



**МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



Невен Вавић

Значај анализе *CYP3A5 A6986G*, *CYP3A4 A392G* и *ABCB1 C3435T* генских полиморфизама за терапијски мониторинг такролимуса и клинички исход код болесника након трансплантације бубрега

Докторска дисертација

Београд, 2016. год.

Захвалница:

Велику захвалност дугујем свом ментору, проф. др Викторији Драгојевић-Симић. Њене јасне идеје и визија наше сарадње, непоколебљива одлучност, ментална отвореност и поверење су неке од кључних ствари које су биле неопходне за настанак овога рада.

Захваљујем се и проф. др Момиру Микову, проф. др Звонку Магићу, др Бојани Цикоти-Алексић и др Биљани Драшковић-Павловић на великој помоћи у изради и интерпретацији резултата, као и важним сугестијама.

Велику захвалност дугујем особљу и колегама из Центра за трансплантацију солидних органа, Клинике за нефрологију, Центра за клиничку фармакологију, као и свим осталим организационим деловима Војномедицинске академије који су ми, свако у свом домену, свесрдно омогућили да реализујем овај рад.

Посебну захвалност дугујем др Немањи Ранчићу, колеги и пријатељу, пред којим је сјајна будућност у медицинској науци, на заиста немерљивој помоћи у настанку овог рада.

Захваљујем се својој супрузи, родитељима и читавој породици на подршци и љубави. Никада нису престали да верују у мене и нису изгубили стрпљење.

Такође се захваљујем фармацеутској компанији Астелас на подршци и помоћи у обезбеђењу неопходног материјала за фармакогеномску анализу.

САДРЖАЈ:

1. УВОД.....	8
1.1. Историјат примене инхибитора калцинеурина у трансплантацији солидних органа.....	10
1.2. Структура и механизам деловања такролимуса.....	11
1.3. Начин примене и фармакокинетске карактеристике такролимуса.....	12
1.3.1. Ресорпција лека након оралне примене.....	13
1.3.2. Дистрибуција такролимуса.....	13
1.3.3. Елиминација такролимуса.....	14
1.4. Генски полиморфизми повезани са фармакокинетиком такролимуса.....	15
1.4.1. Изоформа ензима цитохрома <i>P450- CYP3A5</i>	16
1.4.2. Изоформа ензима цитохрома <i>P450- CYP3A4</i>	17
1.4.3. Изоформа ензима цитохрома <i>P450- CYP3A4</i>	17
1.4.4. Други генски полиморфизми који могу бити значајани за фармакокинетичку такролимуса.....	18
1.5. Интеракције такролимуса са другим лековима.....	18
1.5.1. Фармакокинетске интеракције.....	18
1.5.2. Фармакодинамске интеракције.....	20
1.6. Нежељени ефекти такролимуса.....	20
1.6.1. Нефротоксичност.....	21
1.6.1.1. Акутна нефротоксичност.....	21
1.6.1.2. Хронична нефротоксичност.....	23
1.6.1.3. Остала нежељена дејства такролимуса на бубрег.....	24
1.6.1.3.1. Акутна микроваскуларна болест.....	24
1.6.1.3.2. Поремећаји електролита и хипертензија.....	24
1.6.2. Нежељени ефекти такролимуса који нису везани за бубрег.....	25
1.7. Терапијски мониторинг такролимуса.....	25
1.7.1. Такролимус као лек са уском терапијском ширином.....	25
1.7.2. Значај терапијског мониторинга такролимуса за лекара практичара.....	26
1.7.3. Значај фармакогеномских испитивања за терапијски мониторинг такролимуса и индивидуализацију терапије код трансплантираних пацијената.....	28

2. ЦИЉЕВИ.....	30
3. ХИПОТЕЗЕ.....	31
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	32
4.1. Пацијенти и дизајн студије.....	32
4.2. Критеријуми за укључивање у студију.....	33
4.3. Имуносупресивни протоколи.....	33
4.4. Терапијски мониторинг такролимуса.....	35
4.5. Генотипизација за изоформе ензима <i>CYP3A5 A6986G</i> и <i>CYP3A4 A392G</i> и транспортера П-гликопротеина <i>ABCB1 C3435T</i>	36
4.6. Клинички параметри праћења пацијената којима је трансплантиран бубрег..	36
4.6.1. Параметри који су били од значаја за терапијски мониторинг такролимуса.....	36
4.6.2. Параметри праћења епизода акутног одбацивања графта.....	37
4.6.3. Параметри који се могу довести у везу са нежељеним реакцијама на такролимус.....	38
4.7. Лабораторијски параметри праћења пацијената којима је трансплантиран бубрег.....	38
4.8. Статистичка обрада података.....	39
4.9. Одлука Етичког одбора.....	39
5. РЕЗУЛТАТИ.....	40
5.1. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са трансплантираним бубрегом.....	41
5.2. Функција графта после трансплантације.....	43
5.3. Биохемијски параметри пацијената у различитим периодима после трансплантације.....	45
5.4. Терапијски мониторинг такролимуса.....	48
5.5. Нежељени ефекти такролимуса у посматраној групи пацијената.....	49
5.6. Фармакогеномска анализа.....	50

5.6.1. Дистрибуција <i>CYP3A5 A6986G</i> , <i>CYP3A4 A392G</i> и <i>ABCB1 C3435T</i> генских полиморфизама код болесника којима је трансплантиран бубрег.....	50
5.6.2. Испитивање утицаја проучаваних генских полиморфизама на параметре терапијског мониторинга такролимуса.....	55
5.6.3. Испитивање утицаја проучаваних генских полиморфизма на поједине клиничке исходе код пацијената са трансплантираним бубрегом.....	66
5.6.4. Утицај генског полиморфизма на функцију графта.....	68
5.6.5. Утицај генског полиморфизма ензима <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A4</i> и П-гликопротеина на биохемијске параметре значајне за исход трансплантације..	73
5.6.6. Израчунати коефицијент варијабилности такролимуса и његова повезаност са изабраним параметрима посматрања.....	75
 6. ДИСКУСИЈА.....	 78
6.1. Демографске особине донора и реципијента, примена индукционе терапије и имунолошки ризик код трансплантираних пацијената укључених у истраживање.....	78
6.2. Функција графта после трансплантације.....	82
6.3. Клинички исходи, епизоде акутног одбацивања и нежељени ефекти такролимуса.....	83
6.3.1. Биохемијски показатељи функције графта.....	83
6.3.2. Учесталост акутног одбацивања.....	84
6.3.3. Нежељени ефекти такролимуса.....	85
6.4. Терапијски мониторинг такролимуса.....	88
6.5. Коефицијент варијабилности такролимуса и његова повезаност са појединим параметрима посматрања.....	90
6.6. Фармакогеномска анализа.....	91
6.6.1. Анализа учесталости полиморфизама <i>CYP3A5 A6986G</i> , <i>CYP3A4 A392G</i> и <i>ABCB1 C3435T</i> у испитиваној групи пацијената.....	91
6.6.2. Утицај генског полиморфизма на параметре терапијског мониторинга такролимуса.....	94
6.6.2.1. Генски полиморфизам и концентрације такролимуса у крви.....	98
6.7. Утицај генског полиморфизма на неке клиничке исходе код пацијената са трансплантираним бубрегом.....	101

6.7.1. Генски полиморфизам и акутно одбацивање графта.....	102
6.7.2. Генски полиморфизам, акутна нефротоксичност и прекид примене такролимуса.....	105
6.7.3. Генски полиморфизам и шећерна болест после трансплантације.....	107
6.7.4. Генски полиморфизам и инфекције после трансплантације.....	108
6.7.5. Генски полиморфизам и функција графта.....	109
 7. ЗАКЉУЧАК.....	 112
7.1. Преглед најважнијих резултата који су добијени у студији.....	112
7.2. Закључак студије.....	115
7.3. Препоруке проистекле из истраживања.....	116
 8. ЛИТЕРАТУРА.....	 117

1. УВОД

Опште је прихваћено да је трансплантација органа једно од највећих достигнућа на пољу медицине у претходном столећу (1). Од утопистичких, експерименталних и углавном неуспешних покушаја пре нешто више од пола века, трансплантација органа је, у међувремену, постала рутинска процедура и најбољи начин лечења пацијената са терминалном инсуфицијенцијом бубрега, јетре, срца и других органа (2). Прва успешна трансплантација бубрега је урађена у Бостону 1954. године код једнојајчаних близанаца (3), а прва трансплантација јетре 10 година касније (4). Од тада, па све до данас, улажу се стални напори да се резултати трансплантације унапреде, првенствено на пољу постизања добре дугорочне функције пресађеног органа, али, ништа мање, и на превенирању потенцијално нежељених ефеката имуносупресивних лекова, побољшању степена рехабилитације и квалитета живота, као и смањењу укупног морбидитета и морталитета ових болесника (5).

Нема никакве дилеме да је трансплантација бубрега најбољи начин лечења пацијента са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (6). Многе студије су потврдиле да је преживљавање пацијената код којих је урађена трансплантација бубрега значајно боље него код пацијената који се налазе на некој од метода хроничне дијализе (7), а овакав резултат је добијен у студијама у којима су поређени пацијенти имали сличне карактеристике и сви су били на листи чекања као погодни реципијенти бубрега. Предност у преживљавању пацијената након трансплантације бубрега у односу на дијализну групу односи се и на популацију дијабетичара, Афро-Американаца, децу и пацијенте старије животне доби (8). Поред побољшане хируршке технике, усавршених метода типизације ткива и боље неге пацијената, највеће заслуге за импресивне резултате трансплантације бубрега првенствено су везане за примену имуносупресивних лекова, чији је развој и увођење у клиничку употребу учинило да трансплантација постане рутинска терапијска процедура и метода избора у лечењу пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (9). Преживљавање пацијената и графта после трансплантације у многоме зависи од постизања оптималног степена супресије имуног одговора реципијента. Поремећај овога баланса може довести до одбацивања графта са једне, или испољавања ефеката превелике имуносупресије и/или нежељених ефеката имуносупресивних лекова, са друге стране. Због тога је постизање и одржавање оптималне концентрације имуносупресивних

лекова у крви изузетно важно, посебно у раним фазама после трансплантације када је интензитет имунолошког одговора на трансплантирани орган највећи (10, 11).

Краткорочни резултати трансплантације бубрега су веома добри и у већини центара који се баве трансплантацијом, једногодишње преживљавање бубрежног графта износи 90-95% (12). Међутим, без обзира на тако добре краткорочне резултате, дугорочно преживљавање графта је и даље незадовољавајуће и није се значајније побољшало последњих 20 година (13). Статистички подаци показују да око 50-70% трансплантираних бубрега изгуби своју функцију током првих 10 година после трансплантације, а терминална дисфункција графта је у многим земљама (у којима је урађен велики број трансплантација бубрега у протеклом периоду) по учесталости једна од 5 најзаступљенијих дијагноза код пацијената који започињу хроничну дијализу (14). Ова чињеница представља велики здравствени, социјални и економски проблем. Разлози за незадовољавајуће дугорочно преживљавање графта су свакако многобројни, а могу се поделити на имунолошке и неимунолошке (15). Међу најважнијим разлозима свакако је и неадекватна примена (или некомпљијанса током примене) имуносупресивних лекова, који се, због природе саме процедуре, морају примењивати све време док функционише трансплантирани бубрег (16). С обзиром да се у савременој трансплантационој медицини примењује велики број имуносупресивних лекова, обавеза лекара који се баве трансплантацијом је да на најбољи начин користе ове лекове и да, на тај начин, резултате трансплантације учине још бољим (17).

Од тренутка увођења у клиничку употребу 1994. године, па све до данас, такролимус је остао један од најзначајнијих и најчешће коришћених имуносупресивних лекова (11, 18). Може се слободно рећи да је овај лек значајно унапредио резултате трансплантације бубрега и других органа (19). Такролимус, као и њему сродни имуносупресивни лек циклоспорин, инхибише калцинеурин, ензим који је неопходан за пуну активацију Т лимфоцита после контакта са страним антигеном, у овом случају са пресађеним бубрегом. Због сличног механизма дејства, такролимус и циклоспорин се заједничким именом називају инхибитори калцинеурина (20). Ова два лека се међусобно хемијски и структурно разликују, али осим деловања на исти ензим имају и сличне (али не и потпуно исте) нежељене ефекте. Инхибитори калцинеурина представљају камен темељац већине савремених имуносупресивних протокола у трансплантацији органа (11, 21). За разлику од других имуносупресивних лекова, инхибитори калцинеурина поседују веома пожељну особину снажне, али релативно

специфичне и непотпуне имуносупресије. С обзиром да при максималној примени ових лекова 50% имунолошког одговора Т лимфоцита остаје очувано (22), током њихове примене није комплетно нарушена природна одбрана од инфекција и малигнитета, па пацијенти ипак немају тежи облик имунодефицијенције (21). Може се стога рећи да такролимус испољава селективну инхибицију имунолошког одговора и да се по томе разликује од других имуносупресивних лекова који се примењују у трансплантацији органа: он не инхибише фагоцитну функцију неутрофила као што то чине кортикостероиди, нити поседују мијелосупресивни ефекат као азатиоприн или микофенолат, нити, пак, омета процесе препознавања антигена на Т лимфоцитима, као што то чине биолошка антитела (23).

Историјски посматрано, ова драгоцену комбинацију ефикасности и релативне безбедности је, осим бубрега, омогућила успешну трансплантацију и других органа, као што су јетра, срце, плућа, панкреас, црева и других органа (10).

1.1. Историјат примене инхибитора калцинеурина у трансплантацији солидних органа

Иако је почетак примене циклоспорина пре више од 30 година, као првог лека из ове групе, направио истинску револуцију у трансплантацији, његова употреба у имуносупресивним протоколима је у већини центара који се баве трансплантацијом бубрега замењена новијим леком из ове групе- такролимусом (24). Такролимус је изолован 1984. године од стране истраживача Универзитета *Chiba* у Јапану. Ова супстанца је у првим клиничким покушајима у трансплантацији примењивана као „спашавајућа терапија“ код тешких форми акутног одбацивања који нису повољно реговали на стандарну терапију, као и код пацијената код којих је рађена поновна трансплантација (25). Такролимус је у клиничкој пракси први пут примењен као примарни имуносупресивни лек 1990. године код пацијената са трансплантираном јетром на Универзитету у Питсбургу од стране *Starzl*-а и сарадника (26). Успех првих покушаја имао је за последицу широку клиничку примену овога лека код трансплантације јетре и бубрега и појаву великог броја рандомизованих мултицентричних студија (27). Већ прве студије су показале да су пацијенти који су лечени такролимусом имали мању учесталост и тежину акутних одбацивања него пацијенти код којих је примењиван циклоспорин (28). Међутим, треба нагласити да је ефикасност циклоспорина, у међувремену, значајно побољшана применом

микроемулговане форме крајем деведесетих година прошлог и ефикаснијим терапијским мониторингом (C2 мониторинг) првих година овога века, па у каснијим студијама ова разлика у ефикасности није више била тако убедљива (29, 30). За разлику од других имуносупресивних лекова, такролимус је 1994. иницијално одобрен од стране Америчке агенције за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration*) за примену код трансплантације јетре, а потом за трансплантацију бубрега 1997. и трансплантацију срца 2006. године (31, 32).

У односу на циклоспорин, такролимус је, у еквимоларним концентрацијама, 100 пута јачи имуносупресивни лек (33), па се сматра да је ефикаснији код пацијената са већим имунолошким ризиком и код мултиорганске трансплантације (19). Такролимус има и једноставнији терапијски мониторинг у односу на циклоспорин, а оба лека се незнатно разликују у репертоару нежељених ефеката (34). Све је ово резултирало већом применом такролимуса у трансплантацији органа у односу на циклоспорин, па су, према подацима *Shapiro* и сарадника, 2003. године, 84% пацијената са трансплантираним бубрегом и 90% пацијената са трансплантираном јетром на отпусту из болнице примали такролимус као примарни калцинеурински инхибитор (35). Истина је, међутим, да се доминантна примена такролимуса над циклоспорином може објаснити и извесним трендом који је постојао у трансплантационој медицини последњих 15 година.

У сваком случају, инхибитори калцинеурина су незаобилазна и драгоцену групу имуносупресивних лекова, при чему је такролимус, тренутно, чешће примењиван (11). Ипак, најреалнији став би био да се (с обзиром на ефикасност и донекле специфичан спектар нежељених ефеката) избор појединог лека из ове групе врши према индивидуалним карактеристикама и потребама пацијента, као и према искуству центра (36).

1.2. Структура и механизам деловања такролимуса

Такролимус је макролидни антибиотик кога продукује гљивица *Streptomyces tsukubaensis* (37). Основа хемијске структуре је лактонски прстен са 23 везујућа места, молекулске тежине од 822,05 далтона. По физичким особинама, ово једињење је веома липофилно, а практично је нерастворљиво у води (38).

Молекул такролимуса се, у функционалном смислу, може поделити у 2 целине: везујућу групу, која се унутар Т лимфоцита веже за специфични имунофилин- ФК

везујући протеин 12 (енг. *FK506-binding protein 12- FKBP-12*), и ефекторну групу, која се везује за ензим калцинеурин (39). Такролимус постаје активан тек када се веже за *FKBP-12*, а овако изграђен комплекс делимично инхибира калцинеурин, ензим који је кључан за активацију Т лимфоцита. Калцинеурин је протеинска фосфатаза која после контакта Т лимфоцита са страним антигеном дефосфорилише неколико нуклеарних протеина који су неопходни за активацију Т лимфоцита, од којих је најважнији нуклеарни фактор активираних Т лимфоцита (енг. *nuclear factor of activated T cells- NFATc*). После активације, *NFATc* се транслоцира у једро где повећава експресију већег броја гена, од којих је активација гена за интерлеукин 2 од примарне важности за даљи раст и диференцијацију Т-лимфоцита (40). Блокадом ензима калцинеурина инхибира се читав низ активационих процеса на различитим генима у Т лимфоциту, па се, осим за интерлеукин 2, смањује транскрипција гена и за интерлеукин 4, интерферон-гама, фактор туморске некрозе алфа, азот моноксид и друге. Осим тога, смањује се дегранулација ћелија, а повећавају се процеси апоптозе (23). За имunosупресивни ефекат такролимуса је ипак најбитнија инхибиција експресије рецептора за интерлеукин 2 на Т лимфоцитима, чиме се значајно умањује „други сигнал активације“, који је неопходан за вишеструко појачавање имуног одговора после контакта Т лимфоцита са антигеном („први сигнал активације“) (41). Осим овога, инхибицијом калцинеурина и последичном супресијом активације Т лимфоцита посредно се смањује и активација Б лимфоцита и интезитет хуморалног одговора на страни антиген због изостанка Т-Б лимфоцитне сарадње (42). Такролимус такође потенцира дејство гликокортикоида и не омета процесе презентације антигена (23).

1.3. Начин примене и фармакокинетске карактеристике такролимуса

Такролимус се у трансплантацији органа може примењивати интравенски или орално. Интравенска доза за одрасле пацијенте износи 25-50 µg/kg/дан, док је орална доза 150-200 µg/kg/дан, подељена у две дневне дозе које се примењују са размаком од 12 сати. Последњих година се појавио и фармацеутски облик такролимуса са продуженим ослобађањем који се примењује једном дневно- *Advagraf*[®] (43). У свакодневној пракси, због могућих озбиљних нежељених ефеката, такролимус се примењује интравенски само у случајевима када је орална примена немогућа (44).

1.3.1. Ресорпција лека након оралне примене

Ресорпција такролимуса из гастроинтестиналног тракта је варијабилна и неправилна. После оралне примене, код већине пацијената, такролимус се релативно брзо ресорбује, а максималне концентрације у крви се постижу унутар 2 до 3 сата од узимања лека. Међутим, код неких пацијената ресорпција лека може бити значајно спорија. Биорасположивост лека је прилично мала због пресистемске елиминације и износи око 20%, мада може и значајно да варира, како код појединачног пацијента у различитим временским периодима, тако и међу различитим пацијентима. Ресорпција лека значајно зависи од функције жучи (45). Присуство хране значајно смањује ресорпцију такролимуса, а величина смањења зависи и од врсте унете хране. Веома масна храна смањује укупну површину лека испод криве (енг. *Area Under the Curve-AUC*) за око 35-40%, док максимална концентрација лека у крви (C_{max}) може бити мања и до 80% (46). Храна која је веома засићена угљеним хидратима снижава *AUC* и C_{max} за 28%, односно 65% (45). С обзиром да узимање лека, чак и 90 минута после масног obroка, може значајно смањити његову концентрацију у плазми, саветује се да се такролимус увек узима најмање 1 сат пре јела (44).

1.3.2. Дистрибуција такролимуса

Удео такролимуса везаног у крви износи скоро 99%, при чему се лек у највећем проценту (око 85%) везује за еритроците (47). Због тога је концентрација лека значајно већа у пуној крви него у плазми (48). Везивање лека за протеине плазме износи 72-98%, у зависности од аналитичке методе која се користи за испитивање (49). Такролимус се у плазми највише везује за албумин и α_1 кисели гликопротеин, затим и за *HDL (High Density Lipoproteins)*, *LDL (Low Density Lipoproteins)* и *VLDL (Very Low Density Lipoproteins)* липопротеине (47). У многим студијама је показано да, у односу на плазму, пуна крв много боље одражава дистрибуцију такролимуса, па се и користи за терапијски мониторинг такролимуса (енг. *therapeutic drug monitoring*- ТДМ). Због интензивног везивања за еритроците, привидни волумен дистрибуције, базиран на концентрацији лека у пуној крви, је значајно нижи (1-1,5 l/kg) у поређењу са концентрацијом лека у плазми (око 30 l/kg) (49). На степен расподеле такролимуса између пуне крви и плазме могу утицати различити фактори као што су хематокрит,

температура одвајања плазме и концентрација протеина у плазми (50). Слободна фракција такролимуса се смањује повећањем хематокрита и нивоа α_1 киселог гликопротеина и липопротеина (51). С обзиром да је слободна фракција у крви једини активан облик такролимуса, није необично да концентрација такролимуса може доста да варира у раном периоду после трансплантације због гладовања, примене великих доза кортикостероида и других лекова, као и различитих коморбидних стања која прате непосредни постоперативни период. Код већине трансплантираних пацијената равнотежно стање у расподели такролимуса се постиже унутар 3-5 дана после операције (48). Поред еритроцита, такролимус се расподељује и у другим ткивима, при чему на ову расподелу утиче и експресија П-гликопротеина у ткивима. Просечна вредност волумена дистрибуције такролимуса је 0,9-1,6 l/kg, док је код педијатријских пацијената волумен дистрибуције и до 1,8 пута већи него код одраслих. Већи волумен дистрибуције такролимуса код деце је последица повећане пропустљивости мембране еритроцита и смањене количине и афинитета протеина плазме за које се лек везује. Такролимус пролази плаценту, а излучује се и у мајчином млеку (49).

1.3.3. Елиминација такролимуса

Такролимус се примарно метаболише у јетри преко ензимског система цитохрома *P450 (CYP-P450)*, а мањим делом и у микрозомима црева. При разградњи такролимуса настаје најмање 8 метаболита који, углавном, нису фармаколошки активни (45). Метаболизам такролимуса и његовог главног активног метаболита М-І у највећој мери се обавља преко подфамилије ензима цитохрома, *CYP3A4* и *CYP3A5* (52). Метаболизам М-І се углавном обавља преко ензима *CYP3A4*, док се метаболизам самог такролимуса обавља преко оба изоензима, али се сматра да је метаболизам преко ензима *CYP3A5* ефикаснији и значајнији (53).

Поред ових ензима, за фармакокинетику такролимуса је значајан и пресистемски метаболизам за који је одговоран П-гликопротеин, продукт *ABCB1* гена (раније *MDR1* ген) (54). П-гликопротеин је транспортни протеин за многе ксенобиотице. Овај транспортер служи као “ефлукс пумпа” и налази се у различитим органима и ткивима. Своју функцију примарно обавља на луминалној страни епитела дигестивног тракта, а у мањој мери на епителу бубрежних тубула, у хепатоцитима, ћелијама крвно-мождане

барјере и плаценте. П-гликопротеин враћа већ ресорбовани такролимус из ентероцита у лумен црева и тиме смањује биорасположивост лека (55).

Трансплантирани пацијенти имају бржу елиминацију такролимуса у односу на здраву популацију: полувреме елиминације лека код трансплантираних пацијената је од 12 до 16 сати, док код здравих особа износи 43 сата (56). Највећи део такролимуса, преко 90%, елиминише се преко жучи, мање од 5% преко бубрега, док се око 1% лека елиминише у непромењеном облику (48). Та чињеница да се само око 1% такролимуса налази у столици и урину у неизмењеном облику указује на то да се он, пре излучивања путем жучи, готово потпуно метаболише (57). Клиренс такролимуса је релативно низак код здравих особа и износи око 2,2 л/сат, док је код трансплантираних пацијената већи- око 6,7 л/сат. Одређени фактори, који могу постојати и деловати у непосредном периоду после трансплантације бубрега (низак хематокрит, ниска концентрација протеина, примена великих доза кортикостероида), повећавају удео слободног такролимуса у крви, па, самим тим, и његов клиренс. Лек се сасвим незнатно уклања дијализом, па није потребно подешавати дозу после ње (45). Описани фармакокинетски параметри елиминације лека из организма могу значајно да варирају код појединих болесника. Клиренс лека је већи код деце и Афро-Американаца, па су овим пацијентима, генерално, потребне веће дозе и/или чешћа примена лека. Са друге стране, дужи интервали између примене и мање укупне дозе лека се могу очекивати као неопходне код старијих особа и пацијената са обољењем јетре (56).

Пол пацијената је један од фактора који доприноси фармакокинетској варијабилности такролимуса. Резултати указују да при примени истих доза такролимуса жене имају значајно мање максималне концентрације лека у крви, ниже вредности *AUC*-а, као и краће полувреме елиминације лека (58). Код жена је повећан клиренс и других лекова који су супстрати за ензимски систем цитохрома *CYP3A*, што се може делимично објаснити и већим садржајем *CYP3A* ензима у поређењу са мушкарцима (59).

1.4. Генски полиморфизми повезани са фармакокинетиком такролимуса

Сматра се да су гени одговорни за 20-95% варијабилности у биорасположивости и ефектима лекова (60). Најчешће се ради о замени једног нуклеотида другим (енг. *single nucleotide polymorphism- SNPs*) у молекулу ДНК, у генима за ензиме који учествују у метаболизму лекова, транспортне пумпе и рецепторских места на које делују лекови.

На тај начин, *SNPs* у одређеним генима имају за последицу промене у функционалној активности различитих ензима и протеина, што има значајан утицај на метаболизам и укупни ефекат лекова (61). У општој популацији *SNPs* се појављују са учесталошћу већом од 1%, а могу се јављати на различитим местима у гену. Постоје велика очекивања да би примена фармакогеномике у свакодневној клиничкој пракси могла да допринесе развоју персонализоване медицине, где би примена лека била прилагођена одређеним генским варијацијама код појединог пацијента (62).

SNPs у генима који синтетишу ензиме *CYP3A4* и *CYP3A5* могу као последицу имати значајне варијације у функционалном стању ових ензима. С обзиром да се такролимус примарно метаболише преко њих, ове промене могу значајно утицати на брзину и обим метаболизма такролимуса и концентрацију лека у крви (56). Познато је да се примена такролимуса карактерише великом интериндивидуалном и интраиндивидуалном фармакокинетском варијабилношћу, а ова варијабилност се, бар једним делом, може објаснити и генским полиморфизмом *CYP3A* гена (63).

1.4.1. Изоформа ензима цитохрома *P450*- *CYP3A5*

Ензим *CYP3A5* се налази у јетри, танком цреву, желуцу и бубрегу. Овај ензим се одликује израженом полиморфном експресијом, с обзиром да је до сада регистровано најмање 11 полиморфизама у појединим нуклеотидима његовог гена, који кодирају функционално различите изоформе овога ензима. Од свих полиморфизама *CYP3A5* ензима, сматра се да је *CYP3A5* 6986A>G полиморфизам најзначајнији, а карактерише се транзицијом аденина (A) у гуанин (G) на позицији 6986 у оквиру интрона 3 гена који кодира *CYP3A5* (64, 65). Код пацијената са трансплантираним бубрегом је показано да су концентрације такролимуса у крви значајно ниже код генотипова *CYP3A5**1*1 (AA) и *CYP3A5**1*3 (AG) у односу на генотип *CYP3A5**3*3 (GG) (66). Разлог овоме је што пацијенти који су носиоци *CYP3A5**3*3 генотипа синтетишу нефункционални ензим *CYP3A5*, па се означавају као „*CYP3A5* не-експресори“ и значајно спорије метаболишу такролимус. Насупрот њима, носиоци полиморфизма *CYP3A5**1*1 и *CYP3A5**1*3 синтетишу функционалну форму ензима *CYP3A5*, означавају се као „*CYP3A5* експресори“ и знатно брже метаболишу лек. *CYP3A5**1*1 се означава и као „дивљи“ тип гена, а сматра се да је овај полиморфизам присутан тек у око 5-15% особа беле расе (66). Показано је да носиоци *CYP3A5**1 алела, који су експресори за овај ензим, захтевају и до 50% већу дозу такролимуса да би имали пожељну концентрацију лека у

крви, у поређењу са пацијентима који имају *CYP3A5**3*3 алел и који су не-експресори за *CYP3A5* (64).

1.4.2. Изоформа ензима цитохрома *P450-CYP3A4*

Ензим *CYP3A4* се налази у јетри, јејунуму, колону и панкреасу. И овај ензим има полиформну експресију, с обзиром да је до сада описано најмање 42 *SNPs* његовог гена (67). Један од највише проучаваних полиморфизама је *CYP3A4*-392A>G полиморфизам, који се карактерише транзицијом аденина (A) у гуанин (G) на позицији 392 (68). Код овог полиморфизма, изоформа *CYP3A4**1*1 (AA) представља „дивљи тип“ гена који синтетише функционални облик ензима *CYP3A4*. У случају транзиције A и G настаје *CYP3A4**1B (GG) форма која синтетише нефункционални облик ензима *CYP3A4*. Досадашња испитивања су показала да је, насупрот поменутом *SNP CYP3A5* 6986 A>G, нефункционални *CYP3A4* ензим присутан само код 2-10% пацијената беле расе. Изгледа да је код особа беле расе ензим *CYP3A4*, за разлику од *CYP3A5* ензима, углавном тонично активан код највећег броја људи, али, према већини аутора, и мање ефикасан у односу на *CYP3A5* ензим (69).

1.4.3. Полиморфизам П-гликопротеина

П-гликопротеин је такође полиморфно експримиран и до сада је дефинисано 50 *SNPs* његовог гена. Најзначајнији полиморфизам *ABCB1* гена (који кодира П-гликопротеин) је на позицији 3435 на егзону 26, где долази до транзиције цитозина (C) у тимин (T), *ABCB1* 3435 C>T (70). Овај тип мутације је присутан код 32% беле популације. Генски полиморфизми *CC* и *TC* кодирају функционалне форме ензима (*CC* форма је „дивљи тип“), док *TT* изоформа кодира ензим са смањеном функцијом. Поред тога, описан је и полиморфизам *ABCB1* 1236 C>T и 2677 G>T/A. Досадашњи резултати углавном показују да, ако се изоловано посматра полиморфизам за овај транспортер, не постоји значајна разлика у фармакокинетским параметрима такролимуса између група пацијената са различитим полиморфизмима *ABCB1* гена, као ни значајна веза између полиморфизма ових гена и примењене укупне дневне дозе такролимуса и концентрације такролимуса у крви (71). Међутим, у неким радовима је показано да полиморфизам за П-гликопротеин може имати утицај на фармакокинетику

такролимуса у случајевима када је удружен са одређеним полиморфизмима *CYP3A5* ензима (72).

1.4.4. Други генски полиморфизми који могу бити значајани за фармакокинетику такролимуса

У последње време је код пацијената са трансплантираним бубрегом описан клинички значај и неких других генских полиморфама, као што је полиморфизам *P450* оксидоредуктазе*28 (*POR*28*) и ензима *CYP3A4*22* (68). *POR* је основни систем за донирање електрона у микрозомалној монооксигенацији посредованој *CYP-P450*. До сада је идентификовано око 40 *SNPs* изоформи *POR* гена (68). *POR*28 C>T* мутација може повећати активност овог ензима и мењати основне метаболичке капацитете изоформи *CYP* ензима (73). Неки аутори сматрају да *POR* генотип утиче на метаболизам такролимуса само у групи *CYP3A5* експресора (74). Такође, показано је и да *CYP3A4*22* алел (*rs35599367* транзиција *C>T* на интрону 6) може имати утицај на фармакокинетику такролимуса (68). У студији *Elens*-а и сарадника, пацијенти који су били носиоци једног или два *T* алела захтевали су значајно мању дозу такролимуса у поређењу са хомозиготним носиоцима „дивљег“ типа *C* алела (75).

1.5. Интеракције такролимуса са другим лековима

1.5.1. Фармакокинетске интеракције

Многи лекови који се релативно често користе у клиничкој пракси, када се истовремено примене са такролимусом, могу утицати на промену његове концентрације у крви (76). Лекови мењају метаболизам такролимуса индукцијом или инхибицијом ензима цитохрома *CYP3A* у јетри и у дигестивном тракту. Због мале терапијске ширине такролимуса, веома је важно познавати могуће интеракције овог имunosупресивног лека са другим лековима који се примењују после трансплантације бубрега. Код трансплантираних пацијената сваки лек, а посебно из групе лекова за које се зна да утичу на метаболизам *CYP3A*, треба примењивати опрезно, уз чешћу проверу концентрације такролимуса у крви ради евентуалне корекције дозе. У скорој ретроспективној студији која је укључила 208 пацијената који се контролишу у Центру за трансплантацију солидних органа Војномедицинске академије, анализирајући

вредности 5014 измерених концентрација такролимуса у крви, показали смо да су, у нашој средини, на концентрацију овога лека значајно утицали и неки лекови који се свакодневно примењују, као што су блокатори калцијумских канала, фуросемид и инхибитори протонске пумпе, а о чему се, у свакодневној клиничкој пракси, не води увек довољно рачуна (77).

Лекови који смањују концентрацију такролимуса у крви индукцијом ензима CYP3A и убрзавањем метаболизма лека су:

- антитуберкулозни лекови (рифампицин посебно, треба га избегавати при истовременој примени такролимуса, изониазид утиче мање);
- антиконвулзивни лекови (барбитурати знатно смањују концентрацију такролимуса, фенитоин мање, карбамазепин сасвим мало, док бензодиазепини и валпроична киселина не утичу на ниво такролимуса) и
- неки антибиотици (у мањој мери): имипенем, цефалоспорини, нафцилин, интравенски триметоприм и цiproфлоксацин.

Лекови који повећавају концентрацију такролимуса у крви инхибицијом ензима CYP3A или компетицијом са такролимусом на ове ензиме су:

- антихипертензивни лекови који блокирају калцијумске канале (значајно утичу: верапамил, дилтиазем и никардипин- при примени ових лекова потребно је смањити дозу такролимуса за 30%; инхибитори калцијумских канала дихидропиридинске групе: нифедипин, амлодипин и фелодипин мање утичу на концентрацију такролимуса у крви);
- антигљивични лекови (кетоконазол веома значајно утиче на концентрацију такролимуса- потребно је смањити дозу такролимуса и до 80%; флуконазол и итраконазол утичу мање);
- неки антибиотици (еритромицин значајно повећава концентрацију такролимуса, кларитромицин мање, азитромицин не утиче на концентрацију лека) и
- неки хормони (кортикостероиди у иницијално великим дозама и/или при примени пулсних доза у епизодама акутног одбацивања повећавају концентрацију такролимуса, бромкриптин, орални контрацептиви, анаболични стероиди и тестестерон мање).

Неки од побројаних лекова могу инхибисати или индуковати функцију интестиналног П-гликопротеина. Треба напоменути да је ефекат ове интеракције спор (концентрација такролимуса се мења током недеља), за разлику од ефекта који настаје због интеракције са ензимима цитохрома у јетри, где до промене концентрације такролимуса долази већ после прве дозе истовремено примењеног лека (78).

Неки лекови својим фармакодинамским механизмима утичу на степен ресорпције такролимуса из дигестивног тракта: метоклопрамид повећава концентрацију такролимуса због боље ресорпције из црева, док холестирамин и неки од лекова који се користе у лечењу гојазности индиректно смањују концентрацију такролимуса у крви смањујући ресорпцију масти из дигестивног тракта (79).

Такође, веома је важно упозорити пацијенте да неки биљни препарати који се налазе у слободној продаји значајно утичу на концентрацију такролимуса у крви. Пример за то је екстракт кантариона, који се широко користи као природни антидепресив, а који може значајно смањити концентрацију такролимуса у крви (80).

