi strukturalne, np. cząsteczkę AMP podstawioną w pozycji 8 atomem bromu (Br-AMP, przejście MRM: 428,0 > 216,0) [25]. W metodach wykorzystujących klasyczną detekcję spektrofotometryczną w świetle UV stosowano klasyczne substancje wzorcowe, bez znakowanych izotopowo atomów w cząsteczce substancji wzorcowych [16,20-23,27].

Najpopularniejszą wykorzystywaną fazą stacjonarną w kolumnie chromatograficznej było wypełnienie oktadecylolilowe (C<sub>18</sub>). Rzadko stosowane były kolumny z niemodyfikowanym żelom krzemionkowym oraz w przypadku badania Beringera i in. ze złożem modyfikowanym grupami aminowymi [25]. W przypadku metod opartych o chromatografię jonowymienną (LC-IEC, ang. *ion-exchange liquid chromatography*), stosowane są fazy stacjonarne z kationitami lub anionitami, czyli tzw. wymiennicami jonowymi.

W przypadku wykorzystywanych faz ruchomych, można zauważyć, że często podczas oznaczenia były stosowane przynajmniej dwie różne fazy ruchome. Świadczy to o prowadzeniu oznaczenia z wykorzystaniem tzw. elucji gradientowej. Elucja izokratyczna została zaś wykorzystana w części metod prowadzonych w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z detekcją w świetle UV. Jak się okazuje, w jednej z najbardziej aktualnych prac, ten rodzaj elucji pozwolił na uzyskanie zadowalających wyników oznaczeń [27].

Dodatek do fazy ruchomej tzw. modyfikatorów, czyli substancji zmieniających pH, często znacząco poprawia wygląd piku chromatograficznego. Najczęściej stosowanym modyfikatorem w przypadku metod opartych o detekcję masową był octan amonu, niekiedy z dodatkiem kwasu mrówkowego [17-18,24,26]. Wykorzystanie LC-IEC wymaga zaś dobrania takiego składu fazy ruchomej, przy której cząsteczka analitu będzie zjonizowana, a sam proces rozdzielania przy użyciu wymienniczy jonowych będzie zachodził w sposób efektywny.

Szeregując metody chromatograficzne pomiaru aktywności IMPDH w kolejności chronologicznej, można zauważyć tendencję polegającą na skracaniu czasu analizy. W sposób oczywisty najkrótsze czasy analizy dotyczą metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrem mas ze względu na bardzo wysoką czułość tego detektora w porównaniu do innych typów detektorów. Podobną tendencję obserwuje się dla objętości nstrzyku analizowanego roztworu, od kilkudziesięciu mikrolitrów w metodach z wykorzystaniem detekcji UV, po nawet 1 µL w najczulszych metodach z wykorzystaniem detekcji MS [17-18,24-26,28].

#### 6.4. Interpretacja wyników i sposób wyrażania aktywności enzymu

Istnieją trzy, powszechnie akceptowane możliwości normalizacji aktywności enzymu. Jedną z nich zakłada odniesienie aktywności enzymu do liczby komórek PBMC poddanych analizie, druga zaś polega na odniesieniu aktywności enzymu do zawartości białka w lizacie komórek PBMC. Obie metody postępowania wymagają opracowania dodatkowej metodyki postępowania z analizowanym materiałem biologicznym. Natomiast trzecia metoda zakłada dodatkowe oznaczenie stężenia AMP w próbce i uznanie go za czynnik normalizujący. W tym przypadku konieczne są więc opracowanie i walidacja dodatkowej metody analitycznej pozwalającej na oznaczenie AMP w próbce, bądź takie dobranie warunków analizy chromatograficznej, by oznaczenie AMP i XMP obok siebie było możliwe. Aktywność enzymatyczna w każdym przypadku jest wyliczana jako stosunek liczby moli wyprodukowanego XMP w czasie reakcji enzymatycznej *in vitro* w ciągu jednostki czasu, na gram białka, 10<sup>6</sup> komórek

PBMC, lub na 1 mol oznaczonego AMP, w zależności od obranego czynnika normalizującego [16,18,21].

Tradycyjny sposób wyrażania aktywności enzymów zakłada powiązanie jej z ilością białka oznaczoną w danej próbce. Wymaga to jednak opracowania dodatkowej metodyki postępowania z próbą lizatu komórkowego. Najprostszy do przeprowadzenia jest spektrofotometryczny pomiar absorbancji w świetle UV, przy analitycznej długości fali równej 280 nm. Inne możliwe do przeprowadzenia metody to: reakcja z odczynnikiem *Coomasie Blue*<sup>®</sup> (a następnie pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 595 nm), test białkowy z kwasem bitychtoninowym, czy reakcja biuretowa, w której wykorzystuje się tworzenie przez białka barwnych związków kompleksowych ze związkami miedzi(II). W ostatnim przypadku, w obecności TRIS w buforze inkubacyjnym, niemożliwe jest wykorzystanie tej metody ze względu na prawdopodobieństwo uzyskania fałszywych wyników [29]. Dodatkowym ograniczeniem zastosowania tego czynnika normalizującego jest możliwość uzyskania błędnych wyników oznaczeń spektrofotometrycznych zawartości białka ze względu na potencjalne czynniki interferujące znajdujące się w badanej próbce lizatu komórkowego. Zanieczyszczenie próbki erytrocytami może się przełożyć na zwiększoną zawartość białka w próbce, co w konsekwencji może przełożyć się na obniżoną aktywność IMPDH. Nawet starannie dobrana metoda izolacji PBMC nie zapewni uzyskania supernatantu wolnego od białka pochodzącego spoza komórek PBMC poddanych lizie. Wpływ na wartość aktywności enzymatycznej ma również czas przechowywania krwi pełnej po pobraniu od pacjenta. Dłuższy czas przechowywania sprzyja agregacji erytrocytów z limfocytami, co w konsekwencji może powodować zwiększoną dekontaminację lizatu komórkowego erytrocytami [22].

