Leki immunosupresyjne – problemy diagnostyczne

Michał Sławiński¹, Małgorzata Marchelek-Myśliwiec², Violetta Dziedziejko³, Barbara Dołęgowska¹

¹ Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

² Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

³ Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Adres do korespondencji: Violetta Dziedziejko, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Al. Powst. Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, e-mail: viola@pum.edu.pl

Wstęp

Początek farmakologicznego leczenia immunosupresyjnego to przełom lat 50. i 60. XX w. Początkowo w leczeniu stosowano 6-merkaptopurynę, a następnie zastąpiono ją azatiopryną (AZA) – lekiem antyproliferacyjnym – która podawana była łącznie z prednizolonem [1]. Dwadzieścia lat później odkryta została cyklosporyna (CsA) – inhibitor kalcyneuryny. Jej zastosowanie to kolejny przełom w leczeniu immunosupresyjnym. Leczenie CsA pozwoliło na dłuższe przeżycie przeszczepionego narządu [2]. Lata 90. XX w. to odkrycie nowych leków: takrolimus (TAC) – inhibitora kalcyneuryny o silniejszym działaniu niż CsA oraz mykofenolanu mofetylu (MMF), który zastąpił azatioprynę. Kolejnym lekiem wprowadzonym do leczenia był sirolimus – inhibitor enzymu mTOR (mammalian target of rapamycin) i jego pochodna everolimus (EVE).

Stosując leki immunosupresyjne dążymy do zahamowania odpowiedzi immunologicznej poprzez ingerencję w proliferację limfocytów T na różnych etapach, co pozwala na uniknięcie zniszczenia przeszczepionego narządu przez komórki układu immunologicznego biorcy [3,4].

Krótką charakterystyka i mechanizm działania leków immunosupresyjnych, w przypadku których wymagane jest monitorowanie ich stężenia we krwi

- Cyklosporyna (CsA) jest polipeptydem wyizolowanym z grzyba *Tohyopocladium inflatum*. Dobrze rozpuszcza się w tłuszczach, wiąże się z lipoproteinami i erytrocytami, dlatego całkowite stężenie CsA jest wyższe we krwi

Immunosuppressive drugs – diagnostic problems · Immunosuppressive drugs are essential for post-transplant therapy of vascular organs. The main purpose of their use is to suppress the recipient's immune response so that the transplanted organ is not damaged and keeps its function. Immunosuppressive therapy must be implemented at the moment of transplantation and continued until the function of the transplanted organ ceases. Since these drugs have a narrow therapeutic index, it is necessary to monitor their concentration in the blood. This article is devoted to the problems and factors that may affect the abnormal concentration result of the selected immunosuppressive drugs in blood.

Keywords: kidney transplantation, immunosuppression, therapeutic monitoring of drugs.

© Farm Pol, 2019, 75(2): 57–60

niż w surowicy. Czas jej półtrwania wynosi 7–11 godzin. Mechanizm działania CsA polega na zahamowaniu aktywności enzymu kalcyneuryny. Kalcyneuryna jest fosfatazą, której działanie jest niezbędne w procesie defosforylacji jądrowych białek regulatorowych. Konsekwencją jest zmniejszenie wytwarzania cytokin, zwłaszcza interleukiny 2 (IL-2), która odpowiedzialna jest za aktywację proliferacji limfocytów T [5].

- Takrolimus (TAC) jest antybiotykiem makrolidowym, który został wyizolowany ze *Streptomyces tsukubaensis*. Jest dobrze rozpuszczalny w tłuszczach. Czas półtrwania TAC wynosi około 11 godzin. Mechanizm jego działania polega również na hamowaniu kalcyneuryny, ale TAC wiąże się z innym białkiem nośnikowym niż CsA oraz silniej niż CsA hamuje kalcyneurynę [6].

