

ROZWIĘCIE I WALIDACJA NOWEJ METODY LC-MS/MS OZNACZANIA STĘŻENIA WOLNEJ FRAKCJI TACROLIMUSU W OSOCZU W ZALEŻNOŚCI OD EKSPRESJI CYP3A5

Przeszczepienie narządu jest najlepszą i często jedyną metodą leczenia niewydolności nerek i wątroby. Po transplantacji konieczne jest włączenie przewlekłej, wielolekowej terapii immunosupresyjnej, która zapobiega odrzucaniu przeszczepu, ale równocześnie wywołuje osłabienie działania układu odporności pacjenta. Obecnie podstawowym lekiem z tej grupy jest tacrolimus, którego skuteczność i bezpieczeństwo zostały potwierdzone przez liczne badania naukowe. Od czasu wprowadzenia tacrolimusu do leczenia pacjentów po przeszczepieniu, udało się zredukować odsetek epizodów ostrego odrzucania narządu z 50-60% do 10-20%. Jednak po trzydziestu latach stosowania leku w praktyce klinicznej, terapia tacrolimusem nadal związana jest z dużym ryzykiem wystąpienia powikłań.

Tacrolimus cechuje się wąskim oknem terapeutycznym oraz bardzo dużą międzyosobniczą i wewnątrzosobniczą zmiennością farmakokinetyki. Oznacza to, że niewielkie różnice stężenia leku we krwi mogą znacznie zmieniać jego wpływ na pacjenta, co wynika z wielu czynników, między innymi genetycznych (ekspresja enzymu CYP3A5 metabolizującego tacrolimus). Dlatego też konieczne jest ciągłe monitorowanie stężenia tacrolimusu we krwi, które docelowo powinno mieścić się w zakresie od 4 do 12 ng/mL. Zarówno zbyt mała jak i zbyt duża ekspozycja na lek wiąże się z występowaniem istotnych działań niepożądanych, takich jak ostre odrzucanie narządu, nefrotoksyczność, neurotoksyczność, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, infekcje, nowotwory oraz powikłania sercowo-naczyniowe. Występowanie tych zdarzeń istotnie zwiększa zachorowalność i śmiertelność u biorców przeszczepów.

Obecnie stężenie tacrolimusu monitorowane jest poprzez pobranie próbki krwi przed porannym przyjęciem leku (tzw. stężenie C_0). Opierając się na tym pomiarze, lekarze modyfikują dawkę, żeby ograniczyć możliwość wystąpienia negatywnych efektów terapii. Niestety, liczne badania kliniczne pokazują, że stężenie C_0 nie odzwierciedla wystarczająco możliwości występowania działań niepożądanych. Ponieważ w Polsce ponad 15000 pacjentów jest leczonych przewlekłe tacrolimusem, opracowanie nowych, dokładniejszych sposobów kontroli działania leku jest bardzo potrzebne.

Celem opisywanego projektu badawczego jest ocena przydatności klinicznej różnych sposobów monitorowania stężenia leku u pacjentów po przeszczepieniu nerki i wątroby, które obejmują pomiary C_0 w pełnej krwi oraz stężenie wolnego tacrolimusu w ultrafiltracie osocza. Uważa się, że jedynie wolna frakcja tacrolimusu jest aktywna biologicznie i wywiera działanie terapeutyczne w organizmie. Dlatego spodziewamy się, że poziom wolnego tacrolimusu będzie dokładniejszym niż stężenie C_0 markerem, który można powiązać z epizodami ostrego odrzucania i działaniami niepożądanymi leku. Zakłada się również odnalezienie matematycznej zależności pomiędzy C_0 , stężeniem albumin i hematokrytem w celu stworzenia wzoru do obliczania stężenia wolnego tacrolimusu. Pomiary będą wykonane przy pomocy systemu chromatograficznego Nexera sprzężonego ze spektrometrem mas LCMS-8050 potrójny kwadrupol.

Kolejnym celem badania jest oznaczenie ekspresji enzymu CYP3A5 u każdego pacjenta. Obecność tego enzymu wiąże się z szybszym metabolizmem leku i niższymi stężeniami C_0 tacrolimusu we krwi. Stężenie wolnego leku zostanie skorelowane z ekspresją enzymu CYP3A5. Zakłada się, że zależność będzie lepiej wyrażona niż w przypadku pomiaru C_0 . Ma to potwierdzić rolę genotypowania w dostosowywaniu dawki leku. Genotypowanie wykonane zostanie przy pomocy systemu QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR.

Badanie ma w znaczący sposób przyczynić się do zrozumienia farmakokinetyki tacrolimusu, czyli jego metabolizmu w organizmie oraz reakcji pacjenta na lek. Proponowany projekt badawczy jest pierwszą próbą zintegrowania różnych metod pomiaru tacrolimusu (C_0 pełnej krwi i wolnego leku w ultrafiltracie osocza) oraz ekspresji genetycznej pacjenta w prospektywnym badaniu klinicznym z równoczesną oceną działań niepożądanych terapii. Projekt ma być podstawą do wprowadzenia spersonalizowanej terapii immunosupresyjnej – oznacza to możliwość dobrania indywidualnej dawki leku dla każdego pacjenta jeszcze przed transplantacją. W rezultacie umożliwi to wydłużenie życia biorców oraz prawidłowej funkcji przeszczepionych narządów.