

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

MILICA Z. KRAVLJAČA

UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA NA  
METABOLIZAM KALCINEURINSKIH  
INHIBITORA I FUNKCIJU PRESADENOG  
BUBREGA

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

MILICA Z. KRAVLJAČA

INFLUENCE OF MDR1 GENE  
POLYMORPHISMS ON CALCINEURIN  
INHIBITORS' METABOLISM AND KIDNEY  
GRAFT FUNCTION

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

## PODACI O MENTORU I KOMISIJI

### MENTOR:

Prof. dr Radomir Naumović, internista – nefrolog, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

### KOMENTOR:

Prof. dr Vera Pravica, imunolog, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

### ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Višnja Ležaić, internista – nefrolog, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Nevena Divac, farmakolog, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Igor Mitić, internista – nefrolog, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

## *Zahvalnica*

*Zahvaljujem se prof. dr Radomiru Naumoviću na ideji, ukazanom poverenju, bezrezervnoj pomoći, podršci i strpljenju prilikom izrade ove doktorske disertacije. Ali pre svega, hvala na mogućnosti da uz njega učim transplantaciju bubrega.*

*Hvala prof. dr Veri Pravici na izuzetnoj stručnoj pomoći oko razumevanja i pisanja dela disertacije u vezi sa genskim polimorfizmima.*

*Posebnu zahvalnost dugujem ass. dr Vladimiru Peroviću na pomoći oko dela disertacije rađenog u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se mojim dragim kolegama ass. dr Voinu Brkoviću, doc. dr Ivanu Soldatoviću i dr Biljani Stanković bez čije pomoći ni ova disertacija ni drugi radovi proistekli iz nje ne bi bili realizovani.*

*Hvala med. sestri Spomenki Stanojković na pomoći oko prikupljanja uzoraka krvi bolesnika.*

*Zahvaljujem se ispitanicima koji su pristali da učestvuju u ovom istraživanju.*

*Beskrajno hvala mojoj porodici i prijateljima na razumevanju i podršci.*

## REZIME

### UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA NA METABOLIZAM KALCINEURINSKIH INHIBITORA I FUNKCIJU PRESADENOG BUBREGA

Uvod: Transplantacija bubrega je najbolji način lečenja bolesnika u terminalnoj fazi hronične bolesti bubrega. Uvođenje kalcineurinskih inhibitora (KNI) u imunosupresivne protokole je jedan od najznačajnijih koraka u razvoju transplantacione medicine koji je značajno poboljšao preživljavanje kako alografta, tako i bolesnika sa presađenim bubregom. Ovi lekovi blokiraju sintezu citokina potrebnih za aktivaciju T-limfocita (interleukina-2, interleukina-4, interferona- $\gamma$  i faktora nekroze tumora- $\alpha$ ) i tako ostvaruju svoj imunosupresivni efekat. Imaju vrlo uzak terapijski opseg, izraženu interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost, kao i veliki broj neželjenih efekata koji utiču na funkciju alografta. Samo neki od neželjenih efekata mogu se objasniti neadekvatnom koncentracijom leka u krvi. Brojna istraživanja bavila su se ispitivanjem povezanosti genskih polimorfizama i farmakokinetike i farmakodinamske varijabilnosti KNI. Jedan od najznačajnijih gena za metabolizma KNI je MDR1 gen koji kodira sintezu P-glikoproteina koji je proteinski nosač KNI iz intracelularnog u ekstracelularni prostor.

Ciljevi istraživanja: Osnovni cilj našeg istraživanja bio je da se ispita učestalost genotipova pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (C1236T, G2677T/A i C3435T) MDR1 gena i njihovih haplotipova. Pored toga, ispitivali smo i uticaj genotipova i haplotipova MDR1 gena na farmakokinetiku KNI, učestalost akutnog odbacivanja (AO), učestalost odložene funkcije alografta (OFA) i funkciju alografta. Imajući u vidu mnogobrojne neželjene efekte KNI, ispitivali smo i uticaj genotipova i haplotipova MDR1 gena na koncentraciju glukoze, kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola, triglicerida i aminotransferaza u serumu.

