

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

mgr farm. Paulina Nosal

**Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu
w osoczu chorych dzieci i dorosłych
z uwzględnieniem aspektów genetycznych**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy: prof. dr hab. Franciszek Główka

Promotor pomocniczy: dr Matylda Resztak

Poznań 2018

Słowa kluczowe: worykonazol, terapeutyczne monitorowanie leku, farmakokinetyka, zakażenia grzybicze, HPLC-FLD, polimorfizm genetyczny

Pracę wykonano we współpracy z ośrodkami:

- Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań,
- Oddziałem Hematologii i Transplantacji Szpiku, Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań,
- Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr Antoniego Jurasza w Bydgoszczy, ul. Marii-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz,
- Oddziałem Anestezjologii i Intensywnej Terapii Pulmonologicznej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II, ul. Prądnicka 80, 30-001 Kraków,
- Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Oddziału Hematologii Dziecięcej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin.

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Franciszkowi Głównce
za możliwość realizacji tematu rozprawy
doktorskiej, cenne wskazówki, życzliwość
i zaufanie jakim mnie obdarzył.*

Dziękuję

Pani dr n farm. Matyldzie Resztak

*za wsparcie i miłą atmosferę podczas
prowadzonych badań, poświęcony czas,
zaangażowanie i wszelką pomoc.*

*Serdecznie dziękuję
Narzeczonemu Jakubowi
za cierpliwość, wyrozumiałość i nieocenioną
pomoc w nauce programu L^AT_EX, który
ułatwił mi napisanie niniejszej rozprawy .*

Pracę dedykuje swoim rodzicom...

Część pracy opublikowano w:

Publikacje:

1. Katarzyna Kosicka, Paulina Nosal, Franciszek Główka; Worykonazol—bezpieczeństwo stosowania oraz wskazania do terapii monitorowanej, *Farm. Współcz.*,6(3):123-128, 2013.

Komunikaty zjazdowe:

1. Katarzyna Kosicka, Paulina Nosal, Matylda Resztak, Agnieszka Sobkowiak-Sobierajska, Franciszek Główka; Determination of plasma voriconazole in human by HPLC-FLD: application to pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring; 2nd European Conference of Oncology Pharmacy; Kraków, Polska, 26-28.06.2014; *Eur. J. Oncol. Pharm.*,8(2):49-50, 2014,
2. Katarzyna Kosicka, Matylda Resztak, Paulina Nosal, Franciszek Główka; Therapeutic monitoring of voriconazole with regard to CYP2C19 genotype; 9th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences “Towards novel concepts in pharmaceutical sciences”; Kraków 26-27.05.2017.

Spis treści

Wykaz skrótów	XI
Wstęp	XIV
Rozdział I. Część teoretyczna	1
I.1. Czynniki predysponujące i etiologia układowych zakażeń grzybiczych . . .	1
I.2. Diagnostyka układowych zakażeń grzybiczych	2
I.3. Budowa i mechanizm działania azolowych leków przeciwgrzybiczych . . .	3
I.4. Worykonazol	7
I.5. Wskazania do stosowania i dawkowanie worykonazolu	8
I.6. Metabolizm worykonazolu	13
I.7. Farmakokinetyka	13
I.8. Działania niepożądane	16
I.9. Polimorfizm genetyczny CYP2C19	17
I.10. Autoindukcja metabolizmu worykonazolu	21
I.11. Interakcje worykonazolu	22
I.12. Metody oznaczania worykonazolu w płynach ustrojowych	28
I.13. Terapeutyczne monitorowanie leków	31
I.13.1. TDM worykonazolu u dzieci i dorosłych	32
Rozdział II. Cel pracy	34
Rozdział III. Część doświadczalna	35
III.1. Metoda HPLC-FLD	35
III.1.1. Aparatura, sprzęt laboratoryjny i odczynniki	35
III.1.2. Warunki metody HPLC-FLD	36

III.1.3. Walidacja metody HPLC-FLD	37
III.1.4. Przygotowanie próbek kontrolnych	38
III.2. Oznaczanie worykonazolu w próbkach klinicznych	38
III.2.1. Procedura pobierania próbek	39
III.2.2. Przygotowanie próbek do oznaczeń worykonazolu u pacjentów	39
III.2.3. Analiza ilościowa worykonazolu w osoczu	40
III.2.4. Analiza parametrów farmakokinetycznych	40
III.3. Metoda PCR	40
III.3.1. Aparatura i sprzęt	40
III.3.2. Odczynniki użyte w metodzie	41
III.4. Identyfikacja polimorfizmów genu CYP2C19	41
III.4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej	41
III.4.2. Identyfikacja polimorfizmów genetycznych	42
III.4.3. Analiza PCR-RFLP- identyfikacja genotypu CYP2C19*2	43
III.4.4. Analiza PCR-RFLP—identyfikacja genotypu CYP2C19*17	44
III.5. Charakterystyka grup badanych	46
III.6. Analiza interakcji międzylekowych	46
III.7. Analiza statystyczna	46
Rozdział IV. Wyniki	49
IV.1. Wyniki poziomów worykonazolu u dzieci i dorosłych	49
IV.2. Parametry biochemiczne pacjentów poddawanych leczeniu VCZ	63
IV.3. Parametry farmakokinetyczne	66
IV.4. Leki stosowane w terapii chorych	74
IV.4.1. Analiza poziomów VCZ z uwzględnieniem potencjalnych interakcji	79
IV.4.2. Obniżenie poziomów VCZ u chorych w trakcie długotrwałej terapii stałą dawką 400 mg/dobę	82
IV.5. Efektywność leczenia VCZ	85
IV.6. Analiza polimorfizmów CYP2C19*2 i CYP2C19*17	88
IV.7. Analiza statystyczna wyników	91
Rozdział V. Omówienie i dyskusja wyników	95

<i>SPIS TREŚCI</i>	X
V.1. TDM worykonazolu w grupach badanych	97
V.2. Analiza polimorfizmów genetycznych CYP2C19*2 i CYP2C19*17	100
V.3. Ocena interakcji międzylekowych w oparciu o analizę VCZ w osoczu pacjentów	101
Rozdział VI. Wnioski	105
Rozdział VII. Streszczenie	106
Rozdział VIII. Abstract	108
Bibliografia	110
Spis rycin	128
Spis tabel	130
Wykaz Załączników	132

Wykaz skrótów

- ACN - acetonitryl
- allo-HSCT - allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (allogenic hematopoietic stem cell transplantation)
- ALL - ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukemia)
- ALT - aminotransferaza alaninowa
- AML - ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia)
- AST - aminotransferaza asparaginowa
- AUC - pole powierzchni pod krzywą zależności zmian stężenia w czasie (area under the curve)
- BAL - popłuczyny oskrzelowo- pęcherzykowe (brocho-alveolar lavage)
- C_{min} - stężenie minimalne
- C_{max} - stężenie maksymalne
- CAR - konstytucyjny receptor androstanu
- CYP450 - cytochrom P450
- CYP3A4 - izoforma 3A4 cytochromu P450
- CYP2C19 - izoforma 2C19 cytochromu P450
- CYP2C19*2 - allel 2 izoformy 2C19 cytochromu P450
- CYP2C19*17 - allel 17 izoformy 2C19 cytochromu P450
- CYP2C9 - izoforma 2C9 cytochromu P450
- DLBCL - chłoniak rozlany z dużych komórek B (Diffuse large B-cell lymphoma)
- EDTA - kwas wersenowy
- eGFR - współczynnik filtracji kłębuszkowej (glomerular filtration rate)

- EMs - prawidłowi metabolizerzy (efficient metabolizers)
- ESI - jonizacja metodą elektrorozpylania (electrospray ionisation)
- GvHD - choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
- HPCE - elektroforeza kapilarna
- HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HPLC-UV - HPLC z detekcją UV
- HPLC-FLD - HPLC z detekcją fluorescencyjną
- HPLC-MS/MS - HPLC z detekcją mas
- FLC - flukonazol
- FLD - detektor fluorescencyjny
- FMO - enzymy należące do grupy monooksygenaz zawierających flawinę
- IFI - inwazyjne grzybice układowe (invasive fungal infections)
- IMs - pośredni metabolizerzy (intermediate metabolizers)
- ITC - itrakonazol
- k_{el} - stała szybkości eliminacji
- LC-MS/MS - wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas (liquid chromatography – tandem mass spectrometry)
- LOQ - oznaczalność (limit of quantitation)
- MeOH - alkohol metylowy
- MIC - najmniejsze stężenie hamujące (minimal inhibitory concentration)
- MIC₅₀ - najmniejsze stężenie leku hamujące wzrost 50% kolonii bakterii/grzybów
- MIC₉₀ - najmniejsze stężenie leku hamujące wzrost 90% kolonii bakterii/grzybów
- OUN - ośrodkowy układ nerwowy
- QC - próby kontroli jakości procesu analitycznego (quality control samples)
- PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction)
- RT-PCR - PCR z odwrotną transkryptazą (reverse transcriptase PCR)
- PCR-RFLP - PCR z analizą długości fragmentów restrykcyjnych
- PMs - wolni metabolizerzy (poor metabolizers)
- PXR - receptor-X-pregnanu
- SBEDC - sulfobutyleter-beta-cyklodekstryny
- SCC - nowotwór kolczystokomórkowy skóry (squamous cell carcinoma)

- $t_{0,5}$ - biologiczny okres półtrwania
- TEMED - tetrametyloetylenodiamina
- TDM - terapeutyczne monitorowanie leków (therapeutic drug monitoring)
- UMs - ultra-szybcy metabolizerzy (ultra rapid metabolizers)
- VCZ - worykonazol

Wstęp

Inwazyjne zakażenia grzybicze (invasive fungal infections—IFI) to wielonarządowe zakażenia o etiologii grzybiczej występujące najczęściej w grupie pacjentów z ciężkimi niedoborami odporności. Są one jednym z cięższych powikłań występujących u pacjentów zmagających się z nowotworami, mukowiscydozą, jak również pacjentów poddawanych przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. U tych ostatnich powikłanie to występuje najczęściej we wczesnym okresie tj. do 30 dni po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Mimo intensywnego postępu medycyny jaki możemy obserwować w ostatnich kilkunastu latach tematyka zakażeń grzybiczych stanowi wciąż duże wyzwanie dla lekarzy klinicystów. Narastający rozwój oporności patogenów stanowi duży problem niemal na każdym etapie leczenia szpitalnego. W dalszym ciągu brakuje odpowiednich metod i narzędzi diagnostycznych w zakresie zakażeń grzybiczych, które mimo coraz większej dostępności nowej generacji leków na rynku farmaceutycznym stanowią jedną z głównych przyczyn śmiertelności u pacjentów z ciężką neutropenią i limfocytopenią dotyczącą szczególnie limfocytów CD4+. W terapii zakażeń grzybiczych kluczową rolę odgrywa czas od momentu rozpoznania do podjęcia leczenia infekcji. Jednak rozpoznanie IFI jest często trudnym zadaniem z uwagi na brak charakterystycznych objawów. Niezwykle istotnym aspektem terapeutycznym jest uzyskanie odpowiedniego stężenia leku w ustroju pozwalającego na ograniczenie rozwoju oporności i zwalczenie patogenu. Do najczęstszych układowych zakażeń grzybiczych, występujących u pacjentów z obniżoną odpornością należy aspergiloza. Jednym z leków, używanych do leczenia IFI jest worykonazol—pochodna triazolu. Mechanizm działania pochodnych triazolu polega na zaburzeniu biosyntezy ergosterolu, podstawowego budulca

blony komórkowej grzybów. Worykonazol posiada bardzo szerokie spektrum działania i z powodzeniem wykorzystywany jest w leczeniu aspergilozy, kandydozy czy fuzariozy oraz w mniejszym stopniu w profilaktyce grzybic układowych. Pacjenci zapadający na inwazyjne zakażenia grzybicze, to bardzo specyficzna grupa chorych, u której z uwagi na choroby pierwotne prowadzona jest zwykle wielolekowa terapia. Niesie to bardzo duże ryzyko interakcji międzylekowych, które nierzadko doprowadzają do wystąpienia licznych działań niepożądanych i pogorszenia stanu zdrowia pacjentów. Istotnym działaniem, zmierzającym do zapobieżenia powyższej sytuacji jest prowadzenie spersonalizowanej terapii monitorowanej. Terapeutyczne monitorowanie leku (TDM) polega na pomiarze stężenia leku w matrycy biologicznej (osocze, surowica, mocz) w celu odpowiedniego dobrania dawki leku i uniknięcia działań niepożądanych. Worykonazol jest lekiem ulegającym licznym interakcjom w fazie farmakokinetycznej na etapie biotransformacji przy udziale izoenzymów cytochromu P450. Zatem, stosowanie worykonazolu w terapii układowych zakażeń grzybiczych wraz z wieloma innymi lekami, przyjmowanymi przez pacjentów niesie duże ryzyko niepowodzenia terapii przeciwgrzybiczej. Jednym z powodów niepowodzeń terapeutycznych jest występująca zmienność międzysobnicza genotypu w zakresie funkcji enzymów metabolizujących ksenobiotyki. Farmakokinetyka worykonazolu charakteryzuje się właśnie dużą zmiennością międzysobniczą, co znaczy, że po podaniu tej samej dawki u różnych pacjentów obserwuje się różne stężenia leku we krwi, a więc różna może być jego skuteczność. W przypadku zbyt niskich stężeń leku we krwi terapia może nie być skuteczna. Z kolei przy zbyt wysokich stężeniach może dojść do wystąpienia działań niepożądanych. Monitorowanie leków w znaczący sposób przyczynia się do poprawy efektywności i bezpieczeństwa terapii.

Rozdział I

Część teoretyczna

I.1. Czynniki predysponujące i etiologia układowych zakażeń grzybiczych

Powikłania infekcyjne o etiologii grzybiczej są jedną z głównych przyczyn śmiertelności pacjentów po chemioterapii i poddawanych przeszczepieniu komórek krwiotwórczych—HSCT (ang. hematopoietic stem cell transplantation). Grupą najbardziej zagrożoną zakażeniami są pacjenci po HSCT od dawców niespokrewnionych a najmniej chorzy poddawani autologicznemu przeszczepieniu szpiku kostnego [1]. Głównymi czynnikami predysponującymi do wystąpienia IFI są [2]:

- długotrwała neutropenia (liczba granulocytów poniżej $500/\text{mm}^3$ krwi utrzymująca się powyżej 10 dni),
- zakażenie CMV (cytomegalovirus),
- utrzymująca się wysoka gorączka powyżej 38°C mimo zastosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania,
- zastosowane leczenie lekami immunosupresyjnymi (powyżej 30 dni),
- leczenie kortykosteroidami powyżej 3 tygodni,
- GVHD (choroba—przeszczep przeciwko gospodarzowi).

Obecnie wyodrębnia się siedem typów zakażeń grzybiczych. Należą do nich:

1. kandydozy (zakażenia wywołane przez drożdżaki z rodzaju *Candida* sp.),
2. aspergilozy (*Aspergillus* sp. głównie *A.fumigatus*),
3. kryptokokozy (*Cryptococcus neoformans*),

4. hialohyfomykozy (*Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*),
5. mukormykozy (*Rhizopus sp.*, *Absidia sp.*, *Mucor sp.*),
6. zakażenia innymi drożdżakami (*Malassezia sp.*, *Trichosporon sp.*),
7. infekcje wywołane grzybami ciemnostrzępkowymi (*Alternaria sp.*, *Bipolaris sp.*, *Cladophialospora sp.*, *Wangiella sp.*, *Dactylaria sp.*)[3].

Do najczęściej występujących u pacjentów hematologicznych zakażeń należą jednak aspergiloza i kandydoza. Bardzo rzadko występującymi zakażeniami są fusariozy, scedosporiozy czy mukormykozy. Zakażenia grzybami pleśniowymi i drożdżakami różnią się mechanizmem inwazji tkankowej. W przypadku pierwszych do zakażenia dochodzi głównie przez inhalacje zarodnikami grzybów obecnymi w środowisku zewnętrznym. Z kolei zakażenia drożdżakami to zakażenia endogenne, do których dochodzi poprzez inwazję śluzówek przewodu pokarmowego i skóry pacjenta.

I.2. Diagnostyka układowych zakażeń grzybiczych

Diagnostyka IFI stanowi w dalszym ciągu duże wyzwanie z uwagi na ograniczoną dostępność nowoczesnych i szybkich metod diagnostycznych w ośrodkach szpitalnych. Standardy diagnostyczne opierają się głównie na badaniach mikrobiologicznych, serologicznych, diagnostyce obrazowej i histopatologicznej. Posiewy wykonuje się z materiałów klinicznych takich jak: krew, płwocina, materiał szczoteczkowy, BAL (popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe), płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z opłucnej oraz mocz. Diagnostyka mikrobiologiczna nie jest jednak precyzyjnym narzędziem diagnostycznym z powodu długiego czasu trwania hodowli i nie zawsze umożliwia określenie gatunku grzyba chorobotwórczego. Diagnostyka serologiczna opiera się na wykrywaniu specyficznych antygenów i przeciwciał, do których należą między innymi:

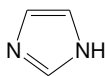
- galaktomannan (*Aspergillus sp.*),
- mannan/antymannan (*Candida sp.*),
- glukan (*Aspergillus sp.*, *Candida sp.*),
- enolazy (czynnik różnicujący kolonizację od inwazji).

Do celów diagnostyki układowych zakażeń grzybiczych wykorzystuje się również nowoczesne metody spektrometrii masowej oraz metody molekularne takie jak: wykrywanie DNA i RNA metodą PCR/RT-PCR, hybrydyzacja z użyciem sond molekularnych [4–7].

I.3. Budowa i mechanizm działania azolowych leków przeciwgrzybiczych

Podstawą budowy azolowych związków przeciwgrzybiczych jest jeden lub więcej pierścieni azolu różniący się liczbą atomów azotu w pierścieniu. Z uwagi na ilość atomów azotu w pierścieniu rozróżnić możemy pochodne imidazolu (ryc. 1) (2 atomy azotu w pierścieniu)—są to dobrze znane i używane w dermatologii antymikotyki takie jak: ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, izokonazol czy ekonazol. Trzy atomy azotu posiadają natomiast pochodne triazolu (ryc. 2), wśród których wyróżnia się dwie generacje [8]. I generację tworzą starsze lecz nadal stosowane w leczeniu leki takie jak: **flukonazol, itrakonazol**. Do II generacji triazoli należą: **worykonazol, posakonazol, rawukonazol, isawukonazol** - są to związki o szerokim spektrum działania, posiadające rekomendacje do leczenia grzybic układowych opornych na triazole I generacji. Struktury chemiczne triazoli I i II generacji przedstawiono na rycinach 3- 4 [9].

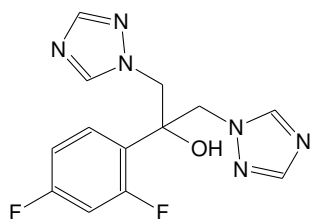
Mechanizm działania triazoli oparty jest na zahamowaniu syntezy ergosterolu—budulca błony komórkowej grzyba. Polega on na wiązaniu się leku z układem cytochromu P-450 i zahamowaniu reakcji hydroksylacji i demetylacji prekursorów ergosterolu. W wyniku połączenia się atomu azotu cząsteczki azolu z żelazem hemu cytochromu P-450 dochodzi do zahamowania izoenzymu 14 alfa demetylazy lanosterolu i zamiast ergosterolu powstają zmetylowane sterole, co w efekcie prowadzi do destabilizacji błony komórkowej, wolniejszego namnażania się komórek grzybów i zwiększenia ich podatności na fagocytozę. Ryciny 5–6 obrazują syntezę ergosterolu oraz uproszczoną budowę komórki grzyba z miejscem uchwytu różnych grup leków o działaniu przeciwgrzybiczym [8, 10–12].



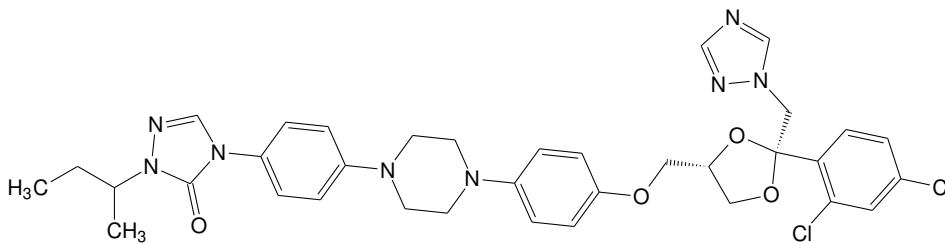
Rycina 1. Pierścień imidazolu



Rycina 2. Pierścień triazolu

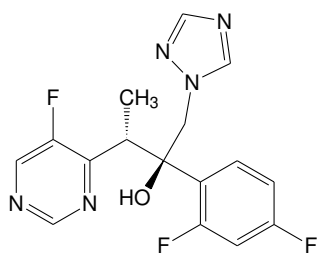


(a) Flukonazol

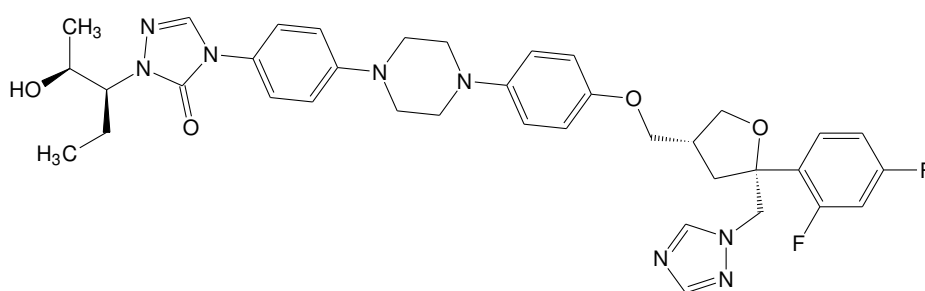


(b) Itrakonazol

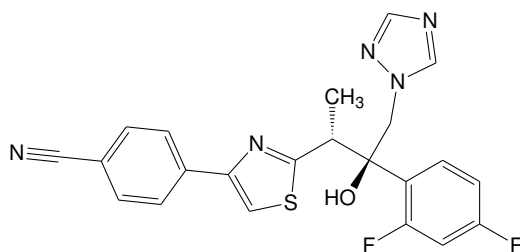
Rycina 3. Struktury chemiczne triazoli I generacji



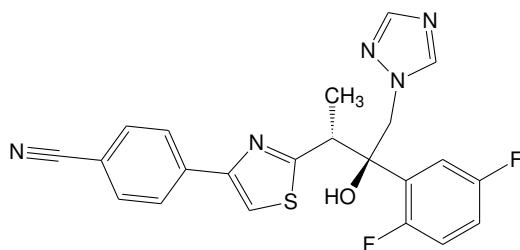
(a) Worykonazol



(b) Posakonazol

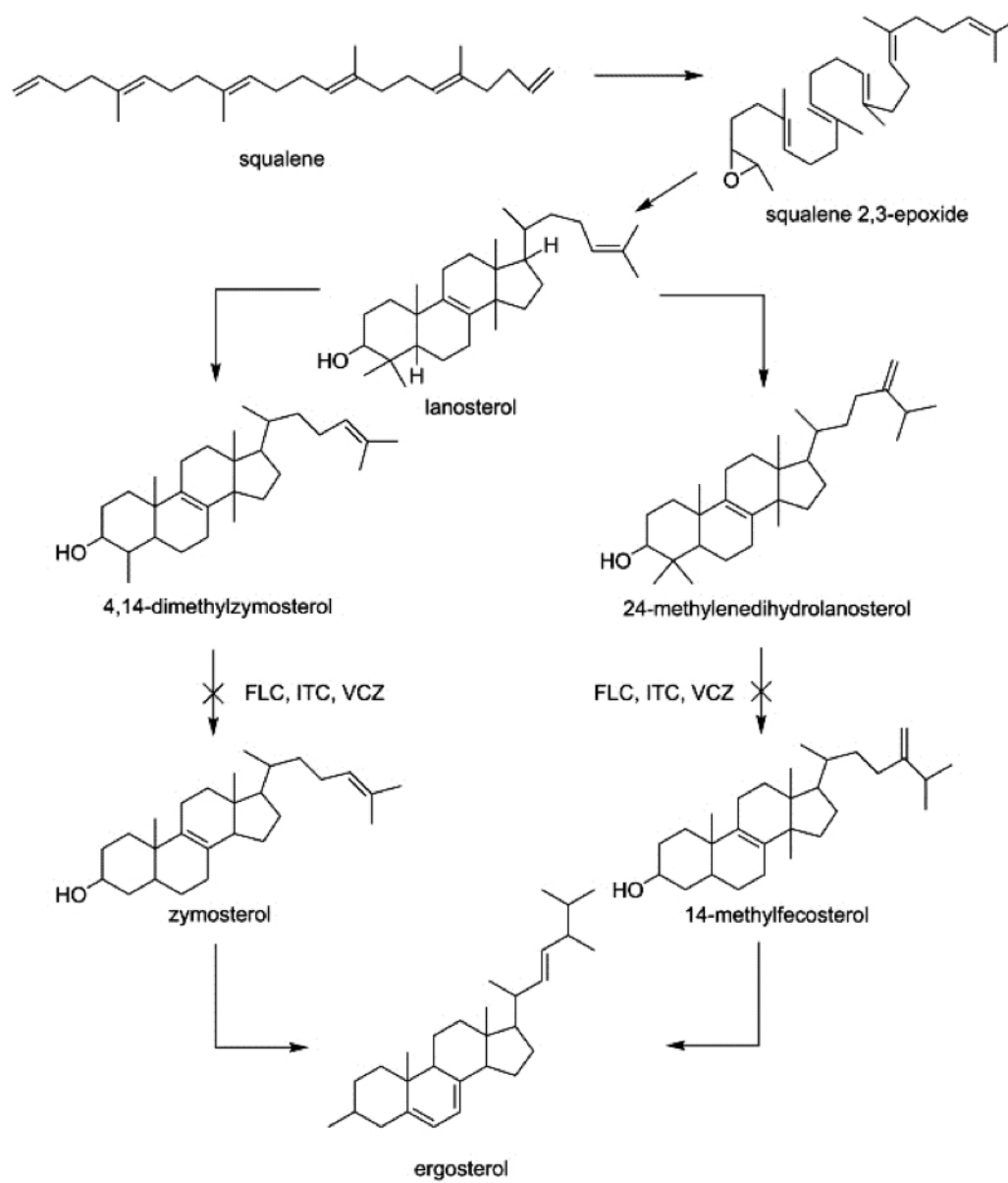


(c) Rawukonazol

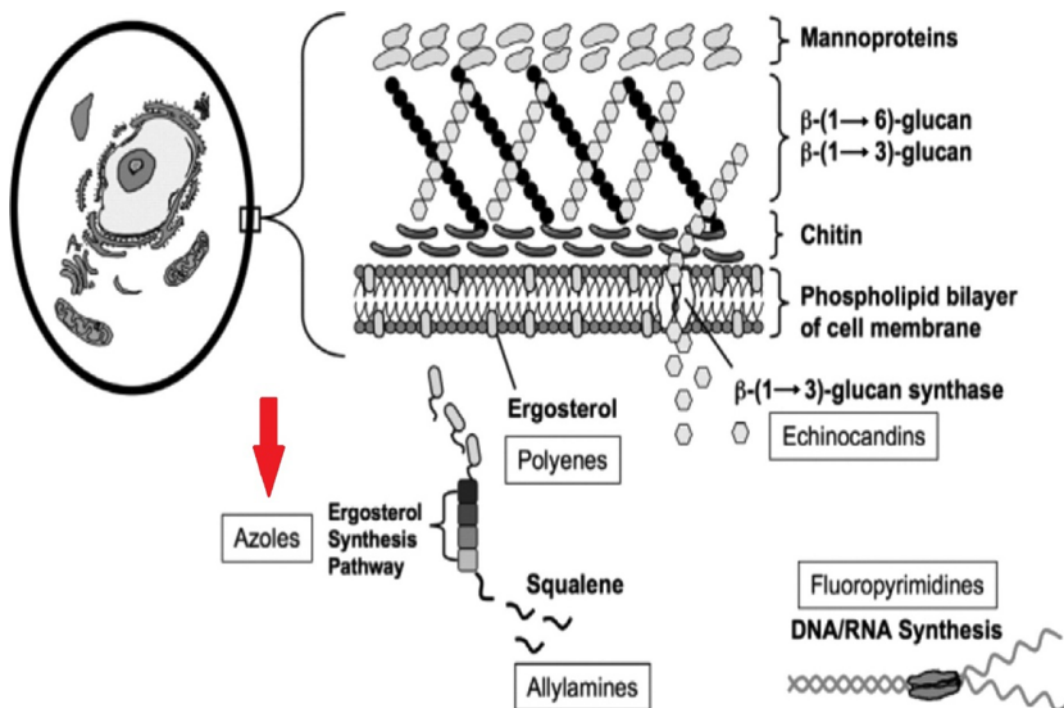


(d) Izawukonazol

Rycina 4. Struktury chemiczne triazoli II generacji



Rycina 5. Schemat syntezy ergosterolu [8]



Rycina 6. Schemat budowy komórki grzyba obrazujący miejsca działania leków przeciwgrzybiczych wg [12]

I.4. Worykonazol

Worykonazol—(VCZ) triazol II generacji wprowadzony został do lecznictwa w 2002 roku przez amerykański koncern farmaceutyczny Pfizer, pod nazwą handlową Vfend w trzech postaciach: proszku do sporządzania roztworu do infuzji, tabletek i zawiesiny doustnej. Z uwagi na bardzo dużą biodostępność postaci doustnej, sięgającą powyżej 95%, ta droga podania jest bardzo często wybierana przez lekarzy i pacjentów [13]. Na chwilę obecną na polskim rynku dostępne są już preparaty 10 firm farmaceutycznych produkujących zamienniki Vfend-u. Postać dożylna leku posiada natomiast 3 preparaty generyczne. Wykaz preparatów zawierających worykonazol przedstawia tabela 1 [14].

Tak szeroki wybór generyków w postaci tabletek podyktowany jest wejściem tej formy leku na listę leków refundowanych przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Niestety lek oryginalny pozostaje dla pacjentów w odpłatności 100%. Szeroki wybór preparatów generycznych, refundowanych worykonazolu daje możliwość kontynuacji leczenia w tak zwanej profilaktyce wtórnej, po wypisie pacjenta ze szpitala. Nie było to możliwe

Tabela 1. Preparaty worykonazolu zarejestrowane na rynku polskim

nazwa handlowa	postać leku	dawka [mg]	opakowanie
Vfend—Pfizer	proszek do sporz. roztworu do infuzji	200	1 fiol.
Vfend—Pfizer	proszek do sporz. zawiesiny doustnej	40 mg/ml	1 fiol. 75 ml
Vfend—Pfizer	tabletki	50	20 tabl.
Vfend—Pfizer	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Accord	tabletki	50	20 tabl.
Voriconazole Accord	tabletki	200	10 tabl.
Voriconazole Accord	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Actavis	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Adamed	tabletki	50	20 tabl.
Voriconazole Adamed	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Adamed	proszek do sporz. roztworu do infuzji	200	1 fiol.
Voriconazole Genoptim	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Mylan	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Polpharma	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Polpharma	proszek do sporz. roztworu do infuzji	200	1 fiol.
Voriconazole Sandoz	tabletki	200	28 tabl.
Voriconazole Stada	tabletki	200	14 tabl.
Voriconazole Teva	tabletki	50	20 tabl.
Voriconazole Teva	tabletki	200	20 tabl.
Voriconazole Zentiva	tabletki	200	20 tabl.
Voricostad Stada	proszek do sporz. roztworu do infuzji	200	1 fiol.

dotychczas z uwagi na zbyt wysoką cenę leku, co warunkowało zamianę worykonazolu na inny lek przeciwgrzybiczy, choć z klinicznego punktu widzenia nie zawsze jest to dobre rozwiązanie.

I.5. Wskazania do stosowania i dawkowanie worykonazolu

Worykonazol jest lekiem wskazanym do leczenia inwazyjnej aspergilozy, kandydozy, fusariozy i zakażeń wywołanych *Scedosporium sp.*[15]. Aktywność in vitro worykonazolu wobec wybranych gatunków grzybów *Aspergillus sp.* i *Candida sp.* przedstawia tabela 2.

Worykonazol jest lekiem zarejestrowanym w leczeniu dzieci powyżej 2 roku życia i dorosłych. Obecnie zarejestrowane dawkowanie u dorosłych i dzieci od 14 roku życia oraz dzieci między 12-14 rokiem życia, których masa ciała przekracza 50 kg wynosi 6 mg/kgmc. w dawce dożylniej lub doustnie 400 mg co 12 h w pierwszej

Tabela 2. Aktywność in vitro worykonazolu wobec niektórych gatunków grzybów

gatunek grzyba	MIC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]	MIC ₉₀ [$\mu\text{g/ml}$]	źródło
<i>A.fumigatus</i>	0,25	0,50	[16]
<i>A.niger</i>	0,50	1,00	[16]
<i>A.flavus</i>	0,50	1,00	[16]
<i>A.versicolor</i>	0,50	-	[16]
<i>A.terreus</i>	0,25	-	[16]
<i>C.albicans</i>	$\leq 0,06$	0,50	[17–19]
<i>C.tropicalis</i>	$\leq 0,06$	0,25	[18]
<i>C.parapsilosis</i>	$\leq 0,06$	0,12	[17, 18]
<i>C.glabrata</i>	0,50	4,00	[18, 19]
<i>C.krusei</i>	0,50	0,50	[17, 20]
<i>C.albicans</i> , oporna na flukonazol	0,25	1,00	[18]
<i>C.guilliermondii</i>	0,06	-	[19]
<i>C.lusitaniae</i>	$< 0,03$	0,06	[19]
<i>C.kefyr</i>	$\leq 0,06$	-	[19]

MIC₅₀ i MIC₉₀—najmniejsze stężenie antybiotyku, hamujące wzrost kolonii grzybów odpowiednio o 50% i 90%.

dobie leczenia—dawka inicjująca. Dawkowanie od drugiej doby leczenia to odpowiednio 4 mg/kgmc.- dożylnie lub doustnie 200 mg co 12 h. Jeżeli określone dawkowanie nie wystarcza do utrzymania stężenia terapeutycznego leku, którego zakres wynosi 1–5,5 µg/ml, dawkowanie można podwyższyć z 200 do 300 mg co 12h. Dolna granica zakresu związana jest z MIC (minimalnym stężeniem hamującym) patogenów grzybiczych i wynosi ona 1 µg/ml, jednak z uwagi na narastający rozwój oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze opisywana w literaturze wartość C_{min} zwiększa się nawet do 2 µg/ml. Górna granica zakresu terapeutycznego winna być ściśle przestrzegana z uwagi na możliwość wystąpienia silnych działań niepożądanych leku, co zostało opisane w podrozdziale I.8. Dawkowanie u dzieci od 2–12 roku życia i dzieci od 12-14 roku życia, których masa ciała nie przekracza 50 kg wynosi 9 mg/kgmc. dożylnie co 12 h w pierwszej dobie leczenia i 8 mg/kgmc. od 2 doby [21].

Worykonazol nie jest rekomendowany do leczenia IFI u pacjentów pediatrycznych poniżej 2 roku życia, jednak w praktyce klinicznej stosowany jest on *off label* (poza wskazaniami rejestracyjnymi) nawet u niemowląt i dzieci do 2 roku życia w dawkach od 2,5–12 mg/kgmc. [22–24].

Przyjmowanie tabletek lub zawiesiny doustnej worykonazolu z posiłkiem może zmniejszyć jego biodostępność nawet o 22%. Lek należy zatem przyjmować na czczo lub przynajmniej 1 h przed lub po posiłku [21]. Worykonazol jest lekiem słabo rozpuszczalnym w wodzie, z tego powodu postać dożylna zawiera SBEDC (Sulfobutyleter-β-cyklodekstryny). Jest to związek zwiększający rozpuszczalność worykonazolu w wodzie, który może ulegać kumulacji w nerkach. Nie zaleca się zatem stosowania postaci dożylnej leku u pacjentów, u których klirens kreatyniny jest poniżej 50 ml/min [25]. W tabeli 3 i 4 przedstawione zostały rekomendacje oraz sposób ich klasyfikacji według wytycznych ECIL 3 (3rd European Conference on Infections in Leucemia—Juan-les-Pins 2009). Rekomendacje dotyczą profilaktyki i leczenia IFI worykonazolem chorych z neutropenią oraz wykorzystują system opracowany według *Centers of Disease Control and Prevention*

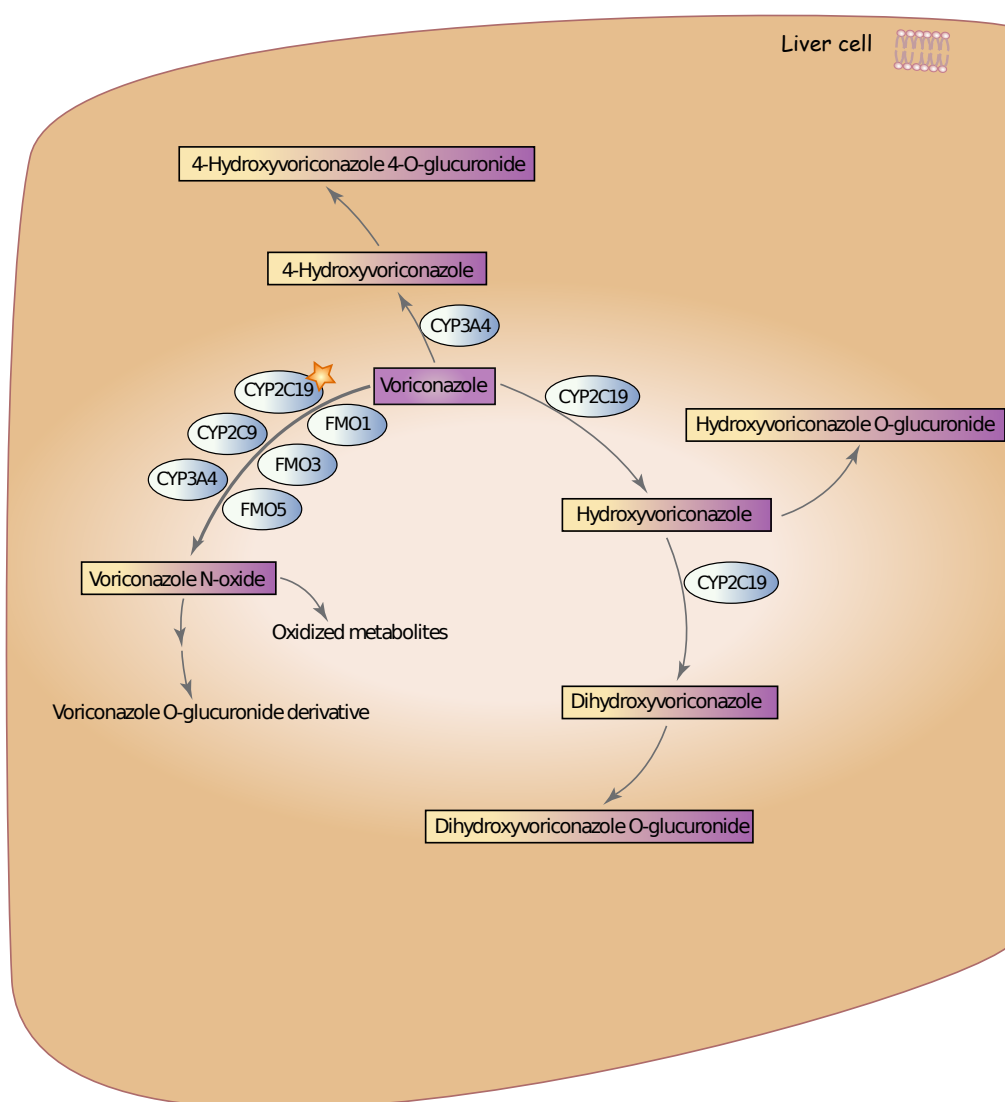
Tabela 3. Klasyfikacja rekomendacji według ECIL 3 [26]

Jakość dowodów	Siła Rekomendacji
I. Co najmniej jedno dobrze przeprowadzone badanie kliniczne randomizowane.	A. Mocne dowody na skuteczność i korzyść kliniczną (mocno rekomendowane).
II. Co najmniej jedno dobrze przeprowadzone badanie kliniczne bez randomizacji, badanie typu case-controlled przekonujące wyniki badań eksperymentalnych.	B. Mocne lub umiarkowane dowody na skuteczność; ograniczona korzyść kliniczna (generalnie rekomendowane).
III. Opinie ekspertów na podstawie doświadczenia klinicznego, badań opisowych lub raporty panelu ekspertów.	C. Umiarkowane dowody potwierdzające toksyczność lub brak aktywności (generalnie nierekomendowane).
	D. Mocne dowody potwierdzające toksyczność lub brak aktywności (nierekomendowane).

Tabela 4. Rekomendacje do stosowania worykonazolu u chorych z neutropenią [27]

Lp.	Wskazanie	Siła rekomendacji
1.	Profilaktyka pierwotna IFI u chorych po allo-HSCT faza neutropenii	AI
2.	Profilaktyka pierwotna IFI u chorych po allo-HSCT faza GvHD	AI**
3.	Terapia empiryczna IFI	BI
4.	Inwazyjna aspergiloza	AI
5.	Ratunkowe leczenie inwazyjnej aspergilozy o ile nie było leczenia VCZ I rzutu	BII
6.	Inwazyjna kandydoza	BII

** rekomendacja tymczasowa



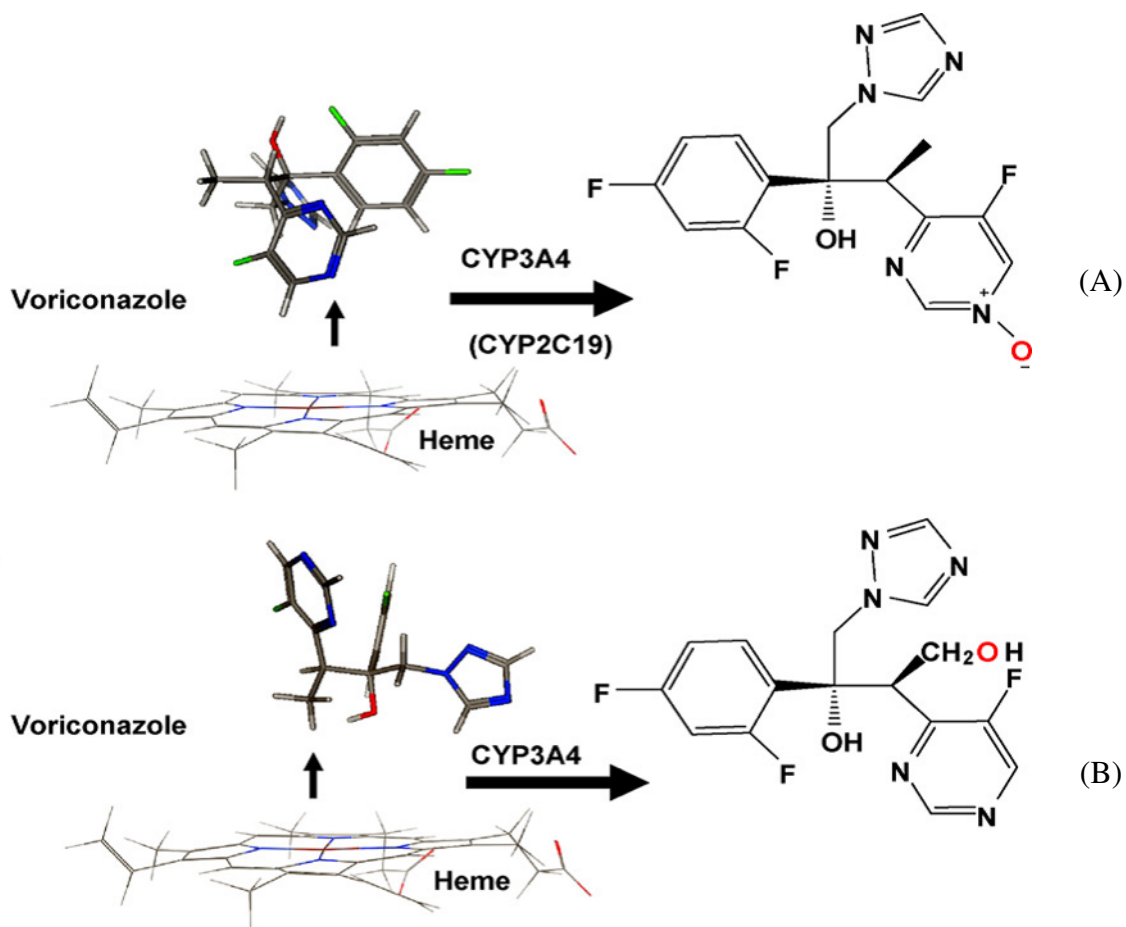
Rycina 7. Schemat metabolizmu worykonazolu przy udziale enzymów CYP450 [28]

I.6. Metabolizm worykonazolu

Worykonazol metabolizowany jest głównie w wątrobie i zaledwie 2% leku wydalane jest drogą nerkową w postaci niezmienionej. Metabolity leku są wykrywalne w moczu w ilości ok. 80% podanej dawki. Głównym metabolitem worykonazolu jest N-tlenek, który pozbawiony jest aktywności przeciwgrzybiczej, stanowi on blisko 72% wszystkich metabolitów worykonazolu [29, 30]. Za metabolizm leku do tej formy odpowiedzialna jest głównie izoforma CYP2C19, jednakże widoczny jest też udział CYP3A4, CYP2C9 oraz enzymów z grupy monoooksygenaz zawierających flavinę tzw. FMO. Szacuje się, że za metabolizm worykonazolu w ok 75% odpowiadają enzymy cytochromu P-450, a ok 25% odbywa się za sprawą FMO. N-tlenek VCZ ulega w dalszym etapie reakcji sprzęgania z kwasem glukuronowym, lub też istnieje możliwość jego przemiany do innych nieistotnych klinicznie metabolitów [29, 31]. Worykonazol może być zarówno substratem jak i inhibitorem enzymów CYP2C19, CYP3A4 czy CYP2C9. Głównym z punktu widzenia klinicznego szlakiem metabolicznym VCZ jest reakcja hydroksylacji, która zachodzi dwutorowo i następuje w obrębie grupy metylowej lub w obrębie pierścienia fluoropirymidynowego, do którego przyłączona może zostać jedna bądź dwie grupy hydroksylowe. Hydroksylowe pochodne są w dalszym etapie również sprzęgane z kwasem glukuronowym. Nie ma pełnej informacji dotyczącej tego jakie enzymy odpowiedzialne są za reakcje hydroksylacji grupy metylowej, wiadomo natomiast, że hydroksylacja do pierścienia fluoropirymidynowego zachodzi za sprawą CYP2C19 [32–34]. Schemat metabolizmu worykonazolu, oraz budowę chemiczną poszczególnych metabolitów przedstawiono na rycinach (7-8). Badania *in vitro* enzymów wątrobowych u dzieci i dorosłych wykazały, że największy udział w N-oxidacji u dzieci ma CYP2C19 i FMO-3 i to właśnie te enzymy w dużej mierze przyczyniają się do zwiększonego klirensu metabolicznego VCZ u tej grupy pacjentów. U dorosłych za ten szlak metaboliczny odpowiada w największym stopniu CYP3A4 [35].

I.7. Farmakokinetyka

Worykonazol jest prawie całkowicie wchłaniany po podaniu doustnym a maksymalne stężenie (C_{maks}) osiągane jest już po 1–2 h od podania leku. Wykazano biorównoważność



Rycina 8. Mechanizm powstawania głównych metabolitów worykonazolu: N-tlenku (A) i OH-worykonazolu (B) [31]

między tabletkami a zawiesiną doustną w tej samej dawce 200 mg. Należy jednak zwrócić uwagę na doustne podawanie leku z posiłkami wysokotłuszczowymi, które mogą zmniejszać C_{maks} nawet do 60%, co ma istotne znaczenie w terapii przeciwgrzybiczej, której efekty są zależne w głównej mierze od stężenia leku we krwi. Lek w znacznym stopniu wiąże się z białkami osocza, wiązanie z albuminami wynosi ok. 58% [15, 36]. VCZ bardzo dobrze przenika do tkanek o czym świadczy wysoka objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym, wynosząca 4,6 l/kg. Wykazano obecność VCZ w płynie mózgowo-rdzeniowym, u pacjentów u których zastosowano go poza wskazaniami rejestracyjnymi jako lek tzw. "ostatniej szansy". Penetracja leku do płynu mózgowo-rdzeniowego znajduje zastosowanie w leczeniu aspergilozy mózgu [37–39]. Odnotowano także skuteczność worykonazolu w leczeniu fusariozy ocznej, z uwagi na dobrą przenikliwość leku do cieczy wodnistej oka [40, 41]. Dane literaturowe wskazują na zróżnicowany charakter farmakokinetyki VCZ. Analiza worykonazolu u chorych dzieci wykazała, że w zakresie dawek 3–4 mg/kgmc farmakokinetyka leku była liniowa. Natomiast w wyższych dawkach powyżej 8 mg/kgmc obserwowano nieliniowy jej charakter [42]. U dorosłych również obserwowano nieliniową farmakokinetykę VCZ. Najbardziej wysycalnym etapem metabolizmu jest N-oksydacja. Badania wykazały, że to właśnie reakcja powstawania N-tlenku worykonazolu, jest procesem wysycalnym i warunkuje nieliniowość farmakokinetyki VCZ bardziej niż zmienność fenotypu CYP2C19 u pacjentów. Zastosowanie dawek nasycających w pierwszej dobie leczenia pozwala osiągnąć stan stacjonarny już po 24 h. W przypadku, gdy nie stosuje się dawek nasycających stan stacjonarny leku osiągnany jest po ok. 6 dniach [21]. Czas biologicznego półtrwania worykonazolu ($t_{0,5}$) wynosi ok. 6 h po podaniu doustnym 200 mg, jednak z uwagi na wysycalny metabolizm leku w kolejnych dawkach ulega on wydłużeniu [43].

Czynnikami pozagenetycznymi wpływającymi na farmakokinetykę worykonazolu są [33, 42–46]:

Płeć. U zdrowych kobiet wartości C_{maks} i AUC po podaniu wielokrotnym były większe odpowiednio o 83% i 113% od wartości tych parametrów uzyskanych u mężczyzn w grupie wiekowej 18–45 lat [13].

Wiek. U zdrowych mężczyzn w podeszłym wieku >65 rż. w porównaniu z młodszą grupą wiekową 18–45 lat, wartości C_{maks} i AUC po podaniu wielokrotnym były większe

odpowiednio o 61% i 86%. Różnice w farmakokinetyce widoczne są także między populacją dzieci i dorosłych. Przy dawkowaniu wielokrotnym do 350 mg dwa razy na dobę u dzieci obserwuje się taką samą ekspozycję na lek jak u dorosłych przy dawkowaniu 200 mg, dwa razy na dobę [13].

Masa ciała. U dzieci z mniejszą, nieadekwatną do wieku masą ciała i zaburzeniami wchłaniania może dojść do zmniejszonej biodostępności doustnych form VCZ. Z kolei wraz ze wzrostem masy ciała dzieci maleje również ekspozycja na lek. Wyższy stosunek masy wątroby do masy ciała u dzieci w porównaniu do dorosłych jest powodem zwiększonej eliminacji. [47].

Zaburzenia czynności wątroby. U pacjentów z łagodną i umiarkowaną marskością wątroby (Child-Pough A i B), AUC worykonazolu było o 233% wyższe niż u pacjentów z prawidłową czynnością. Dawkowanie podtrzymujące u tych pacjentów powinno być zmniejszone o 50% [13].

I.8. Działania niepożądane

Poziomy worykonazolu przekraczające $5,5 \mu\text{g/ml}$ predysponują do wystąpienia działań niepożądanych leku, z których najcięższym jest **hepatotoksyczność**. Objawia się ona najczęściej wysokimi poziomami enzymów wątrobowych, żółtaczką, niewydolnością wątroby a także zapaleniem woreczka żółciowego [48, 49]. Badanie na 52 dorosłych pacjentach, leczonych z powodu IFI wykazało encefalopatię wątrobową u 31% z nich przy poziomach leku powyżej $5,5 \mu\text{g/ml}$ [50, 51]. Z kolei Denning et al. w badaniu na 22 pacjentach udowodniła wystąpienie zaburzeń czynności wątroby lub jej uszkodzenie u 6 z nich przy poziomach przekraczających $6,0 \mu\text{g/ml}$ [52]. Podobne wnioski wyciąga w swoim badaniu Ueda et al., wskazując stężenie $6,0 \mu\text{g/ml}$, utożsamiane z hepatotoksycznością worykonazolu [53]. Retrospektywna analiza wykonana u japońskich pacjentów pokazuje, że uszkodzenie wątroby zwiększa się z 1,6–21,6% przy wzroście C_{min} z 2 do $4 \mu\text{g/ml}$ [54].

