Imunosupresivna terapija nakon transplantacije organa - praćenje ciklosporina nakon transplantacije srca

Bašić, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:814338

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Anita Bašić

Imunosupresivna terapija nakon transplantacije organa -

praćenje koncentracije ciklosporina nakon transplantacije srca

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinčka farmacija s farmakoterapijom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Vesne Bačić Vrca i dr. sc. Lovorke Đerek, specijalistice medicinske biokemije.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Vesni Bačić Vrca i komentorici dr.sc.Lovorki Đerek na pomoći, podršci, savjetima i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada. Vaša stručnost i ljudskost te nesebičan pristup uvelike su mi olakšali pisanje.
Neizmjerno hvala cijeloj obitelji bez koje moja priča ne bi ni započela. Hvala vam na utočištu i podršci u najtežim trenutcima i veselju u onim lijepim.
Veliko hvala i svim mojim prijateljima koji su bili uz mene od samog početka, olakšali teške i podijelili sa mnom brojne divne trenutke studiranja.

Svoj rad i sva svoja postignuća posebno posvećujem svom ocu.
Iako na samom cilju ne možeš biti pokraj mene, zauvijek ćeš živjeti u mojim mislima. Tvoja kovrčava Sue.

Sadržaj

1. **UVOD** 1

1.1. Transplantacija kao standardna terapijska opcija 1

1.1.1. Transplantacija srca 1

1.2. Imunosni odgovor na presađeni organ 2

1.2.1 Oblici odbacivanja presađenog organa 4

1.3. Imunosupresivna terapija - zaokret u transplantacijskoj medicini 4

1.3.1. Inhibitori kalcineurina 5

1.3.2. mTOR inhibitori 9

1.3.3. Mikofenolna kiselina 11

1.3.4. Glukokortikoidi 12

2. **OBRAZLOŽENJE TEME** 14

3. **MATERIJALI I METODE** 14

4. **REZULTATI I RASPRAVA** 15

4.1. Terapijsko praćenje lijekova 15

4.2. Analitičke metode 16

4.2.1. Imunokemijske metode 16

4.2.2. LC-MS/MS 17

4.2.3. Predanalitička faza 19

4.3. Terapijsko praćenje ciklosporina (CsA) 20

4.3.1. Optimalno vrijeme uzorkovanja 21

4.4. Prikaz slučaja 23

5. **ZAKLJUČAK** 25

6. **LITERATURA** 27

7. **SAŽETAK/ SUMMARY** 31

8. **PRILOG** 33

9.**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

1. UVOD

1.1. Transplantacija kao standardna terapijska opcija

Kronična bolest organa u završnoj fazi kao i akutno zatajenje istoga javnozdravstveni je problem s nekoliko alternativnih načina liječenja, a transplantacijom kao često najboljom opcijom za vitalne organe: bubreg, jetru, srce i pluća. Transplantacijska medicina je područje koje se tijekom više od pedeset godina ubrzano razvijalo zahvaljujući kombinaciji napretka u poljima kirurgije, imunologije, razvoja lijekova i generalnih standarda skrbi među kojima se ističe napredak u liječenju i profilaksi infekcija što je imalo veliki utjecaj na konačan klinički ishod (www.ema.eu).

Uspješna transplantacija omogućuje novi život, ali i poboljšava njegovu kvalitetu te bolesnicima pruža mogućnost povratka normalnim životnim i radnim aktivnostima. Kirurški zahvat se može izvoditi sa mrtvog davatelja (moždano mrtva osoba) dok u nekim slučajevima darivatelji mogu biti i žive osobe (dio jetre, bubreg)
(www.msd-prirucnici.placebo.hr).

1.1.1. Transplantacija srca

Od najranijih dana i prve opisane transplantacije srca izvedene na psu 1905.godine za koju je zaslužan Alexis Carrel, preko brojnih pokušaja sredinom 20.stoljeća mahom na životinjama pa sve do prve humane transplantacije srca izvedene 1967.godine pod vodstvom Christiaana Barnarda brojni stručnjaci su pokušavali premostiti osnovne probleme koji su se javljali te produljiti period preživljavanja bolesnika nakon zahvata. Nakon razvoja i unaprjeđenja odgovarajućih kirurških tehnika te pronalaska prikladnog predoperativnog načina čuvanja organa donora kao velika prepreka javilo se akutno odbacivanje alotransplantata zbog kojeg, u nedostatku odgovarajućeg rješenja, svi veći centri 70ih godina 20.stoljeća napuštaju ovaj kriurški zahvat. Otkrićem ciklosporina i njegovim uvođenjem u terapiju, transplantacija srca je ponovno oživjela i do danas ostala općeprihvaćena terapijska opcija kod bolesnika s teškim refraktornim zatajenjem srca kod kojih su iscrpljene sve druge mogućnosti farmakoterapije ili standardnog kirurškog liječenja (Stehlik i sur., 2018).

Indikacije za transplantacijsko liječenje najčešće su teško zatajenje srca kao posljedica ishemijske bolesti srca ili dilatacijske kardiomiopatije. Kako bi se zahvat uspješno proveo važan je odabir prikladnog primatelja za pojedini srčani presadak što uključuje obradu bolesnika

kojom se utvrđuju moguće kontraindikacije (postojanje aktivne sistemske infekcije, malignog oboljenja, ovisnosti o pušenju, alkoholu, drogama, oštećenje jetre, bubrežna insuficijencija, šećerna bolest s uznapredovanim komplikacijama te simptomatska karotidna stenoza) (Samardžić i sur., 2011).

Procjenjuje se i funkcijska sposobnost bolesnika prema NYHA klasifikaciji (engl. *New York Heart Association)* koja svrstava bolesnike u 4 stupnja s obzirom na njihovu limitiranost tijekom fizičke aktivnosti, a kod bolesnika koji su u funkcijskom stupnju 3 ili 4 indicirana je transplantacija organa (www.heart.en).

Također je potrebno odrediti razinu humanih leukocitnih (antiHLA) protutijela tj. njihovu reaktivnost prema HLA molekulama u presjeku populacije (engl. *panel reactive antibodies – PRA*) koja mora biti ispod 10% kako bi se smanjio rizik od odbacivanja organa. Važna je i podudarnost s donorom pri čemu se u obzir uzimaju krvna grupa (ABO), proporcije (visina, težina) te test ukrižene reaktivnosti (Cross-Match test). Nakon prikladnog odabira primatelja te uspješno izvedenog kirurškog zahvata, javljaju se novi poslijeoperacijski izazovi, a među njima je najvažnija supresija imunosnog sustava primatelja optimalnim izborom doze i kombinacije lijekova, prevencija i liječenje infekcija te praćenje stanja bolesnika kako bi se produžilo preživljenje transplantata te osigurao normalan, aktivan i kvalitetan život (Samardžić i sur., 2011).

1.2. Imunosni odgovor na presađeni organ

Transplantacijska reakcija je reakcija imunosnog sustava na nesrodan organ odnosno tkivne antigene iz presađenog organa. Glavne stanice koje posreduju imunoreakciju su limfociti T, a usmjereni su na molekule MHC klase (engl. *Major histocompatibility complex* - molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti) koje se u ljudi nazivaju HLA molekule (engl. *human leukocyte antigens*). Upravo podudarnost davatelja i primatelja u molekulama MHC tj. u HLA antigenskom kompleksu pospješuje prihvaćanje transplantata (Andreis i sur., 2010).

Klasa I (HLA- A, B, C) proteina eksprimirana je na svim tjelesnim stanicama s jezgrom, dok je klasa II proteina (HLA- DR, DQ, DP) eksprimirana na antigen prezentirajućim stanicama (B stanice, dendritičke stanice i makrofagi), ali može biti eksprimirana i na drugim tjelesnim stanicama koje konstitutivno ne eksprimiraju ove proteine osim u slučaju infekcije okolnog tkiva (fibroblasti, timusne epitelne stanice, glija stanice u mozgu, beta stanice gušterače). Uloga ovih proteina je da prezentiraju vlastite unutarstanične peptide citotoksičnim T-limfocitima

(klasa I) ili pak da strane fagocitirane i prerađene antigene predoče pomagačkim T-limfocitima (klasa II). HLA genski lokus koji kodira ove molekule smješten je na kromosomu 6, a sadrži polimorfan set gena zbog čega su one izrazito raznolike te omogućuju svakoj osobi reakciju protiv širokog spektra stranih tvari (Yoon Choo, 2007.).

Zbog velike različitosti među pojedincima iste vrste nemoguće je pronaći, osim u slučaju jednojajčanih blizanaca, dvije osobe koje posjeduju identičan set od šest HLA antigena na površini stanice. Aktivacija imunosnog sustava primatelja naspram ovih molekula nakon transplantacije dovodi do odbacivanja transplantata. Kako bi se osigurala što veća sličnost između davatelja i primatelja, prije same transplantacije provodi se tipizacija tkiva koja za cilj ima ustanoviti stupanj podudarnosti te spriječiti odbacivanje (Guyton i Hall, 2010.). Osim limfocita T, važnu ulogu u transplantacijskoj reakciji imaju i limfociti B, plazma stanice koje proizvode protutijela te makrofagi kao dio urođene imunosti čija aktivacija dovodi do upalne reakcije u presađenom tkivu.

Primatelj na različite načine može reagirati na antigene iz presađenog tkiva. Na poticaj izlučenih citokina, stanice presađenog tkiva eksprimiraju MHC molekule na svojoj površini te prezentiraju peptide davateljevog podrijetla koji aktiviraju limfocite T primatelja. U ovom slučaju se radi o izravnom prepoznavanju. Davateljevi antigeni također se mogu preraditi i predočiti na primateljevim antigen prezentirajućim stanicama (engl. *antigen presenting cell, APC*) putem molekula MHC klase te dovesti do aktivacije limfocita T i pokretanja imunosne reakcije neizravnim prepoznavanjem. Limfociti T prepoznaju prezentirani antigen putem T-staničnog receptora (engl. *T-cell receptor, TCR*) uz interakcije kostimulatornih molekula (CD28 na T-limfocitu sa CD80/86 na APC-u) koje osiguravaju prikladan imunosni odgovor.

Pokreću se unutarstanični signalni putevi koji dovode do aktivacije transkripcijskih faktora i ekspresije gena za citokine koji potiču T-stanice na aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju.