Metode: Studija je dizajnirana kao neinterventno retrospektivno opservaciono ispitivanje, sprovedeno u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije i Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U ispitivanje su uključena 152 bolesnika sa presađenim bubregom koji su imali CYP3A5\*3\*3 genotip. Izolacija molekula DNK vršena je iz uzoraka pune krvi standardnom metodom kolonika. Podaci o dozama i koncentracijama KNI, funkciji alografta, AO i OFA, kao i vrednosti glikemije, hemoglobina, hematokrita, mokraćne kiseline, kalijuma, aspartat- i alaninaminotransferaze, ukupnog holesterola i triglicerida, dobijeni su iz ambulantnog kartona bolesnika sa presađenim bubregom. AO je

definisano kao pogoršanje funkcije allografta koje se oporavilo nakon primene pulsni doza kortikosteroida, ili je dijagnostikovano na osnovu patohistološkog nalaza bioptiranog allografta. OFA je definisana kao neuspostavljanje adekvatne funkcije allografta i potrebe za lečenjem hemodijalizama tokom prvih 15 dana nakon transplantacije.

Rezultati: Analizom tri SNP-a MDR1 gena dobijeni su sledeći genotipovi: C1236T - CC (28,95%), CT (70,39%), TT (0,66%); G2677T/A – GG (29,61%), TT (15,79%), GT (51,97%), TA (2,63%); C3435T – CC (26,97%), CT (50,66%) i TT (22,37%). Na osnovu dobijenih genotipova identifikovano je 10 haplotipova. Četiri najučestalija su CGC (45,38%), TTT (30,01%), CTT (8,42%) i CGT (7,12%). Među bolesnicima koji su primali CsA nije bilo značajne razlike u dozama potrebnim za dostizanje ciljne koncentracije leka u krvi. Najveća razlika u dozama leka kod bolesnika koji su primali TAC bila je vezana sa polimorfizam na egzonu 21. Varijant homozigotima su bile potrebne značajno veće doze leka da bi dostigli ciljni nivo u odnosu na divlje homozigote i heterozigote u svakom trenutku praćenja nakon transplantacije ( $p < 0,05$ ). Nije bilo značajnog uticaja ni genotipova ni haplotipova na učestalost AO i OFA. Funkcija allografta nije zavisila od polimorfizama MDR1 gena kod bolesnika koji su primali TAC. Najbolju funkciju, mereno vrednošću serumskog kreatinina među bolesnicima koji su primali CsA, imali su divlji homozigoti za sva tri polimorfizma MDR1 gena. AO je bilo jedini značajn prediktor nastanka insuficijencije allografta ( $p=0,001$ ).

Zaključci: Za sva tri SNPs MDR1 gena, heterozigoti su bili najučestaliji. Polimorfizmi MDR1 gena nisu uticali na doze CsA potrebne za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi. Bolesnicima koji su bili „varijant homozigoti“ za polimorfizme G2677T/A i C3435T bile su potrebne najveće doze TAC za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi. Polimorfizam G2677T/A bio je jedini nezavisan prediktor doziranja TAC. Polimorfizmi MDR1 gena nisu uticali na učestalost AO i OFA, kao ni na funkciju allografta kod bolesnika koji su primali TAC. Bolesnici koji su bili „varijant homozigoti“ za sva tri polimorfizma imali su bolju funkcija allografta ukoliko su primali CsA. Analizom faktora rizika za nastanak insuficijencije allografta AO je pokazano kao jedini prediktor nastanka insuficijencije allografta.

KLJUČNE REČI: transplantacija bubrega, kalcineurinski inhibitori, farmakokinetika, polimorfizmi MDR1 gena.

