

Ústav farmakologie Lékařské fakulty UP Olomouc

Oddělení klinické farmakologie, ÚLD FN Ostrava

Ústav klinické farmakologie Lékařské fakulty OU v Ostravě

Mgr. Petra Halvová

Terapeutické monitorování léčiv v klinické praxi a výzkumu

Nové možnosti TDM cyklosporinu A a jeho metabolitů po
transplantaci ledvin

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu, studijní obor
Lékařská farmakologie.

Ostrava 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem lidem, kteří mi pomáhali v průběhu přípravy této práce:

- svému školiteli doc. MUDr. Milanu Grundmanovi, CSc. za vedení, rady a připomínky v průběhu celého studia,
- MUDr. Ivaně Kacířové, Ph.D. za možnost vypracování práce na Oddělení klinické farmakologie ÚLD FN Ostrava a cenné rady,
- RNDr. Haně Brozmanové, CSc. za vypracování metody a cenné podněty,
- všem spolupracovníkům na Oddělení klinické farmakologie ÚLD FN Ostrava za pomoc při sběru a zpracování vzorků,
- a hlavně své rodině, zejména mým rodičům za neutuchající důvěru a podporu bez níž by tato práce nemohla vzniknout.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně a uvedla všechny použité prameny.

V Ostravě dne

Petra Halvová

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíle	17
3. Metoda	19
4. Výsledky	29
5. Diskuse	57
6. Závěry	65
7. Souhrn	67
8. Zkratky	75
9. Literatura	77
10. Publikované práce, které jsou součástí disertační práce	87
11. Publikované práce	132

1. ÚVOD

1. Terapeutické monitorování hladin

TDM (terapeutické monitorování hladin léčiv) je specifická metoda klinické farmakologie pro monitorování terapie pomocí měření koncentrace léčiva v séru (plazmě, krvi). Jejím základním předpokladem je existence úzkého vztahu mezi koncentrací léčiva v séru a jeho farmakologickým efektem. (1)

Je významným pomocníkem pro personalizovanou medicínu v oblasti individualizace dávkování, poněvadž umožňuje racionální terapii s minimalizací výskytu nežádoucích účinků, snížení mortality a morbidit a snížení nákladů.(1)

Použití TDM v nemocnici vede ke zkrácení doby hospitalizace, sníží se morbidita a mortalita, jsou nižší náklady. TDM je i dobrým ukazatelem interdisciplinární spolupráce tří různých oborů (analytik, klinický farmakolog, klinik). Výsledkem využívání TDM u ambulantních pacientů je méně hospitalizací, snížení pracovní neschopnosti a zvýšení kvality života. Při nesprávném používání TDM, kdy nejsou prováděny odpovídající změny v terapii a dochází ke zbytečným odběrům krve, zvyšujeme zbytečně náklady. (1)

V současné době je pro kontrolu farmakoterapie využíváno TDM následujících skupin léčiv:

1. **imunosupresiva – cyklosporin A, takrolimus, sirolimus, everolimus, mykofenolát**
2. antibiotika – aminoglykosidy (gentamicin, amikacin), vankomycin
3. bronchodilatancia – teofylin
4. antiepileptika – fenobarbital, primidon, fenytoin, etosuximid, karbamazepin, kyselina valproová, klonazepam, lamotrigin, topiramát, levetiracetam
5. cytostatika – metotrexát, busulfan
6. kardiaka – amiodaron, digoxin
7. psychofarmaka – lithium, diazepam, antidepressiva

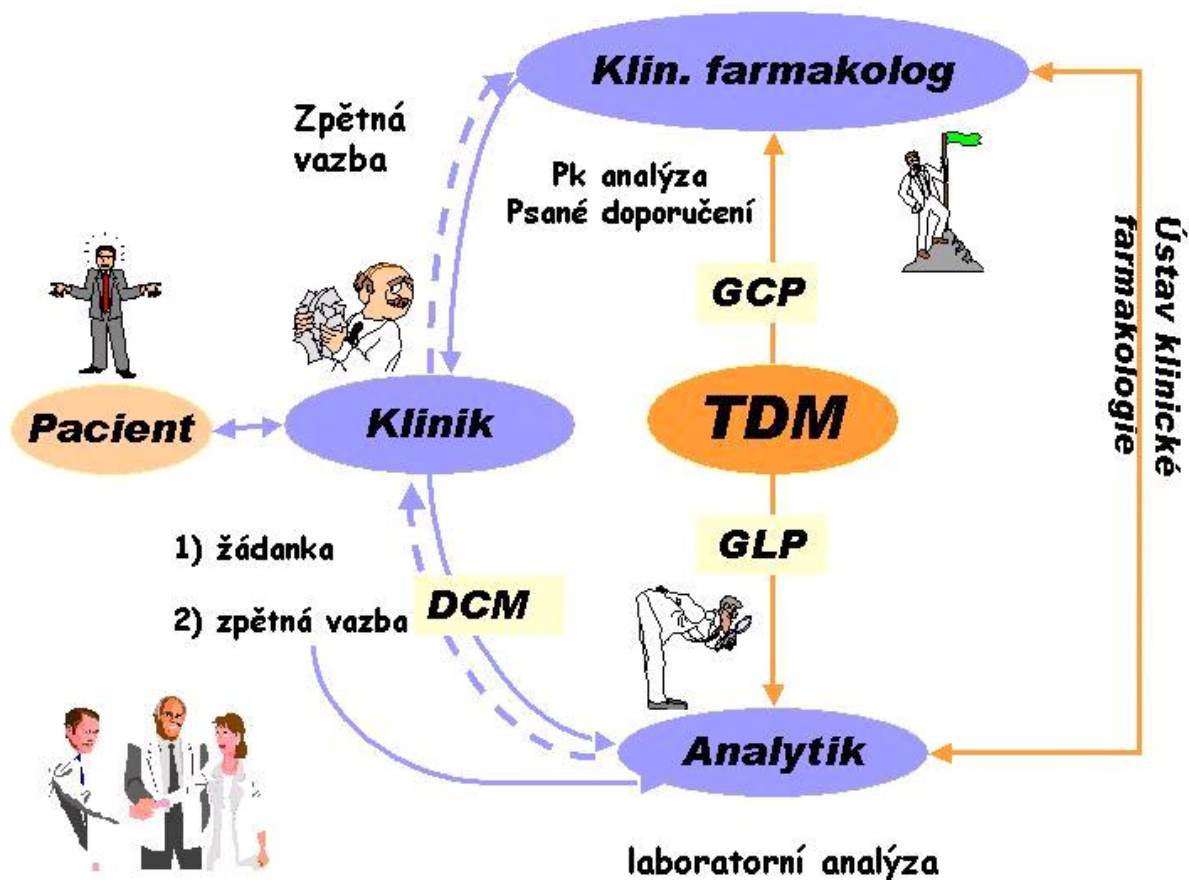
Praktické provedení TDM má tři základní části (obr 1.):

1. **Analýza léčiv** podle zásad GLP (good laboratory practice) s použitím imunoanalytických enzymo-imunoanalytických metod, plynové chromatografie, kapalinová chromatografie a nejnověji kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Klinik

pro vyřešení neuspokojivých farmakoterapeutických výsledků odebere pacientovi krev a s vyplněnou podrobnou žádankou posílá materiál k laboratornímu vyšetření.

2. **Interpretace hladiny léčiva** s případnou farmakokinetickou analýzou. Výsledek koncentrace léčiva je poslán z laboratoře klinickému farmakologovi, který na základě GCP (good clinical practice) pošle psané doporučení pro eventuální úpravu dávky nebo dávkového intervalu klinikovi.
3. **Zpětná vazba s klinikem.** Zpětná vazba s klinikem má zásadní význam, poněvadž jeho akceptace psaného doporučení a další kontrola podle tohoto doporučení zajistí změnu dávkování a tím i racionální farmakoterapii. Pokud klinik nevyužije psané doporučení a výsledek jen založí do chorobopisu, jedná se pouze o zbytečné zvyšování nákladů. (1). Zásadní je dobrá spolupráce mezi klinikem a klinickým farmakologem.

Obrázek 1. Schéma správného terapeutického monitorování hladin léčiv (TDM)



2. Imunosupresiva

Imunosupresiva jsou chemicky různorodá léčiva, která působí v různých stupních imunitní reakce. Hlavní uplatnění nacházejí v transplantologii, některá současně dostupná imunosupresiva byla vyvinuta také k použití při autoimunitních chorobách a závažných projevech alergie. Další využití je v hematologii a v kardiologii, monoklonální protilátky jsou používány v diagnostice. Některá imunosupresiva vyvolávají imunodepleci efektorových buněk, zatímco jiná jsou převážně imunomodulátory ovlivňující aktivitu buněk obvykle pomocí inhibice cytokinů. Některá z těchto léčiv mají nespecifický účinek na imunitní systém, zatímco jiná působí na specifické cíle. U léčiv s nespecifickým účinkem se daleko častěji objevují závažné nežádoucí účinky. Farmakologický účinek specificky působících léčiv může být snížen, pokud je cíl jejich účinku obejit alternativní cestou. (2)

Mezi nejběžněji používaná imunosupresiva můžeme zařadit kortikosteroidy (prednison, prednisolon, metylprednisolon, dexametazon), inhibitory a analoga DNA bází (azatioprin, metotrexát) a malé molekuly (kalcineurinové inhibitory – cyklosporin A a takrolimus; mTOR inhibitory – sirolimus a everolimus). V případě indukční léčby se pak používají antilymfocytární protilátky, ať už polyklonální (ALG) nebo monoklonální (muromonab, basiliximab, daklizumab, alemtuzumab). (2, 3)

Dlouhodobě podávaná imunosuprese u transplantovaných pacientů způsobuje sníženou schopnost imunitního systému plnit svou homeostatickou funkci, což vede k vyšší morbiditě a mortalitě u těchto jedinců. Monitorování funkčnosti imunitního systému a jeho schopnosti odpovídat na antigenní podněty má proto velký význam, aby mohla být u těchto pacientů aplikována individualizovaná imunosupresivní terapie zajišťující optimální poměr mezi nutnou imunosupresí a schopností imunitního systému zajišťovat imunitní dozor v organismu. Mezi nejčastější virová agens způsobující posttransplantační komplikace patří herpetické viry a mezi nimi cytomegalovirus (CMV), z bakteriálních infekcí jsou to pak mykobakteria, především mycobacterium tuberculosis. Pro obě výše zmíněná agens je charakteristické, že se jedná o organismy, které přežívají intracelulárně a jejich úplná eradikace je velmi obtížná. Imunitní systém dokáže při normální, nesuprimované funkci, jejich případnou aktivaci v rámci svého dozoru sám eliminovat, takže postižený jedinec vůbec nepozoruje příznaky nemoci. Jestliže se však po transplantaci nachází ve stavu silnější imunosuprese, mohou se tato agens

nekontrolovatelně aktivovat, nejsou účinně eliminována a infekce propuká v plném rozsahu. Proto je např. také doporučováno, aby u příjemců orgánů, kteří jsou séronegativní na CMV, byla již preventivně podávána virostatika především tehdy, obdrželi-li orgán od CMV pozitivního dárce (4, 5). Pro monitoring akutní CMV infekce nestačí sérologický screening a je zapotřebí provádět průkaz CMV-DNA (6).

2.1. Kalcineurinové inhibitory

Kalcineurinové inhibitory (CNI) významně přispívají již od 80-tých let k úspěchu při orgánových transplantacích, a to zejména u transplantací ledvin. Patří zde cyklosporin A a takrolimus. Cyklosporin A je prvním lékem selektivně působícím na T-buňky, který oproti dříve užívanému azatioprinu nevyvolává myelosupresi, takrolimus byl vyvinut jako jeho terapeutická alternativa. CNI mají prokazatelnou roli nejen při prevenci akutní buněčné rejekce transplantovaných orgánů, ale také při léčbě psoriázy a nefrotického syndromu. Jsou užívány i u mnoha autoimunitních chorob, například cyklosporin A slouží jako lék II.-III. linie ve farmakoterapii revmatoidní artritidy. (7)

Mechanismus účinku, kterým CNI inhibují aktivaci T-buněk, je dobře znám. Vazba receptoru T-buněk s MHC (major histocompatibility complex) peptidem za normálních okolností spustí kalcium dependentní intracelulární signalizaci, která vyústí v aktivaci kalcium/kalmodulin dependentní fosfatázy kalcineurinu. To vede k defosforylaci NFAT (nuclear factor activated T-lymphocytes) umožňující jeho translokaci do jádra, kde zvyšuje vazbu transkripčních faktorů pro geny kódující prozánětlivé cytokiny jako jsou IL-2, IL-3, IL-4, INF- γ a TNF- α . Kalcineurinové inhibitory po vstupu do cytoplazmy T-buněk vytvoří komplexy s jejich imunofiliny (7, 8), přičemž cyklosporin A se váže na cyklofilin a takrolimus na tzv. 12kDa FK506-vázající protein (FKBP-12 - FK binding protein-12). Komplexy CNI-imunofilin inhibují kalcineurinovou aktivitu a tím předcházejí translokaci NFAT do jádra a transkripci genů cytokinů. Výsledkem je, že CNI zablokují produkci prozánětlivých cytokinů jako je např. IL-2 a inhibují aktivaci T-buněk a jejich proliferaci (9). Při léčbě revmatoidní artritidy je cyklosporin A dále schopen kompletně nebo částečně zablokovat tvorbu IL-15 a IL-17.

2.1.1. Cyklosporin A

Cyklosporin A (CsA) je cyklický undekapeptid se strukturou cyclo-[MeBmt-a-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal] a s molekulovou hmotností 1201 Da. Na rozdíl od lineárních peptidů nemá volnou karboxy ani amino skupinu a proto se nerozpouští ve vodě, je však dobře rozpustný v tucích. Je velmi stálý a jeho cyklická struktura se rozpadá až při působení silných kyselin nebo zvýšené teploty.

CsA se používá nejen v transplantologii a při léčbě vybraných autoimunitních poruch, ale jeho uplatnění se rozšiřuje i na řadu onemocnění vyvolaných nebo provázených poruchami imunity. Jeho indikace zasahují do oboru revmatologie, gastroenterologie, hematologie, neurologie, diabetologie, oftalmologie a dermatologie (10, 11).

2.1.1.1. Farmakokinetika

Cyklosporin A může být podáván jak intravenózně tak perorálně. Je vysoce lipofilní, díky čemuž je snadno distribuován přes membrány a do tkání. V krvi je 58% CsA vázáno na erythrocyty, 4% na granulocyty, 5% na lymfocyty a 33% se vyskytuje v plazmě, kde je asi 98% vázáno na proteiny (85-90% na lipoproteiny a 5-15% na ostatní proteiny) (12). Po perorálním podání je popisována jeho signifikantní presystémová eliminace, zejména díky biotransformaci léčiva 3A izoformou cytochromu P450. Přítomnost jiných P450 izoenzymů na biotransformačních procesech CsA není vyloučena, zejména díky metabolitům nalezeným v moči po perorálním podání léčiva. Cyklosporin A byl popsán také jako středně silný inhibitor biotransformační aktivity P450 3A4 a je i substrátem a inhibitorem P-glykoproteinu. Ačkoli je peptidová struktura CsA k metabolismu rezistentní, boční řetězce jsou extenzivně metabolizovány na více než 30 metabolitů (13). Tyto jsou nazvány podle jednotné nomenklatury z roku 1990, která zahrnuje primární i sekundární metabolity nalezené v moči, žluči, krvi a stolici (14). Názvosloví metabolitů CsA je velmi jednoduché, písmeno A ve zkratce značí cyklosporin A a písmeno M metabolit. Číslice označuje pořadí aminokyseliny, u které došlo k hydroxylaci. V případě N-demetylace se přidává navíc písmeno N, u cyklizace písmeno c. Tento systém věnuje také pozornost rozlišení různých metabolitů podléhajících oxidaci v pozici 1. Například. AM1A znamená oxidaci v pozici 1 na kyselinu. Cyklický analog je pak označován AM1cA, aldehyd AM1cAL (14). Běžně měřitelnými metabolity v krvi jsou AM1,

AM9, AM1c, AM19 a AM4N, přičemž AM1 dosahuje nejvyšší koncentraci v porovnání s ostatními metabolity. Ve žluči byly nalezeny AM19, AM4N9, AM1, AM1A a AM1c, hlavním metabolitem je zde AM1A. (15) Vzniklé metabolity vykazují nižší imunosupresivní aktivitu a nežádoucí účinky než mateřská látka.(15) Pouze 0,1 % CsA je v nezměněné formě vylučováno močí, případně stolicí (16) Základní farmakokinetické parametry jsou uvedeny v tabulce 1.(3)

Tabulka 1. Farmakokinetické parametry cyklosporinu A ($t_{1/2}$, biologický poločas; Cl, clearance; V_d , distribuční objem; f_u vazba na plazmatické proteiny; F, absolutní biologická dostupnost po perorálním podání)

	$t_{1/2}$ [h]	Cl [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f_u [%]	F [%]
cyklosporin A	3 - 27	5 – 10	3,6 – 7,4	96 – 99	5 - 80

2.1.1.2. Lékové interakce

Cyklosporin A je substrátem CYP 3A (a zároveň inhibitorem P450 3A4) a substrátem i inhibitorem P-glykoproteinu, z tohoto důvodu je popisována celá řada lékových interakcí spojených s jeho podáváním. P-glykoprotein je transmembránový transportér, který přenáší mnoho endogenních substancí z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Ve střevě snižuje P-glykoprotein biologickou dostupnost léčiva po perorálním podání tím, že ho vylučuje z enterocytů do lumen střeva. Je kódován genem MDR-1 (multidrug resistance-1) známým také pod označením ABCB1. Genetický polymorfismus tohoto transportéru může přispívat k výrazné interindividuální variabilitě farmakokinetiky CsA, nicméně výsledky doposud provedených studií jsou protichůdné. Zcela jasný není ani vliv současného podání inhibitorů či induktorů P-glykoproteinu a CYP 3A4 k cyklosporinu A. Biologická dostupnost CsA může být kromě toho ovlivněna i současně užitou potravou, jídlo zvyšuje biologickou dostupnost o 23 % a mléko o 39 % (16). Lékové interakce jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Interakce cyklosporinu A (AUC – plocha pod křivkou)(3)

Zvýšení hladin CsA		
makrolidová antibiotika	klaritromycin	↑ AUC 3x
	erytromycin	↑ AUC 5x
	roxitromycin	↑ AUC o 37 %
azolová antimykotika	itrakonazol	↑ AUC 2-3x
	ketokonazol	↑ AUC 2x
	vorikonazol	↑ AUC 2,5x
H ₂ -antihistaminika	cimetidin	↑ AUC o 32 %
antidepresiva	fluoxetin, fluvoxamin	↑ AUC 2x
kalciové blokátory	verapamil	↑ AUC o 50 - 70 %
	diltiazem	↑ AUC o 30 - 60 %
antibiotika	gentamicin	↑ AUC o 5 - 65 %
	chloramfenikol	↑ AUC o 41 %
Ostatní	grapefruitová šťáva	↑ AUC o 72 %
Snížení hladin CsA		
antiepileptika	fenobarbital	↓ AUC o 25 %
	karbamazepin	↓ AUC o 50 %
	fenytoin	↓ AUC o 37 - 47 %
Ostatní	rifampicin	↓ AUC až o 70 %
	saquinavir	↓ AUC až o 90 %
	třezalka tečkovaná	↓ AUC o 30 - 65 %

2.1.1.3 Nežádoucí účinky

CNI jsou spojeny s řadou lékově specifických nežádoucích účinků. Mnoho z nich je závislých na dávce a ve vztahu k místům, kde je hladina kalcineurinu nejvyšší, tedy v mozku a v ledvinách. Užívání cyklosporinu A je spojeno zejména s nefrotoxicitou, která je jedním z nejvýznamnějších nežádoucích účinků, zvláště po transplantaci. Částečně je to díky vazokonstrikci aferentní arterioly s následnou redukcí renálního průtoku krve a míry glomerulární filtrace; tyto změny jsou projevem akutní toxicity a jsou reverzibilní při vysazení CNI. Dlouhodobě cyklosporin A vyvolává chronické ireverzibilní změny, které jsou charakterizovány intersticiální fibrózou a obliterativními arteriolárními změnami díky fibróznímu ztlustění intimy. Běžným důsledkem léčby cyklosporinem A je pak hypertenze (7), která je někdy spojená se zvýšením krevního tlaku v nočních hodinách (17-19). Důvodem hypertenze je CsA indukovaná rozsáhlá vazokonstrikce v systémové cirkulaci a nárůst arteriálního krevního tlaku (20). Vzestup krevního tlaku při užívání CsA byl ve dříve provedených studiích ve srovnání s placebem statisticky významný a je také zřejmě závislý na dávce - nižší dávky (1-4 mg/kg/den) zvyšovaly střední krevní tlak průměrně o 5mmHg, zatímco vyšší dávky (>10 mg/kg/den) průměrně o 11mmHg (21). Neurotoxicita způsobená CNI je zhoršená v případě nízké sérové hladiny hořčiku a může se projevovat několika způsoby. Příkladem je bolest hlavy a tremor, které se zvyrazňují v době dosažení maximální koncentrace léčiva v plazmě (asi za 1-2 hod po užití). Běžná je nespavost, méně časté rozčilení, neklid, křeče, psychózy, halucinace, encefalopatie a poruchy vědomí (8). Metabolické účinky CsA zahrnují diabetogenní efekt, hyperurikémii a hyperlipidemii. Specifickým nežádoucím účinkem cyklosporinu A je hyperplazie dásní a hypertrichóza (8).

2.1.1.4. Terapeutické monitorování

Cyklosporin A je lék s úzkým terapeutickým rozmezím, u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita farmakokinetiky, mající za následek rozdílnou odpověď na terapii při podání stejné dávky. Jeho nedostatečná sérová koncentrace vede k rejekci transplantátů, naopak vysoké koncentrace se projevují nefrotoxicitou, selháváním orgánů a deliriem. V klinické praxi neexistují imunologické testy, kterými by bylo možno účinnost imunosuprese CsA sledovat, a proto se monitorování CsA omezuje na stanovení jeho koncentrací v krvi. Bylo zjištěno, že monitorování CsA pomocí údolních hladin (C_0 – trough) je nepřesné (22, 23). Proto se v poslední době výzkum soustřeďuje na sledování celkové expozice CsA (vyjádřené jako AUC), která by měla lépe korelovat s klinickým stavem a rizikem rejekce. Pro výpočet AUC se používá metoda omezeného počtu odběrů, tzv. sparse sampling (24-29). Spolehlivé i praktické je také stanovení hodnoty C_{max} (maximální dosažená koncentrace CsA) nebo C_2 (koncentrace dosažená ve 2. hodině po podání CsA) (30-34). Terapeutické monitorování (TDM) CsA kromě stanovení jeho hladin sleduje také klinický stav pacienta při imunosupresi a zabývá se tak nejen farmakokinetickými, ale i farmakodynamickými údaji založenými na kvantitativní analýze CsA. Cyklosporin A se používá i v kombinaci s jinými imunosupresivy, jako je sirolimus, everolimus a kyselina mykofenolová. Terapeutická rozmezí jednotlivých imunosupresiv uváděná v literatuře jsou zatím velmi rozdílná.

Vzhledem k mechanismu účinku CsA, kterým je vazba na cyklofilin A v cytoplazmě lymfocytů, je výhodnější monitorovat koncentrace CsA právě v místě účinku, a to v lymfocytech (35). Někteří autoři prokázali, že koncentrace v lymfocytech mají, na rozdíl od hladin v krvi, výraznou souvislost s klinickým stavem a imunitní odpovědí. (36, 37)

Pro TDM cyklosporinu A se používají především metody imunoanalytické, metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS).

2.1.1.4.a Imunoanalytické metody stanovení cyklosporinu A

Pro účely TDM jsou ke stanovení hladin CsA v laboratorní praxi využívány různé varianty kompetitivních imunoanalytických metod. Jejich principem je soutěž (tedy kompetice) o omezené množství vazebných míst na specifické protilátce. Během reakce mezi sebou

soutěží na jedné straně cyklosporin A přítomný v analyzovaném vzorku a na straně druhé cyklosporin A označený vhodným způsobem (radioizotopem, enzymem, fluoresceinem apod.), který je do reakce přidáván jako indikátor pro kvantifikaci jejího průběhu.

S ohledem na postupný vývoj těchto metod byly ke značení používány nejdříve radioizotopy (tritium ^3H nebo jod ^{125}I), později pak především enzymy, s využitím jejich následné reakce s odpovídajícím substrátem a fotometrické nebo fluorometrické detekce. Vývoj těchto metod se odehrával také ve vztahu k používaným specifickým protilátkám, což mělo samozřejmě vliv na vlastní specifitu stanovení. Ta je právě v případě monitorování CsA, vzhledem k přítomnosti řady jeho metabolitů, významným problémem. V posledních letech byly zavedeny do rutinní praxe specifické monoklonální protilátky s malou zkříženou reakcí s metabolity CsA, které se připravují *in vitro* hybridizací.

Imunoanalytické metody jsou z hlediska instrumentálního provedení poměrně jednoduché a nezávislé na proměnných parametrech přístrojové techniky. S postupem času byly zejména neizotopové varianty těchto metod automatizovány s možností jejich zpracování nejen na imunoanalyzátozech (metoda FPIA), ale také na běžných biochemických analyzátozech (metody EMIT, CEDIA).

Některé parametry specifických imunoanalytických metod jsou shrnuty v publikaci autorů Šafarčík, a kol. (38).

2.1.2.4.b HPLC metoda stanovení cyklosporinu A

Stanovení CsA v biologických tekutinách pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) umožňuje přesné měření parentní látky, proto je považována za referenční metodu. Tato metoda dovoluje na rozdíl od imunoanalytických metod stanovit společně s CsA i jeho metabolity. HPLC metody využívají principu separace látek na základě distribuce mezi pevnou (stacionární) fází zakotvenou na koloně a pohyblivou (mobilní) fází kolonou protékající.

Bylo popsáno velké množství chromatografických metod stanovení cyklosporinu A (13, 28, 39-48) a pro všechny je společné, že vyžadují poměrně náročnou přípravu vzorků, která je podmínkou pro spolehlivé monitorování. Extrakční postupy jsou založeny na principech extrakce v kapalně fází (liquid-liquid extraction), extrakce na kolonkách (liquid-solid extraction) a extrakce prováděná na zařízeních spojených přímo s HPLC přístrojem (column-

switching techniques a automatic sample clean-up). Tyto složité pracovní postupy jsou důležité vzhledem k používané krátké vlnové délce UV záření (200-220 nm), při které může mnoho látek při analýze interferovat. Protože především mnohonásobnými extrakčními postupy dochází ke ztrátám účinné látky, analýza CsA se provádí výlučně pomocí vnitřního standardu (IS). To je látka podobných vlastností, která se přidává ke každému kalibračnímu i analyzovanému vzorku a vyhodnocuje se poměr sledovaného analytu a vnitřního standardu. Jako vnitřní standard se nejčastěji po-užívají cyklosporiny D a C (CsD, CsC) při stanovení parentní látky a CsD při současné analýze metabolitů.

Jednotlivé metody stanovení samotného cyklosporinu A nebo CsA s jeho metabolity se liší použitými extrakčními činidly (diethyleter, methanol, hexan atd.), složením mobilní fáze (acetonitril/voda, voda/methanol/acetonitril, methanol/voda, acetonitril/fosfátový pufr atd.), stacionární fází (C18 nebo CN-kolony), teplotou (50-80°C) a rychlostí průtoku mobilní fáze (0,25-1 ml/min). Přehledné porovnání nejobvyklejších HPLC analýz stanovení CsA je uvedeno v publikaci autorů Komzáková, a kol. (49).

2.1.1.4.c Stanovení cyklosporinu A metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)

Protože hmotnostní spektrometrie je založena na produkci, rozlišení a detekci iontů v plynné fázi, byla dříve hmotnostní detekce využívána pouze v kombinaci s plynovou chromatografií. Až začátkem 80-tých let 20. století vývoj ionizace za atmosférického tlaku (elektrosprej a chemická ionizace) umožnil spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. Pro kvantitativní analýzu léčiv se převážně používá kapalinová chromatografie s jednoduchým (LC-MS) nebo trojitým kvadrupólem (LC-MS/MS). LC-MS metody jsou rychlé, ale podobně jako HPLC-UV vyžadují přípravu vzorků vzhledem k rušivým vlivům matrice. Pracuje se výhradně s vnitřním standardem. Používají se buď stabilní značené izotopy a/nebo látky strukturně podobné cyklosporinu A, převážně CsD nebo askomycin pro analýzu dalších imunosupresiv. Je možné analyzovat látky se stejným retenčním časem, a to na základě poměru hmotnosti/náboji (m/z), což výrazně zkracuje čas analýzy ve srovnání s klasickou HPLC-UV metodou. Výhodou LC-MS metod je selektivní detekce, která dovoluje při vhodném zpracování vzorků pracovat se složitými směsmi i velmi podobných látek jakými jsou např. metabolity cyklosporinu A (50). LC-MS metody jsou robustní, velmi přesné a vysoce citlivé. Mohou simultánně měřit

několik látek v širokém rozmezí koncentrací, čehož se s velkou výhodou, finanční i časovou, využívá při stanovení CsA s dalšími imunosupresivy (51-55).

Publikované metody stanovení CsA metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí jsou podobné, liší se např. v objemu a přípravě vzorku, použitém vnitřním standardu, složení a průtoku mobilní fáze, typu kolony nebo nastavení MS detektoru. Většina prezentovaných metod vychází z analýzy předem upraveného analytu. Existují však také metody, které využívají on-line extrakce v podobě dvojdimenzionální chromatografie nebo techniky přepínání kolon (52-54, 56, 57). LC-MS metody mohou být dobře využity i tam, kde je limitováno množství vzorku, např. u biopsií nebo u vzorků krve od pediatrických pacientů (58, 59). Výhodné je využití této metody v případě měření velmi nízkých koncentrací, jako např. stanovení CsA nebo CsA s jeho hlavními metabolity AM1, AM4N a AM9 v lymfocytech (60-64).

2. CÍLE

- zavést, optimalizovat a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na stanovení cyklosporinu A a metabolitů AM1, AM9 a AM4N v plné krvi a separovaných periferních lymfocytech
- srovnat koncentrace cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech
- sledovat vliv cyklosporinu A a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku
- využití této metody pro terapeutické monitorování v běžné klinické praxi
- sledovat vliv cyklosporinu A a metabolitů na imunitní systém

3. METODA

Práce byla vypracována v rámci grantu MZ IGA 1A/8655-5 schválena Etickou komisí FN Ostrava a provedena v souladu s Helsinskou deklarácí 1975 ve znění z roku 1996. Všichni pacienti podepsali Informovaný souhlas

3.1. Vývoj nové metody stanovení cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů v krvi a lymfocytech

TDM cyklosporinu A je založeno na stanovení koncentrace cyklosporinu A v krvi a případně i v lymfocytech. Proto byla vyvinuta a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Tato metoda umožňuje stanovení cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů AM1, AM9 a AM4N jak v krvi, tak i v periferních lymfocytech (28).

3.1.1. Použité chemikálie

Standardy cyklosporin A (Cyclosporine Ivax secondary standard RD016A) a cyklosporinu D (cyclosporine D Ivax primary standard RD0821) byly dodány firmou Ivax v odpovídající čistotě. Metabolity AM1, AM9 a AM4N (Ivax) byly připraveny semisynteticky nebo izolací z hub a jejich čistota byla nad 98% HPLC. Zásobní roztoky cyklosporinu A a D byly připraveny v metanolu v koncentraci 100 μ g/ml, zásobní roztoky jednotlivých metabolitů v koncentraci 1 mg/ml a byly uchovávány při -20 °C. Pracovní roztoky všech látek (cyklosporinu A a D a metabolitů) byly připraveny v metanolu v koncentraci 4000 ng/ml a uchovány při 4 °C. Tyto roztoky pak byly použity na přípravu kalibračních standardů. Extrakční činidlo bylo složeno z acetonitrilu a metanolu v poměru 2:3 s malým množstvím síranu zinečnatého v konečné koncentraci 10 mmol/l.

3.1.2. Příprava kalibračních standardů pro krev

Standardní vzorky jednotlivých látek o koncentraci 5, 50, 100, 250, 500, 1000 a 2000 ng/ml) byly připraveny ředěním pracovního roztoku (koncentrace 4000 ng/ml). Z každého takto připraveného roztoku jsme pipetovali 50 μ l do skleněných zkumavek spolu s 50 μ l roztoku cyklosporinu D (IS) a metanol jsme odpařili v horkovzdušném termostatu při 80 °C. Do každé zkumavky jsme přidali 200 μ l plné krve od dárce neužívajícího danou

látku a extrakci jsme provedli podle pracovního postupu, který je uveden pod bodem 3.2.4.1. Extrakce vzorků krve.

3.1.3. Příprava kalibračních standardů pro lymfocyty

Standardní vzorky o koncentraci 2, 5, 50, 100, 250 a 500 ng/ml jsme pipetovali v množství 50 μ l do skleněných zkumavek a metanol jsme odpařili v horkovzdušném termostatu při 80 °C. Do každé zkumavky jsme následně přidali 50 μ l vnitřního standardu a 0,5 ml extrakčního činidla.

3.1.4. Příprava vzorků pro analýzu

3.1.4.1. Extrakce vzorků krve

Do zkumavek s vnitřním standardem jsme pipetovali 0,5 ml extrakčního činidla a 200 μ l plné krve. Vzorek jsme intenzivně promíchali po dobu 30 s na laboratorní třepače a centrifugovali 10 min v chlazené centrifuze při 1260 otáčkách/min. Supernatant jsme přelili do měřících vialek.

3.1.4.2. Izolace a extrakce lymfocytů

Lymfocyty jsme izolovali z 1,5 ml nesrážlivé krve za použití centrifugace v hustotním gradientu na Ficoll-Histopaque (Histopaque 1077, Sigma). Po 30-ti minutové centrifugaci při otáčkách 2700ot./min a teplotě 4 °C jsme vrstvu obsahující lymfocyty přenesli do čisté zkumavky a dvakrát promyli fyziologický roztokem. Izolace jsme prováděli ihned po doručení vzorku (nejdéle za 1 hod po odběru) vzhledem k výraznému poklesu metabolitu AM1 v lymfocytech. Po izolaci byl vzorek lymfocytů zmražen a uchováván při -20 °C. Při vlastním stanovení jsme do každé zkumavky pipetovali 50 μ l vnitřního standardu cyklosporinu D a 0,5 ml extrakčního činidla. Po extrakci a centrifugaci jsme supernatant přelili do měřících vialek.

3.1.5. Přístrojové vybavení

Na stanovení se použil kapalinový chromatograf Acquity (Waters, USA), složený z binárního čerpadla a autosampleru a hmotnostní detektor MS/MS Quattro Micro API (Micromass, Velká Británie). Jako zdroj dusíku sloužil dusíkový generátor (Dominick Hunter scientific, Německo).

3.1.5.1. Kapalinová chromatografie

Na analýzu CsA a jeho metabolitů AM1, AM9 a AM4N jsme použili kolonu 2,1x100 mm, C18, o velikosti částic 1,7 μ m (Acquity ultra performance LC, Waters) a gradientovou eluci. Mobilní fáze byla složena z mobilní fáze A – (2mmol /l octan amonný a 0,5 % kyselina mravenčí ve vodě) a mobilní fáze B (2mmol /l octan amonný a 0,5 % kyselina mravenčí v acetonitrilu) o průtoku 0,4 ml /min. Doba analýzy byla 5 minut.

3.1.5.2. MS/MS detekce

Detekce daných látek probíhala v pozitivním ESI módu a jednotlivá MRM spektra použitá na kvantifikaci jsou uvedena v tabulce 3

Tabulka 3. MRM spektra MS/MS detekce

	CsA	CsD	AM1	AM9	AM4N
Retenční čas	2,5	2,62	2,2	2,2	2,34
m/z1	1202,8	1216,9	1219,1	1219,1	1189,0
m/z 2	156,2	199,25	425,6	212,4	142,2

Na vyhodnocení kalibrací a výsledků jsme použili softwarový program MassLynx V 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) (28)

3.2. Soubor pacientů

3.2.1 TDM CsA a jeho metabolitů u pacientů v akutní fázi po transplantaci ledviny – skupina č. 1

Do skupiny č. 1 bylo zařazeno 14 pacientů přijatých na Transplantační JIP Interní kliniky FN Ostrava k transplantaci (Tx) ledviny. Pacienti užívali cyklosporin A (Sandimmun Neoral®, Novartis s.r.o, Praha, Česká republika nebo Equoral® TEVA Czech Industries, Opava, Česká republika), v kombinaci s prednisonem a kyselinou mykofenolovou. U jednoho pacienta byla 14 dnů po transplantaci zaměněna kyselina mykofenolová za azatioprin. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 4 .Krev na stanovení CsA a metabolitů byla odebírána do zkumavek s EDTA. Odběry byly provedeny během prvního týdne každý den

a poté na konci 2. a 3. týdne a měsíc po transplantaci vždy před užitím (C₀), za 2 hod (C₂) a za 4 hod (C₄) po užití medikace. Další odběry byly 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10. a 12 měsíc a poté co 3 měsíce, vždy v C₀ a C₂.

Vzorky byly co nejrychleji dopraveny do laboratoře, zpracovány (separace lymfocytů) a dle možností ihned změřeny nebo zamraženy na -20 °C.

Zároveň byly pacientům provedeny standardní kontrolní odběry na stanovení biochemických parametrů (urea v séru, sérový kreatinin, ALT, AST), krevního obrazu (absolutní počet lymfocytů) a byla vypočítána clearance kreatininu podle Cockrofta a Gaulta. AUC₀₋₄ byla vypočítána pomocí lineárního lichoběžníkového pravidla.

Pacienti skupiny č.1 byli na základě hodnot sérového kreatininu rozděleni do 2 skupin – skupina s okamžitým nástupem funkce štěpu (IF) a skupina s opožděným nástupem funkce štěpu (DF). Zpožděná funkce štěpu byla definována jako a) nutnost provedení více než 1 dialýzy v průběhu prvního týdne po transplantaci, b) plazmatické koncentrace kreatininu >500 μmol/l v průběhu prvního týdne po transplantaci nebo c) oligourie <1l/24hod trvající déle než 2 dny (65).

Tabulka 4. Charakteristika pacientů (IF – pacienti s okamžitým nástupem funkce, DF – pacienti s opožděným nástupem funkce)

	IF	DF	P
muži/ženy	3/4	5/2	
hmotnost (kg)	60.7 ± 9.7	86.1 ± 17.7	0.013
výška (cm)	163.9 ± 8.1	176.6 ± 8.3	0.021
věk (roky)	50.1 ± 17.6	55.7 ± 9.9	N.S.
Sandimmun Neoral /Equoral	2/5	2/5	
dárce (kadaverózní/žijící)	6/1	7/0	
Doba studené ischémie (hod)	13 ± 6	18 ± 3	N.S.

3.2.2 TDM CsA a jeho metabolitů při chronickém podávání po transplantaci ledviny – skupina č. 2

3.2.2.a Sledování hladiny CsA a metabolitů v krvi a lymfocytech

Do skupiny č. 2 bylo zařazeno 54 pacientů navštěvujících Nefrologickou ambulanci Interní kliniky FN Ostrava. Pacienti užívali cyklosporin A (Sandimmun Neoral[®], Novartis s.r.o, Praha, Česká republika nebo Equoral[®] TEVA Czech Industries, Opava, Česká republika), nejčastěji v kombinaci s kyselinou mykofenolovou, kortikosteroidy, everolimem a azatioprinem. Charakteristika souboru je uvedena v tabulce č. 5. Krev na stanovení CsA a metabolitů byla odebírána do zkumavek s EDTA. Odběry u pacientů této skupiny se prováděly co 3 měsíce při ambulantní kontrole, vždy s odběrem před a za 2 hod po užití. Vzorky byly po doručení do laboratoře okamžitě zpracovány (separace lymfocytů) a dle možností ihned změřeny nebo zamraženy při -20 °C.

Zároveň byly pacientům provedeny standardní kontrolní odběry na stanovení biochemických parametrů (urea v séru, sérový kreatinin, ALT, AST), krevního obrazu (absolutní počet lymfocytů)

Byla sledována korelace koncentrací CsA a metabolitů analyzovaných v krvi a v lymfocytech.

Charakteristika pacientů na počátku sledování je uvedena v tabulce číslo 11. Pacienti byli sledováni celkem 4 roky.

Tabulka č. 5. Charakteristika souboru

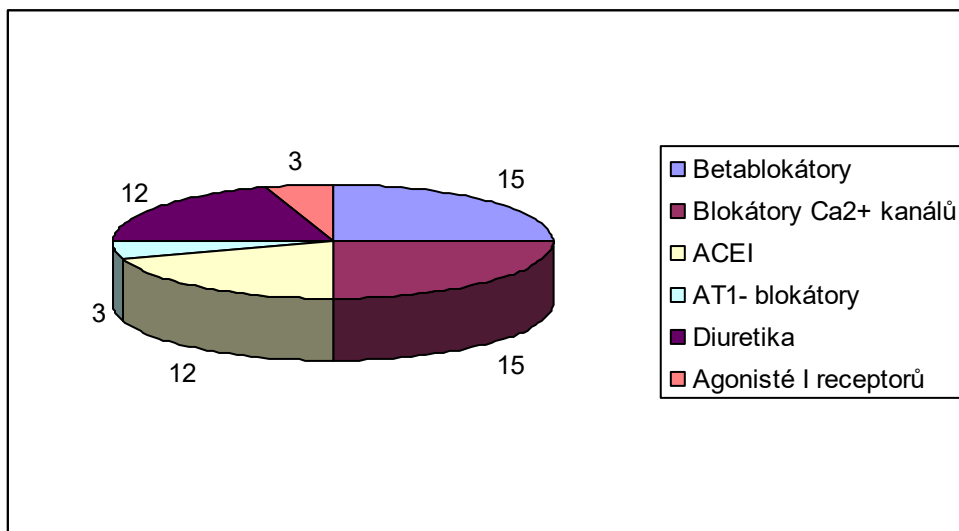
muži/ženy	30/24
hmotnost (kg)	76,1±15,9
výška (cm)	167,9±9,8
věk (roky)	54,7±10,8
denní dávka (mg)	152,0±47,4
kreatinin (μmol/l)	144±54
počet lymfocytů (počet buněk/l)	1,9*10⁹±1,1*10⁹

3.2.2.b Sledování vlivu CsA a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku

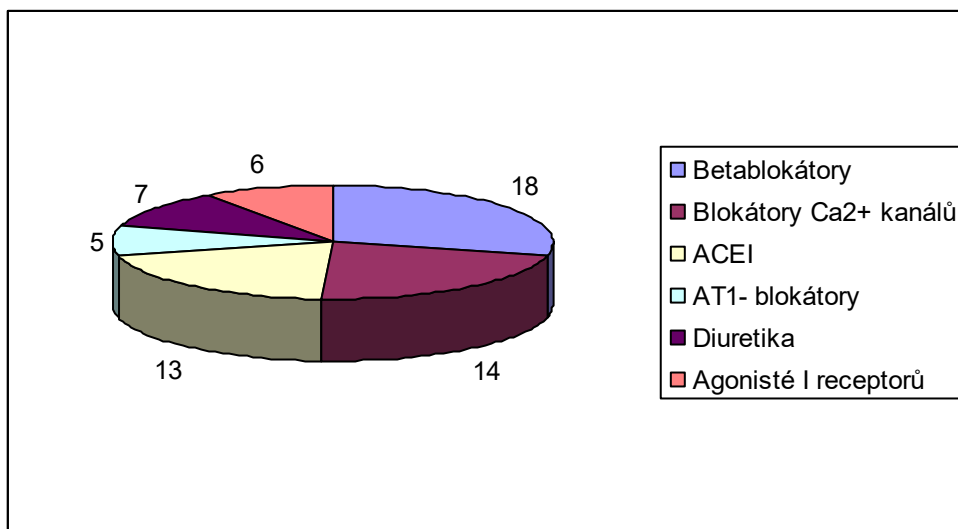
Vzhledem k výskytu hypertenze po transplantaci ledvin bylo 31 pacientů (z toho 16 mužů a 15 žen) ze skupiny 2 dispenzarizováno v Ambulanci pro léčbu hypertenze a bylo jim provedeno 24-hodinové ambulantní monitorování krevního tlaku (ABPM) ve stejný den jako odběr krve na CsA. Průměrný věk byl 54 ± 12 roků, průměrná hmotnost 75 ± 16 kg a průměrná výška 167 ± 11 cm. Sledování bylo provedeno 3x v 1-ročních intervalech. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle toho, zda došlo k poklesu nočního tlaku („dipper“ - D) či nikoliv („non-dipper“ – N, pokles nočního tlaku $< 10\%$) a byl sledován vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku.

Antihypertenzivní medikace ve skupině „dipper“ a „non-dipper“ užívaná pacienty v celém průběhu studie a zaznamenaná během 3 vyšetření je uvedena grafu 1 a 2.

Graf 1 Antihypertenzivní medikace ve skupině „dipper“



Graf 2 Antihypertenzivní medikace ve skupině „non-dipper



3.2.3 Sledování funkčnosti imunitního systému

Odběry na vyšetření imunitního systému byly provedeny u pacientů skupiny č. 1 následovně: před transplantací, 1., 2. a 7. den po transplantaci – před, za 2 hod a za 4 hod po užití; poté 2. a 4. týden po transplantaci a 2.,3., 4., 5., 6., 8.,10. a 12. měsíc po transplantaci – vždy před užitím léku.