Povišenjem citoplazmatske razine Ca^{2+} aktivira se kalcineurin koji dovodi do defosforilacije nuklearnog faktora aktivacije T-stanica (NFAT). Dolazi do translokacije NFAT u jezgru i inicijacije transkripcije gena za IL-2 koji se veže za receptore na površini stanice. Vezanjem na receptor aktivira se mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) koji regulira prolazak kroz faze staničnog ciklusa T-limfocita. U poticanju imunoreakcije na aloantigene osim IL-2, ističu se i IFN-gama , TNF-alfa te interleukini 4, 5 i 6 koji svi zajedno pojačavaju odgovor urođene i stečene imunosti u vidu aktivacije limfocita B, diferencijacije u plazma stanice, proizvodnje protutijela i aktivacije komplementa što dovodi do oštećenja endotela krvnih žila, krvarenja, tromboze te fibroznih promjena presađenog tkiva (Andreis i sur., 2010; Stehlik i sur., 2018).

1.2.1 Oblici odbacivanja presađenog organa

Prema brzini i mehanizmu odbacivanja razlikuju se tri oblika transplantacijske reakcije. Hiperakutno odbacivanje događa se nekoliko minuta do nekoliko sati po izvršenju operacije zbog prisutnosti specifičnih protutijela u osoba koje su prethodno senzibilizirane na davateljeve antigene. Protutijela aktiviraju sustav komplementa i uzrokuju aglutinaciju eritrocita i trombozu prije razvoja same upalne reakcije.

Do akutnog odbacivanja, koje može biti stanično ili humoralno, dolazi nekoliko dana do nekoliko tjedana nakon presađivanja. Stanično odbacivanje je posredovano T-limfocitima koji su usmjereni na miokard donorskog srca. Pokreće se upalni odgovor koji uzrokuje nekrozu miocita i odbacivanje transplantata. Humoralno odbacivanje je posredovano protutijelima koja aktiviraju sustav komplementa i dovode do upale endotela krvnih žila presatka koje se detektira kao jedan od prvih znakova odbacivanja.

Konačno, kronično odbacivanje koje nastupa nakon nekoliko godina, a uzrokovano je dugotrajnim taloženjem imunoglobulina, komponenti sustava komplementa te kompleksa antigen-protutijelo u vaskulaturi donorskog srca dovodi do ishemijskog oštećenja presatka zbog karakterističnog suženja koronarnih arterija (Andreis i sur., 2010.; Soderlund i Radergan, 2015.).

1.3. Imunosupresivna terapija - zaokret u transplantacijskoj medicini

Zbog složenih imunosnih puteva i reakcija koje se pokreću kao odgovor na transplantirani organ, a koje su neizbježne prilikom ovakvog zahvata te dovode do odbacivanja presatka i rezultiraju smrtnim ishodom, nužno je uvođenje imunosupresiva u doživotnu terapiju.

Imunosupresivnom terapijom, neophodnom za bolesnika, potrebno je postići ravnotežu između modulacije imunosnog sustava kojom suprimiramo imunosnu reakciju na strani organ, a da pri tome ne dovodimo primatelja u opasnost izazivajući neželjene pojave uzrokovane imunodeficijencijom (infekcije, maligna oboljenja) te toksičnošću primijenjenih lijekova (nefrotoksičnost, hipertireoza, hiperglikemija, hiperlipidemija) (Stehlik i sur., 2018).

S obzirom da lijekovi koji pripadaju ovoj terapijskoj skupini obično imaju usku terapijsku širinu, preniske koncentracije mogu dovesti do izostanka imunosupresivnog djelovanja i odbacivanja organa dok su previsoke koncentracije u krvi uzrokom toksičnih efekata u obliku ozbiljnih i teških nuspojava. Individualizacija terapije te optimalno doziranje i kombiniranje

različitih lijekova koje za sobom povlači redovito terapijsko praćenje koncentracije lijeka nužno je kako bi se osigurala sigurna primjena i maksimalan terapijski učinak za svakog bolesnika (Seger i sur., 2016.; Zhang i Vierling, 2019.).

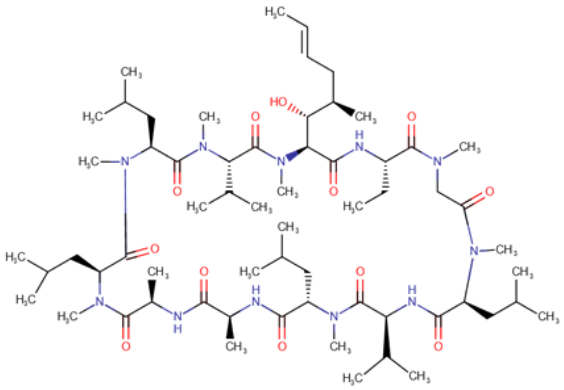
U samim začecima imunosupresivne terapije korišteni su glukokortikoidi i antimetaboliti (6-merkaptopurin, azatioprin). S novim saznanjima o imunosnim mehanizamima odbacivanja transplantata u terapiju su uvedeni lijekovi iz skupine kalcineurinskih inhibitora (ciklosporin, takrolimus) te mTOR inhibitori (sirolimus, everolimus) izolirani iz sakupljenih uzoraka tla. Daljnjim istraživanjem i razvojem novih lijekova sintetizirani su novi antiproliferativni agensi mikofenolna kiselina i leflunomid. Otkrićem biološke terapije razvijena su terapeutska monoklonska protutijela (MAb) usmjerena protiv različitih staničnih meta. Muromonab cilja CD3, a alemtuzumab CD52 molekulu na T-stanicama. Basiliksimab je usmjeren na CD25 (IL-2R, eksprimiran na svim T-stanicama) čime sprječava signalizaciju putem citokina IL-2. Monoklonska protutijela protiv CD20 molekule usmjerena su pak protiv B-limfocita (Zhang i Vierling, 2019).

Kako bi se poboljšala učinkovitost terapije i smanjio intenzitet nuspojava, imunosupresivni režim danas podrazumijeva politerapiju što pruža mogućnost smanjenja doze svakog od lijekova u kombinaciji. Nakon transplantacije srca najčešća je trojna terapija koja se sastoji od ciklosporina A, mikofenolne kiseline i steroida (prednizona) (Jia i sur., 2018.).

1.3.1. Inhibitori kalcineurina

1.3.1.1. Ciklosporin A

Ciklosporin je smjesa hidrofobnih cikličkih peptida izoliranih iz gljivice Tolypocladium inflatum Gams pronađene u uzorcima tla. Jedan od njih, ciklosporin A (CsA), sastavljen je od 11 aminokiselina čijih je 7 od 11 amidnih veza N-metilirano što osigurava veliku stabilnost na enzimsku razgradnju te pruža mogućnost peroralne primjene (Czogalla, 2009.).



Slika 1. Kemijska struktura ciklosporina A.
Preuzeto sa www.drugbank.ca

U kliničkoj praksi najčešće se koristi kod transplantacije solidnih organa i koštane srži, ali i za netransplantacijske indikacije gdje je svoju primjenu pronašao u liječenju endogenog uveitisa, nefrotskog sindroma te autoimunih (reumatoidni artritis, atopijski dermatitis) i kroničnih upalnih bolesti (psorijaza) (www.halmed.hr).

Ulaskom u ciljnu stanicu, u citoplazmi se veže za receptorski protein ciklofilin. Ovako formirani kompleks potom veže kalcineurin čime se inhibira kalcijem stimulirana defosforilacija transkripcijskog faktora NFAT (engl. *Nuclear factor of activated T-cells*). Kada je citoplazmatski NFAT defosforiliran translocira se u jezgru i vežući se na promotorsko mjesto aktivira transkripciju gena za IL-2 koji posljedično aktiviraju T-lifmocite kao odgovor na specifičnu stimulaciju antigenom. Ciklosporin A također potiče ekspresiju gena za TGF-beta, potentni inhibitor IL-2 -stimulirane proliferacije i sazrijevanja citotoksičnih T-stanica (Brunton i sur., 2005.).

Apsorpcija iz gastrointestinalnog sustava događa se kroz prva 4 sata nakon oralne administracije, a zbog velike inter- i intraindividualne varijabilnosti karakterizirana je brzim i naglim promjenama koncentracije u krvi. Bioraspoloživost oralnog oblika (Sandimmune) varira između 20 i 50%, dok se novijim formulacijama u obliku mikroemulzije (Neoral) postigla uniformnija i veća bioraspoloživost te viši Cmax (maksimalna koncentacija u krvi). U velikoj se mjeri distribuira izvan volumena krvi, a frakcija u krvi se raspodjeljuje tako da je 33 do 47% lijeka u plazmi, 4 do 9% u limfocitima, a 41 do 58% u eritrocitima. U plazmi je u velikoj mjeri (90%) vezan za proteine plazme, poglavito lipoproteine. Podliježe ekstenzivnom metabolizmu u jetri primarno preko citokrom P450 3A enzimskog sustava uz nastanak preko 15 različitih metabolita neznatnog imunosupresivnog učinka, a eliminira se u najvećoj mjeri putem žuči.

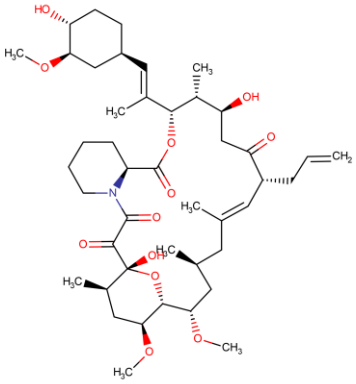
Vrijeme polueliminacije u rasponu je od 7.7 do 26.9 sati ovisno o korištenoj metodi i tipu transplantata koji je bolesniku presađen (www.transplant.bc) ; Topić i sur., 2018. ; Brunton i sur., 2005.).

Glavne nuspojave uočene u kliničkim ispitivanjima i povezane s povišenim koncentracijama ciklosporina u krvi uključuju nefrotoksičnost, metaboličke nuspojave (hipertenzija, hiperuricemija, hiperlipidemija), neurološke (tremor), hiperplazija gingive, hirzutizam, povećanu podložnost infekcijama, povišen rizik od malignih oboljenja te gastrointestinalne tegobe (proljev, anoreksiju, mučninu i povraćanje)
(www.halmed.hr ; www.transplant.bc).

