

**Εφαρμογές της Φασματομετρίας Μάζας
στην Κλινική Χημεία
(προσδιορισμός στεροειδών ορμονών, βιταμίνης D,
μετανεφρινών, φαρμάκων)**

Π. Μουτσάτσου
Κλινικός Βιοχημικός
Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Διευθύντρια Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟ»

Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)

- Αναλυτική τεχνική υψηλής τεχνολογίας η οποία προσδιορίζει **ταυτόχρονα** πολλαπλές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, σε **ένα δείγμα**, με υψηλή **ευαισθησία, ειδικότητα**, και ταχύτητα. Η χρήση της τεχνικής αυτής αυξάνει συνεχώς στα κλινικά εργαστήρια διότι έχει πολλές εφαρμογές τόσο στην διαγνωστική όσο και στην θεραπευτική σε τομείς όπως η κλινική ενδοκρινολογία, νευροψυχιατρική, τοξικολογία, καρδιολογία, παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων κλπ.

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS)



Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)

Με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) μπορούν να προσδιοριστούν περισσότερες από 400 βιοχημικές παράμετροι σε **ορό/πλάσμα, ολικό αίμα, σίελο και ούρα** .

ΕΡΩΤΗΜΑ

Ποιοί λόγοι οδήγησαν στο προσδιορισμό βιοχημικών παραμέτρων με την χρήση της μεθοδολογίας LC-MS/MS ;

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΙ ΣΤΑΘΜΟΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

- Εισαγωγή της τεχνικής των Ανοσοαναλύσεων
- Εισαγωγή της Αυτοματοποίησης/Πληροφορικής
- Εισαγωγή της Χρωματογραφίας/Φασματοσκοπίας Μάζας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΩΝ: ΕΦΙΚΤΗ Η ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ pmol/L

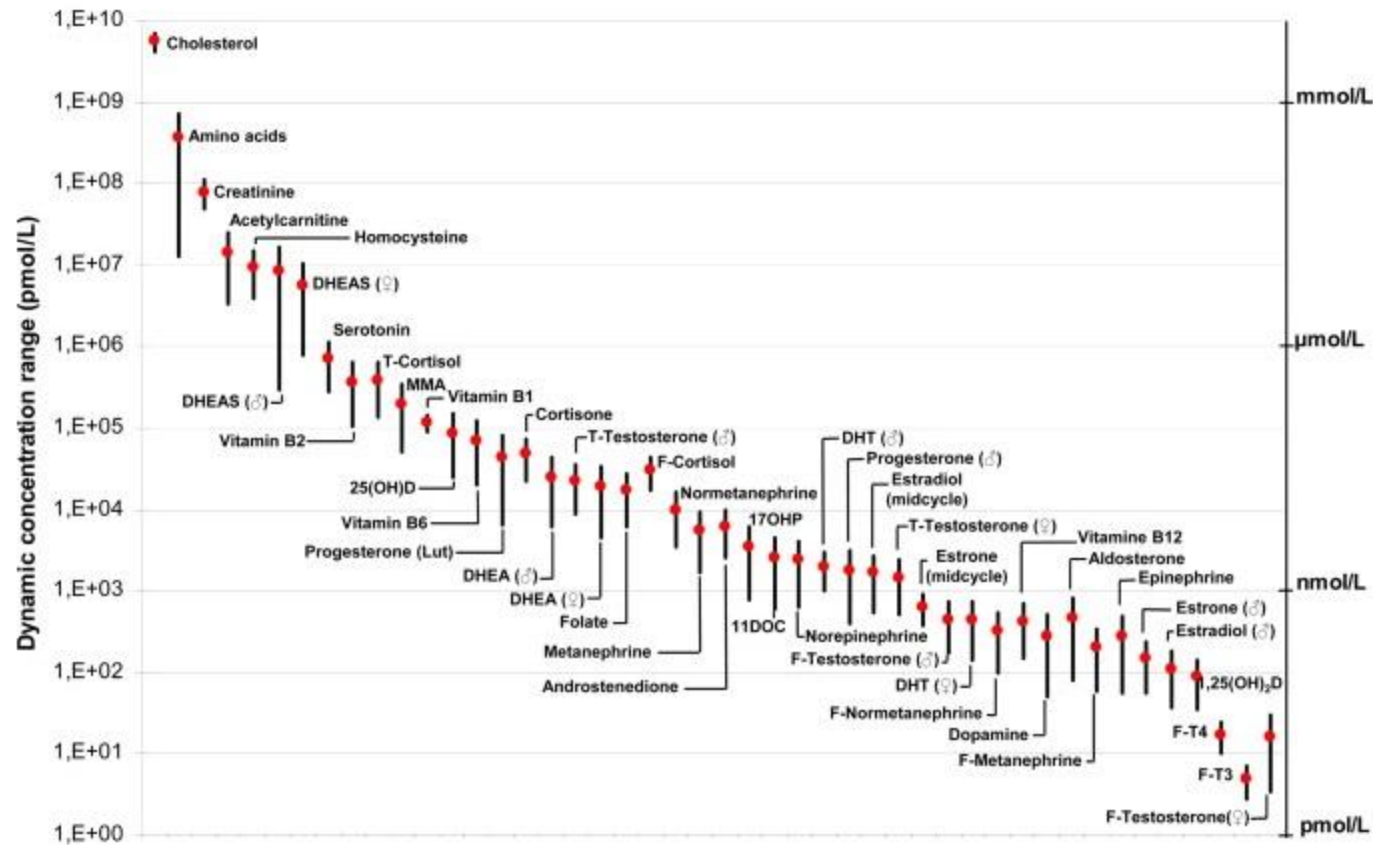


Fig. 1. Dynamic range of LMW biomarkers in human adult serum. Shown are mean and ranges. MMA, methylmalonic acid; DHEA(-S), dehydroepiandrosterone(-sulphate); 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; 17OHP, 17-hydroxyprogesterone; 11-DOC, 11-deoxycortisol; DHT, dihydrotestosterone; 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; T4, thyroxine; T3, triiodothyronine; T, total; F, free; lut, luteal; ♂, male; ♀, female. Adapted from Kushnir et al. [10].

ΟΙ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΘΟΥΝ

- Οι αναλύσεις μετακινούνται από «τα χέρια» του Εργαστηριακού Επιστήμονα (manual αναλύσεις) στις εμπορικές εταιρείες κατασκευής πλήρως αυτοματοποιημένων αναλυτικών συστημάτων και συνοδών αντιδραστηρίων.
- Ριζική αντιμετώπιση της έλλειψης προσωπικού και των πολλών εργαστηριακών λαθών στις «manual» αναλύσεις.
- Η πλήρης αυτοματοποίηση βελτίωσε την **αναπαραγωγικότητα (επαναληψιμότητα)** των αναλύσεων, μείωσε σημαντικά το χρόνο της ανάλυσης, διεκπεραιώνει μεγάλο όγκο δειγμάτων (πολλαπλών αναλύσεων) και οι αναλύσεις εκτελούνται συχνότερα (π.χ. καθημερινά)

Η ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ



Προβλήματα της Αυτοματοποίησης

- Οι προσδιορισμοί κατ' ευθείαν στον ορό (Direct assays) χωρίς προηγούμενο καθαρισμό του δείγματος και απομάκρυνση των πιθανών παρεμβαλλόμενων ουσιών δημιούργησε προβλήματα έλλειψης ειδικότητας σε διάφορες βιοχημικές παραμέτρους όπως στον προσδιορισμό στεροειδών, της βιταμίνης D, των φαρμάκων και διάφορων τοξικολογικών παραμέτρων.
- Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη μεθοδολογιών με υψηλή ειδικότητα όπως είναι η μέθοδος LC-MS/MS.
- Υπάρχουν εμπορικές εταιρείες με έτοιμα διαθέσιμα αντιδραστήρια (kits) , για χρήση σε μεθοδολογία LC-MS/MS, που μπορούν να προσδιορίσουν πολλαπλές παραμέτρους ταυτόχρονα σε ένα δείγμα ασθενούς (Chromsystems, Eureka) με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια. Η διαθεσιμότητα αυτών των αντιδραστηρίων οδήγησε στην αλματώδη εισαγωγή της LC-MS/MS στα κλινικά εργαστήρια.

■

CHROMSYSTEMS

Diagnosics by
HPLC & LC-MS/MS

Η **CHROMSYSTEMS** παρέχει ολοκληρωμένες λύσεις (kit) για τον προσδιορισμό **> 400 ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ** σε ορό/πλάσμα, ολικό αίμα, σίελο και ούρα με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS)



June 2021



ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ



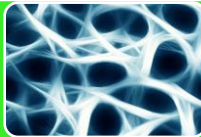
1. Έλεγχος Εξαρτησιογόνων Ουσιών
(Drugs of Abuse Testing)



2. Μεταβολικές Νόσοι και Νεογνικός Έλεγχος
(Metabolic Diseases and Newborn Screening)



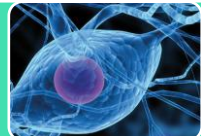
3. Στεροειδή
(Steroids)



4. Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης
(Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)



5. Προφίλ Βιταμινών: B1, B6, MMA
(Vitamin Profiling: B1, B6, MMA)



6. Βιογενείς αμίνες
(Biogenic Amines)



7. Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων
(Therapeutic Drug Monitoring)



8. Βιοδείκτες Κατάχρησης Αλκοόλ
(Biomarker for Alcohol Abuse)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Ο προσδιορισμός τους στο αίμα, στα ούρα και το σίελο χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πρακτική για τη διερεύνηση και διάγνωση πολλών ενδοκρινικών νοσημάτων.

ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΑΙΤΕΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΟΛΛΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ

- Νόσος Cushing
- Νόσος Addison
- Υπεραλδοστερονισμός
- Συγγενής Υπερπλασία των Επινεφριδίων (Ενήλικες και Νεογνά)
- Όγκος Επινεφριδίων
- Υπετρίχωση στις γυναίκες,

Απαραίτητοι προσδιορισμοί

- Κορτιζόλη
- Αλδοστερόνη
- 17OH Προγεστερόνη
- Κορτικοστερόνη
- 11-Δεοξυκορτιζόλη
- Τεστοστερόνη
- Δ4-Ανδροστενεδιόνη
- Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA)
- Κορτιζόλη ούρων 24ώρου και Μεταβολίτες κορτιζόλης

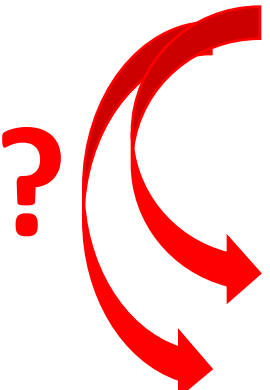
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΑΙΤΕΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΟΛΛΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

- ΓΟΝΑΔΕΣ
- Υπογονιμότητα στους άνδρες και στις γυναίκες
- Διαταραχές εμμήνου ρύσεως στις γυναίκες
- Υπερανδρογοναιμία /αρρενοποίηση στις γυναίκες
- Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
- Προβλήματα διαφοροποίησης του φύλου

Απαραίτητοι προσδιορισμοί

- 17OH Προγεστερόνη, κορτιζόλη,
- Ανδρογόνα (τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, θεική δευδροεπιανδροστερόνη)
- Οιστραδιόλη, προγεστερόνη

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

- 
- Ανοσοαναλύσεις (απλές, φθηνές, γρήγορες, διεκπεραίωση μεγάλου όγκου δειγμάτων, αλλά έχουν προβλήματα έλλειψης ειδικότητας διότι δεν γίνεται προκατεργασία του δείγματος για απομάκρυνση παρεμβαλλόμενων ουσιών)
 - Υγρή Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας (LC-MS/MS)
 - Αέριος Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας

ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Προβλήματα

- Οι προσδιορισμοί κατ' ευθείαν στον ορό (Direct assays) χωρίς εκχύλιση (καθαρισμός δείγματος και απομάκρυνση παρεμβαλλόμενης ουσίας).
- Έχουν έλλειψη ειδικότητας λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων από τη παρουσία άλλων ενώσεων με παρόμοιο χημικό τύπο (μεταβολίτες, φάρμακα).
- Έλλειψη προτυποποίησης διότι διαφορετικοί κατασκευαστές χρησιμοποιούν διαφορετικά αντιδραστήρια τα οποία αλλάζουν χωρίς να ενημερώνουν για τις επιπτώσεις τους στα αποτελέσματα.
- Αδυναμία συγκρισιμότητας των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων που χρησιμοποιούν αντιδραστήρια διαφορετικών εταιρειών.
- Χαμηλή ευαισθησία.
- Η δέσμευσή τους με τις ειδικές σφαιρίνες τους (SHBG, CBG) και με την αλβουμίνη παρεμβαίνει στη μέτρησή τους

ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Προβλήματα

- Η πλήρης αυτοματοποίηση δεν επιτρέπει την αλλαγή του αντιδραστηρίου της εταιρείας που δίνει εσφαλμένα αποτελέσματα (κλειστά συστήματα).
- Οι μεγάλες πλατφόρμες προσδιορίζουν παραμέτρους με μεγάλη κατανάλωση (π.χ. τεστοστερόνη, οιστραδιόλη, κορτιζόλη, βιταμίνη D) και όχι παραμέτρους με μικρότερη κίνηση (αλδοστερόνη, 17OH προγεστερόνη, ανδροστερόνη, DHEA, DHT, 11-δεοξυ κορτικοστερόνη).
- Προσδιορισμός μίας ορμόνης σε κάθε δείγμα.

Ketha H, Kaur S, Grebe SK, Singh RJ. Clinical applications of LC-MS sex steroid assays: evolution of methodologies in the 21st century. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014 Jun;21(3):217-26.

Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol.* 2015 Aug;173(2):D1-12

ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

Μέσος όρος 44,19 ng/dL

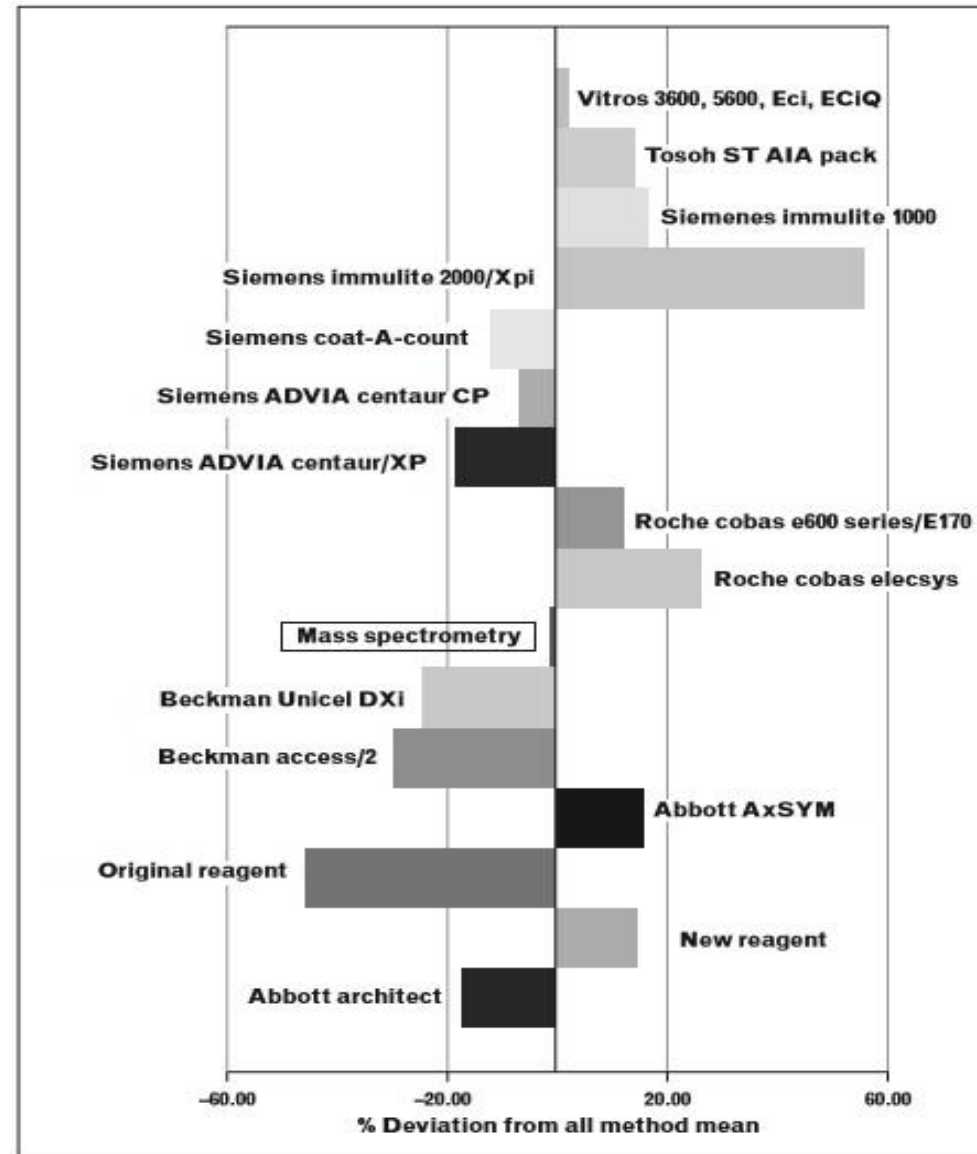


FIGURE 4. Percentage deviation from all method mean for serum testosterone measured by 15 different immunoassays and one LC-MS/MS assay. All method mean = 44.19 ng/dl. LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry.

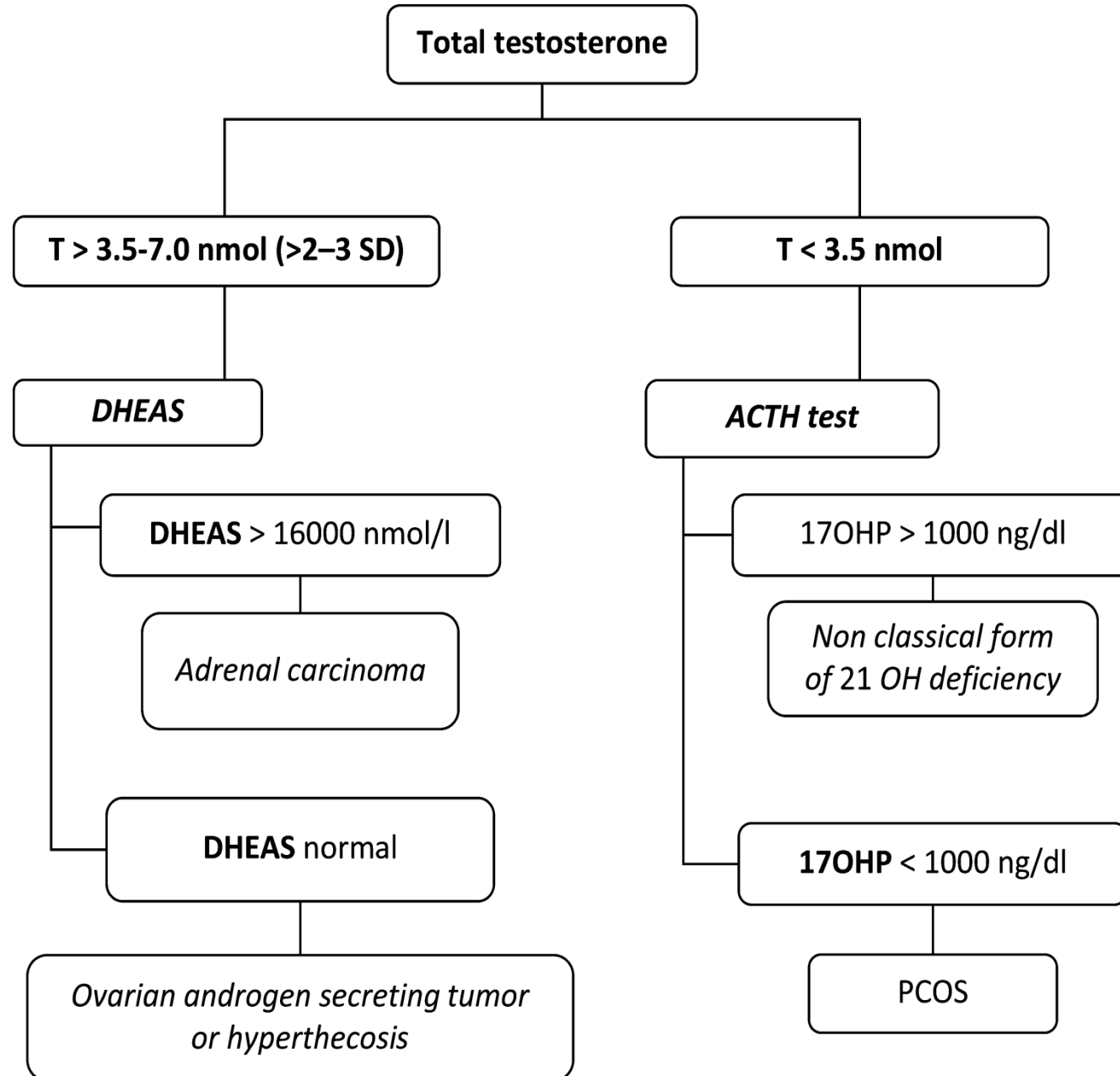


Table 2 Main advantages, disadvantages and pitfalls with direct immunoassay.

