

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA ZUPAN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA ZUPAN

**DOLOČANJE KONCENTRACIJE EVEROLIMUSA V KRVI PRI
BOLNIKI PO PRESADITVI SRCA S POTRJENO KORONARNO
VASKULOPATIJO**

**DETERMINATION OF EVEROLIMUS BLOOD CONCENTRATION IN
HEART TRANSPLANT RECIPIENTS WITH CONFIRMED CARDIAC
ALLOGRAFT VASCULOPATHY**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za aplikativno biokemijo na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Za strokovno pomoč, usmerjanje pri delu, koristne nasvete in spodbudo se iskreno zahvaljujem mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvaljujem se tudi Marjani Prah Krumpak, dipl. inž. lab. biomed. in Veri Troha Poljančič, lab. teh., za praktično pomoč v laboratoriju.

Na tem mestu bi se za sodelovanje rada zahvalila tudi prof. dr. Aljoši Kandusu, dr. med., asist. dr. Gregorju Poglajnu, dr. med. in dr. Miranu Šebeštjenu, dr. med.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Mojca Zupan

Ljubljana, junij 2012

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

KAZALO

KAZALO	I
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
SEZNAM PREGLEDNIC.....	VIII
SEZNAM SLIK.....	X
SEZNAM GRAFOV	X
POVZETEK	XI
ABSTRACT	XIII
1. UVOD	1
1.1. PRESADITEV ORGANOV	1
1.2. PRESADITEV SRCA.....	3
1.2.1. PATOGENEZA SRČNEGA POPUŠČANJA.....	3
1.2.2. INDIKACIJE ZA PRESADITEV SRCA.....	4
1.2.3. KONTRAINDIKACIJE ZA PRESADITEV SRCA	5
1.2.4. PRIPRAVA NA PRESADITEV SRCA.....	7
1.2.4.1. PSIHOFIZIČNA PRIPRAVLJENOST PREJEMNIKA	7
1.2.4.2. PRED-TRANSPLANTACIJSKO TESTIRANJE.....	7
1.2.5. IZBIRA DAJALCA.....	9
1.2.6. ZAPLETI PO PRESADITVI SRCA	11
A) <i>Okužbe</i>	11
B) <i>Akutna zavrnitvena reakcija</i>	12
1.2.6.2. POZNI ZAPLETI.....	14
A) <i>Koronarna vaskulopatija presadka</i>	15
B) <i>Rakava obolenja</i>	15
C) <i>Hipertenzija</i>	16
D) <i>Kronična ledvična okvara</i>	16

E)	<i>Hiperlipidemija</i>	17
F)	Sladkorna bolezen.....	17
G)	Osteoporoza.....	17
1.2.7.	FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE.....	18
A)	<i>Indukcijsko zdravljenje</i>	20
B)	<i>Vzdrževalno zdravljenje</i>	21
C)	<i>Zdravljenje akutne zavrnitve</i>	22
1.2.8.	EVEROLIMUS	22
1.2.8.1.	<i>Farmakološke značilnosti</i>	23
1.2.8.2.	<i>Priporočeni režim zdravljenja in odmerjanje EVL</i>	25
A)	Zgodnji prehod na EVL (≤ 6 mesecev po presaditvi srca)	26
B)	Srednji in pozni prehod na EVL (> 6 mesecev po presaditvi srca)	26
C)	Odmerjanje EVL.....	27
1.2.8.3.	<i>Neželeni učinki EVL</i>	28
1.2.8.4.	<i>Spremljanje koncentracij EVL</i>	28
2.	NAMEN	29
3.	MATERIALI IN METODE	30
3.1.	SKUPINA BOLNIKOV	30
3.2.	DOLOČANJE KONCENTRACIJE EVEROLIMUSA Z IMUNSKO TURBIDIMETRIČNO METODO (QMS Everolimus Immunossay) IN REAGENTI Thermo Scientific	31
3.2.1.	PRINCIP METODE	31
3.2.2.	REAGENTI IN MATERIALI	31
3.2.3.	IZBOR VZORCEV IN ROKOVANJE Z NJIMI.....	32
3.2.4.	POSTOPEK KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA EVEROLIMUSA.....	33
3.2.5.	ZNAČILNOSTI METODE	34

3.2.6. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA S TANDEMNSKO MASNO SPEKTROMETRIJO (LC-MS/MS)	36
3.2.7. REFERENČNE VREDNOSTI.....	38
3.3. STATISTIČNE METODE IN ORODJA.....	38
4. REZULTATI.....	39
5. RAZPRAVA	53
6. SKLEP.....	58
7. REFERENCE	59
8. PRILOGE.....	64

SEZNAM OKRAJŠAV

ABO..... sistem krvnih skupin ABO

ACE..... angiotenzin konvertirajoči encim

Ag.....antigen

AIDS.....Acquired Immune Deficiency Syndrome (sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti)

APC.....antigen predstavitvena celica

APRIL.....A Proliferatin Inducing Ligand (indukcijski ligand proliferacije)

ATG.....Anti-Thymocyte Globulin (poliklonska anti-timocitna protitelesa)

AZA.....azatioprin

BLyS.....B-Lymphocyte Stimulator (B-limfocitni stimulator)

CD.....Cluster of Differentiation (CD3: T-celični koreceptor, CD4: glikoprotein na površini T celic pomagalk, CD8: transmembranski glikoprotein, T-celični koreceptor, CD28: kostimulatorna molekula, izražena na T celici, za T-celično aktivacijo, CD80: protein na aktiviranih B celicah in monocitih, kostimulatorni signal za T-celično aktivacijo, CD86: protein, izražen na antigen predstavitvenih celicah, kostimulator T-celične aktivacije)

CMV..... citomegalovirus

CNI.....kalcinevrinski inhibitor

CŽS.....centralni živčni sistem

CYA.....ciklosporin A

CYP.....citokromi–odgovorni za metabolizem ksenobiotikov (npr. CYP3A4, 3A5, 2C8,...)

DEXA.....Dual-Energy X-ray Absorptiometry (postopek, pri katerem merijo kostno gostoto)

DM.....diabetes mellitus

EBV.....Epstein-Barr virus

EU.....Evropska Unija

EVL.....everolimus

FKBP12.....FK506 (takrolimus)-vezoči protein

GFR.....Glomerular Filtration Rate (hitrost glomerulne filtracije)

GIT.....gastrointestinalni trakt

HBV.....virus hepatitisa B

HCV.....virus hepatitisa C

HIV.....virus humane imunske pomanjkljivosti

HLA.....Human Leukocyte Antigen (humani levkocitni antigen, tkivni antigen)

HMG–CoA.....3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG–CoA reduktazni inhibitorji ali statini znižujejo raven holesterola v krvi)

HPV.....humani papiloma virus

HSV.....herpes simplex virus

IgG.....imunoglobulin G

ITM.....indeks telesne mase

KM.....kostni mozeg

KS.....krvna skupina

KV.....koeficient variacije

LC-MS/MS.....tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektroskopijo

MHC.....Major Histocompatibility Complex (poglavitni histokompatibilnostni kompleks)

MMF.....mikofenolat mofetil

mTOR.....Mammalian Target of Rapamycin (tarča rapamicina)

NFAT.....Nuclear Factor of Activated T-cells (jedrni faktor aktiviranih T celic-transkripcijski faktorji, pomembni pri imunskem odgovoru)

QMS.....Quantitative Microsphere System (imunska turbidimetrična metoda za kvantitativno določanje everolimusa)

PAP.....Papanicolaou-ov test

PČ/INR.....protrombinski čas/International Normalised Ratio (mednarodni normaliziran odnos)

PRA.....Panel Reactive Antibody (panelna reaktivna protitelesa, merjenje anti-HLA protiteles v krvi-pokazatelj hipersenzibilizacije)

PSA.....prostata-specifični antigen

Pt.....protitelo

Rp.....receptor

RTG.....rentgensko slikanje

SD.....standardna deviacija

SLE.....sistemski lupus eritematosus (avtoimunsko obolenje)

SRL.....sirolimus

TAC.....takrolimus

TDM.....Therapeutic Drug Monitoring (spremljanje koncentracij zdravil v krvi)

UZ.....ultrazvočno slikanje

VLDL..... Very Low Density Lipoproteins (lipoproteini nizke gostote)

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I. Indikacije za presaditev srca

Preglednica II. Kontraindikacije za presaditev srca

Preglednica III. Pred–transplantacijsko testiranje za vse bolnike

Preglednica IV. Pred–transplantacijsko testiranje za izbrane bolnike

Preglednica V. Kontraindikacije za darovanje srca

Preglednica VI. Imunosupresivna zdravila pri presaditvi srca

Preglednica VII. Neželeni učinki imunosupresivov, uporabljenih pri vzdrževalni terapiji

Preglednica VIII. Ponovljivost imunske turbidimetrične metode "QMS Everolimus Immunossay"

Preglednica IX. Povprečne vrednosti in standardni odkloni izmerjenih koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS ter njihovih razlik (vse vrednosti)

Preglednica X. Kolmogorov-Smirnov test normalnosti (vse meritve)

Preglednica XI. Povprečne vrednosti in standardni odkloni izmerjenih koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS ter njihovih razlik (brez osamelcev)

Preglednica XII. Kolmogorov-Smirnov test normalnosti (brez osamelcev)

Preglednica XIII. Korelacija med imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS

Preglednica XIV. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 1

Preglednica XV. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 2

Preglednica XVI. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 3

Preglednica XVII. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 4

Preglednica XVIII. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 5

Preglednica XIX. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 6

SEZNAM SLIK

Slika 1. Shematski prikaz delovanja imunosupresivov

Slika 2. Strukturna formula EVL

SEZNAM GRAFOV

Graf 1. Razsevni diagram vseh meritev

Graf 2. Razsevni diagram brez osamelcev

Graf 3. Prikaz porazdelitve meritev koncentracij EVL v polni krvi z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS

Graf 4. Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo

Graf 5. Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev koncentracij EVL s LC-MS/MS

Graf 6. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 1

Graf 7. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 2

Graf 8. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 3

Graf 9. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 4

Graf 10. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 5

Graf 11. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 6

POVZETEK

Presaditev srca predstavlja izbirno metodo zdravljenja bolnikov z napredovalim srčnim popuščanjem, ko le-to postane po konvencionalnem medikamentoznem in kirurškem zdravljenju neobvladljivo. Z ustrezno imunosupresijo želimo preprečiti ali zdraviti zavrnitev presadka ob zmanjšanju tveganja za okužbo ali raka. Everolimus (EVL) zavira pojav kronične zavrnitve, ki lahko prispeva k izgubi presadka, z inhibicijo celične proliferacije, ko celični cikel zadrži v G₁-S interfazi in s preprečitvijo tanjšanja neointime ter po-transplantacijske arterioskleroze.

Koncentracijo EVL v polni krvi smo pri bolnikih po presaditvi srca in ledvic določili s pomočjo imunske turbidimetrične metode "QMS Everolimus Immunoassay," aplicirane na biokemičnem analizatorju Roche/Hitachi Modular. Metoda temelji na medsebojnem tekmovanju učinkovine v vzorcu polne krvi in učinkovine na mikrodeltah za vezavna mesta reagenta z anti-EVL protitelesi (Pt). Reagent, ki vsebuje mikrodeltce, prevlečene z EVL, v prisotnosti reagenta z anti-EVL Pt in v odsotnosti drugih kompetirajočih zdravil v vzorcu hitro aglutinira. Po dodatku vzorca z EVL se pojavi delna inhibicija aglutinacijske reakcije s padcem absorbance, ki jo analizator izmeri fotometrično in na podlagi izrisane kalibracijske krivulje poda koncentracijo EVL v µg/L.

S primerjavo meritev koncentracij EVL v polni krvi pri bolnikih po presaditvi ledvic, izmerjenih z imunsko turbidimetrično metodo in s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS) (meritve opravljene v Gradcu), smo ugotovili, da so razlike med njunimi meritvami vzporednih vzorcev primerljive in da med metodama obstaja medsebojna povezanost ($r = 0,825$, $P < 0,0001$). Pri meritvah z imunsko turbidimetrično metodo ne prihaja do sistemske napake, rezultati sipajo v obe smeri, kar je za klinike sprejemljivo.

Pri spremljanju primernosti koncentracij EVL pri bolnikih po presaditvi srca smo spoznali, da variabilnost v farmakokinetiki in farmakodinamiki med in znotraj posameznika prispeva k spremenljivim odzivom glede na odmerek EVL. Samo pri 2 bolnikih se koncentracije EVL nahajajo znotraj meja terapevtskega območja, pri ostalih pa se spreminjajo glede na vzporedno terapijo in ekspresijo citokroma CYP3A4 ter P-glikoproteina. Močan inhibitor

CYP3A4 Sporanox[®] izrazito zviša koncentracije EVL v polni krvi, medtem ko imajo zmerni in šibki inhibitorji manjši vpliv na koncentracije EVL.

Zaradi ozkega terapevtskega indeksa EVL in optimalnega izkoristka njegove učinkovitosti ob čim manjši toksičnosti, je spremljanje koncentracij EVL v polni krvi bistvenega pomena za individualizacijo prilagoditve odmerka. Spremljanje koncentracij EVL je s pomočjo imunske turbidimetrične metode zanesljivo in enostavno. Metoda je glede specifičnosti, občutljivosti in odsotnosti interferenc primerljiva s LC-MS/MS.

ABSTRACT

Heart transplantation has become the treatment of choice for patients with intractable advanced heart failure after conventional medications and surgical procedures are being exhausted. With adequate immunosuppression we want to prevent or to treat allograft rejection while minimizing risk for infection or cancer. Everolimus (EVL) inhibits the manifestation of chronic allograft rejection which may contribute to graft loss with inhibition of cell proliferation, arresting cell cycle in G₁-S interphase, preventing neointimal thickening, and transplantation arteriosclerosis.

We determined the concentration of EVL in whole blood in patients after heart and kidney transplantation with immune turbidimetric assay "QMS Everolimus Immunoassay" using biochemical Roche/Hitachi Modular analyzer. The assay is based on competition between drug in the sample and drug coated onto micro particles for antibody binding sites of the anti-EVL antibody reagent. The EVL-coated micro particle reagent is rapidly agglutinated in the presence of the anti-EVL antibody reagent and in the absence of any competing drug in the sample. When a sample containing EVL is added, the agglutination reaction is partially inhibited, slowing down the rate of absorbance change which is measured photometrically. The analyzer gives a concentration on a base of calibration curve.

When we compared whole blood concentrations of EVL in kidney recipients determined with immune turbidimetric assay and with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we established that measurements of parallel samples were entirely comparable. There is a mutual connection between both techniques ($r = 0.825$, $P < 0.0001$). Moreover, in measurements with immune turbidimetric assay we did not notice any systemic error. Measurements scatter in both sides were acceptable for clinicians.

With therapeutic drug monitoring (TDM) of EVL concentrations in heart recipients, we established that intra- and inter-subject variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics contribute to changeable responses on EVL dosing. Only two patients had EVL concentrations within EVL trough levels, while the concentrations in other patients were varying and depended on concomitant therapy, and the expression of cytochrome CYP3A4 and P-glycoprotein. Very potent inhibitor of CYP3A4 Sporanox[®] markedly increases the EVL

whole blood concentrations. On the other hand, moderate and weak inhibitors have smaller impact on EVL concentrations.

Therapeutic drug monitoring of EVL concentrations is due to a narrow therapeutic index and optimal efficacy with minimal toxicity essential for individual dosing of EVL. TDM of EVL concentrations with immune turbidimetric assay is reliable, simple and in comparison to LC-MS/MS, specific, sensitive and without any interferences.

1. UVOD

1.1. PRESADITEV ORGANOV

Prvo uspešno presaditev ledvice je pri enojajčnem dvojčku izvedel dr. Joseph E. Murray v Bostonu, leta 1954. Temu uspehu sta sledili še uspešna presaditev jeter v Denverju (dr. Thomas E. Starzl) in srca v Cape Townu (dr. Christiaan N. Barnard) leta 1967 (1).

Pomemben mejnik v zgodovini presaditev organov predstavlja tudi ugotovitev britanskega biologa Petra B. Medawra, da je za zavrnitev presadka odgovorna imunska reakcija. S kolegi je leta 1953 dognal, da je pridobljena toleranca imunsko specifična, in da nastopi zaradi specifičnega odklona gostiteljevega imunskega sistema (2, 3).

Sledilo je Dausset-jevo pomembno odkritje humanih levkocitnih antigenov (HLA) in van Rood-ovo odkritje anti-levkocitnih protiteles, za katere se je kmalu zatem izkazalo, da so usmerjeni proti antigenom HLA (oboje leta 1958). Paul I. Terasaki in John D. McClelland sta 1964 predstavila mikrolimfocitotoksični test, s katerim sta serološko detektirala antigene HLA v zelo majhni količini seruma. Dogodek je sprožil nadaljnje raziskave v zvezi s klasifikacijo antigenov HLA (4).

Kljub napredku v kirurških pristopih ob postopkih presaditve, je presaditev organov kot izbirna oblika zdravljenja končne odpovedi organa postala vse uspešnejša šele z odkritjem vse učinkovitejših imunosupresivov v zgodnjih osemdesetih letih 20. stoletja (1) (prvič so s pomočjo imunosupresivov dosegli imunsko toleranco leta 1963) ter s skrbno načrtovano izbiro prejemnika in darovalca. Za preprečitev hiperakutne zavrnitve je zelo pomembna tudi skladnost v krvno-skupinskem sistemu AB0. Visoko afinitetni izoaglutinini se v primeru neskladja AB0 v serumu prejemnika vežejo na A ali B antigene v žilah presadka in parenhimskih celicah, čemur sledijo hitre spremembe v prejemnikovem titru izoaglutininov s posledično revaskularizacijo organa (4).

Poleg še vedno obstoječih imunoloških ovir za prejemnika največjo oviro predstavlja pomanjkanje organov. Število posameznikov, uvrščenih na čakalno listo, daleč presega število

razpoložljivih darovanih organov. Zaradi tega dejstva kliniki čedalje bolj podpirajo možnost darovanja organov živih darovalcev, npr. dela jeter ali pljuč (1).

Slovenija je od leta 2000 članica Eurotransplanta, organizacije, ki vključuje transplantacijske centre, laboratorije in bolnišnične donorske centre sedmih držav (poleg Slovenije še Belgija, Nemčija, Nizozemska, Luksemburg, Avstrija in Hrvaška). S članstvom je pridobila pravico do pridobitve tkivno skladnega organa iz mreže Eurotransplant za slovenskega prejemnika, če v Sloveniji ni ustreznega darovalca, hkrati pa je obvezana darovane organe slovenskih državljanov ponuditi Eurotransplantu, kadar le-ti niso porabljeni za slovenske prejemnike (5).

V Sloveniji so do konca leta 2011 presadili 792 ledvic, 126 src, 182 jeter, 5 trebušnih slinavk in 1 pljuča. V letu 2011 so presadili 46 ledvic, 14 src, 21 jeter in 1 trebušno slinavko. Na čakalno listo za presaditev organov je bilo na dan 16.05.2012 uvrščenih skupno 170 posameznikov, od tega 118 za ledvica, 38 za srce in 14 za jetra (6).

Zaradi velikega števila razlik v zahtevah po kakovosti in varnosti darovanih oz. presajenih organov med članicami Evropske unije (EU) sta Evropski parlament in Svet EU 19.05.2010 sprejela Direktivo o standardih kakovosti in varnosti človeških organov, namenjenih za presaditev. Direktiva teži k lažji izmenjavi organov in povečanju nabora darovalcev organov preko več načinov: pristojni strokovnjaki v vsaki članici EU morajo slediti priporočilom direktive, ustanoviti morajo sistem za preskrbo z organi in presaditve, vpeljati morajo nacionalne programe kakovosti za zagotavljanje neprekinjenega spremljanja in sistem sledljivosti za poročanje resnih neželenih dogodkov in reakcij.

Istočasno je Komisija EU sprožila t.i. "Action Plan," ki pripomore k razpoložljivosti organov umrlih in živih darovalcev znotraj EU, povečuje dobavljivost organov, izboljša transplantacijske sisteme in zagotavlja kakovost in varnost postopkov. Vključuje številne prednosti, in sicer povečano razpoložljivost organov, povečano učinkovitost in dostopnost transplantacijskih sistemov ter izboljšanje kakovosti in varnosti.

Odklonitev darovanja organov predstavlja oviro za pridobitev organa umrlega darovalca, še posebej v državah z informiranim pristankom, do določene mere pa tudi v državah s predhodno pridobljenim pristankom darovalca. V mnogih evropskih državah znaša delež odklonitve darovanja organov s strani družine krepko preko 40 %. Pridobitev večjega števila privolitev bi tako imela trajnejši vpliv na razpoložljivost darovanih organov. K največjemu in

najhitrejšemu vplivu na darovanje organov so pripomogli zdravniki in medicinske sestre na intenzivnih oddelkih. Le-ti se udeležujejo posebnih izobraževalnih tečajev, na katerih pridobijo znanja o izboljšani prepoznavi možnega darovalca in spremenjenem odnosu do presaditve, ki ga prenašajo na svojce morebitnih darovalcev organov (7).