3.2.3.a Funkčnost imunitního systému

Funkčnost imunitního systému byla testována testem transformace lymfocytů (TTL) po stimulaci fytohemaglutininem (PHA), pomocí produkce $\text{INF-}\gamma$ po stimulaci PHA, antigenem cytomegaloviru (CMV Ag) a směsí antigenů *M. tuberculosis* za využití systému QuantiFERON firmy Cellestis (dle instrukcí výrobce). V supernatantech kultur získaných v testu QuantiFERON byly stanoveny také další cytokiny ($\text{INF}\gamma$, IL-2, IL-10, IL-4 a IL-5) pomocí multiplexové metody ALBIA soupravami firmy BioSource. Případná rejekční krize byla monitorována stanovováním sIL2-R v plasmě ELISA soupravou firmy Bender, popř. R&D.

3.2.3.b Imunita proti CMV

U pacientů byla také posuzována CMV-specifická imunita zprostředkovaná CD8+ T-lymfocyty. Pacienti podstoupili sérologický screening výskytu CMV a detekci CMV-specifické DNA metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR). Specifické protilátky proti CMV byly stanoveny komplement fixačním testem a enzymoimunoanalýzou. Ke stanovení celkové avidity byl použit komerční set ELISA-Viditest anti-CMV (TestLine) s antigenem pp65. CMV nálož v krvi byla stanovena metodou real-time PCR ReSSQ CMV (LightUp) a byla vyjádřena jako počet kopií v 1 ml. Vyšetření CMV-specifické DNA bylo provedeno pouze při podezření na CMV infekci nebo reaktivaci této infekce. Celkem bylo testováno 178 krevních vzorků. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 6.

Tabulka 6. Charakteristika pacientů

muži/ženy	8/6
věk	53 (27-75)
pacienti s "nízkou" hladinou protilátek	3
CMV-pozitivní dárce	13
pacienti s potvrzenou CMV infekcí (PCR)	4 (28,6%)
pacienti s podezřením na CMV infekci (PCR)	3 (21,4%)
čas k rozvoji CMV infekce od transplantace k potvrzení infekce (dny; min-max)	60 (29-90)

3.3. Statistické metody

Ke statistickému zpracování výsledků byl použit program Graph Pad version 5.00 pro Windows. Za statisticky signifikantní byla považována hodnota $p < 0,05$. Všechna data byla testována D'Agostinovým-Pearsonovým testem normality dat. Na základě tohoto testu pak byla jednotlivá data porovnávána nepárovým t-testem (v případě Gaussova rozložení) nebo neparametrickým Mann-Whitney testem (i u výsledků pacientů skupiny č. 1 z důvodu malého

souboru). Při sledování korelace mezi hladinami byl použit Pearsonův, příp. Spearmanův korelační koeficient.

K porovnání rozdílu v antihypertenzivní terapii mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ byl použit χ^2 -test.

Při testování funkčnosti imunitního systému byl vzhledem k abnormální distribuci dat ke statistické analýze použit 2-výběrový Wilcoxonův (Mann-Whitney) test s hranicí významnosti 5%.

4. VÝSLEDKY

4.1. Validace LC-MS/MS metody (66)

Parametry metody jako je teoretická a naměřená koncentrace, variační koeficient (CV v %) a recovery (%) jsou pro krev uvedeny v tabulce č. 7 a pro lymfocyty v tabulce č. 8

Tabulka 7. Parametry metody pro krev (CV – variační koeficient, R – výtěžnost)

Koncentrace přidaná (µg/l)	V sérii			Mezi sériemi		
	koncentrace mean ± SD (µg/l)	CV %	R %	koncentrace Mean ± SD (µg/l)	CV %	R %
CsA						
10	9,9 ± 0,41	4,1	99,0	9,8 ± 0,57	5,8	98,0
500	496,9 ± 19,7	4,0	99,4	532,1 ± 18,0	3,4	106,4
2000	2009,2 ± 35,9	1,8	100,5	2019,2 ± 100,8	5,0	101,0
AM1						
10	10, ± 0,73	7,3	100,0	10, ± 0,1	7,9	103,0
500	500,1 ± 36,4	7,2	100,0	517,5 ± 38,6	7,7	103,5
2000	1967,0 ± 57,8	2,9	98,3	2085,7 ± 119,6	5,7	104,2
AM9*						
10	9,8 ± 0,55	5,6	98,0	9,9 ± 0,91	9,1	99,0
500	494,5 ± 15,2	3,1	98,9	491 ± 30,5	6,2	98,2
1000	970,9 ± 44,4	4,6	97,9	961,5 ± 57,6	6,0	96,1
AM4N						
5	5,0 ± 0,39	7,7	100,0	5,3 ± 0,48	9,1	106,0
100	97,0 ± 4,4	4,4	97,0	109,5 ± 10,5	9,5	109,5
500	511,4 ± 24,8	5,0	102,2	517,5 ± 37,6	7,3	103,5

V Tabulce je uveden variační koeficient, výtěžnost a mezilehlá preciznost cyklosporinu A a metabolitů v krvi (n= 12)

Tabulka 8. Parametry metody pro lymfocyty (CV – variační koeficient, R – výtěžnost)

Přidaná koncentrace (µg/l)	V sérii			Mezi sériemi		
	koncentrace Mean ± SD (µg/l)	CV %	R %	koncentrace mean ± SD (µg/l)	CV %	R %
CsA						
5	5,4 ± 0,34	6,6	108,0	5,5 ± 0,40	7,2	110,0
100	108,1 ± 5,9	5,4	108,1	95,9 ± 3,8	4,0	95,9
250	248,6 ± 14,6	5,9	99,4	240,2 ± 12,3	5,1	96,0
AM1						
5	4,6 ± 0,31	6,7	92,0	4,7 ± 0,41	8,7	94,0
100	98,9 ± 4,8	4,9	98,9	102,8 ± 9,8	9,6	102,8
250	246,7 ± 9,8	4,0	98,7	267 ± 20,5	7,7	106,8
AM9*						
5	4,9 ± 0,45	9,1	98,0	5,1 ± 0,49	9,6	102,0
100	99,0 ± 0,46	6,3	99,0	102,5 ± 10,1	9,8	102,5
250	251,9 ± 11,8	4,7	100,7	259,0 ± 15,6	6,0	103,6
AM4N						
5	5,1 ± 0,33	6,5	102,0	5,2 ± 0,38	7,3	104,0
100	99,0 ± 4,4	4,4	99,0	106,5 ± 10,3	9,6	106,5
250	241,3 ± 14,3	5,9	96,5	269,0 ± 18,6	6,9	107,6

V Tabulce je uveden variační koeficient, výtěžnost a mezilehlá preciznost cyklosporinu A a metabolitů v lymfocytech (n= 12)

S každým souborem analyzovaných vzorků byly analyzovány i kontrolní vzorky vždy ve třech hladinách.: 150, 400 a 800 ng/ml cyklosporinu A. Výsledky kontrolních vzorků jsou tabulce č. 9.

Tabulka 9. Kontrolní vzorky měřené se vzorky pacientů (n=8)

koncentrace	150	400	800
průměr	147 ±8,3	396,4 ± 28,5	773,3 ± 41,2
VK (%)	5,6	7,2	5,3
Recovery (%)	98	99,0	96,6

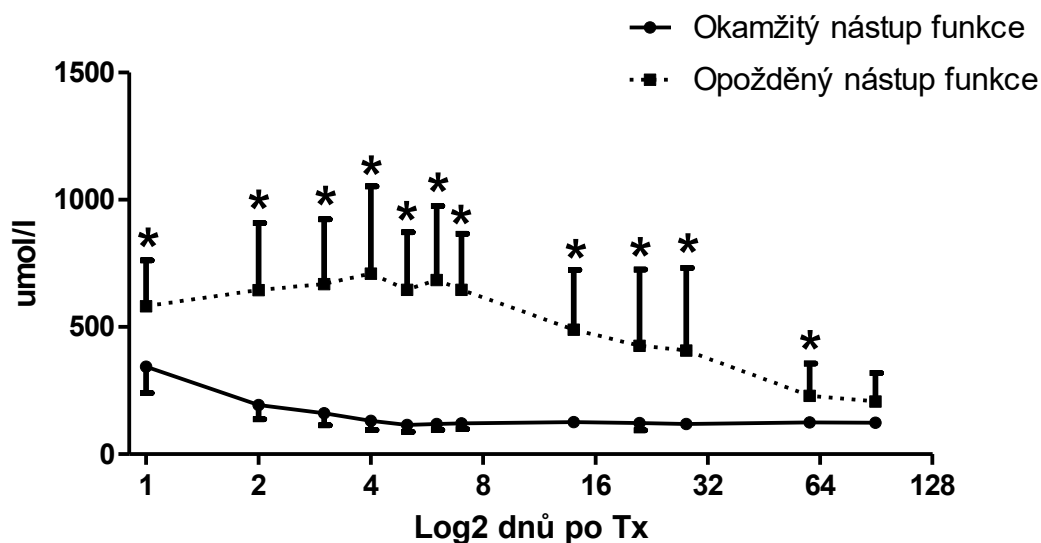
4.2. Výsledky pacientů

4.2.1 TDM CsA a jeho metabolitů u pacientů v akutní fázi po transplantaci ledviny – skupina č. 1

4.2.1.a. Sledování koncentrací v krvi

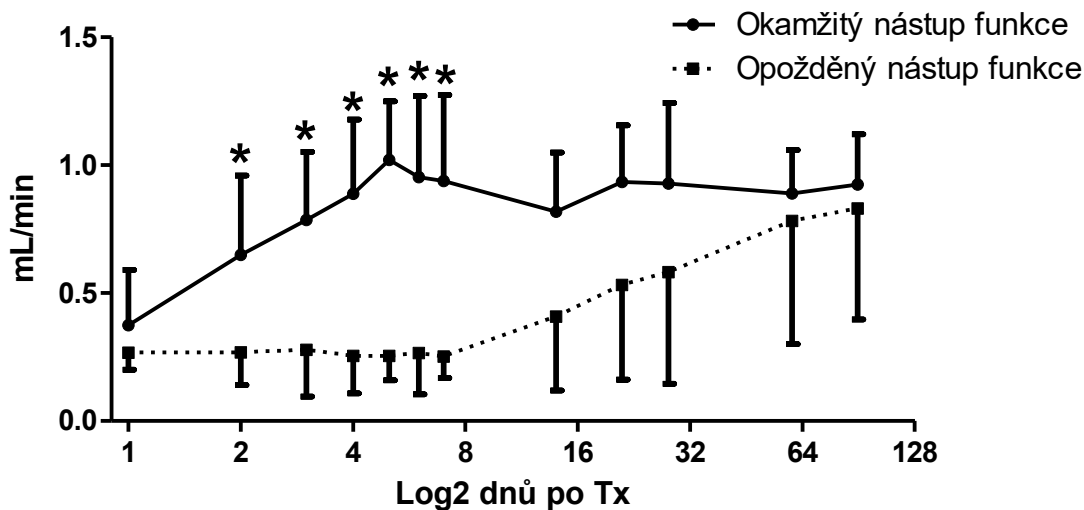
Po rozdělení do skupin byly u DF v krvi nalezeny během prvních dvou měsíců po transplantaci signifikantně vyšší koncentrace sérového kreatininu (v průběhu prvního týdne cca 5-6krát). (graf číslo 3)

Graf 3. Hodnoty sérového kreatininu během 3 měsíců po transplantaci (* p<0,05)



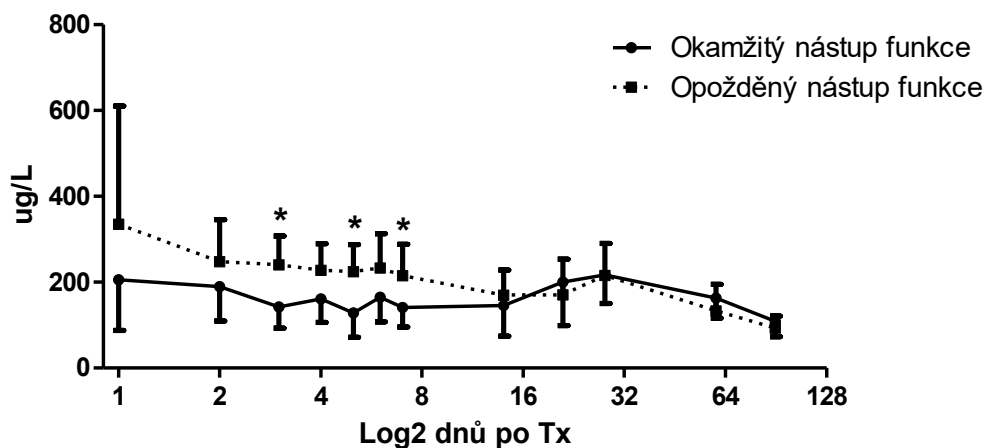
Clearance kreatininu byla vyšší také v průběhu dvou měsíců, signifikantní rozdíl však byl pouze mezi 2. a 7. dnem po Tx (graf číslo 4)

Graf 4. Hodnoty clearance kreatininu během 3 měsíců po transplantaci (* $p < 0,05$)

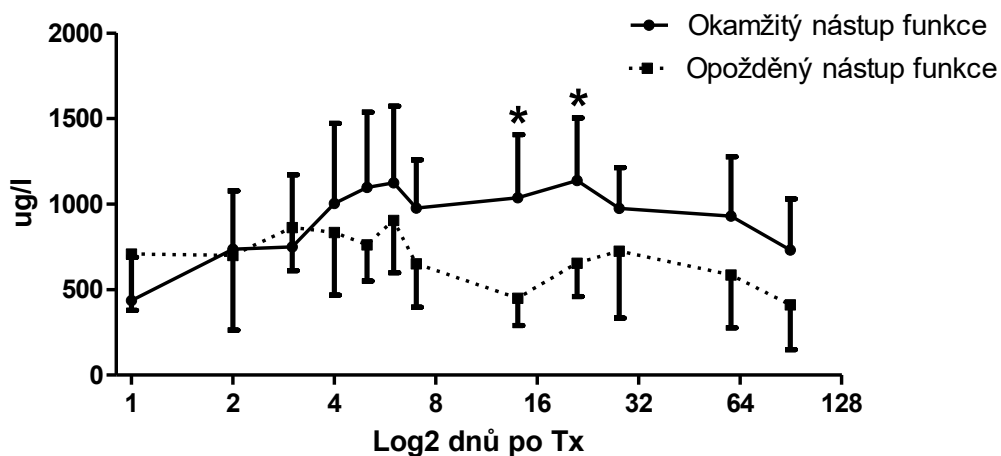


U skupiny s DF byly v průběhu prvního týdne naměřeny signifikantně vyšší koncentrace CsA v C_0 , (signifikantní v 3., 5. a 7. den po Tx), v C_2 byly vyšší první tři dny po Tx, poté byly nižší (signifikantní rozdíl byl jen 14. a 28. den po Tx) (graf 5a a 5b)

Graf 5a. Koncentrace CsA v C_0 v krvi (* $p < 0,05$)

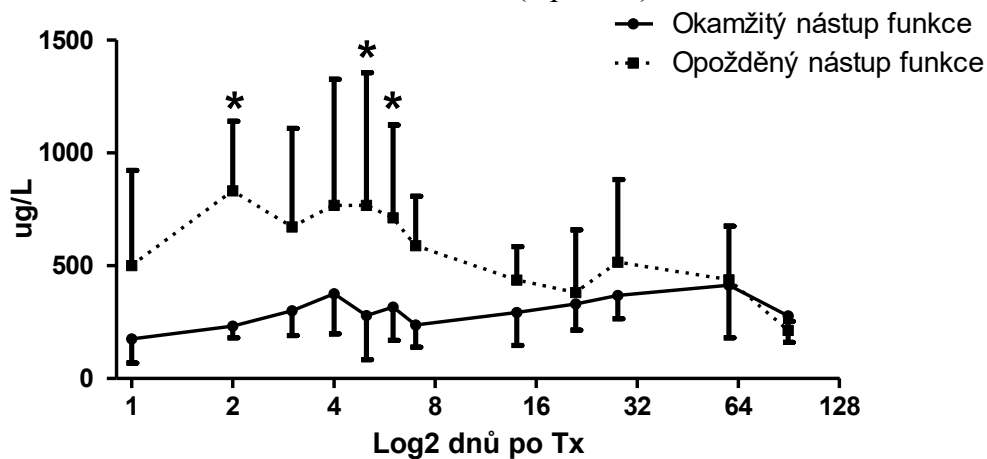


Graf 5b. Koncentrace CsA v C₂ v krvi (* p<0,05)

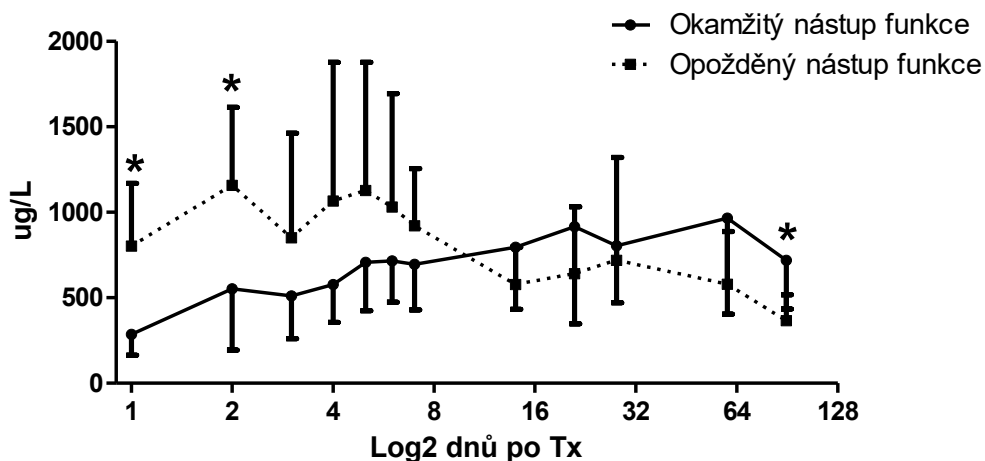


U metabolitu AM1 byly koncentrace v C₀ u skupiny s DF také vyšší - 5. den po Tx téměř trojnásobné (signifikantně 2., 5. a 6. den po Tx). Koncentrace v C₂ byly u DF vyšší jen v průběhu prvního týdne po Tx (signifikantně 1. a 2. den), poté byly nižší (graf 6a a 6b)

Graf 6a. Koncentrace AM1 v C₀ v krvi (* p<0,05)

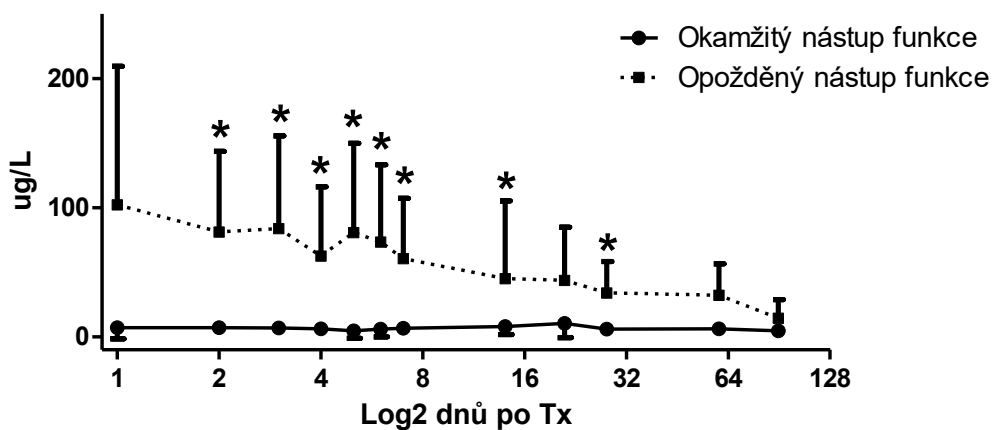


Graf 6b. Koncentrace AM1 v C₂ v krvi (* p<0,05)

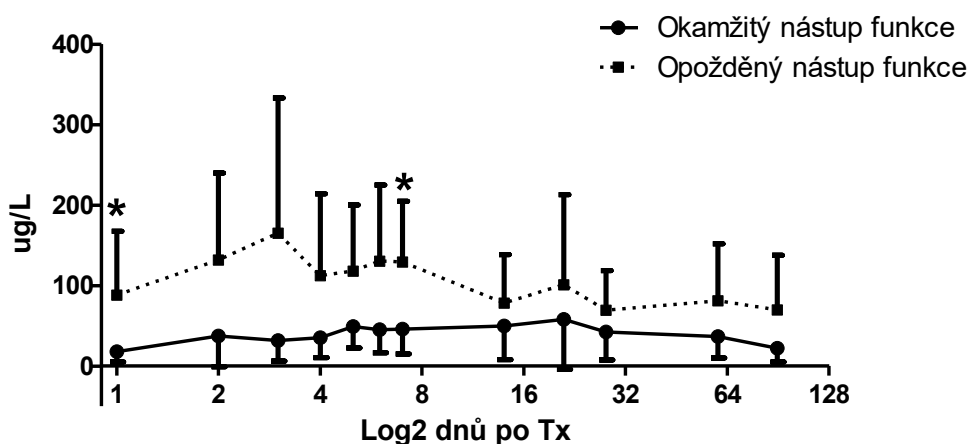


Byly nalezeny zejména velké rozdíly u AM4N. Koncentrace v C₀ u DF byly vyšší - v prvním týdnu 15-20krát vyšší (signifikantně 2. až 14. den a 28. den po Tx) (graf 7a). Rozdíly po užití byly nižší (signifikantní pouze 1. a 7. den po Tx).(graf 7b)

Graf 7a. Koncentrace AM4N v C₀ v krvi (* p<0,05)



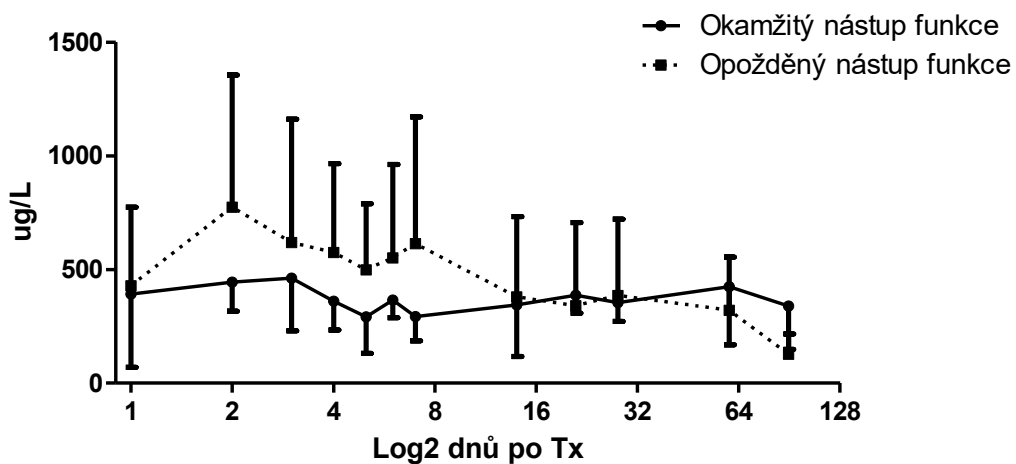
Graf 7b. Koncentrace AM4N v C₂ v krvi (* p<0,05)



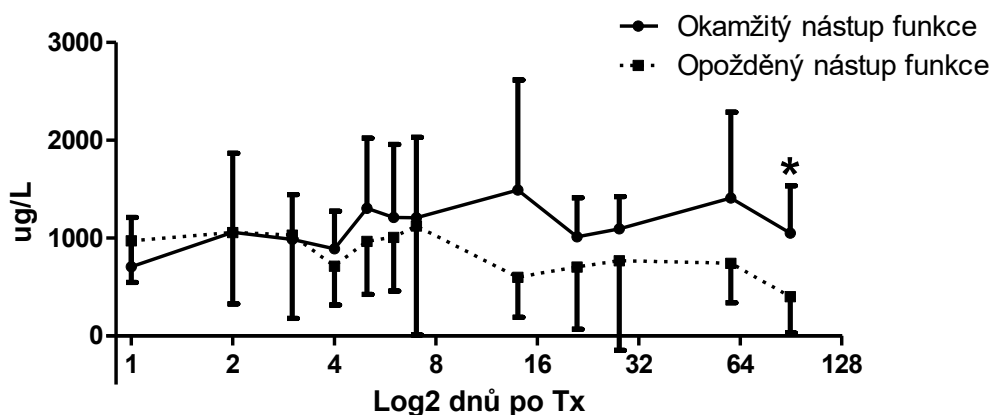
Koncentrace u skupiny s DF byly vyšší v C₀ v průběhu prvního týdne, poté byly koncentrace v obou skupinách obdobné. Koncentrace v C₂ byly v průběhu prvního týdne po Tx obdobné u obou skupin, poté byly u DF nižší. Rozdíly však u AM9 nebyly statisticky významné ani v C₀ ani v C₂. (graf 8a a 8b)

Ke zlepšení renálních funkcí u DF pak došlo postupně a mezi druhým a třetím měsícem rozdíly v koncentraci sérového kreatininu, CsA i metabolitů mezi skupinami vymizely

Graf 8a. Koncentrace AM9 v C₀ v krvi (* p<0,05)



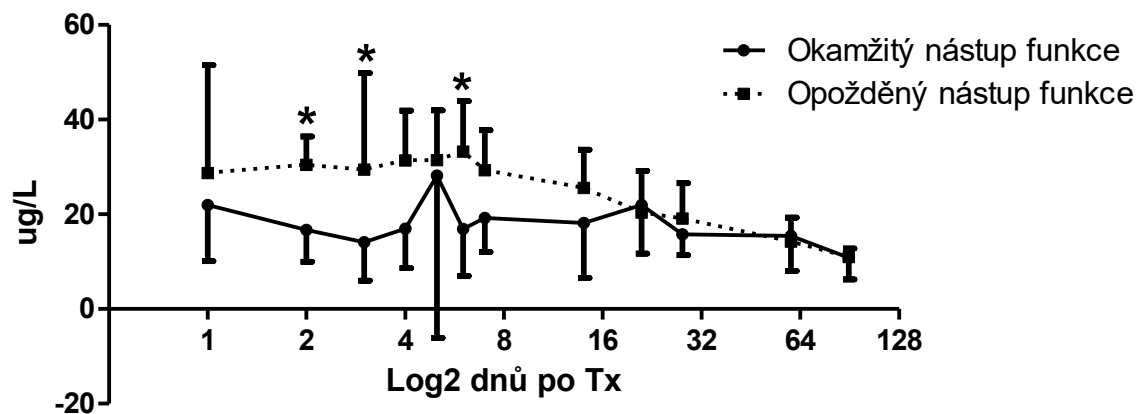
Graf 8b. Koncentrace AM9 v C₂ v krvi (* p<0,05)



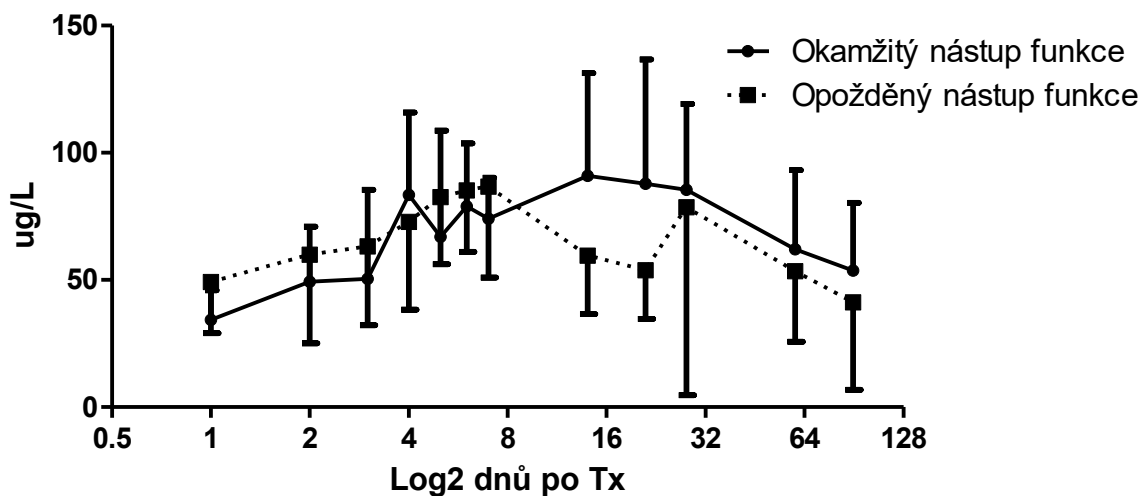
4.2.1.b. Sledování koncentrací v lymfocytech

Obdobné výsledky jako v krvi byly nalezeny i v lymfocytech. U skupiny s DF byly v C₀ nalezeny vyšší koncentrace CsA (signifikantní rozdíl byl 2., 3. a 6. den po Tx), v C₂ byly koncentrace u DF vyšší jen první tři dny po Tx, poté byly 4. až 7. den koncentrace obdobné a od 14. dne byly nižší. (graf 9a a 9b)

Graf 9a. Koncentrace CsA v C₀ v lymfocytech (* p<0,05)

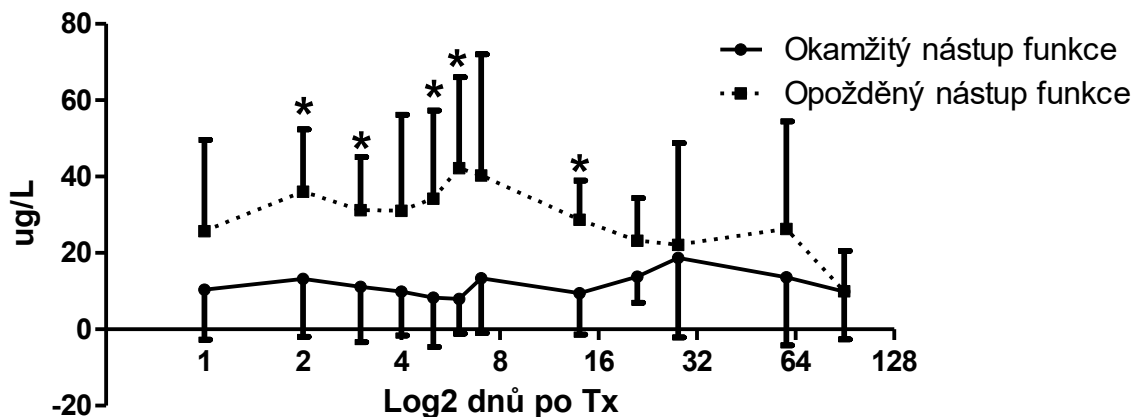


Graf 9b. Koncentrace CsA v C₂ v lymfocytech (* p<0,05)

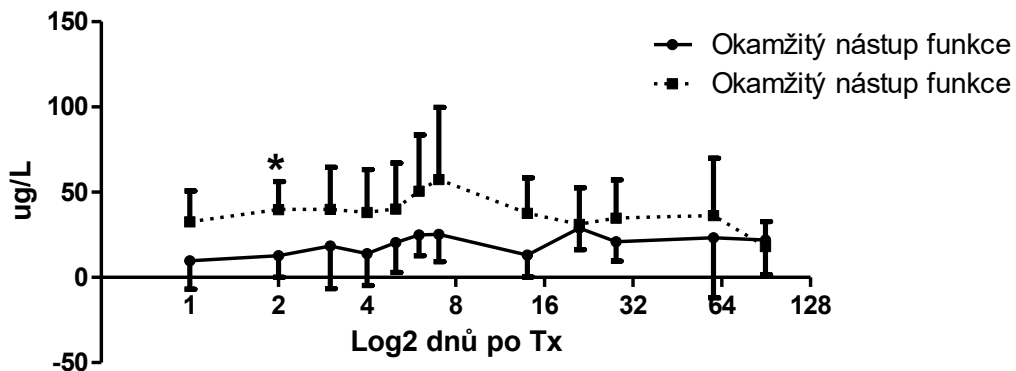


Koncentrace v C₀ metabolitu AM1 u skupiny s DF byly také vyšší – nejvyšší rozdíl byl 6. den po Tx, téměř pětinasobný (signifikantně 2., 3., 5. a 6. den po Tx). Koncentrace v C₂ byly obdobné (signifikantně vyšší u DF 2. den) (graf 10a a 10b)

Graf 10a. Koncentrace AM1 v C₀ v lymfocytech (* p<0,05)

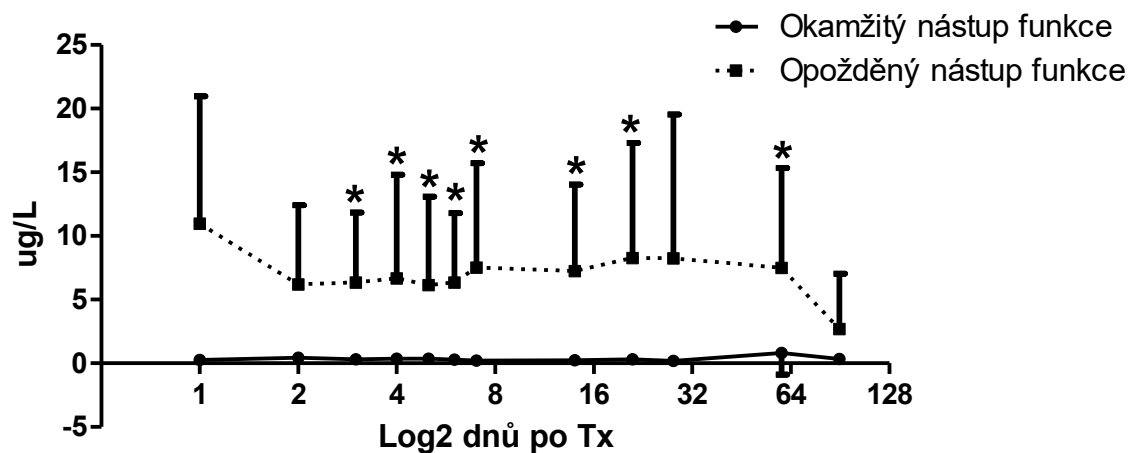


Graf 10b. Koncentrace AM1 v C₂ v lymfocytech (* p<0,05)

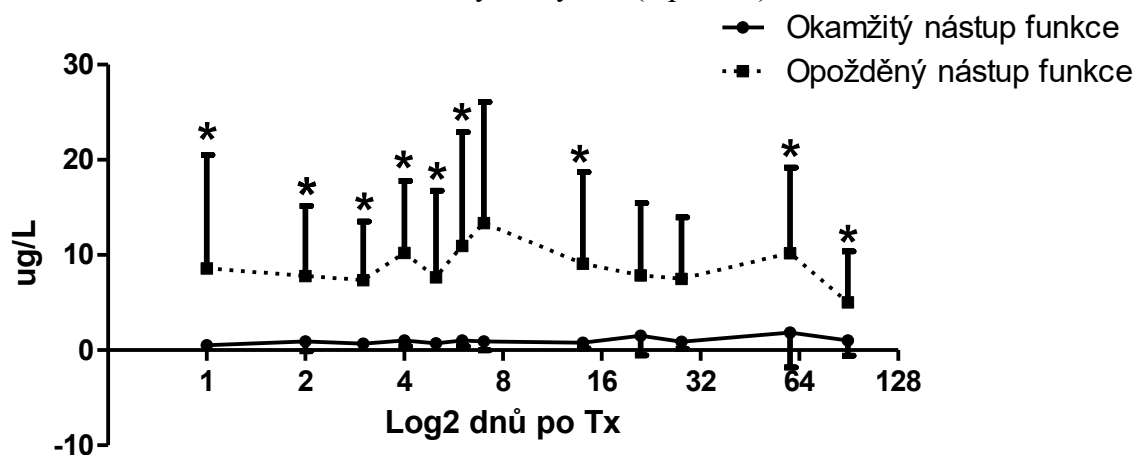


Nejvyšší rozdíly mezi oběma skupinami byly opět nalezeny u metabolitu AM4N, obdobně jako v krvi. Koncentrace v C₀ byly u DF cca 10x vyšší, významně vyšší od 3. do 60. dne, s výjimkou konce 2. měsíce. Koncentrace v C₂ byly u DF vyšší po celou dobu sledování, rozdíl byl významný s výjimkou 7., 21. a 28. dne). (graf 11a a 11b)

Graf 11a. Koncentrace AM4N v C₀ v lymfocytech (* p<0,05)

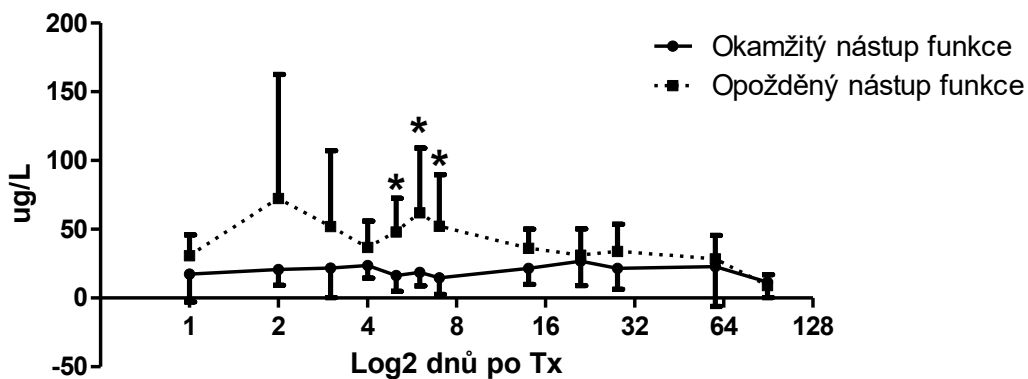


Graf 11b. Koncentrace AM4N v C₂ v lymfocytech (* p<0,05)

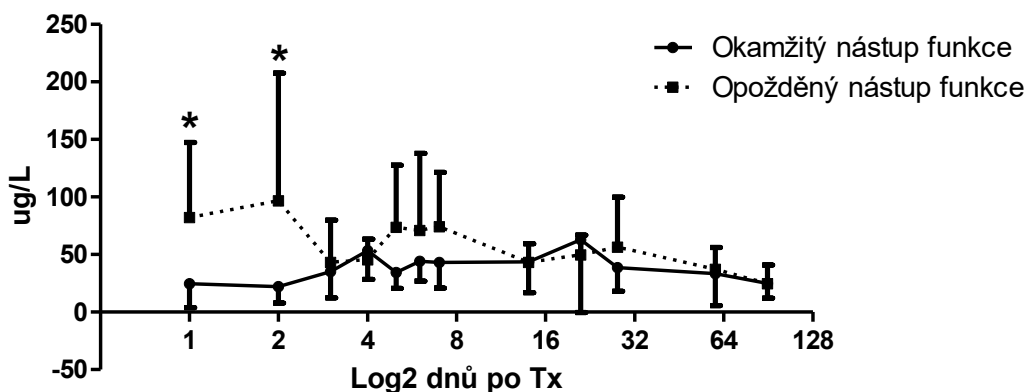


Koncentrace AM9 byly v C₀ u DF prvních 14 dnů vyšší (signifikantně 5.-7. den), poté byly obdobné. Koncentrace v C₂ byly u DF vyšší jen první 2 dny a to signifikantně. (graf 12a a 12b).

Graf 12a. Koncentrace AM9 v C₀ v lymfocytech (* p<0,05)



Graf 12b. Koncentrace AM9 v C₂ v lymfocytech (* p<0,05)



4.2.1.c. Srovnání AUC₀₋₄

Porovnávali jsme také AUC₀₋₄ mezi skupinou s okamžitou a zpožděnou funkcí. U CsA a AM9 byla naměřena vyšší AUC₀₋₄ u IF, u AM1 a AM4N naopak u DF. Největší rozdíl byl nalezen u metabolitu AM4N, statisticky však byl významný jen 1., 5. a 7. den po Tx. (tabulka 10a a 10b).