- **Sirolimus i Everolimus** – inhibitory kinazy mTOR (mammalian target of rapamycin kinase) to makrolidy wyizolowane z grzyba *Streptomyces hygroscopicus*. Kinaza mTOR to kinaza treonino- nowo-serynowa biorąca udział między innymi w procesie proliferacji komórek. Jej zahamowanie powoduje zablokowanie cyklu komórkowego i jego przejście z fazy G1 do S. Okres półtrwania sirolimusu jest bardzo długi – ponad 60 godzin, natomiast jego pochodnej – EVE – 16 godzin. Inhibitory mTOR to leki o wąskim indeksie terapeutycznym.

Zarówno inhibitory kalcyneuryny, jak i mTOR są metabolizowane przez enzymy z grupy cytochromu P-450: CYP3A i CYP3B znajdujące się w wątrobie i jelitach. Stąd też inne, równolegle stosowane leki, które metabolizowane są przez ten sam układ enzymatyczny, wpływają na ostateczne ich stężenie we krwi [7].

Oprócz wymienionych wyżej leków, obowiązkowo monitorowanych w standardowej terapii immunosupresyjnej, stosowany jest mykofenolan mofetylu. Jest prolekiem, który po wchłonięciu z przewodu pokarmowego przekształca się w aktywną postać – kwas mykofenolowy. W przypadku tego leku nie pojedynczy pomiar, ale pole pod krzywą stężenie–czas (AUC_{0-12}) jest najlepszym pomiarem skuteczności, a także bezpieczeństwa leczenia. Z uwagi na czasochłonność tego badania, w codziennej praktyce nie monitoruje się jego stężenia [8].

Pozostałe leki stosowane w transplantologii nie wymagają monitorowania stężeń we krwi. Są to glikokortykosteroidy, immunoglobuliny, przeciwciała poliklonalne, monoklonalne i inhibitory sygnału kostymulującego.

Diagnostyka laboratoryjna w terapeutycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych

Faza analityczna terapeutycznego monitorowania leków

Ze względu na zmienną farmakokinetykę oraz wąskie indeksy terapeutyczne leków immunosupresyjnych, monitorowanie ich stężenia odgrywa kluczową rolę w kontroli skuteczności leczenia i pozwala zminimalizować ryzyko toksycznych działań ubocznych oraz ostrego odrzucenia przeszczepionych narządów [9]. Metody analityczne stosowane w terapeutycznym monitorowaniu leków (TLM) muszą cechować się zdolnością do oznaczania niskich stężeń badanych substancji z odpowiednią swoistością, dokładnością oraz precyzją dla danej metody analitycznej. Od tych metod laboratoryjnych wymaga się również, aby wynik analizy dostępny był w krótkim czasie oraz wiązał

się z dość niskim kosztem oznaczeń. Wyżej opisane wymagania, spośród szerokiego spektrum metod analitycznych, spełniają dwa rodzaje metod: immunochemiczne oraz chromatograficzne [10].

W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej na potrzeby TLM najczęściej stosuje się metody immunochemiczne, których początek zastosowania sięga lat 60. XX w., kiedy to Berson i Yalow opracowali radioimmunologiczną metodę (RIA) oznaczania insuliny [11]. Przewaga tej metody związana jest z pełną automatyzacją procesu badawczego, co znacząco wpływa na skrócenie czasu oczekiwania klinicystów na wynik analizy. Mimo tak szerokiego zastosowania immunochemii w analizach laboratoryjnych, w tym, w procesie terapeutycznego monitorowania leków, należy w dalszym ciągu pamiętać o istniejących niedoskonałościach metody, które znacząco mogą wpływać na otrzymany wynik. Zastosowanie różnych typów przeciwciał, różne sposoby znakowania przeciwciał lub antygenów, jak i wykorzystanie różnych technik pomiarowych ogranicza porównywalność wyników oznaczeń pochodzących od różnych producentów testów i możliwość zamiennego ich stosowania w laboratorium badawczym. Uwarunkowane jest to także brakiem standaryzacji metod, a uzyskane wyniki oznaczeń odnoszone są tylko do kalibratorów dedykowanych przez producenta metody analitycznej, dla których nie jest możliwe w pełni przeprowadzenie zgodności pomiarowej. Obecne testy immunochemiczne są w dalszym stopniu podatne na wystąpienie reakcji krzyżowych z powstałymi metabolitami oznaczanych substancji [12]. W sytuacjach, w których wydalanie leków immunosupresyjnych jest zaburzone, np. choroby wątroby, dochodzi do gromadzenia się metabolitów dając jednocześnie wyniki fałszywie zawyżone. W takich przypadkach należy rozważyć użycie bardziej swoistej techniki analitycznej. Za metodą referencyjną oznaczania stężeń leków immunosupresyjnych uznaje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [13]. W przypadku zastosowania tej metody możliwe jest odrębne oznaczenie zarówno stężenia leku macierzystego, jak i jego aktywnych metabolitów. Jednakże czas otrzymania wyników analizy jest dłuższy, jak również koszt badania jest zdecydowanie wyższy, ponadto konieczna jest zaawansowana, kosztowna aparatura.