NAUČNA OBLAST: medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: nefrologija

## SUMMARY

### INFLUENCE OF THE MDR1 GENE POLYMORPHISMS ON CALCINEURIN INHIBITORS' METABOLISM AND KIDNEY GRAFT FUNCTION

**Introduction:** Kidney transplantation is the best treatment option for patients with end stage chronic kidney disease. The introduction of calcineurin inhibitors (CNI) in immunosuppressive protocols have played an important role in improving the outcome of kidney transplantation. These drugs block the cytokine synthesis needed to activate T-lymphocytes and thereby achieve their immunosuppressive effect. They have a narrow therapeutic range, interindividual and intraindividual variability, and a large number of side effects that affect the function of the allograft. However, only some of the side effects can be explained by an inadequate drug concentration in the blood. Numerous studies have investigated the relationship between gene polymorphisms and pharmacokinetic and pharmacodynamic variability of CNI. One of the most significant genes for CNI metabolism is the MDR1 gene that encodes the synthesis of the protein carrier CNI.

**Objective:** The primary aim of our study was to examine the frequency of genotypes of SNPs (C1236T, G2677T/A and C3435T) of the MDR1 gene and their haplotypes. In addition, we examined the influence of genotypes and haplotypes of the MDR1 gene on the CNI pharmacokinetics, the frequency of acute rejection (AR), the frequency of delayed function (DGF) and the allograft function. Also, we examined the influence of SNPs and haplotypes of the MDR1 gene on the serum level of glucose, potassium, uric acid, cholesterol, triglyceride and aminotransferase.

**Methods:** This study was designed as a retrospective observation study conducted at the Clinical Center of Serbia, Clinic of Nephrology and the Institute of Microbiology and Immunology at the University of Belgrade, Medical Faculty. This study included 152 patients who were kidney transplant recipients with a CYP3A5 \* 3 \* 3 genotype. DNA molecules were extracted from whole blood samples using a standard colonic method. The patient charts revealed data about the CNI dosage and concentration, allograft function, frequency of AR and DGF, as well as the serum level of glucose, hemoglobin, hematocrit, uric acid, potassium, aspartate and alanine aminotransferase, total cholesterol and triglyceride. AR was diagnosed by allograft biopsy or on the basis of allograft function deterioration that has improved after high-dose of corticosteroid therapy. DGF was defined as a need for hemodialysis during the first two weeks after kidney transplantation.

Results: According to our results, genotype frequencies for the three SNPs of the MDR1 gene were: C1236T-CC (28.95%), CT (70.39%), TT (0.66%); G2677T / A - GG (29.61%), TT (15.79%), GT (51.97%), TA (2.63%); C3435T - CC (26.97%), CT (50.66%) and TT (22.37%). On the basis of these isolated genotypes, 10 haplotypes were identified. According to the results, the most frequent ones were: CGC (45.38%), TTT (30.01%), CTT (8.42%) and CGT (7.12%). Among the patients receiving CsA there was no significant difference in dosage requirements for achieving target drug concentration. The biggest difference in the drug dosage requirement in patients receiving TAC was related to polymorphism on exon 21. The variant homozygotes had significantly higher dose requirements than wild homozygotes and heterozygotes ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference observed between genotypes or haplotypes regarding the frequency of AO and OFA. The function of the allograft did not depend on the polymorphisms of the MDR1 gene in patients receiving TAC. The best function, measured by the serum creatinine level among patients receiving CsA, had wild homozygotes for all three polymorphisms of the MDR1 gene. AR was shown as the only significant predictor of allograft insufficiency ( $p=0.001$ ).

Conclusion: Heterozygotes were the most frequent genotypes out of all three SNPs of the MDR1 gene. Polymorphisms of the MDR1 gene did not affect the CsA doses needed to reach the target level of the drug in the blood. The variant homozygotes for polymorphisms G2677T/A and C3435T needed the highest TAC doses to reach the target level of the drug in the blood. Polymorphism G2677T/A was shown as the only independent predictor of TAC dosing. MDR1 gene polymorphisms did not affect the incidence of AO, OFA, or the allograft function in patients receiving TAC. The variant homozygote was associated with a better function of allograft in the group of patients who received CsA. AO was shown to be the only predictor of allograft insufficiency.