Kolejnym, zależnym od stężenia leku we krwi działaniem niepożądanym są zaburzenia widzenia, do których zaliczyć można upośledzenie widzenia, krwotok do siatkówki, nieostre widzenie, światłowstręt czy chromatopsję. Incydenty związane

z tym działaniem niepożądanym wynoszą od 10% u pacjentów z poziomami VCZ $>3 \mu\text{g/ml}$ do 40% u pacjentów, u których odnotowano poziomy przekraczające $9 \mu\text{g/ml}$. Jedna z retrospektywnych analiz wykazała, że szansa wystąpienia zaburzeń w zakresie narządu wzroku rośnie o 4,7% wraz ze wzrostem stężenia worykonazolu o każdy $1 \mu\text{g/ml}$ [22]. Do innych działań niepożądanych, które zwykle bywają przejściowe i nie dyskwalifikują z leczenia VCZ należą reakcje skórne (wysypka), zaburzenia czynności serca (tachykardia, arytmia), zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (biegunka, niestrawność, zapalenie dziąseł) oraz ogólne zaburzenia związane z miejscem podania (dreszcze, gorączka, obrzęk twarzy).

I.9. Polimorfizm genetyczny CYP2C19

Farmakokinetyka worykonazolu u ludzi charakteryzuje się dużą zmiennością międzyosobniczą. Dzieje się tak, ponieważ za metabolizm VCZ odpowiada jeden z bardziej polimorficznych enzymów cytochromu P-450, CYP2C19. Posiada on aż 30 wariantów alleli [55]. Najistotniejsze z punktu widzenia metabolizmu VCZ są allele *1,*2, *3 i *17. Aktywność enzymu CYP2C19 zależna jest od wieku pacjentów i jest ona odmienna u dzieci [56, 57]. Analiza *in vitro* wykonana na próbkach wątroby dzieci wykazała, że aktywność CYP2C19 w chwili urodzenia wynosi 23% aktywności tego enzymu u dorosłych, a w pierwszym roku życia dochodzi do 50% [58–63]. Badania *in vitro* nie są jednak adekwatnym miernikiem aktywności enzymów wątrobowych, bowiem Upreti i Wahlstrom w swojej pracy udowodnili, że badania *in vivo* w sposób bardziej precyzyjny opisują farmakokinetykę u ludzi. Jako markera aktywności CYP2C19 użyto lansoprasolu i wykazano, że aktywność CYP2C19 u dzieci zaraz po urodzeniu miała wartość wynoszącą 25% aktywności u dorosłych i do 5-go roku życia osiągała wartość 200%. Daje to odpowiedź na pytanie, dlaczego odsetek niepowodzeń terapeutycznych jest zdecydowanie większy u dzieci, niż u dorosłych i sięga nawet 73% [59]. Po 5 roku życia aktywność enzymu spada i dopiero w 12 roku życia osiąga poziom jak u dorosłych. Z tego powodu dawkowanie worykonazolu u dzieci poniżej 12 roku życia, wynoszące 7 mg/kgmc dwa razy na dobę wykazuje taką samą ekspozycję na lek jak dawka 4 mg/kgmc dwa razy na dobę u dorosłych [21].

Badania *in vivo* nad drugą izoformą, biorącą udział w metabolizmie worykonazolu oraz większości ksenobiotyków—CYP3A4 wykazują, że aktywność tego enzymu u dzieci już w 1 roku życia przewyższa znacząco aktywność u dorosłych jednak stabilizuje się osiągając ten sam poziom już w wieku 2 lat [59].

Podstawą różnic w farmakokinetyce worykonazolu jest różny genotyp izoformy CYP2C19, skutkujący różnymi wariantami fenotypu metabolicznego [64–66]. Spośród różnych wariantów fenotypów wyróżnić można:

PMs (poor metabolizers)—osoby wolno metabolizujące z osłabioną funkcją enzymatyczną, wolni metabolizerzy [67–69],

EMs (extensive metabolizers)—osoby posiadające normalną funkcję enzymu, szybcy metabolizerzy [70, 71],

IMs (intermediate metabolizers)—osoby z uszkodzoną funkcją jednego z alleli tzw. pośredni metabolizerzy [72–74],

UMs (ultrarapid metabolizers)—posiadające allel zwiększający aktywność enzymu tzw. ultra szybcy metabolizerzy [75–78].

Homozygoty (CYP2C19*1/*1) to osoby o prawidłowej funkcji enzymu. Pośredni metabolizerzy posiadają jeden allel *1 prawidłowy i jeden allel pozbawiony funkcji, którego wynikiem jest enzym o obniżonej aktywności (*1/*2). Z kolei wolni metabolizerzy posiadają oba allele pozbawione funkcji (*2/*2), czego wynikiem jest bardzo słaba aktywność enzymu lub jej brak. Ultra szybcy metabolizerzy są posiadaczami allelu *17, w wersjach (*1/*17 lub *17/*17). Osobnicy posiadający wariant pozbawiony funkcji enzymu i nadający funkcję enzymu (*2/*17) są klasyfikowani do pośrednich metabolizerów—IMs [71]. Allel CYP2C19*2 różni się częstością występowania w populacjach. Odnotowuje się jego 15% obecność w grupie kaukaskiej, 18% afrykańskiej i amerykańskiej oraz 29-34% u azjatyckiej. Występowanie allelu *3 jest bardzo rzadkie. Odnotowuje się ok 0,6% w grupie kaukaskiej, 0,3% afrykańskiej i amerykańskiej oraz 2–9% u azjatyckiej. Allel *17 posiada największą frekwencję w grupie kaukaskiej ok. 22%, 19% afrykańskiej i amerykańskiej oraz 2% we wschodnio-azjatyckiej i 17% w centralno i południowo-azjatyckiej [79].

W tabeli 5 przedstawiono poszczególne warianty fenotypów CYP2C19 oraz ich wpływ na farmakokinetykę worykonazolu w odniesieniu do ekspozycji na lek u dorosłych. Jedno z badań wykazało, że obecność wariantu CYP2C19*2/*2 zdyskwalifikowało pacjentów z dalszego leczenia z powodu nasilenia objawów toksycznych leku, głównie zaburzeń rytmu serca (wydłużenia odcinka QT), na skutek zbyt wysokich poziomów worykonazolu [80]. Badania na pacjentach nie potwierdziły istotnych statystycznie różnic w epizodach toksyczności worykonazolu u osób wolno metabolizujących PMs i osób o innych fenotypach [54, 69, 81, 82]. W przypadku genotypu *1/*17 (UMs) niektóre wyniki badań bywają zaskakujące. Kilka doniesień potwierdza, że osoby z tym genotypem posiadają zdolności szybkiego metabolizowania leku, co skutkuje subterapeutycznymi poziomami worykonazolu lub poziomami poniżej granicy wykrywalności [71, 76–78, 83]. Jednakże w jednym z badań u dzieci chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową odnotowywano wysokie poziomy worykonazolu na początku badania a przy kolejnych oznaczeniach VCZ oznaczono poziomy poniżej granicy wykrywalności. Tak odmienny efekt mimo fenotypu UMs tłumaczony jest obniżeniem poziomów CYP450 na skutek choroby przewlekłej o podłożu zapalnym [84]. Hics et al. uzyskali znamienne statystycznie niższe wyniki poziomów worykonazolu u dzieci z genotypem *17/*17 niż u NMs (*1/*1). Kolejne badania potwierdzają ten stan rzeczy, wskazując na konieczność rezygnacji z terapii worykonazolem [65]. Inne badanie, w którym łącznie z worykonazolem podawana była karbamazepina pokazuje, że podczas prób wyjaśniania niskich stężeń worykonazolu nie można wykluczyć zarówno chorób pacjenta jak i leków wpływających na modulację aktywności CYP2C19 czy CYP3A4 [75, 85]. Genotyp *1/*17 i *17/*17 predysponuje do wystąpienia nowotworu kolczystokomórkowego skóry (SCC) u pacjentów po przeszczepieniu płuc [86]. Użycie worykonazolu w prewencji lub leczenia IFI u pacjentów po przeszczepieniu płuc zwiększa ryzyko SCC o 73%. Zwiększone ryzyko tłumaczone jest uszkodzającym wpływem N-tlenku worykonazolu na ludzkie DNA [87].

Tabela 5. Warianty genotypów CYP2C19 i odpowiadające im fenotypy

Allel CYP2C19	Wariant CYP2C19	Fenotyp	Wpływ genotypu na PK worykonazolu	Źródło
*1	CYP2C19 *1/*1	szybki metabolizer	1,0 ekspozycja wyjściowa na VCZ	[80]
2	CYP2C19 *2/*1	pośredni metabolizer	1,8-krotnie większa ekspozycja na VCZ	[88]
	CYP2C19 *2/*2	słaby metabolizer	3,5-krotnie większa ekspozycja na VCZ	[71]
*3	CYP2C19 *3/*1	pośredni metabolizer	2,4-krotnie większa ekspozycja na VCZ	[33]
	CYP2C19 *3/*3	wolny metabolizer	3,5-krotnie większa ekspozycja na VCZ	[71]
*17	CYP2C19 *1/*17	ultraszybki metabolizer	2,0-krotnie niższa ekspozycja na VCZ	[71]
	CYP2C19 *17/*17	ultraszybki metabolizer	4,9-krotnie niższe C_{min}	[65]

I.10. Autoindukcja metabolizmu worykonazolu

Badania nad worykonazolem u ludzi i zwierząt przedstawiają problem autoindukcji leku jako jeden z powodów dużej zmienności międzyosobniczej w zakresie jego metabolizmu. VCZ posiada zdolność do indukcji własnego metabolizmu w czasie stosowania. Coraz więcej doniesień literaturowych potwierdza, że stosowanie worykonazolu w terapii inwazyjnych grzybic układowych dłużej niż 2 miesiące znacząco zwiększa odsetek niepowodzeń terapii w wyniku subterapeutycznych poziomów leku, wynoszących poniżej $1 \mu\text{g/ml}$ [89]. W trwającej 30 dni analizie toksykologicznej wykonanej na psach i szczurach, otrzymujących worykonazol w postaci doustnej odnotowano 3-krotnie zwiększoną aktywność enzymów wątrobowych w porównaniu z grupą kontrolną. U obu gatunków odnotowano przy tym powiększenie wątroby. Indukcja enzymatyczna u badanych zwierząt skutkowała 3–6 krotnym zmniejszeniem AUC worykonazolu. Odstawienie leku u szczurów oraz miesięczna faza oczyszczania z leku (tzw. faza washout) przywróciła poziom enzymów wątrobowych do tych sprzed badania. Obserwacja ta może potwierdzać teorię o autoindukcji metabolizmu worykonazolu [32]. U podstaw mechanizmu autoindukcji leży aktywacja receptorów (PXR)—receptor-X-pregnanu i (CAR)—konstytucyjny receptor androstanu, odpowiedzialnych za ekspresję genów CYP3A (PXR) oraz CYP2C (CAR) [90–92].

W analizie retrospektywnej u 29 dorosłych leczonych worykonazolem odsetek stężeń minimalnych poniżej $1 \mu\text{g/ml}$ wynosił aż 70% w grupie dorosłych otrzymujących worykonazol dłużej niż 2 miesiące i tylko 10,5% w grupie leczonej krócej niż 60 dni [89]. Kolejne badanie u dorosłych leczonych worykonazolem w wyniku infekcji *A. ustus*, którego celem było uzyskanie stężenia minimalnego wynoszącego $4 \mu\text{g/ml}$ (MIC_{90} dla tego gatunku) pokazało, że mimo stosowania wysokich dawek ($9,5 \text{ mg/kg}$ i.v.) co 12 godzin, tygodniowa terapia skutkowała znaczącym spadkiem stężenia minimalnego z $9,94 \mu\text{g/ml}$ do $1,17 \mu\text{g/ml}$. Autorzy przedstawiają możliwość autoindukcji metabolizmu worykonazolu w krótkim czasie terapii [93]. Do podobnych wniosków dochodzą autorzy badania, w którym zastosowano lek u dorosłych, chorych na scedosporiozę. W tym przypadku przy dawkowaniu 300 mg p.o. co 12 h, po tygodniowej kuracji stężenia minimalne zmalały z $1,2 \mu\text{g/ml}$ do $0,1 \mu\text{g/ml}$, osiągając

poziomy subterapeutyczne. Zmiana dawkowania do 400 mg p.o. co 12h u tych chorych spowodowała wzrost stężenia minimalnego do 2,3 $\mu\text{g/ml}$, jednak dwa miesiące później to samo dawkowanie skutkowało stężeniem 0,9 $\mu\text{g/ml}$ [94].

Istnieją również doniesienia o istnieniu zjawiska autoindukcji metabolizmu worykonazolu u dzieci. Badanie z 2015 roku, wykonane u 10-letniej dziewczynki, leczonej w wyniku inwazyjnej aspergilozy płuc wykazało blisko 5-krotny spadek stężenia minimalnego po niespełna miesięcznej kuracji VCZ. Dalsze leczenie w wyniku tak dużych zmian stężeń VCZ wymagało bardzo licznych modyfikacji dawkowania oraz wdrożenia terapii skojarzonej z powodu prawdopodobnej autoindukcji metabolizmu worykonazolu. Podczas prowadzonego badania wykluczono wpływ innych przyjmowanych leków na metabolizm VCZ [95].

Opisane przykłady zarówno u zwierząt jak i u ludzi pokazują, że problem autoindukcji metabolizmu VCZ jest bardzo poważny, gdyż w przypadku niemonitorowania leku nie ma możliwości przewidzenia tendencji zmian stężeń leku we krwi. Należy mieć na uwadze fakt, iż w leczeniu inwazyjnych infekcji grzybiczych subterapeutyczne poziomy VCZ skutkują ponad 6-krotnym wzrostem ryzyka śmiertelności pacjentów [49].

I.11. Interakcje worykonazolu

W leczeniu IFI u pacjentów z obniżoną odpornością, po przeszczepieniu narządów i szpiku kostnego znaczącą pozycję odgrywa VCZ. Z uwagi na fakt, że chorzy przyjmują jednocześnie wiele innych leków, obserwuje się liczne działania uboczne, będące wynikiem ich interakcji. Sytuację komplikuje fakt, że VCZ jest jednocześnie substratem i inhibitorem enzymów CYP450 (CYP2C19, CYP3A4, CYP2C9). Jednoczesne podawanie VCZ z innymi substratami wymienionych enzymów może skutkować spowolnieniem metabolizmu tych leków. Z kolei induktory enzymatyczne mogą obniżyć stężenia VCZ we krwi, co może stać się powodem niepowodzeń w terapii IFI. [11, 13, 58]. Wiele leków metabolizowanych jest przy udziale takich samych enzymów jak VCZ. Są to zarówno substraty, inhibitory jak również induktory izoform CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 (tabela 6). Analiza interakcji leków stosowanych wraz z worykonazolem jest zatem bardzo ważnym aspektem terapii pacjentów. W tabeli 7 zestawiono substancje,

które zastosowane jednocześnie z VCZ wpływają na jego stężenie we krwi. Okazuje się jednak, że worykonazol w oddziaływaniu z wieloma lekami powoduje w większości przypadków zahamowanie aktywności enzymów CYP450, skutkujące zwiększeniem AUC tych leków. Przykładowe interakcje oraz zmiany AUC leków istotnych w praktyce klinicznej zestawiono w tabeli 8. VCZ należy stosować ze szczególną ostrożnością u pacjentów przyjmujących leki mogące wydłużyć odstęp QTc, w szczególności, gdy istnieje potencjalne ryzyko zwiększenia przez VCZ stężenia zastosowanego leku. Sytuacja ta dotyczy niektórych leków przeciwhistaminowych, chinidyny, pimozydu, cyzaprydu. Jeżeli jednak nie ma możliwości ich odstawienia na czas leczenia IFI należy rozważyć możliwość zastosowania innego leku przeciwgrzybiczego [13]. Potwierdzono interakcje azolowych leków przeciwgrzybiczych z digoksyną (itakonazol, ketokonazol), powodujące znaczne zwiększenie jej poziomów we krwi. W badaniu u zdrowych ochotników wykazano, że VCZ nie powoduje interakcji z doustnie podaną digoksyną. [96].

Znaczna grupa pacjentów przyjmujących worykonazol z powodu inwazyjnych grzybic układowych, to pacjenci po przeszczepieniu narządów czy komórek krwiotwórczych. U tych pacjentów wdrożona jest na stałe terapia lekami immunosupresyjnymi. Ta grupa leków to w większości substraty CYP3A4. Należy zatem spodziewać się wzrostu ich stężenia przy jednoczesnym stosowaniu VCZ. Jednym z tych leków, często stosowanym jest cyklosporyna. W badaniu u siedmiu pacjentów po przeszczepieniu nerki, ze stabilną funkcją nerek stosowano cyklosporynę w dawkach 150–375 *mg/doba* oraz worykonazol w dawce 200 *mg* dwa razy na dobę przez 7,5 dnia. Jednoczesne stosowanie worykonazolu i cyklosporyny doprowadziło do 1,7- krotnego wzrostu C_{min} immunosupresantu, w porównaniu do jego stężenia minimalnego w monoterapii. Z kolei zaprzestanie stosowania cyklosporyny spowodowało nieadekwatną do dawki ekspozycję na lek. Zaleca się redukcję dawki cyklosporyny do 50% w momencie rozpoczęcia terapii worykonazolem i jednoczesne monitorowanie jej stężeń we krwi [97]. Po zakończonej terapii przeciwgrzybiczej należy ponownie wrócić do dawki pierwotnej cyklosporyny, pamiętając o terapeutycznym monitorowaniu leku. Bardzo silną interakcję z worykonazolem wykazuje także syrolimus, którego zastosowanie wraz z VCZ już po pojedynczej dawce 2 *mg* prowadzi do zwiększenia

C_{maks} ponad 7-krotnie. Przeciwwskazane jest zatem jednoczesne stosowanie tego leku z VCZ. Istnieje możliwość zastosowania worykonazolu z takrolimusem, jednak zalecane jest monitorowanie jego stężeń i obniżenie dawki takrolimusu do jednej trzeciej już od rozpoczęcia terapii VCZ. Wysokie stężenie takrolimusu wiąże się z silną nefrotoksycznością tego leku [13].

Istotna klinicznie jest także interakcja VCZ z inhibitorem pompy protonowej—omeprazolem. Przy jednoczesnym stosowaniu omeprazolu i VCZ zaleca się stosowanie dawki dobowej inhibitora pompy wynoszącej 20 mg. Zastosowanie omeprazolu w dawce 40 mg prowadzi do podwyższenia jego C_{maks} o 116%. Istnieją również doniesienia o wpływie omeprazolu na stężenie VCZ. Badanie wykonane na 18 zdrowych ochotnikach, otrzymujących worykonazol w dawce 400 mg na dobę i omeprazol 40 mg na dobę przez 10 dni pokazało, że C_{maks} i AUC worykonazolu, w porównaniu z grupą placebo zwiększyły się odpowiednio o 14% i 41%. Interakcja worykonazolu z inhibitorami pompy protonowej wynika z faktu, iż leki z tej grupy analogicznie do VCZ są jednocześnie substratami CYP2C19 i CYP3A4 oraz inhibitorami CYP2C19. [50, 98]. Podczas terapii VCZ należy mieć również na uwadze leki z grupy statyn. Zaleca się zmniejszenie dawek statyn podczas leczenia VCZ, z uwagi na fakt iż wysokie stężenie statyn w osoczu może predysponować do wystąpienia rabdomiolizy u pacjentów [99].

Tabela 6. Wykaz klinicznie istotnych substratów, induktorów i inhibitorów niektórych enzymów CYP450 [100]

Enzym	Substraty	Inhibitory	Induktory
CYP2C9	Worykonazol, Diklofenak, Piroksydam, Ibuprofen, Losartan, Celekoksyb, Fluwastatyna, Fenytoina, Sulfametoksazol, Torasemid, Tamoksyfen, Warfaryna, Naproksen	Worykonazol, Amiodaron, Flukonazol, Izoniazyd	Ryfampicyna, Sekobarbital
CYP2C19	Worykonazol, Omeprazol, Lansoprazol, Pantoprazol, Rabeprazol, Diazepam, Fenytoina, Fenobarbital, Amitriptylina, Klomipramina, Kłopidogrel, Cyklofosfamid, Progesteron	Worykonazol, Fluoksetyna, Fluwoksamina, Ketoconazol, Lansoprazol, Omeprazol, Tyklopidyna	b. d.
CYP3A4	Worykonazol, Klarytromycyna, Erytromycyna, Telitromycyna, Chinidyna, Alprazolam, Diazepam, Midazolam, Triazolam, Cyklosporyna, Takrolimus, Indynawir, Rytonawir, Sakwinawir, Cyzapryd, Astemizol, Chlorfeniramina, Amlodypina, Diltiazem, Felodypina, Nifendypina, Nizoldypina, Nitrendypina, Werapamil, Atorwastatyna, Cerywastatyna, Lowastatyna, Simwastatyna, Arypirprazol, Buspiron, Imatynib, Haloperydol (częściowo), Metadon, Winkrystyna, Trazodon, Tamoksyfen, Pimozyd, Chinina, Syldenafil	Worykonazol, Indynawir, Nelfinawir, Rytonawir, Amiodaron, Cymetydyna, Klarytromycyna, Diltiazem, Erytromycyna, Fluwoksamina, sok grejpfrutowy, Itrakonazol, Ketokonazol, Werapamil, Nefazodon	Karbamazepina, Fenobarbital, Fenytoina, Ryfampicyna, Dziurawiec*, Ryfabutyna

*wyciągi etanolowe i wodno-etanolowe

Tabela 7. Najważniejsze interakcje worykonazolu z innymi lekami [58]

Leki i składniki pożywienia	Efekt	Postępowanie
sok grejpfrutowy, karbamazepina, barbiturany, rifampicyna	obniżenie stężenia VCZ we krwi	przeciwwskazane łączne podawanie
cyklosporyna, takrolimus, sirolimus, alkaloidy Vinca, statyny, benzodiazepiny, blokeru kanału wapniowego, warfaryna, inhibitory pompy protonowej	podwyższenie stężenia danego leku	przeciwwskazane łączne podawanie lub konieczna redukcja dawki, wskazane monitorowanie stężenia leku we krwi lub efektu farmakodynamicznego jeśli to możliwe
fenytoina, rifabutyna	obniżenie stężenia VCZ i zwiększenie stężenia danego leku	przeciwwskazane łączne podawanie a jeśli nie można inaczej konieczne monitorowanie obu leków

Tabela 8. Wpływ worykonazolu na AUC podawanych wraz z nim leków

Lek	Zmiana AUC pod wpływem VCZ *	Mechanizm interakcji	Źródło
Alfentanyl (i.v.)	5,9	inhibicja CYP3A	[101]
Cyklosporyna	1,7	inhibicja CYP3A	[97]
Diazepam	2,1	inhibicja CYP2C19/3A	[102]
Diklofenak	1,8	inhibicja CYP2C19/3A	[103]
Digoksyna	1,0	brak interakcji	[13]
Etynyloestradiol	1,6	inhibicja CYP3A	[104]
Fentanyl (i.v.)	1,3	inhibicja CYP3A	[105]
S-ibuprofen	2,0	inhibicja CYP2C9	[106]
idinawir	0,9	inhibicja CYP3A	[13]
R-metadon	1,5	inhibicja CYP3A/2C9/2C19	[107]
midazolam (p.o.)	9,8	inhibicja CYP3A	[108]
midazolam (i.v.)	3,6	inhibicja CYP3A	[108]
omeprazol	3,8	inhibicja CYP3A/2C19	[13]
oksykodon	3,6	inhibicja CYP3A	[109]
fenytoina	1,8	inhibicja CYP2C9/2C19	[13]
Prednisolon	1,3	inhibicja CYP3A	[13]
rifabutyna	4,3	inhibicja CYP3A	[13]
sirolimus	11,1	inhibicja CYP3A	[13]
tacrolimus	3,2	inhibicja CYP3A	[13]
Venlafaksyna	1,3	inhibicja CYP3A/2C9/2C19	[110]
zolpidem	1,5	inhibicja CYP3A/2C9	[111]

1,0 - brak interakcji VCZ z badanym lekiem. * Oznacza ilu krotnie zwiększyło się AUC danego leku na skutek interakcji z VCZ.

I.12. Metody oznaczania worykonazolu w płynach ustrojowych

Opracowanie metod oznaczania stężeń leków w ustroju jest zawsze dużym wyzwaniem analitycznym. Należy dążyć do tego by analiza trwała możliwie jak najkrócej i jak najszybciej prowadziła do otrzymania wyniku, który ma duże znaczenie w podejmowaniu decyzji odnośnie dawkowania leku a w konsekwencji uzyskania pożądanego efektu terapeutycznego. Dodatkowym utrudnieniem w prowadzonych analizach leków jest zawsze niezbędna ilość matrycy. Należy mieć na uwadze, że leczeni pacjenci poddawani są wielu procedurom diagnostycznym, dlatego dąży się do opracowywania metod, które pozwolą na oznaczenie poziomów leku przy jak najmniejszej objętości matrycy. Problem ten dotyczy w szczególności dzieci, u których ogranicza się ilość procedur diagnostycznych do niezbędnego minimum. Jest to bardzo ważny aspekt, który często dyskwalifikuje tą grupę pacjentów w badaniach farmakokinetycznych, do przeprowadzenia których potrzebne jest zwykle wiele próbek, pobieranych w określonych punktach czasowych.

Bardzo dobra przenikalność VCZ do tkanek daje możliwość oznaczania tego leku w wielu matrycach biologicznych. Najczęściej wykorzystywane w badaniach są: osocze, surowica oraz ślina [112–114]. Opracowano również metody oznaczania VCZ w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz cieczy wodnistej oka [40, 115, 116]. Obecnie najczęściej stosowanymi technikami stosowanymi do oznaczania worykonazolu w płynach biologicznych są:

HPLC —Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV i fluorescencyjną (FLD), oraz detekcją mas (MS) [117–120].

HPCE —wysokosprawna elektroforeza kapilarna [121].

Odchodzi się od oznaczania worykonazolu metodami mikrobiologicznymi, ponieważ są to metody bardzo czasochłonne o niskiej specyficzności i oznaczalności, a to sprawia, że nie nadają się do oznaczania VCZ ordynowanego wraz z innymi lekami [122].

Metody HPLC cechują się wysoką oznaczalnością i specyficznością oznaczeń analitów, co daje możliwość oznaczania VCZ niezależnie od przyjmowanych wraz z nim leków. Ponadto w odróżnieniu od metod mikrobiologicznych cechują się szybkim czasem analizy wynoszącym od kilku do kilkunastu minut. Jest to ogromna

przewaga nad czasochłonnymi, trwającymi do kilkunastu godzin lub kilku dni metodami mikrobiologicznymi. Niewątpliwym atutem metody HPLC jest stosunkowo niewielka jednorazowa ilość matrycy potrzebna do oznaczeń. W przypadku śliny, surowicy i osocza, w zależności od użytej detekcji i sposobu przygotowywania próbek mieści się ona w zakresie 100–1000 μl [122, 123]. Jest to relatywnie duża rozpiętość i jest ona szczególnie istotna jeśli chodzi o badania farmakokinetyczne, wymagające większej ilości próbek dla uzyskania pełnego profilu farmakokinetycznego.

Jeszcze wyższą specyficnością i oznaczalnością charakteryzuje się metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją mas (HPLC-MS/MS) [124, 125]. Ograniczeniem tej metody jest bardzo wysoki koszt aparatury, jednak obecnie jest ona coraz częściej wykorzystywana z uwagi na możliwość ograniczenia objętości matrycy nawet do kilku μl . Objętość (2 μl) cieczy wodnistej wystarczyła na oznaczenie poziomów worykonazolu u królików z zastosowaniem metody LC-MS/MS z użyciem elektrojonizacji rozpyłowej (ESI), z LOQ wynoszącym 5 ng/ml [120].

W tabeli 9 zestawiono popularne metody oznaczania worykonazolu w różnych matrycach biologicznych. Z analizy dostępnych danych literaturowych wynika, że metody HPLC w połączeniu z dostępnymi metodami detekcji są najczęściej wykorzystywane w terapeutycznym monitorowaniu worykonazolu u pacjentów. Międzynarodowe, między laboratoryjne badania w ramach programu obejmującego oznaczanie stężeń leków przeciwgrzybiczych, w tym worykonazolu w osoczu pokazują, że metody HPLC-UV i HPLC-FLD dostarczają równie precyzyjnych wyników, jak metoda HPLC-MS/MS [126].

Tabela 9. Metody oznaczania worykonazolu w różnych matrycach biologicznych

Lp.	metoda	IS	LOQ [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	matryca	czas analizy [min]	źródło
1.	HPLC-FLD	UK-115794	0,10	ślina, osocze (300 μl)	10	[127]
2.	HPLC-UV	UK-115794	0,05	osocze (250 μl)	4	[112]
3.	HPLC-UV	ketokonazol	0,10	surowica (1000 μl)	16	[113]
4.	HPLC-UV	brak	0,05	osocze (500 μl)	9	[117]
5.	HPLC-UV	UK-115794	0,20	osocze (500 μl)	10	[118]
6.	LC-MS/MS	cyjanoimipramina	0,10	osocze (100 μl)	4	[128]
7.	LC-MS/MS	ketokonazol	0,014	osocze (100 μl)	3	[119]
8.	LC-MS/MS	ketokonazol	0,05	osocze (100 μl)	4	[120]

IS - wzorzec wewnętrzny.

I.13. Terapeutyczne monitorowanie leków

Terapeutyczne monitorowanie leków (therapeutic drug monitoring, TDM) polega na pomiarze stężenia leku w określonej matrycy (osocze, surowica, ślina, mocz), w określonych interwałach czasowych w odniesieniu do konkretnego pacjenta. Ma ono na celu kontrolę nad bezpieczeństwem i skutecznością leczenia poprzez indywidualizację dawkowania w oparciu o zmierzone stężenie leku i stan kliniczny chorego. TDM jest wskazane w sytuacjach, gdy mamy do czynienia z lekiem który charakteryzują:

Wąski indeks terapeutyczny —niewielki zakres pomiędzy stężeniem terapeutycznym a toksycznym leku, przez który nawet niewielkie różnice poziomów leków we krwi po zastosowaniu zwykle stosowanych dawek rzutują na efektywność i bezpieczeństwo farmakoterapii,

Farmakokinetyka nieliniowa —gdy nie obserwuje się liniowej zależności między podaną dawką leku a jego stężeniem we krwi w stanie stacjonarnym,

Różnice międzypersoniczne w zakresie farmakokinetyki leku —występowanie polimorfizmu genetycznego w zakresie enzymów metabolizujących lek, wpływające na jego farmakokinetykę,

Zastosowanie w politerapii —dotyczy leków, o wysokim potencjale interakcji, stosowanych jednocześnie z kilkoma innymi lekami,

Zastosowanie w długotrwałej terapii [129, 130].

Terapeutyczne monitorowanie leków to tak naprawdę szereg działań, które mają na celu uniknięcie niepowodzeń terapeutycznych, podniesienie bezpieczeństwa farmakoterapii i traktowania jej w sposób zindywidualizowany. Ocena poziomów leku a w szczególności stężeń minimalnych pozwala z kolei na uniknięcie działań niepożądanych leku, wynikających ze zbyt wysokich poziomów leku we krwi. Prowadzenie TDM leków o wysokim potencjale interakcji tzn. silnych induktorów czy inhibitorów CYP450 daje zdecydowanie większą kontrolę nad prowadzoną terapią nad pacjentem [131]. Poprawa profilu bezpieczeństwa farmakoterapii to też zmniejszenie kosztów szpitala, wynikających z wydłużenia hospitalizacji na skutek występujących działań niepożądanych leków. Worykonazol jest lekiem, który spełnia wszystkie opisane

powyżej kryteria. Terapeutyczne monitorowanie VCZ byłoby wskazane w następujących sytuacjach [132, 133]:

- na początku leczenia po osiągnięciu stanu stacjonarnego leku,
- po modyfikacjach schematu dawkowania,
- po zmianie formy leku (np. przejście z formy dożylniej na doustną i odwrotnie),
- gdy istnieje niebezpieczeństwo interakcji lekowych z powodu politerapii (zastosowanie leków o wysokim potencjale interakcji),
- jeżeli występują u pacjentów dysfunkcje nerek, wątroby czy trzustki,
- jeżeli mamy do czynienia z czynnikami genetycznymi wpływającymi na farmakokinetykę VCZ,
- jeżeli VCZ zastosowany jest u dzieci od 2–12 roku życia.

I.13.1. TDM worykonazolu u dzieci i dorosłych

Korzyści zastosowania TDM worykonazolu opisane zostały w kontrolowanym, randomizowanym badaniu Park et al., wykonanym na grupie 110 dorosłych, otrzymujących VCZ w terapii IFI (udowodnionej lub prawdopodobnej) według standardowego dawkowania. Pacjenci podzieleni byli na 2 grupy. W jednej grupie badanej zastosowano TDM, w drugiej nie monitorowano stężeń leku. Przez pierwsze 12 tygodni leczenia nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy grupami. Jednakże w trzecim miesiącu terapii odnotowano lepsze efekty leczenia oceniane na podstawie całkowitego wyleczenia lub częściowej odpowiedzi w grupie z TDM vs. nie TDM (86% vs 63%; $p = 0,04$) [134]. Dostępne są również wyniki badań TDM wśród pacjentów oddziałów dziecięcych po przeszczepieniu szpiku kostnego w wieku 0,3–20 lat. Badania wykazały brak odpowiedzi na worykonazol u 61% z powodu subterapeutycznych poziomów leku $<1 \mu\text{g/ml}$. W grupie dzieci poniżej 2 roku życia ten odsetek wynosił aż 86% [44]. Ciekawe doniesienie dotyczy monitorowania pacjentów pediatrycznych podczas zamiany formy leku z dożylniej na doustną. Badanie wykazało znaczny spadek biodostępności do 50% w stosunku do dorosłych, u których wynosiła ona 90% [135]. Konieczność monitorowania stężeń opisuje badanie pochodzące z 6 szpitali w Madrycie, w których TDM wdrożone zostało w 2011 roku. Do stycznia 2016 roku przebadanych zostało 107 pacjentów zarówno dzieci jak i dorosłych, w różnych stanach klinicznych

i jednostkach chorobowych, u których VCZ zastosowany był zarówno w leczeniu inwazyjnej aspergilozy (74,6%), jak i w profilaktyce (14%). Celem badań były przede wszystkim ocena stężeń na początku leczenia / profilaktyki (33%), ocena efektywności leczenia już trwającego u (47%), oraz podejrzenia dotyczące objawów toksyczności VCZ (3,5%). Oznaczono poziomy (C_{min}) w 258 próbkach surowicy, stosując metodę HPLC-UV. Oznaczano zarówno próbki pochodzące z początku leczenia (5 doba), jak i kolejnych dni terapii. U blisko 20% pacjentów odnotowano poziomy subterapeutyczne. Prowadzone w ciągu kilku lat badanie przyczyniło się do obniżenia odsetka terapii, w których lek nie osiągał zakresu terapeutycznego [136].

Z powyższych doniesień wynika, że TDM worykonazolu jest bardzo cennym narzędziem oceny efektywności leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych zarówno u dzieci jak i dorosłych. Bardzo pomocne w TDM są również badania genotypu pacjentów, pozwalające na wstępną ocenę tendencji metabolizmu [79]. W dalszym ciągu istnieje wiele przeszkód, głównie finansowych i personalnych, stojących na drodze do wdrożenia TDM worykonazolu w wielu krajach. Do prowadzenia takich analiz niezbędny jest fachowy personel- farmaceuci kliniczni, których zadaniem byłaby ocena i interpretacja uzyskanych wyników analiz.

Rozdział II

Cel pracy

Celem pracy była analiza czynników farmakokinetycznych, genetycznych oraz interakcji międzylekowych, które w znaczący sposób mogą wpływać na poprawę efektywności leczenia i zmniejszenie odsetka niepowodzeń w leczeniu inwazyjnych grzybic układowych pacjentów pediatrycznych i dorosłych w ośrodkach leczniczych w Polsce.

Cel pracy realizowany był poprzez następujące zadania badawcze:

1. Oznaczenie poziomów VCZ u dzieci i dorosłych walidowaną metodą HPLC-FLD.
2. Obliczenie parametrów farmakokinetycznych worykonazolu u pacjentów.
3. Analiza polimorfizmów genetycznych w zakresie CYP2C19*2 i CYP2C19*17.
4. Ocena interakcji leków przyjmowanych przez pacjentów wraz z VCZ oraz ich potencjalnego wpływu na farmakokinetykę worykonazolu.

Rozdział III

Część doświadczalna

III.1. Metoda HPLC-FLD

III.1.1. Aparatura, sprzęt laboratoryjny i odczynniki

Do przygotowania prób oraz przeprowadzenia badań wykorzystano:

- zestaw HPLC (Hewlett Packard 1100, USA): degazer (typ G1322A), pompa (typ G1311A), auto-sampler (typ G1313A), termostat (typ G1316A), detektor fluorescencyjny (typ G1321A)—zestaw sterowany za pomocą oprogramowania ChemStation umożliwiającego analizę danych,
- kolumna LiChrospher 100 RP-18e (125 mm x 4 mm; 5 μm) z pre-kolumną LiChroCART (4 mm x 4 mm; 5 μm) (Merck, Darmstadt, Niemcy),
- zestaw pipet automatycznych (10–5000 μl) (Eppendorf, Hamburg, Niemcy),
- zestaw szkła laboratoryjnego,
- waga analityczna Sartorius BP110S (Sartorius, Goettingen, Niemcy),
- wirówka EBA 12R (Hettich Zentrifugen, Niemcy),
- urządzenie do odgazowywania metodą ultradźwięków UM-4 (Unitra, Olsztyn, Polska),
- szklany zestaw filtracyjny (Sartorius, Goettingen, Niemcy),
- filtry membranowe z nitrocelulozy, wielkość porów 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Niemcy),
- pH-metr automatyczny CyberScan 500 (Utech Cybernetics, Singapur),
- urządzenie do dejonizacji wody Simplicity UV (Millipore, Milwaukee, USA),
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy).

W pracy badawczej użyto następujących odczynników:

- worykonazol (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Niemcy),
- N,N,N',N''-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma Aldrich, Niemcy),
- amlodypiny bezyłan (Camlin Limited, Mumbai, Indie),
- osocze wolne od leków, pochodzące z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu,
- acetonitryl do HPLC o czystości gradientowej (Merck, Niemcy),
- metanol do HPLC o czystości gradientowej (Merck, Niemcy),
- kwas ortofosforowy 85% o czystości technicznej (Fluka Chemie, Szwajcaria),
- jednozasadowy fosforan potasu o cz.d.a. (Xenon, Łódź, Polska),
- woda dejonizowana, uzyskiwana z zastosowaniem aparatury Simplicity UV,
- węgiel sodu o cz.d.a (POCH, Gliwice, Polska).

III.1.2. Warunki metody HPLC-FLD

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym. Zestaw do HPLC-FLD składał się degazera, pompy czterzędowej, autosamplera do automatycznego nastrzyku próbek, termostatu zapewniającego stałą temperaturę kolumny, detektora fluorescencyjnego oraz programu ChemStation służącego do sterowania pracą chromatografu, a także komputerowej analizy danych. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie LiChrospher 100 RP-18e, wypełnionej krzemionką modyfikowaną grupami oktadecylowymi, o wymiarach (125 mm x 4 mm), ze średnicą ziaren 5 μm , wyposażoną w prekolumnę LiChroCART RP-18e (4 mm x 4 mm).

Warunki analizy HPLC:

- faza ruchoma: ACN: bufor o pH 6,5 zawierający 0,01 M KH_2PO_4 oraz 0,01 M TEMED (35:65 v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,2 ml/min,
- objętość nastrzyku: 50 μl ,
- temperatura kolumny: 30°C,
- wzorzec wewnętrzny: amlodypina o stężeniu 4 $\mu\text{g/ml}$,
- warunki pracy detektora fluorescencyjnego oraz czas analizy
0—6,19 min: maksimum wzbudzenia— $\lambda = 254 \text{ nm}$, maksimum emisji— $\lambda = 385 \text{ nm}$

6,20–9,50 min: maksimum wzbudzenia— $\lambda = 254$ nm, maksimum emisji— $\lambda = 450$ nm.

Faza ruchoma

Bufor do fazy ruchomej sporządzono w następujący sposób:

- Do kolby miarowej odważono odpowiednią ilość KH_2PO_4 (1,38 g na 1 litr buforu) i uzupełniono wodą bidestylowaną, zawierającą 0,01M TEMED,
- Bufor przesączono przez zestaw do sączenia i doprowadzono do pH 6,5 przy użyciu 0,01 M kwasu ortofosforowego.

Fazę ruchomą sporządzono poprzez zmieszanie ze sobą buforu oraz ACN w stosunku 65:35 v/v. Tak przygotowaną fazę odgazowano przy pomocy ultradźwięków.

Roztwory podstawowe i wzorcowe

Do przeprowadzenia analiz wykorzystano roztwory podstawowe amlodypiny 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w bezwodnym ACN (r-r bezyłanu amlodypiny w przeliczeniu na amlodypinę) oraz worykonazolu 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w MeOH. Z roztworów podstawowych przygotowano poprzez rozcieńczenie roztwory wzorcowe wzorca wewnętrznego-amlodypiny o stężeniu 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oraz worykonazolu o stężeniach 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do próbek kontrolnych.

III.1.3. Walidacja metody HPLC-FLD

Metoda HPLC-FLD została zwalidowana według wytycznych Europejskiej Agencji ds. Leków (EMA) z lipca 2011r. w ramach pracy magisterskiej mojego autorstwa “Metoda HPLC oznaczania worykonazolu w osoczu ludzkim z przeznaczeniem do badań farmakokinetycznych”. Uzyskano następujące parametry walidacyjne metody: precyzja w ciągu dnia (2,6–13,1%), między dniami (2,0–19,1%), dokładność w ciągu dnia (1,7–12,7%), dokładność między dniami (-7,1–2,6%). Precyzja i dokładność wyrażone są odpowiednio za pomocą współczynnika zmienności (Wz) i błędu względnego. Liniowość metody badano w zakresie krzywej wzorcowej (0,1–10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). W trakcie prowadzonych analiz na osoczu pacjentów, celem potwierdzenia użyteczności metody w dalszych badaniach wykonywano próbki kontrolne (QC—Quality control sample). Próbkę wykonywano dla 3 stężeń krzywej kalibracyjnej 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

którym odpowiadały stężenia w matrycy wynoszące odpowiednio 0,6 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$.

III.1.4. Przygotowanie próbek kontrolnych

Próbki kontrolne wykonywano w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Do probówki dodawano 100 μl osocza ze stacji krwiodawstwa (nieobciążonego analitmi), 50 μl metanolowego roztworu wzorcowego VCZ o odpowiednim stężeniu, 50 μl roztworu wzorca wewnętrznego—amlodypiny o stężeniu 4 $\mu\text{g/ml}$ oraz 50 μl ACN w celu strącenia białek osocza. Próba ślepa zawierała 150 μl mieszaniny ACN:MeOH (2:1, v/v). Próba zerowa zawierała 50 μl roztworu wzorca wewnętrznego oraz 100 μl mieszaniny ACN:MeOH (1:1, v/v). Próby starannie wymieszano i odwirowywano w celu oddzielenia osadu przez 10 min, przy 26660 g, w temperaturze 20°C. Po odwirowaniu, do nowej probówki pobierano 150 μl supernatantu i ponownie odwirowano w takich samych warunkach. Następnie 120 μl supernatantu przeniesiono do szklanego insertu i nastrzyknięto na kolumnę chromatograficzną. Próbki kontrolne z 3 stężeń (0,6 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$) wykonywano podczas każdej analizy próbek klinicznych.

III.2. Oznaczanie worykonazolu w próbkach klinicznych

Próbki osocza pacjentów otrzymano z 4 ośrodków leczniczych w Polsce. Próbki pacjentów pediatrycznych pochodziły ze Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera w Poznaniu, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy oraz SPSK nr 1 PUM w Szczecinie. Próbki pacjentów dorosłych pozyskiwano ze Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w Krakowie oraz Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego UM w Poznaniu.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 535/16 oraz nr 297/18—wykaz załączników).

III.2.1. Procedura pobierania próbek

Wszystkie otrzymane do analizy VCZ w osoczu próbki kliniczne pobierane były według opracowanej procedury. Krew o objętości 2 ml pobierano od pacjentów poddawanych terapii przeciwgrzybiczej worykonazolem przez minimum 6 dni, w czterech punktach czasowych:

- 2 h po podaniu leku,
- 6 h po podaniu leku,
- 8 h po podaniu leku,
- 12 h po podaniu leku jednakże przed podaniem kolejnej dawki leku (2 ml krwi),
- Dodatkowa próbka krwi pełnej pobierana była do systemu monovette EDTA w celu przeprowadzenia badań genetycznych.

Tak pobrane próbki krwi odwirowano i przeniesiono do plastikowych, zakręcanych probówek. Każda z próbek opatrzona została szczegółową godziną pobrania materiału biologicznego, datą oraz inicjałami pacjenta. Przygotowane próbki osocza pacjentów zamrożono do temp -20°C . Zwrócono szczególną uwagę personelowi medycznemu na ścisłe przestrzeganie czasu pobierania próbek. Każdy ze współpracujących podczas prowadzenia analiz worykonazolu oddziałów otrzymał procedurę pobierania próbek klinicznych w wersji papierowej i elektronicznej oraz wzór karty pacjenta do wypełnienia w celu uzyskania szczegółowych informacji. Probki osocza pacjentów wraz z kartami transportowane były w warunkach kontrolowanych, według procedur dotyczących transportu materiału biologicznego.

III.2.2. Przygotowanie próbek do oznaczeń worykonazolu u pacjentów

Do $100\ \mu\text{l}$ osocza pacjenta dodano $50\ \mu\text{l}$ roztworu wzorcowego amlodypiny oraz $100\ \mu\text{l}$ mieszaniny ACN:MeOH (1:1, v/v) i poddano procedurze jak w przypadku próbek kontrolnych. Analizę ilościową prowadzono z zastosowaniem zwalidowanej metody HPLC-FLD.

III.2.3. Analiza ilościowa worykonazolu w osoczu

Wartości stężeń worykonazolu w osoczu pacjentów obliczano z równań odpowiednich krzywych wzorcowych, przygotowanych przy użyciu próbek kontrolnych oznaczonych w jednym cyklu analitycznym równocześnie z próbkami badanymi.

III.2.4. Analiza parametrów farmakokinetycznych

Parametry farmakokinetyczne worykonazolu obliczono na podstawie zmian stężeń leku w osoczu. Wyznaczanymi parametrami były AUC_{ozn} , k_{el} , $t_{0,5}$. Pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia od czasu $t = 2$ h do ostatniego zmierzonego stężenia w czasie $t = 12$ h (AUC_{ozn}) obliczono metodą trapezów. Stałą szybkości eliminacji (k_{el}) wyznaczono z nachylenia końcowego prostoliniowego odcinka zależności logarytmu stężenia od czasu. Wartość biologicznego okresu półtrwania ($t_{0,5}$) obliczono z równania $t_{0,5} = \ln 2/k_{el}$.

III.3. Metoda PCR

III.3.1. Aparatura i sprzęt

- probówki do PCR o pojemności 0,2 ml,
- zestaw pipet automatycznych i końcówek o zakresie pojemności 0,5–1000 μ l, seria Discovery Comfort (HTL Lab Solutions, Polska),
- probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml (SARSTEDT, Niemcy),
- termocykler: Thermo Cycler T100 (Biorad, Singapur),
- miniwirówka (Biorad, Singapur),
- termowyrząsarka: Thermo-Shaker MS100 (Allsheng, Chiny),
- wirówka EBA 12R (Hettich Zentrifugen, Niemcy),
- aparat do prowadzenia elektroforezy MultiSub Choice (Biocom Direct System, Wielka Brytania),
- system do dokumentacji żelu z transluminatorem UV (MaestroGEN, USA).

III.3.2. Odczynniki użyte w metodzie

- **zestaw do izolacji DNA z krwi pełnej Quick Blood DNA Purification Kit (EurX, Polska),**
- **zestaw odczynników do przygotowania mieszaniny do przeprowadzenia reakcji PCR i analizy restrykcyjnej:**
 - woda jałowa,
 - bufor reakcyjny 10-krotnie stężony z MgCl₂ o stężeniu 20 mM FastStart (Thermo Scientific, Wielka Brytania),
 - polimeraza FastStart 5 U/ μ l (Thermo Scientific, Wielka Brytania),
 - mieszanina dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 10 mM (Thermo Scientific, Wielka Brytania),
 - liofilizowane startery (Oligo, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Polska) rozpuszczone w wodzie jałowej do stężenia 100 μ M,
 - enzym restrykcyjny SmaI 20 U/ μ l z buforem CutSmart 10-krotnie stężonym (New England Biolabs, Wielka Brytania).
- **zestaw odczynników do przeprowadzenia elektroforezy:**
 - agaroz (Bioshop, Kanada),
 - bufor TBE 5-krotnie stężony (TRIS, kwas borowy EDTA; Bioshop, Kanada),
 - barwnik obciążający 6-krotnie stężony Loading Dye Blue Buffer (Solis BioDyne, Estonia),
 - marker masy (Quick Load 100bp DNA Loader Ready to Load o stężeniu 50 μ g/ml; Solis BioDyne, Estonia),
 - barwnik SimplySafe (EurX, Polska).

III.4. Identyfikacja polimorfizmów genu CYP2C19

III.4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Izolację DNA z krwi pełnej zawierającej antykoagulant (EDTA) wykonano za pomocą zestawu Quick Blood DNA Purification Kit. Wszystkie czynności wykonywano według

Tabela 10. Sekwencje starterów użytych w reakcji PCR

Gen	Sekwencja startera	Długość produktu PCR [pz]	Temperatura przyłączenia [°C]
2C19*2	1F:CAGAGCTTGGCATATTGTATC 1R:TAGTAAACACAAAAGTAGTCAATG	321	59
2C19*17	2F:GCCTTAGCACCAAATTCTC 2R:ATTTAACCCCCTAAAAAACACG	473	52

protokołu producenta. Do próbki typu Eppendorf dodano 200 μ l krwi oraz 2 μ l RNAzy, która zapewniała otrzymanie preparatu DNA pozbawionego RNA. Całość dokładnie wymieszano przez wytrząsanie i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. W kolejnym kroku dodano 10 μ l proteinazy K oraz 200 μ l buforu SolQB, w celu lizy komórek i degradacji białek, i ponownie wytrząsano. Po 15-minutowej inkubacji w 70°C dodano 200 μ l etanolu 96% i dokładnie wymieszano zawartość próbki, wirując przez 1 minutę przy 17060 g. Całość lizatu przeniesiono do aktywowanej buforem QB minikolumny, znajdującej się w próbce odbierającej. DNA obecne w lizacie selektywnie wiąże się ze złożem wypełniającym minikolumnę. Po 2 minutach wirowania przy 17060 g wyjęto minikolumnę i wylano przesącz, ponownie umieszczając minikolumnę w próbce odbierającej. W celu dokładnego oczyszczenia DNA, kolumnę przemywano kolejno 500 μ l buforu Wash QBX1 (wirowano przez 1 minutę przy 17060 g) i 500 μ l buforu Wash QBX2 (wirowano przez 2 minuty przy 17060 g), po każdym wirowaniu wylewając filtrat. Ostatni etap—elucję wykonano przy użyciu 100 μ l buforu Elution (10 mM Tris-HCl o pH = 8,5), ogrzanego do temperatury 70°C. Po inkubacji przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, próbki wirowano przy 17060 g przez 1 minutę, a filtrat zawierający wyizolowane DNA przeniesiono do sterylnych probówek o pojemności 1,5 ml i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

III.4.2. Identyfikacja polimorfizmów genetycznych

Do identyfikacji polimorfizmu CYP2C19*2 wykorzystano metodę łańcuchowej reakcji polimerazy połączonej z analizą długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction—Restriction Fragments Length

Tabela 11. Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji 2C19*2

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość [μ l]
mieszanina starterów 1F/1R	5 μ M	2,0
bufor dla polimerazy FastStart Taq	10x	2,5
mieszanina dNTP	10 mM	0,5
polimeraza FastStart Taq	5 U/ μ l	0,2
woda	-	18,8
DNA	różne	1,0

Polymorphism). Pierwszy etap obejmował amplifikację regionu DNA obejmującego dany polimorfizm. W kolejnym przeprowadzono analizę restrykcyjną z wykorzystaniem odpowiednich enzymów. Wynik reakcji PCR sprawdzono przy pomocy rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Simply Safe. Rozdział prowadzono przez 8 min. Sekwencje starterów użytych do reakcji oraz optymalne warunki temperatury reakcji PCR przedstawiono w tabeli 10.

III.4.3. Analiza PCR-RFLP- identyfikacja genotypu CYP2C19*2

Reakcję PCR dla genotypu CYP2C19*2 wykonano zgodnie z warunkami opisanymi przez Giusti i wsp. Skład mieszanin użytych w reakcji amplifikacji przedstawiono w tabeli 11 [137].

Amplifikację przeprowadzono według następującego schematu (Punkty (2–4)—37 cykli):

1. wstępna denaturacja: 95 °C—5 minut,
2. denaturacja: 95 °C—30 sekund,
3. przyłączenie starterów: 59 °C—30 sekund,
4. elongacja 72: °C—45 sekund,
5. końcowa elongacja: 72 °C—7 minut.