Сок од грејпфрута селективно инхибише интестиналну форму CYP3A ензима, па доводи до пораста концентрације такролимуса у крви (овај ефекат није присутан код интравенске примене лека) (81).

1.5.2. Фармакодинамске интеракције

Поједини лекови потенцирају вазоконстрикторни ефекат такролимуса на крвне судове бубрега, па такве, потенцијално нефротоксичне лекове, треба избегавати за време примене такролимуса. Настанак или погоршање нефротоксичности описано је при истовременој примени такролимуса са аминогликозидним антибиотцима, нестероидним антиреуматичима, амфотерицином и АЦЕ инхибиторима, ређе са ципрофлоксацином и триметаприм-сулфаметоксазолом (80). При истовременој примени ловастатина и инхибитора калцинеурина могућа је појава значајне миопатије, па и спорадични случајеви акутне бубрежне инсуфицијенције због рабдомиолизе (82). Статини новије генерације знатно ређе доводе до ових компликација.

1.6. Нежељени ефекти такролимуса

Нежељени ефекти такролимуса су бројни, а веома су слични нежељеним ефектима циклоспорина, уз одређене мање разлике које се тичу, углавном, интестинитета и

учесталости реакција. У односу на циклоспорин, такролимус испољава мању учесталост хипертензије, хиперлипидемије, хепатотоксичности, хиперплазије десни и козметских промена, а већу учесталост поремећаја гликорегулације и неуролошких и дигестивних поремећаја (83-85). С обзиром да такролимус има малу терапијску ширину, при уобичајеној клиничкој примени нежељени ефекти су релативно чести, али су, углавном, реверзибилни и нестају смањивањем концентрације лека у крви (86). Нежељени ефекти су најчешће проузроковани високом концентрацијом лека, мада код неких пацијената може постојати и повећана индивидуална осетљивост и испољавање нежељених ефеката и при уобичајеним терапијским концентрацијама лека (87). Због овога је важан пажљив терапијски мониторинг такролимуса, посебно у раној фази после трансплантације бубрега када су пожељне максималне терапијске концентрације лека због повећаног ризика од одбацивања графта.

Најчешћи нежељени ефекти такролимуса су нефротоксичност, различите манифестације неуротоксичности, хипертензија, поремећај гликорегулације и шећерна болест, хепатотоксичност, различити дигестивни поремећаји, хиперурикемија, хиперкалемија, хипомагнезијемија и други ређи поремећаји (17). Осим овога, као и остали имуносупресивни лекови, такролимус, дозно зависно и кумулативно, повећава учесталост секундарних тумора и опортунистичких инфекција (88).

1.6.1. Нефротоксичност

Нефротоксичност је један од најчешћих нежељених ефеката инхибитора калцинеурина (89). Нефротоксичност се најчешће испољава као акутно повећање азотних материја у крви, повремено и уз смањење диурезе, а ове појаве су реверзибилне после смањења концентрације лека у крви. Осим тога, може се испољити и као хронична нефропатија графта са хистолошки карактеристичним променама у ткиву бубрега. Ређи нежељени ефекти такролимуса на бубрег су поремећаји функције тубула и електролита у крви, као и оштећења крвних судова у склопу акутне микроваскуларне болести која може бити покренута овим леком (90).

1.6.1.1. Акутна нефротоксичност

Акутна нефротоксичност изазвана такролимусом настаје због вазоконстрикције крвних судова у бубрегу са последичним смањењем протока крви кроз гломерул и

акутог пада гломерулске филтрације (91). Већина података о акутној нефротоксичности је добијена дугогодишњим проучавањем ефеката циклоспорина на графт, али је касније показано да и такролимус испољава практично исте ефекте (92, 93). Промене у бубрежној хемодинамици настају веома брзо после примене такролимуса, углавном зависно од дозе лека и реверзибилне су природе (91). Такролимус, као и циклоспорин, доводи до сужења првенствено аферентних, а у мањој мери, и еферентних артериола. Механизам вазоконстрикције није сасвим јасан, али је вероватно изазван различитим механизмима: поремећајем метаболизма арахидонске киселине и појачаним стварањем вазоконстриктора тромбоксана, повећаном продукцијом ендотелина (веома снажног вазоконстриктора), смањеном локалном продукцијом вазодилаторних медијатора- простагландина и азотног оксида, појачаним тонусом симпатикуса, као и повећаном активношћу система ренин-ангиотензин (94). Осим пролазне вазоконстрикције, такролимус поседује и директно токсично дејство на ендотелне ћелије графта, при чему се из њих ослобађа већи број вазоактивних материја који даље неповољно делују на циркулацију у графту (87). Акутна вазоконстрикција крвних судова у бубрегу се клинички манифестује наглим повећањем азотних материја у крви, а у тежим случајевима и хипертензијом и ретенцијом натријума и воде (95). Пораст креатинина у овим стањима је умерен (до 30% од претходних вредности), реверзибилан завистан од концентрације лека у крви. Начин реаговања графта у стањима акутне вазоконстрикције изазване такролимусом веома подсећа на тзв. “пререналну” дисфункцију бубрега. У првим данима после трансплантације вазоконстрикција изазвана инхибиторима калцинеурина може имати за последицу настанак (и/или спорији опоравак) одложене функције графта (96). Ово је посебно изражено при примени иницијално високих доза лека, па и постигнутих високих концентрација у крви, али код неких болесника овај ефекат може настати и при уобичајеним терапијским концентрацијама такролимуса у крви, што указује на постојање индивидуалне осетљивости трансплантираног бубрега на лек, или могуће интеракције са другим лековима (87). Наиме, интересно је да бубрези узети од истог кадаверског донора, а потом трансплантирани различитим пацијентима, углавном, имају слично испољавање нежељених ефеката инхибитора калцинеурина (91). Такође је показано да се, ако постоји у раној фази, повећана склоност ка вазоконстрикцији у гломерулима графта изазвана већим концентрацијама инхибитора калцинеурина одржава у мањем обиму и касније, све време после трансплантације, али овај ефекат обично није клинички испољен због мањих концентрација лека у крви (97).

1.6.1.2. Хронична нефротоксичност

Врло брзо после почетка шире примене циклоспорина, описане су хистолошке промене у трансплантираном бубрегу код пацијената који су дуже примали овај лек (98). У међувремену, хистолошке промене у графту удружене са применом такролимуса и циклоспорина су добро дефинисане и заједнички се означавају као хронична калцинеуринска нефротоксичност (99). Ове промене се карактеришу хијалинизацијом и задебљањем ендотелних ћелија са сужењем лумена крвних судова у графту (што се сматра иницијалним узроком оштећења графта), специфичним начином фиброзе интерстицијума, склерозом гломерула и атрофијом и вакуолизацијом ћелија тубула (100). Сматра се да фиброза интерстицијума у графту настаје због повећане локалне продукције профибротичких цитокина, у првом реду трансформишућег фактора раста бета ($TGF-\beta$) и остеопонтина (101). $TGF-\beta$ је профибротички цитокин који у графту потенцира процесе фиброзе повећаним стварањем екстрацелуларног матрикса и ендотелина, а осим код примене инхибитора калцинеурина, појачана експресија гена за $TGF-\beta$ може постојати и у стањима хроничне инфламације, исхемије и хипомагнезијемије (102).

Међутим, последњих година се доводи у питање ранији став да, несумњиво присутне, хистолошке промене у графту током примене инхибитора калцинеурина могу бити узрок хроничне дисфункције и губитка графта (103, 104). Шта више, показано је да графтови са јасном хистолошком сликом тзв. „хроничне калцинеуринске нефропатије“ имају боље дугорочно преживљавање, а разлог томе би могао бити мањи степен имунолошког оштећења због боље изложености инхибиторима калцинеурина (105). Због тога се, у последње време, пре испитује концепт ране минимизације дозе или укидања инхибитора калцинеурина (уз евентуалну касну конверзију на лекове из групе *m-Tor* инхибитора) који је, после поменутих хистолошких описа, био актуелан последњих десетак година (106). Неки аутори чак сматрају да је недостатак напретка у дугорочном преживљавању графта управо последица минимизације дозе калцинеуринских инхибитора (и/или лоше комплијансе код неких болесника), што је код већег броја пацијената имало за последицу антителима изазвана, а непрепозната, субклиничка одбацивања и губитак графта (107, 108).

1.6.1.3. Остала нежељена дејства такролимуса на бубрег

1.6.1.3.1. Акутна микроваскуларна болест

Акутна микроваскуларна болест (хемолитичко уремијски синдром и тромботична микроангиопатија) настаје као последица значајнијих оштећења ендотелних ћелија изазваних циклоспориноми такролимусом (109). Овај поремећај се може испољити локалним променама у графту, или као системска болест са поремећајем функције графта, знацима интраваскуларне хемолизе и интраваскуларним тромбима који се уочавају на биопсији графта и других органа (90, 110). Ово стање не мора да буде удружено са осталим нежељеним ефектима такролимуса, нити са повишеном концентрацијом лека у крви. С обзиром на потенцијалну могућност губитка графта, потребно је мислити на овај поремећај, посебно у раној фази после трансплантације када се примењују велике дозе лека. Важно је да се дијагноза акутне микроваскуларне болести постави рано, будући да прекид примене такролимуса и, у тежим случајевима, плазмаферезе, могу довести до опоравка графта, као што је то показано у ранијим студијама са циклоспорином (109).

1.6.1.3.2. Поремећаји електролита и хипертензија

Током примене такролимуса и циклоспорина може настати хиперкалемија као последица смањене бубрежне екскреције калијума због оштећења тубула, поремећене активности система ренин-ангиотензин-алдостерон, као и смањеног одговора тубула на алдостерон (111). Хиперкалијемија је често удружена са хиперхлоремијском ацидозом (тип IV реналне тубулске ацидозе) због смањене активности алдостерона и екскреције јона амонијума услед оштећења калијум зависних канала у тубулима (112).

При примени такролимуса може настати и хиперурикемија због смањене екскреције мокраћне киселине урином, као и хипомагнезијемија, хиперкалциурија и хиперфосфатурија због поремећене функције одређених специфичних транспортних протеина у тубулима (113).

Настанак или погоршање постојеће хипертензије је честа последица примене инхибитора калцинеурина, а нешто је више изражена током примене циклоспорина. Разлози за настанак хипертензије су многоструки: задржавање натријума у организму, вазоконстрикција крвних судова у графту, повишен тонус симпатикуса и осовине

ренин-ангиотензин-алдостерон, као и супресија атријалног натриуретског фактора и азотног оксида (114).

1.6.2. Нежељени ефекти такролимуса који нису везани за бубрег

Најчешћи нежељени ефекти такролимуса који нису везани за бубрег су интолеранција глукозе, ново-настала шећерна болест после трансплантације, различите манифестације неуротоксичности (тремор, главобоља, поремећај сна, болови у костима), различите дигестивне тегобе (дијареја, грчеви и болови у трбуху), повишење трансаминаза и билирубина, хиперкалијемија, хипомагнезијемија, гихт, хиперлипидемија, склоност ка тромбозама, алопеција, као и повећана учесталост опортунистичких инфекција и тумора (17).

1.7. Терапијски мониторинг такролимуса

1.7.1. Такролимус као лек са уском терапијском ширином

У последње време постоји велики интерес за оптималнијом применом лекова са уском терапијском ширином. Мада нема јасно прихваћених критеријума који би дефинисали ове лекове, Бенет их описује “као лекове чија релативно мала промена у системској циркулацији ($\pm 20\%$) има за последицу значајне промене у фармакодинамици” (115), док их други аутори карактеришу као “критичну групу лекова код којих чак и мало смањење концентрација у крви може довести до изостанка ефекта, док мало повећање концентрације може имати за последицу токсичне ефекте” (116).

Такролимус је пример лека са малом терапијском ширином, код кога су потребна пажљива подешавања дозе да би се постигла жељена ефикасност, одржала добра подношљивост и избегли токсични ефекти (117). Варијације концентрација овога лека у крви код трансплантираних болесника могу имати веома озбиљне последице, будући да недовољне концентрације могу покренути акутно одбацивање графта, а високе довести до испољавања нежељених ефеката лека (118). У свакодневој клиничкој пракси интериндивидуална и интраиндивидуална варијабилност представља велики потенцијални проблем због могућих последица по судбину графта (119). За клиничара је посебно неугодно што је фармакокинетика такролимуса варијабилна, а разлози за

њено испољавање бројни. Међу најважијима су пол (58, 120), године старости (120), индекс телесне масе (120), храна (46), хематокрит (56), интеракције са другим лековима (31), аналитичка метода квантификације лека у крви (121), генски полиморфизам (122), функција јетре и хепатитис Ц вирусна инфекција (120). Постизање и одржавање оптималне концентрације такролимуса у крви је посебно важно у првим недељама после трансплантације, када је ризик од акутног одбацивања највећи.

1.7.2. Значај терапијског мониторинга такролимуса за лекара практичара

Терапијско праћење концентрација лекова у крви примењује се у свакодневној клиничкој пракси у циљу побољшања ефикасности и безбедности терапије и подразумева мерење концентрације лека и/или метаболита у биолошком узорку, пре свега у плазми или серуму, у равнотежном стању (123). Терапијски мониторинг лекова је саставни део рационалне фармакотерапије и индивидуализације терапије, с обзиром да различити пацијенти захтевају различите дозе лека за постизање истог терапијског одговора, па је терапију неопходно прилагодити њиховим индивидуалним потребама. Осим мерења концентрације лека у крви, ТДМ подразумева и правилна одлука када да се узоркује биолошки материјал, правилно добијање узорака, исправно мерење концентрације лека у узорку и адекватно тумачење добијених резултата у зависности од клиничког стања пацијента (124). После модификовања дозе, неопходно је да прође период од пет полувремена елиминације лека да би се опет успоставило равнотежно стање и поновио ТДМ (125).

Терапијски мониторинг такролимуса се обавља мерењем концентрације лека у крви 12 сати након последње примењене дозе лека (минимална концентрација такролимуса у крви, C_{min}). За разлику од циклоспорина, минимална концентрација такролимуса у крви доста добро корелира са површином лека испод криве (AUC_{0-12}) за коју је доказано да представља поуздан показатељ укупне изложености организма леку и да најбоље корелира са клиничким дешавањима код трансплантираних болесника (44).

Мада није универзално прихваћен, пожељни (циљни) терапијски опсег минималне концентрације такролимуса у крви пре примене наредне дозе је 8-12 ng/ml током прва три месеца и 6-10 ng/ml током прве године после трансплантације (126, 127). Циљни опсег за овај рани период је у неким центрима и већи, а негде мањи, а ове вредности су

се, осим тога, и мењале током времена. Оне су раније биле, генерално, веће, мада *Gaston* још 2001. године предлаже минималне циљне концентрације од 7-10 ng/ml током прва три месеца и 3-7 ng/ml после тога, и то код пацијената код којих није била примењена индукциона терапије (128). Циљни терапијски опсег такролимуса у раним периодима после трансплантације значајно зависи и од тога да ли је за време трансплантације примењена индукциона терапија, као и од процене степена имунолошког ризика код пацијента. Чињеницом да се индукциона терапија тренутно примењује у преко 70% трансплантација бубрега могу се објаснити нешто ниже циљне концентрације такролимуса које се сада примењују у раном периоду после трансплантације. У сваком случају, сматра се да ће такролимус испољити неке од токсичних ефеката када је концентрација лека у крви већа од 20 ng/ml (68).

Бројне студије су потврдиле да је за постизање дуготрајне и стабилне функције графта веома важно достићи пожељну концентрацију такролимуса што пре после трансплантације (117). Први дани после хируршке интервенције су посебно критични, јер се тада такролимус дозира емпиријски, са донекле непредвидљивим одговором болесника на иницијалне дозе лека. Такође, у овом периоду је и ресорпција лека веома непоуздана, с обзиром да пацијент не узима храну и да постоји пареза црева (31). Прво поуздано мерење концентрације лека у крви и корекција дозе се, у суштини, може обавити 3 до 5 дана после трансплантације, када се очекује успостављање стабилне концентрације лека односно његове фармакокинетики (117). У каснијем периоду после трансплантације, такролимус се дозира према циљним концентрацијама у крви, па се благовременом корекцијом дозе смањује могућност неадекватних концентрација лека.

У последње време се потенцира важност постизања стабилних и одговарајућих концентрација такролимуса, не само у раном периоду, већ и у каснијем току, односно, све време после трансплантације (17). Као што је већ речено, ове препоруке су утемељене на основу новијих студија које су показале узрочну повезаност нижих концентрација такролимуса са *de novo* настанком донор специфичних антитела, хуморалног одбацивања и хроничне и прогресивне дисфункције графта, што може настати и више година после трансплантације (107). Због тога, сада велики број аутора сматра да минимална концентрација такролимуса у крви не би требало да буде испод 5 ng/ml у било ком периоду после трансплантације бубрега (108).

Дакле, нема никакве сумње да је прецизан и пажљив терапијски мониторинг такролимуса неопходан за адекватну клиничку примену овога лека. Међутим, у свакодневној пракси се код одређеног броја болесника, посебно у раном периоду после

трансплантације, и поред одговарајућег мониторинга, релативно тешко постижу препоручене концентрације овог лека, или оне непредвидљиво и значајно варирају. Због тога поједини пацијенти имају ниске концентрације и повећани ризик од раног акутног одбацивања, док неки имају концентрације које су значајно више од препоручених па испољавају нежељене ефекте, што може водити ка привременом или чак дефинитивном прекиду примене овог важног лека. Посебно су критични први дани после трансплантације када се лек дозира емпиријски, за све пацијенте исто- на основу телесне масе, са повремено потпуно неочекиваним одговором пацијента на ове иницијалне дозе лека.

1.7.3. Значај фармакогеномских испитивања за терапијски мониторинг такролимуса и индивидуализацију терапије код трансплантираних пацијената

Фармакогеномика, као нова област истраживања, управо испитује варијабилност одговора на неки лек у чијој основи стоје генски фактори који утичу на фармакокинетске процесе и/или механизме деловања неког лека (129). За разлику од фенотипских обележја, генотип је стабилна карактеристика коју је потребно одредити само једном, па су и због тога клиничке импликације фармакогеномских испитивања веома значајне (68).

Међутим, и поред великог броја до сада описаних генских полиморфизама, изгледа да само мањи број има клинички значај и да утиче на фармакокинетске и фармакодинамске карактеристике неког лека. Да би генски полиморфизам имао утицај на метаболизам лека, потребно је да постоје 2 услова: да постоји полиморфизам за доминантни ензим преко кога се метаболише лек, као и да лек има малу терапијску ширину (68). Такролимус поседује оба ова услова. Сматра се да је изражена фармакокинетска варијабилност такролимуса великим делом условљена полиморфизмом гена одговорних за синтезу ензима значајних за елиминацију овога лека (60). С обзиром да је рани период после трансплантације веома важан за каснију судбину графта, ова слаба индивидуална предвидљивост и велика фармакокинетска варијабилност представљају озбиљан проблем код дозирања такролимуса у пацијената подвргнутих трансплантацији (118).

Стога, због свега наведеног, и даље постоји реална потреба да се испитају фактори који одређују индивидуалну варијабилност фармакокинетике такролимуса и његових концентрација у крви и утичу на ефикасност његове примене после трансплантације

бубрега. Важан корак ка успешнијој примени такролимуса може представљати сазнање да су промене у елиминацији овога лека у највећој мери одговорне за описане разлике које постоје међу пацијентима. Последњих година је у већем броју студија показано да је полиморфизам гена који одређују функционално стање најважнијих ензима за метаболизам такролимуса- *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина, фактор који значајно доприноси фармакокинетској варијабилности овога лека и да може имати значајне последице за судбину графта (130). Постоје реална очекивања да би се, сагледавајући профил генског полиморфизма за поменуте ензиме и транспортер пре трансплантације, могла проценити брзина и обим елиминације такролимуса код одређеног пацијента. То би омогућило да се пре трансплантације планира почетна, условно речено, индивидуализована доза овога лека, што би примену такролимуса у трансплантацији бубрега учинило још ефикаснијом, безбеднијом и једноставнијом (131).

Дакле, идентификација генског полиморфизма за сада обећава као могућност за индивидуализовану и ефикаснију примену такролимуса, посебно у првим данима после трансплантације. Међутим, проспективне клиничке студије тек требају да покажу да ли, и у којој мери, одређивање полиморфизма гена за поменуте ензиме и транспортер пре трансплантације може допринети индивидуализацији примене овога лека, а самим тим и његовој већој ефикасности, смањењу нежељених реакција на лек и бољем укупном преживљавању графта.

Због свега до сада поменутог, постављени су следећи циљеви овог истраживања.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати учесталост *CYP3A5 A6986G*, *CYP3A4 A392G* и *ABCB1 C3435T* алела и генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом који у оквиру имуносупресивне терапије примају такролимус.
2. У истој популацији испитати у којој мери поменути алели и генотипови, као и њихове комбинације, могу бити повезани са:
 - брзином постизања жељене концентрације такролимуса после трансплантације;
 - могућношћу правовременог постизања оптималног односа концентрације и дозе такролимуса прилагођене телесној маси после трансплантације.
3. Испитати утицај испитиваних генских полиморфизама на:
 - учесталост акутног одбацивања графта;
 - дугорочну функцију графта;
 - учесталост нежељених догађаја који се могу довести у везу са применом такролимуса.

3. ХИПОТЕЗЕ

С обзиром да у свакодневном клиничком раду и даље постоје тешкоће у дозирању такролимуса због непредвидљивих варијација у концентрацијама овога лека у раном периоду после трансплантације бубрега код појединих пацијената, као и да је у појединим студијама показано да генски полиморфизам ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина има значајан утицај на елиминацију такролимуса и посредно на судбину графта, постављене су следеће радне хипотезе:

Полиморфизам гена чија је експресија одговорна за синтезу ензима *CYP3A5* и *CYP3A4*, као и транспортера П-гликопротеина:

1. Доводи до интериндивидуалне фармакокинетске варијабилности такролимуса, значајно утиче на његову концентрацију, као и на безбедност примене овога лека код болесника са трансплантираним бубрегом;
2. Има утицај на различите клиничке исходе после трансплантације бубрега, као што су: одложена функција графта, учесталост акутног одбацивања, нежељене догађаје који су повезани са применом такролимуса, као и на укупно преживљавање графта, па може значајно унапредити терапијски мониторинг такролимуса.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Пацијенти и дизајн студије

Првим, прелиминарним, испитивањима било је обухваћено 208 пацијената који су после трансплантације бубрега, у склопу имуносупресивне терапије одржавања, примали такролимус најмање 3 месеца пре почетка испитивања и који су амбулантно контролисани у Центру за трансплантацију солидних органа Војномедицинске академије у Београду. Истраживање је дизајнирано као ретроспективна серија случајева у којој је јединица праћења била амбулантна посета пацијента, у периоду од 2006-2008. године. Укупан број ванболничких посета трансплантираних пацијената и њихових анализираних концентрација такролимуса је био 5011. Циљни опсег концентрација такролимуса у овом периоду је, према тадашњим препорукама, био од 5 до 15 ng/ml (77).

У другом делу истраживања, на основу критеријума укључења и искључења, анализирани су само они пацијенти који су испунили ове критеријуме и имали све податке од интереса. Оно је обухватило 110 болесника код којих је урађена трансплантација бубрега на Војномедицинској академији у Београду, у временском периоду од 2008. до 2014. године. Код свих ових пацијената је од првог дана после трансплантације примењена терапија такролимусом. Пре укључења у студију пацијенти су били информисани о циљевима студије и дали су писмени пристанак за учествовање у њој.

Студија је спроведена као опсервациона студија (типа серија случајева) током прве године након трансплантације бубрега. У првом делу, студија је била ретроспективна и анализирани су релевантни подаци из амбулантне базе података која се води у облику *Excel* базе у Центру за трансплантацију солидних органа Војномедицинске академије, као и из историја болести у току боравка истих болесника, а које су се односиле на непосредни период после трансплантације бубрега (прве две до три недеље).

У другом делу су проспективно праћени пацијенти, а током 2014. године је урађена анализа *SNPs CYP3A5 A6986G*, *CYP3A4 A392G* и *ABCB1 C3435T*, узимањем једног узорка крви за генетска испитивања од свих пацијената који су ушли у испитивање од 2008. године.

У току студије анализирани су подаци који се односе на клиничке и биохемијске параметре и параметре терапијског мониторинга такролимуса 3. и 7. дана, као и 1., 3., 6. и 12. месеца после трансплантације бубрега.

4.2. Критеријуми за укључивање у студију

Критеријуми за укључивање у други део студије су били: пацијенти оба пола старији од 18 година код којих је урађена трансплантација бубрега у Центру за трансплантацију солидних органа Војномедицинске академије у Београду; пацијенти код којих је примењиван такролимус од првог дана после трансплантације; пацијенти којима је редовно вршен терапијски мониторинг такролимуса током прве године после трансплантације и пацијенти који су дали писмени пристајак за одређивање генског полиморфизма код којих је одређен *SNPs CYP3A5 A6986G, CYP3A4 A392G и ABCB1 C3435T*.

Критеријуми за искључивање су били: пацијенти код којих није примењиван такролимус од првог дана после трансплантације; пацијенти којима није редовно вршен терапијски мониторинг лека; и пацијенти који нису дали писмени пристајак за одређивање генског полиморфизма или код којих није одређен генски полиморфизам.

4.3. Имуносупресивни протоколи

Код свих пацијената је после урађене трансплантације примењена стандардна трострука имуносупресивна терапија која се примењује у Центру за трансплантацију солидних органа Војномедицинске академије: кортикостероиди (*Methylprednisolon-Lemod Solu[®] Hemofarm; Pronison[®], Galenika*), микофенолат мофетил или микофенолат натријум (*CellCept[®] Roche Laboratories; Myfortic[®], Novartis Pharma*) и такролимус (*Prograf[®], Astellas Pharma Inc*).

Кортикостероиди су примењивани према стандардном протоколу Центра: 500 mg интравенски у операционој сали током саме трансплантације, 250 mg/дан интравенски наредна два дана, 125 mg следећа два дана, 1,5 mg/kg интравенски наредна 3 дана, а после тога пероралним путем са постепеним смањењем дозе лека на 0,3 mg/kg телесне тежине месец дана после трансплантације, 10 mg дневно до прве године, а 10 mg сваки други дан током друге године после трансплантације.

Микофенолат мофетил је примењиван перорално, у дози од 1,0 gr на 12 сати прва 3 месеца, а потом 500 mg на 12 сати током годину дана. Микофенолат натријум је примењиван перорално, у дози 760 mg на 12 сати прва 3 месеца, а потом 360 mg на 12 сати током годину дана. Са применом једног од ова два лека из групе антиметаболита је отпочињано 2 дана пре трансплантације. Током примене ових лекова није одређивана концентрација активног састојка- микофеноличне киселине у крви, а доза лека је смањивана у случају испољавања неког од нежељених ефеката који су карактеристични за ову групу лекова. Избор једног или другог антиметаболичког лека је вршен према одлуци лекара из Центра за трансплантацију на основу искуства и конкретне клиничке ситуације.

Такролимус је примењиван перорално, у облику капсула, на празан стомак. Са применом лека је отпочињано на дан трансплантације, у јутарњим часовима (у 05 сати), у дневној дози од 0,2 mg/kg током прва 3 дана после интервенције. Лек је примењиван у две дневне дозе, са временским интервалом од 12 сати између доза, у 08 сати и 20 сати, под контролом медицинског особља током боравка пацијента у болници. После 3. дана, доза лека је подешавана према циљним концентрацијама у крви. За групу пацијената који су праћени од 2008. до 2014. циљне концентрације такролимуса у крви су биле 8-12 ng/ml током прва 3 месеца и 6-10 ng/ml до краја прве године после трансплантације бубрега.

Код пацијената за које је процењено да имају већи имунолошки ризик (мања ХЛА подударност, већи проценат цитотоксичних антитела код реципијента, компатибилне- али не исте крвне групе донора и реципијента, кадаверичне трансплантације), када је после трансплантације постојала одложена функција графта или акутно одбацавање које је било резистентно на примену кортикостероида, примењивана је индукциона тераја са антилимфоцитним поликлонским антителима (*ATG, Anti-Tymocyte globulin® - Rabbit, Pasteur Merieux Serums et Vaccins, France* или *ATG-Fresenius S®, Fresenius Biotech GmbH, Nemačka*), у спорој интравенској инфузији преко централне венске каниле, у дневној дози од 1,5 mg/kg током 4-10 дана или 2-5 mg/kg 3 до 5 дана, зависно од коришћеног препарата. Дозе ових лекова су подешаване према укупном броју лимфоцита у крви. Са применом индукционих биолошких препарата се отпочињало у операционој сали, пре затварања васкуларне анастомозе, уз парентералну премедикацију са кортикостероидима и препаратима калцијума. Код пацијената који су примали антилимфоцитна антитела примењивана је парентерална профилакса са

ганцикловиром (Cymevene[®], Roche Laboratories) у дози 2,5 mg/kg на дан, у трајању од 14 дана.

4.4. Терапијски мониторинг такролимуса

Као параметри терапијског мониторинга такролимуса у другом делу истраживања праћена су укупна дневна доза лека (збир јутарње и вечерње дозе), минимална концентрација лека у крви измерена 12 сати након претходне дозе (*C_{min}*), као и прерачунати однос концентрације у крви и дозе лека по килограму телесне масе. Параметри терапијског мониторинга такролимуса су, као што је речено, анализирани 3. и 7. дана, 1., 3., 6. и 12. месеца после трансплантације. Концентрације такролимуса у крви су мерене у узорцима пуне крви применом хемилуминесцентног микрочестичног имуноесеја (енг. *Chemiluminescent microparticle immunoassay- CMIA*) (ARCHITECT i1000SR Abbott Laboratories; Abbott Park, Illinois, USA). Мерења су вршена у Институту за медицинска истраживања, Војномедицинске академије. Ова метода за одређивање концентрације такролимуса у крви користи магнетне микрочестице обложене специфичним анти-такролимус-антителом. Такролимус из узорка (антиген) и такролимус коњугован са хемилуминесцентним обележивачем “надмећу се” за места на магнетним микрочестицама. Обележивач побуђен хемијском енергијом емитије светлост. Количина емитоване светлости изражава се релативним светлосним јединицама и обрнуто је пропорционална количини антигена из узорка (чију концентрацију одређујемо).

Пуна крв за одређивање концентрације такролимуса у крви узимана је пре јутарње дозе лека, у 08 сати ± 15 минута. Прво мерење концентрације такролимуса у крви је рађено 3. дана од трансплантације, потом сваког 2. или 3. дана током прве две недеље, а касније при свакој редовној и ванредној амбулантној контроли. Контролни прегледи су обављани два пута недељно до краја трећег месеца; два пута месечно до краја шестог месеца и једном месечно до краја прве године после трансплантације. Подаци о концентрацијама такролимуса добијени на овај начин су коришћени за први део истраживања- скрининг студију.

Такође, код испитиваних пацијената у другом делу истраживања је израчунаван коефицијент варијабилности такролимуса из концентрације у крви и примењене дневне дозе лека, и то из најмање 3, а највише 5 узорака (мерења). За израчунавање коефицијента варијабилности и унос података коришћена је оригинална и слободно

доступна апликација намењена за персоналне рачунаре и мобилне уређаје, дизајнирана од стране произвођача лека (132).

4.5. Генотипизација за изоформе ензима CYP3A5 A6986G и CYP3A4 A392G и транспортера П-гликопротеина ABCB1 C3435T

Код 110 пацијената је урађена генотипизација изоформи ензима цитохром-оксидазе CYP3A5 6986 A>G и CYP3A4 -392 A>G, као и транспортера П-гликопротеина (ABCB1 3435 C>T). Одређен је полиморфизам појединачних нуклеотида (енг. *single nucleotide polymorphism- SNP*) за мутације за које је у ранијим студијама показано да имају најзначајну улогу за функционално стање ових ензима и транспортера и метаболизам такролимуса: CYP3A5*1/*3 (CYP3A5 A6986G), CYP3A4*1B (CYP3A4 A392G) и ABCB1 (C3435T). Генотипизација је урађена на апарату 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) помоћу есеја за алелску дискриминацију који су базирани на TaqMan[®] методологији. Периферна крв је узимана у ЕДТА епруветама и замрзавана на -40 C⁰. Из крви је издвајана ДНК помоћу Pure LinkTM Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) према инструкцијама произвођача. Урађена је генотипизација за CYP3A5 на позицији 6986A>G (*3 или *1, rs776746), за CYP3A4 на позицији -392A>G (*1 или *1B, rs2740574), као и ABCB1 на егзону 26 (3435C>T, rs1045642). Генотипизација је урађена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

4.6. Клинички параметри праћења пацијената којима је трансплантиран бубрег

На свакој амбулантној контроли, осим анамнезе и физикалног прегледа пацијента, вршено је мерење крвног притиска и пулса, као и ултразвучни и колор доплер преглед крвних судова графта

4.6.1. Параметри који су били од значаја за терапијски мониторинг такролимуса

У студији су анализирани фактори који могу да утичу на концентрацију такролимуса у крви: пол и старост пацијента, индекс телесне масе, врста индукционе

терапије, дијализни стаж пре трансплантације, непосредна функција графта, као и придружена терапија. Регистровано је време које је било потребно да се пацијент после трансплантације уведе у жељени терапијски опсег лека, као и учесталост одступања концентрације такролимуса у крви изван жељеног терапијског опсега.

Код испитиваних пацијената је од тренутка трансплантације па до краја прве године праћења примењиван је велики број различитих лекова, али су, углавном, коришћени они за које се верује да значајније не мењају концентрацију такролимуса у крви (калцијумски антагонисти дихидропиридинске групе, бета блокатори, триметоприм-сулфаметоксазол и нистатин) (31).

4.6.2. Параметри праћења епизода акутног одбацивања графта

Код испитиваних пацијената су регистроване епизоде акутног одбацивања бубрега, време протекло од трансплантације до тренутка појаве акутног одбацивања, као и концентрација такролимуса у крви у тренутку акутног одбацивања. Акутно одбацивање је дефинисано на основу патохистолошког налаза добијеног игленом биопсијом графта, смањеног мокрења (диуреза 500 ml и мање током 24 сата), присуства бола у пределу графта, фебрилности, пораста серумског креатинина за више од 30% у односу на раније вредности (у одсуству знакова за акутну нефротоксичност изазвану такролимусом), налаза активираних лимфоцита у урину (преко 10 ћелија на 10 видних поља великог увећања), као и нормализовања креатинина и повлачења описаних промена после примене лекова који се уобичајено користе за лечење акутног одбацивања графта (133). Биопсија бубрега и патохистолошка верификација епизода акутног одбацивања је рађена само у случајевима тежих форми одбацивања и/или када примена кортикостероида није дала повољан терапијски ефекат. Епизоде акутног одбацивања су лечене интравенском применом метилпреднизолона у дози од 3-5 mg/kg, 3-5 дана (зависно од тежине клиничке слике и одговора на терапију). Уколико после 5 дана није било повољног клиничког ефекта, примењиван је ATG на начин како је предходно описано. Епизоде акутног одбацивања су, на основу клиничких и биохемијских параметара, подељене на лакше и теже. Лакша одбацивања су дефинисана одсуством олигурије, порастом креатинина у крви до 50% у односу на предходну вредност, као и повољним клиничким одговором на терапију кортикостероидима. Тежа одбацивања су дефинисана олигуријом, порастом креатинина у крви за више од 50% у односу на ранију вредност, као и изостанком

повољног терапијског одговора на примењене кортикостероиде, као што је описано у нашој ранијој студији (134).

4.6.3. Параметри који се могу довести у везу са нежељеним реакцијама на такролимус

Дијагноза акутне нефротоксичности која је узрокована применом такролимуса (акутна калцинеуринска нефротоксичност) је постављана на основу наглог пораста креатинина у крви (пораст креатинина до 30% у односу на предходну вредност), одсуства елемената за акутно одбацивање, повећане концентрације такролимуса у крви, присуства других нежељених ефеката који могу бити удружени са применом лека (тремор, хипертензија, главобоља, дијареја, смањено мокрење и несаница), као и на основу побољшања функције графта и нестанка или смањења описаних симптома после редукције дозе и смањења концентрације лека у крви (135).

Дијагноза одложене функције графта је постављана када је постојала потреба за дијализама током првих 7 дана после трансплантације, и/или када је смањење креатинина у крви било мање од 10% у односу на предходни дан током 3 дана, и/или када је дневна диуреза била мања од 1000 ml/24 сата (136).

Осим поменутих, из базе података су регистровани и други нежељени ефекти који се могу повезати са применом такролимуса: тремор, пост-трансплантациони дијабетес, микроангиопатија, инфекције и други.