**KEY WORDS:** kidney transplantation, calcineurin inhibitors, MDR1 gene polymorphisms, pharmacokinetics

**SCIENTIFIC FIELD:** medicine

**NARROW SCIENTIFIC FIELD:** nephrology



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KALCINEURINSKI INHIBITORI .....	2
1.1.1. Farmakološki oblici .....	2
1.1.2. Mehanizam delovanja.....	3
1.1.3. Osnovne farmakokinetičke osobine .....	3
1.2. P-GLIKOPROTEIN .....	4
1.2.1. Distribucija u tkivima .....	5
1.3. INTERREAKCIJE KALCINEURINSKIH INHIBITORA SA DRUGIM LEKOVIMA ...	7
1.4. GENSKI POLIMORFIZMI ZNAČAJNI ZA METABOLIZAM KALCINEURINSKIH INHIBITORA.....	9
1.4.1. CYP3A genski polimorfizmi .....	9
1.4.2. MDR1 genski polimorfizmi.....	10
1.4.3. Ostali polimorfizmi važni za metabolizam KNI.....	11
1.5. FARMAKODINAMIKA KALCINEURINSKIH INHIBITORA I POVEZANOST SA GENSKIM POLIMORFIZMIMA .....	11
1.5.1. Akutno odbacivanje.....	12
1.5.2. Neželjeni efekti kalcineurinskih inhibitora.....	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	17
3. MATERIJAL I METODE .....	18
3.1. DIZAJN STUDIJE I ISPITANICI.....	18
3.2. IZOLACIJA DNK I DETEKCIJA POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA I HAPLOTIPOVA MDR1 GENA.....	18
3.3. IMUNOSUPRESIVNI PROTOKOLI I TERAPIJSKI MONITORING KALCINEURINSKIH INHIBITORA .....	19
3.4. AKUTNO ODBACIVANJE .....	20
3.5. ODLOŽENA FUNKCIJA ALOGRAFTA .....	20
3.6. LABORATORIJSKI I KLINIČKI PARAMETRI PRAĆENJA.....	20
3.7. STATISTIČKA ANALIZA .....	20
4. REZULTATI.....	22
4.1. OSNOVNI PODACI.....	22
4.2. UČESTALOST GENOTIPOVA POJEDINAČNIH NUKLEOTIDNIH POLIMORFIZAMA (C1236T, G2677T/A I C3435T) MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA.....	24

4.3. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA FARMAKOKINETIKU KALCINEURINSKIH INHIBITORA.....	26
4.3.1. Uticaj polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova na farmakokinetiku TAC	26
4.3.2. Uticaj polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova na farmakokinetiku CsA	32
4.4. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA UČESTALOST AKUTNOG ODBACIVANJA .....	36
4.5. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA UČESTALOST ODLOŽENE FUNKCIJE ALOGRAFTA.....	39
4.6. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA FUNKCIJU ALOGRAFTA .....	41
4.7. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA BIOHEMISJKE PARAMETRE KRVI.....	51
4.8. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA NASTANAK INSUFICIJENCIJE ALOGRAFTA.....	53
5. DISKUSIJA .....	59
6. ZAKLJUČCI.....	72
7. LITERATURA.....	74

## 1. UVOD

Transplantacija bubrega je metod izbora zamene bubrežne funkcije kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Omogućava visok stepen rehabilitacije, najduže preživljavanje bolesnika i najkvalitetniji način života u odnosu na peritoneumsku dijalizu i hemodijalizu (1). Istorija transplantacije bubrega počinje 1954. godine, kada je dr Joseph Murray sa kolegama u Bostonu, čoveku koji je bio na dijalizi presadio bubreg od identičnog brata blizanca. Prvi put u ljudskoj istoriji zdravom čoveku učinjena je opsežna hirurška intervencija, izvađen zdrav organ, za dobro druge osobe (2).