Zbog svog metaboličkog profila stupa u brojne interakcije s induktorima i inhibitorima citokrom P450 sustava u jetri. Uz istodobnu primjenu s induktorima CYP 3A enzima kao što su lijekovi iz skupine antikonvulziva (fenobarbital, karbamazepin, fenitoin) i antimikrobnih lijekova (rifampin, kaspofungin) povećava se metabolizam ciklosporina i smanjuje njegova koncentracija u krvi. Ukoliko se primjenjuje istodobno s inhibitorima CYP 3A enzima kao što su makrolidi (eritromicin, klaritromicin), azolni antifungici (flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol), antidepresivi (fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, mirtazapin) te lijekovi za liječenje kardiovaskularnih bolesti (diltiazem, verapamil, amiodaron) povećavaju se koncentracije u krvi i povećava se rizik od toksičnosti. Zbog sinergističkog učinka s drugim imunosupresivima često se pribjegava kombinaciji CsA s mikofenolnom kiselinom ili sirolimusom. S obzirom na velike interindividualne razlike u apsorpciji i metabolizmu te uski terapijski indeks CsA obavezno je individualno terapijsko praćenje koncentracija lijeka u krvi (Brunton i sur., 2005; www.transplant.bc).

1.3.1.2. Takrolimus

Takrolimus je makrolidni antibiotik izoliran iz aktinobakterije Streptomyces tsukubaensis.



Slika 2. Kemijska struktura takrolimusa.

Preuzeto sa www.drugbank.ca

Iako je po kemijskoj strukturi nesrodan ciklosporinu te se veže za drugačije receptore u stanici, oba lijeka blokiraju iste unutarstanične puteve koji posljedično suprimiraju imunosni odgovor. Ciljni protein za takrolimus je FK506-binding protein-12 (FKBP-12). Kompleks FKBP12-takrolimus specifično se veže na kalcineurinsku fosfatazu i inhibira ju, što dovodi do kalcij ovisne inhibicije puteva transdukcije signala T-stanica (defosforilacije i translokacije transkripcijskog faktora NFAT u jezgru što za posljedicu ima izostanak ekspresije gena za IL-2 te inhibiciju aktivacije i proliferacije T-limfocita) (Brunton i sur.,2005; Katzung i sur., 2017.). Indiciran je za profilaksu odbacivanja presatka solidnih organa (jetre, bubrega, srca) te za liječenje odbacivanja presatka koje je rezistentno na konvencionalnu imunosupresivnu terapiju. Razvijeni su i topikalni oblici koji su pokazali učinkovitost u liječenju atopijskog dermatitisa kod odraslih i adolescenata u slučaju neprikladnog odgovora na uobičajenu terapiju (topikalni kortikosteridi) (www.halmed.hr).

Nakon oralne administracije, apsorpcija iz gastrointestinalnog sustava je slaba i nepotpuna sa bioraspoloživošću koja varira od 5 do 67%. Istodobna primjena s hranom dodatno smanjuje i prolongira apsorpciju takrolimusa, no unatoč tome pokazuje bolju korelaciju između koncentracije (C0) i kliničkog odgovora u odnosu na ciklosporin. Vršne koncentracije (Cmax) se postižu 1-3 sata nakon primjene. U sistemskoj cirkulaciji se izrazito snažno veže za eritrocite, dok je u plazmi u visokom postotku vezan za proteine plazme (>98,8% , najviše za albumin, alfa1 kiseli glikoprotein, globuline, lipoproteine). Metabolizira se primarno preko citokrom P450 sustava u jetri u 9 metabolita, a u najvećoj mjeri se eliminira fecesom. Vrijeme polueliminacije iznosi 9-12 sati dok se uravnotežene koncentracije u krvi postižu unutar 3 dana za većinu bolesnika. Pokazuje od 10 do 100 puta veću potentnost u inhibiciji imunosnog sustava u odnosu na ciklosporin uz manju nefrotoksičnost. Koncentracije takrolimusa u punoj krvi su

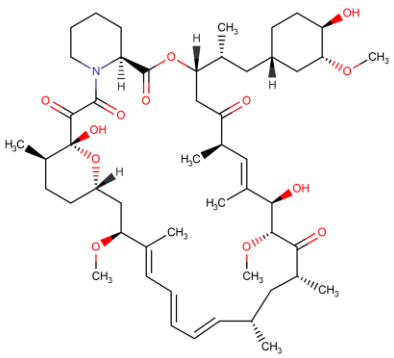
10-35 puta veće u odnosu na plazmu, stoga praćenje koncentracije u punoj krvi pruža dobru procjenu sistemskog izlaganja. Profil nuspojava je širok, a kreće se od nefrotoksičnosti, preko neuronalnih smetnji (tremor, glavobolja, motorne smetnje, napadaji) do tegoba gastrointestinalnog sustava (mučnina, proljev). Zapažena je i hipertenzija, hiperkalijemija te endokrine komplikacije (negativan utjecaj na beta stanice Langerhansovih otočića gušterače, periferna intolerancija na glukozu, šećerna bolest). Kao i ciklosporin, ulazi u interakcije sa inhibitorima i induktorima citokrom P450 enzimskog sustava u jetri što može utjecati na koncentracije takrolimusa u krvi te smanjiti njegov terapijski učinak odnosno povećati toksičnost (Brunton i sur., 2005; Katzung i sur., 2017. ; Topić i sur., 2018.; www.transplant.bc).

1.3.2. mTOR inhibitori

mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) je član novoidentificirane obitelji fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) koje imaju bitnu ulogu u staničnom ciklusu u vidu regulacije progresije ciklusa, provjere u kontrolnim točkama (zaustavljanje replikacije u slučaju oštećenja DNA u G1 fazi) te regulacije staničnog rasta, angiogeneze i metabolizma (Saber-Moghaddama i sur., 2019.). Inhibicija ovog unutarstaničnog puta dovodi do inhibicije citokinima posredovane aktivacije T-stanica te supresije imunosnog odgovora. U inhibitore mTOR-a, nazvane još i inhibitore stanične proliferacije, ubrajamo sirolimus i everolimus, a terapijska su alternativa inhibitorima kalcineurina nakon transplantacije organa (Katzung i sur., 2017.).

1.3.2.1.Sirolimus

Sirolimus je makrolidni antibiotik dobiven kao produkt bakterije Streptomyces hygroscopicus koji osim imunosupresivnog, pokazuje i antitumorski te antifungalni učinak. Indiciran je za profilaksu odbacivanja solidnih organa (najčešće bubrega) u odraslih bolesnika, a vrlo često se primjenjuje u kombinaciji sa ciklosporinom A (www.transplant.bc).



Slika 3. Kemijska struktrua sirolimusa.
Preuzeto sa www.drugbank.ca

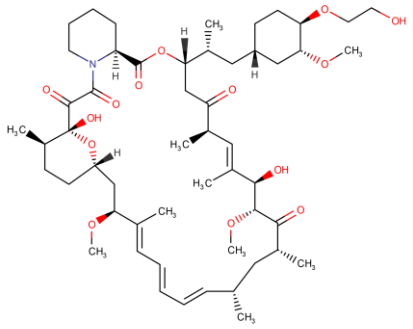
Nakon peroralne primjene apsorbira se brzo, a vršne koncentracije u krvi dostiže nakon 1-3 sata. Bioraspoloživost je svega 14%, a primjena uz obrok s visokim udjelom masti značajno reducira Cmax te prolongira vrijeme postizanja vršne koncentracije (Tmax) (Brunton i sur., 2005.).

Supstrat je CYP3A4 enzima i transportnog proteina P-gp te podliježe metabolizmu u zidu gastrointestinalng sustava i jetri pri čemu nastaje 7 glavnih metabolita detektiranih u fecesu, urinu i krvi. Ipak, intaktni severolimus je glavna komponenta u punoj krvi i nosi 90% imunosupresivne aktivnosti (Nguyen i sur., 2019.). Pretežno se eliminira fecesom, a vrijeme polueliminacije je dugotrajno i iznosi 57- 62 sata zbog čega se ne preporučuje praćenje koncentracija lijeka u krvi pet do sedam dana nakon peroralne primjene (Topić i sur., 2018. ; Bruton i sur., 2005). Od nuspojava zabilježene su oralne ulceracije, mukozitis, stomatitis, hiperglikemija, dislipidemija, hipertrigliceridemija, hiperkolesterolemija, angioedem, gastrointestinalne tegobe, tromboembolija, trombocitopenija, glomerukonefritis, sporije zacijeljivanje rana (Nguyen i sur., 2019.).

1.3.2.2.Everolimus

Everolimus je polusintetski derivat sirolimusa koji se u kombinaciji s inhibitorima kalcineurina koristi kao prevencija odbacivanja transplantata bubrega, jetre i srca. Iako istog mehanizma djelovanja, zbog promjena u strukturi u odnosu na sirolimus, farmakokinetički parametri su poboljšani. Nakon oralne primjene bioraspoloživost mu je 90%, a vrijeme polueliminacije dvostruko kraće u odnosu na sirolimus (t1/2=30 sati). Apsorpcija iz gastrointestinalnog sustava je brza pa se vršne koncentracije postižu za 1.3-1.8 sati. Podliježe ekstenzivnom metabolizmu u jetri putem CYP3A4 enzima, a supstrat je i P-glikoproteina što pruža velik potencijal za

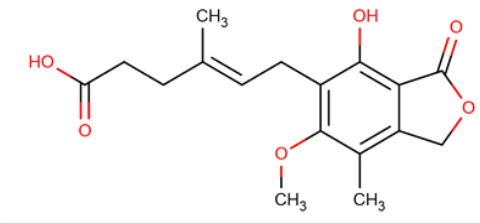
interakcije s induktorima i inhibitorima ovih proteina (Topić i sur., 2018.; Nguyen i sur.,2019.). Profil nuspojava je sličan kao kod sirolimusa. Iako manje nefrotoksičan od kalcineurinskih inhibitora ipak se javljaju mnoge, o dozi ovisne, nuspojave kao što su oralne ulceracije, stomatitis, dijareja, mučnina, pad apetita, osip, anemija, sporije zacjeljivanje rana. Rjeđe, ali ozbiljne nuspojave uključuju intersticijalni pneumonitis, zatajenje bubrega, reakcije hipersenzitivnosti i embrio-fetalnu toksičnost te hepatotoksičnost (povišenje serumskih enzima, bilirubina, hepatitis) (www.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 4. Kemijska struktura everolimusa.
Preuzeto sa www.drugbank.ca

1.3.3. Mikofenolna kiselina

Mikofenolna kiselina (MPA) je imunomodulatorni lijek koji se primjenjuje u obliku estera mikofenolat mofetila čijom se brzom hidrolizom u probavnom sustavu aktivira. Na tržištu postoji i formulacija u obliku natrijeve soli zaštićena enteričkom ovojnicom koja osigurava odgođeno oslobađanje u tankom crijevu (Benjanuwattra i sur., 2019.).