Advantages	Disadvantages and pitfalls
<ul style="list-style-type: none">• RIAs and chemiluminescence immunoassays are the most widely used methods (>80% of labs)• Easy to use, requiring small sample volume, short assay time• Suitable for automated platforms that reduce the risk of human error• Precision: good intra- and inter-assay reproducibility• Increased effort by manufacturers to calibrate their assays	<ul style="list-style-type: none">• Low accuracy• Lack of specificity, which depends on the quality of testosterone antibodies• Potential interference with binding proteins• Potential interference and matrix effects, despite good specificity of the antibodies used• Unexpected interference: e.g., biotin

M.PUGEAUT ET AL. Hyperandrogenic states in women: Pitfalls in laboratory diagnosis
Eur. J. Endocrinol. 178 (2018)

Table 3 Main advantages vs disadvantages and pitfalls with LC-MS/MS for measuring testosterone.

Advantages	Disadvantages and pitfalls
<ul style="list-style-type: none">• Accuracy• High specificity owing to its ability to select for the mass of the compound of interest (parent ion) and to fragment the parent ion into specific, smaller ions (daughter ions)• Sensitivity• Potential for simultaneous measurement of several different steroids	<ul style="list-style-type: none">• Expensive equipment• Technical demands• Variability between labs (risk of human error, automata are not yet available)• Technical pitfalls: high degree of variation in the efficiency of atmospheric pressure ionization, standardization mandatory, 'isotope effects' of internal standards, differential impact of matrix effects on analyte and isotope internal standard, interference from in-source transformation of conjugate metabolites, isobaric congeners, matrix compounds sharing mass transitions, etc.

17-OH Προγεστερόνη στα νεογνά

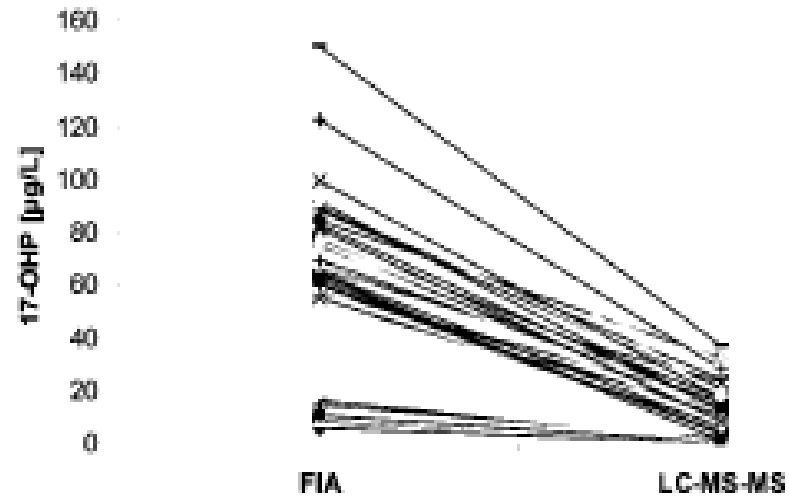


Fig. 2. Comparison of 17-OHP concentrations in newborn-screening blood spots as determined by fluorescence immunoassay (FIA) and LC-MS/MS.

All 54 blood spots were from newborns not affected by CAH, but 42 of these had abnormal screening results by fluorescence immunoassay. Note the consistently lower 17-OHP concentrations measured by LC-MS/MS, demonstrating the high specificity of this technology, which is not affected by cross-reactivity.

ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ

Συγκέντρωση 29 pg/ml

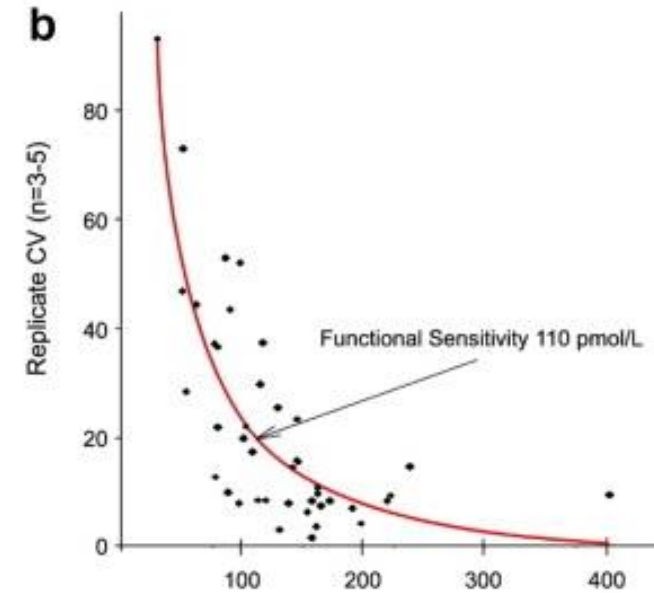
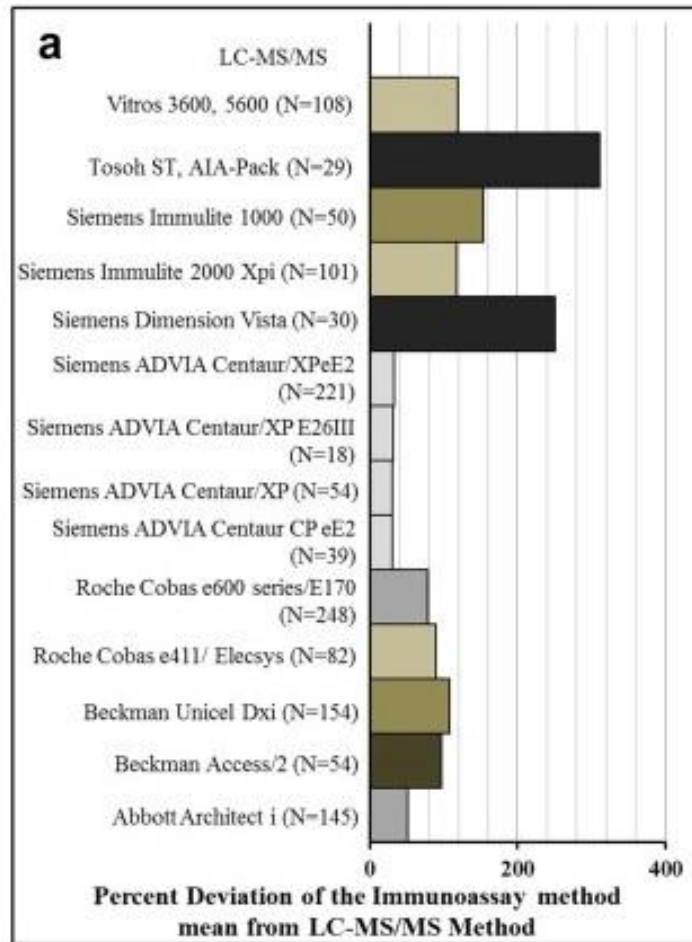


Fig. 2. (a) Percent deviation of 14 immunoassay mean concentrations from LC–MS/MS value. Number of laboratories performing each immunoassay is listed in parenthesis. Data from CAP 2013 survey (concentration using LC–MS/MS = 29 pg/mL). (b) Lack of precision at low estradiol concentration measured on AxSYM (Assembly #37000-108, Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL) (*figure adapted from Dighe et al. Clin Biochem 2005, permission pending).

ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ

Προσδιορίζεται στον ορό, ούρα 24ώρου, σίελο 11 μ.μ. (Direct assays, χωρίς εκχύλιση του δείγματος) για τη διάγνωση:

- Νόσο Cushing
- Νόσο Addison

Υπάρχουν παρεμποδίσεις από:

- Φάρμακα (Prednisone, Dexamethasone κλπ.)
- Μεταβολίτες κορτικοστεροειδών
- Δεσμευτικές πρωτεΐνες κορτικοστεροειδών (CBG)
- Υποπρωτεϊναιμία
- Φάρμακα που αναστέλλουν τη στεροειδογένεση

Casals G et al. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? *Ann Lab Med*. Jul 2020. The mean positive biases introduced by the immunoassay in all healthy control subjects and CS patients were determined to be 121% (range: 44–219%; N=33) and 135% (range: 33–344%; N=35), respectively. UFC, urinary free cortisol;

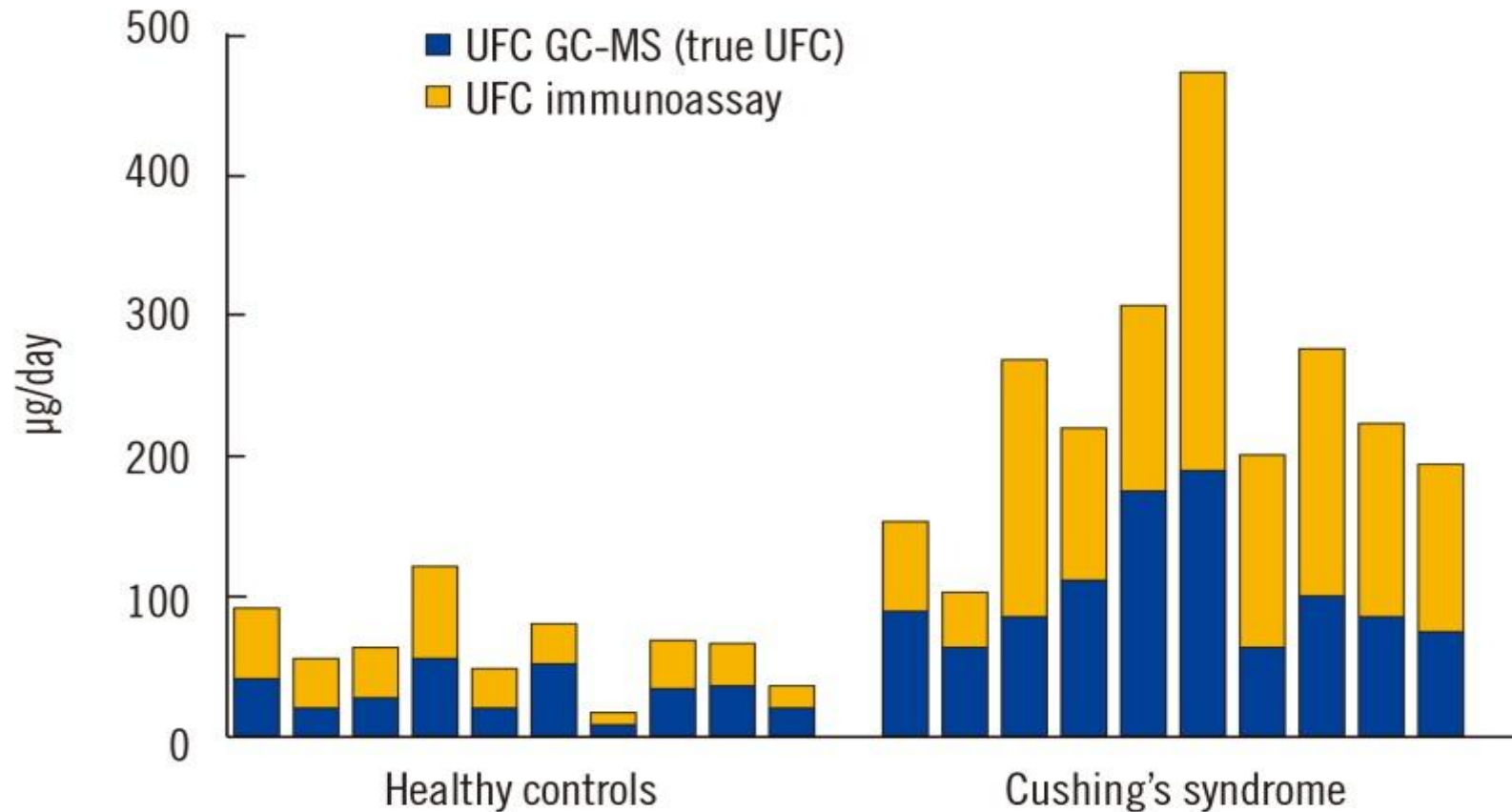


Table 2. Considerations regarding mass spectrometry measurements for Cushing's syndrome (CS) evaluation

Advantage provided by mass spectrometry	References
Cortisol measurement results are more specific. In contrast to immunoassays, only true cortisol is measured.	[6, 14, 25-29, 48, 56, 60, 61, 73, 85]
The variability of cortisol measurements across laboratories is reduced.	[2, 25, 45, 71, 73]
Clinical value for the screening of CS is high. Comparable (but probably not better) to many immunoassays.	[2, 26, 32, 61]
May be used to reduce false-positive results obtained through immunoassays.	[2, 26, 57]
Allows the detection of individually exogenous corticosteroids.	[3, 36-38]
Ensures adequate plasma dexamethasone levels during DST in equivocal cases.	[6, 69,70]
Allows accurate cortisol measurement in patients undergoing interfering medical treatment.	[72]
Allows measurement of endogenous metabolites that may be useful for the following purposes:	[3, 39, 40]
- subtyping CS	[75]
- classifying adrenal incidentalomas	[42]
- detecting subclinical CS	[74]
- differentiating Cushing's disease from ectopic ACTH syndrome	[43]
- detection of saliva contamination	[62, 63]

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotrophic hormone; CS, Cushing's syndrome; DST, dexamethasone suppression test.

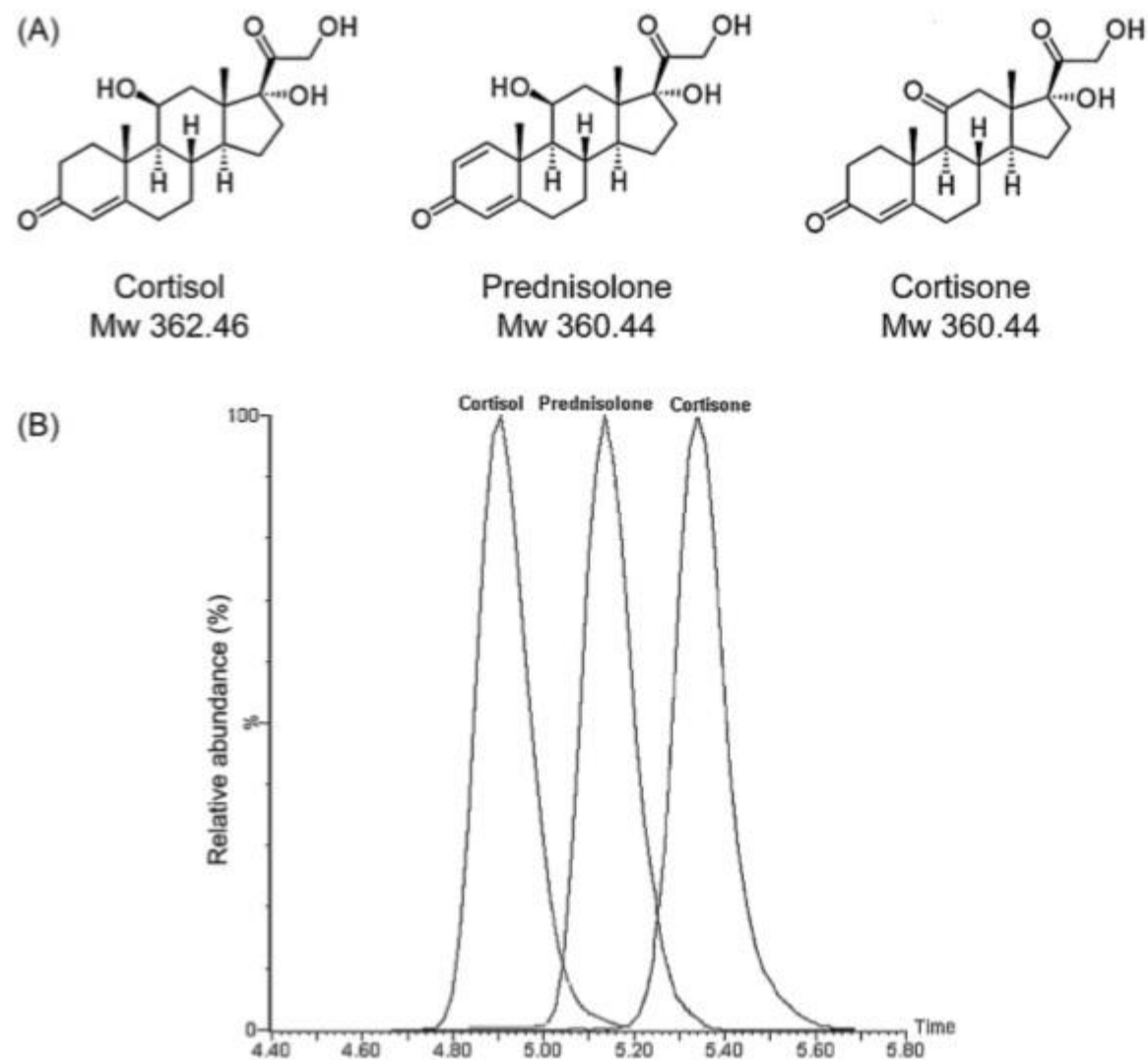


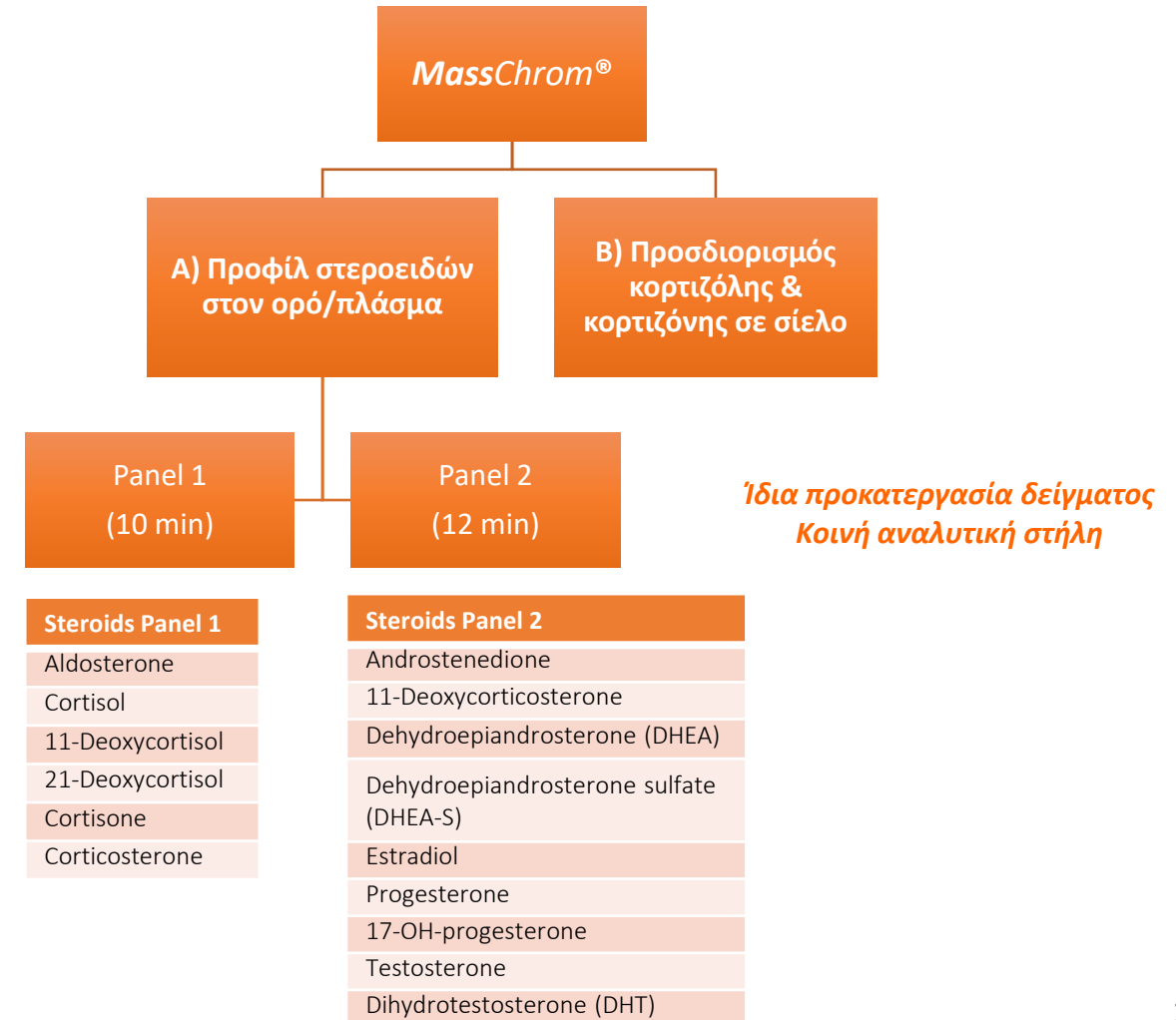
Fig. 6. (a) Molecular structures of cortisol, prednisolone and cortisone. (b) Representative chromatogram showing the separation of cortisol (m/z 363 \rightarrow 121), prednisolone (m/z 361 \rightarrow 147) and cortisone (m/z 361 \rightarrow 163) standards on a UPLC CSHTM fluoro-phenyl column (Acquity 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm, Waters).