4.7. Лабораторијски параметри праћења пацијената којима је трансплантиран бубрег

Од биохемијских параметара праћени су: крвна слика, серумске концентрације креатинина, уреје, гликемије, холестерола, аланин аминотрансферазе, аспартат аминотрансферазе, протеина, албумина и билирубина. Концентрација креатинина у крви је одређивана методом по *Bonsens* и *Taussky* везивањем креатинина алкалним пикритом. Мерење је обављано колориметријском техником на апарату *Dade Behring* у Институту за медицинску биохемију Војномедицинске академије.

Рађена је и хемијска анализа урина (pH, специфична тежина, протеини, хемоглобин, леукоцити, глукоза, аскорбинска киселина, кетони, уробилиноген, билирубин и нитрити), анализа седимента урина, квантитативно одређивање протеина

у урину током 24 сата (биурет метода), уринокултура и цитолошки преглед урина на активирани лимфоцити (као сурогат маркер акутног одбацивања графта).

Дијагноза бактеријских, вирусних и гљивичних инфекција је постављана на основу уобичајених биохемијских, клиничких и радиолошких критеријума, као и изолацијом узрочника и/или порастом титра специфичних антитела у крви.

4.8. Статистичка обрада података

Комплетна статистичка анализа података је урађена уз помоћ статистичког компјутерског програма, *PASW Statistics*, верзија 18. Све атрибутивне варијабле су представљене у облику фреквенција појединих категорија, а статистичка значајност између појединих категорија је тестирана *Chi-square* тестом. Све континуалне варијабле су представљене у облику средње вредности $\pm$ стандардне девијације (СД). Значајност разлика ових параметара је проверавана применом *Student's t* теста за независне или зависне узроке или *Mann-Whitny* тестом односно *Wilcoxon* тестом, у зависности од нормалности расподеле. Корелациона анализа је урађена уз помоћ *Pearson's* или *Spearman's r* коефицијента корелације, а снага корелације је утврђена на основу Кохенових критеријума: јака корелација ($r > 0,5$), средње јака корелација ($r = 0,3-0,49$) и слаба корелација ($r = 0,1-0,29$). За поређење више од 2 групе примењивана је *ANOVA* тест, као и њене непараметарске алтернативе (*Kruskal-Wallis* или *Friedman* тест) у случају да нису испуњени услови за нормалност расподеле података. Такође је урађена анализа сензитивности и специфичности одређених параметара терапијског мониторинга, као и дефинисање граничне вредности (*cut-off* вредност) уз помоћ *ROC* анализе (енг. *Receiver Operating Characteristic Curve*). Све анализе су процењене на нивоу статистичке значајности од најмање $p < 0,05$. Након статистичке обраде података, резултати су представљени табеларно и графички.

4.9. Одлука Етичког одбора

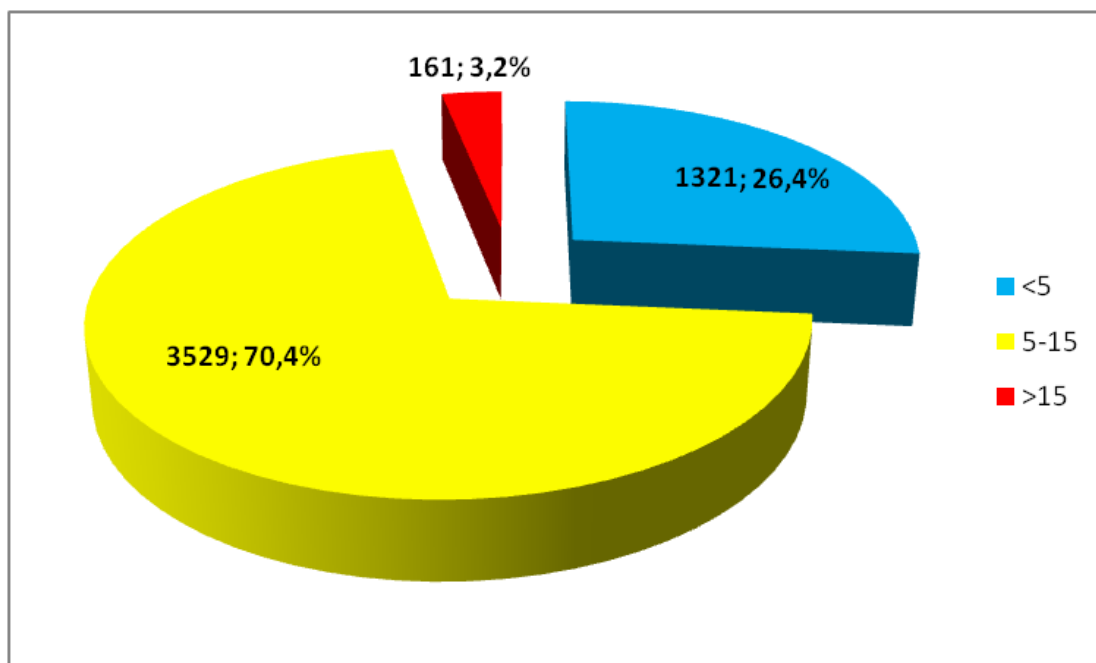
Студија је одобрена од стране Етичког одбора Војномедицинске академије (одобрење 01/31-01-13, студијски протокол 910-1).

У истраживању су испоштовани принципи Добре клиничке праксе, Хелсиншке декларације и других етичких докумената битних у процесу истраживања у која су укључени људи и приликом публикавања резултата.

5. РЕЗУЛТАТИ

У првом делу истраживања које је обухватило 208 пацијената који су после трансплантације бубрега, у склопу имуносупресивне терапије одржавања, примали такролимус најмање 3 месеца пре почетка испитивања и који су амбулантно контролисани у нашем Центру од 2006. до 2008. год., укупан број ванболничких посета трансплантираних пацијената и анализираних концентрација овог лека у крви био је 5011. Циљни опсег концентрација такролимуса у овом периоду је, према тадашњим препорукама, био од 5 до 15 ng/ml. Анализом резултата нађено је да је у 26,4% случајева (1321 мерења) концентрација била нижа од 5 ng/ml, док је у 3,2% случајева (161 мерење) концентрација лека била преко 15 ng/ml. У нешто више од две трећине измерених концентрација (70,4% или 3529 мерења) оне су биле у очекиваном опсегу од 5 до 15 ng/ml (графикон 1).

Графикон 1. Дистрибуција 5011 концентracија такролимуса у крви у односу на посматране опсеге лека (< 5, 5-15 и > 15 ng/ml)



Пошто би се у испитиваној групи проценат концентрација такролимуса која нису у терапијском опсегу вероватно приближио цифри од око 50% да је терапијски опсег лека био ужи, од 6-10 ng/ml (што се у последње време препоручује), ови налази су били повод за детаљнију анализу фактора који код испитиваних пацијената могу бити

повезани са варирањем и/или неодговарајућим концентрацијама овог лека у крви, посебно у раном периоду после трансплантације

5.1. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са трансплантираним бубрегом

У другом делу истраживања, на основу критеријума укључења и искључења, обухваћено је 110 болесника код којих је урађена трансплантација бубрега у нашем Центру у временском периоду од 2008. до 2014. године. Ови пацијенти су праћени током прве године након трансплантације.

У испитиваној групи је 70 пацијената (63,6%) било мушког, а 40 (36,4%) женског пола. Просечна старост пацијената је била 44,5 година (опсег година од 22 до 65). Просечан индекс телесне масе пацијената је био $22,77 \text{ kg/m}^2$. Антропометријске карактеристике пацијената у испитиваној групи су приказане у табели 1.

Табела 1. Антропометријске карактеристике пацијената са трансплантираним бубрегом

Параметри	Средња вредност $\pm$ СД		<i>Mann-Whitney</i> тест
	Мушкарци (n = 70)	Жене (n = 40)	
Старост (године)	43,96 $\pm$ 10,12	45,35 $\pm$ 10,80	p = 0,604
Висина (m)	1,78 $\pm$ 0,08	1,64 $\pm$ 0,08	p < 0,001
Телесна маса (kg)	73,68 $\pm$ 11,35	59,79 $\pm$ 11,58	p < 0,001
Индекс телесне масе (kg/m^2)	23,16 $\pm$ 3,03	22,09 $\pm$ 3,69	p = 0,024

Очекивано, мушкарци и жене су се значајно разликовали у односу на висину, телесну масу и индекс телесне масе, али не и према годинама старости.

Трансплантација од живог донора бубрега је урађена код 79 (71,8%) пацијената, а од кадаверичног донора код 31 (28,2%) пацијента (табела 2).

Табела 2. Врста донорских бубрега у пацијената са трансплантираним бубрегом

	Укупно	Живи давалац	Кадавер
Број (%)	110 (100)	79 (71,8)	31 (28,2)

Што се тиче старости донора, 85 (77,2%) донора бубрега је било млађе од 60 година, док је 25 (22,8%) донора било старије од 60 година.

Код пацијената у испитиваној групи најчешћи разлог настанка терминалне инсуфицијенције бубрега је био гломерулонефритис (47,3%), потом дијабетес, хипертензија и полицистична болест (табела 3). Код 20 (18,2%) пацијената узрок није био познат.

Табела 3. Узроци терминалне инсуфицијенције бубрега у пацијената са трансплантираним бубрегом

Дијагноза	Број	%
Гломерулонефритис	52	47,3
Непозната	20	18,2
Дијабетес	12	10,9
Хипертензија	7	6,4
Полицистична болест	7	6,4
Везикоуретерални рефлукс	4	3,6
Ниска стеноза уретре	2	1,8
Пијелонефритис	1	0,9
Ендемска нефропатија	1	0,9
Трауматског порекла	1	0,9
<i>Syogren</i> -ов синдром	1	0,9
Уронефролитијаза	1	0,9
Уретерохидронефроза	1	0,9
Укупно	110	100

У посматраној групи је код 58 пацијената (52,7%) примењена индукциона терапија. У табели 4 је приказана дистрибуција пацијената у односу на примењену индукциону терапију.

Табела 4. Дистрибуција пацијената у односу на примењену индукциону терапију

	Индукциона терапија		Укупно
	Да	Не	
Број (%)	58 (52,7)	52 (47,3)	110 (100)

Пре трансплантације 99 (90%) пацијената је било подвргнуто некој од дијализних метода лечења (хемодијализа или перитонеумска дијализа). Просечано време проведено на дијализи пре трансплантације износило је 41,7 месеци (распон месеци од 1 до 252). Код 11 пацијената (10%) трансплантација је урађена пре отпочињања хроничног програма дијализе.

5.2. Функција графта после трансплантације

Током првих 15 дана после трансплантације, 75 (68,2%) пацијената је имало добру непосредну функцију графта, док је 35 (31,8%) пацијената имало одложену функцију. Просечно време нормализације креатинина за све пацијенте је било 9,7 дана; код пацијената са добром непосредном функцијом 5,5 дана, а код пацијената са одложеном функцијом графта 18,8 дана. Просечна концентрација креатинина у крви после 15 дана у испитиваној групи је била 133,1 $\mu\text{mol/l}$; код пацијената са добром непосредном функцијом креатинин у крви је био 115,4 $\mu\text{mol/l}$, а код пацијената са одложеном функцијом 170,5 $\mu\text{mol/l}$. У табели 5 су приказане просечне концентрације серумског креатинина и време нормализације креатинина после трансплантације бубрега код пацијената са непосредном и одложеном функцијом графта.

Табела 5. Просечне концентрације серумског креатинина и време нормализације креатинина код пацијената са трансплантираним бубрегом у односу на брзину успостављања функције графта у раној фази после трансплантације

Креатинин (μmol/l)	Средња вредност ± СД		Mann-Whitney тест	Укупно
	Рана функција графта			
	Добра (75; 68,2%)	Одложена (35; 31,8%)		
Нормализација (данима)	5,51 ± 4,59	18,79 ± 9,35	p < 0,001	9,72 ± 8,95
Најнижа вредност	115,46 ± 27,75	170,50 ± 47,28	p < 0,001	133,11 ± 43,47

Код пацијената код којих је за статистички значајно краће време успостављена функција графта након трансплантације и вредности креатинина су биле значајно ниже.

Годину дана после трансплантације код пацијената код којих је непосредно успостављена функција графта концентрација креатинина у крви била је 117,65 $\mu\text{mol/l}$, а код пацијената са одложеном функцијом 148,09 $\mu\text{mol/l}$. Клиренс креатинина у истом периоду након трансплантације је код пацијената са добром непосредном функцијом графта био 71,7 ml/мин, а код пацијената са одложеном функцијом 63,7 ml/мин. У табели 6 су приказане просечне вредности клиренса креатинина, креатинина у серуму и протеинурије годину дана после трансплантације бубрега у пацијената са добром непосредном и одложеном функциом графта.

Табела 6. Просечне вредности клиренса креатинина, креатинина у серуму и протеинурије годину дана после трансплантације бубрега код пацијената у зависности од непосредне функцију графта након операције

	Непосредна функција графта		<i>Mann-Whitney</i> тест
	Добра	Одложена	
Клиренс креатинина (ml/мин)	71,71 $\pm$ 19,49	63,70 $\pm$ 20,33	p = 0,084
Креатинин ($\mu\text{mol/l}$)	117,65 $\pm$ 30,45	148,09 $\pm$ 42,58	p < 0,001
Протеинурија (g/24h)	0,23 $\pm$ 0,29	0,28 $\pm$ 0,32	p = 0,290

Може се видети да су годину дана од трансплантације бубрега вредности клиренса креатинина, као и креатинин у серуму, били значајно нижи код пацијената са непосредно добром функцијом графта. Вредности протеинурије се нису разликовале између ове две групе.

У табели 7 је приказана учесталост акутног одбацивања графта у зависности од његове непосредне функције. Није било разлике у учесталости епизода одбацивања у односу на то да ли је графт почео да функционише добро одмах после операције или је до успостављања функције графта дошло одложено.

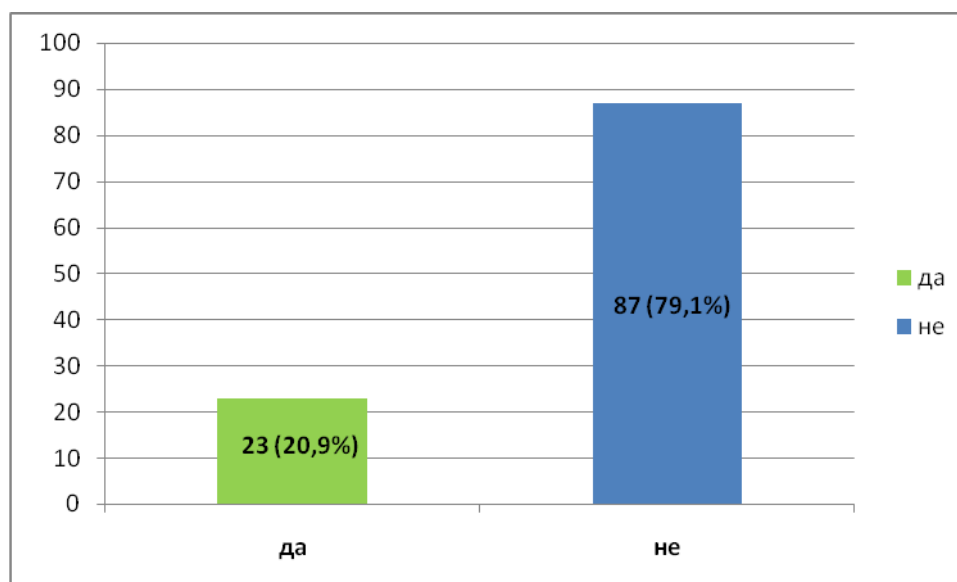
Табела 7. Учесталост акутног одбацивања графта у зависности од брзине успостављања његове функције

Акутно одбацивање графта; Број пацијената (%)	Непосредна функција графта		<i>Chi-square</i> тест
	Добра	Одложена	
Да	61 (70,1%)	26 (68,2%)	p = 0,552
Не	14 (29,9%)	9 (31,8%)	

Током прве године после трансплантације регистроване су 23 епизоде акутног одбацивања бубрега код 23 пацијената (20,9%). Није било понављаних епизода одбацивања код истог пацијента. У 18 епизода (78,3%) се радило о лакшем облику, а у 5 епизода (21,7%) о тежем облику одбацивања. Рано акутно одбацивање је регистровано код 21 (91,3%) пацијента, а касно код 2 (8,7%) пацијента. Просечна концентрација такролимуса у крви у тренутку одбацивања је била 9,00 ng/ml (опсег од 3,3-19,2 ng/ml).

На графикону 2 је приказана учесталост акутног одбацивања бубрега у посматраној групи наших пацијената.

Графикон 2. Учесталост акутног одбацивања бубрега у посматраној групи пацијената



5.3. Биохемијски параметри пацијената у различитим периодима после трансплантације

У табели 8 су приказани поједини биохемијски параметри који су праћени код испитиваних пацијената током ране фазе после трансплантације, док се у табели 9 могу видети исти параметри, али праћени у периоду од првог месеца, па до краја прве године после хируршке интервенције.

Табела 8. Просечне вредности појединих биохемијских параметара код пацијената током првих 7 дана после трансплантације бубрега

Параметри (после трансплантације)	Средња вредност $\pm$ СД		<i>t</i> тест за зависне узорке
	3. дан	7. дан	
Хематокрит (%)	0,29 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,04	$p < 0,001$
Креатинин ($\mu\text{mol/l}$)	242,31 $\pm$ 184,40	190,55 $\pm$ 145,46	$p < 0,001$
Протеинурија (g/24h)	1,85 $\pm$ 1,88	1,21 $\pm$ 1,02	$p < 0,001$
Гликемија (mmol/l)	10,92 $\pm$ 41,20	6,54 $\pm$ 3,93	$p = 0,285$
Холестерол (mmol/l)	4,12 $\pm$ 0,60	4,22 $\pm$ 1,00	$p = 0,918$
Триглицериди (mmol/l)	1,72 $\pm$ 0,53	2,30 $\pm$ 1,08	$p = 0,128$
АЛТ (U/l)	28,75 $\pm$ 12,98	47,85 $\pm$ 43,98	$p < 0,001$
АСТ (U/l)	24,75 $\pm$ 10,81	24,66 $\pm$ 17,15	$p = 0,803$
Укупни протеини (g/l)	55,04 $\pm$ 8,16	56,92 $\pm$ 7,21	$p = 0,099$

Из табеле 8 се може видети да су просечне вредности хематокрита и ензима аланин аминотрансферазе у крви били статистички значајно мањи 3. дана након трансплантације у односу на 7. дан, док су вредности креатинина у крви и протеинурије били значајно већи.

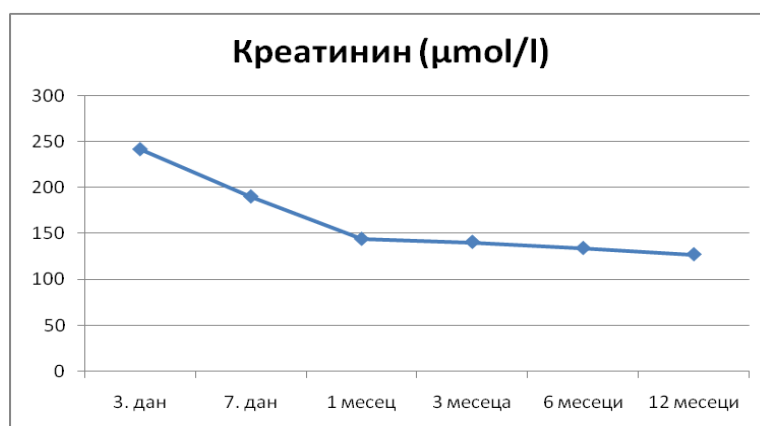
Коришћењем теста анализе варијансе за поновљена мерења показано је да вредности хематокрита код испитиваних пацијената значајно расту током целе прве године након трансплантације, док вредности креатинина у крви и протеина у урину значајно падају у истом периоду. Иако су се вредности гликемије константно смањивале током прве године после трансплантације, ове разлике нису достигле ниво статистичке значајности (табела 9).

На графикону 3 су приказане просечне концентрације креатинина у крви, а у табели 10 просечне вредности клиренса креатинина у испитиваној групи током првих годину дана после трансплантације. Уочава се да концентрација креатинина у крви константно пада, као и да вредности клиренса креатинина значајно расту током једногодишњег периода праћења.

Табела 9. Просечне вредности појединих биохемијских параметара код пацијената током прве године после трансплантације

Параметри након трансплантације	Средња вредност $\pm$ СД				АНОВА за поновљена мерења
	1 месец	3 месеца	6 месеци	12 месеци	
Хематокрит (%)	0,36 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,06	p < 0,001
Креатинин ($\mu\text{mol/l}$)	144,08 $\pm$ 55,12	140,77 $\pm$ 46,75	134,02 $\pm$ 38,97	127,15 $\pm$ 37,28	p < 0,001
Протеинурија (g/24h)	0,37 $\pm$ 0,37	0,33 $\pm$ 0,37	0,24 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,30	p = 0,019
Гликемија (mmol/l)	5,49 $\pm$ 2,43	5,33 $\pm$ 2,45	5,16 $\pm$ 2,09	4,98 $\pm$ 1,77	p = 0,089

Графикон 3. Просечне концентрације креатинина у крви током првих годину дана после трансплантације

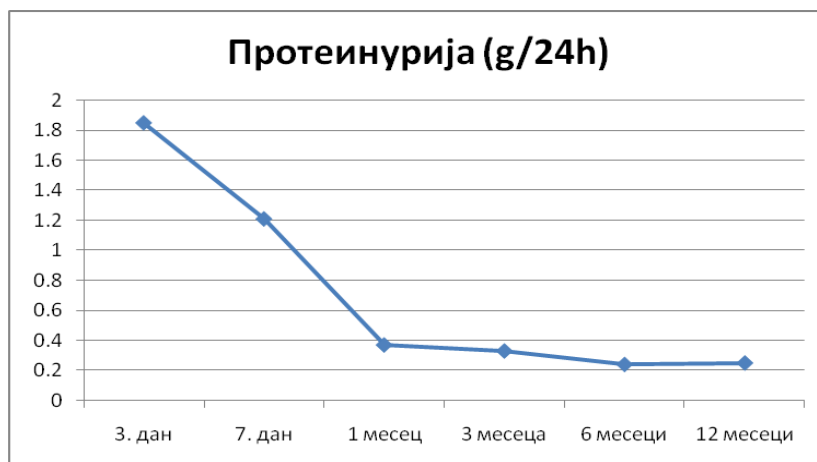


Табела 10. Просечне вредности клиренса креатинина током првих годину дана после трансплантације

Клиренс креатинина (ml/мин); Средња вредност $\pm$ СД				АНОВА за поновљена мерења
1. месец	3. месец	6. месец	12. месец	
57,09 $\pm$ 17,23	57,98 $\pm$ 17,61	63,76 $\pm$ 17,74	69,26 $\pm$ 20,00	p < 0,001

На графикону 4 су приказане просечне вредности протеинурије код испитиваних пацијената током првих 12 месеци после трансплантације. Као што је већ поменуто, код ових пацијената вредности протеинурије се значајно смањују током целог једногодишњег периода праћења (табела 9, графикон 4).

Графикон 4. Просечне вредности протеинурије у групи испитиваних пацијената током прве године после трансплантације



5.4. Терапијски мониторинг такролимуса

Трећег дана после трансплантације, просечна дневна доза такролимуса је била 9,64 mg; просечна концентрација такролимуса у крви 11,09 ng/ml, а однос концентрације и дозе 98,02 ml/mg/kg. Седмог дана после трансплантације, просечна дневна доза такролимуса била је 11,49 mg; просечна концентрација такролимуса у крви 10,29 ng/ml, а однос концентрације и дозе 66,40 ml/mg/kg. У табели 11 су приказане вредности параметара терапијског мониторинга такролимуса 3. и 7. дана, а у табели 12 после 1., 3., 6. и 12. месеца после трансплантације.

У табели 11 се може запазити да је укупна дневна доза такролимуса којом су пацијенти третирали 7. дана након трансплантације била значајно већа у односу на примењену дозу лека 3. дана, али је однос концентрације и дозе лека био значајно мањи 7. дана у односу на 3. дан.

Врло интересантни резултати су добијени праћењем параметара терапијског мониторинга такролимуса у току прве године након трансплантације. Наиме, значајно смањење дозе примењеног лека је било праћено и падом његове концентрације у крви, али и значајним порастом односа концентрације и дозе лека (табела 12).

Табела 11. Просечне вредности параметара терапијског мониторинга такролимуса 3. и 7. дана после трансплантације бубрега

Параметри мониторинга такролимуса	Средња вредност $\pm$ СД		<i>t</i> тест за зависне узорке
	3. дан	7. дан	
Укупна дневна доза (mg)	9,64 $\pm$ 5,31	11,49 $\pm$ 5,37	$p < 0,001$
Концентрација лека у крви (ng/ml)	11,09 $\pm$ 7,45	10,29 $\pm$ 5,57	$p = 0,185$
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	98,02 $\pm$ 166,66	66,40 $\pm$ 50,88	$p = 0,049$

Табела 12. Просечне вредности параметара терапијског мониторинга такролимуса од првог месеца до прве године после трансплантације бубрега

	Средња вредност $\pm$ СД				АНОВА за поновљена мерења
	1 месец	3 месеца	6 месеци	12 месеци	
Укупна дневна доза (mg)	8,97 $\pm$ 5,61	5,66 $\pm$ 3,46	4,69 $\pm$ 3,02	3,79 $\pm$ 2,14	$p < 0,001$
Концентрација лека у крви (ng/ml)	11,03 $\pm$ 5,53	7,67 $\pm$ 2,68	6,79 $\pm$ 2,25	5,99 $\pm$ 1,81	$p < 0,001$
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	100,30 $\pm$ 74,67	116,33 $\pm$ 85,42	118,78 $\pm$ 96,09	126,06 $\pm$ 103,72	$p = 0,003$

5. 5. Нежељени ефекти такролимуса у посматраној групи пацијената

У табели 13 је приказана учесталост нежељених реакције на такролимус у посматраној групи пацијената, у периоду праћења од годину дана после трансплантације.

У табели 14 су приказане просечне вредности гликемије у групи пацијената који су развили пост-трансплантациони дијабетес у односу на просечне вредности гликемије код пацијената без пост-трансплантационог дијабетеса. Види се, очекивано, да су од 7. дана након трансплантације, па надаље, вредности гликемије биле значајно веће код пацијената код којих се развио пост-трансплантациони дијабетес.

Табела 13. Нежељене реакције на такролимус у пацијената са трансплантираним бубрегом током годину дана после трансплантације

Нежељена реакција	Број пацијената (%)
Тремор	25 (22,7)
Рана нефротоксичност	14 (12,7)
Посттрансплантациони дијабетес	9 (8,2)
Дубока венска тромбоза	2
Полицитемија	3
Погоршање микроангиопатије	2
Опадање косе	1
Хемолитичко-уремички синдром	3

Табела 14. Просечне вредности гликемије код пацијената са пост-трансплантационим дијабетесом и код пацијената који нису развили дијабетес у испитиваној групи

Гликемија (mmol/l)	Посттрансплантациони дијабетес		Mann-Whitney тест
	Не	Да	
3. дан	6,79 ± 2,77	7,74 ± 4,04	p = 0,648
7. дан	6,32 ± 3,80	8,91 ± 4,70	p = 0,005
1 месец	5,27 ± 2,13	7,90 ± 3,98	p = 0,008
3 месеца	5,19 ± 2,30	7,00 ± 3,72	p = 0,054
6 месеци	5,00 ± 1,98	7,36 ± 2,59	p = 0,001
12 месеци	4,80 ± 1,38	7,23 ± 3,89	p = 0,006

5.6. Фармакогеномска анализа

5.6.1. Дистрибуција *CYP3A5* A6986G, *CYP3A4* A392G и *ABCB1* C3435T генских полиморфизама код болесника којима је трансплантиран бубрег

Испитивање дистрибуције генотипова и алела генских полиморфизама *CYP3A5* A6986G, *CYP3A4* A392G и *ABCB1* C3435T спроведено је код свих пацијената са трансплантираним бубрегом који су укључени у испитивање. Резултати генотипизације су показали да генотипови и алели испитиваних полиморфизама у популацији пацијената нису одступали од *Hardy-Weibergove* равнотеже ($p > 0,05$).

Учесталост генотипова и алела испитиваних полиморфизама *CYP3A5* A6986G, *CYP3A4* A392G и *ABCB1* C3435T гена у популацији пацијената приказани су у табелама 15-19 и на графикону 5.

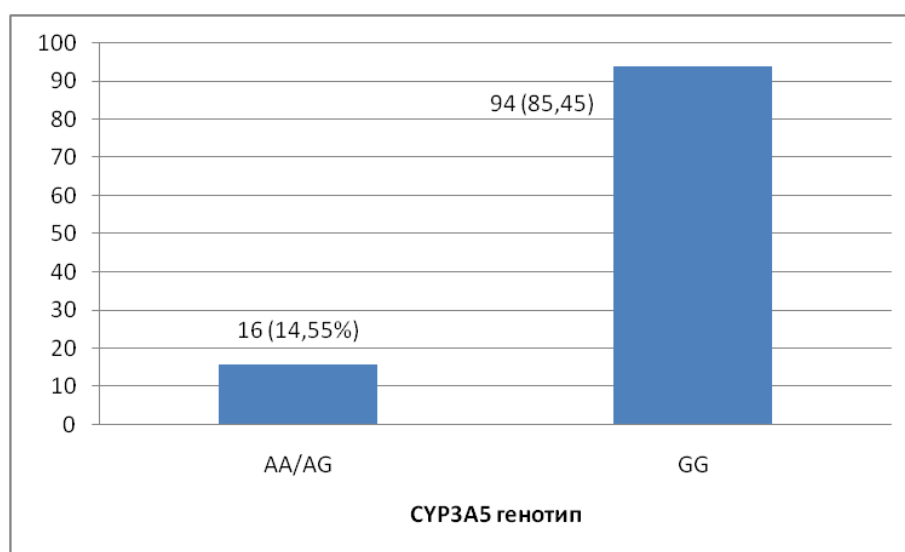
У посматраној групи, 94 пацијента (85,5%) су били носиоци *CYP3A5**3*3 (GG) изоформе алела, док су 16 пацијената (14,5%) били носиоци AA и AG алела за *CYP3A5* ензим. У посматраној групи су 102 пацијента (92,7%) били носиоци *CYP3A4**1*1 (AA) изоформе алела, а 8 пацијената (7,3%) AG и GG алела за *CYP3A4* ензим. Код испитиваних пацијената је постојала релативно уједначена дистрибуција све три алелске варијанте гена за П-гликопротеин (табела 15).

Табела 15. Дистрибуција полиморфизама генских локуса за *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеин код трансплантираних пацијената

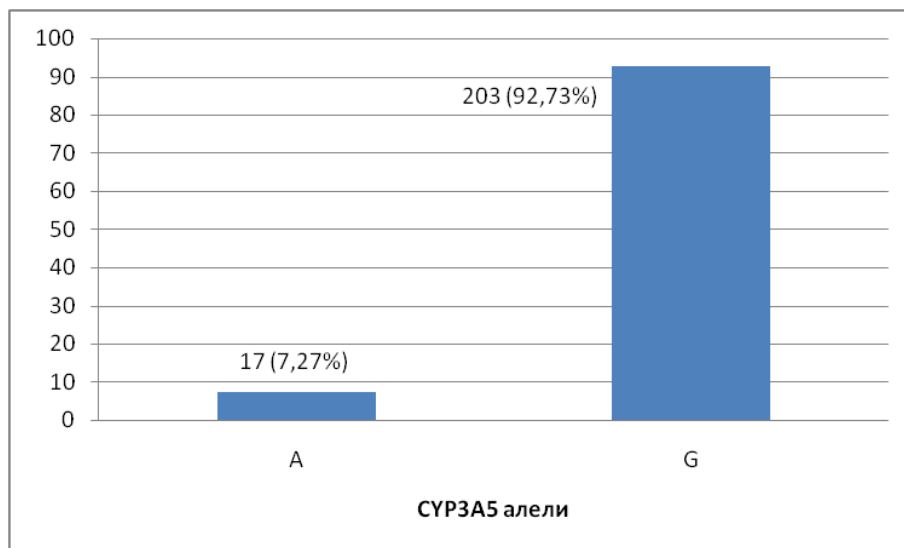
	% (број пацијената)		
<i>CYP3A5</i> 6986 A>G	AA 0,9% (1)	AG 13,6% (15)	GG 85,5% (94)
<i>CYP3A4</i> -392 A>G	AA 92,7% (102)	AG 6,4% (7)	GG 0,9% (1)
<i>ABCB1</i> 3435 C>T	CC 36,4% (40)	CT 38,2% (42)	TT 25,5% (28)

На графиконима 5а-ф је приказана учесталост *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеин алела код болесника са трансплантираним бубрегом.

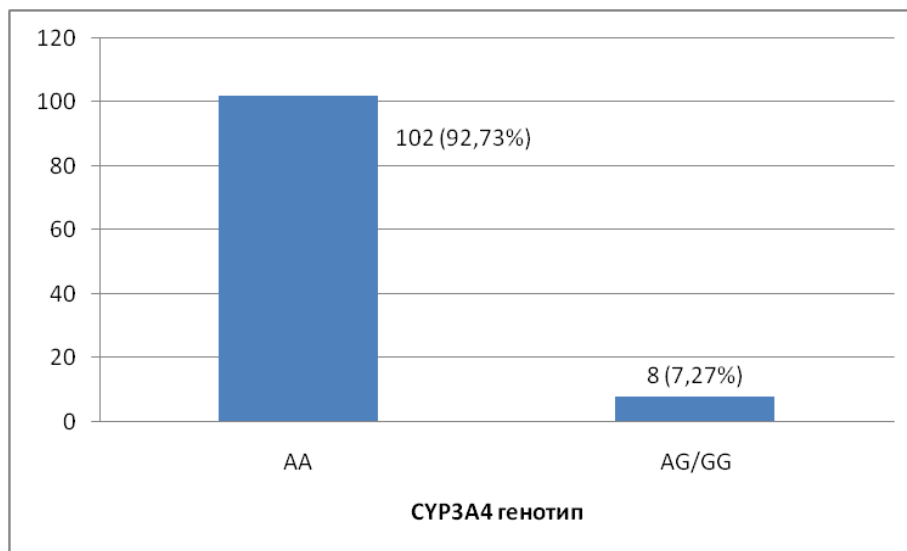
Графикон 5а. Учесталост *CYP3A5* генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом



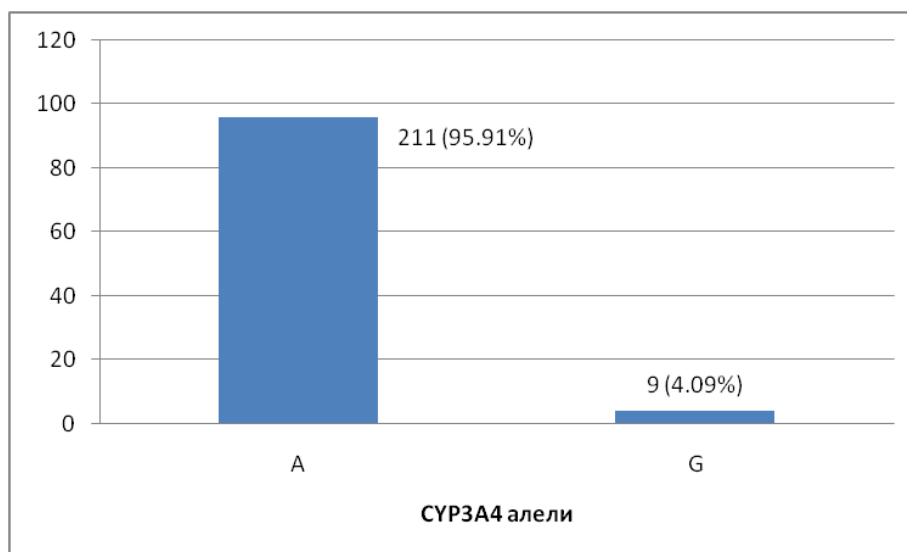
Графикон 5б. Учесталост *CYP3A5* алела код болесника са трансплантираним бубрегом



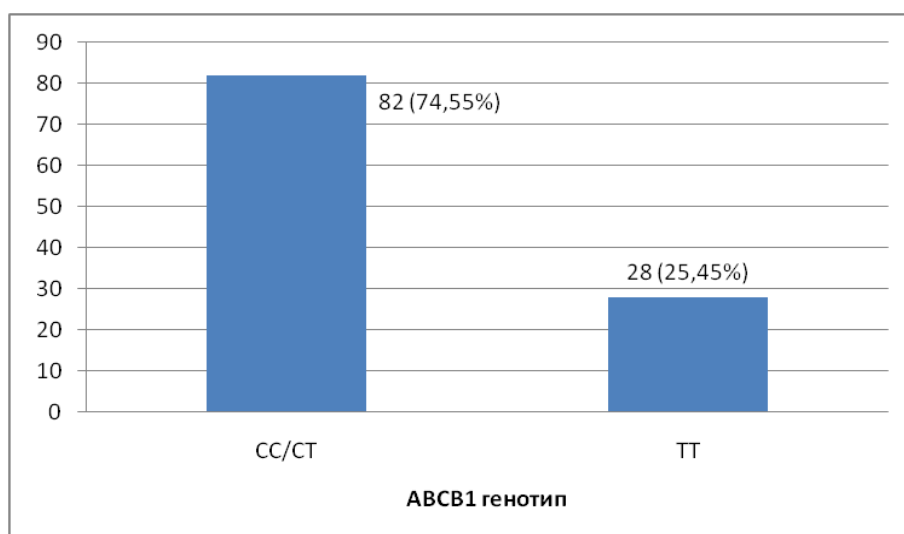
Графикон 5ц. Учесталост *CYP3A4* генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом



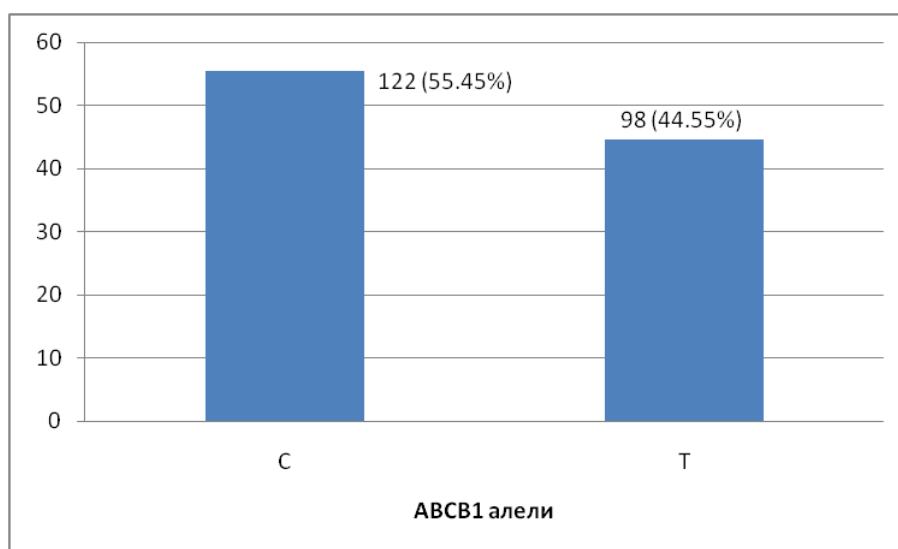
Графикон 5д. Учесталост *CYP3A4* алела код болесника са трансплантираним бубрегом



Графикон 5е. Учесталост *ABCB1* генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом



Графикон 5ф. Учесталост ABCB1 алела код болесника са трансплантираним бубрегом



У табели 16 се може видети да је у испитиваној групи далеко највише (81,82%) било пацијената који су истовремено носиоци *CYP3A5 GG* и *CYP3A4 AA* изоформи алела.