Tabulka 10a. Porovnání of AUC₀₋₄ CsA a AM1 mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	CsA		AM1	
	IF	DF	IF	DF
1	1102 (487,3;2609)	2518 (737,3;3093)	1243 (320,4;2096)	2566 (1526;4239)**
2	2802 (1572;3077)	2048 (1124;4485)	1691 (1035;3837)	4732 (1569;5664) *
3	2231 (1145;3352)	2454 (2126;3960)	1769 (870,1;2999)	3314 (990,6;7555)
4	3247 (1670;4464)	2381 (1032;3630)	1992 (1743;2857)	4039 (942,7;7604)
5	3233 (1342;4377)	2487 (1932;2881)	2063 (1527;3459)	3264 (1586;9410)
6	3339 (1420;4136)	2650 (1719;3624)	2805 (1680;3220)	3485 (1598;8226)
7	2695 (1604;3566)	2269 (1004;2831)	2148 (1407;3421)	3724 (1477;4665)
14	2337 (2153;4786)	1448 (482,9;1940) ***	2270 (1406;4454)	2272 (1372;3295)
21	3185 (1735;4896)	1916 (1206;2433) *	2370 (2005;4350)	2325 (700,3;4841)
28	2563 (1824;3704)	2180 (695,6;2943)	2322 (2130;4517)	2424 (735,3;6229)

Statistická významnost * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Tabulka 10b. Porovnání of AUC₀₋₄ AM4N a AM9 mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	AM4N		AM9	
	IF	DF	IF	GF
1	56,60 (5,40;142,8)	402,2 (9,40;643,2)*	2115 (363,1;6918)	2084 (1549;5800)
2	83,45 (8,70;253,3)	443,6 (11,0;1070)	3250 (1859;8257)	3168 (1799;9202)
3	91,75 (9,20;223,6)	300,7 (9,10;958,8)	3676 (1507;5204)	2720 (1424;8653)
4	110,3 (20,0;240,8)	427,7 (10,8;955,0)	3062 (2056;5004)	2683 (1220;4756)
5	149,4 (18,20;236,7)	464,5 (10,0;950,5) *	3931 (23025;7065)	3421 (1087;6801)
6	153,1 (15,30;218,7)	474,3 (8,20;1052) *	3509 (2346;7032)	2786 (1246;7423)
7	151,4 (15,4;228,7)	450,7 (6,10;735,3) *	2833 (1877;7872)	1622 (1306;10027)
14	156,1 (11,70;343,5)	294,5 (5,4;489,4)	2799 (2030;9329)	1643 (523,8;7332)
21	103,3 (17,70;246,9)	224,7 (12,4;427,6)	3040 (2483;4689)	1650 (510,8;7669)
28	138,2 (9,10;207,5)	210,0 (9,6;522,0)	3728 (2868;4693)	1948 (655,5;8635)

Statistická významnost * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Vzhledem k tomu, že v různých studiích bylo prokázáno, že C₂ CsA a AUC₀₋₄ spolu korelují a C₂ je nejlepším ukazatelem AUC₀₋₄ (67, 68), provedli jsme korelaci i těchto dvou parametrů. Podle předpokladu jsme našli korelaci v obou skupinách. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Tabulka 11. Korelace mezi CsA za 2 hod po užití a AUC₀₋₄ (r_s – Spearmanův korelační koeficient, P – významnost)

Dny po Tx	IF		DF	
	r _s	P	r _s	P
1	0,7000	0,2333	0,9000	0,0833
2	0,7000	0,2333	0,7857	0,0480
3	1,0000	0,0280	0,7000	0,2333
4	0,8857	0,0333	1,0000	0,0028
5	1,0000	0,0004	0,6000	0,2417
6	1,0000	0,0028	1,0000	0,0040
7	0,9286	0,0067	0,9643	0,0028
14	0,8571	0,0238	0,9286	0,0670
21	0,9643	0,0028	0,9429	0,0167
28	0,7857	0,0480	1,0000	0,0167

4.2.1.d. Sledování fenotypu v krvi

Jak již bylo uvedeno výše, byly naměřeny v krvi v C₀ většinou vyšší koncentrace metabolitů ve skupině se zpožděnou funkcí. Zkoumali jsme, zda se to projeví i na poměru metabolit/mateřská látka. Nalezli jsme vyšší hodnoty poměru metabolit/mateřská látka u DF v případě AM1 a AM4N v C₀ i C₂, tyto rozdíly však byly statisticky nejčastěji signifikantní u metabolitu AM4N. (tabulka 12a-c)

Tabulka č. 12a. Porovnání poměru AM1/CsA v krvi mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C ₀		C ₂	
	IF	DF	IF	DF
1	0,89 (0,42;1,9,0)	1,43 (0,66;2,77)	0,56 (0,0;1,55)	1,32 (0,38;2,54)
2	1,24 (0,69;2,46)	4,00 (1,39;6,14) *	0,81 (0,35;2,67)	1,87 (0,80;3,68)
3	1,81 (1,04;3,86)	2,91 (0,64;4,23)	0,87 (0,29;1,05)	1,02 (0,30;1,55)
4	1,70 (0,83;7,45)	2,85 (0,78;5,44)	0,58 (0,33;1,34)	1,45 (0,27;2,52)
5	2,30 (1,01;4,12)	2,85 (1,15;6,88)	0,72 (0,26;1,47)	1,53 (0,33;3,04)
6	2,02 (0,87;3,10)	3,00 (1,34;7,09)	0,55 (0,28;1,87)	1,00 (0,43;2,53)
7	1,98 (0,47;2,94)	3,21 (1,11;4,41)	0,68 (0,35;1,69)	1,62 (0,46;2,51) *
14	2,42 (0,67;3,56)	3,33 (1,25;3,85)	0,84 (0,34;1,66)	1,28 (0,49;2,30)
21	1,76 (0,00;2,85)	1,63 (0,00;5,77)	0,74 (0,31;1,64)	1,08 (0,27;2,04)
28	2,01 (1,05;2,35)	1,97 (0,33;8,14)	0,73 (0,52;1,12)	0,99 (0,33;8,14)
60	2,88 (1,10;3,46)	3,65 (1,91;5,02)	1,10 (0,44;1,87)	1,05 (0,31;2,28)
90	2,86 (0,81;5,33)	2,49 (1,17;3,85)	1,24 (0,31;1,57)	1,20 (0,49;2,34)

Statistická významnost * P < 0,05

Tabulka č. 12b. Porovnání poměru AM4N/CsA v krvi mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C0		C2	
	IF	DF	IF	DF
1	0,013 (0,003;0,082)	0,208 (0,002;1,302)	0,054 (0,004;0,094)	0,109 (0,003;0,253)
2	0,048 (0,007;0,063)	0,287 (0,005;0,743)*	0,057 (0,001;0,136)	0,181 (0,004;0,625)
3	0,059 (0,007;0,110)	0,254 (0,002;0,777)	0,046 (0,003;0,076)	0,150 (0,003;0,381)
4	0,046 (0,002;0,082)	0,262 (0,002;0,576)	0,046 (0,004;0,078)	0,122 (0,004;0,356)
5	0,044 (0,002;0,101)	0,239 (0,012;0,574)*	0,059 (0,003;0,121)	0,129 (0,002;0,403)
6	0,042 (0,000;0,083)	0,407 (0,001;0,673)*	0,049 (0,003;0,164)	0,148 (0,003;0,351)
7	0,045 (0,004;0,119)	0,186 (0,004;1,091)*	0,045 (0,003;0,143)	0,237 (0,001;0,766)
14	0,072 (0,000;0,095)	0,182 (0,004;0,923)	0,061 (0,002;0,148)	0,214 (0,002;0,348)
21	0,049 (0,001;0,132)	0,193 (0,001;0,885)	0,041 (0,000;0,070)	0,089 (0,00;0,136)
28	0,037 (0,000;0,051)	0,173 (0,001;0,362)*	0,047 (0,002;0,085)	0,109 (0,004;0,223)
60	0,048 (0,001;0,063)	0,301 (0,002;0,731)*	0,045 (0,003;0,087)	0,116 (0,004;0,662)*
90	0,050 (0,003;0,1567)	0,177 (0,002;0,544)	0,030 (0,005;0,080)	0,131 (0,005;0,396)

Statistická významnost * $P < 0,05$

Tabulka č. 12c. Porovnání poměru AM9/CsA v krvi mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C0		C2	
	IF	DF	IF	DF
1	1,80 (0,47;2,88)	1,23 (0,97;1,94)	1,12 (0,00;2,84)	1,58 (0,57;2,41)
2	2,29 (1,22;4,80)	2,50 (1,03;8,84)	1,61 (0,64;3,94)	0,99 (0,58;5,46)
3	3,07 (1,37;6,50)	1,81 (0,92;6,53)	1,48 (0,65;2,47)	1,07 (0,24;3,44)
4	2,42 (1,02;3,95)	2,30 (0,92;5,75)	0,94 (0,50;1,82)	0,88 (0,59;1,08)
5	2,65 (0,00;3,59)	1,45 (0,65;5,43)	1,44 (0,41;2,90)	1,46 (0,32;2,80)
6	2,27 (1,13;4,21)	1,77 (0,89;5,86)	0,84 (0,31;4,55)	1,13 (0,35;2,96)
7	2,02 (0,88;4,61)	1,46 (1,19;7,06)	0,97 (0,40;4,49)	1,16 (0,47;5,23)
14	2,43 (0,65;5,78)	1,31 (0,66;7,44)	1,09 (0,47;3,51)	1,22 (0,70;2,78)
21	2,13 (0,00;4,59)	1,36 (0,33;5,66)	0,82 (00;1,34)	0,92 (0,22;2,57)
28	1,83 (0,89;2,88)	1,32 (0,41;3,24)	1,05 (0,59;1,64)	0,78 (0,22;3,70)
60	2,34 (1,09;4,10)	2,17 (1,54;4,24)	1,52 (0,57;2,50)	0,94 (0,74;2,84)
90	3,62 (0,09;6,09)	0,90 (0,71;3,46)*	1,64 (0,19;2,72)	0,86 (0,35;3,47)

Statistická významnost * $P < 0,05$

4.2.1.e. Sledování fenotypu v lymfocytech

Porovnání fenotypu (poměr metabolit/mateřská látka) jsme provedli také v lymfocytech. Výsledky byly podobné jako v krvi. U metabolitů AM1 a AM4N byl nalezen vyšší poměr u DF v obou odběrových časech. (tabulka 13a-c)

Tabulka 13a. Porovnání poměru AM1/CsA v lymfocytech mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C0		C2	
	IF	DF	IF	DF
1	0,10 (0,00;1,05)	1,13 (0,00;1,84)	0,00 (0,00;0,71)	0,68 (0,00;1,69)
2	0,43 (0,00;1,82)	1,16 (0,35;2,09)	0,21 (0,00;0,83)	0,55 (0,32;3,64)*
3	0,00 (0,00;1,82)	1,36 (0,00;2,51)	0,00 (0,00;1,88)	0,48 (0,00;1,74)
4	0,34 (0,00;1,38)	0,87 (0,00;2,47)	0,11 (0,00;0,65)	0,48 (0,00;1,44)
5	0,38 (0,00;1,39)	0,75 (0,46;2,62)*	0,22 (0,00;0,78)	0,48 (0,20;0,81)
6	0,24 (0,00;2,07)	0,86 (0,51;4,00)*	0,30 (0,17;0,86)	0,41 (0,22;1,55)
7	0,48 (0,00;1,65)	1,08 (0,55;5,05)*	0,31 (0,15;0,52)	0,53 (0,27;1,79)
14	0,46 (0,00;2,04)	1,15 (0,49;2,07)*	0,13 (0,00;0,25)	0,62 (0,24;1,57)*
21	0,70 (0,00;1,09)	1,34 (0,41;2,28)	0,40 (0,16;0,65)	0,59 (0,18;1,32)
28	0,69 (0,00;3,87)	0,74 (0,00;3,46)	0,22 (0,00;0,83)	0,46 (0,00;3,21)
60	0,00 (0,00;1,09)	1,21 (0,00;5,25)	0,27 (0,00;0,82)	0,47 (0,00;1,48)
90	0,42 (0,00;3,92)	0,63 (0,00;3,10)	0,44 (0,00;1,19)	0,34 (0,00;1,38)

Statistická významnost * $P < 0,05$

Tabulka č. 13b. Porovnání poměru AM4N/CsA v lymfocytech mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C0		C2	
	IF	DF	IF	DF
1	0,011 (0,000;0,043)	0,347 (0,005;1,688)	0,018 (0,006;0,037)	0,139 (0,004;0,596)
2	0,021 (0,014;0,045)	0,192 (0,000;0,709)	0,015 (0,004;0,045)	0,087 (0,006;0,487)*
3	0,013 (0,000;0,060)	0,315 (0,005;1,031)	0,009 (0,007;0,042)	0,127 (0,005;0,458)
4	0,013 (0,000;0,061)	0,111 (0,008;0,586)	0,011 (0,005;0,027)	0,148 (0,019;0,337)*
5	0,026 (0,004;0,049)	0,091 (0,009;0,636)*	0,012 (0,003;0,020)	0,062 (0,006;0,267)*
6	0,018 (0,004;0,085)	0,169 (0,008;0,580)*	0,010 (0,007;0,024)	0,110 (0,006;0,555)
7	0,012 (0,000;0,025)	0,169 (0,008;1,023)*	0,008 (0,002;0,031)	0,180 (0,003;0,407)
14	0,009 (0,000;0,052)	0,311 (0,012;0,908)*	0,005 (0,001;0,025)	0,121 (0,004;0,497)
21	0,013 (0,000;0,029)	0,647 (0,008;1,080)	0,006 (0,000;0,044)	0,215 (0,004;0,367)
28	0,008 (0,000;0,045)	0,198 (0,000;1,400)	0,011 (0,003;0,020)	0,100 (0,000;1,417)*
60	0,010 (0,000;0,209)	0,540 (0,025;1,000)*	0,007 (0,003;0,084)	0,179 (0,007;0,674)*
90	0,024 (0,000;0,088)	0,067 (0,000;0,991)	0,014 (0,000;0,076)	0,110 (0,002;0,438)

Statistická významnost * P < 0,05

Tabulka č. 13c. Porovnání poměru AM9/CsA v lymfocytech mezi skupinami (medián (min; max))

dny po Tx	C0		C2	
	IF	DF	IF	DF
1	0,42 (0,00;1,59)	1,01 (0,69;2,80)	0,80 (0,00;1,35)	1,29 (0,67;3,26)
2	1,14 (0,00;1,73)	1,11 (0,32;8,30)	0,51 (0,00;1,15)	1,73 (0,23;4,76)
3	1,59 (0,00;2,14)	1,51 (0,36;6,21)	1,06 (0,24;2,40)	0,75 (0,14;2,41)
4	1,42 (0,89;2,08)	0,94 (0,80;2,69)	0,63 (0,24;1,15)	0,48 (0,38;1,51)
5	0,81 (0,00;3,64)	1,39 (0,43;3,33)	0,66 (0,22;1,25)	0,64 (0,38;2,29)
6	0,99 (0,50;3,58)	1,88 (0,46;3,02)	0,65 (0,26;1,12)	0,42 (0,19;2,87)
7	0,93 (0,00;1,69)	1,74 (0,59;3,20)	0,57 (0,27;0,90)	0,75 (0,38;2,37)
14	1,35 (0,00;2,92)	1,38 (0,61;3,23)	0,33 (0,00;1,13)	0,82 (0,30;1,60)
21	1,50 (0,00;1,95)	1,56 (0,29;3,09)	0,49 (0,18;1,45)	0,95 (0,59;1,37)
28	1,25 (0,34;3,03)	2,01 (0,53;3,14)	0,42 (0,22;0,74)	0,73 (0,15;3,57)
60	0,84 (0,00;3,34)	2,51 (0,00;3,25)	0,49 (0,15;0,99)	0,83 (0,34;1,38)
90	0,49 (0,00;3,59)	0,69 (0,00;1,92)	0,43 (0,16;1,09)	0,95 (0,10;2,00)

Statistická významnost * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

4.2.2 Pacienti více než 1 rok po transplantaci ledviny – skupina č. 2

4.2.2.a Sledování hladiny CsA a metabolitů v krvi a lymfocytech

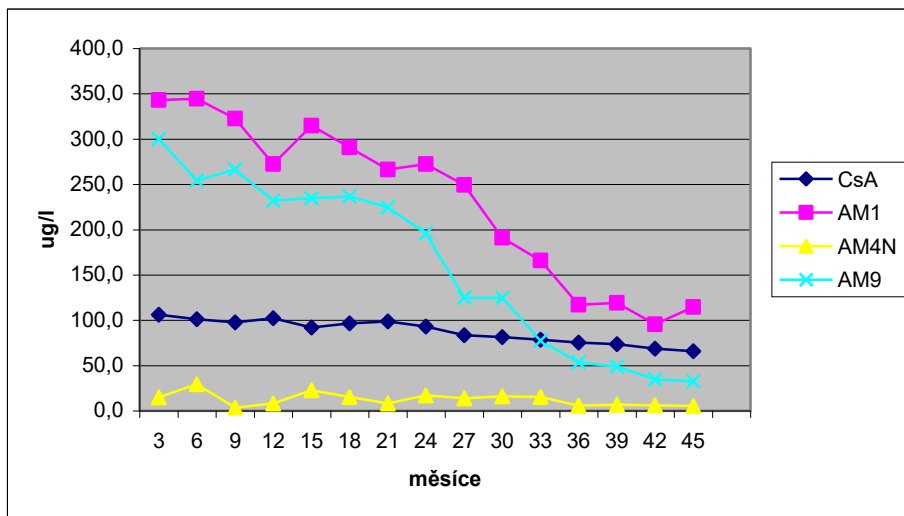
V průběhu sledování byla postupně snižována celková denní dávka CsA, dávka na kilogram také mírně klesala (tabulka č. 14)

Tabulka 14. Celková denní dávka a dávka na kilogram v průběhu sledování

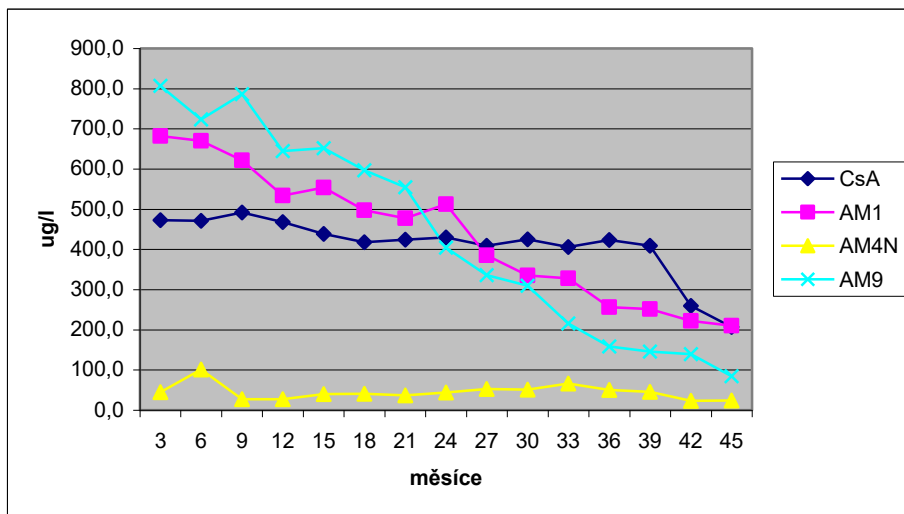
měsíc	dávka (mg)	dávka/kg (mg/kg)
3	152	2,0
6	145	1,9
9	150	2,0
12	146	1,9
15	143	1,9
18	137	1,8
21	136	1,7
24	135	1,8
27	138	1,8
30	134	1,8
33	129	1,7
36	132	1,8
39	123	1,6
42	125	1,6
45	133	1,7

Koncentrace CsA v krvi, stejně jako koncentrace metabolitů v C₀ i C₂ během 4 let klesaly. V průběhu sledování byly v krvi nalezeny vyšší hladiny metabolitů AM1 a AM9 než mateřské látky v odběrech před užitím, nejnižší koncentrace byly u AM4N (graf 13 a 14)

Graf č. 13. Koncentrace CsA a metabolitů v krvi v C₀

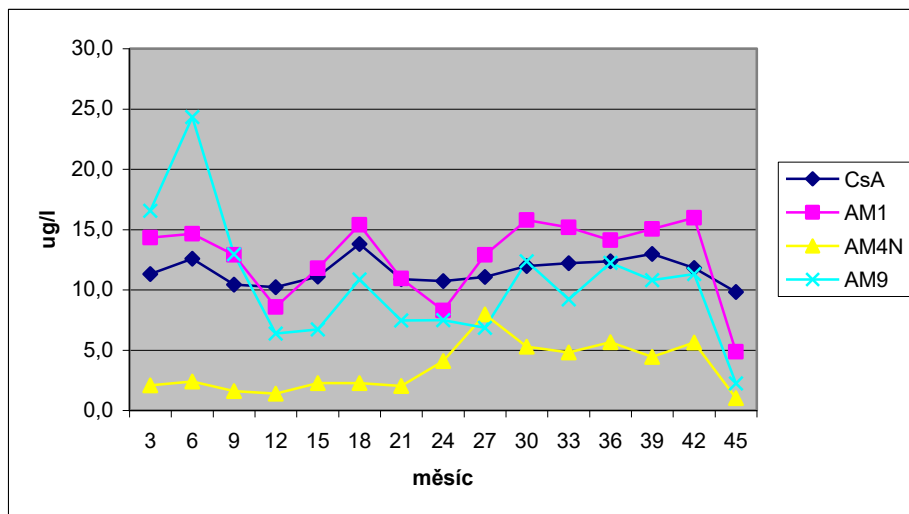


Graf č. 14. Koncentrace CsA a metabolitů v krvi v C₂

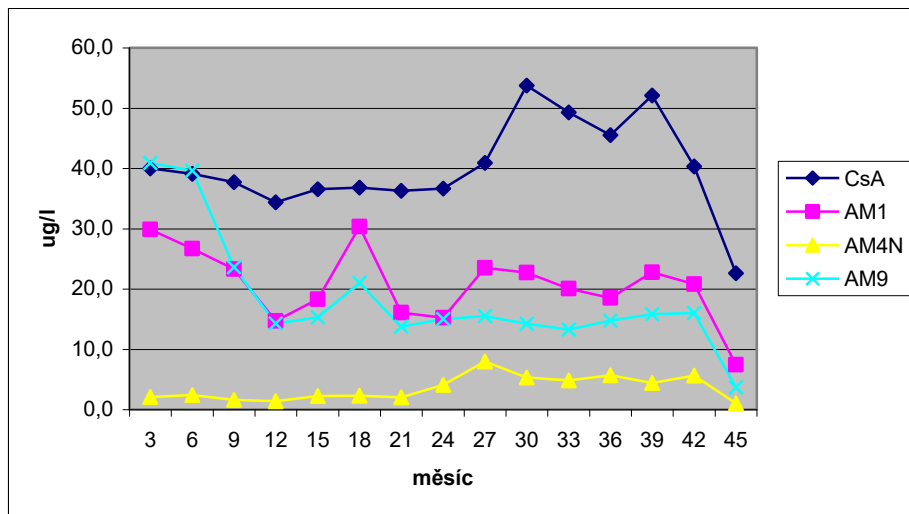


Koncentrace všech látek v lymfocytech se C_0 i C_2 výrazně neměnila., v C_2 byly naměřeny nejvyšší koncentrace u CsA. Nejnižší koncentrace v obou odběrech byly u AM4N (grafy číslo 15 a 16)

Graf č. 15. Koncentrace CsA a metabolitů v lymfocytech v C_0



Graf č. 16. Koncentrace CsA a metabolitů v lymfocytech v C_2



Korelace hladin v krvi a lymfocytech

Provedli jsme také korelaci hladin v krvi a lymfocytech. Korelace byla slabá, našli jsme ji u CsA v obou odběrech v průběhu celého sledování. U metabolitu AM1 v byla korelace v 1.a 2.roce v C₀ i C₂ a ve 4. roce pouze v C₂, u metabolitu AM4N v 1. roce v C₂ a v 2. roce v C₀ i C₂. Hladiny metabolitu AM9 korelovaly v 2. roce v obou odběrech a v 4. roce v C₀ (tabulka č.15)

Tabulka 15. Korelace hladin CsA a metabolitů v krvi a lymfocytech v průběhu 4-letého sledování (0h – koncentrace v odběru před užitím, 2h – koncentrace 2h po užití)

		CsA C0	CsA C2	AM1 C0	AM1 C2	AM4N C0	AM4N C2	AM9 C0	AM9 C2
1. rok	r	0,6288	0,5091	0,2783	0,3014	0,2560	0,3487	0,1879	0,1551
n=207	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0416	0,0268	0,0617	0,0098	0,1735	0,2628
2. rok	r	0,5664	0,7389	0,4559	0,4373	0,2961	0,5584	0,3201	0,3496
n=177	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0013	0,0024	0,0457	< 0,0001	0,0301	0,0160
3. rok	r	0,5920	0,6748	0,0722	0,2907	0,0221	0,0623	-0,1652	0,3333
n=104	p	0,0011	0,0001	0,7203	0,1413	0,9129	0,7575	0,4103	0,0894
4. rok	r	0,8121	0,9758	0,4681	0,8121	0,5380	0,4616	0,6995	0,5798
n=31	p	0,0143	0,0002	0,242	0,0265	0,1690	0,2971	0,0535	0,1724

4.2.2.b Sledování vlivu CsA a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku

Prvního vyšetření se zúčastnilo 31 pacientů (skupina „non-dipper“ 13 pacientů), druhého vyšetření 16 pacientů (skupina „non-dipper“ 8 pacientů) a třetího vyšetření 4 pacienti (skupina „non-dipper“ 4 pacienti). Po rozdělení všech pacientů do dvou skupin jsme zaznamenali 25 měření pacientů skupiny „non-dipper“ a 26 měření pacientů skupiny „dipper“.

1. Kompenzace TK

V průběhu celé studie dosahoval průměrný krevní tlak v denních hodinách hodnot $128 \pm 11 / 75 \pm 10$ mmHg, během nočních hodin $124 \pm 15 / 70 \pm 11$ mmHg. Průměrné hodnoty TK a pulsové frekvence během 24-hodinového měření (ABPM) při jednotlivých vyšetřeních jsou uvedeny v tabulce 16.

Po podrobném rozboru jednotlivých měření byli pacienti rozděleni na skupinu „dipper“ a „non-dipper“. Průměrné hodnoty TK a pulsové frekvence během 24-hodinového měření (ABPM) u obou skupin jsou uvedeny v tabulce 17.

2. Porovnání koncentrace CsA a metabolitů mezi skupinami

Při porovnání naměřených koncentrací jsme nenašli žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ v případě CsA ani primárních metabolitů AM1 a AM9, jediný statisticky významný rozdíl ($p=0.0339$) byl nalezen u metabolitu AM4N, jehož koncentrace v lymfocytech byla ve skupině „non-dipper“ 4-násobná (tabulka 18 a 19)

Tabulka 16. Průměrné hodnoty krevního tlaku a pulsové frekvence při 24-hodinovém měření (ABPM) při jednotlivých vyšetřeních;
STK - systolický krevní tlak, DTK - diastolický krevní tlak

číslo vyšetření	den			Noc		
	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min
1	129±14	76±11	75±7	125±18	71±13	65±7
2	126±7	74±7	70±8	122±10	68±8	61±8
3	125±4	75±7	71±3	126±3	73±7	61±3

Tabulka 17. Průměrné hodnoty krevního tlaku a pulsové frekvence při 24-hodinovém měření (ABPM) ve skupině „dipper“ a „non-dipper“ ; STK - systolický krevní tlak, DTK - diastolický krevní tlak

skupina	den			Noc		
	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min
„dipper“	128±11	75±10	72±7	115±12	65±10	62±6

„non-dipper“	129±12	76±10	73±8	132±15	75±10	65±9
--------------	--------	-------	------	--------	-------	------

Tabulka 18. Koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů (μg/l) v krvi
(„dipper“ - D, „non-dipper“ – N)

	CsA		AM1		AM9		AM4N	
	D	N	D	N	D	N	D	N
No	26	25	26	25	26	25	26	25
mean±SD	90.5±40.1	97.3±44.5	230.0±138.2	219.4±191.0	199.6±193.8	142.1±140.0	8.3±14.8	13.6±19.2

Tabulka 19. Koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů (μg/l) v lymfocytech
(„dipper“ - D, „non-dipper“ – N)

	CsA		AM1		AM9		AM4N	
	D	N	D	N	D	N	D	N
No	25	25	25	25	25	25	25	25
mean±SD	11.4±4.0	11.8±5.0	10.1±10.9	14.0±15.3	7.4±6.7	10.6±13.0	0.4±0.8	1.7±2.6*

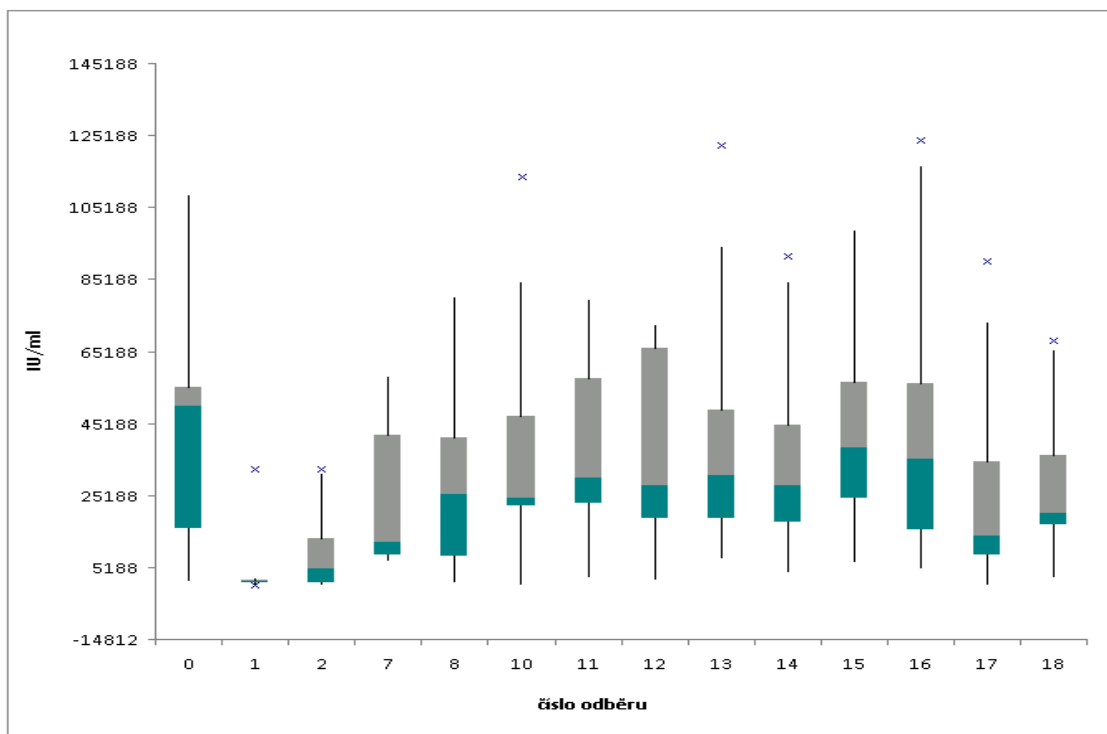
***p=0.0339**

4.2.3. Sledování funkčnosti imunitního systému

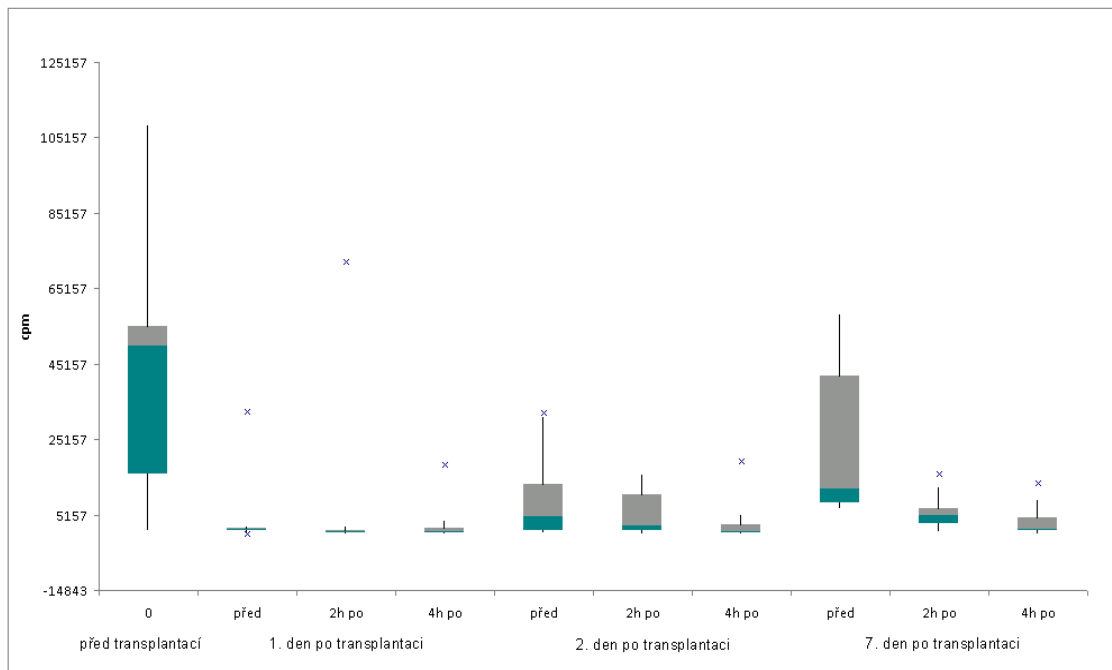
4.2.3.a Funkčnost imunitního systému

Obecně lze říci, že odpověď imunitního systému na stimuly sledovaná pomocí TTL nebo pomocí produkce cytokinů je silně utlumena v prvních dnech po transplantaci, zvláště v prvních hodinách po podání CsA (graf číslo 17 a 18) a normalizuje se po snížení jeho terapeutických dávek. Během našeho sledování však nebylo možno oddělit vliv a působení jednotlivých současně aplikovaných imunopresiv, která ovlivňují funkci imunitního systému různým způsobem.

Graf 17. Produkce IL-2 v TTL v odběru před užitím během 1. roku po transplantaci



Graf 18. Produkce IL-2 v TTL 1., 2. a 7. den po transplantaci v odběru před užitím a za 2 a za 4 hod po užití imunosuprese



Odpovídavost pacientů v TTL a QFN na PHA spolu sice celkově statisticky významně korelují, ale tato korelace není příliš těsná (r_s 0,7265, $p=0,0000$). Byla také nalezena závislost mezi koncentracemi CsA a jeho metabolitů jak v plné krvi, tak v lymfocytech a odpovídavosti lymfocytů na mitogenní a antigenní podnět v testech TTL a QFN (tabulka číslo 20 a 21). V praxi však opět musí být výše uvedené výsledky hodnoceny individuálně.

Tabulka 20. Korelace schopnosti lymfocytů odpovídat v testu transformace lymfocytů po stimulaci PHA s koncentracemi CsA a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech

	plná krev			lymfocyty		
	n	r_s	P	n	r_s	P
CsA	225	-0,5733	0,0000	162	-0,5064	0,0000
AM1	225	-0,2680	0,0000	165	-0,2193	0,0046
AM4N	225	-0,2840	0,0000	162	-0,2293	0,0033
AM9	224	-0,4345	0,0000	165	-0,3565	0,0000

Tabulka 21. Korelace schopnosti lymfocytů odpovídat v QFN testu po stimulaci PHA s koncentracemi CsA a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech

	plná krev			lymfocyty		
	n	rs	P	n	rs	P
CsA	227	-0,7367	0,0000	166	-0,7000	0,0000
AM1	227	-0,4561	0,0000	169	-0,4010	0,0000
AM4N	227	-0,4360	0,0000	166	-0,2540	0,0010
AM9	226	-0,5262	0,0000	169	-0,4783	0,0000

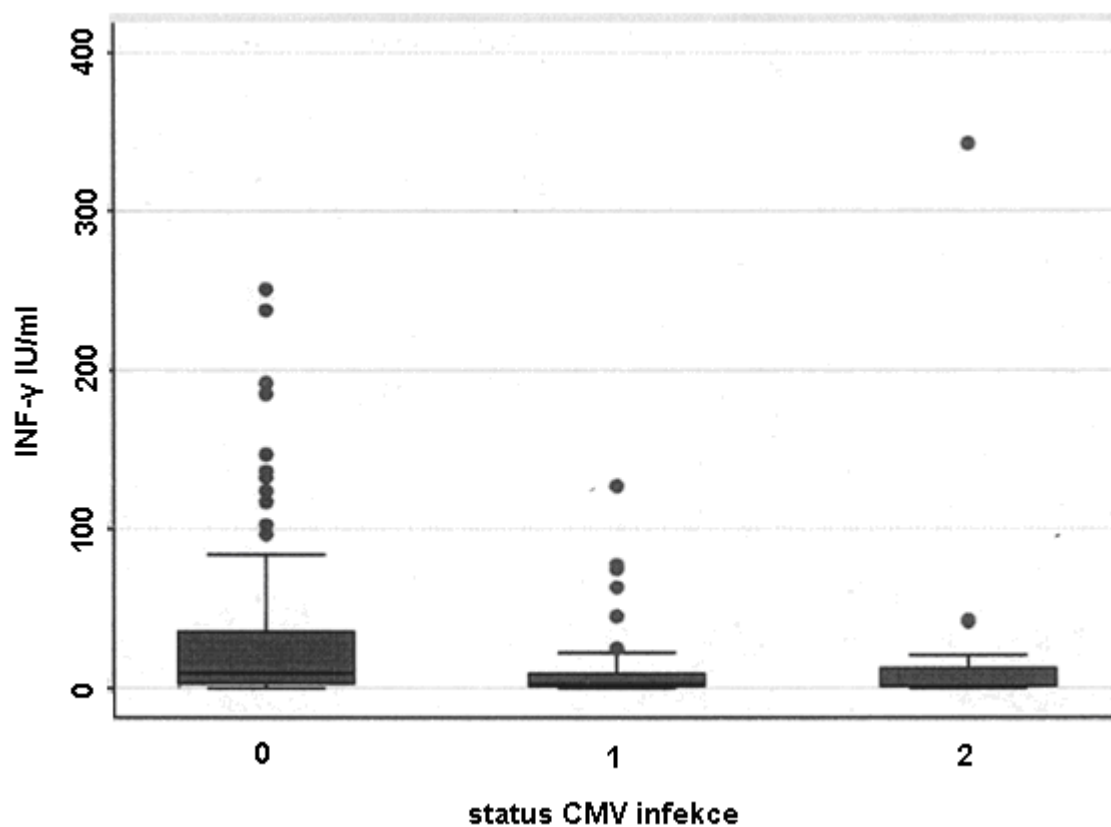
4.2.3.b Posouzení CMV-specifické imunity (69)

Po rozdělení na základě CMV séropozitivity(+)/negativity(-) dárce/příjemce (D/P) byly nalezeny následující skupiny: D-/P+ (n=1), D+/P+ (n=11) a D+/P- (n=2).

Podle CMV-DNA pozitivita a historie výskytu CMV infekce byli pacienti rozděleni do 3 kategorií: 1) CMV status 0 - bez historie CMV infekce; 2) CMV status 1 - CMV nálož <500 kopií/ml prokázaná alespoň 1x během sledování; 3) CMV status 2 - CMV nálož >5000 kopií/ml pozorovaná alespoň 1x během sledování.

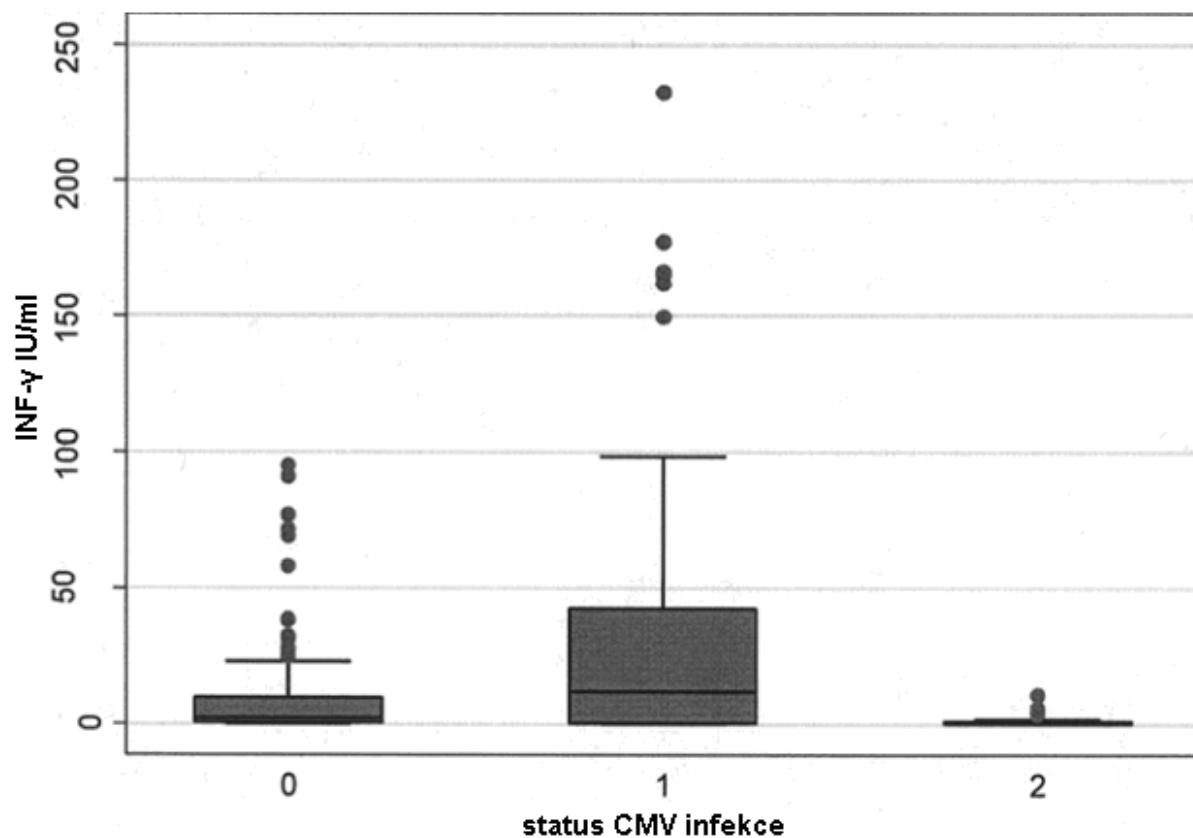
Ve vzorcích od pacientů bez předchozí CMV infekce (CMV status 0) byla po mitogenní stimulaci (PHA) ve srovnání s ostatními skupinami (CMV status 1 a 2) výrazně vyšší množství INF- γ . (graf 19). Mezi skupinami však nebyl pozorován žádný statisticky signifikantně významný rozdíl.

Graf 19. Produkce INF- γ po stimulaci mitogenem (PHA) měřená QuantiFERON-CMV testem



Vzorky pacientů s nízkou virovou náloží (CMV status 1) vykazovali výrazně vyšší produkci INF- γ proti CMV antigenu ve srovnání s pacienty s vysokou virovou náloží (CMV status 2). (graf. 20) Mezi skupinami však nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl.

Graf 20. Produkce INF- γ proti CMV antigenu stanovená QuatiFERON-CMV testem



Ukázalo se, že pacienti, kteří mají v testu QFN trvale sníženou odpověď na CMV antigeny mají významně vyšší riziko aktivace latentní nebo získání nové CMV infekce, než pacienti, kteří na CMV antigen v testu QFN dobře odpovídají (data neuvedena, testováno nepárovým t-testem, $p < 0.0001$).

5. DISKUSE

Pro správné TDM je velice důležitá rychlá a specifická analytická metoda. První metody používané ke stanovení CsA byly kompetitivní imunoanalytické metody. Jejich principem je soutěž o omezené množství vazebných míst specifické protilátky (70). Nevýhodou těchto metod je přítomnost zkřížené reakce s metabolity CsA, která se liší v závislosti na použité metodě. (71) Práce ze studie CONCERT (71) odkazuje na review autorů Kahan a spol. (72) a na práci autorů Johnston a spol. (73), které porovnávali metody LC/MS, EMIT, CEDIA (pouze u pacientů po transplantaci jater) a TDx s metodou RIA. Byly měřeny vzorky odebrané před a za 2 hod po užití u pacientů po transplantaci ledviny (22 párů vzorků odebraných 3, 7, 14 a 84 dnů po transplantaci) nebo jater (nejméně 33 párů vzorků ve stejné dny). Poměr LC/MS a RIA byl signifikantně nižší (0,89) u pacientů po transplantaci ledviny, zatímco TDx a EMIT se od RIA výrazně nelišily. Metody byly porovnávány s LC/MS u pacientů po transplantaci jater jen tehdy, když nebyl nalezen rozdíl 2 hod po užití. Autoři vyvodili nutnost stanovit terapeutické rozmezí na základě použité analytické metody. Karamperis a spol. (74) našli rovněž dobrou shodu mezi EMIT a LC/MS v případě AUC₀₋₁₂ u 12 pacientů po transplantaci ledviny. Na druhou stranu Cattaneo a spol. hlásili v roce 2004 průměrné nadhodnocení 28,9-35,0 % u metod ACMIA, CEDIA+ a EMIT-VIVA (75). Grundmann a spol. tento jev popsali u specifické RIA metody, kdy nadhodnocení dosahovalo až 100%. Zajímavé je, že na této nespecifické reakci se významně nepodílely hlavní metabolity jako jsou AM1, AM9 a AM4N (23)

Za referenční metodu k měření koncentrací CsA je považována HPLC, která umožňuje přesné měření mateřské látky (14), ale umožňuje stanovit i metabolity (70). Nevýhodou této metody je poměrně náročná příprava vzorků (70). Proto jsme vyvinuli metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která je rychlá, přesná a umožňuje stanovit CsA i s metabolity. Naše metoda umožňuje také stanovení koncentrace CsA a jeho metabolitů v cílovém orgánu působení, v lymfocytech (60) Díky malému množství krve, rychlé analýze a specifitě měření může být tato metody použita k rutinnímu TDM u pacientů v rané i pozdní fázi po transplantaci a při úsilí k objasnění role CsA a jeho primárních metabolitů při akutní rejekci, hypertenzi a nefrotoxicitě.(60)

Ze 14 pacientů zařazených do skupiny č. 1 se u 7 (50%) projevil opožděný nástup funkce transplantované ledviny. Když jsme zařadili pouze pacienty s nutností dialýzy, byla prevalence 36%, což je srovnatelné s daty z literatury. (76-78) V průběhu prvního měsíce jsme našli vyšší hladiny CsA i metabolitů ve skupině se zhoršenou funkcí, přičemž rozdíly byly statisticky významné u metabolitu AM4N. Za 3 měsíce po transplantaci rozdíl v koncentracích jednotlivých látek vymizel. Koncentrace lipofilního metabolitu AM4N byly nízké, podobně jako v literatuře (23, 74, 79) V naší studii jsme měli malý počet pacientů (7 v každé skupině), což může být problém, obzvláště v případě léku s výrazně vyšší niter- i intraindividuální variabilní farmakokinetikou.

AUC_{0-4} je považována za významný farmakokinetický parametr ukazující na celkovou expozici průběhu jednoho dávkovacího intervalu. Absorpce CsA během prvních 4 hodin po užití dávky (AUC_{0-4}) je obdobím největší variability mezi jednotlivými pacienty. Přiměřená absorpce CsA v tomto období je důležitým faktorem pro účinnou profylaxi akutní rejekce v průběhu rané fáze po transplantaci (71). Bylo zjištěno, že AUC_{0-4} CsA v rozmezí 4400-5500 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ měřené specifickou RIA metodou poskytuje během rané fáze optimální míru imunoprese (68). Dosažení tohoto rozmezí mezi 2. a 4. dnem po Tx bylo spojeno s nejnižším výskytem akutní rejekce a nefrotoxicity během prvním 3 měsíců po Tx (68, 80). U našich pacientů jsme výše uvedené rozmezí AUC_{0-4} nedosáhli, přesto se během prvním 3 měsíců po Tx akutní rejekce nevyskytla. Nižší AUC_{0-4} v naší studii souvisí pravděpodobně i s použitím LC-MS/MS metody, která je přesnější než RIA metoda (23) použitá ve výše uvedené práci. Přestože byly ve skupině s DF naměřeny vyšší hodnoty CsA v C_0 , AUC_{0-4} byla s výjimkou první dne po Tx nižší, zřejmě z důvodu nižší C_2 .

Poměr metabolit/mateřská látka se během sledování výrazně neměnil. Vyšší hodnoty byly zaznamenány ve skupině s DF u poměru AM1/CsA a AM4N/CsA, v případě AM9/CsA byly vyšší poměry v jednotlivých odběrech spíše ve skupině s IF a poměr metabolit/mateřská látka byl v C_2 nižší než v C_0 .

U pacientů ve skupině č. 2 klesala v průběhu sledování koncentrace CsA i metabolitů v krvi v souladu s klesající dávkou, hladiny v lymfocytech se výrazně neměnily. V důsledku toho se postupně zvyšoval podíl CsA i metabolitů v lymfocytech z celkového množství v krvi.

Je otázkou, zda jsou zvýšené koncentrace metabolitů důvodem nebo následkem nefrotoxicity CsA. CsA je výrazně metabolizován systémem cytochromu P4503A na více než

30 metabolitů (13). Na základě *in vitro* pokusů jsou tyto metabolity považovány za méně toxické a méně účinné než mateřská látka. Příspěvek metabolitů k imunosupresivní aktivitě CsA *in vivo* ve srovnání s *in vitro* studii je ovlivněn různými faktory jako je farmakokinetika, distribuce, afinita k vazebným proteinům, koncentrace a interakce metabolitů (81). Částečný imunosupresivní účinek byl nalezen u metabolitu AM1, AM9 a AM4N (42). Nefrotoxický potenciál jednotlivých metabolitů se v jednotlivých studiích provedených *in vitro* liší. Copeland a spol. zkoumal vliv CsA a metabolitů na růst buněk, syntézu DNA, RNA a proteinů. Největší inhibiční účinek pozoroval u AM4N, který vykazoval 17-50% aktivity CsA v IC₅₀ (koncentrace, která je nutná pro 50% inhibici příslušných parametrů). Při koncentraci 25 mg/l CsA a AM4N vykazovaly > 90% inhibici všech parametrů. Morfologické změny v buněčné kultuře vyvolané AM4N byly srovnatelné s těmi vyvolanými CsA (82). Ve studii autorů Radeke a spol. byla zkoumána nefrotoxicita CsA a metabolitů pomocí inhibice proliferace mesangiálních buněk. Nejvyšší inhibiční efekt vykazoval CsA, následován metabolitem AM4N, AM1c, AM1c9, AM9, AM19, AM1, AM4N9, AM14N, AM1A, AM11d. Metabolity AM4N9, AM14N, AM1A, AM11d byly považovány za neaktivní (13). Možným mechanismem toxického působení metabolitů tedy může být kovalentní vazba na makromolekuly v játrech a ledvinách a synergický účinek kombinace CsA s metabolity na mesangiální buňky (15). Metabolit AM4N by se tak mohl podílet na nefrotoxickém působení CsA vedoucím mimo jiné i k poruše kolísání krevního tlaku během dne.

