

## BÖBREK TRANSPLANTASYONU YAPILAN HASTALARDA CYCLOSPORİN-A DÜZEYLERİNİN İKİ DEĞİŞİK METOD İLE KARŞILAŞTIRILMASI

### COMPARISON OF TWO DIFFERENT METHODS OF CYCLOSPORIN-A MEASUREMENTS IN RENAL TRANSPLANT SUBJECTS

Gülây Sönmez, Hayriye Şentürk, Mahmut Carin

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD. Çapa- İSTANBUL

#### ÖZET

Çalışmada transplantasyon sonrası takipleri yapılan hastalar arasında oluşturulan gruplarda tam kanda FPIA monoklonal CsA ve EMIT Cyclosporin Assay karşılaştırmaları yapıldı. Böbrek transplantasyonu yapılmış 33 hastanın yaşları 15-57 arasındaydı. Tam kan ile yapılan çalışmalara ek olarak altı hastanın transplantasyon sonrası ilk 60 günlük sürede FPIA TDx CsA serum düzeyleri ölçüldü. Üç ay ile yedi yıllık dönem içinde durumlarında değişiklik gözlenmeyen hastalardan seçilen ikinci grupta ise tek doz Neoral kullanımı sonrası alınan kanlarda FPIA monoklonal CsA ve EMIT Cyclosporin Assay testleri yapıldı ve sonuçların ortalama değerleri karşılaştırıldı. Sonuçta ilk gruptaki hasta sayısı yetersiz olmasına rağmen, alınan doz ile EMIT Cyc Assay sonuçlarının, alınan doz ile FPIA monoklonal CsA ve FPIA TDx CsA serum sonuçlarından daha uyumlu olduğu gözlemlendi. Diğer grupta ise poliklinik takibinde olan hastalarda alınan doz ile EMIT Cyc Assay arasında  $r=0.43$  ( $p<0.01$ ), alınan doz ile FPIA monoklonal CsA arasında  $r=0.34$  ( $p<0.03$ ) ve EMIT Cyc Assay-FPIA monoklonal CsA arasında  $r=0.92$  ( $p<0.001$ ) olarak bulundu.

**Anahtar kelimeler:** Transplantasyon, immunsupresyon, FPIA, EMIT

#### SUMMARY

In this study, FPIA monoclonal CsA and EMIT Cyc Assays of whole blood were compared among a group of early transplanted patients. Thirty-three subjects who underwent renal transplantation were of age between 15-57. In addition to the whole blood assays, FPIA TDx CsA serum level was also measured in only six of the patients during the first 60 days of posttransplantation. In other patients whose transplant age was between three months and seven years had only FPIA monoclonal CsA and EMIT Cyc Assay done after taking their single dose of Neoral, which was stabilized during the study. The mean values of the results were compared. Although we did not have sufficient number of subjects in the first group EMIT Cyc Assay results were more compatible than FPIA monoclonal CsA and FPIA TDx CsA. The analysis of EMIT Cyc Assay in the other group of patients, who were taking the same dosage of Neoral resulted in  $r=0.43$  ( $p<0.01$ ), where as FPIA monoclonal CsA resulted in  $r=0.34$  ( $p<0.03$ ). The comparison of the two tests results in  $r=0.92$  ( $p<0.001$ ).

**Key words:** Transplantation, immunsupresion, FPIA, EMIT

#### GİRİŞ

Organ ve doku nakli yapılan hastalarda nakil sonrası grafitin atılımının engellenmesinde immunsupresif tedavi önemli bir yer tutmaktadır. Hastaların metabolik faaliyetlerinin farklılıklar göstermesi nedeni ile yapılan tedavilerde hastaya özel

reçeteler uygulanmaktadır. Kullanılan immunsupresanın, özellikle cyclosporinin kan düzeyinin ayarlanması grafitin ömrünü etkilemektedir. Yüksek düzeyler renal disfonksiyona neden olmakta, düşük düzeyler greft kaybı ve rejeksiyon riskini arttırmaktadır. Posttransplant hastaları takip eden kliniklerin Neoral

