

Utjecaj funkcije bubrega na serumske koncentracije levetiracetama

Čurak, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:298464>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Tea Čurak

**Utjecaj funkcije bubrega na serumske
koncentracije levetiracetama**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) KBC-a Zagreb pod stručnim vodstvom nasl.doc.dr.sc. Mile Lovrić.

Zahvala mentorici Mili na stručnosti, ažurnosti i savjetima tijekom izrade ovog rada kojima me uvela u znanstveni svijet te ga spojila s našom strukom i kliničkom primjenom objedinivši time i farmaceutsku i biokemijsku stranu mojih interesa koje sam razvijala tijekom studija.

Malo je reći hvala mojim roditeljima, Jasni i Zlatku, što su me trpjeli tijekom cijelog mog života i bili mi ogromna podrška! Što su dali svaki dio sebe da ja postanem ovo što jesam i dospijem ovdje gdje sam sada.

Neizmjereno sam zahvalna na svim predivnim ljudima koje mi je ovaj fakultet donio u život, a koji su mi svojim iznimnim osobnostima i prisutnošću uljepšali život na fakultetu i izvan njega.

SADRŽAJ

1.	UVOD	6
1.2.	Levetiracetam	11
1.2.1.	Farmakološki profil	12
1.2.2.	Indikacije i doze	14
1.2.3.	Rizične skupine bolesnika	15
1.3.	Terapijsko praćenje koncentracije lijeka (TDM)	16
1.3.1.	Načela i indikacije za praćenje koncentracije antiepileptika	17
1.3.2.	Uzorkovanje	19
1.3.3.	Terapijski referentni raspon	22
1.4.	Dosadašnja istraživanja i metode određivanja levetiracetama u biološkim uzorcima	23
1.5.	Primjena kromatografije u terapijskom praćenju koncentracije lijeka	23
1.5.1.	Temeljni principi kolonske kromatografije	24
1.5.2.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	25
1.6.	Validacija bioanalitičke metode	26
1.6.1.	Validacijski parametri	26
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	28
3.	MATERIJALI I METODE	30
3.1.	Materijali	31
3.1.1.	Uzorci	31
3.1.2.	Kemikalije	31
3.1.3.	Radni instrumenti	32
3.1.4.	Laboratorijski pribor	32
3.2.	Metode	32
3.2.1.	Priprema kalibratora i standarda	32
3.2.2.	Priprema mobilne faze	33
3.2.3.	Priprema ispitivanog uzorka	34
3.2.4.	Kromatografski uvjeti	34
3.2.5.	Očitavanje rezultata	34
3.3.	Verifikacija metode	35
4.	REZULTATI	37
4.1.	Ispitanici	38
4.2.	Biokemijski parametri funkcije bubrega i jetre	39
4.3.	Koncentracije levetiracetama u ispitanika i usporedba s terapijskim referentnim rasponom	40
4.4.	Utjecaj funkcije bubrega na koncentracije levetiracetama	42
4.5.	Utjecaj funkcije jetre na koncentracije levetiracetama	46
5.	RASPRAVA	48
6.	ZAKLJUČAK	53
7.	LITERATURA	55
8.	SAŽETAK/SUMMARY	60

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AE	antiepileptik (eng. <i>antiepileptic</i>)
AMPA	glutamatni receptor (α -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propionat)
CEDIA	imunoanaliza klonirajućim enzimom (eng. <i>cloned enzyme donor immunoassay</i>)
CNS	središnji živčani sustav (eng. <i>central nervous system</i>)
CLCR	klirens kreatinina (eng. <i>creatinine clearance</i>)
CRRT	kontinuirana bubrežna nadomjesna terapija (eng. <i>continuous renal replacement therapy</i>)
C _{max}	vršna koncentracija
C _{ss-min}	najniža koncentracija u stanju dinamičke ravnoteže (eng. <i>trough level</i>)
CT	kompjuterizirana tomografija (eng. <i>computerized tomography</i>)
EEG	elektroencefalografija
EMIT	enzimski višestruki imunotest (eng. <i>enzyme multiplied immunoassay technique</i>)
LEV	levetiracetam
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (eng. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LLE	ekstrakcija tekuće-tekuće (eng. <i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	granica dokazivanja (eng. <i>limit of detection</i>)
LOQ	granica određivanja (eng. <i>limit of quantification</i>)
GABA	gama-aminomaslačna kiselina
GAT1	GABA transporter-1
GLP	dobra laboratorijska praksa (eng. <i>good laboratory practice</i>)
HKMB	hrvatska komora medicinskih biokemičara
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ILAE	međunarodna liga protiv epilepsije (eng. <i>International League Against Epilepsy</i>)
IS	unutarnji standard (eng. <i>intern standard</i>)
i.v.	intravenozno (način primjene injekcijski u venu)
k	koeficijent korelacije regresijskog pravca
MR	magnetska rezonancija
o/min	okretaja/minuti
PDA	fotodiodni detektor (eng. <i>photodiode array detector</i>)

p.o.	peroralno (način primjene kroz usta)
RPLC	reverzno-fazna tekućinska kromatografija (eng. <i>reverse phase liquid chromatography</i>)
R _s	kromatografska rezolucija
SD	standardna devijacija
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. <i>solid phase extraction</i>)
SV2A	sinaptički vezikularni protein 2A (eng. <i>synaptic vesicle protein 2A</i>)
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijeka (eng. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
UV/VIS	ultraljubičasti/vidljivi dio spektra (eng. <i>ultraviolet/visible</i>)
5YTR	5-godišnja terminalna remisija (eng. <i>5-year terminal remission</i>)

1. UVOD

1.1. Epilepsija

Epilepsija, kao skup raznolikih simptoma, spada u kronični poremećaj karakteriziran napadajima (konvulzijama). To su zapravo epizode moždane disfunkcije ograničenog trajanja zbog pretjeranog električnog izbijanja iz moždanih neurona, čiji su uzroci mnogobrojni, a **epidemiologija** raznolika. Prema najnovijim smjernicama Internacionalne lige protiv epilepsije - ILAE (eng. *International League Against Epilepsy*) iz 2017. godine, etiološki ih se može podijeliti na: genetske, strukturalne, metaboličke, imunološki posredovane, epilepsije uzrokovane infekcijama središnjeg živčanog sustava te epilepsije nepoznate etiologije. Primjerice, početak javljanja može uslijediti prilikom infekcije, traume, ozljede glave ili trudnoće, korištenja nekih lijekova s djelovanjem na CNS (sedativi-hipnotici, droge, anestetici, analgetici, antimalarici itd), dok se genetski oblik nasljeđuje autosomno-dominantno (Petelin Gadže i sur., 2019; Rang i sur., 2006).

Pritom se glavni **mehanizmi epileptogeneze** svode na: elektrolitni disbalans, promijenjenu strukturu neurona i mutacije gena za ionske kanale ili GABA receptore. Naime, do produljene depolarizacije stanične membrane neurona dolazi prvenstveno zbog obilnog ulaska ekstracelularnog kalcija u stanicu, posljedičnog otvaranja natrijskih voltažnih kanala i njegovog masivnog utoka, dovodeći time do repetitivnih akcijskih potencijala i neuronskog izbijanja. To postaje značajno tek ako se prijeđe takozvani „konvulzivni prag“, kada započinje napadaj te, šireći se u susjedna područja, regrutira sve veći broj neurona. U normalnim uvjetima bi se takvo širenje poništilo fiziološkom hiperpolarizacijom i aktivacijom inhibicijskih neurona, što je u slučaju epileptičnog napadaja onemogućeno istjecanjem kalija iz neurona (prelazi ekstracelularno zbog utoka kalcija, a potencira daljnju depolarizaciju neurona). Ovakvi procesi vode u ekscitotoksičnost i posljedičan gubitak neurona, od kojih se neki mogu regenerirati ili stvoriti potpuno nove, s novim neuronskim vezama te tako doprinijeti nestabilnosti (Hauser i sur., 2013).

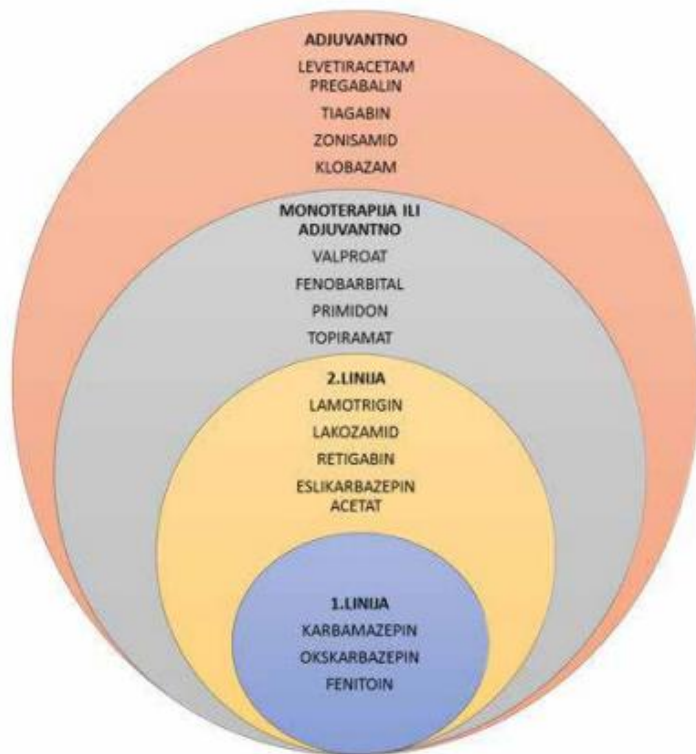
Prema klasičnoj **klasifikaciji**, uvriježeno su se razlikovale dvije glavne skupine- parcijalni (s podskupinama: jednostavni, kompleksni, parcijalni sa sekundarnom generalizacijom) i generalizirani napadaji (s podskupinama: atonički, tonički, klonički i mioklonički, generalizirani toničko-mioklonički), a simptomi koji se prilikom napadaja jave, ovisе isključivo o zahvaćenoj moždanoj regiji i širenju oko epileptičkog žarišta (Katzung i sur., 2011). Svima je zajednička ponovljivost fenomena napadaja, dakle da se kod pojedinog oboljelog, patološka izbijanja uvijek šire iz istog dijela mozga, istim obrascem dajući isti elektroencefalografski nalaz. Međutim, aktualna klasifikacija iz 2017. godine ipak dopušta

veću fleksibilnost pri razvrstavanju tipova napadaja. Primjerice, "parcijalni" napadaj postaje "fokalni" i obuhvaća nove tipove poput: automatizama, prekida radnje, hiperkinetskih, autonomnih, kognitivnih i emocionalnih napadaja. Sekundarno generalizirani napadaj zamijenjen je "fokalnim napadajem s prelaskom u bilateralni toničko-klonički napadaj", a podtipovi poput atoničkog, kloničkog, toničkog, mioklonalnog i epileptičkih spazama mogu biti fokalni ili generalizirani. Dodatno su uvedeni i novi generalizirani podtipovi: apsans s mioklonusom vjeđa te miklonalni apsans (Petelin Gadže i sur., 2017).

Dijagnozu epilepsije moguće je postaviti nakon dvaju neprovociranih (ili refleksnih) epileptičnih napadaja koji su se dogodili u vremenskom razmaku duljem od 24 sata. Ona obuhvaća uzimanje anamneze, točnije heteroanamneze od osoba prisutnih pri samom napadaju kojega je bolesnik doživio, kvalitetan klinički pregled specifičnih simptoma i znakova koje bi neurolog prepoznao kao posljedicu epileptogeneze uz dodatnu pomoć neuroslikovnih metoda (EEG- elektroencefalografija, MR- magnetska rezonancija, CT- kompjuterizirana tomografija) te, iznimno, rezultata molekularno-genetskih analiza u pojedinim slučajevima. Od laboratorijskih pretraga značajno je određivanje kompletne krvne slike, biokemijskih parametara u serumu poput glukoze, elektrolita, amonijaka, alkohola i ostalih toksikoloških pretraga za isključivanje intoksikacije, jetrenih i bubrežnih pokazatelja, ali i analiza likvora (posebice ukoliko je prisutna povišena tjelesna temperatura, glavobolja ili promjenjen mentalni status). Poželjno je učiniti i EKG kako bi se isključile eventualno prisutne aritmije kao uzrok sinkope, npr., sindrom produljenog QT-a (Petelin Gadže i sur., 2019).

Terapija bolesnika s postavljenom dijagnozom uglavnom uključuje farmakološku profilaktičku monoterapiju s ciljem kontrole napadaja i postizanjem dugotrajne remisije uz primjenu minimalne učinkovite doze lijeka bez javljanja nuspojava. Ukoliko je nedovoljna, doza se postepeno povećava do maksimalne dozvoljene ili se pokuša s jednim od ostalih lijekova na raspolaganju. Kod većine bolesnika, provedenom se monoterapijom koja ima prednost pred politerapijom, statistički gledano, zapravo i uspijeva postići dobra kontrola epileptičnih napadaja u oko 50% bolesnika, dok se s dva ili tri lijeka u kombinaciji ona postiže kod još 15–20% njih, tako da se poštujući navedene preporuke u oko 70–80% bolesnika javlja remisija bolesti.

Dosad postojeći lijekovi nisu specifični prema uzroku, već donekle specifični prema tipu napadaja.



Slika 1. Terapijski pristup novodijagnosticiranim fokalnim epilepsijama (preuzeto s: <http://gyrus.hiim.hr/>)



Slika 2. Terapijski pristup novodijagnosticiranim generaliziranim epilepsijama (preuzeto s: <http://gyrus.hiim.hr/>)

Mehanizmi konvencionalnih antiepileptika uglavnom se temelje na produljenju GABA inhibitorne neurotransmisije, smanjenju glutamatne ekscitacijske neurotransmisije i/ili

modificiranju propusnosti ionskih kanala. Cilj dužeg zadržavanja GABA neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini ostvaruje se agonistima receptora, inhibicijom njezinog ponovnog unosa u neurone ili transaminacije nakon čega bi mogli prijeći ekstracelularno ili preko GAT-1 transportera u glija stanice i metabolizirati se. S druge strane, u glutamatergičnoj sinapsi želi se blokirati ekscitacija membrane, odnosno stanica, i stvaranje akcijskog potencijala reducirajući provodljivost voltažnih Na^+ (samo onih koji se ponavljano okidaju), K^+ i Ca^{2+} kanala ili izravno inhibirati AMPA podtip glutamatnih receptora (Rang i sur., 2006).

Tablica 1 . Mehanizmi djelovanja antiepileptika (<http://gyrus.hiim.hr/>)

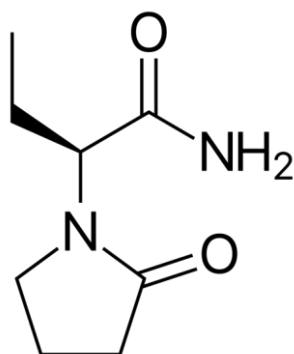
inaktivacija Na^+ voltažnih kanala	karbamazepin, okskarbazepin, fenitoin, lamotrigin
blokiranje T-tipa Ca^{2+} kanala	etosuksimid
modificiranje Ca^{2+} kanala	gabapentin, pregabalin
multipli mehanizmi (blokada Na^+ i Ca^{2+} kanala $\rightarrow$ GABA, glut)	fenobarbital, metilfenobarbital, topiramat, valproat
vezanje na protein sinaptičkih vezikula SV2A	levetiracetam
alosterička modifikacija vezanjem na GABA receptor	benzodiazepini, barbiturati

Antiepileptici starijih generacija (valproat, karbamazepin, fenitoin, fenobarbital) poznati su po značajnom stupnju interakcija u koje stupaju s drugim lijekovima- antiepilepticima i lijekovima drugih skupina te brojnim nuspojavama zbog čega su bolesnici često nesuradljivi. Novijim generacijama (topiramat, okskarbazepin, eslikarbazepin acetat, lamotrigin) doskočilo se na način da su klinički manje rizični za kombiniranje, mogu se češće uzimati u manjim dozama ili u formulacijama s produženim otpuštanjem čime se uvelike poboljšao klinički odgovor jer nije rijetkost da bolesnici s epilepsijom moraju kombinirati nekoliko antiepileptika istovremeno, ali i liječiti komorbiditete (aritmija, hipertenzija, hiperkolesterolemija i dr.). Međutim, iako su donijeli više terapijskih opcija, antiepileptici novije generacije i drugačijih mehanizama djelovanja, poput levetiracetama, nisu bitno smanjili učestalost bolesnika s farmakorezistentnom epilepsijom pa su preostali, tzv. farmakorezistentni oblici (koje ILAE definira kao neuspjeh kontrole napadaja unatoč

liječenju s bar dva adekvatno izabrana antiepileptička lijeka u adekvatnoj dozi i trajanju liječenja) kandidati za neurokirurško liječenje (Hajnšek, 2014.; www.ilae.org). Farmakorezistentne epilepsije mogu se još tretirati i resekcijom, diskonekcijom te invazivnim stimulacijskim metodama poput VNS, tj. „Vagusnog stimulatora“ (Petelin Gadže i sur.,2019). Longitudinalno populacijsko istraživanje koje su Sillanpää M. i Schmidt D. proveli 2006. godine na 148 bolesnika prateći ih prosječno 37 godina od početka javljanja epilepsije, potvrdilo je kako prekid terapije treba prethodno vrlo oprezno razmotriti jer je upravo on odgovoran za lošu prognozu liječenja relapsirajućih napadaja i rezistenciju. Naime, od 90 bolesnika koji su potpuno prestali s AE-om došlo je do relapsa bolesti kod njih 33 (37%), nakon čega je njih 8 odlučilo ponovno uspostaviti istu, godinama učinkovitu, terapiju, međutim samo je jedna četvrtina njih uspjela ponovno postići kontrolu- tzv. 5YTR (eng. *5-year terminal remission*) i to tek nakon 10-19 godina (Sillanpää i Schmidt, 2006).