ABPM je nejen důležitým nástrojem při diagnostice hypertenze a ke zhodnocení účinnosti léčby, ale umožňuje také odhalit abnormální cirkadiální kolísání krevního tlaku. Pokles nočního tlaku krve o >10% oproti denním hodnotám (tj. poměr krevního tlaku noc/den < 0,9) je všeobecně akceptován jako hranice, aby mohl být pacient označen jako „dipper“ (83). Odhaduje se, že normální cirkadiální rytmus je zachován zhruba u 70% pacientů užívajících antihypertenzivní terapii (84). Nejčastěji se jako normální TK při ABPM udává průměrný denní TK < 135/85 mmHg, průměrný noční TK < 120/70 mmHg a 24hodinový průměrný TK < 130/80 mmHg (85). Z tohoto pohledu byl průměrný TK v námi sledovaném souboru v průběhu dne dobře kompenzován, v noci však u části pacientů k poklesu krevního tlaku nedošlo. Statistické zpracování prokázalo, že jediný významný rozdíl mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ byl nalezen mezi koncentracemi metabolitu AM4N v lymfocytech

před podáním cyklosporinu A, kdy byla v lymfocytech skupiny „non-dipper“ koncentrace významně vyšší ($p = 0.0339$). K potransplantační hypertenzi přispívají mnohé faktory, mezi které patří i užívání kalcineurinových inhibitorů, jako je CsA a takrolimus (86). CsA snižuje průtok krve ledvinami vazokonstrikcí aferentních cév. Tento jev může nastat již po jedné dávce a určitý stupeň renální vazokonstrikce se pravděpodobně vyskytuje u všech osob léčených CsA. Vazokonstrikce vyvolává snížení glomerulární filtrace, zvýšení reabsorpce sodíku, oligurii a nárůst sérového kreatininu spolu s dalšími klinickými projevy jako je hyperkalemie, tubulární acidóza a hypertenze. Bylo zjištěno, že tyto akutní hemodynamické účinky jsou funkční, eversibilní a závislé na dávce (87).

Vzhledem k malému počtu pacientů mohou být pacienti při monitorování imunitního systému hodnoceni jen individuálně. Přesto se ukazuje, že při posuzování stavu imunitního systému je nutno brát v úvahu celkový stav a komplexní léčbu pacienta nejen v období po transplantaci, ale i před transplantací. Použité testy pak dobře informují o stavu imunity pacienta a umožňují potenciální úpravu medikace.

Je všeobecně známo, že dlouhodobé užívání imunosupresiv ovlivňuje imunitní systém pacientů. Současná imunosupresivní terapie používaná k prevenci rejekce působí škodlivě na T-lymfocyty a buněčnou imunitní odpověď, což vede ke zvýšené náchylnosti k infekcím, i CMV infekci. Většina dárců i příjemců orgánů má navíc při transplantaci latentní CMV infekci. Infekce se pak může být výsledkem reaktivace latentního viru nebo jako nová infekce z tkáně dárce. Proto je CMV pozitivita dárce nejvýznamnějším rizikovým faktorem infekce po transplantaci, zejména v případě, kdy příjemce CMV infekci neprodělal. Je jasné, že již dříve získaná imunita modifikuje průběh infekce. (5)

CMV vyvolává jak humorální, tak buněčnou imunitní odpověď, ačkoli se zdá, že buněčná odpověď je kritičtější faktorem pro kontrolu viru. Analýza virově specifické odpovědi T-lymfocytů má větší prediktivní hodnoty než sérologické vyšetření, protože replikace CMV je více kontrolovaná buněčnou složkou imunitního systému. V současné době jsou dostupné mnohé techniky, které pomáhají s diagnózou CMV infekce, ale pouze několik studií uváděných v literatuře používá QuantiFERON-CMV test k popsání CMV-specifické imunitní odpovědi. (88, 89).

Imunitní systém tvoří dynamická souhra pozitivních a negativních regulačních faktorů, které jsou ovlivněny jak individuální odpovědí pacienta, tak vlastními klinickými

podmínkami. Protože je test QuantiFERON-CMV prováděn z plné krve, přítomnost dalších profesionálních antigen-prezentujících buněk v této matrici, může zlepšit aktivaci prahu pro syntézu cytokinů specifickými T-lymfocyty, což vede ke zvýšené odpovědi (tvorbě) INF- γ . (69),

Při srovnání pacientů s prodělanou CMV infekcí s těmi bez CMV infekce, rozsah odpovědi na peptidy CMV viru a individuální riziko rozvoje nemoci bylo vyšší mezi pacienty s trvale nízkou nebo negativní odpovědí na CMV proteiny ve srovnání s těmi, kteří vykazovali dostatečnou INF- γ odpověď. Tato odpověď koreluje s produkcí INF- γ po mitogenní stimulaci přesto, že nejvyšší produkce INF- γ byla zaznamenána mezi pacienty bez předchozí CMV infekce. Generalizované chyby v odpovědi T-buněk na mitogeny a antigeny byly vztahovány k abnormalitám repertoáru receptorů T-buněk (90)

Komplexní zhoršení proliferativní odpovědi na již dříve se vyskytující antigeny bylo také pozorováno u některých neoplastických onemocnění a při chronickém zánětu. Jedním z možných vysvětlení je, že přirozeným podnětem k reaktivaci u imunokompetentního hostitele je imunitní odpověď na infekci a že alogenní transplantace tento proces maskuje. (91, 92)

Podle našich výsledků pacienti s vyšší buněčnou imunitní odpovědí měřenou QuantiFERON-CMV testem měli nižší riziko manifestace CMV infekce než pacienti s nižší odpovědí. Mechanismus, kterým se CMV reaktivuje z latence, není stále dobře objasněn; ale preexistující imunita má zásadní význam pro průběh infekce. Nejzávažnější průběh nemoci byl pozorován u pacientů, kteří neměli trvale odpověď jak na CMV antigen, tak na mitogen. (69)

Naše studie měla některá omezení, jmenovitě malý počet pacientů, výraznou intra- a interindividuální variabilitu a abnormální distribuci dat, která neumožňovala robustnější statistickou analýzu. Měly by být provedeny další studie na rozsáhlejší souboru pacientů. (69)

6. ZÁVĚRY

1. Byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda pro stanovení koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů nejen v krvi, ale i v lymfocytech, vyznačující se snadnou přípravou vzorku a krátkým časem analýzy, která je vhodná pro terapeutické monitorování, což dokládá článek *Brozmanová H, Perinová I, Halvová P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients.*
2. Významně vyšší koncentrace AM4N i AM1 v krvi i lymfocytech u pacientů v rané fázi po transplantaci může souviset s opožděným nástupem normálních renálních funkcí po transplantaci ledvin
3. V souboru pacientů po transplantaci ledvin jsme v průběhu sledování zaznamenali abnormální cirkadiální kolísání krevního tlaku téměř v 50% provedených měření. Dle našich výsledků hladiny CsA a metabolitů AM1 a AM9 neovlivnily pokles nočního tlaku, statisticky významný rozdíl mezi skupinami „dipper“ a „non-dipper“ byl však nalezen u hladiny metabolitu AM4N v lymfocytech před užitím. Výsledek naznačuje, že zvýšená koncentrace výrazně lipofilního metabolitu AM4N v lymfocytech může být příčinou, eventuálně i markerem pro výskyt „non-dippingu“, což jsme ukázali v článku *Halvová P, Kacířová I, Brozmanová H, Grundmann M. Vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku.*
4. Zjistili jsme, že QuantiFERON-CMV test se zdá být citlivým specifickým testem na detekci virově specifické odpovědi T-lymfocytů. Toto vyšetření se v kombinaci s vyšetřením virové DNA nálože může prokázat jako účinné kurčení pacientů s rizikem CMV infekce, což jsme ukázali v článku *Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, Dedochova J, Martinek A, Brozmanova H, Grundmann M. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation.*

7. SOUHRN

TDM (terapeutické monitorování hladin léčiv) je metoda pro monitorování terapie pomocí měření koncentrace léčiva v biologickém materiálu (séru, plazmě, krvi). Jejím základním předpokladem je existence úzkého vztahu mezi koncentrací léčiva v séru a jeho farmakologickým efektem. TDM je využíváno u různých skupin léčiv, jednou z nich jsou imunosupresiva.

Cyklosporin A patří mezi základní používaná imunosupresiva. Spolu s takrolimem ho řadíme mezi kalcineurinové inhibitory.

CsA může být podáván jak intravenózně, tak perorálně. Po perorálním podání je popisována jeho signifikantní presystémová eliminace, zejména díky biotransformaci 3A izoformou cytochromu P450. CsA je substrátem CYP 3A (a zároveň také inhibitorem P450 3A4) a substrátem i inhibitorem P-glykoproteinu, z čehož vyplývají jeho lékové interakce. CsA se vyznačuje řadou nežádoucích účinků, ze kterých je nejvýznamnější nefrotoxicita. Mezi další nežádoucí účinky patří např. hypertenze, neurotoxicita, bolest hlavy, diabetogenní efekt, hyperlipidemie.

CsA je lék s úzkým terapeutickým rozmezím, u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita farmakokinetiky, proto je nutné jeho koncentrace monitorovat. Vzhledem k mechanismu účinku by bylo vhodné monitorovat jeho koncentrace v místě účinku, v lymfocytech. Pro TDM cyklosporinu se používají metody imunoanalytické, vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Imunoanalytické metody mají nevýhodu v různé míře zkřížené reakce používané protilátky s metabolity CsA, což vede k různé míře nadhodnocení naměřených koncentrací. Metody HPLC jsou přesné a citlivé a umožňují i stanovení metabolitů, ale jsou velmi pracné a náročné na přípravu vzorku. Proto jsme vyvinuli jako první na světě LC-MS/MS metodu, která umožňuje stanovení CsA a jeho primárních metabolitů (AM1, AM4N a AM9) v krvi i periferních lymfocytech. Výtěžnost metody byla v rozmezí 97,0-109,5% pro krev a 92,0-110,0% pro lymfocyty pro všechny látky a správnost metody vyjádřena jako variační koeficient v rámci série a mezi sériemi byla mezi 1,8 a 9,8% v krvi, resp. v lymfocytech.

Nově vyvinutou metodu jsme použili pro TDM CsA v prospektivní studii u pacientů po transplantaci ledviny jednak v akutní fázi do 3 měsíců (skupina č. 1), jednak při sledování v chronické fázi po dobu do 4 let (skupina č. 2).

Ve skupině č. 1 jsme na základě renální funkce rozdělili pacienty na skupinu s okamžitým nástupem funkce štěpu (IF) a se zpožděným nástupem funkce štěpu (DF). Ve skupině s DF byly vyšší koncentrace sérového kreatininu a nižší clearance kreatininu. Ve skupině s DF jsme zjistili vyšší koncentrace CsA a metabolitů v údolních koncentracích (C_0). Koncentrace za 2 hod po užití (C_2) byly u DF vyšší jen u AM4N. Porovnávali jsme také AUC_{0-4} , které byly vyšší u CsA a AM9 ve skupině s IF, u AM1 a AM4N ve skupině s DF. AUC_{0-4} velmi dobře korelovala s C_2 u obou sledovaných skupin. Při sledování fenotypu (poměr metabolit/mateřská látka) v krvi i lymfocytech byl nalezen vyšší poměr u DF u AM1 a AM4N v obou odběrech. Během druhého a třetího měsíce po Tx došlo k normalizaci renální funkce u DF a rozdíly mezi skupinami vymizely.

Ve skupině č. 2 jsme sledovali po dobu 4 let pacienty, kteří podstoupili Tx více než rok před zařazením do studie. Koncentrace CsA a metabolitů v krvi v obou odběrech postupně klesaly, stejně jako byla snižována celková denní dávka. V C_0 byly nalezeny vyšší koncentrace AM1 a AM9 než CsA, hladiny AM4N byly nízké. Na rozdíl od nálezů v krvi koncentrace v lymfocytech zůstávaly stabilní. Koncentrace CsA v krvi korelovala s významně s koncentracemi v lymfocytech, zatímco u metabolitů nebyly výsledky jednoznačné.

U 31 pacientů jsme sledovali vliv CsA a metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. Pacienti podstoupili 3 vyšetření ABPM (ambulantní monitorování krevního tlaku) a celkem bylo provedeno 51 vyšetření. Po rozdělení pacientů jsme zaznamenali 25 měření skupiny „non-dipper“ (pokles nočního tlaku krve $<10\%$) a 26 měření skupiny „dipper“ (pokles nočního tlaku krve $>10\%$). Při porovnání naměřených koncentrací jsme nenašli žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ v případě CsA ani primárních metabolitů AM1 a AM9, jediný statisticky významný rozdíl ($p=0.0339$) byl nalezen u metabolitu AM4N, jehož koncentrace v lymfocytech byla ve skupině „non-dipper“ 4-násobná.

Sledovali jsme také funkčnost imunitního systému pomocí testu transformace lymfocytů po stimulaci fytohemagglutininem (PHA) a pomocí produkce $INF-\gamma$ po stimulaci

PHA, antigenem cytomegaloviru (CMV Ag) a směsí antigenů *M. tuberculosis* za využití systému QuantiFERON firmy Cellestis. Obecně lze říci, že odpověď imunitního systému na stimuly sledovaná pomocí TTL nebo pomocí produkce cytokinů je silně utlumena v prvních dnech po transplantaci, zvláště v prvních hodinách po podání CsA a normalizuje se po snížení jeho terapeutických dávek. Během našeho sledování však nebylo možno oddělit vliv a působení jednotlivých současně aplikovaných imunosupresiv, která ovlivňují funkci imunitního systému různým způsobem. U pacientů byla také posuzována CMV-specifická imunita zprostředkovaná CD8⁺ T-lymfocyty. Zjistili jsme, že QuantiFERON-CMV test se zdá být citlivým specifickým testem na detekci virově specifické odpovědi T-lymfocytů. Toto vyšetření se v kombinaci s vyšetřením virové DNA nálože může ukázat jako účinné k určení pacientů s rizikem CMV infekce.

Naše práce přinesla následující prioritní výsledky:

1. byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda pro stanovení koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů nejen v krvi, ale i v lymfocytech
2. významně vyšší koncentrace AM4N i AM1 v krvi i lymfocytech během rané fázi po transplantaci může souviset s opožděným nástupem normálních renálních funkcí po transplantaci ledvin
3. při dlouhodobém podávání CsA se vyvinul stav „non-dipper“, u této skupiny pacientů byla signifikantně zvýšena koncentrace metabolitu AM4N v lymfocytech

SUMMARY

TDM (therapeutic drug monitoring) is a tool for optimisation of therapy by drug concentration measurement in biologic fluids (serum, plasma, blood). Its basic premise is the existence of a close relationship between drug concentration in serum and its pharmacologic effect. TDM is used for different groups of drugs, one of which are immunosuppressants.

Cyclosporine A (CsA) is one of the basic used immunosuppressants and together with tacrolimus is classified as calcineurin inhibitors.

The administration of CsA can be both intravenous and oral. Following oral administration, a significant presystemic elimination was found due to biotransformation by cytochrome P450 3A. CsA is a substrate and inhibitor of P450 3A4 and P-glycoprotein too, which results in high potency of drug interaction. CsA has many adverse effects, the most significant is nephrotoxicity. Other adverse effects are hypertension, neurotoxicity, headache, diabetogenic effect and hyperlipidemia.

CsA is a drug with narrow therapeutic index and significant interindividual variability in pharmacokinetics has been observed. Hence, therapeutic drug monitoring is necessary. Due to the mechanism of action it should be appropriate to monitor its concentration at the site of action, lymphocytes. Immunoassays, high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) are used in TDM of CsA. Disadvantage of immunoassays is different cross-reactivity with CsA metabolites resulting in different extent of overestimation. HPLC methods are precise and sensitive, enable metabolite determination, but they are difficult and time-consuming for sample preparation. So we developed LC-MS/MS method for the determination of cyclosporine A (CsA) and its first line metabolites AM1, AM9, and AM4N in whole blood and lymphocytes. The accuracy of the method was in the range of 97.0–109.5% in blood and 92.0–110.0% in lymphocytes for all compounds and precision of the assay expressed by within-day and between-day coefficient of variations was between 1.8 and 9.8% in blood and in lymphocytes, respectively.

We used our new developed method for determination of CsA in a prospective study in patients during first three months after renal transplantation (group 1) and in patients during long term therapy (group 2).

Patients in group 1 were divided according their serum creatinine levels into group with immediate graft function (IF) and delayed graft function (DF). We found higher serum creatinine levels and lower creatinine clearance levels in DF group. Patients in DF group had

higher trough concentration (C_0) of CsA and metabolites. 2 hours after CsA administration (C_2) only the metabolite AM4N concentrations were higher in the DF group. Patients in the IF group had higher AUC_{0-4} of CsA and AM9 and AUC_{0-4} of AM1 and AM4N was higher in the DF group. AUC_{0-4} of CsA correlated well with C_2 in both groups. We determined the phenotype (the ratio of the metabolite/parent compound) in blood and lymphocytes. We found a higher ratio of AM1/CsA and AM4N/CsA in both samples in DF group. Renal function in the DF group normalised during 2nd and 3rd month after transplantation and differences between groups disappeared.

Patients in group 2 were followed for 4 years. These patients underwent Tx more than a year prior to enrollment. The concentration of CsA and its metabolites in both samples gradually decreased, as well as the total daily dose. Higher C_0 concentrations of AM1 and AM9 than CsA were found, AM4N levels were low. In contrast to the findings in the blood concentrations in lymphocytes remained stable. CsA concentrations in blood correlated with concentrations in lymphocytes significant, while metabolites results were not unequivocal.

The effect of CsA metabolites on circadian blood pressure fluctuations was investigated in 31 patients from group 2. Patients underwent three ABPM (Ambulatory Blood Pressure Monitoring) examinations and a total of 51 measurements were performed. Patients were divided into the group of "non-dipper" (nocturnal blood pressure decrease <10%; 25 measurements) and the group of "dipper" (nocturnal blood pressure decrease > 10%; 26 measurements). When comparing measured concentrations we found no statistically significant difference between groups "dipper" and "non-dipper" in the case of CsA or primary metabolites and AM9 AM1, the only statistically significant difference ($p = 0.0339$) was found in AM4N metabolite, whose concentration in the lymphocytes was in the group "non-dipper" 4-fold higher.

We investigated also the functionality of the immune system by using the lymphocyte transformation test after stimulation with phytohemagglutinin (PHA) and by producing INF- γ after stimulation with PHA, cytomegalovirus antigen (CMV Ag) and mixtures of M. tuberculosis antigens using a system QuantiFERON (Cellestis). Generally, the immune response to stimuli monitored by using TTL or via production of cytokines is strongly attenuated in the first few days after transplantation, especially during the first hours after administration of CsA and normalized after reduction its therapeutic dose. During our study it

was not possible to distinguish the impact of individual action simultaneously administered immunosuppressive drugs that affect the immune system in different ways. CMV-specific immunity mediated by CD8+ T lymphocytes was also assessed in patients. The QuantiFERON-CMV assay seems to be sensitive specific test to detect virus-specific T-cell response. This examination seems to be effective to identify patients at risk for CMV infection combined with the examination of the viral DNA load.

Key messages:

1. New LC-MS/MS method for determination of CsA and its first line metabolites not only in blood but also in lymphocytes was developed.
2. Significantly higher concentrations of AM4N and AM1 in blood during early phase after renal transplantation may have relation to delayed onset of normal renal function after renal transplantation.
3. During long-term CsA therapy 50% of patients switched to “non-dipper” status. Significantly higher concentration of metabolite AM4N in lymphocytes were observed in this group of patients.

8. ZKRATKY

ALG – antilymfocytární globulin
AUC₀₋₄ – plocha pod křivkou 4 hod po užití
C₀ – údolní koncentrace (v odběru před užitím)
C₂ – koncentrace za 2 hod po užití
CEDIA - enzymová imunoanalýza
C_{max} – maximální dosažená koncentrace
CMV – cytomegalovirus
CsA – cyklosporin
CsC - cyklosporin
CsD - cyklosporin
CV - variační koeficient
D - dipper
DF - skupina s opožděným nástupem funkce štěpu
EDTA - etylendiamintetraoctová kyselina
ELISA – enzymatická imunoanalýza
EMIT - enzymová imunoanalýza
FPIA - fluorescenční polarizační imunoanalýza
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IF - skupina s okamžitým nástupem funkce štěpu
IS - vnitřní standard
LC-MS, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
N - non-dipper
PCR – polymerázová řetězová reakce
PHA – fytohemaglutinin
QFN – test QuantiFERRON
R - výtěžnost
RIA - radioimunoanalýza
TDM – terapeutické monitorování hladin léčiv
TDx - imunochemický analyzátor
TTL – test transformace lymfocytů
Tx – transplantace

9. LITERATURA

1. Grundmann M, Kacířová I. Význam TDM, fenotypizace a genotypizace pro správné dávkování léčiv. Čas Lék Čes. 2010;149(482-487).
2. Maršálková P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv I. Klin Farmakol Farm. 2009;23(3):138-41.
3. Halvová P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv II. Klin Farmakol Farm. 2010;24(1):51-6.
4. Weikert BC, Blumberg EA. Viral infection after renal transplantation: surveillance and management. Clin J Am Soc Nephrol. 2008 Mar;3 Suppl 2:S76-86.
5. Hughes D, Hafferty J, Fulton L, Friend P, Devaney A, Loke J, et al. Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: an analysis of 486 patients. J Clin Virol. 2008 Feb;41(2):92-5.
6. Naumnik B, Malyszko J, Chyczewski L, Kovalchuk O, Mysliwiec M. Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. Transplant Proc. 2007 Nov;39(9):2748-50.
7. Trevillian P. The CARI guidelines. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: therapeutic drug monitoring. Nephrology (Carlton). 2007 Feb;12 Suppl 1:S57-65.
8. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol. 2005 Oct;56(1):23-46.
9. Masri MA. The mosaic of immunosuppressive drugs. Mol Immunol. 2003 Jul;39(17-18):1073-7.
10. Martinek V, Matoušovič K, Špatenka J. Objev a užití cyklosporinu v klinické praxi. Prakt lék. 2002;82(1):14-20.
11. Kučera M, Kalouš R, Kratochvíl P. Rozšířené indikace cyklosporinu A. Ref vyb revm. 2000;40(4):227-80.
12. Dirks NL, Huth B, Yates CR, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective on ethnic differences. Int J Clin Pharmacol Ther. 2004 Dec;42(12):701-18.
13. Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. Kidney Int. 1991 Jun;39(6):1255-66.

14. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem*. 1990 Aug;36(8 Pt 1):1510-6.
15. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1993 Feb-Mar;57(2-3):291-345.
16. Elbarbry FA, Marfleet T, Shoker AS. Drug-drug interactions with immunosuppressive agents: review of the in vitro functional assays and role of cytochrome P450 enzymes. *Transplantation*. 2008 May 15;85(9):1222-9.
17. Lipkin GW, Tucker B, Giles M, Raine AE. Ambulatory blood pressure and left ventricular mass in cyclosporin- and non-cyclosporin-treated renal transplant recipients. *J Hypertens*. 1993 Apr;11(4):439-42.
18. van den Dorpel MA, van den Meiracker AH, Lameris TW, Boomsma F, Levi M, Man in 't Veld AJ, et al. Cyclosporin A impairs the nocturnal blood pressure fall in renal transplant recipients. *Hypertension*. 1996 Aug;28(2):304-7.
19. Galiatsou E, Morris ST, Jardine AG, Rodger RS, Watson MA, Elliott HL. Cardiac and vascular abnormalities in renal transplant patients: differential effects of cyclosporin and azathioprine. *J Nephrol*. 2000 May-Jun;13(3):185-92.
20. Cifkova R, Hallen H. Cyclosporin-induced hypertension. *J Hypertens*. 2001 Dec;19(12):2283-5.
21. Robert N, Wong GW, Wright JM. Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(1):CD007893.
22. Blick KE, Melouk SH, Fry HD, Gillum RL. A validation study of selected methods routinely used for measurement of cyclosporine. *Clin Chem*. 1990 Apr;36(4):670-4.
23. Grundmann M, Perinova I, Brozmanova H, Koristkova B, Safarcik K. Significant discrepancy in cyclosporin A post-dose concentrations when analyzed with specific RIA and HPLC method. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2010 Feb;48(2):87-92.
24. Akhlaghi F, Steel LA, Price C, Wallwork J, Trull A. Cyclosporine A (CyA) concentration at time 2 hours post dose correlates with rejection and renal function after lung transplantation (LTx). *Ther Drug Monit*. 2001;23(4):462.
25. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Dec;14(12):436-41.

26. Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Schottmann R, Thiesemann C, Strohmeyer S, et al. Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of kidney graft patients in relation to liver function. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;40(6):565-9.
27. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993 Dec 15;119(12):1198-208.
28. Brozmanova H, Grundmann M, Safarcik K, Jegorov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Nov 10;749(1):93-100.
29. Koristkova B, Grundmann M, Brozmanova H, Perinova I, Safarcik K. Validation of sparse sampling strategies to estimate cyclosporine A area under the concentration-time curve using either a specific radioimmunoassay or high-performance liquid chromatography method. *Ther Drug Monit.* 2010 Oct;32(5):586-93.
30. Amante AJ, Kahan BD. Abbreviated area-under-the-curve strategy for monitoring cyclosporine microemulsion therapy in immediate posttransplant period. *Clin Chem.* 1996 Aug;42(8 Pt 1):1294-6.
31. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Mar;32(3):210-58.
32. Brossat B, Straczek J, Heulin MH, Herbeuval X, Belleville F, Nabet P, et al. Liquid chromatographic determination of cyclosporin A in serum with use of a solid-phase extraction. Comparison between high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay levels in clinical investigations. *J Chromatogr.* 1987 Jan 23;413:141-50.
33. David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit.* 2001 Apr;23(2):100-14.
34. Dumont RJ, Ensom MH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2000 May;38(5):427-47.
35. Masri MA, Barbari A, Stephan A, Rizk S, Kilany H, Kamel G. Measurement of lymphocyte cyclosporine levels in transplant patients. *Transplant Proc.* 1998 Nov;30(7):3561-2.

36. Barbari AG, Masri MA, Stephan AG, Mourad N, El-Ghoul B, Kamel GS, et al. Cyclosporine lymphocyte maximum level: a new alternative for cyclosporine monitoring in kidney transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2005 Jun;3(1):293-300.
37. Barbari A, Stephan A, Masri MA, Kamel G, Karam A, Mourad N, et al. Mycophenolic acid plasma trough level: correlation with clinical outcome. *Exp Clin Transplant*. 2005 Dec;3(2):355-60.
38. Safarcik K, Komzakova I, Bartos V, Grundmann M. [Immunoanalytical methods of cyclosporine A determination]. *Ceska Slov Farm*. 2002 May;51(3):112-20.
39. Jindal RM, Pescovitz MD, Cummings OW, Book B, Lumeng L, Milgrom ML, et al. Persistence of cyclosporine after withdrawal of the drug in a patient with chronic liver transplant rejection. Role of the monoethylglycinexylidide test. *Transplantation*. 1996 Jun 15;61(11):1657-8.
40. Oka K, Hosoda K, Hirano T, Sakurai E, Kozaki M. Determination of cyclosporin A in the serum of kidney transplant patients by rapid-flow fractionation and normal-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1989 May 5;490(1):145-54.
41. Kohlhaw K, Wonigeit K, Schafer O, Ringe B, Bunzendahl H, Pichlmayr R. Association of very high blood levels of cyclosporin metabolites with clinical complications after liver transplantation. *Transplant Proc*. 1989 Feb;21(1 Pt 2):2232-3.
42. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, et al. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit*. 1995 Dec;17(6):642-54.
43. Shah AK, Sawchuk RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. *Clin Chem*. 1988 Jul;34(7):1467-71.
44. Svinarov DA, Dimova MN. Liquid chromatographic determination of cyclosporine-A in blood, with chromosorb P columns used for sample purification. *Journal of liquid chromatography*. 1991;14(9):1683-90.
45. Christians U, Schlitt HJ, Bleck JS, Schiebel HM, Kownatzki R, Maurer G, et al. Measurement of cyclosporine and 18 metabolites in blood, bile, and urine by high-performance liquid chromatography. *Transplant Proc*. 1988 Apr;20(2 Suppl 2):609-13.

46. Holt DW, Johnston A, Roberts NB, Tredger JM, Trull AK. Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force. *Ann Clin Biochem.* 1994 Sep;31 (Pt 5):420-46.
47. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Carlson IH. Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. 1: Purification of analytical standards and optimization of the assay. *Clin Chem.* 1987 Oct;33(10):1841-50.
48. Annesley T, Matz K, Balogh L, Clayton L, Giacherio D. Liquid-chromatographic analysis for cyclosporine with use of a microbore column and small sample volume. *Clin Chem.* 1986 Jul;32(7):1407-9.
49. Komzakova I, Brozmanova H, Safarcik K, Grundmann M. [Determination of cyclosporine A using high-performance liquid chromatography]. *Ceska Slov Farm.* 2002 May;51(3):107-11.
50. Koseki N, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AM4N and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(5):733-40.
51. Vidal C, Kirchner GI, Wunsch G, Sewing KF. Automated simultaneous quantification of the immunosuppressants 40-O-(2-hydroxyethyl) rapamycin and cyclosporine in blood with electrospray-mass spectrometric detection. *Clin Chem.* 1998 Jun;44(6 Pt 1):1275-82.
52. Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF, et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Oct 1;748(1):41-53.
53. Kirchner GI, Vidal C, Jacobsen W, Franzke A, Hallensleben K, Christians U, et al. Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Jan 22;721(2):285-94.
54. Deters M, Kirchner G, Resch K, Kaefer V. Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med.* 2002 Mar;40(3):285-92.

55. Seger C, Tentschert K, Stoggl W, Griesmacher A, Ramsay SL. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc.* 2009;4(4):526-34.
56. Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography--tandem mass-spectrometry. *Clin Biochem.* 2001 Jun;34(4):285-90.
57. Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Jun 15;805(2):215-22.
58. Taylor PJ, Jones CE, Martin PT, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Microscale high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998 Feb 13;705(2):289-94.
59. Whitman DA, Abbott V, Fregien K, Bowers LD. Recent advances in high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: detection of cyclosporine and metabolites in kidney and liver tissue. *Ther Drug Monit.* 1993 Dec;15(6):552-6.
60. Brozmanova H, Komzakova I, Grundmann M. Determination of cyclosporine A and primary metabolites in blood and lymphocytes by LC/MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2007;29(4):506.
61. Komzakova I, Grundmann M, Dedochova J, Marsalkova P, Martinek A, Brozmanova H. Comparison of blood and lymphocytes levels of cyclosporine A and its metabolites AM1, AM9 and AM4N in early phase after renal transplantation. *Ther Drug Monit.* 2007;29(4):531.
62. Grundmann M, Brozmanova H, Dedochova J, Komzakova I, Martinek A, Marsalkova P. Comparison of blood and lymphocytes levels of cyclosporine A and its metabolites AM1, AM9 and AM4N in stable renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2007;29(4):531.
63. Falck P, Guldseth H, Asberg A, Midtvedt K, Reubsæet JL. Determination of cyclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1-2):345-52.

64. Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clin Biochem.* 2008 Jul;41(10-11):910-3.
65. Halloran PF, Aprile MA, Farewell V, Ludwin D, Smith EK, Tsai SY, et al. Early function as the principal correlate of graft survival. A multivariate analysis of 200 cadaveric renal transplants treated with a protocol incorporating antilymphocyte globulin and cyclosporine. *Transplantation.* 1988 Aug;46(2):223-8.
66. Brozmanova H, Perinova I, Halvova P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients. *J Sep Sci.* 2010 Aug;33(15):2287-93.
67. Belitsky P, Levy GA, Johnston A. Neoral absorption profiling: an evolution in effectiveness. *Transplant Proc.* 2000 May;32(3A Suppl):45S-52S.
68. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999 Jul 15;68(1):55-62.
69. Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, et al. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2010 Nov;42(9):3574-7.
70. Peřinová I, Brozmanová H, Halvová P, Grundmann M. Možnosti stanovení cyklosporionu A v terapeutickém monitorování léčiv. *Klin Farmakol Farm.* 2010;24(2):93-7.
71. Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation.* 2002 May 15;73(9 Suppl):S12-8.
72. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther.* 2002 Mar;24(3):330-50; discussion 29.
73. Johnston A, Chusney G, Schutz E, Oellerich M, Lee TD, Holt DW. Monitoring cyclosporin in blood: between-assay differences at trough and 2 hours post-dose (C2). *Ther Drug Monit.* 2003 Apr;25(2):167-73.

74. Karamperis N, Koefoed-Nielsen PB, Brahe P, Hojskov C, Egfjord M, Poulsen JH, et al. Correlations between calcineurin phosphatase inhibition and cyclosporine metabolites concentrations in kidney transplant recipients: implications for immunoassays. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006 Jun;98(6):569-74.
75. Cattaneo D, Zenoni S, Murgia S, Merlini S, Baldelli S, Perico N, et al. Comparison of different cyclosporine immunoassays to monitor C0 and C2 blood levels from kidney transplant recipients: not simply overestimation. *Clin Chim Acta*. 2005 May;355(1-2):153-64.
76. Boletis J, Balitsari A, Filiopoulos V, Stamataki E, Lionaki S, Zavos G, et al. Delayed renal graft function: the influence of immunosuppression. *Transplant Proc*. 2005 Jun;37(5):2054-9.
77. Marcen R, Fernandez-Rodriguez A, Rodriguez-Mendiola N, Ponte B, Galeano C, Villafruela JJ, et al. Evolution of rejection rates and kidney graft survival: a historical analysis. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug;41(6):2357-9.
78. Kamar N, Garrigue V, Karras A, Mourad G, Lefrancois N, Charpentier B, et al. Impact of early or delayed cyclosporine on delayed graft function in renal transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Am J Transplant*. 2006 May;6(5 Pt 1):1042-8.
79. Wang CP, Burckart GJ, Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Schwinghammer T, Hakala T, et al. Cyclosporine metabolite concentrations in the blood of liver, heart, kidney, and bone marrow transplant patients. *Transplant Proc*. 1988 Apr;20(2 Suppl 2):591-6.
80. Mahalati K, Belitsky P, West K, Kiberd B, Fraser A, Sketris I, et al. Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Apr;12(4):828-33.
81. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther*. 1993 Feb-Mar;57(2-3):291-345.
82. Copeland KR, Thliveris JA, Yatscoff RW. Toxicity of cyclosporine metabolites. *Ther Drug Monit*. 1990 Nov;12(6):525-32.
83. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013 Jul;34(28):2159-219.

84. White WB. Circadian variation of blood pressure: clinical relevance and implications for cardiovascular chronotherapeutics. *Blood Press Monit.* 1997 Dec;2(1):47-51.
85. Filipovsky J, Widimsky J, Jr., Ceral J, Cifkova R, Horky K, Linhart A, et al. [Diagnosis and treatment of arterial hypertension. 2012 Guidelines of the Czech Hypertension Society]. *Vnitr Lek.* 2012 Oct;58(10):785-801.
86. Crespo-Leiro MG. Arterial hypertension. *Transplant Proc.* 2002 Feb;34(1):127-9.
87. Vitko S, Viklicky O. Cyclosporine renal dysfunction. *Transplant Proc.* 2004 Mar;36(2 Suppl):243S-7S.
88. Westall GP, Mifsud NA, Kotsimbos T. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant.* 2008 Aug;8(8):1749-54.
89. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis.* 2007 Jun;9(2):165-70.
90. Lim JB, Kwon OH, Kim HS, Kim HO, Choi JR, Provenzano M, et al. Adoptive immunotherapy for cytomegalovirus (CMV) disease in immunocompromised patients. *Yonsei Med J.* 2004 Jun 30;45 Suppl:18-22.
91. Huissoon AP, Davies G, Cox RA, Sloper CML, Thomson BJ, Robins RA. Loss of cytomegalovirus-specific immunological memory in a patient with thymoma. *Clin Exp Immunol.* 2002 Aug;129(2):297-301.
92. Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol.* 2002 Aug;25 Suppl 2:S123-36.

10. Publikované práce, které jsou součástí dizertační práce

- 10.1 Maršálková P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv I.. *Klin Farmakol Farm* 2009; 23(3): 138-141
- 10.2 Halvová P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv II.. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(1): 51-56
- 10.3 Peřinová I, Brozmanová H, Halvová P, Grundmann M. Možnosti stanovení cyklosporinu A v terapeutickém monitorování léků. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(2): 93-97
- 10.4 Brozmanová H, Perinová I, Halvová P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients. *J Sep Sci.* 2010 Aug;33(15):2287-93. doi: 10.1002/jssc.201000185; IF=2,631
- 10.5 Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, Dedochova J, Martinek A, Brozmanova H, Grundmann M. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2010 Nov;42(9):3574-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.101.
Erratum in: *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2838. Grundmann, M [added]; IF=0,993
- 10.6 Halvová P, Kacířová I, Brozmanová H, Grundmann M. Vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. *Klin Farmakol Farm* – přijato k tisku

10.1 Maršálová P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv I. *Klin Farmakol Farm* 2009; 23(3): 138-141

Dostupná imunosupresiva jsou užívána v transplantaci orgánů, u autoimunitních onemocnění, astma bronchiale, revmatoidní artritidy a v mnoha dalších indikacích. Zástupci skupiny imunosupresiv mají relativně úzké terapeutické rozmezí a významnou toxicitu závislou na podané dávce. Tento přehledový článek je věnován farmakodynamice, biotransformaci, lékovým interakcím a nežádoucím účinkům kortikoidů, inhibitorů a analogů DNA bází, monoklonálních a polyklonálních protilátek.

Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv I.

Petra Maršáková, Milan Grundmann

Ústav klinické farmakologie, Fakultní nemocnice Ostrava a Fakulta zdravotnických studií, Ostravská univerzita, Ostrava

Dostupná imunosupresiva jsou užívána v transplantaci orgánů, u autoimunitních onemocnění, astma bronchiale, revmatoidní artritidy a v mnoha dalších indikacích. Zástupci skupiny imunosupresiv mají relativně úzké terapeutické rozmezí a významnou toxicitu závislou na podané dávce. Tento přehledový článek je věnován farmakodynamice, biotransformaci, lékovým interakcím a nežádoucím účinkům kortikoidů, inhibitorů a analogů DNA bází, monoklonálních a polyklonálních protilátek.

Klíčová slova: imunosupresiva, kortikoidy, polyklonální protilátky, monoklonální protilátky.

Pharmacokinetics and clinical applications of selected immunosuppressants I.

The currently available immunosuppressive agents have been used for the management of patient with a wide range of medicinal issues, such as organ transplantation, autoimmune diseases, asthma, and rheumatoid arthritis, among others. All of the agents have relatively narrow therapeutic ranges with significant dose-limiting toxicities. This review discusses pharmacodynamic properties, biotransformation, drug interactions, and side effects of corticoids, inhibitors and analogues of DNA bases, polyclonal and monoclonal antibodies.

Key words: immunosuppressive agents, corticoids, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies.

Klin Farmakol Farm 2009; 23(3): 138–141

Imunosupresiva jsou chemicky různorodé látky, které působí v různých stupních imunitní reakce. Hlavní uplatnění nacházejí imunosupresivní léčiva v transplantologii, některá současně dostupná imunosupresiva byla vyvinuta k použití při autoimunitních chorobách a závažných projevech alergie. Další využití je v hematonekologii a v kardiologii, monoklonální protilátky jsou používány v diagnostice. Některá imunosupresiva vyvolávají imunodepleci efektorových buněk, zatímco jiná jsou převážně imunomodulátory, které ovlivňují aktivitu buněk obvykle pomocí inhibice cytokinů. Některá léčiva mají nespecifický účinek na imunitní systém, zatímco jiná působí na specifické cíle. Léčiva s nespecifickým účinkem daleko častěji způsobují závažné nežádoucí účinky. Farmakologický účinek specificky působících léčiv může být snížen, pokud je cíl jejich účinku objevit alternativní cestou.

Kortikoidy

Kortikoidy jsou stále součástí většiny imunosupresivních protokolů a jsou používány i jako léčba první linie při rejekci štěpu. Dalšími indikacemi jsou revmatoidní a kolagenní onemocnění. K prevenci rejekce štěpu jsou využívány zejména prednison a prednisolon (1, 2).

Mechanismus účinku: Kortikosteroidy mají rozmanité protizánětlivé a imunomodulační účinky. Ty zahrnují stabilizaci lysosomálních membrán, útlum syntézy prostaglandinů, snížení uvolňování histaminu a bradykininu a snížení ka-

pilární permeability. Kortikoidy prostupují do cytoplazmy a váží se na glukokortikoidní receptory. Doposud byly identifikovány dva subtypy glukokortikoidního receptoru (GR), GR α a GR β . Subtyp GR α je popisován ve všech tkáních a reprezentuje klasické účinky endogenně vyplavených či exogenně podaných glukokortikoidů. Subtyp GR β se vyskytuje bez výraznější tkáňové specifity, na rozdíl od GR α neváže endogenní ani exogenní glukokortikoidy, vazbou transkripčních faktorů uvolněných při aktivaci GR α se podílí na modulaci aktivity GR α , aktivitu GR α zpětnovazebně inhibuje. V nepřítomnosti ligandu je GR popisován v inaktivním stavu v multi-proteinovém komplexu v cytoplasmě buňky. V cytoplasmě je GR vázán na dvě molekuly HSP 90 (heat shock protein) a jednu molekulu HSP 70 a několik dalších složek proteinové struktury, které udržují GR v inaktivním stavu. Po navázání ligandu dochází k alosterické modifikaci vazebných míst GR a k odštěpení molekul rodiny HSP a zbývajících inaktivizačních proteinových složek. Takto modifikovaný komplex GR s ligandem

podléhá již v cytoplasmě dimerizaci za vzniku stabilních homodimerů GR/GR, které jsou transportovány do buněčného jádra. Vzniklé homodimery jsou schopny vazby se specifickým místem ve struktuře DNA, mechanismus dimerizace není doposud přesně znám. Homodimery GR/GR se vážou na specifické vazebné místo pro glukokortikoidy označované jako GRE a mohou aktivovat negativní GRE promotor (nGRE) nebo pozitivní GRE promotor (pGRE). Vazba homodimeru na nGRE ústí v inhibici genové transkripce, zatímco vazba na pGRE místo vede k indukci genové transkripce, zahrnující transkripci genů rodiny jaderných aktivačních faktorů (NFAT – nuclear factor of activated T cells). Tyto geny jsou důležité v aktivaci transkripce a produkce rozličných prozánětlivých cytokinů a výsledkem je pokles zánětlivé odpovědi díky snížené produkci cytokinů, zahrnujících interleukiny IL-1, IL-2, IL-6, Interferon- γ (INF- γ), a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α). Kortikoidy také oslabují funkci monocytů/makrofágů a snižují počet cirkulujících CD4+ T-lymfocytů (3).

Tabulka 1. Farmakokinetické parametry kortikoidů ($t_{1/2}$, poločas eliminace; Cl, clearance; V_d , distribuční objem; fu vazba na plazmatické proteiny; F, absolutní biologická dostupnost po perorálním podání)

Farmakokinetika	$t_{1/2}$ [hod]	Cl [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f, [%]	F [%]
prednison prednisolon	1,7–4,1	10	2,2	podle dávky	98
metylprednisolon	1,9–6	4–8	1,2–1,5	40–60	99 při i.v. aplikaci 80 per os
dexametazon	3–4	2,8–3,5	0,8–1,0	70	50–80

Prednison a prednisolon jsou syntetické deriváty kortizolu, prednison je podáván jako pro-léčivo, které je biotransformováno v játrech za vzniku aktivního metabolitu prednisolonu. Vzhledem k tomu, že všechny tři látky jsou velmi staré a v terapii jsou déle než byl plně objasněn biotransformační systém cytochromu P450, jejich biotransformace není přesně popsána a stále je zde řada otázek. Endogenní i exogenní kortikoidy jsou biotransformovány P450 3A4 za vzniku příslušných β -hydroxymetabolitů. V nezměněné formě se do moči vyloučí 34% prednisonu a prednisolonu, přibližně 10% metylprednisonu a 8% dexametazonu. Prednison a prednisolon mohou být odstraněny hemodialýzou, protože jejich vazba na proteiny je závislá na dávce. Nicméně dialýzou eliminované množství není tak velké, aby vyžadovalo úpravu dávkování. U pacientů s cirhózou je clearance nevázané frakce snížena na 2/3 normálu a mělo by se s tím počítat při dávkování. Při hypertyreoidismu jsou hladiny celkové a nevázané frakce sníženy na polovinu normálu a k dosažení terapeutických hladin je nutné podávání vyšších dávek.