Wynik aktywności enzymatycznej uzyskany podczas normalizacji wyników w stosunku do ilości wyizolowanych komórek PBMC wyrażany jest jako liczba moli XMP wytworzona w ciągu sekundy na gram białka (co jest równoważne katal/g białka).

W przypadku normalizacji wyników w stosunku do ilości wyizolowanych komórek, należy zastosować odpowiednią metodę ich liczenia. Możliwe jest zliczanie pod mikroskopem, po umieszczeniu pelletu komórkowego o określonej objętości w komorze Bürkera, która jest szczególnie przydatna do zliczania komórek w ciekłej zawieszynie. Inną, wygodniejszą metodą jest użycie automatycznego zliczania komórek, gdzie na szkiełku podstawowym z odpowiednią komorą umieszcza się rozcieńczoną wodą zawieszynę komórkową wybarwioną barwnikiem – błękitem trypanu (*Trypan Blue*<sup>®</sup>). Metoda ta pozwala nie tylko na zliczenie całkowitej liczby komórek, ale określenie procentowego udziału komórek martwych [16,21-22]. Ograniczeniem tej metody zliczania jest jednak granica oznaczalności automatycznego licznika komórek. Zbyt mała ilość PBMC w próbce, pomimo możliwości oznaczenia stężenia XMP, nie pozwoli na uzyskanie konkretnej wartości liczby komórek, a w konsekwencji aktywności IMPDH. Głównym ograniczeniem tej metody jest brak powtarzalności w liczbie wyizolowanych komórek z krwi pełnej oraz proces niszczenia komórek, jaki może zachodzić podczas wirowania czy przemywania pelletu komórkowego [21-22]. Pomimo tego, należy zaznaczyć, że metoda ta uwzględnia zmiany w wydajności wyizolowanych komórek, a w konsekwencji pozwala na zindywidualizowane podejście do wyliczenia aktywności enzymu w próbce.



Wynik aktywności enzymatycznej uzyskany podczas normalizacji wyników w stosunku do ilości wyizolowanych komórek PBMC wyrażany jest jako liczba moli XMP wytworzona w ciągu sekundy na  $10^6$  liczby komórek PBMC (co jest równoważne katal/ na  $10^6$  komórek).

W celu zminimalizowania ograniczeń związanych z obecnością związków zewnątrzkomórkowych w próbce lizatu komórkowego, rekomenduje się normalizację aktywności enzymu w stosunku do oznaczonej ilości nukleotydu wewnątrzkomórkowego – AMP [17-18]. Dodatkowo, w odniesieniu do normalizacji aktywności do ilości komórek PBMC, zaletą tej metody jest możliwość oznaczenia zawartości AMP w tej samej próbce, w której oznaczany jest produkt reakcji enzymatycznej, czyli XMP. Istotne są oczywiście warunki przeprowadzenia oznaczenia chromatograficznego, podczas którego należy tak modyfikować skład fazy ruchomej, aby wartości czasów retencji dla obydwu analitów były z jednej strony jak najkrótsze, a piki chromatograficzne odpowiadające AMP i XMP były jak najbardziej od siebie odseparowane na chromatogramie. Potencjalnym ograniczeniem normalizacji tego typu może być zanieczyszczenie próbki erytrocytami, które mogą powodować obniżenie obliczonej wartości aktywności IMPDH ze względu na dodatkową ilość AMP, pochodzącą z czerwonych krwinek [28]. Według Glander i in., odnoszenie aktywności enzymatycznej do AMP jest o tyle korzystne, że stan kliniczny chorego nie ma znaczącego wpływu na oznaczone stężenie tego nukleotydu w próbce, w przeciwieństwie do dość istotnej statystycznie zmienności w ilości oznaczonego białka wśród pacjentów po przeszczepieniu (odpowiednio:  $p = 0,63$  i  $p < 0,001$ ) [21-22]. Wadą tej metody jest konieczność prowadzenia długiej inkubacji komórek PBMC celem uzyskania stabilnej wartości stężenia AMP (minimum 2 godziny) [22]. W tym przypadku aktywność enzymatyczna będzie wyrażana jako liczba moli XMP wytworzona w ciągu sekundy na 1 mol wykrytego AMP (co jest równoważne katal/ mol AMP).