Ανάλυση Στεροειδών Ορμονών με LC-MS/MS (Steroids)

LC-MS/MS Gold Standard in Steroid Profiling

Υπερέχει έναντι ανοσοχημικών αναλύσεων σε:

- ✓ Ευαισθησία (χαμηλότερα όρια ανίχνευσης)
- ✓ Ειδικότητα (προηγούμενα προβλήματα επίδρασης μήτρας και διασταυρούμενων αντιδράσεων αντισωμάτων)
- ✓ Προτυποποίηση και συγκρισιμότητα αποτελεσμάτων (διαφορετικοί κατασκευαστές – διαφορετικά αντιδραστήρια)
- ✓ Δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης πολλαπλών αναλυτών (panel/profile) σε ένα μόνο δείγμα – Χαμηλότερο κόστος



Ανάλυση Στεροειδών Ορμονών με LC-MS/MS (Steroids)

Προφίλ στεροειδών στον ορό/πλάσμα

Προσδιορισμός κορτιζόλης & κορτιζόνης
σε σίελο

Panel 1

Panel 2

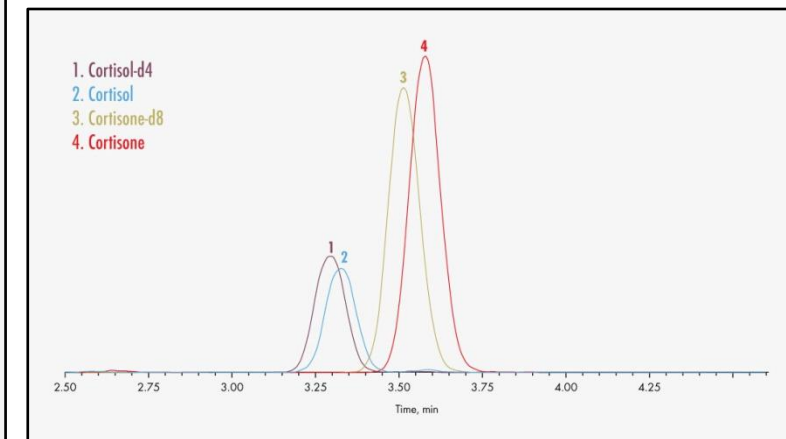
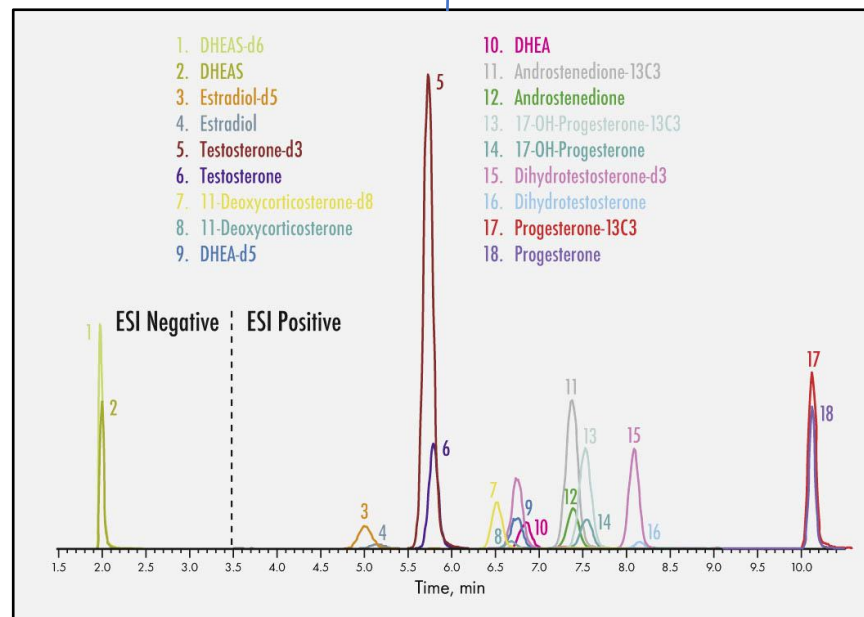
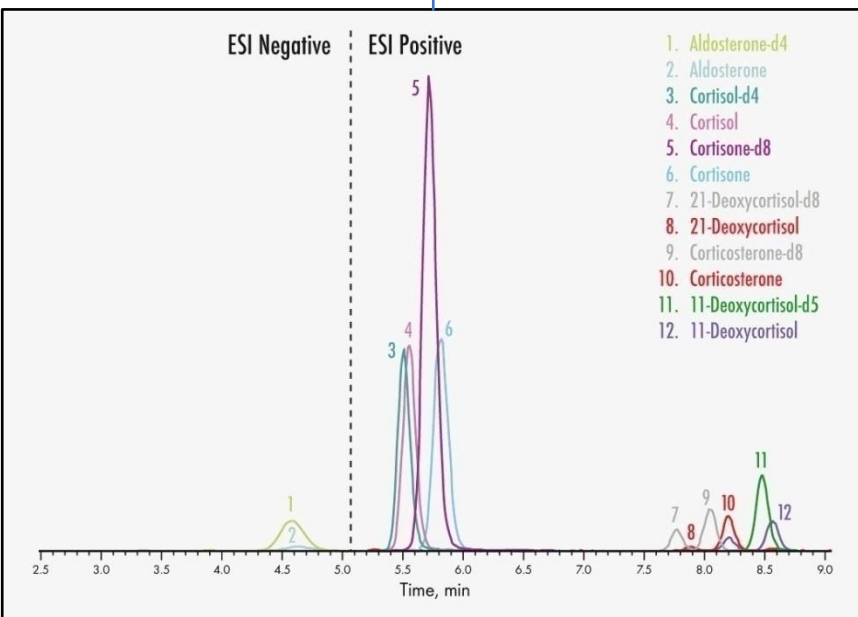


Table 1

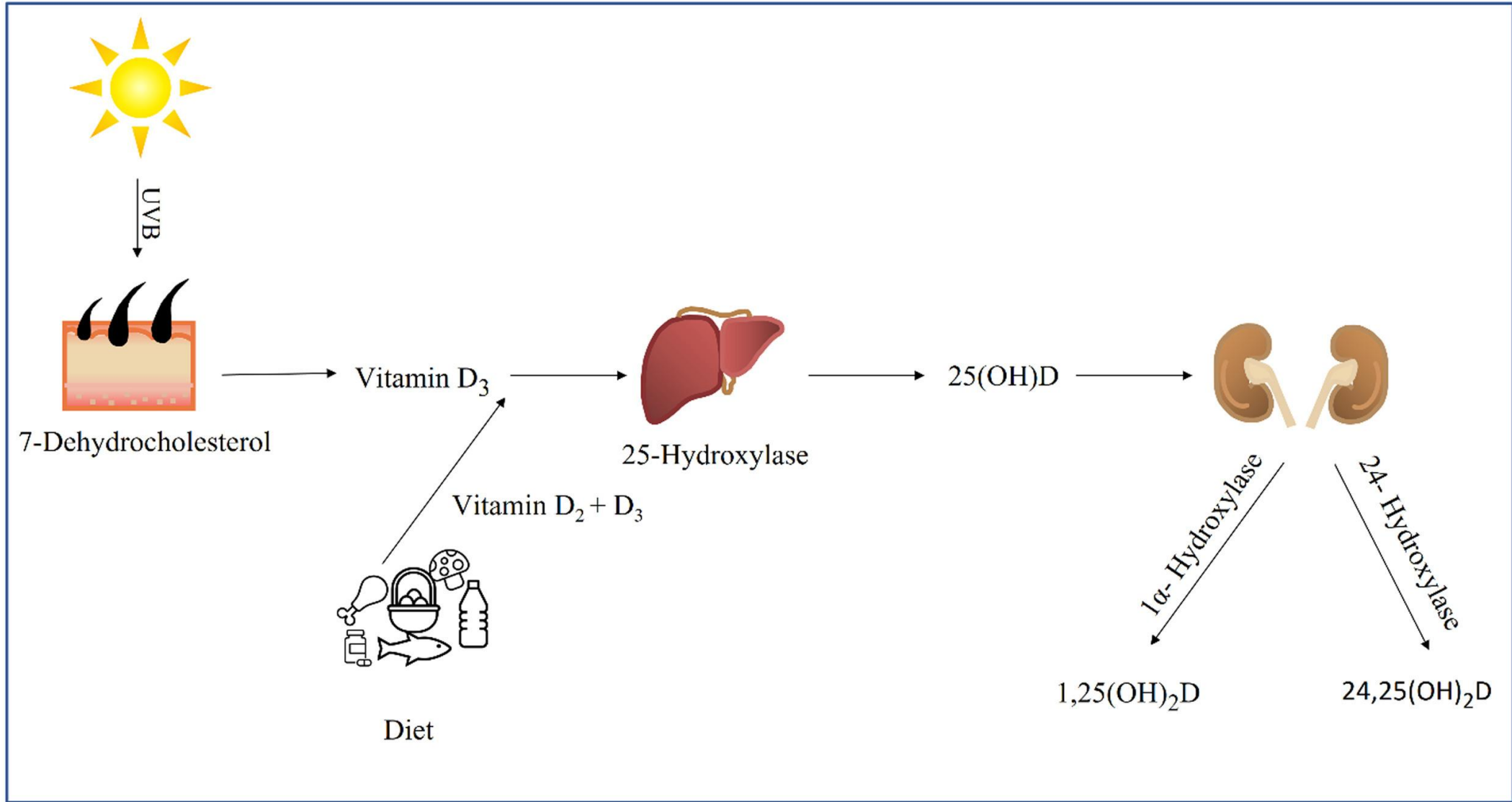
Comparison of relative and absolute numbers of UK NEQAS steroid hormone proficiency testing scheme [68] participants from 2011 and 2019, demonstrating a strong increase in LC-MS/MS installations in clinical practice. Consequently, in this decade, for most analytes, the target value assignment was changed from all laboratories trimmed mean (ALTM) to mass spectrometry (LCMS).

Analyte	PT distribution 371 (1/2011)			PT distribution 469 (11/2019)		
	LC-MS/MS participants (%)	Overall participants (n)	Target value	LC-MS/MS participants (%)	Overall participants (n)	Target value
Testosterone (female)	6	264	ALTM	25	218	LCMS
Testosterone (male)	4	268	ALTM	17	219	LCMS
Estradiol (low)	0	298	ALTM	7	234	ALTM
Estradiol (high)	0	127	ALTM	4	112	ALTM
Progesterone	0	295	ALTM	2	253	ALTM
Cortisol (serum)	0	278	ALTM	6	256	LCMS
Cortisol (urine)	19	91	ALTM	67	82	LCMS
17-OH-Progesterone	12	52	ALTM	71	69	LCMS
Androstenedione	12	73	ALTM	57	82	LCMS
Aldosterone	0	131	ALTM	14	149	LCMS
DHEAS	0	68	ALTM	20	81	LCMS

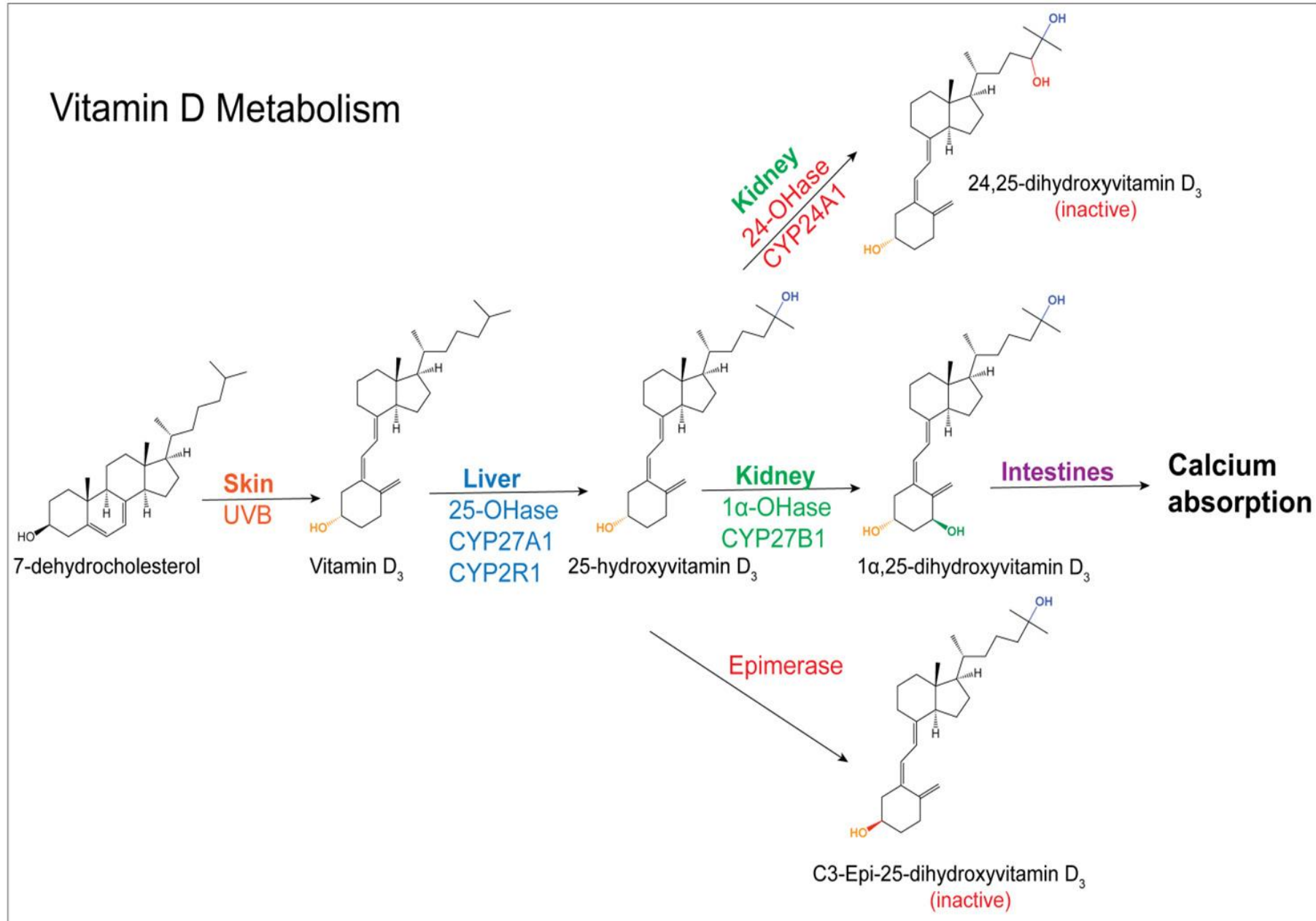
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

A. Tripathi et al. Analytical methods for 25-hydroxyvitamin D: advantages and limitations of the existing assays, J. Nutr. Biochem. 109 (2022). **Vitamin D metabolism in the human**

body. Vitamin D₃ is synthesized in human skin and some amount of vitamin D₃ and D₂ obtained from vitamin D-rich foods. Both vitamins are hydroxylated in the liver into the active form 25(OH)D₃ and D₂ (together they are termed as 25(OH)D). Further they are hydroxylated into 1,25-dihydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D. Among these metabolites 25(OH)D is the most stable and major circulatory form of vitamin D.



Galior K, et al. 10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency. *Bone Rep.* Jun 2018. **The vitamin-D metabolic pathway.**



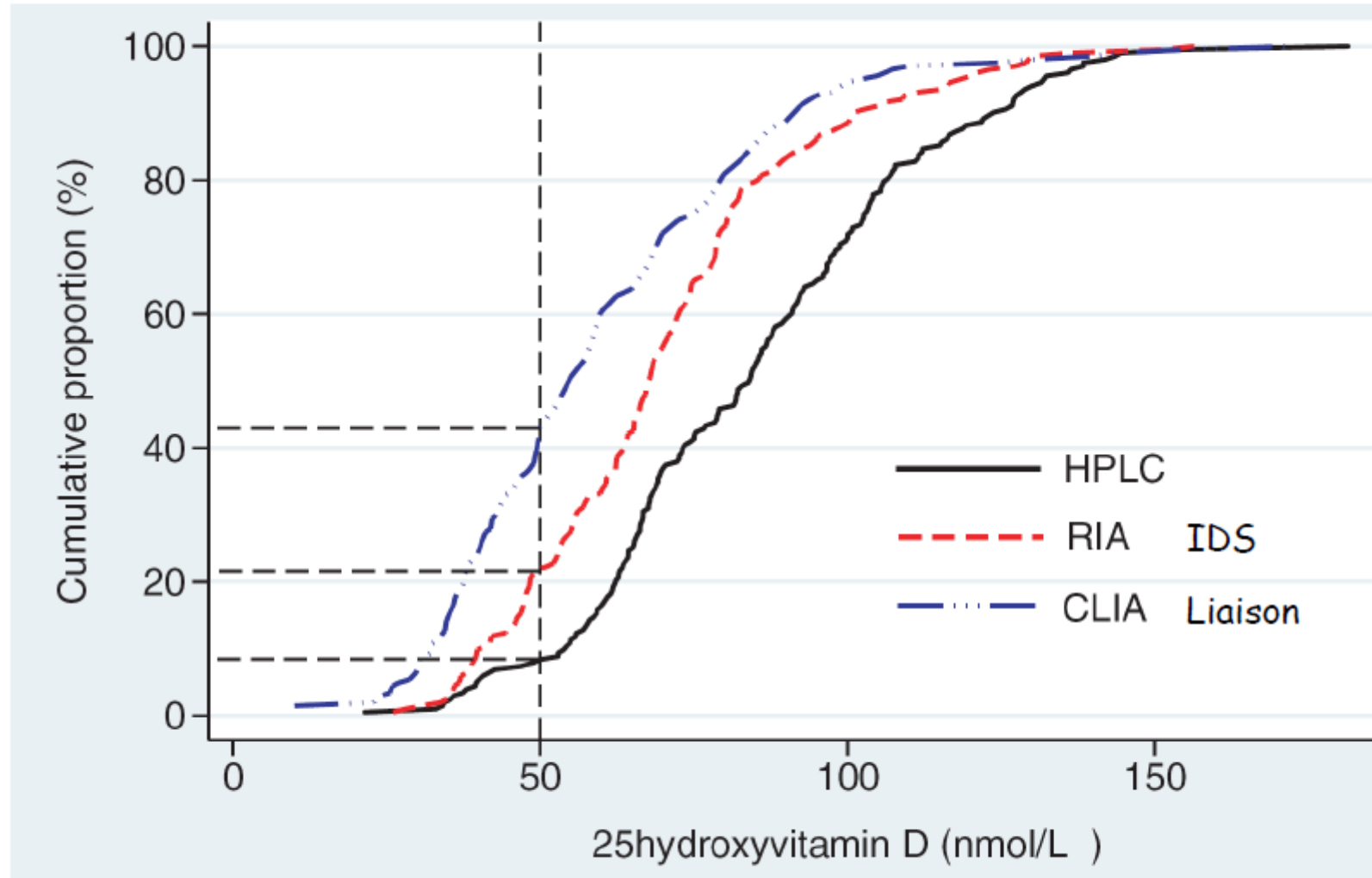
ΧΑΜΗΛΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D (ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΑ?)

- ❖ Σύμφωνα με τα δεδομένα του NHANES (National Health and Nutrition Examination Surveys), το διάστημα 2000-2004 σε σχέση με το διάστημα 1994-1998 έχει παρατηρηθεί μια μείωση στα επίπεδα της 25-OH βιταμίνης D σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες σε διάφορες περιοχές του πλανήτη.
- ❖ Το γεγονός αυτό, και δεδομένου ότι η έλλειψη 25-OH βιταμίνης D σχετίζεται με πολλά νοσήματα, οδήγησε σε μια αλματώδη αύξηση στη χορήγηση βιταμίνης D σε θεραπευτικές δόσεις.

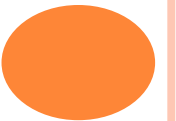
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

- Η βιταμίνη D χορηγείται ως Cholecalciferol (D3) η ως Ergocalciferol (D2) . Η χορήγηση βιταμίνης D3 διατηρεί τα επίπεδα της 25(OH)D σε καλύτερη κατάσταση από ότι η βιταμίνη D2, επομένως ο προσδιορισμός της βιταμίνης D3 θεωρείται ότι αντανακλά καλύτερα τα επίπεδα της συνολικής βιταμίνης D στον οργανισμό.
- Εν τούτοις, στη περίπτωση χορήγησης υψηλών δόσεων βιταμίνης D2 είναι αναγκαίο να γίνει ο προσδιορισμός και της μορφής αυτής στο αίμα, προκειμένου να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Cumulative Proportion of Subjects Classified As Insufficient Depending on Method Used



G. Snellman et.al. PLoS ONE, 2010 , 5:e11555



ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

GALIOR K, KETHA H, GREBE S, SINGH RJ. 10 YEARS OF 25-HYDROXYVITAMIN-D TESTING BY LC-MS/MS-TRENDS IN VITAMIN-D DEFICIENCY AND SUFFICIENCY. *BONE REP.* JUN 2018;8:268-273

ALONSO N, ZELZER S, EIBINGER G, HERRMANN M. VITAMIN D METABOLITES: ANALYTICAL CHALLENGES AND CLINICAL RELEVANCE. *CALCIF TISSUE INT.* MAR 3 2022;

W.D. FRASER, J.C.Y. TANG, J.J. DUTTON, I. SCHOENMAKERS, VITAMIN D MEASUREMENT, THE DEBATES CONTINUE, NEW ANALYTES HAVE EMERGED, DEVELOPMENTS HAVE VARIABLE OUTCOMES, *CALCIF. TISSUE INT.* 106 (2020) 3–13

K. RUETER, L.J. BLACK, A. JONES, M. BULSARA, M.W. CLARKE, C. GAMEZ, E.M. LIM, D.J. PALMER, S.L. PRESCOTT, A. SIAFARIKAS, ANALYTICAL BIAS IN THE MEASUREMENT OF PLASMA 25-HYDROXYVITAMIN D CONCENTRATIONS IN INFANTS, *INT. J. ENVIRON. RES. PUBLIC HEALTH.* 17 (2020).

