

# Speeksel als matrix voor meting van pyrazinamide bij farmacokinetisch onderzoek en *therapeutic drug monitoring*

C.A.W. Heijens <sup>a\*</sup>, H.H. Semvua <sup>b</sup>, C.M. Mtabho <sup>b</sup>,  
M.J. Teulen <sup>c</sup>, A.P. Colbers <sup>c</sup>, P.M.G. Filius <sup>a</sup>,  
D.M. Burger <sup>c</sup>, G.S. Kibiki <sup>b</sup> en R.E. Aarnoutse <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Afdeling Apotheek, Rijnstate Ziekenhuis, Arnhem.

<sup>b</sup> Kilimanjaro Clinical Research Institute, Kilimanjaro Christian Medical Centre, Moshi, Tanzania.

<sup>c</sup> Afdeling Apotheek, Radboudumc, Nijmegen.

\* Thans: Apotheek Zuyderland MC, locatie Heerlen. Correspondentie: claudia.heijens@gmail.com.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van C.A.W. Heijens.

Citeer als: Heijens CAW, Semvua HH, Mtabho CM, Teulen MJ, Colbers AP, Filius PMG, Burger DM, Kibiki GS, Aarnoutse RE. Speeksel als matrix voor meting van pyrazinamide bij farmacokinetisch onderzoek en *therapeutic drug monitoring*. Nederland Platform voor Farmaceutisch Onderzoek. 2016;1:a1601.

## Kernpunten

- Speeksel is een aantrekkelijke matrix voor farmacokinetisch onderzoek en *therapeutic drug monitoring* (TDM).
- De farmacokinetiek van het tuberculosemiddel pyrazinamide in speeksel was nog niet beschreven.
- De blootstelling van pyrazinamide in speeksel bedraagt circa 60% van de totale blootstelling in plasma.
- Speekselmetingen leveren hoogstens een semikwantitatieve schatting van de plasmaconcentratie; daarmee zijn ze niet geschikt voor farmacokinetisch onderzoek, maar wel voor onderscheid in lage en hoge plasmaconcentraties bij TDM en voor meting van therapietrouw.

## Inleiding

Tuberculose veroorzaakt wereldwijd veel morbiditeit en mortaliteit. In 2012 waren er naar schatting 8,6 miljoen nieuwe gevallen van actieve tuberculose en 1,3 miljoen doden als gevolg van deze infectieziekte.

Pyrazinamide is een essentieel tuberculosemiddel, waarvan de thans toegepaste dosis waarschijnlijk suboptimaal is bij zowel volwassenen als kinderen [1, 2]. De combinatie met nieuw ontwikkelde tuberculosemiddelen is in onderzoek [3]. Farmacokinetisch onderzoek is

## ABSTRACT

*Saliva as a matrix for the measurement of pyrazinamide in pharmacokinetic studies or therapeutic drug monitoring*

### OBJECTIVE

To describe the pharmacokinetics of pyrazinamide in saliva and to assess whether saliva can be a matrix for pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring (TDM).

### DESIGN AND METHODS

Intensive pharmacokinetic sampling for both plasma and saliva took place during 24 h in 15 adult tuberculosis patients in Moshi, Tanzania. Pharmacokinetic parameters for both matrices were derived from the measured saliva and total (protein-bound plus unbound) plasma concentrations of pyrazinamide. The reciprocal saliva/plasma concentration ratio was used to estimate plasma concentrations based on the measured salivary concentrations. The predictive performance of these estimations was assessed by the jackknife method.

### RESULTS

Geometric means of AUC<sub>0-24</sub> and C<sub>max</sub> of pyrazinamide in saliva were 61% and 78%, respectively, of the corresponding values in plasma. t<sub>max</sub> in saliva was similar to that in plasma. Salivary concentrations and total plasma concentrations (n = 133) were strongly correlated (Spearman's rho = 0.909; P < 0.001). The mean plasma/saliva concentration ratio was 0.637 (CI95 0.600-0.673). The ratio was dependent on the sampling time. It was highest in the absorption phase and decreased afterwards. Bias and imprecision of the prediction of total pyrazinamide plasma concentrations based on salivary concentrations were 5.5% and 24.7%, respectively. Using samples in a time window of t = 2-8 h post dose, bias was 13.5% and imprecision was 21.4%.