Tabela 12. Skład mieszanin reakcyjnych do restrykcji CYP2C19*2

Składnik mieszaniny	Objętość [μ l]
produkt PCR	10
bufor	2,5
enzym 5U	0,2
woda	7,05
BSA	0,25

Tabela 13. Charakterystyka reakcji restrykcji 2C19*2

Mutacja	Enzym	Miejsce cięcia enzymu	Długość fragmentów po hydrolizie enzymem restrykcyjnym
2C19*2 c.681 G>A	SmaI	5'...CCC'GGG...3'	*1/*1:(212 pz i 109 pz)
		3'...GGG'CCC...5'	*1/*2: (321 pz, 212 pz i 109 pz)
			*2/*2 321pz

Produkty uzyskane w wyniku reakcji amplifikacji poddano trawieniu, przy użyciu enzymów restrykcyjnych. Informacje dotyczące składu mieszanin restrykcyjnych przedstawiono w tabeli 12. Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C przez 1 h. Powstałe w wyniku reakcji fragmenty rozdzielono elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Simply Safe. Rozdział prowadzono przez 30 min. Genotyp identyfikowany był na podstawie długości powstałych fragmentów DNA, przedstawionych w tabeli 13.

III.4.4. Analiza PCR-RFLP—identyfikacja genotypu CYP2C19*17

Polimorfizm genetyczny CYP2C19*17 analizowano według warunków zaproponowanych przez Sim i wsp. Pierwszy etap obejmował amplifikację fragmentu rejonu flankującego 5'. Skład mieszaniny wyszczególniono w tabeli 14 [138].

Tabela 14. Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji 2C19*17

Reagent	stężenie początkowe	Objętość [μl]
mieszanina starterów 2F/3R	5 μM	2,0
bufor dla polimerazy FastStart Taq	10x	2,5
mieszanina dNTP	10 mM	0,5
polimeraza FastStart Taq	5 $\text{U}/\mu\text{l}$	0,2
woda	-	17,8
DNA	różne	2,0

Tabela 15. Skład mieszanin reakcyjnych do restrykcji CYP2C19*17

Składnik mieszaniny	Objętość [μl]
produkt PCR	15
bufor	2
enzym 5U	1,5
woda	1,5

Reakcję przeprowadzono według schematu (Punkty (2–4)—39 cykli):

1. wstępna denaturacja: 95°C—5 minut,
2. denaturacja: 95°C—30 sekund,
3. przyłączenie starterów: 56°C—30 sekund,
4. elongacja 72:°C—45 sekund,
5. końcowa elongacja: 72°C—7 minut.

Produkt PCR analizowano na 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Simply Safe. Za pozytywny wynik uznano obecność prążka DNA o długości 473 pz po rozdziale elektroforetycznym. Próbki poddano w dalszym etapie reakcji restrykcji. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 15.

Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C przez 1 h. Uzyskane w reakcji produkty rozdzielono w 3% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Simply Safe. Czas rozdziału wynosił 30 min.

III.5. Charakterystyka grup badanych

Poziomy worykonazolu w osoczu oznaczono u 36 pacjentów. 23 osoby to dzieci w przedziale wiekowym 2–17 lat w tym (8 dziewczynek i 15 chłopców). Analiza dorosłych dotyczyła 13 pacjentów (4 kobiet i 9 mężczyzn). Przeważająca grupa chorych zarówno w grupie dzieci jak i dorosłych leczona była worykonazolem w wyniku podejrzanego lub potwierdzonego inwazyjnego infekcji grzybiczej, będącej następstwem choroby nowotworowej. Charakterystykę pacjentów wraz z rozpoznaniem klinicznym przedstawiono w tabelach (16–17). Wykonano analizę polimorfizmów genetycznych w zakresie CYP2C19*2 i CYP2C19*17 u 17 pacjentów (9 dzieci i 8 dorosłych).

III.6. Analiza interakcji międzylekowych

W oparciu o dane literaturowe dokonano analizy leków przyjmowanych przez pacjentów podczas jednoczesnej terapii przeciwgrzybiczej worykonazolem. Analiza polegała na opisanu potencjalnych interakcji z oznaczanym lekiem. Uwzględniono zarówno wpływ leków na metabolizm VCZ, jak również wpływ VCZ na metabolizm leków powszechnie stosowanych u pacjentów chorych na mukowiscydozę, białaczkę i inne nowotwory.

III.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 12 (StatSoft INC., USA). Testy wykonywano przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Normalność rozkładu zmiennych zbadano przy użyciu testu Shapiro Wilka. Korelacje badano testem Pearson'a oraz Spearmana. Do badania różnic między grupami wykorzystano test Manna-Whitney'a.

Tabela 16. Charakterystyka grupy badanej—dzieci

numer pacjenta	inicjały	pleć	wiek	masa ciała [kg]	wzrost [cm]	rozpoznanie
1	C.G.	k	7	35/32/33*	124	ciężka anemia aplastyczna, stan po allo-HSCT, podejrzenie grzybiczy płuc
2	D.N.	k	13	27	144	DLBCL, zespół Nijmegen, podejrzenie aspergilozy płuc
3	G.W.	k	12	32	149	mukowiscydoza, inwazyjna aspergiloza płuc,refluks żołądkowo-przetykowy
4	G.W.	m	5	15	106	AML, stan po allo-HSCT
5	G.W.	m	6	19,5	117	medulloblastoma mózdzku, aspergiloza płuc
6	G.K.	k	15	32	148	AML, stan po allo-HSCT, aspergiloza płuc
7	J.K.	m	16	39,5	165	stan po HAPLO-HSCT, GvHD postać skóra, aspergiloza płuc
8	K.P.	m	11	29/34*	150	ALL , podejrzenie grzybiczy płuc, stan po ALLO-HSCT
9	K.S.	m	6	17	108	ALL , podejrzenie grzybiczy płuc, stan po ALLO-HSCT
10	K.K.	m	13	38	150	wznowa AML, stan po allo-HSCT, grzybica płuc
11	Ł.M.	m	14	60	154	wznowa AML (mózgowo-szpikowa), grzybica płuc
12	Ł.J.	k	17	40	161	mukowiscydoza, inwazyjna aspergiloza płuc
13	M.O.	m	16	45	167	wznowa AML, stan po allo-HSCT, grzybica płuc
14	O.K.	m	13	27	157	AML, stan po allo-HSCT, fusarioza
15	P.W.	m	14	38	159	mukowiscydoza, inwazyjna aspergiloza płuc
16	R.M	k	2	14	92	AML, stan po allo-HSCT, przewencja p/grzybicza
17	S.J.	m	14	39	168	ALL , podejrzenie grzybiczy płuc, stan po ALLO-HSCT
18	S.K.	k	15	42	168	ALL , podejrzenie grzybiczy płuc, stan po ALLO-HSCT
19	S.K.	m	16	51	172	ALL , stan po ALLO-HSCT, aspergiloza płuc
20	T.K.	m	2	15,5	98	AML, stan po allo-HSCT, aspergiloza płuc
21	T.K.	m	14	52/53*	171	ALL , stan po ALLO-HSCT, aspergiloza płuc
22	W.B.	m	12	28/24,5*	125	stan po przeszczepie serca, chłoniak limfoblastyczny T-komórkowy, aspergiloza OUN
23	S.M.	k	9	38	127	anemia aplastyczna , stan przed allo-HSCT

* zmiana masy ciała przy poszczególnych oznaczeniach

Tabela 17. Charakterystyka grupy badanej—dorośli

* zmiana masy ciała przy poszczególnych oznaczeniach						
numer pacjenta	inicjały	pleć	wiek	masa ciała [kg]	wzrost [cm]	rozpoznanie
1	J.B.	m	50	62	174	drobnokomórkowy rak płuc, grzybniaak płuca lewego
2	J.D.	m	18	70/69/65*	b./d.	wznowa AML , stan po allo-HSCT, grzybica płuc
3	J.W.	m	70	62	168	wstrząs septyczny, hepatomegalia, niewydolność krążeniowo-oddechowa
4	K.A.	m	55	67	172	AML
5	K.M.	m	69	70	b./d.	ropniak opłucnej prawej na skutek perforacji przetyku
6	K.J.	k	55	50	b./d.	AML, stan po allo-HSCT, przewencja przeciwigrybicza
7	L.B.	k	36	50	169	chłoniak limfoblastyczny, grzybica płuc
8	L.E.	k	30	46	162	grzybniaak płuca lewego nie odpowiadający na leczenie I i II rzutu, stan po dwukrotnym allo-HSCT, wznowa pozaszpikowa - mięsak szpikowy
9	M.A.	m	51	70	175	wymiana zastawki aortalnej oraz plastyka zastawki mitralnej, przebyta gruźlica, grzybniaak płuca lewego
10	N.B.	m	57	103	173	AML, stan po allo-HSCT, przewencja przeciwigrybicza
11	P.H.	k	64	50	164	AML, stan po allo-HSCT, podejrzenie grzybicy płuc
12	P.A.	m	67	79	170	wznowa AML , grzybica płuc
13	Ż.J.	m	64	60	164	samoistna odma opłucnowa , grzybica płuc (<i>A. fumigatus</i>)

Rozdział IV

Wyniki

IV.1. Wyniki poziomów worykonazolu u dzieci i dorosłych

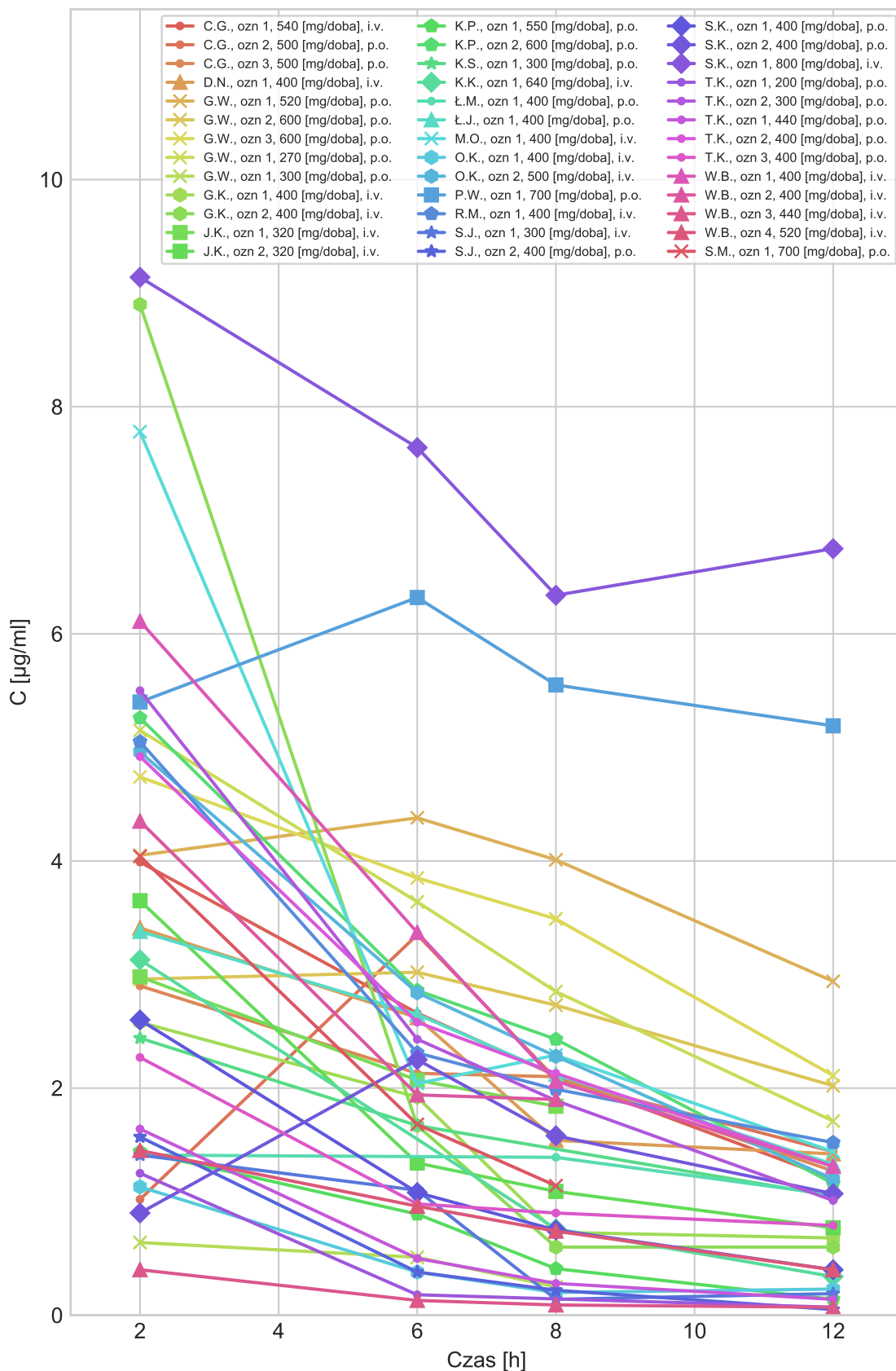
Oznaczone poziomy VCZ w osoczu 36 pacjentów zestawiono w tab. 18 i 19. Zmiany stężeń VCZ w czasie przedstawiono na ryc. 9–11 oraz w załączniku. Przykładowe chromatogramy, uzyskane podczas analizy VCZ w osoczu pacjentów metodą HPLC-FLD przedstawiono na ryc. 12–15. W tabeli 20 oraz na ryc. 16–20 przedstawiono uzyskane w wyniku analiz VCZ wyniki C_{min} , czyli stężeń oznaczonych w 12 h od podania dawki VCZ.

Tabela 18. Oznaczone poziomy worykonazolu u dzieci

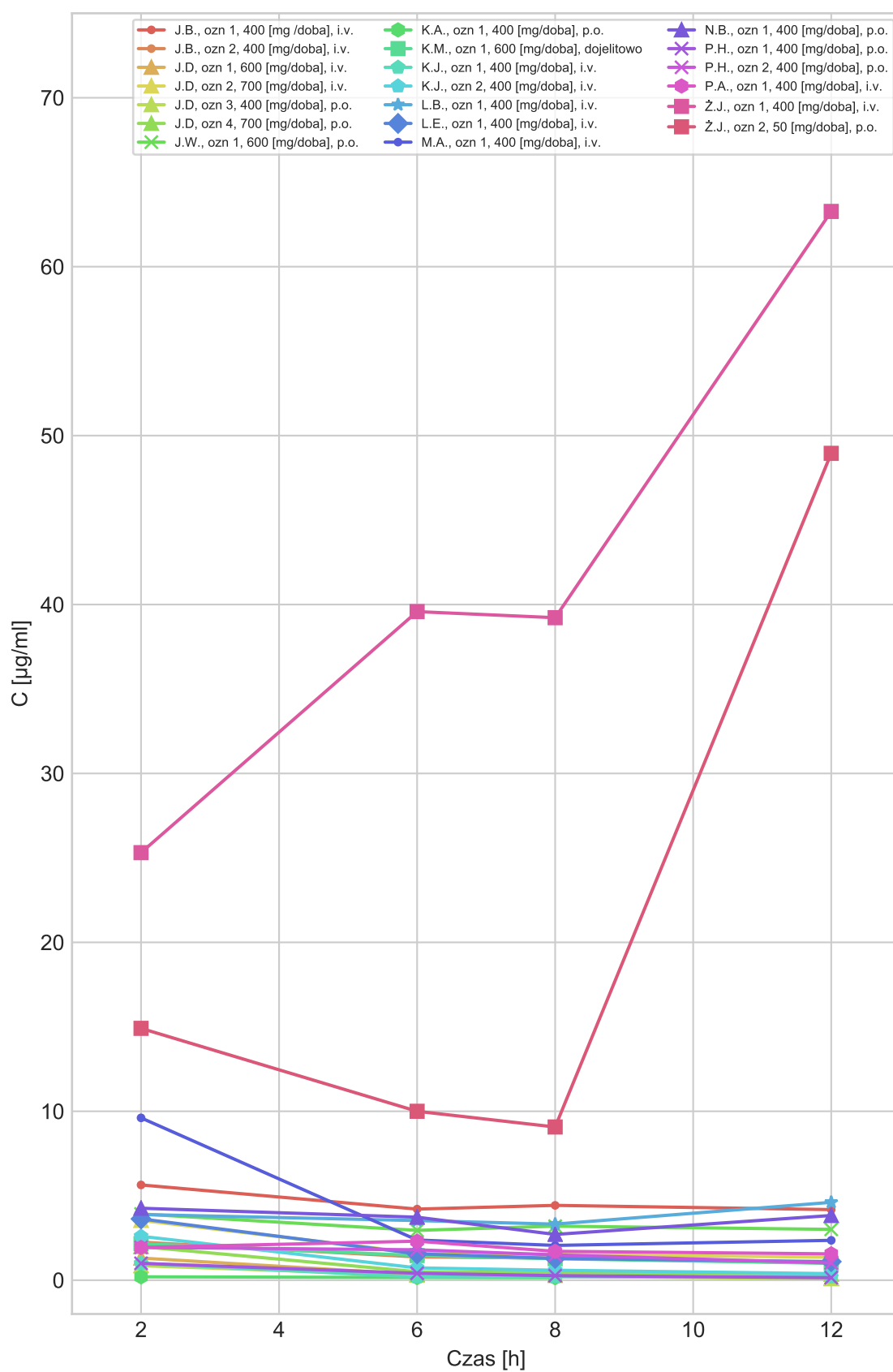
numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg]	dzień terapii	droga podania	C ₂ [μ g/ml]	C ₆ [μ g/ml]	C ₈ [μ g/ml]	C ₁₂ [μ g/ml]
1	I	540	4	i.v.	3,99	2,66	2,11	1,20
	II	500	10	p.o.	1,02	3,35	2,08	1,44
	III	500	26	p.o.	2,90	2,13	2,10	1,27
2	I	400	6	i.v.	3,41	2,62	1,54	1,42
	I	520	6	p.o.	4,05	4,38	4,01	2,94
3	II	600	10	p.o.	2,96	3,02	2,73	2,02
	III	600	180	p.o.	4,74	3,85	3,49	2,11
	I	270	6	p.o.	5,15	3,64	2,85	1,71
5	I	300	6	p.o.	0,64	0,51	0,25	b.d.
	I	400	6	i.v.	2,58	1,92	0,73	0,68
6	II	400	12	i.v.	8,90	1,67	0,60	0,60
	I	320	6	i.v.	2,98	2,07	1,84	b.d.
8	II	320	14	i.v.	3,65	1,34	1,09	0,77
	I	550	5	p.o.	1,44	0,89	0,41	0,14
9	II	600	48	p.o.	5,26	2,86	2,43	1,16
	I	280	6	p.o.	2,44	1,67	b.d.	1,05
10	I	640	6	i.v.	3,13	b.d.	0,76	0,34
	I	500	6	p.o.	1,41	b.d.	1,39	1,06
12	I	400	15	p.o.	3,38	2,65	2,12	1,33
	I	400	6	i.v.	7,78	2,04	2,29	1,44
14	I	400	6	i.v.	1,13	0,38	0,20	0,23
	II	500	27	i.v.	4,96	2,84	2,28	1,20
15	I	700	23	p.o.	5,40	6,32	5,55	5,19
	I	180	10	i.v.	5,05	2,31	1,99	1,52
17	I	300	26	i.v.	1,41	1,10	0,14	0,19
	II	400	38	p.o.	1,57	0,38	0,22	0,05
18	I	400	10	p.o.	2,60	1,08	0,75	0,40
	II	400	31	p.o.	0,90	2,25	1,58	1,07
19	I	800	6	i.v.	9,14	7,64	6,34	6,75
	I	200	8	p.o.	1,25	0,18	b.d.	0,07
21	II	300	6	p.o.	5,50	2,43	1,89	1,01
	I	440	6	p.o.	1,64	0,50	0,28	0,14
22	II	400	10	p.o.	4,92	2,58	2,13	1,31
	III	400	79	p.o.	2,27	0,98	0,90	0,79
22	I	400	6	i.v.	6,11	3,37	2,06	1,31
	II	400	14	i.v.	4,35	1,94	1,90	b.d.
23	III	440	6	i.v.	0,40	0,13	0,09	0,07
	IV	520	22	i.v.	1,45	0,96	0,74	0,40
23	I	700	7	p.o.	4,04	1,68	1,14	b.d.

Tabela 19. Oznaczone poziomy worykonazolu u dorosłych

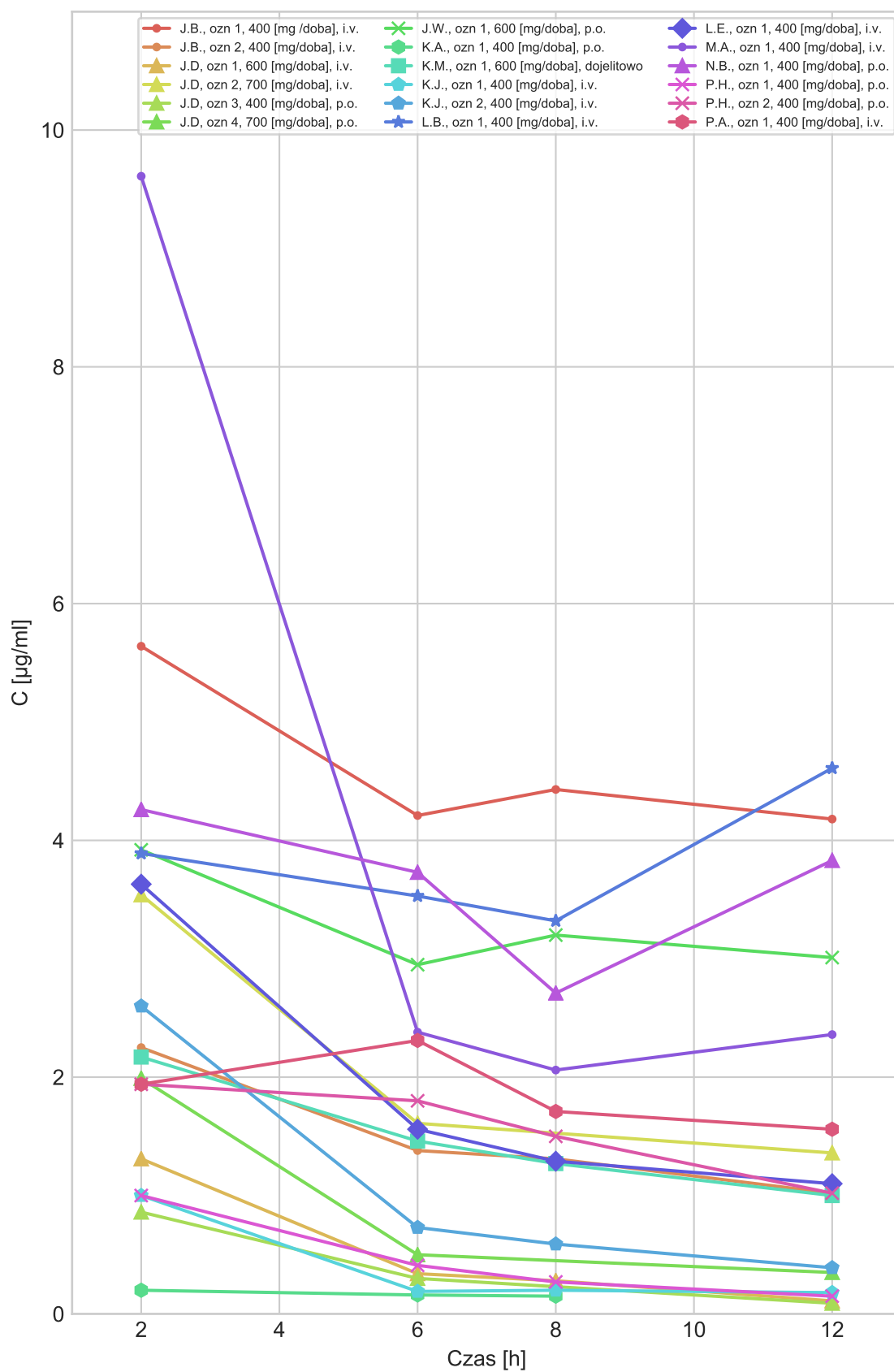
numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg]	dzień terapii	droga podania	C ₂ [μ g/ml]	C ₆ [μ g/ml]	C ₈ [μ g/ml]	C ₁₂ [μ g/ml]
1	I	400	8	i.v.	5,64	4,21	4,43	4,18
2	II	400	55	i.v.	2,25	1,38	1,31	1,02
	I	600	6	i.v.	1,31	0,34	0,28	0,11
3	II	700	30	i.v.	3,54	1,61	b.d.	1,36
	III	400	12	p.o.	0,86	0,30	b.d.	0,09
	IV	700	9	p.o.	1,99	0,50	b.d.	0,35
	I	600	9	p.o.	3,92	2,95	3,20	3,01
4	I	400	5	p.o.	0,20	0,16	0,15	b.d.
5	I	600	29	dojelitowo	2,17	1,46	1,27	1,00
6	I	400	6	i.v.	1,00	0,19	0,20	0,18
7	II	400	12	i.v.	2,60	0,73	0,59	0,39
	I	400	11	i.v.	3,89	3,53	3,32	4,61
8	I	400	40	i.v.	3,63	1,56	1,29	1,10
9	I	400	19	i.v.	9,61	2,38	2,06	2,36
10	I	400	6	p.o.	4,26	3,73	2,71	3,83
11	I	400	8	p.o.	1,00	0,41	0,27	0,15
12	II	400	35	p.o.	1,94	1,80	1,50	1,02
	I	400	3	i.v.	1,94	2,31	1,71	1,56
13	I	400	21	i.v.	25,31	39,58	39,22	63,27
	II	50	10	p.o.	14,91	10,00	9,07	48,95



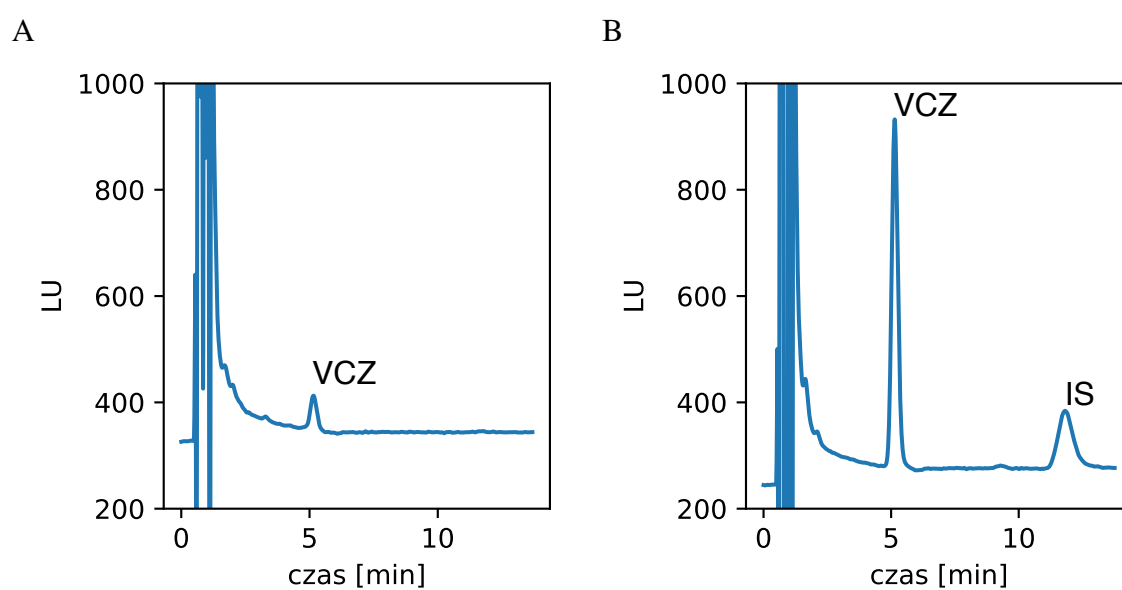
Rycina 9. Poziomy worykonazolu u dzieci



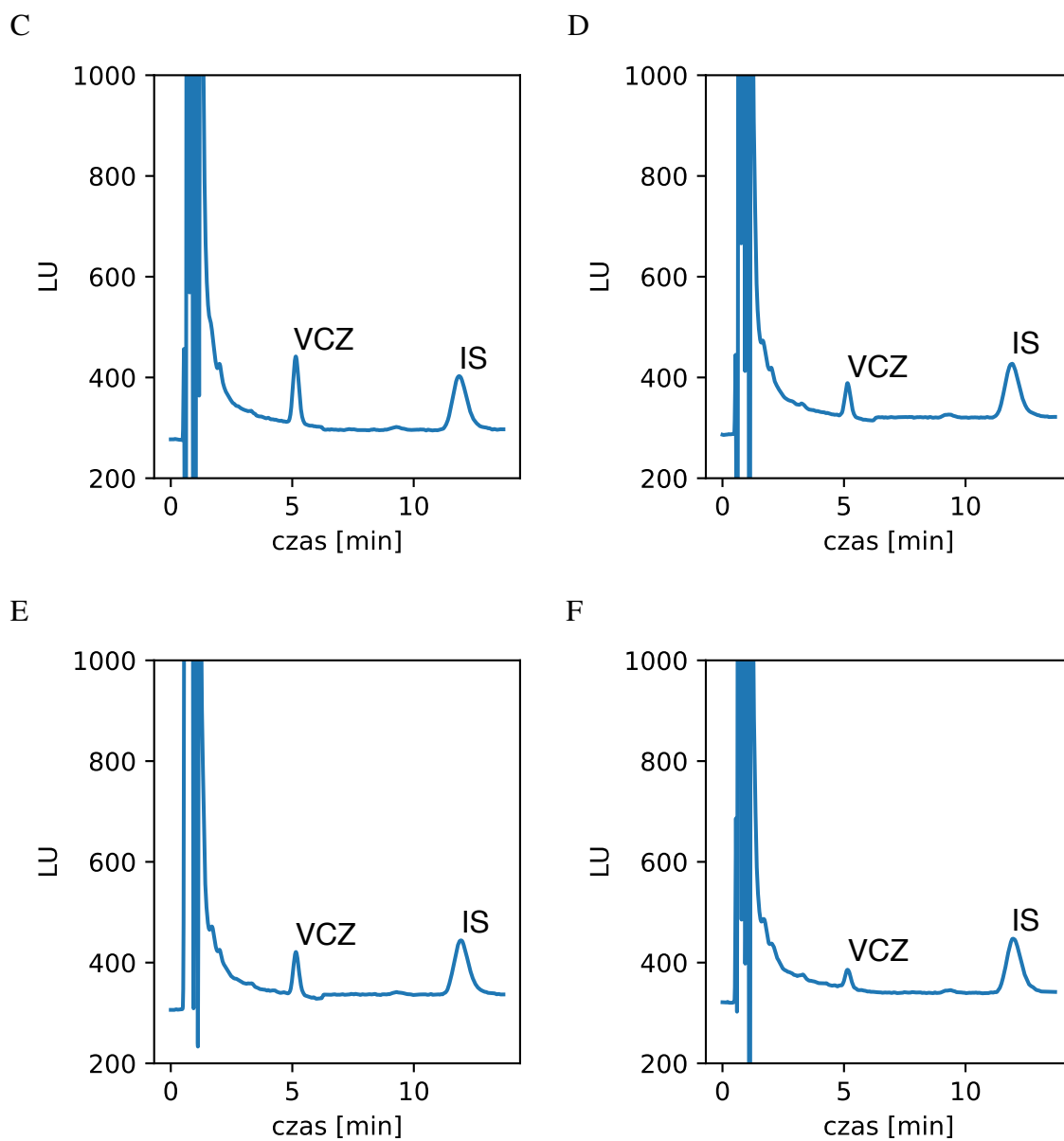
Rycina 10. Poziomy worykonazolu u dorosłych



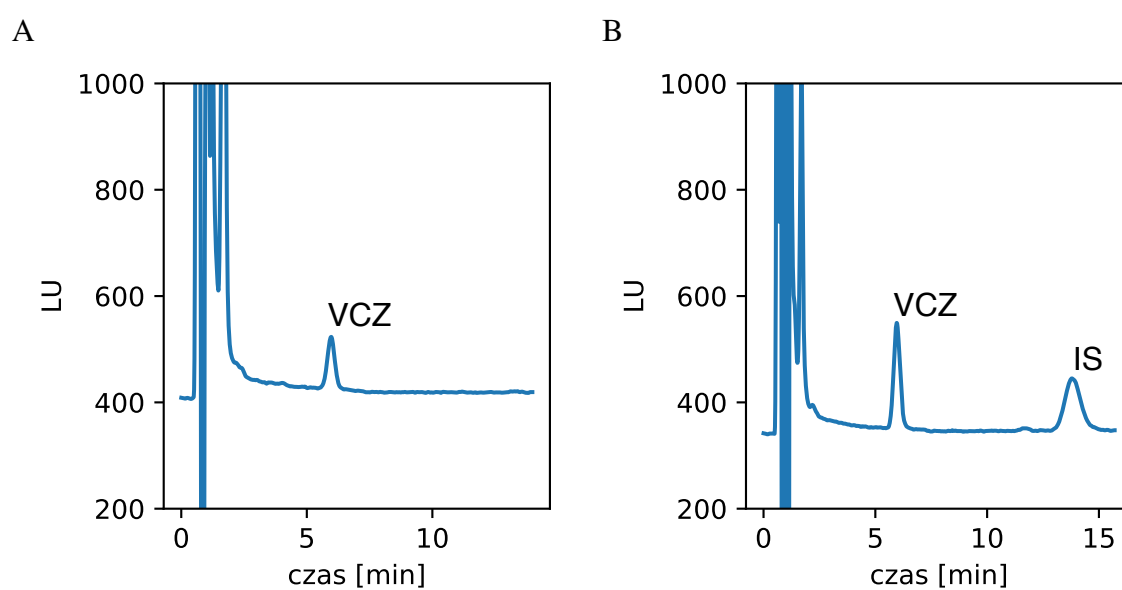
Rycina 11. Poziomy worykonazolu u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J.)



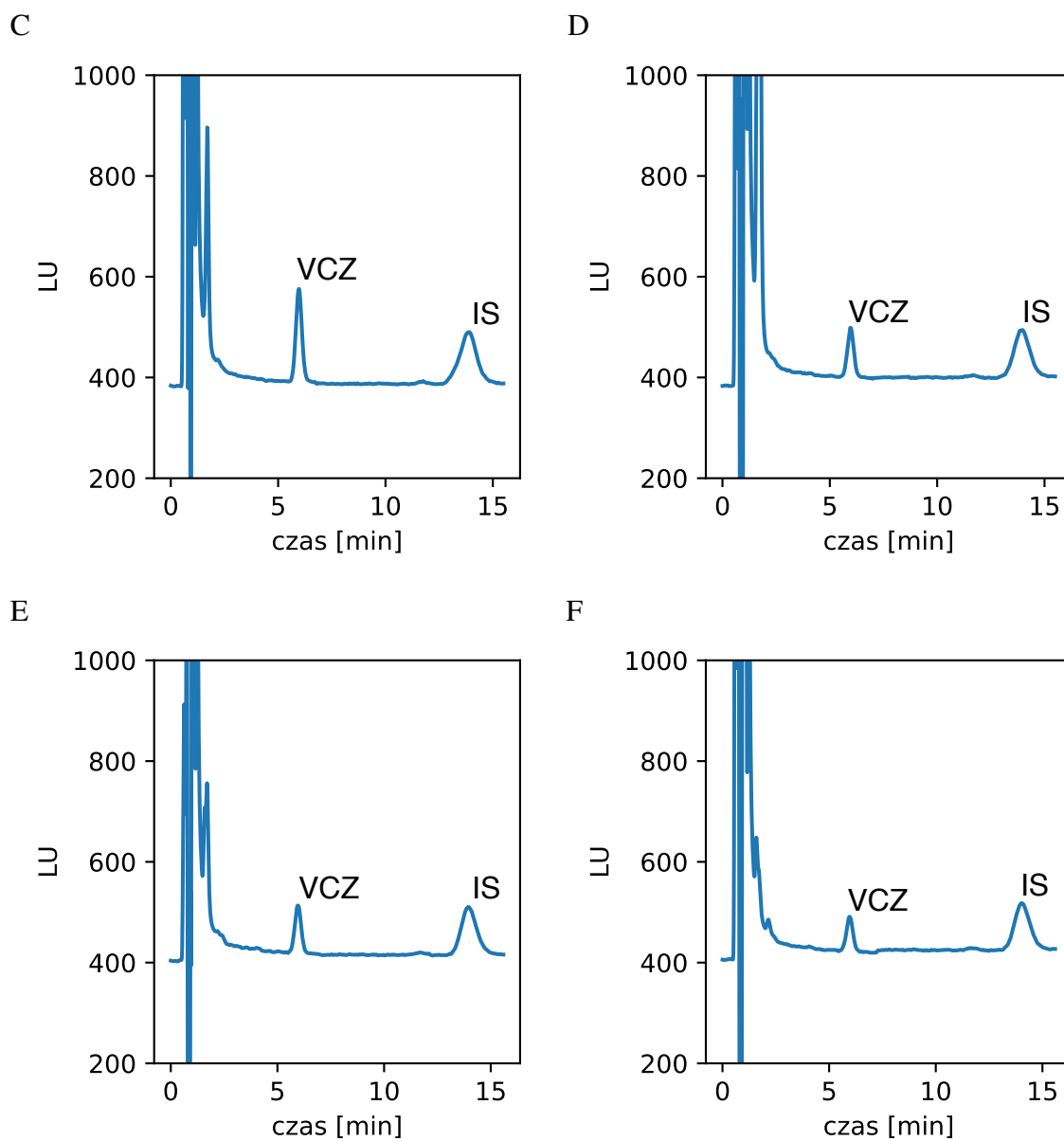
Rycina 12. Analiza próbki osocza chorego dziecka W.B. (A) w 6 h po podaniu dawki 200 mg i.v., nieobciążonej wzorcem wewnętrznym, oraz próby kontrolnej (B) o stężeniu $7,5 \mu\text{g/ml}$



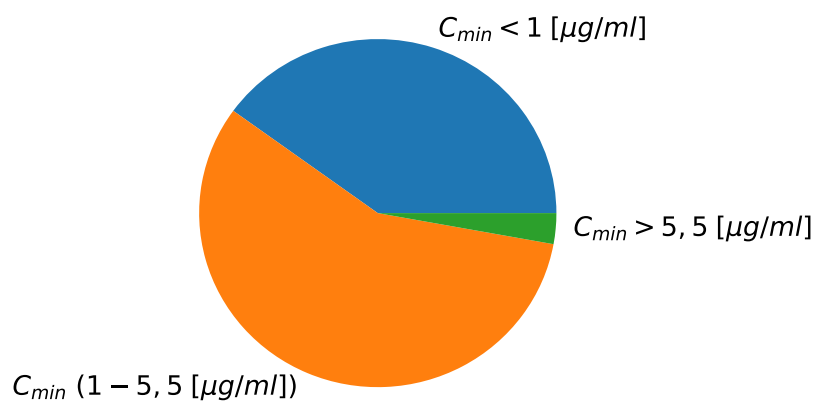
Rycina 13. Chromatogramy HPLC-FLD uzyskane podczas analizy poziomów VCZ w osoczu dziecka (W.B.) 2 h (C), 6 h (D), 8 h (E), 12 h (F) po dożylnym podaniu dawki 200 mg



Rycina 14. Analiza próbki osocza osoby dorosłej J.B. (A) w 6 h po podaniu dawki 200 mg i.v., nieobciążonej wzorcem wewnętrznym, oraz próby kontrolnej (B) o stężeniu $2,5 \mu\text{g/ml}$



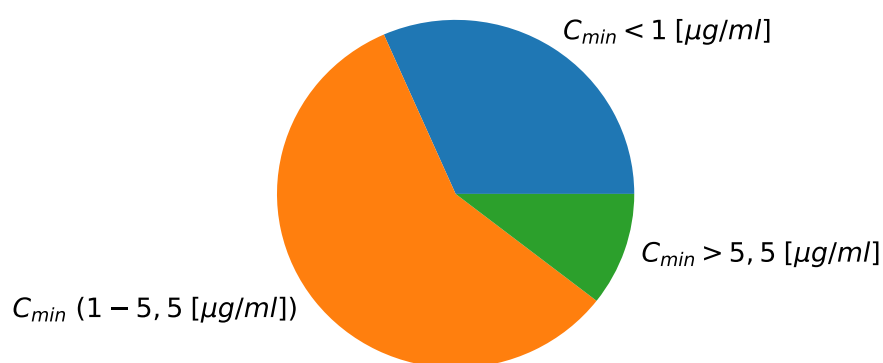
Rycina 15. Chromatogramy HPLC-FLD uzyskane podczas analizy osocza osoby dorosłej (J.B.) 2 h (C), 6 h (D), 8 h (E), 12 h (F) po dożylnym podaniu dawki 200 mg



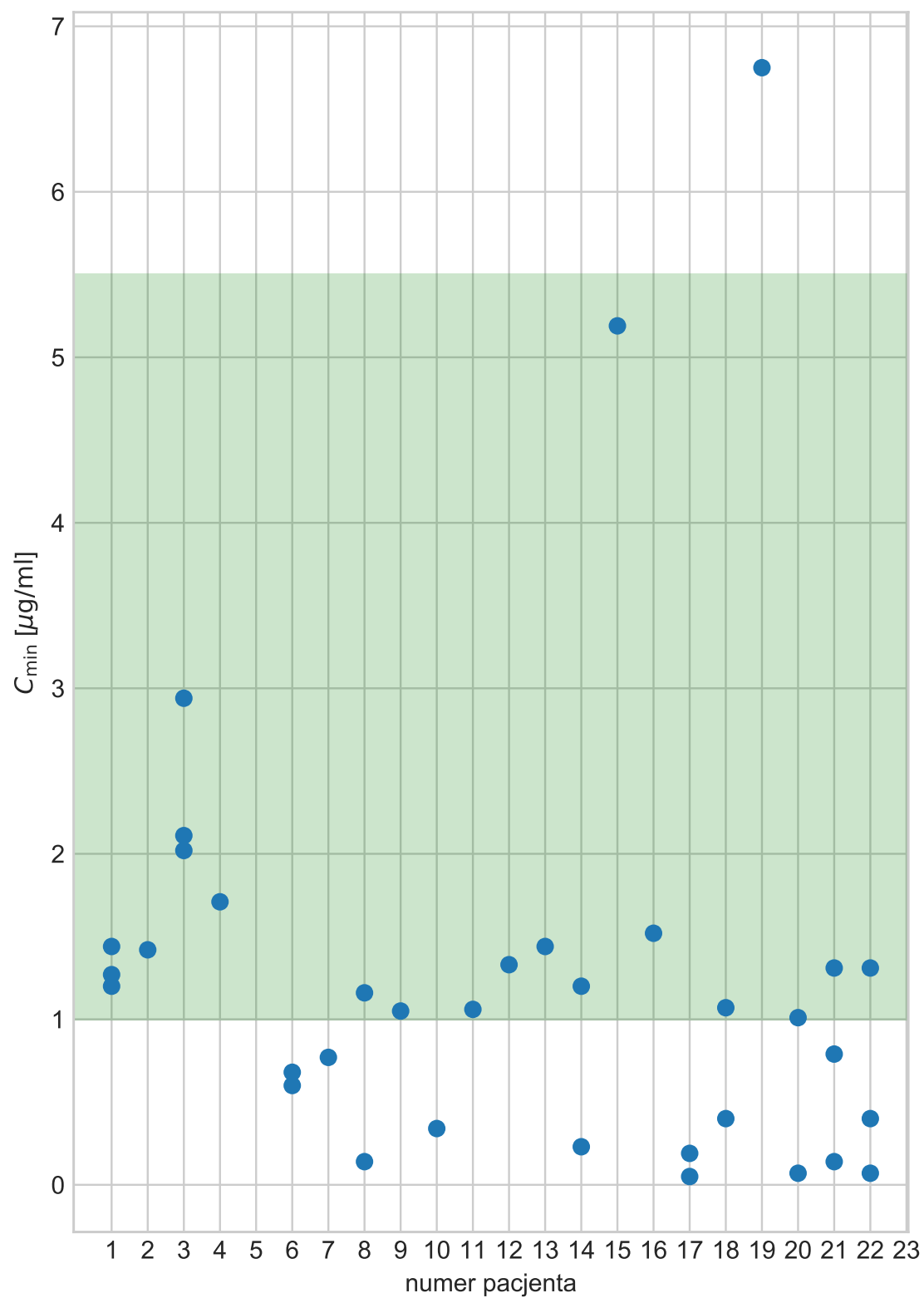
Rycina 16. Wyniki stężeń minimalnych u dzieci

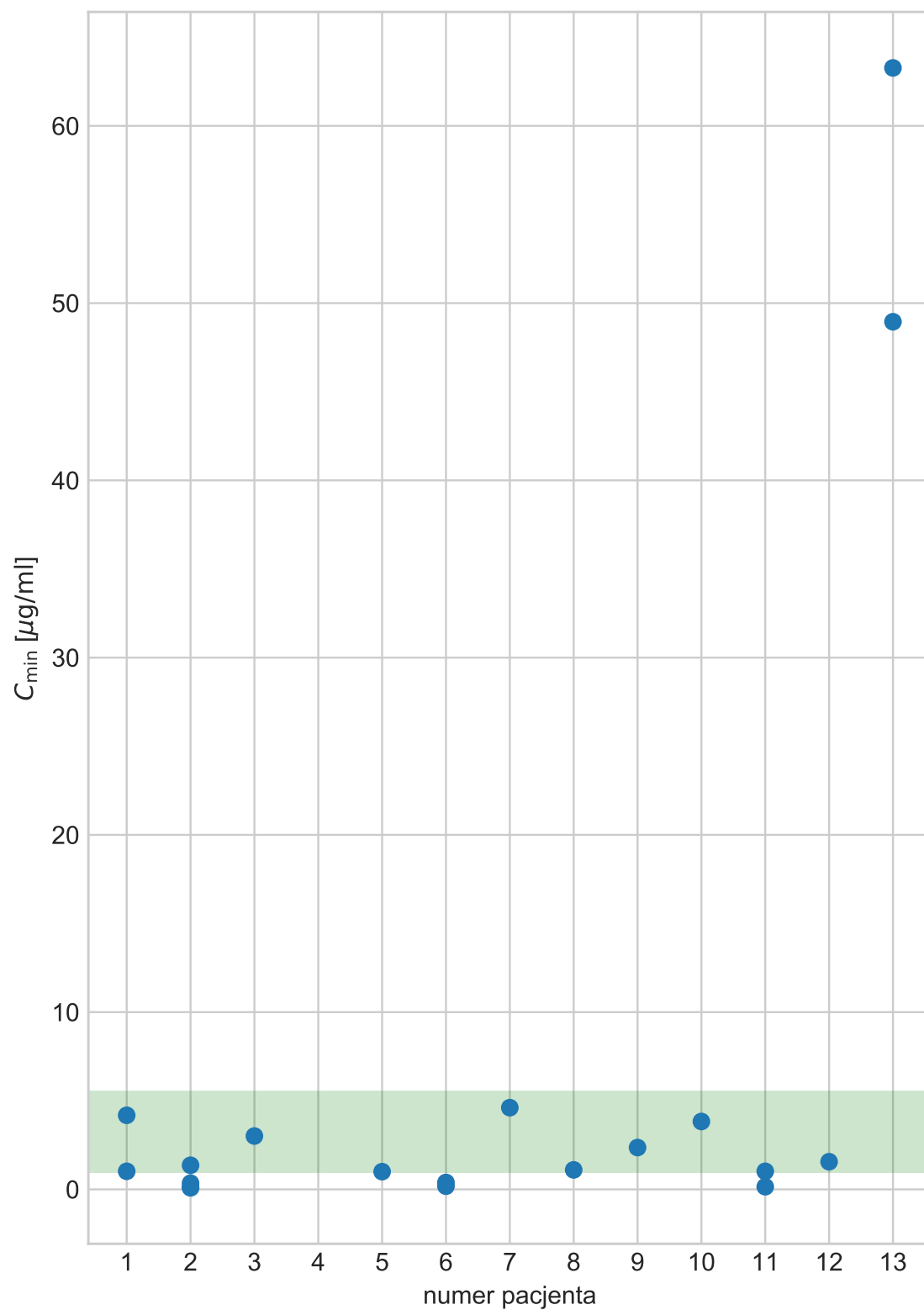
Tabela 20. Wyniki stężeń minimalnych u dzieci i dorosłych

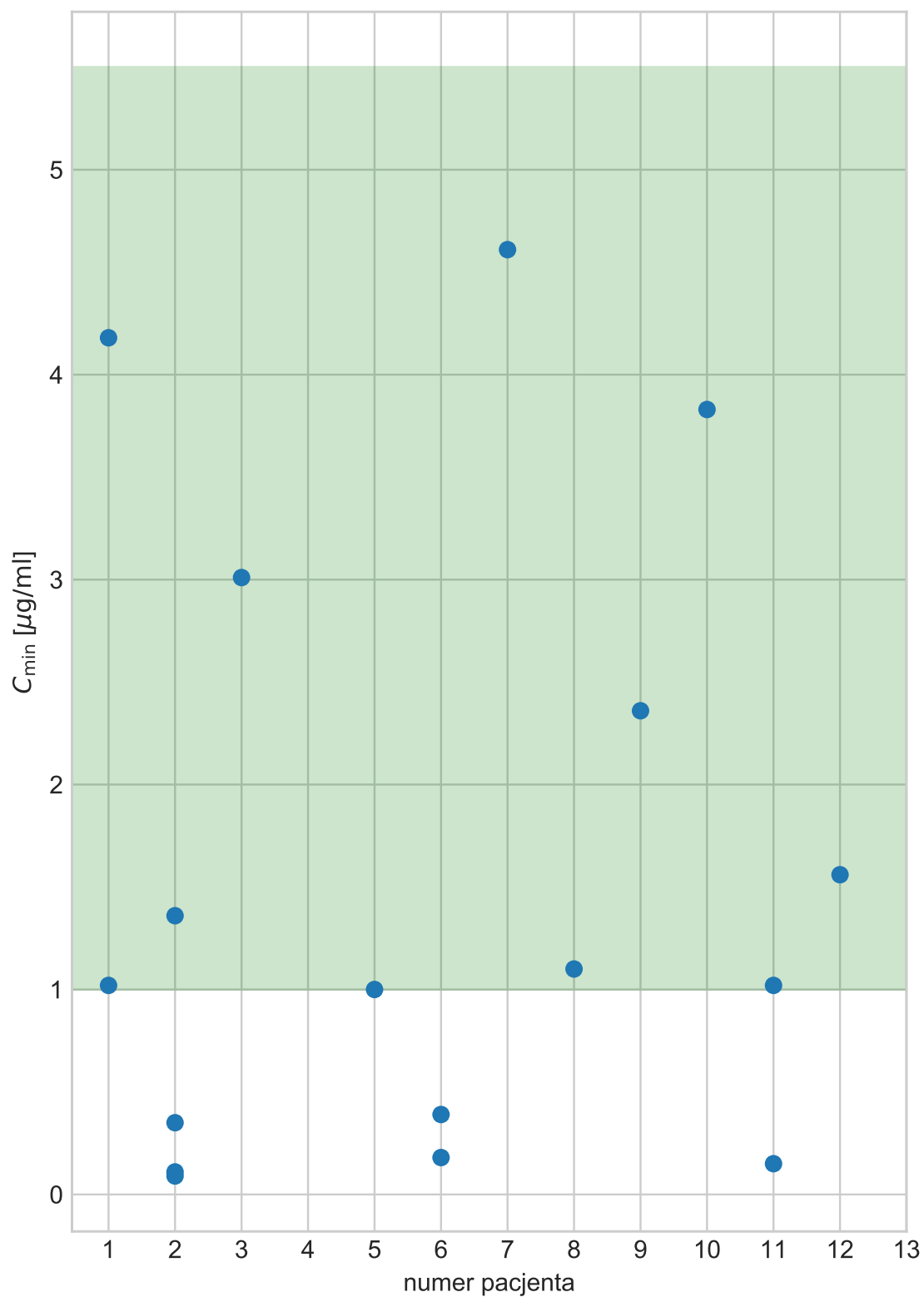
grupa badana	liczba oznaczeń	$C_{min} < 1$ [$\mu\text{g/ml}$]	$C_{min} 1-5,5$ [$\mu\text{g/ml}$]	$C_{min} > 5,5$ [$\mu\text{g/ml}$]
DZIECI	n=35	n=14 (40%)	n=20 (57,1%)	n=1 (2,9%)
DOROŚLI	n=19	n=6 (31,6%)	n=11 (57,9%)	n=2 (10,5%)



Rycina 17. Wyniki stężeń minimalnych u dorosłych

Rycina 18. Poziomy C_{min} VCZ u dzieci

Rycina 19. Poziomy C_{min} VCZ u dorosłych

Rycina 20. Poziomy C_{min} VCZ u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J)

IV.2. Parametry biochemiczne pacjentów poddawanych leczeniu

VCZ

Wyniki parametrów biochemicznych pacjentów poddawanych leczeniu VCZ zestawiono w tab. 21 i 22. Z uwagi na wątrobowy metabolizm leku podczas leczenia VCZ monitorowano próby wątrobowe pacjentów. Ponadto oceniono parametry obrazujące kondycję nerek. Zarówno u dzieci jak i dorosłych zauważalne są wysokie wyniki eGFR (obliczony współczynnik przesączania kłębuszkowego), którego norma wynosi 90–120 [$ml/min/1,73m^2$]. Wyniki te należy traktować jako fałszywie zawyżone z powodu obniżonych stężeń kreatyniny u pacjentów. Niskie poziomy kreatyniny występują u osób niedożywionych, z niską masą ciała, wyniszczonych oraz przy uszkodzeniach wątroby. Normy, do których odnoszono wyniki pacjentów wg kompendium medycyny praktycznej- choroby wewnętrzne pod redakcją A. Szczeklika (2010)[139].