A. TRIPATHI, M. ANSARI, P. DANDEKAR, R. JAIN, ANALYTICAL METHODS FOR 25-HYDROXYVITAMIN D: ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF THE EXISTING ASSAYS, *J. NUTR. BIOCHEM.* 109 (2022)

DIRKS NF, ACKERMANS MT, LIPS P, ET AL. THE WHEN, WHAT & HOW OF MEASURING VITAMIN D METABOLISM IN CLINICAL MEDICINE. *NUTRIENTS.* APR 13 2018;10(4).

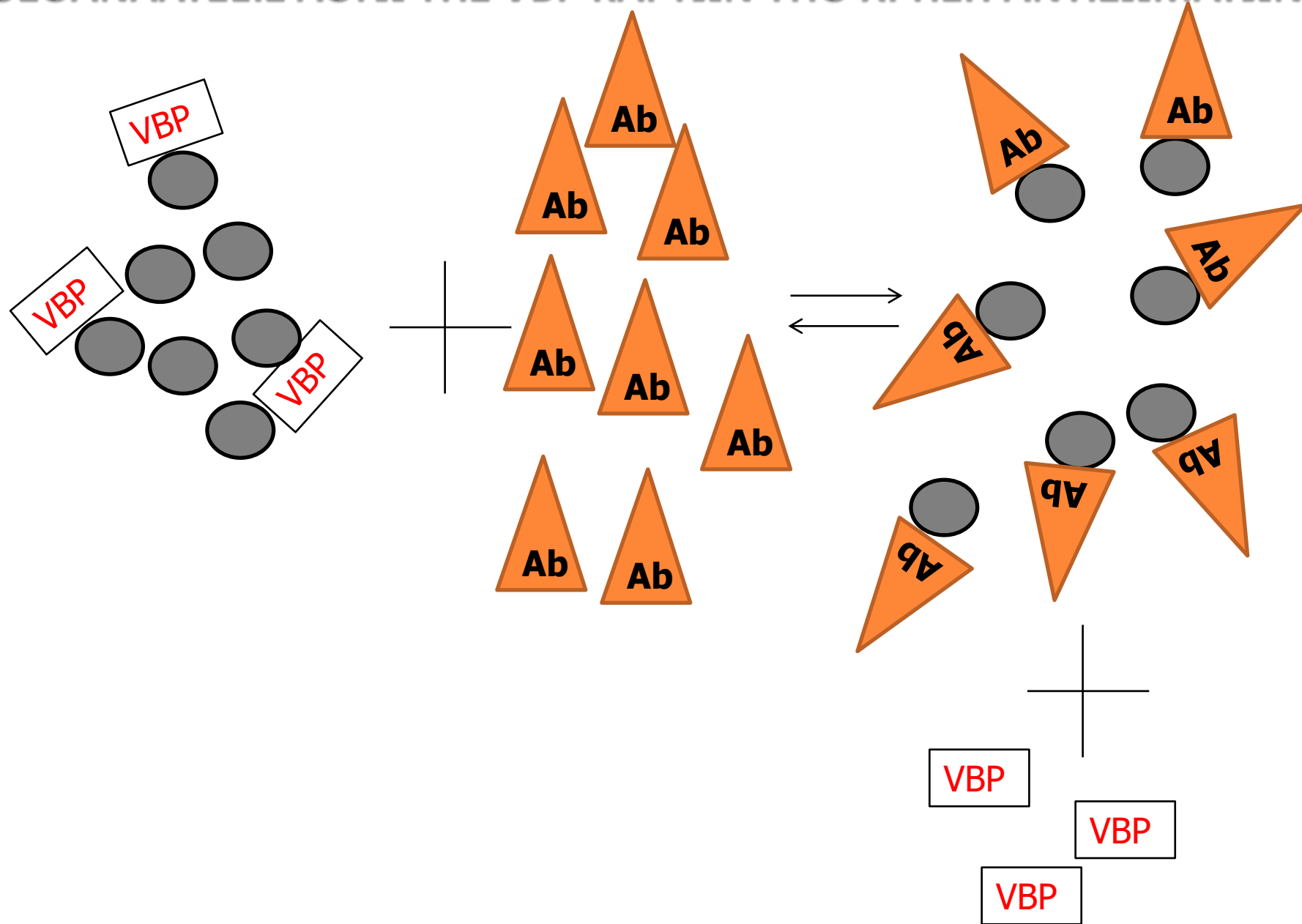
Η ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΕΙ ΟΤΙ

1. ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ 25 (OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ
2. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ
3. Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ LC-MS/MS ΕΙΝΑΙ Η «**GOLD STANDARD**» ΤΕΧΝΙΚΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ 25 (OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

ΑΙΤΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ 25OH - ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

- ✓ Τα στάδια προ-κατεργασίας του δείγματος για την απελευθέρωση της 25OH-VITAMIN-D από τη VDBP (οργανικοί διαλύτες, αντισώματα VITD διαφορετικής χημικής συγγένειας)
- ✓ Η παρουσία της VDBP παρεμβαίνει στη ανάλυση και προκαλεί ψευδώς χαμηλά αποτελέσματα. Η 25(OH) βιταμίνης D δεσμεύεται σε μεγάλο ποσοστό στην δεσμευτική της πρωτεΐνη VDBP (85-90%) , στην αλβουμίνη (10%) ενώ ένα μικρό ποσοστό είναι ελεύθερο (1%).
- ✓ διαχωρισμός της VITAMIN-D από τα άλλα συστατικά του ορού (matrix-effects).
- ✓ οι παρεμβολές του C3 epimer 25-OH VITD (παιδιά < 1 έτους) καθιστά την ανάλυση ακατάλληλη για παιδιά.
- ✓ έλλειψη τυποποιημένων βαθμονομητών

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ 25(OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΛΟΓΩ ΤΗΣ VBP ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



ΑΙΤΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ 25(OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

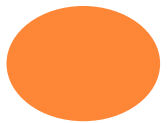
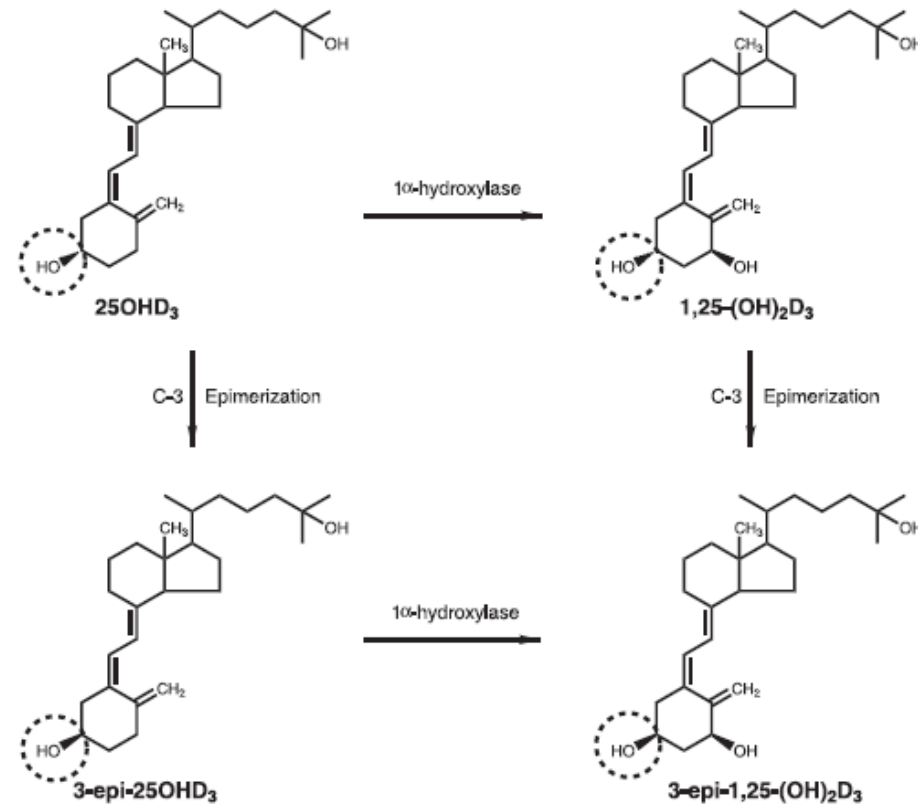
Τα αντισώματα στις διαφορετικές ανοσοαναλύσεις είναι ποικίλης χημικής συγγένειας με την 25(OH) βιταμίνη D, και δεν έχουν την ίδια δυνατότητα να αποσπάσουν την βιταμίνη D από την δεσμευτική της πρωτεΐνη VDBP, γεγονός που οδηγεί σε ανακριβή και αποκλίνοντα αποτελέσματα .

Τα αντισώματα στις διαφορετικές ανοσοαναλύσεις έχουν διαφορετική χημική συγγένεια με την 25(OH) βιταμίνη D3 , με την 25(OH) βιταμίνη D2 γεγονός που οδηγεί σε υπερεκτίμηση της ολικής 25(OH) βιταμίνης D

Τα αντισώματα στις διαφορετικές ανοσοαναλύσεις έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με διάφορους μεταβολίτες της 25(OH) βιταμίνης D , το οποίο οδηγεί σε εσφαλμένως υψηλά αποτελέσματα

C-3 Epimers Can Account for a Significant Proportion of Total Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Infants, Complicating Accurate Measurement and Interpretation of Vitamin D Status

Ravinder J. Singh, Robert L. Taylor, G. Satyanarayana Reddy, and Stefan K. G. Grebe



ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ 25(OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι ανοσοαναλύσεις έχουν προβλήματα ειδικότητας και είτε **υπερεκτιμούν** είτε **υποεκτιμούν** τα πραγματικά επίπεδα της 25(OH) βιταμίνης D στο αίμα.

Υπερεκτιμούν /Υποεκτιμούν τόσο στα χαμηλά όσο και στα υψηλά όρια του εύρους των τιμών μέτρησης της 25(OH) βιταμίνης D, δηλαδή **στα όρια τιμών** που η ακρίβεια είναι ιδιαίτερα σημαντική για να τεθεί η διάγνωση έλλειψης είτε επάρκειας της βιταμίνης D.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 25(OH) ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΜΕ LC-MS/MS

1. Η τεχνική της LC-MS/MS είναι η **“Gold standard”** για τον προσδιορισμό της 25(OH) βιταμίνης D.
2. Είναι υψηλής **ακρίβειας και ειδικότητας** και δίνει την δυνατότητα στα όρια της ιατρικής απόφασης να τεθεί η σωστή διάγνωση για επάρκεια ή έλλειψη 25(OH) βιταμίνης
3. Δίνει την δυνατότητα να προσδιοριστούν οι επι μέρους μορφές 25(OH) βιταμίνης D₂, 25(OH) βιταμίνης D₃ καθώς και (μεταβολίτες) όπως το C₃-ερί-25(OH)D₃.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ/ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ LC-MS/MS

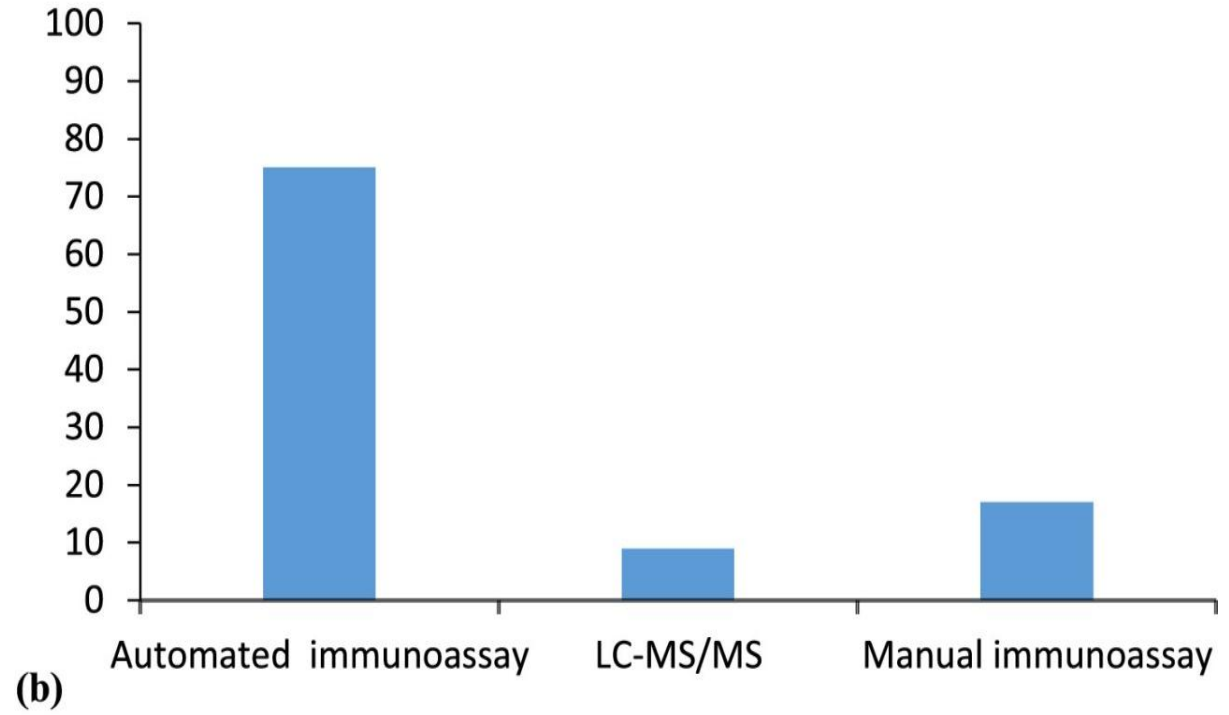
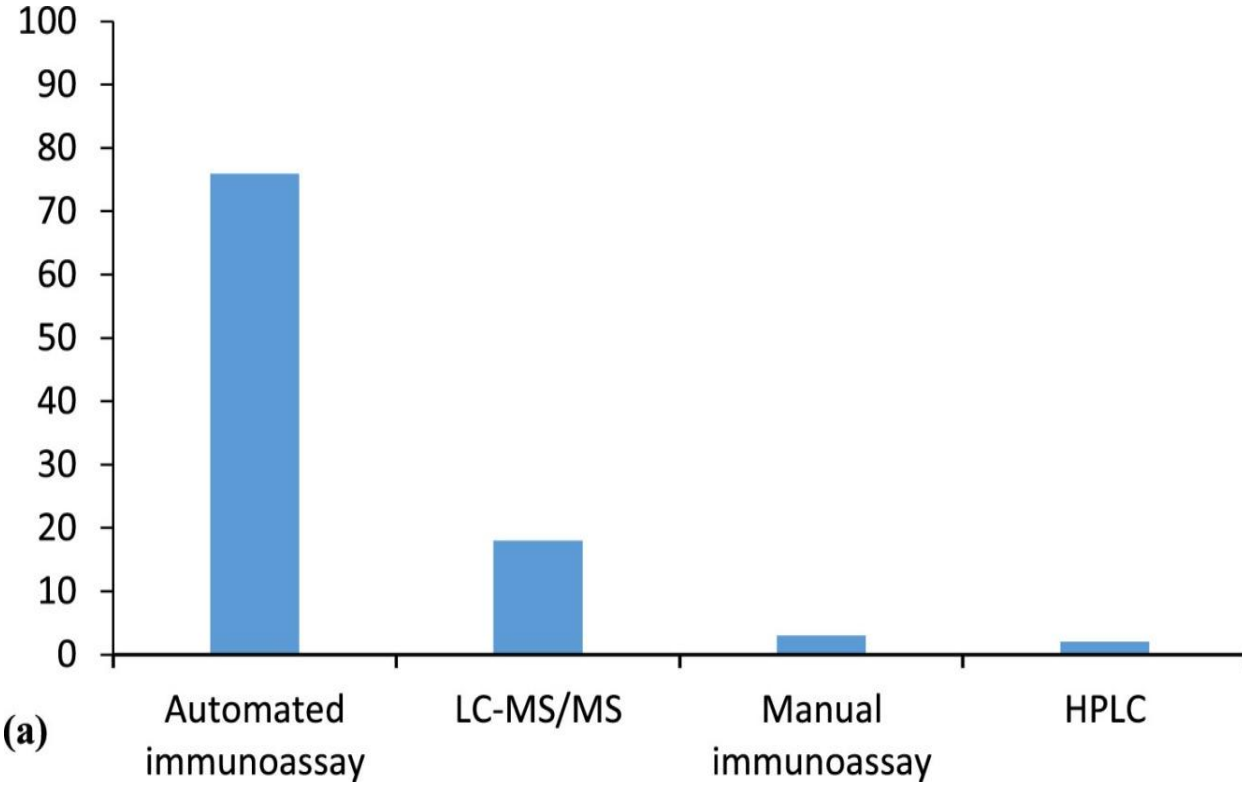
- **ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

- Υψηλή ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα, ταχύτητα, χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων, προσδιορισμός πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα σε ένα δείγμα

- **ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

- Υψηλό κόστος εξοπλισμού, απαιτείται εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό για την χρήση του εξοπλισμού

A. Tripathi et al. Analytical methods for 25-hydroxyvitamin D: advantages and limitations of the existing assays, J. Nutr. Biochem. 109 (2022).



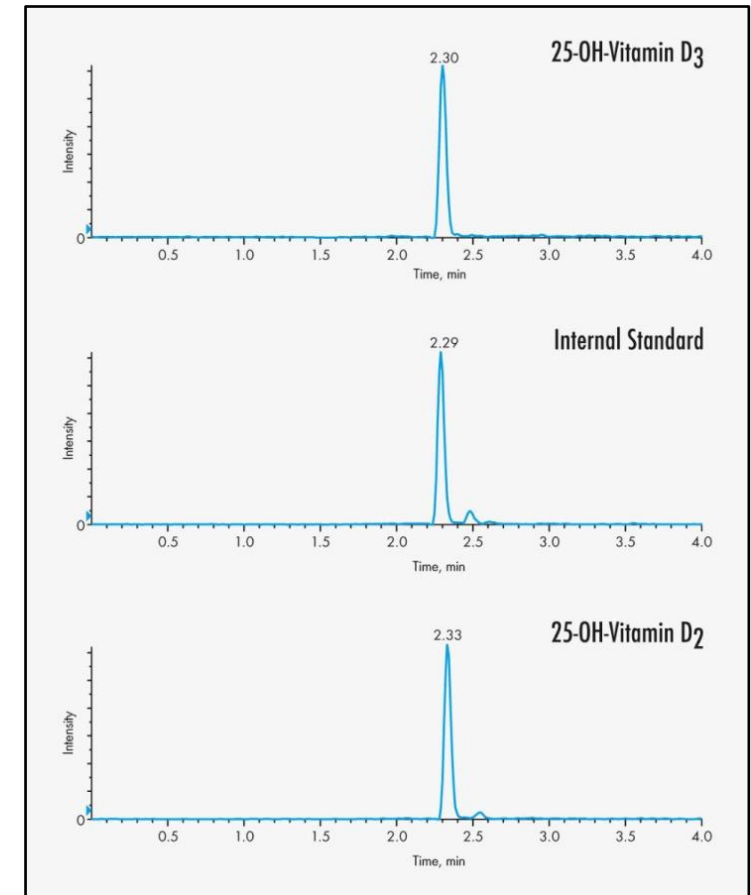
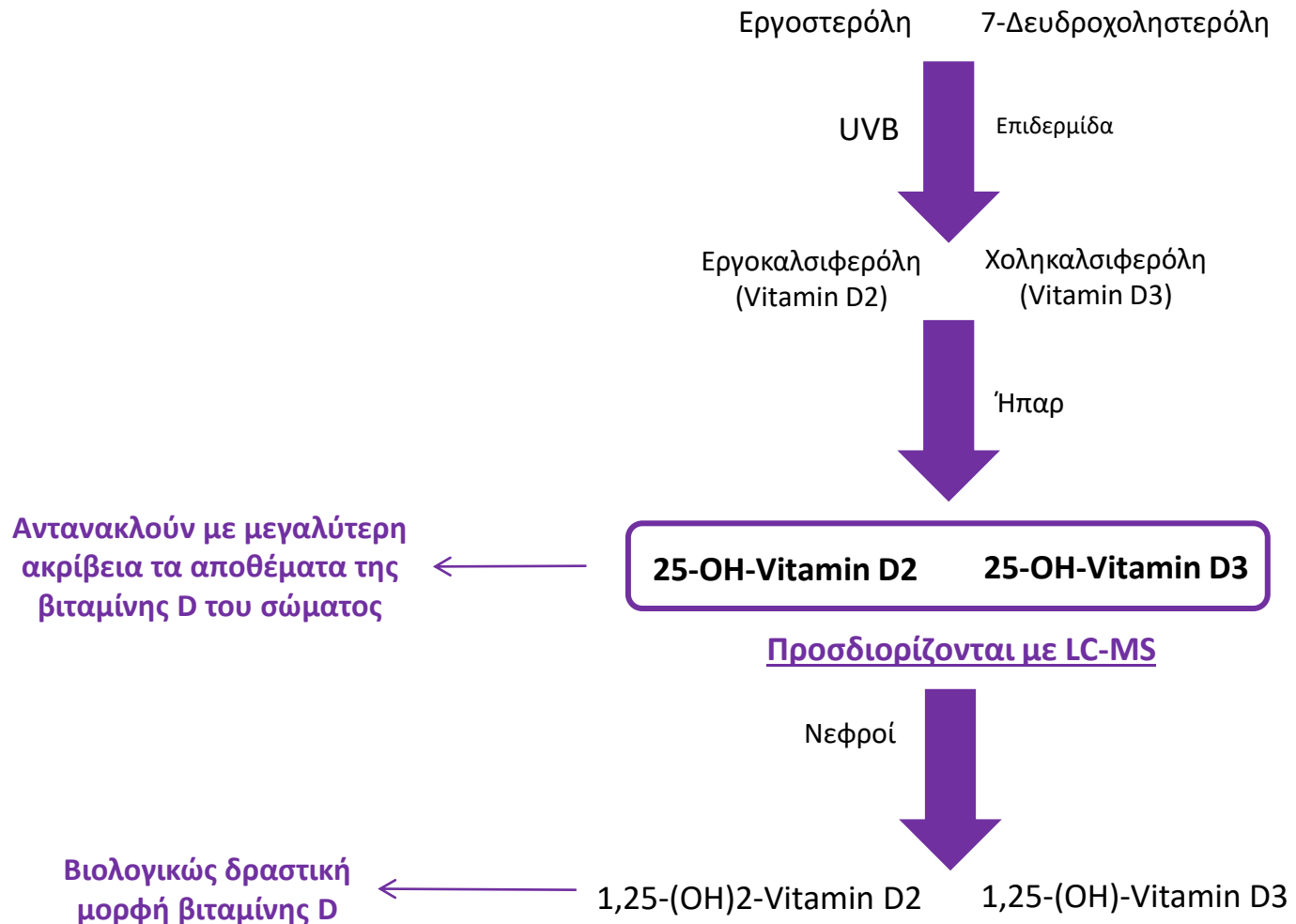
ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ 25(OH)D