1.2. PRESADITEV SRCA

Presaditev srca predstavlja izbirno metodo zdravljenja bolnikov s končno odpovedjo srca, potem ko so bili izčrpani že vsi drugi načini farmakološkega oz. kirurškega zdravljenja. Poslužujejo se je pri bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem, ki ga je sprožil virus, resna bolezen koronarnih arterij in miokarda, nepravilnosti srčnih zaklopk ali prirojena srčna napaka. Srčno popuščanje nastopi, ko srčna mišica ni več sposobna prečrpati zadostnega volumna krvi, ki bi zadostil potrebam celotnega organizma. Zaradi tega bolniki občutijo utrujenost, oteženo dihanje, zmanjšano telesno zmogljivost in otekanje nog ali trebuha (8). Populacijske študije so pokazale, da je pojavnost srčnega popuščanja v populaciji 2–5 % oz. 10 % pri starejših od 65 let. Pojavnost srčnega popuščanja kot edine bolezni srca in ožilja, ki iz leta v leto narašča, se z vsakim letom poveča za 2 %. Napovedujejo, da naj bi bilo do leta 2040 preko 20 % starostnikov, obolelih za srčnim popuščanjem (9).

1.2.1. PATOGENEZA SRČNEGA POPUŠČANJA

Zaradi okvare črpalne funkcije srca se aktivirajo kompenzatorni mehanizmi, ki povzročijo značilne hemodinamske spremembe, predvsem povišane polnilne tlake, in nevrohormonsko aktiviranje sistema renin–angiotenzin–aldosteron in adrenergičnega sistema. Oslabljeni miokard sprva s povišanimi polnilnimi tlaki in hipertrofijo še uspe vzdrževati ustrezen minutni srčni iztis. Z napredovanjem srčnega popuščanja prevzame glavno vlogo nevrohormonska kompenzacija, ki posledično preoblikuje levi prekat in s tem dolgotrajno dodatno obremeni srčno mišico ter okvari črpalno funkcijo. Zaradi volumske, tlačne obremenitve, hormonskega vpliva in sproščanja mediatorjev vnetja, citokinov, pride do spremembe miocitov in razrasta vezivnega tkiva v srčni mišici; prekat se s postopnim preoblikovanjem razširi. Dodatno slabenje srčne mišice stopnjuje aktiviranje nevrohormonskega sistema, s čimer se pozitivna povratna zanka sklene (9).

1.2.2. INDIKACIJE ZA PRESADITEV SRCA

Na splošno imajo bolniki, ki so primerni za presaditev srca, pričakovano manj kot 50 % 1-letno preživetje z vpeljeno farmakološko terapijo in imajo močno poslabšano kakovost življenja zaradi kardioloških simptomov, ki ne kažejo izboljšanja brez presaditve. Transplantacijska ekipa oceni primernost bolnika za presaditev (10) in alternativnih načinov zdravljenja z resinhronizacijskim srčnim spodbujevalnikom (CRT) ali z mehansko podporo levega prekata (LVAD). K daljšim obdobjem stabilnosti bolnika pred presaditvijo so v zadnjem času pripomogli številni terapevtski pristopi. Posebej oblikovani programi za napredovalo srčno popuščanje so namenjeni oceni optimalne obravnave bolnika z medicinskimi oz. mehanskimi načini zdravljenja. Še posebno pri ambulantnih bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem je izboljšano preživetje zaradi presaditve srca primerljivo z drugimi načini zdravljenja. Za boljšo, natančnejšo opredelitev in napoved prognoze teh bolnikov je združenje International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) oblikovalo smernice za primere, ko je ocena Heart Failure Survival Score (HFSS) dvoumna (11).

Preglednica I. Indikacije za presaditev srca (9, 10, 12)

Napredovalo srčno popuščanje (funkcijski razred III ali IV po klasifikaciji NYHA)

Pogosti bolnišnični sprejemi zaradi poslabšanja srčnega popuščanja

6–minutni test hoje < 300 m

Minimalno 3–mesečno optimalno farmakološko zdravljenje

Zmanjšana maksimalna poraba kisika ($VO_2 \text{ max} < 12 \text{ mL/kg x min}$)

NYHA – New York Heart Association

Zaradi velike razlike v številu bolnikov, predvidenih za presaditev srca in razpoložljivih darovalcev, ocenjujejo da znaša smrtnost bolnikov, uvrščenih na čakalni seznam za presaditev, letno okrog 10 % (10).

1.2.3. KONTRAINDIKACIJE ZA PRESADITEV SRCA

Kontraindikacije za presaditev srca temeljijo na oceni komorbidnih stanj in psihosocialnega statusa, ki so povezane s slabšimi izidi po presaditvi. Nekateri primeri teh stanj predstavljajo absolutne kontraindikacije, večina pa jih predstavlja relativne kontraindikacije (odvisno od resnosti stanja in z njim povezanih dejavnikov tveganja). Največjo kontraindikacijo na splošno predstavlja "nekardiološko" stanje, ki bi samo po sebi skrajšalo življenjsko dobo bolnika ali pa povečalo tveganje smrti zaradi zavrnitve srca ali zapletov imunosupresije (10).

Preglednica II. Kontraindikacije za presaditev srca (9, 10, 11, 12, 13)

Absolutne kontraindikacije

Refraktarni kardiogeni šok

Ireverzibilna pljučna hipertenzija (transpulmonalni gradient > 15 mm Hg)

Aktivno rakavo obolenje v obdobju zadnjih 5 let

Sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS) s pogostimi oportunističnimi okužbami

Aktivne več-sistemske bolezni: sistemski lupus eritematosus (SLE), sarkoidoza, amiloidoza

Ireverzibilna ledvična in jetrna okvara

Relativne kontraindikacije

Starost prejemnika > 70 let

Debelost (indeks telesne mase (ITM) > 30 kg/m²)

Nekatera rakava obolenja z majhno možnostjo zasevkov

Periferna žilna bolezen

Sladkorna bolezen z napreduvalimi okvarami organov (nefropatija, nevropatija, retinopatija)

Aktivna mentalna bolezen in psihosocialna nestabilnost

Zloraba drog, tobaka ali alkohola

Starost prejemnika predstavlja največji izključitveni kriterij. ISHLT zaradi nenehnega pomanjkanja darovanih organov dovoljuje presaditev srca tudi pri starejših bolnikih. Ponekod presajajo srce tudi pri bolnikih, starih nad 70 let. Zanje običajno uporabijo organe starejših darovalcev, ki se sicer ne bi porabili (načelo "starejši za starejše") (10). Poleg tega so rezultati raziskav pokazali, da imajo prejemniki, stari nad 70 let, slabše preživetje, povečano pojavnost rakavih obolenj in ledvičnih okvar. Gledano z druge strani, se pri bolnikih, starejših od 65 let, pojavlja manjši delež zavrnitev. Imunska senescenca je povezana z upadom sposobnosti obrambe gostitelja proti patogenom oz. karcinogenom, zato ni presenetljivo, da je pri višji starosti obolevnost in umrljivost zaradi infektivnih bolezni in raka večja. Iz tega razloga so pri starejših prejemnikih predlagali nižje odmerke imunosupresivov v izogib okužbam, kljub temu pa bi stopnja zavrnitve ostala nespremenjena. Pri starejših bolnikih se pogosteje pojavita tudi s steroidi povzročen diabetes mellitus in osteoporoza, ki pred presaditvijo upravičujeta podrobnejše testiranje teh bolnikov na komorbidna stanja.

Pljučna hipertenzija je tesno povezana s povečanim tveganjem za zgodnjo izgubo funkcije presadka in posledično umrljivostjo po presaditvi (13). Bolniki s kroničnim srčnim popuščanjem najpogosteje razvijejo pljučno hipertenzijo zaradi povišanega diastoličnega tlaka v levem ventriklu kot rezultat povišanega levo–atrijskega tlaka in pljučne venske hipertenzije.

Pri bolnikih z diabetesom pride do nalaganja kolagena in drugih glikiranih produktov v miokardu, kar vodi do večje togosti miokarda in posledično spremenjene diastolične funkcije. Poleg tega imajo diabetiki po presaditvi večje tveganje za ledvično okvaro (11). Kljub temu so pazljivo izbrani bolniki z urejenim diabetesom lahko primerni kandidati za uspešno presaditev srca s podobno stopnjo obolevnosti in umrljivosti kot bolniki brez diabetesa (13).

Pri debelih bolnikih ($ITM > 30 \text{ kg/m}^2$) se po odprti operaciji srca pojavi povečana obolevnost in umrljivost zaradi slabšega celjenja operativne rane, povečanega tveganja za okužbo, tromboze spodnjih okončin in pljučnih zapletov. Debelost pred presaditvijo je na splošno povezana s slabšimi izidi in krajšim preživetjem pri vseh bolnikih.

Pri srčnem popuščanju ledvična okvara zmanjša cirkulirajoči volumen, kar vzdraži simpatično živčevje in sistem renin–angiotenzin–aldosteron, s povišanimi koncentracijami tumor nekrotizirajočega faktorja alfa ter atrijskega in možganskega natriuretičnega peptida. Slabša ledvična funkcija pripomore k pojavu neželenih srčno–žilnih zapletov, kot je motena

homeostaza kalcija in fosfata. Kronično ledvično obolenje prispeva k razvoju in poslabšanju srčnega popuščanja, napredovalo srčno popuščanje pa k zmanjšani prekrvitvi ledvic in aktivaciji vnetnih dejavnikov, kar lahko vodi v razvoj oz. poslabšanje ledvične funkcije (11).

1.2.4. PRIPRAVA NA PRESADITEV SRCA

1.2.4.1. PSIHOFIZIČNA PRIPRAVLJENOST PREJEMNIKA

Med pripravo na presaditev srca mora prejemnik skrbeti za primerno psihofizično stanje. Pomembno je, da je v okviru svojih zmožnosti čim več telesno aktiven, da uživa uravnoteženo, zdravo hrano, opustiti mora kajenje, pitje alkohola ali druge nedovoljene droge in v primeru prevelike telesne teže shujšati. Ne sme prenehati jemati predpisanih zdravil in spremljati drugih sočasnih kroničnih obolenj v specialističnih ambulantah (12).

Velik pomen pri pripravi prejemnika na presaditev ima tudi duševna stabilnost. Kvaliteta življenja bolnikov s srčnim popuščanjem je pogosto slabša. S pomočjo družine in psihologa se prejemnik pripravi na številne zahteve, ki jih s seboj prinaša presaditev, od sprejema režima zdravljenja, doživljenjskega jemanja zdravil s pogostim pojavom neželenih učinkov, spremljanja simptomov poslabšanja bolezni, do izogibanja dejavnikom tveganja (alkohol, kajenje, nezdrava prehrana, premalo fizične aktivnosti) in rednih zdravniških pregledov. Pomembno je, da pri prejemniku pravočasno prepoznamo znake depresivnosti in anksioznosti, osebnostne motnje, neupoštevanje navodil jemanja zdravil in debelost ter jih poskušamo odpraviti zaradi velikega vpliva na zavrnitev presadka (14).

1.2.4.2. PRED-TRANSPLANTACIJSKO TESTIRANJE

Bolniki, predvideni za presaditev, morajo opraviti obsežno testiranje po priporočilih ISHLT Preglednica III).

Preglednica III. Pred–transplantacijsko testiranje za vse bolnike (10, 11)

Anamneza, telesna teža in fizični pregled

Ocena stopnje srčnega popuščanja

- 6-minutni test hoje
- Ehokardiogram
- Kateterizacija desnega srca
- Koronarna angiografija
- Elektrokardiogram

Ocena funkcije ostalih organov

- Rutinski laboratorijski testi (elektroliti z glukozo, testi za oceno jetrne in ledvične funkcije, celotna krvna slika)
- protrombinski čas/mednarodni normaliziran odnos (PČ/INR)
- Urinska analiza (proteini v urinu)
- Hitrost glomerulne filtracije (GFR)
- Testi za oceno pljučne funkcije s plinsko analizo arterijske krvi
- rentgensko slikanje (RTG) prsnega koša
- Ultrazvočno slikanje (UZ) trebuha
- Blato na okultno kri (3x)

Imunološko testiranje

- Krvna skupina (KS AB0) ((2x)
- HLA tipiziranje
- Panelna reaktivna protitelesa (PRA Pt) in pretočna citometrija

Virusna serologija in cepljenja

- Virus hepatitisa B (HBV): HBVs antigen (Ag), HBVs Pt, HBVcore Pt
- Virus hepatitisa C (HCV): HCV Pt
- Virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV)
- Herpes simplex virus (HSV): HSV imunoglobulin G (IgG)
- Citomegalovirus (CMV): CMV IgG

- Toksoplazmoza IgG
- Epstein-Barr virus (EBV): EBV IgG
- Varicella IgG
- Tuberkulozni kožni test

Splošna ocena

- Psihosocialni status
-

Preglednica IV. Pred–transplantacijsko testiranje za izbrane bolnike

Ocena funkcije več–organskih sistemov

- Doppler karotid in UZ arterij spodnjih okončin (bolezen koronarnih arterij, kadihci, > 50 let)
- Ocena pljučne funkcije (kadihci, uporaba amiodarona)
- Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) (> 50 let)
- Stomatološki pregled (slaba ustna higiena)
- Oftalmološki pregled (diabetiki)

Izključitev in preventiva malignosti

- Kolonoskopija (M > 50 let)
 - Mamografija (Ž > 40 let)
 - Ginekološki pregled s Papanicolaou-ov testom (PAP) (Ž > 18 let, spolno aktivne)
 - Prostata-specifični antigen (PSA) in digitalni rektalni pregled (M > 50 let)
-

1.2.5. IZBIRA DAROVALCA

Število razpoložljivih darovanih src že vsa leta znatno omejuje postopke presaditve srca. V nekaterih državah 50 % vseh bolnikov na čakalni listi zaradi vse daljših čakalnih dob in pomanjkanja organov ne bo nikoli prejelo srca. Iz tega razloga je postalo nujno potrebno

povečati nabor darovalcev in omiliti kriterije za darovanje organov. Začelo se je z dvigom starostne meje darovalca, ki je bila prvotno postavljena pri starosti 40 let (10).

Izbira darovalca je dvo–stopenjski proces. Prvi korak predstavlja izključitev kontraindikacij za darovanje srca, kot so značilna disfunkcija srca, prirojena bolezen srca, prenosljive bolezni ali maligne neoplazme, razen primarnih tumorjev centralnega živčnega sistema (CŽS) z majhnim metastatskim potencialom. Drugi korak označuje ujemanje specifičnega darovalca s primernim kandidatom za presaditev. Pri presaditvi srca ujemanje pomeni skladnost krvnih skupin AB0 prejemnika in darovalca ter primerljiva velikost srca (sprejemljiva je do 20 % odstopajoča velikost src), ki zagotavlja ustrezen minutni volumen srca.

Z izidom presaditve so povezani starost in hipertrofija levega ventrikla darovalca ter neskladje spolov. Do višje stopnje ob-operativne umrljivosti in višje pojavnosti poznejše vaskulopatije presadka srca pride največkrat pri uporabi src darovalcev, starejših od 40 let. Slabše dolgoročno preživetje navajajo pri hipertrofiji levega ventrikla darovalca, ko je debelina stene levega ventrikla večja od 14 mm. Po podatkih ISHLT je 5- in 10-letno preživetje slabše pri presadkih, ki so jih darovale ženske (15), predvsem zaradi prisotnih protiteles proti enemu ali več antigenom HLA darovalca, ki so se formirala tekom nosečnosti. Nastala protitelesa z vezavo na antigene HLA, izražene v endoteliju žil presadka, sprožijo aktivacijo komplementne kaskade, ki se izrazi s trombozo in infarktom presadka (hiperakutna zavrnitev) (16).

Preglednica V. Kontraindikacije za darovanje srca (10)

Starost > 50 let

Poškodba srca (zmečkanina) kot posledica poškodbe prsnega koša

Difuzno obolenje koronark

Miokardni infarkt in druge bolezni srca

Refraktarne ventrikularne aritmije

Hemodinamska nestabilnost z visokimi odmerki inotropov

Maligne neoplazme (razen v CŽS)

Refraktarne generalizirane okužbe

K izboljšanju izidov presaditve doprinesejo novosti v ohranitvi organov. Med novimi pristopi je najobetavnejša normotermična ohranitev organa, ki omogoča prekrvitev organa z ogreto krvjo in s tem zmanjšanje reperfuzijske poškodbe ter izgubo funkcije presadka. Veliko prednost s tem načinom daje tudi skrajšanje obdobja ishemije, ki je pri presaditvi srca zelo pomembno (15).

1.2.6. ZAPLETI PO PRESADITVI SRCA

Izjemni napredki v imunosupresivnem zdravljenju, nadzoru infekcije in zavrnitve so pripomogli k boljšim rezultatom presaditve srca. Trenutno znaša ob-operativna umrljivost okrog 5–10 %, 1–letno preživetje pa nad 85 %, ki pozneje linearno pada (okrog 3,4 % letno) (17) in po 10 letih znaša še približno 50 % (9). Izboljšano preživetje je rezultat novih režimov imunosupresije z boljšim razumevanjem imunskih mehanizmov pri zavrnitvi presadka, interakcij zdravilo–zdravilo in drugih komorbidnih stanj bolnikov (10). Cilj vzdrževanja imunosupresije je doseči prilagoditev prejemnika na presadek (zaščita pred akutno zavrnitveno reakcijo presadka in koronarno vaskulopatijo presadka) ob zmanjšanju tveganja za okužbo ali rakom. Nezdostna raven imunosupresije vodi v zavrnitveno reakcijo, prekomerna pa v pojav okužb in malignosti (11).

1.2.6.1. ZGODNJI ZAPLETI

Zgodnji zapleti se lahko pojavijo že med samim operativnim posegom, lahko pa tudi po njem. Mednje štejemo krvavitve, nastanek krvnih strdkov, težave z dihanjem, okužbe in akutno zavrnitveno reakcijo.

A) Okužbe

Okužbe ostajajo pomemben vzrok umrljivosti po transplantaciji srca. Tik pred operativnim posegom prejemnik prične z imunosupresivno terapijo, ki bistveno zavira njegov imunski sistem. S terapijo nadaljuje tudi po operaciji, postopno se odmerki znižajo, vendar nikoli povsem ne ukinejo. Dovzetnost organizma za okužbe se zaradi tega znatno poveča, zato se je po presaditvi potrebno izogibati stikom z bolnimi osebami, prostorom z večjim številom ljudi in hišnim ljubljencekom (12). Na splošno se tveganje za okužbo spreminja skozi čas in ima dokaj napovedljiv vzorec; v zgodnjem obdobju (do 1. meseca) po presaditvi so okužbe povezane s tehničnimi dejavniki, pri čemer gre predvsem za bolnišnične okužbe, v obdobju

med 1. in 6. mesecem so povezane z oportunističnimi patogeni ali pojavom latentnih okužb, po 6. mesecu po presaditvi pa se pojavijo okužbe, povezane z družbeno skupnostjo (15). Bolniki po presaditvi pogosto ne kažejo znakov okužb zaradi zavrtega imunskega sistema. Kljub napredku v preprečevanju okužb 20 % smrti v prvem letu po presaditvi pripisujejo okužbam in spremljajočim zapletom.

Pri okužbah v 1. mesecu po presaditvi prevladujejo med bakterijami stafilokoki in Gram-negativne bakterije, med virusi pa HSV. S preventivno uporabo aciklovirja zmanjšamo pojavnost okužb s herpes virusi. S presaditvijo povezane okužbe so okužbe, ki se pojavijo med 1. in 6. mesecem po presaditvi. V tem obdobju so bolniki dovzetni za okužbe s ponovno aktiviranimi virusi, kot so HSV, EBV in CMV. Poleg teh so lahko klinično pomembne tudi okužbe z oportunističnimi patogeni, npr. *Pneumocystis carinii pneumonia* in okužbe z *Nocardio* in *Aspergillusom* (pogosto opazimo listerije in glivične okužbe). Po 6 mesecih po presaditvi se pri prejemnikih srca pojavijo okužbe, povezane z družbeno skupnostjo, predvsem pljučne okužbe, okužbe z oportunističnimi patogeni pa so redkejše.

Najpomembnejši patogen v po-presaditvenem obdobju je CMV. Spada v družino *Herpes viridae*; edini do sedaj znani gostitelj teh virusov je človek. Pri zdravih ljudeh poteka okužba s CMV brez očitnih znakov. Pri prejemnikih srca se okužba s CMV najpogosteje pojavi v prvih 3 mesecih po presaditvi, ko je imunosupresivno zdravljenje najobsežnejše. CMV predstavlja vzročni dejavnik množice zapletov, vključno z akutnim virusnim sindromom, pnevmonitisom, gastroenteritisom, hepatitisom, retinitisom, miokarditisom, kronične zavrnitvene reakcije presadka in izgubo funkcije endotelija. Za preprečevanje in zdravljenje okužbe s CMV se uporablja zdravilo valaciklovir (10). Z občutljivimi mikrobiološkimi testi in boljšimi orodji za spremljanje imunosti bomo v prihodnosti lahko zmanjšali umrljivost zaradi zapletov ob okužbi pri prejemnikih srca (15).

B) Akutna zavrnitvena reakcija

Čeprav bi pričakovali, da bo nastop akutne zavrnitvene reakcije zaradi imunosupresivnega zdravljenja manj pogost, ostaja vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti po presaditvi. Po podatkih ISHLT je akutna zavrnitev odgovorna za okrog 12 % smrti v prvem letu po presaditvi (11).