- ALT (aminotransferaza alaninowa) [5–40 IU/l],
- AST (aminotransferaza asparaginianowa) [5–40 IU/l],
- stężenie kreatyniny (dorośli: [0,6–1,3 mg/dl], dzieci: [0,3–1,1 mg/dl]),
- albuminy (dzieci: [3,7–5,6 g/dl], dorośli: [3,5–5,5 g/dl]).

eGFR u dzieci obliczono za pomocą wzoru Schwartza z uwzględnieniem stałej (d) zależnej od wieku.

$$\text{SCHWARTZ: eGFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = (d^{**}) \times (\text{wzrost(cm)}) / (\text{Scr}^*)$$

* stężenie kreatyniny (mg/dl) **stała (d) :

- dzieci 2–12 lat (0,55),
- dziewczynki 13–21 lat (0,55),
- chłopcy 13–21 lat (0,70).

Do obliczeń eGFR u dorosłych wykorzystano wzór MDRD, przedstawiony poniżej:

$$\text{MDRD: eGFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 186,3 \times (\text{Scr}^*)^{-1.154} \times (\text{Wiek})^{-0.203} \times (0.742 \text{ płęć żeńska}).$$

Tabela 21. Parametry biochemiczne dzieci

numer pacjenta	pleć	wiek	numer oznaczenia	AST [IU/l]	ALT [IU/l]	albuminy [g/dl]	kreatynina [mg/dl]	eGFR [ml/min/1,73m ²]
1	k	7	I	48	24	2,6	0,57	90,0
			II	15	7	4,3	0,41	125,0
			III	16	7	4,4	0,41	125,0
2	k	13	I	66	130	3,1	0,60	99,0
3	k	12	I	23	9	3,9	0,29	282,6
			II	24	30	3,9	0,25	327,7
			III	25	18	3,7	0,41	172,0
4	m	5	I	29	35	b.d.	0,23	253,5
5	m	6	I	30	26	b.d.	b.d.	b.d.
6	k	15	I	35	23	b.d.	b.d.	b.d.
			II	26	35	b.d.	b.d.	b.d.
7	m	16	I	25	29	b.d.	0,44	262,5
			II	26	42	b.d.	0,35	330,0
8	m	11	I	10	16	3,4	0,28	294,6
			II	17	10	3,4	0,18	458,3
9	m	6	I	89	63	4,9	0,27	220,0
10	m	13	I	16	11	3,7	0,43	246,0
11	m	14	I	17	21	b.d.	0,57	190,0
12	k	17	I	19	32	3,6	0,53	168,2
13	m	16	I	23	47	b.d.	0,55	212,5
14	m	13	I	23	49	3,7	0,37	300,8
			II	52	113	3,2	0,17	646,5
15	m	14	I	47	80	3,3	0,42	154,5
16	k	2	I	25	30	b.d.	0,25	202,4
17	m	14	I	24	35	3,9	0,37	317,8
			II	16	20	3,9	0,46	255,7
18	k	15	I	100	66	4,9	0,71	130,0
			II	95	70	b.d.	0,93	96,5
19	m	16	I	b.d.	30	b.d.	1,07	112,5
20	m	2	I	16	30	b.d.	0,31	173,9
			II	19	33	b.d.	0,31	173,9
21	m	14	I	38	47	3,7	0,31	386,5
			II	34	97	b.d.	0,18	665,0
			III	16	20	3,8	0,46	260,2
22	m	12	I	78	105	b.d.	0,37	185,8
			II	b.d.	57	3,1	0,60	114,6
			III	20	18	3,8	0,66	104,2
			IV	b.d.	27	b.d.	0,62	110,9
23	k	9	I	25	37	3,85	0,38	183,8

Tabela 22. Parametry biochemiczne dorosłych

numer pacjenta	płeć	wiek	numer oznaczenia	AST [IU/l]	ALT [IU/l]	albuminy [g/dl]	kreatynina [mg/dl]	eGFR [ml/min/1,73m ²]
1	m	50	I	b.d.	9	2,4	0,72	123
2	m	18	II	27	55	3,1	0,34	292
			I	44	116	b.d.	0,94	111
			II	103	117	3,9	0,94	111
			III	25	38	b.d.	0,55	206
3	m	70	IV	29	38	3,8	0,45	260
			I	b.d.	45	b.d.	0,38	240
			I	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
			I	b.d.	50	2,0	0,48	184
4	m	55	I	34	46	b.d.	0,37	193
			II	34	38	4,3	0,43	162
5	m	69	I	15	21	17,1	0,34	230
			I	b.d.	38	3,2	0,32	258
6	k	55	I	20	40	b.d.	0,37	264
			I	15	36	4,1	0,41	229
7	k	36	I	b.d.	26	3,6	0,29	248
			II	b.d.	24	3,6	0,29	248
8	k	30	I	12	32	b.d.	0,40	228
			I	b.d.	b.d.	3,0	0,62	139
9	m	51	I	12	32	b.d.	0,40	228
			I	b.d.	b.d.	3,0	0,62	139
10	m	57	I	12	32	b.d.	0,40	228
			I	b.d.	b.d.	3,0	0,62	139
11	k	64	I	12	32	b.d.	0,40	228
			II	b.d.	40	3,0	0,60	144
12	m	67	I	12	32	b.d.	0,40	228
			I	b.d.	b.d.	3,0	0,62	139
13	m	64	I	12	32	b.d.	0,40	228
			II	b.d.	40	3,0	0,60	144

IV.3. Parametry farmakokinetyczne

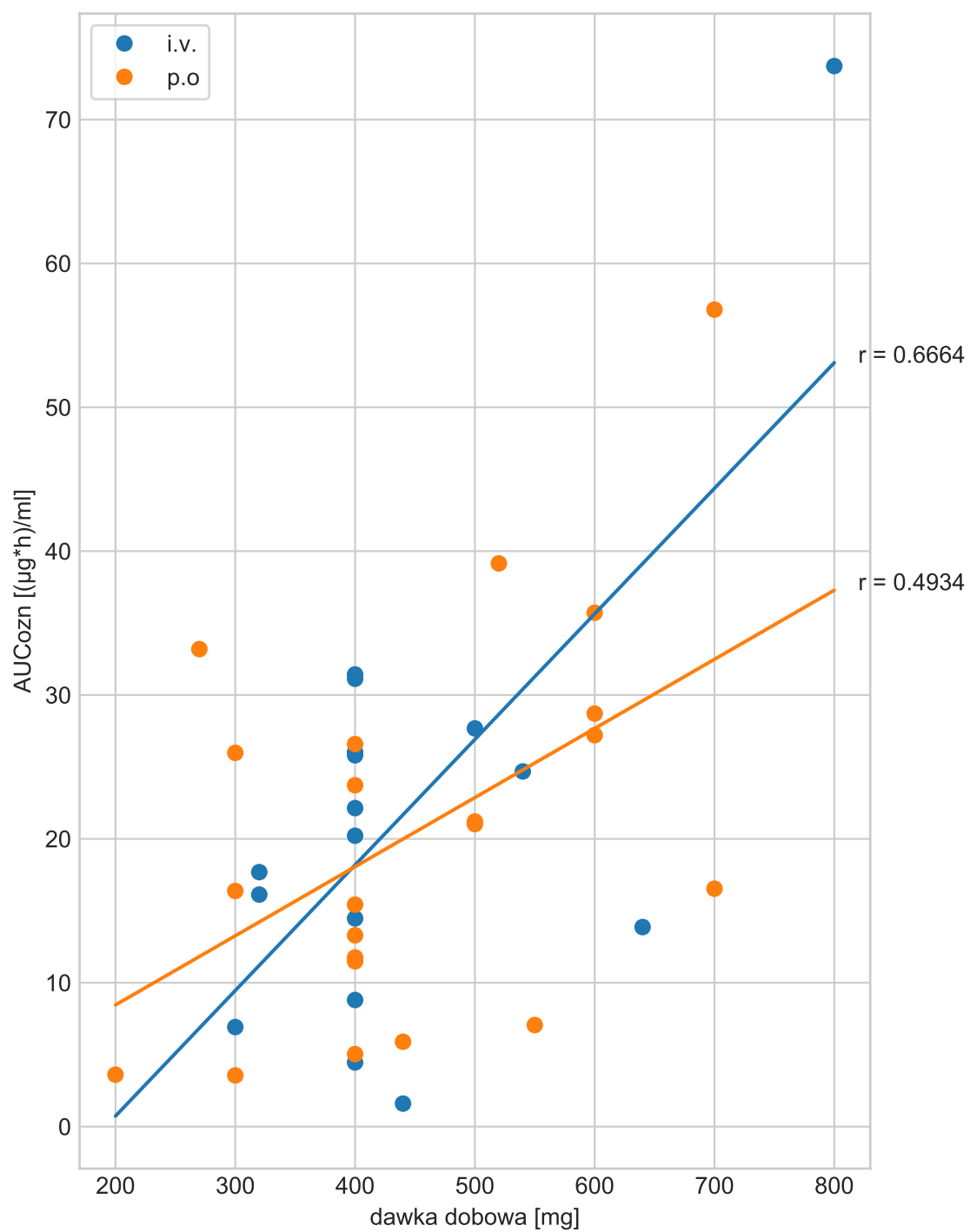
Parametry farmakokinetyczne AUC_{ozn} , k_{el} oraz $t_{0,5}$ wyznaczone na podstawie oznaczonych stężeń VCZ w osoczu pacjentów zestawiono w tab. 23 i 24. Na ryc. 21–25 przedstawiono zależność parametru AUC_{ozn} oraz $t_{0,5}$ od przyjmowanej dawki dobowej VCZ.

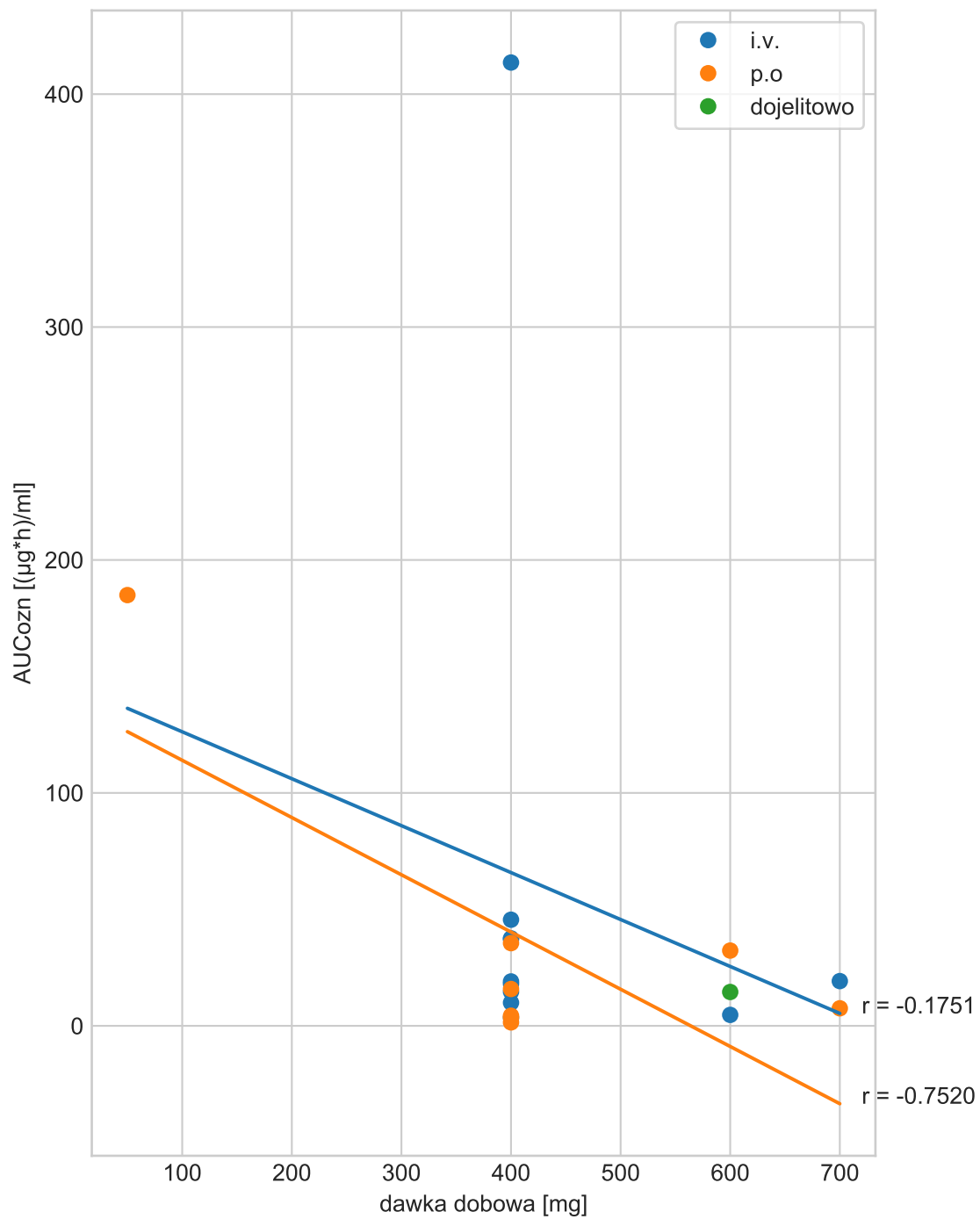
Tabela 23. Obliczone parametry farmakokinetyczne AUC_{ozn} , k_{el} oraz $t_{0,5}$ u dzieci

numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg]	AUC_{ozn} [$(\mu g * h)/ml$]	k_{el} [1/h]	$t_{0,5}$ [h]
1	I	540	24,69	0,1339	5,18
	II	500	21,21	0,1337	5,18
	III	500	21,03	0,0797	8,70
2	I	400	22,14	0,0945	7,33
3	I	520	39,15	0,0680	10,19
	II	600	27,21	0,0682	10,16
	III	600	35,72	0,1039	6,67
4	I	270	33,19	0,1262	5,49
5	I	300	3,56	0,1424	4,87
6	I	400	14,47	0,1468	4,72
	II	400	25,81	0,4450	1,56
7	I	320	17,69	0,0713	9,72
	II	320	16,13	0,0916	7,57
8	I	550	7,06	0,3026	2,29
	II	600	28,71	0,1485	4,67
9	I	280	16,38	0,0838	8,27
10	I	640	13,87	0,2231	3,11
11	I	500	13,30	0,0265	26,15
12	I	400	23,73	0,1151	6,02
13	I	400	31,43	0,1600	4,33
14	I	400	4,46	0,2863	2,42
	II	500	27,68	0,1460	4,75
15	I	700	56,79	0,0305	22,72
16	I	180	26,04	0,0694	9,99
17	I	300	6,92	0,2324	2,98
	II	400	5,04	0,3426	2,02
18	I	400	11,49	0,1643	4,22
	II	400	15,43	0,1201	5,77
19	I	800	73,72	0,0587	11,81
20	I	200	3,61	0,2779	2,49
	II	300	25,98	0,1478	4,69
21	I	440	5,90	0,2066	3,35
	II	400	26,59	0,1142	6,07
	III	400	11,76	0,1031	6,72
22	I	400	31,13	0,1512	4,58
	II	400	20,22	0,1472	4,71
	III	440	1,60	0,1747	3,97
	IV	520	8,80	0,1470	4,71
23	I	700	16,54	0,2121	3,27

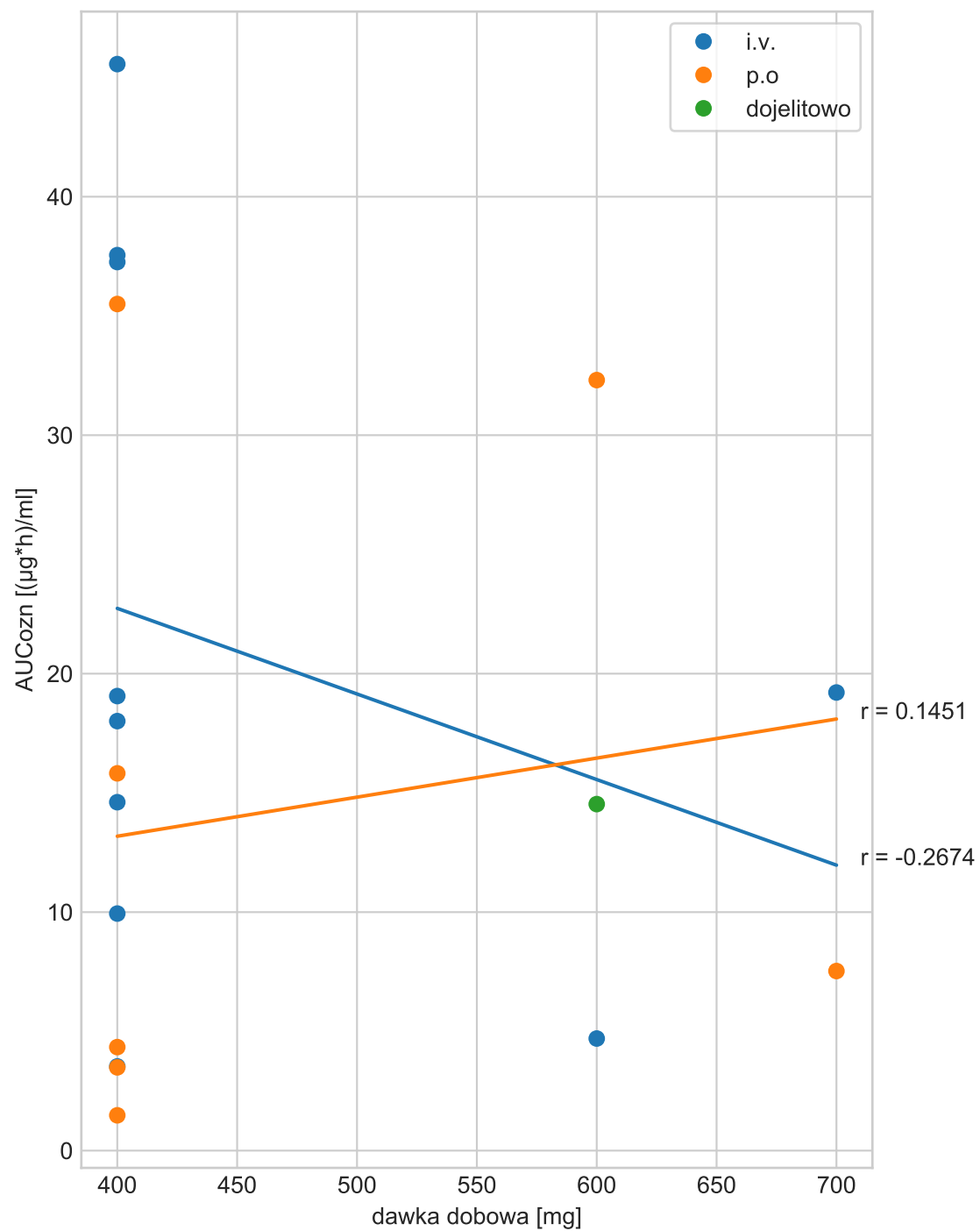
Tabela 24. Obliczone parametry farmakokinetyczne AUC_{ozn} , $t_{0,5}$ oraz k_{el} u dorosłych

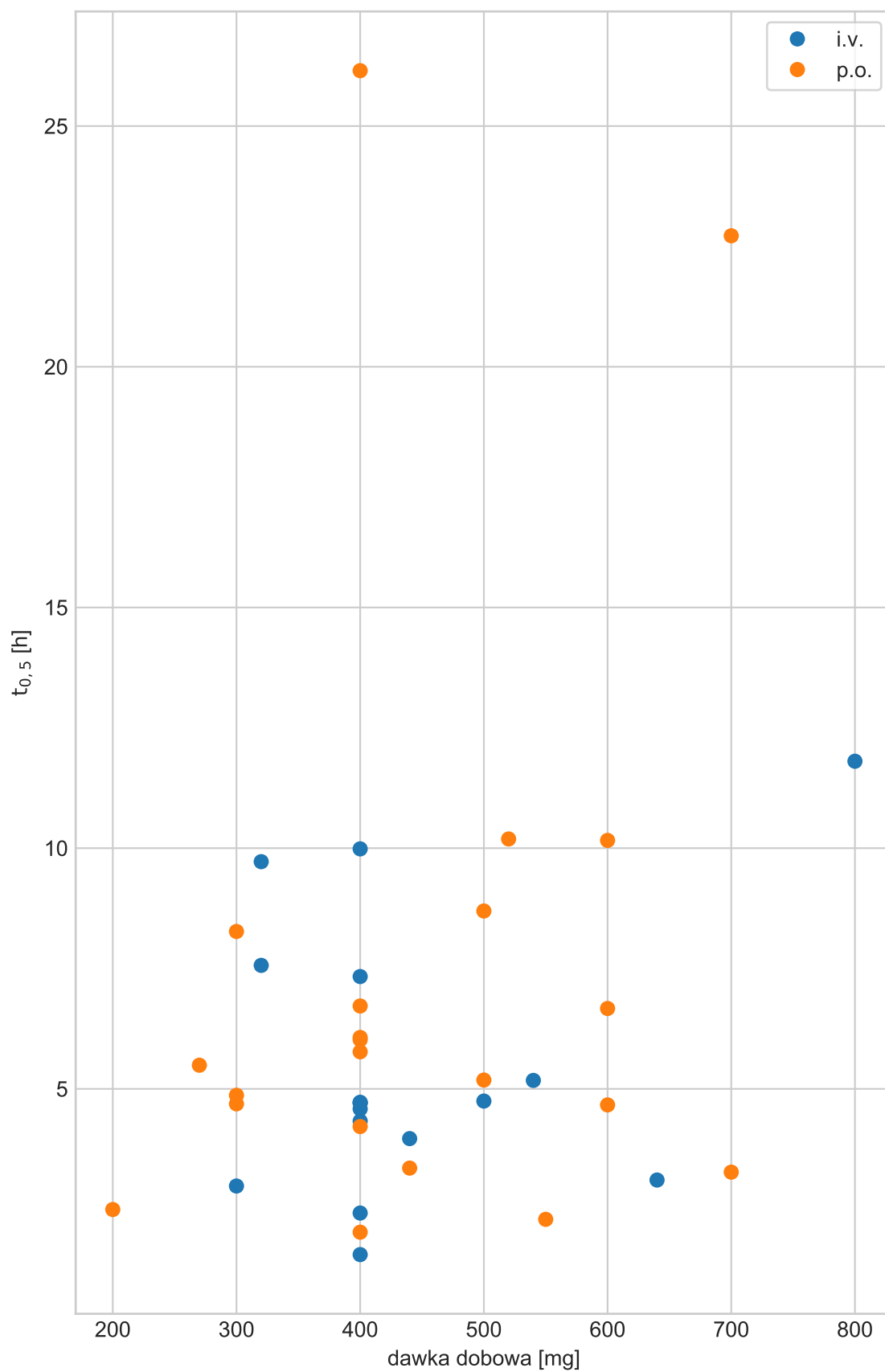
numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg]	AUC_{ozn} [$h * \mu g/ml$]	k_{el} [1/h]	$t_{0,5}$ [h]
1	I	400	45,56	0,0449	15,43
	II	400	14,61	0,0521	13,30
2	I	600	4,70	0,1946	3,56
	II	700	19,21	0,0903	7,67
	III	400	3,49	0,2237	3,10
	IV	700	7,53	0,1648	4,21
3	I	600	32,31	0,0391	17,72
4	I	400	1,48	0,0491	14,11
5	I	600	14,53	0,0626	11,07
6	I	400	3,53	0,2892	2,40
	II	400	9,94	0,1043	6,64
7	I	400	37,55	0,0499	13,89
8	I	400	18,01	0,0556	12,46
9	I	400	37,26	0,2699	2,57
10	I	400	35,50	0,0694	9,99
11	I	400	4,34	0,1646	4,21
	II	400	15,82	0,0949	7,30
12	I	400	19,06	0,0594	11,67
13	I	400	413,56	0,0841	8,24
	II	50	184,93	0,2871	2,41

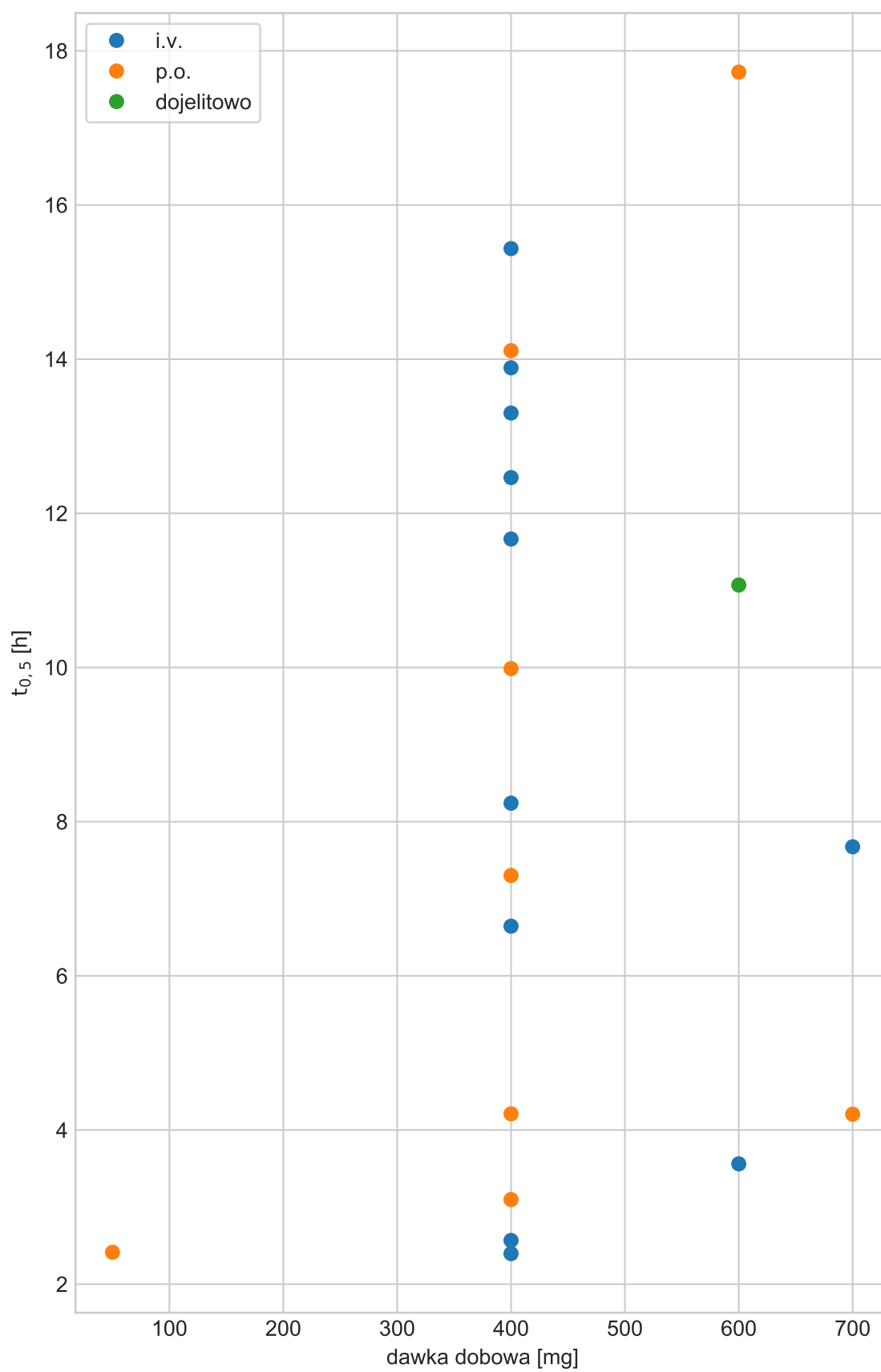
Rycina 21. Zależność AUC_{0zn} od dawki dobowej VCZ u dzieci



Rycina 22. Zależność AUC_{0zn} od dawki dobowej VCZ u dorosłych

Rycina 23. Zależność AUC_{0zn} od dawki dobowej VCZ u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J.)

Rycina 24. Zależność $t_{0,5}$ od dawki dobowej VCZ u dzieci

Rycina 25. Zależność $t_{0,5}$ od dawki dobowej VCZ u dorosłych

IV.4. Leki stosowane w terapii chorych

Leki przyjmowane przez pacjentów wyróżniono w tab. 25 i 26. Zestawione leki analizowano również pod kątem potencjalnych interakcji, mogących wpływać na efekt farmakodynamiczny jak i farmakokinetyczny. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 25: Leki przyjmowane wraz z VCZ u dzieci

nr pacjenta	oznaczenie	substancja czynna
1	I	cyklosporyna, gancyklowir, kloksacylina, wankomycyna, tramadol
	II	cyklosporyna, gancyklowir, cefepim, kloksacylina
	III	cyklosporyna, kloksacylina
2	I	meropenem, omeprazol
3	I	dornaza alfa, meropenem, amikacyna, metylprednizolon, salbutamol, budesonid
	II	dornaza alfa, meropenem, metylprednizolon, salbutamol
	III	dornaza alfa, meropenem, kloksacylina, salmeterol, salbutamol
4	I	cyklosporyna, gancyklowir, piperacylina + tazobaktam, doksycyklina, azytromycyna
5	I	cyklosporyna, gancyklowir, piperacylina + tazobaktam, klindamycyna
6	I	cyklosporyna, gancyklowir, meropenem, fitomenadion
	II	b.d.
7	I	acyklowir, ciprofloksacyna, kolistyna, deferazyroks
	II	metylprednizolon, omeprazol, kolistyna, deferazyroks
8	I	cyklosporyna, gancyklowir, wankomycyna, piperacylina + tazobaktam
	II	cyklosporyna, mykafungina, meropenem, ranitydyna, sertralina, walproinian sodu

9	I	meropenem, teikoplanina, filgrastym, omeprazol
10	I	cyklosporyna, acyklowir, oseltamiwir, amfoterycyna B, omeprazol
11	I	sulfometoksazol + trimetoprim, ornityna, neomycyna, losartan
12	I	metylprednizolon, esomeprazol, acetylocysteina, etynyloestradiol + drospirenon
13	I	mykofenolan mofetylu, kaspofungina, teikoplanina
14	I	amfoterycyna B, meropenem, esomeprazol, paracetamol, metylprednizolon, chlorprotyksen, propranolol
	II	j.w.
15	I	meropenem, kolistyna, amikacyna, klarytromycyna, salbutamol, flutykazon, dornaza alfa
16	I	amfoterycyna B, gancyklowir, piperacylina + tazobaktam
17	I	cyklosporyna, gancyklowir
	II	wankomycyna, piperacylina + tazobaktam, cyklosporyna, gancyklowir
18	I	cyklosporyna, rifaksymina, meropenem, amfoterycyna B
	II	cyklosporyna, acyklowir, amfoterycyna B, cefepim
19	I	acyklowir, amikacyna, ceftazydym
20	I	b.d.
	II	b.d.
21	I	cyklosporyna, gancyklowir, amfoterycyna B, piperacylina + tazobaktam, sulfometoksazol + trimetoprim, omeprazol
	II	cyklosporyna, gancyklowir, meropenem, teikoplanina, defibrotyd
	III	cyklosporyna, gancyklowir, meropenem, metylprednisolon
22	I	cyklosporyna, mykafungina, wankomycyna, meropenem, kaptopryl, amlodypina, furosemid
	II	cyklosporyna, meropenem, amlodypina, kaptopryl

	III	sirolimus, ceftriakson, metotreksat, cytarabina, linezolid, walproinian sodu, karbamazepina,
	IV	sirolimus, meropenem, amlodypina, karbamazepina, walproinian sodu, furosemid
23	I	piperacylina + tazobaktam, sulfometoksazol + trimetoprim, acyklowir, ornityna, etamsylat,

Tabela 26: Leki przyjmowane wraz z VCZ u dorosłych

nr pacjenta	oznaczenie	substancja czynna
1	I	doksycyklina, meropenem, sulfometoksazol + trimetoprim
	II	amfoterycyna B, meropenem, kolistyna, levofloksacyna
2	I	mykofenolan mofetylu, walgancyklowir, amlodypina
	II	mykofenolan mofetylu, gancyklowir, meropenem, ciprofloksacyna, defibrotyd
	III	mykofenolan mofetylu, gancyklowir, meropenem, ciprofloksacyna, defibrotyd
	IV	gancyklowir, teikoplanina, kanrenonian potasu, amlodypina
3	I	meropenem, norepinefryna, dobutamina
4	I	b.d.
5	I	wankomycyna, esomeprazol
6	I	cyklosporyna, acyklowir, lewofloksacyna
	II	cyklosporyna, gancyklowir, penicylina fenoksymetylowa
7	I	acyklowir, pantoprazol, walproinian sodu, lewotyroksyna
8	I	cyklosporyna, gancyklowir, amfoterycyna B, meropenem
9	I	meropenem, furosemid
10	I	acyklowir, wankomycyna, meropenem, omeprazol, heparyna
11	I	cyklosporyna, acyklowir, ciprofloksacyna
	II	cyklosporyna, acyklowir, amlodypina
12	I	sulfometoksazol + trimetoprim, bisoprolol, folinian wapnia, ramipryl
13	I	metotreksat, werapamil, salbutamol, zolpidem, ipratropium, acetylocysteina, digoksyna, teofilina, amiodaron, tramadol
	II	metotrexat, gentamycyna, ceftazydym, levonoradrenalina

Tabela 27. Potencjalne interakcje leków stosowanych z VCZ u badanych pacjentów

leki stosowane z VCZ	mechanizm interakcji	efekt interakcji
amlodypina, amiodaron, budesonid, cyklosporyna, flutykazon, esmeprazol, etynyloestradiol, esmeprazol, losartan, metylprednizolon, omeprazol, pantoprazol, propranolol, sirolimus, werapamil	⊥ CYP3A4 i CYP2C19 przez VCZ	↑ stężenia leku stosowanego z VCZ
azytromycyna, ciprofloksacyna, levofloksacyna, klarytromycyna, salbutamol		wydłużenie odcinka QT - ryzyko wystąpienia arytmii
karbamazepina, deferazyroks	indukcja CYP2C19	↓ stężenia VCZ
metotrexat	uszkodzenie systemu cytochromu P450	↑ hepatotoksyczności

IV.4.1. Analiza poziomów VCZ z uwzględnieniem potencjalnych interakcji

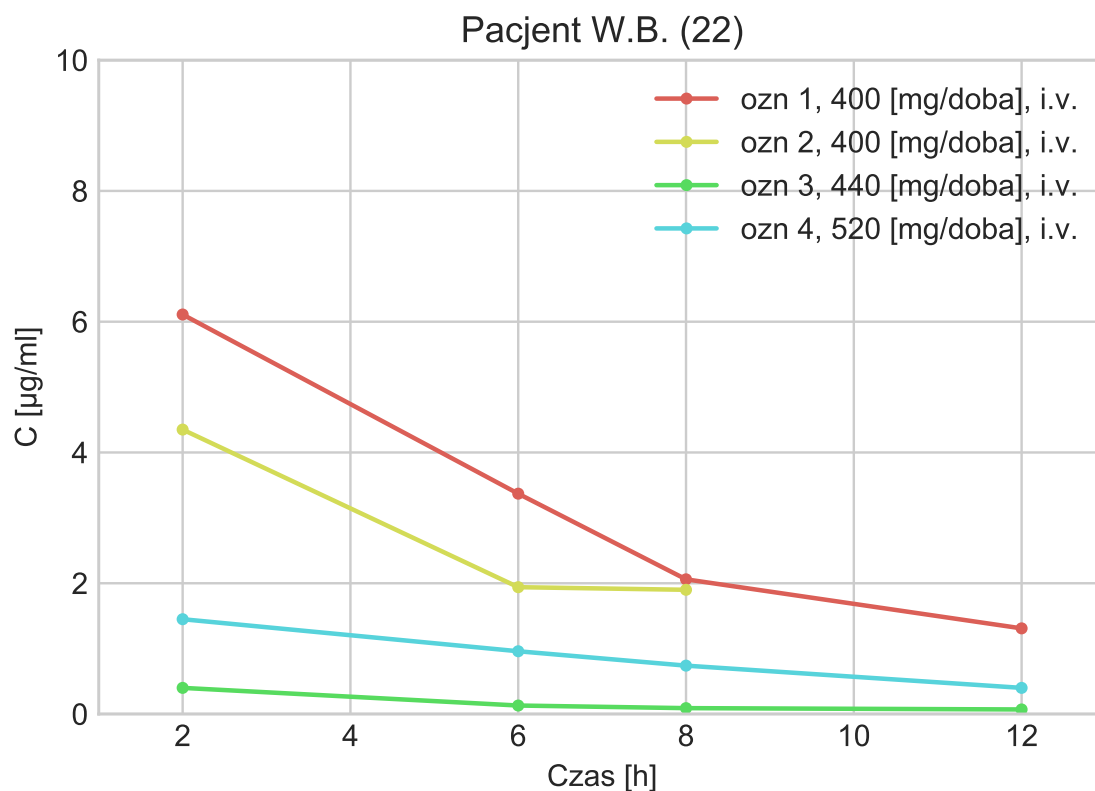
Oprócz wpływu postaci leku, stanu fizjologicznego pacjenta stosowana politerapia u chorych dzieci i dorosłych może również wpływać na poziomy VCZ, co przekłada się z kolei na skuteczność terapii IFI. Zebrane w pracy wyniki oznaczeń VCZ w osoczu chorych wydają się potwierdzać to założenie.

Włączenie karbamazepiny u pacjenta W.B (chłopiec 12 lat), spowodowało znaczące obniżenie poziomów VCZ. Pacjent otrzymywał leczenie przeciwgrzybicze z powodu potwierdzonej aspergilozy OUN. Podczas pierwszego oznaczenia lekarz poinformował o złych wynikach prób wątrobowych dziecka, wskazując na prawdopodobne hepatotoksyczne działanie VCZ, co potwierdzały wysokie wyniki prób wątrobowych AST (78 IU/l), ALT (105 IU/l). Wyniki oznaczeń VCZ potwierdziły wysokie poziomy leku tabela 28 i rycina 26. Z uwagi na rozwijającą się infekcję IFI kontynuowano dawkowanie według schematu 400 mg na dobę, uzyskując kontrolę nad zakażeniem. Rok później, podczas III i IV oznaczenia VCZ pacjentowi w wyniku wystąpienia u niego objawów padaczkowych włączono karbamazepinę. Stan pacjenta wyraźnie zaczął się pogarszać, nastąpiło nasilenie infekcji grzybiczej. Modyfikacja dawki do 520 mg VCZ na dobę poprawiła stan kliniczny dziecka dzięki zwiększeniu się poziomów VCZ. Kolejny przypadek pacjenta (mężczyzna 64 lata) przedstawia hepatotoksyczny wpływ wieloletniego stosowania metotrexatu w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Mimo standardowego dawkowania VCZ 400 mg na dobę oznaczone poziomy leku kilkakrotnie przewyższały poziom terapeutyczny. Dawkę dobową VCZ obniżono do 50 mg. Zmiany stężenia VCZ w czasie podczas I i II oznaczenia przedstawiono w tabeli 29 i na rycinie 27.

Tabela 28. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dziecka (W.B.) - pacjent nr 22

dawka dobowa [mg]	numer oznaczenia w kolejnych dniach*	C_2 [$\mu\text{g/ml}$]	C_6 [$\mu\text{g/ml}$]	C_8 [$\mu\text{g/ml}$]	C_{12} [$\mu\text{g/ml}$]
400	I (6)	6,11	3,37	2,06	1,31
400	II (14)	4,35	1,94	1,90	b.d.
440	III (6)	0,40	0,13	0,09	0,07
520	IV(22)	1,45	0,96	0,74	0,40

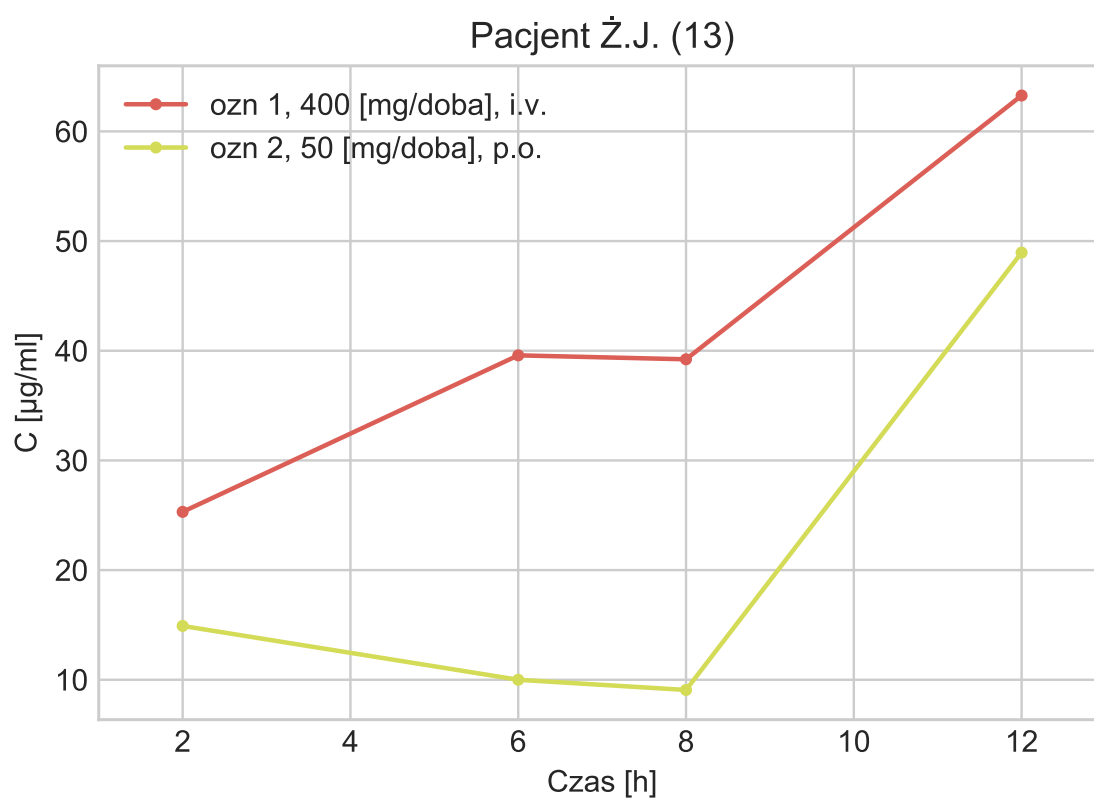
* Oznaczenia I i II wykonano w XI i XII 2015. Oznaczenia III i IV pochodzą z XI i XII 2016



Rycina 26. Zmiany stężeń VCZ podczas czterech oznaczeń poziomów leku u dziecka W.B.

Tabela 29. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dorosłego (Ż.J.)—pacjent nr 13

dawka dobowa [mg]	numer oznaczenia w kolejnych dniach	C_2 [$\mu\text{g/ml}$]	C_6 [$\mu\text{g/ml}$]	C_8 [$\mu\text{g/ml}$]	C_{12} [$\mu\text{g/ml}$]
400	I (21)	25,31	39,58	39,22	63,27
50	II (10)	14,91	10,00	9,07	48,95



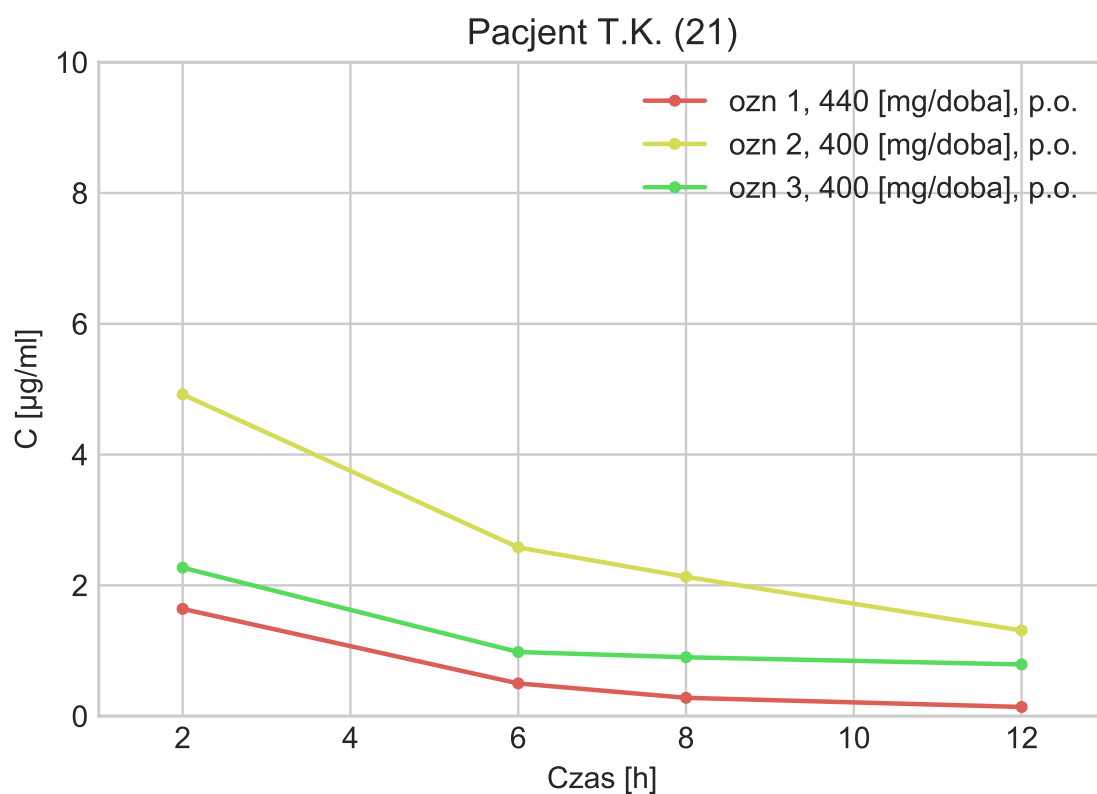
Rycina 27. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dorosłego Ż.J.

IV.4.2. Obniżenie poziomów VCZ u chorych w trakcie długotrwałej terapii stałą dawką 400 mg/dobę

Podczas prowadzonych badań w zakresie terapeutycznego monitorowania VCZ u dzieci i dorosłych zaobserwowano przypadki znaczącego obniżenia poziomów leku po dłuższym czasie stosowania tej samej dawki dobowej VCZ u dziecka T.K.—chłopiec, 14 lat. Poziomy VCZ w 79 dniu terapii spadły znacząco mimo, iż nie stosowano leków oddziałujących na VCZ tab. 30 i ryc. 28. Podobną sytuację obserwowano w 55 dniu terapii u osoby dorosłej ((J.B.)—mężczyzna 50 lat)—tab. 31 i ryc. 29.

Tabela 30. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dziecka (T.K.)—pacjent nr 21

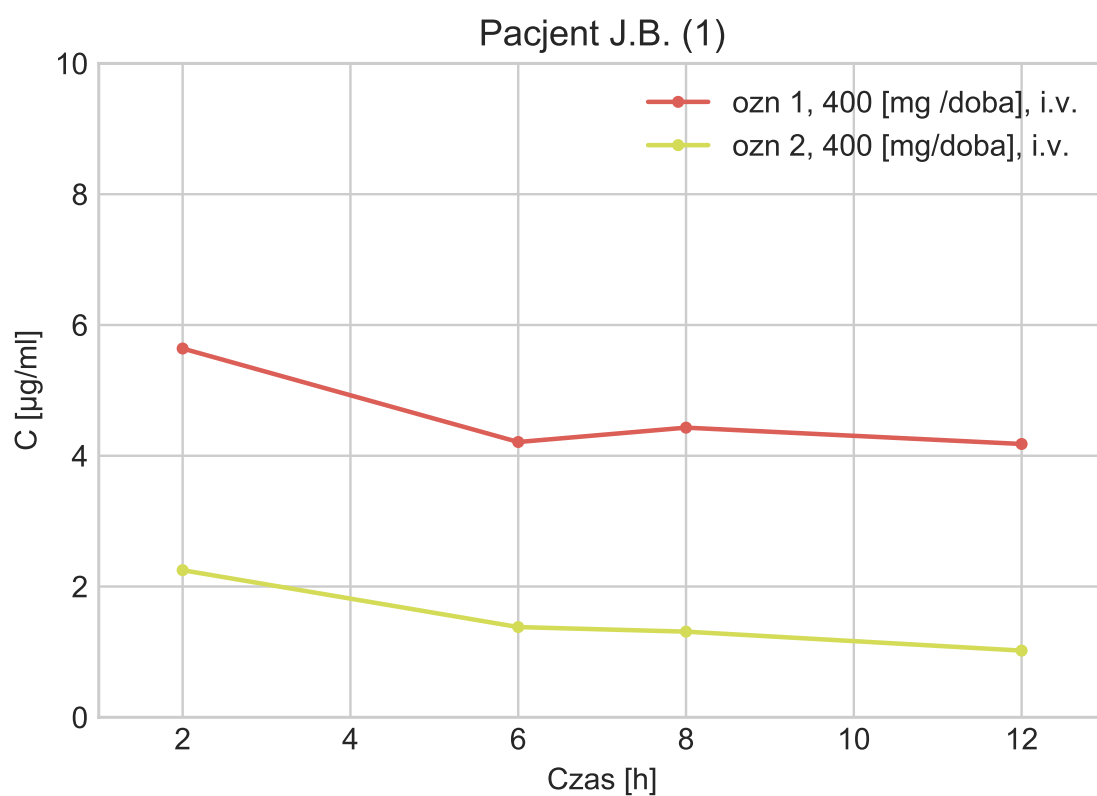
dawka dobowa [mg]	numer oznaczenia w kolejnych dniach	C_2 [$\mu\text{g/ml}$]	C_6 [$\mu\text{g/ml}$]	C_8 [$\mu\text{g/ml}$]	C_{12} [$\mu\text{g/ml}$]
440	I (6)	1,64	0,50	0,28	0,14
400	II (10)	4,92	2,58	2,13	1,31
400	III(79)	2,27	0,98	0,90	0,79



Rycina 28. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dziecka T.K.

Tabela 31. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dorosłego (J.B.)—pacjent nr 1

dawka dobowa [mg]	numer oznaczenia w kolejnych dniach	C_2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	C_6 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	C_8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	C_{12} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
400	I (8)	5,64	4,21	4,43	4,18
400	II (55)	2,25	1,38	1,31	1,02



Rycina 29. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dorosłego J.B.

IV.5. Efektywność leczenia VCZ

W tab. 32 i 33 przedstawiono informacje o decyzjach terapeutycznych uwzględniających TDM worykonazolu oraz uzyskanych efektach leczenia przeciwgrzybiczego dzieci i dorosłych. U większości pacjentów terapia przeciwgrzybicza VCZ poprawiła stan kliniczny chorych.