η εμπειρία του προσωπικού (τεχνογνωσία)

- ο όγκος των δειγμάτων (μικρός όγκος → HPLC, LC-MS/MS)
- η προέλευση των δειγμάτων
 - Αμερική (χορήγηση D2 για αναπλήρωση)
 - Εργαστήριο που παραλαμβάνει δείγματα νεογνών (μέθοδο που να διαχωρίζει το C3-επιμερές)

Για μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες (NHANES), οι ανοσομέθοδοι δεν ενδείκνυνται λόγω περιστασιακών αλλαγών του αντισώματος ή ανασύνθεσης των αντιδραστηρίων *Scheicher R et al, Clinical Laboratory News 2009; 35: 1-7.*

Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης (Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)



Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης (Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)

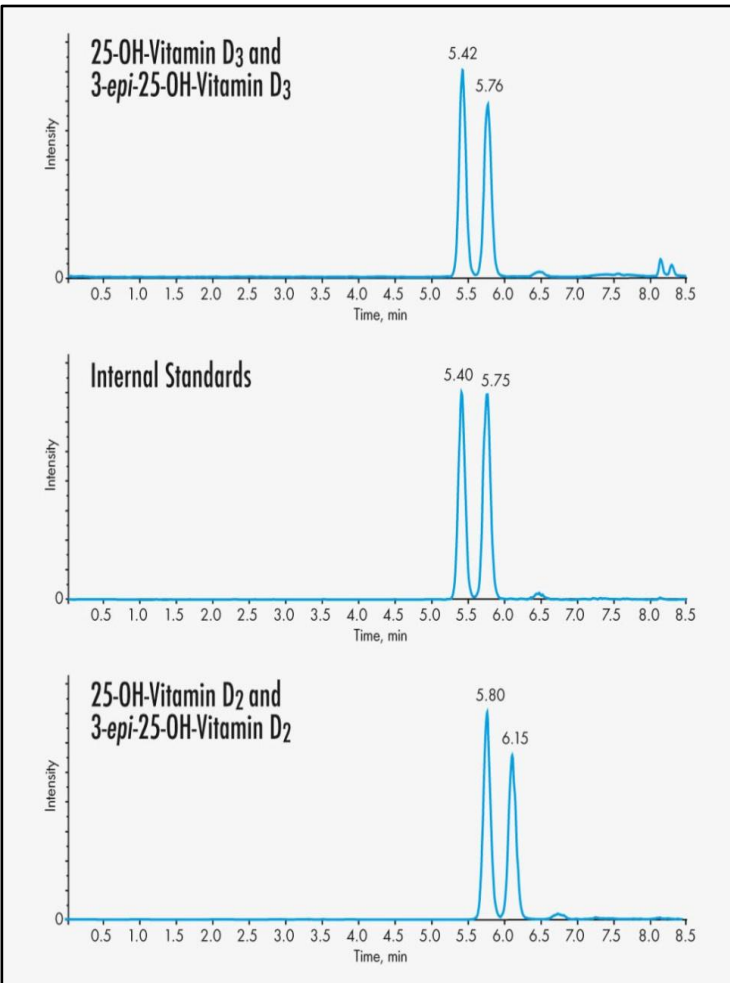
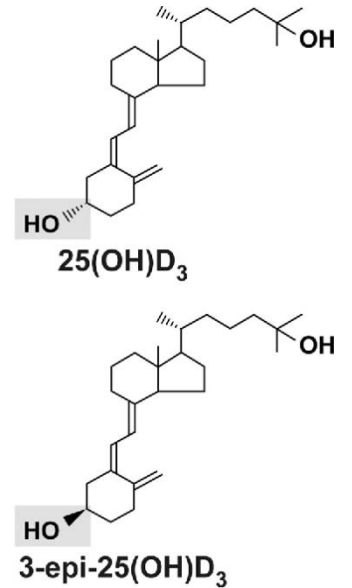
Επιπλέον προσδιορισμός C3-επιμερών 25-OH-Vitamin D

➤ Σημαντικό μέρος των 25-OH-Vitamin D₃/D₂ απαντάται στα βρέφη < 1 έτους στη μορφή των C3-επιμερών

➤ Διαφορετικός προσανατολισμός της –OH ομάδας του C3 στον χώρο
➤ Διαφορετική βιολογική δραστικότητα!

➤ Τα επιμερή της βιταμίνης D έχουν μειωμένη ικανότητα ασβεστοποίησης των οστών
(*reduced calcaemic effect in bone mineralisation*)

Επομένως είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των C3-επιμερών στα βρέφη



Προφίλ Βιταμινών: B1, B6, MMA (Vitamin Profiling: B1, B6, MMA)

MassChrom®

Προσδιορισμός βιταμινών
B1, B6 σε ολικό αίμα

Προσδιορισμός
Methylmalonic Acid σε
ορό/πλάσμα και ούρα

Έλλειψη B12 προκαλεί:

- Νευρολογικές διαταραχές
- Αναιμία
- Επιπλοκές στην εγκυμοσύνη

Έγκαιρη διάγνωση
Έγκαιρη επέμβαση
Αποτροπή μη αναστρέψιμων βλαβών

*Succinic acid: Ισοβαρής ένωση που διαχωρίζεται
χρωματογραφικά από το MMA προς αποφυγή
ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Προσδιορίζονται οι βιολογικές
δραστικές μορφές των
βιταμινών

- ✓ TPP: Thiamine pyrophosphate (B1)
- ✓ PLP: Pyridoxal-5'-phosphate (B6)

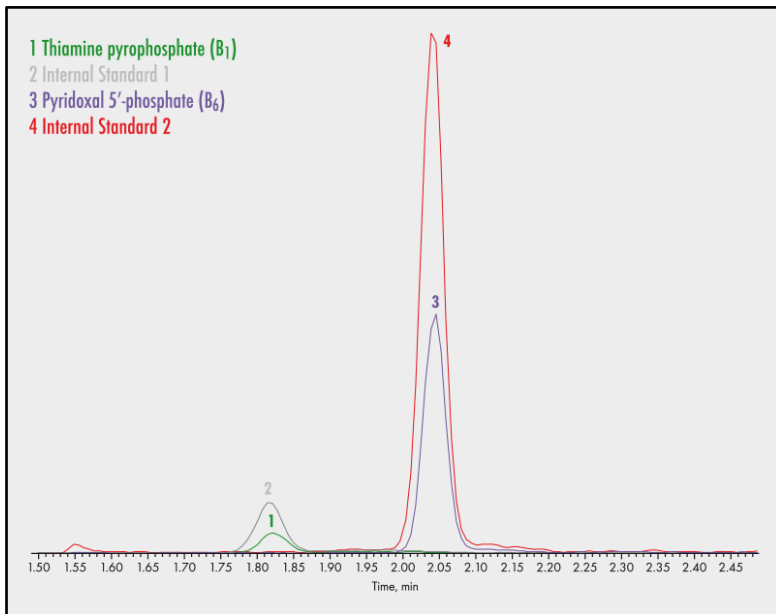
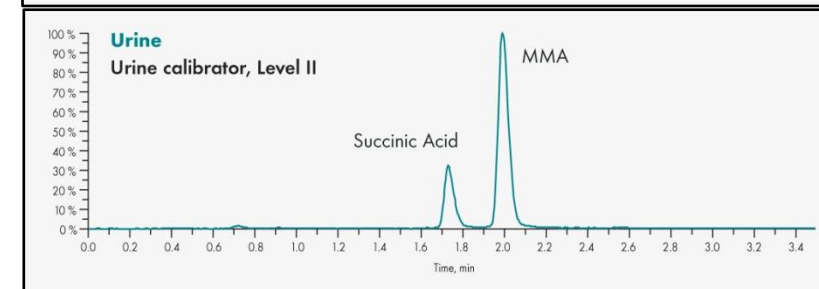
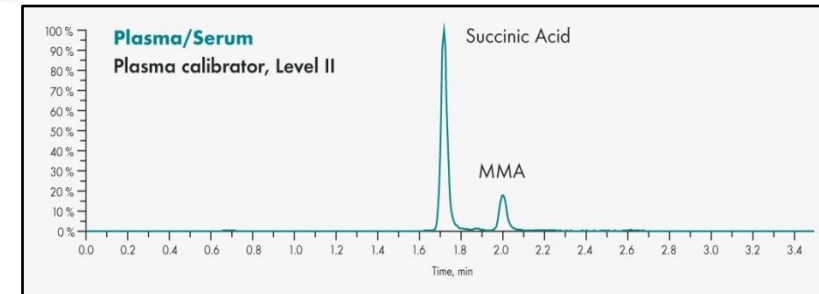
[Όχι τα ολικά επίπεδα]

Πρώτος, ευαίσθητος
δείκτης έλλειψης
B12



Καταλληλότερος για τη
διάγνωση υποκλινικής
έλλειψης B12, από την
ίδια τη B12 γιατί:

- Πιο σταθερό μόριο
- Δεν δεσμεύεται στις
πρωτεΐνες του αίματος



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΩΝ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΩΝ

Για την αρχική διερεύνηση των φαιοχρωμοκυττωμάτων και των παραγαγγλιωμάτων, σήμερα θεωρούνται κατάλληλοι οι παρακάτω προσδιορισμοί

Ο προσδιορισμός των ολικών μετانهφρινών στα ούρα (ελεύθερες και συζευγμένες μετانهφρίνες)

Ο προσδιορισμός των ελεύθερων μετانهφρινών στο πλάσμα

Αυτά τα δύο τεστ χρησιμοποιούνται για την ρύθμιση της υποτροπιάζουσας νόσου και της μεταστατικής νόσου.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΩΝ

Οι ελεύθερες μετανεφρίνες ούρων έχουν μεγάλη διαγνωστική αξία σε σχέση με τον προσδιορισμό των ολικών μετανεφρινών στα ούρα.

Οι ελεύθερες όμως μετανεφρίνες στο πλάσμα θεωρούνται σήμερα η μέθοδος με την μεγαλύτερη διαγνωστική αξία.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΩΝ

Ο προσδιορισμός των μετানেφρινών σήμερα γίνεται με την χρήση των ανοσοαναλύσεων καθώς και με χρωματογραφικές τεχνικές (κυρίως LC-MS/MS)

Οι ανοσοαναλύσεις έχουν προβλήματα χαμηλής διαγνωστικής ευαισθησίας, έλλειψη ακρίβειας, και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα , ενώ δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός της 3-methoxytyramine

Η μέθοδος LC-MS/MS είναι η “ Gold Standard” τεχνική για τον προσδιορισμό των ελεύθερων μετানেφρινών στο πλάσμα . Ιδιαίτερα σημαντικό είναι οτι μπορεί να προσδιορισθεί και η 3-methoxytyramine (μεταβολίτης της ντοπαμίνης) , η μέτρηση της οποίας έχει ιδιαίτερη αξία σε όγκους που εκκρίνουν ντοπαμίνη και στη μεταστατική νόσο

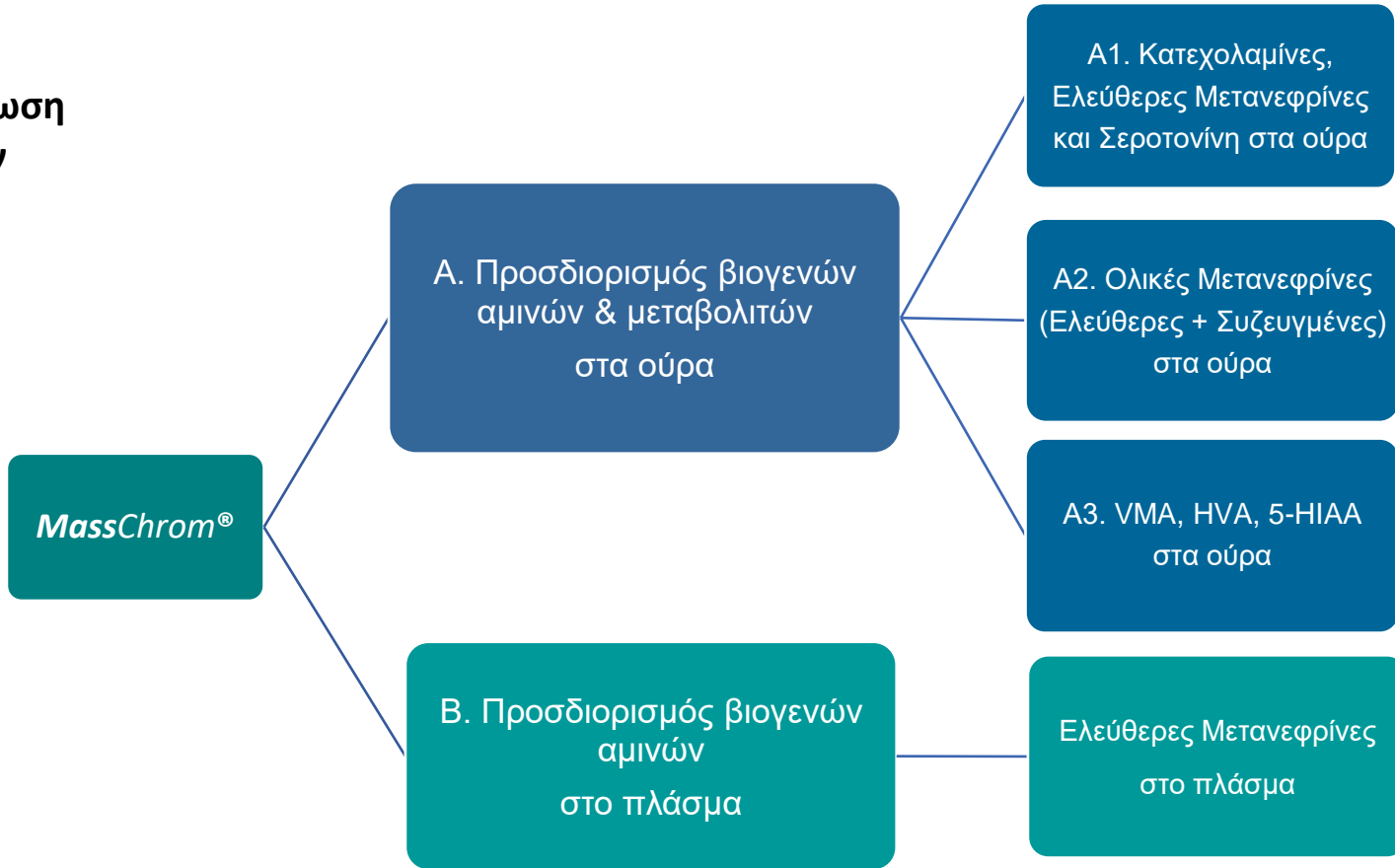
Προσοχή απαιτείται στις παρεμβολές απο φάρμακα, διατροφή και νεφρική δυσλειτουργία

Βιογενείς Αμίνες (Biogenic Amines)

Χρησιμοποιούνται στη διάγνωση
νευροενδοκρινικών όγκων

Όγκοι που παράγουν ορμόνες:

- ✓ Φαιοχρωμοκύττωμα (επινεφρίδια)
- ✓ Καρκινοειδείς όγκοι (πνεύμονες και γαστρεντερικό)
- ✓ Παραγαγγλίωμα (όλο το σώμα)
- ✓ Νευροβλάστωμα (κυρίως σε παιδιά)



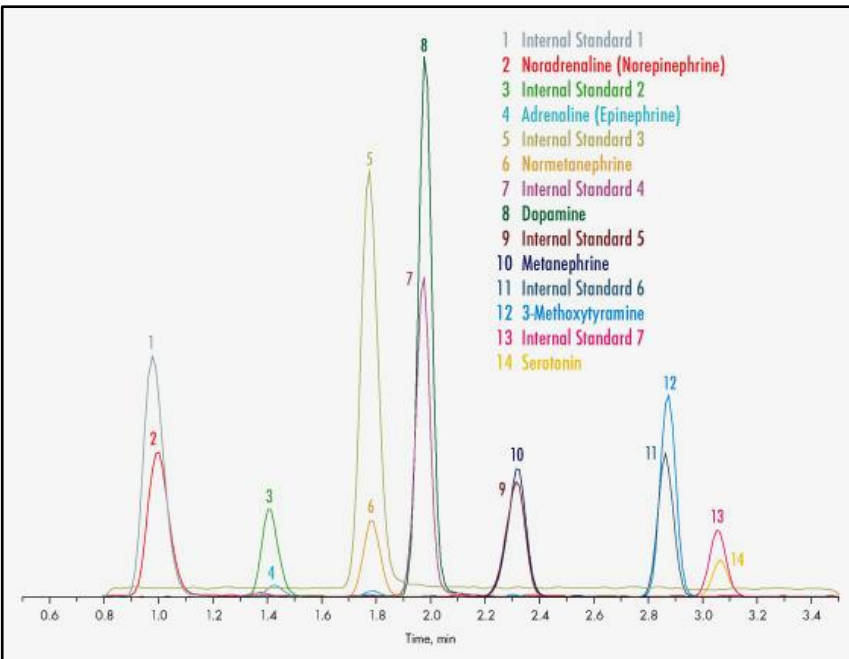
TARGET ANALYTES
Adrenaline (epinephrine)
Noradrenaline (norepinephrine)
Dopamine
Free metanephrine
Free normetanephrine
Free 3-methoxytyramine
Serotonin
Total metanephrine (free + conjugated)
Total normetanephrine (free + conjugated)
Total 3-methoxytyramine (free + conjugated)
Vanillylmandelic Acid (VMA)
Homovanillic Acid (HVA)
5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA)
Free metanephrine
Free normetanephrine
Free 3-methoxytyramine

Βιογενείς Αμίνες (Biogenic Amines)

A. Προσδιορισμός βιογενών αμινών και μεταβολιτών στα ούρα

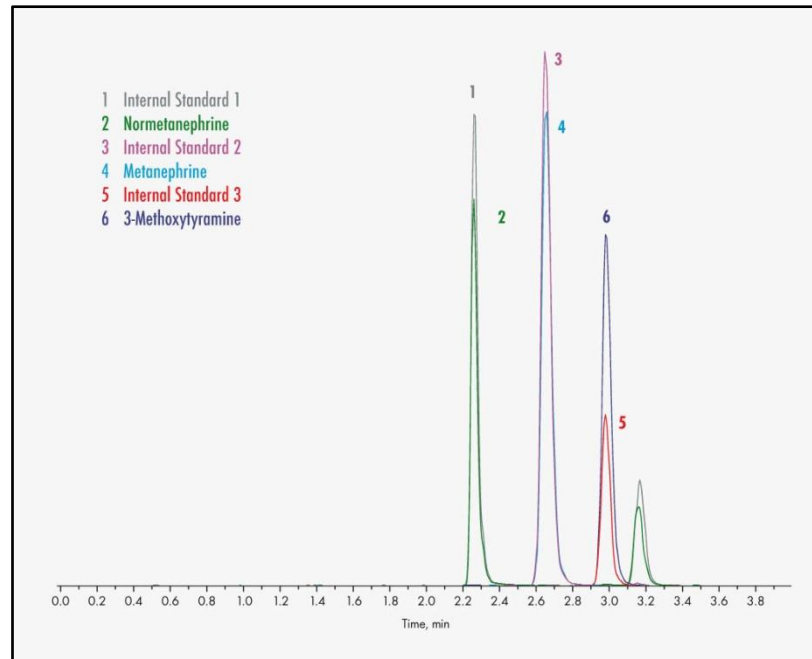
A1.