Pri akutni celični zavrnitvi efektorske T celice posredujejo vnetni odgovor, ki vodi v infiltracijo miokarda z aktiviranimi makrofagi, efektorskimi T celicami in plazmatkami. Mononuklearne celice, ki vdrejo v miokard, povzročijo značilne poškodbe (11). Prejemnikov imunski sistem v procesu neposredne prepoznavne presadka spozna presadek kot tujek, pri čemer darovalčeve antigen predstavitvene celice (APC) potujejo iz presadka v prejemnikova limfatična tkiva in predstavijo darovalčeve HLA molekule prejemnikovim T celicam. V procesu posredne prepoznavne pa prejemnikove APC predstavijo fragmente darovalčevih HLA prejemnikovim T celicam. APC stimulirajo T celice preko več signalov. Signal I poteka s prepoznavo in vezavo aloantigenov na APC s T-celičnim receptorjem (Rp)-CD3 kompleksom in njegovim koreceptorjem (CD8 za poglobitni histokompatibilnostni kompleks (MHC) razred I ali CD4 za peptide MHC razreda II). Sam signal v odsotnosti kostimulacijskega signala ni zadosten za aktivacijo T celic. Signal II prevladujoče vključuje interakcijo B7 (CD80 in CD86) na APC s CD28 na T celicah. Po obeh signalih sledi aktivacija tirozin kinaze ZAP-70, ki nato sproži tri poti, ki vodijo v povečano izražanje genske ekspresije v T celicah:

- Kalcij-kalcinevrinska pot
- Jedrni faktor-kappa B pot (NFκB) in
- Mitogen-aktivirana protein kinazna pot.

Aktivacija teh poti sproži produkcijo citokinov (interlevkin 2 in 15: IL-2 in IL-15) in molekul CD25 ter CD154, ki se vežejo na površinske receptorje T celic. Signal III nastopi po vezavi citokinov na receptorje (npr. vezava IL-2 na IL-2 Rp) in sproži proces celične proliferacije preko sesalske tarče rapamicina (mTOR).

Aktivirane T celice potujejo iz limfatičnega sistema preko žilnega endotelija presadka srca, ki se posledično infiltrira z efektorskimi T celicami, makrofagi, B celicami in plazmatkami. Prisotnost akutne celične zavrnitve predstavljajo limfociti v miokardu; hujša kot je zavrnitvena reakcija, bolj je miokard poškodovan (18). Monojedrna celična infiltracija brez ali z enim žariščem se po ISHLT oceni z oceno 1R, infiltrat s prisotnostjo 2 ali več žarišč miocitne poškodbe z oceno 2R, infiltrat z razpršeno miocitno poškodbo in/ali spremljajočim edemom, krvavitvijo ali vaskulitisom pa z oceno 3R (11, 18).

S protitelesi posredovana akutna zavrnitev (humoralna zavrnitev) je manj pogosta od akutne celične zavrnitve; pojavi se pri približno 10 % bolnikov v povezavi s hemodinamsko nestabilnostjo. Pri senzibiliziranih prejemnikih srca je tveganje za s Pt posredovano akutno zavrnitvijo večje. Pri tej zavrnitvi prevladujejo B celice s Pt, usmerjenimi proti darovalčevim žilno-endotelijskim Ag. B-celični Rp se vežejo na darovalčeve Ag, kar vodi v aktivacijo B celic, proliferacijo in zorenje v Pt izločujoče plazmatke ter vezavo komplemента na endotelij, to pa privede do neposredne celične poškodbe, pojava vnetnih celic in s fagociti posredovane celične smrti. Na ta način poškodovan endotelij izgubi funkcijo, pojavi se kapilarna koagulacija, ishemija miokarda in disfunkcija presadka. Zgodnja histopatološka opažanja se kažejo v otekanju endotelijskih celic arteriol, venul in kapilar, povečanju jedra in znotraj-kapilarni infiltraciji makrofagov. Vezavi Pt in aktivaciji komplemента sledi naval nevtrofilcev, intersticijska oteklina, pojav žilnih trombusov in poškodba miocitov. S Pt posredovano akutno zavrnitev imunohistokemijsko dokažemo s prisotnostjo imunoglobulinov razreda IgG, IgM ali IgA, fragmenti komplemента (C3d, C4d, Cq1) ali CD68 celic (makrofagi), poleg tega pa še s cirkulirajočimi novimi Pt HLA proti darovalcu (18).

Večje tveganje za pojav akutne zavrnitve imajo mlajši prejemniki, ženske, prejemniki z nizko stopnjo histokompatibilnosti in okužba prejemnika ali darovalca s CMV. Pri ženskah zasledimo večjo pojavnost akutne zavrnitve in slabšega preživetja predvidoma zaradi pogostejših avtoimunskih bolezni in prejšnjih nosečnosti. V primerjavi z moškimi se zaradi tega poslužujejo intenzivnejšega imunosupresivnega zdravljenja. V nasprotju z ženskami pa starejši prejemniki prejemaajo nižje odmerke imunosupresivov zaradi že obstoječega oslabiljenega imunskega odziva.

Trenutno še ni na voljo zanesljiv neinvazivni test, zato ostaja biopsija endomiokarda zlati standard za odkrivanje akutne zavrnitve presajenih src. Nenadzorovana kronična zavrnitev presadka lahko z ostalimi dejavniki tveganja vodi v koronarno bolezen presadka (11).

1.2.6.2. POZNI ZAPLETI

Zelo pogosto se lahko pojavijo tudi pozni zapleti, med katere prištevamo koronarno vaskulopatijo presadka (kronična zavrnitev), povišan krvni tlak, sladkorno bolezen, hiperlipidemijo, kronično ledvično okvaro, osteoporozo in maligna obolenja.

A) Koronarna vaskulopatija presadka

To stanje predstavlja najpogostejši vzrok pozne zavrnitve presadka. Koronarno vaskulopatijo presadka označuje zmanjšanje žilnega premera za več kot 50 %, ki ga odkrijejo pri približno 30–50 % bolnikov po 5 letih po presaditvi (15). Označuje difuzno, koncentrično tanjšanje intime tako epikardialnih kot intramuralnih arterij. Klinični znaki vključujejo miokardni infarkt, aritmije, kongestivno srčno popuščanje in nenadno smrt. Preživetje je tesno povezano z resnostjo bolezni in s slabimi izidi pri bolnikih, ki imajo stenozo primarne ali sekundarne ali tri-žilne bolezni koronarnih arterij večjo od 70 % (15). Poškodba endotelija in vnetni procesi prispevajo k tanjšanju intime s citokini povzročene miofibroblastne proliferacije in fibroze (11).

Kljub temu, da vaskulopatijo presadka danes bolje razumemo, ostajajo podrobnejši patofiziološki mehanizmi nepopolno razumljeni. K nastanku bolezni naj bi prispevali ne-imunološki in imunološki dejavniki tveganja. Ne-imunološki dejavniki vključujejo hiperlipidemijo, povišan krvni tlak, diabetes mellitus, hiperhomocisteinemijo in višjo starost darovalca srca. Med imunološke dejavnike spadajo neujemanje darovalčevih in prejemnikovih Ag HLA (še posebej HLA DR neujemanje), ponovljiva celična zavrnitev in s Pt posredovana zavrnitev. Veliko pozornosti je kot dejavnik tveganja za vaskulopatijo presadka deležna tudi okužba s CMV. Nedavne študije so razkrile, da bolniki s CMV-okužbo z znaki okužbe ali brez, pogosteje zbolijo za vaskulopatijo presadka, poleg tega poteka pri njih bolezen v mnogo resnejši obliki. Okužba s HBV pri prejemniku in darovalcu ter okužba darovalca s HCV naj bi pospešili potek bolezni (15).

Diagnozo bolezni postavijo na podlagi koronarne angiografije ali intravaskularnega ultrazvoka (IVUS). Hitro napredujoča vaskulopatija s stanjšanjem intime za ≥ 5 mm v prvem letu po presaditvi predstavlja močan kazalec za umrljivost, miokardni infarkt in žilne nepravilnosti (11).

B) Rakava obolenja

Rakava obolenja predstavljajo vodilni vzrok smrti med prejemniki z daljšim preživetjem in se enačijo s koronarno vaskulopatijo presadka kot vzroka smrti med prejemniki, ki preživijo obdobje 5 let. Pojavijo se zaradi dolgotrajnega imunosupresivnega zdravljenja, ki inaktivira mehanizme učinkovitega odstranjevanja rakavih celic, zaradi prekomerne rabe in

sinergističnega učinka imunosupresivov ter onkogenih virusov (EBV, humani papiloma virus (HPV)) (10, 15). V primerjavi z ostalo populacijo imajo prejemniki srčnih presadkov izrazito povišano pojavnost limfoproliferativnih malignomov in kožnega raka. Tveganje za kožnega raka se poveča po 3 letih po presaditvi, še posebej pri starejših prejemnikih (10). Z uvedbo inhibitorjev signalnih poti proliferacije zmanjšamo napredovanje rakavih obolenj in lahko celo dosežemo regresijo nekaterih oblik rakavih obolenj (15).

C) Hipertenzija

Po 5 letih po presaditvi ugotovijo zvišan krvni tlak pri približno 95 % bolnikov. Za razvoj hipertenzije so odgovorni kalcinevrinski inhibitorji (CNI) in kortikosteroidi (imunosupresivi) skupaj z denervacijo srca. Prvi pristop k zdravljenju hipertenzije je zmanjšanje vnosa soli v prehrano, sledi zdravljenje z inhibitorji angiotenzin konvertirajočega encima (ACE) in blokatorji kalcijevih kanalčkov. Če funkcija ledvic pri bolniku ni prizadeta, se lahko poslužujemo tudi diuretikov (10).

D) Kronična ledvična okvara

Funkcija ledvic se po presaditvi srca poslabša, predvsem pri starejših prejemnikih. Uporaba CNI predstavlja glavni vzrok za poslabšanje ledvične funkcije, poleg njih pa k upadu funkcije prispevajo tudi že obstoječa okvara ledvične funkcije in spremenjena hemodinamika, ki povzroči zmanjšano prekrvitev ledvic skupaj s hipertenzijo, diabetesom in dislipidemijo. Koncentracija serumskega kreatinina pred presaditvijo se je izkazala za kazalca kronične ledvične okvare, in sicer imajo bolniki s koncentracijo kreatinina $> 132,6 \mu\text{mol/L}$ pred presaditvijo 3-krat večje relativno tveganje za kronično ledvično okvaro glede na ostale prejemnike. Očistek kreatinina pri okvarjeni ledvični funkciji pred presaditvijo je prav tako povezan z večjo zgodnjo in pozno smrtnostjo po presaditvi ter povečano potrebo po dializi. Poslabšanje ledvične funkcije opazimo pri približno polovici bolnikov s presajenim srcem 1 leto po presaditvi. Glomerularna filtracija $< 40 \text{ mL/min}$ pri kandidatu za presaditev srca se smatra kot relativna kontraindikacija.

Odkar so odkrili, da so CNI odgovorni za nefrotoksičnost in kronično ledvično okvaro, so vpeljali smernice za zmanjšanje odmerkov, izogibanje ali popolno ukinitvev teh zdravil, s čimer pripomoremo k zmanjšanju poslabšanja ledvične funkcije pri prejemnikih srca. Pri

bolnikih z obstoječo nepopravljivo ledvično okvaro in končno odpovedjo srca v odsotnosti drugih pomembnih bolezni predstavlja rešitev kombinirana presaditev srce/ledvica (10).

E) Hiperlipidemija

Bistveni povzročitelji hiperlipidemije so neprimerna prehrana, genetska nagnjenost in imunosupresivna terapija. Kalcinevrinski inhibitor ciklosporin A (CYA) zviša nivo holesterola z zmanjšanjem sinteze žolčnih kislin iz holesterola in inhibicijo delovanja lipoprotein lipaze. Na drugi strani kortikosteroidi sprožijo delovanje acetyl-CoA karboksilaze, sintezo prostih maščobnih kislin, jetrno sintezo lipoproteinov nizke gostote (VLDL) in 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktazno delovanje, pri čemer koncentracija celokupnega, LDL holesterola in trigliceridov poraste, koncentracija HDL holesterola pa se zniža (10).

Hiperlipidemijo opazimo pri več kot 85 % bolnikov 5 let po presaditvi. Več raziskav je pokazalo, da je hiperlipidemija povezana z visoko pojavnostjo koronarne vaskulopatije presadka, zato je po presaditvi nujno zdravljenje s statini (10, 11).

F) Sladkorna bolezen

Razvoj sladkorne bolezni po presaditvi srca je povezan z zmanjšano funkcijo presadka in preživetjem prejemnika, ravno tako tudi s povečanim tveganjem za zavrnitev presadka. Vsi ti razlogi narekujejo strikten nadzor nad koncentracijo glukoze po presaditvi, saj lahko s tem pripomoremo k manj številnim koronarnim obolenjem (11).

G) Osteoporoza

Osteoporoza je pomemben dejavnik obolevnosti pri postmenopavzalnih ženskah, ki so jemale kortikosteroide. Vzroki za nastanek osteoporoze po presaditvi so zmanjšanje kostne gostote pred presaditvijo, imunosupresivna terapija in kronična ledvična okvara. Največje zmanjšanje kostne gostote se pojavi med 6. in 12. mesecem po presaditvi, saj so takrat odmerki steroidov največji. Dve leti po presaditvi ima resnejšo osteoporozo na vratu stegenice približno 20 % prejemnikov, 28 % pa jih ima osteoporozo na ledvenih vretencih. Redna telesna aktivnost, nadomeščanje kalcija in vitamina D ter jemanje bisfosfonatov so ukrepi, s katerimi preprečujemo nastanek osteoporoze (10, 12).

1.2.7. FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE

Cilj imunosupresivnega zdravljenja je preprečiti zavrnitev presajenega srca in istočasno zmanjšati neželene učinke zdravil kot so okužbe, rakava obolenja, sladkorna bolezen, zvišan krvni tlak in okvara ledvične funkcije. Zelo pomembno je tudi preprečevanje napredovanja koronarne vaskulopatije presadka (11). Imunosupresivni protokol pri presaditvi srca predstavlja kombinacija zdravil, ki učinkujejo na različne poti aktivacije T celic (18). Odkritje učinkovitih imunosupresivov predstavlja velik napredek in posledično uspeh pri presajanju srca. V zgodnjih 80-ih letih prejšnjega stoletja je vpeljava CYA v protokole imunosupresivnega zdravljenja doprinesla k bistveno daljšemu preživetju prejemnikov srca. Za tem so odkrili še druge imunosupresive, katere v številnih raziskavah preučujejo še danes, predvsem vprašanja v zvezi s potrebo po zgodnji indukcijski terapiji, najučinkovitejši in najvarnejši kombinaciji imunosupresivov, varnosti zgodnje ukinitve steroidov in najmanjšega možnega vzdrževalnega odmerka imunosupresivov (15).

Učinke imunosupresivov delimo v tri skupine:

- Želeni imunosupresivni učinki
- Neželeni učinki imunodeficiencie (okužbe, rakava obolenja) in
- Ne–imunski toksični učinki (sladkorna bolezen, zvišan krvni tlak, okvara ledvične funkcije) (10, 19).

Preglednica VI. Imunosupresivna zdravila pri presaditvi srca

<i>Imunosupresiv</i>	<i>Tarčno delovanje</i>	<i>Pojasnila</i>
Poliklonska Pt -konjski ali kunčji anti-timocitni globulin (ATG)	odstranitev Pt proti T celicam	selektivna uporaba pri zdravljenju akutne zavrnitve in/ali za indukcijsko zdravljenje
Humanizirana monoklonska Pt (anti-IL-2 Rp Pt) -daklizumab in baziliksimumab (anti-IL-2 Rp Pt)	anti-CD25 Pt	selektivna uporaba za indukcijsko zdravljenje

-rituksimab	anti-CD20 Pt (odstranitev B celic)	selektivna uporaba pri zdravljenju humoralne zavrnitve oz. senzibiliziranih bolnikov
-------------	---------------------------------------	--

Kortikosteroidi

-prednizon (15)	več tarč, vključno z inhibicijo APC in procesa transkripcije	običajno zdravilo ukinemo v 1 letu
-----------------	--	------------------------------------

CNI

-CYA (20)	vezava na ciklofilin, ki ima visoko afiniteto za kalcinevrin (proteinska fosfataza v procesu T-celične aktivacije)	uporaba pri bolnikih s slabo nadzorovanim DM
-TAC (21)	vezava na FKBP12– inhibicija produkcije IL-2	uporaba pri bolnikih z visokim tveganjem za akutno zavrnitev in okvaro ledvične funkcije

Antiproliferativna zdravila

-MMF (22)	inhibicija glikozilacije in izražanja adhezijskih molekul	nadomestil AZA, za preprečevanje in zdravljenje zavrnitve presadka
-----------	---	--

Inhibitorji signalne poti proliferacije

-SRL	tarča rapamicina pri sesalcih (mTOR)	SRL + CYA → sinergistični učinek nefrotoksičnosti
-EVL		EVL + CYA → daljše preživetje presadka, manj akutnih zavrnitev

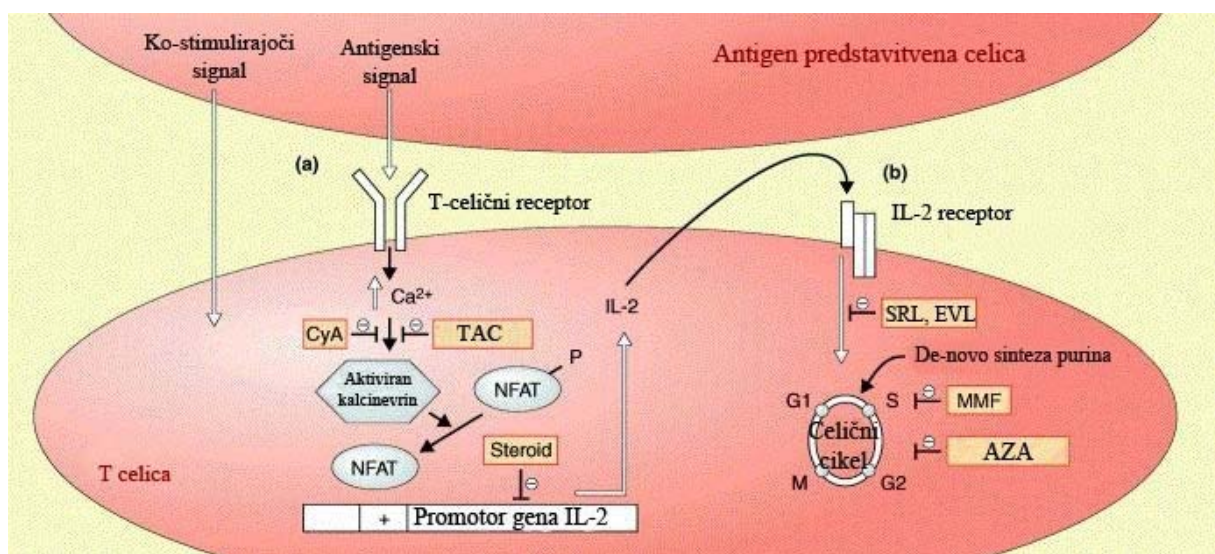
Imunoglobulin za i.v. aplikacijo (IVIG) (15)	večstopenjski model delovanja do nastanka imunskih kompleksov, ki interagirajo z Fc R _p na APC	selektivna uporaba pri zdravljenju humoralne zavrnitve ali senzibiliziranih bolnikov
---	---	--

Fuzijski receptorski proteini (23)

-atacicept	inhibira stimulacijo B celic (zavrtje BLYS in APRIL liganda)	zdravljenje senzibiliziranih bolnikov
-bortezomib	apoptoza hitro delečih celic	preprečevanje zavrnitve,

	(inhibicija 26S proteasoma)	izboljšanje ledvične funkcije
-belatacept	inhibicija sign. poti preko CD28	izboljšana GF
	Rp z vezavo na njegova liganda	
	CD80 in CD86	

Protokoli imunosupresivnega zdravljenja se v splošnem delijo na indukcijsko, vzdrževalno in proti-zavrnitveno terapijo (10).



Slika 1. Shematski prikaz delovanja imunosupresivov

A) Indukcijsko zdravljenje

Nanaša se na močna imunosupresivna zdravila, ki jih prejemnik jemlje pred ali v prvih dneh po presaditvi (4-6 dni), da preprečimo pojav zgodnje akutne zavrnitve organa. Zasnovana so tako, da sprožijo toleranco do presadka, in sicer z močno imunosupresijo takrat, ko je aloimunski odziv najmočnejši. Lahko se uporablja tudi za odloženo vpeljavo kalcinevrinskih inhibitorjev (CNI) za vzdrževanje imunosupresije pri bolnikih z ledvično okvaro (10). Za indukcijsko zdravljenje se uporabljajo **limfocitolitične učinkovine** (monoklonska anti-CD3 Pt glodavcev: OKT3, konjska ali kunčja poliklonska anti-timocitna Pt: ATG) ali **anti-IL-2 Rp protitelesa**: daklizumab, baziliksimumab) (11, 18). OKT3 bolniki težko prenašajo zaradi pogostih alergijskih reakcij, okužb (CMV) in limfomov, zato njegova uporaba pada;

uspešneje ga nadomestita ATG in anti-IL-2 Rp Pt. Daklizumab in baziliksimumab vsebujeta rekombinantna, humanizirana monoklonska Pt, ki se vežejo na α -podenoto IL-2 Rp na aktiviranih T limfocitih in kompetitivno inhibirajo vezavo IL-2, pri čemer pride do imunosupresije. Pri ATG so opazili večje tveganje za limfom. Pomanjkljivosti indukcijskega zdravljenja sta povečano tveganje za okužbe, rakava obolenja ali oboje in s tem povečani stroški zdravljenja (10).