Nežádoucí účinky: Vedlejších účinků léčby steroidy je celá řada a jsou dobře známé. Běžné rané nežádoucí účinky jsou pocit, chraptavý hlas, poruchy spánku nebo zvýšení chuti k jídlu (1). Metabolické účinky zahrnují redistribuci tuku z periferních oblastí vedoucí k centrální obezitě, a snížení podílu bílkovin v kosterních svalích vedoucí k tělesné slabosti. Zadržování tekutin je následek mineralokortikoidního účinku s hypokalemii a hypertenzí. Z uváděných látek mají mineralokortikoidní účinek prednison a prednisolon, u metylprednisonu a dexametazonu je uváděn minimální nebo žádný mineralokortikoidní účinek. Největší dlouhodobé terapie steroidy vede k útlumu funkce nadledvinek a příp. atrofií nadledvinek. Psychózy, katarakty a glaukomy, peptické vředy, strle a purpura bříšní stěny, nevaskulární nekróza hlavičky stehenní kosti a osteoporóza, případně zhoršení hojení zranění jsou další časté problémy (1, 2). Kortikoidy jsou hlavní částí většiny imunosupresivních protokolů jak v počáteční fázi, tak ve fázi udržovací. Ve vysokých intravenózních pulzních dávkách (250–1 000 mg metylprednisolonu denně po dobu 1–3 dny) jsou glukokortikoidy lymfocytotoxické. V menších dávkách mají imunosupresivní a protizánětlivý účinek omezením produkce cytokinů. Používané dávky a délka trvání léčby jsou proto závislé na typu onemocnění. Některá onemocnění, např. astma odpovídají na krátkou léčbu, která může být náhle ukončena, ale většina revmatických onemocnění vyžaduje velmi

pomalé snižování dávek v průběhu měsíců. Při náhlém ukončení je nejen riziko relapsu nemoci, ale také hypoadrenokortikoidismus. V ukončovací fázi je běžná polyartralgie a myalgie, která však reaguje na užítí malé dávky následované obnovením pomalejším snižováním dávek (1). Dávky používané v imunosupresivní terapii jsou vyšší než při substituční léčbě.

Inhibitory a analoga DNA bází

Azatioprin

Mechanismus účinku: Azatioprin je biotransformován na 6-merkaptopurin (6-MP) redukcí glutathionem a poté je konvertován na kyselinu 6-thiomočovou, 6-metylmerkaptopurin a 6-thioguanin (6-TG). Tyto látky jsou inkorporovány do DNA a zastavují replikaci, blokuje také metabolickou cestu *de novo* purinové syntézy tvorbou kyseliny thioinosinové. Tento pozdější účinek propůjčuje specifitu působení na T-lymfocyty, které nedísej alternativní cestou syntézy purinů (20). Současně poznatky naznačují, že azatioprin interferuje se stimulací CD28 aloreaktivních T-lymfocytů. Signálizace CD28 receptoru je mediována fosfatázami jako je GTP-áza Rac1. Jeden z metabolických produktů azatioprinu, 6-TG, vede k tvorbě 6-thioguanin trifosfátu (6-thioGTP), který se váže na GTP-ázu Rac1 v místě GTP. Blokáda Rac1 mění stimulační signál CD28 na signál apoptózy, čímž ničí aktivované T-lymfocyty (2).

Ve farmakokinetice těchto látek je významná inter- a intraindividuální variabilita. I přes to

je azatioprin obvykle dávkován podle tělesné hmotnosti. Azathioprin je do organismu podáván jako pro-léčivo a je následně bioaktivován, děje se tak v játrech enzymem glutathion-S-transferázou (GST) (21). Genetický polymorfismus byl prokázán u tří forem GST, byl prokázán u μ GST (μ GST1, μ GST3), τ GST (τ GST1) a π GST (π GST1). Formy μ GST1 (39–62% kavkazské populace) a τ GST1 (10–21% kavkazské populace) mají značně redukovanou metabolickou aktivitu, případně nejsou schopny biotransformovat vůbec. Dalším enzymem, který je polymorfní a podílí se na biotransformaci azathioprinu je thioipurin-S-metyltransferáza (TPMT). Aktivita TPMT je monitorována na základě měření aktivity v erythrocytech, aktivita enzymu v játrech, ledvinách a lymfocytech koreluje s aktivitou v erythrocytech. Více než 90% kavkazské populace má zvýšenou aktivitu TPMT, 9% kavkazské populace vykazuje nezměněnou biotransformační aktivitu a méně než 1% jedinců má sníženou aktivitu tohoto enzymu. U jedinců se sníženou aktivitou TPMT byly popsány dvě mutanční alely TPMT*2 a TPMT*3. Jejich aktivita může být až 400krát nižší než u zdravého jedince. Mutanční alela TPMT*3 je v populaci zastoupena až u 70% jedinců, u kterých je mutace TPMT popsána. Dalším enzymem podílejícím se na biotransformaci léčiva je xantinoxidáza. Její inhibice allopurinolem vede k inhibici oxidace a následně kumulaci azathioprinu s následným rozvojem nežádoucích účinků.

Vedlejší účinky: Významný vedlejší účinek je na dávce závislá suprese kostní dřeně, kte-

Tabulka 2. Interakce kortikoidů (AUC, plocha pod koncentrační křivkou léčiva)

Zvýšení hladin			
ostatní léčiva	ketokonazol	↑ AUC o 50%	(3, 4)
	erytromycin	prodloužení $t_{1/2}$ o 28–61 % ↓ CI o 47%	(5)
Snížení hladin			
antiepileptika	fenobarbital	↑ hladiny β -OH kortizonu o 105 % ↑ CI o 150–200%	(6, 7, 8, 9)
	fenytoin	↑ CI 4–20krát	(10, 11, 12, 13)
	karbamazepin	↑ CI dexametazonu o 80%	(9)
ostatní léčiva	nifampicin	↑ hladiny β -OH kortizonu o 268–410%	(14, 15, 8)
	ritonavir	↑ CI o 30%	(16)
	perorální kontraceptiva	↑ CI o 30%	(17, 18)
	antacida	↓ F dexametazonu až o 75 %, prednisonu a prednisolonu o 35–40%	(18, 19)

Tabulka 3. Farmakokinetické parametry azathioprinu a merkaptopurinu

Farmakokinetika	$t_{1/2}$ [hod]	CI [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f_e [%]	F [%]
azathioprin/ merkaptopurin*	1–2*	11*	0,55*	20*	60, 12*

růžná vzniká náhle a je reverzibilní, leukopenie, trombocytopenie a megaloblastická anémie, zvýšené riziko rozvoje infekčního onemocnění a vyšší výskyt malignit, zejména hematologických a lymforetikulárního systému (20). Dalšími nežádoucími účinky mohou být poškození jater a cholestatická žloutenka. Byla také popsána jaterní veno-okluzní choroba. Navíc bylo popsáno množství hypersenzitivních reakcí, obvykle se manifestujících jako rush (2).

Proteiny

Počáteční imunosuprese v období transplantace je tradičně označována jako indukční, kdy jsou používány antilymfocytární protilátky nebo neindukční, kdy pacient dostává jen kortikosteroidy, kalcineurinové inhibitory a azathioprin nebo MMF (mykofenolát).

Polyklonální protilátky

Původ: Polyklonální protilátky (ATG, ALS a ALG) připravené naočkováním králíků nebo koní lidskými lymfocyty nebo thymocyty jsou stále široce používány u transplantace orgánů. Předčistěná IgG frakce obsahuje protilátky proti mnoha různým povrchovým molekulám, které jsou přítomny na povrchu na T lymfocytech, B buňkách, NK buňkách a makrofáziích (2).

Mechanismus účinku: Podání antilymfocytových polyklonálních protilátek vyústí v rychlou a těžkou lymfopenii u většiny pacientů, pravděpodobně díky lýze buněk zprostředkované komplemtem a vychytávání opsonizovaných T buněk retikuloendotelálním systémem. Navíc mimo deplece mohou polyklonální protilátky získaně reagovat s TCR (T-cell receptor – receptor T buněk) a způsobovat částečnou aktivaci T buněk a blokádu proliferace T buněk (22).

Vedlejší účinky: Takzvaná reakce první dávky se vyskytuje až u 80% pacientů a může být vyvolána přítomností xenogenních proteinů nebo počáteční aktivací T buněk následovanou obsazením receptorů buněčného povrchu a uvolněním cytokinů (22). Nejběžnější reakcí je horečnatý záchvat, který je vidět méně často po následující infuzi a je považován za výsledek uvolnění pyrogenů po úvodní velké lýze lymfocytů. Ostatní reakce zahrnují kožní vyrážku, pruritus, trombocytopenii a vzácně anafylaktický šok. K minimalizaci těchto reakcí je 30–60 min před začátkem terapie protilátkami rutinně podávána kombinace steroidů, antihistaminik a paracetamolu (2).

Monoklonální protilátky

Původ: Ve srovnání s polyklonálními protilátkami mají monoklonální protilátky (mAbs)

jednotlivě dobře definovanou specifitu, jsou více standardizované a neobsahují vedlejší proteiny. Novější mAbs jsou navrženy, aby snižovaly riziko stimulace odpovědi na lidské protimysí protilátky, tato stimulace může být omezující faktor účinnosti mAb terapie a znemožnit opakované podání. Humanizované mAbs jsou navrženy tak, že jen doplňkové determinantové oblasti (CDR) na myších protilátkách jsou naočkované na parentní lidskou IgG molekulu, zatímco chimerické mAbs zahrnují variabilní myš oblasti naočkované na lidský IgG konstantní podíl. Většina mAbs jsou IgG, s různými izotypy s různými propůjčenými vlastnostmi (2).

Mechanismus účinku: mAbs se váží na epitopy na buněčném povrchu, které mohou spustit řadu mechanismů. mAbs, jako alemtuzumab, fixují komplement a ničí cílové buňky, odstraňující je z cirkulace. Jiné mAbs upravují (odstraňují) cílovou molekulu z buněčného povrchu buď uvolňováním antigenů nebo internalizací. Modulační nebo fyzikální (fyzické) blokování epitopu může předcházet navázání molekul na buněčný povrch, molekul, které jsou zahrnuty v signalizaci, stejně jako CD28 antigen (2).

Nomenklatura monoklonálních protilátek:

Koncovka

- ximab – chimerické protilátky (např. rituximab)
- zumab – humanizované protilátky (např. alemtuzumab)
- umab – plně humánní protilátky (např. adalimumab)
- cept – produkt fúze solubilního receptoru a Ig (např. etanercept)

Muromonab-CD3 (OKT3): Muromonab-CD3 je nekonstruovaná mAb, která zasahuje CD3 molekulu na T-buňkách. CD3 komplex je nezbytný pro přenos intracelulárních signálů, které vyplývají ze spojení TCR s antigenem. V průběhu minut po podání OKT3 dojde k těžké lymfodepleci masivní lýzou T buněk. Po 3–5 dnech jsou T-lymfocyty detekovatelné v cirkulaci, ale nemají na povrchu CD3 a jsou proto imunologicky inkompetentní (2). Když se OKT3 zpočátku naváže na CD3, dojde k aktivaci T-buněk, lýze buněk a masivnímu uvolnění cytokinů, známé jako syndrom uvolnění cytokinů (1, 23). Ten je charakterizován uvolněním několika cytokinů, hlavně TNF- α a zadržením neutrofilů v plicích, což vede k plicnímu edému a akutnímu respiračnímu selhání a vzácněji k trombóze graftu a aseptické meningitidě. Ke snížení těchto účinků jsou před podáním OKT3 rutinně podávány steroidy a antihistaminika (2). Muromonab se používá

k prevenci nebo k léčbě akutní rejekce transplantovaného orgánu (1). Klinicky je muromonab-CD3 používán jak k indukci imunosuprese, tak pro léčbu steroidy rezistentní rejekce, k přerušení rejekce u 75–86% příjemců (2).

CD25 monoklonální protilátky: CD25 je α -řetězec IL-2 receptoru (IL-2R α), běžně se vyskytující jen na aktivovaných T-buňkách. Dvě CD25 mAbs byly schváleny pro klinické užívání, basiliximab a daclizumab. Jednou podané protilátky zůstávají v oběhu několik týdnů, délka závisí na ostatní užívané imunosupresivní terapii. S prednisolonom a cyklosporinem zůstávají saturační koncentrace na receptoru asi okolo 7 týdnů; při přidavku azatioprinu a MMF se prodlužuje doba působení (na 50, resp. 59 dnů). Anti-CD25 mAbs nespouštějí silnou protiglobulinovou odpověď, ačkoliv jsou popsány občasné anafylaktické reakce. Na rozdíl od muromonabu-CD3 nevyvolávají basiliximab a daclizumab reakci první dávky a mají velmi málo vedlejších účinků odpovídajících protilátkám (2).

Tyto látky jsou využívány jako indukční látky při transplantacích, kdy výrazně snižují míru akutní rejekce. U autoimunitních chorob zatím nejsou významně využívány (1, 2).

Rituximab: Chimerická lidská/myší protilátka s vazbou na CD20 B-lymfocytů a maligních B-lymfocytů (24). Rituximab snižuje produkci IgG a je schválen k použití proti B-buněčným lymfomům, ale byly publikovány neoficiální zprávy o jeho účinnosti u 29 různých autoimunitních chorob. Prohájí randomizované kontrolované studie u systémového lupusu erytematodes, revmatoidní artritidy, dermatomyozitidy, ANCA – (antineutrophil cytoplasmic antibody) pozitivní vaskulitidy a při transplantacích ledvin u vysoce senzitivizovaných pacientů (1). U B-buněčných lymfomů vyvolává rituximab lýzu zprostředkovanou komplemtem, indukuje apoptózu. Další využití je v terapii revmatoidní artritidy u pacientů, u kterých selhala léčba minimálně jedním z anti-TNF- α přípravků.

Alemtuzumab: Nová monoklonální protilátka, alemtuzumab, je namířena proti povrchové molekule (CD52), která je široce rozšířena na lymfocytech, makrofáziích a dendritických buňkách, kde způsobuje vážnou a dlouhotrvající depleci těchto buněčných linií. Výsledkem je zvýšené riziko výskytu závažných infekcí (1). Je indikován k léčbě chronické B-lymfatické leukemie a nově k léčbě relabující sclerosis multiplex (24).

Anti-TNF protilátky: První protilátkou této skupiny byl infliximab, což je chimerická protilátka (obsahuje 75% lidského proteinu a 25% myšího proteinu), poté následoval adalimumab, což je

plně humánní protilátka. Tyto protilátky se přímo váží na TNF. Další možnou cestou blokády TNF je neutralizace solubilním receptorem – etanerceptem. Etanercept obsahuje dvě extracelulární domény TNF receptoru (TNF-p75) připojené na Fc část lidského IgG1. Infliximab se používá k léčbě revmatoidní artritidy, ankylozující spondylitidy a Crohnovy choroby. K léčbě revmatoidní artritidy se používá i adalimumab a etanercept, který má navíc efekt i u ankylozující spondylitidy.

Jednotlivé preparáty mají různý biologický poločas. Nejkratší je u etanerceptu (4 dny), následuje infliximab (8–10 dnů) a nejdelší poločas má adalimumab (10–20 dnů).

Mezi nežádoucí účinky pak patří zvýšený výskyt infekce, sepse a malignit, zejména lymfomů. Výskyt infekce je kontraindikací pro podání těchto protilátek, proto je třeba výskyt infekce včetně tuberkulózy monitorovat a doporučuje se provést před zahájením léčby screeningové vyšetření na tuberkulózu (25, 26).

Intravenózní imunoglobuliny: Intravenózní imunoglobuliny byly představeny k obnovení imunokompetence u pacientů se syndromem získané imunodeficiency (AIDS). Paradoxně objev jejich schopnosti inhibovat produkci a vazbu auto- a aloprotilátek znamená, že jsou nyní široce využívány jako imunomodulační léky v léčbě oslabujících autoimunitních chorob a v léčbě protilátkami zprostředkované reakce graftu. Fakt, že imunoglobuliny také poskytují pasivní imunitu znamená, že jsou považovány za látky mající nižší riziko infekčních komplikací ve srovnání s ostatními imunosupresivy (1).

Protilátky k CD40/CD40 ligandu byly představeny nedávno k indukci dlouhodobého přežití štěpu s inhibicí Th1 cytokinů, INF- γ , IL-2 a IL-12 a k upregulaci Th2 cytokinů IL-4 a IL-10. Reakce štěpu může být posléze snížena blokadou B7/CD28 kostimulační cesty s „fusion“ proteinem CTLA-4lg. Dostupnost takových účinných a různorodých látek umožňuje vyvinout mnohalekové režimy, které mohou utlumit imunitní systém

v různých krocích aktivační kaskády. Je také jasné, že imunosuprese bez vedlejších účinků je nemožný úkol přinejmenším v současné době. Základním úkolem by měl být rozvoj prostředků k dosažení tolerance vůči transplantátu, který je nejlepší imunosupresí (20).

Pokračování přehledu imunosupresiv vyjde v příštím čísle.

Tato práce je podporována grantem IGA TA/8655-5

Literatura

1. Trevilian P. The CAPS guidelines. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: therapeutic drug monitoring. *Nephrology (Carlton)* 2007; 12 Suppl 1: S57–S65.
2. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1): 23–46.
3. Legler UF, Benet LZ. Marked alterations in dose-dependent prednisolone kinetics in women taking oral contraceptives. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39(4): 425–429.
4. Kozower M, Veitch I, Kaplan MM. Decreased clearance of prednisolone, a factor in the development of corticosteroid side effects. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38(3): 407–412.
5. LaForca CF, Szeffer SJ, Miller MF, Ebling W, Brenner M. Inhibition of methylprednisolone elimination in the presence of erythromycin therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72(1): 34–39.
6. God C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Borles P, Michel H, Seauve P, Maurel R. The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P4503A induction. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28(4): 373–387.
7. Brooks PM, Buchanan WW, Grove M, Downie WW. Effects of enzyme induction on metabolism of prednisolone. Clinical and laboratory study. *Ann Rheum Dis* 1986; 35(4): 339–343.
8. Ohnhaus EE, Park BK. Measurement of urinary 6-beta-hydroxycortisol excretion as an in vivo parameter in the clinical assessment of the microsomal enzyme-inducing capacity of antipyrine, phenobarbital and rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 15(2): 139–145.
9. Bartosik M, Brenner AM, Szeffer SJ. Prednisolone and methylprednisolone kinetics in children receiving anticonvulsant therapy. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 42(4): 424–432.
10. Petrait LB, Melke AW. Effectiveness of prednisolone during phenytoin therapy. *Clin Pharmacol Ther* 1977; 22(6): 912–916.
11. Choi Y, Thrasher K, Werk EE Jr, Shollon LJ, Ollinger C. Effect of diphenhydantoin on cortisol kinetics in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 176(1): 27–34.

12. Werk EE Jr, Macgee J, Shollon LJ. Effect of diphenhydantoin on cortisol metabolism in man. *J Clin Invest* 1964; 43: 1824–1835.
13. Christy NF, Hofmann AD. Effects of diphenhydantoin upon adrenal cortical function in man. *Neurology* 1959; 9(6): 345–348.
14. Bullington GA, Dominguez JH, Piring WF, Hebert LA, Kaufman HM Jr, Lemann J Jr. Interaction of rifampin and glucocorticoids. Adverse effect on renal allograft function. *Jama* 1976; 236(17): 1958–1960.
15. Handricka W, McEneaney J, Pickup M, Lowe J. Rifampicin-induced non-responsiveness to corticosteroid treatment in nephrotic syndrome. *Br Med J* 1979; 1(6559): 306.
16. Perzak SR, Formentini E, Alfaro RM, Long M, Natarajan V, Kovacs J. Prednisolone pharmacokinetics in the presence and absence of rifampin after oral prednisone administration to healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(5): 573–580.
17. Bookenoogen SJ, Szeffer SJ, Jusko WJ. Prednisolone disposition and protein binding in oral contraceptive users. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56(4): 702–709.
18. Naggar VF, Khalil SA, Gouda MW. Effect of concomitant administration of magnesium trisilicate on GI absorption of dexamethasone in humans. *J Pharm Sci* 1978; 67(7): 1029–1030.
19. Urbe M, Casan C, Rojas S, Sierra JG, Go VL. Decreased bioavailability of prednisone due to antacids in patients with chronic active liver disease and in healthy volunteers. *Gastroenterology* 1981; 80(4): 661–665.
20. Mazur MA. The mosaic of immunosuppressive drugs. *Mol Immunol* 2003; 39(17–18): 1073–1077.
21. Hotsara N, Watanabe A. Impaired metabolism of azathioprine in carbon tetrachloride-injured rats. *Hepatology* 1981; 28(4): 192–194.
22. Merton RM, Howell T, Bromberg JS. Partial T-cell activation and energy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplant* 1998; 65(11): 11481–11489.
23. Hong JC, Kahan BD. Immunosuppressive agents in organ transplantation. *Semin Nephrol* 2000; 20(2): 108–125.
24. Rommer PS, Slovic O, Goertsches R, Mix E, Zettl UK. Monoclonal antibodies in the therapy of multiple sclerosis, an overview. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 6: 28–35.
25. Suchý D, Koružáková I, Grundmann M. Základní charakteristiky vybraných imunosupresiv. *Klin Farmakol Farm* 2004; 18: 90–95.
26. Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patient with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Res Ther* 2009; 11 Suppl 11.

Mgr. Petra Marsálková

*Ústav klinické farmakologie
Fakultní nemocnice Olomouc
17. listopadu 1790, 708 52 Olomouc-Portuba
petra.marsalkova@fnop.cz*

10.2 Halvová P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv II.. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(1): 51-56

Tento přehled se věnuje popisu farmakokinetických a farmakodynamických vlastností a indikací kalcineurinových inhibitorů (cyklosporinu A a takrolimu), mTOR inhibitorů (sirolimu a everolimu), mykofenolátu, cyklofosfamidu a metotrexátu.

Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv II

Petra Halvová, Milan Grundmann

Ústav klinické farmakologie, FN a FZS Ostrava

Ostravská univerzita, Ostrava

Dostupná imunosupresiva jsou užívána u transplantací orgánů, u autoimunitních onemocnění, astma bronchiální, revmatoidní artritidy a v mnoha dalších indikacích. Zástupci skupiny imunosupresiv mají relativně úzké terapeutické rozmezí a významnou toxicitu závislou na podané dávce. Tento přehledový článek je věnován farmakodynamice, biotransformaci, lékovým interakcím a nežádoucím účinkům kalcineurinových inhibitorů, mTOR inhibitorů, mykofenolátu, cyklofosfamidu a metotrexátu.

Klíčová slova: imunosupresiva, kalcineurinové inhibitory, mTOR inhibitory, mykofenolát.

Pharmacokinetics and clinical applications of selected immunosuppressants II

The currently available immunosuppressive agents have been used for the management of patient with a wide range of medical issues, such as organ transplantation, autoimmune diseases, asthma, and rheumatoid arthritis, among others. All of the agents have relatively narrow therapeutic ranges with significant dose-limiting toxicities. This review discusses pharmacodynamic properties, biotransformation, drug interactions, and side effects of calcineurin inhibitors, mTOR inhibitors, mycophenolat, cyclophosphamide, and methotrexate.

Key words: immunosuppressive agents, calcineurin inhibitors, mTOR inhibitors, mycophenolat.

Imunosupresiva jsou chemicky různorodé látky, které působí v různých stupních imunitní reakce (1). V předchozím článku (1) jsme se blíže věnovali farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem kortikoidů, inhibitorů a analogů DNA bází, monoklonálních a polyklonálních protilátek. Nyní bychom rádi dokončili přehled používaných imunosupresiv se zaměřením na kalcineurinové inhibitory, mTOR inhibitory, mykofenolát, cyklofosfamid a metotrexát.

1. Malé molekuly

Malé molekuly imunosupresiv zahrnují kalcineurinové inhibitory (CNI) jako cyklosporin a takrolimus a antiproliferativní látky jako sirolimus a everolimus.

1.1. Kalcineurinové inhibitory

Od 80ých let kalcineurinové inhibitory významně přispívají k úspěchu při orgánových transplantacích, zejména u transplantací ledvin. Kalcineurinové inhibitory mají prokazatelnou roli při prevenci akutní buněčné rejekce transplantovaných orgánů, při psoriáze a u nefrotického syndromu. Jsou také užívány u mnoha autoimunitních chorob, například cyklosporin A je používán jako lék II–III. linie ve farmakoterapii revmatoidní artritidy, psoriatické artopatie nebo lupusové nefritidy. Zatímco jsou výhodné k udržení autoimunitních chorob v remisi, jejich vysazení vede často k relapsu (2). Při transplantaci orgánů

jsou lepší výsledky při kombinaci kalcineurinových inhibitorů s mykofenolátem a prednisonem než při použití v monoterapii. Paradoxně jsou kalcineurinové inhibitory nefrotoxické a mohou přispívat k dlouhodobému renálnímu selhávání jak u ledvin transplantovaných, tak zdravých (2). Mezi kalcineurinové inhibitory patří cyklosporin A a takrolimus. Cyklosporin A byl prvním lékem selektivně působícím na T-buňky, který oproti dříve užívanému azatioprinu nevyvolával myelosupresi. Takrolimus byl vyvinut jako terapeutická alternativa k cyklosporinu po transplantaci orgánů.

1.1.1. Cyklosporin A

Cyklosporin je cyklický undekapeptid s molekulovou hmotností 1201 Da. Na rozdíl od lineárních peptidů, cyklosporin A nemá volnou karboxy ani amino skupinu, a proto se nerozpouští ve vodě, je však dobře rozpustný v tucích. Cyklosporin A je velmi stálý a jeho cyklická struktura se rozpadá až za působení silných kyselin a zvýšené teploty.

Mechanismus účinku: Molekulární mechanismus kterým CNI inhibují aktivaci T-buněk, je dobře znám. Vazba receptoru T-buněk s MHC (major histocompatibility complex) peptidem

dárce normálně spustí kalcium dependentní intracelulární signalizaci, která vyústí v aktivaci kalcium/kalmodulin dependentní fosfatázy kalcineurinu. To vede k defosforylaci NFAT (nuclear factor activated T-lymphocytes) umožňující translokaci do jádra, kde zvyšuje vazbu transkripčních faktorů pro geny kódující prozánětlivé cytokiny jako jsou IL-2, IL-3, IL-4, INF- γ a TNF- α . Ve vztahu k revmatoidní artritidě je cyklosporin A schopen kompletně nebo částečně zablokovat tvorbu IL-15 a IL-17. Po vstupu do cytoplazmy tvoří CNI komplexy s jejich imunofiliny (2, 3). Cyklosporin A se váže na cyklofilin a takrolimus na 12kDa FK506-vázací protein (FKBP-12 – FK binding protein-12). Komplexy CNI-cyklofilin inhibují kalcineurinovou aktivitu a tím předcházejí translokaci NFAT do jádra a transkripci genů cytokinů. Cílovým výsledkem je, že CNI blokují produkci cytokinů jako je IL-2 a inhibují aktivaci T-buněk a proliferaci (4).

Farmakokinetika: Cyklosporin A je vysoce lipofilní látka, díky čemuž je snadno distribuován přes membrány a do tkání. Podáván může být jak intravenózně, tak perorálně. V krvi je 58 % cyklosporinu vázáno na erytrocyty, 4 % na granulocyty, 5 % na lymfocyty a 33 % je volné

Tabulka 1. Farmakokinetické parametry cyklosporinu A. ($t_{1/2}$, poločas eliminace; Cl, clearance; V_d , distribuční objem; f, vazba na plazmatické proteiny; F, absolutní biologická dostupnost po perorálním podání)

	$t_{1/2}$ [hod]	Cl [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f _s [%]	F [%]
cyklosporin A	3–27	5–10	3,6–7,4	96–99	5–80

v plazmě. V plazmě je pak asi 98 % cyklosporinu vázáno na proteiny (85–90 % na lipoproteiny, 5–15 % na ostatní proteiny) (5). Po perorálním podání je popisována signifikantní presystémová eliminace, zejména díky biotransformaci léčiva P450 3A podrodinou. Cyklosporin A byl popsán jako středně silný inhibitor biotransformační aktivity P450 3A4. Navíc cyklosporin je substrátem a inhibitorem P-glykoproteinu. Přítomnost jirých P450 enzymů na biotransformačních procesech cyklosporinu není vyloučena, zejména díky metabolitům nalezeným v moči po perorálním podání léčiva. Ačkoliv je peptidová struktura k metabolismu rezistentní, boční řetězce jsou extenzivně metabolizovány na více než 30 metabolitů nazvaných podle jednotné nomenklatury z roku 1990 zahrnující primární i sekundární metabolity cyklosporinu, které byly nalezeny v moči, žluči, krvi a stolici (6). Běžně měřitelnými metabolity v krvi jsou AM1, AM9, AM1c, AM19, AM4N, kde AM1 má nejvyšší koncentraci v porovnání s koncentracemi ostatních metabolitů. Metabolity nalezené ve žluči jsou AM19, AM1c, AM4N9, AM1A, AM1 a AM1c, kde AM1A je hlavním metabolitem nalezeným ve žluči. Vzniklé metabolity vykazují výrazně nižší imunosupresivní aktivitu a nežádoucí účinky než mateřská látka (7). Pouze 0,1 % je vylučováno močí, případně stolicí v nezměněné formě (7). Názevový metabolit cyklosporinu A je velmi jednoduché, písmeno A ve zkratce značí cyklosporin A a písmeno M metabolit. Číslice označuje pořadí aminokyseliny u které došlo k hydroxylaci. Pokud došlo k N-demetylacii, přidává se ještě písmeno N, písmeno c znamená, že došlo k cyklizaci (6).

Lékové interakce: Vzhledem ke skutečnosti, že cyklosporin je substrátem podrodiny P450 3A, je popisováno mnoho lékových interakcí spojených s podáním cyklosporinu. Cyklosporin má poměrně úzké terapeutické rozmezí a jeho nedostatečná sérová koncentrace vede k rejekci transplantátů, naopak vysoké hladiny se projevují nefrotoxicitou, selháváním orgánů a delíriem.

Cyklosporin, jak bylo uvedeno, je substrátem a zároveň inhibitorem aktivity P-glykoproteinu. P-glykoprotein je transmembránový transportér, který přenáší mnoho endogenních substancí z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Ve střevě snižuje P-glykoprotein biodostupnost po orálním podání léčiv tím, že je vylučuje z enterocytů do lumen střeva. P-glykoprotein je kódován MDR-1 (multidrug resistance-1), známým také jako ABCB1 gen. Farmakogenetika tohoto transportéru může také přispívat k výrazné interindividuální

Tabulka 2. Interakce cyklosporinu A

Zvýšení hladin		
makrolidová ATB	klaritromycin	↑ AUC 3krát
	erythromycin	↑ AUC 5krát
	roxitromycin	↑ AUC o 37%
azolová antimykotika	itraconazol	↑ AUC 2–3krát
	ketokonazol	↑ AUC 2krát
	vorikonazol	↑ AUC 2,5krát
H ₂ -antihistaminika	cimetidin	↑ AUC o 32%
antidepresiva	fluoxetin, fluvoxamin	↑ AUC 2krát
kalciové blokátory	verapamil	↑ AUC o 50–70%
	diltazem	↑ AUC o 30–60%
ATB	gentamicin	↑ AUC o 5–65%
	chloramfenikol	↑ AUC o 41%
ostatní	gliprid	↑ AUC 2krát
	grapefrutová šťáva	↑ AUC o 72%
Snížení hladin		
antiepileptika	fenobarbital	↓ AUC o 25%
	karbamazepin	↓ AUC o 50%
	fenytoin	↓ AUC o 37–47%
ostatní	rifampicin	↓ AUC až o 70%
	saquinavir	↓ AUC až o 90%
	tfootka tačovaná	↓ AUC o 30 až 65%

variabilně, nicméně výsledky různých studií jsou protichůdné. Je těžké odhadnout, jaký vliv bude mít současné podání cyklosporinu s inhibitory či induktory P-glykoproteinu a cytochromu P450 3A4. Biologická dostupnost může být ovlivněna i současným podáním potravou. Jídlo zvyšuje biodostupnost o 23 %, mléko o 39% (7).

Nežádoucí účinky: CNI jsou spojeny s řadou lékových specifických nežádoucích účinků. Mnoho významných nežádoucích účinků je závislých na dávce a ve vztahu k místům, kde je hladina kalcineurinu nejvyšší (nejvyšší hladiny jsou popisovány v mozku a v ledvinách). Užívání cyklosporinu je spojeno s nefrotoxicitou, která je jedním z nejdůležitějších nežádoucích účinků, zvláště po transplantaci. Částečně je to díky vazokonstrikci aferentní arterioly s následnou redukcí renálního průtoku krve a míry glomerulární filtrace; tyto změny jsou projevem akutní toxicity a jsou reverzibilní při vysazení CNI. Dlouhodobě cyklosporin vyvolává chronické ireverzibilní změny, které jsou charakterizovány intersticiální fibrózou a obliterativními arteriálními změnami díky fibróznímu ztluštění intimy. Běžným důsledkem léčby cyklosporinem je hypertenze (2). Neurotoxicita CNI se může projevovat několika způsoby, a je zhoršená v přítomnosti nízké sérové hladiny hořčičku. Mohou se objevovat

bolesti hlavy a tremor, horší 1–2 hod po užití, kdy je plazmatická koncentrace léku nejvyšší. Běžná je také nespavost. Méně běžné je rozčilení, neklid, křeče, psychózy, halucinace, encefalopatie a poruchy vědomí (3). Metabolické účinky cyklosporinu pak zahrnují diabetogenní efekt, který může odrážet různou citlivost k diabetogennímu účinku kortikosteroidů. Hyperkalemie, hyperurikemie a hyperlipidemie jsou další běžné metabolické vedlejší účinky. Specifickým vedlejším účinkem cyklosporinu je hyperplazie dásní a hypertichóza (3).

1.1.2. Takrolimus

Takrolimus je 23členný makrocyclický laktón o molekulové hmotnosti 804,2 Da. V léčivých přípravcích se vyskytuje ve formě monohydrátu, který má lipofilní charakter, je prakticky nerozpustný ve vodě.

Mechanismus účinku: Obdobný jako u cyklosporinu A, takrolimus se však váže FKBP12 (FK binding protein 12), což je enzym řadící se mezi rotamázy. Rotamázová aktivita je nezbytná pro správné strukturální skládání nově syntetizovaných bílkovin.

Farmakokinetika: Absorpce takrolimu je ze zažívacího traktu rychlá, ale nekompletní. Biologickou dostupnost a rychlost vstřebávání snižuje potrava, zejména je-li s vysokým obsahem tuku. Byla

vyvinuta i modifikovaná léčivá forma, která je podávána jednou denně. Maximální koncentrace této formy jsou dosaženy za 2–2,5 hodiny, ostatní farmakokinetické parametry jsou obdobné jako u konvenční formy při dávkování 3krát denně. Takrolimus se váže v červených krvinkách a jeho koncentrace v nich může být až 35krát vyšší než v plazmě. Poměr vazby v erytrocytech je nižší při celkových vyšších koncentracích, protože dochází k saturaci. V krevní plazmě se takrolimus váže hlavně na kyselý α_1 glykoprotein a albumin, volně zůstává méně než 1% látky. Takrolimus prochází placentární bariérou a v plazmě pupečnickové krve dosahuje asi třetinu koncentrace v krvi matky, neprochází však do mozkomíšního moku. Takrolimus podléhá rozsáhlé biotransformaci P450 3A4. Je metabolizován hydroxylací a demethylací na více než 15 metabolitů. Hlavním metabolitem je 13-demetyltakrolimus (TRL), který má stejně jako některé další metabolity určitý imunosupresivní účinek, i když menší než mateřská látka. Srovnatelný účinek s původní látkou má 31-demetylovaný metabolit. Hlavní cestou eliminace je pak vyloučení žlučí ve formě metabolitů. Méně než 1% původní látky je vyloučeno do moči.

Nežádoucí účinky: Běžně udávané nežádoucí účinky zahrnují nefrotoxicitu, neurotoxicitu, průjem a zažívací obtíže, výskyt infekcí, hypertenzi a poruchy glycidového metabolismu. Ve srovnání s terapií cyklosporinem A je častěji udáván průjem, poruchy glycidového metabolismu a některé typy neurotoxickeho poškození, méně častá je naopak hypertenze a hypercholesterolemie. Takrolimus může působit pruritus a gingivitidu. Podávání takrolimu je často doprovázeno nízkými hladinami hořčíku (hypomagneziemií), někdy je také pozorována hyperkalemie. Ve srovnání s osobami léčenými cyklosporinem je při terapii takrolimem příznivější profil hladin lipoproteinů a nižší krevní tlak.

Lékové interakce: Takrolimus je silně metabolizován v játrech a střešní mukóze jaterním mikrozomálním izoenzymem CYP 450 3A4 a P-glykoproteinem, proto léčiva interagující s těmito systémy mohou mít vliv na farmakokinetické vlastnosti takrolimu.

1.2. mTOR inhibitory – sirolimus a everolimus

Sirolimus a everolimus patří ke skupině imunosupresivních léčiv nazývaných inhibitory mammalian target of rapamycin.

1.2.1. Sirolimus

Sirolimus je hydrofobní makrocyclický laktón s molekulovou hmotností 914 Da.

Tabulka 3. Farmakokinetické parametry takrolimu

	$t_{1/2}$ (hod)	Cl (ml/min/kg)	V_d (l/kg)	f_e (%)	F (%)
Takrolimus	4–41	0,5–1,5	0,5–1,9	99	4–93

Tabulka 4. Interakce takrolimu

Zvýšení hladin		
azolová antimykotika	ketokonazol	↑ AUC o 30–50%
	flukonazol	↑ AUC 3krát
	vorikonazol	↑ AUC 10krát
ostatní léčiva	erytromycin	↑ AUC 3–4krát
	grapefruitová šťáva	↑ AUC 3krát
Snižování hladin		
ostatní léčiva	rifampicin	↓ plazmatické hladiny až 8krát
	trezalka tečkováná	↓ AUC o 15–64%

Tabulka 5. Farmakokinetické parametry sirolimu

	$t_{1/2}$ (hod)	Cl (ml/min/kg)	V_d (l/kg)	f_e (%)	F (%)
sirolimus	40–86	2–3	12	98	14–41

Mechanismus účinku: Sirolimus se váže na 12 kDa intracelulární imunofilin FK 506-vázející protein (FKBP12), ale na rozdíl od takrolimu neinhibuje kalcineurinovou aktivitu. Místo toho je komplex sirolimus/FKBP12 vysoce specifickým inhibítozem mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR je serinová/treoninová kináza zapojená do signalizační dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)/AKT (proteinkinázy) (3). Konečným efektem je blokáda T buněčné aktivity zabraňující postupu buněčného cyklu z G1 do S fáze (4). Sirolimus účinkuje v pozdější fázi alloimunitní reakce než kalcineuriové inhibitory a blokuje až IL-2 indukovanou proliferaci (11). Navíc vedle imunosupresivního účinku mTOR inhibitory inhibují fibroblastový růstový faktor nutný pro obnovu tkáně (3).

Farmakokinetika: Po perorálním podání je sirolimus rychle absorbován z gastrointestinálního traktu a maximální hladiny v periferní krvi dosahuje u zdravých lidí do 1 hodiny po podání a do 2 hodin u pacientů po transplantaci ledviny. V plazmě se sirolimus váže z 92% na plazmatické bílkoviny (97% na albumin, zbytek na α -glykoproteiny a lipoproteiny). Volná frakce sirolimu v plazmě tvoří přibližně 2%. Sirolimus je biotransformován O-demethylací a/ nebo hydroxylací CYP 450 3A na 7 hlavních metabolitů, ty jsou detekovatelné v plazmě, moči a stolici. Sirolimus je vylučován ve formě neaktivních produktů biotransformace žlučí, pouze malá část je vylučována močí. V klinických studiích byla zjištěna nižší clearance a biologický poločas eliminace u mužů, avšak tyto změny

nevyžadují úpravu dávkování. Strava s vysokým obsahem tuků prodlužuje čas k dosažení maximální plazmatické koncentrace a snižuje maximální plazmatickou koncentraci léčiva o třetinu. Proto se doporučuje podávat sirolimus pravidelně buď s jídlem nebo nalačno.

Nežádoucí účinky: Vedlejší účinky lze rozdělit jako metabolické, hematologické, dermatologické a účinky spojené s inhibicí růstového faktoru. Hlavními metabolickými účinky jsou nárůst sérového cholesterolu (celkového, HDL i LDL) a triglyceridů, jejichž clearance je snížena (2, 4). Ostatní účinky zahrnují snížení kyseliny močové a zvýšení ve funkčních jaterních testech. Běžná je suprese všech tří krevních elementů – leukocytů, erytrocytů a počtu destiček, s anemií, která je nejméně zejména v přítomnosti renálního poškození a reaguje na suplementaci erythropoetinem (2, 3). Kožní vyrážky, akné a vředy v ústech jsou běžnější u pacientů, kteří byli na mTOR inhibitory přivedeni, než u těch, kteří s nimi začínají de novo. Vředy úst se často manifestují jako herpes simplex. Inhibice růstového faktoru pak může dobře vysvětlit účinek sirolimu na kožní dřeň. Inhibice epitelálního růstového faktoru může přispívat k výskytu ulcerací úst, zatímco inhibice fibroblastového růstového faktoru odpovídá za zhoršení hojení ran (3). Vedlejším účinkem zasluhujícím zvýšenou pozornost je výskyt intersticiální pneumonie, která se zdá být závislá na dávce a mizí po vysazení sirolimu (3).

Lékové interakce: Sirolimus je extenzivně metabolizován systémem CYP 450 3A ve střevě

a v játrech. Sirolimus se nejčastěji kombinuje s cyklosporinem, který patří mezi substráty CYP 3A4, a tím inhibuje metabolismus sirolimu. Bylo zjištěno, že při současném podání těchto látek se zvyšuje biologická dostupnost sirolimu až o 240%. V případě, že je mezi dávkami časový odstup 4 hodiny, snižuje se biologická dostupnost sirolimu na 80%. Ketokonazol zvýšil AUC 10,9krát, vorikonazol 11krát, podobný efekt byl popsán pro blokátory kalciových kanálů (verapamil zvýšil AUC 2,2krát, diltiazem zvýšil AUC o 40 až 60%). Rifampicin zvýšil clearance sirolimu 5,5krát a snížil AUC o 82%. Podobný efekt byl popsán pro fenobarbital, fenytoin a karbamazepin, inhibitory proteázy.

1.2.2. Everolimus

Mechanismus účinku: Everolimus se váže, stejně jako sirolimus, na 12 kDa intracelulární imunofilin FKBP12, ale na rozdíl od takrolimu neinhbuje kalcineurinovou aktivitu. Místo toho je komplex everolimus/FKBP12 vysoce specifickým inhibitorem mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR je serinová/treoninová kináza zapojená do signální dráhy fosfatidylnositol-3-kinázy (PI3K/AKT (proteinkinázy) (3). Konečným efektem je blokáda T buněčné aktivity zabraňující postupu buněčného cyklu z G1 do S fáze (3, 4).

Farmakokinetika: Everolimus je po perorálním podání rychle absorbován, pиковá koncentrace je dosažena asi za 2 hod po podání. Biotransformace probíhá systémem cytochromu P450 3A4 a P-glykoproteinem. Everolimus se vylučuje zejména stolicí, méně pak močí. Bylo popsáno, že sirolimus a everolimus zvyšují nefrotoxicitu pokud jsou podávány s CNI, zvyšují absorpci CsA (3, 4).

Nežádoucí účinky: Mezi časté nežádoucí účinky patří leukopenie, trombocytopenie, alergické reakce a infekční komplikace, hyperlipoproteinémie, hypertenze, poškození jater a ledvín.

Lékové interakce: Plazmatická hladina everolimu byla zvýšena současným podáním s inhibitory aktivity P450, současně podání s ketokonazolem zvýšilo AUC 15krát, cyklosporinem o 90 až 170%, verapamilem 3,5krát. Rifampicin zvýšil clearance everolimu o 172% a snížil AUC o 65%.

2. Mykofenolát

Od svého uvedení do praxe mykofenolát významně nahradil při orgánových transplantacích azathioprin. Jeho výhodou oproti azathioprinu je, že může být k profylaxi dny používán alopurinol bez nutnosti redukovat dávky mykofenolátu.

Tabulka 6. Farmakokinetické parametry everolimu

	$t_{1/2}$ (hod)	Cl (ml/min/kg)	V_d (l/kg)	f_e (%)	F (%)
everolimus	20–32	8,8	1,4–1,7	74	90–100

Tabulka 7. Farmakokinetické parametry mykofenolátu

	$t_{1/2}$ (hod)	Cl (ml/min/kg)	V_d (l/kg)	f_e (%)	F (%)
mykofenolát	1,5–3	17–22	2,8	3,6	97,2–98,7

Mykofenolát je účinný, možná díky charakteru působení na B-buňky, zejména u těžkých forem systémového lupus erythematosus. (Při formě lupusu s nefropatií jsou jeho výsledky srovnatelné s cyklofosfamidem). Získal také popularitu jako steroid-šetřící látka v udržovací fázi mnoha imunitních poruch, zejména při vaskulitidě (např. ANCA – (Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) pozitivní vaskulitidě) (2).