Κατεχολαμίνες, Ελεύθερες Μετανεφρίνες
και Σεροτονίνη στα ούρα



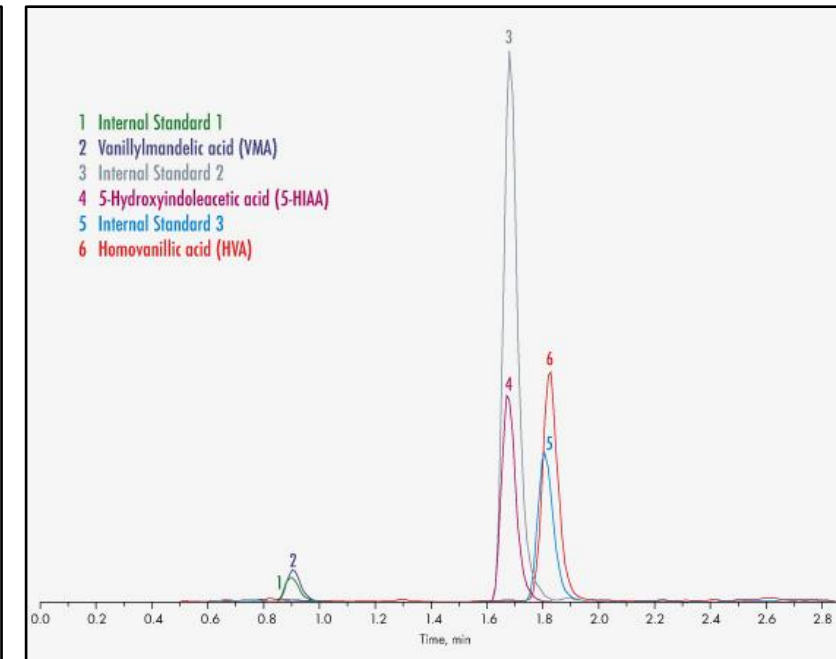
A2.

Ολικές Μετανεφρίνες
(Ελεύθερες + Συζευγμένες) στα ούρα



A3.

VMA, HVA, 5-HIAA στα ούρα



Βιογενείς Αμίνες (Biogenic Amines)

Β. Προσδιορισμός ελεύθερων μετανεφρινών στο πλάσμα



Καλύτερος βιοδείκτης σε σχέση με:

1. Μετανεφρίνες ούρων
2. Κατεχολαμίνες πλάσματος
(επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη)

- ✓ Πιο σταθερές ουσίες
- ✓ Εκκρίνονται σε συνεχή βάση
- ✓ Μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση φαιοχρωμοκυττώματος

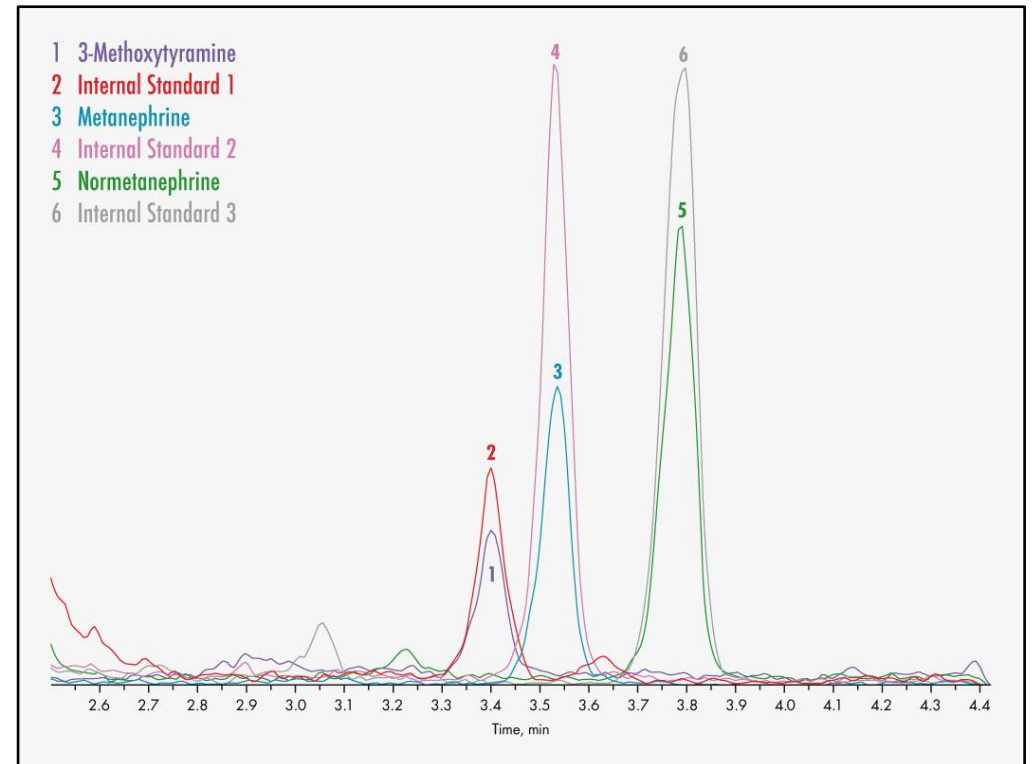


Table 1

Summary of the advantages and disadvantages of PMets compared with UMets. Adapted from [5].

Advantages PMets vs UMets

Reflect the free metadrenalines produced directly by tumours.
Samples are more convenient and reliable for patients to collect than 24 h urines.
Dietary and drug confounders are easier to control than in urine.
More useful in chronic kidney disease (CKD).

Disadvantages PMets vs UMets

Requirement for supine/fasted samples.
Greater analytical challenges (picomolar concentrations in a complex matrix necessitating extraction).
Sample instability (collected on ice, with prompt centrifugation and freezing).
Increased cost of clinic sampling.

Abbreviations: PMets - plasma free metadrenalines; UMets - total fractionated urine metadrenalines.

Table 2

Summary of the advantages and disadvantages of LC-MS/MS, LC-ECD and IA methods for PMets. Adapted from [10].

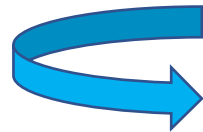
	LC-MS/MS	LC-ECD	IA
Advantages	<p>Minimal consumable costs.</p> <p>High sample throughput (facilitated by less stringent requirements for chromatographic separation). Simplified sample preparation.</p> <p>High analytical sensitivity. High analytical specificity with fewer interferences.</p> <p>Precise measurement of 3MT. High versatility of LC-MS/MS instruments. Kit methods and commercial calibrators / quality control materials available. Some of these are on-line.</p>	<p>Minimal consumable costs (in-house methods). More moderate capital cost of instrumentation.</p> <p>Relatively simple operation and troubleshooting (expertise implications). Some kit methods available with high consumable costs.</p> <p>Moderate analytical sensitivity. Chromatographic interferences can be identified. 3MT measurement possible.</p>	<p>Minimal instrumentation costs.</p> <p>Easy to set up kit methods.</p> <p>Minimal operator expertise required.</p>
Disadvantages	<p>High capital cost of instrumentation. Operator expertise required. Some laboratories need to develop in-house methods.</p> <p>High cost of kit methods.</p>	<p>Labour-intensive sample preparation. Susceptible to analytical interferences. Low sample throughput (long sample run times).</p>	<p>High costs of consumables for kit methods. Lengthy sample preparation / analysis times. Requires separate measurement of each metabolite.</p> <p>Interferences difficult to identify. Poor accuracy with negative bias and potential for false negatives. Poor analytical sensitivity. 3-MT measurement not possible (with implications for dopamine producing tumours, hereditary and metastatic disease).</p>

Abbreviations: IA - immunoassay; LC-ECD - liquid chromatography with electrochemical detection; LC- MS/MS - liquid chromatography tandem mass spectrometry; PMets - plasma free metadrenalines; 3MT- 3-methoxytyramine.

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

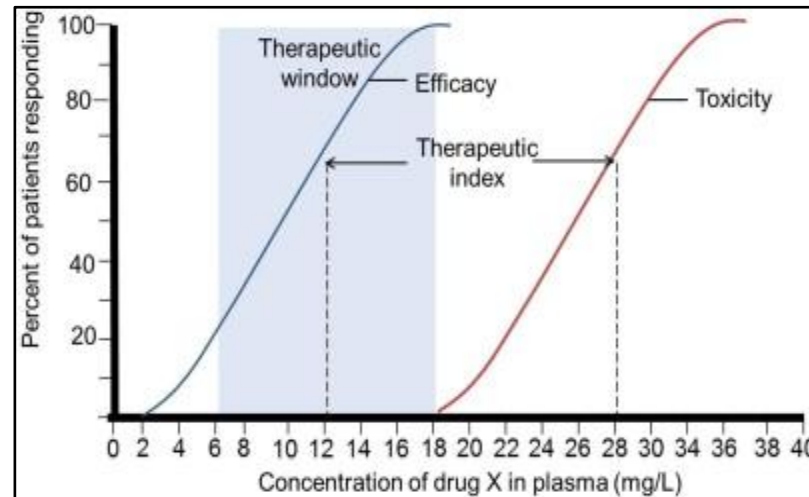
ΣΤΟΧΟΣ

Διατήρηση θεραπευτικών συγκεντρώσεων φαρμάκου στο αίμα



Μεγιστοποίηση θεραπευτικού αποτελέσματος

Ρύθμιση της δοσολογίας του φαρμάκου
ανάλογα με τα συμπτώματα



Αποτροπή εμφάνισης ανεπιθύμητων
παρενεργειών του φαρμάκου

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

CYCLOSPORIN, TACROLIMUS, SIROLIMUS, EVEROLIMUS, MYCOPHENOLIC ACID

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Η χορήγηση των ανοσοκατασταλτικών (η οποία έχει ξεκινήσει από το 1970) είναι απαραίτητη μετά την μεταμόσχευση ενός οργάνου ώστε να μην γίνει απόρριψη του μοσχεύματος.

Η παρακολούθηση των επιπέδων των ανοσοκατασταλτικών είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί η σωστή δοσολογία και να αποφευχθούν οι παρενέργειες της θεραπείας καθώς και η απόρριψη του μοσχεύματος

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Η χαμηλή δοσολογία και τα χαμηλά επίπεδα των ανοσοκατασταλτικών στο αίμα, αυξάνουν το ρίσκο απόρριψης του μοσχεύματος

Η υψηλή δόση και τα υψηλά επίπεδα ανοσοκατασταλτικών στο αίμα έχουν σοβαρές παρενέργειες και προκαλούν τοξικότητα στα νεφρά, στην καρδιά, στο νευρικό σύστημα, προκαλούν λοιμώξεις κλπ.

Η δοσολογία εξαρτάται από το είδος του μοσχεύματος, την ηλικία, και την παρουσία άλλων φαρμάκων στο αίμα του ασθενούς.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Η θεραπεία συνήθως περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο από τα ανοσοκατασταλτικά που χορηγούνται σήμερα (τα οποία είναι cyclosporin, tacrolimus, sirolimus, everolimus, mycophenolic acid).

Ο προσδιορισμός των ανοσοκατασταλτικών γίνεται στο ολικό αίμα διότι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των φαρμάκων δεσμεύεται στα ερυθροκύτταρα και στις πρωτεΐνες του πλάσματος (40-60% cyclosporin, 95% tacrolimus), ενώ το ελεύθερο είναι διαθέσιμο για δράση στα κύτταρα στόχο.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι

1) Ανοσοαναλύσεις

2) Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Οι ανοσοαναλύσεις για τα ανοσοκατασταλτικά είναι διαθέσιμες από το 1980, και αποτελούν μια φθηνή, γρήγορη και εύκολη λύση χωρίς απαιτήσεις στην χρήση τους για ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό

Το κύριο μειονέκτημα τους είναι οι **πολλές παρεμβολές** από ενεργούς και μη ενεργούς μεταβολίτες των φαρμάκων και άλλων ουσιών στο δείγμα των ασθενών οι οποίες δεν μπορεί να περιορισθούν.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ

Η τεχνολογία (LC-MS/MS) είναι υψηλότερης ακρίβειας και ειδικότητας από ότι οι ανοσοαναλύσεις διότι υπάρχουν πολύ λιγότερες πιθανές παρεμβολές από μεταβολίτες ή άλλες ουσίες στα δείγματα των ασθενών

Σήμερα, η LC-MS/MS είναι η «Gold Standard» τεχνική για τον προσδιορισμό των ανοσοκατασταλτικών.

Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού και η απαίτηση υψηλά εξειδικευμένου επιστημονικού προσωπικού για τον χειρισμό του.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΜΕΛΛΟΝ

Απόλυτη ανάγκη για τον ακριβή και υψηλής ειδικότητας προσδιορισμό των ανοσοκατασταλτικών

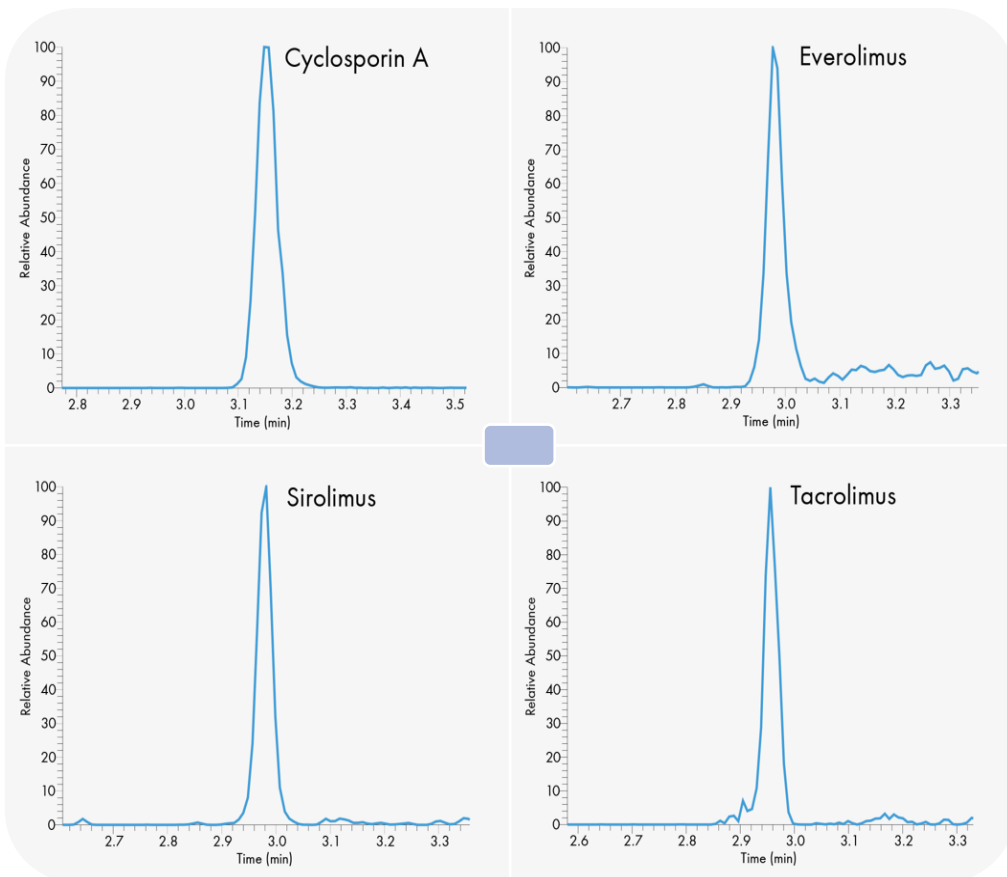
Ανάπτυξη υψηλής ειδικότητας αντισωμάτων για τον περιορισμό των παρεμβολών στις ανοσοαναλύσεις

Αυτοματοποίηση της τεχνολογίας LC-MS/MS

Ανάπτυξη πρωτοκόλλων για προσδιορισμό του ελεύθερου κλάσματος καθώς και για τον προσδιορισμό των ενδοκυττάρων επιπέδων (π.χ. στα λεμφοκύτταρα).

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ



ΕΦΑΡΜΟΓΗ

- ✓ Πρόληψη απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων
- ✓ Θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών

!!! Ποσοτικός προσδιορισμός μόνο με LC-MS !!!

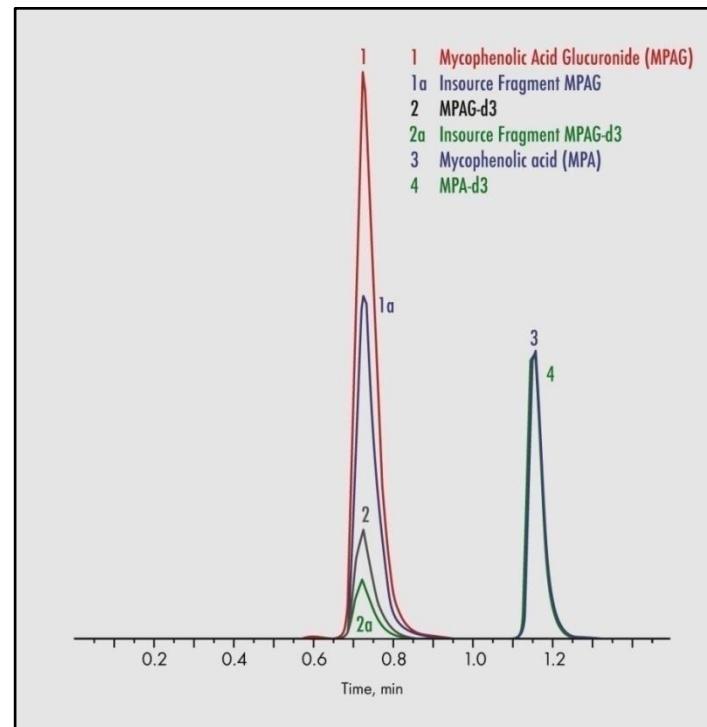
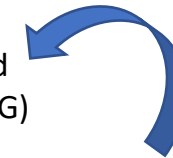
Ανοσοαναλύσεις έχουν μειωμένη ευαισθησία & ειδικότητα

- Ανιχνεύουν ανενεργούς μεταβολίτες των φαρμάκων
- Ισχυρή επίδραση μήτρας λόγω πολυπλοκότητας ολικού αίματος

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΜΥΚΟΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

Ανοσοκατασταλτικός παράγοντας



Αντιστρεπτή αντίδραση

Συνιστάται ο προσδιορισμός και των δύο παραμέτρων

Target Analytes

Mycophenolic Acid
Glucuronide (MPAG)

Mycophenolic Acid
(MPA)

- ✓ Πρόληψη απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνου
- ✓ Θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών
(Ψωρίαση, Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, Σκληρόδερμα)

ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (1/6)

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ

Ανοσοκατασταλτικά
σε ολικό αίμα

Cyclosporin A
Sirolimus
Everolimus
Tacrolimus

Ανοσοκατασταλτικά DUAL KIT
σε ολικό αίμα/πλάσμα

Ανοσοκατασταλτικά
σε ολικό αίμα
Cyclosporin A
Sirolimus
Everolimus
Tacrolimus

Μυκοφαινολικό οξύ
στο πλάσμα

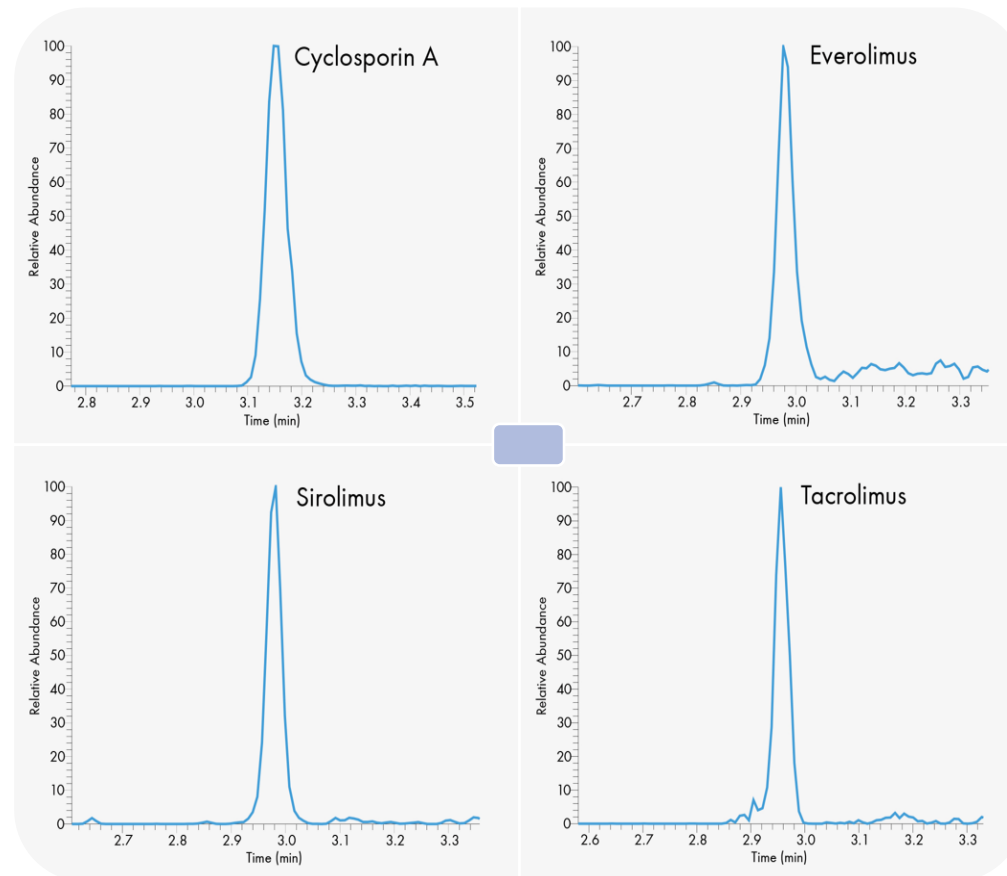
7. Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ

- ✓ Πρόληψη απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων
- ✓ Θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών

!!! Ποσοτικός προσδιορισμός μόνο με LC-MS !!!