B) Vzdrževalno zdravljenje

Cilj vzdrževalnega zdravljenja je doseči prilagoditev prejemnika na presadek in zmanjšati tveganje za okužbo ali rakavo obolenje. Večina programov za presaditve srca vključuje v vzdrževalnem imunosupresivnem zdravljenju kombinacijo zdravil, ki zmanjšajo stranske učinke enega zdravila in istočasno vzdržujejo zadostno vsesplošno imunosupresijo. Predstavnik imunosupresivov za vzdrževalno zdravljenje predstavljajo **kortikosteroidi** (prednizon), **CNI** (CYA, TAC), **antiproliferativna zdravila** (MMF, AZA) in **mTOR inhibitorji** (SRL, EVL). Vzdrževalno zdravljenje se običajno sestoji iz kombinacije 3 skupin zdravil, in sicer CNI, antiproliferativnih zdravil in steroidov (10, 15).

Preglednica VII. Neželeni učinki imunosupresivov, uporabljenih pri vzdrževalni terapiji

<i>Imunosupresiv</i>	<i>Neželeni učinki</i>
Kortikosteroidi	
-prednizon	hipertenzija, hiperglikemija, dislipidemija, želodčna razjeda, Cushingovemu sindromu podobni simptomi, osebne motnje, pojav katarakt, osteoporoza
CNI	
-ciklosporin (CYA)	nefrotoksičnost, hiperglikemija, hipertenzija, dislipidemija, hiperurikemija, tremor, parestezije, hiperplazija dlesni, hipertrikoza
-takrolimus (TAC ali FK506)	hiperlipidemija, hipertenzija, hirsutizem, in hiperplazija dlesni v manjši meri kot pri CYA
Antiproliferativna zdravila	
-azatioprin (AZA)	depresija kostnega mozga (KM), hepatoksičnost, motnje

	gastrointestinalnega trakta (GIT)
-mikofenolat mofetil (MMF)	manjša depresija KM

Inhibitorji signalne poti

proliferacije (mTOR)

-sirolimus (SRL)	podaljšano celjenje kirurške rane, plevralni in
-everolimus (EVL)	perikardialni izlivi, levkopenija

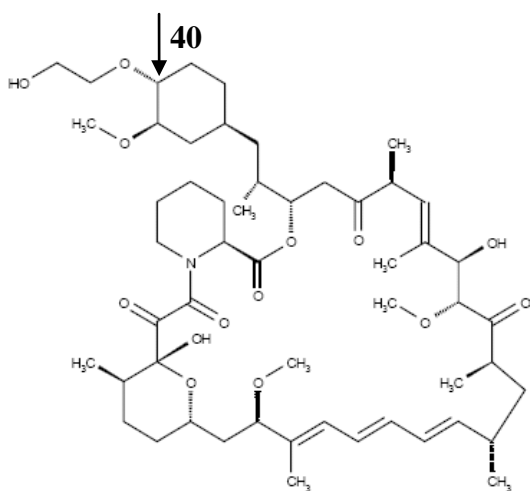
C) Zdravljenje akutne zavrnitve

Kljub standardizaciji rezultatov endomiokardne biopsije temelji zdravljenje akutne zavrnitve na individualnem pristopu. Zdravniki se o vrsti zdravila odločijo na podlagi kliničnih znakov, histoloških in hemodinamskih sprememb. Način zdravljenja je na splošno odvisen od časa po presaditvi, resnosti akutne zavrnitve in protokola transplantacijskega centra. Zdravljenje lahko sestoji iz **steroidov, monoklonskih ali poliklonskih Pt ali povečanih** (CYA, TAC, MMF) **oz. znižanih odmerkov** (zamenjava CYA s TAC ali MMF z EVL) **že uporabljenih imunosupresivov**. Z zdravljenjem akutne zavrnitve pričnemo, ko je rezultat biopsije $\geq 3A$, in sicer z intravensko aplikacijo steroidov (3-5 dni). Če bolniki kažejo znake povišane telesne temperature, aritmij in poslabšanja hemodinamike, jih zdravimo kljub nižjemu rezultatu biopsije. Ponavljajoče hude epizode akutne zavrnitve potekajo sorazmerno z razvojem koronarne vaskulopatije presadka. Ponavljajoči milejši nastopi zavrnitve so vzrok kasnejše okvare presadka, zaradi česar je preživetje bolnikov krajše kot pri bolnikih brez pojavov zavrnitve presadka (10).

1.2.8. EVEROLIMUS

Everolimus je makrolidni imunosupresiv z 2-hidroksietilno verigo na mestu 40 in molekulska masa 958,224 g/mol ($C_{53}H_{83}NO_{14}$). Je derivat sirolimusa (rapamicin), makrolidnega antibiotika, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces hygroscopicus* (1975 izolirana iz prsti blizu mesta Rapa-Nui na Velikonočnih otokih). Prav tako kot SRL tudi EVL izkazuje antiproliferativno in imunosupresivno delovanje s še boljšo stabilnostjo, topnostjo in farmakokinetičnimi lastnostmi (24, 25). EVL (Certican®) je v Evropi za imunosupresivno zdravljenje pri presaditvah ledvic in srca Evropska agencija za zdravila EMA odobrila leta

2003 (najprej na Švedskem), v Združenih državah Amerike (Zortress®) pa pri presaditvah ledvic agencija Food and Drug Administration leta 2010 (26). EVL uporabljamo za preprečevanje akutne zavrnitve presadka, poleg tega zmanjšuje tveganje za okužbe s CMV in koronarno vaskulopatijo presadka. Ob sočasnem jemanju EVL s CYA pride do sinergističnega učinka in s tem do večje nefrotoksičnosti, povezane z jemanjem CYA. Za omejitev nefrotoksičnosti in ohranitev zadostne stopnje imunosupresije je potrebno spremljati koncentracijo EVL v polni krvi bolnika (TDM) in postopoma zmanjševati odmerke CYA (24).



Slika 2. Strukturna formula EVL

1.2.8.1. Farmakološke značilnosti

EVL zavira z rastnimi faktorji spodbujeno celično proliferacijo hematopoetskih in nehematopoetskih celic z nastankom kompleksa s FK506-vezočim proteinom 12 (FKBP12). Kompleks EVL-FKBP12 inhibira proteinsko kinazo mTOR, ki ustavi celični cikel v G₁ fazi. Poleg tega inaktivira p70 S6 kinazo v celicah sesalcev *in vitro*, posledica česar je zavrtje sinteze ribosomalnih proteinov. Celični cikel je tako podaljšan (zadržan) v G₁-S interfazi (24, 25). Zdravilo izkazuje antiproliferativno delovanje v imunskem sistemu in na z rastnimi faktorji spodbujeni celični replikaciji (celična proliferacija žilnega gladkega mišičja, žilna remodelacija in angiogeneza). To odkritje je vodilo v raziskave klinične uporabnosti imunosupresiva in antineoplastičnega zdravila EVL pri transplantacijah organov in srčno-žilnih boleznih (26). Primarno izkazujejo inhibitorji mTOR regulatorno delovanje na celično proliferacijo z nadzorom produkcije ciklina D1; ta protein uravnava aktivnost encimov od

ciklina odvisnih kinaz preko zadržanja G₁-S faze celičnega cikla, ki v nasprotnem primeru uravnava proces celične delitve. Povečano izražanje ciklina D1 povezujejo z mnogimi rakavimi obolenji (karcinom dojke, širokega črevesa, karcinom prostate, limfom in melanom). Do povečanega delovanja mTOR vodijo tudi mutacije v tumor skleroznem kompleksu 1 in 2 (TSC1 in TSC2), čemur sledi nenadzorovana celična proliferacija in pojav več sistemskih tumorjev (27).

Inhibitorji mTOR in TAC imajo skupne znotrajcelične vezoče proteine, vendar pride do kompetitivne inhibicije *in vitro* le, kadar koncentracija enega od zdravil presega koncentracijo drugega zdravila za več kot trikrat. Običajno je vezanega manj kot 5 % FKBP12 proteina, zaradi česar kompetitivna inhibicija ne predstavlja kliničnih težav (26).

Farmakokinetične lastnosti EVL so odvisne od odmerka učinkovine. Absorpcija poteka hitro, saj najvišje koncentracije učinkovine izmerimo v vzorcu polne krvi 1-2 uri po zaužitju zdravila. Ravnovesno stanje se vzpostavi po 4 dneh jemanja zdravila. Več kot 75 % učinkovine se prenese v eritrocite. 75 % plazemske frakcije EVL je vezanega na plazemske proteine. Presnavlja se pretežno v GIT in jetrih s pomočjo citokromalnih encimov P450 (CYP) 3A4, 3A5 in 2C8. Približno 98 % se ga izloči v žolč v obliki metabolitov; teh je 13, v glavnem so hidroksiliranih oblik. Biološka razpoložljivost EVL je majhna (16 %), vseeno pa nekoliko višja od SRL (10 %). Odvisna je od prisotnosti hrane (obrok z veliko maščobami podaljša razpolovni čas EVL in za polovico zmanjša c_{max}) v prebavnem traktu in od funkcije jeter (zaposnelo odstranjevanje EVL iz telesa in posledično povišanje koncentracije učinkovine v krvi). Absorpcija EVL, kot tudi SRL, najverjetneje poteka pod vplivom aktivnosti P-glikoproteina (25, 26), membranskega proteina, ki služi kot črpalka za prenos ksenobiotikov iz celic. Omejuje biološko razpoložljivost učinkovin substratov s prečrpavanjem iz enterocitov nazaj v lumen GIT. Ugotovili so, da grenivkin sok zavira CYP3A4, kar poveča biološko razpoložljivost zdravil, ki so substrat za CYP3A4, zato uživanje grenivkinega soka ob jemanju EVL odsvetujejo (28). Zaradi nenehne potrebe po naboru različnih zdravil pri bolnikih, ki so prestali presaditev srca (ali drugega organa), je uspeh imunosupresivne terapije odvisen od zadostne izpostavitve učinkovini brez toksičnih učinkov in učinkov, ki se pojavijo ob sočasnem jemanju več zdravil hkrati. Jemanje EVL z močnimi inhibitorji (grenivkin sok) oz. induktorji CYP3A4 zato ni priporočljivo.

Drugi CYP3A4 in/ali P-glikoprotein inhibitorji, kot sta makrolida eritromicin in azitromicin ter antifungicidni snovi ketokonazol in itrakonazol, povečajo izpostavljenost EVL-u. Prav tako lahko koncentracije EVL zvišajo proteazni inhibitorji (nelfinavir, indinavir, amprenavir) in zaviralci kalcijevih kanalčkov. V nasprotju s temi koncentracije EVL v krvi zmanjšajo induktorji CYP3A4 (rifampicin, nekateri antiepileptiki in nekatera anti-HIV zdravila: efavirenz, nevirapin). CYP3A4 izoencimi in P-glikoprotein so vpleteni tudi v metabolizem HMG-CoA reduktaznih inhibitorjev (statini), ki jih uporabljamo za zdravljenje dislipidemij pri bolnikih po presaditvi srca. Glede na podatke, pridobljene pri zdravih posameznikih, ki so sočasno jemali atorvastatin (substrat CYP3A4) ali pravastatin (substrat P-glikoproteina) in EVL, interakcije niso klinično pomembne (24).

Razpolovna doba EVL je od 18 do 35 ur, zaradi česar je potrebno dvakratno dnevno odmerjanje zdravila (SRL ima razpolovni čas 60 ur, ki narekuje le enkratni dnevni odmerek). Pri bolnikih z jetrno okvaro je očistek EVL nižji, zato morajo biti odmerki zdravila prilagojeni in ustrezno zmanjšani za polovico (25). Pri Kavkazijcih niso opazili sprememb očistka EVL (ob sočasnem jemanju CYA in kortikosteroidov), medtem ko so pri črnski rasi opazili za 20 % nižje vrednosti koncentracij EVL glede na ne-črnsko raso. Iz tega razloga je pri črncih potrebno odmerke zdravila prilagoditi in ga ustrezno povišati. Starost, spol in telesna teža nimajo vpliva na farmakološke lastnosti EVL (24).

Inhibitorji signalne poti proliferacije dopuščajo pri skrbno izbranih bolnikih znižanje odmerkov, ukinitvev ali izogibanje CNI zaradi nefrotoksičnosti, ki je poleg učinkovite imunosupresije posledica sočasnega jemanja EVL in CYA. Z izkoriščanjem antiproliferativnega in antineoplastičnega učinka inhibitorjev signalne poti proliferacije dosežemo zavrtje akutne zavrnitvene reakcije z manjšo dolgoročno **okvaro ledvic, koronarno vaskulopatijo presadka in pogostostjo rakavih obolenj** (26).

1.2.8.2. Priporočeni režim zdravljenja in odmerjanje EVL

EVL (v obliki tablet) se v kombinaciji s CYA in kortikosteroidi uporablja za preprečevanje akutne zavrnitve pri odraslih prejemnikih presadka srca ali ledvice (24, 29). Boljši nadzor kardiovaskularnih faktorjev tveganja in rutinska vpeljava statinov v terapijo vsem bolnikom po presaditvi srca sta občutno zmanjšala obolevnost, umrljivost in napredovanje koronarne vaskulopatije presadka. Obetajoče rezultate na tem področju so pokazali tudi kalcijevi antagonisti, ACE inhibitorji in anti-CMV zdravila. Rakava obolenja so naslednji dejavnik z

vplivom na dolgoročne izide presaditev srca. Inhibitorji signalne poti proliferacije zmanjšajo tveganje za po-transplantacijska rakava obolenja.

A) Zgodnji prehod na EVL (≤ 6 mesecev po presaditvi srca)

Prvih 6 mesecev po presaditvi srca je kritično obdobje zaradi pojavov najpomembnejših po-transplantacijskih težav: koronarne vaskulopatije presadka, nefropatije in rakavih obolenj, zato je potrebno čimprejšnje preprečevanje teh stanj. V tem obdobju je imunosupresivno zdravljenje najobsežnejše, zaradi česar se pojavi tudi večje število neželenih učinkov zdravil. Klinične raziskave so pokazale, da ima čimprejšnja vpeljava inhibitorjev signalne poti proliferacije večje koristi pri preprečevanju koronarne vaskulopatije presadka.

B) Srednji in pozni prehod na EVL (> 6 mesecev po presaditvi srca)

Okvara ledvične funkcije je pogost zaplet pri prejemnikih presadka srca in je sorazmerno povezana s slabšimi izidi. Nefrotoksičnosti zaradi CNI se lahko izognemo z manjšimi odmerki CNI ali pa jih opustimo. Inhibitorji signalne poti proliferacije sami po sebi niso nefrotoksični, vendar lahko v kombinaciji s polnimi odmerki CYA ali TAC stopnjujejo nefrotoksični vpliv CNI, če ni nadzora nad odmerki in koncentracijami zdravila v krvi. Mnoge raziskave so razkrile, da je vpeljava EVL ali SRL s pridruženim postopnim zniževanjem odmerkov ali ukinitvijo CNI, povezana z značilnim izboljšanjem ledvične funkcije brez izgube imunosupresivnih učinkov. Omenjeni režim je potrebno vpeljati zgodaj, saj je pri bolnikih z napredovalo ledvično okvaro pričakovano izboljšanje slabše. Kljub temu v nekaterih raziskavah priporočajo vpeljavo EVL z zniževanjem odmerkov CNI pri že obstoječi okvari ledvične funkcije.

Zamenjava CNI z inhibitorji signalne poti proliferacije je povezana s 50–70 % remisij kožnih rakov, ki se pojavijo v po-transplantacijskem obdobju. Nekatere raziskave namigujejo, da so inhibitorji signalne poti proliferacije skupaj z drugimi standardnimi terapevtskimi merili učinkoviti v boju proti po-transplantacijskim limfomom. Na osnovi trenutno še vedno omejenih podatkov o proti-rakavem delovanju EVL ali SRL pri prejemnikih organov mora odločitev o vpeljavi inhibitorjev signalne poti proliferacije kot možnosti imunosupresivnega zdravljenja temeljiti na individualiziranem pristopu v sklopu multidisciplinarne oskrbe in spremljanja bolnikov po presaditvi.

C) Odmerjanje EVL

Pri novih bolnikih priporočajo uvedbo EVL skupaj s CYA in kortikosteroidi čim prej po presaditvi, in sicer z odmerkom 0,75 mg/12 ur. Pri bolnikih z blago do zmerno jetrno okvaro so potrebni manjši odmerki, običajno za več kot polovico. Zagotoviti moramo spremljanje koncentracij zdravila v krvnem obtoku (TDM), da vzdržujemo terapevtsko območje EVL med 3 in 8 µg/L. Tak odmerek zagotavlja primeren učinek proti zavrnitvi brez povečanega pojava stranskih učinkov. Pri novih bolnikih, zdravljenih z EVL, je pomembno upoštevati tudi možnost zniževanja odmerka CYA za preprečitev nefrotoksičnih učinkov. Za ohranitev ledvične funkcije je potrebno začeti z zniževanjem odmerka CYA čimprej po vpeljavi EVL. Pri bolnikih z okvarjeno funkcijo ledvic pred presaditvijo protokol zdravljenja obsega EVL (z zdravili za indukcijsko zdravljenje), MMF/AZA in kortikosteroide, ki omogočijo odloženo vpeljavo CNI.

Pri srednji in pozni vpeljavi EVL s sočasnim znižanjem odmerka CYA stabilizira funkcijo ledvic brez povečanja tveganja za zavrnitev. Istočasno ukinemo MMF/AZA in pričnemo z EVL pri odmerku 0,50 do 0,75 mg/12 ur. Po doseženem terapevtskem območju med 3 in 8 µg/L lahko začnemo s postopnim zniževanjem odmerka CYA (3 dni po vpeljavi EVL), da dosežemo ciljne vrednosti koncentracij med 50 in 100 µg/L (2.-3. teden). Med procesom ukinitve CNI je potrebno sočasno zdravljenje z MMF in kortikosteroidi pri polnih odmerkih ter ugotavljanje akutne zavrnitve z endomiokardnimi biopsijami med 30 in 90 dnevi po prenehanju zdravljenja s CNI. Pri bolnikih s hudo okvaro ledvic pričnemo z vpeljavo EVL in MMF. Glede na po-transplantacijska rakava obolenja so koristi zamenjave CNI z EVL verjetno rezultat tako antineoplastičnih učinkov inhibitorjev signalne poti proliferacije, kot tudi ukinitve potencialno onkogenih učinkovin kot sta CYA in TAC. Kadar se pri bolnikih po vpeljavi EVL in ukinitvi CNI pojavijo rakava obolenja in koronarna vaskulopatija presadka z akutno zavrnitvijo, moramo nadaljevati z EVL zaradi antiproliferativnih učinkov, ukiniti MMF in ponovno uvesti CNI z nizkimi odmerki, da preprečimo zavrnitveno reakcijo (29).

Pri bolnikih, zdravljenih z EVL, moramo spremljati funkcijo ledvic. Zdravilo naj bolniki ne bi jemali s polnim odmerkom CYA daljše časovno obdobje. Priporočajo zmanjševanje odmerkov CYA po 1 mesecu po presaditvi (24).

1.2.8.3. Neželeni učinki EVL

Kljub dobri toleranci je pojav neželenih učinkov ob uporabi EVL dokaj pogost. V raziskavi CADENCE so poročali o 25 % bolnikov, ki so prenehali z jemanjem EVL zaradi enega ali več neželenih učinkov (26). Najpogostejši neželeni učinki so hiperlipidemija (\uparrow celotni holesterol, trigliceridi, LDL holesterol, \downarrow HDL holesterol; EVL spremeni homeostazo lipidov v makrofagih s povečano esterifikacijo holesterola, kljub temu pa EVL in SRL preprečujeta razvoj ateroskleroze), levkopenija, trombocitopenija, periferni edemi (spremenjena permeabilnost endotelija z oksidativnim stresom in sproščanjem prostaciklina), slabo celjenje kirurške rane (zaradi antiproliferativnega učinka in okužb rane), nefrotoksičnost (\uparrow kreatinin: hujša nefrotoksičnost ob sočasnem jemanju CYA, proteinurija zaradi zmanjšane tubulne reabsorpcije proteinov), akne, okužbe (bakterijske okužbe: pnevmonitis, vnetje žrela; virusne infekcije: sinusitis, herpes simplex, CMV) in GIT motnje (slabost, bruhanje, driska) (25, 26, 29, 30, 31, 32).

1.2.8.4. Spremljanje koncentracij EVL

Za vzdrževanje koncentracij EVL v ozkem terapevtskem območju med 3 in 8 $\mu\text{g/L}$ je potrebno tako kot pri ostalih imunosupresivih spremljati koncentracije učinkovine v polni krvi. Poleg ozkega terapevtskega območja ima EVL tudi spremenljivo biorazpoložljivost med posamezniki (24, 25). Z vzdrževanjem koncentracije učinkovine v polni krvi v terapevtskem območju zmanjšamo možnost pojava neželenih učinkov (še posebej ob vzporedni terapiji s CYA) ob hkratni ohranitvi koristnih učinkov zdravila (26). Prvotno so koncentracije učinkovine v polni krvi določali le s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (LC-MS). Slabost te metode je obsežna predpriprava vzorca, sposobnost analiziranja le enega vzorca, potreba po usposobljenem osebju za delo na analizatorju, visoki stroški nakupa in vzdrževanja analizatorja. V zadnjem času v vse več laboratorijih poskušajo vpeljati cenejšo in prijaznejšo metodo za merjenje koncentracij EVL s principom imunske reakcije. V primeru, ko bolnik preide s SRL na EVL, pristop merjenja koncentracije s fluorescenčno polarizacijsko imunsko metodo ni primeren, ker prihaja do navzkrižne reaktivnosti z razponom od 74–100 % zaradi še vedno cirkulirajočega preostanka SRL z daljšo razpolovno dobo. V takem primeru je potrebno analizo izvesti na LC-MS, ki predstavlja referenčno metodo za določanje koncentracij EVL v polni krvi (33).