Część zespołów badawczych, których publikacje zostały przytoczone w niniejszym przeglądzie, normalizowała aktywność IMPDH w stosunku do zawartości hemoglobiny w próbce [25]. Należy zaznaczyć, że ten sposób wyrażania aktywności enzymu nie jest rekomendowany, podobnie jak procentowa (%) aktywność enzymu [28].

Wyliczając aktywność enzymu, oprócz czasu i jednostki normalizującej, uwzględnia się ilość wytworzonego w czasie reakcji enzymatycznej produktu. Najczęściej uwzględnia się tu liczbę moli lub stężenie XMP, rzadziej stosunek XMP do AMP.

W tabeli w dalszej części tekstu (tabela 1 i 2) dokonano klasyfikacji omawianych metod z uwzględnieniem ich najważniejszych, różnicujących cech, charakterystycznych dla poszczególnych parametrów [15,17-28].

## 7. Metody genetyczne (biologii molekularnej)

Stosując łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) można określić ekspresję genów odpowiedzialnych za kodowanie IMPDH w odniesieniu do mRNA. Jest to względnie łatwiejsza do przeprowadzenia, ale dłuższa trwająca analiza aktywności enzymu. Dodatkowo, tylko dzięki tej metodzie można określić równoległe poziomy ekspresji obydwu izoform IMPDH (typu I i II) [29].

Zwiększona ekspresja genów oznacza zwiększoną aktywność IMPDH oraz większą proliferację i namnażanie się komórek. Oznacza to konieczność modyfikacji dawek leku ze względu na możliwość wystąpienia ostrego odrzucenia prze-

szczepionego narządu. Z drugiej strony zmniejszona ekspresja genów oznacza obniżoną aktywność IMPDH, co może powodować konieczność zmniejszenia dawki MMF w celu uniknięcia toksycznych skutków działania leku [30].

Udowodniono, że izolowany materiał genetyczny może mieć wpływ na uzyskany wynik reakcji PCR (najistotniejsze różnice obserwowano pomiędzy analizami komórek: CD4+ i PBMC). Innym czynnikiem mogącym mieć wpływ na wynik analizy uzyskany metodami biologii molekularnej jest stosowanie w terapii immunosupresyjnej glikokortykosteroidów [29,30].

Wydaje się, że oznaczenie aktywności IMPDH może mieć największe znaczenie kliniczne przed rozpoczęciem podawania MMF czy EC-MPS. Pozwoli ono bowiem dobrać w sposób właściwy odpowiednią dawkę mykofenolanu. Mimo to, że wynik takiej analizy jest względnie jednoznaczny i uwzględnia zmienność międzypersonalną w aktywności IMPDH, to obecnie nie ma większego znaczenia diagnostycznego. Wynika to z trudności w ustaleniu algorytmów populacyjnych oraz nielicznych badań kohortowych, szczególnie w populacji pediatrycznej. Na ekspresję genu kodującego IMPDH, a w konsekwencji na jej aktywność, ma wpływ szereg czynników, począwszy od chorób współistniejących, po płeć, rasę i wiek [1-4,30]. Sugerowane są wieloosrodkowe badania populacyjne, które pozwolą na ustalenie modelu PK-PD, uwzględniającego zmienność zarówno farmakokinetyki mykofenolanów, jak i aktywności międzypersonalnej IMPDH. Analiza chromatograficzna w ramach takiego modelu, pozwala z jednej strony na oznaczenie stężenia wolnego, jak i całkowitego MPA, z drugiej zaś aktywności IMPDH, z tej samej próbki krwi, za pomocą różnych metod analitycznych. Metody genetyczne pozwalają określić jedynie poziom ekspresji genu kodującego IMPDH, w związku z tym przydatne mogą być do oznaczenia początkowej aktywności enzymu przed podaniem pierwszej dawki leku [30,31].

## 8. Podsumowanie

IMPDH jest specyficznym biomarkerem, którego ocena aktywności optymalizuje terapię prowadzoną z użyciem preparatów uwalniających MPA w ustroju, (MMF, ES-MPS) szeroko stosowanych w schematach immunosupresyjnych podczas terapii przeciwdrzuceniowej. Leki te charakteryzują się wąskim przedziałem terapeutycznych stężeń, co oznacza, że ich losy i stężenie we krwi muszą być ściśle monitorowane.

Obecnie w diagnostyce laboratoryjnej pomiar aktywności IMPDH nie jest rutynowo wykonywany, niemniej istnieje konieczność wprowadzenia oznaczeń tego typu do praktyki klinicznej. Warto dodać, że z metodami oceny farmakodynamicznej stosowanego produktu leczniczego wiąże się obecnie duże nadzieje, ponieważ optymalny przedział terapeutyczny dla MPA nie został jeszcze do końca ustalony. Wynika to przede wszystkim z niedoskonałości farmakokinetycznego monitorowania tego leku w organizmie.

Przedstawione w niniejszej pracy metody chromatograficzne, które opisują pomiar aktywności IMPDH, charakteryzują się podobnymi punktami krytycznymi, a przegląd tych metod pozwala na krytyczną ocenę różnic między nimi. Istotnym elementem składowym jest wybór materiału biologicznego, który zostanie poddany analizie. Z jednej strony łatwiejsze w izolacji z krwi pełnej pozostają erytrocyty niż limfocyty, których metodyka izolacji jest droższa i wiąże się

Tabela 1. Przegląd metod enzymatycznych stosowanych w pomiarze aktywności IMPDH.