Tabela 32. Ocena efektywności leczenia przeciwgrzybiczego dzieci

numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg] przed oznaczeniem VCZ	dawka dobową [mg] po uwzgl. TDM VCZ	decyzje terapeutyczne	efekt terapii	czas trwania terapii VCZ [dni]
1	I	540	500	obniżenie dawki VCZ, kontynuacja leczenia	poprawa	
	II	500	500	kontynuacja leczenia VCZ, włączono amfoterycynę B	poprawa	
	III	500	500	zakończenie terapii	poprawa	35
2	I	400	400	profilaktyka wtórna VCZ, pacjent wypisany do domu	poprawa	40
	I	520	600	włączono leczenie miejscowe nystatyną, zwiększenie dawki VCZ	poprawa	42
3	II	600	600	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
	III	600	600	kontynuacja VCZ, pacjent wypisany do domu	poprawa	180
	I	270	270	zamiana VCZ na amfoterycynę B i mykafunginę	poprawa	6
5	I	300	300	zamiana VCZ na mykafunginę	postępsja	51
	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	b.d.
6	I	400	400	b.d.	poprawa	b.d.
	II	320	320	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
7	I	320	320	zakończenie terapii	poprawa	21
	II	550	600	zwiększenie dawki VCZ, kontynuacja leczenia	postępsja	
8	I	600	600	zamiana VCZ na mykafunginę	poprawa	53
	II	280	300	zamiana VCZ na mykafunginę	poprawa	b.d.
9	I	640	640	zamiana VCZ na amfoterycynę B	postępsja	28
	I	500	400	zamiana VCZ na flukonazol	poprawa	17
11	I	400	400	pacjent przekazany do innego szpitala	poprawa	b.d.
	I	400	400	b.d.	poprawa	b.d.
12	I	400	400	zwiększenie dawki VCZ, włączono amfoterycynę B	postępsja	
	II	500	500	zamiana VCZ na posakonazol	postępsja	20
15	I	700	400	obniżenie dawki VCZ, kontynuacja leczenia w domu	poprawa	leczenie nadal trwa
	I	180	200	do VCZ, włączono amfoterycynę B liposomalną	poprawa	b.d.
16	I	300	400	zwiększenie dawki VCZ	postępsja	b.d.
	I	400	400	zmiana VCZ na amfoterycynę B	postępsja	b.d.
17	II	400	400	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
	I	400	400	zamiana VCZ na amfoterycynę B i mykafunginę	poprawa	60
18	I	800	800	odstawienie VCZ z powodu toksycznego uszkodzenia wątroby	poprawa	15
	II	200	300	zwiększenie dawki VCZ	postępsja	
19	I	300	300	zamiana VCZ na flukonazol	poprawa	13
	II	440	400	obniżenie dawki VCZ	poprawa	
20	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
	II	400	400	zamiana VCZ na amfoterycynę B	poprawa	97
21	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
	II	440	400	zamiana VCZ na amfoterycynę B	poprawa	
22	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
	II	440	400	odstawienie VCZ	poprawa	25
23	III	440	520	zwiększenie dawki VCZ	postępsja	
	IV	520	520	zakończenie terapii VCZ	poprawa	17
23	I	700	700	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	leczenie nadal trwa

Tabela 33. Ocena efektywności leczenia przeciwegrybiczego dorosłych

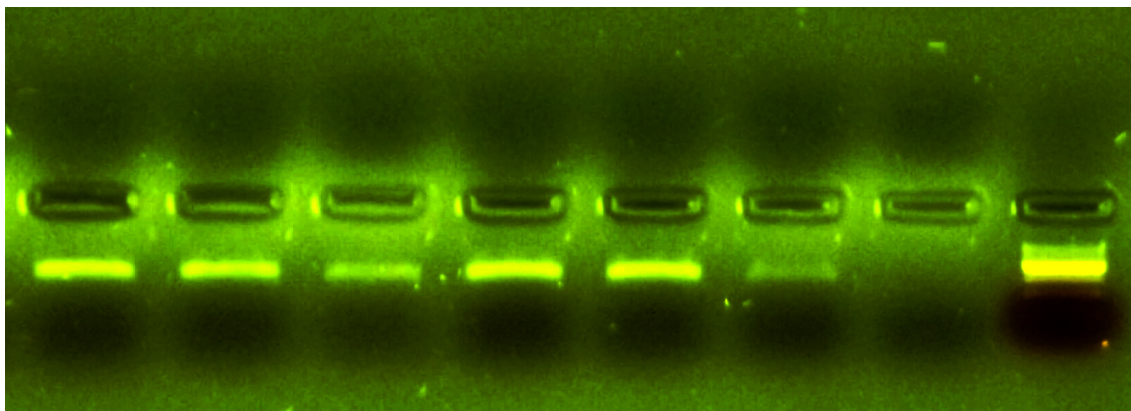
numer pacjenta	numer oznaczenia	dawka dobową [mg] przed oznaczeniem VCZ	dawka dobową [mg] po uwzgl. TDM VCZ	decyzje terapeutyczne	efekt terapii	czas trwania terapii VCZ [dni]
1	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ, włączono amfoterycynę B	poprawa	322
	II	400	400	pacjent wypisany do domu, zakończenie terapii VCZ	poprawa	
2	I	600	700	zwiększenie dawki VCZ, kontynuacja leczenia	poprawa	108
	II	700	700	kontynuacja leczenia VCZ	poprawa	
3	III	400	700	zwiększenie dawki VCZ, kontynuacja leczenia	progresja	10
	IV	600	600	zamiana VCZ na amfoterycynę B	progresja	
4	I	600	600	zgon - wstrząs septyczny	progresja	b.d.
5	I	400	b.d.	b.d.	poprawa/ wyleczenie	b.d.
6	I	600	600	zakończenie terapii, wypis do domu	progresja	66
7	I	400	400	b.d.	poprawa	b.d.
8	II	400	400	b.d.	progresja	b.d.
9	I	400	400	zgon pacjenta	progresja	11
10	I	400	400	kontynuacja leczenia VCZ, włączono amfoterycynę B	poprawa	b.d.
11	I	400	400	pacjent przewieziony do innego ośrodka	poprawa	12
12	I	400	400	b.d.	poprawa	b.d.
13	I	400	400	b.d.	poprawa	b.d.
	II	50	50	obniżenie dawki VCZ	poprawa	b.d.
	II	50	50	odstawienie VCZ, liczne interakcje, zgon	progresja	23
						16

IV.6. Analiza polimorfizmów CYP2C19*2 i CYP2C19*17

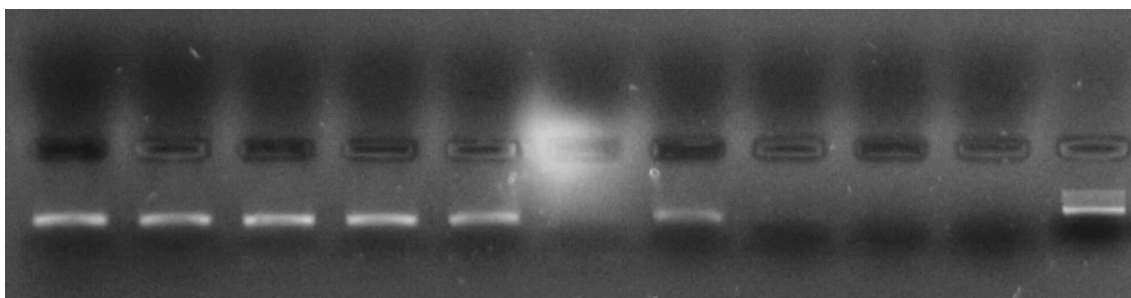
Produkty reakcji PCR CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 przedstawiono na ryc. 30 i 31. Wyniki analizy polimorfizmu CYP2C19*2 i CYP2C19*17 po reakcji restrykcji enzymatycznej obrazują ryc. 32 i 33.

Analizy polimorfizmu genetycznego w zakresie CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 wykonano u 17 pacjentów (9 chorych dzieci i 8 dorosłych). Przeważającym genotypem w badaniu obecności allelu *2 CYP2C19 był genotyp szybkiego metabolizera-EM (*1/*1) i występował u 67% badanych dzieci oraz 75% dorosłych. Genotyp pośredniego metabolizera-IM (*1/*2) obserwowano u 33% dzieci oraz 25% dorosłych.

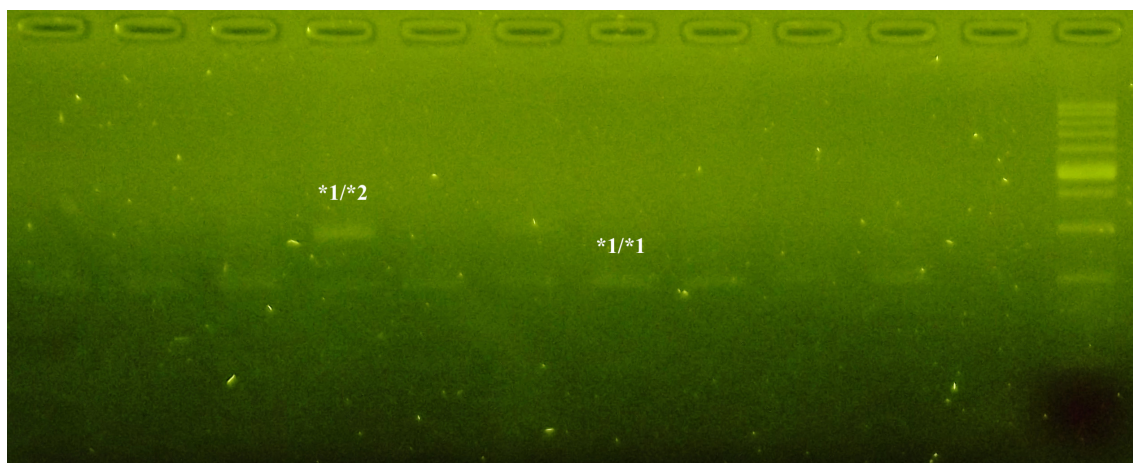
Z kolei wyniki analizy polimorfizmu CYP2C19*17 potwierdzają obecność genotypu *1/*1 u 56% dzieci i 37,5% dorosłych. Genotyp *1/*17 wykryto u 44% badanych dzieci oraz 62,5% dorosłych. W żadnej z grup nie odnotowano obecności genotypów wolnych metabolizerów *2/*2 oraz *17/*17. Wyniki analizy polimorfizmów genetycznych przedstawiono w tabeli 34.



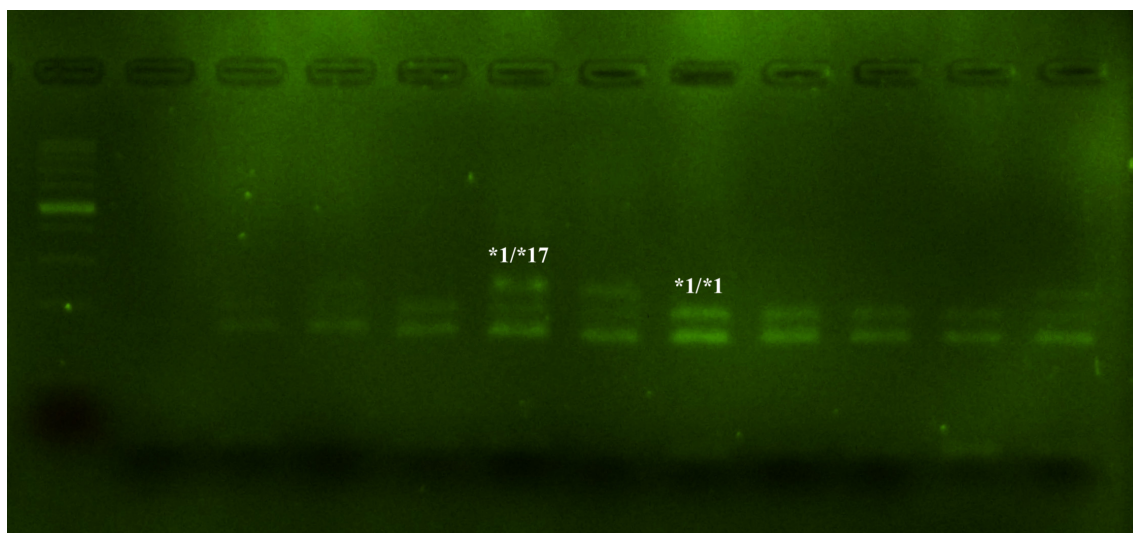
Rycina 30. Wynik analizy produktu PCR dla allelu CYP2C19*2



Rycina 31. Wynik analizy produktu PCR dla allelu CYP2C19*17



Rycina 32. Wynik analizy polimorfizmu CYP2C19*2 po reakcji restrykcji enzymatycznej



Rycina 33. Wynik analizy polimorfizmu CYP2C19*17 po reakcji restrykcji enzymatycznej

Tabela 34. Wyniki analizy polimorfizmu CYP2C19 u dzieci i dorosłych

numer pacjenta	grupa	płeć	genotyp CYP2C19*2	genotyp CYP2C19*17
2	dziecko	k	*1/*2	*1/*17
3	dziecko	k	*1/*2	*1/*1
7	dziecko	m	*1/*2	*1/*1
11	dziecko	m	*1/*1	*1/*17
15	dziecko	m	*1/*1	*1/*1
18	dziecko	k	*1/*1	*1/*17
19	dziecko	m	*1/*1	*1/*1
21	dziecko	m	*1/*1	*1/*1
22	dziecko	m	*1/*1	*1/*17
1	dorosły	m	*1/*2	*1/*1
2	dorosły	m	*1/*1	*1/*17
4	dorosły	m	*1/*1	*1/*1
6	dorosły	k	*1/*1	*1/*1
8	dorosły	k	*1/*2	*1/*17
10	dorosły	m	*1/*1	*1/*17
11	dorosły	k	*1/*1	*1/*17
12	dorosły	m	*1/*1	*1/*17

IV.7. Analiza statystyczna wyników

Test Shapiro-Wilka wykazał brak rozkładu normalnego zmiennych. Wykonano test nieparametryczny Manna-Whitneya, porównując grupy w zakresie parametrów farmakokinetycznych oraz stężenia minimalnego VCZ ze względu na płeć i wiek. Wyniki przedstawiono w tab. 35. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami. Oznaczone poziomy VCZ u dzieci i dorosłych, tab. 36 korelowały istotnie z AUC_{ozn} . Wykazano słaby stopień współzależności pomiędzy oznaczonymi poziomami VCZ a dawką dobową u dzieci. Oznaczone poziomy VCZ u dorosłych wykazały ujemny związek korelacyjny z podaną dawką dobową leku. Obliczone parametry farmakokinetyczne u dzieci korelowały istotnie ze stężeniem minimalnym VCZ. Wykazano słaby stopień współzależności pomiędzy parametrami AUC_{ozn} i k_{el} oraz dawką dobową worykonazolu u dzieci. Odnotowano ścisłą zależność między parametrem AUC_{ozn} a stężeniem minimalnym C_{min} oraz ujemny związek korelacyjny AUC_{ozn} z dawką dobową VCZ u dorosłych tab. 37. Dokonano oceny wpływu parametrów biochemicznych (AST, ALT), opisujących funkcję wątroby na metabolizm VCZ poprzez analizę zmiennych C_{min} i AUC_{ozn} . Nie wykazano korelacji zmiennych z aktywnością AST i ALT, tab. 38. Na poziomy oraz parametry VCZ nie miała wpływu również droga podania leku, tab. 39. Efekt leczenia IFI za pomocą VCZ, definiowany jako poprawa stanu zdrowia pacjenta lub progresja choroby korelował ze stężeniem minimalnym u dzieci, jednakże był to słaby stopień współzależności. Nie odnotowano takiej korelacji u pacjentów dorosłych, tab. 40.

Podjęto próbę ustalenia czy stosowana często w terapii immunosupresyjnej u wielu pacjentów cyklosporyna istotnie wpływa na uzyskane poziomy VCZ. Analiza testem Spearmana nie wykazała wpływu cyklosporyny na poziomy worykonazolu w osoczu, tab. 41.

Korelowano wyniki genotypu pacjentów uzyskanego w analizach polimorfizmu genetycznego w zakresie CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 z poziomami oraz obliczonymi parametrami farmakokinetycznymi VCZ. Nie wykazano korelacji między zmiennymi tab. 42.

Tabela 35. Porównanie C_{min} oraz parametrów farmakokinetycznych VCZ względem wieku i płci (test Manna-Whitneya)

	wiek	płeć
	p	p
C_{min} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,250	0,811
AUC_{ozn} [$(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}$]	0,644	0,986
$t_{0,5}$ [h]	0,117	0,840
k_{el} [1/h]	0,117	0,840

Tabela 36. Korelacja oznaczonych poziomów VCZ u dzieci i dorosłych z AUC_{ozn} oraz dawką dobową VCZ (test Pearsona)

	AUC_{ozn} [$(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}$]				dawka dobową VCZ [mg]			
	Dzieci		Dorośli		Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p	r	p	r	p
C_2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,8648	0,000	0,9622	0,000	0,3490	0,185	-0,7985	0,002
C_6 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,9796	0,000	0,9993	0,000	0,6458	0,007	-0,8064	0,001
C_8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,9860	0,000	0,9992	0,000	0,6477	0,007	-0,7994	0,002
C_{12} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,9685	0,000	0,9986	0,000	0,7160	0,002	-0,8051	0,002

Tabela 37. Korelacja parametrów farmakokinetycznych ze stężeniem minimalnym (C_{min}) oraz dawką dobową u dzieci i dorosłych (test Pearsona)

	C_{min} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]				dawka dobową VCZ [mg]			
	Dzieci		Dorośli		Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p	r	p	r	p
AUC_{ozn} [$(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}$]	0,9654	0,000	0,9986	0,000	0,5634	0,010	-0,8074	0,001
$t_{0,5}$ [h]	0,5612	0,010	-0,1300	0,968	0,3743	0,104	0,1452	0,652
k_{el} [1/h]	-0,6535	0,002	-0,1562	0,628	-0,2271	0,002	0,0069	0,983

Tabela 38. Korelacja C_{min} oraz AUC_{ozn} u dzieci i dorosłych z parametrami biochemicznymi opisującymi funkcję wątroby (test Pearsona)

	AST [IU/l]				ALT [IU/l]			
	Dzieci		Dorośli		Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p	r	p	r	p
C_{min} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,0947	0,700	-0,7701	0,073	0,2390	0,324	-0,6728	0,143
AUC_{ozn} [$(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}$]	0,1317	0,591	-0,7887	0,062	0,2513	0,299	-0,6539	0,159

Tabela 39. Korelacja oznaczonych poziomów VCZ oraz parametrów farmakokinetycznych u dzieci i dorosłych z drogą podania VCZ (test Spearmana)

	droga podania			
	Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p
C_2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,2559	0,238	-0,2065	0,947
C_6 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,2047	0,373	0,0412	0,894
C_8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,0157	0,946	-0,0412	0,894
C_{12} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,1041	0,662	0,1224	0,705
$\text{AUC}_{\text{ozn}}[(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}]$	-0,1968	0,368	-0,1237	0,687
$t_{0,5}$ [h]	0,0525	0,812	0,1649	0,590
k_{el} [1/h]	-0,0525	0,812	-0,1649	0,590

Tabela 40. Korelacja C_{min} oraz dawki dobowej VCZ u dzieci i dorosłych z efektem leczenia IFI (test Spearmana)

	efekt leczenia			
	Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p
dawka dobowa VCZ [mg]	-0,1287	0,558	0,2082	0,495
C_{min} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,4638	0,039	-0,4096	0,186

Tabela 41. Korelacja C_{min} oraz AUC_{ozn} VCZ u dzieci i dorosłych z jednoczesną terapią cyklosporyną (test Spearmana)

	cyklosporyna			
	Dzieci		Dorośli	
	r	p	r	p
C_{min} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,4272	0,060	-0,5296	0,076
$\text{AUC}_{\text{ozn}}[(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}]$	-0,3173	0,140	-0,4879	0,091

Tabela 42. Korelacja wyników genotypu pacjentów z oznaczonymi poziomami i parametrami farmakokinetycznymi VCZ (test Spearmana)

	Dzieci (n=9)		Dorośli (n=8)	
	r	p	r	p
*2& C_2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,0000	1,000	-0,6337	0,091
*2& C_6 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,0563	0,894	-0,5039	0,202
*2& C_8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,0913	0,815	-0,5039	0,202
*2& C_{12} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-0,2520	0,547	-0,4743	0,282
*2& $\text{AUC}_{\text{ozn}}[(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}]$	-0,0913	0,815	-0,5039	0,202
*2& $t_{0,5}$ [h]	0,0000	1,000	-0,6299	0,094
*2& k_{el} [1/h]	0,0000	1,000	0,6299	0,094
*17& C_2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,2598	0,499	0,1901	0,652
*17& C_6 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,2817	0,499	0,3779	0,355
*17& C_8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,4330	0,244	0,3150	0,447
*17& C_{12} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,4364	0,279	-0,0567	0,903
*17& $\text{AUC}_{\text{ozn}}[(\mu\text{g} * \text{h})/\text{ml}]$	0,3464	0,361	0,3150	0,447
*17& $t_{0,5}$ [h]	0,1732	0,655	-0,2520	0,547
*17& k_{el} [1/h]	-0,1732	0,655	0,2520	0,547

Rozdział V

Omówienie i dyskusja wyników

Inwazyjne infekcje grzybicze to jedno z groźniejszych powikłań występujące u pacjentów z obniżoną odpornością, szczególnie pacjentów hematoonkologicznych, po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Obniżenie odporności u tej grupy chorych jest wynikiem zastosowanego leczenia, szczególnie lekami zapobiegającymi odrzuceniom przeszczepionego szpiku tzw. lekami immunosupresyjnymi. Mimo ciągłego rozwoju medycyny i farmacji, śmiertelność z powodu układowych zakażeń grzybiczych jest wciąż bardzo wysoka.

Worykonazol jest lekiem o szerokim spektrum działania i dużej skuteczności przeciwgrzybiczej, stosowanym zarówno u dzieci jak i dorosłych. Należy do II generacji triazoli, których mechanizm działania opiera się na zahamowaniu syntezy błony komórkowej grzyba. Jest on lekiem skutecznym, jednakże niebezpiecznym z uwagi na złożony profil kinetyczny i dużą zmienność międzyosobniczą w zakresie metabolizmu, będącą następstwem polimorfizmu genetycznego CYP2C19. Dodatkowo VCZ charakteryzuje się wąskim indeksem terapeutycznym. Konsekwencją tych cech jest różna biodostępność formy doustnej, jak również trudne do przewidzenia stężenie leku we krwi, zarówno po pierwszym podaniu, w trakcie leczenia, czy po modyfikacjach dawkowania. Konsekwencją metabolizmu wątrobowego leku przy udziale CYP3A4 i CYP2C19 oraz zdolności VCZ do hamowania tych enzymów jest duże ryzyko licznych interakcji międzylekowych. Zbyt wysokie stężenie VCZ we krwi objawia się najczęściej hepatotoksycznością, która jest bardzo groźnym dla pacjentów powikłaniem, jak również zaburzeniami widzenia i rozpoznawania barw. Zbyt niskie poziomy leku, które obserwuje się często u dzieci mimo zastosowania standardowych a nawet zwiększonych dawek

doprowadza do niepowodzenia terapii przeciwgrzybiczej, zwiększając przy tym oporność patogenów na alternatywne leczenie. Rozwiązaniem opisanych powyżej problemów jest monitorowanie stężenia VCZ, w szczególności na początku terapii jak i w trakcie jej trwania oraz po modyfikacjach dawkowania czy też zmianie postaci leku.

Celem pracy była analiza czynników farmakokinetycznych, genetycznych oraz interakcji międzylekowych, których poznanie w znaczący sposób może przyczynić się do poprawy efektywności leczenia worykonazolem. Do oznaczeń VCZ zastosowano opracowaną i zwalidowaną w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP metodę HPLC z detektorem fluorescencyjnym. Przed zastosowaniem do analizy VCZ w próbkach biologicznych metoda poddana była częściowej walidacji. Próby kontrolne w zakresie krzywej wzorcowej, a w szczególności próbki kliniczne potwierdziły przydatność metody do TDM.

Istotnym aspektem w opracowaniu metody z przeznaczeniem do badań farmakokinetycznych zarówno u dzieci jak i dorosłych było zastosowanie małej objętości osocza wynoszącej 100 μl , stąd możliwe było ograniczenie ilości pobieranej krwi w każdym punkcie czasowym do 1 ml . Ważnym elementem analizy jest jej czas. W stosowanej do oznaczeń VCZ metodzie był on stosunkowo krótki i wynosił 12 min. Metoda z zastosowaniem czułego detektora FLD charakteryzuje się ponadto wysoką oznaczalnością (LOQ = 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), znacznie poniżej dolnej granicy zakresu terapeutycznego, wynoszącego 1,0–5,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Potwierdzono zbliżoną wartość LOQ w innej metodzie HPLC-FLD, opisanej w literaturze [127]. Metody HPLC-UV oznaczania VCZ w płynach biologicznych charakteryzują się nieco niższą oznaczalnością rzędu 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [125]. Najbardziej czułym detektorem jest obecnie detektor masowy, którym można oznaczać worykonazol w stężeniach rzędu 50 ng/ml [120]. Uproszczenie procedury przygotowania próbek z wykorzystaniem metody strącania białek osocza w wykorzystanej metodzie HPLC-FLD przyspieszyło i ułatwiło proces analityczny a także ograniczyło potencjalne błędy jakie niesie za sobą standardowa ekstrakcja ciecz-ciecz, wykorzystywana często w metodach oznaczania VCZ w płynach biologicznych. Dodatkową zaletą użytej metody była jej wysoka selektywność, co ma istotne znaczenie w przypadku stosowania jednocześnie wielu leków. Na otrzymanych chromatogramach (ryc. 12–15) nie zaobserwowano dodatkowych

pików, interferujących z pikiem leku badanego-VCZ, czy pikiem wzorca wewnętrznego użytego w metodzie—amlodypiny.

Wiarygodność oraz użyteczność metody HPLC-FLD oznaczania VCZ w osoczu 2 pacjentów w 12 h od podania VCZ, potwierdzono w niezależnym laboratorium referencyjnym we Francji, rekomendowanym przez producenta leku, firmę Pfizer (*Pharmacie Laboratoire de Suivi Therapeutique, Bobigny, Paris*), w którym oznaczono VCZ metodą HPLC-UV. Uzyskane wyniki potwierdziły wiarygodność opracowanej w Polsce metody (0,90 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC-UV); 1,00 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC-FLD)—dla próbki 1) oraz (0,60 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC-UV); 0,65 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC-FLD)—dla próbki 2).

Europejskie zalecenia w zakresie profilaktyki i leczenia celowanego inwazyjnych grzybic układowych u pacjentów z nowotworami hematologicznymi i po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych wydawane są przez ECIL (European Conference on Infections in Leucemia). Na tych zaleceniach opierają się aktualne standardy leczenia infekcji u wymienionych grup pacjentów również w Polsce. Oprócz zaleceń i poziomów rekomendacji ECIL określa, czy lek posiada wskazania do TDM [140]. Worykonazol niemal w każdym opisanym wskazaniu do stosowania wg ECIL-5 z 2013 roku posiada zalecenie do TDM. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy nie ma w Polsce laboratorium oferującego analizę worykonazolu, a mimo to lek jest w dalszym ciągu stosowany do leczenia IFI.

V.1. TDM worykonazolu w grupach badanych

Należy podkreślić bardzo dobrą współpracę z ośrodkami klinicznymi w Poznaniu, Bydgoszczy, Krakowie i Szczecinie w zakresie pobierania i przygotowania próbek do badań. Pozwoliło to na oznaczenie poziomów VCZ u 23 pacjentów pediatrycznych oraz 13 dorosłych. Zauważalna jest w tych ośrodkach potrzeba prowadzenia TDM zwłaszcza w przypadku VCZ, który wykazuje zróżnicowaną farmakokinetykę. Wykonano łącznie 59 oznaczeń poziomów worykonazolu. Próbki pacjentów pobierano w czterech punktach czasowych, zawsze po 2 h, 6 h, 8 h i 12 h od podania VCZ u pacjentów w wieku 2–70 roku życia, hospitalizowanych z powodu przeszczepienia komórek krwiotwórczych a także przeszczepienia serca, chłoniaka, drobnokomórkowego raka płuca oraz mukowiscydozy.

Ograniczona ilość pobieranych próbek podyktowana jest ciężkim stanem zdrowia pacjentów oraz faktem, iż podczas leczenia poddawani są oni wielu procedurom diagnostycznym. Dąży się zatem do ograniczenia procedur medycznych wymagających pobierania krwi szczególnie w grupie pacjentów pediatrycznych (tab. 16 i 17).

Poziomy VCZ u pacjentów oznaczano zarówno na początku terapii tj. w 6 dobie leczenia, po uzyskaniu stanu stacjonarnego leku, jak również w trakcie trwania terapii. Monitorowanie worykonazolu prowadzono również u pacjentów poddawanych długotrwałej terapii w 55, 79 i 180 dobie leczenia. Pacjenci poddawani TDM VCZ stanowili bardzo niejednorodną grupę, u której jednocześnie z terapią VCZ stosowano wiele innych leków. Oznaczone poziomy VCZ w osoczu pacjentów zarówno u dzieci jak i dorosłych wskazują na złożoną farmakokinetykę VCZ.

Poziomy VCZ w osoczu pacjentów poniżej dolnego zakresu terapeutycznego $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ odnotowano w 25% próbek krwi zarówno u dzieci jak i dorosłych. Sytuacja ta dotyczy 9 (40%) pacjentów pediatrycznych oraz 5 (38%) dorosłych (tab. 18 i 19). Analiza stężeń minimalnych, czyli stężeń w 12 godzinie od podania leku (C_{min}) wykazała poziomy subterapeutyczne w 40% wykonanych analiz u dzieci oraz 32% u dorosłych. To właśnie u tych osób najczęściej obserwowano brak skuteczności leczenia. Stężenia minimalne znajdujące się w zakresie terapeutycznym ($1\text{--}5,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) obserwowano u 54,3% pacjentów pediatrycznych oraz 57,9% dorosłych. U dwóch osób, dziecka **nr 19** i dorosłego **nr 13** odnotowano poziomy (C_{min}) znacząco przekraczające górny zakres terapeutyczny leku powyżej $5,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (tab. 20).

U większości pacjentów terapia IFI przy użyciu VCZ przyniosła wymierne rezultaty. Terapeutyczne monitorowanie VCZ w osoczu pacjentów z całą pewnością przyspieszyło znacząco podejmowanie decyzji terapeutycznych. U dzieci **nr 8 i 14** zwiększenie dawki VCZ zwiększyło poziomy leku do stężeń terapeutycznych, lecz mimo to stan pacjentów pogarszał się i podjęto decyzję o zmianie leku przeciwgrzybiczego na mykafunginę i posakonazol. Mimo zmiany leku na posakonazol u pacjenta **nr 14** nie zaobserwowano poprawy stanu zdrowia. Wśród badanych osób znaleźli się również pacjenci (**dziecko nr 5 i 10**), u których z powodu zbyt niskich, subterapeutycznych poziomów leku zaprzestano terapię VCZ już po pierwszym oznaczeniu poziomów leku w osoczu i kontynuowano terapię IFI innymi lekami przeciwgrzybiczymi. Odmienną

sytuację obserwowano u dziecka **nr 19**, u którego odnotowano wysokie poziomy VCZ i toksyczne uszkodzenie wątroby będące ich następstwem. W związku z powyższym podjęto decyzję o odstawieniu VCZ. Nie odnotowano informacji odnośnie dalszego postępowania terapeutycznego u tego pacjenta. Analiza farmakokinetyczna poziomów worykonazolu u dwóch pacjentów pozwoliła obniżyć dawkę dobową leku z 540 mg na 500 mg (dziecko nr 1) oraz 440 mg na 400 mg (dziecko nr 21), zmniejszając narażenie na działanie toksyczne VCZ przy zachowaniu odpowiednich poziomów terapeutycznych i kontroli choroby grzybiczej (**dziecko nr 1, 21**). Natomiast dość odmienną sytuację odnotowano u dorosłego **nr 13**, u którego mimo kilkukrotnego obniżenia dawki dobowej VCZ z 400 mg na 50 mg obserwowano bardzo wysokie poziomy VCZ, kilkakrotnie przewyższające poziom terapeutyczny. Przypuszcza się, iż było to spowodowane znacznym uszkodzeniem wątroby na skutek wieloletniej terapii metotreksatem. Leczenie IFI u 3 pacjentów dorosłych zakończyło się zgonem, najprawdopodobniej z powodu zbyt intensywnego postępu choroby grzybiczej (tab. 32 i 33).

Na podstawie analizy poziomów worykonazolu u chorych dzieci i dorosłych wyznaczono parametry farmakokinetyczne worykonazolu takie jak AUC_{0zn} , k_{el} oraz $t_{0,5}$. Wyznaczone metodą trapezów AUC_{0zn} mieściło się w zakresie 1,60–73,72 $[(\mu g * h)/ml]$ u dzieci oraz 1,48–413,56 $[(\mu g * h)/ml]$ u dorosłych. Stała szybkości eliminacji mieściła się w przedziale 0,0265–0,4450 $[1/h]$ u dzieci oraz 0,0391–0,2892 $[1/h]$ u dorosłych pacjentów. Okres biologicznego półtrwania VCZ ($t_{0,5}$) u badanych pacjentów mieścił się w szerokim zakresie od 1,56–26,15 $[h]$ u dzieci oraz 2,40–17,72 $[h]$ u dorosłych (tab. 23 i 24). Uzyskane dane potwierdzają opisane w literaturze wartości biologicznego okresu półtrwania VCZ, który wynosi ok. 6 h lecz może się wydłużać nawet do 24 h. Istnieje zatem niebezpieczeństwo kumulowania dawki VCZ u pacjentów. Dane literaturowe oraz dane zawarte w karcie charakterystyki leku Vfend wskazują na nieproporcjonalny wzrost AUC w zależności od podanej dawki VCZ. Wskazuje to na nieliniową farmakokinetykę leku. Czynnikiem wpływającymi na farmakokinetykę VCZ są między innymi upośledzenie funkcji wątroby, obecność inhibitorów enzymów wątrobowych CYP450, przyjmowanie VCZ wraz z posiłkiem oraz czynniki genetyczne. [13, 29, 33]

Duża zmienność międzyosobnicza poziomów VCZ u dzieci jak i dorosłych wskazuje na konieczność terapeutycznego monitorowania poziomów leku w trakcie terapii IFI.

V.2. Analiza polimorfizmów genetycznych CYP2C19*2 i CYP2C19*17

Opracowana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP metoda PCR-RFLP umożliwiła oznaczenie genotypu pacjentów oraz wykonanie badań na obecność mutacji w allelu 2 i 17, warunkujących zmianę metabolizmu VCZ. Genotyp oznaczono u 17 chorych w tym 9 dzieci i 8 dorosłych. Analiza pacjentów wykazała, iż nosicielami jednego zmutowanego allelu *2 o genotypie (*1/*2), warunkującym fenotyp pośredniego metabolizera jest 3 dzieci i 2 dorosłych. Pozostałe osoby posiadają fenotyp (*1/*1), co oznacza, że posiadają zdolność do szybkiego metabolizmu. W przypadku analizy CYP2C19*17, nosicielami zmutowanego allelu *17 było 9 osób, w tym 4 dzieci i 5 dorosłych, a zatem byli to pośredni metabolizerzy. Pozostałych 8 chorych posiadało genotyp szybkich metabolizerów (*1*1), pozbawiony mutacji. Analiza statystyczna otrzymanych wyników nie wykazała korelacji pomiędzy genotypem badanych pacjentów a oznaczonymi poziomami worykonazolu u dzieci i dorosłych. Powodem braku zależności może być mało liczna statystycznie grupa badana jak również inne czynniki pozagenetyczne, wpływające na metabolizm VCZ (stan fizjologiczny pacjenta, przyjmowane leki). Badana grupa pacjentów to bardzo niejednorodna grupa chorych, w różnych stanach klinicznych, u których prowadzona była wielolekowa terapia tab. 34. Literaturowo potwierdzono fakt, że polimorfizm genetyczny w zakresie CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 warunkujący fenotyp wolnego metabolizera zarówno na zdrowych ochotnikach [83], jak i chorych [33] zwiększa ekspozycję na worykonazol nawet trzykrotnie. Ocenę genotypu pacjentów należy zatem traktować jako uzupełnienie TDM w celu zwiększenia bezpieczeństwa chorych a przede wszystkim uniknięcia toksycznych działań VCZ wynikających z wysokich stężeń leku [141].

V.3. Ocena interakcji międzylekowych w oparciu o analizę VCZ w osoczu pacjentów

Dzięki TDM worykonazolu u kilku pacjentów możliwe było wykrycie interakcji między stosowanymi lekami oraz modyfikacja dawkowania VCZ w celu utrzymania kontroli nad IFI. Bardzo dobra współpraca z personelem medycznym w zakresie monitorowania VCZ doprowadziła do szybkiego wykrycia interakcji między VCZ a karbamazepiną u dziecka nr 22 (W.B). Wspomniany pacjent otrzymywał leczenie VCZ na przestrzeni 1,5 roku i wykonano u niego 4 analizy poziomów VCZ w osoczu. Podczas I i II oznaczenia pacjent nie otrzymywał leków indukujących enzymy CYP450. Poziomy leku podczas tych oznaczeń mieściły się w zakresie (1,31–6,11 $\mu\text{g/ml}$). Po ponownym przyjęciu pacjenta z przyczyn wznowy nowotworu oraz wystąpienia objawów padaczkowych podano karbamazepinę. Dodatkowo zdiagnozowano u pacjenta grzybicę OUN w wyniku której zastosowano VCZ w dawce 440 mg na dobę. Podawanie VCZ w dawce 440 mg na dobę nie przyniosło wymiernych rezultatów przez 6 kolejnych dni leczenia. Zlecona analiza poziomów VCZ wykazała stężenia subterapeutyczne VCZ (0,07–0,40 $\mu\text{g/ml}$). Podjęto decyzję o zwiększeniu dawki VCZ z 440 mg do 520 mg na dobę. Stan pacjenta po kilku dobach od podania zmienionej dawki leku zaczął się poprawiać. W 22 dobie leczenia ponownie otrzymano próbki do analizy VCZ. Oznaczone poziomy leku były znacznie wyższe niż poprzednio (0,40–1,45 $\mu\text{g/ml}$). Niskie poziomy VCZ wskazują na wystąpienie interakcji pomiędzy VCZ a silnym induktorem CYP2C19—karbamazepiną. Monitorowanie poziomów VCZ u pacjenta z całą pewnością zwiększyło skuteczność i bezpieczeństwo terapii IFI. Kolejny przypadek kliniczny pacjenta dorosłego (Ż.J.) potwierdza, że TDM worykonazolu jest szczególnie ważne u pacjentów poddawanych długoletnim terapiom chorób przewlekłych. Przypadek dorosłego mężczyzny dotyczył wieloletniego leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów metotreksatem. To prawdopodobnie ten lek doprowadził do uszkodzenia wątroby w wyniku którego upośledzony był metabolizm innych leków, w tym VCZ. Pacjent otrzymywał VCZ w wyniku potwierdzonej grzybicy płuc wywołanej *A.fumigatus*. Zastosowano standardowe dawkowanie wynoszące 400 mg na dobę. U pacjenta oznaczono poziomy 10-krotnie przewyższające poziom

terapeutyczny leku (25,31–63,27 $\mu\text{g/ml}$). Po natychmiastowej konsultacji z lekarzem prowadzącym lek odstawiono, wprowadzając pacjenta w kilkudniową fazę wash-out, następnie wznowiono terapię VCZ dawką 50 mg na dobę. Oznaczone poziomy VCZ w 10 dobie terapii były znacznie niższe, jednak nadal przewyższały poziom terapeutyczny leku (9,07–48,95 $\mu\text{g/ml}$). Zastanawiający jest wynik poziomów VCZ po 12 h od podania leku—oznaczenia I (63,27 $\mu\text{g/ml}$) i II (48,95 $\mu\text{g/ml}$). Przypuszcza się, że w obu przypadkach mogło dojść do nieprzestrzegania procedury pobierania próbek, które prawdopodobnie pobrane zostały tuż po podaniu kolejnej dawki leku.

Czynnikiem wpływającym na zmianę poziomów worykonazolu w czasie długotrwałego podawania może być autoindukcja. W literaturze opisano przykłady autoindukcji VCZ u ludzi i zwierząt podczas terapii trwających dłużej niż 60 dni [32, 90]. W przypadku dzieci autoindukcję VCZ obserwowano już po kilkunastu dniach terapii [95]. Dzięki trwającemu blisko 4 lata TDM VCZ w osoczu dzieci i dorosłych, podczas wielokrotnych oznaczeń na różnych etapach terapii odnotowano przypadki, które mogłyby wskazywać na powyższe zjawisko. Pierwszym odnotowanym podczas badań przypadkiem jest 14-letni chłopiec (pacjent nr 21) poddawany terapii przeciwgrzybiczej VCZ. Początkowo u pacjenta odnotowano subterapeutyczne poziomy VCZ (oznaczenie I, 440 mg/doba). Po kilku dniach wykonano kolejne oznaczenie poziomów VCZ (oznaczenie II, 400 mg/doba). Mimo obniżenia dawki leku (przyczyna nieznana) odnotowano znaczenie wyższe niż poprzednio poziomy leku, mieszczące się w zakresie terapeutycznym. W 79 dobie leczenia dawką 400 mg/doba wykonano III oznaczenie stężeń VCZ. Poziomy leku po 6, 8, i 12 godzinie od podania dawki w III oznaczeniu nie przewyższały stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$. Lekarz podjął decyzję o zaprzestaniu stosowania VCZ i rozpoczęciu terapii amfoterycyną B. Wynik ten potwierdza opisany w literaturze przypadek 10-letniego dziecka, któremu podawano również wysokie dawki VCZ przez okres dłuższy niż 2 miesiące. W trakcie zwiększania dawki leku obserwowano obniżony poziom C_{min} . Jako przyczynę tego stanu rzeczy wskazano autoindukcję metabolizmu VCZ [95]. Podobną sytuację obserwowano u pacjenta dorosłego (J.B.), u którego poziomy w 55 dobie leczenia mimo niezmiennego dawkowania VCZ 400 mg/doba były znacznie niższe (1,02–2,25 $\mu\text{g/ml}$), niż poziomy badane w 8 dobie leczenia (4,18–5,64 $\mu\text{g/ml}$). W tym przypadku jednak stężenia VCZ we wszystkich próbkach

mieściły się w zakresie terapeutycznym leku. Opisane przykłady mogą skłaniać do stwierdzenia, że wydłużona terapia VCZ prowadzi do obniżenia poziomów leku w osoczu pacjentów. Jest to dowód na to, że TDM leków a w szczególności VCZ tylko na początku terapii nie jest wystarczające dla uzyskania pełnego obrazu zmian stężenia leku we krwi. Zatem bardzo ważne jest monitorowanie VCZ także w trakcie trwania terapii, by w razie konieczności zmodyfikować dawkowanie leku lub jeśli to możliwe zmienić strategię terapeutyczną.

Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych, będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej pokazuje, że jest to bardzo ważne, jeśli nie niezbędne narzędzie farmakoterapii grzybic układowych. Oznaczone poziomy zarówno u dzieci i dorosłych wskazują na często zróżnicowaną farmakokinetkę VCZ. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że lek w wyższych stężeniach wykazuje farmakokinetkę nieliniową. Ponadto na poziom leku we krwi chorych w sposób znaczący wpływają interakcje oraz zjawisko autoindukcji VCZ podczas długotrwałych terapii. Dzięki monitorowaniu VCZ możliwa jest kierunkowa modyfikacja dawkowania leku, przyczyniająca się do sukcesu terapeutycznego IFI. Ponadto umożliwia ono kontrolę nad bezpieczeństwem oraz personalizację farmakoterapii. Konsekwencją takiego działania jest ponadto racjonalizacja wydatków placówek ochrony zdrowia, w których znaczną część budżetu pochłaniają zawsze terapie przeciwdrobnoustrojowe. Trudno odnieść się do atutu TDM jakim jest skrócenie terapii pacjentów, gdyż wymagałoby to znacznie bardziej szczegółowych badań z grupą kontrolną. Można jednakże zaryzykować stwierdzenie, iż możliwość szybciej podjętych decyzji terapeutycznych na skutek TDM VCZ mogła przyczynić się do skrócenia terapii IFI, a z całą pewnością zmniejszyła narażenie na możliwe działania niepożądane worykonazolu. Metoda HPLC-FLD użyta w badaniach poziomów VCZ w osoczu pacjentów jest odpowiednio selektywna i dokładna oraz z uwagi na krótki czas analizy z całą pewnością może być implementowana do rutynowego TDM. Badania genetyczne w zakresie polimorfizmu enzymów metabolizujących VCZ są uzupełnieniem niniejszych badań i z całą pewnością powinny towarzyszyć monitorowaniu VCZ u pacjentów, gdyż mogą być bardzo przydatne podczas szczegółowej analizy przypadków klinicznych. Przeprowadzone badania farmakokinetyczne VCZ, stanowiące zasadniczy element terapeutycznego monitorowania

leków wskazuje na istotną rolę farmaceuty klinicznego w zakresie efektywności leczenia i bezpieczeństwa pacjentów.

Rozdział VI

Wnioski

- Walidowana metoda HPLC-FLD z powodzeniem była stosowana do terapeutycznego monitorowania worykonazolu w osoczu krwi chorych dzieci i dorosłych.
- Zastosowanie u pacjentów standardowych dawek VCZ, zalecanych przez producenta często nie gwarantuje skuteczności terapii przeciwgrzybiczej, której efekt zależy od stężenia leku we krwi.
- Analiza stężeń minimalnych C_{min} wykazała poziomy subterapeutyczne w 40% wykonanych analiz u dzieci oraz 32% u dorosłych. Poziomy C_{min} poniżej $1 \mu\text{g/ml}$ stanowią najbardziej prawdopodobną przyczynę obniżenia efektywności terapii IFI, w szczególności u dzieci.
- Analiza polimorfizmów genetycznych w zakresie CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 u badanych pacjentów może stanowić przydatne uzupełnienie TDM worykonazolu, jakkolwiek w grupach badanych pacjentów nie odnotowano istotnie znaczących korelacji między oznaczonymi poziomami VCZ a genotypem.
- Istotnymi czynnikami wpływającymi na poziomy VCZ, a w konsekwencji efektywność leczenia przeciwgrzybiczego są: zjawisko autoindukcji metabolizmu tego leku oraz jego interakcje z karbamazepiną.
- Mocno zróżnicowane stężenia VCZ w osoczu chorych, nieproporcjonalne do podanej dawki, wskazują na możliwość nieliniowej farmakokinetyki leku, stąd istnieje konieczność prowadzenia terapeutycznego monitorowania VCZ.

Rozdział VII

Streszczenie

Worykonazol jest lekiem przeciwgrzybiczym należącym do II generacji triazoli. Wykazuje on szerokie spektrum działania i jest wykorzystywany do leczenia inwazyjnych grzybic układowych u dzieci od 2 roku życia oraz u dorosłych. Stosuje się go przede wszystkim do leczenia infekcji wywołanych przez grzyby z rodziny *Aspergillus spp.*, jak również w kandydozach, fusariozach czy scedosporiozach. VCZ charakteryzuje zmienna i trudna do przewidzenia farmakokinetyka, a także wąski indeks terapeutyczny oraz duża zmienność międzypersoniczna w zakresie metabolizmu związana z polimorfizmem genetycznym izoformy CYP2C19. Wymienione cechy leku sprawiają, że trudno jest przewidzieć poziomy VCZ we krwi pacjentów a w konsekwencji efekt terapii przeciwgrzybiczej. Pomimo, iż lek posiada wskazania do TDM na chwilę obecną nie ma w Polsce laboratorium badawczego, w którym wykonuje się oznaczenia stężeń worykonazolu we krwi pacjentów.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z pięciu ośrodków leczniczych w Polsce. Efektem badań miało być zmniejszenie odsetka niepowodzeń terapii przeciwgrzybiczej VCZ oraz poprawienie bezpieczeństwa i kontroli nad możliwymi działaniami niepożądanymi leku. Oceniono możliwość wystąpienia potencjalnych interakcji międzylekowych, ponadto wykonano oznaczenia genotypu pacjentów w zakresie polimorfizmu genetycznego CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17.

Do oznaczenia poziomów VCZ zastosowano zwalidowaną metodę HPLC-FLD o dużej precyzji, dokładności i selektywności oraz stosunkowo niskim LOQ wynoszącym 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Krew pacjentów pobierana była w 4 punktach czasowych po 2 h, 6 h, 8 h

i 12 h od podania dawki VCZ. Do oznaczeń genotypu pacjentów zastosowano metodę PCR-RFLP.

Badaniom poziomów VCZ w osoczu poddanych zostało 36 osób w tym 23 dzieci i 13 dorosłych. Analiza stężeń minimalnych VCZ wykazała poziomy subterapeutyczne poniżej $1 \mu\text{g/ml}$ u 40% wykonanych analiz u dzieci i 32% dorosłych. Analiza polimorfizmu genetycznego u pacjentów wykazała obecność jednego zmutowanego allelu *2 u 33,3% badanych dzieci oraz 25% dorosłych. W przypadku allelu *17 wykazano jego obecność u 44% dzieci i 62,5% dorosłych. Analiza statystyczna wyników nie wykazała istotnych statystycznie korelacji oznaczonych poziomów VCZ z genotypem pacjentów.

Przyczyną niskich poziomów VCZ u chorych, wymagającą modyfikacji dawkowania, a nawet zmiany strategii terapeutycznych IFI jest zjawisko autoindukcji metabolizmu VCZ oraz interakcja z karbamazepiną.

Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w trakcie leczenia grzybic układowych stanowi dużą wartość kliniczną i powinno stanowić nieodzowny element terapii IFI w polskich ośrodkach leczniczych.

Rozdział VIII

Abstract

Voriconazole belongs to the antifungal agent from the second generation of triazoles. It has a broad spectrum of activity and is used to treat invasive fungal infections in children from 2 years old and adults. It is used primarily for the treatment of infections caused by fungi of the *Aspergillus spp.* family, as well as in candidiasis, fusariosis or scedosporiosis. VCZ is characterized by variable and unpredictable pharmacokinetics, as well as a narrow therapeutic index and high intra-individual variability of metabolism connection with genetic polymorphism of the CYP2C19 isoform. The aforementioned aspects make it difficult to predict VCZ levels in the blood of patients and, as a consequence, the effect of antifungal therapy. Despite strong indications for TDM, currently in Poland there is no research laboratory that determines the concentration of voriconazole in patients' blood.

The aim of this dissertation was therapeutic monitoring of voriconazole in the plasma of ill children and adults from five treatment centers in Poland. Desired outcomes of this research included reducing the percentage of failures in VCZ antifungal therapy, and improving the safety and control over possible side effects of the drug.

The possibility of potential drug interactions was assessed, and genotype designations of patients in terms of genetic polymorphism CYP2C19 *2 and CYP2C19 *17 were performed.

VCZ levels were determined using a validated HPLC-FLD method with high precision, accuracy, and selectivity with a low LOQ of 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Patients' blood was collected at 4 time points: 2 h, 6 h, 8 h, and 12 h after the administration of the VCZ dose. Genotype of patients was determined using the PCR-RFLP method.

Determination of VCZ was performed in a group of 36 subjects, consisting of 23 children and 13 adults. The analysis of VCZ minimal concentrations showed subtherapeutic levels, below $1 \mu\text{g/ml}$, in 40% of analyzes performed on children and in 32% of analyzes performed on adults. Analysis of genetic polymorphism in patients revealed the presence of one mutated allele *2 in 33.3% of the examined children and in 25% of the examined adults. In case of the *17 allele, it was found in 44% of the examined children and 62.5% of the examined adults. Statistical analysis of the results did not show any statistically significant correlations between determined VCZ levels and the patients' genotype.

The reason for low VCZ levels in patients, requiring dose modification or even change of therapeutic strategies of IFI, is the phenomenon of autoinduction of VCZ metabolism and interaction with carbamazepine.

Therapeutic monitoring of voriconazole during treatment of invasive fungal infections has a great clinical value and should be an indispensable element of IFI therapy in treatment centers in Poland.

Bibliografia

- [1] E. Zielińska. “Kontrowersje dotyczące optymalnej profilaktyki i leczenia zakażeń grzybami w stanach obniżonej odporności”. *Przegl Epidemiol* 57 (2003), s. 299–307.
- [2] M. Staniszewska, M. Bondaryk, M. Kowalska, U. Magda, M. Łuka, Z. Ochal i W. Kurzątkowski. “Patogeneza i leczenie zakażeń *Candida* spp.” *Postępy Mikrobiologii* 53.3 (2014).
- [3] D. Dzierżanowska, L. Gil, B. Jakubas, S. Kyrzcz-Krzemień i J. Styczyński. “Epidemiology and microbiologic diagnostics of invasive fungal disease”. *Postępy Nauk Medycznych* (2015).
- [4] O. A. Cornely, M. Bassetti, T. Calandra, J. Garbino, B. J. Kullberg, O. Lortholary, W. Meersseman, M. Akova, M. C. Arendrup, S. Arikan-Akdagli, J. Bille, E. Castagnola, M. Cuenca-Estrella, J. P. Donnelly, A. H. Groll, R. Herbrecht, W. W. Hope, H. E. Jensen, C. Lass-Flörl, G. Petrikos, M. D. Richardson, E. Roilides, P. E. Verweij, C. Viscoli i A. J. Ullmann. “ESCMID guideline for the diagnosis and management of candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients”. *Clinical Microbiology and Infection* 18.s7 (2012), s. 19–37.
- [5] W. Meersseman, K. Lagrou, J. Maertens, A. Wilmer, G. Hermans, S. Vanderschueren, I. Spriet, E. Verbeken i E. Van Wijngaerden. “Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients”. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177.1 (2008), s. 27–34.

- [6] M. Cuenca-Estrella, M. Bassetti, C. Lass-Flörl, Z. Ráčil, M. Richardson i T. R. Rogers. “Detection and investigation of invasive mould disease”. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 66.suppl_1 (2011), s. i15–i24.
- [7] M. Ellis, B. Al-Ramadi, R. Bernsen, J. Kristensen, H. Alizadeh i U. Hedstrom. “Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever”. *Journal of medical microbiology* 58.5 (2009), s. 606–615.
- [8] K. Shalini, N. Kumar, S. Drabu i P. K. Sharma. “Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles”. *Beilstein journal of organic chemistry* 7 (2011), s. 668.
- [9] E. K. Brefo-Mensah i M. Palmer. “mol2chemfig, a tool for rendering chemical structures from molfile or SMILES format to LATE X code”. *Journal of cheminformatics* 4.1 (2012), s. 24.
- [10] W. Abuhammour i E. Habte-Gaber. “Newer antifungal agents”. *Indian journal of pediatrics* 71.3 (2004), s. 253–259.
- [11] R. E. Lewis. “Current concepts in antifungal pharmacology”. *Mayo Clinic Proceedings*. T. 86. 8. Elsevier. 2011, s. 805–817.
- [12] E. S. D. Ashley, R. Lewis, J. S. Lewis, C. Martin i D. Andes. “Pharmacology of systemic antifungal agents”. *Clinical Infectious Diseases* 43.Supplement_1 (2006), S28–S39.
- [13] *Aneks I: Charakterystyka Produktu Leczniczego*. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000387/WC500049756.pdf (data wejścia 18.11.2017).
- [14] *Wykaz refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na dzień 2017-11-01*. URL: <http://www.mz.gov.pl/wp-content/uploads/2017/10/zalacznik-do-obwieszczenia-1.pdf> (data wejścia 18.11.2017).
- [15] D. Levêque, Y. Nivoix, F. Jehl i R. Herbrecht. “Clinical pharmacokinetics of voriconazole”. *International journal of antimicrobial agents* 27.4 (2006), s. 274–284.