Slika 5. Kemijska struktura mikofenolne kiseline.
Preuzeto sa www.drugbank.ca

Selektivan je, nekompetitivan i reverzibilan inhibitor inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), važnog enzima u biosintetskom putu gvanina. Dok druge stanice u tijelu pronalaze

alternativne puteve sinteze ovog nukleotida, B i T limfocitima je ovo nezaobilazan put te se inhibicijom IMPDH selektivno inhibira proloferacija i funkcija limfocita, uključujući stvaranje protutijela, stanična adhezija i migracija (Katzung i sur., 2017.). Oralna bioraspoloživost je visoka, a kreće se od 80.7 do 93.5%, dok je vrijeme polueliminacije 11-18 sati. Vršne koncentracije u plazmi postižu se 1-2 sata nakon primjene. U jetri, mikofenolna kiselina podliježe reakcijama glukuronidacije pri čemu nastaje inaktivni glukuronid mikofenolne kiseline (MPAG). Ovaj glukuronid potom podliježe enterohepatičkoj cirkulaciji. Putem žuči se vraća u probavni sustav gdje se odvija deglukuronidacija bakterijama intestinalne flore. Zatim slijedi resorpcija zbog čega se uočava sekundarni pik koncentracije MPA u krvi (Benjanuwattra i sur., 2019.). Koncentracija u plazmi ovisi o složenoj farmakokinetici same MPA, primjeni lijekova iz drugih farmakoterapijskih skupina, prisutnosti metabolita, bolesniku (dob, rasa) te kombinaciji s drugim imunosupresivima (npr. ciklosporin smanjuje enterohepatičku cirkulaciju pa će izmjerene koncentracije mikofenolne kiseline biti niže) (Topić i sur., 2018.).

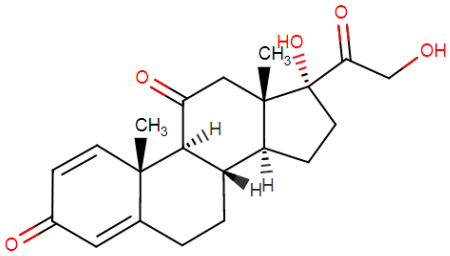
1.3.4. Glukokortikoidi

1.3.4.1. Prednizon

Prednizon je sintetski kortikosteroid koji je u kliničkoj praksi korišten zbog svojih protuupalnih i nespecifičnih imunosupresivnih svojstava. Reducira aktivnost i volumen limfnog sustava uzrokujući limfocitopeniju, smanjuje koncentraciju imunoglobulina, sprječava prolazak imunosnih kompleksa kroz bazalnu membranu te suprimira reaktivnost tkiva uslijed interakcija antigena i antitijela. Radi sinergističkog učinka koristi se u kombinaciji s drugim imunosupresivima.

Nakon oralne primjene apsorbira se brzo i gotovo u potpunosti te reverzibilno veže za proteine plazme. Maksimalna koncentracija se postiže nakon 1-2 sata. Metabolizira se u jetri u reakcijama druge faze, a eliminira urinom. Potreban je oprez pri istovremenoj primjeni s alkoholom, protuupalnim lijekovima, amfotericinom B, acetilsalicilnom kiselinom, barbituratima, digoksinom, oralnim kontraceptivima, inzulinom i oralnim antidijabeticima. Nuspojave su brojne, a zahvaćaju živčani sustav (glavobolja, vertigo, parestzija), metabolički (poremećaju menstrualnog ciklusa, Cushingov sindrom, supresija rasta kod djece, šećerna bolest, hiperglikemija, glikozurija, hipernatrijeija, hipokalijemija), gastrointestinalni trakt (mučnina, povraćanje, povećan apetit, povišenje tjelesne težine) te izazivaju dermatološke

probleme (sporije zacijeljivanje rana, petehije, strije, hiperpigmentaciju, akne, hirzutizam, dermatitis, urtikariu, alopeciju) (www.transplant.bc.ca, www.halmed.hr).



Slika 6. Kemijska struktura prednizona.
Preuzeto sa www.drugbank.ca

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Farmakološka svojstava imunosupresiva i velika intra- i interindividualnost čine ih kandidatima za praćenje koncentracija u krvi bolesnika, čime se pruža mogućnost individualizacije liječenja te osigurava optimalan terapijski učinak uz minimalne nuspojave.

Cilj ovog rada je opisati bitne aspekte terapijskog praćenja lijekova u kliničkoj praksi s posebnim naglaskom na ciklosporin A te benefite koje pruža implementacija ove multidisciplinarne kliničke specijalnosti u svakodnevnu rutinu.

3. MATERIJALI I METODE

Pri izradi ovog diplomskog rada proučavana je stručna i znanstvena literatura koja uključuje udžbenike iz područja farmakologije, fiziologije, imunologije, kliničke kemije i ostale relevantne priručnike i znanstvene časopise koja obuhvaćaju različite grane farmacije i medicine. Pretraživane su i bibliografske baze poput PubMeda prema ključnim riječima i njihovim kombinacijama: *transplantation, heart transplantation, HLA system, transplant rejection, immunosupressive therapy, cyclosporine A, everolimus, tacrolimus, sirolimus, mycophenolic acid, prednisone, adverse effects, therapeutic drug monitoring, TDM, analytical methods, LC-MS/MS, immunoassays.*

Pregledavane su i mrežne stranice različitih organizacija kao što je *American Heart Association* te regulatornih agencija poput Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Terapijsko praćenje lijekova

Terapijsko praćenje lijekova (engl. *Therapeutic Drug Monitoring - TDM)* je multidisciplinarna klinička specijalnost koja za cilj ima optimizaciju terapije u svrhu poboljšanja skrbi za svakog pojedinog bolesnika, individualnom prilagodbom doze lijekova za koje je u kliničkim istraživanjima i praksi primijećeno poboljšanje ishoda terapije. Nužan preduvjet za provođenje TDM je postojanje korelacije između terapijskog učinka i koncentracije lijeka u krvi. Pravovremeno mjerenje koncentracije lijeka (farmakokinetički monitoring) uz ostale parametre kao što su opće stanje bolesnika (postojanje komorbiditeta, politerapija), farmakogenetika, farmakodinamičke karakteristike te demografski podaci za pojedinog bolesnika ili populaciju, faktori su koji zajednički doprinose individualizaciji terapije. To je posebno važno za rizične skupine bolesnika u koje spadaju trudnice, djeca, adolescenti, osobe starije životne dobi te bolesnici s disfunkcijom jetre i bubrega.

Terapijska širina jest raspon koncentracija unutar kojeg lijek ispoljava farmakološki učinak, ali ne uzrokuje toksične efekte. Omeđen je minimalnom efektivnom i minimalnom toksičnom koncentracijom, a doziranje i interval doziranja moraju biti prilagođeni tako da koncentracije u krvi ostanu unutar tih granica. Kada je riječ o imunosupresivima, ukoliko su postignute koncentracije ispod donje granice, u subterapijskom području, može doći do odbacivanja presađenog organa jer imunosni sustav nije dovoljno suprimiran. S druge strane, prekoračenje gornje granice rezultira toksičnim učincima lijekova i pretjeranom imunosupresijom što posljedično povećava rizik od infekcija i malignih oboljenja. S obzirom na njihovu usku terapijsku širinu, ostanak unutar intervala predstavlja dodatan izazov pa je terapijsko praćenje nužno. Kod ove skupine lijekova posebno je problematična činjenica da se toksodinamički učinci (npr. nefrotoksičnost kao česta nuspojava ciklosporina) ponekad teško razlikuju od kliničke slike oštećenja presatka bubrega koja može rezultirati odbacivanjem stoga je važno na temelju izmjerene koncentracije u krvi i kliničke slike procijeniti potrebu za korigiranjem doze. Na odnos primijenjene doze, postignutih koncentracija u krvi i terapijskog učinka utjecaj imaju postojanje genetskog polimorfizma koje se očituje u interindividualnim razlikama u metaboliziranju lijekova, interakcije lijeka s drugim lijekovima ili hranom, put primjene lijeka i formulacija, postotak vezanja za proteine plazme, bolesti koje mogu uzrokovati lošu apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta, disfunkcije bubrega koje utječu na procese eliminacije ili oštećenja jetre koja interferiraju s očekivanom biotransformacijom lijeka (Plavšić i sur., 2009; Seger i sur., 2016).

4.2. Analitičke metode

Napredak TDM-a olakšan je razvojem brzih, osjetljivih i specifičnih analitičkih metoda. Za uspješno praćenje imunosupresivne terapije i određivanja koncentracije lijeka u krvi nužan je izbor odgovarajuće kromatografske ili imunokemijske metode. Kako bi se osigurali točni podaci i napravila valjana procjena stanja bolesnika, praćenje se mora obavljati longitudinalno istom metodom jer su usporedbom kvantitativnih rezultata dobivenih različitim metodama uočene razlike u izmjerenim vrijednostima što ukazuje na nemogućnost zamjene jedne metode drugom (Seger i sur., 2016.; Topić i sur. 2018.).

4.2.1. Imunokemijske metode

Najčešće rutinski korištene metode u kliničkim laboratorijima su one imunokemijske.
Osnovni princip na kojem se temelje imunokemijske metode je specifično prepoznavanje protutijela i antigena (lijeka) te detekcija stvorenog kompleksa uz uporabu različitih obilježivača odgovarajućim mjerenjem nastalog signala. Visoka selektivnost protutijela prema antigenu rezultat je stereospecifičnosti antigen-vezujućeg mjesta. U upotrebi su monoklonska protutijela (mAb) proizvedena u jednoj plazma stanici s afinitetom prema istom epitopu te poliklonska protutijela (pAb) proizvedena u različitim plazma stanicama koja pokazuju afinitet za isti antigen ali različite epitope što ih čini manje selektivnima (Rifai i sur., 2018.).

