ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗ ΣΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΜΕ ΞΗΡΑΜΕΝΕΣ ΚΗΛΙΔΕΣ ΑΙΜΑΤΟΣ (DRIED BLOOD SPOTS, DBS)

Ντότσικας Ιωάννης[1], Καραλής Ευάγγελος[2], Νταουσάνη Χρύσα[1]
1Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
e-mail: idotsik@pharm.uoa.gr

Περίληψη

Οι ξηραμένες κηλίδες αίματος (Dried Blood Spots, DBS) συνιστούν την πιο σύγχρονη εκδοχή βιολογικού δείγματος. Δημιουργούνται από την απόθεση αρτηριακού ή φλεβικού αίματος επί ειδικού προσροφητικού χαρτιού και τη φυσική ξήρανση της σχηματιζόμενης κηλίδας. Η ανάλυση πραγματοποιείται, συνήθως, επί ενός δίσκου που αποσπάται από την κηλίδα με ειδική διατρητική συσκευή. Παρά τη χρήση τους επί δεκαετίες στον νεογνικό έλεγχο, το έναυσμα για τη γενικευμένη αξιοποίησή τους αντί του «κλασικού» πλάσματος/ορού έδωσε η ανάπτυξη της τεχνολογίας των φασματομέτρων μαζών. Ως συνέπεια, τα τελευταία 15 χρόνια υπάρχει μία διαρκώς αυξανόμενη ενασχόληση με το συγκεκριμένο τύπο δείγματος και πληθώρα δημοσιεύσεων με φαρμακοκινητικό, τοξικολογικό και νεογνικό ενδιαφέρον.

Ένας από τους κυριότερους προβληματισμούς σχετικά με τα DBS αποτελεί το φαινόμενο του αιματοκρίτη, καθώς διαφορετικός αιματοκρίτης οδηγεί, λόγω διαφορετικού ιξώδους, σε διαφορετική έκταση μετατόπισης του αίματος και διαφορετικό, τελικά, μέγεθος κηλίδας. Με δεδομένο πως η ποσοτικοποίηση γίνεται με καμπύλη βαθμονόμησης που έχει κατασκευαστεί με πρότυπα διαλύματα συγκεκριμένου αιματοκρίτη, καθίσταται σαφές πως ο προσδιορισμός αγνώστων δειγμάτων διαφορετικού αιματοκρίτη ξεκινά εξ' αρχής με ένα ποσοστό σφάλματος.

Για την αντιμετώπιση του φαινομένου έχει προταθεί μία σειρά από λύσεις, όπως αξιοποίηση όλης της κηλίδας, εφαρμογή ειδικού διηθητικού χαρτιού που δεν αντιμετωπίζει αντίστοιχο πρόβλημα και διόρθωση των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων με κατάλληλο συντελεστή.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιούνται υπολογιστικές μέθοδοι με σκοπό να διερευνηθεί με ποσοτικό τρόπο η επίδραση του αιματοκρίτη στις τιμές των επιπέδων διαφόρων βιολογικών δεικτών ή φαρμάκων σε ενήλικες. Στα πλαίσια αυτά αναπτύχθηκε ένας κώδικας σε γλώσσα R® που: α) μοντελοποιεί το % σχετικό σφάλμα σε σχέση με τον αιματοκρίτη, β) πραγματοποιεί προσομοιώσεις Monte Carlo σε ένα πληθυσμό ανδρών και γυναικών με σκοπό την ποσοτικοποίηση του % σχετικού σφάλματος σε σχέση με τον αιματοκρίτη που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση της αναλυτικής τεχνικής.

Λέξεις-Κλειδιά: φαινόμενο αιματοκρίτη, DBS, κηλίδες αίματος, υπολογιστικές προσομοιώσεις, μοντελοποίηση

Abstract

Dried blood spots (DBS) are the most modern version of biological samples. They are created by the placement of arterial or venous blood on special paper and the physical drying of the formed spot. The analysis is usually performed on a disk that is removed from the spot by a special punching device. Despite their use for decades in neonatal screening, the challenge of generalized use instead of "classical" plasma /serum has become feasible thanks to mass spectrometry technology. As a result, over the last 15 years there has been an increasing concern with this type of sample and a multitude of publications with pharmacokinetic, toxicological and neonatal significance.
One of the main concerns about DBS is the hematocrit effect, as different hematocrit values lead, due to different viscosity, to a different extent of blood displacement and different, eventually, spot size. Given that quantification is done with a calibration curve constructed with standard solutions of a particular hematocrit, it becomes clear that the determination of unknown samples of different hematocrit starts with a % error at the outset.
To address the phenomenon, a series of solutions have been proposed, such as the use of the entire spot, the application of a special filter paper that does not encounter a corresponding problem, and the correction of the determined concentrations with an appropriate coefficient.
In the present study, computational methods were used to quantitatively investigate the effect of hematocrit on the levels of various biological markers or drugs in adults. In this context, a R® language code was developed that: a) models the% relative error with respect to the hematocrit; b) performs Monte Carlo simulations in a population of men and women in order to quantify the relative error relative to the hematocrit which was used to calibrate the analytical technique.