Табела 16. Учесталост *CYP3A5* и *CYP3A4* генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом

Број (%)		<i>CYP3A4 AA</i>	<i>CYP3A4 AG/GG</i>	<i>Chi-square</i> тест
<i>CYP3A5</i>	<i>AA/AG</i>	12 (10,90)	4 (3,64)	p = 0,015
	<i>GG</i>	90 (81,82)	4 (3,64)	

Што се тиче *CYP3A5* и П-гликопротеин генотипова, највише је било заступљено пацијената који су имали истовремено присутне *CYP3A5 GG* и *ABCB1 CC/CT* изоформе алела (64,55%), а најмање оних (4,55%) са комбинацијом *CYP3A5 AA/AG* и *ABCB1 TT* изоформи алела (табела 17).

Табела 17. Учесталост *CYP3A5* и П-гликопротеин генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом

Број (%)		<i>ABCB1 CC/CT</i>	<i>ABCB1 TT</i>	<i>Chi-square</i> тест
<i>CYP3A5</i>	<i>AA/AG</i>	11 (10,00)	5 (4,55)	p = 0,791
	<i>GG</i>	71 (64,55)	23 (20,90)	

Када се посматра учесталост комбинације *CYP3A4* и П-гликопротеин генотипова, запажа се да су најчешће присутни пацијенти који су носиоци и *CYP3A4 AA* и *ABCB1 CC/CT* изоформи алела (69,09%), док је најмање било оних са комбинацијом *CYP3A4 AG/GG* и *ABCB1 TT* (1,82%).

Табела 18. Учесталост *CYP3A4* и П-гликопротеин генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом

Број (%)		<i>ABCB1 CC/CT</i>	<i>ABCB1 TT</i>	<i>Chi-square</i> тест
<i>CYP3A4</i>	<i>AA</i>	76 (69,09)	26 (23,64)	p = 1,000
	<i>AG/GG</i>	6 (5,45)	2 (1,82)	

На крају, комбинацијом сва три посматрана генотипа код испитиваних пацијената може се закључити да је највише било оних са *CYP3A5 GG*, *CYP3A4 AA* и *ABCB1 CC/CT* изоформама алела (60,91%). Свега 1,82% пацијената су били носиоци *CYP3A5 AA/AG*, *CYP3A4 AG/GG* и *ABCB1 TT* изоформи алела (табела 19).

Табела 19. Учесталост *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеин генотипова код болесника са трансплантираним бубрегом

		<i>CYP3A4 AA</i>		<i>CYP3A4 AG/GG</i>		<i>Chi-square</i> тест
Број (%)		<i>ABCB1 CC/CT</i>	<i>ABCB1 TT</i>	<i>ABCB1 CC/CT</i>	<i>ABCB1 TT</i>	
<i>CYP3A5</i>	<i>AA/AG</i>	9 (8,18)	3 (2,73)	2 (1,82)	2 (1,82)	p = 0,0028
	<i>GG</i>	67 (60,91)	23 (20,90)	4 (3,64)	-	

5.6.2. Испитивање утицаја проучаваних генских полиморфизама на параметре терапијског мониторинга такролимуса

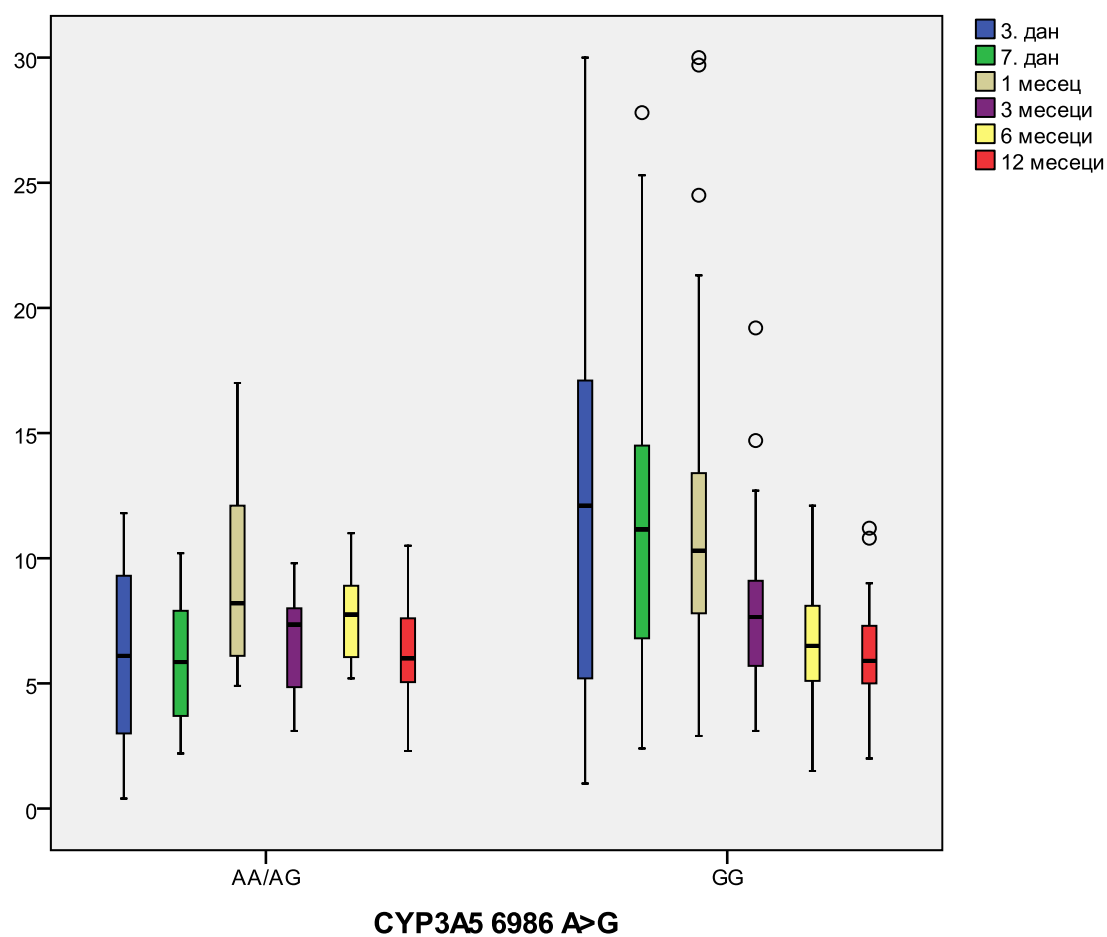
Испитиван је утицај генског полиморфизма *CYP3A5* ензима у посматраним временским периодима на параметре терапијског мониторинга такролимуса: на укупну дневну дозу лека, просечну концентрацију лека у крви, као и на однос концентрације и дозе лека у крви. Добијени резултати су приказани у табели 20 и графиконима 6-8. Може се запазити да су 3. и 7. дана концентрација лека у крви и однос концентрације и дозе значајно већи код пацијената који су носиоци *GG* генотипа у односу на носиоце

најмање једног *A* алела (*AA* или *AG* генотипа). После тога, до краја прве године од трансплантације, пацијенти који су били носиоци *GG* генотипа су добијали значајно мању дозу такролимуса и имали су значајно већи израчунат однос концентрације и дозе лека, док није било разлике у концентрацијама лека у крви у односу на носиоце *AA* и *AG* генотипа.

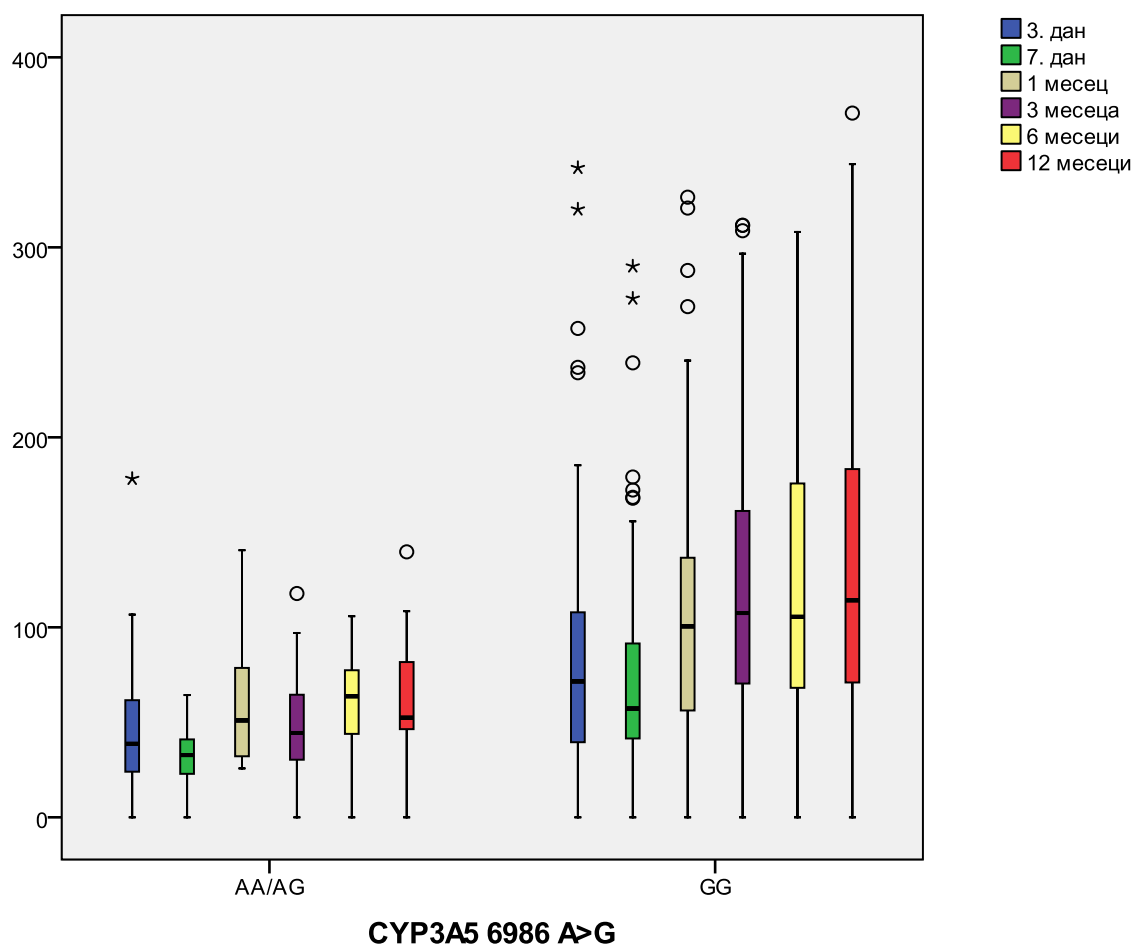
Табела 20. Дистрибуција параметара терапијског мониторинга такролимуса у односу на полиморфизам *CYP3A5* ензима

Параметри мониторинга такролимуса	CYP3A5 6986 A>G		Mann-Whitney тест
	AA/AG	GG	
3. дан			
Укупна дневна доза (mg)	8,50 ± 5,02	9,82 ± 5,36	p = 0,411
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,22 ± 3,49	11,93 ± 7,64	p = 0,006
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	50,17 ± 44,44	106,17 ± 178,25	p = 0,024
7. дан			
Укупна дневна доза (mg)	12,46 ± 5,57	11,34 ± 5,35	p = 0,455
Ниво лека у крви (ng/ml)	5,89 ± 2,60	10,97 ± 5,60	p < 0,001
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	31,27 ± 17,77	72,38 ± 52,30	p < 0,001
1 месец			
Укупна дневна доза (mg)	12,91 ± 5,75	8,26 ± 5,32	p = 0,002
Ниво лека у крви (ng/ml)	9,22 ± 3,79	11,37 ± 5,75	p = 0,198
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	57,87 ± 30,31	107,53 ± 77,62	p = 0,003
3 месеца			
Укупна дневна доза (mg)	10,03 ± 4,54	4,94 ± 2,66	p < 0,001
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,68 ± 2,19	7,83 ± 2,73	p = 0,233
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	48,04 ± 30,91	127,95 ± 86,36	p < 0,001
6 месеци			
Укупна дневна доза (mg)	9,07 ± 4,08	4,00 ± 2,13	p < 0,001
Ниво лека у крви (ng/ml)	7,86 ± 2,01	6,62 ± 2,25	p = 0,051
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	58,78 ± 29,93	128,99 ± 99,76	p = 0,001
12 месеци			
Укупна дневна доза (mg)	7,13 ± 2,36	3,24 ± 1,50	p < 0,001
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,42 ± 2,13	5,92 ± 1,75	p = 0,450
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	63,81 ± 32,01	136,66 ± 107,99	p = 0,001

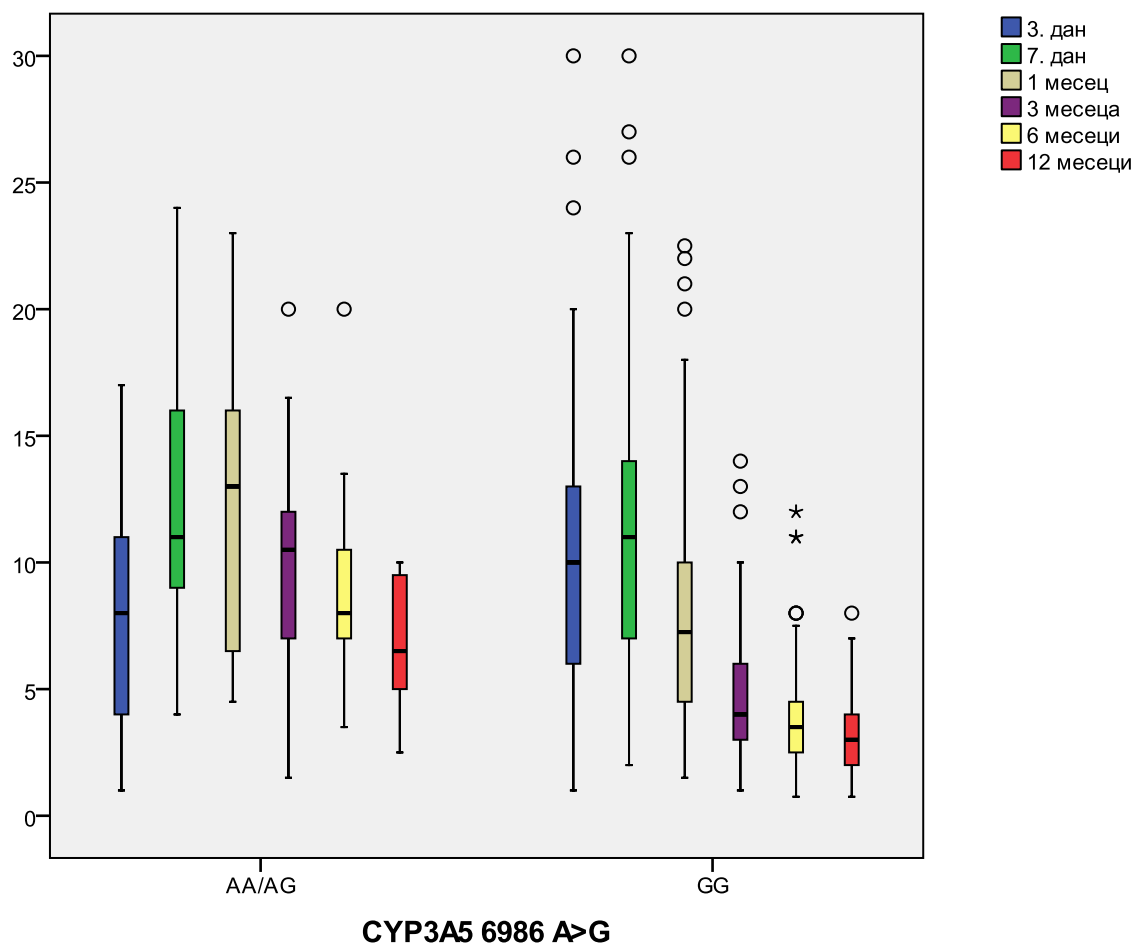
Графикон 6. Дистрибуција концентрација такролимуса у крви (ng/ml) код пацијената у изабраним временским периодима након трансплантације у односу на полиморфизам *CYP3A5* ензима



Графикон 7. Дистрибуција укупне примењене дневне дозе такролимуса (mg) у пацијената у изабраним временским периодима након трансплантације у односу на полиморфизам *CYP3A5* ензима



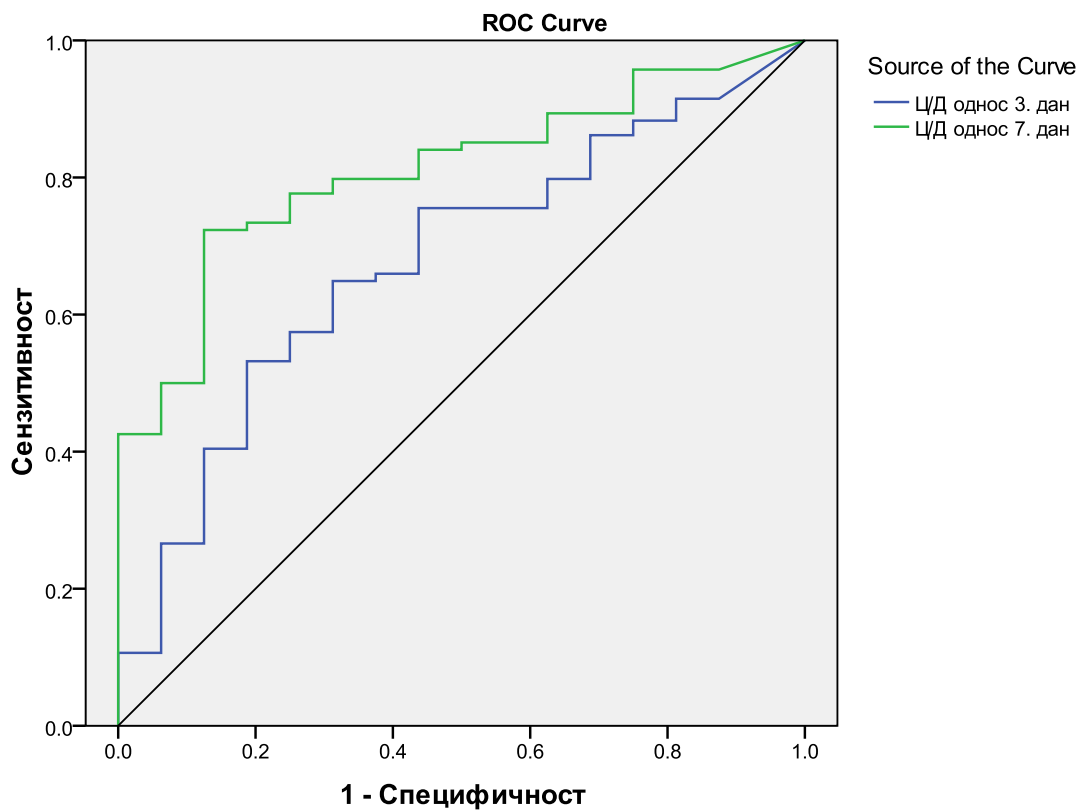
Графикон 8. Дистрибуција односа концентрације и дозе такролимуса (ng/ml/mg/kg) у пацијената у изабраним временским периодима након трансплантације у односу на полиморфизам *CYP3A5* ензима



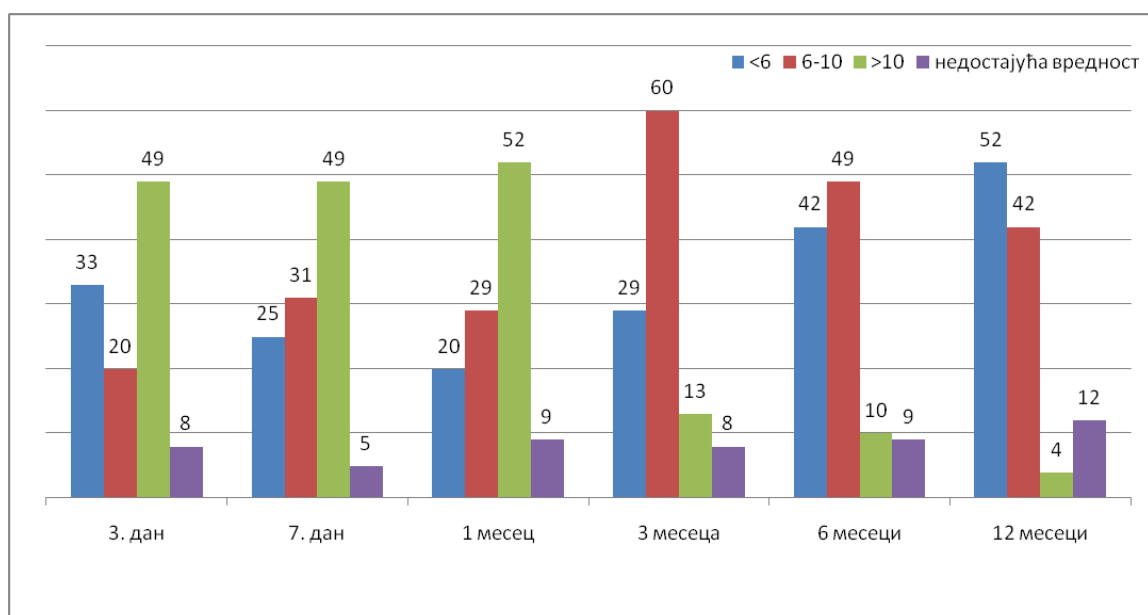
Када је урађена *ROC* анализа за израчунавање сензитивности и специфичности тестова (графикон 9), показано је да је однос концентрације и дозе лека 7. дана након трансплантације добар индиректан показатељ генског полиморфизма *CYP3A5* ензима. Може се видети да су 72,3% пацијената који су имали однос концентрације и дозе такролимуса већи од 43,97 били су неекспресори за *CYP3A5* ензим. Иако је сензитивност теста велика (72,3%), на основу специфичности се види да ће и 12,5% пацијената који су експресори за *CYP3A5* такође имати виши однос концентрација/доза лека од ове граничне вредности (43,97%).

На графикону 10 је приказана дистрибуција пацијената у односу на концентрацију такролимуса у крви у изабраним временским периодима после трансплантације.

Графикон 9. Однос сензитивности и специфичности односа концентрације и дозе такролимуса 3. и 7. дана након његове примене у трансплантираних пацијената



Графикон 10. Дистрибуција пацијената (у апсолутним бројевима) у односу на концентрацију такролимуса у крви у изабраним временским периодима после трансплантације бубрега



У табели 21 је приказан утицај *CYP3A5* 6986 A>G генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви код посматраних пацијената, у односу на жељену концентрацију лека у току годину дана од трансплантације бубрега.

Може се запазити да се 7. дана од операције концентрације лека значајно разликују код пацијената носиоца *GG* генотипа, у односу на носиоца најмање једног *A* алела (*AA* или *AG* генотипа). Трећег дана је та разлика на граници статистичке значајности, али у сваком случају, у оба термина, око 50% носиоца *AA* или *AG* генотипа је имало концентрацију такролимуса мању од 6 ng/ml, а нешто више од 50% пацијената који су носиоца *GG* генотипа су имали концентрацију лека већу од 10 ng/ml.

Табела 21. Утицај *CYP3A5* 6986 A>G генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви у групи посматраних пацијената после трансплантације бубрега у односу на жељену концентрацију лека

Број пацијената (%)	Ниво лека у крви (ng/ml)	<i>CYP3A5</i> 6986 A>G		<i>Chi-square</i> тест
		<i>AA/AG</i>	<i>GG</i>	
3. дан	<6	8 (53,3)	25 (28,7)	p = 0,057
	6-10	4 (26,7)	16 (18,4)	
	>10	3 (20,0)	46 (52,9)	
7. дан	<6	7 (50,0)	18 (19,8)	p = 0,004
	6-10	6 (42,9)	25 (27,5)	
	>10	1 (7,1)	48 (52,7)	
1 месец	<6	4 (25,0)	16 (18,8)	p = 0,195
	6-10	7 (43,8)	22 (25,9)	
	>10	5 (31,3)	47 (55,3)	
3 месеца	<6	5 (35,7)	24 (27,5)	p = 0,293
	6-10	9 (64,3)	51 (58,0)	
	>10	-	13 (14,8)	
6 месеци	<6	4 (28,6)	38 (43,7)	p = 0,240
	6-10	7 (50,0)	42 (48,3)	
	>10	3 (21,4)	7 (8,0)	
12 месеци	<6	7 (46,7)	45 (54,2)	p = 0,143
	6-10	6 (40,0)	36 (43,4)	
	>10	2 (13,3)	2 (2,4)	

Дистрибуција параметара терапијског мониторинга у односу на полиморфизам *CYP3A4* ензима у посматраним временским интервалима је приказана у табели 22. Запажа се да није било статистички значајних разлика у параметрима терапијског мониторинга такролимуса између носиоца *AA* генотипа и носиоца најмање једног *G* алела.

Табела 22. Дистрибуција параметара терапијског мониторинга у односу на полиморфизам *CYP3A4* ензима

Параметри мониторинга такролимуса	CYP3A4 -392 A>G		Mann-Whitney тест
	AA	AG/GG	
3. дан			
Укупна дневна доза (mg)	9,73 ± 5,40	8,36 ± 3,96	p = 0,471
Ниво лека у крви (ng/ml)	11,18 ± 7,65	10,09 ± 4,66	p = 0,985
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	98,41 ± 172,29	93,13 ± 64,53	p = 0,437
7. дан			
Укупна дневна доза (mg)	11,58 ± 5,31	10,29 ± 6,50	p = 0,279
Ниво лека у крви (ng/ml)	10,42 ± 5,67	8,53 ± 3,60	p = 0,426
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	66,84 ± 51,58	60,83 ± 43,37	p = 0,904
1 месец			
Укупна дневна доза (mg)	8,87 ± 5,54	10,19 ± 6,77	p = 0,616
Ниво лека у крви (ng/ml)	11,10 ± 5,56	10,27 ± 5,48	p = 0,885
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	101,64 ± 76,25	83,22 ± 50,85	p = 0,549
3 месеца			
Укупна дневна доза (mg)	5,52 ± 3,18	7,44 ± 5,98	p = 0,688
Ниво лека у крви (ng/ml)	7,72 ± 2,73	7,01 ± 2,03	p = 0,779
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	117,71 ± 87,11	98,73 ± 61,21	p = 0,713
6 месеци			
Укупна дневна доза (mg)	4,55 ± 2,65	6,64 ± 6,22	p = 0,506
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,82 ± 2,25	6,43 ± 2,44	p = 0,547
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	121,96 ± 98,29	78,13 ± 48,44	p = 0,185
12 месеци			
Укупна дневна доза (mg)	3,72 ± 2,09	4,86 ± 2,70	p = 0,250
Ниво лека у крви (ng/ml)	5,99 ± 1,85	6,11 ± 1,20	p = 0,793
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	128,93 ± 106,40	89,52 ± 50,01	p = 0,434

У табели 23 је приказан утицај *CYP3A4* -392 A>G генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви код посматраних пацијената у односу на жељену концентрацију лека. Запажа се да није било разлике у концентрацијама лека између носиоца *CYP3A4* AA и AG/GG генотипова у току целог посматраног периода праћења.

Табела 23. Утицај *CYP3A4* -392 A>G генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви у групи посматраних пацијената после трансплантације бубрега у односу на жељену концентрацију лека

	Број пацијената (%)	<i>CYP3A4</i> -392 A>G		<i>Chi-square</i> тест
	Ниво лека у крви (ng/ml)	AA	AG/GG	
3. дан	<6	30 (31,9)	3 (37,5)	p = 0,860
	6-10	19 (20,2)	1 (12,5)	
	>10	45 (47,9)	4 (50,0)	
7. дан	<6	22 (22,4)	3 (42,9)	p = 0,416
	6-10	30 (30,6)	1 (14,3)	
	>10	46 (46,9)	3 (42,9)	
1 месец	<6	17 (18,3)	3 (37,5)	p = 0,337
	6-10	28 (30,1)	1 (12,5)	
	>10	48 (51,6)	4 (50,0)	
3 месеца	<6	26 (27,7)	3 (37,5)	p = 0,502
	6-10	55 (58,5)	5 (62,5)	
	>10	13 (13,8)	-	
6 месеци	<6	38 (40,4)	4 (57,1)	p = 0,549
	6-10	47 (50,0)	2 (28,6)	
	>10	9 (9,6)	1 (14,3)	
12 месеци	<6	49 (53,8)	3 (42,9)	p = 0,665
	6-10	38 (41,8)	4 (57,1)	
	>10	4 (4,4)	-	

Дистрибуција параметара терапијског мониторинга такролимуса према генском полиморфизму *ABCB1* 3435 C>T транспортера у посматраним периодима је приказана у табели 24. Није било статистички значајних разлика у параметрима мониторинга такролимуса између носиоца CC генотипа и носиоца најмање једног T алела.

Табела 24. Дистрибуција параметара терапијског мониторинга у односу на генски полиморфизам *ABCB1* 3435 C>T транспортера

Параметри мониторинга такролимуса	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis
	CC	CT	TT	тест
3. дан				
Укупна дневна доза (mg)	9,69 ± 5,58	9,15 ± 4,39	10,31 ± 6,21	p = 0,912
Ниво лека у крви (ng/ml)	11,38 ± 6,33	10,97 ± 8,26	10,83 ± 8,06	p = 0,622
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	137,58 ± 257,23	75,25 ± 66,87	75,67 ± 78,20	p = 0,158
7. дан				
Укупна дневна доза (mg)	11,34 ± 5,53	11,13 ± 4,52	12,24 ± 6,33	p = 0,741
Ниво лека у крви (ng/ml)	9,86 ± 4,43	10,30 ± 6,45	10,91 ± 5,82	p = 0,690
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	66,84 ± 44,26	69,27 ± 60,29	61,47 ± 45,43	p = 0,782
1 месец				
Укупна дневна доза (mg)	8,61 ± 5,96	8,74 ± 4,36	9,80 ± 6,73	p = 0,525
Ниво лека у крви (ng/ml)	10,45 ± 5,39	11,01 ± 5,36	11,86 ± 6,06	p = 0,713
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	97,37 ± 66,19	102,85 ± 77,16	100,68 ± 84,37	p = 0,983
3 месеца				
Укупна дневна доза (mg)	5,64 ± 3,53	5,56 ± 2,73	5,86 ± 4,39	p = 0,839
Ниво лека у крви (ng/ml)	7,83 ± 2,66	7,48 ± 2,75	7,71 ± 2,69	p = 0,692
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	115,29 ± 72,73	109,91 ± 71,23	127,44 ± 117,97	p = 0,880
6 месеци				
Укупна дневна доза (mg)	4,70 ± 3,08	4,57 ± 2,03	4,88 ± 4,15	p = 0,583
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,35 ± 2,18	6,98 ± 2,25	7,20 ± 2,34	p = 0,294
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	111,01 ± 73,27	119,68 ± 85,09	128,50 ± 135,42	p = 0,875
12 месеци				
Укупна дневна доза (mg)	3,77 ± 2,08	4,03 ± 2,06	3,45 ± 2,36	p = 0,265
Ниво лека у крви (ng/ml)	6,33 ± 1,69	6,13 ± 2,01	5,32 ± 1,51	p = 0,072
Однос концентрације и дозе (ng/ml/mg/kg)	126,78 ± 98,75	116,07 ± 78,04	140,02 ± 140,48	p = 0,963

У табели 25 је приказан утицај *ABCB1 3435 C>T* генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви у групи посматраних пацијената у односу на циљну концентрацију лека у свим изабраним терминима праћења након трансплантације бубрега. Запажа се да овај полиморфизам није имао утицаја на постигнуте концентрације лека у крви током посматраног временског периода од годину дана.

Табела 25. Утицај *ABCB1 3435 C>T* генског полиморфизма на концентрацију такролимуса у крви у групи посматраних пацијената после трансплантације бубрега у односу на жељену концентрацију лека

	Број пацијената (%)	<i>ABCB1 3435 C>T</i>			<i>Chi-square</i> тест
	Ниво лека у крви (ng/ml)	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
3. дан	<6	10 (25,6)	13 (35,1)	10 (38,5)	p = 0,616
	6-10	7 (17,9)	9 (24,3)	4 (15,4)	
	>10	22 (56,4)	15 (40,5)	12 (46,2)	
7. дан	<6	8 (20,5)	13 (33,3)	4 (14,8)	p = 0,455
	6-10	11 (28,2)	11 (28,2)	9 (33,3)	
	>10	20 (51,3)	15 (38,5)	14 (51,9)	
1 месец	<6	8 (22,2)	8 (20,5)	4 (15,4)	p = 0,926
	6-10	9 (25,0)	11 (28,2)	9 (34,6)	
	>10	19 (52,8)	20 (51,3)	13 (50,0)	
3 месеца	<6	11 (28,9)	11 (28,2)	7 (28,0)	p = 0,700
	6-10	20 (52,6)	25 (64,1)	15 (60,0)	
	>10	7 (18,4)	3 (7,7)	3 (12,0)	
6 месеци	<6	18 (47,4)	15 (38,5)	9 (37,5)	p = 0,765
	6-10	18 (47,4)	19 (48,7)	12 (50,0)	
	>10	2 (5,3)	5 (12,8)	3 (12,5)	
12 месеци	<6	15 (42,9)	20 (52,6)	17 (68,0)	p = 0,192
	6-10	19 (54,3)	15 (39,5)	8 (32,0)	
	>10	1 (2,9)	3 (7,9)	-	

5.6.3. Испитивање утицаја проучаваних генских полиморфизма на поједине клиничке исходе код пацијената са трансплантираним бубрегом

У табели 26 је показана повезаност појединих облика генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина са учесталошћу акутног одбацивања графта. Није било значајније повезаности ових полиморфизама са акутним одбацивањем графта.