U začecima TDM-a najviše je korištena radioimunoesej (engl. *radioimmunoassay, RIA*) metoda koja je polako istisnuta razvojem neizotopskih metoda od kojih su danas u upotrebi imunokemijska metoda na magnetskim česticama obloženim antitijelima (engl. *antibody conjugated magnetic immunoassay, ACMIA*), kemiluminescentna imunokemijska metoda na mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA*), enzim-donorska imunokemijska metoda (engl. *cloned enzyme donor immunoassay CEDIA*), elektrokemiluminescentna imunokemijska metoda (engl. *electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA*), enzimimunokemijska metoda s umnažanjem enzimske aktivnosti (engl. *enzyme multiplied immunoassay, EMIT*), imunoturbidimetrijska kompetitivna metoda na mikročesticama(engl. *quantitative microsphere system, QMS*), imunoturbidimetrijska inhibicijska metoda na mikročesticama (engl. *particle enhanced turbidimetric inhibition*

immunoassay, PETINIA), enzimsko vezani imunoapsorbirajći esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) (Andrews i Cramb, 2002.; Rifai i sur.,2018.).

Prednosti ovih metoda su jednostavnost uporabe, izdrživost, reproducibilnost, osjetljivost, minimalni ručni predtretman uzorka (liza eritrocita, centrifugiranje, sakupljanje supernatanta), veliki kapacitet i brzina analize te ih je u većini slučajeva jednostavno postaviti na automatske analizatore u kliničkom laboratoriju. Brzina analize čini ih prikladnima za korištenje u svakodnevnoj procjeni statusa transplatiranih bolesnika pa su ove metode u širokoj upotrebi u kliničkim laboratorijima. Međutim, uočeni nedostatci uvelike utječu na laboratorijske analize. Osnovni je problem podložnost interferencijama do kojih dolazi uslijed prisustva kemijskih tvari u uzorku ili reagensu koje mogu uzrokovati odstupanje od prave vrijednosti. Može doći do križne reaktivnosti protutijela s drugim lijekovima zbog strukturnih sličnosti ili pak metabolitima ispitivanog lijeka koji uglavnom nemaju imunosupresivan učinak. Posljedica toga je precjenjivanje koncentracije lijeka u krvi što može utjecati na donošenje odluka o smanjenju doze i ozbiljnim posljedicama za bolesnika (Hétu i sur., 2012.; Zhang i Zhang, 2018.).
S obzirom da različite imunokemijske metode pokazuju različit stupanj specifičnosti te rezultati nisu međusobno usporedivi, za dugoročno praćenje koncentracija lijeka u pojedinog bolesnika koristi se isključivo ista imunokemijska metoda kako bi se otklonile moguće pogreške (Andrews i Cramb, 2002.).

4.2.2. LC-MS/MS

Iako nije u širokoj upotrebi, zlatnim standardom za terapijsko praćenje imunosupresivne terapije smatra se metoda tekućinske kromatografije (engl. *liquid chromatography, LC*) spregnuta s dvojnom spektrometrijom masa (engl. *tandem mass spectrometry, MS/MS*). Ovakav vezani sustav LC-MS/MS pruža mogućnost istovremene separacije svih sastavnica uzorka te potom pojedinačne karakterizacije pomoću spektroskopske tehnike (Watson, 1999.; Andrews i Cramb, 2002.). S obzirom da imunosupresivni režim nakon transplantacije obično podrazumijeva kombinaciju više lijekova, ova metoda pruža mogućnost istovremene analize svih lijekova u terapiji (Zhang i Zhang, 2017.).
Prije same analize potrebna je predobrada uzorka pune krvi što podrazumijeva hemolizu i dodatak precipitirajućeg agensa kako bi se istaložile velike molekule (prvenstveno proteini)

koji bi mogli otežati analizu i uzrokovati loše kromatografsko odjeljivanje (Andrews i Cramb, 2002.; Zhang i Zhang, 2017.).
Unošenjem uzorka u kolonu, sastavnice se razdvajaju na osnovu različitog afiniteta za stacionarnu odnosno mobilnu fazu što rezultira različitim vremenom zadržavanja i brzinom eluacije iz kolone. Dolaskom u maseni spektrometar svaka komponenta podliježe ionizaciji i fragmentaciji. Najčešća ionizacijska tehnika je ionizacija analita elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization, ESI*) kojom se komponente uzorka specifično pretvaraju u pozitivne ili negativne ione koji se potom odjeljuju u analizatorima na temelju različitog omjera mase i naboja (m/z) te se identificiraju i kvantificiraju (Watson, 1999.; Zhang i Zhang, 2017.).

Velika prednost LC-MS/MS u odnosu na imunokemijske metode je visoka selektivnost, bolja osjetljivost i niske granice detekcije te određivanje traženog analita (lijeka) i njegove koncentracije bez interakcije sa metabolitima i strukturno sličnim molekulama. S druge strane, osim složene predobrade uzorka koja zbog svoje dugotrajnosti onemogućuje primjenu metode u svrhu hitne dijagnostike, prepreke koje se javljaju pri uvođenju ove metode kao rutinske analize u kliničke laboratorije jesu i visoki troškovi nabave same instrumentacije što ga čini nedostupnim za široku upotrebu te potreba za visokoeduciranim osobljem koje će rukovati ovim uređajem (Hétu i sur., 2012.; Zhang i Zhang, 2017.; Topić i sur., 2018.;).
Važno je naglasiti da su maseni spektrometri složeni analitički uređaji osjetljivi na promjene u radnom okruženju i moguće kontaminacije te da je važno kontrolirati uvjete u kojima se odvija analiza, prije svega temperaturu okoline (Topić i sur., 2018.).

Ipak, napredak i poboljšanje u obradi uzorka prije analize koje uključuje automatiziranu pripremu uzorka i razvoj metode s prikladnom gradijentnom eluacijom te standardizacija i komercijalizacija kitova za analizu doprinijeli su skraćenju trajanja analize te poboljšanju preciznosti i točnosti. Uvođenje UPLC metode (engl. *ultra performance liquid chromatography*) u kombinaciju s dvojnom spektrometrijom masa poboljšana je djelotvornost. Naime, smanjenjem čestica stacionarne faze i povišenjem tlaka skraćeno je vrijeme analize uz bolju osjetljivost i bolje razlučivanje. U nekim laboratorijima, kao dodatan korak u pripremi uzorka za analizu, obavlja se i SPE (engl.*solid phase extraction*, ekstrakcija na čvrstoj fazi) kojom se analit odvaja od čvrstog matriksa i ukoncentrirava što olakšava njegovu kvantifikaciju. Iako određene prepreke i dalje postoje, ova poboljšanja su omogućila implementaciju LC-MS/MS metode u rutinsku kliničku praksu (Zhang i Zhang, 2017.).

4.2.3. Predanalitička faza

Osim odabira prikladne analitičke metode, za rezultate analize izrazito je važno pravilno prikupljanje i priprema uzorka. Ovisno o farmakološkim parametrima lijeka, uzorak izbora može biti venska krv (puna krv, plazma, serum), tkivo (tkivo jetre), stanice (limfociti) i slina. Ukoliko je potreban mali uzorak krvi može se koristiti kapilarna krv iz jagodice prsta (fingerprick sampling) radi manje invazivnog uzorkovanja i dulje stabilnosti uzorka (Zhang i Zhang, 2017.).

Važno je da uzorci uzeti za analizu budu pohranjeni na ispravan način. Uzorci pune krvi stabilni su 8h na sobnoj temperaturi (15-30°C) , 7 dana na temperaturi 2-8°C, a 28 dana na temperaturi < -10°C. Ako se kao uzorak koristi plazma, stabilni su do osam sati na sobnoj temperaturi (15 – 30 °C), do četiri dana na temperaturi od 2 – 8 °C, a za duže vremensko razdoblje nužno ih je pohraniti na temperaturi < -18 °C (Topić i sur., 2018.).

Posebno bitan predanalitički faktor je i vrijeme uzorkovanja. U rutinskim laboratorijskim analizama vađenje krvi najčešće se obavlja neposredno prije primjene sljedeće doze, pa se izmjerena koncentracija naziva trough ili koncentracija C0. Iako je najbolji pokazatelj djelovanja odnosno sveukupne izloženosti bolesnika imunosupresivnim učincima površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije o vremenu (engl. *area under the curve, AUC*) zbog nedostataka kao što su uzastopno uzorkovanje kroz točno definirane vremenske intervale, visoke cijene i nepraktičnosti ova metoda nije zaživjela u rutinskom radu. Kod nekih lijekova (npr. ciklosporin) koncentracija C2 (koncentracija lijeka dva sata nakon uzimanja) pokazuje dobru korelaciju s kliničkim odgovorom i toksičnošću, no unatoč tome rutinski se ipak prati C0, a rjeđe C2 (Sivathasan, 2004.).

4.3. Terapijsko praćenje ciklosporina (CsA)

Uzak terapijski indeks, ozbiljne posljedice koje se javljaju uslijed preniske ili previsoke doze, nejasna korelacija doze i učinka zbog intra- i interpersonalnih razlika u farmakokinetičkim parametrima te teška distinkcija toksičnih od subterapijskih učinaka kod bolesnika liječenih ciklosporinom čini ga idealnim kandidatom za terapijsko praćenje. Kao polipeptid izrazito lipofilnih svojstava teško je topljiva molekula, što rezultira i otežanom apsorpcijom. Prva komercijalna formulacija, Sandimmune, pokazivala je nepotpunu i nepravilnu apsorpciju što je rezultiralo nepredvidivim koncentracijama lijeka u krvi. Razvojem novog, poboljšanog pripravka u obliku mikroemulzije (Neoral) apsorpcija je postala konzistentna i brža što je uvelike doprinijelo efektivnijem praćenju terapije i redukciji rizika od nastanka i broja epizoda akutnog odbacivanja nakon transplantacije (Jorga i sur., 2004).

S obzirom na ekstenzivnu distribuciju ciklosporina u eritrocite u koje se raspodjeljuje od 48 do 51% primjenjene doze, uzorak izbora je puna krv uz dodatak antikoagulansa K2 ili K3-EDTA. Koncentracije u punoj krvi pokazale su bolju korelaciju sa stupnjem imunosupresije i toksičnosti. Kako ne bi došlo do razgradnje matriksa, puna krv se mora čuvati na propisanoj temperaturi. Istraživanja ne-tradicionalnih načina uzimanju uzoraka ukazala su na mogućnost korištenja suhe kapi krvi (engl. *dried blood spot, DBS*). Ovakav pristup je pokazao brojne benefite zbog manje invazivnosti, dulje stabilnosti uzorka i mogućnosti frekventnog monitoringa za pojedinog bolesnika (Midtvedt, 2004.; Seger i sur. 2016.; Zhang i Zhang, 2017.).