### CONCLUSION

The exposure to pyrazinamide in saliva is relatively high, but less than the exposure in plasma. The saliva/plasma concentration ratio was time-dependent, contributing to an insufficient predictive performance (imprecision > 20%). Based on this study saliva measurements of pyrazinamide can only be used for a semiquantitative assessment of pyrazinamide plasma concentrations.

nodig ter onderbouwing van nieuwe doseringen en behandelregimes met pyrazinamide. In Nederland en verschillend de andere landen vindt *therapeutic drug monitoring* (TDM) van pyrazinamide plaats om de therapie voor de individuele patiënt te optimaliseren en soms om therapietrouw te controleren [4].

Speeksel is een aantrekkelijke matrix voor farmacokinetisch onderzoek en TDM [5, 6]. Het is eenvoudig, niet-invasief en pijnloos te verkrijgen en de in speeksel gemeten concentratie is mogelijk representatief voor de niet-eiwitgebonden (farmacologisch actieve) concentratie in plasma. Er zijn geen gegevens gepubliceerd over de farmacokinetiek van pyrazinamide in speeksel.

Het doel van dit onderzoek was ten eerste de *steady state*-farmacokinetiek van pyrazinamide in speeksel te beschrijven en ten tweede vast te stellen of speeksel kan worden gebruikt als alternatief voor plasma bij farmacokinetisch onderzoek naar en TDM van pyrazinamide.

## Methoden

### Onderzoeksoptzet en populatie

Dit was een beschrijvend farmacokinetisch onderzoek onder volwassen tuberculosepatiënten in Moshi (Tanzania) die minimaal twee weken waren behandeld met tuberculosemedicatie. Op de onderzoeksdag namen zij alle tuberculosemedicatie, waaronder pyrazinamide, met voedsel in. Daarna spoelden zij zorgvuldig hun mond met water. Venus bloed werd afgenomen op 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 en 24 uur na inname van de medicatie. Binnen twee minuten na afname van elk bloedmonster werden speekselmonsters afgenomen met een Salivette (Sarstedt, Etten-Leur). Een Salivette bestaat uit een wattenstaafje met citroenzuur dat speekselsecretie stimuleert. De speeksel- en plasmamonsters werden onmiddellijk opgeslagen bij  $-80^{\circ}\text{C}$ . Concentraties pyrazinamide in speeksel en plasma werden gemeten met gevalideerde hogedruk-vloeistofchromatografie.

Dit was een verkennend onderzoek. Het streven was 15 patiënten te includeren, zodat circa 135 gekoppelde concentraties van pyrazinamide in speeksel en plasma zouden worden verkregen.

Het onderzoek was goedgekeurd door de medisch-ethische toetsingscommissie van het Kilimanjaro Christian Medical Centre te Moshi (Tanzania) en alle patiënten gaven *informed consent*.

### Farmacokinetische en statistische analyse

Farmacokinetische parameters werden bepaald met niet-compartmentele farmacokinetische analyse in WinNonlin versie 6.3 (Pharsight, Verenigde Staten). Farmacokinetische parameters werden eerst beschreven; verschillen tussen farmacokinetische parameters in speeksel en plasma werden getoetst met de gepaarde t-test op logaritmisch getransformeerde parameters of met de Wilcoxon-rangtekentoon ( $t_{\max}$ ).

De speeksel/plasma-concentratieratio werd bepaald voor alle monsters van alle patiënten. Het effect van het tijdstip van monstername (van  $t = 0$  h tot  $t = 24$  h) op de concentratieratio werd getoetst met variantieanalyse (ANOVA) voor *repeated measures (within-subject)*. Het geometrisch gemiddelde voor de speeksel/plasma-concentratieratio werd berekend en de reciproke waarde hiervan werd gebruikt als omrekenfactor om plasmaconcentraties van pyrazinamide te voorspellen op basis van gemeten speekselconcentraties.

De *predictive performance* van dergelijke voorspellingen werd vastgesteld door de omrekenfactor te baseren op de concentratieratio's van 14 patiënten om daarmee bij de 15e patiënt de plasmaconcentraties te voorspellen. Dergelijke voorspellingen werden voor alle 15 patiënten uitgevoerd (*jackknife analysis*).

Bias werd uitgedrukt als de *median percentage prediction error* (MPPE): dit is de mediaan van alle *prediction errors*, waarbij de *prediction error* (in %) werd gedefinieerd als  $100 \times [(\text{voorspelde plasmaconcentratie} - \text{gemeten plasmaconcentratie}) / \text{gemeten plasmaconcentratie}]$ . Imprecisie werd uitgedrukt als de *median absolute percentage prediction error* (MAPE). Voor een acceptabele *predictive performance* moest zowel MPPE als MAPE kleiner zijn dan 15-20% [7].