1.2. Levetiracetam

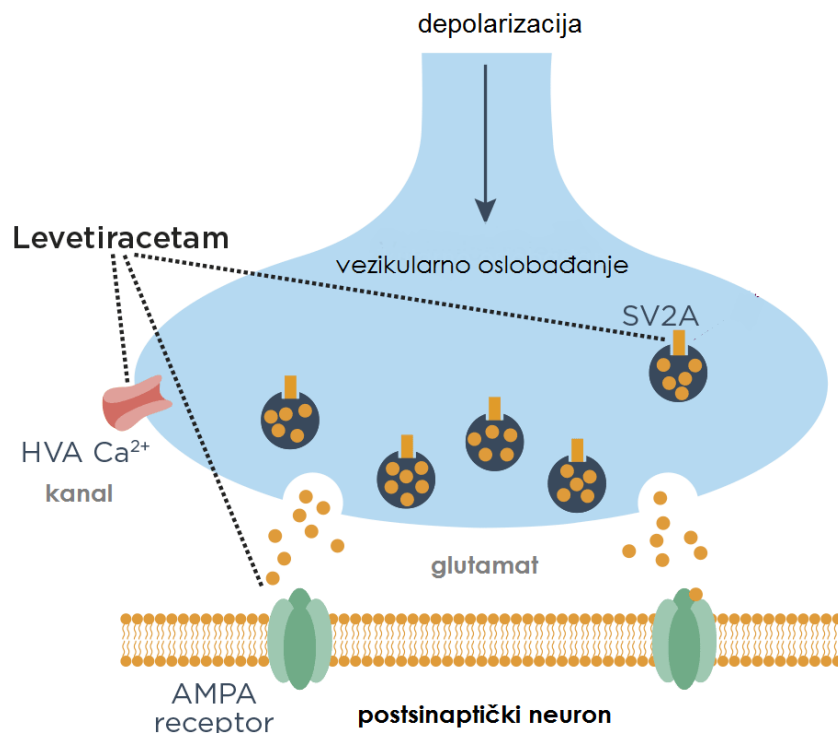
Antiepileptički lijek novije generacije (2000.), drugačiji je strukturom i mehanizmom od dosadašnjih. Strukturni je analog piracetama, zapravo derivat pirolidona (S-enantiomer á-etil-2-okso-1-pirolidinacetamida) i izvorno u obliku kristaliničnog praška slabog mirisa, gorka okusa, vrlo dobro topljiv u vodi (104,0 g/100 mL), ali i kloroformu, metanolu, etanolu, za razliku od n-heksana. U kliničkoj primjeni, poznatiji je pod komercijalnim nazivom Keppra u obliku tableta koje se primjenjuju p.o. ili rjeđe i.v. kao infuzijska otopina.



Slika 3. Strukturna formula (preuzeto s: www.wikipedia.org).

Specifičan i, dugo vremena nerazjašnjen, **mehanizam** djelovanja, ističe ga kao lijek koji ne utječe na osnovna svojstva neuroloških stanica zbog čega pruža novu opciju za postizanjem kontrole napadaja pristupajući bolesti na nov način. Naime, levetiracetam utječe na razinu Ca^{2+} na način da djelomično inhibira protok tih iona i smanjuje njihovo otpuštanje iz skladišta

u neuronima. Drugim, glavnim mehanizmom djelomično modificira otpuštanje GABA i glutamatnih neurotransmitera na način da se selektivno veže za sinaptički vezikularni protein 2A koji je uključen u fuziju vezikula i potreban za egzocitozu neurotransmitera (Bassel, 2008).



Slika 4. Mehanizmi djelovanja levetiracetama (preuzeto s: www.briviacthcp.com)

1.2.1. Farmakološki profil¹

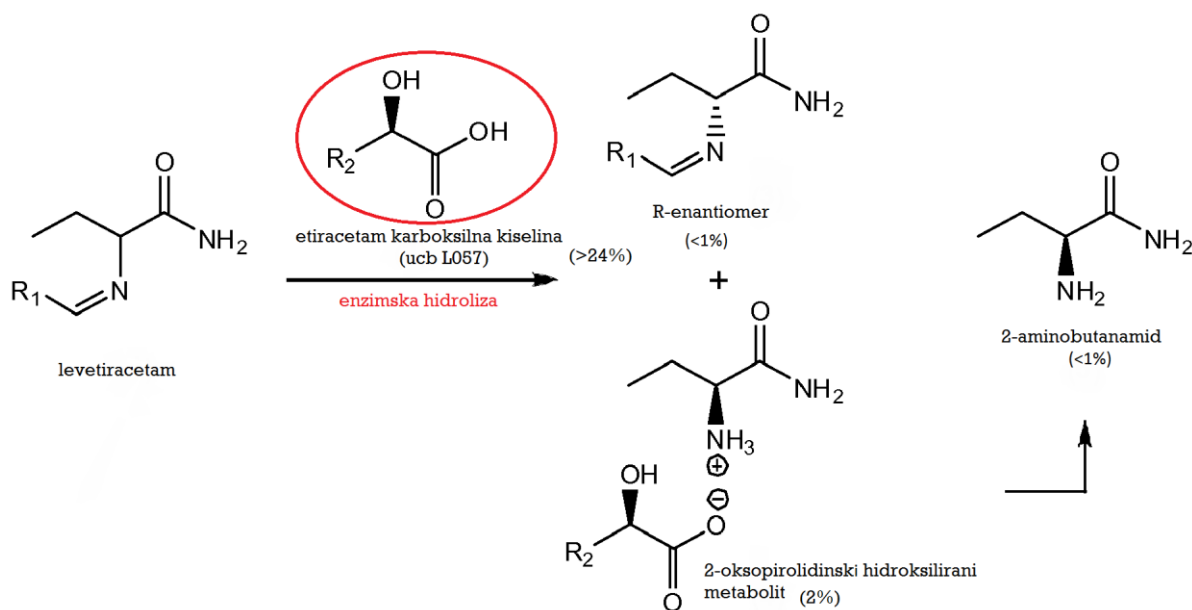
Farmakokinetički profil levetiracetama je linearan u rasponu koncentracija od 500-5000 mg, konstantan tijekom vremena uz vrlo nisku inter- i intravarijabilnost među bolesnicima, što ga čini jednostavnim za korištenje uz lako predvidljive razine lijeka u serumu. Nakon oralne primjene apsolutna bioraspoloživost je gotovo 100% s vršnom koncentracijom ($c_{\max}$) nakon 1,3 sata, a može se uzimati neovisno o hrani što olakšava primjenu kod djece koja imaju češće obroke i teže podnose uzimanje terapije. Stanje dinamičke ravnoteže (c_{ss} , eng. *steady state*) postiže se nakon dva dana doziranja dva puta dnevno, a vršna koncentracija u plazmi ($c_{\max}$) je 31 mg/L nakon jedne doze od 1000 mg i 43 mg/L nakon ponovljene doze od 1000 mg dva puta na dan (www.ema.europa.eu).

¹ skup odrednica lijeka utvrđen sustavnim testiranjima na razini molekule, stanice, organa i organizma (Struna-Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje)

Kod djece i odraslih postoji značajna korelacija između koncentracije lijeka u slini i u serumu gdje je omjer koncentracije u rasponu od 1 do 1,7 za lijek u obliku oralne tablete te nakon 4 sata od uzimanja lijeka u obliku oralne otopine.

Kako bi bio učinkovit u području od interesa (CNS), supstrat je P-glikoproteina te prolazi krvno-moždanu barijeru. Slabo se veže za proteine plazme (<10%), a glavnim metaboličkim putem enzimске hidrolize acetamidne skupine koja se odvija u mnogim tkivima, nastaje neaktivan metabolit (ucb L057) te sam metabolizam nije ovisan o jetrenim izoformama citokroma P₄₅₀, kao niti o glukuronil transferazi. (www.ema.europa.eu) Zbog tog svojstva smatra se prikladnim za istovremeno korištenje uz lijekove koji se metaboliziraju tim putem jer gotovo da ne stupaju u interakcije, ali i primjenjiv kod osoba s farmakorezistentnim oblicima ili oštećenom funkcijom jetre uzrokovanom dugogodišnjom terapijom antiepileptičkim lijekovima.

Kod ljudi poluvijek levetiracetama u plazmi iznosi 7±1 sati i ne varira ovisno o dozi, putu unosa ili ponavljanju primjene, nakon čega se izlučuje uglavnom putem bubrega glomerularnom filtracijom, a samo 0,3% doze izlučuje se stolicom (Bassel, 2008).



Slika 5. Metabolizam levetiracetama (preuzeto s: <https://newdrugapprovals.org/>)

Starost i prisutnost induktivne komedikacije, najznačajniji su čimbenici u predviđanju potencijalne varijabilnosti farmakokinetike levetiracetama.

Primjećene su rijetke nuspojave i uglavnom se odnose na somnolenciju, promjene ponašanja poput anksioznosti, agitacije te nazofaringitis, a rjeđe i smanjenje broja krvnih stanica, posebice leukocitopenija (www.ema.europa.eu).

1.2.2. Indikacije i doze

Zbog prethodno navedenih karakteristika farmakološke inertnosti, levetiracetam se kombinira s drugim antiepilepticima te se primjenjuje kao pomoćna terapija tretmana parcijalnih napadaja odraslih, djece s primarnim generaliziranim toničko-kloničkim napadajima i kod miokloničkih napadaja u juvenilnoj miokloničkoj epilepsiji. U slučajevima liječenja parcijalnih napadaja sa sekundarnom generalizacijom ili bez nje u odraslih i adolescenata od 16. godine života s novodijagnosticiranom epilepsijom, moguća je primjena u obliku monoterapije.

Komercijalno su dostupne Keppra tablete od: 250 mg djelatne tvari (plave), 500 mg (žute), 750 mg (narančaste), 1000 mg (bije), oralna otopina (100 mg/mL) i koncentrat za otopinu za infuziju (100 mg/mL). Preporučeno je započeti terapiju s 1000 mg u dvije doze po 500 mg, a kasnije moguće povećavati za 1000 mg svaka dva tjedna do maksimalnih 3000 mg pri čemu je značajno da ponovljene primjene lijeka ne uzrokuju promjenu klirensa. S obzirom da je izlučivanje levetiracetama usko povezano s klirensom kreatinina (CL_{cr}) odnosno bubrežnom funkcijom bolesnika, ključno je procijeniti klirens te prilagoditi dozu prema propisanim kriterijima. Procjenu je moguće donijeti preko koncentracije serumskog kreatinina (mg/dL) prema formuli:

$$\text{CL}_{\text{cr}} (\text{mL/min}) = \frac{[140 - \text{dob (godine)}] \times \text{masa (kg)}}{72 \times \text{kreatinin u serumu } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right)} \quad (\times 0,85 \text{ za žene})$$

Potom se klirens kreatinina prilagodi za površinu tijela (PT) prema sljedećem:

$$\text{CL}_{\text{cr}} (\text{mL/min/1,73 m}^2) = \frac{\text{CL}_{\text{cr}} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}}\right)}{\text{PT bolesnika (m}^2\text{)}} \times 1,73 \text{ PT bolesnika (m}^2\text{)}$$

Tablica 2. Prilagođavanje doze za odrasle bolesnike i adolescente tjelesne mase veće od 50 kg s oštećenom bubrežnom funkcijom (www.ema.europa.eu)

skupina	klirens kreatinina (mL/min/1,73m ²)	doza i učestalost primjene
normalna bubrežna funkcija	>80	500 do 1500 mg dva puta na dan
blago oštećenje	50-79	500 do 1000 mg dva puta na dan
umjereno oštećenje	30-49	250 do 750 mg dva puta na dan
teško oštećenje	<30	250 do 500 mg dva puta na dan
završna faza bubrežne bolesti (dijaliza) ⁽¹⁾	/	500 do 1000 mg jedanput na dan ⁽²⁾

⁽¹⁾ prvog dana liječenja levetiracetamom preporučuje se udarna doza od 750 mg

⁽²⁾ nakon dijalize preporučuje se dopunska doza od 250 ili 500 mg

Ukoliko bolesnik iz nekog razloga treba prekinuti s terapijom, nužno je to učiniti postepeno.

1.2.3. Rizične skupine bolesnika

Varijabilnosti farmakokinetike levetiracetama javlja se kod gerijatrijskih i pedijatrijskih bolesnika, kao i kod bolesnika s oštećenom bubrežnom funkcijom jer je kod svih promijenjen klirens samog lijeka. Naime, on je značajno povećan za 30-40% kod pedijatrijskih bolesnika, a gotovo dvostruko opada kod bolesnika iznad 65 godina starosti zbog čega je produljen poluživot levetiracetama za oko 40% te iznosi 10 do 11 sati.

Također, unutar populacije bolesnika starije životne dobi smanjen je metabolizam antiepileptika u jetri (oksidacija), a primijećene su i znatno češće interakcije s drugim primijenjenim lijekovima u odnosu na bolesnike mlađe životne dobi, zbog čega spadaju u skupinu osjetljivijih (Hajnšek, 2014).

Farmakokinetička linearnost je narušena u terminalnim fazama bubrežne bolesti, pogotovo kod bolesnika kojima je potrebna bubrežna nadomjesna terapija (CRRT), kod kritično bolesnih bolesnika čiji klirens lijeka raste pa zahtijevaju povećane doze, dok kod trudnica i kod žena u postpartalnom razdoblju zbog promjena u glomerularnoj filtraciji bi doze trebalo smanjivati (Jarvie, 2018).

Studije koje su pratile štetnosti levetiracetama na plodnost i reproduktivnu sposobnost žena te embriofetalni razvoj u trudnoći, nisu uočile povezane nuspojave niti pojačan rizik pa se smatra kako je siguran za uzimanje i u toj populaciji, ali poželjno u monoterapiji te u najnižoj

učinkovitoj dozi. Budući da se luči u mlijeko, ne preporuča se dojiljama. (Mawhinney i sur., 2013).

1.3. Terapijsko praćenje koncentracije lijeka (TDM)

TDM (eng. *therapeutic drug monitoring*) kao multidisciplinski alat u optimizaciji terapije koristi se već preko 50 godina. Neophodan je u bolestima ili stanjima koje prate brojni komorbiditeti zbog čega su bolesnici izloženi kombinacijama različitih skupina lijekova, primjerice kod bubrežnog, jetrenog, srčanog zatajenja, infekcija, opekлина, dijalize, HIV-a i sl.- kada je najznačajnija promjena farmakokinetičkog i farmakodinamičkog profila lijekova, stupnja vezanja za proteine plazme te stupanja u interakcije. Stoga su postavljeni kriteriji za TDM prema kojima je lijek-kandidat onaj koji ima: uzak terapijski raspon i definiran prag toksičnosti, nedostatnu korelaciju modela „doza-činak“, ali dobru korelaciju koncentracije u krvi s kliničkim učinkom, značajnu interindividualnu varijabilnost, ozbiljne nuspojave kod subterapije ili predoziranja, značajne interakcije s drugim lijekovima te da poznavanje nivoa lijeka ima utjecaj na doziranje.

Najčešće indikacije za TDM su ukoliko treba promijeniti protokol doziranja, ako bolesnik ima simptome neuspješne terapije ili toksičnosti, a pogotovo ako toksičnost ima iste simptome kao i sama indikacija za uzimanje lijeka. Specifičnosti provedbe dalje ovise o njegovom metabolizmu, formulaciji i kompletnoj kliničkoj slici.

Cilj TDM-a je prvenstveno uspostaviti minimalnu učinkovitu dozu, uz to analizirati potencijalan uzrok nedjelotvornosti terapije (brzina metabolizma, nesuradljivost bolesnika, interakcije) ili toksičnosti (promijenjen učinak iz fizioloških razloga- adolescenti, gerijatrijska skupina i sl.; patoloških razloga- bubrežno ili jetreno zatajenje; brzina metabolizma; interakcije...) te u konačnici smanjiti vjerojatnost razvoja ovisnosti o dozi (Lynch, 2013).

Interakcije među lijekovima mogu se javiti kad bolesnik koristi dva ili više lijekova istovremeno- tada jedan lijek može modificirati aktivnost drugog, bilo pojačavajući ili smanjujući njegov farmakološki učinak. Ishod može biti koristan ukoliko se poveća terapijski učinak lijeka, ali i štetan ako dolazi do povećanja štetnih učinaka ili do smanjenja učinkovitosti. Interakcije mogu biti farmakokinetičke pa utjecati na promjene u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji (ADME), dok one farmakodinamičkog tipa, mogu se odnositi na njihov sinergizam ili antagonizam. U praksi je interakcije vrlo teško

generalizirati, budući da jako variraju među bolesnicima ovisno o dozi, prisutnosti komorbiditeta, genetici (ekspresija metaboličkih enzima) i osjetljivosti.