Prije uzimanja uzorka krvi potrebna je i priprema bolesnika što podrazumijeva izbjegavanje tjelesne aktivnosti, obroka s visokim udjelom masti, pušenja, konzumacije alkohola te različitih tvari s mogućim farmakološkim učinkom koje mogu utjecati na izmjerene vrijednosti lijeka i dovesti do krivih zaključaka o postignutim koncentracijama u krvi (Topić i sur., 2018.).

4.3.1. Optimalno vrijeme uzorkovanja

Tablica 1. Terapijsko područje ciklosporina. Prilagođeno prema Seger i sur., 2016.

Farmakokinetički parametar koji se prati	Jedinica	Spol	Dob	Terapijsko područje
C0 CsA	µg/L	M/Ž	svi	50 - 350
C2 CsA	µg/L	M/Ž	svi	480 - 2000

Objašnjenje:

C0 – „trough" koncentracija, koncentracija izmjerena neposredno prije sljedeće peroralne doze

C2 – koncentracija izmjerena točno 2h nakon primjenjene peroralne doze

CsA- ciklosporin A

Standardni način praćenja koncentracije ciklosporina u krvi je preko najniže, trough, odnosno C0 koncentracije. Kod ovakvog mjerenja uzorak za analizu uzima se neposredno prije sljedeće oralne doze. S obzirom da se ciklosporin dozira 2 puta dnevno, vađenje krvi se provodi 12 sati nakon uzimanja večernje doze. Ovaj način uključuje i optimizaciju terapije titracijom doze do postizanja koncentracija koje zadovoljavaju predviđeni terapijski interval. Iako je u rutinskoj praksi tijekom godina ostalo uvriježeno praćenje preko C0, istraživali su se i ostali načini terapijskog praćenja ciklosporina, posebno nakon razvoja nove formulacije (mikroemulzije Neoral), a najkorisnijim su se pokazale površina ispod krivulje(AUC), C_{av} te C2 (Jorga i sur., 2004.).

Kao osjetljiv prediktor pokazala se površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u krvi o vremenu (AUC). Kako bi se dobila ova krivulja potrebno je uzimati uzorke krvi nekoliko puta tijekom intervala doziranja, u slučaju ciklosporina nekoliko puta tijekom 12 sati. Dijeljenjem s intervalom doziranja dobije se C_{av} (prosječna koncentracija u krvi). I $AUC_{(0\text{-}12)}$ i C_{av} dobar su pokazatelji sistemske izloženosti lijeku te omogućuju predviđanje konačnog ishoda liječenja (preživljenje transplantata) i pojavu nuspojava. Međutim ova metoda ima određene nedostatke

zbog kojih ipak nije zaživjela kao rutinski laboratorijski postupak, a to su prije svega složenost, dugotrajnost i nepraktičnost za svakodnevna mjerenja u kliničkim laboratorijima te visoki troškovi zbog višestrukog uzorkovanja i uzastopnih analiza.

Razvoj mikroemulzije Neoral doveo je do postepenog uvođenja novog pripravka u terapiju kao zamjene za Sandimmune što je zahtijevalo praćenje stanja bolesnika zbog razlika u farmakokinetičkim parametrima dvaju pripravaka (reducirana varijabilnost u apsorpciji, viša bioraspoloživost što je rezultiralo većoj sistemskoj izloženosti). Ove dvije formulacije nisu se mogle smatrati bioekvivalentnima i prebacivanjem na Neoral doza se morala pravilno korigirati. Mjerenjem koncentracije ciklosporina u točki C0 za pripravake Sandimmune i Neoral primijećeno je da su izmjerene vrijednosti gotovo identične, dok su koncentracije tijekom prva 4sata nakon administracije značajno veće za Neoral što se povezalo s boljom efikasnošću nove formulacije. Provođenjem re-evaluacije površine ispod krivulje kao parametra od značaja za TDM uočeno je da mjerenje koncentracije tijekom prva 4 sata od administracije doze ($AUC_{(0-4)}$) najbolje korelira s rizikom od akutnog odbacivanja i pojave neželjenih učinaka.

Tome su pridonijela nova saznanja o farmakokinetičkom profilu ciklosporina. Maksimalan terapijski učinak (koji se očituje kao inhibicija kalcineurina) postiže se u vrijeme kada su koncentracije lijeka u krvi najviše, a to je 2 sata nakon administracije lijeka. Osim toga, maksimalan stupanj inter- i intraindividualnih razlika pojavljuje se oko apsorpcijske faze tijekom prva 4h nakon uzimanja doze, a minimalne razlike su uočene u razdoblju od 4 do 12 sati nakon doziranja (Jorga i sur., 2004.; Midtvedt, 2004.; Andrews i Cramb, 2002.).

Praćenje CsA u vremenskoj točki C2 pokazalo se prikladnim za karakterizaciju profila apsorpcije mikroemulzije što je čini dobrim parametrom za individualizaciju terapije te prilagodbu doze lijeka za svakog bolesnika ponaosob. Primjećeno je i smanjenje incidencije kardiovaskularnih i renalnih komplikacija koje se promatraju kroz vrijednosti krvnog tlaka odnosno povišenje koncentracija kreatinina u serumu. Iako literaturni podaci sugeriraju korištenje vremenske točke C2 za karakterizaciju profila apsorpcije ciklosporina i individualizaciju terapije, zbog uočenih minimalnih razlika u praksi se ustalilo i zadržalo praćenje preko C0 (Jia i sur., 2018.).

4.4. Prikaz slučaja

Dvadesetsedmogodišnjem bolesniku s dilatacijskom kardiomiopatijom transplantirano je srce u KB Dubrava. Nakon zahvata u terapiju je uveden ciklosporin A.
Doza lijeka se titrirala do postignutih vrijednosti od 50mg.
U kliničkom laboratoriju provodi se mandatorno praćenje koncentracija lijeka u krvi bolesnika. Uzorak pune krvi se analizira imunokemijskom metodom kemiluminiscencijom na analizatoru Architect i1000 (Abbott Laboratoires, Illinois, SAD), a predobrada uzorka se sastoji od lize eritrocita, centrifugiranja i sakupljana supernatanta.

Referentni interval za ciklosporin:

- 12 h nakon doze: 100-400 mikrograma/L
- 24h nakon doze: 100-200 mikrograma/L

Analiza se provodila svaki dan te je prema laboratorijskim nalazima primijećeno da je primjena ciklosporina u dnevnoj dozi dozi od 50 mg rezultirala previsokim koncentracijama lijeka u krvi (1133.8 mikrogram/L). Prelazak gornje granice terapijskog intervala doveo je do toksičnih učinaka što se očitovalo povišenjem koncentracija ureje (10.5 mmol/L) i kreatinina (117 mmol/L) u serumu kao znak nefrotoksičnosti te povišenjem glukoze (12.6 mmol/L).
Brzina glomerularne filtracije (GFR) je blago snižena (73.7 ml/min/1.73m^2) što se karakterizira kao drugi stupanj bubrežne disfunkcije.

Referentni interval:

- Ureja 2.8 - 8.3 mmol/L
- Kreatinin 64 – 104 mmol/L
- Glukoza 4.2 – 6.0 mmol/L

Kategorije GFR:

- G1 > 90 ml/min/1.73m^2
- G2 60-89 ml/min/1.73m2
- G3a 45-59 ml/min/1.73m2
- G3b 30-44 ml/min/1.73m2
- G4 15-29 ml/min/1.73m2
- G5 <15 ml/min/1.73m2

Na temelju izmjerenih parametara zaključeno je da je potrebna korekcija doze. Smanjenjem doze nalaz se vratio u normalu (koncentracije lijeka su se vratile unutar terapijskog intervala), ali je došlo i do oporavka bubrežne funkcije i smanjenja vrijednosti glukoze u krvi.

5. ZAKLJUČAK

Transplantacija srca je kompleksan zahvat u kojem se prožimaju znanja iz različitih medicinskih područja, a u posttransplantacijskom razdoblju nužno je dugoročno praćenje stanja bolesnika te primjena imunosupresiva kao cjeloživotne terapije.

Od svog uvođenja u praksu 80ih godina 20.stoljeća, ciklosporin A (CsA) je napravio revoluciju u transplantacijskoj medicini te je do danas ostao glavni izbor, kako u monoterapiji tako i u različitim kombinacijama lijekova koje uspješno produljuju preživljenje transplantata srca i pružaju bolesnicima mogućnost povratka normalnom i kvalitetnom životu.

Osnovan zahtjev koji se mora ispuniti prilikom primjene ovog lijeka je balans između postizanja takve razine imunosupresivnog učinka koja će spriječiti odbacivanje organa, a da neće izazvati pretjeranu supresiju imunosnog odgovora koja bi dovela bolesnika u stanje velike podložnosti infekcijama, malignim oboljenjima te velikom riziku pojave neželjenih učinaka koji su izrazito ozbiljni i štetni. Kod ciklosporina je ovakav balans teško postići zbog uskog terapijskog intervala i velikih inter- i intraindividualnih razlika u apsorpciji, a posljedično i sistemskoj izloženosti lijeku. Osim toga na razine CsA u krvi utječe i ekstenzivan metabolizam u jetri putem CYP enzima te brojne interakcije u koje stupa s drugim lijekovima, a koje mogu dovesti do povećanja ili sniženja koncentracije u krvi. Upravo je iz navedenih razloga jasno da je individualan pristup svakom bolesniku nužan kako bismo osigurali optimalan terapijski učinak uz minimalne nuspojave. Ovakav personalizirani pristup zahtjeva praćenje koncentracije lijeka u krvi svakog bolesnika i na temelju izmjerenih vrijednosti, uzimajući u obzir farmakogenetičke parametare i opće stanje bolesnika, korigiranje doze do postizanja stabilnih koncentracija u krvi. Od svoje implementacije u kliničku praksu, terapijsko praćenje lijekova (TDM) kao novija laboratorijska specijalnost razvijalo se i unaprjeđivalo ponajprije zahvaljujući razvoju prikladnih analitičkih metoda koje su pružile mogućnost pravovremene i točne kvantifikacije lijeka u krvi. Osim izbora prikladne metode, važno je i pravilno uzimanje te priprema uzorka za analizu, čuvanje na prikladnoj temperaturi i optimalan izbor vremenske točke uzorkovanja koja će dobro okarakterizirati profil apsorpcije ciklosporina. Iako C2 i AUC kao parametri za praćenje imaju svoje benefite, C0 se pokazao kao pouzdan alat za optimizaciju terapije i sigurnu primjenu ciklosporina uz minimalne nuspojave te se u praksi zadržalo praćenje preko ove točke. Ovim načinom doza se uspješno kontrolira i po potrebi korigira, a smanjena je i incidencija najčešćih neželjenih učinaka (hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija, renalna insuficijencija) nakon transplantacije.