kullanımına geçmeleri ile hastalarda daha az doz kullanılmaya ve daha az sıklıkla düzey tayini yapılmaya başlanmıştır. Laboratuvarımızda daha önce serum düzeyi ölçülürken, yeni dönemde tam kanda tayin yapılmaya başlanmış ve bu çalışma geçiş döneminde iki ayrı metodun kıyaslanarak, kliniğe daha gerçekçi sonuçların verilebilmesi için planlanmıştır.

## HASTALAR VE YÖNTEM

Böbrek transplantasyonu yapılmış 33 hastanın (24 erkek ve 9 kadın) yaş ortalaması 15 ile 57 arasında bulunmaktaydı. İlk grupta yakın dönemde transplante olmuş altı hastanın ilk 60 gün içinde Neoral kullanıldıktan sonra akşam dozlarını takiben 12. saatte iki ml. serum ve iki ml. EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. İkinci grupta seçilen 27 hastanın posttransplant dönemleri üç ay ile yedi yıl arasında değişiyordu. Hastaların bir ay boyunca akşam dozundan 12 saat sonra kan örnekleri iki ml. EDTA'lı tüplere alındı. Çalışmada kullanılan birinci metod serum ve tam kan düzeylerinin ölçülmesinde florescence polarization immunoassay (FPIA) tekniği için ABBOTT kitleri ile ikinci metod ise tam kan düzeylerinin ölçülmesinde enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT) tekniği için BEHRING kitleri kullanıldı. (1)

A) FPIA TDx CsA serum düzeyi tayini : Hastadan alınan kan örneğinden ayrılan 60 µl serum üzerine 160 µl çöktürme solüsyonu ilave edilerek vortekslenir. 9500 rpm'de beş dakika santrifüj edilen ependorf içindeki örneğin süpernatantı karoseldeki tüplere aktarılır. Cihaz açılarak kit tanıtımı yapılır ve çalıştırılır. Her hasta için yaklaşık dört dakika sonunda test tamamlanarak siklosporin ve metabolitlerinin ölçülen değerleri print edilir.

B) FPIA monoclonal CsA tam kan düzeyi tayini: Hastadan EDTA'lı tüplere alınan kandan 150 µl alınarak üzerine 50 µl çöktürme solüsyonu ve 300 µl pake wash ilave edilerek vortekslenir. 9500 rpm'de beş dakika santrifüj edilen ependorf içindeki süpernatant'tan 150 µl alınarak karoseldeki tüplere aktarılır. Cihaz açılarak kit tanıtımı yapılır ve çalıştırılır. Her hasta için yaklaşık dört dakika sonunda test tamamlanarak siklosporin ve metabolitlerinin ölçülen değerleri print edilir.

C) EMIT 2000 Cyc Assay tam kan tayini : Hastadan EDTA'lı tüplere alınan kandan 100 µl üzerine 300 µl çöktürme solüsyonu ilave edilir ve vortekslenir. 13.000 rpm'de beş dakika santrifüj edilen ependorf içindeki süpernatant'tan 100 µl alınıp mavi tüpe aktarılır. COBAS MİRA 2000 cihazı açılarak kit tanıtımı yapılır. Örnek sayısı belirtilerek test başlatılır. Her hasta için iki dakikalık bir süre sonunda ölçülen total siklosporin miktarı print edilir.

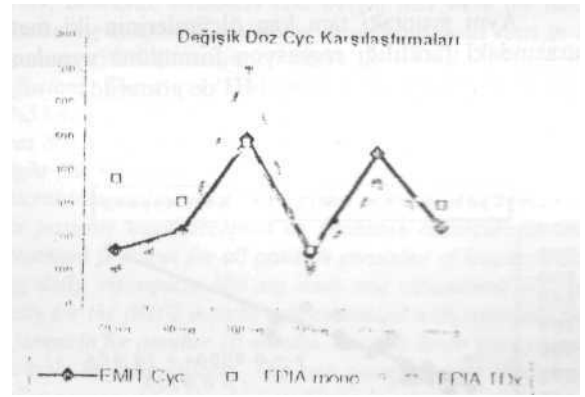
Her üç testin değerleri ng/ml olarak verilir.