Autor, rok publikacji	Montero i in. (1995) [16]	Griesmacher i in. (1997) [20]	Albrecht i in. (2000) [19]	Glander i in. (2001) [21]	Daxecker i in. (2002) [23]	Vethe i in. (2006) [17]	Glander i in. (2009) [22]	Laverdiere i in. (2012) [24]	Vethe i in. (2014) [18]	Beringer i in. (2017) [25]	Kawanishi i in. (2007) [26]	Liu i in. (2018) [27]	Weißbarth i in. (2020) [28]
<b>Sposób izolacji i przygotowania komórek do analizy</b>													
Materiał biologiczny	erytrocyty	limfocyty	krew pełna	PBMC	PBMC	T/CD4+	PBMC	PBMC	T/CD4+	krew pełna	PBMC	PBMC	PBMC
Izolacja komórek	wirowanie	wirowanie	wirowanie	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradient gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości	metoda gradientu gęstości
<b>Właściwy pomiar aktywności IMPDH (reakcja enzymatyczna)</b>													
Skład buforu do inkubacji	1 mM IMP, 0,5 mM NAD <sup>+</sup> , 100 mM KCl, 40 mM PBS	80 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 200 mM KCl, 500 mM NAD <sup>+</sup> , 1000 mM IMP	0,25 mM IMP, 0,25 mM NAD <sup>+</sup> , 3,0 mM EDTA, 0,058 mM allopurinol, 0,1 mM TRIS	1 mM IMP, 0,5 mM NAD <sup>+</sup> , 100 mM KCl, 40mM buforu fosforanowego	0,273 mM IMP, 0,273 mM NAD <sup>+</sup> , 200 mM KCl, 40mM buforu fosforanowego	1,79 mM IMP, 0,38 mM NAD <sup>+</sup> , 3,0 mM EDTA, 0,058 mM allopurinol, 0,1 mM TRIS	1 mM IMP, 0,5 mM NAD <sup>+</sup> , 100 mM KCl, 40mM buforu fosforanowego	40 mM PBS, 100 mM KCl, po 0.25 mM IMP i NAD <sup>+</sup>	TRIS/HCl 250 mM, EDTA 7.5 mM KCl 250 mM DTT 5.0 mM	50 mM IMP, 3 mM NAD <sup>+</sup> , 5 mM DTT, 2 mM KCl, 1 mM TRIS/HCl	1,6 mM buforu fosforanowego 3,9 mM KCl, 1,2 mM IMP, 0,6 mM NAD <sup>+</sup>	40 mM PBS i 100mM KCl (pH = 7,4) + testowano różne ilości NAD <sup>+</sup> i IMP	40 mM buforu fosforanowego i 100 mM KCl (pH = 7,4)
Sposób zakończenia inkubacji	40% CCl <sub>3</sub> COOH	kwask nadchlorowy	kwask nadchlorowy	kwask nadchlorowy	kwask nadchlorowy	kwask nadchlorowy	kwask nadchlorowy	metanol	kwask nadchlorowy	temperatura 120°C, 3 min.	kwask nadchlorowy	acetonitryl	metanol
Czas i temperatura inkubacji [min, °C]	120 37	90/150 37	30/60 37	150 37	120 37	120 37	150 37	150 37	120 37	24h 37	150 37	120 37	150 37
Odczynnik neutralizujący	eter dietylowy pH > 5,0	węglan potasu	1h ogrzewania 100°C, KOH pH 2-3	węglan potasu	3 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH > 7,2	1 h ogrzewania 100°C, KOH pH 2-3	węglan potasu	-----	węglan potasu	-----	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-----	-----
Jednostka aktywności enzymu	pmol/h/mg białka	pmol/h/10 <sup>6</sup> komórek	nmol/min/mL komórek	nmol/h/mg białka	pmol/h/10 <sup>6</sup> komórek	pmol/h/10 <sup>6</sup> komórek	nmol/h/mol AMP	μmol/s/mol	pmol/10 <sup>6</sup> komórek/min	nmol/g Hb/h	μmol/s/mol	μmol/s/mol	% aktywności

Tabela 2. Przegląd metod chromatograficznych służących do pomiaru aktywności IMPDH.