1.3.1. Načela i indikacije za praćenje koncentracije antiepileptika

Koncentracije antiepileptika, posebice onih starije generacije poput karbamazepina, fenitoina, fenobarbitala, valproata potrebno je pratiti zbog suženog terapijskog raspona i znatnih individualnih varijabilnosti između doze i koncentracije u krvi (Wahab, 2010.; Bowers, 1998). Prvenstveno je problematično procijeniti hoće li propisana doza biti dovoljna za dugoročnu kontrolu napadaja, a s druge strane je činjenica da su klinički simptomi i znakovi toksičnosti teško mjerljivi. Serumska koncentracija i klinički učinci AE-a puno bolje koreliraju nego model „doza-činak“. Terapijski rasponi su definirani za većinu AE-a, ali individualne varijacije pokazuju koncentracije izvan referentnog raspona pa je potrebno definirati **individualnu terapijsku koncentraciju**. Stoga se javila potreba za pronalaskom testova kojima bi se određivale njihove serumske koncentracije, a statistički podaci pokazuju da su AE, pored vankomicina, skupina lijekova koja se najviše terapijski prati. Noviji antiepileptici: lamotrigin, gabapentin, topiramat, levetiracetam te okskarbazepin se terapijski prate nešto rijede, a ključno je da postoji jasno definirana korelacija između serumske koncentracije i kontrole napadaja jer zapravo i preniska i previsoka dovode do istog (Zaccara i Perucca, 2014).

Kod AE-a najčešće dolazi do inhibicije (nastupi odmah) ili indukcije (zahtjeva više vremena) metabolizma lijeka pa su tako karbamazepin, fenitoin, fenobarbital i primidon jaki induktori citokroma P₄₅₀ i glukuronizirajućih enzima zbog čega smanjuju učinkovitost oralnih antikoagulantnih, antimikrobnih, steroidnih i drugih lijekova koji se metaboliziraju tim putem. Valproat je najpoznatiji inhibitor UGT1A4 enzima (produljuje poluživot → toksičnost). Međutim, ako se pametno iskoriste istražena svojstva interakcija, kombiniranjem lijekova može se postići ekonomičniji, a još važnije uspješniji terapijski učinak. Tako se najučinkovitijom pokazala kombinacija valproata kao inhibitora s lamotriginom kojeg je, u tom slučaju, potrebno primjenjivati u manjim dozama (povećane serumske koncentracije) čime se uspostavila kontrola nad različitim vrstama napadaja koje niti jedan od lijekova primijenjen u maksimalnim dozama nije mogao samostalno prouzročiti. Tako se za kontrolu apsans napadaja valproat kombinira s etosuksimidom, a za žarišne fokalne- s karbamazepinom. Pri sinergističkim kombinacijama AE-a ipak se sugerira koristiti one različitih mehanizama djelovanja, budući da neki poput inhibitora Na⁺kanala dokazano

izazivaju neurotoksične simptome (kontraefekt). Također, ako se ne vodi računa o interakcijama pri komedikaciji (indukcija ili inhibicija metabolizirajućih enzima) mogu nastupiti nekontrolirane konvulzije (etilenestradiol-estrogenska komponenta kontraceptiva inducira glukuronidaciju lamotrigina čime snižava njegovu koncentraciju oko 50% te rezultira napadajem), gubitak učinka lijekova (steroidni kontraceptivi mogu izgubiti kontraceptivni učinak ako se kombiniraju s AE-om starije generacije) ili fatalni ishodi (ako antitumorski, antiretrovirusni lijekovi, imunosupresivi u interakcijama s AE-om izgube učinak) (Patsalos, 2002).

Tablica 3. Farmakokinetički profil antiepileptika (Patsalos, 2002)

				poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$)		
AED	linearna kinetika	nelinearna kinetika	vezanje za proteine plazme (%)	primjenjeno s neinteraktivnim lijekom	primjenjeno s AE induktorima CYP P ₄₅₀	primjenjeno s AE inhibitorima CYP P ₄₅₀
I.generacija AED						
karbamazepin	+		75	16±24	9±10	A
klobazam	+		85	10±58	<10±58	A
klonazepam	+		85	19±40	<19±40	A
diazepam	+		98	24±48	16±32	A
etosuksimid	+		0	40±60	34±56	A
fenobarbiton	+		50	80±100	80±100	>80±100
fenitoin		+	90	7±42	<7±42	>7±42
primidon	+		25	8±12	3±11	A
valproat		+	90	8±18	2±12	A
II.generacija AED						
felbamat	+		25	13±23	14	A
gabapentin		+	0	5±9	/	/
lamotrigin	+		56	22±38	14±15	70
levetiracetam	+		0	6±8	/	/
okskarbazepin	+		40	5±30	6±19	5±28
tiagabin	+		98	5±8	2±5	A
topiramat	+		15	19±25	9±12	A

vigabatrin	+		0	5±7	4±6	A
zonisamid		+	60	57±68	27±37	/

+ =ima

/ =nema dostupnih informacija

A =poluvrijeme nije formalno ispitivano, ali očekivano je povećanje u kombiniranoj terapiji

Iako se TDM kod levetiactetama, kao lijeka koji ima linearnu, predvidivu farmakokinetiku i ne stupa u interakcije s drugim lijekovima, smatrao nepotrebnim, provedene studije ustvrdile su da njegova farmakokinetika ipak značajno varira u određenim slučajevima. Primjerice, trudnicama je serumska koncentracija snižena za 60% i pada ispod terapijskog raspona, dok je poluživot jednog takvog liposolubilnog lijeka LEV u novorođenčadi produljen na 16-18 h i postiže toksičan učinak (Hajnšek, 2014).

Provedena retrospektivna klinička studija pratila je bolesnike na levetiracetamu od 2011.-2013. godine te ih podijelila prema antikonvulzivnoj komedikaciji u 4 skupine i 3 starosne podskupine (<9, 9-17, >18 godina) kako bi prikupila udio bolesnika iz svih skupina koji su postigli najniže koncentracije u terapijskom rasponu i zabilježila njihov klirens. Od 348 bolesnika, odnosno 706 uzoraka- 56,9% nalazilo se unutar, 43,1% ispod, nitko iznad terapijskog raspona, a uočen je značajno promijenjen klirens u komedikaciji s indukcijskim lijekovima (smanjuju izloženost LEV-u) te u skupinama <9 godina (ubrzano- 25,5% varijance u klirensu) i >18 godina zbog čega je manje vjerojatno postizanje minimalne učinkovite koncentracije unutar terapijskog raspona (Naik, 2015).

Iz toga se zaključuje kako TDM levetiracetama nije potreban za sve skupine, već samo za one s promjenjenom farmakokinetikom- kritično bolesni, trudnice, pedijatrijski, gerijatrijski te uz antikonvulzivne komedikacije propisane/ukinute u protokolu liječenja, kako bi se prilagodila doza (Jarvie, 2018).

1.3.2. Uzorkovanje

TDM antiepileptika započeo je sredinom 1950-ih određivanjima fenotoina i fenobarbitala kolorimetrijskim metodama. Za LEV korišteno je više analitičkih metoda: homogeni imunotest (Ark Diagnostics Immunoassay), LC-MS/MS (tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa) te najčešće HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) (Reineks i sur., 2011). Neovisno o korištenoj metodi, od ključne je važnosti predanalitički čimbenik odvajanja seruma/plazme od stanica u najkraćem roku kako bi se izbjegla hidroliza lijeka *in vitro*. Nadzor serumskih koncentracija lijeka, zajedno s praćenjem

biokemijskih parametara poput ureje i kreatinina te drugim kliničkim informacijama, liječnicima pomaže u postizanju optimalnog terapijskog učinka.

Kako bi se pravilno protumačile **serumske koncentracije**, potreban je podatak o vremenu uzorkovanja i zadnjoj primijenjenoj dozi te trajanju i načinu liječenja. Ukoliko se krv uzorkuje prije postizanja ravnotežne raspodjele lijeka u tkiva, primjerice kod digoksina, koncentracija u serumu bit će veća od očekivane.

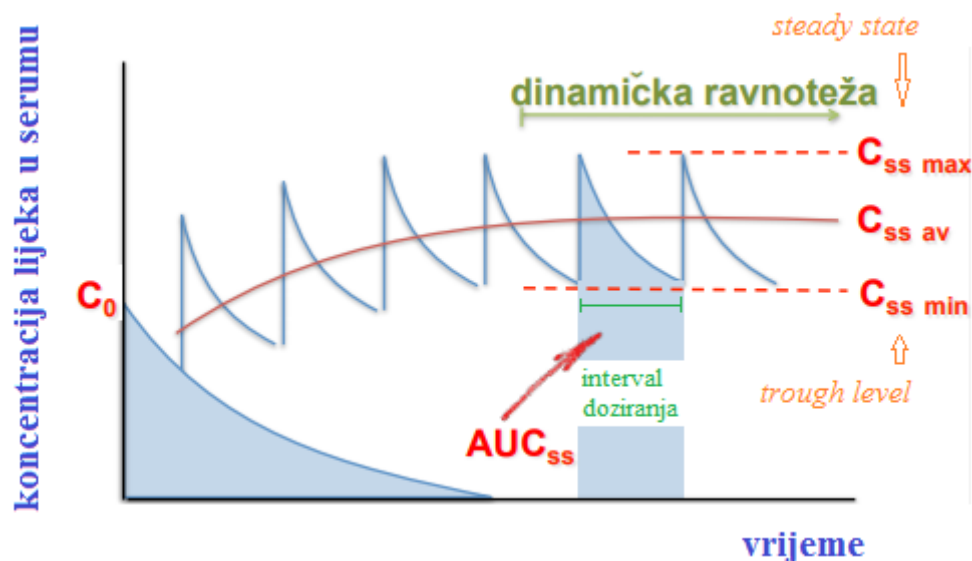
Važno je imati uzorak krvi za mjerenje koncentracije lijeka u točno vrijeme nakon doziranja. Pogreške u vremenu uzorkovanja vjerojatno su odgovorne za najveći broj pogrešaka u tumačenju rezultata. U većini slučajeva, uzorak krvi može se krivo povući u hepariniziranu epruvetu ili zgrušati, a problem je i neadekvatnost skladištenja prije mjerenja.

Apsorpcija lijeka varijabilna je nakon peroralne primjene pa bi se uzorci krvi trebali prikupljati u fazi izlučivanja, a ne u fazi apsorpcije ili raspodjele. Uobičajno je uzimanje uzoraka na kraju intervala doziranja (najniža razina lijeka). Ako se lijek primjenjuje bolus injekcijom, uzorke treba uzeti najmanje 1 sat nakon doziranja kako bi se izbjegla preklapanja faze raspodjele. Uobičajno, optimalnim vremenom uzorkovanja smatra se kada koncentracije lijeka postignu stabilno stanje, primjerice, nakon najmanje 5 poluživota u trenutnom protokolu doziranja. Međutim, lijekove s dugim poluživotom treba pratiti prije postizanja stabilnog stanja kako bi se osiguralo da osobe s oštećenim metabolizmom ili renalnom ekskrecijom nisu izložene riziku od razvoja toksičnosti na početku intervala doziranja, što se može dogoditi s amiodaronom i perheksilinom. Ako se pak sumnja na toksičnost lijeka, koncentracije u serumu treba pratiti što je prije moguće.

Iako su vršne koncentracije ($c_{\max}$) u serumu za mnoge lijekove 1 do 2 sata nakon primjene oralne doze, čimbenici kao što su spora ili odgođena apsorpcija mogu značajno odgoditi vrijeme u kojem se one postižu. Stoga, uz nekoliko iznimaka, uzorke treba uzimati neposredno prije sljedeće doze ($c_{ss \min}$; minimalna koncentracija u stanju ravnoteže- eng. *trough level*) pri određivanju rutinskih koncentracija lijeka u serumu jer je manje vjerojatno da će te najniže razine biti pod utjecajem varijacija u apsorpciji i raspodjeli (Winter, 2004) .

Ako se bolesniku opetovano daje terapija, lijek i njegovi metaboliti nakupit će se u tijelu ukoliko brzina izlučivanja nije dostigla brzinu primjene. U konačnici, kada je količina unešenog lijeka jednaka količini koja se izlučuje postiže se dinamička ravnoteža ili "stabilno stanje" (eng. *steady state*). Vrijeme potrebno za njegovo postizanje kod višestrukog doziranja ovisi o: poluživotu lijeka, klirensu, volumenu raspodjele, dozi te intervalu doziranja, a smatra se vremenom kad je lijek od prve doze gotovo potpuno izlučen iz tijela- standardizirano

nakon 5 poluživota nakupljat će se više od 95% lijeka (točnije 96,87%), a za praktične svrhe postignuto je stabilno stanje.



Slika 6. Farmakokinetika lijeka pri višestrukom doziranju

Za tumačenje rezultata neophodni su detalji protokola doziranja (doza i trajanje), kao i vrijeme uzorkovanja u odnosu na zadnju uzetu dozu, budući da se koncentracija lijeka u serumu značajno mijenja tijekom intervala doziranja. Koncentracije izmjerene u tim vremenskim točkama uspoređuju se s terapijskim rasponom utemeljenim na prospektivnim studijama koje su pratile koncentracije lijeka u stanju ravnoteže i farmakodinamičke odgovore (Rane i sur., 2001).

Kada se interpretiraju mjerenja koncentracije lijeka, faktori koji se trebaju uzeti u obzir uključuju vrijeme uzorkovanja u odnosu na dozu, povijest doziranja, odgovor bolesnika i željene kliničke ciljeve.

U novije vrijeme, sve se više pribjegava određivanju **koncentracije AE-a iz sline** kao biološkog uzorka iz više razloga. Naime, prvenstveno se pokazalo kao jednostavnije za uzorkovanje, budući da je u potpunosti neinvazivno (prigodnije za pedijatrijske i gerijatrijske bolesnike), postoji mogućnost opetovanog uzorkovanja kao i samostalnog što je uvelike olakšalo TDM. Bolesnici mogu prikupiti uzorak sline doma, neposredno u trenutku kada proživljavaju simptome potencijalno toksičnih doza te poslati u laboratorij pri čemu je uzorak stabilan i može se pouzdano odrediti i nakon 4 dana. Također, pokazana je značajna prednost pred serumskim određivanjem kod bolesnika čiji je klinički status teško procijeniti- djeca,

mladi, osobe s mentalnim i/ili tjelesnim invaliditetom, a kod onih s bubrežnim zatajenjem i uremijom čak bolja korelacija koncentracije lijeka, posebice fenitoina i karbamazepina, u slini s njegovim učinkom, nego što je bila ona određivana u krvi. Osim toga, kod lijekova koji se jako vežu za proteine plazme, kao i kod bolesnika s bubrežnim i hepatičkim bolestima kojima je ono promijenjeno, pogodnije je odrediti koncentracije AE u slini. Primjena salivarnog određivanja korisna je kada je postignut maksimalni učinak i odgovor na terapiju kako bi se odredila individualna terapijska koncentracija. Time se još doprinijelo otkrivanju nesuradljivosti bolesnika i slučajevima toksičnosti, a pokazalo se pogodnim za usporedbu farmakokinetičkih značajki različitih formulacija jednog AE. Uzorkovanje se provodi uzimanjem 2-3 mL stimulirane sline s kapljicom limunske kiseline na vrhu jezika jer je manje viskozna, manje varijabilnog pH i koncentracije analita u odnosu na serum. Pri tome je nužno zabilježiti vrijeme uzorkovanja te vrijeme primijenjene zadnje doze lijeka. Vrijeme uzorkovanja je standardizirano i optimalno ujutro neposredno prije doziranja, odnosno u konkretnom trenutku proživljavanja toksičnih simptoma (Pasalos, 2013).

1.3.3. Terapijski referentni raspon

Terapijski rasponi za antiepileptike nove generacije prema HKMB nisu konačno definirani jer su dokazane značajne individualne razlike te se za procjenu terapijske koncentracije koristi individualni pristup i ovisno o indikaciji za koju se primjenjuje (HKMB dokument, 2011). Naime, uočena je učinkovitost LEV i za liječenje neuropatske boli kod ozljede kralježnice, postmastektomije te profilaksno kod migrene u dozi 500 mg dnevno. U literaturi je propisan raspon za liječenje epilepsije od 12 do 46 mg/L, odnosno 70-270 $\mu\text{mol/L}$. www.ilae.org/).

