

**VELOCITA' DI DEGRADAZIONE DEL 5-FLUOROURACILE IN CELLULE
MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO (PBMC) IN LC-MS/MS**
Codice LC85010

Prodotto sviluppato in collaborazione con l'Azienda ospedaliero-universitaria Sant'Andrea di Roma

BIOCHIMICA

Il Fluoro uracile (5-FU) è attualmente considerato il più efficace ed utilizzato agente antineoplastico per il trattamento di tumori del tratto gastrointestinale, del seno, delle ovaie.

Il 5-FU è un analogo dell'uracile e agisce come antagonista pirimidinico.

Il metabolismo di questo farmaco interferisce con il normale metabolismo della pirimidina e quindi necessita di essere incorporato a livello nucleotidico al fine di esercitare il suo effetto.

Il 5-FU svolge la sua funzione principalmente agendo da antagonista alla Timidilato Sintetasi (TS).

La sua conversione a 5-Fluoro-2'-deossi-5'-monofosfato (FdUMP) porta all'inibizione della TS bloccando in questo modo la sintesi del DNA e quindi interrompendo tutto il processo trascrizionale e la sintesi proteica.

La grande efficacia di questo farmaco però va di pari passo al suo basso indice terapeutico.

Il 5-FU è catabolizzato principalmente dall'enzima Diidropirimidina Deidrogenasi e pazienti con completo o parziale deficit funzionale di questo enzima rischiano di sviluppare effetti collaterali, come tossicità cardiaca, mielosoppressione e blocco renale.

Il presente metodo permette di monitorare il grado di tolleranza del paziente al farmaco ancor prima che venga sottoposto a terapia con 5FU.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE del 27/10/1998 e del D.L. n.332 del 08/09/2000 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 005	Velocità di degradazione del 5-FLUOROURACILE SU PBMC IN LC-MS/MS	06/2025
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Il presente metodo consente di determinare, *ex-vivo*, la velocità di degradazione del farmaco 5-fluorouracile (5-FU). Dopo purificazione di linfociti da sangue periferico, le cellule vengono incubate con una quantità nota di 5-FU, e la quantità di farmaco metabolizzata dopo 2 ore viene determinata mediante LC-MS/MS.

<u>Recupero del Metodo:</u>	100 %
<u>Accuratezza:</u>	>85%
<u>Precisione:</u>	5.2 %
<u>LOD:</u>	0,0625 µg/ml
<u>LOQ:</u>	0,156 µg/ml
<u>Linearità del Metodo:</u>	0,0635 – 40 µg/ml
<u>Valutazione della velocità di degradazione (V_d):</u>	ng/ml/min/milione di cellule
<u>Interpretazione del risultato:</u>	V_d minore di 0.68 = deficit grave V_d compresa tra 0.68 e 1.12 = deficit moderato V_d compresa tra 1.12 e 1.36 = deficit lieve V_d compresa tra 1.36 e 1.9 = normale V_d maggiore di 1.9 = metabolizzatore rapido

Contenuto della confezione :

Reagente A – Soluzione Diluente, 2 x 300 ml

Reagente B – Soluzione Estraente, 2 x 500 ml

**Reagente C – Standard Chimico, 1 x 3 ml
(50 µg/ml)**

Calibratore liofilo su siero – Livello 0, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 1, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 2, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 3, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 4, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 5, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo su siero – Livello 6, 1 x 1 ml

Reagente D – Soluzione Standard Interno, 1 x 20 ml

Reagente E – Soluzione Stabilizzante, 1 x 10 ml

Reagente M1 – Fase mobile A, 1 x 500 ml

Reagente M2 – Fase mobile B, 1 x 500 ml

Provetta SepMate 50 pezzi

**Una volta aperto conservare a 2-8°C
Conservare a -20°C**

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a -20°C

Conservare a Temperatura ambiente

Dotazione strumentale minima richiesta:

Centrifuga per falcon da 50 ml
Contatore linfociti
Agitatore con incubazione a temperatura controllata
Sistema LC-MS/MS
ESI positivo

Modalità di prelievo ematico:

2 provette da 7.5 ml con anticoagulante EDTA, da processare in giornata.