- [16] M. Pfaller, S. Messer, R. Hollis, R. Jones i SENTRY Participants Group. "Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46.4 (2002), s. 1032–1037.
- [17] A. L. Barry i S. D. Brown. "In vitro studies of two triazole antifungal agents (voriconazole [UK-109,496] and fluconazole) against *Candida* species." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40.8 (1996), s. 1948–1949.
- [18] L. D. Saravolatz, L. B. Johnson i C. A. Kauffman. "Voriconazole: a new triazole antifungal agent". *Clinical Infectious Diseases* 36.5 (2003), s. 630–637.
- [19] A. Espinel-Ingroff. "In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens". *Journal of Clinical Microbiology* 36.1 (1998), s. 198–202.
- [20] M. Szymankiewicz i M. Dancewicz. "In vitro activity of voriconazole and caspofungin against *Candida* spp. strains assessed by Etest method". *MIKOLOGIA LEKARSKA* 15.1 (2008), s. 13.
- [21] R. S. Kadam i J. N. Van Den Anker. "Pediatric clinical pharmacology of voriconazole: role of pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in pharmacotherapy". *Clinical pharmacokinetics* 55.9 (2016), s. 1031–1043.
- [22] J. Chen, C. Chan, D. Colantonio i W. Seto. "Therapeutic drug monitoring of voriconazole in children". *Therapeutic drug monitoring* 34.1 (2012), s. 77–84.
- [23] I. Celik, G. Demirel, S. Oguz, N. Uras, O. Erdeve i U. Dilmen. "Compassionate use of voriconazole in newborn infants diagnosed with severe invasive fungal sepsis". *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17.6 (2013), s. 729–34.
- [24] K. Frankenbusch, F. Eifinger, A. Kribs, J. Rengelshauseu i B. Roth. "Severe primary cutaneous aspergillosis refractory to amphotericin B and the successful treatment with systemic voriconazole in two premature infants with extremely low birth weight". *Journal of perinatology* 26.8 (2006), s. 511–514.

- [25] M. A. von Mach, J. Burhenne i L. S. Weilemann. “Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy”. *BMC clinical pharmacology* 6.1 (2006), s. 6.
- [26] J. Maertens, O. Marchetti, R. Herbrecht, O. Cornely, U. Flückiger, P. Frere, B. Gachot, W. Heinz, C. Lass-Flörl, P. Ribaud i C. Cordonnier. “European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3—2009 update”. *Bone marrow transplantation* 46.5 (2011), s. 709–718.
- [27] A. Wierzbowska i A. Pluta. “Profilaktyka i leczenie inwazyjnych zakażeń grzybiczych u chorych w neutropenii według zaleceń ECIL-3”. *Hematologia* 2.2 (2011), s. 140–148.
- [28] J. M. Barbarino, A. O. Obeng, T. E. Klein i R. B. Altman. “PharmGKB summary: voriconazole pathway, pharmacokinetics”. *Pharmacogenetics and genomics* 27.5 (2017), s. 201–209.
- [29] U. Theuretzbacher, F. Ihle i H. Derendorf. “Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole”. *Clinical pharmacokinetics* 45.7 (2006), s. 649–663.
- [30] R. Hyland, B. Jones i D. Smith. “Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole”. *Drug Metabolism and Disposition* 31.5 (2003), s. 540–547.
- [31] N. Murayama, N. Imai, T. Nakane, M. Shimizu i H. Yamazaki. “Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes”. *Biochemical pharmacology* 73.12 (2007), s. 2020–2026.
- [32] S. Roffey, S. Cole, P. Comby, D. Gibson, S. Jezequel, A. Nedderman, D. Smith, D. Walker i N. Wood. “The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human”. *Drug Metabolism and Disposition* 31.6 (2003), s. 731–741.
- [33] I. Scholz, H. Oberwittler, K.-D. Riedel, J. Burhenne, J. Weiss, W. E. Haefeli i G. Mikus. “Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype”. *British journal of clinical pharmacology* 68.6 (2009), s. 906–915.

- [34] K. Bourcier, R. Hyland, S. Kempshall, R. Jones, J. Maximilien, N. Irvine i B. Jones. "Investigation into UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme kinetics of imidazole-and triazole-containing antifungal drugs in human liver microsomes and recombinant UGT enzymes". *Drug Metabolism and Disposition* 38.6 (2010), s. 923–929.
- [35] S. B. Yanni, P. P. Annaert, P. Augustijns, J. G. Ibrahim, D. K. Benjamin i D. R. Thakker. "In vitro hepatic metabolism explains higher clearance of voriconazole in children versus adults: role of CYP2C19 and flavin-containing monooxygenase 3". *Drug Metabolism and Disposition* 38.1 (2010), s. 25–31.
- [36] L. Purkins, N. Wood, P. Ghahramani, K. Greenhalgh, M. Allen i D. Kleinermans. "Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous-to oral-dose escalation regimens". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46.8 (2002), s. 2546–2553.
- [37] S. Schwartz, D. Milatovic i E. Thiel. "Successful treatment of cerebral aspergillosis with a novel triazole (voriconazole) in a patient with acute leukaemia". *British journal of haematology* 97.3 (1997), s. 662–665.
- [38] I. Lutsar, S. Roffey i P. Troke. "Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients". *Clinical Infectious Diseases* 37.5 (2003), s. 728–732.
- [39] M. Bakleh, A. J. Aksamit, I. M. Tleyjeh i W. F. Marshall. "Successful treatment of cerebral blastomycosis with voriconazole". *Clinical Infectious Diseases* 40.9 (2005), e69–e71.
- [40] S. M. Hariprasad, W. F. Mieler, E. R. Holz, H. Gao, J. E. Kim, J. Chi i R. A. Prince. "Determination of Vitreous, Aqueous, and Plasma Concentration of Orally Administered Voriconazole in Humans". *Archives of Ophthalmology* 122.1 (2004), s. 42–47.
- [41] A. Reis, R. Sundmacher, K. Tintelnot, H. Agostini, H. E. Jensen i C. Althaus. "Successful treatment of ocular invasive mould infection (fusariosis) with the new antifungal agent voriconazole". *British Journal of Ophthalmology* 84.8 (2000), s. 928–928.

- [42] T. J. Walsh, M. O. Karlsson, T. Driscoll, A. G. Arguedas, P. Adamson, X. Saez-Llorens, A. J. Vora, A. C. Arrieta, J. Blumer, I. Lutsar, P. Milligan i N. Wood. "Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single-or multiple-dose administration". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48.6 (2004), s. 2166–2172.
- [43] T. Yamada, Y. Mino, T. Yagi, T. Naito i J. Kawakami. "Saturated metabolism of voriconazole N-oxidation resulting in nonlinearity of pharmacokinetics of voriconazole at clinical doses". *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38.10 (2015), s. 1496–1503.
- [44] I. H. Bartelink, T. Wolfs, M. Jonker, M. de Waal, T. C. Egberts, T. T. Ververs, J. J. Boelens i M. Bierings. "Highly variable plasma concentrations of voriconazole in pediatric hematopoietic stem cell transplantation patients". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57.1 (2013), s. 235–240.
- [45] C. Michael, U. Bierbach, K. Frenzel, T. Lange, N. Basara, D. Niederwieser, C. Mauz-Körholz i R. Preiss. "Voriconazole pharmacokinetics and safety in immunocompromised children compared to adult patients". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54.8 (2010), s. 3225–3232.
- [46] I. Spriet, K. Cosaert, M. Renard, A. Uyttebroeck, I. Meyts, M. Proesmans, G. Meyfroidt, J. de Hoon, R. Verbesselt i L. Willems. "Voriconazole plasma levels in children are highly variable". *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 30.2 (2011), s. 283–287.
- [47] S. Goutelle, R. Larcher, C. Padoin, V. Mialou i N. Bleyzac. "Oral voriconazole dose in children: one size does not fit all". *Clinical infectious diseases* 51.7 (2010), s. 870–870.
- [48] S. Miyakis, S. J. Van Hal, J. Ray i D. Marriott. "Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections". *Clinical Microbiology and Infection* 16.7 (2010), s. 927–933.
- [49] M. Neely, T. Rushing, A. Kovacs, R. Jelliffe i J. Hoffman. "Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children". *Clinical Infectious Diseases* 50.1 (2010), s. 27–36.

- [50] A. Pascual, T. Calandra, S. Bolay, T. Buclin, J. Bille i O. Marchetti. “Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes”. *Clinical infectious diseases* 46.2 (2008), s. 201–211.
- [51] K. Tan, N. Brayshaw, K. Tomaszewski, P. Troke i N. Wood. “Investigation of the potential relationships between plasma voriconazole concentrations and visual adverse events or liver function test abnormalities”. *The Journal of Clinical Pharmacology* 46.2 (2006), s. 235–243.
- [52] D. W. Denning, P. Ribaud, N. Milpied, D. Caillot, R. Herbrecht, E. Thiel, A. Haas, M. Ruhnke i H. Lode. “Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis”. *Clinical infectious diseases* 34.5 (2002), s. 563–571.
- [53] K. Ueda, Y. Nannya, K. Kumano, A. Hangaishi, T. Takahashi, Y. Imai i M. Kurokawa. “Monitoring trough concentration of voriconazole is important to ensure successful antifungal therapy and to avoid hepatic damage in patients with hematological disorders”. *International journal of hematology* 89.5 (2009), s. 592–599.
- [54] K. Matsumoto, K. Ikawa, K. Abematsu, N. Fukunaga, K. Nishida, T. Fukamizu, Y. Shimodozono, N. Morikawa, Y. Takeda i K. Yamada. “Correlation between voriconazole trough plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes”. *International journal of antimicrobial agents* 34.1 (2009), s. 91–94.
- [55] S. A. Scott, K. Sangkuhl, A. R. Shuldiner, J.-S. Hulot, C. F. Thorn, R. B. Altman i T. E. Klein. “PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19”. *Pharmacogenetics and genomics* 22.2 (2012), s. 159.
- [56] M. O. Karlsson, I. Lutsar i P. A. Milligan. “Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53.3 (2009), s. 935–944.
- [57] J. Weiss, M. M. Hoevel, J. Burhenne, I. Walter-Sack, M. M. Hoffmann, J. Rengelshausen, W. E. Haefeli i G. Mikus. “CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole”. *The Journal of Clinical Pharmacology* 49.2 (2009), s. 196–204.

- [58] T. N. Johnson, A. Rostami-Hodjegan i G. T. Tucker. "Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children". *Clinical pharmacokinetics* 45.9 (2006), s. 931–956.
- [59] V. V. Upreti i J. L. Wahlstrom. "Meta-analysis of hepatic cytochrome P450 ontogeny to underwrite the prediction of pediatric pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetic modeling". *The Journal of Clinical Pharmacology* 56.3 (2016), s. 266–283.
- [60] R. Hines. "Developmental expression of drug metabolizing enzymes: impact on disposition in neonates and young children". *International journal of pharmaceutics* 452.1 (2013), s. 3–7.
- [61] K. Allegaert, M. Velde i J. Anker. "Neonatal clinical pharmacology". *Pediatric Anesthesia* 24.1 (2014), s. 30–38.
- [62] S. B. Koukouritaki, J. R. Manro, S. A. Marsh, J. C. Stevens, A. E. Rettie, D. G. McCarver i R. N. Hines. "Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308.3 (2004), s. 965–974.
- [63] S. N. de Wildt, G. L. Kearns, J. S. Leeder i J. N. van den Anker. "Cytochrome P450 3A". *Clinical pharmacokinetics* 37.6 (1999), s. 485–505.
- [64] D. Zonios, H. Yamazaki, N. Murayama, V. Natarajan, T. Palmore, R. Childs, J. Skinner i J. E. Bennett. "Voriconazole metabolism, toxicity, and the effect of cytochrome P450 2C19 genotype". *The Journal of infectious diseases* 209.12 (2014), s. 1941–1948.
- [65] J. K. Hicks, K. R. Crews, P. Flynn, C. E. Haidar, C. C. Daniels, W. Yang, J. C. Panetta, D. Pei, J. R. Scott, A. R. Molinelli, U. Broeckel, D. Bhojwani, W. E. Evans i M. V. Relling. "Voriconazole plasma concentrations in immunocompromised pediatric patients vary by CYP2C19 diplotypes". *Pharmacogenomics* 15.8 (2014), s. 1065–1078.
- [66] F. Lamoureux, T. Duflot, J.-B. Woillard, D. Metsu, T. Pereira, P. Compagnon, H. Morisse-Pradier, M. El Kholy, L. Thiberville, J. Stojanova i C. Thuillez. "Impact of CYP2C19 genetic polymorphisms on voriconazole dosing and

- exposure in adult patients with invasive fungal infections”. *International journal of antimicrobial agents* 47.2 (2016), s. 124–131.
- [67] Y. Ikeda, K. Umemura, K. Kondo, K. Sekiguchi, S. Miyoshi i M. Nakashima. “Pharmacokinetics of voriconazole and cytochrome P450 2C19 genetic status”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 75.6 (2004), s. 587–588.
- [68] P. K. Chawla, S. R. Nanday, A. J. Dherai, R. Soman, R. V. Lokhande, P. R. Naik i T. F. Ashavaid. “Correlation of CYP2C19 genotype with plasma voriconazole levels: a preliminary retrospective study in Indians”. *International journal of clinical pharmacy* 37.5 (2015), s. 925–930.
- [69] X. Li, C. Yu, T. Wang, K. Chen, S. Zhai i H. Tang. “Effect of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on the clinical outcomes of voriconazole: a systematic review and meta-analysis”. *European journal of clinical pharmacology* 72.10 (2016), s. 1185–1193.
- [70] S. Lee, B.-H. Kim, W.-S. Nam, S. H. Yoon, J.-Y. Cho, S.-G. Shin, I.-J. Jang i K.-S. Yu. “Effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics of voriconazole after single and multiple doses in healthy volunteers”. *The Journal of Clinical Pharmacology* 52.2 (2012), s. 195–203.
- [71] G. Wang, H.-P. Lei, Z. Li, Z.-R. Tan, D. Guo, L. Fan, Y. Chen, D.-L. Hu, D. Wang i H.-H. Zhou. “The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers”. *European journal of clinical pharmacology* 65.3 (2009), s. 281–285.
- [72] H. Chung, H. Lee, H. Han, H. An, K. S. Lim, Y. J. Lee, J.-Y. Cho, S. H. Yoon, I.-J. Jang i K.-S. Yu. “A pharmacokinetic comparison of two voriconazole formulations and the effect of CYP2C19 polymorphism on their pharmacokinetic profiles”. *Drug design, development and therapy* 9 (2015), s. 2609.
- [73] M. Berge, R. Guillemain, D. A. Trégouet, C. Amrein, V. Boussaud, P. Chevalier, A. Lillo-Lelouet, C. Le Beller, P. Laurent-Puig, P. H. Beaune, E. M. Billaud i M.-A. Lorient. “Effect of cytochrome P450 2C19 genotype on voriconazole exposure in cystic fibrosis lung transplant patients”. *European journal of clinical pharmacology* 67.3 (2011), s. 253–260.

- [74] J. Trubiano, A. Crowe, L. Worth, K. Thursky i M. Slavin. “Putting CYP2C19 genotyping to the test: utility of pharmacogenomic evaluation in a voriconazole-treated haematology cohort”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70.4 (2015), s. 1161–1165.
- [75] M. M. Malingré, P. C. Godschalk i S. K. Klein. “A case report of voriconazole therapy failure in a homozygous ultrarapid CYP2C19* 17/* 17 patient comedicated with carbamazepine”. *British journal of clinical pharmacology* 74.1 (2012), s. 205–206.
- [76] J. Autmizguine, M. Krajcinovic, J. Rousseau, Y. Théorêt, C. Litalien, C. Marquis, B. Tapiéro i P. Ovetchkine. “Pharmacogenetics and beyond: variability of voriconazole plasma levels in a patient with primary immunodeficiency”. *Pharmacogenomics* 13.16 (2012), s. 1961–1965.
- [77] M. Z. Abidi, A. D’Souza, K. Kuppalli, N. Ledebøer i P. Hari. “CYP2C19* 17 genetic polymorphism—an uncommon cause of voriconazole treatment failure”. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 83.1 (2015), s. 46–48.
- [78] J. D. Weigel, N. G. Hunfeld, B. C. Koch, M. Egal, J. Bakker, R. H. van Schaik i T. van Gelder. “Gain-of-function single nucleotide variants of the CYP2C19 gene (CYP2C19* 17) can identify subtherapeutic voriconazole concentrations in critically ill patients: a case series”. *Intensive care medicine* 41.11 (2015), s. 2013–2014.
- [79] S.-J. Lee. “Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine”. *Frontiers in genetics* 3 (2013), s. 318.
- [80] B. Moriyama, O. Falade, J. Leung, S. R. Penzak, C. JJingo, X. Huang, S. A. Henning, W. H. Wilson i T. J. Walsh. “Prolonged half-life of voriconazole in a CYP2C19 homozygous poor metabolizer receiving vincristine chemotherapy: avoiding a serious adverse drug interaction”. *Mycoses* 54.6 (2011), e877.
- [81] S.-H. Kim, D.-G. Lee, J.-C. Kwon, H.-J. Lee, S.-Y. Cho, C. Park, E.-Y. Kwon, S. H. Park, S.-M. Choi, J.-H. Choi i J.-H. Yoo. “Clinical impact of cytochrome P450 2C19 genotype on the treatment of invasive aspergillosis under routine therapeutic drug monitoring of voriconazole in a Korean population”. *Infection & chemotherapy* 45.4 (2013), s. 406–414.

- [82] M.-D. Levin, J. G. den Hollander, B. Van Der Holt, B. J. Rijnders, M. Van Vliet, P. Sonneveld i R. H. Van Schaik. "Hepatotoxicity of oral and intravenous voriconazole in relation to cytochrome P450 polymorphisms". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60.5 (2007), s. 1104–1107.
- [83] T. Wang, H. Zhu, J. Sun, X. Cheng, J. Xie, H. Dong, L. Chen, X. Wang, J. Xing i Y. Dong. "Efficacy and safety of voriconazole and CYP2C19 polymorphism for optimised dosage regimens in patients with invasive fungal infections". *International journal of antimicrobial agents* 44.5 (2014), s. 436–442.
- [84] Y. Bouatou, C. F. Samer, K. R. I. Lorenzini, Y. Daali, S. Daou, M. Fathi, M. Rebsamen, J. Desmeules, A. Calmy i M. Escher. "Therapeutic drug monitoring of voriconazole: a case report of multiple drug interactions in a patient with an increased CYP2C19 activity". *AIDS research and therapy* 11.1 (2014), s. 25.
- [85] Y. Bennis, S. Bodeau, R. Bouquié, G. Deslandes, C. Verstuyft, B. Gruson, M. Andréjak, A.-S. Lemaire-Hurtel i T. Chouaki. "High metabolic N-oxidation of voriconazole in a patient with refractory aspergillosis and CYP2C19* 17/* 17 genotype". *British journal of clinical pharmacology* 80.4 (2015), s. 782–784.
- [86] K. Williams i S. T. Arron. "Association of CYP2C19* 17/* 17 genotype with the risk of voriconazole-associated squamous cell carcinoma". *JAMA dermatology* 152.6 (2016), s. 719–720.
- [87] M. Mansh, M. Binstock, K. Williams, F. Hafeez, J. Kim, D. Glidden, R. Boettger, S. Hays, J. Kukreja, J. Golden, M. M. Asgari, P. Chin-Hong, J. P. Singer i S. T. Arron. "Voriconazole exposure and risk of cutaneous squamous cell carcinoma, Aspergillus colonization, invasive aspergillosis and death in lung transplant recipients". *American Journal of Transplantation* 16.1 (2016), s. 262–270.
- [88] C. K. Imamura, K. Furihata, S. Okamoto i Y. Tanigawara. "Impact of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus when coadministered with voriconazole". *The Journal of Clinical Pharmacology* 56.4 (2016), s. 408–413.
- [89] V. Mulanovich, R. E. Lewis, I. I. Raad i D. P. Kontoyiannis. "Random plasma concentrations of voriconazole decline over time". *Journal of Infection* 55.5 (2007), e129–e130.

- [90] M. Ohbuchi, K. Yoshinari, H. Kaneko, S. Matsumoto, A. Inoue, A. Kawamura, T. Usui i Y. Yamazoe. “Coordinated roles of pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in autoinduction of voriconazole metabolism in mice”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57.3 (2013), s. 1332–1338.
- [91] M. Lee, E. Ayanoglu i L. Gong. “Drug-induced changes in P450 enzyme expression at the gene expression level: A new dimension to the analysis of drug–drug interactions”. *Xenobiotica* 36.10-11 (2006), s. 1013–1080.
- [92] B. L. Urquhart, R. G. Tirona i R. B. Kim. “Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs”. *The Journal of Clinical Pharmacology* 47.5 (2007), s. 566–578.
- [93] B. Moriyama, J. Elinoff, R. L. Danner, J. Gea-Banacloche, G. Pennick, M. G. Rinaldi i T. J. Walsh. “Accelerated metabolism of voriconazole and its partial reversal by cimetidine”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53.4 (2009), s. 1712–1714.
- [94] N. E. Holmes, J. M. Trevillyan, S. E. Kidd i T. Y.-M. Leong. “Locally extensive angio-invasive *Scedosporium prolificans* infection following resection for squamous cell lung carcinoma”. *Medical mycology case reports* 2 (2013), s. 98–102.
- [95] A. J. Hsu, A. Dabb i R. Arav-Boger. “Autoinduction of voriconazole metabolism in a child with invasive pulmonary aspergillosis”. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 35.4 (2015).
- [96] L. Purkins, N. Wood, D. Kleinermans i D. Nichols. “Voriconazole does not affect the steady-state pharmacokinetics of digoxin”. *British journal of clinical pharmacology* 56.s1 (2003), s. 45–50.
- [97] A. J. Romero, P. L. Pogamp, L.-G. Nilsson i N. Wood. “Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 71.4 (2002), s. 226–234.
- [98] N. Wood, K. Tan, L. Purkins, G. Layton, J. Hamlin, D. Kleinermans i D. Nichols. “Effect of omeprazole on the steady-state pharmacokinetics of voriconazole”. *British journal of clinical pharmacology* 56.s1 (2003), s. 56–61.

- [99] E. Doran, J. Iedema, L. Ryan i I. Coombes. “Fatal rhabdomyolysis following voriconazole and simvastatin”. *Australian Prescriber* 35.3 (2012), s. 88–89.
- [100] D. Flockhart. *Drug interactions: cytochrome P450 drug interaction table*. 2007. URL: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table> (data wejścia 21. 04. 2018).
- [101] T. I. Saari, K. Laine, K. Leino, M. Valtonen, P. J. Neuvonen i K. T. Olkkola. “Voriconazole, but not terbinafine, markedly reduces alfentanil clearance and prolongs its half-life”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 80.5 (2006), s. 502–508.
- [102] T. I. Saari, K. Laine, L. Bertilsson, P. J. Neuvonen i K. T. Olkkola. “Voriconazole and fluconazole increase the exposure to oral diazepam”. *European journal of clinical pharmacology* 63.10 (2007), s. 941–949.
- [103] V.-V. Hynninen, K. T. Olkkola, K. Leino, S. Lundgren, P. J. Neuvonen, A. Rane, M. Valtonen i K. Laine. “Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of diclofenac”. *Fundamental & clinical pharmacology* 21.6 (2007), s. 651–656.
- [104] E. Andrews, B. D. Damle, A. Fang, G. Foster, P. Crownover, R. LaBadie i P. Glue. “Pharmacokinetics and tolerability of voriconazole and a combination oral contraceptive co-administered in healthy female subjects”. *British journal of clinical pharmacology* 65.4 (2008), s. 531–539.
- [105] T. I. Saari, K. Laine, M. Neuvonen, P. J. Neuvonen i K. T. Olkkola. “Effect of voriconazole and fluconazole on the pharmacokinetics of intravenous fentanyl”. *European journal of clinical pharmacology* 64.1 (2008), s. 25–30.
- [106] V.-V. Hynninen, K. T. Olkkola, K. Leino, S. Lundgren, P. J. Neuvonen, A. Rane, M. Valtonen, H. Vyyryläinen i K. Laine. “Effects of the antifungals voriconazole and fluconazole on the pharmacokinetics of S-(+)-and R-(-)-ibuprofen”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50.6 (2006), s. 1967–1972.
- [107] P. Liu, G. Foster, R. LaBadie, E. Somoza i A. Sharma. “Pharmacokinetic interaction between voriconazole and methadone at steady state in patients on methadone therapy”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.1 (2007), s. 110–118.

- [108] T. I. Saari, K. Laine, K. Leino, M. Valtonen, P. J. Neuvonen i K. T. Olkkola. “Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 79.4 (2006), s. 362–370.
- [109] N. M. Hagelberg, T. H. Nieminen, T. I. Saari, M. Neuvonen, P. J. Neuvonen, K. Laine i K. T. Olkkola. “Voriconazole drastically increases exposure to oral oxycodone”. *European journal of clinical pharmacology* 65.3 (2009), s. 263.
- [110] V.-V. Hynninen, K. Olkkola, L. Bertilsson, K. Kurkinen, P. Neuvonen i K. Laine. “Effect of terbinafine and voriconazole on the pharmacokinetics of the antidepressant venlafaxine”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 83.2 (2008), s. 342–348.
- [111] T. I. Saari, K. Laine, K. Leino, M. Valtonen, P. J. Neuvonen i K. T. Olkkola. “Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem in healthy subjects”. *British journal of clinical pharmacology* 63.1 (2007), s. 116–120.
- [112] M. Wenk, A. Droll i S. Krähenbühl. “Fast and reliable determination of the antifungal drug voriconazole in plasma using monolithic silica rod liquid chromatography”. *Journal of Chromatography B* 832.2 (2006), s. 313–316.
- [113] G. Khoshsorur, F. Fruehwirth i S. Zelzer. “Isocratic high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for simultaneous determination of levels of voriconazole and itraconazole and its hydroxy metabolite in human serum”. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 49.8 (2005), s. 3569–3571.
- [114] C. Michael, U. Bierbach, K. Frenzel, T. Lange, N. Basara, D. Niederwieser, C. Mauz-Körholz i R. Preiss. “Determination of saliva trough levels for monitoring voriconazole therapy in immunocompromised children and adults”. *Therapeutic drug monitoring* 32.2 (2010), s. 194–199.
- [115] L. J. Langman i F. Boakye-Agyeman. “Measurement of voriconazole in serum and plasma”. *Clinical biochemistry* 40.18 (2007), s. 1378–1385.
- [116] M. A. Thiel, A. S. Zinkernagel, J. Burhenne, C. Kaufmann i W. E. Haefeli. “Voriconazole concentration in human aqueous humor and plasma during

- topical or combined topical and systemic administration for fungal keratitis”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.1 (2007), s. 239–244.
- [117] R. Gage i D. A. Stopher. “A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma”. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 17.8 (1998), s. 1449–1453.
- [118] G. J. Pennick, M. Clark, D. A. Sutton i M. G. Rinaldi. “Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47.7 (2003), s. 2348–2350.
- [119] K. Y. Beste, O. Burkhardt i V. Kaefer. “Rapid HPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma”. *Clinica Chimica Acta* 413.1 (2012), s. 240–245.
- [120] B. Araujo, D. Conrado, E. Palma i T. Dalla Costa. “Validation of rapid and simple LC–MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma”. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 44.4 (2007), s. 985–990.
- [121] A. L. Crego, M. L. Marina i J. Lavandera. “Optimization of the separation of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis”. *Journal of Chromatography A* 917.1 (2001), s. 337–345.
- [122] S. Perea, G. J. Pennick, A. Modak, A. W. Fothergill, D. A. Sutton, D. J. Sheehan i M. G. Rinaldi. “Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44.5 (2000), s. 1209–1213.
- [123] K. Kahle, P. Langmann, D. Schirmer, U. Lenker, D. Keller, A. Helle, H. Klinker i W. J. Heinz. “Simultaneous determination of voriconazole and posaconazole concentrations in human plasma by high-performance liquid chromatography”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53.7 (2009), s. 3140–3142.
- [124] H. Egle, R. Trittler, A. König i K. Kümmerer. “Fast, fully automated analysis of voriconazole from serum by LC–LC–ESI–MS–MS with parallel column-switching technique”. *Journal of Chromatography B* 814.2 (2005), s. 361–367.

- [125] F. Pehourcq, C. Jarry i B. Bannwarth. “Direct injection HPLC micro method for the determination of voriconazole in plasma using an internal surface reversed-phase column”. *Biomedical chromatography* 18.9 (2004), s. 719–722.
- [126] R. J. Brüggemann, D. J. Touw, R. E. Aarnoutse, P. E. Verweij i D. M. Burger. “International interlaboratory proficiency testing program for measurement of azole antifungal plasma concentrations”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53.1 (2009), s. 303–305.
- [127] C. Michael, J. Teichert i R. Preiss. “Determination of voriconazole in human plasma and saliva using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”. *Journal of Chromatography B* 865.1 (2008), s. 74–80.
- [128] J. Alffenaar, A. Wessels, K. Van Hateren, B. Greijdanus, J. Kosterink i D. Uges. “Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS”. *Journal of Chromatography B* 878.1 (2010), s. 39–44.
- [129] V. Kohli, V. Taneja, P. Sachdev i R. Joshi. “Voriconazole in newborns”. *Indian pediatrics* 45.3 (2008), s. 236.
- [130] I. fan Kuo i M. H. Ensom. “Role of therapeutic drug monitoring of voriconazole in the treatment of invasive fungal infections”. *The Canadian journal of hospital pharmacy* 62.6 (2009), s. 469.
- [131] H. Y. Chu, R. Jain, H. Xie, P. Pottinger i D. N. Fredricks. “Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events”. *BMC infectious diseases* 13.1 (2013), s. 105.
- [132] T. A. Driscoll, C. Y. Lolie, H. Frangoul, R. A. Krance, E. Nemecek, J. Blumer, A. Arrieta, M. L. Graham, S. M. Bradfield, A. Baruch i P. Liu. “Comparison of pharmacokinetics and safety of voriconazole intravenous-to-oral switch in immunocompromised children and healthy adults”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55.12 (2011), s. 5770–5779.
- [133] J. Rengelshausen, M. Banfield, K.-D. Riedel, J. Burhenne, J. Weiss, T. Thomsen, I. Walter-Sack, W. E. Haefeli i G. Mikus. “Opposite effects of short-term and long-term St John’s wort intake on voriconazole pharmacokinetics”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 78.1 (2005), s. 25–33.

- [134] W. B. Park, N.-H. Kim, K.-H. Kim, S. H. Lee, W.-S. Nam, S. H. Yoon, K.-H. Song, P. G. Choe, N. J. Kim, I.-J. Jang, M.-d. Oh i K.-S. Yu. “The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial”. *Clinical Infectious Diseases* 55.8 (2012), s. 1080–1087.
- [135] M. Neely, A. Margol, X. Fu, M. van Guilder, D. Bayard, A. Schumitzky, R. Orbach, S. Liu, S. Louie i W. Hope. “Achieving target voriconazole concentrations more accurately in children and adolescents”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59.6 (2015), s. 3090–3097.
- [136] J. Guinea, P. Escribano, L. J. Marcos-Zambrano, T. Peláez, M. Kestler, P. Muñoz, A. Vena, F. López-Fabal i E. Bouza. “Therapeutic drug monitoring of voriconazole helps to decrease the percentage of patients with off-target trough serum levels”. *Sabouraudia* 54.4 (2016), s. 353–360.
- [137] B. Giusti, A. M. Gori, R. Marcucci, C. Saracini, I. Sestini, R. Paniccia, S. Valente, D. Antonucci, R. Abbate i G. F. Gensini. “Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10+ 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients”. *Pharmacogenetics and genomics* 17.12 (2007), s. 1057–1064.
- [138] S. C. Sim, C. Risinger, M.-L. Dahl, E. Aklillu, M. Christensen, L. Bertilsson i M. Ingelman-Sundberg. “A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 79.1 (2006), s. 103–113.
- [139] A. Szczeklik i P. Gajewski. *Choroby wewnętrzne: kompendium medycyny praktycznej*. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, 2010.
- [140] R. Herbrecht, F. Tissot, S. Agrawal, L. Pagano, G. Pettrikos, C. Viscoli, A. Groll, A. Skiada, C. Lass-Flörl i T. Calandra. “Update of the ECIL guidelines for antifungal therapy in leukemia and HSCT patients (ECIL 5)”. *European conference on infections in leukaemia*. 2013.

- [141] A. Owusu Obeng, E. F. Egelund, A. Alsultan, C. A. Peloquin i J. A. Johnson. “CYP2C19 polymorphisms and therapeutic drug monitoring of voriconazole: are we ready for clinical implementation of pharmacogenomics?” *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 34.7 (2014), s. 703–718.

Spis rycin

1.	Pierścień imidazolu	4
2.	Pierścień triazolu	4
3.	Struktury chemiczne triazoli I generacji	4
4.	Struktury chemiczne triazoli II generacji	5
5.	Schemat syntezy ergosterolu [8]	6
6.	Schemat budowy komórki grzyba obrazujący miejsca działania leków przeciwgrzybiczych wg [12]	7
7.	Schemat metabolizmu worykonazolu przy udziale enzymów CYP450 [28]	12
8.	Mechanizm powstawania głównych metabolitów worykonazolu: N-tlenku (A) i OH-worykonazolu (B) [31]	14
9.	Poziomy worykonazolu u dzieci	52
10.	Poziomy worykonazolu u dorosłych	53
11.	Poziomy worykonazolu u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J.)	54
12.	Analiza próbki osocza chorego dziecka W.B. (A) w 6 h po podaniu dawki 200 mg i.v., nieobciążonej wzorcem wewnętrznym, oraz próby kontrolnej (B) o stężeniu $7,5 \mu\text{g/ml}$	55
13.	Chromatogramy HPLC-FLD uzyskane podczas analizy poziomów VCZ w osoczu dziecka (W.B.) 2 h (C), 6 h (D), 8 h (E), 12 h (F) po dożylnym podaniu dawki 200 mg	56
14.	Analiza próbki osocza osoby dorosłej J.B. (A) w 6 h po podaniu dawki 200 mg i.v., nieobciążonej wzorcem wewnętrznym, oraz próby kontrolnej (B) o stężeniu $2,5 \mu\text{g/ml}$	57

15. Chromatogramy HPLC-FLD uzyskane podczas analizy osocza osoby dorosłej (J.B.) 2 h (C), 6 h (D), 8 h (E), 12 h (F) po dożylnym podaniu dawki 200 mg	58
16. Wyniki stężeń minimalnych u dzieci	59
17. Wyniki stężeń minimalnych u dorosłych	59
18. Poziomy C_{min} VCZ u dzieci	60
19. Poziomy C_{min} VCZ u dorosłych	61
20. Poziomy C_{min} VCZ u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J.)	62
21. Zależność AUC_{ozn} od dawki dobowej VCZ u dzieci	69
22. Zależność AUC_{ozn} od dawki dobowej VCZ u dorosłych	70
23. Zależność AUC_{ozn} od dawki dobowej VCZ u dorosłych z wyłączeniem pacjenta (Ż.J.)	71
24. Zależność $t_{0,5}$ od dawki dobowej VCZ u dzieci	72
25. Zależność $t_{0,5}$ od dawki dobowej VCZ u dorosłych	73
26. Zmiany stężeń VCZ podczas czterech oznaczeń poziomów leku u dziecka W.B.	80
27. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dorosłego Ż.J.	81
28. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dziecka T.K.	83
29. Zmiany stężeń VCZ podczas oznaczeń poziomów leku u dorosłego J.B.	84
30. Wynik analizy produktu PCR dla allelu CYP2C19*2	88
31. Wynik analizy produktu PCR dla allelu CYP2C19*17	88
32. Wynik analizy polimorfizmu CYP2C19*2 po reakcji restrykcji enzymatycznej	89
33. Wynik analizy polimorfizmu CYP2C19*17 po reakcji restrykcji enzymatycznej	89

Spis tabel

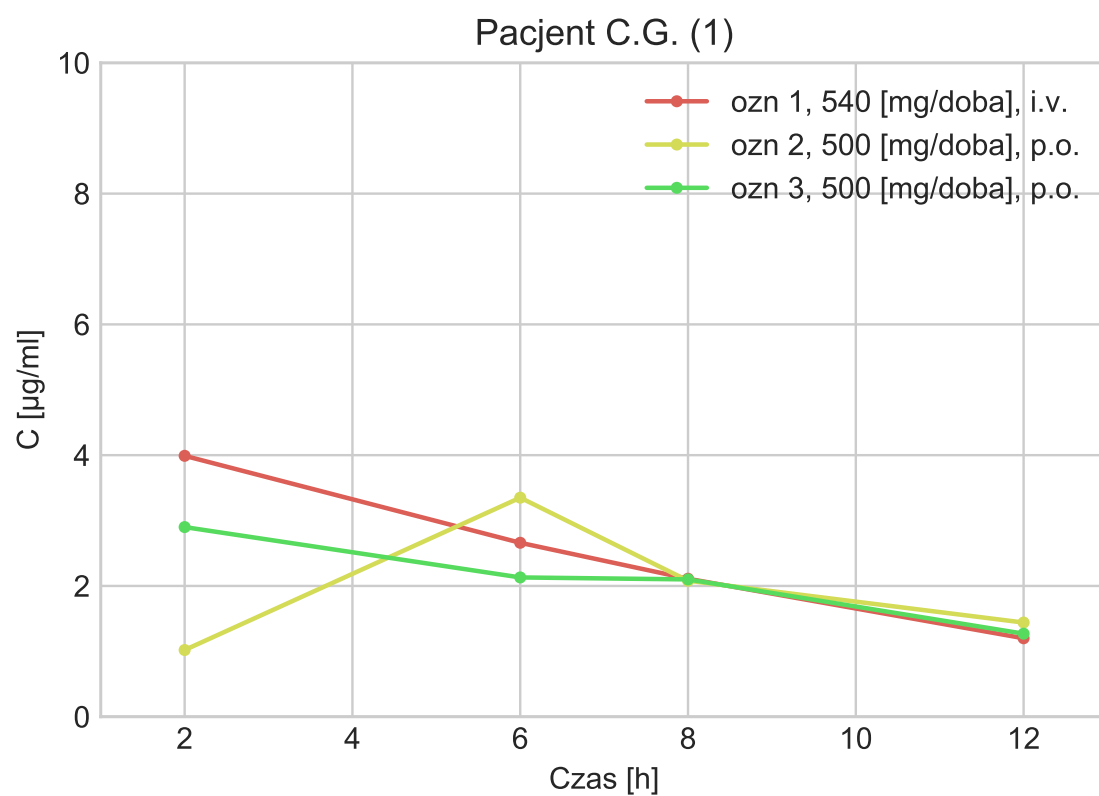
1.	Preparaty worykonazolu zarejestrowane na rynku polskim	8
2.	Aktywność in vitro worykonazolu wobec niektórych gatunków grzybów .	9
3.	Klasyfikacja rekomendacji według ECIL 3 [26]	11
4.	Rekomendacje do stosowania worykonazolu u chorych z neutropenią [27]	11
5.	Warianty genotypów CYP2C19 i odpowiadające im fenotypy	20
6.	Wykaz klinicznie istotnych substratów, induktorów i inhibitorów niektórych enzymów CYP450 [100]	25
7.	Najważniejsze interakcje worykonazolu z innymi lekami [58]	26
8.	Wpływ worykonazolu na AUC podawanych wraz z nim leków	27
9.	Metody oznaczania worykonazolu w różnych matrycach biologicznych . .	30
10.	Sekwencje starterów użytych w reakcji PCR	42
11.	Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji 2C19*2	43
12.	Skład mieszanin reakcyjnych do restrykcji CYP2C19*2	44
13.	Charakterystyka reakcji restrykcji 2C19*2	44
14.	Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji 2C19*17	45
15.	Skład mieszanin reakcyjnych do restrykcji CYP2C19*17	45
16.	Charakterystyka grupy badanej—dzieci	47
17.	Charakterystyka grupy badanej—dorośli	48
18.	Oznaczone poziomy worykonazolu u dzieci	50
19.	Oznaczone poziomy worykonazolu u dorosłych	51
20.	Wyniki stężeń minimalnych u dzieci i dorosłych	59
21.	Parametry biochemiczne dzieci	64
22.	Parametry biochemiczne dorosłych	65
23.	Obliczone parametry farmakokinetyczne AUC_{ozn} , k_{el} oraz $t_{0,5}$ u dzieci . .	67

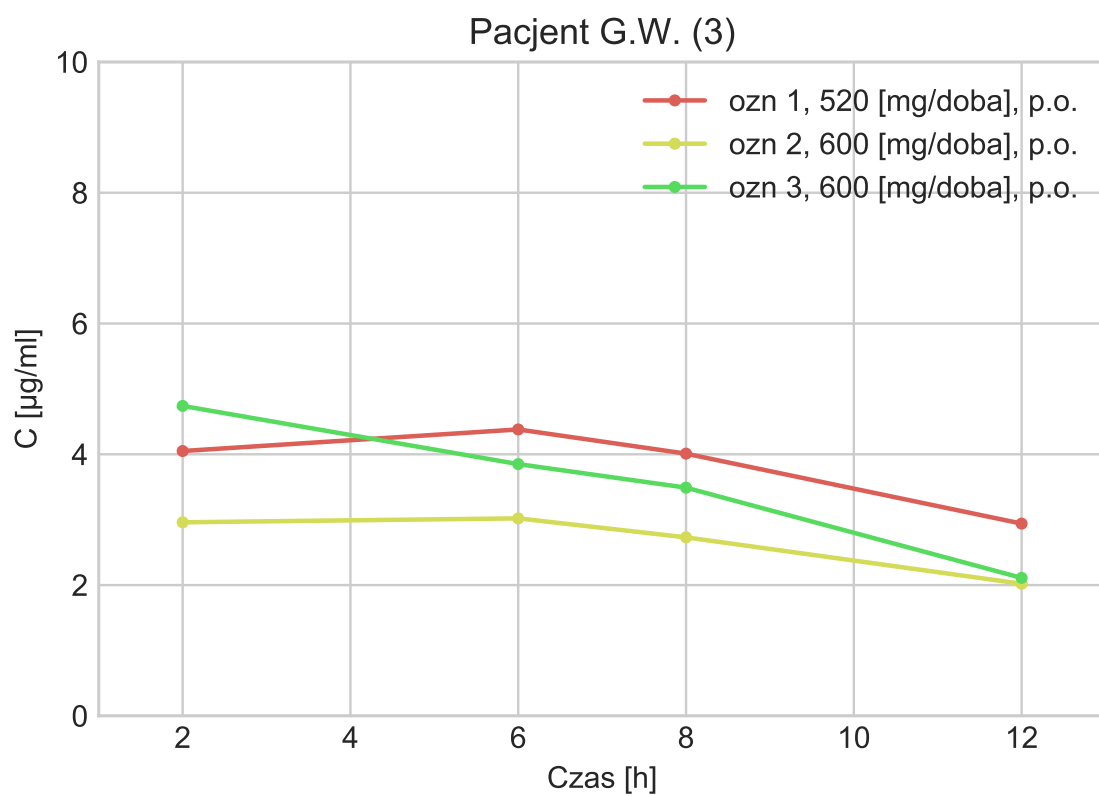
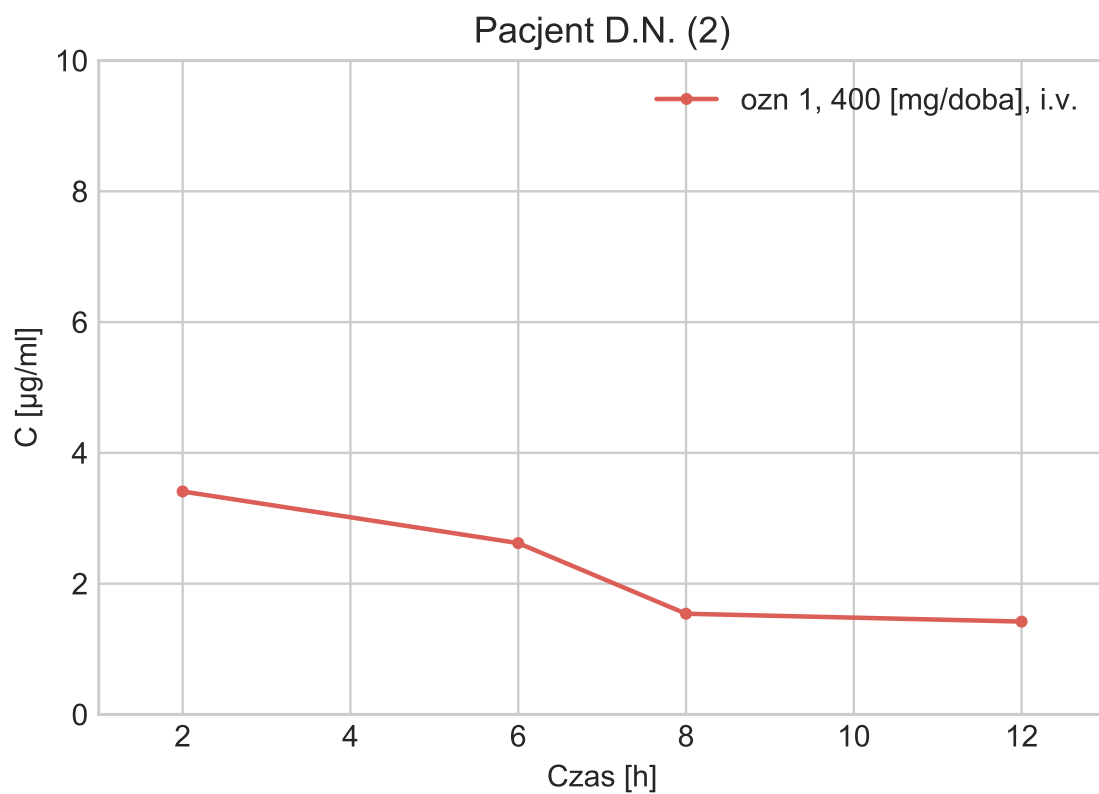
24. Obliczone parametry farmakokinetyczne AUC_{ozn} , $t_{0,5}$ oraz k_{el} u dorosłych	68
25. Leki przyjmowane wraz z VCZ u dzieci	74
26. Leki przyjmowane wraz z VCZ u dorosłych	77
27. Potencjalne interakcje leków stosowanych z VCZ u badanych pacjentów .	78
28. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dziecka (W.B.) - pacjent nr 22	80
29. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dorosłego (Ż.J.)—pacjent nr 13	81
30. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dziecka (T.K.)—pacjent nr 21	83
31. Wyniki oznaczeń poziomów VCZ u dorosłego (J.B.)—pacjent nr 1	84
32. Ocena efektywności leczenia przeciwgrzybiczego dzieci	86
33. Ocena efektywności leczenia przeciwgrzybiczego dorosłych	87
34. Wyniki analizy polimorfizmu CYP2C19 u dzieci i dorosłych	90
35. Porównanie C_{min} oraz parametrów farmakokinetycznych VCZ względem wieku i płci (test Manna-Whitneya)	92
36. Korelacja oznaczonych poziomów VCZ u dzieci i dorosłych z AUC_{ozn} oraz dawką dobową VCZ (test Pearsona)	92
37. Korelacja parametrów farmakokinetycznych ze stężeniem minimalnym (C_{min}) oraz dawką dobową u dzieci i dorosłych (test Pearsona)	92
38. Korelacja C_{min} oraz AUC_{ozn} u dzieci i dorosłych z parametrami biochemicznymi opisującymi funkcję wątroby (test Pearsona)	92
39. Korelacja oznaczonych poziomów VCZ oraz parametrów farmakokinetycznych u dzieci i dorosłych z drogą podania VCZ (test Spearmana)	93
40. Korelacja C_{min} oraz dawki dobowej VCZ u dzieci i dorosłych z efektem leczenia IFI (test Spearmana)	93
41. Korelacja C_{min} oraz AUC_{ozn} VCZ u dzieci i dorosłych z jednoczesną terapią cyklosporyną (test Spearmana)	93
42. Korelacja wyników genotypu pacjentów z oznaczonymi poziomami i parametrami farmakokinetycznymi VCZ (test Spearmana)	94

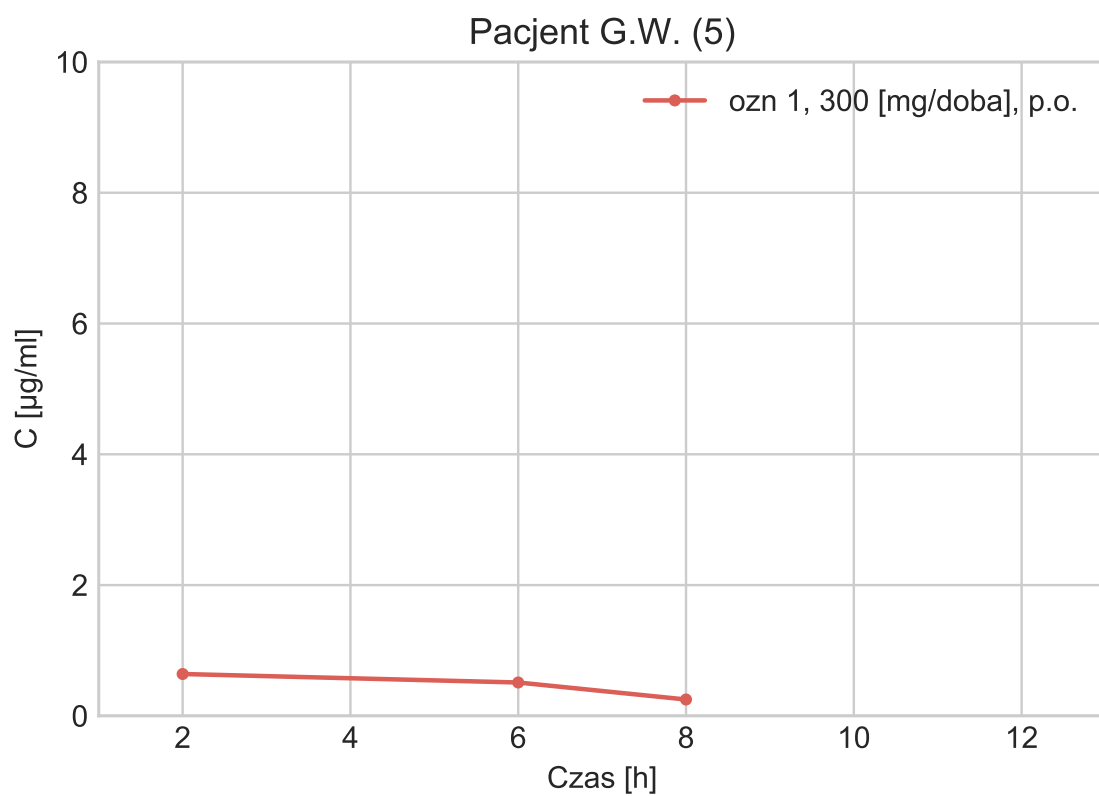
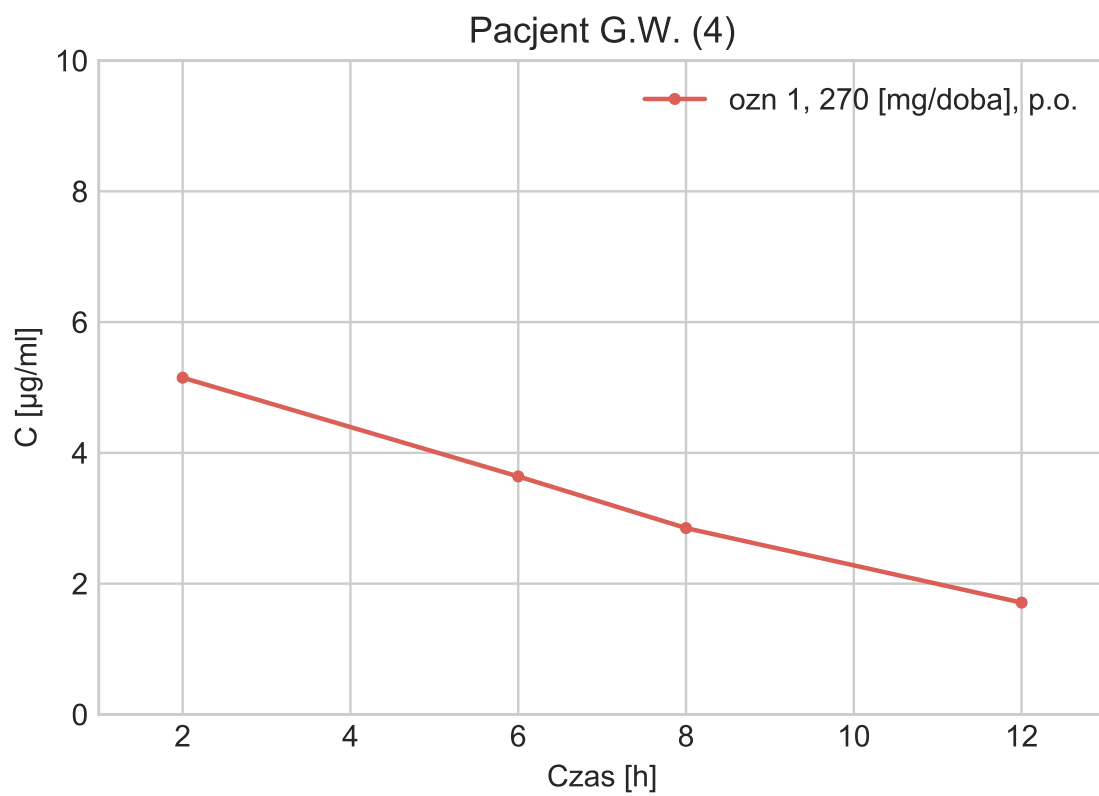
Wykaz Załączników