2. NAMEN

Uporaba učinkovitih imunosupresivnih zdravil je doprinesla k zmanjšanju akutnih zavrnitvenih reakcij in izboljšanemu kratkoročnemu preživetju bolnika in presadka.

Zaradi učinkovitega preprečevanja akutne zavrnitve presadka, zmanjšanega tveganja za koronarno vaskulopatijo presadka in nižje incidence CMV–okužb predstavlja EVL vodilni imunosupresiv pri bolnikih po presaditvi srca. Gledano z druge strani, je zaradi sinergističnega učinka povečanja nefrotoksičnosti ob sočasnem jemanju CYA in drugih neželenih učinkov EVL nujno potrebno spremljati njegovo koncentracijo v polni krvi bolnikov in v primeru večjega odstopanja koncentracije od terapevtskega območja zdravila odmerek ustrezno prilagoditi.

Naša prva naloga bo izmeriti koncentracije EVL v polni krvi pri prejemnikih srca in ledvic s pomočjo imunske turbidimetrične metode in reagenti proizvajalca Thermo Scientific na analizatorju Roche/Hitachi Modular. Za primerjalno metodo bomo uporabili metodo LC-MS/MS (testiranje v Gradcu), s pomočjo katere bodo analizirani vzporedni vzorci polne krvi prejemnikov ledvic, katere smo zaradi majhnega števila obstoječih prejemnikov srca s potrjeno koronarno vaskulopatijo presadka vključili v našo nalogo. S pomočjo statistične obdelave bomo ugotavljali korelacijo oz. moč povezave med metodama.

V drugem delu bomo spremljali primernost oz. učinkovitost terapije z EVL. Cilj terapije je vzdrževanje koncentracij EVL v terapevtskem območju. Glede na terapevtsko območje zdravila in vzporedno terapijo z drugimi zdravili bomo spremljali ustreznost koncentracij EVL v polni krvi posameznih prejemnikov srca.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. SKUPINA BOLNIKOV

Za izračun korelacije med imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS smo uporabili določitve koncentracij EVL pri 9 prejemnikih ledvic (5 moških, 4 ženske; starost žensk 50 ± 14 let, starost moških 46 ± 20 let).

Za spremljanje primernosti oz. učinkovitosti terapije z EVL smo vključili 6 bolnikov, starih od 57 do 75 let (povprečna starost 65 let), od tega 1 žensko (58 let) in 5 moških (66 ± 9 let), pri katerih je bila opravljena presaditev srca in kasneje s kateterizacijo ter UZ srca potrjena koronarna vaskulopatija presadka. Omenjeni bolniki prejemajo zdravilo EVL kot del imunosupresivne terapije. Koncentracijo EVL v polni krvi smo bolnikom merili z namenom spremljanja (monitoringa) zdravila oz. ugotavljanja primernosti koncentracije EVL v polni krvi glede na terapevtsko območje tega zdravila.

Vzorci polne krvi so bili bolnikom odvzeti na nefrološkem in kardiološkem oddelku ter v ambulanti za transplantacijo in kardiološki ambulanti v ravnovesnem stanju zdravila (po 4 dneh jemanja zdravila, pred naslednjim odmerkom) glede na potrebe po spremljanju koncentracije učinkovine. Kadar so koncentracije za terapevtsko območje zdravila neustrezne, je potrebno spremljati koncentracijo dvakrat tedensko, v nasprotnem primeru enkrat tedensko oz. ob rednih kontrolah v ambulanti.

Z vzorci bolnikov smo rokovali kot s potencialno kužnimi. Pri delu smo sledili načelom Dobre laboratorijske prakse in Kodeksu deontologije v laboratorijski medicini.

3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE EVEROLIMUSA Z IMUNSKO TURBIDIMETRIČNO METODO (QMS Everolimus Immunoassay) IN REAGENTI Thermo Scientific

Za določitev koncentracij EVL smo uporabili princip imunske turbidimetrične metode (QMS Everolimus Immunoassay) in reagente proizvajalca Thermo Scientific. Metoda omogoča kvantitativno določitev imunosupresiva EVL pri bolnikih s presajenim srcem v vzorcih polne krvi. Poleg tega metoda omogoča spremljanje koncentracij EVL (Therapeutic Drug Monitoring), na podlagi katerih se kardiolog odloči za prilagoditev odmerka zdravila, v kolikor se le-ta ne nahaja v terapevtskem območju.

3.2.1. PRINCIP METODE

Imunska turbidimetrična metoda za kvantitativno določanje EVL temelji na medsebojnem tekmovanju zdravila v vzorcu polne krvi in zdravila na mikrodcelcih za vezavna mesta v reagentu z anti-EVL Pt.

Reagent z mikrodcelci, prevlečenimi z EVL, hitro aglutinira v prisotnosti reagenta z anti-EVL Pt v odsotnosti drugih kompetirajočih zdravil v vzorcu. Spremembo absorbance analizator izmeri fotometrično. Ko dodamo vzorec z vsebujočim EVL, se pojavi delna inhibicija aglutinacijske reakcije s padcem absorbance. Od koncentracije EVL odvisno klasično aglutinacijsko inhibicijsko krivuljo dobimo z največjim nivojem aglutinacije pri nizkih koncentracijah EVL in z najmanjšim nivojem aglutinacije pri visokih koncentracijah EVL.

3.2.2. REAGENTI IN MATERIALI

Reagenčni komplet QMS Everolimus, **REF** 0373852, v tekoči obliki, je pripravljen za takojšnjo uporabo in je sestavljen iz treh reagentov:

- **R1** Reagent 1: anti-EVL poliklonska Pt (kunčja) in natrijev azid (stabilizator) (22 mL)
- **R2** Reagent 2: mikrodcelci, prevlečeni z EVL in natrijev azid (8 mL)
- **PRE** Precipitacijski reagent: natrijev azid (8 mL)

Poleg reagenčnega kompleta potrebujemo za izvedbo analize še:

- komplet kalibratorjev QMS Everolimus **REF** 0373860 CAL A-F (3 mL)
- in komplet kontrol QMS Everolimus **REF** 0373878 1-3 (3 x 3 mL).

"QMS Everolimus Immunoassay" zahteva popolno 6-točkovno kalibracijo pred začetkom uporabe vsakega reagenčnega kompleta z novo LOT številko. Kalibracijsko krivuljo ovrednotimo z najmanj 2 koncentracijskima nivojema kontrol. V primeru ko se rezultati meritev kontrol ne nahajajo v območju meritev, je potrebno kalibracijo ponoviti.

Ostala oprema in materiali:

- Pasteurjeve pipete
- Elektronska nastavljiva pipeta z nastavki (BIOHIT Proline 50-100 µL in 50-1200 µL)
- PVC epruvete z zamaški
- Vortex mešalo
- PVC vial
- Hladilna centrifuga (Allegra, Beckman Coulter)
- Analizator (Roche/Hitachi Modular)
- Metanol
- Fiziološka raztopina
- Ledena destilirana voda
- Hladilnik
- Zamrzovalnik

3.2.3. IZBOR VZORCEV IN ROKOVANJE Z NJIMI

Za določanje koncentracije EVL z imunsko turbidimetrično metodo (QMS Everolimus Immunossay) in reagenti Thermo Scientific so primerni vzorci polne krvi, odvzeti v steklene ali plastične epruvete z dodanim antikoagulantom K₃EDTA oz. K₂EDTA. Premajhen volumen odvzetega vzorca polne krvi nam lahko da napačne rezultate meritev. Vzorce pred analizo hranimo na 2-8°C do največ 3 dni. Če analize ne moremo izvesti v priporočenem obdobju 3 dni, vzorce polne krvi zamrznemo (≤ -10°C) za največ 28 dni. Polno kri za določanje koncentracije EVL vzorčimo v stanju ravnovesja, to je po 4 do 5 razpolovnih dobah zdravila oz. po 7 odmerkih EVL, in sicer po končani distribuciji in pred novim odmerkom zdravila.

Z vsemi vzorci odvzete polne krvi, kontrolnim in kalibracijskim materialom rokujemo kot s potencialno kužnim.

3.2.4. POSTOPEK KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA EVEROLIMUSA

Priprava reagentov

Pred uporabo smo stekleničke z reagenti večkrat previdno premešali. Ob tem smo pazili, da smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov, ki motijo natančno zaznavanje nivoja reagenta, posledica česar je nezadostna aspiracija reagenta in s tem vpliv na rezultate meritev. Če se zračni mehurčki pojavijo kljub pazljivemu rokovanju z reagenti, jih previdno odstranimo, da ob tem ne zmanjšamo volumna reagenta (uporaba pipet ni primerna).

Neodprti reagenti so stabilni do označenega datuma uporabe pri temperaturi 2-8°C. Reagentov ne smemo izpostavljati temperaturam nad 32°C in jih zatem tudi ne zamrzovati.

Priprava vzorcev

1. Vzorce polne krvi, odvzete v epruveto z EDTA antikoagulantom, smo zamrznili ter pustili preko noči, da so eritrociti v vzorcih hemolizirali.
2. Naslednji dan smo vzorce odmrznili in jih centrifugirali (10 min pri 3500 obr/min).
3. V posebne plastične epruvete smo odpipetirali:
 - 300 µL vzorca, kontrole in kalibratorja
 - 350 µL metanola
 - 50 µL PRE reagenta (precipitacijski reagent)in jih takoj zamašili, da smo preprečili izparevanje.
4. Vsebinsko epruvet smo dobro premešali na Vortex mešalcu pri najvišji hitrosti in najmanj 10 sekund. Epruvete smo obrnili in ponovno dobro premešali. Po mešanju se je barva hemolizata iz rdeče spremenila v rjavo.
5. Epruvete smo nato centrifugirali v hlajeni centrifugi pri 18°C, na 4000 obr/min, 25 minut.
6. Po centrifugiranju smo 350 µL vsakega supernatanta prenesli v PVC vialo za analiziranje na analizatorju Roche/Hitachi Modular.

Postopek imunskega turbidimetričnega testa

- Viale s supernatanti kalibratorjev, kontrol in vzorcev smo čim prej vstavili v analizator, da smo zmanjšali izhlapevanje.
- Na analizatorju smo si pripravili delovno listo z izbrano kalibracijo, kontrolami in vzorci bolnikov za kvantitativno določitev imunosupresiva EVL in zagnali testiranje.
- Glede na količino vsebujočega EVL v vzorcih je prišlo do odklona v absorbanci, ki jo je analizator izmeril fotometrično.

Izračun rezultatov

Analizator na osnovi izrisane kalibracijske krivulje (krivulja med izmerjeno absorbanco in koncentracijo) poda koncentracijo EVL v vzorcu v $\mu\text{g/L}$. Pri vzorcih s koncentracijami EVL višjimi od $20 \mu\text{g/L}$ proizvajalec pred ekstrakcijo vzorca priporoča ročno redčenje vzorcev s kalibratorjem A (CAL A: $0,0 \mu\text{g/L}$). Končen rezultat dobimo, ko izmerjeno koncentracijo EVL pomnožimo s faktorjem redčenja.

$$\text{Faktor redčenja} = \frac{\text{volumen vzorca} + \text{volumen CAL A}}{\text{volumen vzorca}}$$

Končna koncentracija EVL v vzorcu = izmerjena koncentracija EVL \times faktor redčenja

3.2.5. ZNAČILNOSTI METODE

Natančnost

Sposobnost analitske metode, da pri več meritvah koncentracij analita istega vzorca izmeri enake ali podobne vrednosti, imenujemo natančnost. Običajno se natančnost ovrednoti s ponavljanjem vsaj 20-kratnih meritev koncentracij analita v enem samem vzorcu in izračunu standardnega odklona (SD) ter koeficienta variacije (KV). Pri imunski turbidimetrični QMS metodi za merjenje koncentracije EVL znaša SD znotraj-analizne ponovljivosti med meritvami 80 vzorcev $0,18\text{--}0,43$ in KV $2,11\text{--}7,31$ % (odvisno od povprečne koncentracije 3 sklopov 80 vzorcev), pri med-analizni ponovljivosti pa je vrednost SD $0,18\text{--}0,46$, KV pa $2,67\text{--}5,24$ % (odvisno od povprečne koncentracije 3 sklopov 80 vzorcev) (34).

Preglednica VIII. Ponovljivost imunske turbidimetrične metode "QMS Everolimus Immunossay"

Kontrolni vzorci	N	Ponovljivost v seriji			Ponovljivost med serijami		Skupaj	
		Povprečje (µg/L)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
1	80	3,93	0,13	3,21	0,22	5,65	0,28	7,19
2	80	8,20	0,25	3,01	0,33	4,05	0,51	6,16
3	80	14,90	0,83	5,57	0,68	4,55	1,11	7,47
Vzorci bolnikov								
1	80	3,87	0,28	7,31	0,18	4,59	0,37	9,45
2	80	8,73	0,18	2,11	0,46	5,24	0,64	7,27
3	80	12,07	0,43	3,59	0,32	2,67	0,80	6,62

Meja zaznavanja

Meja zaznavanja je definirana kot najnižja koncentracija analita, ki jo z dano metodo še zanesljivo detektiramo (izmerjena koncentracija EVL zadošča znotraj-analizni preciznosti in ponovljivosti (35) ($\leq 20\%$ KV s 15% ponovljivostjo). Meja zaznavanja EVL se nahaja pri koncentraciji 1,3 µg/L (34).

Območje meritev (analitsko območje)

Območje meritev pomeni razpon koncentracij, ki jih dobimo z uporabljenimi metodo brez modifikacij. Referenčne raztopine z različnimi koncentracijami analita analiziramo z želeno metodo. Idealna je linearna kalibracijska krivulja. V takem primeru območje meritev imenujemo linearno območje metode. Kadar linearnega odnosa ne dobimo, moramo v kalibracijskem postopku uporabiti več kalibracijskih raztopin, da ustrezno definiramo kalibracijsko krivuljo. Analitsko območje metode naj bi bilo zadosti široko, da vključuje od 95 % do 99 % koncentracij vzorcev brez predhodnega redčenja (35).

Območje meritev koncentracij EVL z imunske turbidimetrične metodo in reagenti Thermo Scientific ima razpon od 1,5 do 20,0 µg/L (34).

Analitska specifičnost in navzkrižna reaktivnost

Pojem analitska specifičnost je povezan s točnostjo (ujemanje izmerjene vrednosti s pravo vrednostjo) in se nanaša na sposobnost analitske metode, da prepozna v vzorcu izključno analit, ki ga merimo.

Interference predstavljajo snovi ali skupino snovi v vzorcu, ki vplivajo na točnost meritev analita (35). Moteče snovi so nekateri metaboliti EVL in endogene snovi pri določenih koncentracijah (bilirubin, holesterol, gama globulini, hematokrit, revmatoidni faktor, proteini, trigliceridi in sečna kislina), ki prispevajo k manj kot 10 % napaki pri merjenju koncentracije EVL. Navzkrižne reaktivnosti z zdravili pri testiranju hemolizata s koncentracijo EVL 5 µg/L proizvajalec ni ugotovil.

Omejitve

V redkih primerih lahko vzorec bolnika vsebuje heterofilna Pt, ki z metodo "QMS Everolimus Immunoassay" dajo lažno nižje rezultate izmerjenih koncentracij EVL. Moteča heterofilna Pt se v populaciji redko pojavijo. Omenjena Pt povzročijo avtoaglutinacijo reagenta z mikrodelci, zaradi česar so izmerjene koncentracije lažno nizke. Ob takih rezultatih proizvajalec priporoča natančen vpogled v bolnikovo anamnezo in dodatna klinična testiranja, da se izključi oz. potrdi prisotnost teh Pt (34).

3.2.6. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA S TANDEMNSKO MASNO SPEKTROMETRIJO (LC-MS/MS)

Tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektroskopijo predstavlja metodo s širokim dinamičnim območjem, ki omogoča istočasno merjenje koncentracij EVL, SRL, TAC in CYA v polni krvi. Pristop s tandemsko masno spektroskopijo izključuje vpliv interferenc hidrosiliranih in/ali demetiliranih metabolitov imunosupresivov in drugih najpogosteje vzporedno zaužitih zdravil. Merjenje koncentracij EVL (in drugih imunosupresivov) je z metodo LC-MS/MS hitro, ponovljivo in specifično. Potreben je majhen volumen vzorca (100 µL), vzorce direktno injiciramo na kolono in eluiramo, čas analize pa je kratek (od 1,5 min do 4 min, odvisno od modifikacije metode). V 2 urah lahko obdelamo 30 vzorcev. Znotraj ene same analize lahko istočasno detektiramo in izmerimo koncentracijo vzporednih zdravil (kombinirana imunosupresivna terapija s CNI in mTOR), kar omogoča prihranek časa in stroškov (36).

Postopek

V 1,5 mL Eppendorf epice odpipetiramo 100 μ L kalibratorja, kontrole ali vzorca polne krvi bolnika, odvzete z EDTA antikoagulantom in dodamo 200 μ L zmesi metanola in 1,1 mol/L $ZnSO_4$ v volumskem razmerju 65:35 z vsebujočim internim standardom askomicinom (20 μ g/L) in "devteriranima" standardoma everolimus-d4 (3 μ g/L) ter ciklosporin A-d4 (80 μ g/L). Po 10-minutnem centrifugiranju pri 25000 g prenesemo supernatant v posodice avtomatskega vzorčevalnika za injiciranje v LC-MS/MS sistem. Za sprotno izpiranje vzorca smo uporabili perfuzijsko kromatografsko kolono z makroporami (Luna, Phenomenex). Fenil-heksilno reverzno fazno kolono smo uporabili kot analitsko kolono. HPLC ločitve smo izvedli na instrumentu Agilent system 1200 series z dvema črpalkama, avtomatskim vzorčevalnikom in grelnikom kolone z nastavljivo zaklopko. Pri izvedbi postopka potrebujemo še dodatno zunanjo stikalno ploščo pri Agilent avtomatskem vzorčevalniku, ki omogoča zakasnjeno ali neprekinjeno delovanje masnospektroskopskega sistema. Vsi kromatografski elementi so pod nadzorom Xcalibur programske opreme, ki upravlja tudi Voyager TSQ Quantum trojni kvadripol (Thermo Instruments). Za izračun rezultatov se dodatno uporablja še LCQuan programska oprema (Thermo).

Mobilna faza 1 (nosilni eluent metanol/voda v volumskem razmerju 10:90) se prečrpa skozi kolono 1 s pretokom 0,5 mL/min, mobilna faza 2 (izpiralni eluent metanol/voda z vsebujočima 0,32 mM amonijevevim acetatom in 0,1 % očetno kislino v volumskem razmerju 97:3) pa preko kolone 2 s pretokom 0,8 mL/min. Hitrost toka mobilne faze 2 je konstantna skozi celotno trajanje analize. Kolona 2 je nameščena v ogrevalnik kolone pri temperaturi 50°C, kolona 1 pa se nahaja zunaj pri sobni temperaturi.

Po injiciranju 50 μ L pripravljenega vzorca hitrost toka takoj naraste na 5 mL/min v 20 sekundah. V tem času končni del kolone 1 sistem prestavi na mesto za odpad. Po dobi izpiranja se zaklopka prestavi na drugo pozicijo. Kolona 1 se poveže s kolono 2 in izpere z mobilno fazo 2. Po 20 sekundah se analiti popolnoma prenesejo na kolono 2, zaklopka pa se postavi na začetno pozicijo. Kolona 1 je nato po 20 sekundah pripravljena na naslednje injiciranje mobilne faze s pretokom 5 mL/min. Nastavitev avtomatskega vzorčevalnika mora omogočati aspiracijo naslednjega vzorca takoj po injiciranju prejšnjega. Masni detektor začne z zapisovanjem 15 sekund po injiciranju, trajanje detekcije pa je nastavljeno na 40 sekund. Inštrument deluje v načinu opazovanja več reakcij (*multiple-reaction monitoring*, MRM). V pozitivnem načinu smo posneli naslednje MRM prehode (m/z), in sicer: ciklosporin A

1220,0–1203,0; ciklosporin A-d4 1224,0–1207,0; sirolimus 931,4-864,4; takrolimus 821,6-768,4; askomicin 809,6-756,4; everolimus 975,6-908,4 in everolimus-d4 979,6-912,4.

3.2.7. REFERENČNE VREDNOSTI

Terapevtsko območje za EVL v polni krvi se nahaja med 3 in 8 µg/L. K različnim pristopom oz. zahtevam po vzdrževanju optimalne koncentracije EVL v krvi prispevajo resnost in kompleksnost kliničnega stanja, individualne razlike v občutljivosti na imunosupresiv, nefrotoksični učinki EVL, sočasno jemanje drugih imunosupresivov, vrsta presaditve, dolžina po-transplantacijskega obdobja in mnogi drugi faktorji. Posamezne koncentracije EVL ne smejo predstavljati edinega kazalca za spremembo režima odmerjanja EVL, zato je pred spremembo režima zdravljenja potreben temeljit, individualni pristop k vsakemu bolniku posebej. Izmerjene vrednosti koncentracij EVL so primerljive le, kadar so bile pridobljene z enako metodo. Za optimalno prilagoditev odmerka EVL ne zadošča meritev koncentracije EVL le iz 1 vzorca, temveč potrebujemo meritve koncentracij EVL iz več vzorcev (34).