Autor, rok publikacji	Montero i in. (1995) [16]	Griesmacher i in. (1997) [20]	Albrecht i in. (2000) [19]	Glander i in. (2001) [21]	Daxecker i in. (2002) [23]	Vethe i in. (2006) [17]	Glander i in. (2009) [22]	Laverdiere i in. (2012) [24]	Vethe i in. (2014) [18]	Beringer i in. (2017) [25]	Kawanishi i in. (2017) [26]	Liu i in. (2018) [27]	Weißbarth i in. (2020) [28]	
<b>Właściwy pomiar aktywności IMPDH (analiza chromatograficzna)</b>														
Metoda analityczna	LC-IEX	RP-HPLC	RP-HPLC	LC-IEX	LC-IEX	RP-HPLC	RP-HPLC	LC-MS/MS	LC-MS/MS	HPLC-DAD	LC-MS/MS	RP-HPLC	LC-MS/MS	
Rodzaj kolumny i jej parametry	ODS2 Hypersil® (125 x 4,6 mm, 3 µm)	CNU-010® (b/d)	C <sub>18</sub> Nucleosil® (150 x 4,6 mm, 5µm)	ODS AQ Pron-tosil® (250 x 3,1 mm, 5µm)	LiChroCART Superspher® (250 x 4,0 mm)	C <sub>18</sub> Nucleosil® (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ChromSpher C <sub>18</sub> ® (150 x 4,6 mm; 3 µm)	Gemini C <sub>18</sub> ® (100 mm x 4,6 mm, 3 µm)	Waters Atlantis C <sub>18</sub> ® (150 x 2,1 mm, 3 µ)	Luna NH <sub>2</sub> ® (150 x 4,6 mm; 3 µ)	Gemini C <sub>18</sub> ® (150 mm x 2 mm, 3 µm)	C18-WP® (4,6 x 150 mm, 3 µm)	Hypersil Gold® (50 x 2,1 mm, 1,9 µm)	
Faza ruchoma	skład fazy	A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + TBAS; B: modyfikacja fazy A z MeOH (70:30)	A: 0.015 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; B: 0.5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 3,45)	MeOH: woda (4:96) doprowadzony za pomocą H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> do pH 1,80	4% MeOH w 96% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 7 mmol/L TBAS (pH = 5,50)	MgSO <sub>4</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + TEA (pH = 6,40)	MeOH: woda (4:96) (pH = 1,80)	6% MeOH w 94% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 7 mmol/L TBAS (pH = 5,50)	A: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> w H <sub>2</sub> O B: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> w MeOH C: 100% MeOH	A: HCOOH w ACN B: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> w wodzie	bufor zawierający KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 6,20)	woda (A) i metanol (B) zawierające HCOOH i CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	15:85 (v/v) metanol: bufor (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , TBAS pH=5,60)	A: HCOONH <sub>4</sub> w H <sub>2</sub> O B: HCOONH <sub>4</sub> w MeOH
	rodzaj elucji	gradientowa (0-11 min, 10-25% B, 12-21 min 100% B)	gradientowa (0-4,5 min, 10-50% B; 4,5-5,0 min 100% B, 5,0-5,5 min 100-10%)	izokratyczna	izokratyczna	izokratyczna	izokratyczna	izokratyczna	gradientowa (b/d)	gradientowa	izokratyczna	gradientowa (0-4,5 min, 10-50% B; 4,5-5,0 min 100% B, 5,0-5,5 min 100-10%)	izokratyczna	gradientowa (0,1-0,8 min, 15-85% A; 0,8-1,1 min 85% A)
	szybkość przepływu [ml/min]	1,00	1,20	1,00	0,70	1,00	1,00	1,00	0,90	0,15	1,00	0,20	1,00	0,35
Użyta detekcja	UV/VIS (λ = 254 nm i 280 nm)	brak danych	UV/VIS (λ = 260 nm)	UV/VIS (λ = 254 nm)	UV/VIS (λ = 254 nm)	UV/VIS (λ = 260 nm)	UV/VIS (λ = 256 nm)	MS/MS	MS/MS	DAD (λ = 250 nm i 274 nm)	MS/MS	UV/VIS (λ = 256 nm)	MS/MS	
Typ jonizacji (MS)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ESI+	ESI+	-----	ESI+	-----	ESI+	
Temperatura kolumny [°C]	pokojowa	pokojowa	pokojowa	45	22	pokojowa	40	brak danych	brak danych	pokojowa	40	35	30	
Czas analizy [min]	21	33	25	35	54	20	5	4	8	15	< 9	15	2	



z koniecznością wirowania w gradiencie gęstości. Z drugiej strony dużą wadą metod opartych na izolacji erytrocytów jest fakt, że komórki te mogą cechować się zwiększoną aktywnością IMPDH w czasie długotrwałej terapii za pomocą MMF. Dodatkowo celem terapii immunosupresyjnej jest zmniejszenie aktywności i ilości limfocytów, w związku z tym to izolacja tych komórek wydaje się być bardziej uzasadniona. Równie ważna jest ilość materiału biologicznego koniecznego do pomiaru aktywności IMPDH. Z. Zarówno ze względów etycznych, jak i analitycznych dąży się, aby objętość pobieranej krwi była jak najmniejsza.

Ważnym etapem jest również odpowiednia korelacja warunków inkubacji *ex vivo* z warunkami *in vivo*. Niezaprzecalnie, optymalną temperaturą do prowadzenia inkubacji w warunkach *in vitro* jest 37°C. Dodatkowo bufor do inkubacji powinien zostać wzbogacony w jony K<sup>+</sup>, ponieważ IMPDH jest zależna od jonów potasowych, a także w NAD<sup>+</sup> i IMP. Odpowiednio dobrany odczynnik kończący proces inkubacji nie jest bez znaczenia. Po pierwsze nie może powodować on degradacji analitu (najczęściej XMP czy AMP), po drugie nie może on powodować zbyt dużych zmian pH próbki. W przypadku użycia kwasowych czy zasadowych odczynników odbiałczających wymuszających zakończenie reakcji enzymatycznej, należy dobrać odpowiedni odczynnik neutralizujący. Uzyskany po reakcji supernatant należy poddać analizie chromatograficznej.