## Resultaten

Van de 15 geïncludeerde patiënten, onder wie 12 mannen, was de mediane leeftijd 37 jaar, het mediane gewicht 49,5 kg en de mediane dosering pyrazinamide  $27,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .

De geometrische gemiddelden van de  $\text{AUC}_{0-24}$  en de  $C_{\max}$  van pyrazinamide in speeksel waren lager dan de overeenkomstige waarden in plasma (tabel 1).  $t_{\max}$  voor pyrazinamide was vergelijkbaar in speeksel en in plasma. Pyrazinamide werd uit speeksel sneller geëlimineerd dan uit plasma (tabel 1).

In totaal werden 133 gepaarde concentraties van pyrazinamide in speeksel en plasma verkregen. Speeksel- en plasmaconcentraties van pyrazinamide waren sterk gecorreleerd (Spearman's rho = 0,909;  $P < 0,001$ ).

Het geometrisch gemiddelde van de speeksel/plasma-concentratieratio was 0,60 (spreiding 0,18-1,48). De gemiddelde concentratieratio leek afhankelijk te zijn van het tijdstip van afname van bloed en speeksel (figuur 1), wat werd bevestigd door *repeated measures*-ANOVA ( $F = 12,59$ ;  $P < 0,001$ ) waarbij vanaf  $t = 1$  h bij toenemende tijd een significante lineaire trend tot afname van de concentratieratio werd vastgesteld.

De omrekenfactor om plasmaconcentraties van pyrazinamide te voorspellen op basis van speekselconcentraties was 1,67 (spreiding 1,63-1,71, afhankelijk van de combinatie van 14 patiënten). Gebruik van een dergelijke eenvoudige omrekenfactor, die geen rekening houdt met verschillen in speeksel/plasma-concentratieratio tussen afnametijdstippen, resulteerde in een MPPE van 5,5% en een MAPE van 24,7%.

Tabel 1 Farmacokinetiek van pyrazinamide in speeksel en plasma (n = 15)

| Parameter*                                  | Plasma†        | Speeksel†     | P‡      | Ratio speeksel/plasma§ |
|---------------------------------------------|----------------|---------------|---------|------------------------|
| AUC <sub>0-24</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ·h) | 377 [280-588]  | 230 [139-421] | < 0,001 | 0,61 [0,55-0,68]       |
| C <sub>max</sub> (mg/L)                     | 36 [26-60]     | 29 [19-47]    | < 0,001 | 0,78 [0,72-0,86]       |
| t <sub>max</sub> (h)                        | 2,0 [1,0-6,0]  | 2,0 [1,0-6,0] | 0,893   | 0,95 [0,74-1,24]       |
| CL/F (L/h)                                  | 3,6 [2,3-5,5]  | 6,0 [3,3-9,0] | < 0,001 | 1,64 [1,47-1,83]       |
| V <sub>d</sub> /F (L)                       | 38 [30-61]     | 50 [31-82]    | 0,001   | 1,33 [1,15-1,52]       |
| t <sub>1/2</sub> (h)                        | 7,2 [5,6-10,0] | 5,8 [4,4-9,0] | 0,002   | 0,81 [0,72-0,91]       |