Najčešće korištene metode za kvantitativno određivanje koncentracije lijeka u krvi su imunokemijske. Iako su najraširenije u praksi zbog brzine i jednostavnosti ipak nisu idealne jer

veliki problem predstavlja moguća križna reaktivnost koja dovodi do precjenjivanja koncentracije lijeka u krvi i moguće pogrešne medikacijske intervencije. Zato se zlatnim standardom smatra tekućinska kromatografija spregnuta s dvojnom spektrometrijom masa. Ova metoda je izrazito selektivna i specifična te pruža mogućnost određivanja traženog analita (lijeka) bez intereferencija s drugim strukturno sličnim lijekovima ili metabolitima. Ipak, zbog određenih nedostataka kao što su skupa instrumentacija i složena predobrada uzorka još uvijek nije zaživjela u rutinskim laboratorijskim određivanjima. Problemi se pokušavaju premostiti razvojem komercijalnih kompleta reagensa, automatizirane pripreme uzorka, gradijentne eluacije iz kolone, uvođenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti te ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) kao dodatnog koraka u predtretmanu uzorka, a sve s ciljem skraćivanja trajanja analize, smanjenja troškova i šire dostupnosti LC-MS/MS metode.

S obzirom da su referentni intervali za ciklosporin izrađivani na osnovu imunokemijskih metoda i nisu usporedivi s rezultatima masene spektrometrije koja detektira isključivo lijek, a ne i neaktivne metabolite, ukoliko LC-MS/MS metoda uđe u širu upotrebu bit će nužno revidiranje definiranih intervala za uspješno određivanje koncentracija lijeka u krvi.

6. LITERATURA

Andrews DJ, Cramb R. Cyclosporine: revisions in monitoring guidelines and review of current analytical methods. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39, 424-435.

Benjanuwattra J, Pruksakorn D, Koonrungsesomboon N. Mycophenolic Acid and Its Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions in Humans: Review of the Evidence and Clinical Implications. *J Clin Pharmacol*, 2019, 1-17

Classes of Heart Failure, 2017, Dostupno na: www.heart.org
Datumi pristupa: 20.8.2020.

Czogalla A. Oral Cyclosporine A - the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol Biol Lett*, 2009, 14,139-141.

Flegar Meštrić Z, Filipec Kanižaj T. Transplantacijska medicina. U: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 570-575

Grčević D, Marušić M. Presadba tkiva i organa U: Imunologija. Andreis B, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2010. str. 345-351.

Guyton AC, Hall JE. Blood Types, Transfusion, Tissue and Organ Transplantation U: Textbook of Medical physiology. Guyton AC, Hall JE, urednici, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2010. str. 449.

HALMED Baza lijekova. Dostupno na: www.halmed.hr
Datumi pristupa: 17.8.2020. ; 23.8.2020.

Hétu PO, Robitaille R, Vineta B. Successful and cost-efficient replacement of immunoassays by tandem mass spectrometry for the quantification of immunosuppressants in the clinical laboratory. *J Chromatogr B*, 2012, 883– 884, 95– 101.

Jia Y, Meng X, Li Y, Xu C, Zeng W, Jiao Y, Han W. Optimal sampling time-point for cyclosporin A concentration monitoring in heart transplant recipients. *Expl Ther Med,* 2018, 16, 4265-4270

Jorga A, Holt DW, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc*, 2004, 36 ,396-403.

Krensky AM ,Vincenti F, Bennett WM. Immunosuppressants, tolerogens and immunostimulants. U: Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therpaeutics. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, urednici, New York McGraw-Hill, 2005. str 1406, str. 1408-1415.

Lake DF, Briggs AD. Immunopharmacology. U: Basic and Clinical Pharmacology. Katzung BG, urednici, New York McGraw-Hill, 2017. str. 985-989.

Midtvedt, K. Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine. *Transplant Proc* , 2004, 36 , 430-433.

Nguyen LS, Vautier M, Allenbach Y , Zahr N, Benveniste, Funck-Brentano C, Salem JE. Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. *Drug Saf* , 2019, 42, 813-825.

Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 6. izd. St. Louis: Elsevier, 2018.

Saber-Moghaddama N, Nomania H, Sahebkarb A, Johnstond TP, Mohammadpoure AH. The change of immunosuppressive regimen from calcineurin inhibitors to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and its effect on malignancy following heart transplantation. *Int Immunopharmacol* , 2019, 69, 150-159.

Samardžić J, Lovrić D, Miličić D. Transplantacija srca – indikacije, kontraindikacije i dugoročno liječenje transplantiranih bolesnika. *Medix*, 2011, 92/93, 160-164.

Seger C, Shipkova M, Christians U, Billaud EM , Wang P, Holt DW, Brunet M, Kunicki PK, Pawinski T, Langman LJ, Marquet P, Oellerich M, Wieland E, Wallemacq P. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Ther Drug Monit* , 2016, 38, 170–189.

Sivathasan C. Experience with cyclosporine in heart transplantation. *Transplant Proc*, 2004, 36 , 346-348.

Soderlund C, Radegran G. Immunosuppressive therapies after heart transplantation- The balance between under- and over-immunosuppression. *Transplant Rev*, 2015, 29, 181-189

Stehlik J, Kobashigawa J, Hunt SA, Reichenspurner H, Kirklin JK. Honoring 50 Years of Clinical Heart Transplantation. *Circulation*, 2018, 137, 71-87.

Strukturne formule imunosupresiva. Dostupno na: www.drugbank.ca
Datumi pristupa: 25.8.2020.; 27.8.2020

Transplantacija. Dostupno na: www.msd-prirucnici.placebo.hr
Datumi pristupa: 14.8.2020.

Watson, DG. Mass spectrometry. U: Pharmaceutical analysis. Watson, DG, urednici, Churchill Livingstone, 1999, str. 168-175, 186-188.
Yoon Choo S. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J*, 2007 , 48, 11–23.

Zhang WQ, Vierling JM. Progress in Immunosuppressive Agents for Solid-Organ Transplantation. *Tex Heart Inst J* , 2019, 46, 69-70.

Zhang Y, Zhang R. Recent analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppresive drugs. *Drug Test Anal*., 2018, 10, 81-94

Žuntar I, Plavšić F, Wolf A, Štrauss B. Određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije. U: Štrausova medicinska biokemija. Štrauss B, Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, Petlevski R, Petrik J, Plavšić F, Plavšić V, Rumora L, Trbojević-Čepe M, Žuntar I, Wolf A, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009. str. 605.-621.

Clinical guidelines for transplant medications, 2019. Dostupno na: www.transplant.bc.ca
Datumi pristupa: 20.-27.8.2020.

Guideline on clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation, 2008. Dostupno na: www.ema.europa.eu
Datumi pristupa: 20.-27.8.2020.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, 2020. Dostupno na : www.ncbi.nlm.nih.gov
Datum pristupa: 26.8.2020.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Transplantacija je standardna terapijska opcija kod bolesnika sa teškim zatajenjem srca ukoliko su iscrpljene sve druge mogućnosti liječenja uključujući farmakoterapiju i različite kirurške metode. Unatoč detaljnoj predobradi i selekciji koju prolaze bolesnici prije samog zahvata, imunosni odgovor na presađeni organ je neizbježan. Stoga je za uspješno prihvaćanje transplantata nužno uvođenje imunosupresiva u doživotnu terapiju. Ciklosporin A (CsA) se nametnuo kao prvi izbor i temeljni lijek u različitim kombinacijama za sprječavanje odbacivanja. Tijekom godina došlo je do značajnog napretka u razvoju formulacija i poboljšanja farmakokinetičkih parametara, posebno apsorpcije koja je postala konzistentnija i brža s posljedično povećanom bioraspoloživošću. No unatoč ovim poboljšanjima, zbog uskog terapijskog indeksa, ozbiljnih nuspojava i razlika u izloženosti među pojedincima nakon primjene oralne doze potreba za terapijskim praćenjem koncentracija u krvi (TDM) i dalje je postojala. Nužan preduvjet koji mora biti zadovoljen da bi se provodio TDM je postojanje korelacije između terapijskog učinka i koncentracije lijeka u krvi. Mjerenje koncentracija u krvi i razmatranje korekcije doze na temelju izmjerenih vrijednosti pružilo je mogućnost individualnog pristupa svakom pojedinom bolesniku i optimizaciji terapije s ciljem poboljšanja ishoda liječenja. Unatoč određenim nedostatcima, najčešće korištene metode za kvantitativno određivanje lijekova u krvi su imunokemijske, dok se zlatnim standardom smatra tekućinska kromatografija spregnuta s dvojnom spektrometrijom masa. Iako visoko selektivna, nije implementirana u rutinski rad zbog visoke cijene analizatora i složene predobrade uzorka. Osim izbora prikladne metode, važno je i pravilno uzimanje te priprema uzorka za analizu, čuvanje na prikladnoj temperaturi i optimalan izbor vremena uzorkovanja. Standardni način praćenja koncentracije ciklosporina u krvi je preko najniže (trough,C0) koncentracije koji je tijekom godina ostao ustaljen u kliničkoj praksi. Na osnovu farmakokinetičkih karakteristika CsA (najviša koncentracija u krvi dostiže se 2h nakon administracije, maksimalan stupanj inter- i intraindividualnih razlika pojavljuje se oko apsorpcijske faze tijekom prva 4h nakon uzimanja doze) istraživali su se i drugi parametri kao što je vrijednost $AUC_{(0-4)}$ te koncentracija u točki C2 (2h nakon primjene oralnog oblika). Vrijednosti C2 dobro reflektiraju stupanj imunosupresije i toksičnosti lijeka, ali unatoč tome, zbog sličnosti dobivenih rezultata za praćenje CsA se koristi točka C0 koja se pokazala kao pouzdan alat za karakterizaciju profila apsorpcije lijeka i individualizaciju terapije.