Tablica 4. Terapijski referentni raspon antiepileptika (Patsalos, 2013)

	mg/L	$\mu\text{mol/L}$		mg/L	$\mu\text{mol/L}$
karbamazepin	4-12	17-51	okskarbazepin	3-35	12-139
klobazam	0,03-3,0	0,1-1,0	fenobarbital	10-140	43-172
klonazepam	0,02-0,07	0,06-0,22	fenitoin	10-20	40-79
eslikarbazepin	3-35	12-139	primidon	5-10	23-46
etosuksimid	4-100	283-708	topiramat	5-20	15-59
felbamat	30-60	126-252	tiagabin	0,02-0,2	0,05-0,53

gabapentin	2-20	12-117	valproat	50-100	346-693
lamotrigin	2,5-15	10-59	vigabatrin	0,8-36	6-279
levetiracetam	12-46	70-270	zonisamid	10-40	47-188

1.4. Dosadašnja istraživanja i metode određivanja levetiracetama u biološkim uzorcima

U literaturi su dosada opisano određivanje levetiracetama pretežito u farmaceutskim formulacijama različitim analitičkim metodama. Shihabi ZK i sur.(2003.) opisali su metodu za analizu tableta LEV kapilarnom elektroforezom, Rao BM i sur.(2004.) opisali su metodu tekućinske kromatografije za enantioselektivnu analizu LEV i njegovog enantiomera R-alfa-etil-2-okso-pirolidin acetamida, ali službena monografija LEV u tabletama nije prisutna ni u jednoj farmakopeji. Stoga su 2012. godine Jignesh S. Shahu i sur. odlučili razviti i potvrditi jednostavnu metodu HPLC-a u svrhu procjene LEV u farmaceutskoj formulaciji i proširiti studiju kemijskom kinetikom (Jignesh S. Shahu i sur., 2012; Rao BM i sur., 2004; Shihabi ZK i sur., 2003).

Dosadašnje metode određivanja koncentracije AE u biološkim uzorcima, poput enzimskog višestrukog imunotesta (EMIT), imunoanaliza klonirajućim enzimom (CEDIA) i kemiluminiscentna metoda (CLIA) sada su zamijenjene kromatografskim (LC-MS/MS i HPLC), pogotovo za AE novije generacije budući da je njima moguće odrediti koncentraciju nekoliko lijekova istovremeno što je od velike važnosti kod bolesnika na politerapiji, primjerice vrlo učestalom kombinacijom- levetiracetama i zonisamida ili pregabalina (www.clinlabint.com, 2013; Shibata i sur., 2012; Aldaz i sur., 2011; Juenke i sur., 2006).

1.5. Primjena kromatografije u terapijskom praćenju koncentracije lijeka

U laboratorijskoj praksi pri određivanju analita (lijeak) iz biološkog uzorka (serum, plazma, puna krv, urin) isti treba prethodno pripremiti, odnosno osloboditi složenog matriksa punog interferirajućih čestica (poput proteina, lipida) kako bi se niske koncentracije analita mogle odrediti s većom osjetljivošću. Stoga kromatografskoj analizi uglavnom prethodi precipitacija proteina i ekstrakcija, bilo tekuće-tekuće (LLE, eng. *liquid-liquid extraction*) ili na čvrstoj fazi (SPE, eng. *solid phase extraction*). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti HPLC (eng. *high performance liquid chromatography*) koja slijedi omogućuje

odjeljivanje, a zatim i selektivno te osjetljivo određivanje analita u multikomponentnom biološkom uzorku.

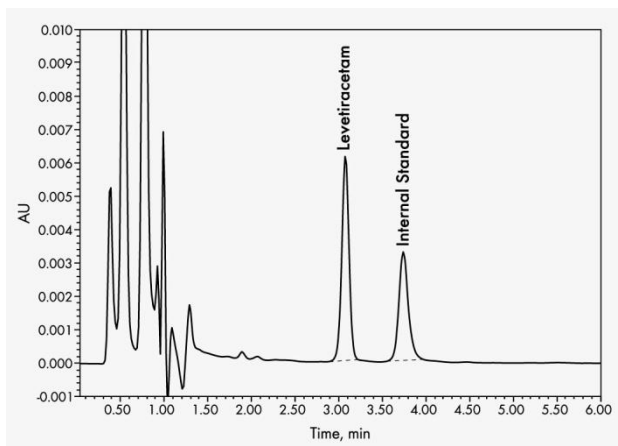
1.5.1. Temeljni principi kolonske kromatografije

Kromatografija je vrlo česta metoda odjeljivanja u analitici lijekova i rutinskoj kliničkoj praksi u kojoj se sastavnice uzorka razdjeljuju između mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Dije se prema vrsti mobilne faze pa postoje plinska, tekućinska i kromatografija sa superkritičnim tekućinama, a drugi sastavni dio čini stacionarna faza koja također može biti tekućina (nanesena na krutinu gela) ili krutina. Ovisno o vrsti stacionarne faze temelje se mehanizmi na osnovu kojih se odvija odjeljivanje sastavnica.

Mehanizmi odjeljivanja su: adsorpcija (ako je stacionarna faza kruta), razdioba (kada je stacionarna faza tekuća), ionska izmjena (stacionarna faza je ionski izmjenjivač što znači da sadrži skupine koje mogu izmjenjivati ione). Odjeljivanje se provodi na temelju različitih fizikalno-kemijskih svojstava molekula. Primjerice, prema veličini molekule (gel kromatografija), naboju analita (ionski izmjenjivač), a ključna fizikalno-kemijska veličina prema kojoj možemo identificirati analit uspoređujući sa standardom jest vrijeme zadržavanja na koloni, odnosno vrijeme koje je potrebno da analit koji je nošen mobilnom fazom dođe od početka kolone (mjesto injektiranja) do detektora. Ona ovisi o puno parametara poput: strukture analita, vrsti stacionarne faze, brzini protoka mobilne faze, stupnju interakcija sa stacionarnom fazom, temperaturi itd., a važan parametar koji određuje kromatografiju jest i djelotvornost kolone za razdvajanje smjese analita. Međusobnim odvajanjem analita prilikom prolaska kroz kolonu i eluiranjem pomoću mobilne faze, nastaju vrpce ili zone koje detektor registrira kao signale tijekom vremena te su definirani kao kromatografski vršci ili pikovi (eng. *peak*).

Razlučivanje pikova ili kromatografska rezolucija (R_s) karakterizira selektivnost cijelog sustava, a računa se korištenjem baznih širina i retencijskih vremena dvaju pikova kako bi se izrazila sposobnost kromatografske kolone da odvoji dva analita.

Pri kvantitativnoj analizi, potrebno je iz kromatograma (grafičkog zapisa provedene kromatografske analize) odrediti širinu pika na polovici visine, odnosno češće površinu pika zbog manje učestalosti pogrešaka. Dakle, integrira se krivulja pika i iz dobivene površine računa se koncentracija. Nadalje, za kvantifikaciju pomoću površine pika nužno je potpuno odjeljivanje sastojaka uzoraka uz $R_s > 1,5$.



Na x osi kromatograma stoji vrijeme retencije, dok AU oznaka na y osi označava da je očitavanjem vrijednosti definirana površina ispod pika.

Slika 7. HPLC kromatogram s pikovima zadržavanja LEV i internog standarda (preuzeto s: www.chromsystems.com)

U tekućinskoj kromatografiji dobrom razlučivanju pridonosi čvrsti nosač malih čestica, a vrijeme retencije izravno raste s brojem teorijskih tavana. Teorija tavana temelji se na pretpostavci da u svakom tavanu dolazi do ravnoteže u razdiobi sastavnica između stacionarne i mobilne faze te prijelaza na sljedeći korak odjeljivanja. Stoga, broj i visina tih teorijskih tavana zapravo karakteriziraju djelotvornost kolone da odvoji analite pa tako ona koja ima manju visinu i veći broj teorijskih tavana smatra se kao ona veće djelotvornosti i bolje rezolucije. Visina tavana jest pod utjecajem brzine protoka mobilne faze, veličine čestica punila kolone, viskoznosti faza i difuzijskih koeficijenata (Luterotti, 2014).

1.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPLC se u kliničkoj praksi uglavnom primjenjuje kao kromatografija obrnutih faza (RP, eng. reverse-phase) što označava kako je stacionarna faza nepolarna, a mobilna faza polarnija te omogućava gradijentnu eluciju (povećanjem udjela organskog otapala). Sama tehnika izvođenja je pod visokim tlakom koji omogućuje prolazak jer kolone nisu šuplje za razliku od plinskih. Kolonu čine napunjene čestice stacionarne faze koje su vrlo male, svega 3-10 mikrometara što metodi daje jako dobro razlučivanje, budući da se te dvije veličine odnose obrnuto proporcionalno, a izbor njezinog sastava mora se slagati s prirodom analita. Primjerice, ako imamo nepolarni analit, treba izabrati polarnu stacionarnu fazu. U RPLC-u je to najčešće silika-gel derivatiziran s alkalnim skupinama što ga čini nepolarnom stacionarnom fazom, pogodnom za razdvajanje polarnih uzoraka jer one nepolarne snažnije

zadržava (van der Waalsove interakcije). Na taj način se razdvajaju uzorci koji imaju veće molekulske mase, primjerice biološki lijekovi.

Sustav čine: spremnici za otapala mobilne faze, otplinjavač (uklanja neželjene plinove iz mobilne faze koji bi u koloni uzrokovali širenje kromatografskih pikova), pumpe (dostavljaju mobilnu fazu u kolonu pod visokim tlakom-15 MPa i stalnom brzinom-0,1-10 mL/min), automatski injektor, predkolona, kolona za odjeljivanje i detektori. Kolone su smještene u termostatirani prostor jer je za dobru ponovljivost i usporedivost retencijskih vremena analita ključno održavanje stalne temperature tijekom analize. Najčešće korišteni načini detekcije su pomoću apsorpcije (UV/VIS, PDA), fluorescencije, elektrokemijski i maseni koji detektiraju karakterističnu fizikalnu veličinu proporcionalnu površini pika, odnosno koncentraciji analita (Mandić, 2018).

1.6. Validacija bioanalitičke metode

Za metode korištene u kliničkoj praksi u biomedicinskim laboratorijima potrebno je provesti postupak validacije kako bi se dokazala njihova garancija dobivanja pouzdanih rezultata. Ti se postupci uglavnom provode prilikom razvoja i uvođenja nove metode u rutinsku primjenu, kod poboljšanja ili prilagodbe postojeće metode ili prenošenja iste u drugi laboratorij. Takvi validirani podaci moraju biti u skladu s dobrom laboratorijskom praksom (GLP, eng. *good laboratory practice*) i znanstvenim standardima, prilikom čega bi trebali zadovoljiti zahtjeve službenih tijela (Luterotti i Bičanić, 2013).

Pouzdanost analitičkih nalaza jest preduvjet za mogućnost točne interpretacije toksikološkog nalaza i posebno je važan kod terapijskog praćenja koncentracije lijeka. Naime, u slučaju nepouzdanosti, mogla bi se odrediti neprimjerena terapija za bolesnike i dovesti do subterapijskih ili toksičnih doza.

1.6.1. Validacijski parametri

Ovisno o vrsti i namjeni metode (kvalitativna, polukvantitativna, kvantitativna, „in-house“, visokospecifična), raspoloživosti kontrolnih uzoraka i stabilnosti analita u biološkom uzroku, određuju se različiti validacijski parametri. Tako bi primjerice, vlastita „in-house“ kvantitativna metoda trebala obuhvaćati procjenu: preciznosti, točnosti, usporednosti s drugom metodom (ako postoji), analitičke osjetljivosti (granica detekcije i kvantifikacije), analitičke specifičnosti uključujući interferencije, stabilnosti uzorka, linearnosti (i modela kalibracije) te referentnog intervala metode.

Općenito je preporučeno koristiti jedan od navedenih terminoloških sustava za potrebe validacije, uz eventualne manje izmjene gdje su potrebne te je u konačnici poželjno zadovoljiti preporučene kriterije prihvatljivosti (Peters i Maurer, 2001).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Epilepsija kao druga najčešća neurološka bolest koja zahvaća čak 1% (45 milijuna) svjetskog stanovništva, a procjenjuje se da će 1 od 20 ljudi do 75. godine života u jednom trenutku razviti neki oblik epilepsije – to jest, da kumulativna incidencija epilepsije iznosi 5% te stoga predstavlja izazovan medicinski i socijalni problem. Njemu se pokušava pristupiti iz više aspekata u kojem prvenstveno zdravstveni djelatnici funkcioniraju kao tim- bilo postavljanjem preciznije dijagnoze i klasifikacije bolesti (laboratorijskom dijagnostikom, slikovnim tehnikama itd.), bilo individualiziranjem terapije prilagođavajući doze rizičnim skupinama bolesnika, kao i prateći iste korištenjem osjetljivih parametara. Pri tome se glavni terapijski pristup očituje primjenom otkrivenih lijekova, a savjetovanje s farmaceutom ili neurologom od ključne je uloge za njihovo pravilno i svrsishodno kombiniranje. Budući da epileptičko žarište zahvaća i psihomotorne regije dovodeći do poremećaja raspoloženja, ponašanja i emocija potreban je i razgovor s psiholozima ili psihijatrima. U konačnici, svima je zajednički cilj poboljšati kvalitetu života tim bolesnicima.

Kako se na tržištu pojavi novi lijek, tako postaje iznimno značajno razviti i analitičku metodu kojom bi se određivao njegov sadržaj, kako u gotovim formulacijama, tako i u biološkim uzorcima, a pogotovo kada se radi o lijeku koji je česta sastavnica politerapije. U takvim kombinacijama u kojima su ostali lijekovi najčešće suženog terapijskog raspona, nužno je pratiti serumske koncentracije više lijekova istovremeno, budući da previsoka doza pojedinih može ostvariti toksičan, a preniska nedovoljan učinak. Biološki uzorci su složen matriks pa je potreban postupak kojim će se analit pročistiti i ukoncentrirati, a zatim određenom analitičkom metodom i kvantificirati.

Cilj ovog rada bilo je preko biokemijskih parametara (ureje i kreatinina) procijeniti utjecaj bubrežne funkcije na koncentracije levetiracetama nakon višekratno primijenjene doze. Sporedni cilj bio je i utvrditi utjecaj koncentracije levetiracetama na bubrežnu funkciju ispitanika te ulogu jetre preko jetrenih enzima na klirens samog lijeka i potrebe za prilagođavanjem doziranja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Uzorci bolesnika uzorkovani su u epruvete bez aditiva i antikoagulansa. Transportirani uzorci nisu bili zamrznuti, a odmah pri primitku u laboratorij, bili su centrifugirani 10 minuta pri 3500 o/min na sobnoj temperaturi kako bi se dobio serum. Ukoliko je analiza bila planirana unutar 24 h, uzorci su se čuvali u hladnjaku na +4°C, a ukoliko kasnije bivali su pohranjeni na -20 °C u ledenici hladnjaka.

Svakom je ispitaniku određivana serumska koncentracija levetiracetama uzorkovana neposredno prije uzimanja sljedeće doze (nakon što je postignuto ravnotežno stanje lijeka u organizmu kako bi se isključile razlike uslijed farmakokinetike), bubrežni parametri (serumske koncentracije kreatinina, ureje), jetreni parametri (katalitičke koncentracije aspartat- i alanin-aminotransferaza, AST i ALT) u razdoblju od 22.02.-05.12.2018. godine.

3.1.2. Kemikalije

- lužina- 0,5 M otopina NaOH
- unutarjni standard (IS)- kloramfenikol 1 mg/mL
- pufer- 50 mmol NaH₂PO₄xH₂O (Merck KgaA, Njemačka)
- mobilna faza: pumpa A- 300 mL fosfatnog pufera (50 mmol NaH₂PO₄xH₂O)
pumpa B- 240 mL acetonitrila (Merck KgaA, Njemačka)
- 90 mL metanola (Merck KgaA, Njemačka)
- organsko otapalo (smjesa etil acetat:n-heksan=1:1)- (Merck KgaA, Njemačka)
- komercijalna serumska kontrola ClinCheck Serum Control LOT 1388 i 1056; liofilizat (Recipe, Njemačka)
- komercijalni serumski kalibrator ClinCal- Serum Calibrator Antiepileptics 2 LOT 1427; liofilizat (Recipe, Njemačka)
- voda HPLC čistoće (<0,060 µS/cm)

3.1.3. Radni instrumenti

- vodoravna tresilica (Heidolph Promax 1020)
- centrifuga (Hettich zentrifugen Rotofix 32)
- vorteks (IKA Genius 3)
- vodena kupelj
- HPLC 6 kromatografski sistem visoke djelotvornosti (Prominence Shimadzu) s kontrolom sistema (CBM-20A), pumpama (LC20 AD), automatskim injektorom (SIL-20AC), ATLANTIS termostatskim kolonom (CTO-20AC) i predkolonom, degaserom (DGU-20A5R)
- PDA (diode array) detektor (Prominence Shimadzu)- SPD-M20A

3.1.4. Laboratorijski pribor

- automatske pipete (Eppendorf Research plus) od 10-100, 20-200, 100-300, 1000-5000 μL
- staklena pipeta od 2 mL (BRAND Germany) i gumena propipeta (Kartell)
- staklene epruvete s navojem i čepovima, konusne staklene epruvete
- bočice 2 mL (Chromacol LTD, SAD)
- umetci za bočice 200 μL (Thermo Scientific, SAD)
- čepovi za bočice i silikonski umetci za čepove (Thermo Scientific, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema kalibratora i standarda

lužina

Za pripremu uzoraka ekstrakcijom korištena je 0,5 M otopina NaOH dobivena razrjeđivanjem 0,3 mL 50% otopine NaOH sa 7,5 mL destilirane vode.