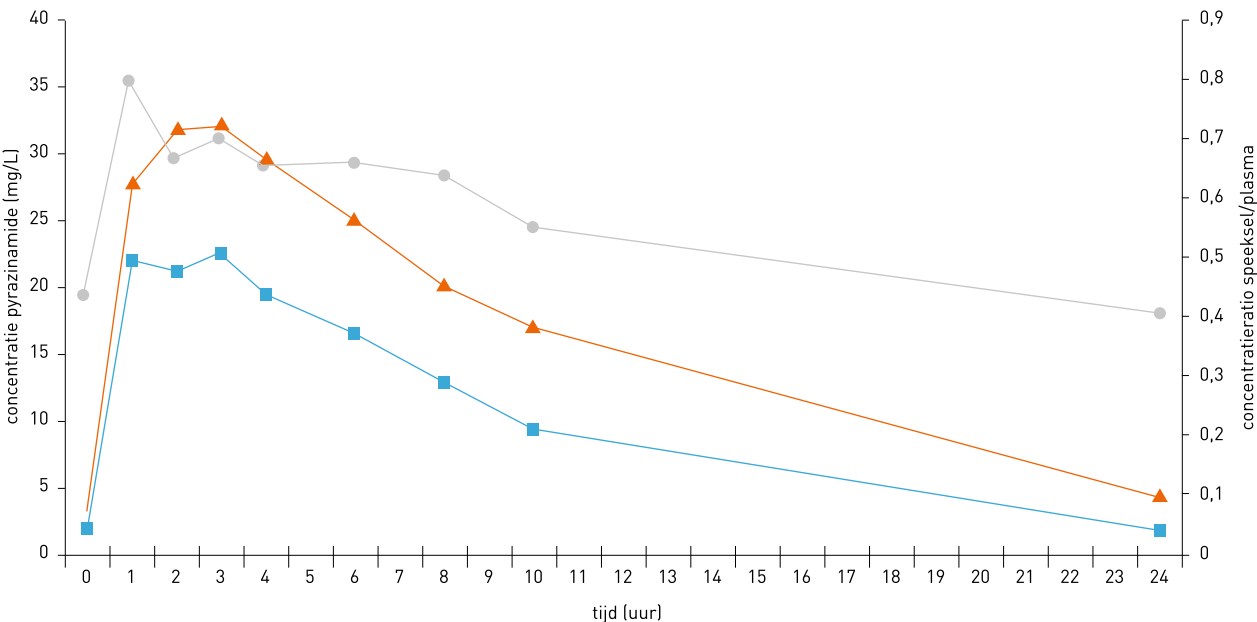
\* AUC<sub>0-24</sub>: oppervlak onder de concentratie–tijdcurve; C<sub>max</sub>: maximale concentratie; t<sub>max</sub>: tijd tot de maximale concentratie; CL/F: schijnbare klaring; V<sub>d</sub>/F: schijnbaar verdelingsvolume; t<sub>1/2</sub>: eliminatiehalfwaardetijd.

† Geometrisch gemiddelde en spreiding, behalve t<sub>max</sub> (mediaan en spreiding).

‡ P-waarde voor vergelijking van waarden in speeksel versus plasma.

§ Geometrisch gemiddelde en 95%-betrouwbaarheidsinterval.

Figuur 1 Verloop van pyrazinamideconcentraties in speeksel en plasma



Geometrisch gemiddelde van speeksel- (■) en plasmaconcentraties (▲) van pyrazinamide (linker y-as) en geometrisch gemiddelde van de speeksel/plasma-concentratieratio (●; rechter y-as) op opeenvolgende tijdstippen na toediening van pyrazinamide.

Gebruik van een omrekenfactor gebaseerd op een stabilere concentratieratio tussen 2 en 8 uur na toediening (figuur 1) resulteerde in een MPPE van 13,5% en een MAPE van 21,4% bij voorspelling van plasmaconcentraties pyrazinamide tussen 2 en 8 uur na toediening.

Beschouwing

De eerste doelstelling van dit onderzoek was de beschrijving van de farmacokinetiek van pyrazinamide in speeksel. Pyrazinamide blijkt snel naar speeksel te verdelen. De blootstelling aan pyrazinamide in speeksel (AUC<sub>0-24</sub>) kan als relatief hoog worden beschouwd, maar is lager dan

de blootstelling aan totaal (niet-eiwitgebonden plus gebonden) pyrazinamide in plasma (tabel 1).

De meeste geneesmiddelen komen door eenvoudige diffusie vanuit de bloedbaan in het speeksel [5, 8, 9]. Het geneesmiddeltransport van bloed naar speeksel is daarom afhankelijk van fysisch-chemische geneesmiddeleigenschappen (molecuulgewicht, vetoplosbaarheid, mate van ionisatie en eiwitbinding) en ook van fysiologische factoren zoals de pH van het speeksel en de speekselvloed [5, 8, 9]. Pyrazinamide heeft een laag molecuulgewicht (123 g/mol). Het is een zeer zwakke base (pK<sub>a</sub> = 0,5); bij een speeksel-pH van 3, zoals verkregen met een Salivette, zal het molecuul onge-

laden zijn. De eiwitbinding van pyrazinamide in plasma zoals vermeld in handboeken varieert van 5-10% tot 50%; primaire bronnen zijn er niet. Alleen vrij, niet-eiwitgebonden geneesmiddel kan vanuit plasma naar speeksel overgaan [8, 9]. De fysisch-chemische eigenschappen van pyrazinamide en de lage eiwitbinding (en dus hoge vrije fractie in plasma) verklaren de relatief hoge blootstelling pyrazinamide in speeksel.