COSTRUZIONE DELLA RETTA DI TARATURA E CALIBRAZIONE DELLA SEDUTA ANALITICA

FASE 1: Preparare 7 provette coniche di tipo eppendorf, denominarle C0; C1; C2; C3; C4; C5; C6 e dispensare:

	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Calibratore liofilo su siero – Livello 0	80 µl						
Calibratore liofilo su siero – Livello 1	-	80 µl	-	-	-	-	-
Calibratore liofilo su siero – Livello 2	-	-	80 µl	-	-	-	-
Calibratore liofilo su siero – Livello 3	-	-	-	80 µl	-	-	-
Calibratore liofilo su siero – Livello 4	-	-	-	-	80 µl	-	-
Calibratore liofilo su siero – Livello 5	-	-	-	-	-	80 µl	-
Calibratore liofilo su siero – Livello 6	-	-	-	-	-	-	80 µl
<u>Reagente D – Sol. Standard Interno</u>	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Chiudere le provette con il tappo – Vortex per 1 minuto

FASE 2: Centrifugare a 15.000 rpm per 5 minuti

FASE 3: Prelevare 100 µl di surnatante e aggiungere 100 µl di **Reagente E – Soluzione Stabilizzante**

Vortex per 20 secondi

INIEZIONE:

- Iniettare 20 µl della soluzione nel Cromatografo LC (non modificare il volume di iniezione).

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1: Porre 15 MI di sangue intero in una falcon da 50 MI (nel caso in cui il volume di sangue fosse inferiore, portare a volume direttamente nella provetta con il **Reagente A – Sol. Diluente**)

FASE 2: Aggiungere al sangue 15 MI di **Reagente A – Sol. Diluente** e miscelare per aspirazione/dispensazione usando una pipetta pasteur.

FASE 3: In una provetta SepMate aggiungere 15 MI di **Reagente B – Soluzione Estraiante** sul fondo della provetta, attraverso il foro centrale del setto (Il livello di reagente B supererà il setto).

FASE 4: Aggiungere delicatamente il sangue precedentemente diluito (Fasi 1-2), usando una pipetta automatica e poggiandosi sul bordo della provetta SepMate.

FASE 5: Porre la provetta SepMate in centrifuga per 10 minuti a 1200 g a temperatura ambiente.

FASE 6: trasferire il contenuto al di sopra del setto della provetta SepMate in una nuova falcon da 50 MI (non fornita nel kit) decantando rapidamente (evitare di tenere la provetta SepMate rovesciata per più di 2 secondi).

FASE 7: Portare a volume (50 MI) con il **Reagente A – Sol. Diluente**.

FASE 8: Centrifugare per 10 minuti a 320 g a temperatura ambiente

FASE 9: Togliere la falcon dalla centrifuga e scartare il surnatante per inversione, in modo che rimanga solamente il pellet di linfociti. Ripetere le fasi 7-8-9 una seconda volta.

FASE 10: Risospendere il pellet nel liquido residuo (250-290 µl), eventualmente aggiungere **Reagente A – Sol. Diluente** per portare al volume indicato.

FASE 11: Preparare in eppendorf la diluizione per la conta linfocitaria: 20 µl del risospeso + 980 di Reagente A

FASE 12: effettuare la conta dei linfociti

FASE 13: calcolare il volume di cellule risospese nella fase10 necessario ad ottenere un numero di linfociti compreso tra 2.7×10^6 e 3.8×10^6 . Tale volume deve essere compreso tra 20 e 64 µl. Quindi trasferire in ognuna di 3 eppendorf (tempi 0, 1 e 2) il volume calcolato. Annotare il volume prelevato ed il numero di cellule ottenute in tale volume.

Nr. Cellule/μl	Volume cellule risospese nella Fase 10	Volume Reagente A
850-1100	64 μl	-
1110-1500	50 μl	14 μl
1510-1800	40 μl	24 μl
1810-2500	30 μl	34 μl
2510-3000	24 μl	40 μl
3010-3800	20 μl	44 μl

Quindi trasferire in ognuna di 3 provette eppendorf (**Tempo 0, 1 e 2**) il volume calcolato. Annotare il volume prelevato ed il numero di cellule ottenute in tale volume.

FASE 14: Portare il volume delle 3 eppendorf a 64 μl con **Reagente A – Sol. Diluente**

FASE 15: Aggiungere ad ognuna delle 3 eppendorf 16 μl di **Reagente C – Standard Chimico**

FASE 16: Nella prima eppendorf (**Tempo 0**) aggiungere subito 150 μl di **Reagente D – Sol. Standard Interno.** Centrifugare a 15.000 rpm per 5 minuti.