W przedstawionym przeglądzie literaturowym, wszystkie analizowane metody zostały poddane pełnej walidacji, dodatkowo po ich uszeregowaniu chronologicznym zauważyć można oczywistą tendencję polegającą na osiągnięciu jak najkrótszego czasu analizy. Metoda HPLC-MS/MS zapewniła szybki czas analizy (nawet do dwóch minut), jednocześnie będąc niezwykle czułą i specyficzną techniką analityczną.

Ważnym etapem analizy jest odpowiednie przedstawienie wyników przeprowadzonych pomiarów. Aktywność enzymu można odnieść (znormalizować) w stosunku do ilości zużytej krwi, ilości białka czy hemoglobiny w analizowanej próbce. Należy przy tym pamiętać o dodatkowej walidacji metod oznaczania ilości hemoglobiny czy białka w tej samej próbce materiału biologicznego. Czasochłonnym procesem jest również zliczanie komórek, ponieważ procedura ta wymaga dodatkowego sprzętu i postępowania z materiałem biologicznym. Dobrą alternatywą wydaje się normalizacja aktywności IMPDH w stosunku do ilości dodatkowo oznaczonego w trakcie analizy AMP. W tabeli 2. można zauważyć, że jednostki aktywności enzymu nie są ujednolicone dla wszystkich opracowanych dotąd metod. Fakt ten generuje potrzebę ujednolicenia jednostki w przyszłości, tak aby dane pochodzące z badań z różnych ośrodków, można było z łatwością porównać.

Główną zaletą oznaczania aktywności IMPDH jest zmniejszenie ryzyka przewlekłego i ostrego odrzucania przeszczepu do minimum, szczególnie w pierwszych tygodniach po zabiegu. Wynik analityczny jest szczególnie cenny dla transplantologów, którzy w odpowiedni sposób mogą dobrać zarówno inicjującą, jak i podtrzymującą dawkę leku. Przykładowo: wysoka osobnicza aktywność IMPDH, pomimo stężenia MPA utrzymującego się w przedziale terapeutycznych stężeń, sugeruje konieczność zwiększenia dawki leku celem osiągnięcia odpowiedniej inhibicji enzymu.

Z drugiej strony, główną wadą przeprowadzania oznaczeń tego typu jest ich czasochłonność i dość duży stopień trudności, gdyż sama procedura analityczna jest wieloeta-

powa. Dodatkowo, nie bez znaczenia jest fakt, że zindywidualizowany pomiar aktywności IMPDH może mieć sens tylko w połączeniu z oznaczeniem parametrów farmakokinetycznych, a więc w tzw. modelu PK/PD.

Podsumowując, konieczne jest nie tylko przeprowadzenie wielośrodkowych, randomizowanych badań pacjentów po przeszczepieniu narządowym celem sprawdzenia osobniczej aktywności IMPDH, ale również wybranie optymalnych i uniwersalnych warunków analitycznych tego pomiaru. Jak rekomendują autorzy Konsensusu Barcelońskiego z 2016 roku, dotyczącego biomarkerów, należy dobrać takie techniki analityczne, które będzie można odtworzyć w standardowym laboratorium diagnostycznym, mającym doświadczenie w oznaczaniu leków immunosupresyjnych [30]. Takie działanie pozwoli na jeszcze bardziej korzystne dla zdrowia i życia biorcy prowadzenie terapii immunosupresyjnej za pomocą dostępnych preparatów zawierających pochodne kwasu mykofenolowego.

## 9. Wykaz skrótów

ACN	acetonitril (ang. <i>acetonitrile</i> )
AMP	monofosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine monophosphate</i> )
AUC	pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (ang. <i>area under the curve</i> )
Br-AMP	monofosforan 8-bromo-5'adenozyiny (ang. <i>8-bromo-adenosine-5'-monophosphate</i> )
C <sub>0</sub>	stężenie początkowe (ang. <i>initial concentration</i> )
CD4+	limfocyty CD4+ (ang. <i>CD4+ lymphocytes</i> )
C <sub>max</sub>	stężenie maksymalne (ang. <i>maximum concentration</i> )
C <sub>min</sub>	stężenie minimalne (ang. <i>minimum concentration</i> )
DAD	detektor diodowy (ang. <i>diode-array detector</i> )
EC-MPS	mykofenolan sodu (ang. <i>enteric-coated sodium mycophenolate</i> )
EDTA	kwas (etylenodiamino)tetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ESI	jonizacja typu elektrosprej (ang. <i>electrospray ionization</i> )
GMP	monofosforan guanozyiny (ang. <i>guanosine monophosphate</i> )
HGPRT	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa (ang. <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> )
IMP	monofosforan inozyiny (ang. <i>inosine monophosphate</i> )
IMPDH	dehydrogenaza inozynomonofosforanowa (ang. <i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i> )
LC-IEC	chromatografia jonowymienna (ang. <i>ion-exchanged liquid chromatography</i> )
MMF	mykofenolan mofetylu (ang. <i>mycophenolate mofetil</i> )
MPA	kwas mykofenolowy (ang. <i>mycophenolic acid</i> )
MRM	tryb monitorowania reakcji następczych (ang. <i>multiple reaction monitoring</i> )
MS/MS	detektor spektrometrii mas z podwójnym kwadrupolem (ang. <i>tandem mass spectrometry</i> )
NAD <sup>+</sup>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PK/PD	model farmakokinetyczno-farmakodynamiczny (ang. <i>pharmacokinetics-pharmacodynamic model</i> )

PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )	in intact human CEM lymphocytes, <i>Biochemical Journal</i> , 1992, 287(3): 785-790.
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i> )	15. Shimura K., Okada M., Shiraki H., Nakagawa H.: IMP dehydrogenase-Studies on regulatory properties of crude tissue extracts based on an improved assay method, <i>The Journal of Biochemistry</i> , 1983, 94(5): 1595-1603.
t <sub>max</sub>	czas, po którym zostało osiągnięte stężenie maksymalne (ang. <i>the time taken to reach the maximum concentration</i> )	16. Montero C., Duley J. A., Fairbanks L. D., McBride M. B., Micheli V., Cant A. J., Morgan G.: Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high-performance liquid chromatography linked method, <i>Clinica Chimica Acta</i> , 1995, 238(2): 169-178.
t <sub>0,5</sub>	biologiczny okres potowicznego rozpadu (ang. <i>biological half-time</i> )	17. Vethe N. T., Bremer S., Rootwelt H., Bergan S.: Pharmacodynamics of mycophenolic acid in CD4+ cells: a single-dose study of IMPDH and purine nucleotide responses in healthy individuals. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , 2008, 30(6): 647-655.
TBAS	sól fizjologiczna buforowana TRIS (ang. <i>TRIS-buffered saline</i> )	18. Vethe N. T., Ali A. M., Reine P. A., Andersen A. M., Bremer S., Line P. D., Bergan S.: Simultaneous quantification of IMPDH activity and purine bases in lymphocytes using LC-MS/MS: assessment of biomarker responses to mycophenolic acid. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , 2014, 36(1): 108-118.
TEA	trietyloamina (ang. <i>triethylamine</i> )	19. Albrecht W., Storck M., Pfetsch E., Martin W., Abendroth D.: Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , 2002, 22(3): 283-294.
TDM	terapia monitorowana stężeniem leku (ang. <i>therapeutic drug monitoring</i> )	20. Griesmacher A., Weigel G., Seebacher G., Müller, M. M.: IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. <i>Clinical Chemistry</i> , 1997, 43(12): 2312-2317.
TRIS	bufor Tris (trometamina) (ang. <i>TRIS buffer (tromethamine)</i> )	21. Glander P., Braun K. P., Hambach P., Bauer S., Mai I., Roots I., Budde K.: Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. <i>Clinical Biochemistry</i> , 2001, 34(7): 543-549.
UV/VIS	detektor spektrofotometryczny (w świetle ultrafioletowym i widzialnym) (ang. <i>ultraviolet/visible detector</i> )	22. Glander P., Sombogaard F., Budde K., van Gelder T., Hambach P., Liefeldt L., Mathot R. A.: Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , 2009, 31(3): 351-359.
XMP	monofosforan ksantozyny (ang. <i>xanthosine monophosphate</i> )	23. Daxecker H., Raab M., Müller M. M.: Influence of mycophenolic acid on inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells. <i>Clinica Chimica Acta</i> , 2002, 318(1-2): 71-77.