Табела 26. Повезаност генског полиморфизма *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина са учесталошћу акутног одбацивања графта у испитиваној групи пацијената

Акутно одбацивање графта; број пацијената (%)	CYP3A5 6986 A>G			Chi-square тест
	AA/AG	GG		
Не	11 (12,6)	76 (87,4)		p = 0,443
Да	5 (21,7)	18 (78,3)		
	CYP3A4 -392 A>G			
	AA	AG/GG		
Не	82 (94,3)	5 (5,7)		p = 0,455
Да	20 (87,0)	3 (13,0)		
	ABCB1 3435 C>T			
	CC	CT	TT	
Не	29 (33,3)	35 (40,2)	23 (26,4)	p = 0,435
Да	11 (47,8)	7 (30,4)	5 (21,7)	

Повезаност генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина и ране акутне нефротоксичности је приказана у табели 27.

Из табеле 27 се види да није било значајне повезаности испитиваних полиморфизама са учесталошћу ране акутне нефротоксичности.

Повезаност генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина и појаве пост-трансплантационог дијабетеса код испитиваних пацијената је приказана у табели 28. Није нађена веза између испитиваних генских полиморфизама и ове нежељене реакције на такролимус.

Табела 27. Повезаност генског полиморфизма CYP3A5, CYP3A4 и П-гликопротеина и ране акутне нефротоксичности такролимуса код трансплантираних пацијената

Рана нефротоксичност; број пацијената (%)	CYP3A5 6986 A>G			Chi-square тест
	AA/AG	GG		
Не	16 (16,7)	80 (83,3)		p = 0,213
Да	-	14 (100)		
	CYP3A4 -392 A>G			
	AA	AG/GG		
Не	88 (91,7)	8 (8,3)		p = 0,568
Да	14 (100)	-		
	ABCB1 3435 C>T			
	CC	CT	TT	
Не	37 (38,5)	35 (36,5)	24 (25,0)	p = 0,442
Да	3 (21,4)	7 (50,0)	4 (28,6)	

Табела 28. Повезаност генског полиморфизма CYP3A5, CYP3A4 и П-гликопротеина и појаве пост-трансплантационог дијабетеса код трансплантираних пацијената

Посттрансплантациони дијабетес; број пацијената (%)	CYP3A5 6986 A>G			Chi-square тест
	AA/AG		GG	
Не	14 (13,9)	87 (86,1)		p = 0,851
Да	2 (22,2)	7 (77,8)		
	CYP3A4 -392 A>G			
	AA		AG/GG	
Не	95 (94,1)	6 (5,9)		p = 0,071
Да	7 (77,8)	2 (22,2)		
	ABCB1 3435 C>T			
	CC	CT	TT	
Не	36 (35,6)	40 (39,6)	25 (24,8)	p = 0,586
Да	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	

У посматраном периоду од 12 месеци после трансплантације, у испитиваној групи је код 9 пацијената дефинитивно прекинута примена такролимуса. Повезаност генског

полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина са прекидом примене такролимуса је приказана у табели 29 и из ње се може видети да се они не могу довести у везу.

Табела 29. Повезаност генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина са прекидом примене такролимуса

Прекид терапије такролимусом; број пацијената (%)	CYP3A5 6986 A>G			Chi-square тест
	AA/AG	GG		
Не	15 (14,9)	86 (85,1)		p = 1,000
Да	1 (11,1)	8 (88,9)		
	CYP3A4 -392 A>G			
	AA	AG/GG		
Не	94 (93,1)	7 (6,9)		p = 1,000
Да	8 (88,9)	1 (11,1)		
	ABCB1 3435 C>T			
	CC	CT	TT	
Не	36 (35,6)	40 (39,6)	25 (24,8)	p = 0,586
Да	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	

У посматраном периоду од 12 месеци после трансплантације, код 7 пацијената је доказана инфекција цитомегаловирусом. Сви ови пацијенти су имали нефункционалну форму *CYP3A5* ензима, док је ензим *CYP3A4* код свих био функционалан.

5.6.4. Утицај генског полиморфизма на функцију графта

Утицај генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина на показатеље непосредне функције графта после трансплантације је приказан у табели 30. Може се закључити да испитивани полиморфизми немају утицаја на показатеље непосредне функције графта.

Табела 30. Утицај генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина на показатеље непосредне функције графта после трансплантације бубрега

Непосредна функција графта; број пацијената (%)	<i>CYP3A5</i> 6986 A>G			<i>Chi-square</i> тест
	<i>AA/AG</i>	<i>GG</i>		
Добра	13 (17,3)	62 (82,7)		p = 0,356
Одложена	3 (8,6)	32 (91,4)		
	<i>CYP3A4</i> -392 A>G			
	<i>AA</i>	<i>AG/GG</i>		
Добра	69 (92,0)	6 (8,0)		p = 0,971
Одложена	33 (94,3)	2 (5,7)		
	<i>ABCB1</i> 3435 C>T			
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
Добра	29 (38,7)	28 (37,3)	18 (24,0)	p = 0,747
Одложена	11 (31,4)	14 (40,0)	10 (28,6)	

У табели 31 је приказано време које је било потребно да би се нормализовао серумски креатинина код посматраних пацијената у односу на испитиване варијанте генског полиморфизма. Може се видети да није било значајних разлика везано за овај показатељ у односу на испитиване генске полиморфизме.

У табели 32 је приказана повезаност најнижих достигнутих вредности серумског креатинина код испитиваних пацијената и генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина после трансплантације бубрега. Није нађено да је било који од испитиваних полиморфизма имао утицаја на овај клинички параметар.

Табела 31. Испитивање повезаности временског периода нормализације креатинина у крви код трансплантираних пацијената и варијанти генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина

Дан нормализације креатинина (μmol/l); средња вредност ± СД	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney тест
	AA/AG		GG	
Добра рана функција графта	5,33 ± 3,05		5,54 ± 4,86	p = 0,735
Одложена рана функција графта	24,33 ± 16,17		18,23 ± 8,65	p = 0,531
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney тест
	AA		AG/GG	
Добра рана функција графта	5,57 ± 4,70		4,83 ± 3,49	p = 0,621
Одложена рана функција графта	19,13 ± 9,44		13,50 ± 7,78	p = 0,458
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis тест
	CC	CT	TT	
Добра рана функција графта	5,67 ± 6,16	6,08 ± 3,82	4,44 ± 2,36	p = 0,290
Одложена рана функција графта	17,90 ± 8,56	21,21 ± 10,61	16,00 ± 8,00	p = 0,511

Табела 32. Најниже достигнуте вредности серумског креатинина у односу на генски полиморфизам ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина после трансплантације бубрега

Најнижа вредност креатинина (μmol/l); средња вредност ± СД	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney тест
	AA/AG		GG	
Добра рана функција графта	123,25 ± 22,44		113,90 ± 28,60	p = 0,245
Одложена рана функција графта	157,67 ± 37,10		171,74 ± 48,47	p = 0,645
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney тест
	AA		AG/GG	
Добра рана функција графта	115,48 ± 27,78		115,17 ± 30,08	p = 0,929
Одложена рана функција графта	171,38 ± 48,55		156,50 ± 16,26	p = 0,856
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis тест
	CC	CT	TT	
Добра рана функција графта	111,18 ± 26,90	116,08 ± 29,46	121,22 ± 26,92	p = 0,597
Одложена рана функција графта	170,09 ± 47,32	181,64 ± 50,21	153,67 ± 42,28	p = 0,430

У табели 33 је показано да вредности клиренса креатина измерене код пацијената 6 и 12 месеци након трансплантације нису зависиле од генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина пацијената у посматраној групи.

Табела 33. Вредности клиренса креатинина у зависности од генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина посматраних пацијената

Клиренс креатина (ml/min); средња вредност ± СД				
	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney
	AA/AG	GG		тест
6 месеци	64,09 ± 18,75	63,71 ± 17,69		p = 0,849
12 месеци	69,93 ± 18,44	69,15 ± 20,34		p = 0,912
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney
	AA	AG/GG		тест
6 месеци	64,01 ± 18,25	60,83 ± 10,10		p = 0,626
12 месеци	69,33 ± 20,46	68,52 ± 14,08		p = 0,971
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis
	CC	CT	TT	тест
6 месеци	58,48 ± 17,80	66,27 ± 16,86	67,97 ± 17,69	p = 0,034
12 месеци	65,61 ± 19,82	70,92 ± 18,91	72,47 ± 21,81	p = 0,247

Такође, анализиране су и концентрације серумског креатинина код испитиваних пацијената у посматраним временским интервалима у односу на генски полиморфизам ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина. Може се видети да ови полиморфизми нису значајно утицали на концентрације креатинина после 6 месеци, као ни после 12 месеци од трансплантације (табела 34).

Табела 34. Утицај генског полиморфизам ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина на концентрације серумског креатинина у групи посматраних пацијената са трансплантираним бубрегом

Креатин (μmol/l); средња вредност ± СД				
	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney
	AA/AG		GG	тест
3. дан	257,53 ± 175,07		239,78 ± 186,73	p = 0,260
7. дан	223,00 ± 188,53		185,02 ± 137,66	p = 0,553
1 месец	145,00 ± 44,93		143,92 ± 56,93	p = 0,538
3 месеца	151,20 ± 36,01		139,09 ± 48,21	p = 0,065
6 месеци	137,07 ± 21,10		133,53 ± 41,19	p = 0,299
12 месеци	128,69 ± 20,86		126,88 ± 39,50	p = 0,290
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney
	AA		AG/GG	тест
3. дан	247,02 ± 188,95		176,43 ± 82,42	p = 0,648
7. дан	195,01 ± 149,18		127,43 ± 42,17	p = 0,274
1 месец	144,98 ± 56,67		133,00 ± 29,72	p = 0,896
3 месеца	141,30 ± 47,60		134,13 ± 36,28	p = 0,991
6 месеци	134,10 ± 39,75		133,00 ± 29,40	p = 0,796
12 месеци	127,54 ± 37,97		122,13 ± 28,51	p = 0,884
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis
	CC	CT	TT	тест
3. дан	214,40 ± 177,08	278,95 ± 201,53	228,36 ± 163,27	p = 0,154
7. дан	176,90 ± 139,64	211,58 ± 169,28	179,19 ± 112,26	p = 0,639
1 месец	134,77 ± 49,94	154,45 ± 66,81	142,55 ± 40,98	p = 0,231
3 месеца	140,03 ± 45,69	145,24 ± 54,05	135,07 ± 36,11	p = 0,771
6 месеци	137,45 ± 40,14	135,27 ± 42,42	127,04 ± 31,49	p = 0,623
12 месеци	126,33 ± 38,59	130,19 ± 38,49	123,63 ± 34,27	p = 0,532

5.6.5. Утицај генског полиморфизма ензима *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеина на биохемијске параметре значајне за исход трансплантације

У табели 35 је анализиран однос вредности протеинурије у испитиваним временским интервалима након трансплантације бубрега и генског полиморфизма ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина у посматраној групи пацијената. Поменути генски полиморфизми нису утицали на вредности протеина у урину код ових пацијената током испитиваног периода од годину дана.

Испитиване су и вредности хематокрита пацијената од 3. дана након трансплантације, па све до краја прве године. Није нађена значајна повезаност са испитиваним генским полиморфизмом код посматраних пацијената (табела 36).

Табела 35. Вредности протеинурије у односу на генски полиморфизам ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина у групи посматраних пацијената

Протеинурија (g/24h); средња вредност ± СД				
	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney
	AA/AG	GG		тест
3. дан	2,88 ± 2,43	1,72 ± 1,80		p = 0,194
7. дан	1,86 ± 1,03	1,11 ± 0,99		p = 0,035
1 месец	0,41 ± 0,24	0,37 ± 0,39		p = 0,284
3 месеца	0,42 ± 0,35	0,31 ± 0,38		p = 0,290
6 месеци	0,21 ± 0,12	0,25 ± 0,26		p = 0,780
12 месеци	0,35 ± 0,43	0,23 ± 0,26		p = 0,197
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney
	AA	AG/GG		тест
3. дан	1,87 ± 1,90	0,88 ± 0,00		p = 0,800
7. дан	1,20 ± 1,04	1,32 ± 0,78		p = 0,577
1 месец	0,39 ± 0,38	0,23 ± 0,16		p = 0,441
3 месеца	0,32 ± 0,37	0,39 ± 0,42		p = 0,747
6 месеци	0,26 ± 0,26	0,12 ± 0,12		p = 0,241
12 месеци	0,23 ± 0,25	0,44 ± 0,63		p = 0,485
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis
	CC	CT	TT	тест
3. дан	1,38 ± 2,15	1,57 ± 1,20	3,46 ± 2,26	p = 0,029
7. дан	1,13 ± 1,09	1,25 ± 1,02	1,27 ± 0,94	p = 0,629
1 месец	0,29 ± 0,28	0,45 ± 0,41	0,35 ± 0,39	p = 0,294
3 месеца	0,29 ± 0,29	0,39 ± 0,44	0,29 ± 0,36	p = 0,331
6 месеци	0,21 ± 0,22	0,29 ± 0,29	0,20 ± 0,21	p = 0,282
12 месеци	0,22 ± 0,34	0,29 ± 0,31	0,24 ± 0,20	p = 0,283

Табела 36. Вредности хематокрита у зависности од генског полиморфизма пацијената са трансплантираним бубрегом

Хематокрит (%); средња вредност ± СД				
	CYP3A5 6986 A>G			Mann-Whitney тест
	AA/AG	GG		
3. дан	0,27 ± 0,03	0,29 ± 0,04		p = 0,265
7. дан	0,28 ± 0,04	0,31 ± 0,04		p = 0,032
1 месец	0,34 ± 0,06	0,36 ± 0,04		p = 0,069
3 месеца	0,37 ± 0,07	0,38 ± 0,05		p = 0,267
6 месеци	0,39 ± 0,07	0,40 ± 0,06		p = 0,329
12 месеци	0,40 ± 0,06	0,41 ± 0,06		p = 0,549
	CYP3A4 -392 A>G			Mann-Whitney тест
	AA	AG/GG		
3. дан	0,29 ± 0,04	0,28 ± 0,03		p = 0,786
7. дан	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,06		p = 0,937
1 месец	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,05		p = 0,256
3 месеца	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,09		p = 0,594
6 месеци	0,40 ± 0,05	0,43 ± 0,08		p = 0,195
12 месеци	0,41 ± 0,06	0,44 ± 0,08		p = 0,152
	ABCB1 3435 C>T			Kruskal-Wallis тест
	CC	CT	TT	
3. дан	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,03	p = 0,232
7. дан	0,32 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,31 ± 0,04	p = 0,158
1 месец	0,37 ± 0,04	0,35 ± 0,05	0,36 ± 0,04	p = 0,198
3 месеца	0,37 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,06	p = 0,118
6 месеци	0,40 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,40 ± 0,06	p = 0,785
12 месеци	0,41 ± 0,06	0,40 ± 0,05	0,43 ± 0,06	p = 0,182

5.6.6. Израчунати коефицијент варијабилности такролимуса и његова повезаност са изабраним параметрима посматрања

У групи испитиваних пацијената одређен је коефицијент варијабилности такролимуса и анализирана његова повезаност са појединим изабраним параметрима

посматрања током првих 12 месеци после трансплантације бубрега. Просечна вредност израчунатог коефицијента варијабилности такролимуса је била 31,54, просечна концентрација такролимуса у крви за све пацијенте 7,28 ng/ml, а просечна стандардна девијација $2,39 \pm 1,71$. У табели 37 је приказана повезаност коефицијента варијабилности такролимуса са изабраним посматраним параметрима. Може се закључити да се коефицијент варијабилности није статистички могао да се повеже ни са једним од испитиваних параметара.

Табела 37. Повезаност коефицијента варијабилности такролимуса са изабраним параметрима посматрања код испитиваних пацијената током првих 12 месеци после трансплантације бубрега

Параметри	Коефицијент варијабилности; Средња вредност $\pm$ СД			Mann-Whitney тест
Пол реципијента: мушкарац или жена	29,41 $\pm$ 16,37		35,25 $\pm$ 19,86	p = 0,190
CYP3A5 6986 A>G: AA/AG или GG	28,30 $\pm$ 14,91		32,07 $\pm$ 18,30	p = 0,596
CYP3A4 -392 A>G: AA или AG/GG	31,41 $\pm$ 17,86		33,40 $\pm$ 19,16	p = 0,820
Индукциона терапија: не или да	32,80 $\pm$ 17,72		30,34 $\pm$ 18,06	p = 0,374
Старост донора: < 60 или > 60 година	31,39 $\pm$ 16,70		37,12 $\pm$ 21,02	p = 0,280
Ливинг или кадавер	33,56 $\pm$ 17,91		26,64 $\pm$ 17,01	p = 0,054
Непосредна функција графта: добра или одложена	31,71 $\pm$ 17,70		31,12 $\pm$ 18,51	p = 0,791
Акутно одбацивање графта: не или да	32,89 $\pm$ 18,46		25,01 $\pm$ 13,05	p = 0,136
Нежељени ефекти лека: не или да	31,27 $\pm$ 18,87		31,95 $\pm$ 16,38	p = 0,675
Прекид терапије такролимусом: не или да	31,49 $\pm$ 17,86		32,54 $\pm$ 20,03	p = 0,884
ABCB1 3435 C>T: CC или CT или TT	34,37 $\pm$ 17,96	28,82 $\pm$ 18,12	31,70 $\pm$ 17,28	p = 0,395*

*Kruskal Wallis test

Исти закључак је добијен када је испитиван утицај различитих вредности коефицијента варијабилности такролимуса на одређене параметре посматрања.

Табела 38. Коефицијент варијабилности такролимуса већи или мањи од 25 и његов утицај на одређене параметре посматрања код испитиваних пацијената током првих 12 месеци после трансплантације бубрега

Коефицијент варијабилности; број (%)		< 25	> 25	Chi-square тест
CYP3A5 6986 A>G	AA/AG	5 (12,8)	9 (15,0)	p = 0,761
	GG	34 (87,2)	51 (85,0)	
CYP3A4 -392 A>G	AA	37 (94,9)	58 (93,3)	p = 0,754
	AG/GG	2 (5,1)	4 (6,7)	
Акутно одбацивање графта	не	31 (79,5)	51 (85,0)	p = 0,477
	да	8 (20,5)	9 (15,0)	
Прекид терапије такролимусом	не	37 (94,9)	58 (96,7)	p = 0,658
	да	2 (5,1)	2 (3,3)	
ABCB1 3435 C>T	CC	12 (30,8)	24 (40,0)	p = 0,513
	CT	18 (46,2)	21 (35,0)	
	TT	9 (23,1)	15 (25,0)	
Ниво креатинина 12. месец	126,41 ± 38,19		127,38 ± 38,03	p = 0,799*
Ниво клиренса креатинина 12. месец	73,17 ± 21,08		66,10 ± 18,65	p = 0,093*

*Mann-Whitney тест

6. ДИСКУСИЈА

Опште је прихваћено да је такролимус, као један од најефикаснијих и најчешће коришћених имуносупресивних лекова, значајно унапредио резултате трансплантације органа (19). Међутим, и поред релативно дугог клиничког искуства, најбољи начин примене и мониторинга овога лека је још увек предмет дебате (61, 116). Разлози овоме су чињеница да такролимус има мали распон између терапијске и токсичне дозе, као и веома изражена фармакокинетска варијабилност лека и висок потенцијал за интеракције са другим лековима и храном (31). У свакодневној клиничкој пракси није реткост да пацијенти сличне телесне масе примају исте дозе такролимуса, али да имају различите концентрације лека у крви (56). Осим тога, свакодневну примену овога лека додатно отежава чињеница да ове концентрације врло лако могу бити и изван пожељних терапијских граница, што може имати значајне клиничке импликације.

Проблем варирања концентрација такролимуса у крви у пракси се превладава одређивањем концентрације лека и подешавањима дозе, али понављана и сувише честа мерења концентрације лека нису економична, а некада ни могућа. Може се рећи да терапијски мониторинг такролимуса (који се заснива на дозирању лека на основу концентрације лека у крви која је измерена пре примене наредне дозе) и поред очигледних предности, има и одређених мана: осим што захтева специфичну опрему, обучено особље и материјална средства, он не одражава у потпуности степен изложености овом леку, нити указује на пацијенте који тешко постижу циљне концентрације лека и/или пацијенте код којих концентрације често и значајно варирају (117). Ово смо и ми, од раније, приметили код трансплантираних пацијената у свакодневном клиничком раду.

С обзиром на наведене тешкоће у дозирању и примени такролимуса, у овом испитивању смо прво анализирали укупну расподелу концентрација такролимуса у крви код 208 пацијената са трансплантираним бубрегом који се контролишу у Центру за трансплантацију органа, а који у оквиру имуносупресивне терапије одржавања примају и такролимус. Скринингом великог броја измерених концентрација такролимуса у крви (5011 узорак), уочено је да је око 30% концентрација лека било изван, у том периоду, препорученог опсега (77). Можда, на први поглед, овај број није превише велики, али га треба узети са резервом, будући да је за ову анализу коришћен релативно широк циљни опсег концентрација такролимуса у крви (од 5 до 15 ng/ml), и то код пацијената који су се налазили у различитим временским периодима после

трансплантације. Могуће је претпоставити да би се број неодговарајућих концентрација лека вероватно приближио цифри и до 50% да је терапијски опсег лека био ужи, од 6-10 ng/ml, што су циљне вредности које се углавном препоручују последњих година. Ови налази су били повод за детаљнију анализу фактора који код испитиваних пацијената могу бити повезани са варирањем и/или неодговарајућим концентрацијама такролимуса у крви, посебно у раном периоду после трансплантације.

Од раније је познато да значајније варирање концентracија такролимуса у крви код истог пацијента (било „спонтано“, било због терапијских покушаја да се постигне циљна концентracија лека у крви) може представљати потенцијални проблем за тог пацијента, будући да је показана повезаност варирања концентracија лека са неповољним клиничким исходом графта (60). С друге стране, узак терапијски прозор онемогућава стратегију примене иницијално високих доза лека код свих пацијената, будући да високе концентracије лека могу имати за последицу одложену функцију графта и различите нежељене ефекте (19). С обзиром да је рани период после трансплантације веома важан за судбину графта, ова слаба индивидуална предвидљивост представља озбиљан проблем код дозирања такролимуса у раном периоду после трансплантације (33). Управо због тога, последњих година се чине напори да се, што је могуће више, предвиди начин реаговања појединог пацијента на примену такролимуса, посебно у првим данима после трансплантације.

Важан корак у овом правцу представља опажање да су разлике у функционисању ензима преко којих се одвија метаболизам овога лека највећим делом одговорне за фармакокинетске разлике које постоје међу пацијентима (63). Иако и даље постоје отворена питања, сада је извесно да су полиморфизми гена који одређују експресију ензима *CYP3A5* и *CYP3A4*, као и ефлукс пумпе П-гликопротеина, један од најзначајнијих фактора који утичу на варијабилност лека и, посредно, на судбину графта (131, 137). Од раније је искуствено било познато да припадници одређених етничких група различитом брзином метаболишу лек, као и да се метаболизам такролимуса разликује код пацијената различитог узраста и пола (138).

У последње време постоји велики интерес да се одређивањем полиморфизма најчешћих ензима који метаболишу такролимус предвиди степен његове биорасположивости код појединачног пацијента, што представља веома обећавајућу опцију за индивидуализовану примену овога лека (61, 68). Тренутно, проспективне клиничке студије тек треба да потврде да ли, и у којој мери, одређивање ових полиморфизма пре трансплантације може допринети индивидуализацији примене

такролимуса, а самим тим и његовој већој ефикасности, смањењу нежељених ефеката и бољем укупном преживљавању графта.

6.1. Демографске особине донора и реципијента, примена индукционе терапије и имунолошки ризик код трансплантираних пацијената укључених у истраживање

Међутим, осим поменутих ензима који учествују у метаболизму, на фармакокинетику такролимуса утичу и многи други фактори, као што су: пол и старост пацијента, непосредна функција графта, функција јетре, примена индукционе терапије и других лекова, концентрација протеина у серуму, хематокрит и други (77, 120). Због тога смо прво анализирали поједине демографске карактеристике које могу бити од интереса за фармакокинетику такролимуса код пацијената у испитиваној групи.

Генерално, може се закључити да пацијенти у овој студији претстављају доста типичан узорак трансплантираних пацијената у нашој средини: ради се о особама беле расе и релативно млађе животне доби- просечна старост пацијената у тренутку трансплантације је била 44,5 година. Наши пацијенти су били млађи у односу на пацијенте из неких других средина (120), а одговарају просечној старости трансплантираних пацијената у другим центрима у Србији (65), као и пацијената у нашој ранијој студији (77). У испитиваној групи је било нешто више мушкараца, што је, такође, у складу са нашим ранијим истраживањем (77), али и са искуствима других аутора (65, 120, 139-141). Епидемиолошки подаци, иначе, показују да се хронична бубрежна инсуфицијенција и уремија чешће јављају код особа мушког пола (142, 143). Поређењем мушкараца и жена није нађена статистички значајна разлика у односу на године старости ($p = 0,604$), док у основним телесним параметрима као што су висина, телесна маса и индекс телесне масе, као што је и очекивано, постоји значајна разлика између полова на рачун мушкараца. Реципијенти бубрега у испитиваној групи нису били гојазни: просечан индекс телесне масе је био $22,77 \text{ kg/m}^2$, статистички значајно већи код мушкараца у односу на жене. Показано је да су већи индекс телесне масе и старија доб удружени са споријим метаболизмом такролимуса (144, 145). *Stratta* и сарадници су показали да су пацијенти преко 60 година и са индексом телесне масе преко 25 имали повећан ризик од нежељених ефеката такролимуса и при примени уобичајених доза лека (120), што се објашњава повећаном концентрацијом

такролимуса због смањене активности CYP ензима у јетри и транспортера П-гликопротеина у цревима и повећане биорасположивости такролимуса (146).

У посматраној групи је нешто више од две трећине трансплантација урађено од живог донора бубрега (71,8%), док је кадаверичних трансплантација било значајно мање. Учесталост трансплантације од живог донора је у нашој групи била доста слична са новијим подацима из других студија у свету (147-149). За разлику од ранијег периода, заступљеност трансплантација од живог донора сада није ретка чак и у центрима где ова врста трансплантација раније није била уобичајена. Чак и у Сједињеним Америчким Државама, које су годинама предњачиле по броју кадаверских трансплантација, од 2001. године број трансплантација од живог донора, у појединим годинама, премашује број трансплантација од кадаверског донора (150). Разлог мањег броја кадаверских донора је комплексан, а делимично се може објаснити мањим бројем тешких повреда главе у саобраћајним удесима и бољим збрињавањем повређених (151). Трансплантација бубрега од живог донора свакако има своје предности, али и мане; једно од најважнијих предности је што је код овог типа трансплантације значајно краће време хладне исхемије, па пацијенти имају мању учесталост одложене функције графта, акутног одбацивања и боље дугорочно преживљавање бубрега (152). У посматраној групи, већи број донора (77,2%) је био млађи од 60 година, што је још један разлог за бољу функцију графта после трансплантације (153). Поменути разлози би се, са демографске стране, могла објаснити релативно добра функција графта коју смо регистровали код испитиваних пацијената.

Када се са имунолошког аспекта анализирају наши пацијенти, може се закључити да њихов имунолошки ризик није био велики: највећи број трансплантација је обављен од живог донора са кратким временима исхемије, при чему донори бубрега нису били превише стари и код свих пацијената се радило о првој трансплантацији бубрега. Такође, време проведено на дијализи пре трансплантације није било предугачко (у просеку 41,7 месеци), с обзиром да се, у највећем броју случајева, радило о трансплантацији од живог донора. Осим овога, код 11 пацијената (10%) обављена је трансплантација и пре отпочињања хроничног програма дијализе, што се сматра најбољим начином лечења терминалне слабости бубрега (154). Иначе, учесталост преддијализне трансплантације се у свету процењује на око 5-30% од свих трансплантација бубрега. *Mange* и сарадници су показали да болесници код којих је извршена преддијализна трансплантација бубрега имају мањи ризик за каснију дисфункцију графта у односу на пацијенте који су пре трансплантације били на

дијализи (155). Разлози неповољног ефекта дијализе на преживљавање графта нису сасвим јасни, али се, уз друге факторе, могу објаснити активацијом имунокомпетентних ћелија и поремећеним односом појединих цитокина током дијализе (156, 157). Због тога је важно знати дужину боравка пацијента на дијализи пре трансплантације, будући да је дужи боравак повезан са већом учесталашћу одбацивања и лошијим преживљавањем графта (158). Са друге стране, пацијенти у испитиваној групи нису били ни без имунолошког ризика, с обзиром да се углавном радило о млађим особама за које је познато да имунолошки бурније реагују на трансплантирани орган (14). Такође, код највећег броја наших пацијената и сам разлог терминалне бубрежне инсуфицијенције је био имунолошки (хронични гломерулонефритис), што је иначе и најчешћи етиолошки разлог трансплантације бубрега у Србији (159). Ипак, у односу на пацијенте у неким другим срединама у којима преовладавају пацијенти Афро-Америчке етничке припадности и где је значајан број пацијената ретрансплантиран и/или сензибилисан на стране антигене (160), можемо закључити да је код испитиваних пацијената имунолошки ризик био умерен или нижи. О томе, посредно, сведочи и мања учесталост примењене индукционе терапије код ових пацијената.

Индукциона терапија се у трансплантацији бубрега примењује када код реципијента постоји већи имунолошки ризик, или када лоша функција графта непосредно после трансплантације онемогућава примену инхибитора калцинеурина због потенцирања нефротоксичности (161). У испитиваној групи, индукциона терапија је примењена у око 50% трансплантација, док се учесталост примене индукционе терапије у свету тренутно процењује на око 55-80% (162). Важно је нагласити да је адекватна примена такролимуса посебно значајна код оних трансплантација бубрега у којима није примењена индукциона терапија. У тим случајевима се са применом такролимуса мора започети у максималним препорученим дозама и то на сам дан трансплантације, а некада и дан пре, да би се што пре постигле пожељне концентрације лека у крви и графт заштитио од раног одбацивања.

6.2. Функција графта после трансплантације

Познато је да је добра рана функција графта значајан предиктор његове добре дугорочне функције (163). Многе студије су показале да је одложена функција графта повезана са већом учесталашћу раног акутног одбацивања због повећаног ослобађања

проинфламаторних цитокина и појачавања имунолошке реакције на терену оксидо-редуктивног оштећења и хипоперфузије графта (164). Осим продужене хладне исхемије током операције и/или раног акутног одбацивања, један од разлога одложене функције графта може бити и акутна нефротоксичност изазвана такролимусом (86). Ово је био разлог због чега смо анализирали рану функцију графта у групи испитиваних пацијената. Код већине пацијената (68,2%) рана функција графта је била добра. Просечно време нормализације креатинина у испитиваној групи је било 9,7 дана, док је просечна концентрација креатинина у серуму после 15 дана од трансплантације (што је обично било време отпуста из болнице) износила 133,1 $\mu\text{mol/l}$. Код пацијената са одложеном функцијом графта просечно време нормализације креатинина је износило 18,7 дана, што је за 13 дана дуже у односу на пацијенте са добром раном функцијом код којих се креатинин нормализовао већ после 5,5 дана. Најниже просечне вредности креатинина, 15 дана од операције, код пацијената са одложеном функцијом графта су биле за 55 $\mu\text{mol/l}$ више у односу на пацијенте са добром раном функцијом графта (170,5 $\mu\text{mol/l}$ у групи са одложеном и 115,4 $\mu\text{mol/l}$ у групи са непосредном функцијом). Годину дана после трансплантације пацијенти са одложеном функцијом графта су имали статистички значајно већи креатинин у серуму у односу на пацијенте са непосредном функцијом (148,09 $\mu\text{mol/l}$ према 117,65 $\mu\text{mol/l}$). Пацијенти са одложеном функцијом су имали и већу протеинурију после годину дана, што је, иначе, лош прогностички знак за дуготрајно преживљавање графта (165). Мада се у литератури описује и другачије (163), у овој студији пацијенти са одложеном функцијом нису имали већу учесталост акутног одбацивања. Може се претпоставити да један од разлога може бити и то што је одложена функција графта била чешћа код пацијента који су у раном периоду после трансплантације имали веће концентрације такролимуса у крви, па су, на тај начин, били заштићени од одбацивања.

6.3. Клинички исходи, епизоде акутног одбацивања и нежељени ефекти такролимуса

6.3.1. Биохемијски показатељи функције графта

Због релативно нестабилног стања пацијента и могућег утицаја различитих фактора у раном периоду после трансплантације, биохемијски параметри везани за

функцију графта су анализирани одвојено за рани период (током прве недеље) и за каснији период (од првог месеца до краја прве године).

Концентрација креатинина у серуму и клиренс креатинина су најзначајнији показатељи функције бубрега. Уочава се да се функција графта у испитиваној групи побољшала током посматраног периода. Просечна концентрација креатинина у серуму после 6 месеци је била 134,02 $\mu\text{mol/l}$, а после 12 месеци 127,15 $\mu\text{mol/l}$, што је статистички значајано мање у односу на просечну концентрацију креатинина (144,08 $\mu\text{mol/l}$) месец дана после трансплантације. Такође, просечне вредности прерачуног клиренса креатинина су биле статистички значајно веће 6 и 12 месеци после трансплантације у односу на вредност после првог месеца (63,76 ml/мин и 69,26 ml/мин према 57,09 ml/мин). Разлике у функцији графта и степену протеинурије су биле највеће у раном периоду, од операције па до првог месеца, а касније су биле знатно мање.

Током читавог испитиваног периода просечне вредности протеинурије код наших пацијената нису прелазиле 500 mg током 24 сата, што је важан параметар добре и стабилне функције графта. У раном периоду после трансплантације просечне вредности трансаминаза биле су у границама нормалних вредности, што значи да у испитиваној групи, при овим дозама и концентрацијама такролимуса, није било значајније хепатотоксичности. Просечне вредности гликемије су биле повишене 3. дана од трансплантације (10,92 mmol/l), гранично повишене 7. дана, док су у каснијем периоду, од 1. до 12. месеца, су биле нормалне.

Веома је важно истаћи да у испитиваној групи током прве године од трансплантације није било ниједног губитка графта.

Можемо закључити да сви ови подаци показују да је функција графта код испитиваних пацијената у периоду посматрања од 12 месеци била веома добра.

6.3.2. Учесталост акутног одбацивања

Од свих имунолошких разлога, акутно одбацивање је најважнији разлог акутне и хроничне дисфункције графта (166). Ипак, немају све епизоде акутног одбацивања исти значај. Фактори као што су време настанка одбацивања, учесталост и тежина епизоде, тип одбацивања (ћелијско или изазвано антителима), начин лечења, као и степен опоравка функције после епизоде одбацивања у значајној мери утичу на интезитет оштећења графта и његову каснију функцију (167). Увођење инхибитора

калицинеурина и антипролиферативних лекова током претходне две деценије је значајно смањило учесталост акутног одбацивања, тако да се његова учесталост током првих 6 месеци од трансплантације последњих година процењује на око 10-20% (168).

У испитиваној групи, учесталост акутног одбацивања током прве године је била 20,9%. Највећи број епизода (78,3%) је имао карактеристике лакшег облика одбацивања, није било понављаних епизода одбацивања код истог пацијента, а у 91,3% епизода акутно одбацивање је настало током прва 2 месеца од трансплантације. Можемо закључити да учесталост одбацивања код наших пацијената није била велика, с обзиром да је одређен број трансплантација обављен од кадаверских донора, да су реципијенти бубрега били релативно млади, донори нешто старији, као и да је индукциона терапија примењена код само 50% трансплантација. Осим тога, мањи број епизода одбацивања је потврђен биопсијом графта, па је могуће да се у неким случајевима радило о акутној дисфункцији графта због других разлога (162). У нашој ранијој студији, у групи од 50 пацијената код којих је примењен цикоспорин и у којој није било кадаверских трансплантација, укупна учесталост акутног одбацивања током првих 12 месеци је била 32% (134). Важан је податак да је у садашњој студији просечна концентрација такролимуса у крви у тренутку одбацивања била у терапијским границама- 9,0 ng/ml, што може сугерисати да су други фактори, осим такролимуса, били одговорни за настанак акутног одбацивања.