Keywords: haematocrit effect, DBS, blood spots, computational simulations, modelling

1. Εισαγωγή

Η χρήση των DBS έχει επεκταθεί ευρέως σε βιοαναλυτικές δοκιμασίες ως αξιόπιστη εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών υγρών βιολογικών δειγμάτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα σημαντικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα DBS έναντι αυτών των δειγμάτων.
Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα που συνδέονται με αυτήν την εναλλακτική στρατηγική δειγματοληψίας, εξακολουθούν να υπάρχουν διάφορες προκλήσεις. Πράγματι, οι ανησυχίες σχετικά με τα αποξηραμένα δείγματα συχνά σχετίζονται με την ομοιογένεια του δείγματος, την επίδραση της θέσης απόσπασης του δίσκου, τη συνέπεια της απόδοσης του χαρτιού προσρόφησης και τις επιδράσεις επί της χρωματογραφίας. Ωστόσο, το πιο σημαντικό ζήτημα είναι, χωρίς αμφιβολία, το λεγόμενο φαινόμενο αιματοκρίτη (Ht), καθώς οι ισχυρές αποκλίσεις των τιμών του αιματοκρίτη μπορεί να επηρεάσουν

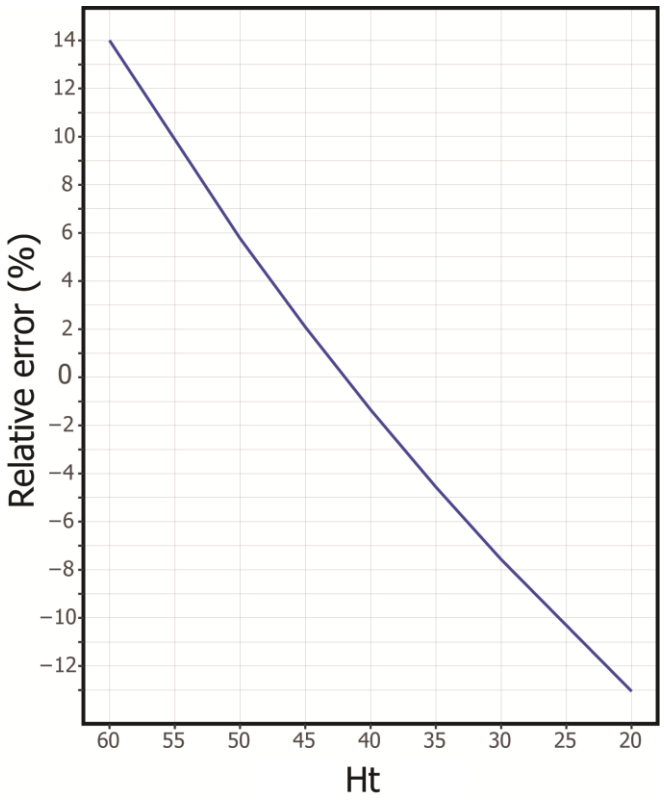
σημαντικά την ποσοτικοποίηση σε δείγματα DBS και, συνεπώς, να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα.
Διαφορετικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση της εξαρτώμενης από το Ht εξάπλωσης του αίματος στο χαρτί-υπόστρωμα έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία. Στην παρούσα εργασία, επιδιώκεται η πρόταση ενός σαφώς καθορισμένου πλαισίου για τη διόρθωση της επίδρασης του Ht σε αναλύσεις με DBS που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες ενηλίκων, εφαρμόζοντας συγκεκριμένους συντελεστές διόρθωσης (δηλαδή εξισώσεις που ενσωματώνουν διορθώσεις του λάθους μέσω συσχέτισης του Ht με μια φυσική παράμετρο) για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων των άγνωστων δειγμάτων.