Od 1954. godine do danas transplantacija bubrega razvila se u rutinski način lečenja. Ona je najoptimalniji i najekonomičniji metod zamene funkcije bubrega. Kratkoročni rezultati transplantacije gotovo su idealni, jednogodišnje preživljavanje presađenog bubrega je 90–95%. Ipak, dugoročno preživljavanje i bolesnika i alografta nije se značajno poboljšalo (3). Dva glavna razloga lošim dugoročnim rezultatima su hronična insuficijencija alografta i smrt bolesnika sa funkcionalnim alograftom. Slično bolesnicima koji se leče dijalizama, najznačajniji uzrok smrti bolesnika nakon transplantacije bubrega su kariovaskularne bolesti, ali u mnogo manjem stepenu u poređenju sa bolesnicima na peritoneumskoj dijalizi ili hemodijalizi.

Uspeh transplantacije bubrega u velikoj meri zavisi od adekvatne imunosupresivne terapije. Nažalost, i mnogobrojne komplikacije nakon transplantacije koje skraćuju životni vek i bolesnika i alografta posledica su primene imunosupresivnih lekova.

U razvoju imunosupresivne terapije, zračenje celog tela primaoca organa predstavlja prve korake. Ranih 60-tih godina dvadesetog veka u imunosupresiju se uvode kortikosteroidi i azatioprin. Prvi primalac bubrega koji je lečen azatioprinom, zbog toksičnih efekata leka, umro je nakon nešto više od mesec dana. Lečenje azatioprinom nije bilo letalno tek iz trećeg pokušaja i 1962. godine učinjena je prva uspešna transplantacija bubrega od preminule osobe, sa preživljavanjem primaoca dužim od godinu dana (4). Sredinom 70-tih godina pojavljuju se poliklonski antitimocitni i antilimfocitni globulini, sa kojima se postiže jednogodišnje preživljavanje kalema od oko 50%, a stopa mortaliteta smanjila se na 10–20% (1). Revolucija u razvoju imunosupresivne terapije nastaje 1983. godine uvođenjem ciklosporina A kao prvog kalcineurinskog inhibitora (KNI). Efekti novog leka sa jednogodišnjim preživljavanjem alografta

više od 80% bili su impresivni. Sedam godina kasnije pojavljuje se i drugi lek iz grupe KNI, takrolimus, koji je bio deset puta potentniji imunosupresiv od ciklosporina A. Iako je prošlo više od 30 godina od prve primene ciklosporina i više decenija od rutinske primene imunosupresivnih lekova poput mikofenolične kiseline, mTOR inhibitora i monoklonskih antitela, kalcineurinski inhibitori ostali su osnov i ključni lekovi u imunosupresivnim protokolima širom sveta (5).

Kalcineurinski inhibitori imaju uzak terapijski opseg i veliki broj neželjenih efekata. U cilju postizanja i održavanja optimalnog stepena imunosuprimiranosti, a minimizacije ili potpunog izbegavanja neželjenih efekata, koncentraciju ovih lekova u krvi potrebno je održavati u uskom željenom terapijskom opsegu. Ipak, neki neželjeni efekti ne mogu se objasniti nedovoljnim ili prevelikim dozama kalcineurinskih inhibitora. Zbog toga se poslednjih godina sve više smatra da su u osnovi ovakvih neželjenih efekata polimorfizmi gena odgovornih za sintezu enzima koji učestvuju u njihovom metabolizmu.

## **1.1. KALCINEURINSKI INHIBITORI**

Kalcineurinski inhibitori, ciklosporin A (CsA) i takrolimus (TAC) predstavljaju osnov imunosupresivne terapije nakon transplantacije solidnih organa. Imaju izraženu intraindividualnu i interindividualnu varijabilnost. Najčešće se primenjuju u kombinaciji sa kortikosteroidima i antiproliferativnim lekovima kao što su preparati mikofenolične kiseline.

### **1.1.1. Farmakološki oblici**

CsA je lipofilni ciklični peptid molarne mase 1203 g/mol. Sastoji od 11 aminokiselina i primarno je izolovan iz gljivice *Tolypocladium inflatum*. Inicijalna formulacija ovog leka Sandimun, bazirana na uljanoj osnovi, danas je zamenjena mikroemulzionim oblikom Neoral. Dostupan je u obliku rastvora koncentracije 100 mg/ml, i u kapsulama od 25 mg, 50 mg i 100 mg. Dozira se dva puta dnevno.

