

## Povzetek

Kronična vnetna črevesna bolezen, ki jo opredelimo kot ponavljajoče vnetje črevesa, se je v zadnjem stoletju razširila v globalno bolezen z naraščajočo pojavnostjo v industrijsko razvitih državah. Sodobni cilj zdravljenja je bolezen brez izrazitih simptomov, zdravljenje pa lahko glede na zahtevnost bolezní poteka v več stopnjah.

Azatioprin, purinski antimetabolit, je imunosupresivno zdravilo, ki se pri zdravljenju kronične vnetne črevesne bolezní uporablja kot samostojno zdravilo, pri težjih oblikah bolezní pa tudi v kombinaciji z biološkimi zdravili iz skupine zaviralcev faktorja tumorske nekroze alfa. Gre za predzdravilo, ki z metabolno pretvorbo prehaja v dve skupini aktivnih metabolitov: 6-tiogvanin nukleotide, nosilce terapevtskega učinka in 6-metilmerkaptopurin nukleotide, ki lahko povzročijo okvaro jeter, njihov terapevtski učinek pa ni dokazan. Za optimalno zdravljenje je priporočeno prilagojeno odmerjanje zdravila glede na koncentracijo aktivnih metabolitov in aktivnost presnovnega encima tiopurin S-metiltransferaze.

Analitika obeh skupin metabolitov je dobro razvita, tradicionalni biološki matrici pa sta polna kri in rdeče krvne celice (ang. *red blood cells* oziroma RBC). Obe matrici zahtevata invaziven odvzem krvi, priprava vzorcev je zaradi narave biološkega materiala zahtevna, stabilnost analitov pa omejena. Alternativno tradicionalnim biološkim matricam predstavljajo posušeni krvni madeži (ang. *dried blood spots* oziroma DBS), pri katerih kapljico krvi vzamemo iz prsta ali pete in jo prenesemo na papirček. Možna je tudi uporaba venske krvi, ki jo na papirček nanese s primerno pipeto.

V raziskovalnem delu smo razvili in validirali metodo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) za kvantitativno določanje metabolitov azatioprina s tehniko posušenih krvnih madežev. Metoda vključuje ekstrakcijo iz 30 µl posušenega krvnega madeža, hidrolizo in kvantitativno določitev vsebnosti 6-tiogvanina in 6-metilmerkaptopurina z metodo LC-MS/MS. Metoda je selektivna, linearna, točna in natančna v območju 50 – 5300 pmol/8×10<sup>8</sup> RBC za 6-tiogvanin in 260 – 5300 pmol/8×10<sup>8</sup> RBC za 6-metilmerkaptopurin. S testom integritete redčenja smo dokazali, da lahko zgornjo mejo koncentracije, pri kateri še določimo točne in zanesljive rezultate, za oba analita premaknemo do 8000 pmol/8×10<sup>8</sup> RBC, s čimer pokrijemo tako terapevtsko območje za 6-tiogvanin kot spodnjo mejo toksičnega območja za 6-metilmerkaptopurin. Absolutni in relativni matrični učinek sta nizka, izkoristek ekstrakcije pa ≥ 80 %. Potrdili smo, da različne vrednosti hematokrita, različni volumni nanosa in odvzem vzorca iz različnih delov krvnega madeža ne vplivajo na točnost in natančnost metode. Oba analita sta v posušeni krvni madeži stabilna vsaj en mesec v temperaturnem območju od -80 do 40 °C. Ustreznost metode smo dodatno potrdili z analizo vzorcev bolnikov. Rezultati naše in referenčne metode so primerljivi in omogočajo sprejemanje enakih odločitev pri odmerjanju zdravil.

Novo razvita metoda je enostavna, zaradi številnih prednosti tehnike posušenih krvnih madežev pa predstavlja pomembno alternativo uveljavljenim metodam za terapevtsko spremljanje koncentracij metabolitov azatioprina.