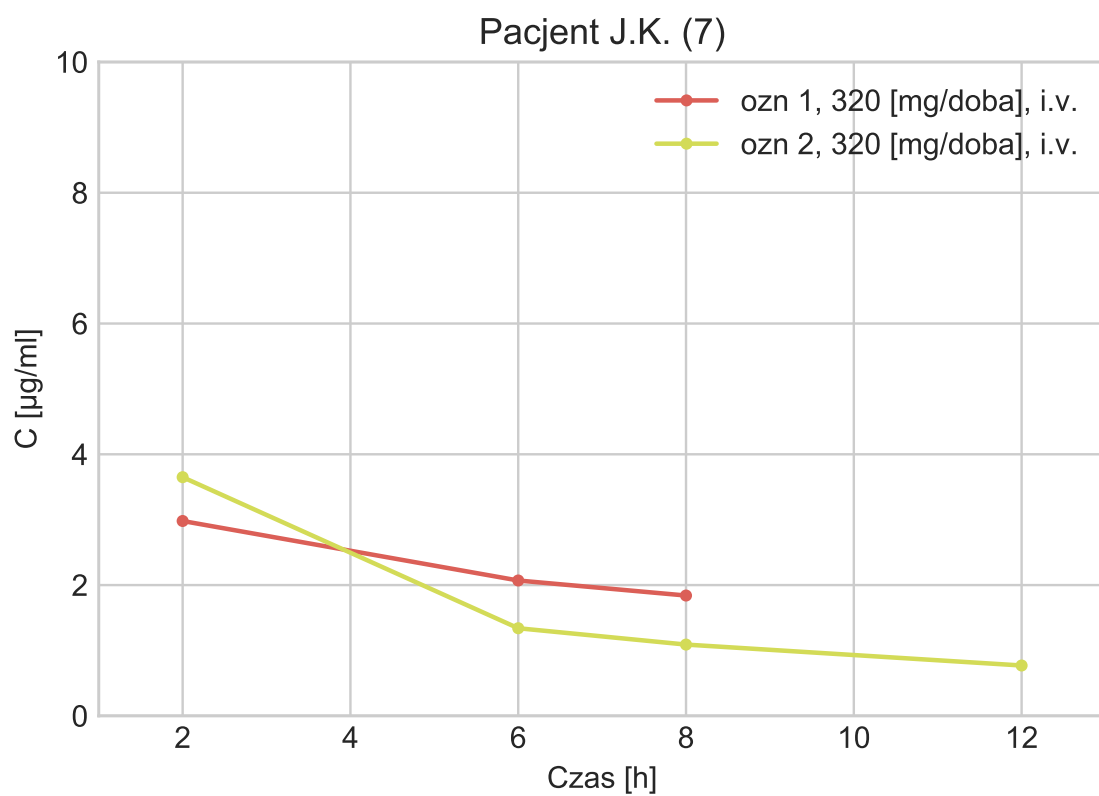
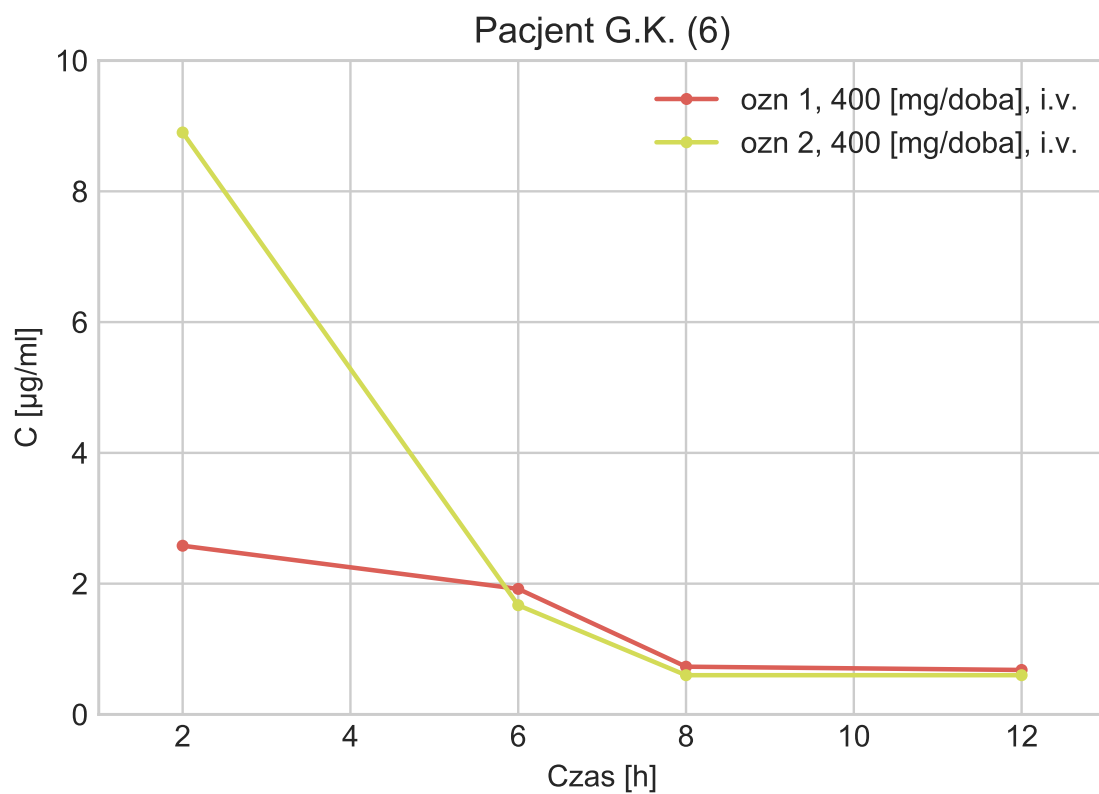
1	Wykresy zależności stężenia VCZ od czasu u dzieci	133
2	Wykresy zależności stężenia VCZ od czasu u dorosłych	145
3	Formularz świadomej zgody	152
4	Procedura pobierania próbek	156
5	Schemat blokowy- pobieranie próbek osocza pacjentów	157
6	Formularz wyniku dla szpitala	158
7	Karta danych pacjenta	159
8	Uchwały Komisji Bioetycznej	160

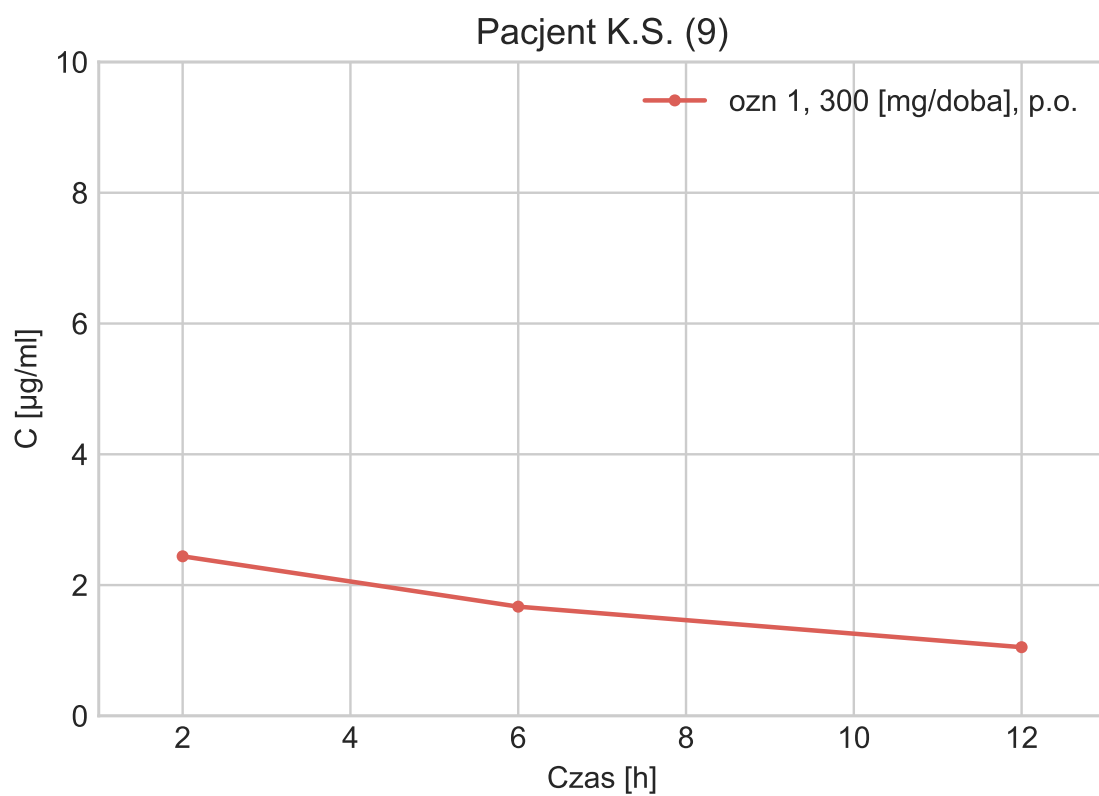
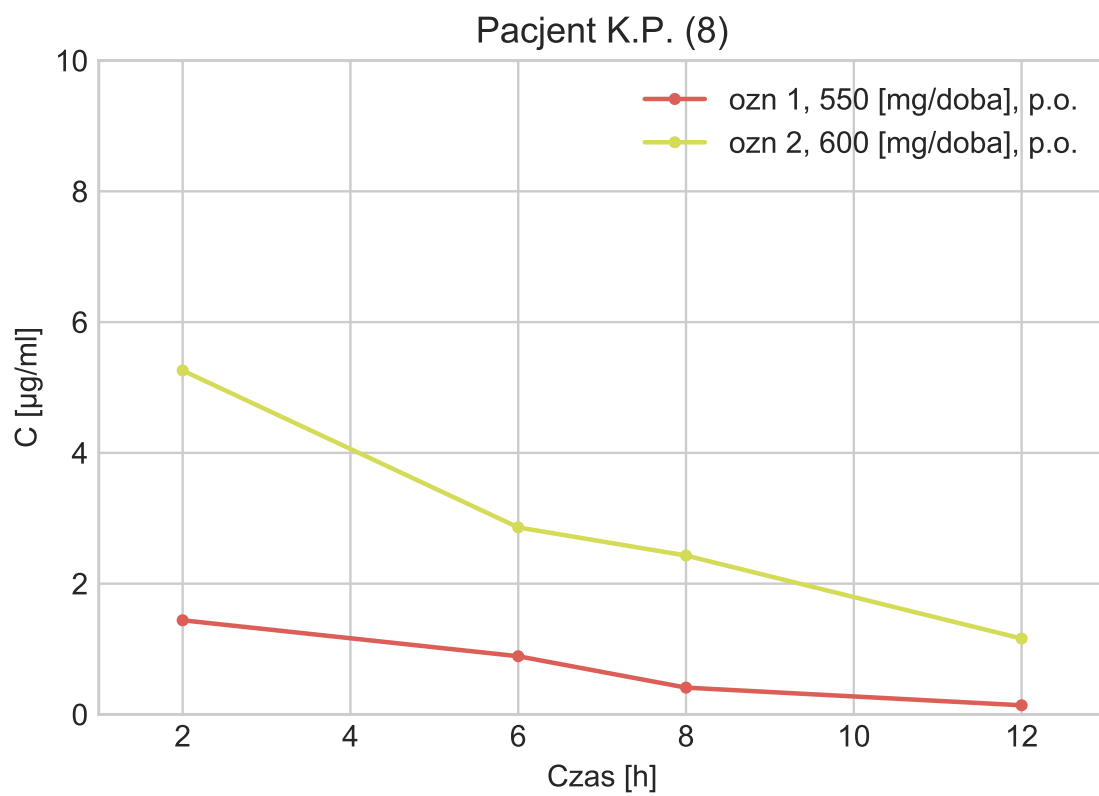
Pacjenci dzieci 1-23

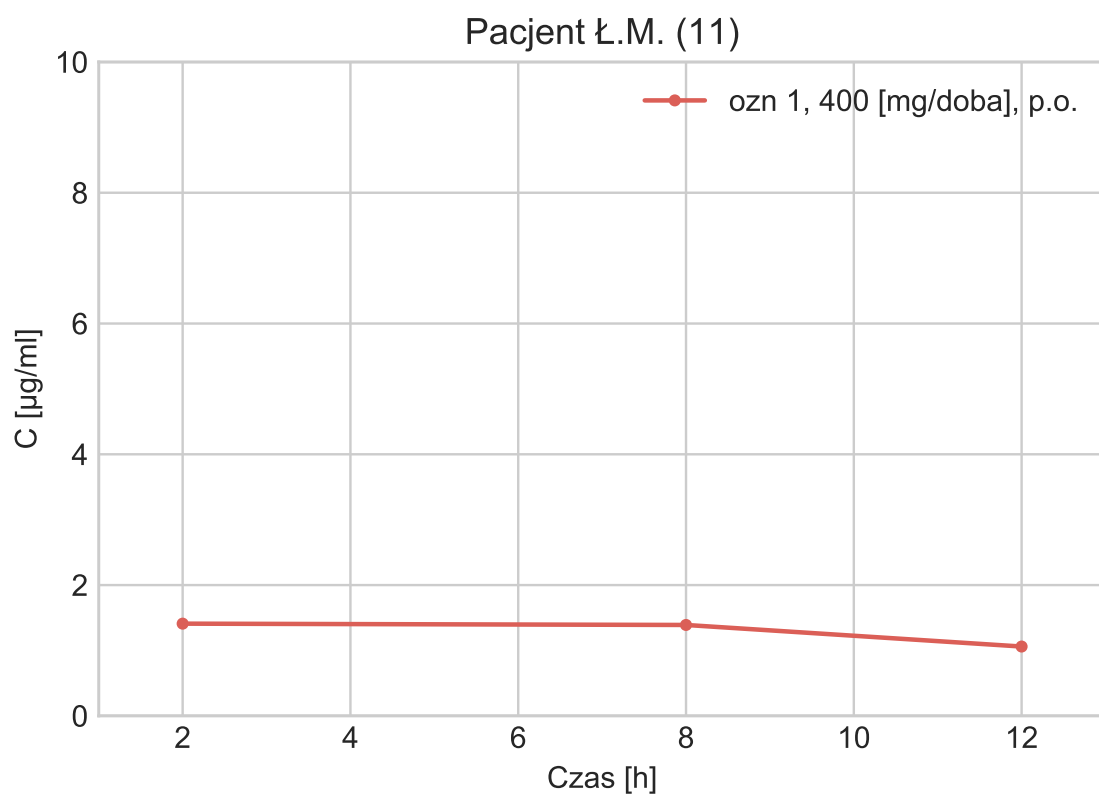
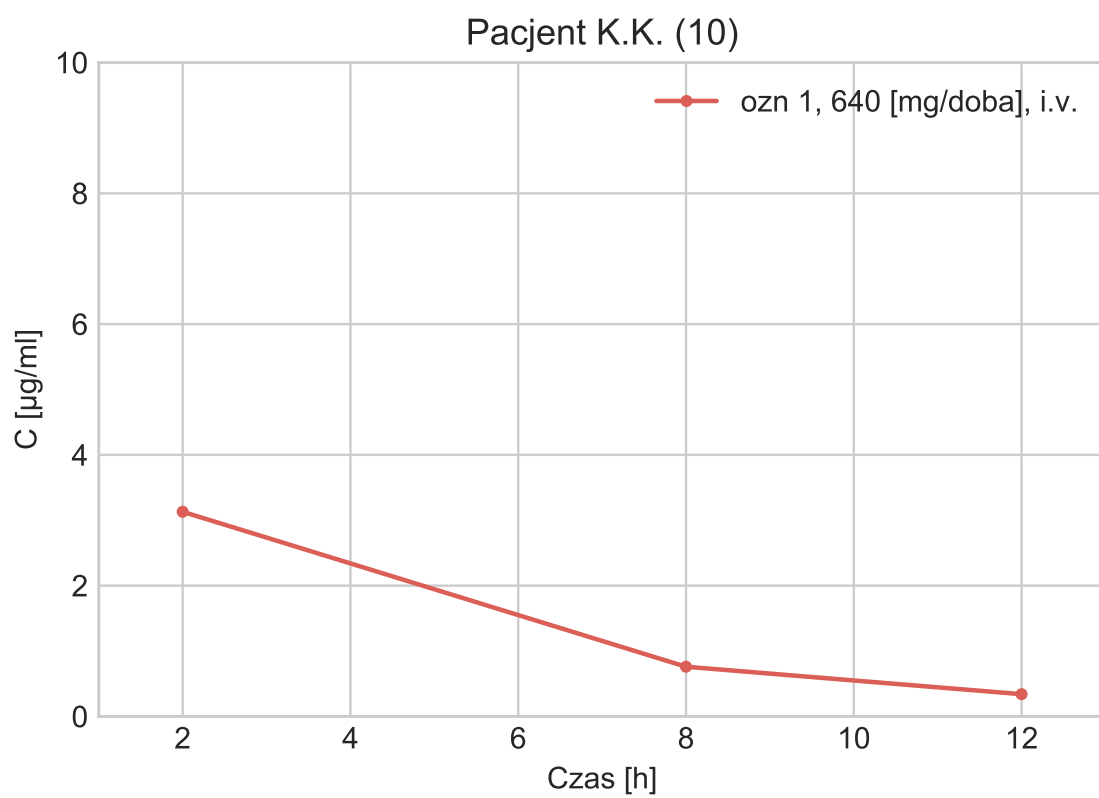


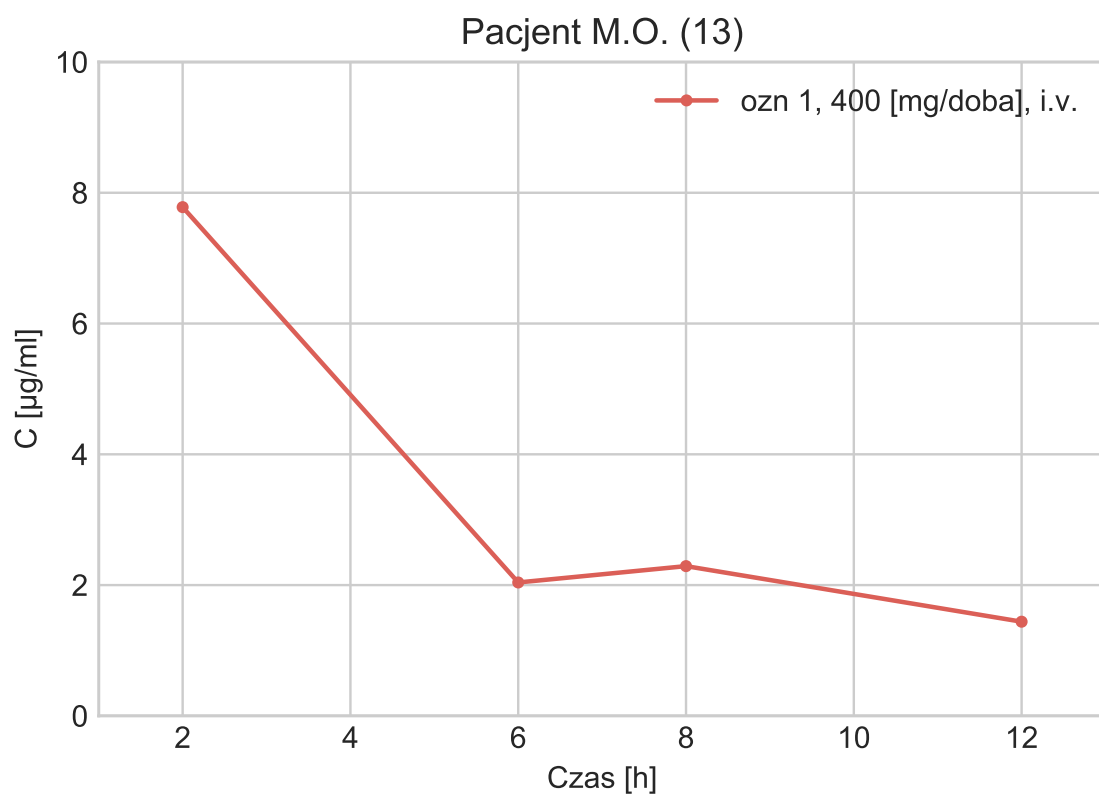
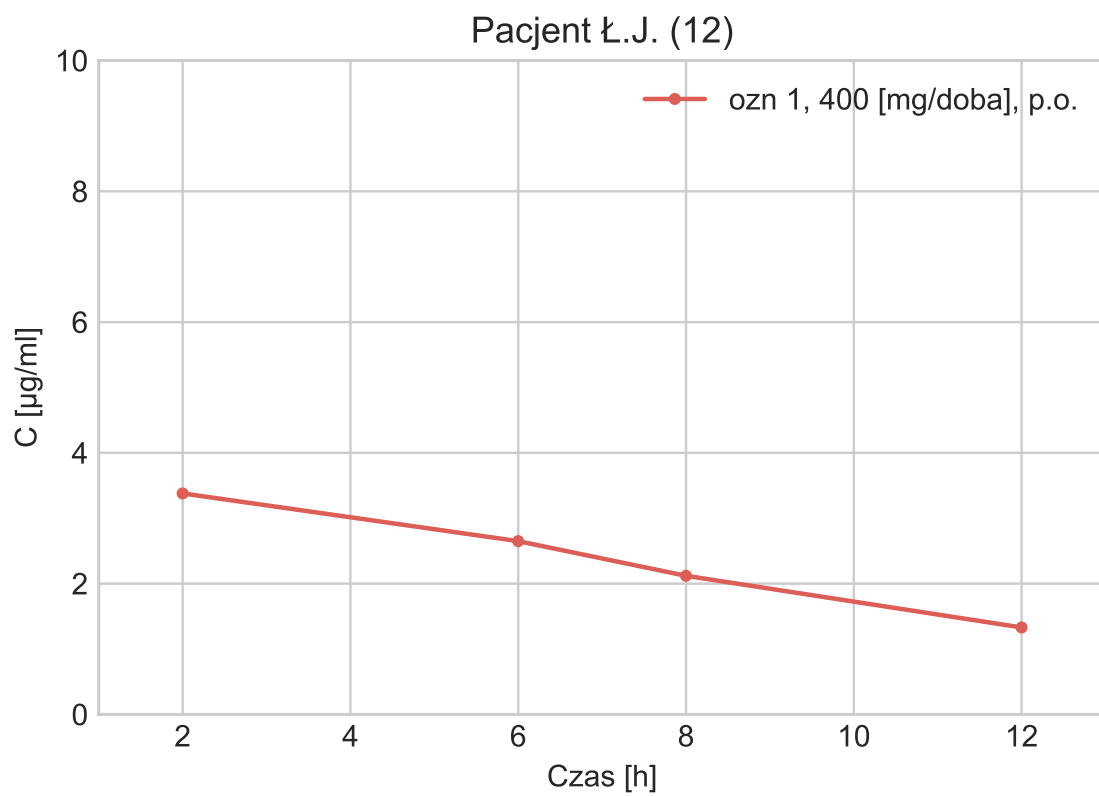


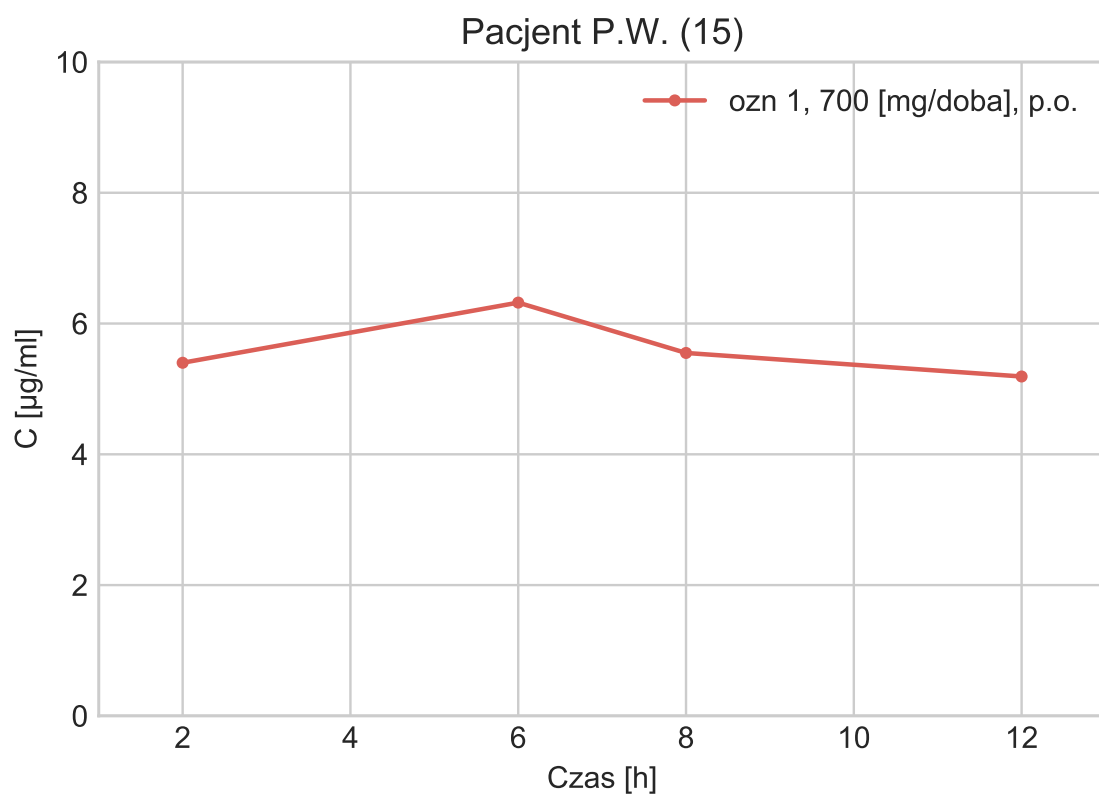
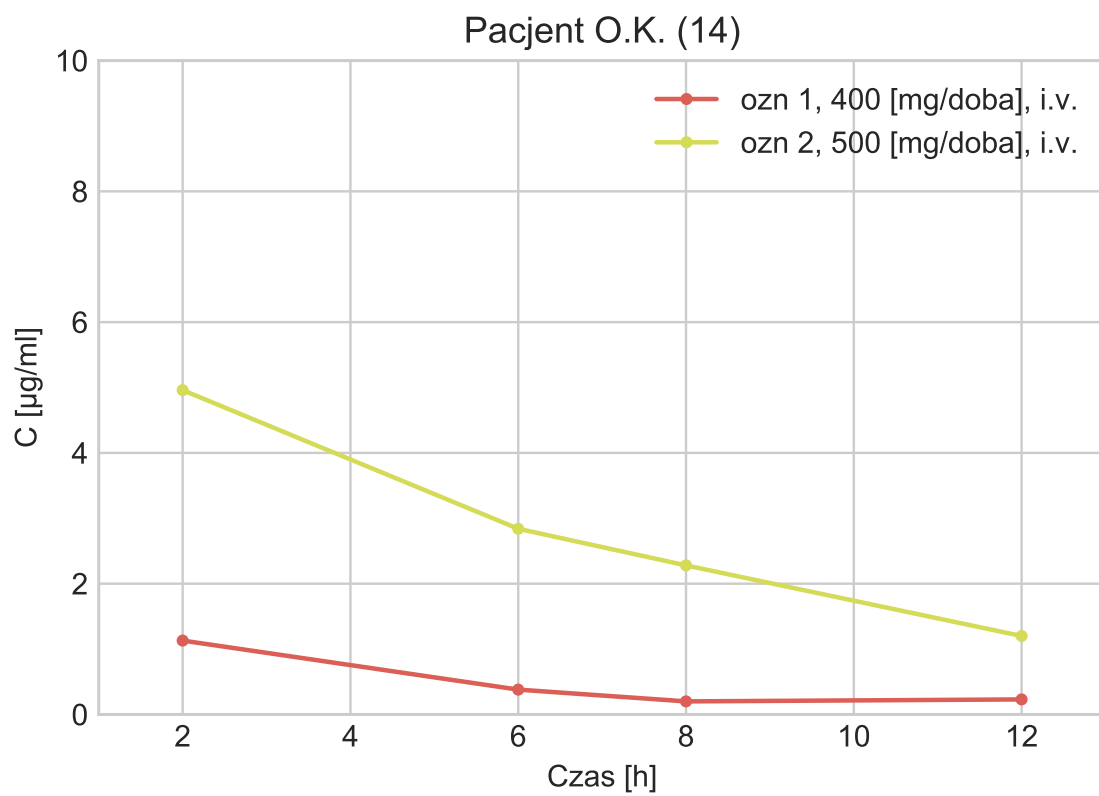


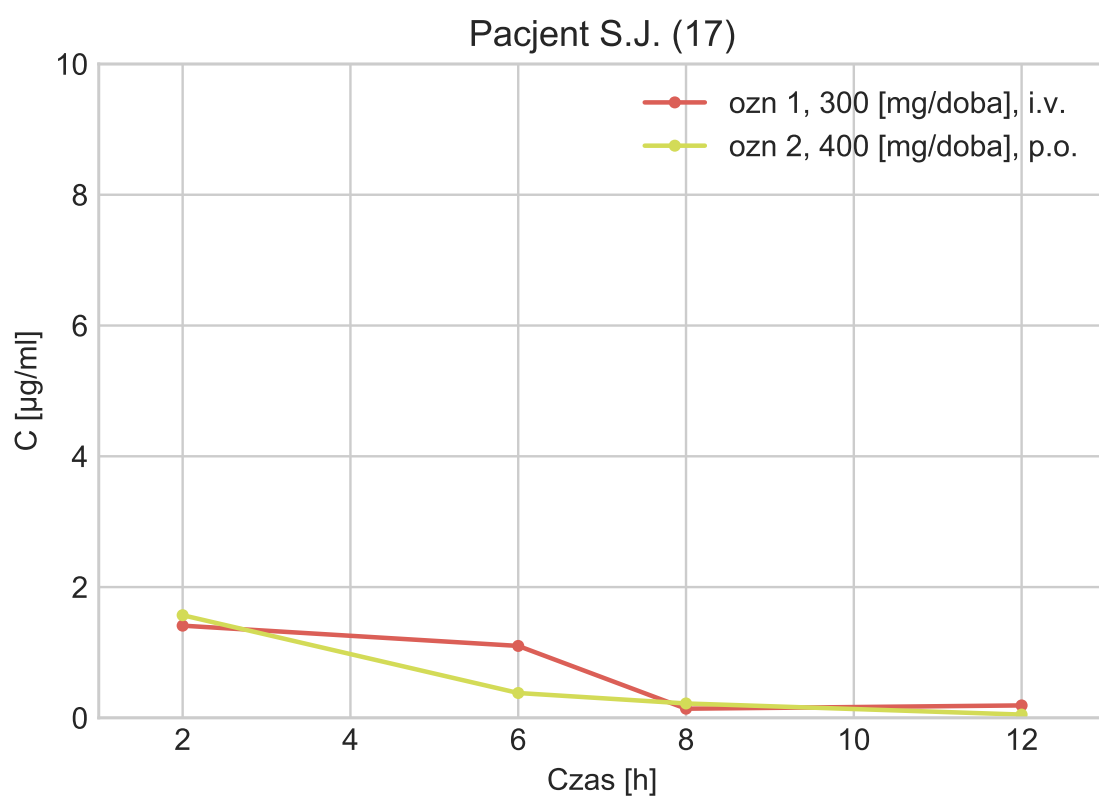
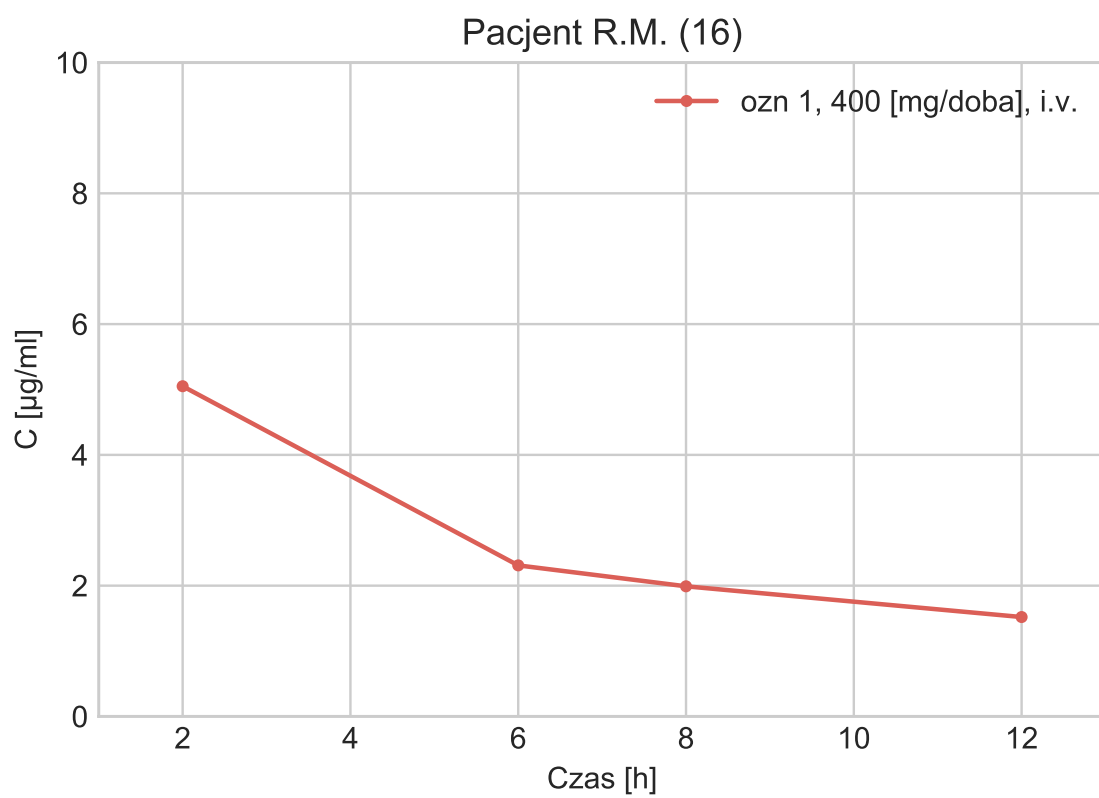


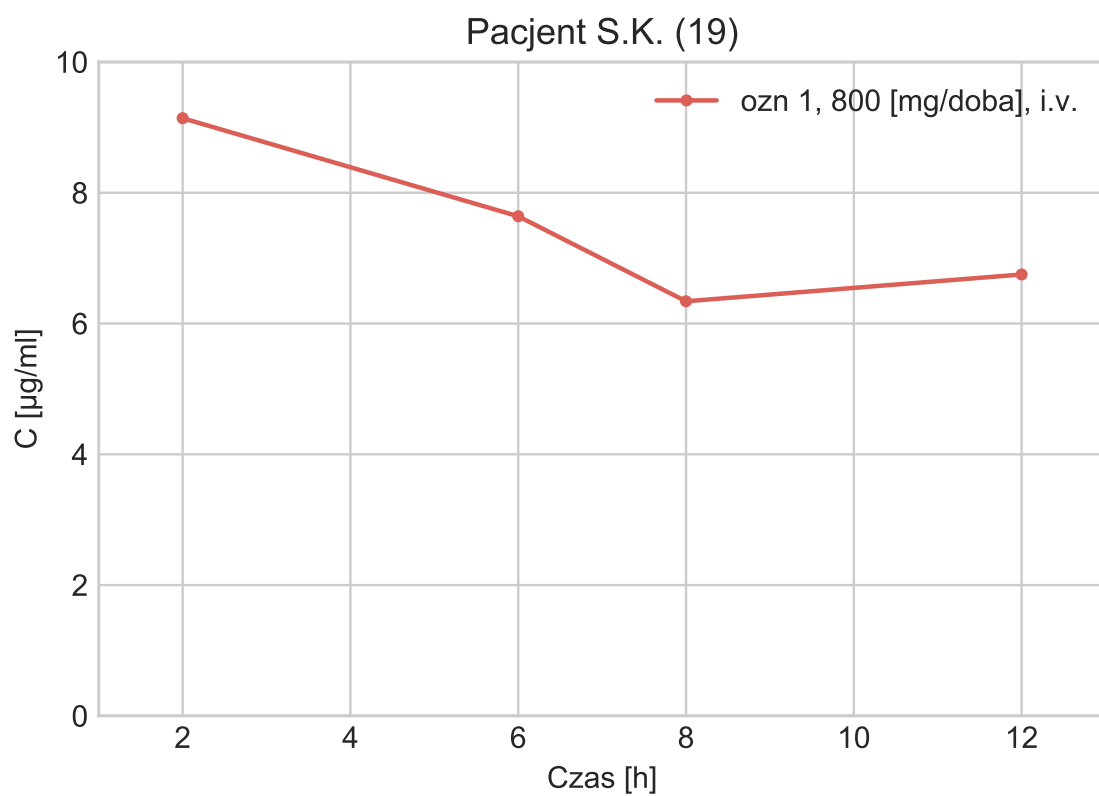
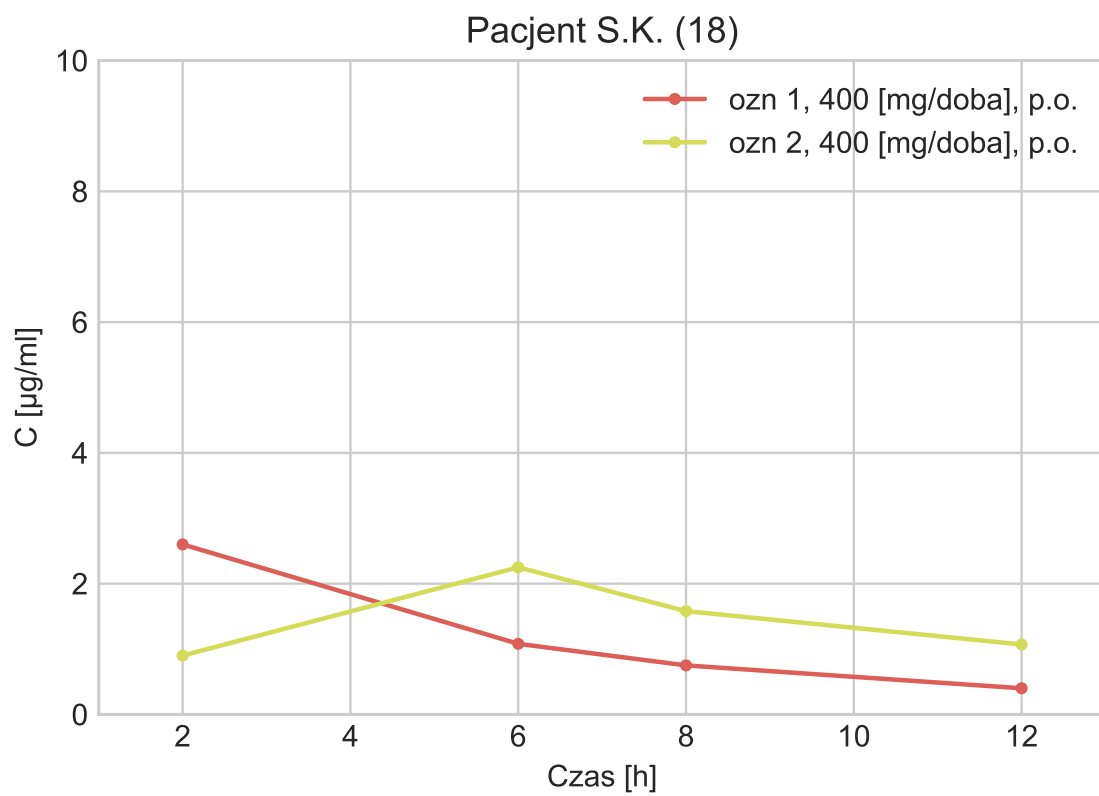


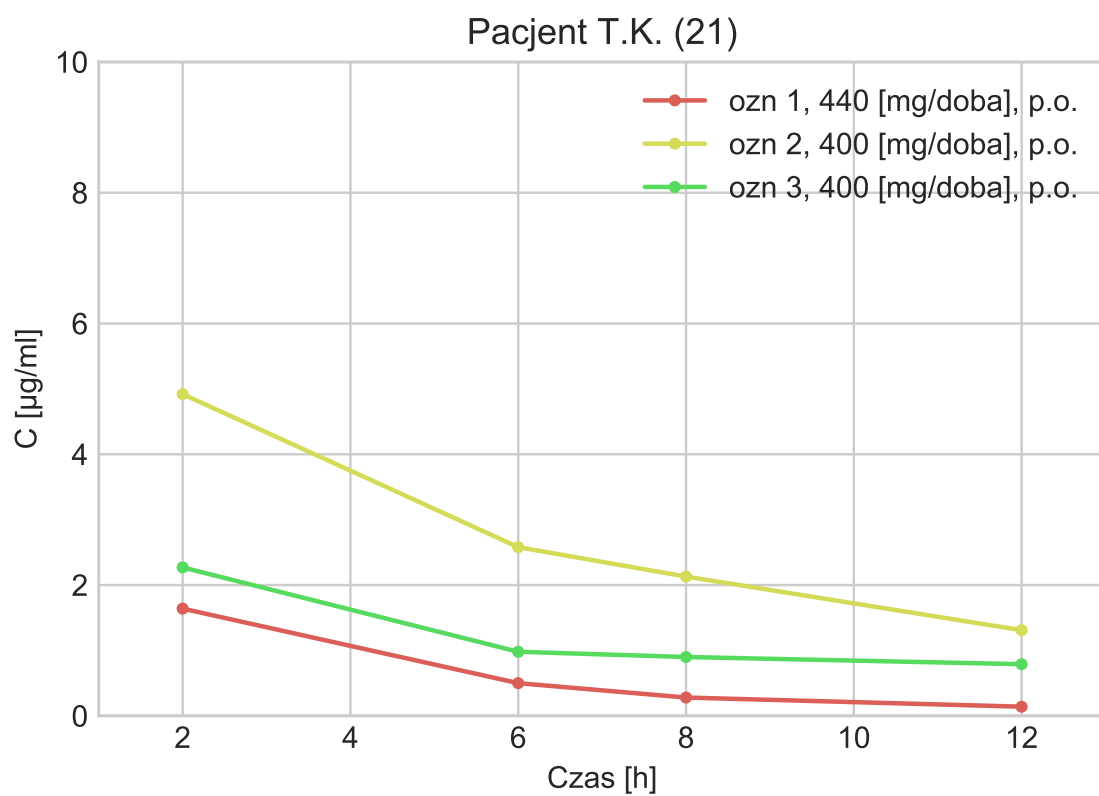
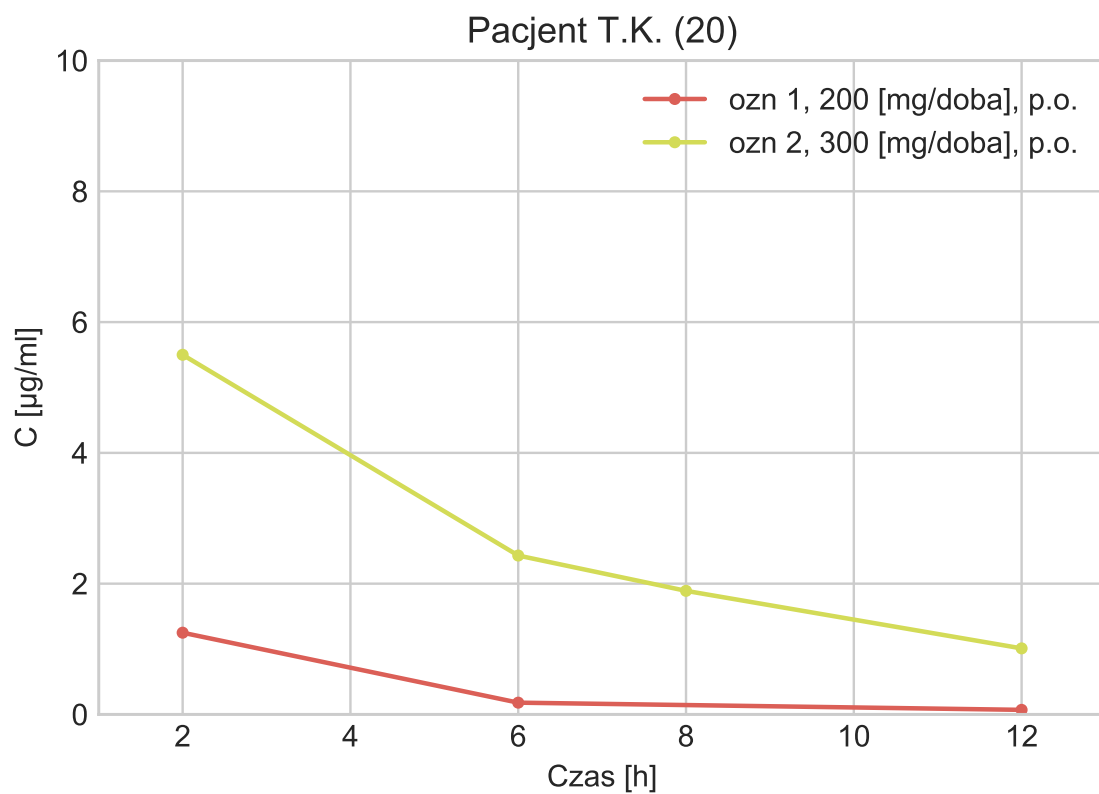


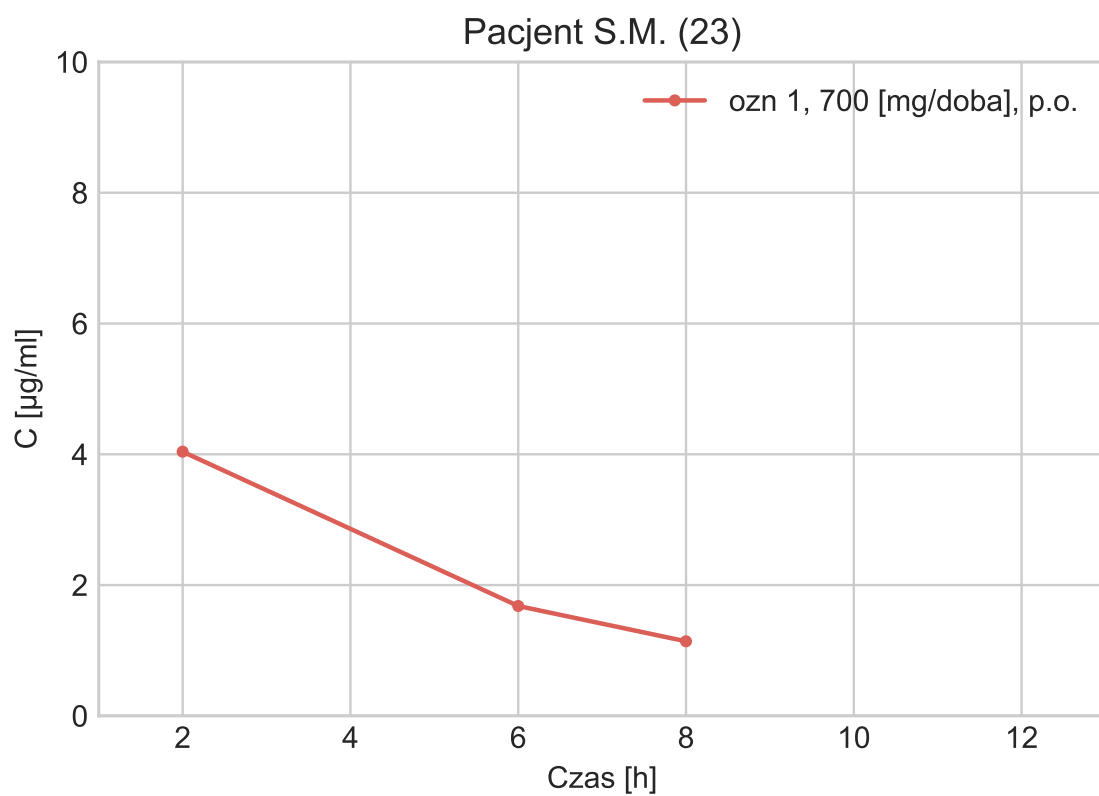
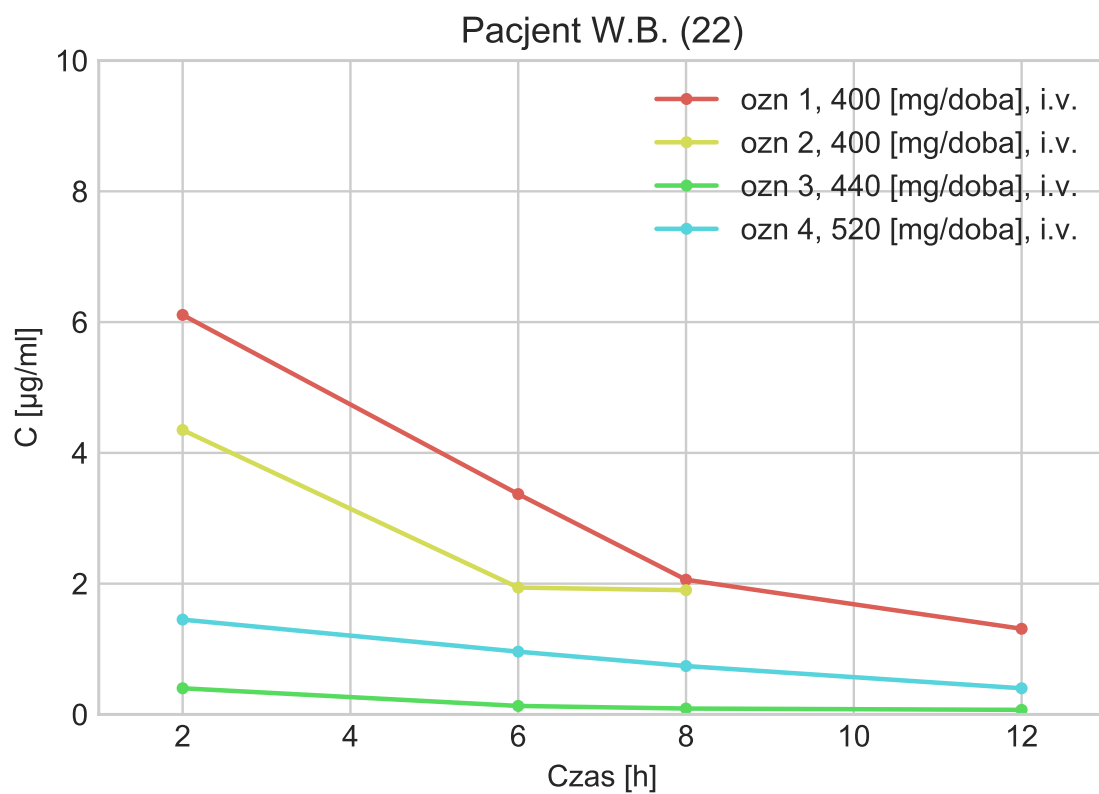