6.3.3. Нежељени ефекти такролимуса

Нежељни ефекти такролимуса могу бити релативно чести, а разликују се по интензитету и клиничком значају. Као што је већ поменуто, нежељени ефекти су најчешће проузроковани високом концентрацијом лека у крви, мада код неких пацијената може постојати и повећана индивидуална осетљивост на лек и испољавање нежељених ефеката и при уобичајеним терапијским концентрацијама лека у крви (86, 87). Још пре више од 15 година, *Böttiger* и сарадници су код својих пацијената показали да је учесталост нежељених ефеката такролимуса била 76% када је концентрација лека била око 30 ng/ml, а свега 5,3% када је концентрација била испод 10 ng/ml. Такође, показали су да се 51% нежељених ефеката лека јавило током првог месеца после трансплантације. Интересантно је да су још тада, анализирајући однос ефикасне и токсичне концентрације лека, ови аутори препоручили циљне ране концентрације такролимуса које су актуелне и сада- око 10 ng/ml (169).

У посматраној групи се током прве године после трансплантације код скоро сваког трећег пацијента (28,2%) регистровала нека од нежељених реакција на такролимус.

Тремор је дозно-зависна и пролазна нежељена реакција, а у испитиваној групи је био релативно често изражен и био је, повремено, присутан код скоро сваког четвртог пацијента. Ова нежељена реакција се брзо кориговала смањењем дозе и концентрације лека, али треба истаћи да тремор није код свих пацијената био удружен са високом концентрацијом лека у крви. Тремор је сигурно најлакши нежељени ефекат примене такролимуса, али, са друге стране, код неких пацијената су регистроване и веома озбиљне нежељене реакције, као што су хемолитичко-уремички синдром и микроангиопатија са исхемијским променама на екстремитетима. Ове компликације су углавном захтевале брзу и трајну обуставу лека.

Један од најважнијих, а релативно честих, нежељених ефеката такролимуса је акутна нефротоксичност која настаје због реверзибилне и дозно зависне вазоконстрикције крвних судова бубрега током примене овога лека (93). У групи наших пацијената, значајну акутну нефротоксичност, у обиму који је захтевао смањење дозе за преко 30% или привремени прекид примене такролимуса, имало је 14 пацијената (12,7%). Сматрамо да учесталост озбиљније нефротоксичности у овој студији није била велика, с обзиром да су донори бубрега били нешто старији (због веће преваленце трансплантација од живог донора, а који су најчешће били родитељи реципијента), као и да је само у 50% трансплантација примењена индукциона терапија. Већа склоност развоја калцинеуринске нефротоксичности код старијих бубрега је од раније позната (170). У нашој ранијој студији, у којој су код једне групе пацијената примењиване веома високе дозе циклоспорина (без индукције) са циљем да се што раније достигну високе циљне концентрације лека 2 сата од примене (C_2 мониторинг), акутну нефротоксичност је имало 17 од 25 пацијената (68%) у овој групи, али и 52% пацијената у групи код којих су примењене ниже дозе циклоспорина и мониторинг рађен на уобичајени (C_0) начин. Интересантан је налаз да, у поменутој студији, пацијенти који су имали акутну циклоспоринску нефротоксичност нису имали и већу учесталост хроничне алогофит нефропатије после 24 месеца, као и да су пацијенти који су имали високе ране концентрације циклоспорина имали и бољу дугорочну функцију графта (134). Овај налаз је у складу са новијим схватањима који су последњих година озбиљно довели у питање механизам хроничног и прогресивног оштећења графта због примене инхибитора калцинурина и, из тога произашао, концепт дугорочне минимизације калцинеуринских инхибитора (104, 171).

Код посматраних пацијената се код 9 пацијената (8,2%) током прве године регистровала новонастала шећерна болест која се може повезати са применом такролимуса. Учесталост ове компликације у овој студији је била слична са учесталошћу која се описује у литератури. *Heisel* и сарадници, у мета анализи студија до 2004., описују учесталост новонастале шећерне болести од 9,8% код пацијената који су примали такролимус и 2,7% код пацијената који су били на режиму са циклоспорином (172). У овој студији, код пацијената код којих се развио пост-трансплантациони дијабетес, гликемија је била значајно већа у свим посматраним временима, па чак и у најранијем периоду после трансплантације, што може бити важан упозоравајући знак. Ипак, сматрамо да учесталост новонастале шећерне болести код испитиваних пацијената није била велика, будући да на појаву ове компликације, осим такролимуса, могу утицати и други фактори, као што су: старија доб реципијента, гојазност, расна припадност, инфекција са хепатитис Ц вирусом, полицистична болест бубрега примаоца, примена кортикостероида, број ХЛА неслагања и други (173).

Значајан број испитиваних пацијената (38%) је током прва 2 месеца после трансплантације имао бактеријске инфекције, углавном уринарног и респираторног система. По мишљењу већине аутора, бактеријске инфекције у раном периоду после трансплантације се у мањем степену могу повезати са применом такролимуса и уопште имunosупресивне терапије, већ су, највећим делом, повезане са постоперативним процедурама и компликацијама (катетери, уретерални стентови, интрахоспиталне инфекције, лежање) (174). Вирусне инфекције се обично јављају од првог до шестог месеца после трансплантације, а оне јесу узрочно повезане са интезитетом примењене имunosупресивне терапије, па тако и са применом такролимуса (174). У групи наших пацијената, после прва 2 месеца је код 7 пацијената (6,4%) доказана инфекција цитомегаловирусом која је захтевала примену антивирусних лекова, док је код 2 пацијента доказана инфекција са полиома (БК) вирусом. Треба, међутим, напоменути да је учесталост вирусних инфекција вероватно била и већа, будући да у појединим временским периодима нису биле доступне све дијагностичке методе за потврду ових инфекција. Поред примене антивирусних лекова, вирусне инфекције су третиране и смањењем имunosупресивних лекова, најчешће смањењем дозе или привременим (ретко дефинитивним) прекидом примене антипролиферативних лекова, што је у складу са важећим препорукама (175). Сасвим ретко је смањивана доза такролимуса, а његова примена због инфекције није прекидана ни код једног пацијента у посматраној групи.

Нежељене реакције на такролимус могу бити тако озбиљне да могу довести и до трајног прекида примене овога лека (90). У испитиваном периоду од годину дана је код 9 пацијената (8,2%) трајно прекинута примена такролимуса због озбиљних нежељених ефеката. У нашој ранијој студији, где је као основни калцинеурински инхибитор примењиван циклоспорин, овај лек је током првих 12 месеци од трансплантације трајно искључен из терапије код 18% пацијената, што је значајно више него у садашњој студији (134). Као што је већ поменуто, у студији са циклоспорином једна група пацијената је у раном периоду после трансплантације примала максималне дозе овога лека, што је био разлог и веће учесталости акутне нефротоксичности и одложене функције графта. У сваком случају, дефинитивни и/или рани прекид примене такролимуса после трансплантације представља непожељни сценарио који може неповољно утицати на дугорочну судбину графта (176), што представља један од разлога због чега би било значајно унапред идентификовати пацијенте код којих се може очекивати оваква реакција на лек.

6.4. Терапијски мониторинг такролимуса

Као параметри терапијског мониторинга такролимуса праћени су укупна дневна доза лека (збир јутарње и вечерње дозе), минимална концентрација лека у крви измерена 12 сати после претходне дозе (C_{min}), као и прерачунати однос концентрације лека у крви и дозе лека по килограму телесне масе.

Може се видети да су испитивани пацијенти имали задовољавајуће просечне концентрације такролимуса у крви у раном периоду после трансплантације: 3. дана је просечна концентрација била 11,09 ng/ml, а 7. дана 10,29 ng/ml. Просечне концентрације такролимуса су код наших пацијената током првих 7 дана биле у складу са препорукама већине аутора (128, 162). Међутим, у испитиваној групи смо регистровали и прилично велике варијације у концентрацијама лека. Ово је посебно било изражено 3. дана од трансплантације: поједини пацијенти су у том (првом) мерењу имали концентрацију такролимуса од 3-4 ng/ml, али је било и оних код којих је концентрација лека била и преко 30 ng/ml. Управо овај податак говори како је код неких пацијената тешко доzirати такролимус у раном периоду после трансплантације, будући да се унапред не може предвидети како ће одређени пацијент одговорити на стандардне почетне дозе лека. Када се међусобно упореде параметри терапијског мониторинга такролимуса 3. и 7. дана, налази се значајна разлика у укупној дневној

дозе лека и у односу концентрације и дозе лека, док су, као што смо већ поменули, остварене концентрације веома сличне. Ово показује да је од првог мерења концентрације лека 3. дана, па до другог мерења 7. дана такролимус био адекватно дозиран: у овом интервалу су дозе лека очигледно повећаване, будући да је просечна дневна доза лека 7. дана била већа за око 2 mg у односу на 3. дан, што је статистички значајна разлика. Може се закључити да је код наших пацијената од 3. дана повећавана доза такролимуса, при чему је концентрација лека 7. дана била и нешто нижа, па је однос концентрације и дозе лека већ 7. дана био статистички значајно нижи у односу на вредност 3. дана. Овакви резултати терапијског мониторинга у раном периоду могу делимично да указују на индивидуалну разлику у функцији ензима који метаболишу лек (што се чак може наслутити већ после првог мерења концентрације лека), али ипак мислимо да, у овом периоду, код већине пацијената, просто одражавају нормалне физиолошке процесе, будући да се од 3 до 5 дана успоставља функција дигестивног система, посебно жучи, што доводи до бржег метаболизма лека (57). Такође, у овом периоду се и значајније смањује доза кортиостероида, за које је познато да у већим дозама инхибишу ензиме цитохрома и успоравају разградњу такролимуса (33). Ови резултати су у сагласности са подацима из литературе, где је описано да се код већине пацијената равнотежно стање такролимуса у организму постиже од 3. до 5. дана после трансплантације (49). Важно је напоменути да смо овакав тренд у раним концентрацијама такролимуса и ми запазили у свакодневном клиничком раду, па често повећавамо дозу лека уколико концентрација лека на првом мерењу није преко 10 ng/ml и ако постоји добра функција графта и нема хирушких компликација које би компромитовале рад црева и одложиле перорални унос хране.

У периоду од првог месеца па до краја прве године, просечне концентрације такролимуса у испитиваној групи су се кретале у циљним терапијским границама. Може се видети да је после месец дана просечна концентрација такролимуса готово иста као концентрација лека 3. и 7. дана, док је касније била статистички значајно мања. Одржавање већих концентрација лека током првих месец дана је, очигледно, циљно рађено да се осигура добра изложеност леку у раном периоду после трансплантације, када је учесталост одбацивања највећа. У периоду од 1. месеца па до краја 1. године после трансплантације, код испитиваних пацијената постоје значајне разлике у сва три посматрана параметра терапијског мониторинга: уочава се статистички значајан тренд смањивања укупне дневне дозе и концентрације лека у

крви, као и тренд повећања прерачуног односа концентрације и дозе такролимуса, што је све и очекивано и пожељно.

6.5. Коефицијент варијабилности такролимуса и његова повезаност са појединим параметрима посматрања

Borra и сарадници су показали да су варијације концентрација такролимуса код истог пацијента фактор ризик за настанак акутног одбацивања, хроничне дисфункције и губитка графта (177). С обзиром да нема пуно студија о овом проблему на великом броју пацијената, у испитиваној групи смо израчунали коефицијент варијабилности такролимуса и анализирали његов утицај на одређене параметре током 12 месеци од трансплантације.

Просечна вредност коефицијента варијабилности такролимуса код наших пацијената је била 31,54%. У различитим студијама коефицијент варијабилности се креће од 15-35% (178), док се у упутству произвођача лека наводи да износи 20-30% (44, 132). Нешто већи коефицијент варијабилности који смо добили у овој студији могао би се, делимично, објаснити и методом израчунавања која је коришћена у овој студији: према алгоритму направљеном од стране произвођача (132), коефицијент варијабилности смо израчунавали из 3 до 5 измерених концентрација и доза лека у периоду од 12 месеци. Овакав дуг посматрани временски период има за последицу већу варијабилност него да су мерења ових параметара обављена током месец дана или у још краћем временском интервалу. Код наших пацијената нисмо нашли статистички значајну повезаност коефицијента варијабилности такролимуса са одређеним испитиваним параметрима. Међутим, одређене разлике (које нису статистички значајне) ипак постоје: коефицијент варијабилности је био већи код жена, код нефункционалне форме *CYP3A* ензима, код пацијената код којих је донорски бубрег био старији од 60 година, као и код трансплантација од живог даваоца и код пацијената који су имали акутно одбацивање.

Осим овога, на основу медијане израчуног коефицијента варијабилности, пацијенте смо поделили у 2 групе: на оне који су имали коефицијент мањи од 25% и на оне код којих је коефицијент био већи од 25%. Више од половине наших пацијената (54,5%) су имали коефицијент варијабилности већи од 25%. Пацијенти који су имали коефицијент варијабилности већи од 25% имали су лошији клиренс креатинина после 12 месеци, али ова разлика није била статистички значајна. Такође, није нађена

статистички значајна разлика међу групама у односу учесталост акутног одбацивања, прекида примене такролимуса, као и дистрибуције изоформи генетског полиморфизма за *CYP3A5*, *CYP3A4* и П-гликопротеин. *Spierings* и сарадници, у студији која је обухватила 118 пацијената са стабилном функцијом графта 12 месеци после трансплантације такође нису нашли удруженост *CYP3A5* генотипа са интраиндивидуалном варијабилноћу пацијената (179).

6.6. Фармакогеномска анализа

6.6.1. Анализа учесталости полиморфизама *CYP3A5* A6986G, *CYP3A4* A392G и *ABCB1* C3435T у испитиваној групи пацијената

Већ је наведено да *SNPs* за гене који кодирају ензиме *CYP3A4*, *CYP3A5* и транспортер П-гликопротеин имају за последицу значајне разлике у њиховој функцији. С обзиром да се такролимус примарно метаболише преко ових ензима, ове генске разлике у појединим нуклеотидима имају велики утицај на концентрацију такролимуса у крви и, посредно, на судбину графта (130). Највећи број радова из ове области односи се на утицај полиморфизма за *CYP3A5* ензим на концентрацију такролимуса у крви. Показано је да пацијенти са генотипом који кодира функционалну форму *CYP3A5* ензима имају и до 40-50% веће потребе за такролимусом да би одржали концентрацију лека у терапијским границама (180, 181). Са друге стране, пацијенти који имају нефункционалну форму овог ензима имају већу изложеност такролимусу и потребна им је мања доза лека (64, 182). „Дивљи тип“ гена се означава као *CYP3A5**1*1 (*AA*) и кодира потпуно функционални *CYP3A5* ензим, док *CYP3A5**1*3 (*AG*) алел кодира нешто мање активан, али, још увек, функционалан *CYP3A5* ензим. Хомозиготна форма *CYP3A5**3*3 (*GG*) гена кодира нефункционалан облик ензима и посебно је интересантна за нас, будући да се сматра да је оваква форма ензима у највећем проценту заступљена код беле популације (64). Међутим, поставља се питање да ли оваква учесталост нефункционалне форме ензима постоји и код пацијената беле расе који живе на различитим просторима, односно, каква је учесталост појединих *SNP* за испитиване ензиме у нашој средини. Због тога смо код испитиваних пацијената прво анализирали учесталост најзначајнијих генских полиморфизама за ензиме *CYP3A5* и *CYP3A4*, као и за ефлукс пумпу П-гликопротеин.

У испитиваној групи, анализа *SNP CYP3A5 A6986G*, најзначајнијег полиморфизма гена за *CYP3A5*, је показала да већина пацијената има тзв. неекспресорну (нефункционалну) варијату гена за ензим *CYP3A5*. Од укупно 110 пацијената, 94 пацијента (85,5%) су били носиоци *CYP3A5*3*3 (GG)* изоформе алела, хомозиготне форме за *G* нуклеотид, која кодира нефункционални *CYP3A5* ензим. При томе, *G* алел је био присутан у 92,73%, а *A* алел у 7,27% у односу на све алеле *CYP3A5* генотипа код испитиваних пацијената. И у нашој ранијој студији, на узорку од 211 пацијената који су трансплантирани у нашем Центру, добијен је готово идентичан резултат: *CYP3A5*3*3 (GG)* изоформу алела је имало 84,8% пацијената (183). Ђорђевић и сарадници су код 140 здравих добровољаца у Србији одредили исти полиморфизам за *CYP3A5* ензим и код 84,7% испитаника показали постојање *CYP3A5*3*3* алела, што је скоро идентично резултату у овој студији (184). Већа учесталост нефункционалне форме *CYP3A5* ензима код пацијената беле расе је показана и у другим срединама (67). Тако, на пример, *Larriba* и сарадници су у Аргентинској популацији нашли учесталост *CYP3A5*3*3* алела код 89% здравих контрола и 85,7% трансплантираних пацијената (185). Насупрот томе, *CYP3A5*1*1 (AA)* и *CYP3A5*1*3 (AG)* форме алела, које кодирају функционални ензим *CYP3A5*, су значајно ређе заступљене код пацијената беле расе. Код пацијената у нашој студији, функционална форма ензима је била заступљена код само 14,5% пацијената, што је веома слично резултатима који су добили и други аутори, који, код пацијената беле расе, описују учесталост функционалне форме ензима од 5-15% (67). Насупрот томе, *CYP3A5*1*1 (AA)* и *CYP3A5*1*3 (AG)* форме алела су заступљене код око 45-73% Афро-Американаца, као и код 15-35% пацијената Азијске популације (186). Многи аутори су већ раније описали да пацијенти Афро-Америчке расе захтевају веће дозе такролимуса од пацијената беле расе да би постигли исту концентрацију лека у крви (187). *MacPhee*, у раду који је објављен пре више од 10 година, наводи да су код Афро-Америчких пацијената у његовом центру емпиријски примењиване двоструко веће дозе такролимуса у раном периоду после трансплантације у жељи да се постигну терапијске концентрације лека (188, 189). Добијени резултати и сазнања о разликама у дистрибуцији функционалне форме *CYP3A5* ензима између појединих раса сада могу да објасне ова емпиријска запажања (190).

Са становишта заступљености функционалне форме ензима међу појединим расама, потпуно је другачија ситуација код *CYP3A4-392A>G*, најчешћег *SNP* за *CYP3A4* ензим. Највећи број пацијената у овој студији (102 од 110 пацијената, или

92,7%) је имао изоформу *CYP3A4*1*1* (AA) која кодира функционални облик *CYP3A4* ензима, док су *CYP3A4*1A*1B* (AG) и *CYP3A4*1B*1B* (GG) форме, које кодирају нефункционални ензим, регистроване код свега 8 (7,3%) испитиваних пацијената. При томе је *CYP3A4 A* алел био присутан у 95,91%, а *G* алел у само 4,09% пацијената. Овакву дистрибуцију функционалне форме *CYP3A4* ензима су описали и други аутори. *Provenzani* и сарадници су збирно приказали резултате неколико студија у којима је испитивана учесталост овог полиморфизма за *CYP3A4* ензим и показали учесталост *CYP3A4*1B SNP* и нефункционалне форме *CYP3A4* ензима код 2-10% белаца, 4,2-11% Латино-Американаца и 35-67% Афро-Американаца (68).

Утицај *ABCB1 3435 C>T SNP* на функционално стање П-гликопротеина и на фармакокинетску варијабилности такролимуса је испитиван у бројним студијама, али су резултати неконзистентни (191, 192). У нашој студији, за разлику од ситуације са генским варијантама за *CYP3A5* и *CYP3A4* ензиме, анализа *ABCB1* генотипа није показала преминацију једне одређене генске форме код испитиваних пацијената: око две трећине пацијената (74,5%) су имали *CC* и *CT* изоформе које кодирају функционални облик П-гликопротеина, док је *TT* изоформа, која кодира нефункционални облик овог транспортног протеина, била заступљена код 25,5% пацијената. При томе се може израчунати да је посматраној популацији било присутно 55,45% *C* алела и 44,55% *T* алела *ABCB1* генотипа. *Kroetz* и сарадници су показали учесталост *TT* изоформе и нефункционалног П-гликопротеина код 5% Афро-Американаца, 27% Азијата и 32% белаца, што је доста слично учесталости коју смо и ми добили у овој студији (193). Интересантно је запажање да *TT* хаплотип и нефункционални П-гликопротеин могу бити удружени са повећаним депоновањем такролимуса у крвним ћелијама и у нервном систему, што може бити удружено са испољавањем неуротоксичних ефеката лека (194).

Комбинацијом сва 3 посматрана генотипа код наших пацијената закључено је да је највише било пацијената са *CYP3A5GG*, *CYP3A4AA* и *ABCB1CC/TT* изоформама алела (60,91%), док су само по 1,82% пацијената су били носиоци *CYP3A5 AA/AG*, *CYP3A4 AA/GG* и *ABCB1 TT* или *CC/TT* изоформи алела. Тек дуже и свеобухватније праћење на већем броју пацијената ће моћи да одговори на питање о значају узајамне повезаности појединих комбинација алела и генотипова код пацијената и клиничких исхода везаних за графт после трансплантације.

6.6.2. Утицај генског полиморфизма на параметре терапијског мониторинга такролимуса

Упоредном анализом параметара терапијског мониторинга такролимуса и варијанти генског полиморфизма за *CYP3A5* ензим код испитиваних пацијената добијена је значајна разлика у већини анализираних временских пресека.

Што се дозе такролимуса тиче, није се регистровала статистички значајна разлика у примењеној дневној дози такролимуса између експресора и не-експресора за *CYP3A5* ензим 3. и 7. дана од трансплантације, мада је 7. дана дневна доза лека код експресора била већа за нешто више од 1 mg у односу на неекспресоре. Одсуство разлике у примењеним дозама лека у најранијем периоду после трансплантације је разумљиво, с обзиром да су током прва 3 дана после операције примењиване исте почетне дозе такролимуса за све пацијенте (по mg/kg), а да је прво подешавање дозе вршено после првог мерења концентрације лека у крви, 3. дана од трансплантације. Међутим, у каснијем периоду, дневна доза такролимуса је била статистички значајно већа код пацијената са *AA* и *AG* изоформама ензима (*CYP3A5* експресори) у односу на *GG* изоформу (*CYP3A5* неекспресори) у свим испитиваним временима- после 1., 3., 6. и 12. месеца од трансплантације. Код *CYP3A5* експресора, укупна дневна доза такролимуса је већ 7. дана била већа за 9,8% у односу на неекспресоре, после месец дана 56,2%, после 3 месеца 103%, после 6 месеци 126%, а после 12 месеци 120%. Овакав налаз је у сагласности са резултатима који су добијени и у другим студијама у којима је поређена дневна доза такролимуса у односу на функционално стање *CYP3A5* ензима и где је, такође, дневна доза такролимуса била значајно већа код пацијената који су били експресори за *CYP3A5* ензим (66, 195).

Насупрот томе, када смо код наших пацијената анализирали концентрације такролимуса у крви у односу на функционално стање *CYP3A5* ензима, нашли смо да значајна разлика у концентрацијама такролимуса постоји само током првих 7 дана од трансплантације: пацијенти са нефункционалном формом *CYP3A5* ензима су 3. и 7. дана после трансплантације имали статистички значајно већу концентрацију такролимуса у крви у односу на пацијенте са функционалном формом *CYP3A5* ензима. Дакле, може бити интересантно запажање да су не-експресори за *CYP3A5* ензим већ од самог почетка примене такролимуса слабије метаболисали лек од експресора, па су имали веће концентарције лека већ при првом мерењу 3. дана, а такође и 7. дана будући да, највероватније, није било довољно времена за фино подешавање

концентрације лека. Међутим, од првог месеца, па до краја прве године, концентрација такролимуса у крви се није статистички значајно разликовала између експресора и не-експресора за CYP3A5 ензим: просечна концентрација лека је 1. и 3 месеца била нешто већа код не-експресора, али без статистичког значаја, док је после 6 и 12 месеци чак била и већа код CYP3A5 експресора. Овакав налаз се може објаснити релативно честим корекцијама дозе и концентрације лека током првих 12 месеци после трансплантације.

Када смо код наших пацијената анализирали однос концентрације такролимуса у крви са дневном дозом лека, нашли смо да је овај однос статистички значајно већи у свим испитиваним временима код пацијената са нефункционалном формом CYP3A5 ензима у односу на пацијенте који имају функционалну форму ензима. Ово је важан налаз, с обзиром да је последњих година објављено неколико студија у којима је добијен сличан резултат и у којима се сугерише да би однос концентрације и дозе могао бити веома добар и поуздан показатељ брзине елиминације такролимуса, а тиме и значајан параметар у терапијском мониторингу лека. *Stratta* и сарадници су међу првима указали да однос концентрације и дозе може бити добар сурогат маркер за биорасположивост такролимуса, будући да су у својој студији показали да су пацијенати код којих је однос концентрације и дозе такролимуса био висок били спори метаболизери такролимуса и да им је била потребна мања доза лека за постизање жељеног нивоа у крви (120). У својој докторској дисертацији која је објављена недавно, Немања Ранчић је код пацијената који су трансплантирани у нашем центру применом мултипле регресионе анализе показао да је однос концентрације и дозе такролимуса осетљивији параметар терапијског мониторинга у односу на концентрацију лека у крви пре следеће дозе (196). Међутим, аутор наглашава да су, с обзиром на релативно велику варијабилност нађеног односа, потребна даља испитивања оба параметра у будућим клиничким студијама (197). Резултати које смо добили у овој студији веома убедљиво потврђују значај односа концентрације и дозе такролимуса, с обзиром да смо у свим испитиваним временима нашли статистички значајну разлику између експресора и не-експресора за CYP3A5 ензим. Чак шта више, у нашој студији се разлика у овом односу између експресора и не-експресора за CYP3A5 ензим појављује чак и у најранијем периоду после трансплантације, већ 3. и 7. дана: при примени истих доза такролимуса, пацијенти са нефункционалном формом ензима су констатно имали статистички значајно већи однос концентрације и дневне дозе лека. Иако значајност овога треба да се потврди и у другим студијама, могуће је да ће овај однос, као што су указали *Stratta* и сарадници (120), постати индиректни маркер

врсте генског полиморфизма за *CYP3A5* ензим, односно, функционалног стања *CYP3A5* ензима, на основу кога би се могао проценити степен биорасположивости такролимуса већ на првим мерењима концентрације лека после трансплантације. Овоме иду у прилог и резултати *ROC* анализе, којом смо показали да сагледавање односа концентрације и дозе лека 7. дана након трансплантације може да буде веома добар индикатор брзине елиминисања такролимуса из организма и његов сензитивнији показатељ од саме измерене минималне концентрације лека у крви пацијента 12 сати након последње примене лека. Овакав рани маркер биорасположивости лека би значајно олакшао и индивидуализовао примену такролимуса код трансплантираних пацијента.

За разлику од ефеката полиморфизма и функционалног стања *CYP3A5* ензима, утицај *CYP3A4-392A>G SNP* на функционално стање *CYP3A4* ензима и на фармакокинетику такролимуса је мање јасан. *Cho* и сарадници, у групи од 70 пацијената из Кореје нису нашли повезаност полиморфизма гена за *CYP3A4* са дозама такролимуса током првих 6 месеци од трансплантације (198), а сличан резултат су добили и *Roy* и сарадници (199). *Hesselink* и сарадници су код 64 трансплантираних пацијената нашли да су носиоци *CYP3A4*1B* полиморфизма (који имају нефункционалан *CYP3A4* ензим) имали нижи однос концентрације и дозе такролимуса у односу на пацијенте са „дивљим типом“ алела и функционалним ензимом. Треба напоменути да је ово управо супротан налаз од онога који је описан за однос концентрације и дозе код полиморфизма за *CYP3A5* ензим (63). И ми смо, код испитиваних пацијената, такође нашли нижи однос концентрације и дозе такролимуса код носиоца *CYP3A4*1B* полиморфизма у односу на изоформе *AA* и *AG* у свим посматраним временским интервалима, али ова разлика ни у једном испитиваном времену није била статистички значајна.

Што се тиче *CYP3A4-392A>G SNP* и концентрација такролимуса, *Gervasini* и сарадници су у студији која је обухватила 103 трансплантирана пацијента у Шпанији нашли да су носиоци *CYP3A4*1B* алела и нефункционалног *CYP3A4* ензима имали концентрације такролимуса које су за 59% биле ниже од концентрација лека код носилаца *CYP3A4*1*1* генотипа (131). И ово су, на први поглед, изненађујући резултати, будући да *CYP3A4*1B* генотип кодира нефункционални *CYP3A4* ензим, па би се очекивале више, а не ниже, концентрације такролимуса у крви при истој дози лека. Међутим, оно што је веома интересно, а што може објаснити ову привидну нелогичност, је откриће да постоји везана неравнотежа (енгл. *linkage disequilibrium*)

између *CYP3A4* и *CYP3A5* полиморфизма, и да су носиоци *CYP3A4*1B* алела такође веома често носиоци и *CYP3A5*1*1* алела. Birdwel и сарадници сматрају да ова везана неравнотежа са *CYP3A5*1*1* алелом вероватно лежи у основи специфичног утицаја *CYP3A4*1B* генотипа на фармакокинетику такролимуса која је описана у неким студијама (200). Чак шта више, неки аутори сматрају да заједнички *CYP3A4*1B-CYP3A5*1*1* хаплотип има значајнији утицај на фармакокинетику такролимуса од утицаја изолованог алела *CYP3A5*1*1* (131). Што се тиче концентрација такролимуса у крви и односа са *CYP3A4* полиморфизмом код наших пацијената, и ми смо добили сличан налаз као аутор из Шпаније- концентрације лека у свим испитиваним временима (осим после 12 месеци) биле ниже за око 10-15% у групи пацијената који су имали нефункционалну форму *CYP3A4* ензима, али ова разлика није била статистички значајна.

Сличан резултат се добија и када се анализирају дозе такролимуса у односу на варијанте *CYP3A4-392A>G SNP* код наших пацијената. Уочава се да је код пацијента са нефункционалном формом *CYP3A4* ензима примењивана већа (а не мања) просечна дневна доза лека од првог месеца после трансплантације па све до краја испитиваног периода, у поређењу са пацијентима који су имали функционални облик *CYP3A4* ензима. Код пацијената са нефункционалном формом *CYP3A4* ензима, 1. месеца је примењена за 14,8%, 3. месеца 34,7%, 6. месеца 45,9%, а 12.месеца 30,6% већа дневна доза такролимуса у односу на *CYP3A4* експресоре. Ова разлика у примењеној дози је ипак значајно мања него код *CYP3A5* полиморфизма, где је, како смо видели, 6. месеца дневна доза такролимуса била за 126%, а 12. месеца 120% већа код *CYP3A5* експресора у односу на не-експресоре. И овај неочекиван резултат у параметрима терпијског мониторинга такролимуса код *CYP3A4* полиморфизма се, вероватно, може објаснити претходно поменути запажањима о везаној неравнотежи генотипова *CYP3A4*1B* и *CYP3A5*1*1*, као и доминантном утицају генотипа *CYP3A5*1*1* (који кодира функционални *CYP3A5* ензим) на метаболизам такролимуса код наших пацијената.

На основу изнетих резултата, може се претпоставити да генски полиморфизам *CYP3A4* ензима има мање важну улогу у односу на полиморфизам *CYP3A5* ензима, али су, у сваком случају, потребна даља истраживања, посебно утицаја везане неравнотеже *CYP3A4*1B* и *CYP3A5*1*1* генотипова на метаболизам такролимуса (201).

Треба још напоменути да су пре неколико година Wang и сарадници описали нови *CYP3A4 SNP*: *CYP3A4*22* и претпоставили да има важну улогу у метаболизму неких лекова (202). Elens и сарадници су показали да је овај полиморфизам значајно утицао

на фармакокинетику такролимуса код њихових пацијената (203). У нашој студији ми нисмо били у могућности да одредимо *CYP3A4*22* полиморфизам.

Резултати студија које су испитивале утицај генског полиморфизма *ABCB1 3435 C>T* на параметре терапијског мониторинга такролимуса такође нису конзистентни. Већина аутора није успела да покаже да овај полиморфизам, сам по себи, има утицај на фармакокинетику такролимуса (131, 204), али су неки аутори добили и супротне налазе (180, 205). Могуће је да је за овакве резултате такође одговорна везана неравнотежа појединих генотипова за *ABCB1* ген (која није до краја испитана) као и у случају гена за *CYP3A4*, што отежава интерпретацију резултата утицаја једног изолованог полиморфизма.

Код наших пацијената анализом *ABCB1 3435 C>T SNP* нису добијене значајне разлике између пацијената са функционалном и нефункционалном формом П-гликопротеина у односу на дозе, концентрације и однос концентрације и дозе такролимуса. Мада разлика није статистички значајна, ипак се уочава да је однос концентрације и дозе лека био већи код *TT* алела и нефункционалне форме П-гликопротеина у периоду од 1. до 12. месеца, што је сличан налаз који смо добили анализом овога односа код нефункционалне форме *CYP3A5* ензима. Овакав налаз концентрације и дозе такролимуса и *ABCB1 3435 TT* полиморфизма нашли су и *Lopez-Montenegro Soria* и сарадници код 35 пацијената са трансплантираним бубрегом (180). На основу до сада познатих резултата, може се закључити да изоловани полиморфизам *ABCB1 3435 C>T* нема константан утицај на метаболизам такролимуса (68), али и да су потребна даља истраживања, посебно у правцу утицаја везане неравнотеже ових генотипова како међусобно, тако и са полиморфизмима гена за *CYP3A5* ензим.

6.6.2.1. Генски полиморфизам и концентрације такролимуса у крви

Да би ближе сагледали утицај генског полиморфизма на концентрације такролимуса у крви, наше пацијенте смо према оствареним концентрацијама такролимуса поделили у 3 групе: у првој групи су били пацијенти који су имали концентрације мање од 6 ng/ml, у другој од 6 до 10 ng/ml, а у трећој пацијенти код којих је концентрација лека била преко 10 ng/ml.

Анализом остварених концентрација у испитиваним временским интервалима уочава се да је у раном периоду после трансплантације значајан број пацијената имао концентрације такролимуса изнад 10 ng/ml: 3. и 7. дана овакве концентрације су нађене

код 44,54% пацијената, а после месец дана код 47,27% пацијента. У 3. месецу после трансплантације је највећи број пацијената (54,54%) имао концентрацију лека у жељеном опсегу од 6-10 ng/ml, док је изнад 10 ng/ml било само 11,81% пацијената. Шестог и 12. месеца у циљном терапијском опсегу је било 44,4% и 38,1% пацијената, али је значајан број пацијената имао концентрацију такролимуса испод циљних вредности (6 ng/ml): оваквих пацијената је после 6 месеци било 44,54%, а после 12 месеци 47,27%. Ово може бити важан податак који, према актуелним ставовима већине аутора, па и нашем, показује извесну субдозираност такролимуса у каснијим фазама после трансплантације код наших пацијената. Овакав налаз је, највероватније, последица тренда који је био актуелан после, раније поменутих, радова *Nankivell* и сарадника у првим годинама овога века (99, 206) где су нађене хистолошке промене (за које се сада сматра да су недовољно специфичне, а за клинички исход, вероватно, и не битне) у великом броју графтова на „протокол биопсијама“ (рутинске биопсије графта у одређеним временским периодима, урађене без клиничког разлога). Као што је поменуто, ови резултати су покренули тренд „минимизације“ доза и концентрација инхибитора калцинеурина, најчешће 3 до 6 месеци после трансплантације (207, 208), у жељи да се превенира развој такозване хроничне алогографт нефропатије изазване инхибиторима калцинеурина, ентитета чије постојање сада многи аутори такође доводе у питање (104).

Опште је прихваћено да је субдозираност такролимуса један од фактора ризика за настанак акутног одбацивања графта (209). Када код наших пацијената погледамо учесталост субдозираности такролимуса у раном периоду после трансплантације, што је и најчешћи период када долази до акутног одбацивања, може се уочити да она није била превише изражена: 7. дана је концентрацију испод 6 ng/ml имало 22,7% пацијената, 1. месеца 18,1%, а 3. месеца 26,3% пацијената.