3.3. STATISTIČNE METODE IN ORODJA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili statistična programa IBM SPSS Statistics Version 19 in Microsoft Office Excel 2007. Z njuno pomočjo smo izvedli Kolmogorov-Smirnov test normalnosti in izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo izmerjenih koncentracij ter Pearsonov ali korelacijski koeficient med obema metodama.

4. REZULTATI

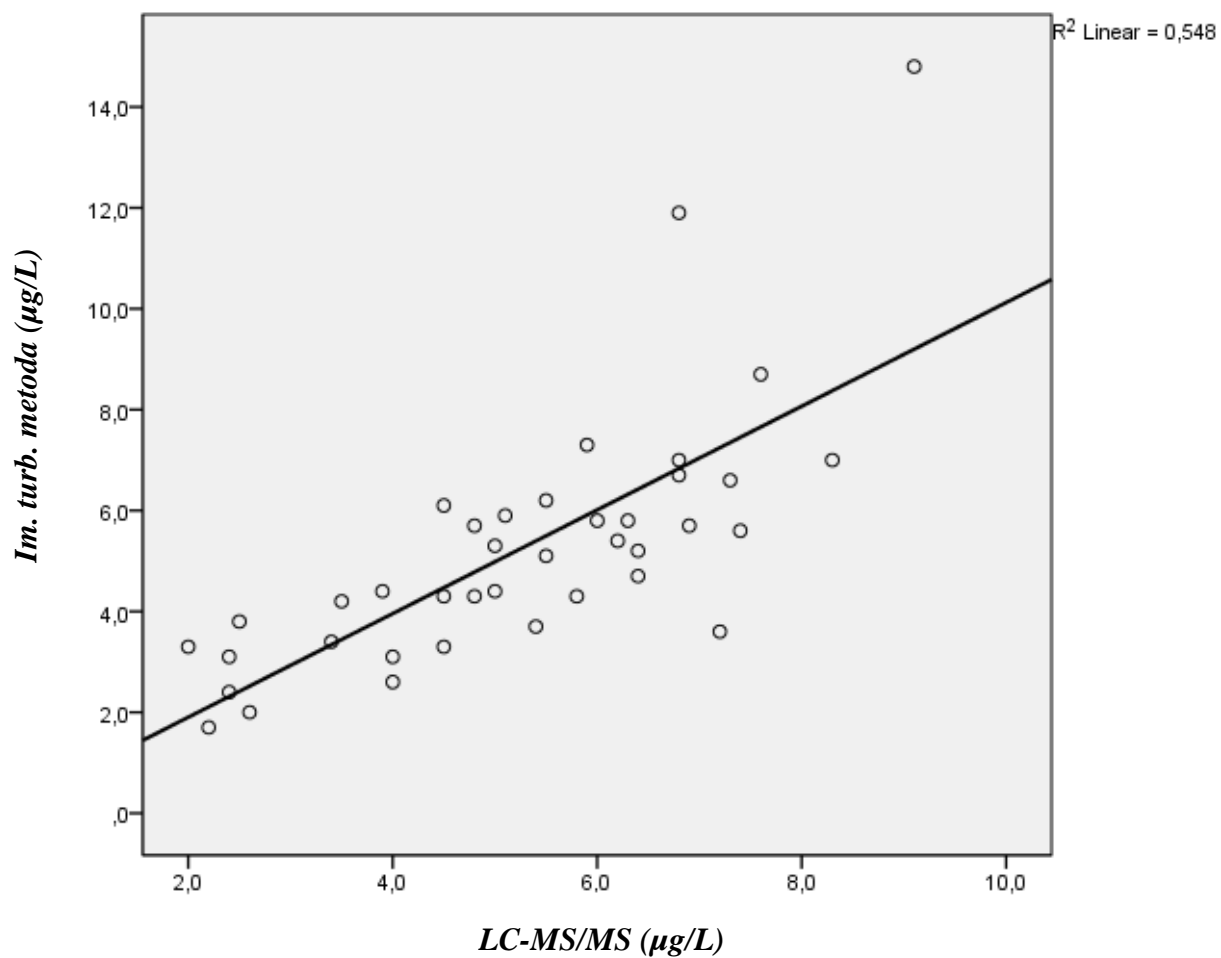
Pri bolnikih, ki kot del imunosupresivne terapije prejemajo EVL (prejemniki srca s potrjeno koronarno vaskulopatijo in prejemniki ledvic), smo v polni krvi izmerili koncentracijo omenjenega zdravila z imunsko turbidimetrično metodo (QMS Everolimus Immunossay). Pridobili smo meritve koncentracij EVL v polni krvi vzporednih vzorcev prejemnikov ledvic, ki so jih opravili v Gradcu (Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Medizinische Universität Graz).

Izmerjenim koncentracijam EVL z obema metodama in razliki izmerjenih koncentracij smo izračunali povprečno vrednost in standardni odklon.

Preglednica IX. Povprečne vrednosti in standardni odkloni izmerjenih koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS ter njihovih razlik (vse vrednosti)

	Imunska turbidimetrična metoda	LC-MS/MS	Razlika (LC-MS/MS – Im. turb. metoda)
Število vzorcev	39	39	39
Minimum (µg/L)	1,7	2,0	-5,7
Maksimum (µg/L)	14,8	9,1	3,6
Povprečna vrednost (µg/L)	5,2	5,3	0,0
Standardni odklon	2,5	1,8	1,7

Povprečni vrednosti sta pri obeh metodah zelo podobni (5,2 µg/L pri imunski turbidimetrični metodi in 5,3 µg/L pri LC-MS/MS), nekoliko se razlikujeta le standardna odklona (2,5 pri imunski turbidimetrični metodi in 1,8 pri LC-MS/MS). Razsevni diagram vseh meritev z obema metodama nam pokaže na 3 izstopajoče pare meritev.



Graf 1. Razsevni diagram vseh meritev

S Kolmogorov-Smirnovim testom normalnosti ugotovimo, da se podatki, ki predstavljajo meritve koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo ne porazdeljujejo normalno, v nasprotju s temi pa se podatki, ki predstavljajo meritve koncentracij EVL s LC-MS/MS, porazdeljujejo normalno.

Preglednica X. Kolmogorov-Smirnov test normalnosti (vse meritve)

Kolmogorov-Smirnov			
	Statistic	df	Sig.
Im. turb. m.	,145	39	,038
LC-MS/MS	,084	39	,200

$\alpha = 0,05$

a) H_0 = Koncentracije EVL, izmerjene z im. turb. metodo so normalno porazdeljene.

H_A = Koncentracije EVL, izmerjene z im. turb. metodo niso normalno porazdeljene.

$P < \alpha \rightarrow H_A$

b) H_0 = Koncentracije EVL, izmerjene s LC-MS/MS so normalno porazdeljene.

H_A = Koncentracije EVL, izmerjene s LC-MS/MS niso normalno porazdeljene.

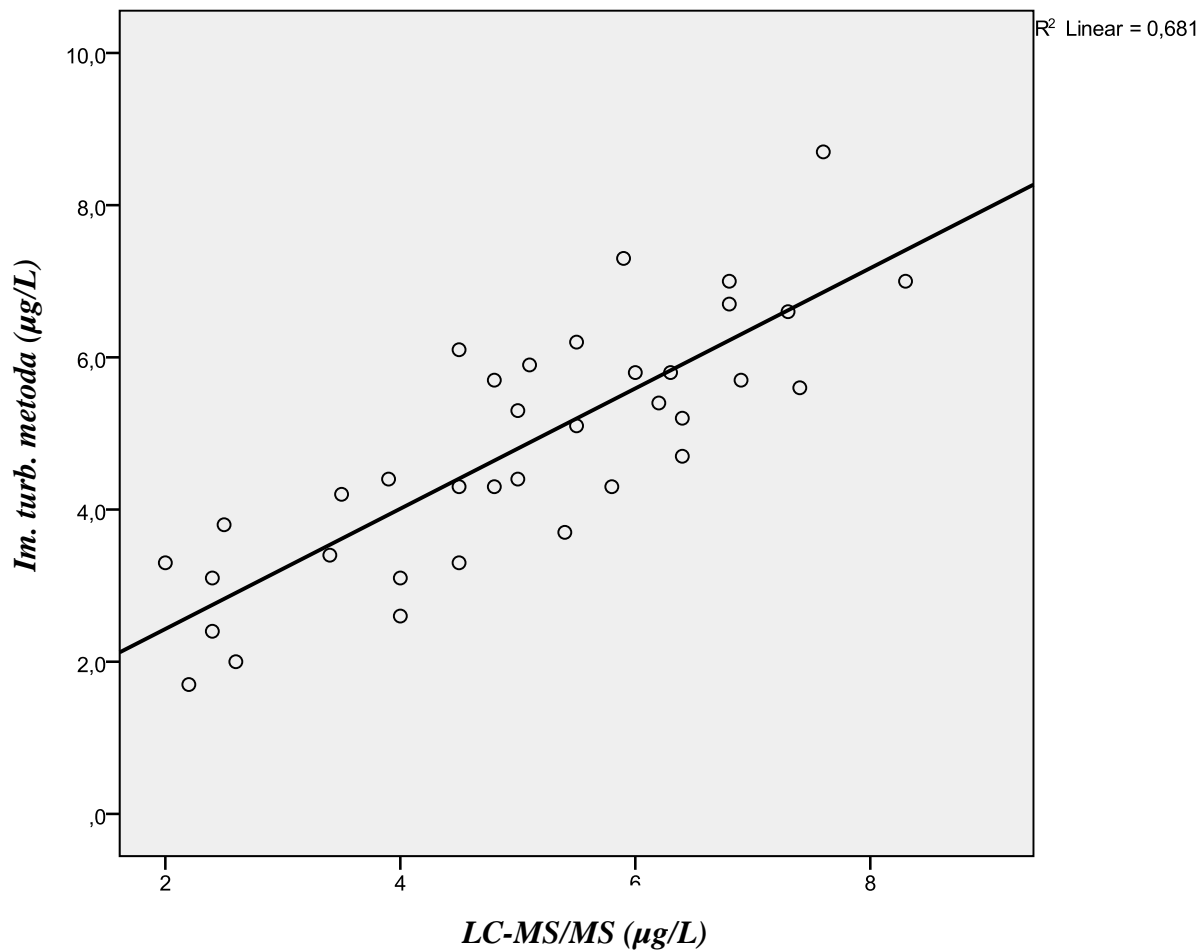
$P > \alpha \rightarrow H_0$

Če želimo ugotoviti, kakšna je moč povezave med obema metodama (korelacija), mora biti izpolnjen pogoj o normalni porazdelitvi podatkov. Ker nam ta razlog onemogoča primerjavo obeh metod, smo se odločili, da 3 pare meritev, katerih razlika je večja ali manjša od 2 standardnih odklonov razlik, izločimo in ponovimo statistično obdelavo podatkov.

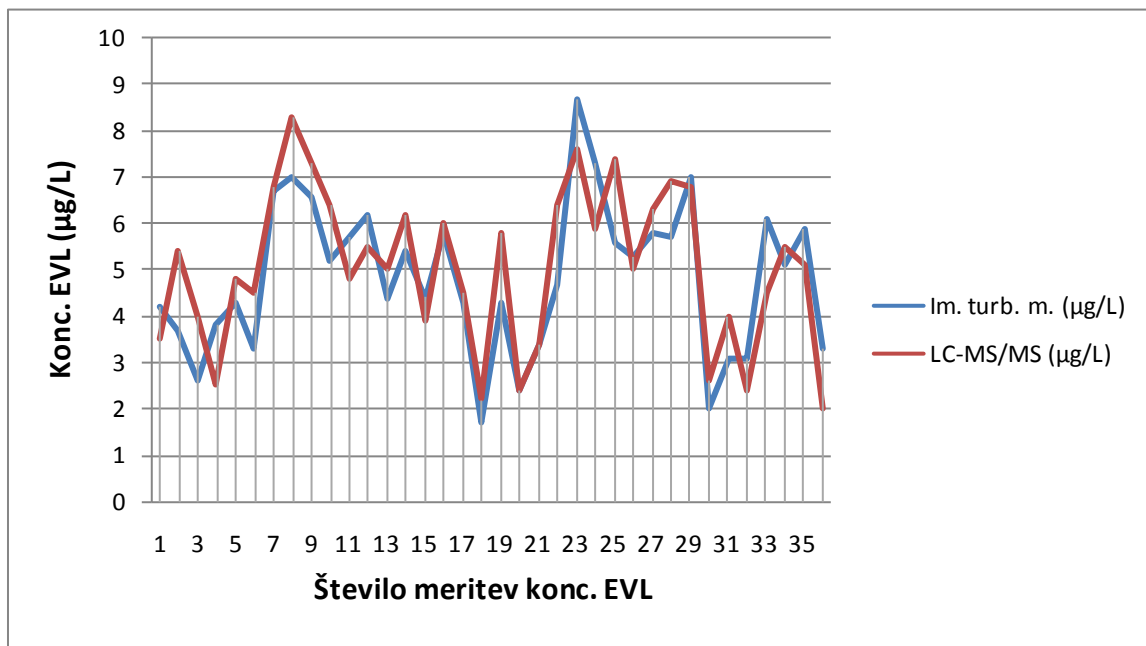
Preglednica XI. Povprečne vrednosti in standardni odkloni izmerjenih koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS ter njihovih razlik (brez osamelcev)

	Imunska turbidimetrična metoda	LC-MS/MS	Razlika (LC-MS/MS – Im. turb. metoda)
Število vzorcev	36	36	36
Minimum (µg/L)	1,7	2,0	-1,6
Maksimum (µg/L)	8,7	8,3	1,8
Povprečna vrednost (µg/L)	4,8	5,0	0,2
Standardni odklon	1,6	1,7	1,0

Iz preglednice je razvidno, da se po izključitvi osamelcev povprečni vrednosti (4,8 µg/L pri imunski turbidimetrični metodi in 5,0 µg/L pri LC-MS/MS) in standardna odklona (1,6 pri imunski turbidimetrični metodi ter 1,7 pri LC-MS/MS) izmerjenih koncentracij EVL z obema metodama močno približajo.



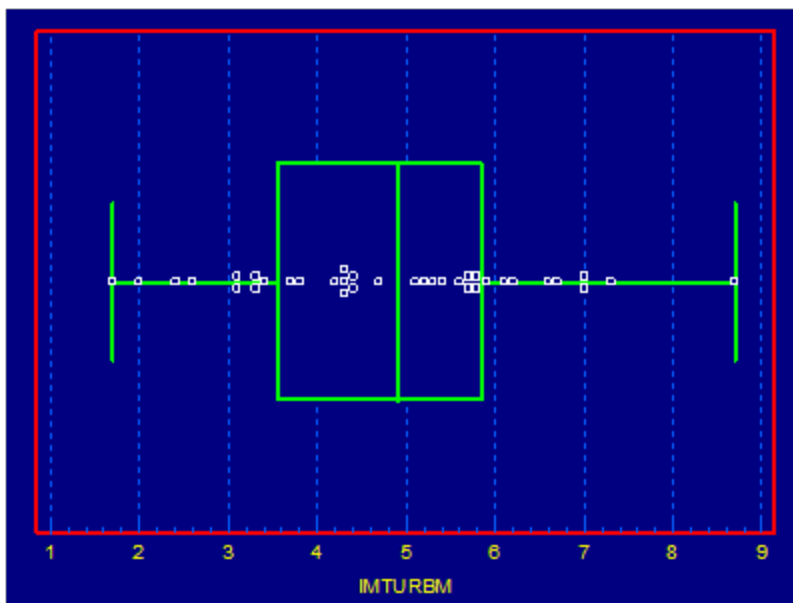
Graf 2. Razsevni diagram brez osamelcev



Graf 3. Prikaz porazdelitve meritev koncentracij EVL v polni krvi z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS

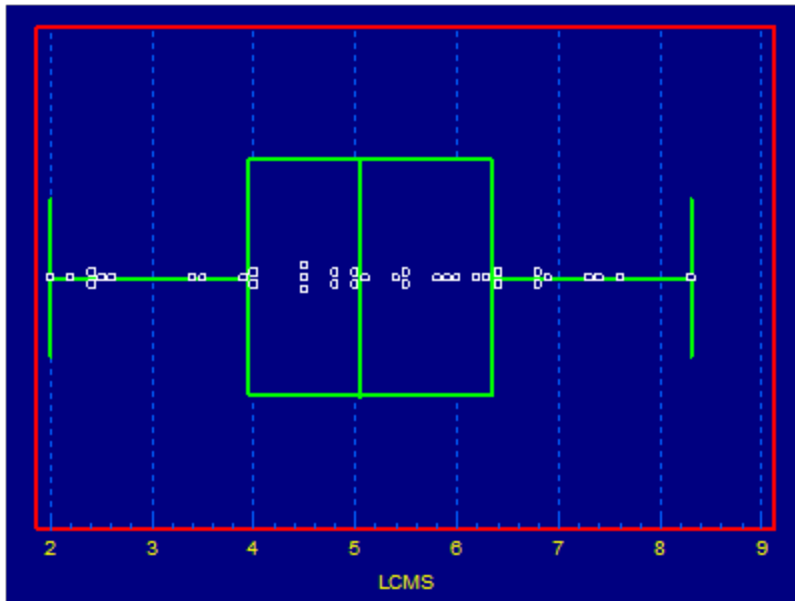
Graf nam prikazuje enakomerno sipanje meritev koncentracij EVL v obe smeri z obema metodama.

Iz kvantilnega diagrama s prikazom porazdelitve meritev koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo je razvidno, da se v interkvartilnem razponu nahaja polovica vseh meritev z največjo gostoto meritev v prvem kvartilu. Mediana se nahaja pri vrednosti 4,9 $\mu\text{g/L}$, spodnja mediana pri 3,6 $\mu\text{g/L}$ in zgornja mediana pri vrednosti 5,8 $\mu\text{g/L}$. Najmanjša vrednost izmerjenih koncentracij EVL je 1,7 $\mu\text{g/L}$, največja pa 8,7 $\mu\text{g/L}$.



Graf 4. Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev koncentracij EVL z imunsko turbidimetrično metodo

Kvantilni diagram s porazdelitvijo izmerjenih koncentracij EVL s LC-MS/MS ponazarja največjo gostoto meritev koncentracij EVL v tretjem kvartilu. Vrednost mediane se nahaja pri 5,1 $\mu\text{g/L}$, spodnja mediana pri 3,9 $\mu\text{g/L}$ in zgornja mediana pri vrednosti 6,3 $\mu\text{g/L}$. Največja izmerjena koncentracija s to metodo je 8,3 $\mu\text{g/L}$, najmanjša pa 2,0 $\mu\text{g/L}$.



Graf 5. Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev koncentracij EVL s LC-MS/MS

Z izključitvijo osamelcev smo dosegli normalno porazdelitev meritev koncentracij EVL, pridobljenih s pomočjo obeh analitskih metod.

Preglednica XII. Kolmogorov-Smirnov test normalnosti (brez osamelcev)

	Kolmogorov-Smirnov		
	Statistic	df	Sig.
Im. turb. m.	,078	36	,200
LC-MS/MS	,092	36	,200

$\alpha = 0,05$

a) H_0 = Koncentracije EVL, izmerjene z im. turb. metodo so normalno porazdeljene.

H_A = Koncentracije EVL, izmerjene z im. turb. metodo niso normalno porazdeljene.

$P > \alpha \rightarrow H_0$

b) H_0 = Koncentracije EVL, izmerjene s LC-MS/MS so normalno porazdeljene.

H_A = Koncentracije EVL, izmerjene s LC-MS/MS niso normalno porazdeljene.

$P > \alpha \rightarrow H_0$

Z izpolnjenim pogojem o normalni porazdelitvi meritev smo izračunali še korelacijski oz. Pearsonov koeficient med imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS.

Preglednica XIII. Korelacija med imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS

		Im. turb. metoda	LC-MS/MS
Im. turb. metoda	Pearsonov koeficient	1	,825
	Sig.		,000
	N	36	36
LC-MS/MS	Pearsonov koeficient	,825	1
	Sig.	,000	
	N	36	36

$\alpha = 0,05$

$H_0: \rho = 0$ (r ni v redu, ne opisuje dobro moči povezave med im. turb. metodo in LC-MS/MS.)

$H_A: \rho \neq 0$ (r dobro opisuje moči povezave med im. turb. metodo in LC-MS/MS.)

$P < \alpha \rightarrow H_A$

$r = 0,825$

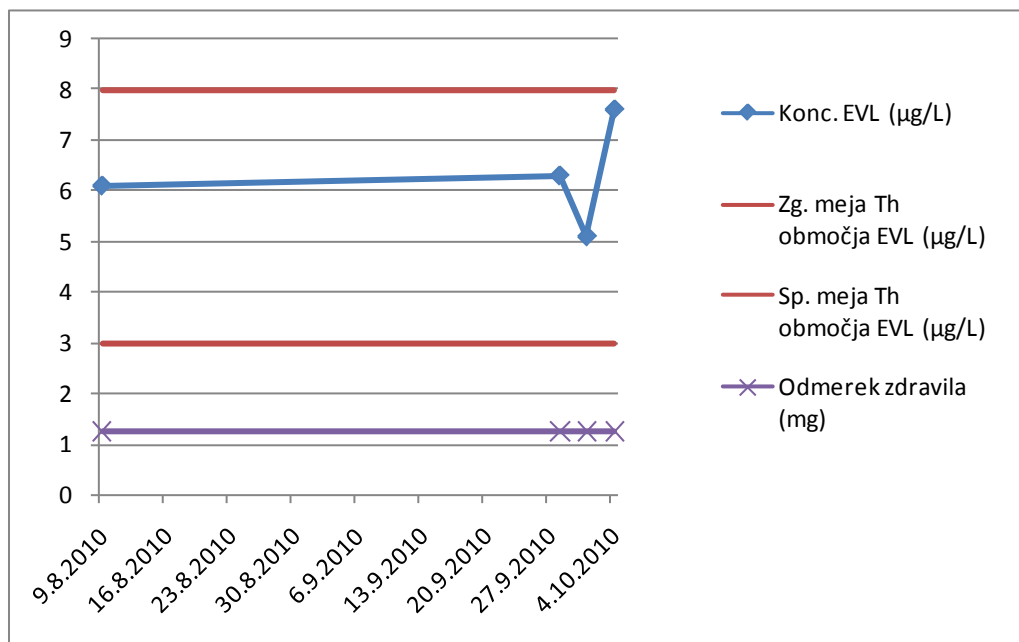
Vrednost Sig. (verjetnost, da je opazovana korelacija resnična in ne naključna) je pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ manjša od α , zato smo sprejeli alternativno hipotezo. Korelacijski koeficient dobro opisuje moč povezave med obema metodama in znaša 0,825.