IS (unutarnji standard)

Unutarnji standard je kemijski spoj strukturno i fizikalno-kemijskim svojstvima srodan analitu koji se koristi za kalibraciju svih uzoraka (kontrole, kalibratora). Koncentracija koja se dodaje u uzorak je poznata i jednaka za svaki uzorak čime se kalibracija temelji na omjeru površine pikova između analita i unutarnjeg standarda, a ne na apsolutnom odgovoru analita

kako bi se eliminirale interindividualne varijabilnosti, pogreške zbog gubitaka i efekta matriksa. Naime, pretpostavlja se kako će potencijalni gubici analita nastali tijekom pripreme ili analize zbog sličnih svojstava biti jednaki i kod unutarnjeg standarda pa se iz omjera površine pika analita i unutarnjeg standarda izrađuje kalibracijska krivulja koja služi za izračun nepoznatih koncentracija. (Mandić, 2018.)

Korišteni kloramfenikol koncentracije 1 mg/mL dobiven je odvagom 10 mg kloramfenikola (Sigma-C6455) i otapanjem u metanolu u odmjernoj tikvici od 10 mL (čuvan na -20°C valjan godinu dana). 1 mL tako dobivene matičnice razrijedi se s 9 mL pročišćene vode i tako pripremljena radna otopina IS koristi se prilikom ekstrakcije uzoraka (čuvana na +4°C ima valjanost 6 mjeseci).

Komercijalna serumska kontrola

Liofilizat (ClinCheck Serum Control, LOT 1388 i 1056) otopljen je u 1,0 mL vode HPLC kvalitete u viali nakon čega je miješana 15 minuta.

Komercijalni serumski kalibrator

Liofilizat ClinCal- Serum Calibrator Antiepileptics 2 (LOT 1427) deklarirane vrijednosti 396,0 $\mu\text{mol/L}$ također je pripremljen otapanjem u 1,0 mL vode HPLC kvalitete u viali nakon čega je miješan 15 minuta.

3.2.2. Priprema mobilne faze

Pufer

Odvagom 6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA LiChrosolv) te nadopunjavanjem 1 litrom vode HPLC kvalitete pripremljen je pufer 50 mmol $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ pri čemu je pH iznosio 4,5, a nakon pripreme ga je potrebno profiltrirati kroz celulozni (hidrofilni) filter 0,45 μm .

Mobilna faza

MF koja se propušta kroz pumpu A čini 300 mL pripremljenog fosfatnog pufera, dok MF propuštanu kroz pumpu B čini 240 mL acetonitrila (Merck KGaA- LiChrosolv) i 90 mL metanola (Merck KGaA LiChrosolv).

3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka

Ekstrakcija

Koristi se 250 μL seruma/kontrole/kalibratora, zatim se pipetira 25 μL 0,5 M NaOH nakon čega se kratko vorteksira, a potom doda 25 μL radne otopine unutarnjeg standarda (IS). Nakon dodanih 2,5 mL organskog otapala (smjese etil acetata:n-heksana=1:1) i 15 minuta treskanja na vodoravnoj tresilici, uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 3500 o/min. Staklenom pipetom odvoji se 2 mL gornjeg organskog sloja, prebaci u čistu staklenu konusnu epruvetu od 10 mL te upari do suhog u struji zraka u vodenoj kupelji na 37°C. Suhi ostatak otopi se u 200 μL mobilne faze, kratko vorteksira i inicira 50 μL u sustav HPLC 6 Prominence Shimadzu.

3.2.4. Kromatografski uvjeti

HPLC sustav Prominence Shimadzu s DAD (*diode array detector*)

Ukupni protok: 1,5 mL

Program:	vrijeme (min)	pumpa B %
	0,01	10
	10,00	10
	10,50	50
	15,00	50
	15,10	10
	20,00	10

Koristi se kolona ATLANTIS T3 C18; 5 μm : 4,5x250 mm te ATLANTIS predkolona

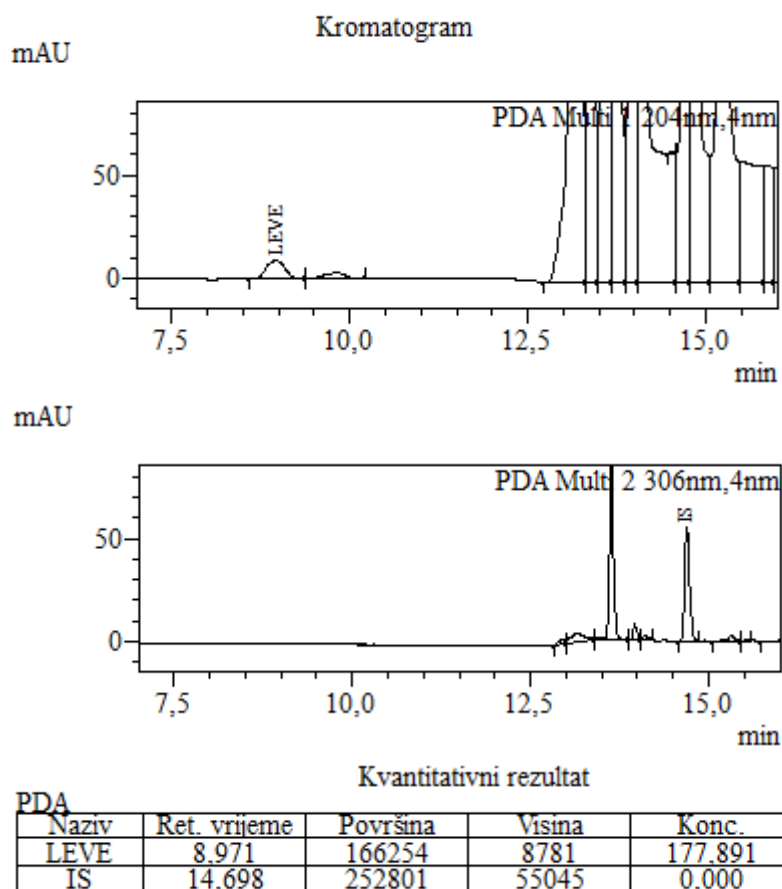
Kolona grijana na 30°C

Inicirano 50 μL pripremljenog uzorka

3.2.5. Očitavanje rezultata

Koncentracija levetiracetama mjeri se na valnoj duljini 204 nm na očekivanom vremenu retencije 8,6 min, a IS na 306 nm, na očekivanom vremenu retencije 14,6 min. Ponekad je potrebno provjeriti UV spektar da nije došlo do pomaka pikova zbog eventualnog onečišćenja mobilne faze. Kalibracijska krivulja dobivena je iz omjera površine krivulje pika analita i IS prema zadanoj koncentraciji kalibratora. Prvo se očitavaju kontrolni uzorci i ukoliko su rezultati kontrolnih uzoraka u seriji s uzrocima bolesnika u dozvoljenim

intervalima, mogu se očitati kromatogrami uzoraka bolesnika poput onog prikazanog na slici 8.



Slika 8. Prikaz kromatograma i kvantitativnog rezultata levetiracetama uzorka komercijalne kontrole i unutaršnjeg standarda (IS) (dobivena pomoću HPLC uređaja- Prominence Shimadzu i PDA detektora SPD-M20A)

3.3. Verifikacija metode

Za ispitivanje preciznosti u seriji, međupreciznosti i točnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci proizvođača Recipe (razina I i II; LOT 1388 i LOT 1056), s ciljnim vrijednostima definiranim od strane proizvođača.

Za ispitivanje donje granice detekcije korišten je uzorak plazme koji ne sadrži ciljni lijek (levetiracetam). Donja granica detekcije (LOD) izračunata je pomoću srednje vrijednosti šuma bazne linije i standardne devijacije, dok je donja granica kvantifikacije (LOQ) određena pomoću uzorka niske koncentracije (najniža točka pravca linearnosti) analiziranog u deset ponovljenih ekstrakcija i mjerenja. Za donju granicu kvantifikacije korištena je primarna

otopina lijeka u ampuli (Keppra 100 mg/mL; CIA70165E) koja je višekratno razrijeđena te pomiješana s plazmom koja ne sadrži ciljnjii lijek (*spike*) do ciljne vrijednosti od 11,7 $\mu\text{mol/L}$. Linearnost je određena temeljem izračuna koeficijenta linearne regresije metodom najmanjih kvadrata; analizom višekratno razrijeđenog uzorka pomoću plazme koja ne sadrži ciljni lijek –*spike* (otopina lijeka; Keppra 100 mg/mL; CIA70165E). Linearnost metode je provjerena za raspon od 5900 $\mu\text{mol/L}$ do 11,5 $\mu\text{mol/L}$.

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni i uređeni grafički i/ili tablično pomoću programa Microsoft Excel i MedCalc te se procjenjivalo zadovoljavaju li dobivene vrijednosti propisane kriterije prihvatljivosti.

4. REZULTATI

4.1. Ispitanici

Ispitanici (N=78) na terapiji levetiracetamom razvrstani su prema dobi, spolu i vrsti terapije (monoterapija ili politerapija) kao što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Raspodjela ispitanika prema dobi, spolu, vrsti terapije

	žene	muškarci	ukupno
N (%)	40 (51,3)	38 (48,7)	78 (100)
$\bar{x}$ dob (g.)	38,7	44,7	42,1
minimum dob (g.)	2	0	0
maksimum dob (g.)	77	86	86
politerapija N (%)	29 (72,5)	24 (63,1)	53 (67,9)
monoterapija N (%)	11 (27,5)	14 (36,8)	25 (32,1)
terapijski raspon* N (%)	29 (72,5)	22 (57,9)	51 (65,4)

*serumska koncentracija LEV između 70 i 270 $\mu\text{mol/L}$ (prema literaturno propisanom rasponu za liječenje epilepsije www.ilae.org/)

Među ispitanicima je uočen nešto veći udio žena (51,3%) u odnosu na muškarce (48,7%). Prema statističkoj obradi podataka u tablici 5. može se utvrditi da se levetiracetam propisuje u terapiji bolesnicima u širokom starosnom rasponu od 7 mjeseci do 86 godina života, pri čemu su žene nešto mlađe životne dobi od muškaraca, dok prosječna ukupna starost iznosi 42,1godinu.

Prateći vrstu terapije, očekivano više bolesnika primjenjuje lijek u obliku politerapije (N=53) u odnosu na monoterapiju (N=25).

Prema kriteriju ILAE-e propisan raspon levetiracetama za liječenje epilepsije u rasponu je od 70 do 270 $\mu\text{mol/L}$ (www.ilae.org/).

Ovisno o izmjerenoj serumskoj koncentraciji lijeka za svakog pojedinog ispitanika, provjeravalo se postizanje terapijskog raspona. Razvrstavanjem ispitanika prema spolu i koncentracijama levetiracetama prema terapijskom rasponu, dobiven je numerički podatak o udjelu bolesnika s postignutim terapijskim rasponom u obje populacije. Serumske koncentracije lijeka kod žena su u većem udjelu zastupljene u terapijskom rasponu (72,5%) u

odnosu na muškrce (57,9%), a u ukupnoj skupini 65,4% . Te se vrijednosti gotovo potpuno preklapaju s udjelom bolesnika po spolu koji lijek primjenjuju u obliku politerapije.

4.2. Biokemijski parametri funkcije bubrega i jetre

Izmjerene vrijednosti bubrežnih i jetrenih parametara ispitanika prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Prikupljene vrijednosti biokemijskih parametara ispitanika

	N	min	max	medijan	95 CI	percentil 5	percentil 95	P*vrijednost
kreatinin [μmol/L]	75	17	319	66	56,1- 70,5	17,2- 33,9	98,4- 312,8	<0,0001
ureja [mmol/L]	74	1,7	25,5	4,7	4,0- 4,9	1,7- 2,4	8,2- 24,9	<0,0001
AST [U/L]	62	9	91	23	21- 25	12,6	60	<0,0001
ALT [U/L]	76	5	170	22	19,9-25,0	5,1- 10,4	54,5-162,6	<0,0001

*D'Agostino-Pearson test

95 CI=interval 95%-tne pouzdanosti

Normalnost razdiobe podataka ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Dobivene P vrijednosti za sve parametre bile su niže od 0,05, što je određena razina značajnosti testa. Prema tom kriteriju, pokazano je da podaci nisu razdijeljeni po normalnoj razdiobi, ali budući da se radi o velikim uzorcima (N>30), prema centralnom graničnom teoremu, njihove aritmetičke sredine, odnosno medijani ipak prate normalnu distribuciju.

Medijani svih biokemijskih parametara (kreatinin, ureja, AST, ALT) su unutar referentnih vrijednosti. Maksimalne vrijednosti kreatinina (319 μmol/L) i ureje (25,5 mmol/L) odgovaraju vrijednostima bubrežnih poremećaja te AST (91 U/L) i značajnije ALT (170 U/L) koji su organ-specifični jetreni enzimi, ukazuju da su među ispitanicima i oni s jetrenim poremećajima.

4.3. Koncentracije levetiracetama u ispitanika i usporedba s terapijskim referentnim rasponom

Koncentracije levetiracetama ($\mu\text{mol/L}$) u serumu podijeljene su s dnevnom dozom lijeka (mg) kako bi se koncentracija ujednačila prema dozi ($\mu\text{mol/L/mg}$) čime su dobivene kasnije korištene vrijednosti **omjera koncentracija/doza (C/D)**.

U tablici 7. prikazani su medijani koncentracija levetiracetama u serumu i primijenjene doze i koncentracije ujednačene prema dozi u svih ispitanika i podijeljenih prema spolu.

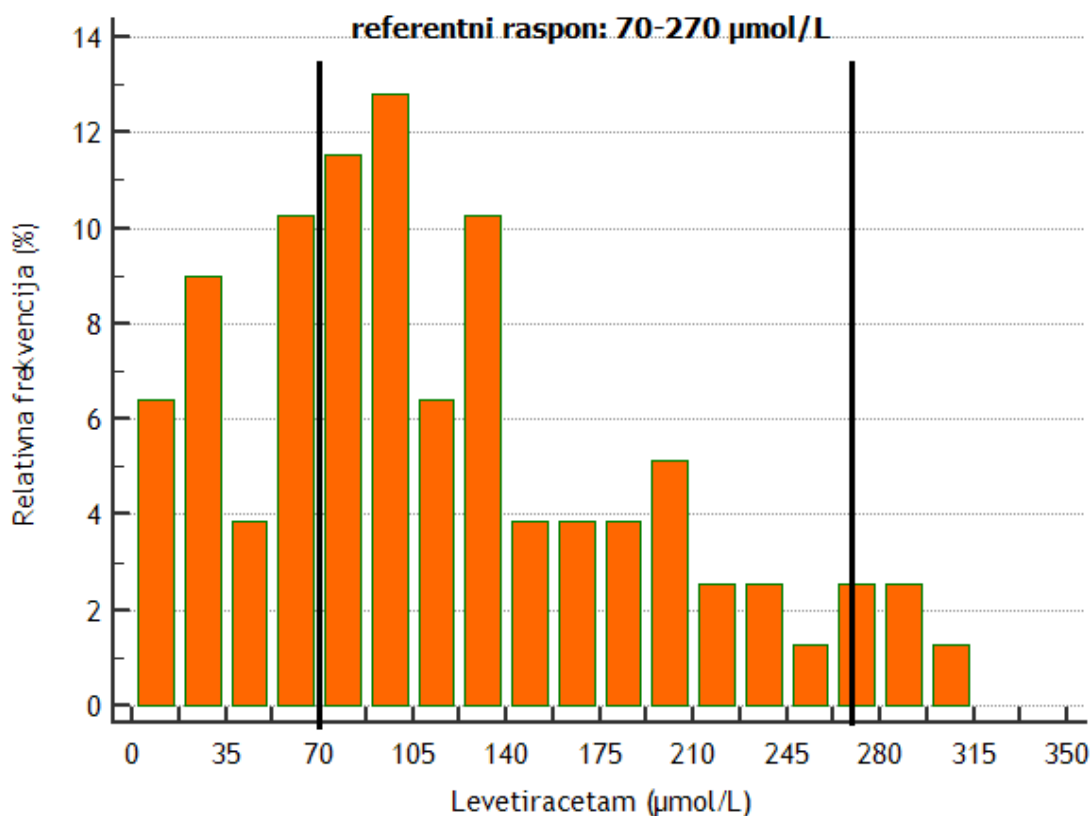
Tablica 7. Koncentracije i doze levetiracetama u ispitanika podijeljenih prema spolu

	žene	muškarci	ukupno
levetiracetam ($\mu\text{mol/L}$)			
medijan	102,8	91,3	99,2
min	<13	<13	<13
max	307	285,7	307
5-95 percentile	27,6-272,6	14,2-260,3	16,5-273,4
levetiracetam doza (mg)			
medijan	1750	1500	1500
min	250	300	250
max	4250	3000	4250
5 - 95 percentile	500-3000	500-3000	500-3000
C/D ($\mu\text{mol/L/mg}$)			
medijan	0,084	0,073	0,079
min	0,0065	0,008	0,0065
max	0,404	0,4384	0,4384
5 - 95 percentile	0,014-0,187	0,010-0,204	0,011-0,195

5-95 percentile (95% CI)=intervalom obuhvaćeno 5-95% podataka s 95%-tnom pouzdanosti

Prema statističkoj obradi podataka prikazanih tablicom 7. najmanje izmjerene serumske koncentracije lijeka kod pripadnika oba spola bile su ispod granice detekcije metode (<13,00 $\mu\text{mol/L}$), dok je najveća koncentracija zabilježena u ženskoj populaciji (307 $\mu\text{mol/L}$).