Mechanismus účinku: Mykofenolát mofetil (MMF) a mykofenolát sodný (MPS) jsou v játrech rychle konvertovány na aktivní látku, kys. mykofenolovou. Cílem kys. mykofenolové je inosin monofosfát dehydrogenáza (IMPDH), limitující enzym v de novo syntéze guanosinových nukleotidů, esenciálních pro syntézu DNA. Většina typů buněk může tvořit guanosinové nukleotidy 2 cestami, cestou IMPDH a náhradní cestou. Lymfocyty neovládají tuto náhradní cestu, takže blokáda IMPDH cesty vyústí v relativně selektivní blokádu proliferace lymfocytů (4). Existují 2 enzymy IMPDH, typ I byl nalezen převážně na lymfocytech v klidovém stadiu a typ II je indukovaný a exprimován na aktivovaných T-lymfocytech (3). Kys. mykofenolová snižuje proliferaci T-buněk nekompetitivní inhibicí typu II izomeru IMPDH (4).

Farmakokinetika: MMF a MPS jsou dobře absorbovány (biodostupnost je asi 94%) a podléhají bezprostřednímu first-pass metabolismu na aktivní formu, kys. mykofenolovou. Ta má poločas 18 hod a je metabolizována játry na 7-O-glukosil (M-1) a na acylglukuronid kys. mykofenolové (M-2), který je primárně vylučován močí. M-2 je vylučován žlučí do střeva, kde vykazuje významný enterohepatální cyklus, s následným druhým píkem kys. mykofenolové v plazmě za 6–12 hod po podání. Tato enterohepatální cirkulace může přispívat ke gastrointestinální intoleranci (3). Výsledky monitorování MMF ukazují, že existuje inter- a intraindividuelní variabilita (9). Tato variabilita je spojena se současným užíváním typem kalcineurinového inhibitory. CsA vede k nižším hladinám MMF, zatímco takrolimus nebo sirolimus zvyšují hladiny MMF (10). V přítomnosti závažného renálního poškození (GFR < 25 ml/min) je AUC kys. mykofenolové zvýšena.

Je také zvyšována současnou kompeticí MPAG o renální sekreci s antivirovými látkami, jako je ganciclovir a aciclovir (3).

Nežádoucí účinky: Lékové specifické nežádoucí účinky jsou stejné u MMF i MPS. Nejběžnější, na dávce závislé, nežádoucí účinek je průjem, ale běžné jsou také nauzea, zvracení a bolest břicha. Také se vyskytuje útlum kostní dřeně (2). Navíc jsou zde náznaky z některých klinických pokusů o zvýšeném výskytu virových infekcí, jako je cytomegalovirus, candida a herpes simplex (3).

Lékové interakce: Antacida snižují AUC mykofenolátu i jeho glukuronidu o 15, resp. 34% (pravděpodobně jako důsledek chelatace). Současné podání s cholestyraminem snížilo AUC mykofenolátu o 40%. Současné podání s cyklosporinem vedlo ke snížení AUC mykofenolátu, naopak, takrolimus AUC mykofenolátu zvyšuje inhibicí UGT – UGT – po úpravě. Současné podání s rifampicinem vedlo ke zvýšení clearance, vysazení rifampicinu pak vedlo ke zvýšení AUC o 221%.

3. Cyklofosamid

Cyklofosamid je cytotoxický lék – bifunkční alkylační látka patřící do skupiny oxazofosforinů. Používá se zejména v hematologii u malignit (akutní lymfoblastické leukémie, lymfoproliferativní onemocněních i solidních nádorů). Je to lék volby u Wegenerovy granulomatózy (obecně je lékem u tzv. ANCA – pozitivních vaskulitid) a je používán také v léčbě systémového lupus erythematosus (zejména u forem s plicním nebo renálním postižením). Měsíční intravenózní pulzy jsou stejně účinné u systémového lupusu erythematosus jako denní orální užívání, ale umožňují snížení celkové dávky, což platí také u vaskulitid, kde je však zřejmě více relapsů. Cyklofosamid je také užíván k navození trvalé remise u relapsujícího nefrotického syndromu. Po šesti týdnech léčby je běžný útlum kostní dřeně s neutropenií a následujících více než 6 měsíců pokračuje riziko útlumu pohlavních orgánů a neplodnosti u obou pohlaví (2).

4. Metotrexát

MTX je antagonistka kyseliny listové. Farmakologické mechanismy účinku zahrnují

inhibici syntézy purinů, podporu uvolňování adenosinu, inhibici produkce prozánětlivých cytokinů, supresi proliferace T-lymfocytů, chemotaxe neutrofilů a snížení sérového imunoglobulinu (12).

Metotrexát indukují *in vitro* apoptózu periferních lymfocytů aktivovaných mitogenem nebo superantigenem a může indukovat klonální delecí aloreaktivních T-lymfocytů (13). Klonální delecce pak vede k apoptické smrti autoreaktivních klonů. Tento antimetabolit je používán u některých autoimunitních onemocnění jako je lupénka, psoriatická artritida, revmatoidní artritida a Crohnova choroba. Bylo prokázáno, že jeho použití jako antirevmatického léku modifikujícího chorobu (anchor drug) v kombinaci s biologickou léčbou – např. inhibitory TNF (jako je infliximab nebo etanercept) a s ostatními antirevmatiky zlepšuje symptomy revmatoidní artritidy (2). Další indikací pak jsou maligní onemocnění, např. akutní lymfatická leukémie, ne Hodgkinův lymfom, karcinom prsu a choriokarcinom.

Metotrexát je možno podávat perorálně nebo parenterálně (jako subkutánní nebo intramuskulární injekci). Obvyklá dávka při užívání v revmatologii je 7,5–15 mg jednou týdně, tato dávka však může být užívána rozděleně ve 3 dávkách co 36 hod. V případě malignit se dávkovací schéma liší v závislosti na indikaci.

V průběhu užívání metotrexátu jsou pak pacienti suplementováni kyselinou listovou nebo kalcium-folinátem (obvykle při použití v onkologii) k záchraně normálních buněk před toxicitými účinky a snížení některých nežádoucích účinků (gastrointestinální nesnášenlivost, stomatitida, hepatotoxicita, hyperhomocysteinémie, alopecie) (15).

Lékové interakce: Hladiny metotrexátu snižují neomycin, nystatin, vanikomycin (snížení absorpce o 30–50%), kortikosteroidy (zpomalují absorpci nebo zvyšují metabolismus) a cholestyramin (zvýšení eliminace). Hladiny metotrexátu zvyšují kanamycin (nárůst gastrointestinální absorpce), salicyláty (snížení eliminace močí), nesteroidní antiflogistika (snížení glomerulární filtrace, sekundárně vedou nesteroidní antiflogistika k indukované renální kapilární konstrikci), probenecid (inhibice renální tubulární sekrece a bilární exkrece), aminoglykosidy, amfotericin B a cyklosporin A (snížení eliminace), cefalosporin (inhibice renální sekrece), hydroxychlorochin (snížení clearance nebo snížení aktivní tubulární reabsorpce). Trimetoprim-sulfametoxazol inhibují stejný enzym jako metotrexát, což může vést k závažné supresi kostní dřeně a pancytopenii a zároveň snižují clearance metotrexátu díky inhibici tubulární sekrece.

Tabulka 8. Farmakokinetické parametry cyklofosfamidu

	$t_{1/2}$ [hod]	Cl [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f_e [%]	F [%]
cyklofosfamid	4–7,5	1,1	0,62	14	60–90
4-hydroxyfosfamid	8–9	0,8		60	

Tabulka 9. Farmakokinetické parametry metotrexátu

	$t_{1/2}$ [hod]	Cl [ml/min/kg]	V_d [l/kg]	f_e [%]	F [%]
metotrexát	α -fáze = 0,75 β -fáze = 2 γ -fáze = 5–10	1,5–2,1	0,4–0,8	50	25–95

Metotrexát naopak může snížit clearance teofylinu a tím zvýšit jeho hladiny.

Závěr

Pro klinické využití při orgánových transplantacích bylo vyvinuto množství imunosupresivních látek. Jak se postupně objevují nové látky, je ujasňováno jejich postavení ve farmakoterapii a současně imunosupresivní protokoly jsou velmi účinné v prevenci ztráty štěpu v důsledku akutní rejekce. Problémem může být přehnaná imunosuprese pacienta vedoucí k výskytu infekcí a případných malignit. Díky velkému počtu možných kombinací dostupných látek se imunosupresivní protokoly mezi jednotlivými transplantáčními centry mohou výrazně lišit. Při současném trendu vytvoření individuální terapie pro potřeby jednotlivých pacientů stoupá význam farmakogenetiky a terapeutické monitorování umožňující právě individualizaci terapie. Prioritou je najít takové imunosupresivní schéma, které minimalizuje výskyt nežádoucích účinků, zejména kardiovaskulárních a renálních. Hlavním problémem po transplantacích orgánů je ztráta štěpu z důvodu chronické rejekce. Ažkolí vypadají některé látky slibně (např. mTOR inhibitory), případně výhody nebo nevýhody jejich dlouhodobého užívání se ukáží až časem. Dlouhodobým cílem v transplantologii zůstává vyvinutí takové strategie, která by navodila specifickou imunologickou toleranci ke štěpu tak, aby nebyla nutná žádná nebo jen minimální imunosupresivní léčba.

Tato práce je podporována grantem IGA 14/8655-5.

Literatura

1. Maršálková P, Grundmann M. Farmakokinetika a klinická aplikace vybraných imunosupresiv. *Klin Farmakol Farm* 2009; 23(3): 138–141.
2. Trevillian P. The CARL guidelines. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: therapeutic drug monitoring. *Nephrol (Carlton)* 2007; 12(suppl 1): S57–65.
3. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1): 23–46.

4. Mezel MA. The mosaic of immunosuppressive drugs. *Mol Immunol* 2003; 39(17–18): 1073–1077.
5. Dilts NL, Huth B, Yates CR, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective on ethnic differences. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(12): 701–718.
6. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grolw J, Johnston A. Consensus document: Hawk's Car meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 1990; 36(8 Pt 1): 1510–1516.
7. Elbarbry FA, Marlett T, Shokar AS. Drug-drug interactions with immunosuppressive agents: review of the *in vitro* functional assays and role of cytochrome P450 enzymes. *Transplantation* 2008; 85(9): 1222–1229.
8. Keogh A, Day R, Critchley L, Duggin G, Baron D. The effect of food and cholestyramine on the absorption of cyclosporine in cardiac transplant recipients. *Transplant Proc* 1988; 20(7): 27–30.
9. Yatscoff RW, Apeslet LJ. The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug Monit* 1998; 20(5): 459–463.
10. Shaw LM, Figurski M, Milone MC, Trote J, Bloom RD. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2(5): 1062–1072.
11. Torada N, Lucas JJ, Szepes A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993; 154(1): 7–15.
12. Genestier L, Pallot R, Foumel S, Ferraro C, Moxsec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest* 1998; 102(2): 322–328.
13. Swierkot J, Saschinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep* 2006; 58(4): 473–482.
14. Hamý J, Grundmann M. Léčba ALL u dětí s vysokodávkovaným metotrexátem. *Čs. pediatr* 1994; 3: 172–175.
15. Hamý J, Grundmann M, Brosmannová H, Blažek B, Šterba J. High-dose methotrexate for the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children (a pharmacokinetic study). *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma II*, Harwood A cad. Publishers 1997; 183–188.

Mgr. Petra Halvová

Ústav klinické farmakologie FN Ostrava
17. listopadu 1 790,
708 52 Ostrava-Poruba
petra.marsalkova@fnspo.cz

10.3 Peřinová I, Brozmanová H, Halvová P, Grundmann M. Možnosti stanovení cyklosporinu A v terapeutickém monitorování léků. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(2): 93-97

V této práci jsme popsali metody stanovení cyklosporinu A a možnosti stanovení jeho metabolitů. Pro terapeutické monitorování (TDM) cyklosporinu A se používají metody imunoanalytické, vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Imunoanalytické metody jsou relativně jednoduché s velkou průchodností vzorků, ale mohou zkříženě reagovat s metabolity CsA, což vede k různé míře nadhodnocení naměřených koncentrací. Metody HPLC jsou přesné a citlivé a umožňují i stanovení metabolitů, ale jsou velmi pracné a náročné na přípravu vzorků. V současné době se ke stanovení imunosupresiv používá metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která je rychlá, přesná a umožňuje stanovení nejen cyklosporinu A, ale i metabolitů.

Možnosti stanovení cyklosporinu A v terapeutickém monitorování léků

Ilona Peřínová, Hana Brozmannová, Petra Halvová, Milan Grundmann

Ústav klinické farmakologie FN Ostrava a Fakulty zdravotnických studií Ostravské univerzity, Ostrava

Cyklosporin A (CyA) je lék s úzkým terapeutickým rozmezím u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita, která má za následek rozdílnou odpověď na terapii. V klinické praxi neexistují imunologické testy, kterými by bylo možno účinnost imunosuprese cyklosporinem sledovat, a proto se monitorování CyA omezuje na stanovení jeho koncentrací v krvi. Pro terapeutické monitorování (TDM) cyklosporinu A se používají především metody imunoanalytické, metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS, popř. LC-MS/MS). Výhodou imunoanalytických metod je analýza velkého množství vzorků během krátkého času a snadná ovladatelnost přístrojů. Jejich nevýhodou jsou zkřížené reakce s metabolity CyA. HPLC metody se považují za referenční metody stanovení CyA. Vyžadují však časově náročné extrakční postupy přípravy vzorků, které jsou důležité pro dobrou separaci. HPLC metody jsou také používány k měření CyA společně s jeho metabolity. V tom případě je celkový čas analýzy až několik desítek minut. Metody LC-MS a LC-MS/MS jsou selektivní, velmi citlivé a specifické. Výhodou těchto metod oproti klasické HPLC je zejména v případě LC-MS/MS rychlá průchodnost vzorků a možnost stanovení CyA s metabolity nebo s dalšími imunosupresivy v jedné analýze. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a nutnost odborné obsluhy.

Klíčová slova: cyklosporin A, TDM, imunoanalytické metody, HPLC-UV, LC-MS, LC-MS/MS.

Possibilities of cyclosporine A determination in therapeutic drug monitoring

Cyclosporine A (CyA) is a drug with narrow therapeutic range and high interindividual variability. No immunologic tests are known to verify immunosuppressive effect of cyclosporine in clinical practice and that's why CyA monitoring is limited mainly to determine its concentration in blood. Immunoanalytic methods, high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) are regularly used to determine CyA concentration in therapeutic drug monitoring (TDM). Immunoanalytic methods can analyze a lot of samples in short time and they are easy practicability, but the disadvantage is crossed reactions with CyA metabolites. HPLC methods are considered to be referential for CyA determination, but they require time-consuming extraction procedures important for successful separation. The analysis may take even tens of minutes. HPLC methods are also used to determine CyA together with its metabolites. LC-MS and LC-MS/MS methods are selective, very sensitive and specific. The advantage of these methods especially in the case of LC-MS/MS is high sample throughput and the possibility to determine CyA simultaneously with its metabolites or other immunosuppressives in one analysis. On the other hand the initial instrumentation cost and a requirements of skilful staff are limitations of these methods.

Key words: cyclosporine A, TDM, immunoanalytic methods, HPLC-UV, LC-MS, LC-MS/MS.

Klin Farmakol Farm 2010; 24(2): 93–97

Úvod

Cyklosporin A ($C_{22}H_{34}N_4O_8$) je cyklický undekapeptid se strukturou cydo- [MeBmt- α -Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal]. Cyklosporin A (CyA) je imunosupresivní látka, která selektivně zasahuje do imunitního systému. Inhibitor aktivity T-lymfocytů cyklosporin zabraňuje produkci některých lymfokínů nezbytných pro imunitní odpověď na cizorodý nebo organismu vlastní antigen (1, 2). CyA se používá nejen v transplantologii a při léčení vybraných autoimunitních poruch, ale jeho uplatnění se rozšiřuje i na řadu onemocnění vyvolaných nebo provázených poruchami imunity. Indikace CyA zasahují do oborů revmatologie, gastroenterologie, hematologie, nefrologie, diabetologie, oftalmologie a dermatologie (2, 3). Nejčastěji uváděné nežádoucí účinky CyA jsou nefrotoxicita, poruchy funkce gastrointestinálního

traktu, hepatotoxicita, kožní a slizniční projevy (hirsutismus, hypertrichóza, hyperplazie gliv), neurotoxicita, hypertenze a určitý vliv diabetogenní (4). Cyklosporin A je metabolizován enzymatickým systémem cytochromu P450 3A. Dnes je známo asi 30 metabolitů CyA (5). Širšímu klinickému sledování hladin cyklosporinových metabolitů brání omezená dostupnost jejich standardů, které se obvykle získávají z moče pacientů (6, 7). Některé metabolity byly připraveny rovněž synteticky nebo semisynteticky. U člověka se v nejvyšších koncentracích nacházejí primární metabolity AM1, AM9, AM4N a sekundární metabolit AM1c. Zejména koncentrace AM1 v některých případech přesahuje i několiknásobně koncentraci CyA. Nejvýznamnějšími a nejvíce prostudovanými metabolity z hlediska toxicity a klinického účinku jsou primární metabolity AM1 a AM9 a AM4N (8, 9). Imunosupresivní

vlastnosti metabolitů jsou nižší než u molekuly CyA. Primární metabolity, které mají nejméně změněnou molekulu, jsou imunosupresivně neaktivnější, zvláště AM1. O vlivu metabolitů na celkový účinek a toxicitu CyA se stále diskutuje (10).

CyA je lék s úzkým terapeutickým rozmezím u něhož se projevuje významná interindividuální variabilita, která má za následek rozdílnou odpověď na terapii. V klinické praxi neexistují imunologické testy, kterými by bylo možno účinnost imunosuprese cyklosporinem sledovat, a proto se monitorování CyA omezuje na stanovení jeho koncentrací v krvi. Zjistilo se, že monitorování CyA pomocí údočních hladin (through level) je nepřesné (11, 12), a proto se v poslední době výzkum soustřeďuje na sledování celkové expozice CyA, vyjádřené jako AUC, protože lépe koreluje s klinickým stavem a rizikem rejekce. Pro

výpočet AUC se používá metoda omezeného počtu odběrů, sparse sampling (13, 14, 15, 16, 17, 18). Spolehlivé i praktické je také stanovení hodnoty C_{max} maximální dosažené koncentrace CyA, nebo C_{2h} , tedy koncentrace ve druhé hodině po podání CyA (19, 20, 21, 22, 23). Terapeutické monitorování (TDM) CyA sleduje klinický stav pacienta při imunosupresi a může zahrnovat farmakokinetické, ale i farmakodynamické údaje založené na kvantitativní analýze CyA. Dnešním trendem v transplantologii je minimalizovat používání steroidů a redukovat expozici kalcineurinových inhibitorů (CyA a takrolimu) čímž se snižují jejich nežádoucí účinky a zlepšuje se imunosupresivní účinek. Cyklosporin A, popř. takrolimus, se používá v kombinaci se sirolimem, everolimem nebo kyselínou mykofenolovou. Koncentrační rozmezí jednotlivých imunosupresiv jsou velmi rozdílná.

Pro TDM cyklosporinu A se používají především metody imunoanalytické, metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS).

Imunoanalytické metody stanovení cyklosporinu A

Pro účely TDM CyA jsou v laboratorní praxi využívány různé varianty kompetitivních imunoanalytických metod. Jejich principem je soutěž (tedy kompetice) o omezené množství vazebních míst specifické protilátky. Během reakce mezi sebou soutěží na jedné straně cyklosporin A přítomný v analyzovaném vzorku a na straně druhé vhodným způsobem označený cyklosporin A (radioizotopem, enzymem, fluorescencem apod.), který je do reakce přidáván jako indikátor pro kvantifikaci jejího průběhu.

S ohledem na postupný vývoj těchto metod byly ke značení používány nejdříve radioizotopy (tritium ^3H nebo ^{125}I), později pak především enzymy, s využitím jejich následné reakce s odpovídajícím substrátem a fotometrické nebo fluorimetrické detekce. Vývoj těchto metod se odehrával také ve vztahu k používaným specifickým protilátkám, což mělo samozřejmě vliv na vlastní specifitu stanovení. Ta je právě v případě monitorování hladin léků v krvi, vzhledem k přítomnosti řady jejich metabolitů, významným problémem. V posledních letech byly zavedeny do rutinní praxe specifické monoklonální protilátky s malou zkříženou reakcí s metabolity CyA. Tyto protilátky se připravují in vitro hybridizací.

Imunoanalytické metody jsou z hlediska instrumentálního provedení poměrně jednoduché

a nezávislé na proměnných parametrech přístrojové techniky. S postupem času byly zejména neizotopové varianty těchto metod automatizovány s možností jejich zpracování nejen na imunoanalýzátorech (metoda FPIA), ale také na běžných biochemických analyzátoch (metody EMIT, CEDIA). Automatizované imunoanalýzy umožňují získání výsledků rychleji než u manuálních radioizotopových metod. V případě metod FPIA (24, 25, 26, 27, 28) je koncentrace analytu ve vzorku nepřímo úměrná intenzitě polarizované fluorescence a tohoto principu se využívá k měření koncentrace CyA. Před analýzou je nutno vzorek upravit pomocí dodaných činidel. Úprava vzorku spočívá v lýze krevních elementů (především erytrocytů), precipitaci proteinů a převedení CyA do organického roztoku, čímž se minimalizuje vliv endogenních proteinů a dalších sloučenin na měření fluorescence. Principem metody EMIT je kompetitivní homogenní imunoanalýza, ve které CyA ve vzorku a CyA konjugovaný s bakteriální glukozo-6-fosfát dehydrogenázou soutěží o vazebná místa na specifické monoklonální myši protilátce v roztoku (29, 30, 31, 32). Koncentrace CyA ve vzorku je přímo úměrná enzymové aktivitě konjugátu, kterou lze detekovat spektrofotometricky. Zkřížené reakce metody EMIT (33) jsou nejnižší mezi automatizovanými imunoanalýzami a dosahují úrovně izotopových technik. Určitou nevýhodou je malá přesnost v oblastech nízkých koncentrací a malý rozsah kalibrace. Tato skutečnost je nevýhodná zejména při sledování farmakokinetiky CyA. Metoda CEDIA je rovněž homogenní kompetitivní enzymoimunoanalýza. Množství CyA ve vzorku je přímo úměrné reziduální enzymové aktivitě. Metoda nevyžaduje extrakci vzorku, ale pouze lýzu krevních elementů bez centrifugace. Vzorek nesrážlivé krve může být přímo zpracován na analyzátoru.

Některé parametry specifických imunoanalytických metod jsou shrnuty v publikaci autorů Šafářčik, a kol. (33).

HPLC metoda stanovení cyklosporinu A

Stanovení CyA v biologických tekutinách pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) umožňuje přesné měření parentní látky, proto je považována za referenční metodu. Metoda HPLC dovoluje na rozdíl od imunoanalytických metod stanovit společně s CyA i jeho metabolity. HPLC metody využívají principu separace látek na základě distribuce mezi pevnou (stacionární) fází zakotvenou na koloně a pohyblivou (mobilní) fází kolonou protékající. Změny ve složení eluátu vycháze-

jího z analytické kolony registrují detektory. Nejčastěji používaným je UWMs detektor. Dalším možným zařízením pro detekci je hmotnostní spektrometr, o němž se zmíníme níže.

Bylo popsáno velké množství chromatografických metod stanovení cyklosporinu A (17, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44) a pro všechny je společné, že vyžadují náročnou přípravu vzorků, která je podmínkou pro spolehlivé monitorování. Příprava vzorků spočívá v přečištění biologických tekutin od balastních látek, které brání identifikaci analyzované látky. Extrakční postupy jsou založeny na principech extrakce v kapalně fázi (liquid-liquid extraction), extrakce na kolonkách (liquid-solid extraction) a extrakce prováděná na zařízeních spojených přímo s HPLC přístrojem (column-switching techniky a automatické sample clean-up). Tyto složité pracovní postupy jsou důležité vzhledem k používané krátké vlnové délce UV záření (200–220 nm), při které může mnoho látek při analýze interferovat. Protože především mnohonásobnými extrakčními postupy dochází ke ztrátám účinné látky, analýza CyA se provádí výlučně pomocí vnitřního standardu (IS). Vnitřní standard musí být látka podobných vlastností, která se přidává ke každému kalibračnímu i analyzovanému vzorku. Vyhodnocuje se vždy poměr sledovaného analytu a vnitřního standardu. Jako vnitřní standard se nejčastěji používají cyklosporiny D a C (CyD, CyC) při stanovení parentní látky a CyD při současné analýze metabolitů. Po přečištění biologických tekutin, které předchází vlastní chromatografické analýze, je dalším krokem k dobré separaci látky a získání spolehlivých výsledků pečlivý výběr analytické kolony a její teploty, mobilní fáze a gradientové nebo izokratické eluce.

Jednotlivé metody stanovení samotného cyklosporinu A nebo CyA s jeho metabolity se liší použitými extrakčními činidly (diethyleter, methanol, hexan atd.), složením mobilní fáze (acetonitril/voda, voda/methanol/acetonitril, methanol/voda, acetonitril/fosfátový pufr atd.), stacionární fází (C18 nebo CN-kolony), teplotou (50–80°C) a rychlostí průtoku mobilní fáze (0,25–1 ml/min). Přehledně porovnání nejobvyklejších HPLC analýz stanovení CyA je uvedeno v publikaci autorů Komzáková, a kol. (45).

Stanovení cyklosporinu A metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) v TDM je v České republice novou technikou. Protože hmotnostní spektrometrie je založena na produkci, rozřazení a detekci ion-

tů v plynné fázi, byla dříve hmotnostní detekce využívána pouze v kombinaci s plynovou chromatografií. Až začátkem 80. let 20. století vývoj ionizace za atmosférického tlaku (elektrosprej a chemická ionizace) umožnil spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. V současné době se nejvíce používá 3 typů hmotnostních analyzátorů. Kvadrupól, iontové pastí a analyzátoru doby průletu. Pro kvantitativní analýzu léčiv se volí kapalinová chromatografie s jednoduchým (LC-MS) nebo trojitým kvadrupólem (LC-MS/MS). LC-MS metody jsou velmi rychlé, ale podobně jako HPLC-UV vyžadují náročnou předúpravu vzorků vzhledem k rušivým vlivům matrice. Pracuje se výhodně s vnitřním standardem. Používají se buď stabilní značené izotopy, které jsou však značně drahé a/nebo látky strukturně podobné cyklosporinu A, převážně CyD nebo askomycin pro analýzu dalších imunosupresiv. Je možné analyzovat látky se stejným retenčním časem, a to na základě poměru hmotnosti/náboje (m/z), což výrazně zkracuje čas analýzy ve srovnání s klasickou HPLC-UV metodou. Výhodou LC-MS metod je selektivní detekce, která dovoluje při vhodném zpracování vzorků pracovat se složitými směsmi i velmi podobných látek jakými jsou např. metabolity cyklosporinu A (46). LC-MS metody jsou robustní, velmi přesné a vysoce citlivé. Mohou simultánně měřit několik látek v širokém rozmezí koncentrací, čehož se s velkou výhodou, finanční i časovou, využívá při stanovení CyA s dalšími imunosupresivy (47, 48, 49, 50, 51). U metod LC-MS/MS se citlivost a specifita analýzy ještě zvyšuje. Kromě analýzy parentní látky se zde analyzují také její specifické fragmenty, které vznikají v druhé části MS zařízení, jenž funguje jako kolizní cela. Vzhledem k vysoké specificitě LC-MS/MS lze přípravu vzorku a chromatografickou separaci redukovat na minimum (52, 53, 54, 55, 56, 57).

Publikované metody stanovení CyA metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí jsou podobné, liší se např. v objemu a přípravě vzorku, použitím vnitřního standardu, složení a průtoku mobilní fáze, typu kolony nebo nastavení MS detektoru. Většina prezentovaných metod vychází z analýzy předem upraveného analytu. Existují však také metody, které využívají on-line extrakce v podobě dvojdimenzionální chromatografie nebo techniky přepínání kolon (48, 49, 50, 56, 57). Velmi jednoduchou a rychlou LC-MS/MS metodou pro simultánní stanovení cyklosporinu A a takrolimu publikoval Salm, a kol. (58). Stanovení se provádí ze 100 μ l plně krve, která se upraví precipitací proteinů síranem zinečnatým a následně acetonitilem. Jako vnitřní standard se používá askomycin a cyklosporin D. Analýza

jednoho vzorku trvá 1,5 minuty. Detekce probíhá v negativním modu za využití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Jedna z nejnovějších prací (59) popisuje LC-MS/MS metodu stanovení 4 základních imunosupresiv, CyA, takrolimu, sirolimu a everolimu. Příprava vzorku 200 μ l plně krve vyžaduje pouze precipitaci proteinů a doba analýzy jednoho vzorku je 2,6 minut. K ionizaci dochází pomocí elektrospreje (ESI) a ionty jsou detekovány v pozitivním modu. LC-MS metody mohou být dobře využity i tam, kde je limitováno množství vzorku, např. u biopsií nebo u vzorků krve od pediatrických pacientů (52, 60). Výhodné je využití této metody v případě měření velmi nízkých koncentrací, jako např. stanovení CyA nebo CyA s jeho hlavními metabolity AMI, AMIN a AM9 v lymfocytech (61, 62, 63, 64, 65).

Diskuze

V TDM cyklosporinu A existuje snaha o měření individuálního stavu imunosuprese u jednotlivého pacienta, protože dosud neexistuje jednoduchá metoda, schopná měřit farmakodynamický účinek imunosuprese. Monitorování CyA je založeno na stanovení jeho koncentrací v krvi. Pro TDM CyA se používají metody imunoanalytické a metody chromatografické, HPLC-UV nebo LC-MS, popř. LC-MS/MS. Pro posouzení toho, kterou metodu použít, je třeba vzít v úvahu základní požadavky, které by měla metoda splňovat a také to jestli metoda bude sloužit ke stanovení samotného CyA, CyA s jeho metabolity nebo CyA s dalšími imunosupresivy. Dobrá klinická metoda by měla být přesná, citlivá, selektivní, reprodukovatelná, automatizovatelná a mít co nejvyšší průchodnost vzorků.

Pomocí imunoanalytických stanovení je možné zejména rychle zpracování velkých sérií vzorků. Vzhledem k rychlosti a jednoduchosti provedení jsou současné imunoanalytické metody stanovení CyA využívány jak pro rutinní monitorování údojných hladin, tak pro měření farmakokinetických profilů (66, 67, 68, 69). Při monitorování C_{max} , AUC a sparse sampling, kde jsou dosahovány často vysoké koncentrace CyA, je nutno některé vzorky s maximálními koncentracemi ředit, protože kalibrační závislosti většiny imunoanalytických metod nejsou nastaveny na tak vysoké hodnoty. Kritické srovnání jednotlivých imunoanalytických metod bylo popsáno v řadě publikací (30, 70, 71, 72, 73, 74, 75). Obecně lze říci, že všechny imunoanalytické metody nahodnocují výsledky koncentrací CyA především v důsledku zkřížených reakcí s jednotlivými metabolity CyA, které jsou přítomny v krvi. Zkřížené reakce specifických imuno metod jsou pro jed-

notlivé metabolity obvykle na úrovni procent, výjimečně 10% (33) až 23% (76). Radioizotopové metody je výhodné použít zvláště při sériovém zpracování velkého počtu vzorků, kdy zejména vyniknou ekonomické výhody tohoto postupu. Automatizované neizotopové imunoanalýzy, které jsou co se týče nákladů někde mezi RIA a HPLC metodami, se zejména od začátku 90. let používají nejčastěji.

Základní referenční metodou pro stanovení CyA je dobře validovaná robustní metoda HPLC, která je schopna měřit přesně a specificky CyA. HPLC dokáže spolu s parentní látkou stanovit také většinu metabolitů, především metabolity primární. HPLC-UV metody na stanovení CyA vyžadují takovou přípravu vzorku před vlastním stanovením, která zahrnuje precipitaci proteinů a až několika stupňové extrakční čištění. CyA je eluován z kolony při vysokých teplotách, což klade také zvýšené nároky na kvalitu používaných analytických kolon. Složení a rychlost mobilní fáze se mění podle toho, zda chceme měřit koncentraci samostatného CyA, a/nebo CyA a jeho hlavních metabolitů. Zatímco analýza parentní látky je poměrně rychlá, při současném měření metabolitů se používají mobilní fáze s menším obsahem organické složky, což vede k prodloužení doby eluce a tím i doby analýzy až na desítky minut.

Zlatým standardem v TDM CyA se v současnosti stává kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Metody LC-MS, popř. LC-MS/MS jsou přesné, vysoce citlivé a specifické. Dovolují stanovit velké množství podobných látek v širokém koncentračním rozmezí v jedné analýze. Velmi efektivní jak časově, tak finančně je simultánní stanovení imunosupresiv pomocí LC-MS nebo LC-MS/MS. Ze zkušeností některých autorů (54, 77) vyplývá, že náhrada imunoanalýzy za LC-MS/MS metodou v TDM imunosupresiv vede až k 50% snížení nákladů a času na analýzu. Simultánní analýza 4 imunosupresiv, cyklosporinu A, takrolimu, sirolimu a everolimu, trvá 4 minuty. Podobně podle Poquette, a kol. (78) je cena za 1 simultánní LC-MS analýzu (CyA s takrolimem a sirolimem) významně nižší než v případě analýzy cyklosporinu A nebo takrolimu prováděné imunoanalytickou metodou.

I přes prozatím ní nevýhody, což je vysoká pořizovací cena přístrojů a nutnost odborné obsluhy, se LC-MS, eventuelně LC-MS/MS, začínají stávat metodou volby v terapeutickém monitorování imunosupresiv.

Poděkování:

Tato publikace byla podporována grantem IGA MZ 1A/8655-5.

Literatura

1. Bowers LD, Mathews SE. Investigation of mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. *J Chromatogr.* 1985; 333: 231–238.
2. Martinek V, Matoušovic K, Špatenka J. Objev a užití cyklosporinu v klinické praxi. *Prakt. lékař.* 2002; 82(1): 14–20.
3. Kučera M, Kalouš R, Kratochvíl P. Rozšířené indikace cyklosporinu A. *Ref. Vyh. Revm.* 2000; 40(4): 277–280.
4. Nouza K. Cyklosporin a tacrolimus (FK 506): líc a rub min-c. *Medicina* 1999; 9(6): 22–23.
5. Radake HH, Christians U, Block JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effect of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1991; 39(6): 1255–1266.
6. Brooks CA, Cramer SM, Rosano TG. Preparative chromatographic purification of cyclosporine metabolites. *Clin. Chem.* 1993; 39: 457–466.
7. Copeland KR, Yatescoff RW. The isolation, structural characterization, and immunosuppressive activity of cyclosporin G (Nw2-cyclosporin) metabolites. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13(4): 281–288.
8. Sadog N, Pham-Huy Ch, Rucay P, Righand S, Halle-Pannenko Q, Claude JR, et al. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporins A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* 1993; 15(2): 163–177.
9. Sadog N, Pham-Huy C, Martin C, Wamat JM, Claude JR. In vitro comparative study on nephrotoxicity of cyclosporine A, its metabolites M1, M17, M21, and its analogues cyclosporine C and D in suspensions of rabbit renal cortical cells. *Drug Chem. Toxicol.* 1994; 17(2): 93–113.
10. Komžíková J, Šafařík K, Brozmannová H, Grundmann M. Terapeutická monitorování cyklosporinu A. *Čes slovfarm.* 2002; 51: 159–167.
11. Blick KE, Melioak SH, Fry HD, Gillum RL. A validation study of selected methods routinely used for measurement of cyclosporine. *Clin. Chem.* 1990; 36: 670–674.
12. Grundmann M, Pořňová I, Brozmannová H, Koristkova B, Šafařík K. Significant discrepancy in cyclosporin A post-dose concentrations when analyzed with specific RIA and HPLC method. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010; 48: 87–92.
13. Akhlaghi F, Steel L, Price C, Wallwork J, Trull A. Cyclosporine (CyA) concentration at time 2 hours post dose correlates with rejection and renal function after lung transplantation (Ltx). *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 462.
14. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14: 436–441.
15. Block JS, Schilt HJ, Christians U, Schottmann R, Thiesmann C, Strohmayer S, et al. Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of kidney graft patients in relation to liver function. *Eu J Clin Pharmacol.* 1991; 40: 465–469.
16. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Coups TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Int Med.* 1993; 119: 1198–1208.
17. Brozmannová H, Grundmann M, Šafařík K, Jagerov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B.* 2000; 749: 93–100.
18. Kořistková B, Grundmann M, Pořňová I, Brozmannová H, Šafařík K. Validation of sparse sampling strategies for estimation cyclosporine A area under the concentration-time curve when analyzed with specific RIA and HPLC method. *Ther Drug Monit.* 2010; (in print).
19. Aramite AJ, Kahan BD. Abbreviated area-under-the-curve strategy for monitoring cyclosporine microemulsion therapy in immediate posttransplant period. *Clin Chem.* 1996; 42: 1294–1296.
20. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interaction. *Clin Pharmacokinet.* 1997; 32: 210–258.
21. Brossat B, Straczek J, Houlin MH, Herbeval X, Belleville F, Nabet P, et al. Liquid chromatographic determination of cyclosporin A in serum with use of solid phase extraction. Comparison between high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay levels in clinical investigations. *J Chromatogr.* 1983; 413: 141–150.
22. David CJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 100–114.
23. Dumont RJ, Ersom MHH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 38: 427–447.
24. Kyme F, Maguire S, O Brain S, McGling P, Wright E. Abbott Tdx selective assay overestimates cyclosporin in whole blood. *Clin Chem.* 1991; 37: 1658.
25. Rogas LC, Smith FA, Jaramo A. Evaluation of the Abbott Tdx monoclonal cyclosporin A assay in pediatric cardiac transplant patients. *Clin Chem.* 1991; 37: 1094.
26. Taylor PJ, Salm P, Norris RL, Ravenscroft PJ, Pond SM. Comparison of high-performance liquid chromatography and monoclonal fluorescence polarization immunoassay for the determination of whole-blood cyclosporin A in liver and heart transplant patients. *Ther Drug Monit.* 1994; 16: 526–530.
27. Wallenmaqv PE, Alexandre K. Evaluation of the new Asym cyclosporine assay compared with Tdx monoclonal whole blood and Emit cyclosporine assay. *Clin Chem.* 1999; 45: 432–435.
28. Yatescoff RW, Copeland KR, Faraci CJ. Abbott Tdx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporine in whole blood. *Clin Chem.* 1990; 36: 1969–1973.
29. Dasgupta A, Saldana S, Desai M. Analytical performance of EMIT cyclosporine assay evaluated. *Clin Chem.* 1991; 37: 2130–2133.
30. Holt DW, Johnston A, Kahan BD, Morris RG, Oellerich M, Shaw LM. New approaches to cyclosporine monitoring raise further concerns about analytical techniques. *Clin Chem.* 2000; 46: 872–874.
31. Doucill L, Hackett LP, Chiswell GM, Ilett KF. Comparison of cyclosporine measurement in whole blood by high-performance liquid chromatography, monoclonal fluorescence polarization immunoassay and monoclonal enzyme-multiplex immunoassay. *Ther Drug Monit.* 1992; 14: 327–332.
32. Schumann G, Petersen D, Hoyer PE, Wonnigat K. Eur J Clin Chem Clin Biochem. Monitoring cyclosporin A (cyclosporin, INN) concentrations in whole blood: evaluation of the EMIT assay in comparison with HPLC and RIA. 1993; 31: 381–388.
33. Šafařík K, Komžíková J, Bartoň V, Grundmann M. Imunanalytické metody stanovení cyklosporinu A. *Čes slovfarm.* 2002; 51: 112–120.
34. Jindal RM, Pescovity MD, Cummings OW, Book B, Lumeng L, Milgrom ML, et al. Persistence of cyclosporine after withdrawal of the drug in a patient with chronic liver transplant rejection. *Transplantation.* 1996; 61: 1657–1658.
35. Oka K, Hosoda K, Hirano T, Sakui E, Kozaki M. Determination of cyclosporin A in the serum of kidney transplant patients by rapid-flow fractionation and normal-phase high-performance liquid chromatography. *J of Chromatogr.* 1989; 490: 145–154.
36. Kohli H, Baraldo M, Gallo F, Marzocchi V, Pica F. Association of very high blood levels of cyclosporin metabolites with clinical complications after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2232.
37. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatescoff R, et al. Lake Louise consensus conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit.* 1995; 17: 642–654.
38. Shah AK, Sawchuk RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. *Clin Chem.* 1988; 34: 1467–1471.
39. Svirnarov DA, Dimova MN. Cyclosporin A in blood. *Liq Chromatography* 1991; 14: 1683.
40. Christians U, Schilt HJ, Block JS, Schliebel HM, Kovnatki R, Maur G, et al. Measurement of cyclosporine and 18 metabolites in blood, bile, and urine by high-performance liquid chromatography. *Transp Proc.* 1988; 20: 609–613.
41. Radake HH, Christians U, Block JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effect of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1991; 39: 1255–1266.
42. Holt DW, Johnston A, Roberts NB, Tredger JM, Trull AK. Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of Association of Clinical Biochemists task force. *Ann Clin Biochem.* 1994; 31: 434–437.
43. Lersmeyer G L, Wiebe D A, Carlson HI. Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. Purification of analytical standards and optimization of the assay. *Clin Chem.* 1987; 33: 1841–1850.
44. Annesley T, Metz K, Balogh I, Clayton L, Giachario D. Liquid-chromatographic analysis for cyclosporine with use of microbore column and small sample volume. *Clin Chem.* 1986; 32: 1407–1409.
45. Komžíková J, Brozmannová H, Šafařík K, Grundmann M. Stanovení cyklosporinu A metodou vysoké účinné kapalinové chromatografie (HPLC). *Čes slovfarm.* 2002; 51: 107–111.
46. Kosaki N, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AMN and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(5): 733–740.
47. Vidal C, Kirchner GJ, Vursch G, Sewing KF. Automated simultaneous quantification of the immunosuppressants 40-O-(2-hydroxyethyl) rapamycin and cyclosporine in blood with electrospray-mass spectrometric detection. *Clin Chem.* 1998; 44: 1275–1282.
48. Christians U, Jacobsen W, Sarkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF, et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 748: 41–53.
49. Kirchner GJ, Vidal C, Jacobsen W, Franke A, Halikensleben K, Christians U, et al. Simultaneous on-line extraction analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 721: 285–294.
50. Dieters M, Kirchner G, Resch K, Kaewer V. Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 285–292.
51. Segar C, Tentschert K, Stöggli W, Griesmacher A, Ramsay SL. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc.* 2009; 4(6): 526–534.
52. Taylor PJ, Jones CE, Martin PT, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Microscale high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 705: 289–294.
53. Keevil BG, Tilmany DP, Cooper DP, Morris MR. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine analysis of cyclosporine A over an extended concentration range. *Clin Chem.* 2002; 48: 69–76.
54. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus everolimus, tacrolimus, and cyclosporine A in whole blood. *Clin Chem.* 2002; 48: 955–958.
55. Bogusz MJ, Erasz EA, Hessian H, Abdel-Jawad J, Rowley JA, Tufal MA. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pre-treatment procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850: 471–480.

56. Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2001; 34: 285–290.
57. Kosal T, Delers M, Casella B, Kaever V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 805: 215–222.
58. Salm P, Taylor PJ, Rooney F. A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method using a novel atmospheric pressure chemical ionization approach for the rapid simultaneous measurement of tacrolimus and cyclosporine in whole blood. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 292–300.
59. Kozler RA, Dijkers ECF, Uges DRA. Robust, high-throughput LC-MS/MS Method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus in whole blood. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 116–125.
60. Whitman DA, Abbott V, Freglon K, Bowers LD. Recent advances in high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: detection of cyclosporine and metabolites in kidney and liver tissue. *Ther Drug Monit.* 1993; 15: 552–556.
61. Brozemanová H, Komžíková J, Grundmann M. Determination of Cyclosporine A and Primary Metabolites in Blood and Lymphocytes by LC/MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 506.
62. Komžíková J, Grundmann M, Dědochová J, Maršáková P, Martinek A, Brozemanová H. Comparison of Blood and Lymphocytes Levels of Cyclosporine A and Its Metabolites AM1, AM9 and AMN in Early Phase after Renal Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 531.
63. Grundmann M, Brozemanová H, Dědochová J, Komžíková J, Martinek A, Maršáková P. Comparison of Blood and Lymphocytes Levels of Cyclosporine A and Its Metabolites AM1, AM9 and AMN in Stable Renal Transplant Patients. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 531.
64. Falick P, Guldsveth H, Asberg A, Midtvedt K, Reubsaal J. Determination of cyclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B.* 2007; 852: 345–352.
65. Ansermet N, Fathi M, Vouthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clin Biochem.* 2008; 41(10): 910–913.
66. Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, et al. Peak cyclosporine levels (Cmax) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of Neoral and Sandimmune for liver transplantation (NCF-8). *Transplantation.* 1999; 67: 1133–1137.
67. Lindholm A, Kahan BD. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 1993; 54: 205–218.
68. Mahalati K, Boltzky P, Skelton J, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999; 68: 55–62.
69. Mahalati K, Lawen J, Kibend B, Boltzky P. Is 3-hour cyclosporine blood level superior to trough level in early post-renal transplantation period? *Urology.* 2000; 163: 34–41.
70. Blier BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ. Cyclosporin A and FK 506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5: 763–773.
71. Bowers LD, Mathews SE. Investigation of mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. *J Chromatogr.* 1986; 333: 231–238.
72. Brooks CA, Cramer SM, Rosano TG. Preparative chromatographic purification of cyclosporine metabolites. *Clin Chem.* 1993; 39: 457–466.
73. Holt DW, Marwaha G, Jones K, Johnston A. Quality assurance programmes for immunosuppressive drugs. Cyclosporine and beyond. *Ther Drug Monit.* 1993; 15: 472–477.
74. Chan GL, Weinstein SS, LeFor WW, Spoto E, Kahana I, Shles DL. Relative performance of specific and nonspecific fluorescence polarization immunoassay for cyclosporine in transplant patients. *Ther Drug Monit.* 1990; 14: 43–47.
75. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolites in transplant patients. *Pharmacol Ther.* 1993; 57: 291–345.
76. Ansermet N, Fathi M, Vouthey JL, Desmeules J, Hochstrasser D, Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 857(1): 92–99.
77. Geilerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: Recent developments. *Ther Drug Monit.* 2006; 28: 720–725.
78. Poquette MA, Lensmeyer GL, Doran TC. Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in routine clinical laboratory for monitoring sirolimus, tacrolimus, and cyclosporine. *Ther Drug Monit.* 2005; 27: 144–150.