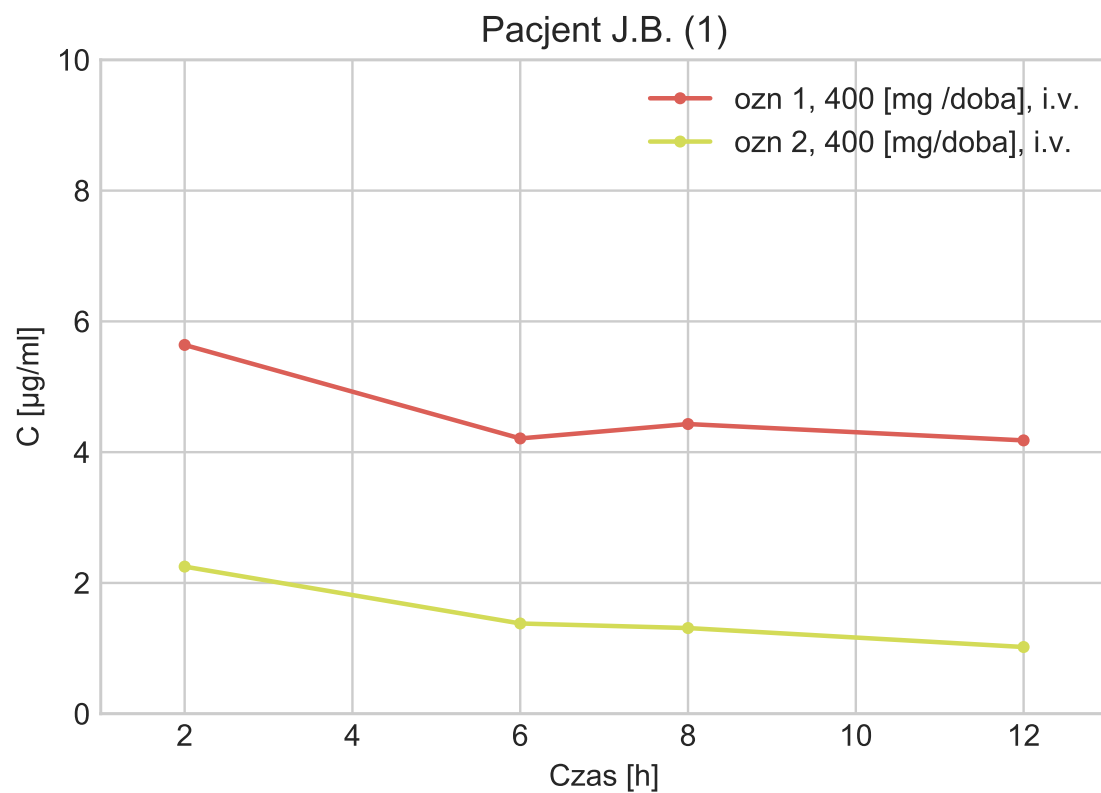


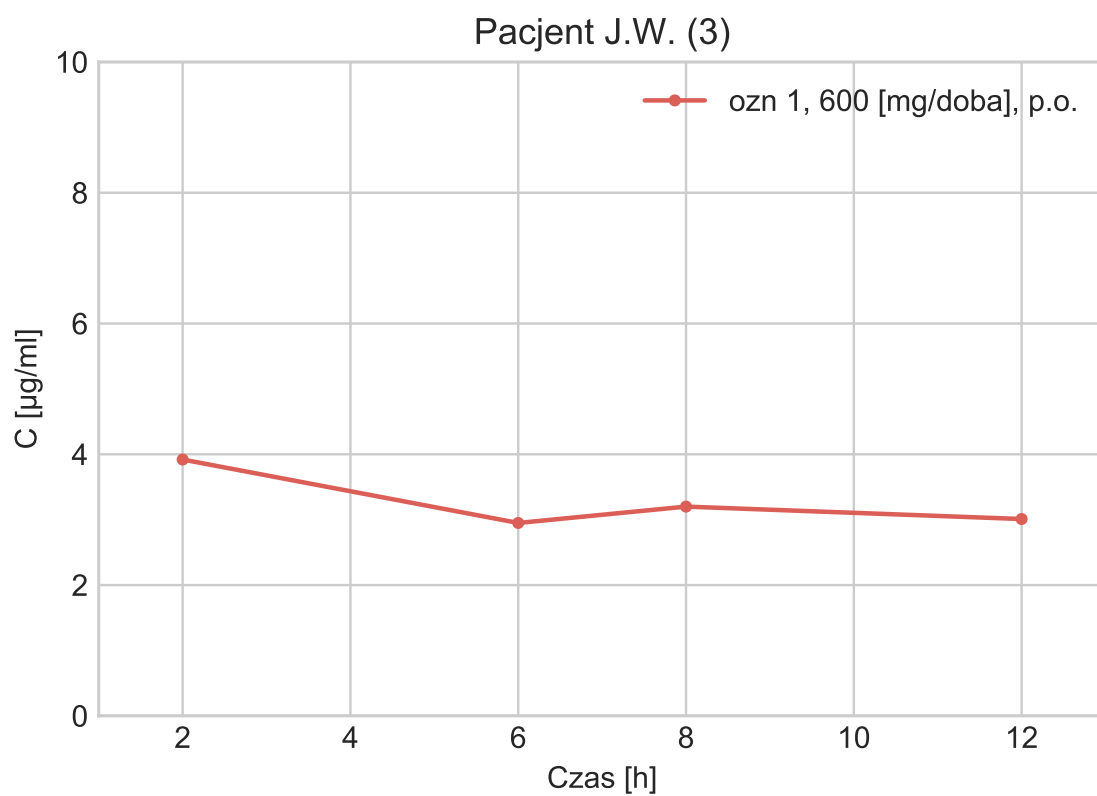
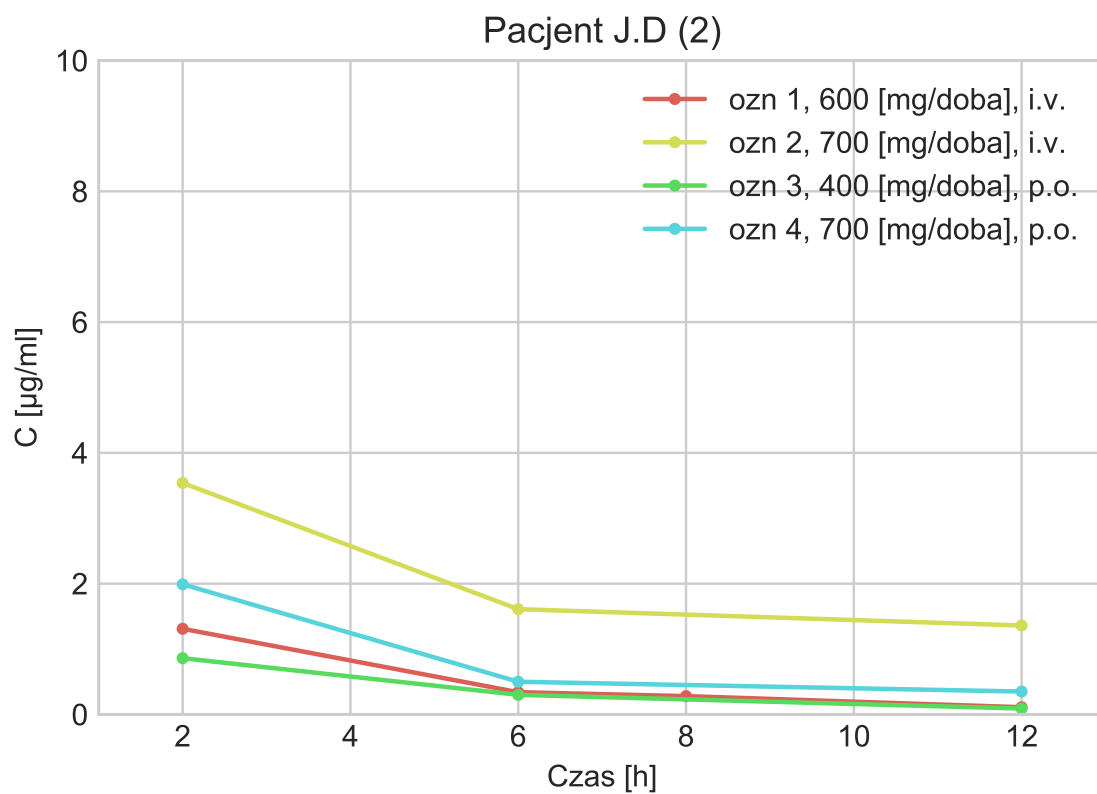


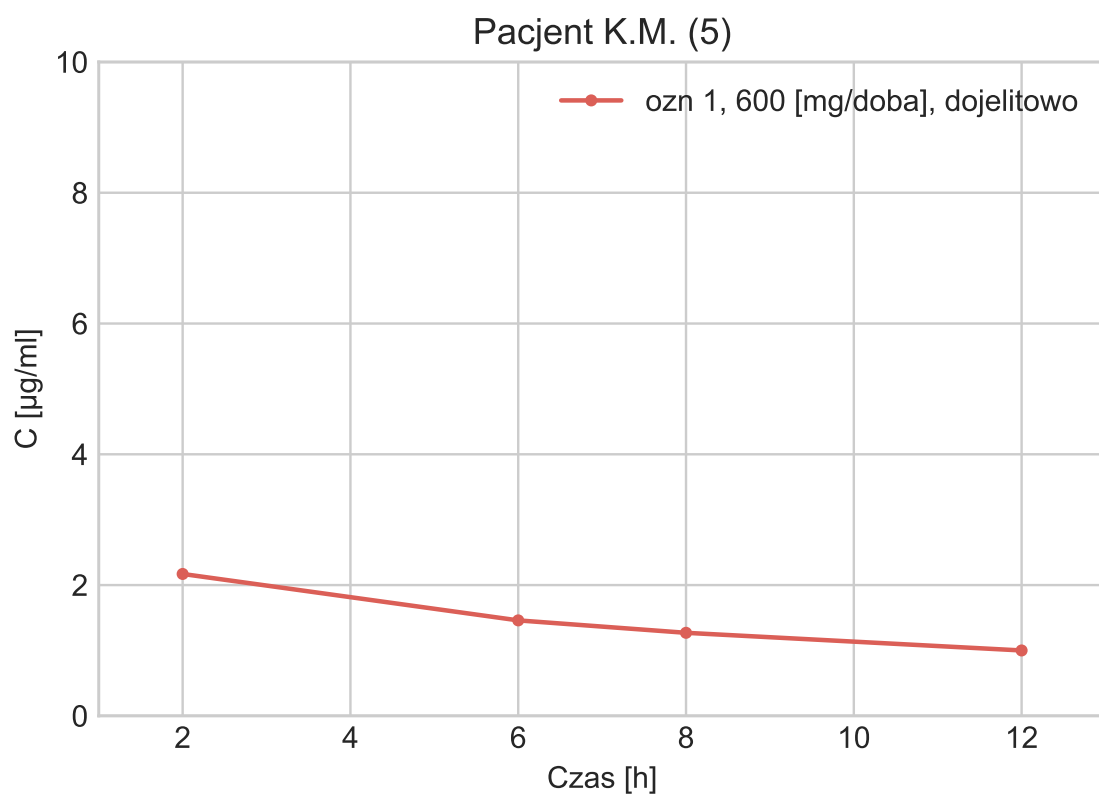
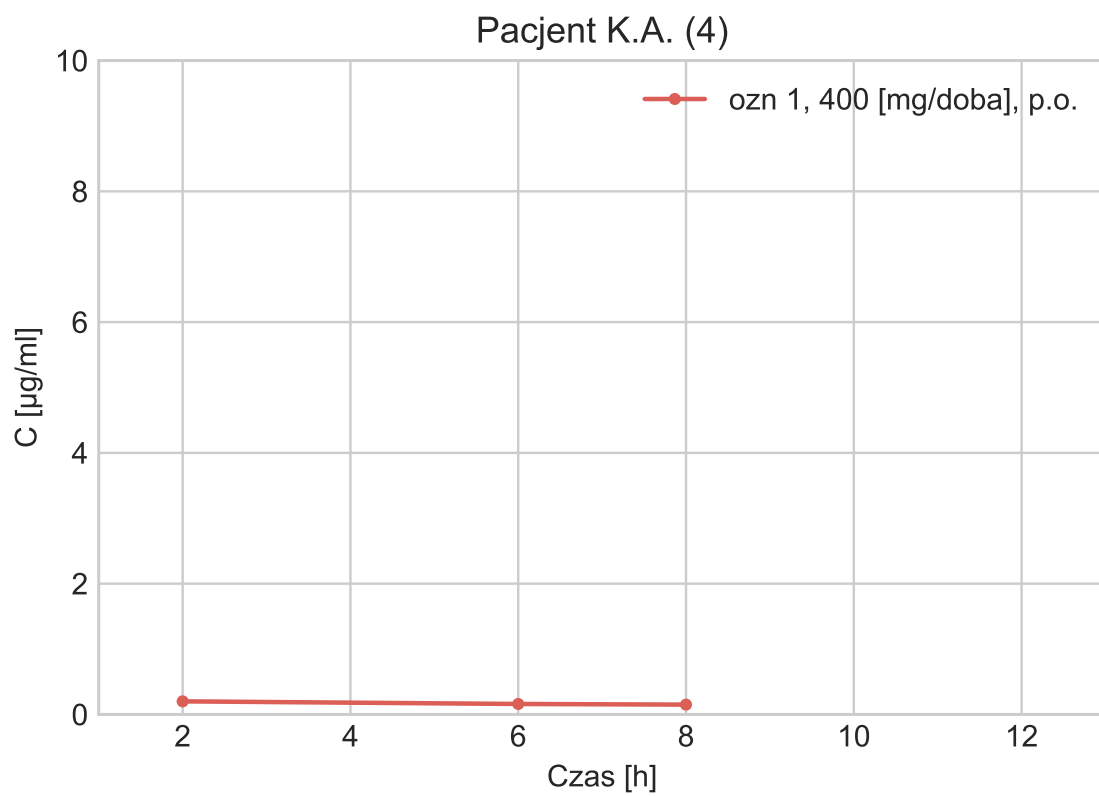


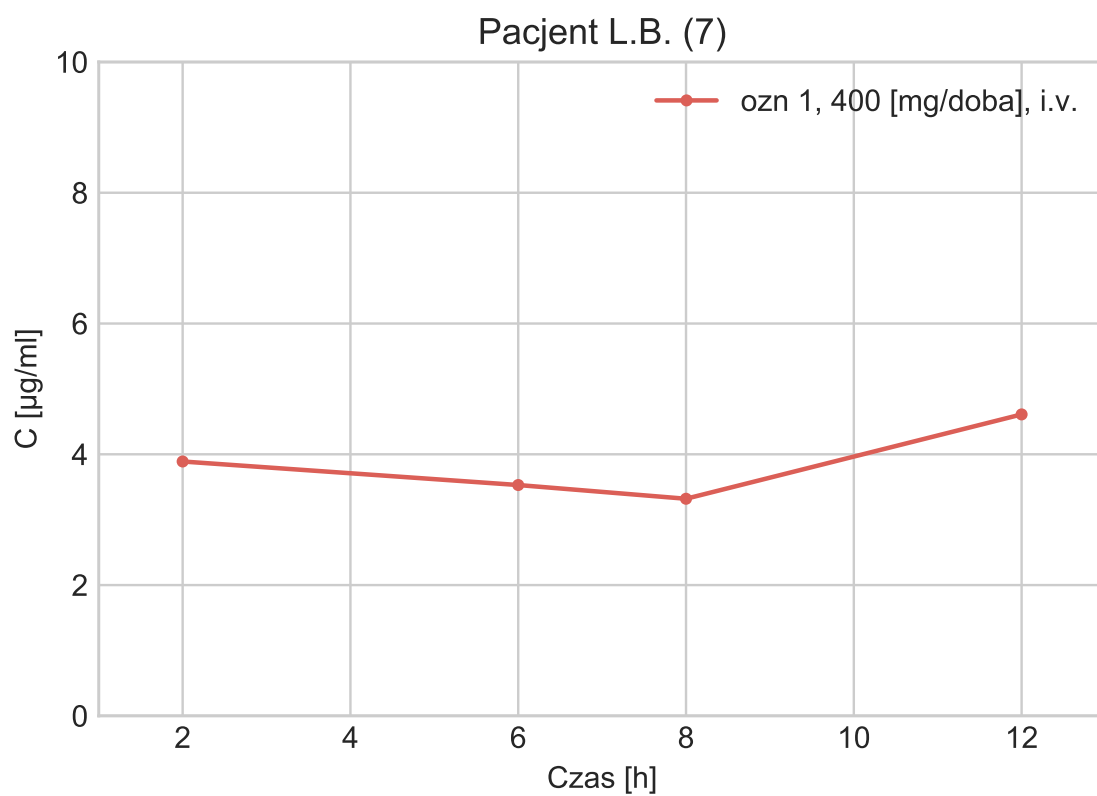
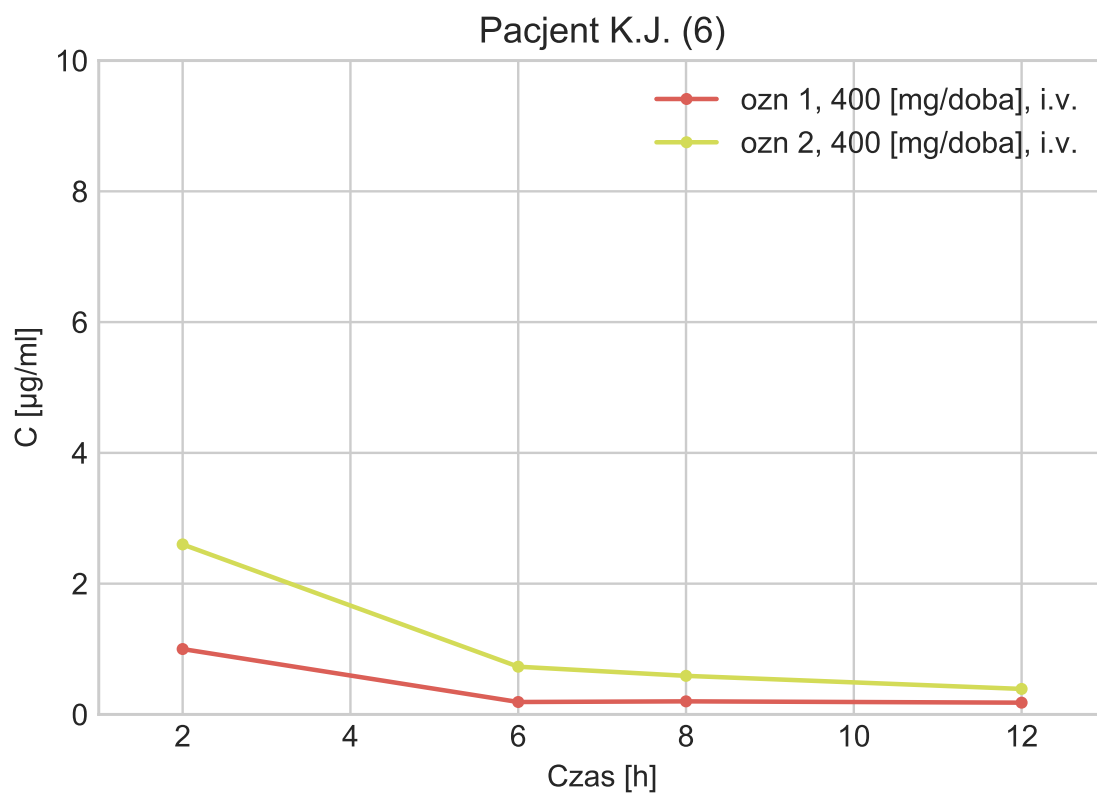


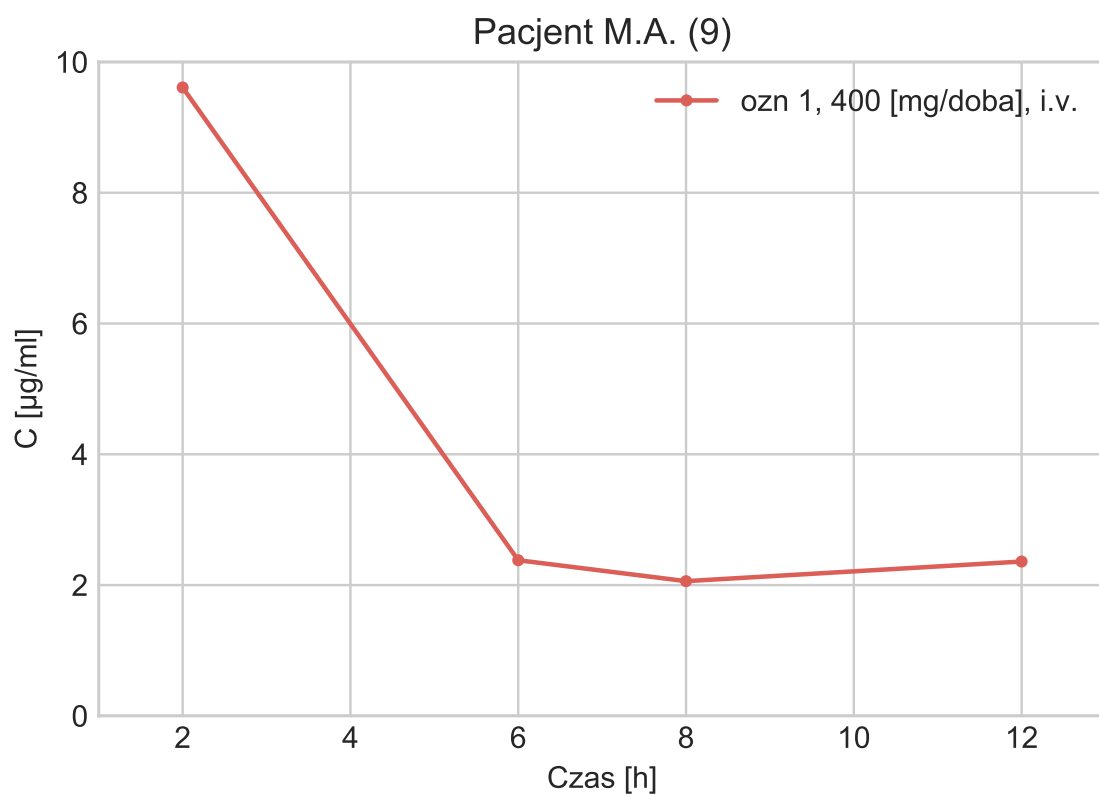
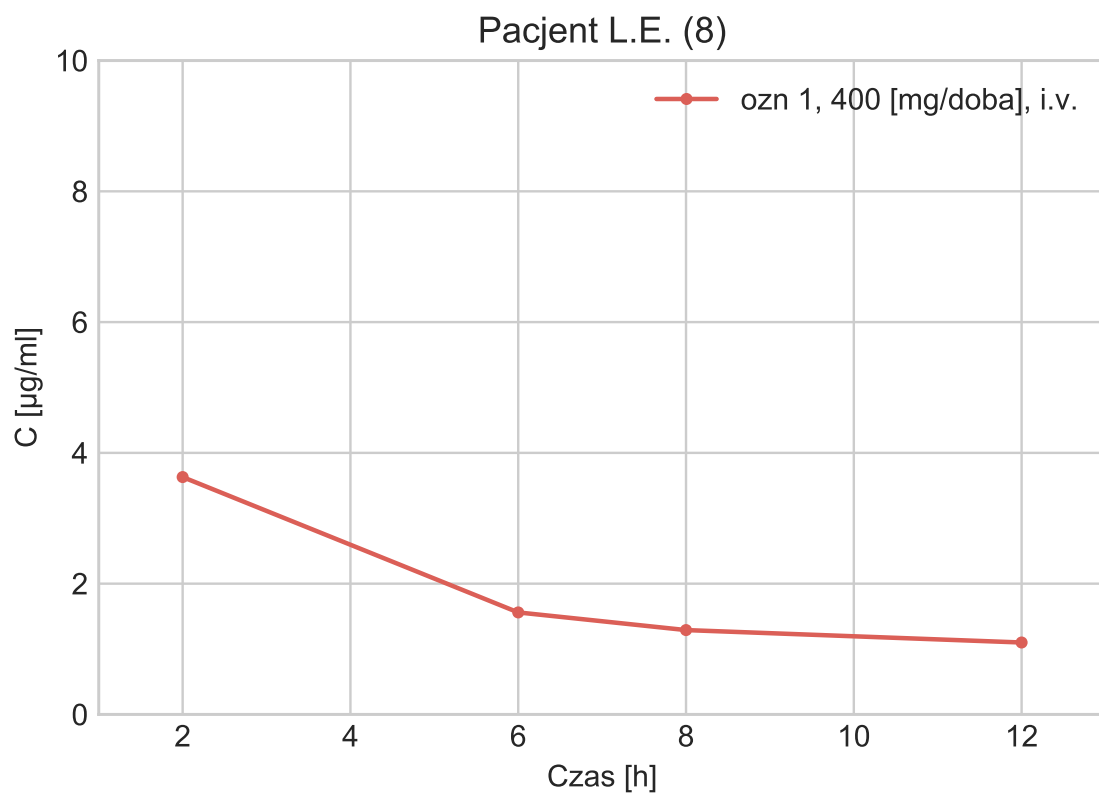
Pacjenci dorośli 1-13

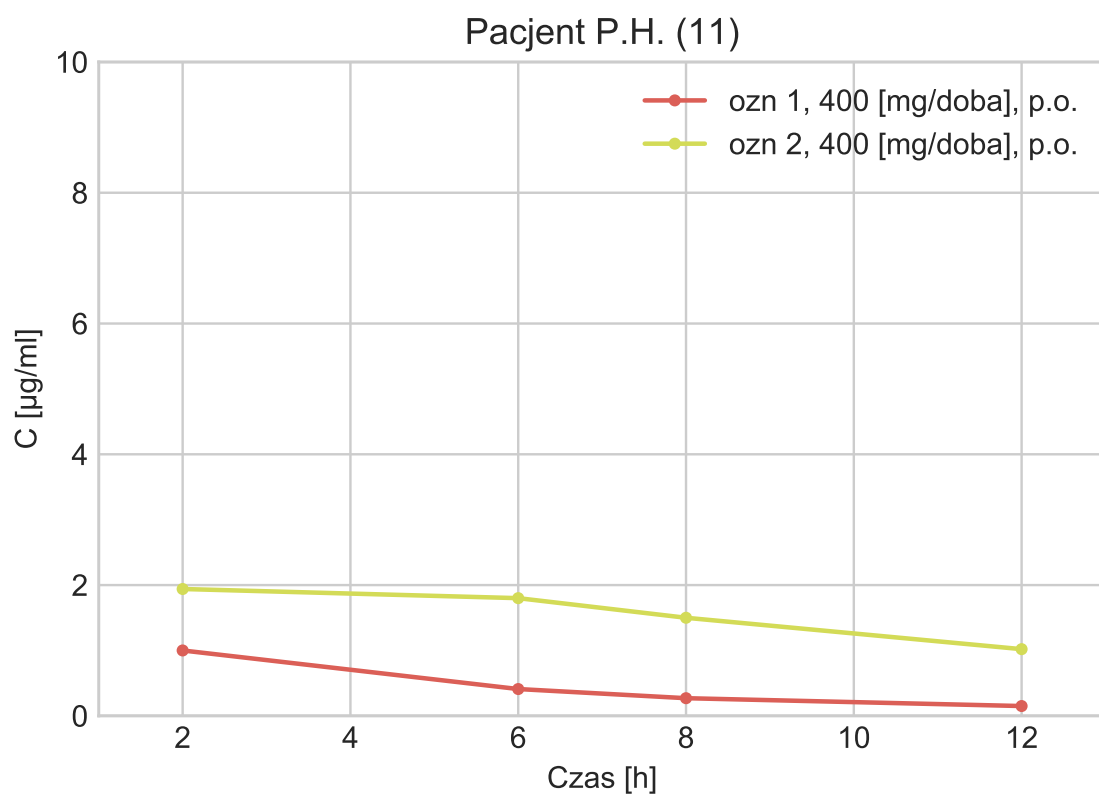
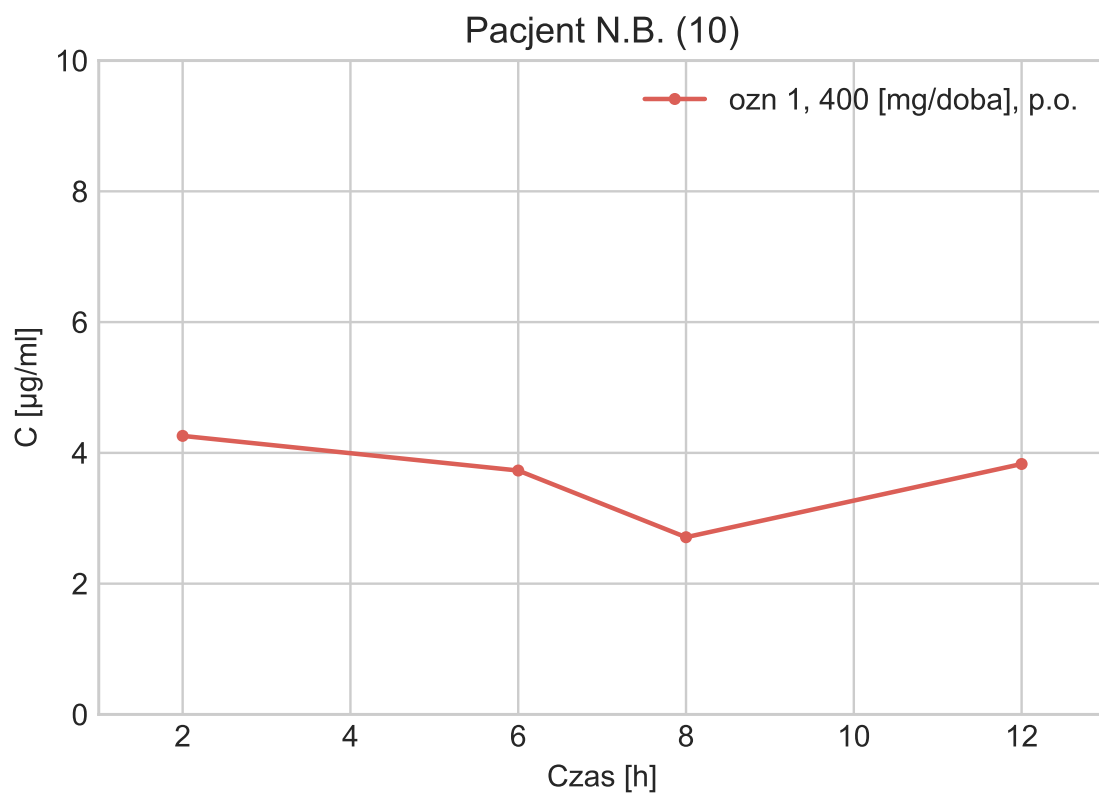


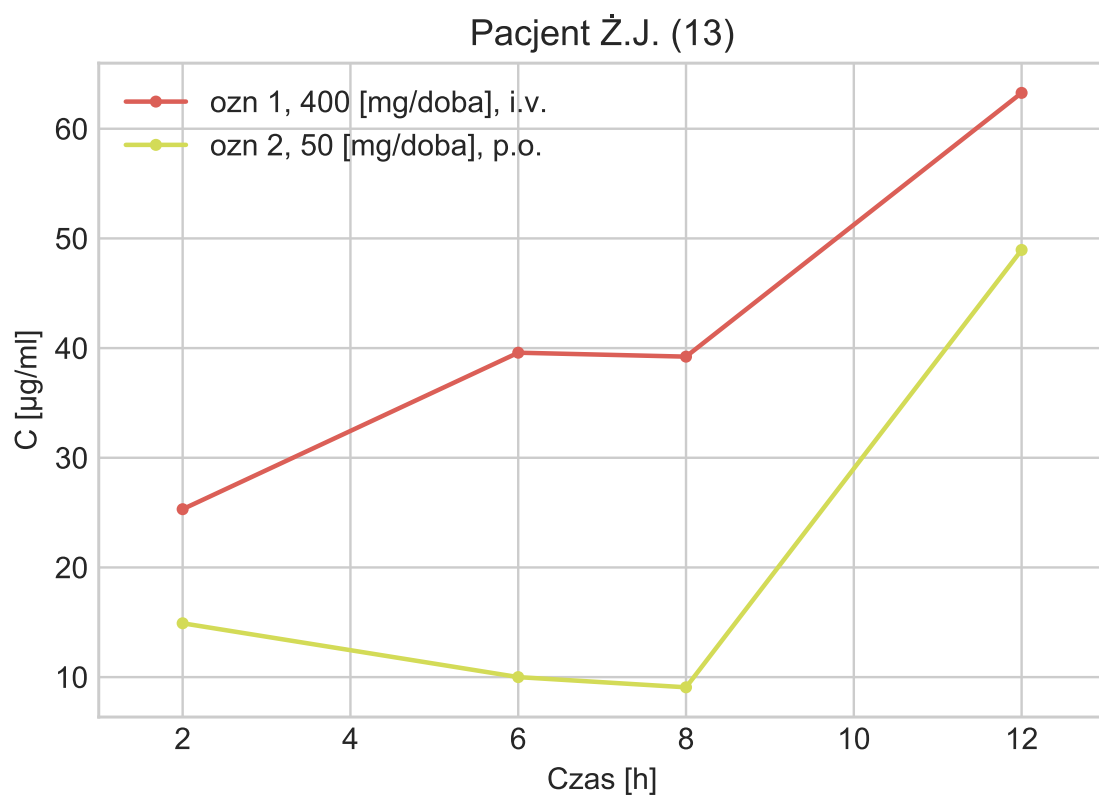
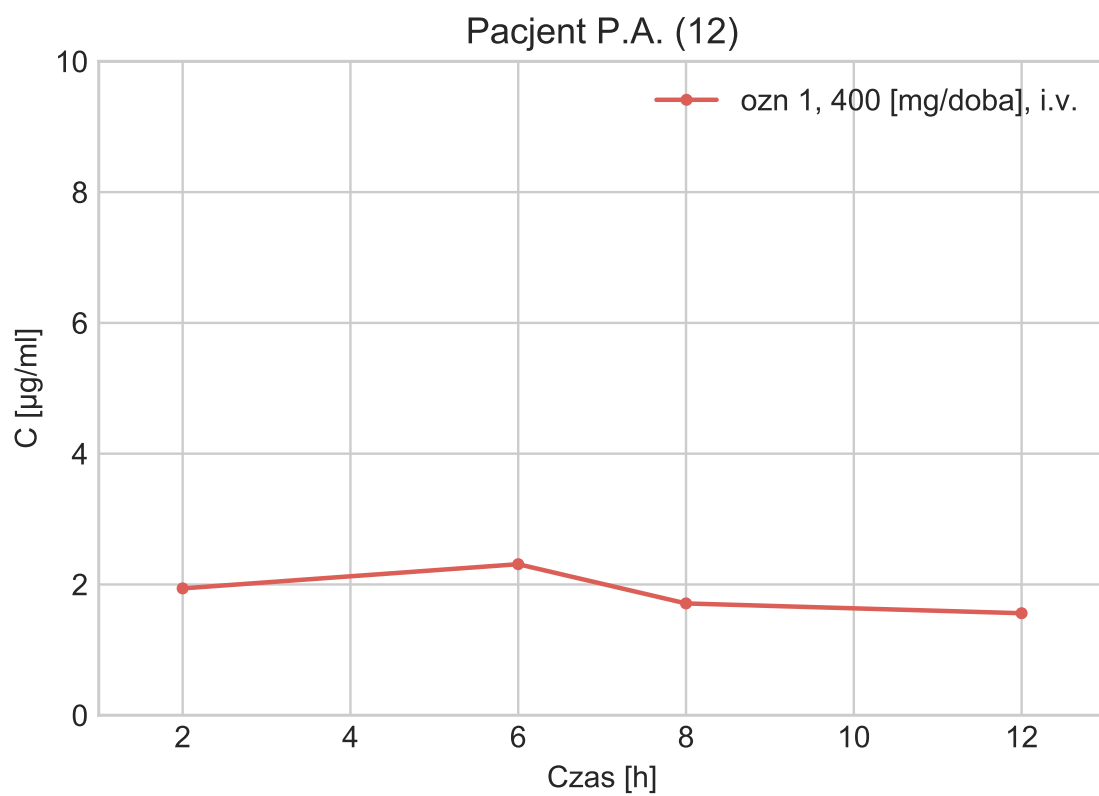












**Informacja dla pacjenta / opiekuna pacjenta
dotyczący analizy poziomu worykonazolu**

Temat projektu badawczego: „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych

Kierownik projektu badawczego: Prof. dr hab. Franciszek Głównka

Ośrodek badawczy:

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 35

Szanowni Państwo,

Zakażenia grzybicze są poważnym problemem w terapii pacjentów z obniżoną odpornością, między innymi u chorych na ostrą białaczkę szpikową lub po przebytych przeszczepie komórek krwiotwórczych i towarzyszącym leczeniu immunosupresyjnym. Leczenie oraz diagnostyka tych zakażeń są niezwykle trudne.

Lekiem często stosowanym w terapii tych zakażeń grzybiczych jest worykonazol (Vfend®). Jest to lek o szerokim spektrum działania, wykazujący skuteczność w zakażeniach wywołanych przez różne gatunki grzybów, także wtedy, kiedy inne leki przeciwgrzybicze są nieskuteczne. Niestety, farmakokinetyka worykonazolu charakteryzuje się dużą zmiennością międzyosobniczą, co znaczy, że po podaniu tej samej dawki u różnych pacjentów obserwuje się różne stężenia leku we krwi, a więc różna może być jego skuteczność. W przypadku zbyt niskich stężeń leku we krwi terapia może nie być skuteczna. W przypadku zbyt wysokich stężeń może dojść do wystąpienia działań niepożądanych.

Z tego powodu konieczne jest monitorowanie (pomiar) stężenia worykonazolu we krwi pacjentów, aby na tej podstawie móc dobrać dawkowanie leku indywidualnie dla każdego pacjenta. Zapewni to skuteczność leczenia przeciwgrzybiczego oraz zminimalizuje ryzyko wystąpienia działań niepożądanych.

Proponowane badania polegają na pomiarze stężenia worykonazolu we krwi pacjentów chorujących na zakażenia grzybicze. W tym celu, w ciągu 12 godzin po podaniu leku zostaną pobrane próbki krwi (w liczbie 4, po ok. 2 ml każda). Na tej podstawie będzie można następnie ustalić odpowiednie dla pacjenta dawkowanie worykonazolu. Zbieranie danych dotyczących prowadzonych badań i ich analiza będą odbywać się w ściśle poufny sposób, z uwzględnieniem wszystkich zasad i przepisów dotyczących ochrony danych osobowych pacjentów.

Jeśli oczekują Państwo dodatkowych informacji dotyczących badania, prosimy o kontakt z:

Dr Matylda Resztak

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

60-781 Poznań, ul. Święcickiego 6

Tel. 61 854 64 33

**Informacja dla pacjenta / opiekuna pacjenta
dotyczący analizy polimorfizmów genetycznych worykonazolu**

Temat projektu badawczego: „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych

Kierownik projektu badawczego: Prof. dr hab. Franciszek Główka

Ośrodek badawczy:

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 35

Szanowni Państwo,

Zakażenia grzybicze są poważnym problemem w terapii pacjentów z obniżoną odpornością, między innymi u chorych na ostrą białaczkę szpikową lub po przebytych przeszczepie komórek krwiotwórczych i towarzyszącym leczeniu immunosupresyjnym. Leczenie oraz diagnostyka tych zakażeń są niezwykle trudne.

Lekiem często stosowanym w terapii tych zakażeń grzybiczych jest worykonazol (Vfend®). Jest to lek o szerokim spektrum działania, wykazujący skuteczność w zakażeniach wywołanych przez różne gatunki grzybów, także wtedy, kiedy inne leki przeciwgrzybicze są nieskuteczne. Niestety, farmakokinetyka worykonazolu charakteryzuje się dużą zmiennością międzyosobniczą, co znaczy, że po podaniu tej samej dawki u różnych pacjentów obserwuje się różne stężenia leku we krwi, a więc różna może być jego skuteczność. W przypadku zbyt niskich stężeń leku we krwi terapia może nie być skuteczna. W przypadku zbyt wysokich stężeń może dojść do wystąpienia działań niepożądanych.

Uważa się, że dużą rolę w zmienności farmakokinetyki worykonazolu odgrywają polimorfizmy genetyczne w obrębie enzymów metabolizujących lek w organizmie pacjenta. Niewielkie zmiany w sekwencji genu kodującego enzym mogą skutkować spowolnionym lub przeciwnie – przyspieszonym metabolizmem worykonazolu. U takich pacjentów konieczne byłoby indywidualne dobranie dawki leku, z uwzględnieniem istnienia wspomnianych polimorfizmów i zmienionej szybkości metabolizmu leku. Zapewni to skuteczność leczenia przeciwgrzybiczego oraz zminimalizuje ryzyko wystąpienia działań niepożądanych.

Proponowane badania polegają na analizie sekwencji DNA w obrębie genów kodujących wybrane enzymy metabolizujące worykonazol. DNA wyizolowane z próbki krwi pacjenta zostanie poddane analizie pod kątem występowania zmian w sekwencji, które we wcześniejszych badaniach opisano jako istotne z punktu widzenia klinicznego. W tym celu jednorazowo zostanie pobrana próbka krwi (ok. 2 ml).

Zbieranie danych dotyczących prowadzonych badań i ich analiza będą odbywać się w ściśle poufny sposób, z uwzględnieniem wszystkich zasad i przepisów dotyczących ochrony danych osobowych pacjentów.

Jeśli oczekują Państwo dodatkowych informacji dotyczących badania, prosimy o kontakt z:

Dr Matylda Resztak

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

60-781 Poznań, ul. Świącickiego 6

Tel. 61 854 64 33

Formularz świadomej zgody pacjenta / opiekuna pacjenta dotyczący analizy poziomu worykonazolu

Imię i nazwisko osoby badanej:.....

Temat projektu badawczego: „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych”

Kierownik projektu badawczego: Prof. dr hab. Franciszek Główka

Niniejszym oświadczam, że:

1. Zostałem/am poinformowany/a o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia, oraz że miałem/am możliwość zadawania pytań badającemu i otrzymałem/am wyczerpujące odpowiedzi na te pytania.
2. Rozumiem na czym mają polegać badania i do czego potrzebna jest moja zgoda.
3. Wyrażam zgodę na pobranie 4 próbek krwi (w objętości 2 ml każda)
4. Zgodę na udział w badaniu wyrażam dobrowolnie. Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili, także podczas ich wykonywania, co w żaden sposób nie wpłynie na dalsze leczenie moje / mojego dziecka .
5. Zgodę tę wyraziłem/am w obecności świadka.
6. Otrzymałem/am jeden egzemplarz formularza informacji dla pacjenta dotyczący niniejszego badania naukowego.

Pacjent/ Opiekun pacjenta (imię i nazwisko.....)

Data.....podpis.....

Świadek (imię i nazwisko.....)

Data.....podpis.....

- Oświadczam, że zostałem/am szczegółowo poinformowany/na o warunkach ubezpieczenia mojego/mojego dziecka udziału w niniejszym badaniu naukowym i przyjmuję te warunki

.....
(podpis pacjenta/ opiekuna pacjenta)

- Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych zgodnie z art. 24 ust. 1 ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (tekst jednolity: Dz.U. z 2016 poz 922 z późn. zm.) w zakresie niezbędnym do realizacji niniejszego projektu badawczego. Rozumiem, że posiadam prawo do dostępu do treści swoich danych oraz mam możliwość ich poprawiania. W związku z udostępnieniem danych osobowych, wyrażam zgodę na ich przechowywanie i ewentualne anonimowe wykorzystywanie do celów badawczych z zachowaniem tajemnicy lekarskiej. Przyjmuję do wiadomości, że dane te nie będą wykorzystywane ani udostępniane do celów pozamedycznych.

.....
(podpis pacjenta/ opiekuna pacjenta)

Formularz świadomej zgody pacjenta / opiekuna pacjenta dotyczący analizy polimorfizmów genetycznych worykonazolu

Imię i nazwisko osoby badanej:.....

Temat projektu badawczego: „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych”

Kierownik projektu badawczego: Prof. dr hab. Franciszek Główka

Niniejszym oświadczam, że:

7. Zostałem/am poinformowany/a o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia, oraz że miałem/am możliwość zadawania pytań badającemu i otrzymałem/am wyczerpujące odpowiedzi na te pytania.
8. Rozumiem na czym mają polegać badania i do czego potrzebna jest moja zgoda.
9. Wyrażam zgodę na pobranie 1 próbki krwi w objętości 2 ml
10. Wyrażam zgodę na izolację i przechowywanie DNA w zamrożeniu
11. Wyrażam zgodę na wykorzystanie DNA do badań pt. „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych”
12. Zgodę na udział w badaniu wyrażam dobrowolnie. Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili, także podczas ich wykonywania, co w żaden sposób nie wpłynie na dalsze leczenie moje / mojego dziecka .
13. Zgodę tę wyraziłem/am w obecności świadka.
14. Otrzymałem/am jeden egzemplarz formularza informacji dla pacjenta dotyczący niniejszego badania naukowego.

Pacjent/ Opiekun pacjenta (imię i nazwisko.....)

Data.....podpis.....

Świadek (imię i nazwisko.....)

Data.....podpis.....

- Oświadczam, że zostałem/am szczegółowo poinformowany/na o warunkach ubezpieczenia mojego/mojego dziecka udziału w niniejszym badaniu naukowym i przyjmuję te warunki

.....
(podpis pacjenta/ opiekuna pacjenta)

- Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych zgodnie z art. 24 ust. 1 ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (tekst jednolity: Dz.U. z 2016 poz 922 z późn. zm.) w zakresie niezbędnym do realizacji niniejszego projektu badawczego. Rozumiem, że posiadam prawo do dostępu do treści swoich danych oraz mam możliwość ich poprawiania. W związku z udostępnieniem danych osobowych, wyrażam zgodę na ich przechowywanie i ewentualne anonimowe wykorzystywanie do celów badawczych z zachowaniem tajemnicy lekarskiej. Przyjmuję do wiadomości, że dane te nie będą wykorzystywane ani udostępniane do celów pozamedycznych.

.....
(podpis pacjenta/ opiekuna pacjenta)

**PROCEDURA POBIERANIA PRÓBEK OSOCZA PACJENTÓW DO
MONITOROWANIA STĘŻEŃ WORYKONAZOLU W OSOCZU LUDZKIM**

- Próbki krwi do oznaczenia poziomu worykonazolu należy pobrać od każdego pacjenta po co najmniej **szóstej dobie leczenia**, w czterech punktach czasowych :
 - **2 h** po podaniu leku (**2ml krwi**)
 - **6h** po podaniu leku (**2ml krwi**)
 - **8h** po podaniu leku (**2ml krwi**)
 - **12 h** po podaniu leku jednak należy pamiętać by pobrać ostatnią próbkę tuż przed podaniem kolejnej dawki leku (**2ml krwi**)
 - Dodatkowa próbka **krwi pełnej 2ml** pobrana do systemu monovette EDTA pobrana w dowolnym czasie.

**ŁĄCZNIE 5 PRÓBEK PO 2 ML KRWI Z CZEGO PIERWSZE 4 NALEŻY
ODWIROWAĆ DO OSOCZA ORAZ 1 PRÓBKA Z KRWIĄ PEŁNĄ W EDTA !!!**

**ŚCISLE PRZESTRZEGANIE CZASU POBIERANIA PRÓBEK MA OGROMNE
ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE !**

**PRÓBKĘ OSOCZA PACJENTÓW NALEŻY OPISAĆ ODPOWIEDNIĄ GODZINĄ
PO KTÓREJ KREW ZOSTAŁA POBRANA ORAZ INICJAŁAMI PACJENTA**

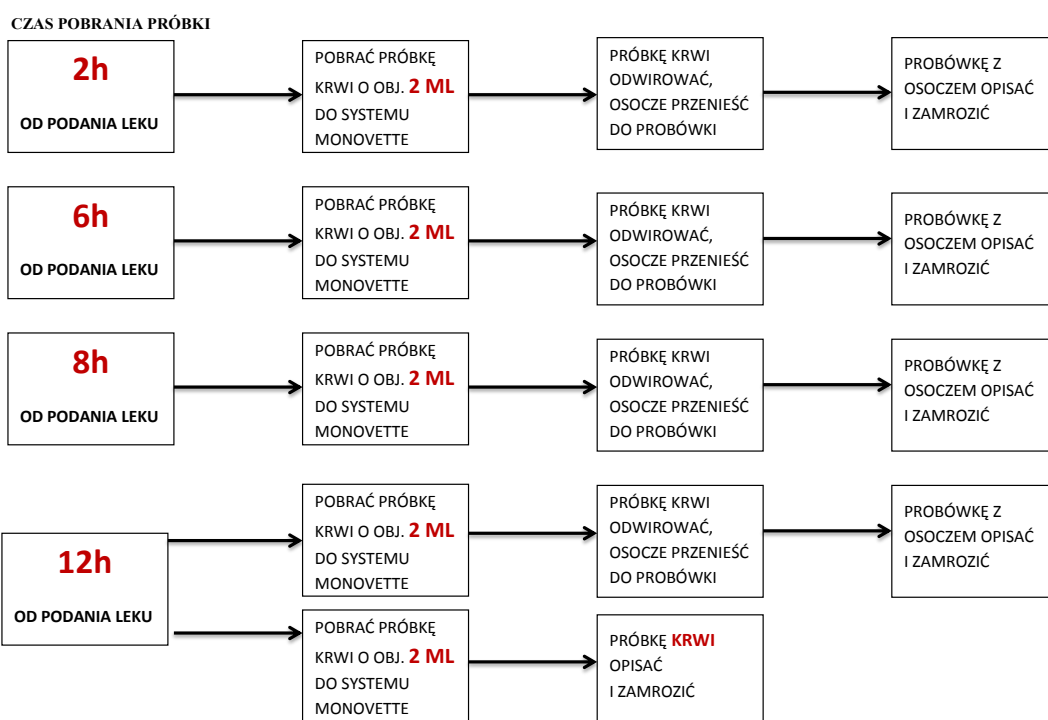
- 4 Próbki z zamrożonym osoczem oraz 1 z krwią pełną należy dostarczyć do Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej i Farmakokinetiki UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu **ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań**

Informację o pobranych próbkach należy przekazać telefonicznie jednej z wybranych osób:

601 209 820 – mgr farm. Paulina Nosal,

600 254 659 - dr n. farm. Matylda Resztak

**PROCEDURA POBIERANIA PRÓBEK OSOCZA PACJENTÓW
DO MONITOROWANIA STEŻEŃ WORYKONAZOLU (VFEND)**



W sumie od każdego pacjenta należy pobrać **5 próbek krwi po 2 ml każda**, łącznie 10ml krwi.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD FARMACJI FIZYCZNEJ I FARMAKOKINETYKI

ul. Świącickiego 6
60-781 Poznańtel. 061 8546435
fax. 061 8546430
e-mail: glowka@ump.edu.plKierownik:
prof. dr hab. Franciszek Główkaoznaczenie wykonał:
mgr Paulina Nosal**MONITOROWANIE STĘŻENIA WORYKONAZOLU W OSOCZU**

DANE PACJENTA:

IMIĘ: NAZWISKO:

PESEL/ DATA URODZENIA:

PŁEĆ: K M

INSTYTUCJA:

ODDZIAŁ:

LEKARZ ZLECAJĄCY:

LEK	ZAKRES REFERENCYJNY	PRÓBKA	WYNIK	KOMENTARZ
V-FEND (worykonazol)	1,0 – 5,5 µg/ml	2 h po podaniu		
		6 h po podaniu		
		8 h po podaniu		
		12 h po podaniu		

data

podpis

KARTA PACJENTA (WORYKONAZOL)

Adres szpitala oraz nazwa oddziału z którego pochodzą próbki	
Nazwisko i imię pacjenta	
Nr pesel/ wiek	
Masa ciała	
Wzrost	
Rozpoznanie oraz choroby współtowarzyszące	
Data rozpoczęcia terapii worykonazolem	
W którym dniu terapii pobrano próbki do oznaczeń poziomu leku	
Dawkowanie worykonazolu	
Postać oraz nazwa handlowa leku	
Klirens kreatyniny	
Ast	
Alt	
Poziom albumin	
Inne podawane leki	
<i>Data i podpis sporządzającego kartę pacjenta oraz nr telefonu lub mail kontaktowy</i>	



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 535/16

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 05 maja 2016 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

dr Katarzyna Kosicka

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Zakład Farmakoekonomiki i Farmacji Społecznej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: dr Matylda Reształt

Członkowie zespołu

badawczego:

prof. dr hab. Franciszek Główka

mgr Paulina Nosal

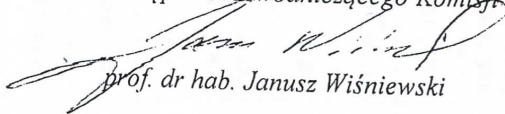
prof. dr hab. Jacek Wachowiak

Temat badań:

„Wpływ polimorfizmów genetycznych na farmakokinetykę worykonazolu u ludzi”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Zastępca Przewodniczącego Komisji


prof. dr hab. Janusz Wiśniewski



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 297/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentyści (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 298); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 08 marca 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Franciszek Główka

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki oraz Klinika Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku Szpitala im. Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
we współpracy z:**

**Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr Antoniego Jurasza w Bydgoszczy; Oddziałem Anestezjologii i Intensywnej Terapii Pulmonologicznej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II ;
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Oddziału Hematologii Dziecięcej
SPSK nr 1 PUM w Szczecinie**

Główny badacz: dr n. farm. Matylda Resztak

Członkowie zespołu

**badawczego: prof. dr hab. Franciszek Główka, dr n. farm. Matylda Resztak,
mgr farm. Paulina Nosal, dr hab. Katarzyna Derwich, prof. dr hab. Jacek Wachowiak, dr n. med. Anna Łojko-Dankowska, mgr farm. Łukasz Hondo,
dr n. med. Tomasz Ociepa**

Temat badań:

„Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu u ludzi z uwzględnieniem aspektów genetycznych”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.:

„Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych

Imię i nazwisko
podpis.....

Data,
podpis.....

.....
Imię i nazwisko

Poznań,

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt.

„Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych”

Informuję, że udzielam/nie udzielam¹ nieodpłatnie Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu (UMP) licencji niewyłącznej do korzystania z ww. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji²

- przechowywanie i archiwizowanie pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania, udostępniania i obrotu w formie elektronicznej
- udostępnienie pracy w Czytelnii Naukowej Biblioteki Głównej UMP

Jednocześnie informuję, że³

- wyrażam zgodę na nieodpłatne opublikowanie całości manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (WBC)
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej, ponieważ zobowiązuję się
 - w terminie nie dłuższym niż 6 miesięcy od daty podpisania niniejszego oświadczenia do przygotowania publikacji opartej na wynikach pracy doktorskiej i wysłania do wydawnictwa,
 - opublikowania ww. wyników w okresie kolejnych 18 miesięcy,
 - afiliowania ww. pracy na rzecz Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej z uwagi na zawarty w niej niejawnny charakter informacji

Przyjąłem do wiadomości fakt obowiązku niezwłocznego poinformowania Dziekanatu Wydziału Farmaceutycznego UMP o wysłaniu manuskryptu do wydawnictwa oraz przyjęciu publikacji do druku⁴. W przypadku niepoinformowania Dziekanatu w terminie o ww. faktach zezwalam Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu na opublikowanie całości mojej pracy doktorskiej w WBC⁵.

.....
Data i podpis

¹ niepotrzebne skreślić

² właściwe pola zaznaczyć

³ należy wybrać jedną z trzech podanych niżej możliwości

⁴ dotyczy wyłącznie sytuacji, w której autor rozprawy doktorskiej prosi o odroczenie publikacji manuskryptu w WBC z uwagi na zamiar opublikowania zawartych w niej wyników w czasopiśmie/czasopismach naukowych

⁵ Art. 14, ust. 1, Ustawa o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994 Nr 24 poz. 83)