Faza przedanalityczna terapeutycznego monitorowania leków

Poza opisanym wyżej aspektem analitycznym, czynnikiem o kluczowym znaczeniu dla otrzymania wiarygodnego wyniku stężenia leków, jest standaryzacja fazy przedanalitycznej procesu laboratoryjnego. Materiałem rutynowo stosowanym do

oznaczeń stężenia leków na potrzeby TLM jest krew pełna pobrana na antykoagulant, którym najczęściej jest sól dwupotasowa kwasu wersenowego (EDTA) [14]. Ze względu na szybkie przenikanie immunosupresantów do komórek m.in. erytrocytów, do analizy laboratoryjnej nie można używać osocza krwi. Winkler i wsp. wykazali, że stężenia leków oznaczanych w osoczu nie korelowały ze stężeniami w krwi pełnej [15]. Hemolizaty krwi pełnej są również lepszym materiałem diagnostycznym niż np. osocze, ponieważ na stężenia oznaczanych w nich leków w mniejszym stopniu mają wpływ takie czynniki jak: temperatura przechowywania i transportu, stężenie lipoprotein [14]. Pomimo wielu zalet, którymi cechuje się krew pełna stosowana do oceny stężenia leków należy mieć również na uwadze pewne ograniczenia, które związane są ze zmiennością parametrów hematologicznych. Wykazano, że u pacjentów z niedokrwistością i tym samym zaburzonymi parametrami czerwonych (hematokryt, hemoglobina, liczba krwinek czerwonych itp.) uzyskano zafałszowane wyniki stężenia takrolimusu oznaczanego metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem mikrocząstek (MEIA) [16]. W związku z tym faktem, ocena czynników hematologicznych wpływających na stężenie takrolimusu we krwi pełnej może być pomocna przy decydowaniu o dawkowaniu tego leku.

Próbki krwi żyłnej nie powinny być pobierane z tego samego naczynia żylnego, do którego za pomocą dojść dożylnych podawane są leki lub inne płyny infuzyjne – możliwość ewentualnej kontaminacji badanej próbki. Konieczne jest ustalenie optymalnego czasu pobierania próbek, który odmienny jest dla różnych leków i sposobów ich dawkowania oraz zależy od właściwości farmakokinetycznych preparatów (tabela 1) [17,18,19]. Schemat monitorowania leczenia wymaga również uwzględnienia czasu potrzebnego do osiągnięcia równowagi pomiędzy procesami wchłaniania i eliminacji leku. Podczas przewlekłego dawkowania, stan ten ustala się po upływie czasu równego około 5 biologicznym okresom półtrwania leku. W przypadku TLM leków immunosupresyjnych proponowany schemat powinien uwzględniać pomiar stężenia minimalnego (C_0), mierzonego przed podaniem kolejnej dawki lub stężenia określanego jako C_{24} lub C_4 , mierzonego po upływie 2 i 4 h od podania leku [20, 21]. Stężenie to związane jest z właściwościami wchłaniania leku i dla większości stosowanych leków immunosupresyjnych odzwierciedla ich stężenie maksymalne.