Међутим, слика је другачија када се изоловано погледају просечне вредности такролимуса 3. дана после трансплантације. На првом мерењу концентрације лека, у временском периоду у коме, углавном, није било промене дозе лека (период од прва 3 дана после трансплантације) највећи број пацијената је имао или ниске (30% пацијената), или високе (44,5% пацијената) концентрације лека, а само је 18,1% пацијената имало циљне концентрације лека у крви. Међутим, већ 7. дана је постигнута циљна концентрација лека код још 10% пацијената (од 18,1% на 28,1%) и то на рачун смањења броја субдозираних пацијената (од 30% на 22,7%). И ови резултати показују да постоје значајне индивидуалне разлике у метаболисању такролимуса, у чијој

основи, као један од разлога, може бити различита функционална активност *CYP* ензима. То индиректно показује релативно велики број пацијената који су имали концентрације лека преко 10 ng/ml 3., 7. и 30. дана од трансплантације (44,5%, 44,5% и 47,2%), што је и очекивано, с обзиром да је, како смо показали, највећи број наших пацијената имао нефункционалну форму *CYP3A5* ензима. Сигурно је да би овакве концентрације такролимуса, да су потрајале, имале за последицу значајано већи број раних нежељених клиничких догађаја, да није било корекција доза и концентрација лека у наредним данима и недељама после трансплантације. Међутим, треба напоменути да чешћа мерења и прилагођавања дозе лека свакако изискују додатно клиничко, лабораторијско и материјално ангажовање.

Када овако подељене концентрације такролимуса корелирамо са налазима генског полиморфизма за поменуте ензиме, видимо да постоје разлике у концентрацијама лека између експресора и не-експресора за *CYP3A5* ензим. Уочава се да се већ 7. дана после трансплантације може наслутити о каквом се метаболизеру такролимуса ради: већина не-експресора за *CYP3A5* ензим је у најранијем периоду после трансплантације имала концентрацију такролимуса изнад 10 ng/ml: 3. дана је ове концентрације имало 52,9%, а 7. дана 52,7% не-експресора. Овакав тренд концентрација код *CYP3A5* не-експресора се одржава током прва 3 месеца после трансплантације, а после тога се губи. Временски период после 3 месеца је, генерално, био период када су испитивани пацијенти ушли у стабилан дозно-концентрацијски опсег (смањивањем дозе лека код не-експресора, а повећањем код експресора); претходно је већ показано да је, неvezано за полиморфизме, у том периоду више од половине испитиваних пацијената (54,54%) имало концентрацију такролимуса у опсегу од 6-10 ng/ml, док је изнад 10 ng/ml било само 11,81% пацијената. Са друге стране, више од половине пацијената који су имали функционалан *CYP3A5* ензим (изоформе *AA/AG*, експресори) имали су у раном периоду после трансплантације концентрацију такролимуса мању од 6 ng/ml: 3. дана је овакве концентрације имало 53,3%, а 7. дана 50% *CYP3A5* експресора.

На основу овога се може закључити да примена уобичајених доза такролимуса после трансплантације код значајног броја не-експресора за *CYP3A5* ензим може имати за последицу концентрацију такролимуса у крви која изнад жељеног терапијског опсега током првих месец дана од трансплантације, што може бити удружено са одложеном функцијом графта и другим нежељеним ефектима овога лека. Истовремено, значајан број пацијената који су експресори за *CYP3A5* ензим, при примени истих почетних доза, могу имати недовољну концентрацију лека у крви, што

може бити повезано са настанком акутног одбацивања. И ови резултати сугеришу да би примена такролимуса била много адекватнија, лакша и ефикаснија ако би се пре трансплантације, унапред, знало функционално стање *CYP3A5* ензима.

Што се тиче утицаја генског полиморфизма *CYP3A4* ензима на концентрацију такролимуса у крви, може се уочити да код наших пацијената није било статистички значајних разлика у односу на жељени опсег концентрација лека. Ипак, неочекивано, види се да је скоро половина пацијената са функционалним обликом *CYP3A4* ензима имала концентрацију такролимуса већу од 10 ng/ml током првог месеца после трансплантације: 3. дана је овакве вредности имало 47,9%, 7. дана 46,9%, а после месец дана 51,6% пацијента. После овог периода смањује се број пацијената који су имали веће концентрације, док се повећава проценат оних који су имали концентрације мање од пожељних. Интересантно је, дакле, да у испитиваној групи функционални облик *CYP3A4* ензима није имао за последицу ниже концентрације такролимуса током првих месец дана. Чак напротив, 3. дана концентрацију мању од 6 ng/ml је имало 31,9% пацијената, 7. дана 22,4%, а после месец дана 18,3% пацијената. И овај резултат указује да код наших пацијената *CYP3A4-392A>G SNP* има мањи утицај на метаболизам такролимуса, као и да свој утицај остварује, највероватније, преко везане неравнотеже са *CYP3A5*1*1* алелом.

Иако нисмо нашли статистички значајне разлике у дистрибуцији пацијената према концентрацији лека у крви у зависности од генског полиморфизма за П-гликопротеин, може се видети да су пацијенти, без обзира на изоформу *ABCB1* транспортера, током првих месец дана имали најчешће ниво лека изнад жељеног опсега. Након тог периода, број пацијената са повећаном изложеношћу такролимусу се смањује, али расте број оних који су били испод жељеног нивоа.

6.7. Утицај генског полиморфизма на неке клиничке исходе код пацијената са трансплантираним бубрегом

Иако је у великом броју студија показан утицај *SNP CYP3A5 A6986G* гена за *CYP3A5* ензим на фармакокинетiku такролимуса (131, 210), ефекат овога полиморфизма на поједине клиничке догађаје, посебно епизоде раног одбацивања, одложеноу функцију графта и друге нежељене ефекте лека до сада није тако јасно показан (68). Као што смо и ми показали у овој студији, један од разлога би свакако могле бити честе корекције доза и концентрација лека у раном периоду после

трансплантације које се практију управо из схватања значаја адекватног мониторинга лека. Ипак, у последње време све већи број аутора указује и на поједине значајне фармакодинамске (клиничке) импликације генски условљених промена у фармакокинетици такролимуса. Због тога смо код испитваних пацијената анализирали и одређене фармакодинамске ефекте такролимуса и њихову могућу повезаност са дистрибуцијом проучаваних полиморфизама.

6.7.1. Генски полиморфизам и акутно одбацивање графта

Акутно одбацивање је најважнији имунолошки разлог губитка графта (211). Акутно одбацивање се најчешће јавља 5-7 дана после трансплантације, али се, у суштини, може јавити у било ком периоду после тога (133). Највећа учесталост акутног одбацивања је током прва 3 месеца од трансплантације, а укупна учесталост током првих 6 месеци варира од 5-40%, зависно од имунолошког ризика пацијента, степена ткивне подударности и врсте имуносупресивног протокола (212). После 6 месеци и касније, акутна одбацивања су ређа, а најчешће су изазвана неадекватном имуносупресијом услед некомпљантности болесника, субдозираности или интеракција имуносупресивних лекова, као и због придружених инфекција или других коморбидитета који могу да утичу на опште стање трансплантираних болесника (17). Нема сумње да су новије технике одређивања ткивне подударности и специфичних антитела код примаоца, усавршена хирушка техника, а посебно, већи избор и бољи мониторинг имуносупресивних лекова, последњих десетак година резултирали значајно бољим једногодишњим преживљавањем бубрежног графта (11). Овај напредак је, добрим делом, узрокован мањом учесталошћу акутног одбацивања у раном периоду после трансплантације (21). Међутим, и поред тога, акутно одбацивање и даље остаје један од најважних разлога за настанак хроничне дисфункције и губитка графта. Већ је раније показано да болесници који нису имали акутно одбацивање током прве године после трансплантације имају значајно боље преживљавање графта у односу на болеснике који су имали одбацивање (213).

У великом броју студија је показана повезаност примене инхибитора калцинеурина са учесталошћу акутног одбацивања (19, 21, 214). Управо због тога је било интересно испитати у којој мери добијене разлике у фармакокинетици такролимуса имају утицај на учесталост акутног одбацивања код испитиваних пацијената.

Већ смо показали да у испитиваној групи учесталост акутног одбацивања током првих 12 месеци после трансплантације није била велика (20,9%), као и да су епизоде одбацивања углавном биле лакше природе. Такође, показали смо да су у тренутку одбацивања, просечне концентрације такролимуса биле у пожељним терапијским границама (9 ng/ml), али и да је опсег концентрација лека био прилично широк (3,3-19,2 ng/ml). Треба напоменути да је појава акутног одбацивања очекивана код пацијента који у раном периоду после трансплантације има концентрацију такролимуса у крви 3,3 ng/ml, али је тешко објашњиво да се одбацивање јави и код пацијента који има концентрацију лека 19,2 ng/ml (162). С обзиром да су подаци за клиничке догађаје били ретроспективни, а да се биопсија графта, углавном, није радила код прве епизоде одбацивања и код клинички лакших форми, врло је вероватно да се код неких пацијената са овако високим концентрацијама такролимуса у тренутку одбацивања и није радило о акутном одбацивању него о акутној калцинеуринској нефротоксичности (215).

Што се тиче удружености акутног одбацивања и генског полиморфизма испитиваних ензима, у нашој студији, генерално, није нађена значајна разлика у учесталости акутног одбацивања графта у односу на испитиване полиморфизме. Ово и није необично, с обзиром да смо раније показали да већина пацијената није била субдозирана у раном периоду после трансплантације, што би могао бити фактор ризика за настанак одбацивања.

Међутим, ако се издвојено анализирају само пацијенти који су имали одбацивање, уочава се да је већина (78,3%) пацијената имала нефункционалну форму *CYP3A5* ензима и функционалне форме *CYP3A4* ензима (87% пацијената) и транспортера П-гликопротеина (78,2% пацијената). Велики проценат нефункционалне форме *CYP3A5* ензима код наших пацијената са акутним одбацивањем је, на први поглед, необичан, али би се могао објаснити тиме да је пацијената са нефункционалним *CYP3A5* ензимом и било значајно више, као и да одбацивања код наших пацијената, као што је већ речено, нису била удружена са ниском концентрацијом такролимуса у тренутку одбацивања. Са друге стране, интересантан је налаз да су пацијенти који су имали одбацивање у великом проценту имали функционалану форму ензима *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина, мада ови полиморфизми у нашој студији нису били удружени са ниском концентрацијом такролимуса у крви (што би могао да буде разлог за одбацивање графта). Сигурно је да на појаву акутног одбацивања у раном периоду после трансплантације могу утицати различити фактори, од којих је концентрација

такролимуса у крви један од могућих разлога (133). На основу добијених резултата могли би само закључити да код највећег броја испитиваних пацијената у овој студији ниска концентрација такролимуса у крви, највероватније, није била разлог за настанак акутног одбацивања.

У литератури постоји доста противречних налаза по питању удружености полиморфизама метаболизућих ензима за такролимус и акутног одбацивања. У већини студија ова удруженост, као и у нашој студији, није нађена, као, на пример, у студији *Jun* и сарадника код 506 транспланираних пацијената у Кореји (216), или студији *Barrera-Pulid* и сарадника код пацијента са трансплантираном јетром (195). У мета анализи резултата дотадашњих студија, *Staat* и сарадници такође нису нашли повезаност *CYP3A4* и *ABCB1* полиморфизма са фармакодинамским ефектима циклоспорина и такролимуса. Што се тиче полиморфизма за *CYP3A5* ензим, ови аутори закључују да, без обзира на снажан утицај *CYP3A5* 6986A>G полиморфизма на фармакокинетику такролимуса, ипак нема јасних доказа да је овај полиморфизам повезан са акутним одбацивањем графта (137, 191). *MacPhee* и сарадници такође нису нашли удруженост *CYP3A5* SNP са епизодама одбацивања, али су показали да су се епизоде одбацивања јавиле раније код носиоца *CYP3A5**1/*1 и *CYP3A5**1/*3 генотипова (експресори за *CYP3A5* ензим) (188, 189). Међутим, у мета анализи новијих студија, *Rojas* и сарадници закључују да експресорски генотип (*CYP3A5**1 алел), осим утицаја на фармакокинетику такролимуса, ипак може имати утицај и на појаву акутног одбацивања и хроничне нефротоксичности код пацијената са трансплантираним бубрегом (217). Једна од првих студија у којој је добијен овакав резултат је била студија *Quteineh* и сарадника, који су показали да су пацијенти који су били *CYP3A5**1 хомозиготи (експресори) имали ниже концентрације такролимуса и већу учесталост акутног одбацивања у поређењу са пацијентима који су имали генотип *CYP3A5* *1/*3 и *CYP3A5**3/*3 (учесталост одбацивања: 38%, 10% и 9%). Будући да су у својој студији имали и Афро-Америчке пацијенте, а осврћући се на студије у којима није нађена ова удруженост, аутори коментаришу да студије са пацијентима беле расе (као што је то био случај у нашој студији) највероватније немају довољно статистичке снаге да покажу утицај хомозиготног експресорског *CYP3A5**1 генотипа на учесталост одбацивања, с обзиром да је код белаца овај полиморфизам значајно ређе заступљен (218).

Неки аутори наговештавају да би функционално стање ензима у самом графту и локална концентрација такролимуса могли да утичу на настанак одбацивања, без

обзира на концентрацију лека у крви (219), али значај полиморфизма и функције ензима који постоје локално у ткивима тек треба да се дефинише.

У сваком случају, повезаност полиморфизма метаболизућих ензима и акутног одбацивања за сада није јасна због неконзистентних резултата. Потребна су даља истраживања која би, осим полиморфизма у крви, између осталих ствари, вероватно укључила и испитивање полиморфизма ових ензима и локално у графту.

6.7.2. Генски полиморфизам, акутна нефротоксичност и прекид примене такролимуса

Акутна нефротоксичност је један од најчешћих нежељених ефеката такролимуса, а ова појава може отежати, а понекад, привремено или трајно, онемогућити примену овога лека (94). Акутна нефротоксичност је обично реверзибилна, зависна је од дозе такролимуса и повлачи се на смањење дозе лека (93). Повезаност генског полиморфизма ензима *CYP3A5* и *CYP3A4* и транспортера П-гликопротеина и акутне нефротоксичности је испитивана у нашој студији и може се видети да је код укупно 14 (12,7%) пацијената регистрована клинички значајна рана акутна нефротоксичност (током првих 30 дана од трансплантације) која је захтевала или привремени прекид примене такролимуса или смањење дозе лека за више од 30%. Веома упадљив налаз је да су сви пацијенти који су имали рану акутну нефротоксичност имали и нефункционалну форму *CYP3A5* ензима и функционалну форму *CYP3A4* ензима. Ова повезаност делује логично, јер су испитивани пацијенти са нефункционалним *CYP3A5* ензимом имали и веће концентрације такролимуса у крви током првих 7 дана после трансплантације.

Међутим, нису сви аутори добили овакве резултате. Тако, на пример, *Kauyepers* и сарадници, у групи од 304 пацијента, налазе да је нефротоксичност била чешћа код пацијената који су били носиоци *CYP3A5*1* алела (експресори) у односу на оне који нису били експресори овога ензима (32,4% према 15,2%) (204). Акутна нефротоксичност се у овој групи јавила код 25% пацијената којима је за постизање циљне концентрације требала дневна доза такролимуса од 0,2 mg/kg, а код свега 4,5% пацијената којима је требала доза од 0,1 mg/kg. С обзиром да су показали да су носиоци *CYP3A5*1* алела захтевали веће дозе такролимуса, аутори закључују да су пацијенти са функционалним ензимом склони нефротоксичности јер захтевају веће дозе такролимуса. У суштини, овакав налаз није у супротности са нашим резултатима,

с обзиром да се удруженост нефункционалног *CYP3A5* ензима, акутне нефротоксичности и веће концентрације такролимуса у крви који смо ми добили односи на најранији период, првих 7 дана, од трансплантације. У каснијем периоду, понављана повећавања дозе због убрзаног метаболизма лека вероватно представљају перманентни ризик за појаву нефротоксичности коју описују ови аутори. Да је појава акутне нефротоксичности повезана са повећаном концентрацијом такролимуса показали су *Jacobson* и сарадници: у проспективној студији код 945 пацијената, свако повећање концентрације такролимуса у крви за 1 ng/ml у раној фази после трансплантације је код испитиваних пацијената повећало ризик од нефротоксичности за 22% (220). Овај налаз показује оно што смо и ми запазили у овој студији: да је рани период после трансплантације време када је графт посебно осетљив на вазоконстрикторно дејство такролимуса.

Неки аутори су изнели интересантно запажање да би експресорска форма *CYP3A5* ензима, који се у неким мањим количинама може наћи и локално у тубулима, могла да заштити графт од хроничних токсичних ефеката такролимуса због веће локалне разградње и мање слободне фракције лека у ћелијама графта (68). Улога и значај варијанти генског полиморфизма ензима локално у графту ће вероватно представљати нову и веома интересантну област истраживања за боље разумевање и превенцију нефротоксичних ефеката такролимуса.

Дефинитивни прекид примене такролимусау испитиваној групи током првих 12 месеци после трансплантације је забележен код 9 пацијената. Разлози обуставе лека су били појава или погоршање макроангиопатије код 2 пацијента са јувенилним дијабетесом пре трансплатације, хемолиза код 1 пацијента, *de novo* шећерна болест код 2 пацијента, субоптимална функција графта код 2 пацијента и појава малигнитета код једног пацијента. 8 од 9 пацијената (88,8%) код којих је прекинута примена такролимуса били су не-експресори и носиоци не функционалне форме *CYP3A5* ензима, док је код свих ових пацијената ензим *CYP3A4* био функционалан.

У закључку овога дела, резултати у овој студији који су везани за акутну нефротоксичност показују да се код спорих метаболизера какви су *CYP3A5* не-експресори и, генерално, већина пацијената у нашем поднебљу, не може искључити појава ране акутне нефротоксичности, а код неких и прекид примене такролимуса при примени уобичајених почетних доза овога лека.

6.7.3. Генски полиморфизам и шећерна болест после трансплантације

Новонастала шећерна болест после трансплантације је веома озбиљан нежељени ефекат такролимуса који неповољно утиче на преживљавање и графта и пацијента (172). Ова појава се раније доживљавала као једна од узгредних компликација после трансплантације, али се сада зна да вишеструко повећава укупни морбидитет и нежељене кардиоваскуларне догађаје код трансплантираних пацијената (221). Учесталост пост-трансплантационе шећерне болести варира од 3-20%, а чешће се испољава код старијих особа, пацијената са вишком телесне масе, код Афро-Американаца, као и код пацијената који су у анамези имали повишен шећер изазван стресом после операције, после примене кортикостероидне терапије и у трудноћи (222). Шећерна болест се најчешће јавља током првих неколико недеља (до месеци) после трансплантације. Уз све побројане факторе ризика, примена кортикостероида после трансплантације је важан доприноси узрок настанка ове компликације, будући да ови лекови доводе до резистенције на инсулин, што се испољава и код пацијената који нису трансплантирани (172). Примена инхибитора калцинеурина такође доприноси настанку новонастале шећерне болести после трансплантације, при чему такролимус има више испољено дијабетогено дејство од циклоспорина, што је потврђено у многим студијама, између осталих и у *DIRECT* студији (18, 223). За разлику од кортикостероида, сматра се да такролимус, преко свог ФК-везујућег протеина, директно смањује секрецију инсулина из панкреаса (224).

У нашој студији новонастала шећерна болест је регистрована код 9 (8,1%) пацијената. 7 од 9 (77,7%) пацијената који су имали пост-трансплантациони дијабетес су имали и нефункционалну форму *CYP3A5* ензима (*CYP3A5* не-експресори). До сличних резултата су дошли и *Kuypres* и сарадници, који су показали већу учесталост новонастале шећерне болести код пацијената који су имали одложену функцију графта, концентрацију такролимуса већу од 15 ng/ml првог дана трансплантације, као и код пацијената који су били не-експресори за *CYP3A5* ензим. Аутори закључују да је разлог овоме чињеница да су *CYP3A5* не-експресори изложени потенцијално токсичним дозама такролимуса у раном периоду после трансплантације (225).

Резултати у нашој студији потврђују став већине аутора да висока концентрација такролимуса у крви, као последица нефункционалне форме *CYP3A5* ензима, може бити фактор ризика за настанак шећерне болести у раном периоду после трансплантације код одређених пацијената. Чињеница да је 7 пацијената са овом компликацијом у

нашој студији имало и функционалну форму *CYP3A4* езима, као и у случају акутне нефротоксичности, још једном указује да је, код испитиваних пацијената, ензим *CYP3A5* био доминантан у метаболизму такролимса у односу на ензим *CYP3A4* и транспортер П-гликопротеин.

6.7.4. Генски полиморфизам и инфекције после трансплантације

Инфекције су најзначајнији узрок морбидитета и mortalитета код трансплантираних пацијената, посебно у раном периоду после трансплантације. Сматра се да 80% пацијената доживи макар једну инфекцију током прве године после трансплантације (226). Инфекције после трансплантације, дисфункција графта и епизоде акутног одбацивања су блиско повезани са применом имуносупресивне терапије (227). Сматра се да је укупна количина имуносупресивне терапије која је примењена у индукционим протоклима, одржавајућој фази лечења и у терапији акутног одбацивања фактор ризика за настанак инфекције, а не поједини имуносупресивни лек (228). Вирусне инфекције се обично јављају од првог до шестог месеца после трансплантације, а узрочно су повезане са интензитетом примењене имуносупресивне терапије, па тако и са применом такролимуса (174). Цитомегаловирусна инфекција је најчешћа инфекција после трансплантације која се, обично, јавља месец дана од трансплантације са учесталошћу од 30- 70%, уколико није примењена медикаментозна профилакса. Учесталост и испољавање инфекције зависе од серолошког стања донора и реципијента, превентивних мера, као и укупног степена имуносупресије код пацијента (229).

Нема пуно студија у којима је испитиван ефекат генског полиморфизма ензима одговорних за метаболизам такролимуса на учесталост вирусних инфекција. *Hattori* и сарадници су у серији од 52 пацијента у Јапану показали да су носиоци *CYP3A5*1* алела (експресори) имали већу учесталост цитомегаловирусне инфекције и поред нижих концентрација такролимуса у крви. Аутори закључују да би се овај налаз могао објаснити чињеницом да се код *CYP3A5*1* алела чешће повећавала доза такролимуса, па су због тога повремено били изложени високим концентрацијама лека, што је могао да буде фактор ризика за настанак ове инфекције (230). Међутим, ми смо код испитиваних пацијената добили супротан налаз: свих 7 пацијената код којих је регистрована ова инфекција су имали нефункционалну форму *CYP3A5* ензима и веће концентрације такролимуса у крви у раном периоду после трансплантације. Код свих 7

пацијената је ензим *CYP3A4* био функционалан, па можемо закључити да је код наших пацијената не-експресорско стање *CYP3A5* ензима било удружено са већом учесталошћу цитомегаловирусних инфекција.

Из свега сагледаног у овом поглављу, можемо закључити да су код пацијената у овој студији *CYP3A5 A6986G* полиморфизам и функционално стање *CYP3A5* ензима били повезани и са одређеним клиничким дешавањима и исходима после трансплантације бубрега. Може се рећи да је *CYP3A5* полиморфизам имао утицај не само на фармакокинетске карактеристике такролимуса, него и на одређене фармакодинамске ефекте овога лека. Утицај полиморфизма *CYP3A4* ензима и ефлукс пумпе П-гликопротеина је био значајно мањи у поређењу са ефектима функционалног стања *CYP3A5* ензима. Остаје да се види да ли, и у којој мери, полиморфизми и ових ензима могу имати одређеног клиничког значаја, посебно у садејству са полиморфизмом за ензим *CYP3A5*.

6.7.5. Генски полиморфизам и функција графта

Као што је већ поменуто, одложена функција графта је најчешћа рана компликација после трансплантације бубрега (136). Ово стање представља пролазни поремећај функције графта који може бити узрокован већим бројем фактора који код појединог пацијента могу бити испољени у различитом степену (231). Одложена функција графта је неповољна компликација после трансплантације јер потенцира инфламаторне и фиброзне процесе у графту и представља фактор ризика за настанак акутног одбацивања и хроничне дисфункције графта (232). Учесталост одложене функције је различита у појединим центрима, а може варирати од 10-50%. Учесталост одложене функције зависи од много чинилаца, од којих су најважнији: врста трансплантације (од живог донора, кадаверска), време хладне исхемије, претходни боравак на дијализи, старост донора, хирушке компликације, као и примена имunosупресивних лекова. Тако на пример, анализирајући *UNOS* регистар, *Сеска* наводи учесталост одложене функције графта од око 20% у случају „идеалног“ кадаверског донора, а чак 40% када је донор старији од 55 година (233).

Већ је поменуто да је у испитиваној групи одложена функција графта регистрована код 31,8% пацијената, што је, с обзиром на старост донора, учесталост која је слична или чак и нешто нижа од поменуте у *UNOS* регистру. У ранијој студији 50 пацијената из нашег Центра код којих је код 25 пацијената примењен интензивирајући дозни

протокол циклоспорином, без индукције и уз терапијски мониторинг лека 2 сата од примене, а код 25 пацијената примењен стандардни дозни протокол циклоспорина уз индукцију, укупна учесталост одложене функције графта је била 22% (134). Већа учесталост одложене функције у садашњој студији се може објаснити чињеницом да је у овој студији било скоро 30% кадаверских трансплантација (у ранијој студији ниједна), да су донори и реципијенти били нешто старији, а да су реципијенти пре трансплантације дуже били на дијализи у односу на претходну студију (41,7 према 20 месеци). Да ли је примена такролимуса у овој студији допринела већој учесталости одложене функције у односу на ранију у којој је примењен циклоспорин- тешко је рећи, али је вероватније да је одложена функција била изазвана претходно поменутиим факторима. У литератури се, иначе, наводи да је акутна нефротоксичност чешћа код примене циклоспорина у односу на такролимус (94).

Веома интересантан налаз ове студије је да је највећи број испитиваних пацијената са одложеном функцијом графта (32 од 35, или 91,4%) имао и нефункционалну форму ензима CYP3A5. Насупрот томе, у овој групи су само 2 пацијента (5,7%) имали и нефункционалну форму ензима CYP3A4. У студији која је обухватила 200 пацијената у Француској, *Glowatski* и сарадници нису показали повезаност одређеног CYP3A5 генотипа са одложеном функцијом графта, а ни са другим клиничким дешавањима (234). Треба, међутим, истаћи да је код ових пацијената такролимус примењиван тек од четвртог дана после трансплантације, што је ипак значајно другачија ситуација (са више аспеката) него у нашој студији, где је прва доза такролимуса увек примењивана пар сати непосредно пре трансплантације.

Мада разлика није била значајна, у групи пацијената који су имали добру рану функцију графта, креатинин у крви се брже нормализовао код оних пацијената који су поседовали функционални облик CYP3A5 ензима и имали ниже концентрације такролимуса у крви у односу на пацијенте са нефункционалном формом CYP3A5 ензима. У групи пацијената који су имали одложену функцију графта, креатинин се брже нормализовао код пацијената који су имали нефункционални CYP3A5 ензим у односу на пацијенте са функционалним ензимом (18,23 дана према 24,33 дана). Може се претпоставити да је разлог овоме то што је код пацијената са одложеном функцијом графта брзо и значајно смањивана доза такролимуса, па је тиме значај функционалног стања CYP3A5 ензима минимализован.

Ови резултати показују да је у испитиваној групи CYP3A5 A6986G полиморфизам имао утицај на рану функцију графта: пацијенти са нефункционалном формом ензима

(CYP3A5 не-експресори, којих је у студији иначе било значајно више него CYP3A5 експресора) су уз повишене концентрације такролимуса у крви, чешће имали одложену функцију графта, креатинин у крви се нешто спорије нормализовао када је постојала непосредна функција графта, али је био и просечно мањи 7 дана после трансплантације у односу на пацијенте са функционалном формом CYP3A5 ензима. После овог периода, од 1 месеца па до краја прве године, функција графта се није статистички разликовала између CYP3A5 експресора и не-експресора, али је концентрација креатинина у крви у свим испитиваним временима била ипак била нижа код не-експресора за CYP3A5 ензим. Иста ситуација је била и код полиморфизма за CYP3A4 ензим: у свим испитиваним временима носиоци нефункционалне форме CYP3A4 ензима су имали ниже концентрације креатинина у односу на пацијенте са функционалним ензимом, мада ова разлика није била статистички значајна.

Када се посматрају вредности прерачуног клиренса креатинина 6 и 12 месеци после трансплантације у односу на генски полиморфизам, може се уочити да, такође, није нађена статистички значајна разлика у испитиваним параметрима, мада су овде пацијенти са нефункционалном формом CYP3A5 и CYP3A4 ензима имали (статистички незначајно) нешто нижи клиренс креатинина у односу на пацијенте који су имали функционалне форме ових ензима.

Sato*h* и сарадници су у циљаним биопсијама графта после годину дана од трансплантације код CYP3A5 не-експресора нашли значајно већи степен фиброзе интерстицијума у графту (235). Међутим, као што је већ коментарисано, тек треба да се потврди да ли ове промене у графту представљају и патолошко стање и имају неповољне клиничке импликације на судбину графта, с обзиром на мишљење појединих аутора да овакви графтови, и поред фиброзе, имају боље дугорочно преживљавање због мање учесталости васкуларног одбацивања (за које се сада сматра да је најважнији имунолошки разлог хроничног губитка графта), а што је све последица веће изложености графтова такролимусу (107, 171). Налаз, ако не статистички боље, оно макар сличне, дугорочне функције графта код не-експресора за ензиме CYP3A5 и CYP3A4 које смо добили у овој студији би био у сагласности са овим ставовима, мада је посматрани временски интервал од 12 месеци сигурно кратак за дугорочне закључке.

Такође, у овој студији нису нађене значајне разлике између варијанти генских полиморфизма у односу на вредности протеинурије и хематокрита у испитиваним временским интервалима.

7. ЗАКЉУЧАК

7.1. Преглед најважнијих резултата који су добијени у студији

- Студија је обухватила 110 пацијената, просечне старости 44,5 година и просечног индекса телесне масе 22,77 kg/m²; 71,8% трансплантација је урађено од живог донора, при чему је 77,2% донора било млађе од 60 година; код 50% пацијената је примењена индукциона терапија.
- Рана функција графта код испитиваних пацијената је била добра: просечно време нормализације креатинина је било 9,7 дана, а просечна концентрација креатинина 15 дана од трансплантације је била 133,1 $\mu\text{mol/l}$.
- Одложену функцију графта је имало 31,8% пацијената; после 12 месеци ови пацијенти су имали лошију функцију графта, а сличну учесталост акутног одбацивања у односу на пацијенте са добром раном функцијом.
- Дугорочна функција графта код испитиваних пацијената је била добра: просечан креатинин после 6 месеци је био 134,02 $\mu\text{mol/l}$, а после 12 месеци 127,15 $\mu\text{mol/l}$; није било губитака графта током периода праћења од 12 месеци.
- Учесталост акутног одбацивања током првих 12 месеци је била 20,9%; није било понављаних епизода одбацивања; просечна концентрација такролимуса у тренутку одбацивања је била 9,00 ng/ml.
- Код 28,2% пацијената је постојала нека од нежељених реакција на такролимус; значајна акутна нефротоксичност је регистрована код 12,7% пацијената; код 8,2% пацијената је трајно прекинута примена такролимуса током периода праћења.
- Просечне концентрације такролимуса у раном периоду су биле у циљном опсегу: 11,09 ng/ml 3. дана и 10,29 ng/ml 7. дана; у првом мерењу 3. дана регистрован је велики распон у концентрацијама лека (од 3 до 30 ng/ml).
- Коефицијент варијабилности такролимуса је био 31,54%, а био је статистички незначајно већи код жена, нефункционалне форме *CYP3A* ензима, донорских бубрега преко 60 година, трансплантација од живог даваоца и код пацијената који су имали акутно одбацивање.
- Генска анализа је показала да је највећи број (85,5%) пацијената имао *CYP3A5*3*3 (GG)* изоформу која кодира нефункционални *CYP3A5* ензим; 92,7% пацијената имало изоформу *CYP3A4*1*1 (AA)* која кодира функционални облик

CYP3A4 ензима. Анализа *ABCB1 3435 C>T* генског полиморфизма није показала преминацију једне одређене форме П-гликопротеина.

- Упоредна анализа параметара терапијског мониторинга такролимуса и варијанти генског полиморфизма за *CYP3A5* ензим је показала да је дневна доза такролимуса била већа код *CYP3A5* експресора у односу на не-експресоре у свим испитиваним временима: 7. дана за 9,8%, 30. дана за 56,2%, после 3 месеца за 103%, после 6 месеци за 126%, а после 12 месеци за 120%.

- Значајне разлике у концентрацијама такролимуса у крви између експресора и не-експресора за *CYP3A5* ензим су регистроване само у првих 7 дана од трансплантације, када су не-експресори имали већу концентрацију лека; ова разлика је нађена већ на првом мерењу, 3 дана од трансплантације.

- Прерачунати однос концентрације и дозе такролимуса је био значајно већи у свим испитиваним временима код *CYP3A5* не-експресора, односно, пацијената са нефункционалном формом *CYP3A5* ензима; ова разлика је видљива већ у првих 7 дана после трансплантације и може бити добар индиректни маркер функционалног стања *CYP3A5* ензима.

- Резултати у овој студији су показали да *CYP3A4-392A>G* и *ABCB1 3435 C>T SNPs* нису имали значајан утицај на фармакокинетику и фармакодинамику такролимуса. Ипак, нађено је да су код *CYP3A4* не-експресора за 14,8% (1. месец) до 45,9% (6. месец) примењене веће (а не очекивано мање) дневне дозе такролимуса у односу на *CYP3A4* експресоре, али је ова разлика у примењеној дози значајно мања него она која је добијена код *CYP3A5* полиморфизма. Осим тога, концентрације такролимуса су код *CYP3A4* не-експресора у свим испитиваним временима биле ниже за 10-15% у односу на *CYP3A4* експресоре; ови неочекивани резултати могу да указују на везану неравнотежу *CYP3A4*1B* алела са експресорском формом гена за *CYP3A5* (*CYP3A5*1*1*). Такође је уочено да је однос концентрације и дозе био већи код нефункционалне форме П-гликопротеина (*TT* алел) у периоду од 1. до 12. месеца (мада незначајно), што је добијено и код нефункционалне форме *CYP3A5* ензима (код које је то било значајно).

- На првом мерењу (3. дан) је само 18,1% пацијената имало концентрације такролимуса у циљним границама; више од половине *CYP3A5* не-експресора је 3. и 7. дана имало концентрацију лека изнад 10 ng/ml (52,9% и 52,7%). Значајан број *CYP3A5* експресора је имао концентрацију такролимуса мању од 6 ng/ml

током првих 7 дана после трансплантације (3. дана 53,3%, 7. дана 50% пацијената).

- Највећи број пацијената у студији није имао субтерапијске концентрације такролимуса у раној фази после трансплантације; међутим, после 6 и 12 месеци, код значајног броја пацијената (44,54% и 47,27%) концентрације лека су биле испод 6 ng/ml, што се према актуелним ставовима сматра недовољним и једним од фактора ризика за одбацивање графта изазваног антителима.

- У раном периоду после трансплантације, креатинин се брже нормализовао код пацијената који су имали функционални облик *CYP3A5* ензима и ниже концентрације такролимуса у крви.

- Највећи број (91,4%) пацијената са одложеном функцијом графта су имали и нефункционалну форму *CYP3A5* ензима; у овој групи је 94,3% пацијената имало и функционалну форму *CYP3A4* ензима.

- Рана акутна нефротоксичност се најчешће јавила у раном периоду после трансплантације, а сви пацијенти са овом компликацијом су имали нефункционалну форму *CYP3A5* ензима и функционалну форму *CYP3A4* ензима.

- Функција графта после 12 месеци није била лошија код пацијената који су имали веће концентрације такролимуса у крви и који су имали нефункционалне форме *CYP3A5* и *CYP3A4* ензима.

- Већина (88,8%) пацијената код којих је трајно прекинута примена такролимуса су имали нефункционалан *CYP3A5* ензим, док је код свих *CYP3A4* ензим био функционалан.

- Није нађена значајна разлика у учесталости акутног одбацивања у односу за испитиване полиморфизме; код највећег броја пацијената концентрација такролимуса није била разлог за настанак акутног одбацивања.

- Сви пацијенти код којих је регистрована цитомегало вирусна инфекција су имали нефункционалну форму *CYP3A5* ензима, функционалну форму *CYP3A4* ензима и веће концентрације такролимуса у крви у раном периоду после трансплантације.

- Већина (77,7%) пацијената код којих је регистрована новонастала шећерна болест после трансплантације је имала нефункционалну форму

CYP3A5 ензима, функционалну форму CYP3A4 ензима и високу концентрацију такролимуса у крви.

7.2. Закључак студије

- Анализа полиморфизма CYP3A5 A6986G, CYP3A4 A392G и ABCB1 C3435T у овој студији је показала да највећи број наших пацијената има нефункционалну форму CYP3A5 ензима и функционалну форму CYP3A4 ензима, док код П-гликопротеина није било преминације једног одређеног генотипа.