Mgr. Ilona Peřinová, Ph.D.
Ústav klinické farmakologie FNO
17. listopadu 1 790,
708 52 Ostrava-Poruba
ilona.perinova@fnspo.cz

10.4 Brozmanová H, Perinová I, Halvová P, Grundmann M. Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplantat patients. *J Sep Sci.* 2010 Aug;33(15):2287-93. doi: 10.1002/jssc.201000185; IF=2,631

Tato práce je věnována vývoji a validaci metody na simultánní stanovení cyklosporinu A a jeho tři primárních metabolitů (AM1, AM4N a AM9) v krvi a separovaných periferních lymfocytech. Metoda se vyznačuje snadnou přípravou vzorku, která spočívala v precipitaci krve extrakčním činidlem složeným z acetonitrilu a metanolu (40:60, v/v) s malým množstvím síranu zinečnatého v konečné koncentraci 10 mmol/l, izolované lymfocyty byly extrahovány směsí acetonitril/metanol (40:60, v/v). Analyty spolu s interním standardem (cyklosporin D) byly separovány na RP koloně BEH C18 za použití gradientové analýzy. Čas analýzy byl 5 minut Detekce daných látek probíhala na trojitém kvadrupólu a na kvantifikaci cyklosporinu A a jeho metabolitů se použila MRM spektra

Hana Broznanová
 Ilona Peřinová
 Petra Halvová
 Milan Grundmann

Department of Clinical
 Pharmacology of University
 Hospital and Faculty of Health
 Studies, University of Ostrava,
 Ostrava, Czech Republic

Received May 17, 2010

Revised May 18, 2010

Accepted May 18, 2010

Research Article

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients

A LC-MS/MS method was developed and validated for the determination of cyclosporine A (CsA) and its three phase 1 metabolites AM1, AM9, and AM4N in whole blood and lymphocytes isolated on the Histopaque gradient. 200 µL of whole blood was precipitated with 10 mol/L zinc sulfate in acetonitrile/methanol (40:60, v/v) and lymphocytes isolated from 1.5 mL blood were extracted with acetonitrile/methanol (40:60, v/v). The analytes and internal standard cyclosporine D were separated on RP column BEH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 µm using gradient LC-MS/MS analysis in positive electrospray mode. Time of analysis was 5 min. Linearity in blood was 5–2000 µg/L for CsA, AM1, and AM9; 2–500 µg/L for AM4N; and 2–500 µg/L for all substances in lymphocytes. Coefficient of variations was 1.8–9.8% and recovery was 92.0–110.0%. The method was used in early and chronic renal transplant patients for therapeutic drug monitoring of CsA to compare either its share in lymphocytes as target organ or binding to one lymphocyte. The same parameters were calculated for all metabolites tested.

Keywords: Cyclosporine A / LC-MS/MS / Metabolites AM1 / AM9 / AM4N / Renal transplant patients / Therapeutic drug monitoring
 DOI 10.1002/jssc.201000185

1 Introduction

Therapeutic drug monitoring (TDM) of cyclosporine A (CsA) is of great importance to optimize CsA level within a recommended range with both minimal risk of rejection and of drug-induced toxicity. For TDM in transplant patient's blood c0 and c2 of CsA are routinely measured and sparse sampling AUC is used [1–3]. Methods evaluating CsA effect in lymphocytes as the target site of action have been used less often [4–8]. However, measurement of intracellular CsA concentration in lymphocytes may give the same relevant information on the efficacy of CsA as compared with whole blood concentration. Masri *et al.* described significant relationship between blood and lymphocytes CsA concentrations [9]. This dependence may

be an important indicator of CsA immunosuppressive effect resulting in an inhibition of cytokine production (mainly IL-2 and INF-γ), which is necessary for proliferation of lymphocyte. According to their results, only low blood and high lymphocytes concentrations of CsA were optimal for both survival of transplant organ and toxicity, which was in good correlation with clinical status of patients [4]. Falck *et al.* measured CsA concentration in T-lymphocytes in the group of early renal transplant patients and found that rejection is accompanied by significantly lower intracellular level of CsA approximately 1 wk before an acute rejection episode has occurred [8].

CsA treatment is usually associated with various side effects, which can terminate in serious diseases such as hypertension, metabolic disorders and chronic nephrotoxicity [10, 11]. CsA is metabolized by cytochrome P 450 3A system to more than 30 metabolites [12]. On the basis of *in vitro* experiments they are considered to be usually less toxic and less potent than parent drug [13], but their role from the clinical point of view has not been clarified yet. Partial immunosuppressive activity of AM1 [14] and higher nephrotoxicity of secondary metabolites AM19 and AM1c9 [15] to compare with parent drug were found.

Correspondence: Dr. Hana Broznanová, Department of Clinical Pharmacology, University Hospital of Ostrava, 17. listopadu 1970, 708 52 Ostrava, Czech Republic
 E-mail: hana.broznanova@fnspo.cz
 Fax: +420-59-737-4353

Abbreviations: CsA, cyclosporine A; CsD, cyclosporine D; TDM, therapeutic drug monitoring; P-gp, P-glycoprotein

Metabolites presented in circulated blood can significantly influence results of CsA in immunoanalytical methods, which are widely used to be less time consuming. Söldin *et al.* tested some commonly marketed immunoanalytical sets to estimate their cross-reactivity with the six most abundant metabolites of CsA (namely AM1, AM9, AM4N, AM19, AM1c and AM4N9) and the overestimation was between 3 and 17% for a single metabolite [16]. Based on results from our previous papers [17–19], it was found that concentration of CsA in blood in renal transplant patients was lower when through and peak results from RIA were compared with HPLC method. The mean of differences was 8% in through and 43–56% in the period of 0.5–5 h after the administration of CsA [19] despite the fact that RIA is more accurate for the measurement of CsA concentration and has a lower cross-reactivity to all CsA metabolites to compare with the most immunoanalytical methods [20].

The consensus document written on the measurement of CsA as a guide recommends the use of specific CsA measurement [3]. In accordance with this requirement, an LC-MS/MS method, which used detection of specific pairs of parent/fragment ion to obtain maximal analytical specificity, was developed and validated. For each analysis, two blood samples were taken in one time interval, routine sample and the other with verapamil to inhibit P-glycoprotein (P-gp) activity responsible for CsA and the metabolites cell efflux [21]. Percentage shares of CsA and its metabolites in the lymphocytes and binding to one lymphocyte were calculated and compared in early and chronic transplant patients.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and solutions

Methanol and acetonitrile both of HPLC gradient grade, ammonium acetate fractopur, and formic acid extra pure were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water of HPLC grade, zinc sulfate, and Histopaque 1077 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). CsA, cyclosporine D (CsD), and metabolites AM1, AM9, and AM4N were obtained as a gift from Teva Pharmaceuticals s.r.o. (Opava, Czech Republic), prepared as published previously [22, 23] and their purity was above 98% (HPLC) in all cases. Control samples (cyclosporine monoclonal whole blood) 150, 400, and 800 µg/L were obtained from Abbott (Abbott Park, IL, USA). Protein precipitation reagent for lymphocytes was prepared from acetonitrile/methanol (40:60, v/v). Whole blood precipitation was performed with 10% solution of ZnSO₄·7H₂O in acetonitrile/methanol (40:60, v/v) prepared immediately before use (final concentration of zinc sulfate was 10 mmol/L). Stock solutions of CsA, CsD, and the metabolites were prepared in methanol at a concentration of 1 mg/mL and were kept at –20°C until use. A solution of verapamil was prepared at a concentration of 100 µmol/L.

2.2 Preparation of calibration standards and blood samples

Standard samples of CsA and its metabolites AM1 and AM9 at concentrations of 20, 200, 400, 1000, 2000, 4000, and 8000 µg/L were prepared from stock solutions by dilution with methanol. Metabolite AM4N was prepared by the same manner at concentrations of 8–2000 µg/L. Working solution of internal standard CsD at a concentration of 4000 µg/L was used. Standard samples in appropriate concentrations were added into glass test tubes (50 µL for CsA and metabolites) and solutions were dried at temperature of 70°C. To the residues, 50 µL of CsD and 200 µL of whole blood from non-medicated volunteer were added and the standards were prepared to obtain a final concentration of 5–2000 µg/L for CsA, AM1 and AM9 and 2–500 µg/L for AM4N.

For measuring of CsA and its metabolites, two blood samples were taken at each time interval, one normal and another with verapamil (used as the inhibitor of P-gp activity). 200 µL of whole blood and CsD as internal standard were used. The proteins were precipitated by the addition of a protein precipitation reagent for whole blood (0.5 mL) and 200 µL of water for HPLC with separation each time by centrifugation at 1370 × g for 10 min, at 4°C. Similar procedures were carried out with all standard samples.

2.3 Preparation of calibration standards and samples of lymphocytes

Standard samples of CsA and its metabolites were used at concentrations of 8, 20, 200, 400, 1000, and 2000 µg/L. Working solution of the internal standard at a concentration of 2000 µg/L was prepared. All standard samples were added into glass test tubes (50 µL for each compound) and solutions were dried at a temperature of 70°C. Residues were dissolved in 50 µL of CsD solution, 200 µL of precipitation reagent prepared from acetonitrile/methanol (40:60, v/v) and 200 µL of water for HPLC and treated as is shown below.

2.3.1 Isolation of lymphocytes

Lymphocytes were isolated from 1.5 mL of blood on Histopaque gradient by centrifugation at 400 × g for 30 min at 4°C. After centrifugation, the lymphocytes layer was transferred into a clean test tube and rinsed two times by saline. Blood samples should be processed immediately to owe significant decrease in AM1 lymphocytes binding after the first hour. The vials with isolated lymphocytes were stored at –20°C until used.

50 µL CsD, 200 µL of precipitation reagent for lymphocytes, and 200 µL of water for HPLC were added into each vial. The vials were intensively mixed and centrifuged at 1370 × g for 10 min, at 4°C and supernatants were used for the measurement.

Concentrations of CsA and its metabolites in blood and lymphocytes were correlated as follows:

- (i) Lymphocyte shares of CsA and its metabolites were calculated as percentage from concentrations found in 1 mL of the whole blood.
- (ii) As amount of all tested substances in fg bonded on one lymphocyte.

2.4 HPLC equipment and MS detection

LC-MS/MS analysis was performed on a Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) connected to a Quattro Micro API triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK). Analysis was performed using Buffer A (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 5% acetonitrile, v/v/v) and Buffer B (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 95% acetonitrile, v/v/v). The samples were injected on an Acquity UPLC RP BEH (C18) column (1.7 μm ; 2.1 \times 50 mm) using solvent mixture from A/B 80:20 (v/v) to A/B 5:95 for 0.0–3.0 min; from A/B 5:95 (v/v) to A/B 80:20 for 3.0–3.1 min; A/B 80:20 (v/v) for 3.1–5.0 min. The following gradient program was used with a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. The temperature of the column was maintained at 50°C.

Analytes in eluate from the HPLC column were introduced into a capillary sprayer with a desolvation temperature of 420°C in the positive ion mode (ESI). Multiple reaction monitoring with high purity argon as collision gas was used for all tested substances AM1, AM9, AM4N, CsA, and CsD. Capillary voltage was 1.5 kV and cone voltage and collision energy were optimized for each drug. Specific data of precursor/product ions are as follows: the ion transitions were AM1 (1219.1 > 425.6; 397.3), AM9 (1219.1 > 212.4; 449.0), AM4N (1189.0 > 142.2), CsA (1202.8 > 156.2), and CsD (1216.9 > 199.2). The first product ions were used for quantification and in isolaric drug pairs AM1 and AM9 further mass fragments (397.3 m/z for AM1 and 449.0 m/z for AM9) were used as the second ion trace.

As the metabolites AM1 and AM9 coeluted in the same retention time and could not be separated, the secondary ion trace in defined ion ratio was used to meet requirements for unambiguous identification of both drugs. The retention times for AM1, AM9, AM4N, CsA and CsD were 2.1, 2.1, 2.2, 2.5, and 2.6, respectively. MassLynx V 4.1 (Waters) was used to perform data.

2.5 Patients

Early and chronic renal transplant patients were scheduled into this study. The study was approved by the local ethic committee and carried out in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 1996. Informed consent was obtained from each patient. Both groups were under a combined immunosuppressive therapy with CsA (Sandi-

mum Neoral and Equoral) and other drugs (Celcept, Myfortic, Azaprine, Prednison, Imuran). Blood was collected into test tubes with EDTA K3 (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) before and 2 h after the morning dose of CsA. Samples were taken before surgery and in the days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, weekly 2, 3, 4, and monthly 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 (continues every 3 months) in early transplant patients and every 3 months in chronic patients (more than 1 year after surgery). In each time interval, two blood samples were taken. First sample was normal and into the second one 50 μL of 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ solution of verapamil was added. Histopaque gradient was used for the isolation of lymphocytes. Blood samples and separated lymphocytes were kept frozen at -20°C until analysis.

3 Results and discussion

3.1 Sample preparation and matrix effects

As precipitation reagent for lymphocytes, a mixture of acetonitrile/methanol (40:60, v/v) was used. When the same reagent was used for the whole blood samples, the supernatant prepared with the centrifugation at 4°C had to be re-centrifuged at room temperature [24]. With the small amount of 10% solution of zinc sulfate added to precipitation reagent immediately before use, the quality of supernatant was improved and second centrifugation was not necessary. Precipitation of whole blood samples using small amount of zinc sulfate is a widely adopted procedure for immunosuppressive drugs either alone or in combination with further extraction [18, 25, 26]. Simple precipitation of whole blood samples with methanol or acetonitrile is often followed by solid-phase extraction [27] or online sample preparation using column switching or two-dimensional chromatography [28]. Extensive sample preparation is necessary to remove potential interference and minimize ion suppression. According to Taylor, the issue of salt and ion suppression can also be overcome by using a fast gradient [28].

Investigating potential ion suppressive effects attributable either to the matrix or zinc sulfate batch of samples was prepared and tested as follows: (i) protein precipitation reagent for blood with 200 μL of water and (ii) protein precipitation reagents for blood with 200 μL of pool immunosuppressant-free EDTA whole blood, respectively. As a reference solution, precipitation reagent for lymphocytes (acetonitrile/methanol, 40:60) with the same content of water was prepared. All samples were enriched with CsA and its metabolites in concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{L}$. Samples were repeatedly injected (five times) on the column and mean peak areas were compared with corresponding peaks in reference sample. The ratios for blood precipitation reagent and for blood were as follows: CsD 0.97 and 0.98, CsA 1.08 and 1.09, AM1 1.0 and 0.95 and AM4N 0.98 and 1.08. As shown no significant ion suppression occurred to compare with reference reagent.

To determine absolute recoveries, 200 μL of whole blood samples at a concentration of 500 $\mu\text{g/L}$ (CsA, CsD, AM1, AM9 and AM4N) were treated with 500 μL precipitating reagent for blood and 200 μL of water. The peak areas obtained from the extracted blood samples were compared with those obtained after injection of equivalent amounts of compounds dissolved in a mixture of precipitation reagent, water, and whole blood. Mean absolute recoveries for CsA, CsD, AM1, AM9 and AM4N were 72.9, 71.9, 78.4, 77.5, and 72.3%, respectively ($n = 5$).

3.2 Validation of method

Least-square calibration curves for blood were constructed by plotting the peak area ratios of all substances versus the internal standard to standard's concentrations in the working range of 5–2000 $\mu\text{g/L}$ for CsA and two metabolites and up to 500 $\mu\text{g/L}$ in the case of AM4N. Calibration curves for CsA and all metabolites in lymphocytes were linear in the range of 2–500 $\mu\text{g/L}$. The coefficients of correlation were 0.999 for CsA and 0.997–0.998 for the metabolites both in blood and lymphocytes. Chromatograms of all tested drugs are shown in

Fig. 1. Retention times and m/z of single drugs used for quantification are shown.

The lower LOQs in blood, defined as the lowest concentration with acceptable precision (coefficient of variations less than 20%) were determined as 5 $\mu\text{g/L}$ for CsA and AM1 and as 2 $\mu\text{g/L}$ for AM4N. LOQ for all compounds in lymphocytes were set at concentration of 2 $\mu\text{g/L}$. Accuracy and precision for both blood and lymphocytes characterized by an average recovery and coefficients of variation are summarized in Tables 1 and 2. Low, middle, and high tested levels were included.

Between-run precisions was also calculated for QC samples with declared concentration of CsA (low, medium or high), which were used for each analytical run. Coefficients of variations were 5.6, 4.7, and 3.3% for concentrations of 150, 400 and 800 $\mu\text{g/L}$, respectively ($n = 20$).

Correlated results of CsA and its metabolites in whole portion of lymphocytes isolated from 1.5 mL of blood in early and chronic transplant patients are given in Tables 3A and B. Blood samples with verapamil were processed by the same way and no significant differences were found both in through and peak concentrations using the paired non-parametric Wilcoxon test for statistical analysis. The lymphocyte isolation is probably so quick that verapamil

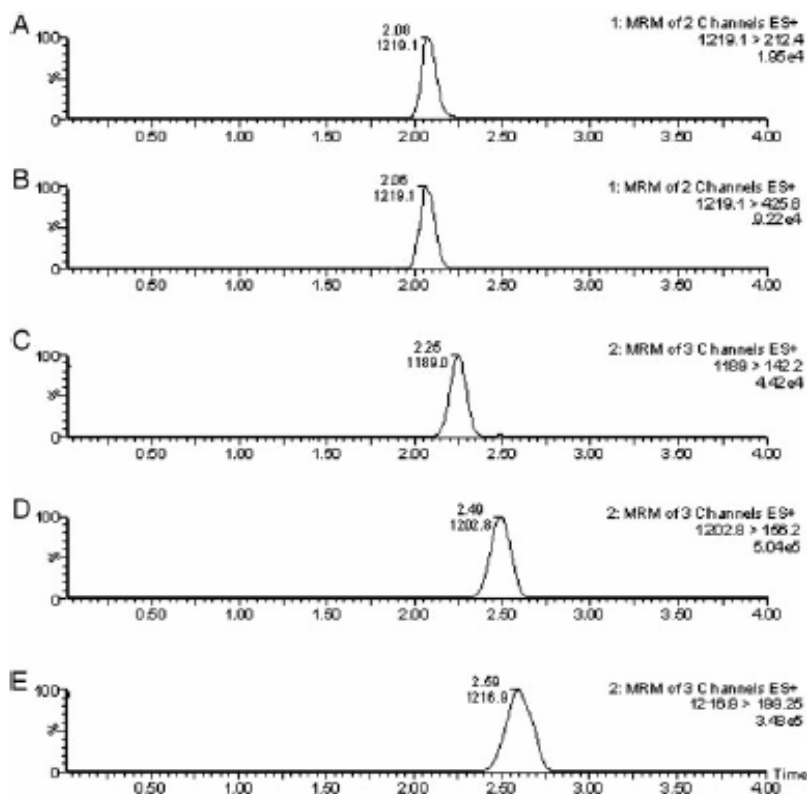


Figure 1. Chromatograms of single drugs: A (AM9), B (AM1), C (AM4N), D (CsA), E (CsD-1S). RT and m/z used for quantification of single drugs is shown.

Table 1. Within-day and between-day accuracy and precision of CsA and its metabolites AM1, AM9 and AM4N in drug-free blood ($n = 12$)

Concentration added ($\mu\text{g/L}$)	Within-day			Between-day		
	Found concentration mean \pm SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	R (%)	Found concentration mean \pm SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	R (%)
CsA						
10	9.9 \pm 0.41	4.1	99.0	9.8 \pm 0.57	5.8	98.0
500	496.9 \pm 19.7	4.0	99.4	532.1 \pm 18.0	3.4	106.4
2000	2009.2 \pm 35.9	1.8	100.5	2019.2 \pm 100.8	5.0	101.0
AM1						
10	10.0 \pm 0.73	7.3	100.0	10.3 \pm 0.81	7.9	103.0
500	500.1 \pm 36.4	7.2	100.0	517.5 \pm 38.6	7.7	103.5
2000	1967.0 \pm 57.8	2.9	98.3	2065.7 \pm 119.6	5.7	104.2
AM9						
10	9.8 \pm 0.55	5.6	98.0	9.9 \pm 0.91	9.1	99.0
500	494.5 \pm 15.2	3.1	98.9	491 \pm 30.5	6.2	98.2
1000	970.9 \pm 44.4	4.6	97.9	961.5 \pm 57.6	6.0	96.1
AM4N						
5	5.0 \pm 0.39	7.7	100.0	5.3 \pm 0.48	9.1	106.0
100	97.0 \pm 4.4	4.4	97.0	109.5 \pm 10.5	9.5	109.5
500	511.4 \pm 24.8	5.0	102.2	517.5 \pm 37.6	7.3	103.5

Table 2. Within-day and between-day accuracy and precision of CsA and its metabolites AM1, AM9 and AM4N in lymphocytes ($n = 12$)

Concentration added ($\mu\text{g/L}$)	Within-day			Between-day		
	Found concentration mean \pm SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	R (%)	Found concentration mean \pm SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	R (%)
CsA						
5	5.4 \pm 0.34	6.6	108.0	5.5 \pm 0.40	7.2	110.0
100	108.1 \pm 5.9	5.4	108.1	95.9 \pm 3.8	4.0	95.9
250	248.6 \pm 14.6	5.9	99.4	240.2 \pm 12.3	5.1	96.0
AM1						
5	4.6 \pm 0.31	6.7	92.0	4.7 \pm 0.41	8.7	94.0
100	98.9 \pm 4.8	4.9	98.9	102.8 \pm 9.8	9.6	102.8
250	246.7 \pm 9.8	4.0	98.7	267 \pm 20.5	7.7	106.8
AM9						
5	4.9 \pm 0.45	9.1	98.0	5.1 \pm 0.49	9.6	102.0
100	99.0 \pm 0.46	6.3	99.0	102.5 \pm 10.1	9.8	102.5
250	251.9 \pm 11.8	4.7	100.7	259.0 \pm 15.6	6.0	103.6
AM4N						
5	5.1 \pm 0.33	6.5	102.0	5.2 \pm 0.38	7.3	104.0
100	99.0 \pm 4.4	4.4	99.0	106.5 \pm 10.3	9.6	106.5
250	241.3 \pm 14.3	5.9	96.5	269.0 \pm 18.6	6.9	107.6

effect on P-gp pump preventing CsA and metabolites efflux is not significant. Falk *et al.* isolated lymphocytes after much longer time period (4h) and CsA concentration without verapamil was not measured [8, 27].

Preliminary results in blood and lymphocytes of 12 renal transplant patients (early and chronic) are summarized in Table 4. Lymphocyte shares of CsA and its metabolites were calculated as percentage from the through concentrations found in 1 mL of the whole blood. High individual variability in all tested parameters is shown.

Figure 2 presents data of through concentrations of all tested substances expressed in fg bounded to one lymphocyte in the same group of patients. Masri *et al.* correlated blood and lymphocytes CsA concentration to obtain the same parameter (binding to one lymphocyte), but concentration of CsA was measured with Abbott FPIA immunological sets based on the use of anti-CsA monoclonal antibodies [4]. As is known this immunological method is less specific with higher metabolites cross-reactivity and the overestimation is about 20–40% [16]. Our method enables to measure CsA and its metabolites in blood and isolated

Table 3. Concentration of CsA and metabolites AM1, AM9 and AM4N (mean \pm SD) in whole portion of lymphocytes isolated from 1.5 mL of blood in normal and verapamil-treated blood samples

Compounds	Blood c0 ng (mean \pm SD)		Blood c2 ng (mean \pm SD)	
	(-)	(+)	(-)	(+)
(A)				
CsA	21.75 \pm 12.1	21.12 \pm 12.11	60.62 \pm 33.71	64.05 \pm 36.46
AM1	38.43 \pm 18.64	43.06 \pm 20.33	47.53 \pm 24.30	44.59 \pm 21.32
AM9	33.34 \pm 14.75	36.40 \pm 15.40	41.22 \pm 13.96	39.31 \pm 15.27
AM4N	11.12 \pm 5.9	11.27 \pm 6.09	13.96 \pm 7.22	13.51 \pm 6.82
(B)				
CsA	11.91 \pm 3.74	11.55 \pm 3.17	36.62 \pm 20.98	36.23 \pm 20.98
AM1	17.78 \pm 13.76	17.19 \pm 13.98	27.95 \pm 18.04	26.34 \pm 19.81
AM9	10.31 \pm 13.11	11.30 \pm 11.56	19.68 \pm 17.54	21.11 \pm 18.84
AM4N	2.17 \pm 3.01	3.33 \pm 4.77	7.82 \pm 5.59	8.35 \pm 7.59

No significant differences were found between verapamil (+) and (-) groups in through (c0) and peak (c2) levels using paired non-parametric Wilcoxon test. A – early renal transplant patients ($n = 57$), B – chronic renal transplant patients ($n = 54$).

Table 4. Through blood concentrations and percentage lymphocyte shares of CsA and its metabolites AM1, AM9 and AM4N (mean \pm SD) in 1 mL of the whole blood are shown

Compounds	Second day after transplantation		One year after transplantation	
	Blood (ng/mL)	Share (%)	Blood (ng/mL)	Share (%)
	(Mean \pm SD)		(Mean \pm SD)	
CsA	222.0 \pm 84.9	1.5 \pm 0.6(0.8–3.2)	104.0 \pm 37.0	1.5 \pm 0.6 (0.8–4.7)
AM1	562.2 \pm 353.8	0.7 \pm 0.6(0–2.4)	360.8 \pm 201.2	0.8 \pm 1.1 (0–3.3)
AM9	643.3 \pm 425.8	0.8 \pm 0.5(0–1.9)	312.1 \pm 201.8	0.8 \pm 1.3 (0–5.9)
AM4N	46.6 \pm 54.3	1.1 \pm 1.6(0–6.3)	15.1 \pm 21.4	2.5 \pm 6.0(0–8.3)

Data from second day and 1 year after transplantation are presented ($n = 12$).

lymphocytes with high specificity and binding to one lymphocyte can be calculated both for CsA and all metabolites tested.

4 Concluding remarks

An LC-MS/MS method that used detection of specific pairs of parent/fragment ions was developed and validated. The method enables to measure CsA and its phase I metabolites in blood and isolated lymphocytes in a short time with high linearity and precision. The accuracy of the method was in the range of 97.0–109.5% in blood and 92.0–110.0% in lymphocytes for all compounds and precision of the assay expressed by within-day and between-day coefficient of variations was between 1.8 and 9.8% in blood and in lymphocytes, respectively. Ion suppressive effects attrib-

table either to the matrix samples or to zinc sulfate was negligible to compare with reference reagent. Mean absolute recoveries for all tested substances were between 71.9 and 78.4%.

Concentration of CsA and its metabolites was measured in blood and lymphocytes simultaneously in the same patient sample and percentage shares of CsA and its three metabolites were calculated in 1 mL of blood comparing blood and lymphocytes levels. Blood samples with verapamil were processed by the same way but no differences were found. The lymphocyte isolation is probably so quick that verapamil effect on P-gp pump preventing CsA and metabolites efflux is insignificant.

The CsA share in lymphocytes is the same as in the beginning of the treatment in early transplant patients to compare with chronic patients and similar results were found in hydrophilic metabolites AM1 and AM9. The share

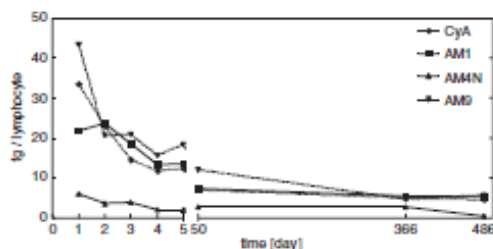


Figure 2. Concentrations of CsA, AM1, AM9 and AM4N in through values expressed at fg bounded to one lymphocyte in early and chronic transplant patients (1 year and more after surgery) ($n = 12$).

of lipophilic AM4N is elevated in chronic transplant patients, but concentration of AM4N in blood is approximately three times lower. The amount of CsA and all metabolites bonded to one lymphocyte decreased during the period after surgery being mainly influenced by low lymphocyte count in the first days after transplantation.

Owing to small amount of blood, rapid analysis and specificity of measurement this method can be used for routine TDM in early and chronic renal transplant patients in an effort to elucidate the role of CsA and its phase 1 metabolites on acute rejection episodes, hypertension and nephrotoxicity.

This work was supported by the grant IGA MZ 1A/8655-5.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Levy, G., Thervet, E., Lake, J., Uchida, K., *Transplantation* 2002, 73, 12–18.
- [2] Keown, P., Kahan, B. D., Johnston, A., Levy, G., Dunn, S. P., Citero, F., Grino, J. M., Hoyer, P. F., Wolf, P., Halloran, P. F., *Transplant. Proc.* 1998, 30, 1645–1649.
- [3] Morris, R. G., Holt, D. W., Armstrong, V. W., Griesmacher, A., Napoli, K. L., Shaw, L. M., *Ther. Drug Monit.* 2004, 26, 227–230.
- [4] Masri, M. A., Barbari, A., Stephan, A., Rizk, S., Kilany, H., Kamel, G., *Transplant. Proc.* 1998, 30, 561–562.
- [5] Barbari, A., Stephan, A., Masri, M., Mours, N., Kamel, G., Kilani, H., Karam, A., Days, I. A., *Transplant. Proc.* 2003, 35, 2742–2744.
- [6] Barbari, A. G., Masri, M. A., Stephan, A. G., Mours, N., El-Ghoul, B., Kamel, G. S., Kilani, H. E., Karam, A. S., *Exp. Clin. Transplant* 2005, 3, 293–300.
- [7] Barbari, A., Masri, M., Stephan, A., Rizk, S., Younan, F. A., *Exp. Clin. Transplant* 2007, 5, 643–648.
- [8] Falck, P., Asber, A., Guldseth, H., Bremer, S., Akhlaghi, F., Reubsæet, J. L. E., Pfeffer, P., Hartmann, A., Midtvedt, K., *Transplantation* 2008, 85, 179–184.
- [9] Masri, M. A., Stephan, A., Barbari, S., Rizk, A., Kamel, G., *Transplant. Proc.* 2002, 34, 2482–2484.
- [10] Jindal, M., Pescovity, M. D., Cummings, O. W., Book, B., Lumeng, L., Milgrom, M. L., Leapman, S. B., Filo, R. S., *Transplantation* 1996, 61, 1657–1658.
- [11] Furlanut, M., Baraldo, M., Galla, M. F., Marzocchi, V., Pes, F., *Pharmacol. Res.* 1996, 33, 349–352.
- [12] Radeke, H. H., Christians, U., Bleck, J. S., Sewing, K. F., *Res. Kidney Int.* 1991, 39, 1255–1266.
- [13] Copeland, K. R., Thliveris, J. A., Yatscoff, R. W., *Ther. Drug Monit.* 1990, 12, 525–532.
- [14] Sadeg, N., Pham-Huy, C., Rucsay, P., Righenzi, S., Halle-Pannenko, O., Claude, J. R., Bismuth, H., Duc, H. T., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1993, 15, 163–177.
- [15] Dai, J., Iwanaga, K., Lin, Y. S., Hebert, M. F., Davis, C. L., Juany, W., Kharasch, E. D., Thummel, K. E., *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 1889–1902.
- [16] Soldin, A. J., Steele, B. W., Witte, D. L., Wang, E., Elin, R. J., *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003, 127, 19–22.
- [17] Šafarčík, K., Broznanová, H., Bartoš, V., Jegorov, A., Grundmann, M., *Clin. Chim. Acta* 2001, 310, 165–171.
- [18] Broznanová, H., Grundmann, M., Šafarčík, K., Jegorov, A., *J. Chromatogr. B* 2000, 749, 93–100.
- [19] Grundmann, M., Perinova, I., Broznanova, H., Koristkova, B., Šafarčík, K., *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* 2010, 48, 87–92.
- [20] Johnston, A., Chusney, G., Schütz, E., Oellerich, M., Lee, T. D., Holt, D. W., *Ther. Drug Monit.* 2003, 25, 167–173.
- [21] Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T., *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 6077–6080.
- [22] Eberle, M. K., Nuninger, F. J., *Org. Chem.* 1992, 57, 2689.
- [23] Jegorov, A., Mat'ha, V., Sedmera, P., Havlíček, V., Stuchlík, J., Seidel, Šimek, P., *Phytochemistry* 1995, 38, 403–407.
- [24] Broznanová, H., Komzárková, I., Grundmann, M., (10th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, September 9–14, 2007 Nice, France) in *Ther. Drug Monit.* 2007, 29, 506.
- [25] Streit, F., Armstrong, V. W., Oellerich, M., *Clin. Chem.* 2002, 48, 955–958.
- [26] Keevil, B. G., Tierney, D. P., Cooper, D. P., Morris, M. R., Machaal, A., *Ther. Drug Monit.* 2002, 24, 757–767.
- [27] Falck, P., Guldseth, H., Asberg, A., Midtvedt, K., Reubsæet, J. L. E., *J. Chromatogr. B* 2007, 852, 345–352.
- [28] Taylor, P. J., *Ther. Drug Monit.* 2004, 26, 215–219.

10.5 Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, Dedochova J, Martinek A, Brozmanova H, Grundmann M. . Quantiferon-CMV test in prediciton of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2010 Nov;42(9):3574-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.101.

Erratum in: *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2838. Grundmann, M [added]; IF=0,993,

Infekce cytomegalovirem (CMV) je hlavním důvodem mortality a morbidity u pacientů užívajících imunosupresivní medikaci. V této práci jsme provedli zhodnocení, zda-li se QuantiFERON-CMV test (Cellestis) dá použít k predikci CMV infekce. Na základě našich dat se ukázalo, že pacienti s vyšší buněčnou imunitní odpovědí měřenou testem QuantiFERON měli nižší riziko manifestace CMV infekce než pacienti s nízkou odpovědí.



Quantiferon-CMV Test in Prediction of Cytomegalovirus Infection After Kidney Transplantation

A. Lochmanova, I. Lochman, H. Tomaskova, P. Marsalkova, J. Raszka, J. Mrazek, J. Dedochova, A. Martinek, and H. Brozmanova

Infection with cytomegalovirus (CMV) is a major cause of morbidity and mortality in immunosuppressed patients, including organ and bone marrow transplant recipients. The majority of CMV disease is caused by reactivation of a latent infection rather than by newly acquired virus. Many techniques have been currently available to aid in the diagnostics of CMV disease. In this report we performed a prospective evaluation of Quantiferon-CMV assay (Cellestis) to determine whether the test is predictive of CMV disease. CD8+ T-cell CMV-specific immunity was assessed in a longitudinal cohort of 14 kidney transplant recipients. According to our data, subjects with higher cellular immune response measured with Quantiferon test had a lower risk of manifestation of CMV infection than subjects with lower responses. Despite the small number of patients and large intra- and interindividual variability of the data in the study, we observed the Quantiferon-CMV assay to be a sensitive specific test to detect a virus-specific T-cell response. We propose that this assay in combination with viral DNA load estimates may prove to be useful to stratify patients at risk of CMV disease.

Cytomegalovirus (CMV) is a member of the human herpes virus family that infects between 50% and 85% of adults in the population, with 50%–90% becoming seropositive by adulthood. Primary CMV infection is always followed by a prolonged inapparent infection during which the virus remains alive (but usually dormant), residing in cells without causing detectable damage or clinical illness. The occurrence of CMV disease is almost exclusively restricted to immuno compromised hosts, namely, organ and bone marrow transplant recipients, hemodialysis patients, cancer patients, patients receiving immunosuppressive drugs, and HIV-infected patients, wherein it is a major cause of morbidity and mortality.^{1,2} The majority of CMV disease is caused by reactivation of a latent infection rather than by newly acquired virus. A series of mechanisms have been proposed to be responsible for CMV reactivation: (1) stress; (2) inflammation; and (3) some cAMP-elevating drugs (eg, pentoxifylline).

CMV infection is a common complication of renal transplantation that significantly contributes to morbidity and mortality among transplant recipients. Virus replication and progression to disease in transplant patients is determined by patient-, graft-, and virus-specific factors. This complex interaction is modulated by the impact on virus-specific cellular immunity of the net state of immunosuppression.

Owing to the increasing potency of immunosuppressive regimens, graft rejection episodes have decreased, but at the expense of an increased susceptibility to infections. Therefore, CMV remains the most important posttransplantation pathogen despite the availability of effective antiviral drugs for prophylactic, preemptive, and therapeutic interventions.^{3–5}

Current immunosuppressive therapies to prevent transplant rejection show detrimental effects upon the T lymphocytes and cell-mediated immune responses, resulting in increased susceptibility to posttransplant infections. The loss of immune control of CMV is closely associated with impaired function of CMV-specific CD8+ T cells, characterized by reduced cytokine production, rather than a lower frequency or absolute number of CMV-specific CD4+ or CD8+ T cells, which is thought to be responsible for the loss of immune control. Reduced numbers of cytokine-producing CMV-specific CD8+ T cells have been observed in individuals with greater risk of CMV reactivation.

From the Institute of Public Health, Ostrava, Czech Republic. Address reprint requests to Alexandra Lochmanova, PhD, Department of Immunology and Allergy, Institute of Public Health, Partyzanske nam. 7, Ostrava 702 00, Czech Republic. E-mail: alexandra.lochmanova@zuova.cz

0041-1345/10/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2010.07.101

© 2010 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

3574

Transplantation Proceedings, 42, 3574–3577 (2010)

tion.⁶⁻⁸ A CMV-naive recipient receiving an allograft from a CMV-seropositive donor is at highest risk of CMV-related complications, because of the absence of a primed CMV-specific immune response. CMV-seropositive recipients are at risk of CMV reactivation disease.⁹

Two main strategies are used to prevent CMV. Universal prophylaxis is used for all patients at risk for disease, namely, seropositivity of the donors and/or the recipients. An alternative to prophylaxis is a preemptive strategy that uses periodic screening for occult CMV viremia demanding initiation of early treatment. Anti-CMV agents in current use are ganciclovir, foscarnet, and cidofovir. The choice of the preventive strategy varies among institutions, in some cases reflecting a cost-benefit analysis.¹⁰

CMV infection elicits a strong virus-specific cytotoxic T-cell response. Previous studies have shown that the interferon (IFN) γ response to CMV antigens may have predictive value.¹¹ In the present report, we performed a prospective evaluation of Quantiferon-CMV assay (Cellestis) to determine whether measurement of CD8+ T-cell mediated immunity (CMI) was predictive of viral disease.

MATERIALS AND METHODS

CD8+ T-cell CMV-specific immunity was assessed in a longitudinal cohort of 14 kidney transplant recipients using the Quantiferon test. Responsive T cells in whole blood were stimulated with specific antigen (CMV) or mitogen phytohemagglutinin (PHA) with subsequent quantification of the released IFN- γ by a rapid single-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The patient cohort consisted of 8 women and 6 men of age range 23-75 years (mean, 53). Their donor/recipient (D/R) CMV serostatus was D-/R+ (n = 1); D+/R+ (n = 11) or D+/R- (n = 2). In total, 178 blood samples were collected from the 14 kidney transplant recipients. Peripheral blood samples from each patient were assessed before transplantation with subsequent samples obtained according to a predefined schedule. Patient entry into the study from the June 21, 2006, to May 12, 2008, and they were followed 75-840 days after transplantation.

The Quantiferon-CMV assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, it uses specialized whole blood collection tubes, including a nil control tube, a mitogen (PHA) tube, and a CMV antigen tube. The tubes were delivered to the laboratory as soon as possible after the collection. Following 16-24 hours incubation at 37°C, the tubes were centrifuged, plasma harvested, and IFN- γ (IU/mL) measured by ELISA. The mitogen tube served both as a positive control and as an indicator of the individual's immunestatus.

In addition to the Quantiferon-CMV assay, all patients were screened both serologically and by detection of CMV-specific DNA via real-time polymerase chain reaction (PCR). CMV-specific antibodies (IgM, IgG, IgA) were determined by complement-fixation tests (CFT) and enzyme immunoassays. Total avidity was assessed using a commercial enzyme immunoassay kit, ELISA-Viditest anti-CMV (TestLine), using pp65 as the coating antigen. CMV load in the blood assessed by real-time PCR ReSSQ CMV Assay (LightUp) was reported as copies/mL. The CMV DNA assay was performed only when we suspected CMV infection or reactivation.

RESULTS

Patient data are summarized in Table 1. According to CMV-DNA positivity and CMV infection history, patients were divided into 3 categories: 1) CMV status 0, no history of CMV infection; 2) CMV status 1, history of CMV load <500 copies/mL proven at least once during the follow-up; and 3) CMV status 2, CMV load >5,000 copies/mL observed at least once during the follow-up.

Compared with the other 2 groups (CMV statuses 1 and 2), patients with no history of CMV infection (CMV status 0) produced significantly greater amounts of IFN- γ after mitogen (PHA) stimulation (Fig 1). Due to abnormal data distribution, we used a 2-sample Wilcoxon rank sum (Mann-Whitney) test with a 5% level of significance to verify this hypothesis. No significant differences were observed between the status groups for this parameter.

Similarly, patients with low CMV viral loads (CMV status 1) showed significantly higher levels of IFN- γ production toward CMV antigens compared with patients displaying high CMV viral loads (CMV status 2 group; Fig 2). Two-sample Wilcoxon rank sum (Mann-Whitney) test at the 5% level of significance did not confirm this hypothesis; no significant differences were observed between status groups for this parameter.

DISCUSSION

It is generally known that long-term use of immunosuppressants affects a patient's immune system. Current immunosuppressive therapies to prevent transplant rejection show detrimental effects upon T lymphocytes and cell-mediated immune responses, resulting in increased susceptibility to CMV infection. Moreover, the majority of donors and recipients have latent CMV infection at the time of transplantation. Infection can occur as result of reactivation of latent virus or a new infection from donor tissues. Thus donor CMV positivity, especially in the absence of prior recipient infection, is the most important risk factor for posttransplant infection. It is clear that preexistent immunity modifies the course of infection.⁷

CMV elicits both humoral and cellular immune responses, although the latter appear to be more critical for viral control. Because CMV replication is largely controlled

Table 1. Characteristics of the Study Population

Gender, male/female	8/6
Age, y (min-max)	53 (27-75)
Time period of enrolling into the study	21.6.06-12.5.08
Monitoring period, d (min-max)	334 (85-740)
Blood collection (number/patient)	8/19
Analyzed samples (total number)	178
Patients with low "protection" level of antibodies	3
CMV-positive donors	13
Patients with confirmed CMV infection (PCR)	4 (28.6%)
Patients suspected of CMV infection (PCR)	3 (21.4%)
Time to development of CMV disease from transplantation to infection confirmation, d (min-max)	60 (29-90)

by cellular immunity, an analysis of virus-specific T-cell responses is more likely to have predictive value than a serologic assessment.^{12,13} Many techniques are currently available to aid in the diagnosis of CMV disease, but there are only a few studies in the literature that use the Quantiferon-CMV assay to delineate CMV-specific immune responses.^{9,14}

The immune system is a dynamic interplay of positive and negative regulatory mechanisms that are affected by both the patient's individual responses and the underlying clinical condition. Because the Quantiferon-CMV assay is performed on whole blood, the presence of additional professional antigen-presenting cells in this matrix may improve the activation threshold for cytokine synthesis by virus-specific T cells, resulting in enhanced IFN- γ responses.

Comparing patients with a history of CMV disease with those without it, the magnitude of the response to CMV peptides and the individual risk of disease development was higher among patients with persistently low or negative responses to CMV proteins compared with those showing a sufficient IFN- γ response. This response correlated with the IFN- γ production after mitogen stimulation, even though the highest IFN- γ production was seen among the patients with no history of CMV infection. Generalized defects in T-cell responsiveness to mitogens and antigens have been related to abnormalities of the T-cell receptor repertoire.¹⁵ Global impairment of proliferative responses to recall antigens have also been observed in some neoplastic diseases and chronic inflammatory conditions. It has been speculated that the natural stimulus for reactivation in immunocompetent hosts is an immune response to infection and that allogeneic transplantation mimics this process.^{16,17}

According to our data, subjects with greater cellular immune responses as measured with the Quantiferon-CMV test were at lower risk for manifestation of CMV infection than subjects with lower responses. The mechanisms by which CMV reactivates from latency are not well understood; but preexistent immunity has a cardinal importance

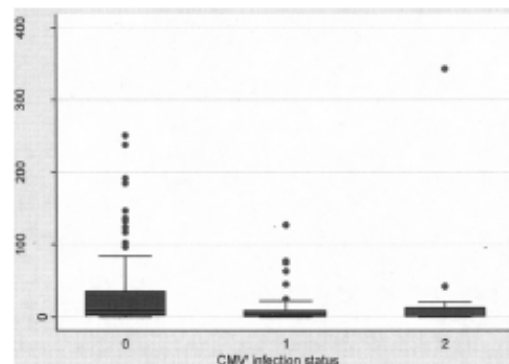


Fig 1. IFN- γ response to mitogen (PHA) measured by the Quantiferon-CMV test.