## BULGULAR

Birinci gruptaki hastalarda transplantasyon sonrası 60 gün içinde haftada iki kez serum ve tam kan cyclosporin düzeyleri ölçüldü ve elde edilen değerlerin ortalamaları alındı. Elde edilen değerler **Tablo 1'de** ve grafik olarak **Şekil 1'de** gösterildi.

Tablo 1: EMIT Cyc Assay, FPIA monoc. CsA ve FPIA TDx CsA tekniklerinin değişik doz uygulama sonuçlarındaki karşılaştırılması

İlaç dozu	EMIT Cyc Assay ort. ng/ml	FPIA monoc. ort. ng/ml	FPIA TDx CsA ort. ng/ml
50 mg	168	381	105
80 mg	226	314	213
100mg	502	489	703
150 mg	165	172	98
250 mg	463	364	373
300 mg	243	309	252



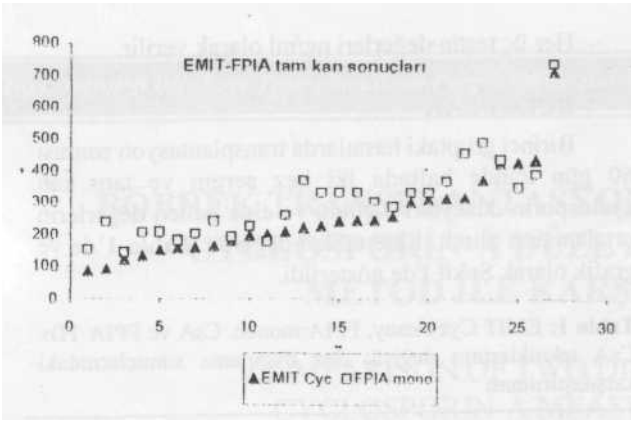
Şekil 1: EMIT Cyc Assay, FPIA monoc. CsA ve FPIA TDx CsA tekniklerinin değişik doz uygulama sonuçlarındaki karşılaştırılması.

EMIT Cyc Assay-FPIA monoclonal CsA arasında  $r=0.70$  ( $p<0.05$ ),

EMIT Cyc Assay-FPIA TDx CsA arasında  $r=0.91$  ( $p<0.005$ ),

FPIA monoclonal CsA- FPIA TDx CsA arasında  $r=0.77$  ( $p<0.03$ ).

İkinci grupta farklı zamanlarda transplantasyon olmuş ve sabit dozlarda Neoral kullanan 27 hasta bir ay boyunca takibe alındı. Bu hastalardan haftada iki gün kan örnekleri alınarak iki ayrı metod kullanılarak siklosporin tam kan sonuçları değerlendirildi. Elde edilen değerler grafik olarak **Şekil H'de** belirtildi.



**Şekil II:** AMİT ve FPIA tam kan sonuçlarının karşılaştırılması.

İkinci grupta çalışılan hastaların kullandıkları doz ile ölçüm yapılan metodlar arasındaki regresyon değerleri hesaplandı.

Alman doz ile EMIT Cyc Assay arasında  $r=0.43$  ( $p<0.01$ ),

Alınan doz ile FPIA monoclonal CsA arasında  $r=0.34$  ( $p<0.03$ ) bulundu.