Ukupno dnevno primijenjene terapijske doze pojedinog ispitanika kretale su se u rasponu od svega 250 mg (minimalna vrijednost) do 4250 mg (maksimalna vrijednost) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti između 500 i 3000 mg.



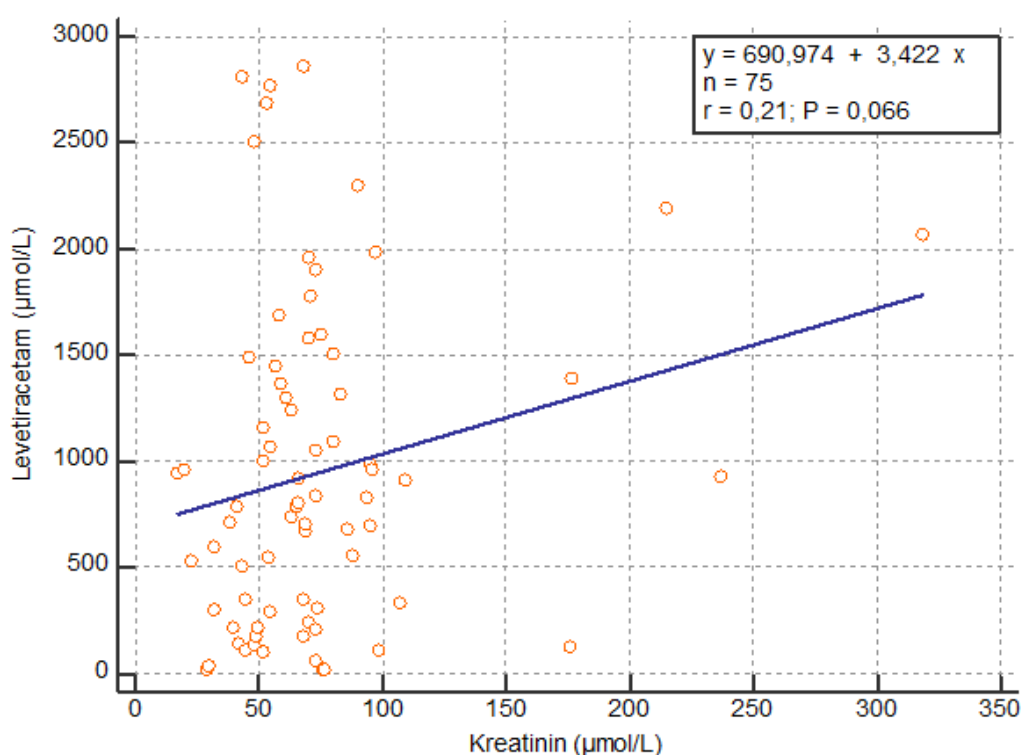
Slika 9. Učestalost serumskih koncentracija levetiracetama

Histogramski prikaz sa slike 9. prikazuje koncentracije levetiracetama ispitanika (N=78) prema učestalosti, neovisno o dobi, spolu i vrsti terapije. Vidljiv je pomak vrijednosti koncentracija prema donjoj granici terapijskog raspona preuzetog iz literature (70-270 µmol/L), iako su najveće relativne učestalosti ipak unutar referentnog raspona.

4.4. Utjecaj funkcije bubrega na koncentracije levetiracetama

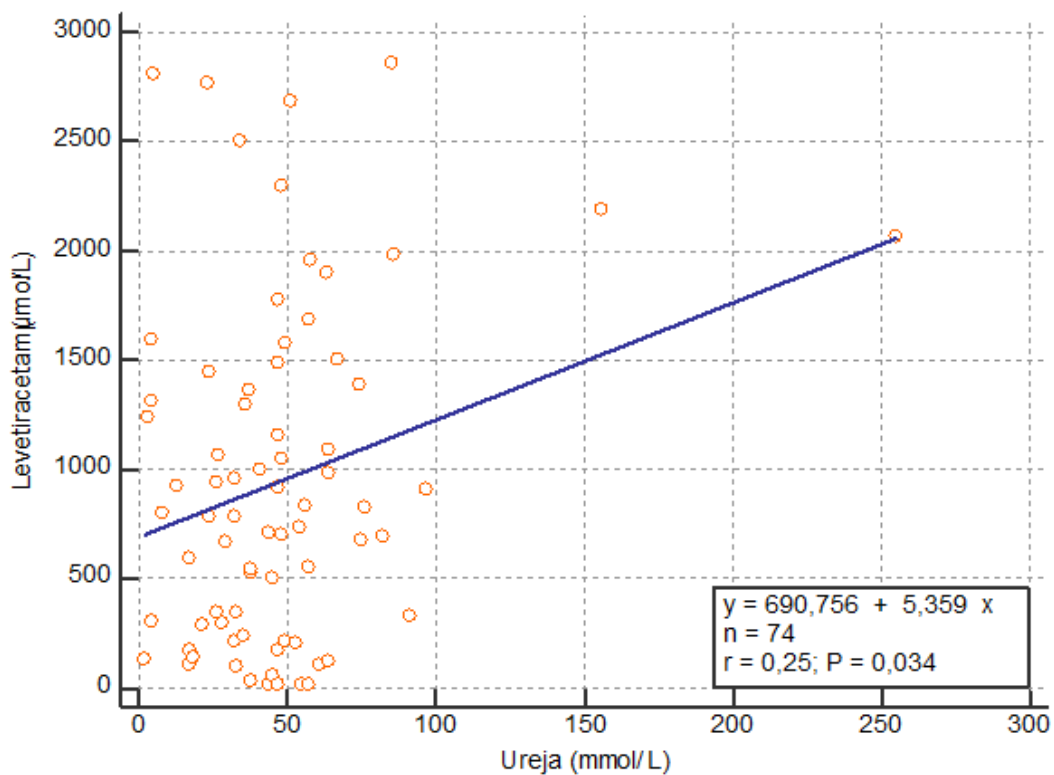
a) koncentracije levetiracetama

Analizirana je povezanost između izmjerenih koncentracija levetiracetama u serumu i biokemijskih parametara kreatinina i ureje kao pokazatelja bubrežne funkcije (Slika 10. i 11.).



Slika 10. Ovisnosti koncentracije levetiracetama o kreatininu u serumu

Dobiveni model linearne regresije prikazan slikom 10. (regresijski pravac) aproksimira izravnu proporcionalnost eksperimentalnih rezultata ispitanika- koncentracije levetiracetama kao zavisne varijable o koncentraciji kreatinina kao nezavisne varijable. Dobivena P vrijednost (0,066) nije statistički značajna, ali je vrlo blizu granične vrijednosti statističke značajnosti ($\alpha=0,05$). Prema tom kriteriju, prihvaća se nul-hipoteza, odnosno negira postojanje statistički značajne povezanosti varijabli.

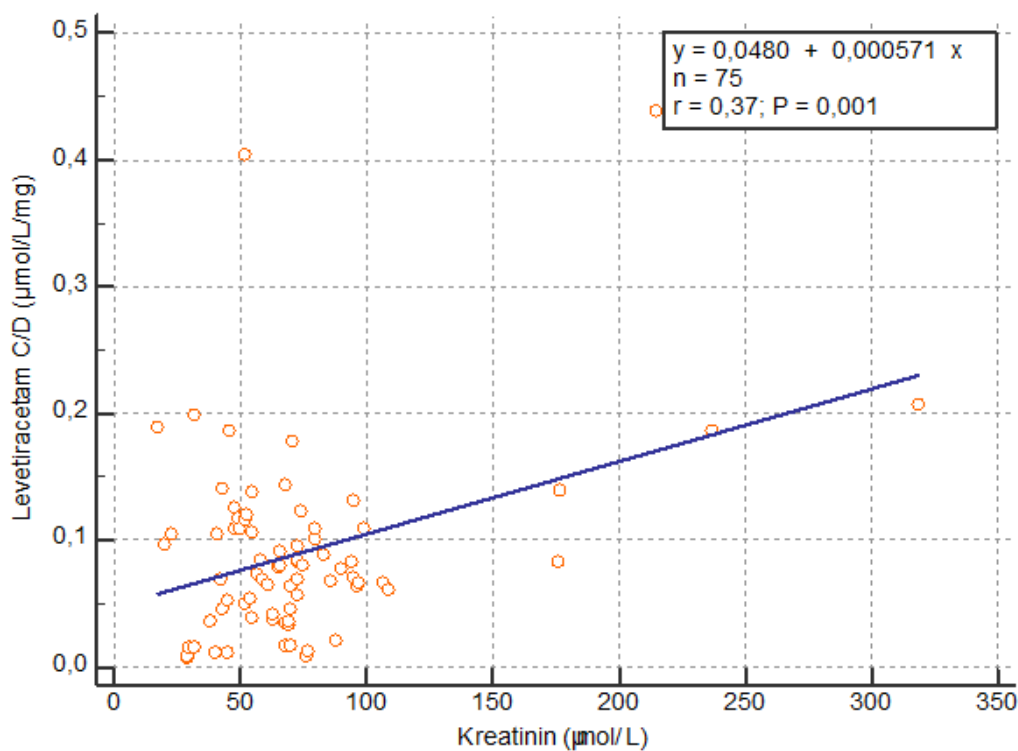


Slika 11. Ovisnosti koncentracije levetiracetama o ureji u serumu

Linearni regresijski model sa slike 11. dobiven na isti način također prati izravnu proporcionalnost koncentracije levetiracetama u serumu kao zavisne varijable o koncentraciji ureje u istom kao nezavisne varijable. U ovom slučaju dobivena P vrijednost (0,034) niža je od statističke značajnosti testa ($\alpha=0,05$) čime se prihvaća alternativna (H_1) hipoteza- postojanje statistički značajne povezanosti ovih varijabli.

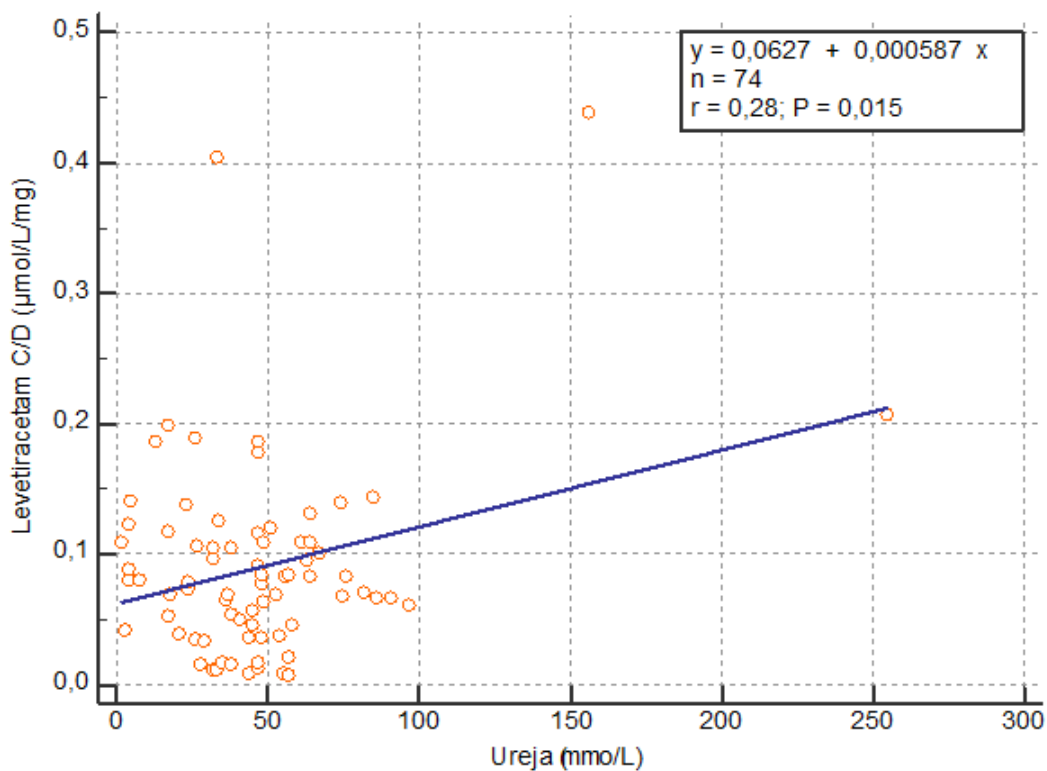
b) koncentracije levetiracetama ujednačene prema dozi

Zatim se analiziralo postoji li model ovisnosti omjera koncentracija/doza levetiracetama kao zavisne varijabla i bubrežnih parametra (kreatinin, ureja- nezavisna varijabla).



Slika 12. Ovisnosti omjera koncentracija/doza levetiracetama o kreatininu u serumu

Slikom 12. prikazan je regresijski pravac ovisnosti omjera koncentracija/doza levetiracetama o koncentraciji kreatinina, a dobivena P vrijednost (0,001) je statistički značajna prema čemu se također prihvaća hipoteza H_1 , odnosno potvrđuje da postoji statistički značajna povezanost ovih varijabli.



Slika 13. Ovisnost omjera koncentracija/doza levetiracetama o ureji u serumu

Regresijski pravac ovisnosti omjera koncentracija/doza levetiracetama o koncentraciji ureje daje linearni prikaz na slici 13. te je dobivena P vrijednost (0,002) tog modela također manja od statističke značajnosti testa ($\alpha=0,05$) prema čemu se prihvća hipoteza H_1 , odnosno potvrđuje statistički značajna povezanost varijabli.

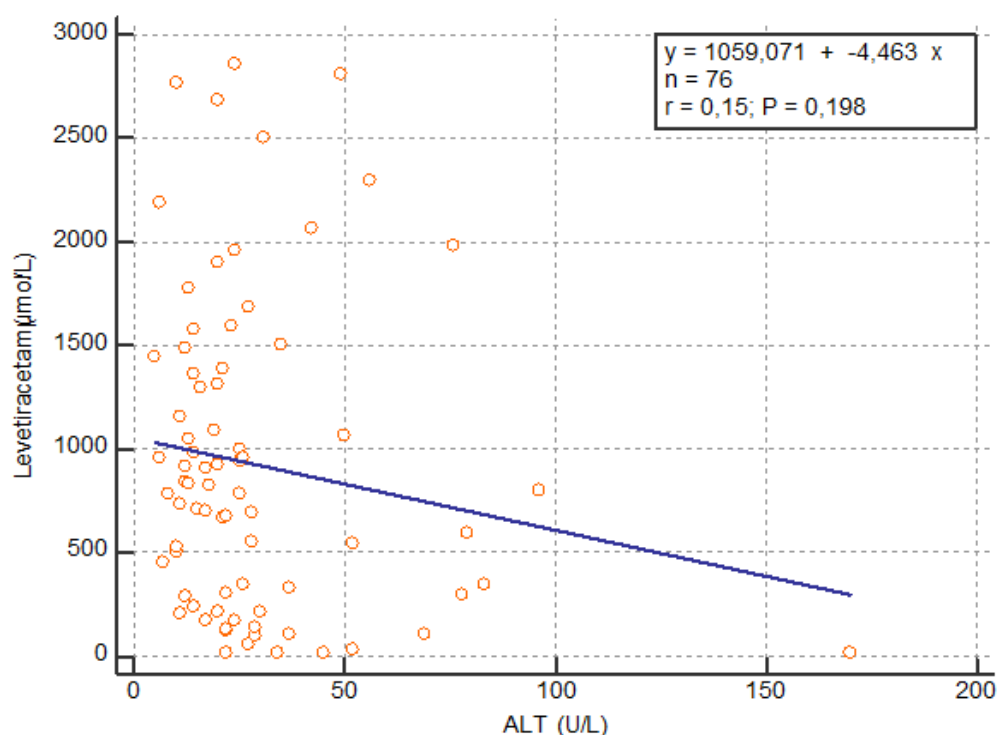
4.5. Utjecaj funkcije jetre na koncentracije levetiracetama

Za procjenu utjecaja funkcije jetre na koncentracije levetiracetama u serumu analizirani su jetreni enzimi- katalitičke koncentracije AST i ALT (aspartat- i alanin-aminotransferaze) te njihov utjecaj na serumske koncentracije lijeka.