- Пацијентима који имају функционалан CYP3A5 ензим је потребна статистички значајно већа доза такролимуса за постизање исте концентрације лека у крви у току прве године након трансплантације бубрега.

- Функционално стање CYP3A5 ензима значајно утиче на концентрације такролимуса у раном периоду после трансплантације.

- Пацијенти који имају нефункционалан ензим CYP3A5 имају значајно већи однос концентрације и дозе такролимуса; ова разлика се уочава врло рано после трансплантације и може бити добар сурогат маркер функционалног стања CYP3A5 ензима.

- Одређивање полиморфизма CYP3A5 A6986G и функционалног стања CYP3A5 ензима може значајно унапредити терапијски мониторинг такролимуса.

- Није нађена повезаност акутног одбацивања графта са полиморфизмима испитиваних ензима.

- Већина наших пацијената су спори метаболизери такролимуса код којих се не може искључити настанак акутне нефротоксичности, одложене функције графта, потреба прекида терапије такролимусом, новонастале шећерне болести и осталих нежељених ефеката при примени уобичајених доза лека. Очигледно да и други, додатни, фактори који немају генску основу имају утицај на различите клиничке исходе везане за графт после трансплантације.

- Резултати студије показују да полиморфизам CYP3A5 A6986G и функционално стање CYP3A5 ензима имају значајан утицај на фармакокинетске ефекте такролимуса. Појединачан утицај полиморфизама CYP3A4 A392G и ABCB1 C3435T и функционалног стања CYP3A4 ензима и П-гликопротеина је занемарљив.

7.3. Препоруке проистекле из истраживања

- При примени уобичајених почетних доза такролимуса у раном периоду после трансплантације се могу очекивати концентрације лека које су веће од циљних, будући да већина наших пацијената има нефункционалану форму *CYP3A5* ензима; при примени истих доза лека, мањи број пацијената, који имају функционалну форму *CYP3A5* ензима, у истом периоду може имати недовољне концентрације такролимуса у крви.

- Сматрамо да би одређивање полиморфизма *CYP3A5* A6986G и функционалног стања *CYP3A5* ензима пре трансплантације допринело ефикаснијој и безбеднијој примени такролимуса код пацијената са трансплантираним бубрегом.

- Висока концентрација такролимуса у крви и висок однос концентрације и дозе лека током првих 7 дана после трансплантације могу послужити као индиректан показатељ присуства нефункционалне форме *CYP3A5* ензима код пацијената са трансплантираним бубрегом.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Morris PJ. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2678-80.
2. Hamilton D. A history of Organ transplantation. Pittsburgh: University of Pittsburgh Press; 2012.
3. Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Ann Surg.* 1976;184(5):565-73.
4. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ Jr, Porter KA. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg.* 1968;168(3):392-415.
5. Neipp M, Karavul B, Jackobs S, Meyer zu Vilsendorf A, Richter N, Becker T, Schwarz A, Klempnauer J. Quality of life in adult transplant recipients more than 15 years after kidney transplantation. *Transplantation.* 2006;81(12):1640-4.
6. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(6):365-76.
7. Arend SM, Mallat MJ, Westendorp RJ, van der Woude FJ, van Es LA. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(8):1672-9.
8. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Arndorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1293-6.
9. Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surg.* 2000;24(7):759-82.
10. Gjertson DW, Cecka JM, Terasaki PI. The relative effects of FK506 and cyclosporine on short- and long-term kidney graft survival. *Transplantation.* 1995;60(12):1384-8.
11. Ponticelli C. Present and future of immunosuppressive therapy in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2439-40.
12. Scientific Registry of Transplant Recipients. US Hospitals with Kidney Transplant Centers. Dostupno na: <http://www.srtr.org/csr/current/Centers/TransplantCenters.aspx?organcode=KI> (citirano 15.12.2015.).
13. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004;4(3):378-83.

14. Delmonico FL. Analyzing risk factors of renal transplant outcome. *Transplantation*. 2000;69(1):1-2.
15. Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS. Immunologic and nonimmunologic factors: different risks for cadaver and living donor transplantation. *Transplantation*. 2000;69(1):54-8.
16. Butler JA, Roderick P, Mullee M, Mason JC, Peveler RC. Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation*. 2004;77(5):769-76.
17. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2715-29.
18. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005;331(7520):810.
19. Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation*. 2004;77(9 Suppl):S41-3.
20. Hooks MA. Tacrolimus, a new immunosuppressant--a review of the literature. *Ann Pharmacother*. 1994;28(4):501-11.
21. Wong W, Venetz JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M. 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? *Transplantation*. 2005;80(3):289-96.
22. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989;321(25):1725-38.
23. Batiuk TD, Kung L, Halloran PF. Evidence that calcineurin is rate-limiting for primary human lymphocyte activation. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1894-901.
24. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant*. 2006;6(5 Pt 2):1111-31.
25. Jordan ML, Naraghi R, Shapiro R, Smith D, Vivas CA, Scantlebury VP, Gritsch HA, McCauley J, Randhawa P, Demetris AJ, McMichael J, Fung JJ, Starzl TE. Tacrolimus rescue therapy for renal allograft rejection--five-year experience. *Transplantation*. 1997;63(2):223-8.
26. Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos R, Jain A, Alessiani M, Takaya S, Shapiro R. Liver, kidney, and thoracic organ transplantation under FK 506. *Ann Surg*. 1990;212(3):295-305; discussion 306-7.

27. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, Eigler FW, Heemann U, Pichlmayr R, Behrend M, Vanrenterghem Y, Donck J, van Hooff J, Christiaans M, Morales JM, Andres A, Johnson RW, Short C, Buchholz B, Rehmert N, Land W, Schleibner S, Forsythe JL, Talbot D, Pohanka E, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation*. 1997;64(3):436-43.
28. Knoll GA, Bell RC. Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 1999;318(7191):1104-7.
29. Margreiter R; European Tacrolimus vs Cyclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet*. 2002;359(9308):741-6.
30. Kaplan B, Schold JD, Meier-Kriesche HU. Long-term graft survival with neoral and tacrolimus: a paired kidney analysis. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(11):2980-4.
31. Krensky MA, Bennett MW, Vincenti F. Immunosuppressants, tolerogens and immunostimulants. In: Brunton LL, editor. *Goodman & Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill Book Company; 2011:1005-31.
32. Meiser BM, Pfeiffer M, Schmidt D, Reichenspurner H, Ueberfuhr P, Paulus D, von Scheidt W, Kreuzer E, Seidel D, Reichart B. Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(2):143-9.
33. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2000;59(2):323-89.
34. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc*. 1999;31(5):1978-80.
35. Shapiro R, Young JB, Milford EL, Trotter JF, Bustami RT, Leichtman AB. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1993-2003. *Am J Transplant*. 2005;5(4 Pt 2):874-86.
36. Guerra G, Ciancio G, Gaynor JJ, Zarak A, Brown R, Hanson L, Sageshima J, Roth D, Chen L, Kupin W, Tueros L, Ruiz P, Livingstone AS, Burke GW 3rd. Randomized trial of immunosuppressive regimens in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1758-68.
37. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I.

- Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* (Tokyo). 1987;40(9):1249-55.
38. Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, Goto T, Okuhara M. Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*. 1987;19(5 Suppl 6):11-6.
 39. Morris R. Modes of action of FK506, cyclosporin A, and rapamycin. *Transplant Proc*. 1994;26(6):3272-5.
 40. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs*. 1997;54(6):925-75.
 41. Thomson AW. FK-506--how much potential? *Immunol Today*. 1989;10(1):6-9.
 42. Propper DJ, Woo J, Thomson AW, Catto GR, Macleod AM. FK506--its influence on anti-class 1 MHC alloantibody responses to blood transfusions. *Transplantation*. 1990;50(2):267-71.
 43. Varagić V, Milošević M. Imunosupresivi i imunostimulansi. U: *Farmakologija*. Dvadesettreće izdanje. Beograd: Elit Medica; 2009;535-46.
 44. Astellas Pharma, Inc. Prograf: Highlights of prescribing information. Dostupno na: <http://www.astellas.us/docs/prograf.pdf> (citirano 10.10.2015.).
 45. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;22(5):328-35.
 46. Bekersky I, Dressler D, Mekki QA. Effect of low- and high-fat meals on tacrolimus absorption following 5 mg single oral doses to healthy human subjects. *J Clin Pharmacol*. 2001;41(2):176-82.
 47. Zahir H, Nand RA, Tattam BN, Brown KF, McLachlan AJ. Validation of the methods to study distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. *J Pharmacol Toxicol Meth*. 2001;46(1):27-35.
 48. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995;29(6):404-30.
 49. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet* 2001;40(4):283-95.
 50. Golubović B, Vučićević K, Radivojević D, Kovačević SV, Prostran M, Miljković B. Total plasma protein effect on tacrolimus elimination in kidney transplant patients--population pharmacokinetic approach. *Eur J Pharm Sci*. 2014;52:34-40.

51. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(3):298-309.
52. Shiraga T, Niwa T, Teramura Y, Kagayama A, Tsutsui M, Ohno Y, Iwasaki K. Oxidative metabolism of tacrolimus and its metabolite by human cytochrome P450 3A subfamily. *Xenobio Metab Dispos*. 1999;14(4):277-385.
53. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, Thummel KE. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):836-47.
54. Jeong H, Chiou WL. Role of P-glycoprotein in the hepatic metabolism of tacrolimus. *Xenobiotica*. 2006;36(1):1-13.
55. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993;268(9):6077-80.
56. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(10):623-53.
57. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Teramura Y, Kawamura A, Hata T, Ninomiya S, Esumi Y. Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. *Xenobio Metab Dispos*. 1998;13(3):259-65.
58. Velicković-Radovanović R, Mikov M, Paunović G, Djordjević V, Stojanović M, Cvetković T, Djordjević AC. Gender differences in pharmacokinetics of tacrolimus and their clinical significance in kidney transplant recipients. *Gend Med*. 2011;8(1):23-31.
59. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2009;31(2):187-97.
60. Yagil Y, Yagil C. Insights into pharmacogenomics and its impact upon immunosuppressive therapy. *Transpl Immunol*. 2002;9(2-4):203-9.
61. Danesi R, Mosca M, Boggi U, Mosca F, Del Tacca M. Genetics of drug response to immunosuppressive treatment and prospects for personalized therapy. *Mol Med Today*. 2000;6(12):475-8.
62. Press RR, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Individualizing calcineurin inhibitor therapy in renal transplantation--current limitations and perspectives. *Curr Pharm Des*. 2010;16(2):176-86.
63. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4,

- CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(3):245-54.
64. Hesselink DA, Bouamar R, Elens L, van Schaik RH, van Gelder T. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(2):123-39.
 65. Stefanović N, Cvetković T, Veličković-Radovanović R, Jevtović-Stoimenov T, Stojanović D, Živković N. Significance of CYP3A5 gene polymorphism in Serbian renal transplant patients. *Acta Medica Medianae.* 2013;52(1):33-7.
 66. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Daly AK. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003;76(8):1233-5.
 67. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, Zhang J, Schuetz EG. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics.* 2002;12(2):121-32.
 68. Provenzani A, Santeusano A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Provenzani A, Polidori C, Vizzini G, Polidori P, D'Alessandro N. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9156-73.
 69. García-Martín E, Martínez C, Pizarro RM, García-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, Agúndez JA. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(3):196-204.
 70. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(10):693-704.
 71. Li Y, Hu X, Cai B, Chen J, Bai Y, Tang J, Liao Y, Wang L. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435 polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2012;27(1):12-8.
 72. Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA, van Hooff JP, van Dieijen-Visser MP, Bekers O. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007;21(4):427-35.

73. Zhang JJ, Zhang H, Ding XL, Ma S, Miao LY. Effect of the P450 oxidoreductase 28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(4):807-12.
74. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics.* 2011;12(9):1281-91.
75. Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, Wallemacq P, Mourad M, Haufroid V. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Ther Drug Monit.* 2013;35(5):608-16.
76. Sandson NB. *Drug Interactions Casebook: The Cytochrome P450 System and Beyond.* 2nd edition. Washington: American Psychiatric Publishing Inc.; 2003.
77. Vavic N, Rancic N, Dragojevic-Simic V, Draskovic-Pavlovic B, Bokonjic D, Ignjatovic L, Mikov M. The influence of comedication on tacrolimus blood concentration in patients subjected to kidney transplantation: a retrospective study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;39(4):243-53.
78. Lo A, Burckart GJ. P-glycoprotein and drug therapy in organ transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(10):995-1005.
79. Nägele H, Petersen B, Bonacker U, Rödiger W. Effect of orlistat on blood cyclosporin concentration in an obese heart transplant patient. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999;55(9):667-9.
80. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(11):813-51.
81. Yee GC, Stanley DL, Pessa LJ, Dalla Costa T, Beltz SE, Ruiz J, Lowenthal DT. Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet.* 1995;345(8955):955-6.
82. Cohen E, Kramer MR, Maoz C, Ben-Dayana D, Garty M. Cyclosporin drug-interaction-induced rhabdomyolysis. A report of two cases in lung transplant recipients. *Transplantation.* 2000;70(1):119-22.
83. Baid-Agrawal S, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin NE, Farrell M, Williams WW, Shih V, Auchincloss H, Cosimi AB, Pascual M. Cardiovascular risk profile after conversion from cyclosporine A to tacrolimus in stable renal transplant recipients. *Transplantation.* 2004;77(8):1199-202.

84. Bresnahan BA, Cherikh WS, Cheng Y, Siddiqi NA, Hariharan S. Short-term benefit of tacrolimus versus cyclosporine therapy after renal transplantation: an analysis of United network for organ sharing/Organ procurement and transplantation network database. *Transplantation Review*. 2003;17(4):S57.
85. Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC. Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes Care*. 2002;25(3):583-92.
86. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):481-508.
87. Lamas S. Cellular mechanisms of vascular injury mediated by calcineurin inhibitors. *Kidney Int*. 2005;68(2):898-907.
88. Birkeland SA, Løkkegaard H, Storm HH. Cancer risk in patients on dialysis and after renal transplantation. *Lancet*. 2000;355(9218):1886-7.
89. Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol*. 2003;23(5):465-76.
90. Trimarchi HM, Truong LD, Brennan S, Gonzalez JM, Suki WN. FK506-associated thrombotic microangiopathy: report of two cases and review of the literature. *Transplantation*. 1999;67(4):539-44.
91. Wissmann C, Frey FJ, Ferrari P, Uehlinger DE. Acute cyclosporine-induced nephrotoxicity in renal transplant recipients: the role of the transplanted kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1996;7(12):2677-81.
92. Lea JP, Sands JM, McMahon SJ, Tumlin JA. Evidence that the inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity by FK506 involves calcineurin. *Kidney Int*. 1994;46(3):647-52.
93. Shimizu T, Tanabe K, Tokumoto T, Ishikawa N, Shinmura H, Oshima T, Toma H, Yamaguchi Y. Clinical and histological analysis of acute tacrolimus (TAC) nephrotoxicity in renal allografts. *Clin Transplant*. 1999;13 Suppl 1:48-53.
94. Williams D, Haragsim L. Calcineurin nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006;13(1):47-55.
95. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med*. 1990;323(11):693-9.
96. Novick AC, Hwei HH, Steinmuller D, Streem SB, Cunningham RJ, Steinhilber D, Goormastic M, Buszta C. Detrimental effect of cyclosporine on initial function of cadaver renal allografts following extended preservation. Results of a randomized prospective study. *Transplantation*. 1986;42(2):154-8.

97. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(2):333-46.
98. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 1984;311(11):699-705.
99. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation.* 2004;78(4):557-65.
100. Myers BD, Newton L. Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 1991;2(2 Suppl 1):S45-52.
101. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2000;58(3):1174-85.
102. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1997;52(3):660-73.
103. Gaston RS. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(12):2029-34.
104. Matas AJ. Chronic progressive calcineurin nephrotoxicity: an overstated concept. *Am J Transplant.* 2011;11(4):687-92.
105. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, Mengel M, Reeve J, Sellares J, Sis B. The molecular phenotype of kidney transplants. *Am J Transplant.* 2010;10(10):2215-22.
106. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, Campistol JM, Racusen L, Polinsky MS, Goldberg-Alberts R, Li H, Scarola J, Neylan JF; Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009;87(2):233-42.
107. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, Kaplan B, Halloran PF. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2520-31.
108. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF. Understanding the causes of kidney transplant failure:

- the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388-99.
109. Walfe JA, McCann RL, Sanfilippo F. Cyclosporine-associated microangiopathy in renal transplantation: a severe but potentially reversible form of early graft injury. *Transplantation.* 1986;41(4):541-4.
 110. Holman MJ, Gonwa TA, Cooper B, Husberg BS, Goldstein RM, Gibbs JF, Klintmalm GB. FK506-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transplantation.* 1993;55(1):205-6.
 111. Kamel KS, Ethier JH, Quaggin S, Levin A, Albert S, Carlisle EJ, Halperin ML. Studies to determine the basis for hyperkalemia in recipients of a renal transplant who are treated with cyclosporine. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(8):1279-84.
 112. Ling BN, Eaton DC. Cyclosporin A inhibits apical secretory K⁺ channels in rabbit cortical collecting tubule principal cells. *Kidney Int.* 1993;44(5):974-84.
 113. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. Downregulation of Ca(2+) and Mg(2+) transport proteins in the kidney explains tacrolimus (FK506)-induced hypercalciuria and hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(3):549-57.
 114. Deray G, Benhmida M, Le Hoang P, Maksud P, Aupetit B, Baumelou A, Jacobs C. Renal function and blood pressure in patients receiving long-term, low-dose cyclosporine therapy for idiopathic autoimmune uveitis. *Ann Intern Med.* 1992;117(7):578-83.
 115. Benet LZ. Relevance of pharmacokinetics in narrow therapeutic index drugs. *Transplant Proc.* 1999;31(3):1642-4; discussion 1675-84.
 116. Johnston A, Holt DW. Immunosuppressant drugs--the role of therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52 Suppl 1:61S-73S.
 117. Undre NA, Stevenson P, Schäfer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: clinically relevant aspects. *Transplant Proc.* 1999;31(7A):21S-24S.
 118. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(2):374-84.
 119. Kahan BD, Welsh M, Schoenberg L, Rutzky LP, Katz SM, Urbauer DL, Van Buren CT. Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection. *Transplantation.* 1996;62(5):599-606.
 120. Stratta P, Quaglia M, Cena T, Antoniotti R, Fenoglio R, Menegotto A, Ferrante D, Genazzani A, Terrazzino S, Magnani C. The interactions of age, sex, body mass index, genetics, and steroid weight-based doses on tacrolimus dosing requirement after adult kidney transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(5):671-80.

121. Dubbelboer IR, Pohanka A, Said R, Rosenberg S, Beck O. Quantification of tacrolimus and three demethylated metabolites in human whole blood using LC-ESI-MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2012;34(2):134-42.
122. Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Mourad M. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant.* 2006;6(11):2706-13.
123. Vitezić D, Bagatin J. Individualizacija liječenja i primena lijekova u posebnim skupinama. U: Francetić I, Vitezić D, urednici. *Klinička farmakologija. Drugo promijenjeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2014:227-309.
124. Pokrajac M. *Farmakokinetika.* Drugo dopunjeno izdanje. Beograd: Grafolik; 2002.
125. Dragojević-Simić V, Dobrić S, Bokonjić D. *Farmakološki priručnik sa recepturom.* Beograd: Vojnomedicinska akademija; 2012.
126. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber LT, Westley IS, Mourad M. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009;31(2):139-52.
127. McEvoy GK, editor. *AHFS drug information 2011.* Bethesda (MD): American Society of Health-System Pharmacists; 2011.
128. Gaston RS. Maintenance immunosuppression in the renal transplant recipient: an overview. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(6 Suppl 6):S25-35.
129. Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. From pharmacokinetics to pharmacogenomics: a new approach to tailor immunosuppressive therapy. *Am J Transplant.* 2004;4(3):299-310.
130. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation.* 2009;88(3 Suppl):S62-7.
131. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int.* 2012;25(4):471-80.
132. Astellas Pharma Inc. *Astellas Transplant Risk factor calculators: Variability calculator.* Dostupno na: <http://www.astellastransplant.eu/> (citirano 02.09.2015.).
133. Amend WJC, Vincenti F, Tolmanovich SJ. The first three posttransplant months. In: Danovitch GM, editor. *Handbook of Kidney Transplantation*, 4th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2005:212-233.

134. Vavić N, Ignjatović L, Drasković B, Hrvacević R, Kovacević Z, Paunić Z. Efficacy of therapeutic monitoring of cyclosporine through C2 and AUC(0-4) during the first 24 months following kidney transplantation. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65(2):119-27.
135. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999;68(1):55-62.
136. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2279-96.
137. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(4):207-21.
138. Greenblatt DJ, von Moltke LL. Gender has a small but statistically significant effect on clearance of CYP3A substrate drugs. *J Clin Pharmacol.* 2008;48(11):1350-5.
139. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(6):660-9.
140. Foroncewicz B, Mucha K, Ciszek M, Małkowski P, Durlik M, Szmidi J, Chmura A, Pączek L. A comparison between two tacrolimus-based immunosuppression regimens in renal transplant recipients: 7-year follow-up. *Ann Transplant.* 2013;18:384-92.
141. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloze P, Halloran PF; ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2562-75.
142. Neylan JF. Effect of race and immunosuppression in renal transplantation: three-year survival results from a US multicenter, randomized trial. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplant Proc.* 1998;30(4):1355-8.
143. Orantes CM, Herrera R, Almaguer M, Brizuela EG, Núñez L, Alvarado NP, Fuentes EJ, Bayarre HD, Amaya JC, Calero DJ, Vela XF, Zelaya SM, Granados DV, Orellana P. Epidemiology of chronic kidney disease in adults of Salvadoran agricultural communities. *MEDICC Rev.* 2014;16(2):23-30.
144. Gijssen V, Mital S, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, van der Heiden IP, Nulman I, Koren G, de Wildt SN. Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(12):1352-9.

145. Rodrigo E, de Cos MA, Sánchez B, Ruiz JC, Piñera C, Fernández-Fresnedo G, Palomar R, Pérez-Ceballos MA, Cotorruelo JG, Zubimendi JA, de Francisco AL, Arias M. High initial blood levels of tacrolimus in overweight renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(3):1453-4.
146. Sawamoto K, Huong TT, Sugimoto N, Mizutani Y, Sai Y, Miyamoto K. Mechanisms of lower maintenance dose of tacrolimus in obese patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(4):341-7.
147. Horvat LD, Shariff SZ, Garg AX; Donor Nephrectomy Outcomes Research (DONOR) Network. Global trends in the rates of living kidney donation. *Kidney Int.* 2009;75(10):1088-98.
148. Health Grades Inc. Prevalence and Incidence of Kidney transplant. Last Update: 13 August, 2015. Dostupno na: http://www.rightdiagnosis.com/k/kidney_transplant/prevalence.htm (citirano 01.09.2015.).
149. Renine. Number of transplantations per year, 1999 - 2013: total, living donor transplantations and postmortal donor transplantations. Updated: 03 July 2014. Dostupno na: <https://www.renine.nl/static> (citirano 01.09.2014.).
150. Cecka JM. Kidney transplantation in the United States. *Clin Transpl.* 2008;1-18.
151. Cuende N, Cuende JI, Fajardo J, Huet J, Alonso M. Effect of population aging on the international organ donation rates and the effectiveness of the donation process. *Am J Transplant.* 2007;7(6):1526-35.
152. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004. *Am J Transplant.* 2005;5(4 Pt 2):843-9.
153. Noppakun K, Cosio FG, Dean PG, Taler SJ, Wauters R, Grande JP. Living donor age and kidney transplant outcomes. *Am J Transplant.* 2011;11(6):1279-86.
154. Kasiske BL, Snyder JJ, Matas AJ, Ellison MD, Gill JS, Kausz AT. Preemptive kidney transplantation: the advantage and the advantaged. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(5):1358-64.
155. Mange KC, Joffe MM, Feldman HI. Effect of the use or nonuse of long-term dialysis on the subsequent survival of renal transplants from living donors. *N Engl J Med.* 2001;344(10):726-31.
156. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, de Groote D, Jungers P, et al. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis.

- Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol.* 1995;154(2):882-92.
157. Gris JC, Branger B, Vécina F, al Sabadani B, Fourcade J, Schved JF. Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int.* 1994;46(3):807-13.
 158. Meier-Kriesche HU, Schold JD. The impact of pretransplant dialysis on outcomes in renal transplantation. *Semin Dial.* 2005;18(6):499-504.
 159. Udruženje nefrologa Srbije. Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplantacijom bubrega u Srbiji, 2011. Beograd: Udruženje nefrologa Srbije; 2013.
 160. Collins BH, Kulkarni S, Johnston TD, David Kim E, Talavera F. Renal transplantation. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/430128-overview#showall> (citirano 02.09.2014.).
 161. Kirk AD. Induction immunosuppression. *Transplantation.* 2006;82(5):593-602.
 162. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
 163. Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, Darby C. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(6):1689-96.
 164. Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation.* 1998;66(12):1697-701.
 165. Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, Laouad I, Chatelet V, Marlière JF, Nivet H, Lebranchu Y. Urinary albumin excretion and the risk of graft loss and death in proteinuric and non-proteinuric renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007;7(3):618-25.
 166. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation.* 1993;55(4):752-6; discussion 756-7.
 167. Opelz G, Döhler B; Collaborative Transplant Study Report. Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation.* 2008;85(5):661-6.
 168. USRDS Coordinating Center (CC). United states renal data system. Dostupno na: <http://www.usrds.org/> (citirano 10.10.2015.).

169. Böttiger Y, Brattström C, Tydén G, Säwe J, Groth CG. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(3):445-8.
170. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, Rigotti P, Baldan N, Beatini M, Valente U, Scalamogna M, Ruggenenti P; Dual Kidney Transplant Group. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med.* 2006;354(4):343-52.
171. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, MengeL M, Reeve J, Sellares J, Sis B. An integrated view of molecular changes, histopathology and outcomes in kidney transplants. *Am J Transplant.* 2010;10(10):2223-30.
172. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant.* 2004;4(4):583-95.
173. Maes BD, Kuypers D, Messiaen T, Evenepoel P, Mathieu C, Coosemans W, Pirenne J, Vanrenterghem YF. Posttransplantation diabetes mellitus in FK-506-treated renal transplant recipients: analysis of incidence and risk factors. *Transplantation.* 2001;72(10):1655-61.
174. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007;20;357(25):2601-14.
175. Allen U, Humar A, Limaye A, Michaels M, Miller R. Discipline of Transplant Infectious Diseases (ID). Foreword. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 4:S1-2.
176. Scolari MP, Cappuccilli ML, Lanci N, La Manna G, Comai G, Persici E, Todeschini P, Faenza A, Stefoni S. Predictive factors in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2482-4.
177. Borra LC, Roodnat JJ, Kal JA, Mathot RA, Weimar W, van Gelder T. High within-patient variability in the clearance of tacrolimus is a risk factor for poor long-term outcome after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(8):2757-63.
178. Mancinelli LM, Frassetto L, Floren LC, Dressler D, Carrier S, Bekersky I, Benet LZ, Christians U. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: a comparison across ethnic groups. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(1):24-31.
179. Spierings N, Holt DW, MacPhee IA. CYP3A5 genotype had no impact on inpatient variability of tacrolimus clearance in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2013;35(3):328-31.

180. López-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltrán Catalán S, Milara Payá J, Pallardó Mateu LM, Jiménez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc.* 2010;42(8):3031-3.
181. Tang HL, Xie HG, Yao Y, Hu YF. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the CYP3A5 nonexpressers than expressers. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(11):713-20.
182. Cheung CY. Pharmacogenetics and renal transplantation. In: Trzcinski M, editor. *Kidney transplantation- new perspectives.* InTech; 2011:147-62.
183. Vavić N, Rančić N, Cikota-Aleksić B, Magić Z, Cimeša J, Obrenčević K, Radojević M, Mikov M, Dragojević-Simić V. The distribution of genetic polymorphism of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 in patients subjected to renal transplantation. *Vojnosanit pregl* 2016; In press.
184. Đorđević N, Janković S, Bertilsson L, Aklillu E. CYP3A4 i CYP3A5 genetski polimorfizam kod Srba. XXXIII Oktobarski zdravstveni dani, oktobar 2008, Kragujevac, Srbija. *Medicinski časopis* 2008;42(1 Suppl. 1):29-29.
185. Larriba J, Imperiali N, Groppa R, Giordani C, Algranatti S, Redal MA. Pharmacogenetics of immunosuppressant polymorphism of CYP3A5 in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2010;42(1):257-9.
186. Bozina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60(2):217-42.
187. Dirks NL, Huth B, Yates CR, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective on ethnic differences. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2004;42(12):701-18.
188. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(6):914-9.
189. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation.* 2002;74(11):1486-9.
190. Chakkera HA, Chang YH, Bodner JK, Behmen S, Heilman RL, Reddy KS, Mulligan DC, Moss AA, Khamash H, Katariya N, Hewitt WR, Pitta TL, Frassetto LA. Genetic differences in Native Americans and tacrolimus dosing after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2013;45(1):137-41.

191. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(3):141-75.
192. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics*. 2004;14(3):147-54.
193. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003;13(8):481-94.
194. Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K, Sugimachi K. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation*. 2002;74(4):571-2.
195. Barrera-Pulido L, Aguilera-García I, Docobo-Pérez F, Alamo-Martínez JM, Pareja-Ciuró F, Nuñez-Roldán A, Gómez-Bravo MA, Bernardos-Rodríguez A. Clinical relevance and prevalence of polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes that encode tacrolimus biotransformation enzymes in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2008;40(9):2949-51.
196. Rančić N. Procena odnosa koncentracija/doza takrolimusa kao parametra za terapijski monitoring u pacijenata podvrgnutih transplantaciji bubrega. [Doktorska disertacija]. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka; 2015.
197. Rančić N, Dragojević-Simić V, Vavić N, Kovačević A, Šegrt Z, Drašković-Pavlović B, Mikov M. Tacrolimus concentration/dose ratio as a therapeutic drug monitoring strategy: the influence of gender and comedication. *Vojnosanit Pregl*. 2015;72(9):813-22.
198. Cho JH, Yoon YD, Park JY, Song EJ, Choi JY, Yoon SH, Park SH, Kim YL, Kim CD. Impact of cytochrome P450 3A and ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms on tacrolimus dose-adjusted trough concentrations among Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2012;44(1):109-14.
199. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(9):659-65.

200. Birdwell KA, Grady B, Choi L, Xu H, Bian A, Denny JC, Jiang M, Vranic G, Basford M, Cowan JD, Richardson DM, Robinson MP, Ikizler TA, Ritchie MD, Stein CM, Haas DW. The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(1):32-42.
201. Kurzawski M, Drożdżik M. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: genes involved in mechanism of action and pharmacokinetics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics*. 2013;14(9):1099-118.
202. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011;11(4):274-86.
203. Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, Mourad M, Haufroid V. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(10):1383-96.
204. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit*. 2010;32(4):394-404.
205. Herrero MJ, Sánchez-Plumed J, Galiana M, Bea S, Marqués MR, Aliño SF. Influence of pharmacogenetic polymorphisms in routine immunosuppression therapy after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2010;42(8):3134-6.
206. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2326-33.
207. Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, Vítko S, Hugo C, Demirbas A, Acevedo RR, Grinyó J, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloze P, Halloran P. Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony study: observational results 3 years after transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9(8):1876-85.
208. Moore J, Middleton L, Cockwell P, Adu D, Ball S, Little MA, Ready A, Wheatley K, Borrows R. Calcineurin inhibitor sparing with mycophenolate in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2009;87(4):591-605.
209. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, Kohnle M, Zanker B, Land W, Morales JM, Andrés A, Schäfer A, Stevenson P. Low

- systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):296-8.
210. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, Toupance O, Touchard G, Alberti C, Le Pogamp P, Moulin B, Le Meur Y, Heng AE, Subra JF, Beaune P, Legendre C. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(6):721-6.
 211. Cole EH, Johnston O, Rose CL, Gill JS. Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):814-21.
 212. Hoffmann SC, Hale DA, Kleiner DE, Mannon RB, Kampen RL, Jacobson LM, Cendales LC, Swanson SJ, Becker BN, Kirk AD. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant.* 2005;5(3):573-81.
 213. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol.* 2000;20(2):126-47.
 214. Morris RG, Russ GR, Cervelli MJ, Juneja R, McDonald SP, Mathew TH. Comparison of trough, 2-hour, and limited AUC blood sampling for monitoring cyclosporin (Neoral) at day 7 post-renal transplantation and incidence of rejection in the first month. *Ther Drug Monit.* 2002;24(4):479-86.
 215. Issa N, Kukla A, Ibrahim HN. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol.* 2013;37(6):602-12.
 216. Jun KR, Lee W, Jang MS, Chun S, Song GW, Park KT, Lee SG, Han DJ, Kang C, Cho DY, Kim JQ, Min WK. Tacrolimus concentrations in relation to CYP3A and ABCB1 polymorphisms among solid organ transplant recipients in Korea. *Transplantation.* 2009;87(8):1225-31.
 217. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Bosó V, Reig J, Poveda JL, Megías J, Bea S, Aliño SF. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(1):38-48.
 218. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, Taburet AM, Charpentier B, Becquemont L. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(6):546-52.

219. Knops N, Levtchenko E, van den Heuvel B, Kuypers D. From gut to kidney: transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation. *Int J Pharm.* 2013;452(1-2):14-35.
220. Jacobson PA, Schladt D, Israni A, Oetting WS, Lin YC, Leduc R, Guan W, Lamba V, Matas AJ; DeKAF Investigators. Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium. *Transplantation.* 2012;93(6):624-31.
221. Cosio FG, Pesavento TE, Kim S, Osei K, Henry M, Ferguson RM. Patient survival after renal transplantation: IV. Impact of post-transplant diabetes. *Kidney Int.* 2002;62(4):1440-6.
222. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2003;3(2):178-85.
223. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, Uchida K, Pescovitz MD, Marchetti P, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Chadban S, El-Shahawy M, Budde K, Goto N; DIRECT (Diabetes Incidence after Renal Transplantation: Neoral C Monitoring Versus Tacrolimus) Investigators. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant.* 2007;7(6):1506-14.
224. Sato T, Inagaki A, Uchida K, Ueki T, Goto N, Matsuoka S, Katayama A, Haba T, Tominaga Y, Okajima Y, Ohta K, Suga H, Taguchi S, Kakiya S, Itatsu T, Kobayashi T, Nakao A. Diabetes mellitus after transplant: relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy. *Transplantation.* 2003;76(9):1320-6.
225. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Vanrenterghem Y. A prospective, open-label, observational clinical cohort study of the association between delayed renal allograft function, tacrolimus exposure, and CYP3A5 genotype in adult recipients. *Clin Ther.* 2010;32(12):2012-23.
226. Rubin RH. Infectious disease complications of renal transplantation. *Kidney Int.* 1993;44(1):221-36.
227. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, Burdick J, Elmagd KA, Zeevi A, Lopez-Cepero M, Daller JA, Gritsch HA, Reed EF, Jonsson J, Hawkins D, Britz JA. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation.* 2006;82(5):663-8.

228. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(2):273-83.
229. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(4):848-55.
230. Hattori Y, Tanaka H, Teranishi J, Ishida H, Makiyama K, Miyajima E, Noguchi K, Kubota Y. Influence of cytochrome P450 3A5 polymorphisms on viral infection incidence in kidney transplant patients treated with tacrolimus. *Transplant Proc.* 2014;46(2):570-3.
231. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant.* 2001;1(2):115-20.
232. Shoskes DA, Cecka JM. Effect of delayed graft function on short- and long-term kidney graft survival. *Clin Transpl.* 1997:297-303.
233. Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. In: Cecka JM, Terasaki PI, editors. *Clinical transplants 2002.* Los Angeles: UCLA Immunogenetics Center; 2003:1-20.
234. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provôt F, Hazzan M, Noël C, Broly F, Cauffiez C. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(9):3046-50.
235. Satos S, Saito M, Numakura M, Miuro Y, Inoue T, Maita S, Obara T, Tsuruta H, Narita S, Horikawa Y, Tsuchiya N, Habuchi T, Mitobe Y, Komatsuda A, Kagaya H, Miura M. Pharmacogenetics and Circadian Exposure of Tacrolimus and Its Impact on the Renal Transplant Outcome: A Way to a Personalized Medicine for Tacrolimus [Innovation in Transplant and Regenerative Medicine. The 13th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science. Communication Center of Hirosaki University School of Medicine. September 9, 2011, Hirosaki, Japan].