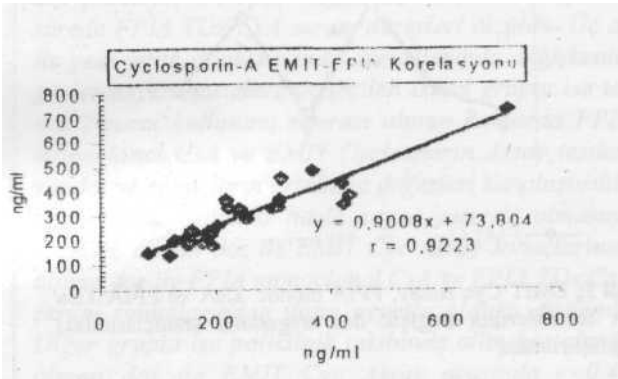
Aynı gruptaki tam kan ölçümlerinin iki metod arasındaki farklılığı regresyon formülüne uygulandı. Karşılaştırmalı sonuçlar **Şekil IH'de** gösterildi.

( $p<0.03$ ) olarak anlamlı bulundu. Aynı tekniğin hem serum hem de tam kan sonuçlarının EMIT ile karşılaştırması yapıldığında ise : EMIT Cyc Assay ile FPIA monoclonal CsA korelasyonu  $r=0.70$  ( $p<0.05$ ) iken, aynı değerlerin FPIA TDX CsA arasındaki korelasyon  $r=0.91$  ( $p<0.005$ ) olarak bulundu. Tam kan ile yapılan çalışmalarda EMIT sonuçlarının yüksek oranda anlamlılık göstermektedir. Erken dönem hastalarda kolay ve hızlı sonuç vermesi, alınan doz ile sonuçların uyumluluk göstermesi nedeni ile EMIT ile çalışmanın FPIA tekniklerine göre avantajlı olduğu gözlenmektedir.

İkinci grup posttransplant sürvileri ve yaş dağılımları değişkenlik gösteren hastalardan oluşmakta ve değişik düzeylerde alınan Neoral sonrası tam kan sonuçları karşılaştırılmaktadır. Genel değerlendirme yapıldığında FPIA monoclonal CsA sonuçları ortalamasının EMIT 'e göre % 25-30 oranında yüksek olduğu gözlenmektedir. Armijo ve ark. yaptıkları karşılaştırmalarda % 28 oranında, Wacke ve ark. ise % 25 oranında yüksek değerler gözlendiğini bildirmektedirler. (2,3) Alınan doz ile EMIT arasında korelasyon  $r=0.43$  ( $p<0.01$ ) iken, alman doz ile FPIA arasındaki korelasyon  $r=0.34$  ( $p<0.03$ ) olarak gözlendiği **Şekil H'de** görülebilmektedir. Her iki metod arasındaki korelasyon ise  $r=0.92$  ( $p<0.001$ ) anlamlı bulunmuştur. Armijo ve ark. yaptıkları çalışmada da iki metod arasındaki korelasyon  $r=0.92$  ( $p<0.001$ ) olarak bildirilmektedir. (2) Morris ve ark. yaptıkları çalışmada korelasyon değerleri  $r=0.99$  ve Wacke ve ark. yaptıkları çalışmada  $r=0.96$  olarak verilmektedir. (3,4)

#### KAYNAKLAR

Gulbis B, Van der Heijden J, Van As H, Thiry P: Whole Blood Cyclosporin Monitoring in Liver and Heart Transplant Patients: Evaluation of the Specificity of a Fluorescence Polarization Immunoassay and an Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique j Pharm. Biomed. Anal 1997;15:957-963.



**Şekil III:** Tam kan siklosporin sonuçlarının korelasyonu

EMIT Cyc Assay- FPIA monoclonal CsA arasında  $y=0.9008x + 73.804$  ve  $r=0.92$  ( $p<0.001$ ) olarak bulundu.

#### TARTIŞMA

Çalışmamızın birinci grubundaki erken dönem posttransplant hastaların 60 günlük takipleri sonucunda ortalama değerlere bakıldığında FPIA tekniği ile çalışıldığında : FPIA TDX CsA sonuçlarının FPIA monoclonal CsA arasındaki korelasyon değeri  $r=0.77$