TAC je makrolidni antibiotik izolovan 1984. godine iz bakterije *Streptomyces tsukubaensis*, ima molarnu masu 822 g/mol. Farmakološki oblici su kapsule sa zaštićenim imenom

„Prograf” od 0,5 mg, 1 mg i 5 mg, koji se dozira dva puta dnevno, i formulacije sa produženim oslobađanjem zaštićenih imena „Advagraf” i „LCP-Tacro” koji se doziraju jednom dnevno. „Advagraf” je dostupan u kapsulama od 0,5 mg, 1 mg, 3 mg i 5 mg, a „LCP-Tacro” od 0,75 mg, 1 mg i 4 mg (1, 6, 7).

### **1.1.2. Mehanizam delovanja**

KNI svoj imunosupresivni efekat ostvaruju blokadom aktivacije T-ćelija. Mesto njihovog delovanja je na putu između prepoznavanja antigena i odgovora T-ćelija. Ovi lekovi vezuju se za svoje intracelularne receptore, CsA za cikofilin A, a TAC za FK-506 vezujući protein (FKBP), i tako stvoreni kompleksi inhibiraju aktivaciju kalcineurina. Kalcineurin je enzim koji vrši defosforilaciju nuklearnog faktora aktiviranih T-ćelija (NFAT), a ovaj u defosforilisanom obliku ulazi u jedro i vezuje se za promotore gena. Na taj način aktivira gene koji kodiraju sintezu interleukina-2 (IL-2), interleukina-4 (IL-4), interferona- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) i faktora nekroze tumora- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (8, 9).

Krajnji rezultat inhibicije kalcineurina je blokada transkripcije gena koji kodiraju sintezu pomenutih citokina potrebnih za aktivaciju T-ćelija.

### **1.1.3. Osnovne farmakokinetske osobine**

Ciklosporin i takrolimus strukturno su dve različite supstance, ali sa vrlo sličnim farmakokinetskim osobinama. Izrazito su lipofilni i imaju malu bioraspoloživost, prosečno oko 25%, ali sa velikom varijabilnošću (koja je 5–60% za CsA, odnosno 4–89% za TAC). Poluvreme eliminacije oba leka je oko osam sati (10). Više od 90% unete količine lekova se metaboliše, a samo 1% CsA i oko 0,5% TAC izlučuje se putem fecesa ili urina u nepromenjenom obliku (11). Manje od 5% unete količine leka metaboliše se u bubregu, te nije potrebna korekcija doze kod snižene bubrežne funkcije; nijedan od lekova nije dijalizibilan (10).

Ovi lekovi imaju veoma uzak terapijski opseg. U cilju postizanja maksimalne efikasnosti i izbegavanja toksičnih efekata u slučaju predoziranja, određivanje koncentracije KNI rutinski se primenjuje u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

KNI, naročito TAC, u cirkulaciji u visokom procentu vezani su za eritrocite, što je posledica velike koncentracije imunofilina na membrani eritrocita, kao i izražena lipofilnost ovih lekova. Koncentracija TAC čak je 13–114 puta veća u punoj krvi nego u plazmi, dok je taj odnos za CsA samo dva do tri puta. Niske vrednosti hematokrita povećavaju klirens KNI i doze potrebne za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi. Ostatak cirkulišućeg TAC primarno je vezan za albumine krvne plazme, dok je više od 80% frakcije CsA u plazmi vezano za lipoproteine (12, 13). Samo 0,5–5% cirkulišuće koncentracije KNI vezano je za limfocite, kao najvažnije ciljne ćelije (10).

Apsorpciju KNI može ometati hrana, tako što će usporiti pražnjenje želuca, uticati na splahnličnu i hepatičku cirkulaciju, menjati pH želuca, formirati neapsorptivne komplekse sa lekovima. Da bi se smanjio uticaj hrane na apsorpciju KNI, preporuka je da se ovi lekovi uzimaju sat pre ili dva sata posle obroka.