Planując terapię lekami immunosupresyjnymi należy uwzględnić dużą zmienność wewnątrz- i międzypersonalną dostępności biologicznej stosowanych preparatów. Powodem występujących różnic mogą być takie czynniki jak: wiek, płeć pacjenta, oraz skład masy ciała, głównie procentowa

Tabela 1. Parametry farmakokinetyczne wybranych leków immunosupresyjnych.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of selected immunosuppressants.

Lek	Farmakokinetyka
Cyklosporyna	• stopień wiązania z białkami osocza – 98% • dostępność biologiczna: 20–40% • maksymalne stężenie w osoczu występuje około 3,5 godziny po podaniu • eliminowana głównie przez wątrobę • obecne aktywne metabolity w osoczu krwi
Takrolimus	• stopień wiązania z białkami osocza – 98% • dostępność biologiczna: 20% • maksymalne stężenie w osoczu występuje około 1,5 godziny po podaniu • eliminowana głównie przez wątrobę • obecne aktywne metabolity w osoczu krwi
Mykofenolan mofetylu	• stopień wiązania z białkami osocza – 98% • dostępność biologiczna: 95% • maksymalne stężenie w osoczu występuje 1–2 godzin po podaniu • eliminowana głównie przez wątrobę, w mniejszym stopniu przez nerki • obecne aktywne metabolity w osoczu krwi
Sirolimus	• stopień wiązania z białkami osocza – 92% • dostępność biologiczna: 14% • maksymalne stężenie w osoczu występuje około 2 godziny po podaniu • eliminowana głównie przez wątrobę • obecne aktywne metabolity w osoczu krwi

zawartość tkanki tłuszczowej. Doniesienia naukowe z ostatniego okresu sugerują, że w przypadku dobierania odpowiedniego dawkowania terapeutycznego leków immunosupresyjnych powinno się brać pod uwagę, poza masą ciała pacjenta, również zawartość tkanki mięśniowej oraz tłuszczowej [22]. Współistnienie innych schorzeń, narząd przeszczepiony (nerka, wątroba, serce, płuca) oraz czas, jaki upłynął od zabiegu również w znaczącym stopniu wpływają na przyswajanie leku. Kluczowe znaczenie odgrywa również aktywność enzymatyczna szlaków metabolicznych zaangażowanych w metabolizm podawanych immunosupresantów, m.in. enzymów cytochromu P-450 3A (CYP3A). Udowodniono, że wyższe dawki terapeutyczne są wymagane u pacjentów rasy czarnej ze względu na farmakogenomiczne różnice w glikoproteinie p i ekspresji enzymów CYP3A4 i CYP3A5, która występuje u 70% do 80% osób rasy czarnej [23]. Ważnym narzędziem pomocnym w monitorowaniu zmienności enzymatycznej uwarunkowanej genetycznie jest farmakogenomika, która może być kolejnym krokiem w indywidualizacji terapii immunosupresyjnej pacjentów.

Podsumowanie

Terapia monitorowana w przypadku leków immunosupresyjnych jest niezbędna, aby jak najdłużej utrzymać dobrą funkcję przeszczepionego narządu. Pozwala na uniknięcie konsekwencji nieadekwatnego dawkowania w postaci ostrego

odrzucania, ciężkich infekcji i nefrotoksyczności. Dotyczy to zwłaszcza inhibitorów kalcyneuryny i inhibitorów kinazy mTOR. Zbyt wysokie ich stężenie doprowadza do upośledzonej funkcji nerki przeszczepionej, ciężkich infekcji bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych. Z drugiej strony zbyt niskie stężenie grozi ostrym odrzucaniem. Ze względu na istotny wpływ fazy zarówno przed-, jak i analitycznej na monitorowanie stężenia leków oraz na ustalanie dawek terapeutycznych wydaje się być niezbędne wdrożenie przez klinicystów strategii leczenia immunosupresyjnego opartej na coraz bardziej „spersonalizowanej” opiece nad pacjentem.