Tablica 8. Linearni regresijski model koncentracije levetiracetama i jetrenih parametara

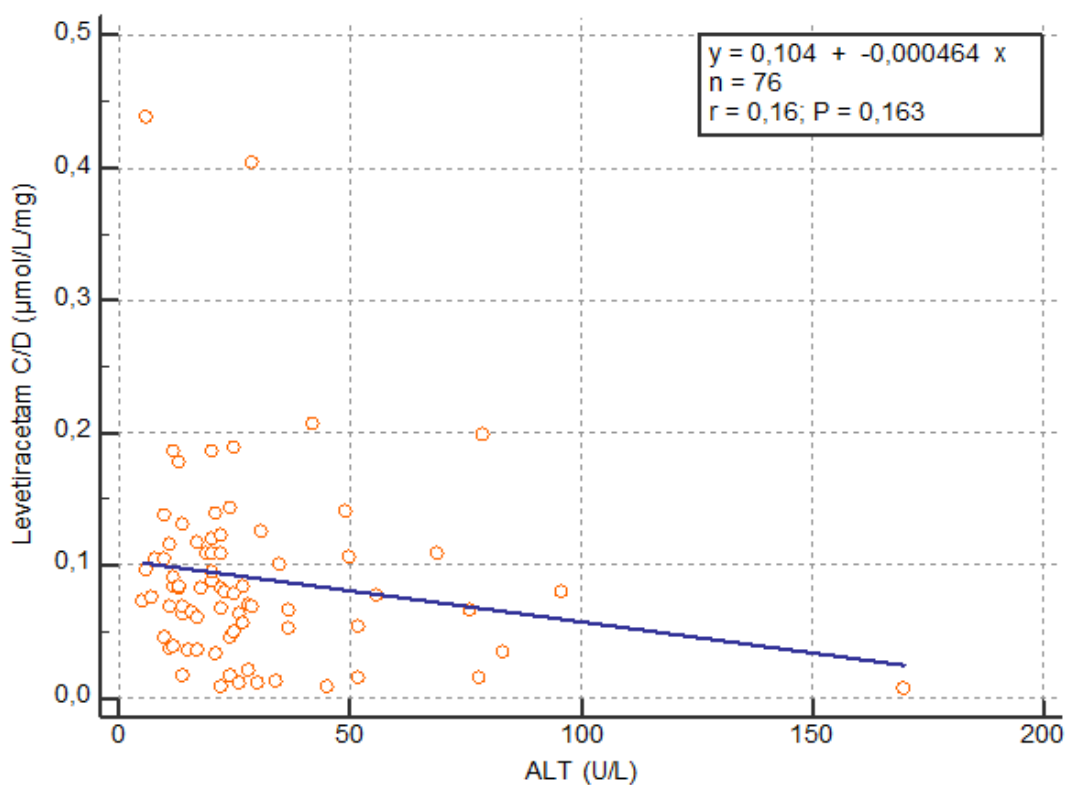
	AST (U/L)	ALT (U/L)
levetiracetam ($\mu\text{mol/L}$)	$y = 1023,209 - 0,714x$ $P = 0,909$	$y = 1059,071 - 4,463x$ $P = 0,198$
levetiracetam C/D ($\mu\text{mol/L/mg}$)	$y = 28,6464 - 0,006226x$ $P = 0,8279$	$y = 0,104 - 0,000464x$ $P = 0,163$

Dobivene vrijednosti prikazane pomoću tablica 8., a grafički je prikazano samo na primjeru katalitičke koncentracije alanin-aminotransferaze kao organ-specifičnijeg jetrenog enzima.



Slika 14. Ovisnosti koncentracije levetiracetama o katalitičkoj koncentraciji alanin-aminotransferaze (ALT)

Regresijski pravac levetiracetama i ALT prati naizgled obrnutu proporcionalnost eksperimentalno dobivenih rezultata ispitanika- koncentracije levetiracetama kao zavisne varijable o katalitičkoj koncentraciji ALT kao nezavisne varijable.



Slika 15. Ovisnosti omjera koncentracija/doza levetiracetama o katalitičkoj koncentraciji alanin-aminotransferaze (ALT)

Dobiven regresijski pravac za ovisnost između omjera koncentracija/doza levetiracetama i katalitičke koncentracije ALT također pokazuje obrnuto proporcionalnu linearnu povezanost. Prema dobivenim P vrijednostima (Tablica 8.) za niti jedan parametar jetrene funkcije nije dokazana statistički značajna povezanost s varijablama levetiracetama (C, C/D) u serumu.

5. RASPRAVA

Za terapijsko praćenje koncentracija lijeka nužno je zadovoljavanje uvjeta poput toga da serumska koncentracija i klinički učinci lijeka, levetiracetama, puno bolje koreliraju nego model „doza-činak“, zatim da postoji jasno definirana korelacija između serumske koncentracije i kontrole napadaja jer zapravo niska i visoka koncentracija dovode do nekontroliranih napadaja i toksičnog učinka. Propisani terapijski rasponi za antiepileptike nove generacije nisu konačno definirani jer su dokazane značajne individualne razlike te se za procjenu terapijske koncentracije koristi individualni pristup i ovisi o indikaciji za koju se primjenjuje. Za učinkovitost levetiracetama pri liječenju epilepsije propisan je referentni raspon od 70-270 $\mu\text{mol/L}$ (www.ilae.org/) koji se u radu uzimao za procjenu serumskih koncentracija bolesnika. U obzir treba uzeti individualne razlike, odnosno činjenicu da neki bolesnici postižu terapijski učinak i na nižim, odnosno višim koncentracijama pa se terapijski rasponi trebaju interpretirati s visokim stupnjem fleksibilnosti.

Da je ova tematika danas dosta istraživana i aktualna, potvrđuje i još nekoliko novijih radova koji su proveli validaciju HPLC-UV metode kao preporučene za serumsko određivanje levetiracetama, poput: Engelbrecht i sur. 2017. te Kalaria i sur. 2018. i svakom je potvrđena jednostavnost, ekonomičnost i preciznost metode u kliničkoj primjeni u odnosu na neke ranije korištene. Međutim, dosadašnje studije nisu pokazale potrebu terapijskog praćenja levetiracetama, budući da nisu uočile klinički relevantne interakcije s drugim lijekovima i AE, posebice ne biotransformacijom preko jetrenih izoenzima citokroma P₄₅₀ jer u potpunosti zaobilazi hepatski put metabolizma za razliku od većine lijekova (Patsalos, 2004; www.rxlist.com).

U provedenom ispitivanju bolesnici na terapiji levetiracetamom praćeni i analizirani su ovisno o dobi, spolu i vrsti primijenjene terapije te su procjenjene serumske koncentracije u odnosu na terapijski raspon.

Obuhvaćeni su bolesnici svih dobnih skupina (od 7 mjeseci do 86 godina), a značajno za reprezentativnost uzorka oni krajnjih. Naime, dokazano je da pedijatrijski bolesnici (mlađi od 7 godina) te gerijatrijski (stariji od 65 godina) pokazuju znatno veću incidenciju bolesti u odnosu na ukupnu populaciju (Mudrovčić M i sur., 2016).

Analiza ispitanika prema spolu, pokazala je neznatno veći udio žena (51,3%) u odnosu na muškarce (48,7%) baš kao što je opisano u nekim literaturnim podacima koji pokazuju veću incidenciju generaliziranih epileptičnih napadaja kod žena (Christensen i sur., 2005), a u nekim zemljama i veću incidenciju svih epilepsija (Neligan, Sander, 2015).

Ovisno o vrsti terapije, statistički podatak o većem udjelu bolesnika na politerapiji neovisno o spolu (67,9%, više nego dvostruko veći od onih na monoterapiji- 32,1%) očekivan je i u skladu s karakteristikama lijeka (EMA-European medicines agency), budući da se radi o primarno pomoćnom lijeku u liječenju epileptičnih napadaja, što znači da bolesnici primjenjuju barem još jedan antiepileptik uz levetiracetam. Učestalija primjena levetiracetama u politerapiji potvrđena je u još nekoliko studija (Egunsola i sur., 2016; Zhan-Miao i sur., 2018).

Zanimljiv je rezultat preklapanja broja bolesnika na politerapiji s onima koji su postigli zadovoljavajuću serumsku koncentraciju lijeka prema kriteriju– redom 29 žena u obje kategorije; 24 odnosno 22 muškaraca te 53 bolesnika ukupno na politerapiji i 51 sa serumskom koncentracijom unutar terapijskog raspona. Time bi se mogla uspješnost kontrole napadaja u terapijskom rasponu serumskih koncentracija lijeka pripisati upravo politerapijskom pristupu liječenja.

Vrijednosti biokemijskih parametara- prvenstveno kreatinina i ureje kao pokazatelja bubrežne funkcije te dodatno katalitičke koncentracije aspartat- i alanin-aminotransferaze kao pokazatelja jetrene funkcije također su obrađene statistički.

Medijani svih biokemijskih parametara su unutar referentnih vrijednosti propisanih od strane Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), ali njihove maksimalne vrijednosti (319 $\mu\text{mol/L}$ kreatinina, 25,5 mmol/L ureje, 91 U/L AST i 170 U/L ALT) potvrđuju da su u uključeni i bolesnici s bubrežnim poremećajima i s oštećenjem jetre ili indukcijom jetrenih enzima koji mogu utjecati na metabolizam lijekova.

Vrijednosti serumskih koncentracija levetiracetama, protokoli doziranja bolesnika te omjer serumске koncentracije i dnevne doze (C/D) statistički su analizirane u ukupnoj skupini i prema spolu.

Najveća serumska koncentracija levetiracetama (307 $\mu\text{mol/L}$), kao i primijenjena doza (4250 mg) uočena je u populaciji žena što se može povezati s fenomenom „katamenijalne epilepsija“ što znači i „menstruacijska epilepsija“. Naime, činjenica da su žene tijekom života izložene značajnijim i češćim hormonskim oscilacijama ima utjecaja na različitu pojavnost i učestalost epileptičnih napadaja tijekom menstrualnog ciklusa (češće prije i tijekom menstruacije) što je prvi puta opisao Sir Charles Locock 1857. godine u članku objavljenom u medicinskom časopisu „Lancet“. U tome ključnu ulogu imaju spolni hormoni

koji mogu djelovati na epileptogenu aktivnost. Estrogen, primjerice, povećava epileptogenu aktivnost, dok ju progesteron smanjuje. No, osim same koncentracije estrogena i progesterona, važniji je omjer između ta dva hormona (Miškov, 2005). Sudeći prema tome, u prilog ide podatak o mogućoj nužnosti povećavanja doze kod žena tijekom menstrualnog ciklusa kako bi se veća incidencija napadaja u pojedinoj fazi ciklusa i dalje održavala pod kontrolom.

Prateći vrijednosti dnevnih doza i postizanja referentnih raspona neovisno o spolu, može se u ispitanika uočiti pomak vrijednosti levetiracetama prema subdoziranosti (najveće relativne učestalosti na donjoj granici referentnog raspona- oko 100 $\mu\text{mol/L}$) te da jako mali udio njih iznad terapijskog raspona (3-5%).

Dobiven podatak o doziranju s 95%-tnim intervalom pouzdanosti između 500 i 3000 mg slaže se s literaturnim podacima o najučestalijim doziranjima pri kojima je postignuta kontrola napadaja propisanim od strane EMA-e (European medicines agency), a iznosi 1000 do maksimalno 3000 mg.

Ujednačavanje koncentracija prema dozi (C/D) pokazale su bolju statističku značajnost- bolja varijabla koja olakšava usporedbu s pojedinim biokemijskim parametrima, ujednačena je i među spolovima, medijani, minimalne i maksimalne vrijednosti manje osciliraju pa je manje podložna individualnim varijabilnostima ispitanika obzirom na masu tijela i uzetu dozu.

Statistička obrada pokazala je značajnu ovisnost levetiracetama o biokemijskim parametarima koji pokazuju funkciju bubrega (kreatinina i ureje).

Za koncentracije kreatinina nije dobivena statistički značajna P vrijednost (0,066), ali je vrlo blizu granične vrijednosti statističke značajnosti ($\alpha=0,05$), dok je za ureju rezultirao P vrijednošću (0,034) nižom od statističke značajnosti testa ($\alpha=0,05$) čime je potvrđeno postojanje statistički značajne povezanosti ovih varijabli.

Nakon ujednačavanja koncentracija levetiracetama prema dozi dobivene su bolje statističke značajnosti za oba parametra- kreatinin $P=0,001$, $r=0,37$; ureja $P=0,002$, $r=0,36$ te budući da su niži od razine značajnosti testa, može se ustvrditi postojanje njihove statistički značajne povezanosti. To je očekivano s obzirom da se lijek iz sistemske cirkulacije uklanja uglavnom renalnim putem u nepromijenjenom obliku te je literaturno dokazana povezanost eliminacije lijeka s klirensom kreatinina (www.rxlist.com).

Nekoliko je skupina znanstvenika dosad proučavalo usku ovisnost klirensa levetiracetama o funkciji bubrega. Tako su Spengler i sur. 2014. godine došli do zaključka kako se, usprkos većinski tolerantnim i blagim nuspojavama lijeka, isti pokazao kao induktor akutnog

zatajenja bubrega. Optimizaciju doziranja u rizičnim skupinama (bolesnici u terminalnoj fazi kronične bubrežne bolesti koji su na hemodijalizi) pratili su Shiue i sur. 2017. godine te zaključili kako se doziranjima dvaput dnevno postižu statistički značajnije preddijalizne koncentracije u serumu te bolji odgovor na terapiju u odnosu na jednostruko dnevno doziranje.

Unazad zadnjih 6 godina, nekoliko je studija opisalo dosad nedokazane slučajeve hepatotoksičnosti levetiracetama u kojima je pri iniciranju lijeka (bilo u kombinaciji s drugim lijekom ili samostalno) asimptomatski porasla katalitička koncentracija jetrenih enzima te došlo do akutnog zatajenja jetre, a uklanjanjem lijeka iste bi se vratile unutar referentnih vrijednosti (Jayashankar i sur., 2019; Azar i Aune, 2014; Sethi i sur., 2013; Gutierrez-Grobe i sur., 2013). To je iznenađujuće s obzirom na činjenicu da levetiracetam zaobilazi hepatički put metabolizma i eliminacije te, stoga, njegov klirens literaturno ne pokazuje ovisnost o funkciji jetre (Patsalos, 2004).

Međutim, EMA u opisu svojstava lijeka ipak napominje da je kod većine bolesnika s teškim oštećenjem jetre klirens levetiracetama smanjen za više od 50% uslijed popratnog oštećenja bubrega, a njihov klirens kreatinina može pokazati i lažno niži stupanj bubrežne insuficijencije. Stoga je preporučeno 50%-tno smanjenje dnevne doze održavanja ako je klirens kreatinina $< 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ (www.ema.europa.eu)

Prateći ispitanike (N=78) u ovom radu, nije uočena povezanost statističke značajnosti između koncentracije levetiracetama i katalitičkih koncentracija AST-a i ALT-a (P vrijednosti veće od statističke značajnosti testa- 0,909 i 0,198).

6. ZAKLJUČAK

Provedba terapijskog praćenja serumskih koncentracija levetiracetama u ispitanika koji ga svakodnevno uzimaju rutinski je postupak. Nasumično je odabrana populacija od 78 ispitanika koji su pristigli u klinički laboratorij te je iz dobivenih rezultata zaključeno:

- većina ispitanika postiže uspješnu kontrolu napadaja unutar terapijskog raspona serumskih koncentracija levetiracetama (51/78) 65,4%, od čega većina primjenjuje lijek u obliku politerapije (67,9%) koja ne dostiže donju granicu terapijskog raspona kod (15/53) 28,3% njih
- postojanje granične statističke značajnosti između povezanosti samih serumskih koncentracija levetiracetama i kreatinina ($P=0,066$)
- postojanje statistički značajne povezanosti među serumskim koncentracijama levetiracetama i ureje ($P=0,034$),
- postojanje statistički značajne povezanosti između koncentracija levetiracetama ujednačenih prema dozi (omjer koncentracija i doza) i koncentracija ureje ($P=0,002$; $r=0,36$)
- postojanje statistički značajne povezanosti između koncentracija levetiracetama ujednačenih prema dozi i koncentracija kreatinina ($P=0,001$; $r=0,37$),
- nepostojanje statistički značajne povezanosti serumskih koncentracija levetiracetama, niti koncentracija nakon ujednačavanja prema dozi s jetrenim parametrima.

Dakle, postoji statistički značajna povezanost između serumskih koncentracija levetiracetama i bubrežnih parametara, ali ne i jetrenih, što je očekivano s obzirom na metabolizam (ekstrahepatički) i izlučivanje lijeka (renalno). Treba naglasiti kako su uočene statistički značajnije i bolje povezanosti varijabli u modelu ujednačenom prema dozi (omjer koncentracija i doza levetiracetama) s pojedinim parametrima.

U odnosu na dosadašnje radove povezane tematike, može se zaključiti da se proširila svijest o potrebi terapijskog praćenja ovog lijeka, ne nužno za sve bolesnike, ali barem za one s promijenjenom farmakokinetikom- kritično bolesni, oštećene bubrežne funkcije, trudnice, pedijatrijski, gerijatrijski te one s antikonvulzivnom komedikacijom propisanom/ukinutom u protokolu liječenja, kako bi im se prilagodila doza. Dosad nedokazan utjecaj oštećenja jetrene funkcije na klirens levetiracetama nije toliko naglašavan u opisu svojstava lijeka kao oštećenje bubrežne funkcije, ali je navedeno da funkcije jetre i bubrega mogu međusobno korelirati zbog čega bi se i bolesnike s oštećenjem jetre trebalo staviti pod povećan nadzor i prilagodbu doziranja ovisno o njihovoj bubrežnoj funkciji.

7. LITERATURA

Aldaz A i sur. Pharmacokinetic monitoring of antiepileptic drugs. *Farm Hosp.* 2011; 35: str. 326.–329.