2. Μεθοδολογία

Αρκετοί μαθηματικοί τύποι έχουν προταθεί στο παρελθόν προκειμένου να διορθωθεί το σφάλμα που οφείλεται στο φαινόμενο Ht. Όλες αυτές οι εξισώσεις είναι γραμμικού τύπου και συσχετίζουν την εξαρτημένη μεταβλητή με τη μετρούμενη τιμή Ht του υποκειμένου. Όπου χρησιμοποιήθηκε το εμβαδό της κηλίδας η εκτίμηση έγινε σχετικά εύκολα με ανάλυση εικόνας (image analysis).
Για να εκτιμηθεί ποσοτικά η επίδραση του Ht στις μετρήσεις DBS, αναπτύχθηκε μια υπολογιστική προσέγγιση η οποία χωρίστηκε σε δύο βασικά μέρη: Α) απλή μοντελοποίηση και Β) προσομοιώσεις Monte Carlo και δημιουργία εικονικού πληθυσμού ανδρών και γυναικών με διαφορετικά επίπεδα Ht. Ολόκληρη η εργασία υπολογισμού υλοποιήθηκε με τη δημιουργία των κατάλληλων σεναρίων στη γλώσσα R®.

3. Αποτελέσματα

Η παράθεση του % σχετικού σφάλματος (%RE) συναρτήσει του αιματοκρίτη των δειγμάτων, θεωρώντας ως τιμή αιματοκρίτη της καμπύλης βαθμονόμησης φαίνεται στην Εικόνα 1.
Από το συγκεκριμένο διάγραμμα είναι σαφές πως τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης (μπλε γραμμή) δείχνουν ότι το% σχετικό σφάλμα ανά τιμές Ht κυμαίνεται από -13,0 έως 14,00% για την επιλεγμένη περιοχή Ht 20-60%. Τα σφάλματα ειδικά στις ακραίες τιμές αιματοκρίτη είναι πολύ σημαντικά και δεν μπορούν να αγνοηθούν. Επομένως, απαιτείται διόρθωσή τους.
Αυτό που μπορεί να προταθεί, είναι για τις περιπτώσεις που οι τιμές του αιματοκρίτη των δειγμάτων είναι πλησίον της τιμής αιματοκρίτη της καμπύλης, το πολύ μικρό σφάλμα να αγνοείται, δεδομένης της ανοχής (± 15%) που δίνεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες στην επιτρεπόμενη απόκλιση από την τιμή αναφοράς για τα δείγματα καμπύλης βαθμονόμησης και ελέγχου ποιότητας (QCs).



Εικόνα 1: Συσχέτιση %RE με τον αιματοκρίτη

Όσον αφορά το επιτρεπόμενο σφάλμα, με προσομοιώσεις Monte Carlo θεωρήθηκε πως ένα λογικό %RE που μπορεί να γίνει ανεκτό είναι 3%. Σε αυτή την περίπτωση, με εικονικό πληθυσμό 50% ανδρών και 50% γυναικών, είναι δυνατό να αγνοηθεί το φαινόμενο του αιματοκρίτη για τιμές Ht στο διάστημα 37,47 – 46,27, όπου πράγματι ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού ανήκει.
Επομένως, έχει μεγάλη σημασία η σωστή επιλογή της τιμής του αιματοκρίτη της καμπύλης βαθμονόμησης ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα διόρθωσης.

4. Συμπεράσματα

Η διαρκώς αυξανόμενη χρήση των DBS στη βιοανάλυση επιβάλει την πρόταση λύσεων για την αντιμετώπιση του κυριότερου προβλήματος, αυτό της επίδρασης του αιματοκρίτη. Η λογική που προτάσσεται με την παρούσα εργασία είναι της αγνόησης του φαινομένου για τις τιμές του αιματοκρίτη πλησίον της τιμής Ht της καμπύλης βαθμονόμησης.

5. Βιβλιογραφία

1. Guthrie, R.; Susi, A. Pediatrics 1963, 32, 338-343.
2. Kostić, N.; Dotsikas, Y.; Jović, N.; Stevanović, G.; Malenović, A.; Medenica, M. J Pharm Biomed Anal. 2015, 10, 79-84.

3. Denniff, P.; Spooner, N. Bioanalysis 2010, 2(8), 1385-1395.
4. de Kesel, P. M. M.; Sadones, N.; Capiau, S.; Lambert, W. E.; Stove, C. P. Bioanalysis 2013, 5(16), 2023-2041.
5. Abu-Rabie, P.; Denniff, N.; Spooner, J.; Brynjolffssen, P.; Galluzzo, G.; Sanders, G. Anal. Chem. 2011, 83, 8779-8786.