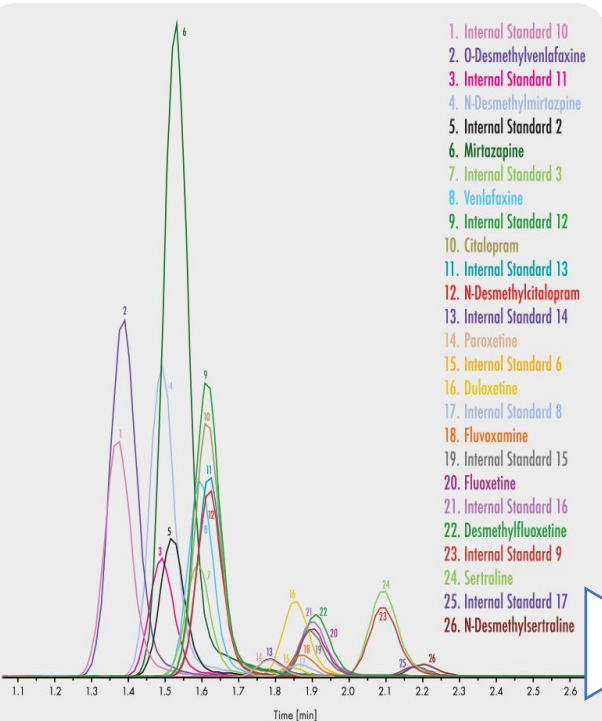
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

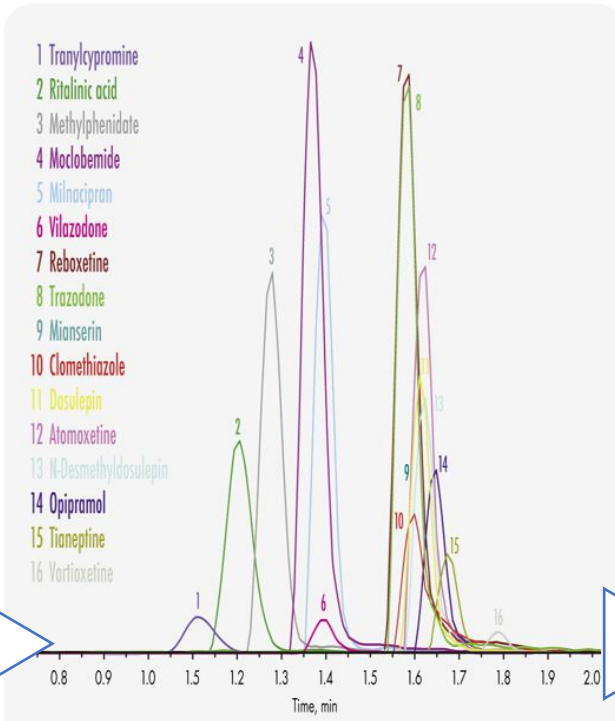
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ & ΨΥΧΟΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

➤ Περιλαμβάνει τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) και τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης - νοραδρεναλίνης (SSNRIs)

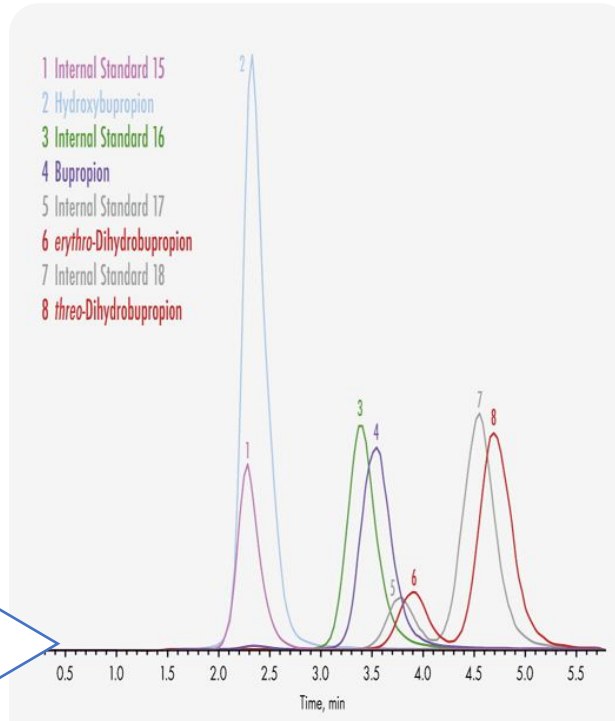
Αντικαταθλιπτικά 1



Αντικαταθλιπτικά 2 / Ψυχοδιεγερτικά (Group 1)



Αντικαταθλιπτικά 2 / Ψυχοδιεγερτικά (Group 2)



Target Analytes	
O-Desmethylvenlafaxine	Αντικαταθλιπτικά 1
N-Desmethylmirtazapine	
Mirtazapine	
Venlafaxine	
Citalopram	
N-Desmethylcitalopram	
Paroxetine	
Duloxetine	
Fluvoxamine	
Fluoxetine	
Desmethylfluoxetine	
Sertraline	
N-Desmethylsertraline	
Tranylcypromine	
Ritalinic acid	
Methylphenidate	
Moclobemide	
Milnacipran	
Vilazodone	
Reboxetine	
Trazodone	
Mianserin	
Clomethiazole	
Dosulepin	
Atomoxetine	
N-Desmethyldosulepin	
Opipramol	Αντικαταθλιπτικά 2 / Ψυχοδιεγερτικά (Group 2)
Tianeptine	
Vortioxetine	
Hydroxybupropion	
Bupropion	Αντικαταθλιπτικά 2 / Ψυχοδιεγερτικά (Group 2)
Erythro-Dihydrobupropion	
Threo-Dihydrobupropion	

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

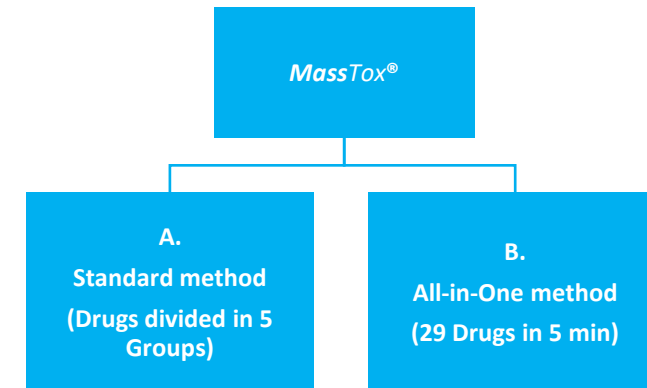
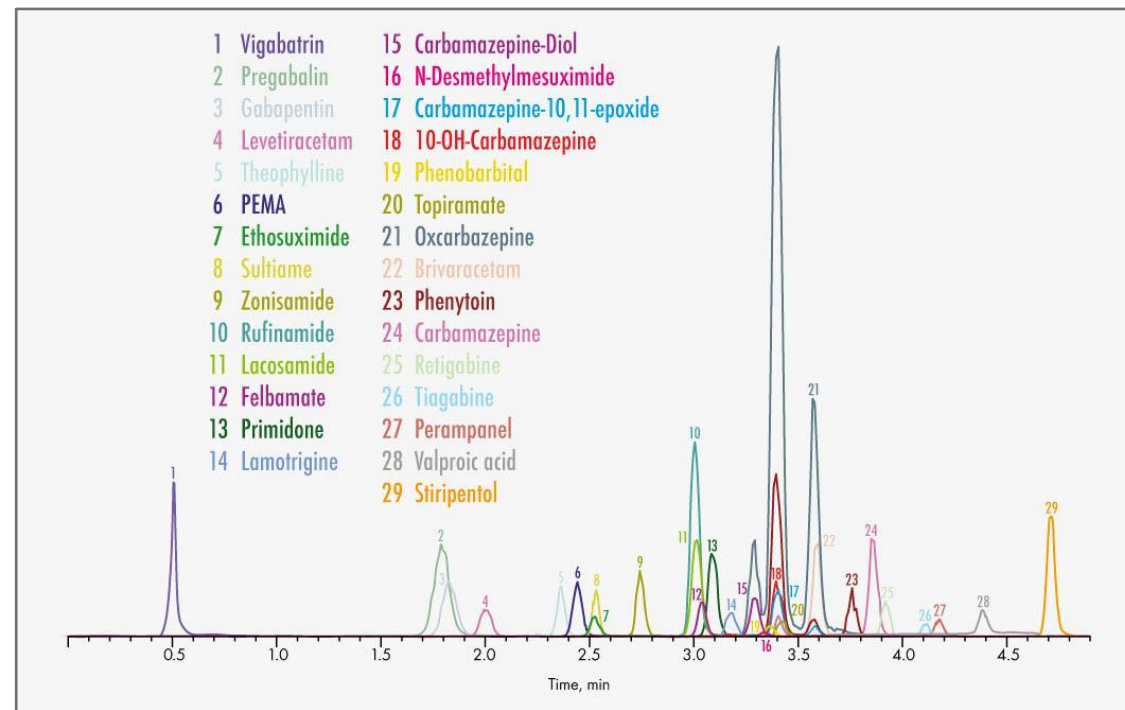
Ελέγχεται η συμμόρφωση του ασθενούς στην τήρηση της αγωγής



Καθορίζει το θεραπευτικό όφελος

Target Analytes	
Carbamazepine	Group 1
Carbamazepine 10,11-Epoxyde	
10-OH-Carbamazepine	
Oxcarbazepine	
10,11-Dihydroxycarbamazepine (Carbamazepine-diol)	Group 2
Felbamate	
Lacosamide	
Lamotrigine	
Levetiracetam	
Rufinamide	Group 3
Theophylline	
Gabapentin	
Pregabalin	
Sultiame	
Tiagabine	Group 4
Topiramate	
Vigabatrin	
Desmethylnesuximide	
Phenytoin	
Primidone	Group 5
PEMA	
Stiripentol	
Ethosuximide	
Phenobarbital	
Valproic Acid	
Zonisamide	

MassTox[®] Antiepileptic Drugs All-in-One Method



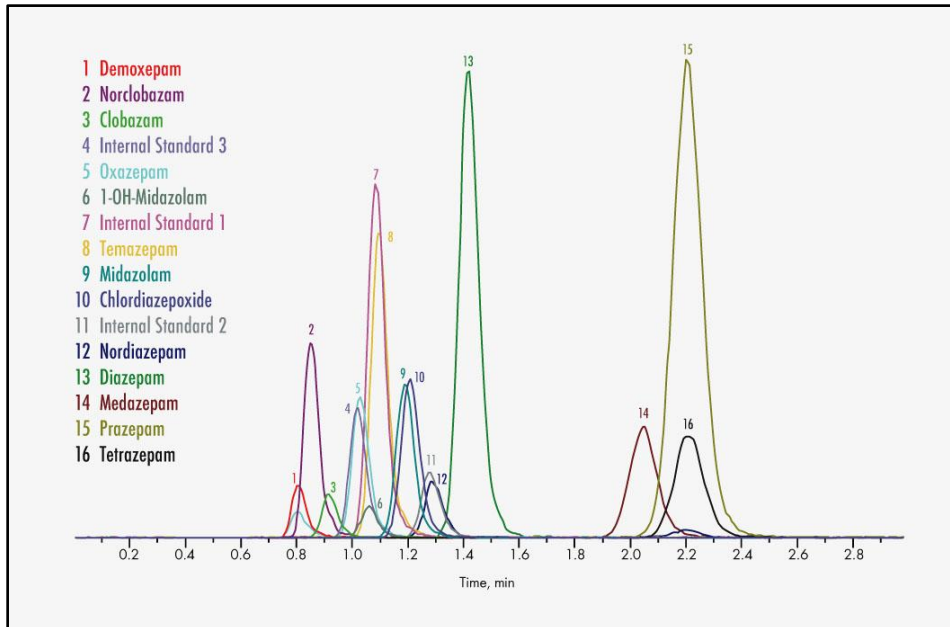
Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

BENZODIAZEPINES ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

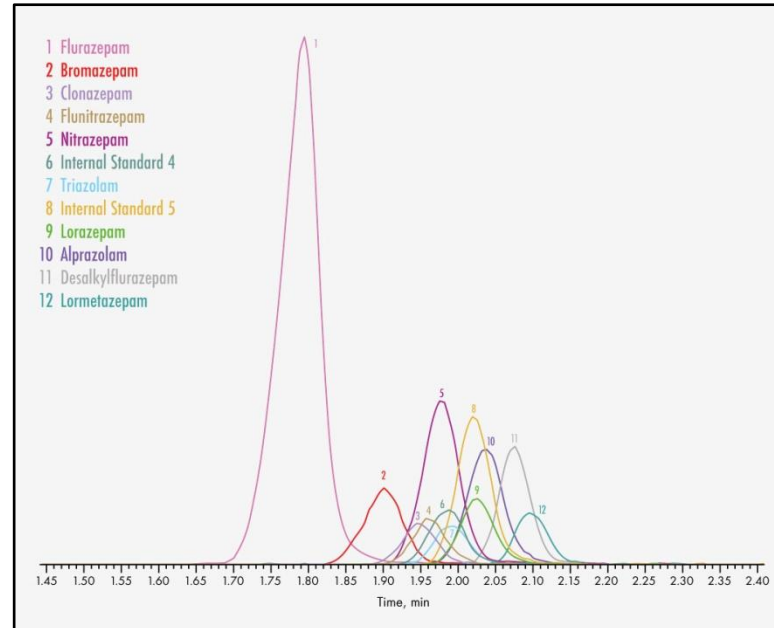
Χρειάζονται παρακολούθηση γιατί μπορεί να προκύψει υπερσυσσώρευση στο αίμα
(τοξική άθροιση φαρμάκου)

- ✓ Ο ρυθμός αποβολής τους από το πλάσμα παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση από λίγες ώρες (midazolam) έως αρκετές μέρες (clobazam)
- ✓ Οι μεταβολίτες των βενζοδιαζεπινών συχνά έχουν μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής από τις μητρικές ενώσεις

Benzodiazepines Group 1



Benzodiazepines Group 2

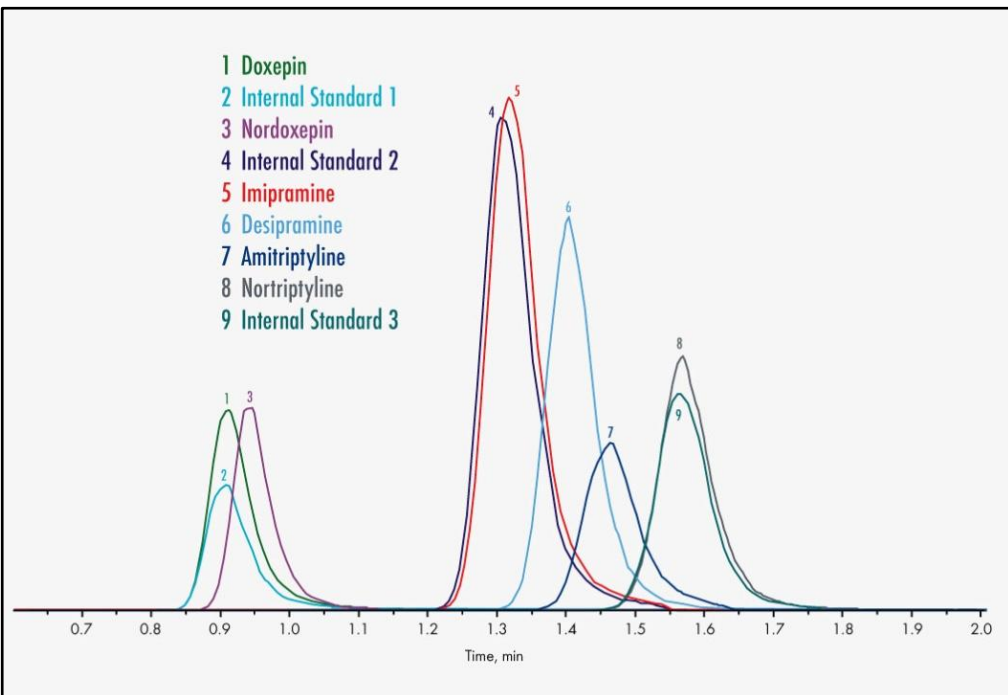


Target Analytes	
Demoxepam	Βενζοδιαζεπίνες 1
Norclobazam	
Clobazam	
Oxazepam	
1-OH-Midazolam	
Temazepam	
Midazolam	
Chlordiazepoxide	
Nordiazepam	
Diazepam	
Medazepam	
Prazepam	
Tetrazepam	Βενζοδιαζεπίνες 2
Flurazepam	
Bromazepam	
Clonazepam	
Flunitrazepam	
Nitrazepam	
Triazolam	
Lorazepam	
Alprazolam	
Desalkylflurazepam	
Lormetazepam	

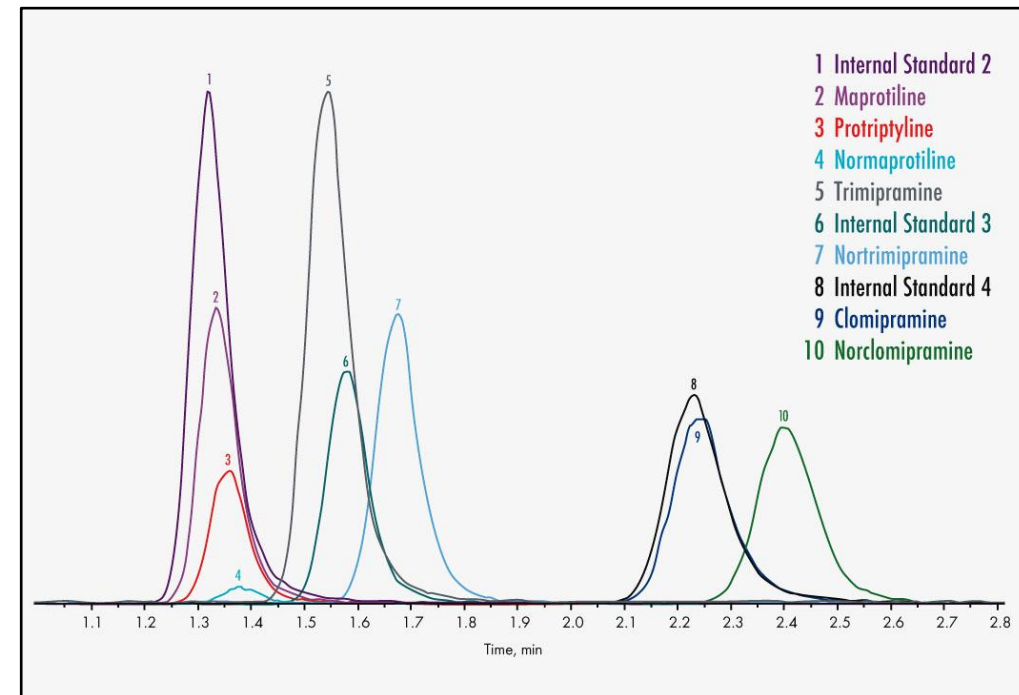
Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΤΡΙΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ (ΤΣΑ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

Tricyclic Antidepressants TCA 1



Tricyclic Antidepressants TCA 2



Target Analytes		
Doxepin	Group 1	
Nordoxepin		
Imipramine		
Desipramine		
Amitriptyline		
Nortriptyline		
Maprotiline		Group 2
Protriptyline		
Normaprotiline		
Trimipramine		
Nortrimipramine		
Clomipramine		
Norclomipramine		

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)



ΝΕΥΡΟΛΗΠΤΙΚΑ (ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΑ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

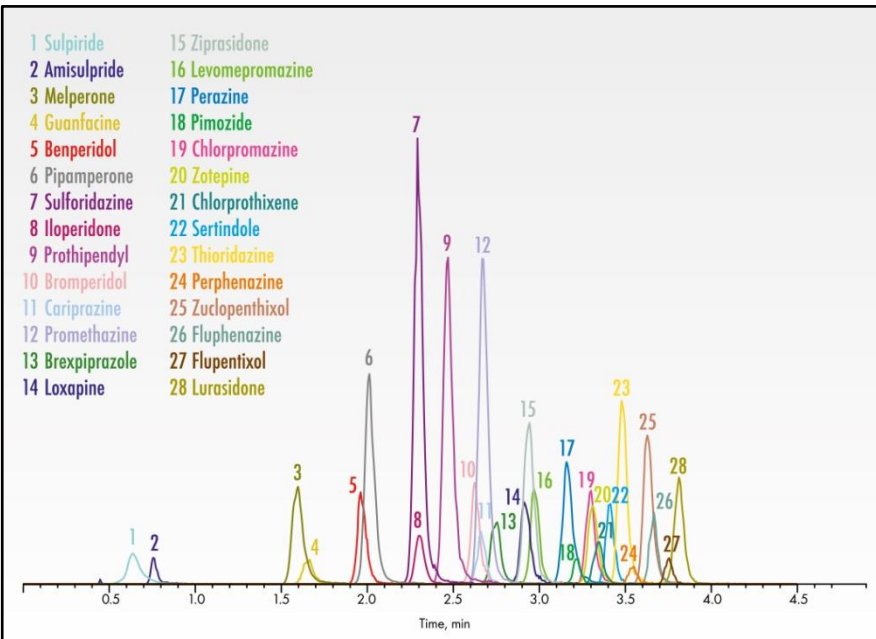
Εύρεση βέλτιστης δόσης

• Διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εν λόγω ασθενών (interindividual variability)

Τήρηση αγωγής

• Η ανεπαρκής συμμόρφωση των ασθενών συχνά θέτει σε κίνδυνο την ανταπόκριση στη θεραπεία