Azar NJ, Aune P. Acute pancreatitis and elevated liver transaminases after rapid titration of oral levetiracetam, *J Clin Neurosci*, 2014

Bassel A. Levetiracetam in the treatment of epilepsy., *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2008, 4(3): str. 507.-523.

Bowers LD. Analytical goals in therapeutic drug monitoring, 1998, (<http://clinchem.aaccjnls.org/content/44/2/375.long>), pristupljeno 07.03.2019.

Christensen J, Kjeldsen MJ, Andersen H, Friis ML, Sidenius P. Gender differences in epilepsy, *Epilepsia*, 2005, Crasto AM. New drug approvals, Levetiracetam (<https://newdrugapprovals.org/2013/11/28/drug-spotlight-levetiracetam/>), pristupljeno 07.04.2019.

Egunsola O, Choonara I, Sammons HM. Safety of Levetiracetam in Paediatrics: A systematic review, *Plos One*, 2016

Engelbrecht L, Grobler CJ, Rheeders M.. A simple and cost-effective HPLC-UV method for the detection of levetiracetam in plasma/serum of patients with epilepsy, 2017, (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.3969>), pristupljeno 09.03.2019.

Gutierrez-Grobe Y, Bahena-Gonzalez JA, Herrera-Gomar M, Mendoza-Diaz P, Garcia-Lopez S, Gonzalez-Chon O. Acute liver failure associated with levetiracetam and lacosamide combination treatment for unspecified epileptic disorder, *Case rep Emerg Med*, 2013

Hajnšek S. Epilepsija- najnovije mogućnosti medikamentne terapije, *Medix*, lipanj 2014, broj 111

Hauser SL, Josephson SA.. Harison's neurology in clinical medicine, *McGraw-Hill education*, 2013

HKMB dokument, Harmonizacija- Lijekovi i analitička toksikologija- revidirano, 2011

Jarvie D. Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam in Select Populations (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30096051>), pristupljeno 07.03.2019.

Jayashankar S, Munakomi S, Sayeerajan V, Kafle P, Chaudhary P, Thingujam J, Poduel D, Cherian I. Case report: Levetiracetam causing acute liver failure complicating post-operative management in neurosurgical patient, *F1000Res*, 2019

Juenke J, Brown PI, Urry FM, McMiliin GA.. Drug monitoring and toxicology: a procedure for monitoring of levetiracetam and zonisamide by HPLC-UV, 2006

Kalaria SN, Dahmane E, Armhanizer M, McCarthy P, Gopalakrishnan M.. Development and validation of a HPLC-UV assay for quantification of levetiracetam concentrations in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy, 2018 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29633294>), pristupljeno 09.03.2019.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. 24. poglavlje: Antiepileptici u: Temeljna i klinička farmakologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2011, str. 399.-403.

Lertsinudom S, Chaikyakum A, Tuntapakul S, Sawanyawisuth K, Tiamkao S.r. Therapeutic drug monitoring in epilepsy clinic: a multi-disciplinary approach, *Neurology International*, 2014, 6:5620

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 196.-223.

Luterotti S. Validacija bioanalitičkih metoda, Odabrane teme iz bioanalitike, Luterotti S, Bičanić D, urednici, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1.-34.

Lynch K. Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetics, University of California San Francisco, 2013

Mandić D. Uvod u kromatografske separacije u: Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije, Debeljak Ž, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 73.-103.

Mawhinney E, Craig J, Morrow J, Russell A, Smithson WH, Parsons L, Morrison PJ, Liggan B, Irwin B, Delanty N, Hunt SJ. Levetiracetam in pregnancy: results from the UK and Ireland Epilepsy and pregnancy registers. *Neurology*, 2013, 80(4): str. 400.-405.

McMillin GA, Krasowski MD. Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring, 2016, (www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/levetiracetam), pristupljeno 07.03.2019.

Miškov S. Katamenijalna epilepsija- znamo li dovoljno o utjecaju hormona na epilepsiju žena?, Gdje smo u neurologiji 2005? Medicina temeljena na dokazima, ured. Demarin, Vida, 2005, Zagreb

Mudrovčić M, Toljan K, Popović J, Njirić N, Stručić M, Horvat Velić E, Đerke F. Epilepsija, 2016, Gyrus (http://gyrus.hiim.hr/images/gyrus10/Gyrus10_web%20verzija_Part1.pdf), pristupljeno 06.04.2019.

Naik GS, Kodagali R, Mahews BS, Thomas M, Prabha R, Mathew V, Fleming DH. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam and lamotrigine: Is there a need?, volume 37, *The Drug Monit*, 2015, str. 437.-444.

Nigović B i sur. Analitika lijekova- Praktikum, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135.-137.

Neligan A, Sander JW. The incidence and prevalence of epilepsy, 2015, (<https://www.epilepsysociety.org.uk/sites/default/files/attachments/Chapter01Neligan-2015.pdf>), pristupljeno 29.06.2019.

Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam, *Clin Pharmacokinet.*, 2004, 43(11), str. 707.-724.

Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva, 2013

Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E. Antiepileptic drugs- best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommisision on therapeutic drug monitoring, ILAE commission on therapeutic strategies, *Epilepsia*, , 2008, 49(7), str. 1239.-1276.

Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, van Rijn CM. The importance of drug ineractions in epilepsy therapy, *Blackwell Publishing, Inc., Epilepsia* 43(4), 2002, str. 365.-385.

Petelin Gadže Ž, Nanković S, Šulentić V, Poljaković Z, Čajić I, Bujan Kovač A. Pregled klasifikacija epilepsija i epileptičnih sindroma, Medicinska naklada, Zagreb, 2017, str.1.-5.

Peters F, Maurer H. Bioanalytical method validation- How, how much and why? A review, *Toxichem, Krimtech*, 2001, 68., str. 116.-127.

Prilog I. Sažetak opisa svojstava lijeka, pristupljeno 06.03.2019. (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keppra-epar-product-information_hr.pdf)

Rane CT, Dalvi SS, Gogtay NJ, Shah PU, Kshirsagar NA. A pharmacoeconomic analysis of the impact of therapeutic drug monitoring in adult patients with generalized tonic-clonic epilepsy, *Br J Clin Pharmacol.*, 2001; 52:str. 193–195.

Rao BM, Ravi R, Shyam SR, Siva Kumar B, Gopichand S. Validated RP-HPLC method for the estimation of levetiracetam in tablet formulations, *J pharm Biomed Anal*, 2004, 35 (5), str. 1017.-1026.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK.39. poglavlje: Antiepileptici u: Farmakologija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2006, str. 550.-558.

Reineks EZ, Lawson SE, Lembright KE, Wang S. Performance characteristics of a new levetiracetam immunoassay and method comparison with a high-performance liquid chromatography method, *The Drug Monit.*, 2011, 33(1):124-7

Sethi NK, Sethi PK, Torgovnick J, Arsura E, Cukiewar F. Asymptomatic elevation of liver enzymes due to levetiracetam: a case report, *Drug Metabol Drug Interact*, 2013

Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring, *Biomed Chromatogr.* 2012; 26: str. 1519–1528.

Shihabi ZK, Oles K, Hinsdale M. Analysis of the antiepileptic drug Keppra by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2003, 1004(1-2), str. 9-12.

Shiue HJ, Taylor M, Sands KA. Comparison of Levetiracetam Dosing Regimens in End-Stage Renal Disease Patients Undergoing Intermittent Hemodialysis, 2017, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28582998>), pristupljeno 17.03.2019.

Sillanpää M, Schmidt D. Prognosis of seizure recurrence after stopping antiepileptic drugs in seizure-free patients: A long-term population-based study of childhood-onset epilepsy, 2006, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616648>), pristupljeno 30.03.2019.

Spengled DC, Montouris GD, Hohler AD. Levetiracetam as a possible contributor to acute kidney injury, 2014, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24986483>), pristupljeno 17.03.2019.

TDM of levetiracetam and pregabalin: the need and the method, 2013, (<https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/tdm-of-levetiracetam-and-pregabalin-the-need-and-the-method/>) , pristupljeno 07.03.2019.

Wahab A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development, *Pharmaceuticals*, 2010; 3: str. 2090.–2110.

Watson DG, Edrada-Ebel R. Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, Chromatographic theory, str. 252.-260., HPLC, str. 301.-340., 3rd edition, *Churchill Livingston Elsevier imprint*, Glasgow, 2012

Winter ME. Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th ed. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*; 2004, str. 73.–74.

Zaccara G, Perucca E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs, *Epileptic Disord*, 2014; 16(4), str. 409.-432.

Zhan-Miao Y, Cheng W, Ting C, Lu X, Xu-Li Z, Si-Yan Z, Suo-Di Z. Levetiracetam for epilepsy: an evidence map of efficacy, safety and economics profiles, *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1-19

7. SAŽETAK/SUMMARY

Terapijsko praćenje koncentracija levetiracetama, pomoćnog lijeka primarno namijenjenog tretiranju parcijalnih epileptičkih napadaja, linearne farmakokinetike, niske varijabilnosti i vjerojatnosti stupanja u interakcije s drugim lijekovima, na prvu se doima nepotrebnim. Međutim, provedene studije dokazale su životnu dob, induktivnu komedikaciju, bilo antikonvulzivnog tipa ili u drugim komorbiditetima, te bubrežna oštećenja kao izvore varijabilnosti farmakološkog profila. Stoga je literaturno primijećen međusobni utjecaj bubrežne funkcije bolesnika na serumske koncentracije lijeka ispitan eksperimentalnim putem u svrhu prilagodbe doziranja, budući da i preniska i previsoka dovode do istog-nekontroliranih napadaja.

Rutinskom analitičkom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i sustavom fotodiodnog detektora, kvantificirane su serumske koncentracije lijeka u nasumično odabranoj populaciji (78 ispitanika) koja svakodnevno primjenjuje lijek te aproksimira ukupnu populaciju bolesnika liječenu istim. Za svakog pojedinog bolesnika praćen je protokol doziranja, ali i biokemijski parametri- kreatinin i ureja (pokazatelji bubrežne) te dodatno aspartat- i alanin-aminotransferazne katalitičke koncentracije (pokazatelji jetrene funkcije).

Na temelju dobivenih podataka i izračunatog modela linearne regresije, primijećena je statistički značajnija povezanost između pojedinih parametara i serumskih koncentracija lijeka ujednačenih prema dozi (omjer koncentracija i doza levetiracetama). Dokazana povezanost s bubrežnim parametrima statistički je značajna (P vrijednosti kreatinina i ureje- 0,001 odnosno 0,002 niže su od razine značajnosti testa $\alpha=0,05$), ali statistički nedovoljno s jetrenim (0,828 za AST, odnosno 0,163 za ALT), čime je dokazana farmakokinetička ovisnost o bubrežnoj funkciji. Dosad nedokazan i, prema uputstvima lijeka, nedovoljno naglašen utjecaj oštećenja jetrene funkcije na klirens levetiracetama može međusobno korelirati s bubrežnom funkcijom te bi se iz tog razloga trebalo i bolesnike oštećene funkcije jetre staviti pod povećan nadzor i prilagodbu doziranja ovisno o njihovoj bubrežnoj funkciji.

Therapeutic drug monitoring of levetiracetam, the adjunctive drug indicated for partial epileptic seizures, might seem unnecessary due to its linear pharmacokinetics, low variability and probability of interaction with other drugs. However, previous studies have demonstrated some sources of pharmacological variability: age, induction effects of other anticonvulsants or comedications and renal dysfunction. Therefore, relative influence of renal function on patients' serum drug concentration has been checked experimentally in order to adjust the dosage since both too low and too high concentrations lead to the same consequence (uncontrolled seizures).

The routine analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) and the photodiode detector system was used for quantification of serum levetiracetam concentrations in randomly selected patients (N=78) with levetiracetam in their therapy. The dosing regimen was monitored for each patient, as well as their biochemical parameters: creatinine, urea as renal function indicators; aspartate and alanine aminotransferase (AST, ALT) catalytic concentrations as liver function indicators.

Based on the evaluated data and calculated linear regression model, statistically significant correlation was observed between some biochemical parameters and concentration/dose ratio of levetiracetam. The reported correlation with the renal parameters is statistically significant for creatinine and urea ($r=0.37, P=0.001$ and $r=0.36, P=0.002$ respectively, significance value $\alpha=0.05$), but statistically insignificant with the liver enzyme AST and ALT ($P=0.828$, $P=0.163$ respectively). Insignificant correlation between levetiracetam serum levels and liver enzyme, but significant correlation with creatinine and urea is the evidence of levetiracetam pharmacokinetic dependence on kidney function. Unproven influence of a liver function on clearance of levetiracetam theoretically can correlate with patients' renal function while those with impaired hepatic function should also be placed under special surveillance and dosage adjustment depending on their renal function.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj funkcije bubrega na serumske koncentracije levetiracetama

Tea Čurak

SAŽETAK

Terapijsko praćenje koncentracija levetiracetama, pomoćnog lijeka primarno namijenjenog tretiranju parcijalnih epileptičkih napadaja, linearne farmakokinetike, niske varijabilnosti i vjerojatnosti stupanja u interakcije s drugim lijekovima, na prvu se doima nepotrebnim. Međutim, provedene studije dokazale su životnu dob, induktivnu komedikaciju, bilo antikonvulzivnog tipa ili u drugim komorbiditetima, te bubrežna oštećenja kao izvore varijabilnosti farmakološkog profila. Stoga je literaturno primijećen međusobni utjecaj bubrežne funkcije bolesnika na serumske koncentracije lijeka ispitan eksperimentalnim putem u svrhu prilagodbe doziranja, budući da i preniska i previsoka dovode do istog- nekontroliranih napadaja.

Rutinskom analitičkom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i sustavom fotodiodnog detektora, kvantificirane su serumske koncentracije lijeka u nasumično odabranoj populaciji (78 ispitanika) koja svakodnevno primjenjuje lijek te aproksimira ukupnu populaciju bolesnika liječenu istim. Za svakog pojedinog bolesnika praćen je protokol doziranja, ali i biokemijski parametri- kreatinin i ureja (pokazatelji bubrežne) te dodatno aspartat- i alanin-aminotransferazne katalitičke koncentracije (pokazatelji jetrene funkcije).

Na temelju dobivenih podataka i izračunatog modela linearne regresije, primijećena je statistički značajnija povezanost između pojedinih parametara i serumskih koncentracija lijeka ujednačenih prema dozi (omjer koncentracija i doza levetiracetama). Dokazana povezanost s bubrežnim parametrima statistički je značajna (P vrijednosti kreatinina i ureje- 0,001 odnosno 0,002 niže su od razine značajnosti testa $\alpha=0,05$), ali statistički nedovoljno s jetrenim (0,198 za AST, odnosno 0,163 za ALT), čime je dokazana farmakokinetička ovisnost o bubrežnoj funkciji. Dosad nedokazan i, prema uputstvima lijeka, nedovoljno naglašen utjecaj oštećenja jetrene funkcije na klirens levetiracetama može međusobno korelirati s bubrežnom funkcijom te bi se iz tog razloga trebalo i bolesnike oštećene funkcije jetre staviti pod povećan nadzor i prilagodbu doziranja ovisno o njihovoj bubrežnoj funkciji.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranica, 15 grafičkih prikaza, 8 tablica i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: levetiracetam, TDM, HPLC, bubrežna funkcija, jetrena funkcija

Mentor: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medicinal Biochemistry
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The effect of renal function on serum concentrations of levetiracetam

Tea Čurak

SUMMARY

Therapeutic drug monitoring of levetiracetam, the adjunctive drug indicated for partial epileptic seizures, might seem unnecessary due to its linear pharmacokinetics, low variability and probability of interaction with other drugs. However, previous studies have demonstrated some sources of pharmacological variability: age, induction effects of other anticonvulsants or comedications and renal dysfunction. Therefore, relative influence of renal function on patients' serum drug concentration has been checked experimentally in order to adjust the dosage since both too low and too high concentrations lead to the same consequence (uncontrolled seizures).

The routine analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) and the photodiode detector system was used for quantification of serum levetiracetam concentrations in randomly selected patients (N=78) with levetiracetam in their therapy. The dosing regimen was monitored for each patient, as well as their biochemical parameters: creatinine, urea as renal function indicators; aspartate and alanine aminotransferase (AST, ALT) catalytic concentrations as liver function indicators.

Based on the evaluated data and calculated linear regression model, statistically significant correlation was observed between some biochemical parameters and concentration/dose ratio of levetiracetam. The reported correlation with the renal parameters is statistically significant for creatinine and urea ($r=0.37, P=0.001$ and $r=0.36, P=0.002$ respectively, significance value $\alpha=0.05$), but statistically insignificant with the liver enzyme AST and ALT ($P=0.828, P=0.163$ respectively). Insignificant correlation between levetiracetam serum levels and liver enzyme, but significant correlation with creatinine and urea is the evidence of levetiracetam pharmacokinetic dependence on kidney function. Unproven influence of a liver function on clearance of levetiracetam theoretically can correlate with patients' renal function while those with impaired hepatic function should also be placed under special surveillance and dosage adjustment depending on their renal function.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 15 figures, 8 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: levetiracetam, TDM, HPLC, renal function, liver function

Mentor: **Mila Lovrić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mila Lovrić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.