Otrzymano: 2019.02.18 · Zaakceptowano: 2019.02.26

Piśmiennictwo

- Woodruff M.F., Nolan B., Wilson T.J., Robson J.S., Lambie A.T., Clark J.G.: Homotransplantation of kidney in patients treated by preoperative local irradiation and postoperative administration of an anti-metabolite (imuran). Report of six cases. *Lancet*. 1963, 2(7309): 675–682.
- Fernando O.N., Sweny P., Farrington K., Rogers H., Baillod R.A., Chan M.K. et al.: Preliminary experience with cyclosporin A in human renal allografts. *Transplant Proc.* 1980, 12(2): 244–245.
- Neylan J.F.: Effect of race and immunosuppression in renal transplantation: three-year survival results from a US multicenter, randomized trial. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplant Proc.* 1998, 30(4): 1355–1358.
- Webster A.C., Lee V.W., Chapman J.R., Craig J.C.: Target of rapamycin inhibitors (TOR-I; sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 2: CD004290.
- Ptacek R.J., Venkataraman R., Burckart G.J.: Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet.* 1986, 11(2): 107–132.
- Campagne O., Mager D.E., Tornatore K.M.: Population Pharmacokinetics of Tacrolimus in Transplant Recipients: What Did We Learn About Sources of Interindividual Variabilities? *J Clin Pharmacol.* 2019, 59(3): 309–325.
- Kirchner G.I., Meier-Wiedenbach I., Manns M.P.: Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2004, 43(2): 83–95.
- Fulton B., Markham A.: Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs*. 1996, 51(2): 278–298.
- Armstrong V.W., Oellerich M.: New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem.* 2001, 34(1): 9–16.
- Mika A., Stepnowski P.: Current methods of the analysis of immunosuppressive agents in clinical materials: A review. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 127: 207–231.
- Blumenthal S.: The insulin immunoassay after 50 years: a reassessment. *Perspect Biol Med.* 2009, 52(3): 343–354.
- Dasgupta A.: Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants: Limitations of Immunoassays and the Need for Chromatographic Methods. In *Resolving Erroneous Reports in Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring 2012* (pp. 323–353). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Aucella F., Lauriola V., Vecchione G., Tiscia G.L., Grandone E.: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method as the golden standard for therapeutic drug monitoring in renal transplant. *J Pharm Biomed Anal.* 2013, 86: 123–126.
- Yatscoff R.W., Honcharik N., Lukowski M., Thliveris J., Chackowsky P., Faraci C.: Distribution of cyclosporin G (NVa2 cyclosporin) in blood and plasma. *Clin Chem.* 1993, 39(2): 213–217.
- Winkler M., Ringe B., Baumann J., Loss M., Wonigeit K., Pichlmayr R.: Plasma vs whole blood for therapeutic drug monitoring of patients receiving FK 506 for immunosuppression. *Clin Chem.* 1994, 40(12): 2247–2253.
- Akbas S.H., Ozdem S., Caglar S., Tuncer M., Gurkan A., Yucetin L., et al.: Effects of some hematological parameters on whole blood tacrolimus concentration measured by two immunoassay-based analytical methods. *Clin Biochem.* 2005, 38(6): 552–557.
- Bullingham R., Monroe S., Nicholls A., Hale M.: Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol.* 1996, 36(4): 315–324.
- Benet L.Z., Cummins C.L., Wu C.Y.: Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm.* 2004, 277(1–2): 3–9.
- Neumayer H.H., Paradis K., Korn A., Jean C., Fritsche L., Budde K., et al.: Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 1999, 48(5): 694–703.
- Wallemacq P., Armstrong V.W., Brunet M., Haufroid V., Holt D.W., Johnston A., et al.: Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009, 31(2): 139–152.
- Knight S.R., Morris P.J.: The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation.* 2007, 83(12): 1525–1535.
- Han S.S., Kim D.H., Lee S.M., Han N.Y., Oh J.M., Ha J., et al.: Pharmacokinetics of tacrolimus according to body composition in recipients of kidney transplants. *Kidney Res Clin Pract.* 2012, 31(3): 157–162.
- Shrestha B.M.: Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences. *Exp Clin Transplant.* 2017, 15(1): 1–9.