FASE 17: Porre le altre due eppendorf (**Tempo 1 e 2**) in un agitatore per eppendorf termostato a 37 °C, alla velocità di 1300 rpm.

FASE 18: **Dopo 1 ora**, prelevare la eppendorf “**Tempo 1**” ed aggiungere 150 μl di **Reagente D – Sol. Standard Interno.** Centrifugare a 15.000 rpm per 5 minuti.

FASE 19: **Dopo 2 ore**, prelevare la eppendorf “**Tempo 2**” ed aggiungere 150 μl di **Reagente D – Sol. Standard Interno.** Centrifugare a 15.000 rpm per 5 minuti.

FASE 20: Da ognuna delle eppendorf (**Tempo 0, 1 e 2**) trasferire 100 μl di surnatante in vial per auto campionatore LC-MS/MS ed aggiungere 100 μl di **Reagente E – Sol. Stabilizzante.**

INIEZIONE :

- Iniettare 20 μl della soluzione nel Cromatografo LC (non modificare il volume di iniezione).

ELABORAZIONE DEI DATI

Considerare per ogni campione il risultato relativo alla concentrazione del 5FU al **Tempo 0** e al **Tempo 2** (120 minuti). Il risultato del dosaggio è ottenibile applicando una formula che tiene conto dei due valori suddetti e del numero di linfociti considerati:

$$\begin{aligned} & \mathbf{\underline{V_d}} \text{ Velocità di degradazione} = \\ & = [\text{quantità di 5FU al } \mathbf{\text{Tempo 0}} \text{ (ug/mL)} - \text{quantità di 5FU al } \mathbf{\text{Tempo 2}} \text{ (ug/mL)}] * 20 \\ & / 120 \text{ (min)} / \text{n. cellule (10}^6\text{)} \times 11.5. \end{aligned}$$

Il risultato sarà espresso in ng / min / milione di cellule.

*N.B.: Il risultato del **Tempo 1** (60 minuti) non è inserito nella formula, ma è determinato per una migliore valutazione dell'avvenuta reazione di metabolismo*

Velocità di degradazione del 5-FLUOROURACILE SU PBMC - Avvertenze

TRATTAMENTO DELLA COLONNA ANALITICA

Installare la colonna analitica nuova Polaris C18 100 x 2 mm – 3 µm. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (20 : 80 v/v) al flusso di 300 µl/min per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare ulteriormente con una soluzione di H₂O : Fase Mobile M1 (5 : 95 v/v) per 10 minuti.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

Alla fine della seduta lavare la colonna con 80% metanolo per 30 minuti ad un flusso di 0.4 mL/min.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (5 : 95 v/v) per 10 minuti al flusso di 300 µl/minuto scaricandola. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (5 : 95 v/v).

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Lavare l'ago di iniezione con Metanolo.

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	100	0	200
4.0	100	0	200
4.1	25	75	200
7.0	25	75	200
7.1	100	0	200
16.0	100	0	200

Parametri ESI SCIEX 4500 Triplo Quadrupolo

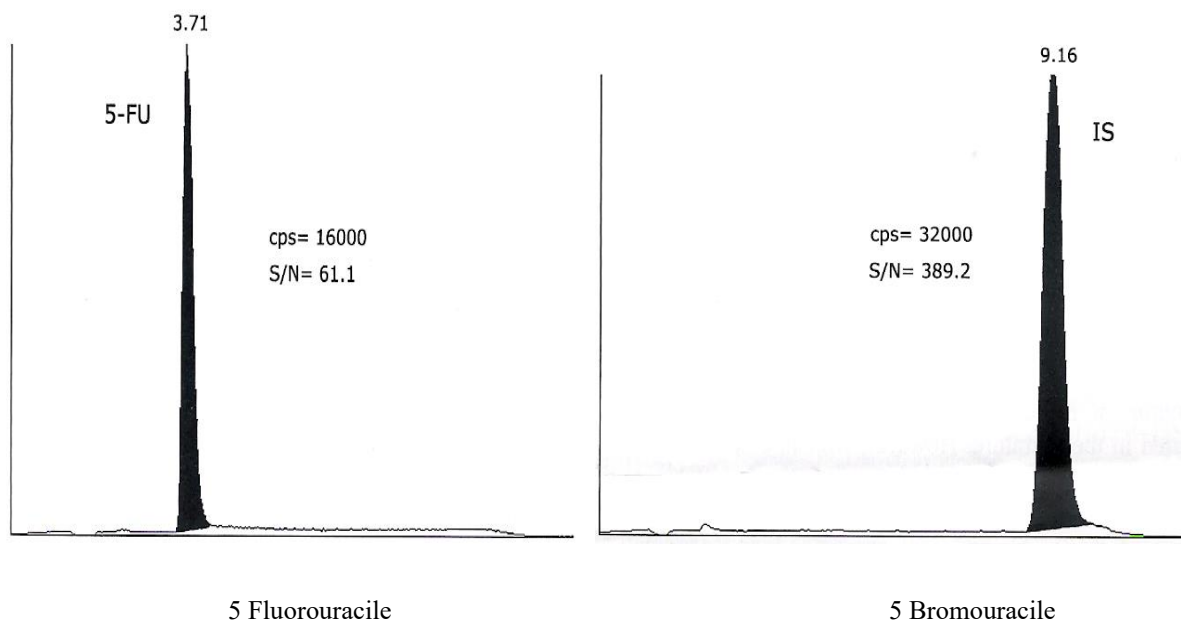
Curtain Gas (CUR): 20
Collision Gas (CAD): 9
Ion Spray Voltage: (IS): 4500 V
Temperature (TEM): 600°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 80
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