De concentratieratio tussen speeksel en plasma was niet constant (figuur 1), ondanks de gestandaardiseerde afname van ‘gestimuleerd’ speeksel met een Salivette. Een hogere speeksel/plasma-concentratieratio in de absorptiefase is een bekend fenomeen en kan worden verklaard doordat de geneesmiddelconcentratie tijdens de absorptiefase in arterieel bloed hoger is dan in veneus bloed [8, 9]. De concentratie in speeksel is in evenwicht met de relatief hoge concentratie in arterieel bloed, terwijl de plasmaconcentratie wordt bepaald in het veneuze bloed. Na de absorptiefase neemt de concentratieratio voor pyrazinamide af en dit kan worden verklaard door een snellere eliminatie in speeksel dan in plasma (tabel 1) [9].

De tweede doelstelling van dit onderzoek was vast te stellen of speeksel kan worden gebruikt als alternatief voor plasma bij farmacokinetisch onderzoek en TDM van pyrazinamide. Voorspelling van totale plasmaconcentraties op basis van speekselconcentraties resulteerde in een acceptabele MPPE van 5,5%, wat betekent dat de systematische fout (bias) gering was wanneer vele individuele voorspellingen (elk met een positieve of negatieve afwijking) werden beschouwd. De MAPE (imprecisie) was met 24,7% echter te hoog.

Tussen 2 en 8 uur na toediening van pyrazinamide waren de concentratieratio (figuur 1) en de eraan gerelateerde omrekenfactor stabiel. Dit is het interval waarin pyrazinamidespiegels worden gemeten om de  $C_{\max}$  vast te stellen of de  $AUC_{0-24}$  te schatten op basis van *limited sampling*-formules [4, 10]. Ook in dit interval bleek de imprecisie van de voorspelling op basis van gemeten speekselconcentraties echter te hoog.

Speekselconcentraties pyrazinamide kunnen derhalve niet worden gebruikt om totale plasmaconcentraties betrouwbaar te voorspellen, zoals gewenst is bij farmacokinetisch onderzoek. Speekselmetingen van pyrazinamide zouden wél geschikt kunnen zijn voor een semikwantitatieve schatting van totale plasmaconcentraties. Dit kan voldoende zijn voor TDM van pyrazinamide, wanneer voor een individuele patiënt een onderscheid tussen evident lage, gemiddelde of hoge blootstelling volstaat. Verder kunnen speekselmetingen van pyrazinamide worden gebruikt om therapietrouw te controleren.

Een beperking van dit onderzoek is dat de niet-eiwitgebonden concentratie van pyrazinamide in plasma niet is bepaald; deze kan mogelijk beter worden voorspeld dan de totale plasmaconcentratie op basis van gemeten speekselconcentraties.

## Conclusie

Samengevat toont dit onderzoek dat de blootstelling aan pyrazinamide in speeksel relatief hoog is, maar lager dan de totale (niet-eiwitgebonden plus gebonden) blootstelling in plasma. Op basis van dit onderzoek kunnen speekselmetingen van pyrazinamide alleen voor een semikwantitatieve schatting van de plasmaconcentratie worden ingezet. ■

## Literatuur

- Ahmad Z, Fraig MM, Bisson GP, Nuernberger EL, Grosset JH, Karakousis PC. Dose-dependent activity of pyrazinamide in animal models of intracellular and extracellular tuberculosis infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 apr;55(4):1527-32.
- Pasipanodya JG, McIlleron H, Burger A, Wash PA, Smith P, Gumbo T. Serum drug concentrations predictive of pulmonary tuberculosis outcomes. *J Infect Dis*. 2013 nov 1;208(9):1464-73.
- Tasneen R, Li SY, Peloquin CA, et al. Sterilizing activity of novel TMC207- and PA-824-containing regimens in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 dec;55(12):5485-92.
- Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *Drugs*. 2002;62(15):2169-83.
- Liu H, Delgado MR. Therapeutic drug concentration monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants. *Clin Pharmacokinet*. 1999 jun;36(6):453-70.
- Mullangi R, Agrawal S, Srinivas NR. Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies and analytical perspectives. *Biomed Chromatogr*. 2009 jan;23(1):3-25.
- Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit*. 2006 jun;28(3):419-30.
- Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 sep 20;694:36-47.
- Haeckel R. Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 sep 20;694:128-42.
- Magis-Escurra C, Later-Nijland HM, Alffenaar JW, et al. Population pharmacokinetics and limited sampling strategy for first-line tuberculosis drugs and moxifloxacin. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 sep;44(3):229-34.