V drugem delu naše naloge smo ugotavljali primernost koncentracij EVL pri prejemnikih srca glede na njegovo terapevtsko območje in spremljajočo terapijo.

Preglednica XIV. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 1

ID 1: M, 69 let, Tx 1999, Th: CYA, EVL

Datum analize	Konc. EVL($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
09.08.2010	6,1	0,75+0,50
28.09.2010	6,3	0,75+0,50
01.10.2010	5,1	0,75+0,50
04.10.2010	7,6	0,75+0,50

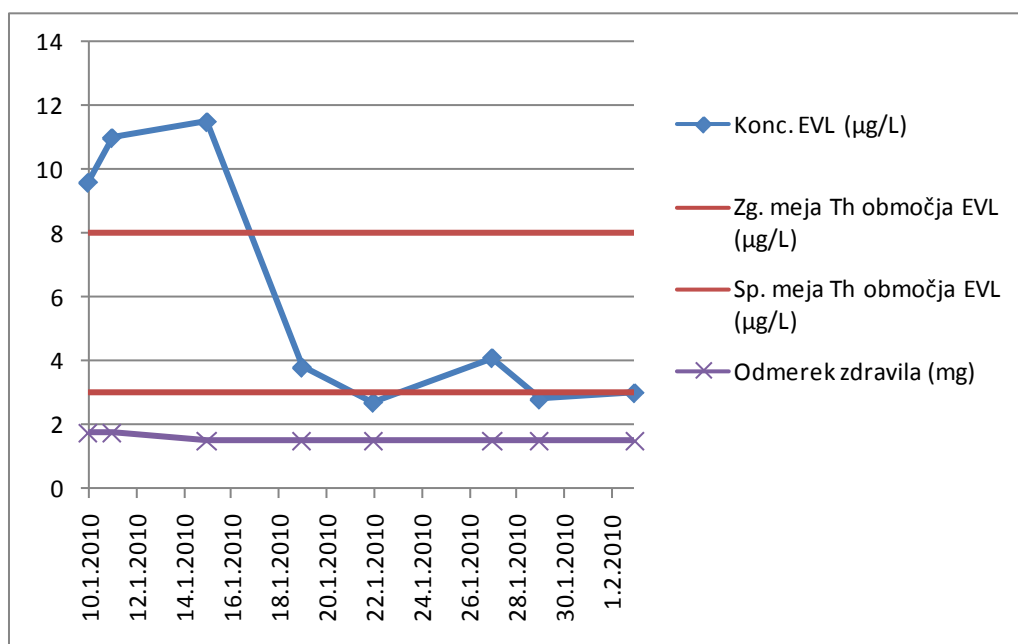


Graf 6. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 1

Preglednica XV. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 2

ID 2: M, 69 let, Tx 2000; Th: CYA, EVL, MMF

Datum analize	Konc. EVL ($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
10.01.2010	9,6	1,00+0,75
11.01.2010	11,0	1,00+0,75
15.01.2010	11,5	0,75+0,75
19.01.2010	3,8	0,75+0,75
22.01.2010	2,7	0,75+0,75
27.01.2010	4,1	0,75+0,75
29.01.2010	2,8	0,75+0,75
02.02.2010	3,0	0,75+0,75

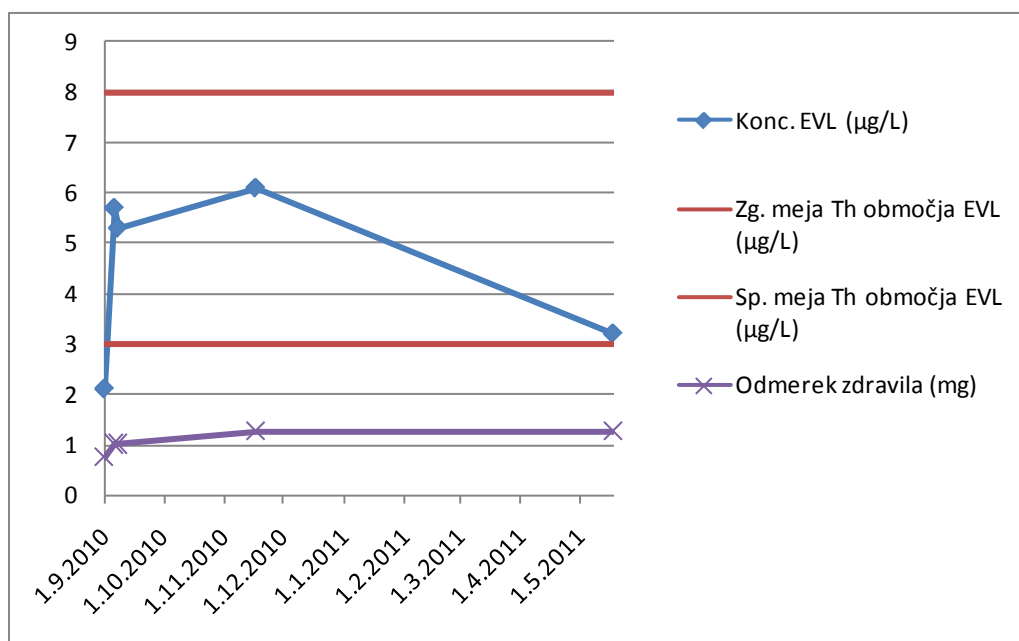


Graf 7. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 2

Preglednica XVI. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 3

ID 3: M, 75 let, Tx 1998, Th: CYA, EVL, MMF, atorvastatin

Datum analize	Konc. EVL ($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
02.07.2010	4,6	0,50+0,25
17.07.2010	5,2	0,50+0,50
21.07.2010	4,9	0,50+0,50
27.07.2010	4,7	0,75+0,50
10.08.2010	5,9	0,75+0,50
12.08.2010	9,5	0,75+0,50
13.08.2010	5,2	0,50+0,25
16.08.2010	6,0	0,50+0,25
23.08.2010	<1,3	0,50+0,25
27.08.2010	1,6	0,50+0,25
31.08.2010	<1,3	0,50+0,25
01.09.2010	2,1	0,50+0,25
06.09.2010	5,7	0,75+0,50
08.09.2010	5,3	0,75+0,50
17.11.2010	6,1	1,00+0,75
18.05.2011	3,2	0,50+1,00

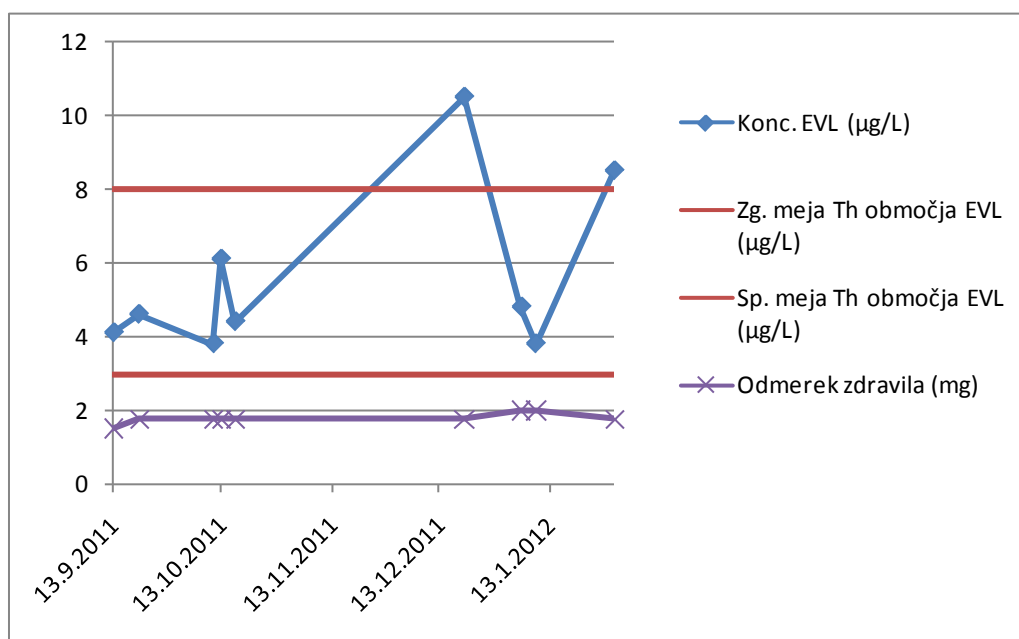


Graf 8. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 3

Preglednica XVII. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 4

ID 4: M, 63 let, Tx 2000, Th: CYA, EVL, MMF, atorvastatin

Datum analize	Konc. EVL($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
13.09.2011	4,1	0,75+0,75
20.09.2011	4,6	1,00+0,75
11.10.2011	3,8	1,00+0,75
13.10.2011	6,1	1,00+0,75
17.10.2011	4,4	1,00+0,75
20.12.2011	10,5	1,00+0,75
05.01.2012	4,8	1,00+1,00
09.01.2012	3,8	1,00+1,00
31.01.2012	8,5	1,00+0,75



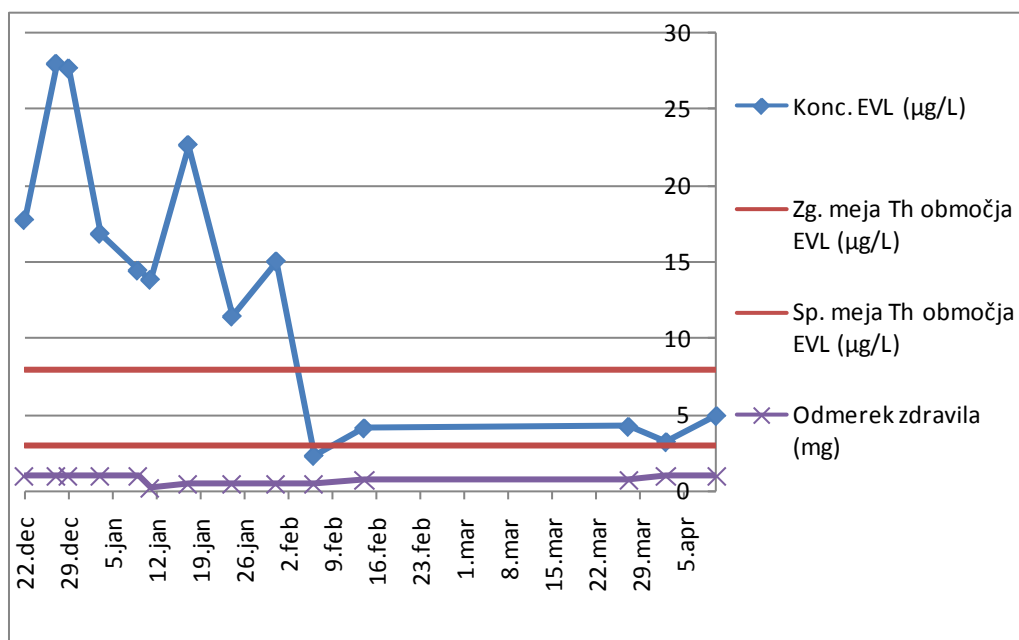
Graf 9. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 4

Preglednica XVIII. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 5

ID 5: Ž, 58 let, Tx 2011, Th: CYA, EVL, MMF, Sporanox®

Datum analize	Konc. EVL($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
22.12.2011	17,7	0,50+0,50
27.12.2011	27,9	0,50+0,50
29.12.2011	27,6	0,50+0,50
03.01.2012	16,8	0,50+0,50
09.01.2012	14,8	0,50+0,50
11.01.2012	13,8	0,50/2 dni
17.01.2012	22,6	0,50/dan
24.01.2012	11,4	0,50/dan
31.01.2012	15,0	0,50/dan
06.02.2012	2,3	0,50/dan
14.02.2012	4,1	0,25+0,50*
27.03.2012	4,2	0,25+0,50*
02.04.2012	3,2	0,50+0,50
10.04.2012	4,9	0,50+0,50

*izmenjaje

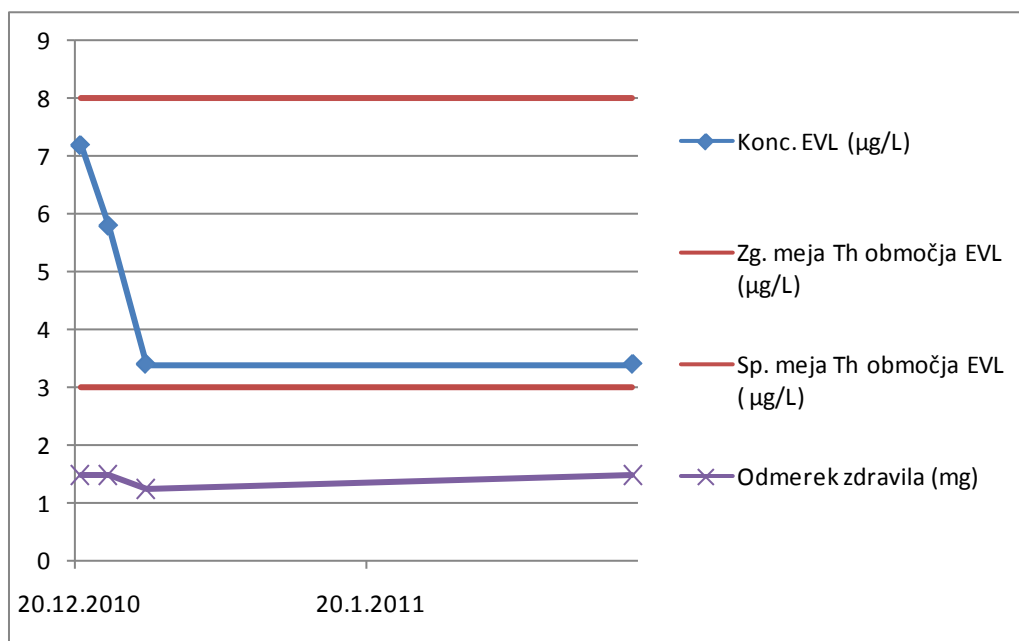


Graf 10. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 5

Preglednica XIX. Prikaz rezultatov meritev koncentracij in režima odmerjanja EVL pri bolniku 6

ID 6: M, 57 let, Tx 2006, Th: CYA, EVL, MMF, atorvastatin

Datum analize	Konc. EVL($\mu\text{g/L}$)	Odmerek EVL (mg)
20.12.2010	7,2	0,75+0,75
23.12.2010	5,8	0,75+0,75
27.12.2010	3,4	0,75+0,75
17.02.2011	3,4	0,75+0,75



Graf 11. Prikaz nihanja koncentracij EVL v polni krvi glede na odmerek pri bolniku 6

5. RAZPRAVA

Spremljanje (TDM) koncentracij imunosupresivov je ključnega pomena pri diagnostični obravnavi prejemnika presadka. Vse od prvih dni po opravljeni presaditvi do poznejšega ambulantnega spremljanja stabilnih prejemnikov presadka, igra TDM v zadnjem času odločilno vlogo v daljšem preživetju presadkov in prejemnikov kljub temu, da težave s pojavom kronične zavrnitve ter nastopi večjega števila dalj trajajočih neželenih učinkov še vedno predstavljajo nerešeno uganko (38). EVL je zdravilo z ozkim terapevtskim območjem in spremenljivo biorazpoložljivostjo. Z inhibicijo celične proliferacije gladkega mišičja, tanjšanja neointime in transplantacijske arterioskleroze zavira pojav tako akutne, kot kronične zavrnitve, ki prispevata k izgubi funkcije presadka (39). Zaradi njegovega načina delovanja se uporablja skupaj s CNI (sinergija), kar omogoča nižje odmerke le-teh in s tem zmanjšanje z odmerkom povezanih toksičnih učinkov CNI, zlasti nefrotoksičnosti. Nizki terapevtski odmerki in ozko terapevtsko območje EVL, izraziti neželeni učinki ob nedoseganju terapevtskega območja (nevarnost zavrnitve ali toksični učinki), obsežne interakcije z ostalimi zdravili, kakor tudi velika intra- in interindividualna variabilnost v metabolizmu zdravila, so vzroki, ki zaradi težavnega vzdrževanja koncentracij učinkovine v terapevtskem območju zahtevajo temeljito spremljanje koncentracij v polni krvi. V prvih tednih po vpeljavi zdravila je pravi odmerek glede na terapevtsko območje težko ugotoviti. Poleg tega kliniki pričakujejo natančne in točne rezultate; že majhna laboratorijska napaka zahteva prilagoditev odmerka ozkemu terapevtskemu območju. Sodobni terapevtski protokoli, kot sta kombinacija zdravil in zmanjševanje odmerka zdravila v primerih delne imunološke tolerance, zahtevajo natančne meritve pri še nižjih koncentracijah zdravila. Lahko rečemo, da smo s sodobnimi imunskimi metodami in s LC-MS/MS dosegli zanesljivo merjenje koncentracij imunosupresiva, ki so nižje od spodnje meje terapevtskega indeksa (38).

Največkrat se za rutinsko spremljanje koncentracij imunosupresivov v polni krvi poslužujejo imunskih tehnik, ki zagotavljajo občutljivost pri nizkih koncentracijah, ki so pri prejemnikih presadkov ključne. Kljub temu meritve koncentracij z imunskimi metodami ogrožata vpliv matriksa in navzkrižna reaktivnost sorodnih zdravil ali njihovih metabolitov. Najbolj poznana navzkrižna reaktivnost se pojavlja med SRL in EVL, in sicer pri fluorescenčni polarizacijski metodi (FPIA-Fluorescence Polarization Immunoassay) (40, 41, 42) in kemiluminescenčni metodi (CMIA-Chemiluminescence Microparticle Immunoassay) (33). Bolniki običajno ne

prejemajo obeh imunosupresivov hkrati, dostikrat pa zaradi netolerance SRL zamenjajo z EVL. SRL zaradi daljšega razpolovnega časa ostaja v polni krvi in daje lažno višji signal zaradi navzkrižne reaktivnosti z metaboliti EVL. V takšnem primeru je priporočljivejši izbor LC-MS/MS metode, ki omogoča nemotene meritve koncentracij obeh zdravil istočasno (40). Slabo izbrana ali pomanjkljivo razvita monoklonska oz. poliklonska Pt v reagenčnih kompletih imunskih tehnik vodijo v zaznavanje strukturno podobnih analitov (metaboliti tarčnega zdravila ali strukturni analogi). V primerjavi s kromatografskimi tehnikami ali encimskimi metodami dajejo sistemsko višje koncentracije učinkovine in posledično nepravilne terapijske odločitve, do katerih privede napačno kvantitativno spremljanje imunosupresiva (42). Poleg tega bi morale nekovalentne interakcije Pt-Ag potekati v bolj ali manj fizioloških pogojih. Če so analiti vezani na proteine (albumin ali spolne hormone vezoči globulin) ali vpeti v celične komponente (imunosupresivi v membranah eritrocitov), jih moramo za kvantitativno določitev sprostiti s proteinov oz. iz celice, kar je nefiziološki proces. Vpliv nefizioloških pogojev je pri kromatografskih metodah zanemarljiv, saj potekajo meritve pod nefiziološkimi pogoji. Slabost imunskih tehnik so tudi kontrolni vzorci in kalibratorji, ki so v primerjavi z vzorci bolnikov nehumanega izvora. Proizvajalci podajo njihovo koncentracijo, posledica česar je pri umeritvi analitskega sistema nemalokrat le približek oz. prireditelj pravi koncentraciji, namesto iskanje pravega vzroka odstopanja (38).

Prednosti LC-MS/MS metode so visoka specifičnost in občutljivost, izjemna ponovljivost, uporaba majhnih količin vzorca (100 μ L), kratek čas analize (največ 4 minute), hkratna kvantifikacija več imunosupresivov (SRL, EVL, TAC in CYA) ter nizka meja zaznavanja analita (1 μ g/L). Če zagotovimo zadostno kromatografsko ločbo metabolitov, nimamo težav z vplivom interferenc. LC-MS/MS predstavlja dragoceno alternativo imunskim tehnikom; omogoča bolj natančen in individualiziran pristop k prilagajanju odmerka EVL. Stroški nakupa opreme so sicer dragi, implementacija metode v rutinsko delo pa težavna, vendar obstajajo možnosti razvoja metod za kvantitativno določitev novih imunosupresivov, kot tudi ostalih zdravil in organskih molekul (maščobne kisline, aminokisline, steroidi, kateholamini,...) na obstoječem analitskem sistemu, kar konec koncev pomeni prihranek denarja. Poleg stroškov investicije slabost LC-MS/MS predstavlja tudi potreba po visoko usposobljenem kadru, ki lahko rokuje s tako zahtevnim analitskim sistemom. Čeprav razvijajo postopke za minimalno predpripravo vzorca, je le-ta še vedno dolgotrajna. Zelo pomembna je tudi priprava reagentov (komponente matriksa) v pravih razmerjih, saj elucija detergentov, soli ali mobilnih topil neprimerne sestave (npr. večji del vode namesto metanola) povzroči

spremenjeno ali propadlo ionizacijo molekul analita. V nasprotju s LC-MS/MS so imunske tehnike s stroškovnega vidika relativno poceni in tehnično nezahtevne. Specifičnost in občutljivost je primerljiva s kromatografskimi tehnikami, koeficienti korelacije med imunskimi in LC-MS/MS tehnikami znašajo od 0,823 navzgor. Apliciramo jih lahko na običajne biokemične analizatorje, nakup novega analitskega sistema ni potreben.