Frammentazioni ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500 Triplo Quadrupolo

ANALITA	PARENT ION / FRAGMENTS
5 - FLUOROURACILE	131,0 / 88,1-58,1-113,8
5 - BROMOURACILE	192,7 / 175,9

Velocità di degradazione del 5-FLUOROURACILE su PBMC

(Cromatogrammi di riferimento)



Bibliografia

- 1: Botticelli A, Onesti CE, Strigari L, Occhipinti M, Di Pietro FR, Cerbelli B, Petremolo A, Anselmi E, Macrini S, Roberto M, Falcone R, Lionetto L, Borro M, Milano A, Gentile G, Simmaco M, Marchetti P, Mazzuca F. A nomogram to predict 5-fluorouracil toxicity: when pharmacogenomics meets the patient. *Anticancer Drugs*. 2017 Jun;28(5):551-556. PubMed PMID: 28296649.
- 2: Roberto M, Romiti A, Botticelli A, Mazzuca F, Lionetto L, Gentile G, Paris I, Falcone R, Bassanelli M, Di Pietro FR, Onesti CE, Anselmi E, Macrini S, Simmaco M, Marchetti P. Evaluation of 5-fluorouracil degradation rate and Pharmacogenetic profiling to predict toxicity following adjuvant Capecitabine. *Eur J Clin Pharmacol*. 2017 Feb;73(2):157-164. PubMed PMID: 27864592.
- 3: Onesti CE, Botticelli A, La Torre M, Borro M, Gentile G, Romiti A, Lionetto L, Petremolo A, Occhipinti M, Roberto M, Falcone R, Simmaco M, Marchetti P, Mazzuca F. 5-Fluorouracil degradation rate could predict toxicity in stages II-III colorectal cancer patients undergoing adjuvant FOLFOX. *Anticancer Drugs*. 2017 Mar;28(3):322-326. PubMed PMID: 27845948.
- 4: Borro M, Botticelli A, Mazzuca F, Onesti EC, Gentile G, Romiti A, Cerbelli B, Mazzotti E, Marchetti L, Lionetto L, Simmaco M, Marchetti P. Pre-treatment assay of 5-fluorouracil degradation rate (5-FUDR) to improve prediction of 5-fluorouracil toxicity in gastro-esophageal cancer. *Oncotarget*. 2017 Feb 21;8(8):14050-14057. PubMed PMID: 27738344.
- 5: Botticelli A, Borro M, Onesti CE, Strigari L, Gentile G, Cerbelli B, Romiti A, Occhipinti M, Sebastiani C, Lionetto L, Marchetti L, Simmaco M, Marchetti P, Mazzuca F. Degradation Rate of 5-Fluorouracil in Metastatic Colorectal Cancer: A New Predictive Outcome Biomarker? *PLoS One*. 2016 Sep 22;11(9):e0163105. PubMed PMID: 27656891.
- 6: Lostia AM, Lionetto L, Ialongo C, Gentile G, Viterbo A, Malaguti P, Paris I, Marchetti L, Marchetti P, De Blasi A, Simmaco M. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 5-Fluorouracil degradation rate by intact peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit*. 2009 Aug;31(4):482-8. PubMed PMID: 19571774.