Kompletan metabolizam KNI pod kontrolom je transmembranskog transportera „permeability” glikoproteina (P-glikoprotein, P-glycoprotein, P-gp) i izoenzima citohroma P-450 IIIA (CYP3A), i to CYP3A4 i CYP3A5. P-glikoprotein kontroliše apsorpciju KNI duž celog gastrointestinalnog trakta, ulazak u hepatocite, bubrežnu ekskreciju, kao i prolazak kroz krvno-moždanu i placentalnu barijeru. Mesta metaboličke razgradnje KNI su jetra, tanko crevo i bubrezi. Svi poznati metaboliti koji nastaju tokom biotransformacije ovih lekova pokazuju značajno manju aktivnost u odnosu na same KNI. Za razliku od CYP3A4 enzima, koji se nalazi u funkcionalnom obliku u jetri i tankom crevu svih ljudi, funkcionalnu formu CYP3A5 enzima imaju samo CYP3A5 ekspresori. Dominantan izoenzim u metabolizmu CsA je CYP3A4, dok CYP3A5 primarno metaboliše TAC kod CYP3A5 ekspresora (14).

## **1.2. P-GLIKOPROTEIN**

P-glikoprotein je najrasprostranjeniji transmembranski transporter u ljudskom organizmu. Odgovoran je za ekskreciju iz intracelularnog u ekstracelularni prostor ćelija mnogobrojnih egzogenih i endogenih supstanci. Pripada familiji ATP vezujućih transportera (ATP binding cassette membrane transporter, ABC) (15). ABC superfamilija u humanoj populaciji ima 49 članova, podeljenih u sedam subfamilija (16). To je efluksna pumpa, prvobitno identifikovana u malignim ćelijama kao protein rezistentan na mnoge lekove („multidrug resistance protein 1“), po čemu je i gen koji kodira sintezu P-glikoproteina nazvan „multidrug resistance gene 1“ (17, 18).

Sastoji se od dva transmembranska domena i dva intracelularna vezujuća regiona, veličine 170 daltona.

P-glikoprotein kontroliše intestinalnu apsorpciju i hepatičku i renalnu ekskreciju mnogobrojnih supstanci, od kojih su neke i potencijalno toksične. Sprečava prolazak lekova i drugih egzotoksina kroz placentalnu i krvno-moždanu barijeru. Na ovaj način P-glikoprotein ima primarno zaštitnu ulogu u našem organizmu.

### **1.2.1. Distribucija u tkivima**

#### **1.2.1.1. Gastrointestinalni trakt**

P-glikoprotein i CYP3A enzimi nehomogeno su eksprimirani duž celog gastrointestinalnog trakta. KNI kao izrazito lipofilni molekuli lako prolaze apikalnu membranu enterocita i njihova sudbina dalje može ići u tri smeru. P-glikoprotein ih može vratiti nazad u lumen creva, mogu postati supstrat CYP3A enzima ili kroz bazolateralnu membranu ući u portnu cirkulaciju (10). Koncentracija CYP3A4 u enterocitima smanjuje se u smeru distalnih partija, a koncentracija P-glikoproteina se povećava (10, 19). U distalnim partijama ileuma i u delu kolona koncentracija CYP3A4 je toliko mala da se i pored velike koncentracije P-glikoproteina TAC vrlo efikasno apsorbuje. U rektumu i sigmi koncentracija P-glikoproteina korelira sa nivoom CYP3A5, ali samo kod osoba koje imaju aktivnu formu ovog enzima (15).

Dijareja povećava koncentraciju TAC u krvi (20). Transport TAC do distalnog ileuma i kolona, a to su mesta najveće apsorpcije ovog leka, tokom dijareje je ubrzan (21). S druge strane, inflamacijom izmenjena sluznica creva pokazuje manju koncentraciju CYP3A4 enzima u odnosu na zdravu sluznicu (22, 23). Povećanoj koncentraciji TAC u krvi tokom dijareje, ali i zapaljenskih procesa sluznice creva drugih etiologija, kao što su inflamatorna bolest creva i divertikuloza, doprinosi i smanjena ekspresija P-glikoproteina na inflamiranoj sluznici creva (22).