SUMMARY

Transplantation is the standard therapeutic option for patients with severe heart failure if all other treatment options, including pharmacotherapy and various surgical methods, have been exhausted. Despite the detailed pretreatment and selection that patients undergo before the procedure itself, an immune response to the transplanted organ is inevitable. Therefore, the introduction of immunosuppressants into a lifelong therapy is necessary for successful graft survival. Cyclosporine A (CsA) has emerged as the first choice and core drug in various combinations to prevent rejection. Over the years, significant progress has been made in the development of formulations and improvements in pharmacokinetic parameters, especially absorption, which has become more consistent and faster with consequently increased bioavailability. However, despite these improvements, due to the narrow therapeutic index, serious side effects, and differences in exposure among individuals after oral administration, the need for therapeutic monitoring of blood concentrations (TDM) still existed. A necessary prerequisite that must be met in order to perform TDM is the existence of a correlation between the therapeutic effect and the drug concentration in the blood. The measurement of blood concentrations and dose adjustment based on measured values provided the possibility of an individual approach to each patient and optimization of therapy with the aim of improving treatment outcomes. Despite certain shortcomings, the most commonly used techniques for quantitative determination of drugs in the blood are immunoassays, while liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is considered the gold standard. Although highly selective, it is not implemented in the routine practice due to the high cost of the analyser and the complex sample pretreatment. Apart from choosing the appropriate method, it is also important to properly take and prepare sample for analysis, storage at the appropriate temperature and choice of the right sampling time. The standard way to monitor cyclosporin blood levels is over the lowest (trough, C0) concentration and it has remained established in clinical practice over the years. Taking into account pharmacokinetic characteristics of CsA (peak blood concentration is reached 2 h after administration, the maximum degree of inter- and intraindividual differences occur around the absorption phase during the first 4 h after dosing) other parameters such as AUC and concentration at point C2 (2h after oral administration) were studied. C2 values well reflect the degree of immunosuppression and drug toxicity, but despite this, due to the similarity of the results obtained, point C0 is used to monitor CsA and it has proven to be a reliable tool for characterizing drug absorption profiles and individualizing therapy.

8. PRILOG

POPIS KRATICA:

NYHA	engl. *New York Heart Association*
HLA	engl. *Human Leukocyte Antigen*
PRA	engl. *Panel Reactive Antibodies* (panel reaktivih protutijela)
MHC	engl. *Major Histocompatibility Complex* (kompleks tkivne podudarnosti)
APC	engl. *Antigen Presenting Cell* (entigen prezentirajuća stanica)
TCR	engl. *T-cell receptor* (T stanični receptor)
IL	interleukin
IFN	interferon
TNF	engl. *Tumor Necrosis Factor* (faktor nekroze tumora)
CsA	Ciklosporin A
mTOR	engl. *mammalian Target of Rapamycin*
NFAT	engl. *Nuclear Factor of Activated T-cells* (nuklearni faktor aktivacije T-stanica)
TGF	engl. *Transforming Growth Factor* (transformirajući faktor rasta)
CYP	citokrom P450
FKBP-12	engl. *FK506-binding protein-12*

AUC	engl. *Area Under the Curve* (površina ispod krivulje)
PI3K	engl. *Phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidilinozitol-3-kinaza)
MPA	engl. *Mycophenolic Acid* (mikofenolna kiselina)
MPAG	engl. *Mycophenlic Acid Glucuronide* (glukuronid mikofenolne kiseline)
IMPDH	engl. *inosine-monophosphate dehydrogenase* (inozin monofosfat dehidrogenaze)
TDM	engl. *Therapeutic Drug Monitoring* (terapijsko praćenje lijekova)
LC-MS/MS	engl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (tekućinska kromatorafija spregnuta s dvojnom spektrometrijom masa)
ESI	engl. *Electrospray Ionization* (elektrosprej ionizacija)
UPLC	engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography* (tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti)
DBS	engl. *Dried Blood Spot* (suha kap krvi)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Kolegij: Klinčka farmacija s farmakoterapijom
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Imunosupresivna terapija nakon transplantacije organa - praćenje koncentracije ciklosporina nakon transplantacije srca

Anita Bašić

SAŽETAK

Transplantacija je standardna terapijska opcija kod bolesnika sa teškim zatajenjem srca ukoliko su iscrpljene sve druge mogućnosti liječenja uključujući farmakoterapiju i različite kirurške metode. Unatoč detaljnoj predobradi i selekciji koju prolaze bolesnici prije samog zahvata, imunosni odgovor na presađeni organ je neizbježan. Stoga je za uspješno prihvaćanje transplantata nužno uvođenje imunosupresiva u doživotnu terapiju. Ciklosporin A (CsA) se nametnuo kao prvi izbor i temeljni lijek u različitim kombinacijama za sprječavanje odbacivanja. Tijekom godina došlo je do značajnog napretka u razvoju formulacija i poboljšanja farmakokinetičkih parametara, posebno apsorpcije koja je postala konzistentnija i brža s posljedično povećanom bioraspoloživošću. No unatoč ovim poboljšanjima, zbog uskog terapijskog indeksa, ozbiljnih nuspojava i razlika u izloženosti među pojedincima nakon primjene oralne doze potreba za terapijskim praćenjem koncentracija u krvi (TDM) i dalje je postojala. Nužan preduvjet koji mora biti zadovoljen da bi se provodio TDM je postojanje korelacije između terapijskog učinka i koncentracije lijeka u krvi. Mjerenje koncentracija u krvi i razmatranje korekcije doze na temelju izmjerenih vrijednosti pružilo je mogućnost individualnog pristupa svakom pojedinom bolesniku i optimizaciji terapije s ciljem poboljšanja ishoda liječenja. Unatoč određenim nedostatcima, najčešće korištene metode za kvantitativno određivanje lijekova u krvi su imunokemijske, dok se zlatnim standardom smatra tekućinska kromatografija spregnuta s dvojnom spektrometrijom masa. Iako visoko selektivna, nije implementirana u rutinski rad zbog visoke cijene analizatora i složene predobrade uzorka. Osim izbora prikladne metode, važno je i pravilno uzimanje te priprema uzorka za analizu, čuvanje na prikladnoj temperaturi i optimalan izbor vremena uzorkovanja. Standardni način praćenja koncentracije ciklosporina u krvi je preko najniže (trough,C0) koncentracije koji je tijekom godina ostao ustaljen u kliničkoj praksi. Na osnovu farmakokinetičkih karakteristika CsA (najviša koncentracija u krvi dostiže se 2h nakon administracije, maksimalan stupanj inter- i intraindividualnih razlika pojavljuje se oko apsorpcijske faze tijekom prva 4h nakon uzimanja doze) istraživali su se i drugi parametri kao što je vrijednost AUC (0-4) te koncentracija u točki C2 (2h nakon primjene oralnog oblika). Vrijednosti C2 dobro reflektiraju stupanj imunosupresije i toksičnosti lijeka, ali unatoč tome, zbog sličnosti dobivenih rezultata za praćenje CsA se koristi točka C0 koja se pokazala kao pouzdan alat za karakterizaciju profila apsorpcije lijeka i individualizaciju terapije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	34 stranice, 6 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 31 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Transplantacija organa, imunospresivi, ciklosporin A, terapijsko praćenje lijekova, imunokemijske tehnike, LC-MS/MS, koncentracija u krvi
Mentor:	**Prof.dr.sc. Vesna Bačić Vrca**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* *Komentor*: **Dr.sc. Lovorka Đerek**, *specijalist medicinske biokemije*
Ocjenjivači:	**Prof.dr. sc. Vesna Bačić Vrca**, , *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
	Dr.sc. Lovorka Đerek, *specijalistica medicinske biokemije*
	Izv.prof.dr. sc. Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* Rad prihvaćen: Ožujak, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Clinical pharmacy with pharmacotherapy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Immunosuppressive therapy after organ transplantation - drug monitoring of cyclosporine after heart transplantation

Anita Bašić

SUMMARY

Transplantation is the standard therapeutic option for patients with severe heart failure if all other treatment options, including pharmacotherapy and various surgical methods, have been exhausted. Despite the detailed pretreatment and selection that patients undergo before the procedure itself, an immune response to the transplanted organ is inevitable. Therefore, the introduction of immunosuppressants into a lifelong therapy is necessary for successful graft survival. Cyclosporine A (CsA) has emerged as the first choice and core drug in various combinations to prevent rejection. Over the years, significant progress has been made in the development of formulations and improvements in pharmacokinetic parameters, especially absorption, which has become more consistent and faster with consequently increased bioavailability. However, despite these improvements, due to the narrow therapeutic index, serious side effects, and differences in exposure among individuals after oral administration, the need for therapeutic monitoring of blood concentrations (TDM) still existed. A necessary prerequisite that must be met in order to perform TDM is the existence of a correlation between the therapeutic effect and the drug concentration in the blood. The measurement of blood concentrations and dose adjustment based on measured values provided the possibility of an individual approach to each patient and optimization of therapy with the aim of improving treatment outcomes. Despite certain shortcomings, the most commonly used techniques for quantitative determination of drugs in the blood are immunoassays, while liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is considered the gold standard. Although highly selective, it is not implemented in the routine practice due to the high cost of the analyser and the complex sample pretreatment. Apart from choosing the appropriate method, it is also important to properly take and prepare sample for analysis, storage at the appropriate temperature and choice of the right sampling time. The standard way to monitor cyclosporin blood levels is over the lowest (trough, C0) concentration and it has remained stable in clinical practice over the years. Taking into account pharmacokinetic characteristics of CsA (peak blood concentration is reached 2 h after administration, the maximum degree of inter- and intraindividual differences occur around the absorption phase during the first 4 h after dosing) other parameters such as AUC and concentration at point C2 (2h after oral administration) were studied. C2 values well reflect the degree of immunosuppression and drug toxicity, but despite this, due to the similarity of the results obtained, point C0 is used to monitor CsA and it has proven to be a reliable tool for characterizing drug absorption profiles and individualizing therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes:	34 pages, 6 figures, 1 table and 31 references. Original is in Croatian language.
Keywords:	Organ transplantation, immunosuppressant, cyclosporine A, therapeutic drug monitoring, immunoassays, LC-MS/MS, blood concentration
Mentor:	**Vesna Bačić Vrca**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Co-mentor: **Lovorka Đerek, Ph.D**., specialist in laboratory medicine, EuSpLM

Reviewers:	**Vesna Bačić Vrca, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
	Lovorka Đerek, Ph.D., *specialist in laboratory medicine, EuSpLM* **Anita Hafner, Ph.D. ,** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry The thesis was accepted: March 2021.