

## 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 různému 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. Výťažnost 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. 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 údoľních 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/materská 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 fytohemaglutininem (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 imunopresiv, 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. Navrhujeme, že toto vyšetření v kombinaci s vyšetřením virové DNA nálože se může prokázat být účinným 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 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