Pričakovati je zmeren porast presaditev organov, zato bodo tudi potrebe po TDM imunosupresivov večje. S pogostimi meritvami koncentracij EVL in drugih imunosupresivov ter posledično prilagoditvijo odmerka učinkovine dosežemo optimalno učinkovitost in minimalno toksičnost imunosupresiva. Ne glede na izbor tehnike je cilj doseči KV, ki ne presega 7-10 % (38, 42, 43).

Pri našem delu smo na podlagi meritev koncentracij EVL v polni krvi pri bolnikih s presajeno ledvico s pomočjo imunske turbidimetrične metode in LC-MS/MS ugotovili, da obstaja med obema metodama medsebojna povezanost, in sicer gre za pozitivno korelacijo ($r = 0,825$; $P < 0,0001$). Pri meritvah ne prihaja do sistemske napake; opazili smo sipanje rezultatov v obe smeri. Primerljive razlike v meritvah koncentracij EVL in podoben koeficient korelacije so med LC-MS/MS in imunskimi tehnikami (FPIA, MEIA-Microparticle Enzyme Immunoassay in CMIA) ($r = 0,823$; $0,846$; $0,98$) dobili Khoschorur, Salustio in Dasgupta. Kljub dobri korelaciji, ki jo navajajo avtorji, opozarjajo, da prihaja do navzkrižne reaktivnosti med SRL in EVL metaboliti pri FPIA, kadar kliniki SRL zamenjajo z EVL. Dokler se SRL povsem ne izloči iz telesa, je za TDM primernejša bolj specifična LC-MS/MS (33, 40, 42).

Optimalen in hkrati univerzalen režim odmerjanja EVL za čim boljši izkoristek učinka imunosupresije in istočasno čim nižjo stopnjo pojavnosti neželenih učinkov je največkrat težko doseči. Zaradi variabilnosti znotraj posameznega bolnika in spremljajoče terapije (inhibitorji in induktorji CYP3A4) je vzdrževanje koncentracij v polni krvi znotraj meja terapevtskega območja EVL težavno. Spodnjo mejo terapevtskega območja EVL predstavlja koncentracija, ki zagotavlja minimalen, vendar klinično pomemben nivo imunosupresije. Zgornjo mejo terapevtskega območja EVL pa označuje koncentracija, ki je običajno povezana z neželenimi učinki, ki nastopijo ob jemanju določenega (višjega) odmerka zdravila (44). S kliničnimi raziskavami so ugotovili, da z vzdrževanjem koncentracij EVL v polni krvi pod $3,5 \mu\text{g/L}$ pri 65 % bolnikov ne pride do zavrnitve presadka, pri koncentraciji med $3,6$ in $7,3 \mu\text{g/L}$ pa dosežemo 69-80 % verjetnost, da do zavrnitvene reakcije ne bo prišlo. Verjetnost se zviša

na 85 % pri koncentracijah med 7,4 in 21,8 µg/L, vendar ob sočasnem porastu resnih neželenih učinkov zdravila (45).

Najpomembnejši faktorji, ki vplivajo na farmakokinetiko EVL, so absorpcija, rasa, genetski polimorfizem P-glikoproteina, CYP3A4, 3A5 in 2C8 ter interakcije z drugimi zdravili (39). Okoli 60 % vseh zdravil, uporabljenih v medicini, se metabolizira s pomočjo citokromalnih izoencimov CYP3A. Posamezniki z večjo ekspresijo CYP3A (nižje koncentracije EVL v krvi, če ni sočasnega jemanja inhibitorjev CYP3A) morajo inhibirati več encima, zaradi česar so interakcije med zdravili v prisotnosti inhibitorjev CYP3A močnejše. Komedikacija z zdravili, ki si delijo isto pot eliminacije, lahko pripelje do farmakokinetičnih interakcij zdravil. Največkrat gre v teh primerih za sočasno jemanje inhibitorjev CYP3A, ki značilno zmanjšajo očistek in zvišajo koncentracije EVL v krvi. Močni inhibitorji CYP3A so ketokonazoli (antifungicidi), zmerni eritromicin, verapamil in ciklosporin, šibek inhibitor pa je atorvastatin (46). Ob sočasnem jemanju EVL in ketokonazola (oz. itrakonazola) koncentracija EVL v krvi poraste v povprečju 3,9-krat, njegov razpolovni čas pa se podaljša 1,9-krat. Ker je v takem primeru težko prilagoditi odmerek koncentraciji znotraj terapevtskega območja, jemanje ketokonazola v takem primeru odsvetujejo (47). Zmerni inhibitorji CYP3A povzročijo nekoliko nižji porast koncentracije EVL. Bolniki, vključeni v našo nalogo, prejema ciklosporin v obliki želatinastih kapsul (Neoral[®]), ki se v nasprotju s ciklosporinom v obliki mikroemulzije (Sandimmune[®]) absorbira hitreje in povzroča 2-3-krat višjo izpostavitv EVL (Certican[®]). Razlog tega je tekmovanje EVL in CYA za vezavna mesta na P-glikoproteinu in CYP3A4 ter približno 100-krat višji odmerki in koncentracije ciklosporina v krvi v primerjavi z EVL (48). Šibki inhibitorji CYP3A minimalno prispevajo k porastu EVL. Ob spremljanju koncentracije EVL v polni krvi in individualnem prilagajanju odmerka se tako šibki kot zmerni inhibitorji lahko jemljejo vzporedno z EVL (46).

Pri prvem in šestem bolniku se vse izmerjene koncentracije EVL nahajajo znotraj meja terapevtskega območja. Odmerek zdravila je pri prvem bolniku vseskozi enak (0,75 + 0,50 mg). Razen CYA (Neoral[®]), ki je zmerni inhibitor CYP3A4, drugih inhibitorjev oz. induktorjev ni prejemal, kar koncentracij v polni krvi bistveno ne spremeni. Odmerek EVL je pri šestem bolniku nekoliko višji (0,75 + 0,75 mg), vmes ga znižajo na 0,75 + 0,50 mg in nazadnje spet zvišajo na izhodiščni odmerek. Bolnik prejema CYA in blag inhibitor CYP3A4 atorvastatin (Atoris). Pri drugem bolniku smo ugotovili, da se koncentracije EVL ob odmerku 1,00 + 0,75 mg nahajajo nekoliko nad zgornjo mejo terapevtskega območja, ob znižanju

odmerka na 0,75 + 0,75 mg pa izmenično nihajo znotraj in pod spodnjo mejo terapevtskega indeksa. Bolnik ima poleg EVL predpisan CYA. Tretji bolnik ima pri odmerku EVL 0,50 + 0,25 mg oz. 0,50 + 0,50 mg koncentracije v polni krvi znotraj terapevtskega območja, s povečanjem odmerka pa se sorazmerno zvišuje tudi koncentracija, ki preseže zgornjo mejo terapevtskega območja. Kliniki so nato odmerek EVL znižali na 0,50 + 0,25 mg, pri katerem so koncentracije zdravila v krvi padle pod spodnji nivo terapevtskega območja. S postopnim zvišanjem odmerka učinkovine so koncentracije uspeli zadržati znotraj priporočljivih meja. Bolnik vzporedno prejema CYA in atorvastatin, ki zaradi interakcij s CYP3A4 lahko pripomoreta k nekoliko višjim koncentracijam EVL v polni krvi. Pri četrtem bolniku se koncentracije EVL sprva nahajajo znotraj meja terapevtskega območja (ob odmerku 0,75 + 0,75 mg in 1,00 + 0,75 mg). Po prvi izmerjeni previsoki koncentraciji, odmerek celo zvišajo (1,00 + 1,00 mg) in tako dosežejo predpisane koncentracije terapevtskega območja zdravila. Iz neznanega razloga koncentracija EVL rahlo poraste nad zgornjo mejo terapevtskega območja, zaradi česar odmerek zdravila malenkostno znižajo (1,00 + 0,75 mg). Možno je, da sta k porastu koncentracij prispevala inhibitorja CYP3A4 CYA in atorvastatin, ki ju je bolnik jemal sočasno z EVL. Itrakonazol Sporanox[®] je pri petem bolniku oz. bolnici povzročil značilno visoke koncentracije EVL v polni krvi ob relativno majhnem odmerku (0,50 + 0,50 mg, 0,50 mg/2 dni in 0,50 mg/dan). Z ukinitvijo zdravila Sporanox[®] in prilagoditvijo odmerka EVL na 0,25 + 0,50 mg in 0,50 + 0,50 mg kliniki uspejo koncentracije v krvi zadržati znotraj meja terapevtskega območja.

Na posamezne nepojasnjene dvige koncentracij EVL je lahko poleg inhibitorjev CYP3A4 vplivala ekspresija CYP3A4, ne smemo prezreti niti vpliva grenivkinega soka, ki deluje kot inhibitor CYP3A4 ter P-glikoproteina in bi ga bolniki lahko uživali. Iz farmakoloških, farmakokinetičnih značilnosti in izmerjenih koncentracij EVL smo razbrali, da je TDM pri imunosupresivu EVL bistvenega pomena za izboljšano ravnotežje učinkovitosti in toksičnosti ter za boljšo dolgoročno toleranco zdravila.

6. SKLEP

V okviru naše naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- koncentracije imunosupresiva EVL, izmerjene s pomočjo imunske turbidimetrične metode "QMS Everolimus Immunoassay" so primerljive s koncentracijami EVL, izmerjenimi s LC-MS/MS
- med imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS obstaja pozitivna korelacija ($r = 0,825$, $P < 0,0001$)
- Imunska turbidimetrična metoda "QMS Everolimus Immunoassay" je v primerjavi s LC-MS/MS cenejša, nezahtevna, s primerljivo specifičnostjo in občutljivostjo
- zaradi velike variabilnosti med in znotraj posameznika prihaja do različnih odzivov na učinkovino (različne koncentracije EVL v polni krvi ob istem odmerku pri različnih osebah)
- itrakonazol Sporanox[®] zaradi inhibicije CYP3A4 povzroči izrazit porast koncentracij EVL v polni krvi, zmerni in šibki inhibitorji CYP3A4 pa imajo na koncentracije EVL manjši vpliv
- za vzdrževanje koncentracij EVL v ozkem terapevtskem območju predstavlja TDM nepogrešljivo orodje pri ohranjanju zadostne stopnje imunosupresije ob zmanjšanju neželenih učinkov zdravila na čim nižjo raven
- spremljanje koncentracij imunosupresiva EVL v polni krvi omogoča prejemnikom srca individualno prilagoditev odmerka

7. REFERENCE

1. Dimartini AF, Dew MA, Trzepacz PT: Organ Transplantation. Focus 2005; 3: 280–303
2. Billingham RE, Brent L, Medawar: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 1953; 4379: 603–606
3. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I: Immunology, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2006: 343-344
4. Starzl TE: History of Clinical Transplantation. World J Surg 2000; 24: 759-782
5. <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=home>; 02.11.2011
6. <http://www.slovenija-transplant.si/>; 02.11.2011
7. Roels L, Rahmel A: The European experience. Transplant International 2011; 24: 350-367
8. Patel JK, Kobashigawa JA: Heart Transplantation. Circulation 2011; 124: e132–e134
9. Vrtovec B, Poglajen G: Sodobni načini zdravljenja srčnega popuščanja. Zdrav Vestn 2011; 80: 302–315
10. Erbasan et al.: Heart Transplantation. Anadolu Kardiyol Derg 2008; 8: Özel Sayı 2; 131–147
11. Vrtovec B: Advanced Chronic Heart Failure and Heart Transplantation, A Guide to Clinical Decision Making, UKC Ljubljana, 2008: 12-95
12. Poglajen G, Okrajšek R, Bunc M, Breskvar Kač U, Šebeštjen M, Zobavnik J, Vrtovec B: Presaditev srca, Program za napredovalo srčno popuščanje in transplantacije srca, Krka, d. d., Novo mesto, 2008: 1–32
13. Mancini D, Lietz K: Selection of Cardiac Transplantation Candidates in 2010. Circulation 2010; 122: 173-183
14. Logar B: Psihološki vidiki zdravljenja s transplantacijo srca, Interdisciplinarna obravnava bolnika pred, med transplantacijo srca in po njej: zbornik predavanj, Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije–Zveza društev medicinskih sester, bobic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v kardiologiji in angiologiji, 2007: 37–41
15. Hunt SA, Haddad F: The Changing Face of Heart Transplantation. JACC 2008; 8: 587-598

16. Mulley WR, Kanellis J: Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology* 2011; 16: 125-133
17. Jung S-H, Kim JJ, Choo SJ, Yun T-J, Chung CH, Lee JW: Long-term Mortality in Adult Orthotopic Heart Transplantation. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 599-603
18. Baran DA, Carboni M, Dengler T, Feldman D, Frigerio M, Kfoury A, Kim D, Kobashigawa J, Shullo M, Stehlik J, Teuteberg J, Uber PA, West L, Zukermann A: Immunosuppression and Rejection, The international society of heart and lung transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2010; 2: 1-41
19. Dandel M, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hertzner R: Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. *Transplant Immunology* 2010; 23: 93-103
20. Krejci K, Tichy T, Bachleda P, Zadrazil P: Calcineurin inhibitor-induced renal allograft nephrotoxicity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154 (4): 297-306
21. Penninga L, Møller CH, Gustafsson F, Steinbrüchel DA, Gluud C: Tacrolimus versus cyclosporine as primary immunosuppression after heart transplantation: systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised trials. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 1177-1187
22. Allison AC, Eugui EM: Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85-118
23. Webber A, Hirose R, Vincenti F: Novel Strategies in Immunosuppression: Issues in Perspective. *Transplantation* 2011; 91: 1057-1064
24. Dunn C, Croom KF: Everolimus, A Review of its Use in Renal in Cardiac Transplantation. *Drugs* 2006; 66 (4): 547-570
25. Kirchner GI, Meier-Wiedwornbach I, Manns MP: Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 83-95
26. Schaffer SA, Ross HJ: Everolimus: efficacy and safety in cardiac transplantation. *Expert Opin. Drug Saf.* 2010; 9 (5): 843-851
27. Advani SH: Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2010; 31 (4): 132-136
28. Parker RB, Yates R, Soberman JE, Laizure C: Effects of Grapefruit Juice on Intestinal P-glycoprotein: Evaluation Using Digoxin in Humans. *Pharmacotherapy* 2003; 23 (8): 979-987

29. Manito N, Delgado JF, Crespo-Leiro MG, González-Vílchez, Almenar L, Arizón JM, Díaz B, Fernández-Yáñez, Mirabet S, Palomo J, Rodríguez Lambert JL, Roig E, Segovia J: Clinical recommendations for the use of everolimus in heart transplantation. *Transplantation Reviews* 2010; 24: 129–142
30. Engelen MA, Amler S, Welp H, Vahlhaus C, Gunia S, Sindermann JR, Rothenburger M, Stypmann J: Prospective Study of Everolimus With Calcineurin Inhibitor-Free Immunosuppression in Maintenance heart Transplant Patients: Results at 2 Years. *Transplantation* 2011; 91:1159–1165
31. Zuckermann A, Arizon JM, Dong G, Eisen H, Kobashigawa J, Lehmkuhl H, Ross H, Pelligrini C, Wang SS, Barten MJ: Impact of De Novo Everolimus-Based Immunosuppression on Incisional Complications in Heart Transplantation. *Transplantation* 2011; 92: 594–600
32. Eisen H, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhard P: Everolimus for the Prevention of Allograft Rejection and Vasculopathy in Cardiac Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2003; 349 (9): 847–858
33. Dasgupta A, Moreno V, Balark S, Smith A, Sonilal M, Tejpal N, Van Buren CT: Rapid Estimation of Whole Blood Everolimus Concentrations Using Architect Sirolimus Immunoassay and Mathematical Equation: Comparison With Everolimus Values Determined by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Clin Lab Anal* 2011; 25: 207–211
34. Navodilo reagenta: *QMS® EVEROLIMUS Immunoassay* for the quantitative determination of everolimus, the active ingredient of Certican®, in human whole blood on automated clinical chemistry analyzers, Thermo Fisher Scientific, Germany, 2010
35. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2000: 234–250
36. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M: Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 2002; 48 (6): 955-958
37. Meinitzer A, Gartner G, Pilz S, Settin M: Ultra Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Cyclosporin

- A, Tacrolimus, Sirolimus, and Everolimus in Whole Blood Using Deuterated Internal Standards for Cyclosporin A and Everolimus. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 61-66
38. Seger C, Vogeser M: Drug Monitoring and Toxicology, Immunosuppressant drug monitoring-a routine undertaking? *J Lab Med* 2010; 34 (3): 1-11
 39. Tedesco-Silva Jr H, Rosso Felipe C, Veras de Sandes Freitas T, Pontello Cristeli M, Araújo Rodrigues C, Medina Pestana JO: Impact of everolimus: update on immunosuppressive therapy strategies and patient outcomes after renal transplantation. *Transplant Research and Risk Management* 2011; 3: 9-29
 40. Sallustio BC, Noll BD, Morris RG: Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and Immunoassay methods. *Clinical Biochemistry* 2011; 44: 231-236
 41. Coentrão L, Carvalho C, Sampaio S, Oliveira JG, Pestana MI: Relationship Between Everolimus Blood Concentration Assessed Using the Innofluor Certican Fluorescence Polarization Immunoassay and the Architect i System Sirolimus Chemiluminescent Microparticle Immunoassay. *Transplantation Proceedings* 2010; 42: 1867-1869
 42. Khoshsorur GA, Fruewirth F, Zelzer S, Stettin M, Halwachs-Baumann G: Comparison of fluorescent polarization immunoassay (FPIA) versus HPLC to measure everolimus blood concentrations in clinical transplantation. *Clinica Chimica Acta* 2007; 380: 217-221
 43. Taylor PJ: Immunosuppressant Drug Monitoring by High-performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry—A Case Study. *Business Briefing: Labtech* 2004: 60-64
 44. Kovarik JM, Kaplan B, Tedesco Silva H, Kahan BD, Dantal J, Vitko S, Boger R, Rordorf C: Exposure-response Relationships for Everolimus in De novo Kidney Transplantation: Defining a Therapeutic Range. *Transplantation* 2002; 73: 920-925
 45. Kovarik JM, Eisen H, Dorent R, Mancini D, Vigano M, Rouilly M, Hsu C-H, Rordorf C: Everolimus in De novo Cardiac Transplantation: Pharmacokinetics, Therapeutic Range, and Influence on Cyclosporin Exposure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2003; 22: 1117-1125
 46. Kovarik JM, Beyer D, Schmouder RL: Everolimus Drug Interactions: Application of a Classification System for Clinical Decision Making. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2006; 27: 421-426

47. Kovarik JM, Beyer D, Bizot MN, Jiang Q, Shenouda M, Schmouder RL: Blood Concentrations of Everolimus Are Markedly Increased by Ketoconazole. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 514-518
48. Kovarik JM, Kalbag J, Figueiredo J, Rouilly M, Frazier O'Bannon OL, Rordorf C: Differential Influence of Two Cyclosporin Formulations on Everolimus Pharmacokinetics: A Clinically Relevant Pharmacokinetic Interaction. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 95-99

8. PRILOGE

Priloga 1: Rezultati vseh meritev koncentracij EVL v polni krvi z imunsko turbidimetrično metodo in LC-MS/MS ter razlike meritev

Imunska turbidimetrična metoda ($\mu\text{g/L}$)	LC-MS/MS ($\mu\text{g/L}$)	Razlika meritev (LC-MS/MS – im. turb. metoda)
4,2	3,5	-0,7
3,7	5,4	1,7
2,6	4,0	1,4
3,8	2,5	-1,3
4,3	4,8	0,5
3,3	4,5	1,2
6,7	6,8	0,1
7,0	8,3	1,3
6,6	7,3	0,7
5,2	6,4	1,2
3,6	7,2	3,6*
5,7	4,8	-0,9
6,2	5,5	-0,7
4,4	5,0	0,6
5,4	6,2	0,8
4,4	3,9	-0,5
5,8	6,0	0,2
4,3	4,5	0,2
1,7	2,2	0,5
4,3	5,8	1,5
2,4	2,4	0,0
3,4	3,4	0,0
14,8	9,1	-5,7*
4,7	6,4	1,7
8,7	7,6	-1,1
7,3	5,9	-1,4
5,6	7,4	1,8
5,3	5,0	-0,3
5,8	6,3	0,5
5,7	6,9	1,2
7,0	6,8	-0,2
2,0	2,6	0,6
3,1	4,0	0,9
3,1	2,4	-0,7
6,1	4,5	-1,6
11,9	6,8	-5,1*
5,1	5,5	0,4
5,9	5,1	-0,8
3,3	2,0	-1,3

*osamelci, ki smo jih izključili iz analize