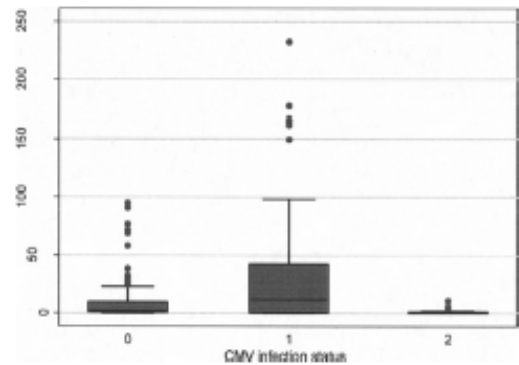


Fig 2. IFN- γ response to CMV antigen measured by the Quantiferon-CMV test.

for the course of infection. The most significant disease was observed among recipients with permanent unresponsiveness toward both CMV antigens and mitogen.

Our study had some limitations, namely, the small number of patients, the large intra- and interindividual variability, and the abnormal data distribution, which did not enable the most robust statistical analysis. Further studies should be performed in larger groups of patients.

In summary, we determined that Quantiferon-CMV assay seemed to be a sensitive specific test to detect virus-specific T-cell responses. We propose that this assay in combination with viral DNA load may prove to be useful to stratify patients at risk of CMV disease. Future research will focus on establishing whether these immunologic assays will inform us as to which patients are at high risk for CMV reactivation and disease.

REFERENCES

1. Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G: Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 65:500, 2004
2. Pescovitz MD: Review of the CMV in renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 18:505, 2007
3. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, et al: Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 22(suppl 8):viii72, 2007
4. Naumnik B, et al: Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 39:2748, 2007
5. Kowalski RJ, et al: Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 82:663, 2006
6. Stone SF, Price P, French MA: Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. *J Antimicrob Chemother* 57:585, 2006
7. Hughes D, et al: Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: an analysis of 486 patients. *J Clin Virol* 41:92, 2008
8. Singh KP, et al: Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4+ T cell recovery. *Clin Immunol* 124:200, 2007

9. Westall GP, Mifsud NA, Kotsimbos T: Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant* 8:1749, 2008
10. Weikert BC, Blumberg EA: Viral infection after renal transplantation: surveillance and management. *Clin J Am Soc Nephrol* 3(suppl 2):S76, 2008
11. Bunde T, et al: Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 201:1031, 2005
12. Kumar D, et al: Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9:1214, 2009
13. Moss P, Khan N: CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol* 65:456, 2004
14. Walker S, et al: Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using Quantiferon-CMV. *Transpl Infect Dis* 9:165, 2007
15. Lim JB, et al: Adoptive immunotherapy for cytomegalovirus (CMV) disease in immunocompromised patients. *Yonsei Med J* 45(suppl):18, 2004
16. Huissoon AP, et al: Loss of cytomegalovirus-specific immunological memory in a patient with thymoma. *Clin Exp Immunol* 129:297, 2002
17. Hummel M, Abecassis MM: A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol* 25(suppl 2):S123, 2002



ERRATA

Regarding the article "Effect of CD4+ Memory T Cells on Rejection Response of Ectopic Heart Transplantation in Mice" by Y. Zhao, Z. Shan, Q. Li, Y. Zhou, X. Zeng, Q. Fan, C. Liao, Y. Zhu, Y. Zhao, X. Lu, J. Liu, *Transplant Proc* 2011 Jun;43(5):1989–93.

In the author byline on page 1989, **Y. Zhao** incorrectly appears twice and should be removed from the first appearance. Hence, the corrected author line should be: **Z. Shan, Q. Li, Y. Zhou, X. Zeng, Q. Fan, C. Liao, Y. Zhu, Y. Zhao, X. Lu, and J. Liu.**

doi:10.1016/j.transproceed.2011.06.071

Regarding the article "Adiponectin Gene Polymorphisms Are Associated With Posttransplantation Diabetes Mellitus in Chinese Renal Allograft Recipients," by A.-R. Yu, H.-W. Xin, X.-C. Wu, X. Fan, H.-M. Liu, G. Li, and Y. Bai, *Transplant Proc* 2011 Jun;43(5):1607–11.

In the affiliation footnote at the bottom of page 1607 the city for the first affiliation is incorrectly listed as Huazhong, the correct city is **Wuhan**. Therefore, the correct affiliation should read: **School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, PR China.**

doi:10.1016/j.transproceed.2011.07.001

Regarding the article "Quantiferon-CMV Test in Prediction of Cytomegalovirus Infection after Kidney Transplantation," by Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, Dedochova J, Martinek A, Brozmanova H, *Transplant Proc* 2010 Nov;42(9):3574–7.

In the author byline on page 3574, **M. Grundmann** should be added as the last author on the article. Also in the footnote on page 3574 the following statement should appear as the second paragraph: **This study was supported by a grant received from IGA MZ IA/8655-5.**

doi:10.1016/j.transproceed.2011.07.021

10.6 Halvová P, Kacířová I, Brozmanová H, Grundmann M. Vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. *Klin Farmakol Farm* – přijato k tisku

V této práci bylo naším cílem studie porovnat vztah mezi koncentrací CsA a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech a poklesem krevního tlaku v noci (tzv. „dipping“). V průběhu celé studie dosahoval průměrný krevní tlak v denních hodinách hodnot $128 \pm 11 / 75 \pm 10$ mmHg, během nočních hodin $124 \pm 15 / 70 \pm 11$ mmHg. Průměrné koncentrace CsA se v krvi pohybovaly v rozmezí 90.5 ± 40.1 μ g/l ve skupině „dipper“ a 97.3 ± 44.5 μ g/l ve skupině „non-dipper“, v lymfocytech 11.4 ± 4.0 μ g/l („dipper“) a 11.8 ± 5.0 μ g/l („non-dipper“). Jediný statisticky významný rozdíl ($p=0.0339$) mezi skupinami byl nalezen u metabolitu AM4N, jehož koncentrace v lymfocytech byla ve skupině „non-dipper“ více než 4-násobná („dipper“ 0.4 ± 0.8 μ g/l, „non-dipper“ 1.7 ± 2.6 μ g/l).

Vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku

Petra Halvová^{1,2}, Ivana Kacířová^{1,2}, Hana Brozmanová^{1,2}, Milan Grundmann²

¹Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

²Ústav klinické farmakologie Lékařské fakulty Ostravské univerzity, Ostrava

Korespondující autor:

Doc. MUDr. Milan Grundmann, CSc.

Ústav klinické farmakologie

Lékařská fakulta

Ostravská univerzita

Syllabova 19

703 00 Ostrava

tel: +420 597 37 4389

e-mail: milan.grundmann@osu.cz

Abstrakt

Úvod: Cyklosporin A je účinné imunosupresivum používané při transplantacích včetně transplantace ledvin. Jedním z jeho nežádoucích účinků je ovlivnění denní variability krevního tlaku, a to jeho signifikantním zvýšením v nočních hodinách. Klíčovým faktorem u pacientů po transplantaci ledvin je dobrá kompenzace krevního tlaku, přičemž k ověření může být užitečným nástrojem jeho 24-hodinové ambulantní monitorování (ABPM). Cílem studie bylo porovnat vztah mezi koncentrací CsA a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech a poklesem krevního tlaku v noci (tzv. „dipping“).

Metoda: Soubor zahrnoval 31 pacientů (16 mužů, 15 žen) s průměrným věkem 54 ± 12 roků a průměrnou hmotností 75 ± 16 kg. Koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů (AM1, AM9 a AM4N) v krvi a lymfocytech před užitím byly stanoveny metodou LC-MS/MS. ABPM bylo prováděno přístrojem Spacelabs 90207-Q, celkem 3x v 1-ročních intervalech. Pacienti byli rozděleni podle nočního poklesu krevního tlaku do 2 skupin – „dipper“ (26 měření) a „non-dipper“ (pokles $< 10\%$, 25 měření). Ke statistické analýze byl použit program GraphPad Prism 5.00 pro Windows.

Výsledky: V průběhu celé studie dosahoval průměrný krevní tlak v denních hodinách hodnot $128 \pm 11 / 75 \pm 10$ mmHg, během nočních hodin $124 \pm 15 / 70 \pm 11$ mmHg. Průměrné koncentrace CsA se v krvi pohybovaly v rozmezí 90.5 ± 40.1 $\mu\text{g/l}$ ve skupině „dipper“ a 97.3 ± 44.5 $\mu\text{g/l}$ ve skupině „non-dipper“, v lymfocytech 11.4 ± 4.0 $\mu\text{g/l}$ („dipper“) a 11.8 ± 5.0 $\mu\text{g/l}$ („non-dipper“). Jediný statisticky významný rozdíl ($p=0.0339$) mezi skupinami byl nalezen u metabolitu AM4N, jehož koncentrace v lymfocytech byla ve skupině „non-dipper“ více než 4-násobná („dipper“ 0.4 ± 0.8 $\mu\text{g/l}$, „non-dipper“ 1.7 ± 2.6 $\mu\text{g/l}$).

Závěr: 400% nárůst lipofilního metabolitu AM4N v lymfocytech v odběru před užitím může být u pacientů po transplantaci ledvin jak příčinou tak markerem pro výskyt „non-dippingu“.

Klíčová slova: Cyklosporin A | Metabolity | Hypertenze | ABPM

Abstract

Background:Cyclosporine A (CsA) is a potent immunosuppressive agent used after organ transplantation, including renal transplantation. CsA has been shown also to affect blood pressure (BP) diurnal variation by significantly increasing nighttime blood pressure. Tight blood pressure control is a key objective in renal transplant patients, and for this purpose ABPM might be a useful tool. The aim of study was to compare the relationship between blood and lymphocytes concentrations of CsA and its metabolites in patients with “dipping” or “non-dipping” status.

Methods:31 stable renal transplant patients (16 men, 15 women) were involved in this study. The mean patient age was 54 ± 12 years and the mean weight 75 ± 16 kg. Trough (C_0) concentrations of CsA and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N were estimated in blood and lymphocytes using LC-MS/MS method. All patients had their ABPM performed. The patients were divided in 2 groups – “dippers” (26 measurements) and “non-dippers” (with nocturnal blood pressure fall $<10\%$, 25 measurements). GraphPad Prism version 5.00 for Windows was used for statistical analysis. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results:The mean of BP was during the daytime $128\pm 11/75\pm 10$ mmHg and $124\pm 15/70\pm 11$ mmHg during sleep. The mean cyclosporine trough level was 90.5 ± 40.1 μ g/L (“dippers”) and 97.3 ± 44.5 μ g/L “non-dippers” in blood and 11.4 ± 4.0 μ g/L (“dippers”) and 11.8 ± 5.0 μ g/L “non-dippers” in lymphocytes. There was found only one statistically significant difference ($p=0.0339$) of AM4N concentrations in lymphocytes between “dippers” (0.4 ± 0.8 μ g/L) and “non-dippers” (1.7 ± 2.6 μ g/L).

Conclusions:400% increase of lipophilic metabolite AM4N in lymphocytes in C_0 should be the cause and/or predictor of “non-dipping” status in renal transplant patients.

Key Words: Cyclosporine A | Metabolites | Hypertension | ABPM

Úvod

Arteriální hypertenze se vyskytuje u 60-80% pacientů po transplantaci ledvin (1). Často se u pacientů, kteří jsou déle než rok po transplantaci, vyskytuje abnormální cirkadiální rytmus krevního tlaku (TK), který se s narůstajícím časem neupravuje (2-4). K posttransplantační arteriální hypertenzi mohou přispívat různé faktory: a) dysfunkce štěpu při akutní rejekci nebo chronická nefropatie štěpu; b) léčba kortikosteroidy, kalcineurinovými inhibitory nebo jejich kombinací; c) vlastní onemocnění ledvin; d) stenóza renální arterie; a e) esenciální hypertenze (5). Míra přežití štěpu je výrazně závislá jak na systolickém, tak diastolickém tlaku krve. Proto hraje arteriální hypertenze hlavní roli v rozvoji selhání štěpu (6) a je významným ukazatelem akutní rejekce (7). Funkce štěpu je rovněž snížena v případech, kdy přetrvává „non-dipper“ profil (tzn. ztráta nočního poklesu TK), který je během pozdní posttransplantační fáze obvykle spojen s onemocněním ledvin: stenózou renální arterie štěpu, chronickou rejekcí atd. (8). Nejvyšší hodnoty krevního tlaku v průběhu 24-hodinového období mohou být zaznamenány v noci a jsou někdy spojeny s krvácením do sítnice a poškozením v oblasti centrálního nervového systému. Ztráta nočního poklesu TK je spojena s vyšším výskytem hypertrofie levé komory, centrální mozkové příhody lakunárního typu a mikroalbuminurie. Noční zvýšení krevního tlaku tak může predisponovat pacienty po transplantaci k urychleným aterosklerotickým komplikacím (9). Mezi příjemci ledvinových štěpů je běžné zastoupení „non-dipper“ hypertoniků s prevalencí více než 90%, ačkoli různé studie používají pro „non-dipper“ různé definice (8). Příčina noční hypertenze není jasná, podle současných důkazů má vztah k základnímu parenchymovému nebo vaskulárnímu onemocnění ledvin nebo k imunosupresivní terapii cyklosporinem A (CsA) a kortikoidy (1, 10). Cyklosporin A je účinná imunosupresivní látka široce používaná při orgánových transplantacích včetně transplantace ledvin (11), která je výrazně metabolizovaná cytochromem P450 3A na více než 30 metabolitů (12). Tyto metabolity jsou na základě *in vitro* experimentů obvykle považovány za méně toxické a méně účinné než mateřská látka, částečná imunosupresivní aktivita byla nalezena u metabolitu AM1 (13), AM9 a AM4N (14), vyšší nefrotoxicita pak u sekundárních metabolitů AM19 a AM1c9 (15-17). Vedlejší účinky CsA, což je kromě nefrotoxicity také hypertenze, přispívají u příjemců k dlouhodobému selhávání štěpu a kardiovaskulární morbiditě (18). Důvodem hypertenze je CsA indukovaná rozsáhlá vazokonstrikce v systémové cirkulaci a nárůst arteriálního tlaku, základem

nefrotoxicity pak vazokonstrikce v ledvinách, která vede ke sníženému průtoku krve (9). Vzestup krevního tlaku při užívání CsA byl ve dříve provedených studiích ve srovnání s placebem statisticky významný a je také zřejmě závislý na dávce - nižší dávky (1-4 mg/kg/den) zvyšovaly střední krevní tlak průměrně o 5mmHg, zatímco vyšší dávky (>10 mg/kg/den) průměrně o 11mmHg (19). Některými autory již bylo prokázáno, že CsA ovlivňuje denní kolísání krevního tlaku jeho signifikantním zvýšením v noci (3, 10, 20), nicméně Kooman et al. a Haydar et al. uvádějí, že jediným nezávislým ukazatelem kolísání TK během dne je věk pacienta a rychlost glomerulární filtrace (21, 22). 24-hodinové ambulantní monitorování krevního tlaku (ABPM) je u pacientů po transplantaci ledviny citlivějším měřítkem hypertenze a lepším ukazatelem hypertrofie levé komory a renálních funkcí než kazuální TK (měřený v ambulanci) (4, 23). Klíčovým faktorem u pacientů po transplantaci ledvin je správná kontrola krevního tlaku, k čemuž může být ABPM velmi užitečným nástrojem (8). V předcházející studii jsme zjistili, že u některých pacientů v akutní fázi po transplantaci ledvin došlo k opožděné normalizaci funkce graftu provázené 20-násobným vzestupem metabolitu AM4N v krvi i v lymfocytech (24). Cílem této práce bylo zjistit, zda se podílí hladina cyklosporinu A a jeho tří základních metabolitů (zejména AM4N) na ovlivnění diurnální variability krevního tlaku.

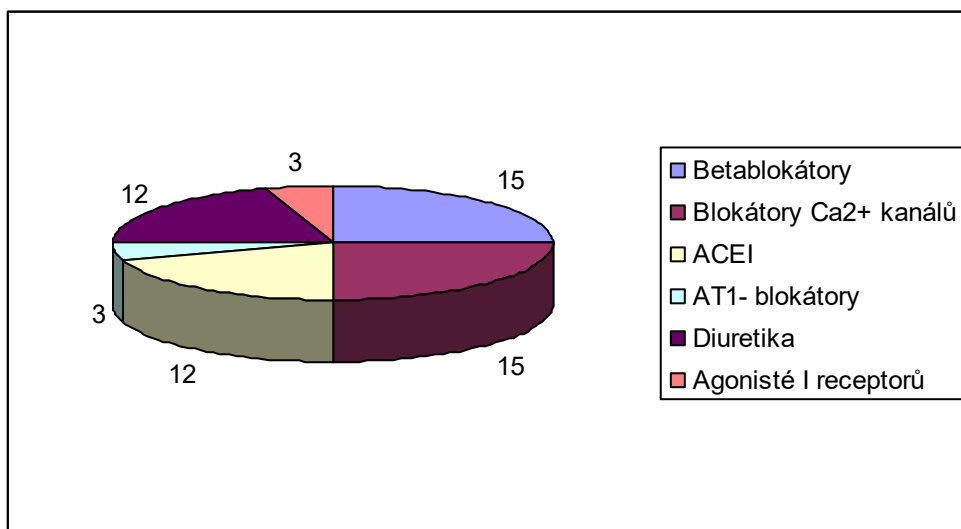
Metoda

Studie se zúčastnilo celkem 31 pacientů po transplantaci ledviny, z toho 16 mužů a 15 žen o průměrném věku 54 ± 12 roků, průměrné hmotnosti 75 ± 16 kg a průměrné výšce 167 ± 11 cm. Pacienti obdrželi podrobné informace a podepsali Informovaný souhlas, studie byla schválena Etickou komisí FN Ostrava. Pacienti byli vyšetřeni na Ústavu klinické farmakologie, kde byly provedeny odběry na stanovení hladiny CsA a jeho tří primárních metabolitů (AM1, AM9 a AM4N) v krvi a v lymfocytech podle námi vypracované metodiky (25). Dále bylo pacientům provedeno ABPM (na přístroji Spacelabs 90207-Q). Sledování bylo provedeno 3x v 1-ročních intervalech. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle toho, zda došlo k poklesu nočního tlaku („dipper“ - D) či nikoliv („non-dipper“ - N, pokles nočního tlaku < 10%).

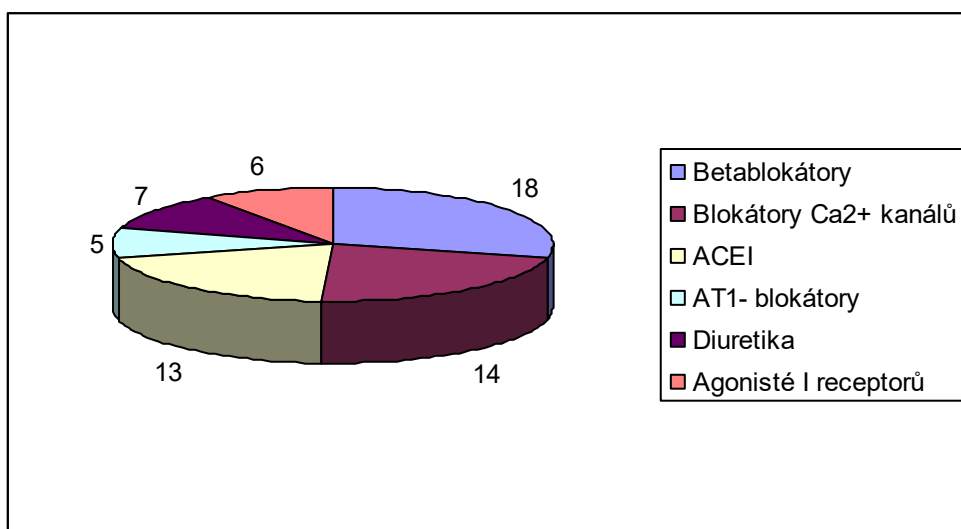
V průběhu studie užívali pacienti kromě cyklosporinu A další imunosupresivní medikaci a to kyselinu mykofenolovou v 80%, azatioprin a everolimus v 6% a kortikosteroidy ve 24%.

Antihypertenzivní medikace užívaná pacienty v celém průběhu studie a zaznamenaná během 3 vyšetření je uvedena pro jednotlivé skupiny v grafu 1 a 2.

Graf 1 Antihypertenzivní medikace ve skupině „dipper“



Graf 2 Antihypertenzivní medikace ve skupině „non-dipper“



Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování byl použit program Graph Pad version 5.00 pro Windows. Za statisticky signifikantní byla považována hodnota $p < 0,05$. Všechna data byla testována D'Agostinovým-Pearsonovým testem normality dat. Na základě tohoto testu pak byla data porovnávána nepárovým t-testem (v případě Gaussova rozložení) nebo neparametrickým Mann-Whitney testem. Rozdíl v anihypertenzivní medikaci mezi skupinami byl testován χ^2 -testem.

Výsledky

Prvního vyšetření se zúčastnilo 31 pacientů (skupina „non-dipper“ 13 pacientů), druhého vyšetření 16 pacientů (skupina „non-dipper“ 8 pacientů) a třetího vyšetření 4 pacienti (skupina „non-dipper“ 4 pacienti). Po rozdělení všech pacientů do dvou skupin jsme zaznamenali 25 měření pacientů skupiny „non-dipper“ a 26 měření pacientů skupiny „dipper“.

1. Kompenzace TK

V průběhu celé studie dosahoval průměrný krevní tlak v denních hodinách hodnot $128 \pm 11 / 75 \pm 10$ mmHg, během nočních hodin $124 \pm 15 / 70 \pm 11$ mmHg. Průměrné hodnoty TK a pulsová frekvence během 24-hodinového měření (ABPM) při jednotlivých vyšetřeních jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Průměrné hodnoty krevního tlaku a pulsová frekvence při 24-hodinovém měření (ABPM) při jednotlivých vyšetřeních; STK - systolický krevní tlak, DTK - diastolický krevní tlak

číslo vyšetření	den			noc		
	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min
1	129±14	76±11	75±7	125±18	71±13	65±7
2	126±7	74±7	70±8	122±10	68±8	61±8
3	125±4	75±7	71±3	126±3	73±7	61±3

Po podrobném rozboru jednotlivých měření byli pacienti rozděleni na skupinu „dipper“ a „non-dipper“. Průměrné hodnoty TK a pulsově frekvence během 24-hodinového měření (ABPM) u obou skupin jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Průměrné hodnoty krevního tlaku a pulsově frekvence při 24-hodinovém měření (ABPM) ve skupině „dipper“ a „non-dipper“ ; STK - systolický krevní tlak, DTK - diastolický krevní tlak

skupina	den			noc		
	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min	STK (mmHg)	DTK (mmHg)	puls/min
„dipper“	128±11	75±10	72±7	115±12	65±10	62±6
„non-dipper“	129±12	76±10	73±8	132±15	75±10	65±9

Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v antihypertenzivní terapii mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“, $p=0,6859$ (garf číslo 1 a 2).

2. Porovnání koncentrace CsA a metabolitů mezi skupinami

Při porovnání naměřených koncentrací jsme nenašli žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ v případě CsA ani primárních metabolitů AM1 a AM9, jediný statisticky významný rozdíl ($p=0.0339$) byl nalezen u metabolitu AM4N, jehož koncentrace v lymfocytech byla ve skupině „non-dipper“ 4-násobná (tabulka 3 a 4)

Tabulka 3 Koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů ($\mu\text{g/l}$) v krvi („dipper“ - D, „non-dipper“ - N)

	CsA		AM1		AM9		AM4N	
	D	N	D	N	D	N	D	N
No	26	25	26	25	26	25	26	25
mean±SD	90.5±40.1	97.3±44.5	230.0±138.2	219.4±191.0	199.6±193.8	142.1±140.0	8.3±14.8	13.6±19.2

Tabulka 4 Koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů (μg/l) v lymfocytech
(„dipper“ - D, „non-dipper“ – N)

	CsA		AM1		AM9		AM4N	
	D	N	D	N	D	N	D	N
No	25	25	25	25	25	25	25	25
mean±SD	11.4±4.0	11.8±5.0	10.1±10.9	14.0±15.3	7.4±6.7	10.6±13.0	0.4±0.8	1.7±2.6*

***p=0.0339**

Diskuse

ABPM je nejen důležitým nástrojem při diagnostice hypertenze a ke zhodnocení účinnosti léčby, ale umožňuje také odhalit abnormální cirkadiální kolísání krevního tlaku. Pokles nočního tlaku krve o >10% oproti denním hodnotám (tj. poměr krevního tlaku noc/den < 0,9) je všeobecně akceptován jako hranice, aby mohl být pacient označen jako „dipper“ (26). Odhaduje se, že normální cirkadiální rytmus je zachován zhruba u 70% pacientů užívajících anihypertenzivní terapii (27). Nejčastěji se jako normální TK při ABPM udává průměrný denní TK < 135/85 mm Hg, průměrný noční TK < 120/70 mm Hg a 24hodinový průměrný TK < 130/80 mm Hg (28). Z tohoto pohledu byl průměrný TK v námi sledovaném souboru v průběhu dne dobře kompenzován, v noci však u části pacientů k poklesu krevního tlaku nedošlo. Statistické zpracování prokázalo, že jediný významný rozdíl mezi skupinou „dipper“ a „non-dipper“ byl nalezen mezi koncentracemi metabolitu AM4N v lymfocytech před podáním cyklosporinu A, kdy byla v lymfocytech skupiny „non-dipper“ koncentrace významně vyšší (p = 0.0339). K potransplantační hypertenzi přispívají mnohé faktory mezi které patří i užívání kalcineurinových inhibitorů, jako je CsA a takrolimus (29). CsA snižuje průtok krve ledvinami vazokonstrikcí aferentních cév. Tento jev může nastat již po jedné dávce a určitý stupeň renální vazokonstrikce se pravděpodobně vyskytuje u všech osob léčených CsA. Vazokonstrikce vyvolává snížení glomerulární filtrace, zvýšení reabsorpce sodíku, oligurii a nárůst sérového kreatininu spolu s dalšími klinickými projevy jako je hyperkalemie, tubulární acidóza a hypertenze. Bylo zjištěno, že tyto akutní hemodynamické účinky jsou funkční, reversibilní a závislé na dávce (30). CsA je výrazně metabolizován systémem cytochromu P4503A na více než 30 metabolitů (12). Na základě *in vitro* pokusů

jsou tyto metabolity považovány za méně toxické a méně účinné než mateřská látka. Příspěvek metabolitů k imunosupresivní aktivitě CsA *in vivo* ve srovnání s *in vitro* studiemi je ovlivněn různými faktory jako je farmakokinetika, distribuce, afinita k vazebným proteinům, koncentrace a interakce metabolitů (31). Částečný imunosupresivní účinek byl nalezen u metabolitu AM1, AM9 a AM4N (14). Nefrotoxický potenciál jednotlivých metabolitů se v jednotlivých studiích provedených *in vitro* liší. Copeland et al. zkoumal vliv CsA a metabolitů na růst buněk, syntézu DNA, RNA a proteinů. Největší inhibiční účinek pozoroval u AM4N, který vykazoval 17-50% aktivity CsA v IC₅₀ (koncentrace, která je nutná pro 50% inhibici příslušných parametrů). Při koncentraci 25 mg/l CsA a AM4N vykazovaly > 90% inhibici všech parametrů. Morfologické změny v buněčné kultuře vyvolané AM4N byly srovnatelné s těmi vyvolanými CsA (17). Ve studii autorů Radeke et al. byla zkoumána nefrotoxicita CsA a metabolitů pomocí inhibice proliferace mesangiálních buněk. Nejvyšší inhibiční efekt vykazoval CsA, následován metabolitem AM4N, AM1c, AM1c9, AM9, AM19, AM1, AM4N9, AM14N, AM1A, AM11d. Metabolity AM4N9, AM14N, AM1A, AM11d byly považovány za neaktivní. (12). Možným mechanismem toxického působení metabolitů tedy může být kovalentní vazba na makromolekuly v játrech a ledvinách a synergický účinek kombinace CsA s metabolity na mesangiální buňky. Metabolit AM4N by se tak mohl podílet na nefrotoxickém působení CsA vedoucím k poruše kolísání krevního tlaku během dne.

Závěr

V souboru pacientů po transplantaci ledvin jsme v průběhu sledování zaznamenali abnormální cirkadiální kolísání krevního tlaku téměř v 50% provedených měření. Dle našich výsledků hladiny CsA a metabolitů AM1 a AM9 neovlivnily pokles nočního tlaku, statisticky významný rozdíl mezi skupinami „dipper“ a „non-dipper“ byl však nalezen u hladiny metabolitu AM4N v lymfocytech před užitím. Výsledek naznačuje, že zvýšená koncentrace výrazně lipofilního metabolitu AM4N v lymfocytech může být příčinou, eventuálně i markerem pro výskyt „non-dippingu“.

Podporováno grantem MZ IGA 1A/8655-5 a MSK RRC/04/2010 (Podpora vědy a výzkumu v MS kraji 2011, Kód programu: RRC/04/2010).

Literatura:

1. Fernandez-Vega F, Tejada F, Baltar J, Laures A, Gomez E, Alvarez J. Ambulatory blood pressure after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:110-3.
2. Goldsmith DJ, Covic AC, Venning MC, Ackrill P. Ambulatory blood pressure monitoring in renal dialysis and transplant patients. *Am J Kidney Dis*. 1997 Apr;29(4):593-600.
3. Lipkin GW, Tucker B, Giles M, Raine AE. Ambulatory blood pressure and left ventricular mass in cyclosporin- and non-cyclosporin-treated renal transplant recipients. *J Hypertens*. 1993 Apr;11(4):439-42.
4. McGregor DO, Olsson C, Lynn KL. Autonomic dysfunction and ambulatory blood pressure in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2001 May 15;71(9):1277-81.
5. Huysmans FT, Hoitsma AJ, Koene RA. Factors determining the prevalence of hypertension after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 1987;2(1):34-8.
6. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int*. 1998 Jan;53(1):217-22.
7. Cosio FG, Pelletier RP, Pesavento TE, Henry ML, Ferguson RM, Mitchell L, et al. Elevated blood pressure predicts the risk of acute rejection in renal allograft recipients. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):1158-64.
8. Covic A, Segall L, Goldsmith DJ. Ambulatory blood pressure monitoring in renal transplantation: should ABPM be routinely performed in renal transplant patients? *Transplantation*. 2003 Dec 15;76(11):1640-2.
9. Cifkova R, Hallen H. Cyclosporin-induced hypertension. *J Hypertens*. 2001 Dec;19(12):2283-5.
10. van den Dorpel MA, van den Meiracker AH, Lameris TW, Boomsma F, Levi M, Man in 't Veld AJ, et al. Cyclosporin A impairs the nocturnal blood pressure fall in renal transplant recipients. *Hypertension*. 1996 Aug;28(2):304-7.
11. Curtis JJ. Hypertensinogenic mechanism of the calcineurin inhibitors. *Curr Hypertens Rep*. 2002 Oct;4(5):377-80.
12. Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int*. 1991 Jun;39(6):1255-66.
13. Sadeg N, Pham-Huy C, Rucay P, Righenzi S, Halle-Pannenko O, Claude JR, et al. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1993 Mar-Jun;15(2-3):163-77.
14. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, et al. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit*. 1995 Dec;17(6):642-54.
15. Furlanut M, Baraldo M, Galla F, Marzocchi V, Pea F. Cyclosporin nephrotoxicity in relation to its metabolism in psoriasis. *Pharmacol Res*. 1996 Jun;33(6):349-52.
16. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol*. 2004 Nov 1;68(9):1889-902.
17. Copeland KR, Thliveris JA, Yatscoff RW. Toxicity of cyclosporine metabolites. *Ther Drug Monit*. 1990 Nov;12(6):525-32.

18. Klein IH, Abrahams A, van Ede T, Hene RJ, Koomans HA, Ligtenberg G. Different effects of tacrolimus and cyclosporine on renal hemodynamics and blood pressure in healthy subjects. *Transplantation*. 2002 Mar 15;73(5):732-6.
19. Robert N, Wong GW, Wright JM. Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(1):CD007893.
20. Galiatsou E, Morris ST, Jardine AG, Rodger RS, Watson MA, Elliott HL. Cardiac and vascular abnormalities in renal transplant patients: differential effects of cyclosporin and azathioprine. *J Nephrol*. 2000 May-Jun;13(3):185-92.
21. Haydar AA, Covic A, Jayawardene S, Agharazii M, Smith E, Gordon I, et al. Insights from ambulatory blood pressure monitoring: diagnosis of hypertension and diurnal blood pressure in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2004 Mar 27;77(6):849-53.
22. Kooman JP, Christiaans MH, Boots JM, van Der Sande FM, Leunissen KM, van Hooff JP. A comparison between office and ambulatory blood pressure measurements in renal transplant patients with chronic transplant nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2001 Jun;37(6):1170-6.
23. Jacobi J, Rockstroh J, John S, Schreiber M, Schlaich MP, Neumayer HH, et al. Prospective analysis of the value of 24-hour ambulatory blood pressure on renal function after kidney transplantation. *Transplantation*. 2000 Sep 15;70(5):819-27.
24. Halvová P, Grundmann M, Brozmanová H, Dědochová J, Martínek A, Peřinová I. Changes of concentrations of cyclosporine A and its first line metabolites during an early phase after renal transplantation in patients with normal and delayed graft function. *IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference*; August 28-30; Prague 2014.
25. Brozmanova H, Perinova I, Halvova P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients. *J Sep Sci*. 2010 Aug;33(15):2287-93.
26. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013 Jul;34(28):2159-219.
27. White WB. Circadian variation of blood pressure: clinical relevance and implications for cardiovascular chronotherapeutics. *Blood Press Monit*. 1997 Dec;2(1):47-51.
28. Filipovsky J, Widimsky J, Jr., Ceral J, Cifkova R, Horoky K, Linhart A, et al. [Diagnosis and treatment of arterial hypertension. 2012 Guidelines of the Czech Hypertension Society]. *Vnitr Lek*. 2012 Oct;58(10):785-801.
29. Crespo-Leiro MG. Arterial hypertension. *Transplant Proc*. 2002 Feb;34(1):127-9.
30. Vitko S, Viklicky O. Cyclosporine renal dysfunction. *Transplant Proc*. 2004 Mar;36(2 Suppl):243S-7S.
31. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther*. 1993 Feb-Mar;57(2-3):291-345.

11. PUBLIKOVANÉ PRÁCE

Původní vědecké publikace in extenso v časopise s IF:

1. Brozmanová H, Perinová I, **Halvová P**, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplantat patients. *J Sep Sci*. 2010 Aug;33(15):2287-93. doi: 10.1002/jssc.201000185; IF=2,631, citováno 6x
2. Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, **Marsalkova P**, Raszka J, Mrazek J, Dedochova J, Martinek A, Brozmanova H, Grundmann M. Quantiferon-CMV test in prediciton of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):3574-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.101.
Erratum in: *Transplant Proc*. 2011 Sep;43(7):2838. Grundmann, M [added]; IF=0,993, citováno 17x

Původní vědecké publikace in extenso v recenzovaném časopise:

- 1 **Halvová P**, Kacířová I, Brozmanová H, Grundmann M. Vliv cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. *Klin Farmakol Farm – přijato k tisku*

Přehledové vědecké publikace v recenzovaném časopise:

1. **Maršálková P**, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv I.. *Klin Farmakol Farm* 2009; 23(3): 138-141
2. **Halvová P**, Grundmann M. Farmakokinetika a klinické aplikace vybraných imunosupresiv II.. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(1): 51-56
3. Peřinová I, Brozmanová H, **Halvová P**, Grundmann M. Možnosti stanovení cyklosporinu A v terapeutickém monitorování léků. *Klin Farmakol Farm* 2010; 24(2): 93-97

Publikovaná abstrakta (pouze 1. autor)::

1. **Maršálková P.**, Komzáková I., Brozmanová H., Grundmann M.: Farmakokinetické monitorování cyklosporinu A (Pharmacokinetic monitoring of cyclosporine A), Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1, str. 6
2. **Maršálková P.**, Lochman I., Grundmann M.: Farmakodynamické monitorování cyklosporinu A (Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine A), Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1, str. 6
3. **Maršálková P.**, Lochman I., Dědochová J., Lochmanová A., Martínek A., Komzáková I., Brozmanová H., Novák V., Grundmann M.: Blood and lymphocyte level of Cyclosporine A and its metabolites - correlation with immunologic parameters during an early phase after renal transplantation. Ther. Drug. Monit, 2007, 29/4:540
4. **Maršálková P.**, Lochman I., Lochmanová A., Dědochová J., Brozmanová H., Komzáková I., Martínek A., Grundmann M.: Korelace hladin cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi a v lymfocytech s imunologickými parametry u pacientů časně po transplantaci ledvin. IX. Česká konference klinické farmakologie, XV. Slovenská konference klinické farmakologie, XIV. Česká konference TDM, XI Česká konference DURG, 18.-20.10.2007, sborník abstrakt, str. 38
5. **Maršálková P.**, Lochman I., Lochmanová A., Dědochová J., Martínek A., Brozmanová H., Grundmann M.: Immunosuppression of cyclosporine A and function of immune system. X. Česká konference klinické farmakologie, XV. Česká konference TDM, XII. Česká konference DURG, 16.-18.10.2008, sborník abstrakt, str. 37
6. **Maršálková P.**, Brozmanová H., Peřinová I., Grundmann M.: TDM of cyclosporine A and its metabolites in blood and in lymphocytes in stable renal transplant patients. X. Česká konference klinické farmakologie, XV. Česká konference TDM, XII. Česká konference DURG, 16.-18.10.2008, sborník abstrakt str. 38
7. **Halvová P.** Srovnání TDM cyklosporinu A v krvi a v lymfocytech pacientů s transplantovanými ledvinami na Sympóziu klinické farmakologie v Ostravě, 25.9.2009, sborník abstrakt str. 55, ISBN 978-80-7368-672-7

8. **Halvová P.**, Grundmann M., Brozmanová H., Peřinová I., Dědochová J., Martínek A: Hladiny cyklosporinu A a jeho hlavních metabolitů v lymfocytech během akutní fáze po transplantaci ledvin u pacientů s normální a zpozděnou renální funkcí. 5. Česko-slovenská konference klinické farmakologie, 19. Slovenská konference klinické farmakologie, 14. Česká konference klinické farmakologie, 18. Česká konference TDM, 15. Česká konference DURG, 4.-7.5.2011, Klin Farmkol Farm 2011; 25(supl. A):A24
9. **Halvová P.**, Grundmann M., Brozmanová H, Dědochová J., Martínek A. Vývoj hladin cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi po transplantaci ledvin během chronické fáze. 6. Slovensko-česká konferencia klinickej farmakologie, 22. Konferencia klinickej farmakologie, 16. Česká konference TDM, 17. Česká konference DURG, Štrbské pleso 24.-26.10.2013, sborník abstrakt
10. **Halvová P.**, Peřinová I, Brozmanová H, Grundmann M. TDM cyklosporinu A a jeho metabolitů v časné fázi po transplantaci ledvin. Květinův den – mezioborový seminář mladých farmakologů a toxikologů, Brno, 29.5.2014, sborník abstrakt str. 8
11. **Halvova P.**, Duricova J., Kacirova I., Brozmanova H., Grundmann M. Drug-drug interaction between cyclosporine A, clarithromycine and ketoconazole - a case report. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014, abstract book p. 51
12. **Halvová P.**, Grundmann M, Brozmanová H, Dědochová J, Martínek A, Peřinová I. Changes of concentrations of cyclosporine A and its first line metabolites during an early phase after renal transplantation in patients with normal and delayed graft function. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014, abstract book p. 64
13. **Halvova P.**, Kacirova I., Brozmanova H., Grundmann M. Drug-drug interaction between digoxin and amiodarone during routine TDM. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014, abstract book p. 97
14. **Halvova P.**, Brozmanova H., Urinovska R., Kacirova I., Grundmann M. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs during last decade. IATDMCT European

Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014, abstract book p. 93

15. **Halvová P**, Kacířová I, Brozmanová H, Grundmann M. Účinek cyklosporinu A a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. V. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty OU v Ostravě; 7.5.2015, Ostrava, sborník abstrakt str. 16

Seznam přednášek a posterů (pouze 1. autor)

1. **Maršálková P.**, Lochman I., Dědochová J., Lochmanová A., Martínek A., Komzáková I., Brozmanová H., Novák V., Grundmann M.: Blood and lymphocyte level of Cyclosporine A and its metabolites - correlation with immunologic parameters during an early phase after renal transplantation. 10th International congress of therapeutic drug monitoring and clinical pharmacology; 9.-14.9.2007, Nice, France
2. **Maršálková P.**, Lochman I., Lochmanová A., Dědochová J., Brozmanová H., Komzáková I., Martínek A., Grundmann M.: Korelace hladin cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi a v lymfocytech s imunologickými parametry u pacientů časně po transplantaci ledvin. IX. Česká konference klinické farmakologie, XV. Slovenská konference klinické farmakologie, XIV. Česká konference TDM, XI Česká konference DURG; 18.-20.10.2007, Rožnov pod Radhoštěm
3. **Maršálková P.**, Lochman I., Lochmanová A., Dědochová J., Martínek A., Brozmanová H., Grundmann M.: Immunosuppression of cyclosporine A and function of immune system. X. Česká konference klinické farmakologie, XV. Česká konference TDM, XII. Česká konference DURG; 16.-18.10.2008, Rožnov pod Radhoštěm
4. **Maršálková P.**, Brozmanová H., Peřinová I., Grundmann M. TDM of cyclosporine A and its metabolites in blood and in lymphocytes in stable renal transplant patients. X. Česká konference klinické farmakologie, XV. Česká konference TDM, XII. Česká konference DURG, 16.-18.10.2008, Rožnov pod Radhoštěm
5. **Halvová P.** Srovnání TDM cyklosporinu A v krvi a v lymfocytech pacientů s transplantovanými ledvinami. Sympóziium klinické farmakologie; 25.9.2009, Ostrava

6. **Halvová P.**, Brozmanová H., Peřinová I., Grundmann M. TDM cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech od časně po chronickou fázi u pacientů po transplantaci ledvin. 4 Slovensko-česká konferencia klinickej farmakológie, 17. Konferencia Spoločnosti klinickej farmakologie SLS, 11. Konference České společnosti klinické farmakologie ČLS JEP, 12. Konference DURG ČR, 16. Konference TDM; 15.-16.10.2009. Bratislava, Slovenská republika
7. **Halvová P.**, Lochman I., Lochmanová A., Grundmann M. Vývoj imunosuprese u pacientů po transplantaci ledvin od časně po chronickou fázi. 4 Slovensko-česká konferencia klinickej farmakológie, 17. Konferencia Spoločnosti klinickej farmakologie SLS, 11. Konference České společnosti klinické farmakologie ČLS JEP, 12. Konference DURG ČR, 16. Konference TDM; 15.-16.10.2009. Bratislava, Slovenská republika
8. **Halvová P.**, Grundmann M., Brozmanová H., Peřinová I., Dědochová J., Martínek A: Hladiny cyklosporinu A a jeho hlavních metabolitů v lymfocytech během akutní fáze po transplantaci ledvin u pacientů s normální a zpozděnou renální funkcí. 5. Česko-slovenská konference klinické farmakologie, 19. Slovenská konference klinické farmakologie, 14. Česká konference klinické farmakologie, 18. Česká konference TDM, 15. Česká konference DURG; 4.-7.5.2011, Ostrava
9. **Halvová P.**, Peřinová I., Brozmanová H., Grundmann M. TDM cyklosporinu A a jeho metabolitů v časně fázi po transplantaci ledvin. Květinův den – mezioborový seminář mladých farmakologů a toxikologů; 29.5.2014, Brno
10. **Halvová P.**, Duricová J., Kacirová I., Brozmanová H., Grundmann M. Drug-drug interaction between cyclosporine A, clarithromycine and ketoconazole - a case report. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014
11. **Halvová P.**, Grundmann M., Brozmanová H., Dědochová J., Martínek A., Peřinová I. Changes of concentrations of cyclosporine A and its first line metabolites during an early phase after renal transplantation in patients with normal and delayed graft function. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014

12. **Halvova P**, Kacirova I., Brozmanova H., Grundmann M. Drug-drug interaction between digoxin and amiodarone during routine TDM. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014
13. **Halvova P**, Brozmanova H., Urinovska R., Kacirova I., Grundmann M. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs during last decade. IATDMCT European Therapeutic Drug Monitoring–Personalised Pharmacotherapy Conference; August 28-30; Prague 2014
14. **Halvová P**, Kacířová I , Brozmannová H, Grundmann M. Účinek cyklosporinu A a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku. V. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty OU v Ostravě; 7.5.2015, Ostrava