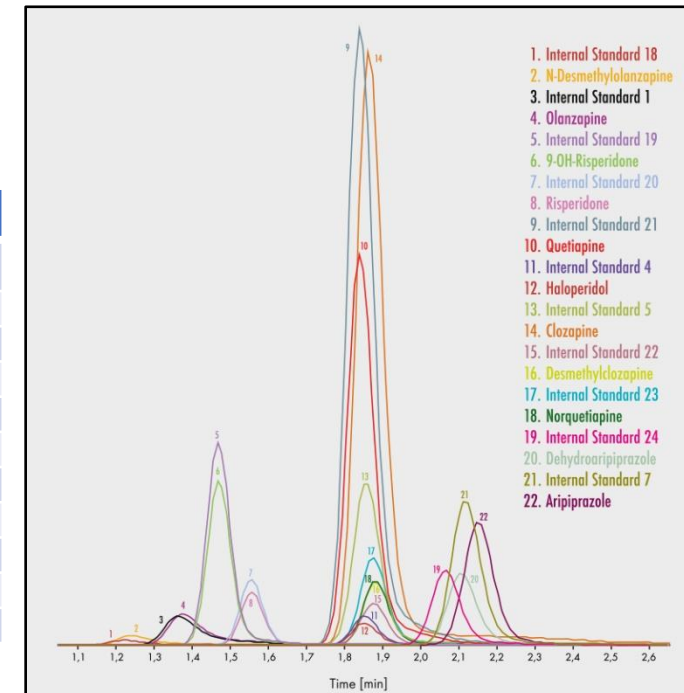
Neuroleptics Group 2



Target Analytes	
Sulpiride	Ziprasidone
Amisulpride	Levomepromazine
Melperone	Perazine
Guanfacine ADHD	Pimozide
Benperidol	Chlorpromazine
Pipamperone	Zotepine
Sulforidazine	Chlorprothixene
Iloperidone	Sertindole
Prothipendyl	Thioridazine
Bromperidol	Perphenazine
Cariprazine	Zuclopenthixol
Promethazine	Fluphenazine
Brexpiprazole	Flupentixol
Loxapine	Lurasidone

Target Analytes
N-Desmethyloanzapine
Olanzapine
9-OH-Risperidone
Risperidone
Quetiapine
Haloperidol
Clozapine
Desmethylchlozapine
Norquetiapine
Dehydroaripiprazole
Aripiprazole

Neuroleptics Group 1



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ, ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΙΚΑ, ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ

ΑΝΤΙΑΡΡΥΘΜΙΚΑ , ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ

THERAPEUTIC DRUG MONITORING KITS (2/6)

Anti-infective drugs

Antibiotics in plasma

- Amikacin
- Ceftazidime
- Ciprofloxacin
- Daptomycin
- Gentamicin
- Levofloxacin
- Linezolid
- Meropenem
- Streptomycin
- Teicoplanin
- Vancomycin

Antimycotics in plasma

- 5-Flucytosine
- Anidulafungin
- Caspofungin
- Fluconazole
- Hydroxy-Itraconazole
- Isavuconazole
- Itraconazole
- Ketoconazole
- Micafungin
- Posaconazole
- Voriconazole

Antituberculotics in plasma

- Ethambutol
- Isoniazid
- Rifampicin

ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (2/6)

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ (ΑΝΤΙΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ)

Αντιβιοτικά στο πλάσμα

- Amikacin
- Ceftazidime
- Ciprofloxacin
- Daptomycin
- Gentamicin
- Levofloxacin
- Linezolid
- Meropenem
- Streptomycin
- Teicoplanin
- Vancomycin

Αντιμυκητια(σι)κά στο πλάσμα

- 5-Flucytosine
- Anidulafungin
- Caspofungin
- Fluconazole
- Hydroxy-Itraconazole
- Isavuconazole
- Itraconazole
- Ketoconazole
- Micafungin
- Posaconazole
- Voriconazole

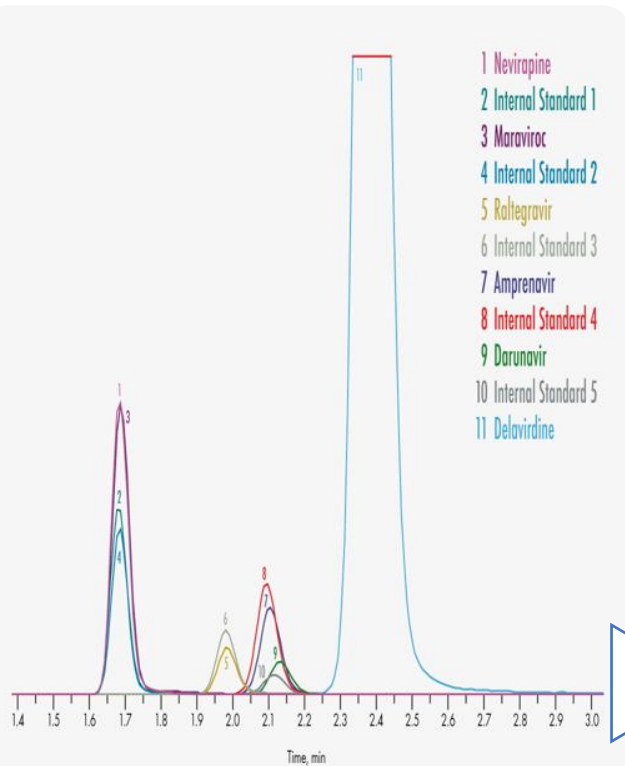
Αντιφυματικά στο πλάσμα

- Ethambutol
- Isoniazid
- Rifampicin

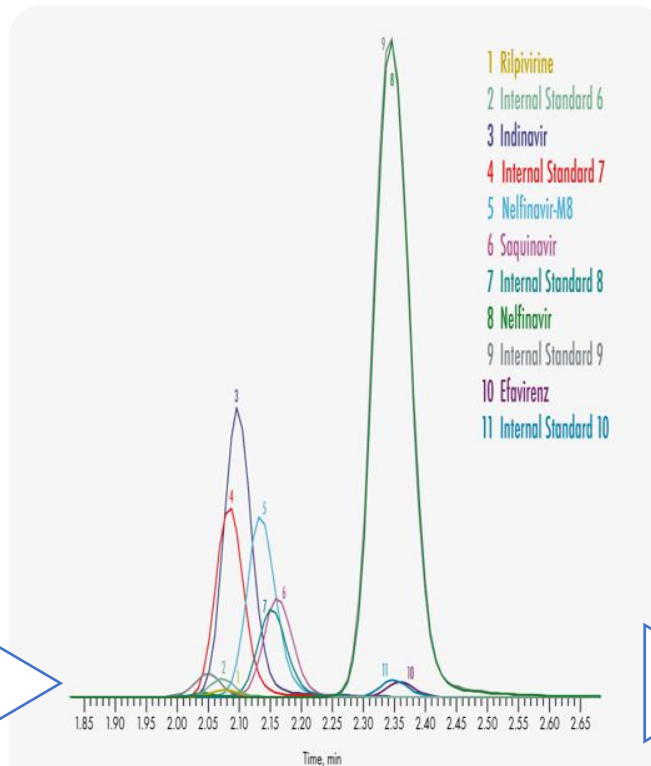
Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΑ (Anti-HIV) ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

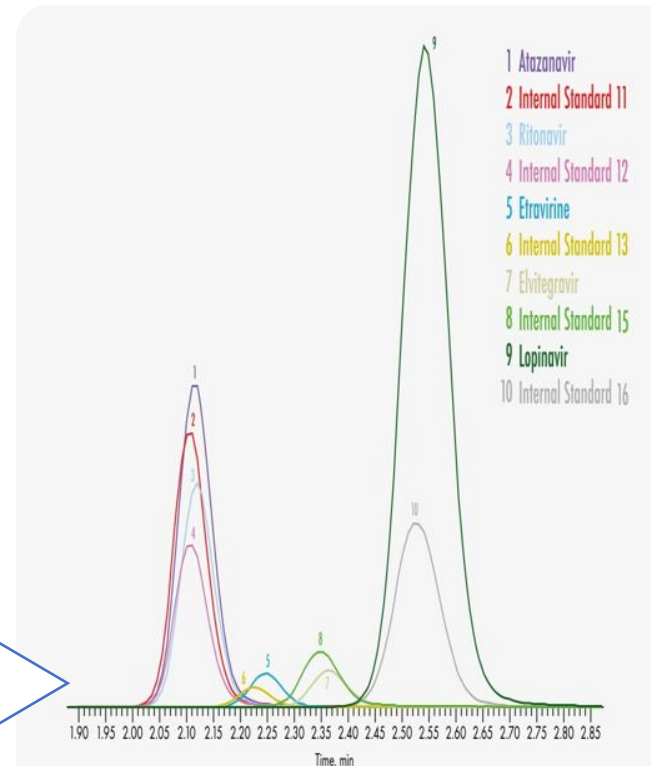
Anti-HIV Drugs Group 1



Anti-HIV Drugs Group 2



Anti-HIV Drugs Group 3

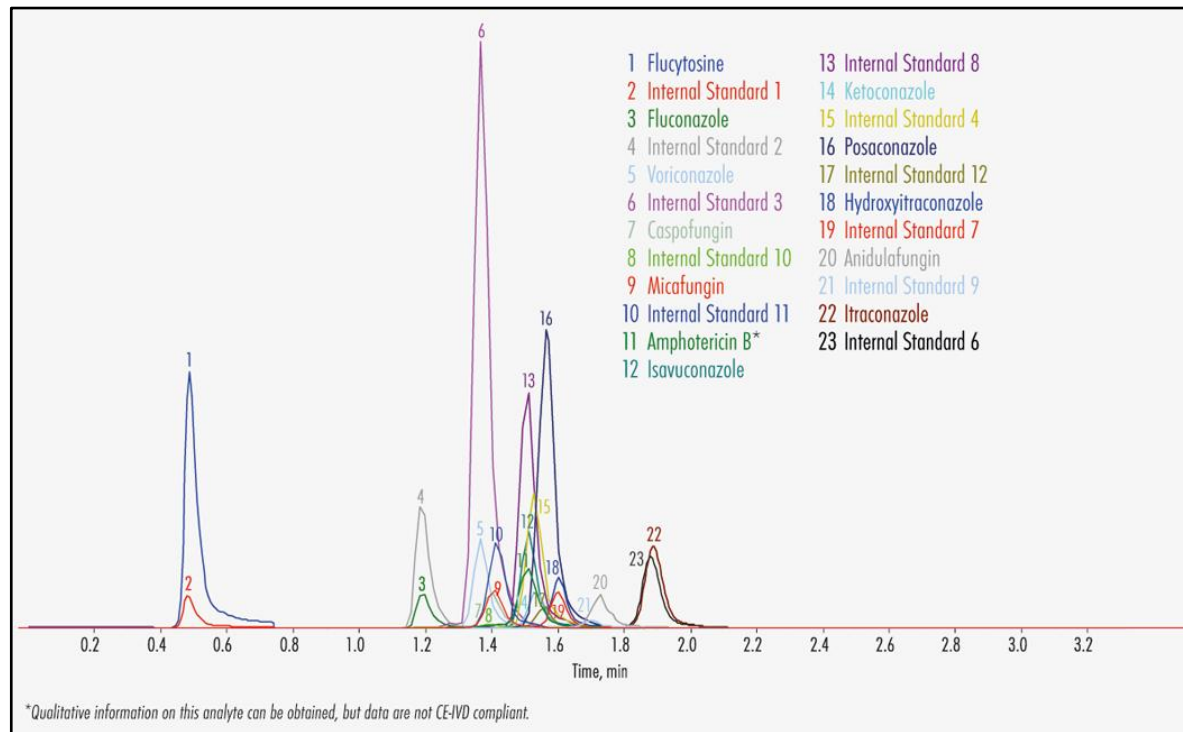


Target Analytes	
Nevirapine	Group 1
Maraviroc	
Raltegravir	
Amprenavir	
Darunavir	
Delavirdine	
Rilpivirine	Group 2
Indinavir	
Nelfinavir-M8	
Saquinavir	
Nelfinavir	Group 3
Efavirenz	
Atazanavir	
Ritonavir	
Tipranavir	
Etravirine	
Elvitegravir	
Lopinavir	

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

Οι μυκητιασικές λοιμώξεις αυξάνονται σταθερά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας του σταθερά αυξανόμενου αριθμού ανοσοκατασταλμένων ασθενών

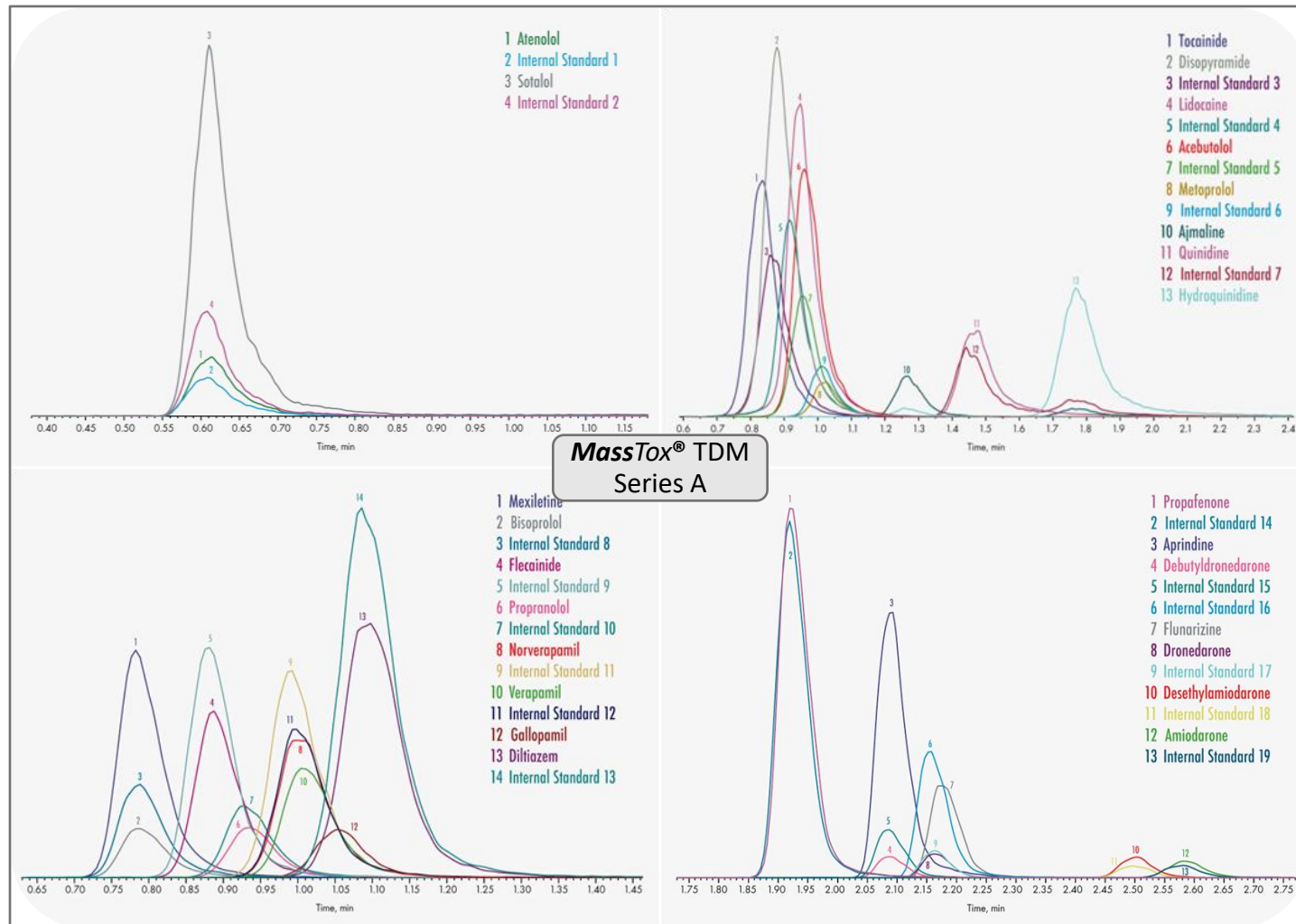


Target Analytes

Flucytosine
Fluconazole
Voriconazole
Caspofungin
Micafungin
Amphotericin B
Isavuconazole
Ketoconazole
Posaconazole
Hydroxyitraconazole
Anidulafungin
Itraconazole

Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)

ΑΝΤΙΑΡΡΥΘΜΙΚΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ



Target Analytes	
Atenolol	Group 1
Sotalol	
Tocainide	Group 2
Disopyramide	
Lidocaine	
Acebutolol	
Metoprolol	
Ajmaline	
Quinidine	
Hydroquinidine	
Mexiletine	
Bisoprolol	
Flecainide	
Propranolol	
Norverapamil	
Verapamil	
Gallopamil	
Diltiazem	Group 4
Propafenone	
Aprindine	
Debutyl-dronedaron	
Flunarizine	
Dronedaron	
Desethylamiodarone	
Amiodarone	

ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (6/6)

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Tamoxifen/Endoxifen
στο πλάσμα

Ronatinib
στο πλάσμα

Irinotecan/7-Ethyl-10-
Hydroxycamptothecin (SN38)
στο πλάσμα

Προσδιορισμός του ρυθμού
αποικοδόμησης της
5-Φθοριοουρακίλης (5-FU)
στα PBMCs*

*Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ex-vivo προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του φαρμάκου 5-Φθοριοουρακίλη (5-FU) από τα PBMCs, προκειμένου να προβλεφθεί ο κίνδυνος τοξικότητας για έναν ασθενή ΠΡΙΝ την χορήγηση της θεραπείας

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ/ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ LC-MS/MS

- **ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

- Υψηλή ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα, ταχύτητα, χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων, προσδιορισμός πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα σε ένα δείγμα

- **ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

- Υψηλό κόστος εξοπλισμού, απαιτείται εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό για την χρήση του εξοπλισμού

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Seger C, Salzman L. After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clin Biochem*. Aug 2020;82:2-11. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.03.004
2. Casals G, Hanzu FA. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? *Ann Lab Med*. Jul 2020;40(4):285-296. doi:10.3343/alm.2020.40.4.285
3. Haddad RA, Giacherio D, Barkan AL. Interpretation of common endocrine laboratory tests: technical pitfalls, their mechanisms and practical considerations. *Clin Diabetes Endocrinol*. 2019;5:12. doi:10.1186/s40842-019-0086-7
4. Alonso N, Zelzer S, Eibinger G, Herrmann M. Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcif Tissue Int*. Mar 3 2022;doi:10.1007/s00223-022-00961-5
5. Athimulam S, Grebe S, Bancos I. Steroid profiling in the diagnosis of mild and overt Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Jan 2021;35(1):101488. doi:10.1016/j.beem.2021.101488
6. Dirks NF, Ackermans MT, Lips P, et al. The When, What & How of Measuring Vitamin D Metabolism in Clinical Medicine. *Nutrients*. Apr 13 2018;10(4)doi:10.3390/nu10040482
7. Rahme M, Al-Shaar L, Singh R, et al. Limitations of platform assays to measure serum 25OHD level impact on guidelines and practice decision making. *Metabolism*. Dec 2018;89:1-7. doi:10.1016/j.metabol.2018.09.003
8. Galior K, Ketha H, Grebe S, Singh RJ. 10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency. *Bone Rep*. Jun 2018;8:268-273. doi:10.1016/j.bonr.2018.05.003

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9. Y. Zhang, R. Zhang, Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 81–94. <https://doi.org/10.1002/dta.2290>.
10. M. Pugeat, I. Plotton, A.B. De La Perrière, G. Raverot, H. Déchaud, V. Raverot, Hyperandrogenic states in women: Pitfalls in laboratory diagnosis, *Eur. J. Endocrinol.* 178 (2018) R141–R154. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0776>.
11. W.D. Fraser, J.C.Y. Tang, J.J. Dutton, I. Schoenmakers, Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged, Developments Have Variable Outcomes, *Calcif. Tissue Int.* 106 (2020) 3–13. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00620-2>.
12. N. Alonso, S. Zelzer, G. Eibinger, M. Herrmann, Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance, *Calcif. Tissue Int.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00961-5>.
13. K. Rueter, L.J. Black, A. Jones, M. Bulsara, M.W. Clarke, C. Gamez, E.M. Lim, D.J. Palmer, S.L. Prescott, A. Siafarikas, Analytical bias in the measurement of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations in infants, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijerph17020412>.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

14. N. Zahr, H. Duce, J. Duffy, C. Webster, K.M. Rentsch, Interlaboratory comparison study of immunosuppressant analysis using a fully automated LC-MS/MS system, *Clin. Chem. Lab. Med.* 60 (2022) 1753–1762. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-1340>.
15. T. Tuzimski, A. Petruczynik, Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM), *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25174026>.
16. S.L. Davies, A.S. Davison, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for plasma metadrenalines, *Clin. Chim. Acta.* 495 (2019) 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.024>.
17. A. Tripathi, M. Ansari, P. Dandekar, R. Jain, Analytical methods for 25-hydroxyvitamin D: advantages and limitations of the existing assays, *J. Nutr. Biochem.* 109 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109123>



LC-MS/MS ΣΤΟ ΚΤΙΡΙΟ «ΑΚΙΣΑ» Π.Γ.Ν. ΑΤΤΙΚΟΝ

- Χρηματοδότηση από το ΕΚΠΑ, μέσω των Προγραμμάτων Δημοσίων Επενδύσεων για το κτίριο ΑΚΙΣΑ του Π.Γ.Ν. «Αττικόν»

Εγκατάσταση πρωτοκόλλων αρκετών διαγνωστικών αναλύσεων

Χ.Βελεσιώτης, Υποψήφιος διδάκτωρ, Υπότροφος ΕΛΙΔΕΚ

Επιβλέπουσα: Καθ. Π. Μουτσάτσου

Συν-επιβλέποντες: Καθ. Δ. Μπούμπας

Καθ. Ν. Θωμαΐδης