## 10. Bibliografia

- Sollinger H.W.: Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients- U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group, *Transplantation*, 1995, 60(3): 225-232.
- Allison A. C., Elsie M.E.: Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action, *Immunopharmacology*, 2000, 47.2-3: 85-118.
- Hedstrom L.: IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition, *Chemical Reviews*, 2009, 109(7): 2903-28.
- Jain J., Almquist S. J., Ford P. J., Shlyakhter D., Wang Y., Nimmesgern E., Germann U.: Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67(4): 767-776.
- Sombogaard F., Peeters A. M., Baan C. C., Mathot R. A., Quaedackers M. E., Vulto A. G., Weimar W., van Gelder T.: Inosine monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression is correlated to clinical outcomes in mycophenolate mofetil-treated kidney transplant patients, whereas inosine monophosphate dehydrogenase activity is not, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2009, 31(5): 549-556.
- Budde K., Glander P., Bauer S., Braun K., Waiser J., Fritsche L., Neumayer, H. H.: Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clinical Chemistry and Medicine Laboratory*, 2000, 38(11): 1213-1216.
- Carr S. F., Papp E., Wu J. C., Natsumeda, Y.: Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(36): 27286-27290.
- Oellerich M., Barten M. J., Armstrong V. W.: Biomarkers- The Link Between Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacodynamics, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2006, 28:35-38.
- Kellum J. A., Lameire N., Aspelin P., Barsoum R. S., Burdman E. A., Goldstein S. L., Herzog C. A., Joannidis M., Kribben A., Levey A. S., MacLeod A. M., Mehta R. L., Murray P. T., Naicker S., Opal S. M., Schaefer F., Schetz M., Uchino S.: Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury, *Kidney International Supplements*, 2012, 2(1): 1-138.
- Raggi M. C., Siebert S. B., Steimer W.: Customized Mycophenolate dosing based on measuring inosine-monophosphate dehydrogenase activity significantly improves patients' outcomes after renal transplantation, *Transplantation*, 2010, 90: 1536-1541.
- Magasanik B., Moyed H. S., Gehring L. B.: Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine- inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*, *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 339-350.
- Proffitt R. T., Pathak V. K., Villacorte D. G., Present, C. A.: Sensitive radiochemical assay for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and determination of activity in murine tumor and tissue extracts, *Cancer Research*, 1983, 43(4): 1620-1623.
- Ikegami T., Natsumeda Y., Weber G.: Direct assay method for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity, *Analytical biochemistry*, 1985, 150(1): 155-160.
- Balzarini J., De Clercq E.: Assay method for monitoring the inhibitory effects of antimetabolites on the activity of inosinate dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes, *Biochemical Journal*, 1992, 287(3): 785-790.
- Shimura K., Okada M., Shiraki H., Nakagawa H.: IMP dehydrogenase-Studies on regulatory properties of crude tissue extracts based on an improved assay method, *The Journal of Biochemistry*, 1983, 94(5): 1595-1603.
- Montero C., Duley J. A., Fairbanks L. D., McBride M. B., Micheli V., Cant A. J., Morgan G.: Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high-performance liquid chromatography linked method, *Clinica Chimica Acta*, 1995, 238(2): 169-178.
- Vethe N. T., Bremer S., Rootwelt H., Bergan S.: Pharmacodynamics of mycophenolic acid in CD4+ cells: a single-dose study of IMPDH and purine nucleotide responses in healthy individuals. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2008, 30(6): 647-655.
- Vethe N. T., Ali A. M., Reine P. A., Andersen A. M., Bremer S., Line P. D., Bergan S.: Simultaneous quantification of IMPDH activity and purine bases in lymphocytes using LC-MS/MS: assessment of biomarker responses to mycophenolic acid. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2014, 36(1): 108-118.
- Albrecht W., Storck M., Pfetsch E., Martin W., Abendroth D.: Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2002, 22(3): 283-294.
- Griesmacher A., Weigel G., Seebacher G., Müller, M. M.: IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. *Clinical Chemistry*, 1997, 43(12): 2312-2317.
- Glander P., Braun K. P., Hambach P., Bauer S., Mai I., Roots I., Budde K.: Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clinical Biochemistry*, 2001, 34(7): 543-549.
- Glander P., Sombogaard F., Budde K., van Gelder T., Hambach P., Liefeldt L., Mathot R. A.: Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2009, 31(3): 351-359.
- Daxecker H., Raab M., Müller M. M.: Influence of mycophenolic acid on inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 318(1-2): 71-77.
- Laverdiere I., Caron P., Couture F., Guillemette C., Lévesque E.: Liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry-based assay to evaluate inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells from stem cell transplant recipients. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(1): 216-223.
- Beringer A., Citterio-Quentin A., Otero R. O., Gustin C., Clarke R., Salvi J. P., Bouliou R.: Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in red blood cells of thiopurine-treated patients using HPLC. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1044: 194-199.
- Kawanishi M., Yano I., Yoshimura K., Yamamoto T., Hashi S., Masuda S., Matsubara, K.: Sensitive and validated LC-MS/MS methods to evaluate mycophenolic acid pharmacokinetics and pharmacodynamics in hematopoietic stem cell transplant patients. *Biomedical Chromatography*, 2015, 29(9): 1309-1316.
- Liu F., Xu L., Sheng C., Qiu X., Zhang M., Jiao, Z.: Optimization and application of an HPLC method for quantification of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity as a pharmacodynamic biomarker of mycophenolic acid in Chinese renal transplant patients. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 485: 333-339.
- Weißbarth G., Wiesen M. H., Fietz C., Streichert T., Ehren R., Weber L. T., Müller C.: Pharmacodynamic monitoring of Mycophenolic acid therapy: improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measuring inosin-5'-monophosphate dehydrogenase activity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2020, 42(2): 282-288.
- Spector, T.: Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for  $\leq 0.5$  to 50  $\mu\text{g}$  of protein. *Analytical Biochemistry*, 1978, 86(1): 42-146.
- Sombogaard F., Peeters A. M., Baan C. C., Mathot R. A., Quaedackers M. E., Vulto A. G., van Gelder T.: Inosine monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression is correlated to clinical outcomes in mycophenolate mofetil-treated kidney transplant patients, whereas inosine monophosphate dehydrogenase activity is not. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2009, 31(5): 549-556.
- Brunet M., Shipkova M., van Gelder T., Wieland E., Sommerer C., Budde K., Haufroid V., Christians U., López-Hoyos M., Barten M., Bergan S., Picard N., Millán L., Marquet P., Hesselink D., Noceti O., Pawinski T., Wallemacq P., Oellerich, M.: Barcelona Consensus on Biomarker-Based Immunosuppressive Drugs Management in Solid Organ Transplantation, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2016, 38(2): 1-20.