### **1.2.1.2. Krvno-moždana barijera**

P-glikoprotein je najznačajniji transporter u okviru krvno-moždane barijere koji štiti CNS od prodora toksičnih egzogenih supstanci. Postoje dokazi da prilikom oštećenja krvno-moždane barijere dolazi do prolaska KNI i ispoljavanja neurotoksičnih efekata ovih lekova (24).

### **1.2.1.3. Placenta**

P-glikoprotein je deo i placentalne barijere. Čineći deo jedne od najvažnijih krvno-tkivnih barijera ljudskog organizma, ovaj transporter učestvuje u zaštiti ploda od potencijalno toksičnih supstanci iz organizma majke. Studije su pokazale da je koncentracija TAC u umibilikalnoj veni i arterijskoj krvi fetusa manja od koncentracije u krvi majke, upravo zbog aktivnosti P-glikoproteina (25, 26).

### **1.2.1.4. Jetra**

P-glikoprotein eksprimiran je i u kanalikularnom sistemu hepatocita, ali oko sedam puta manje u odnosu na tanko crevo. Hepatička ekspresija P-glikoproteina pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost, što delimično objašnjava razlike u bioraspoloživosti KNI i mnogih drugih lekova (27, 28).

### **1.2.1.5. Limfociti**

Intralimfocitna koncentracija KNI najvažnija je frakcija ukupne koncentracije. Direktno je odgovorna za imunosupresivni efekat ovih lekova. Pod kontrolom je P-glikoproteina na membrani limfocita (10). Prema nekim istraživanjima, jedan od faktora koji utiču na intracelularnu koncentraciju KNI jesu i godine. U studiji Meier-a i saradnika pokazano je da je kod bolesnika starijih od 65 godina intralimfocitna koncentracija KNI bila za 44% veća u odnosu na cirkulišuću koncentraciju. Ovo može biti jedan od načina da se objasni manja sklonost ka akutnim odbacivanjima a veća ka predoziranosti KNI kod starijih recipijenata (29).



### **1.2.1.6. Bubrež**

Tubulske ćelije eksprimiraju P-glikoprotein i CYP3A5, a veoma malo CYP3A4 enzim, pri čemu je uloga bubrega u metabolizmu KNI beznačajna. Neposredno nakon transplantacije, kada je u većini slučajeva prisutna i insuficijencija alografta, potrebne su veće doze KNI za održavanje željenog nivoa leka u krvi. Ovo je posledica prvenstveno anemije, primene velikih doza kortikosteroida i hipoalbuminemije, a ne same uloge bubrega u metabolizmu ovih lekova (30).

## **1.3. INTERREAKCIJE KALCINEURINSKIH INHIBITORA SA DRUGIM LEKOVIMA**

KNI interreaguju sa velikim brojem lekova. Samim tim, brojni lekovi koji su supstrati P-glikoproteina i CYP3A enzima mogu da utiču na koncentraciju KNI, inhibicijom ili indukcijom CYP3A enzimskog sistema, odnosno P-glikoproteina (Tabela 1.).

Izuzetno jaki ihibitori P-glikoproteina su kalcijumski antagonisti iz grupe nedihidropiridinskih derivata, koji se često koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Inhibicija P-glikoproteina na nivou krvno-moždane barijere ovim lekovima može dovesti do neurotoksičnih efekata KNI koji se pri normalnoj funkciji P-glikoproteina ne ispoljavaju, što je i pokazano u slučaju istovremene upotrebe verapamila sa loperamidom (31).

Pored lekova, i supstance unete hranom mogu uticati na nivo KNI u krvi. Najznačajniji inhibitor CYP3A4 enzima, koji do čak 200% može povećati koncentraciju KNI, jeste grejpfrut (32). Kurkuma, đumbir i kantarion se smatraju slabim inhibitorima CYP3A4, a o interreakciji KNI sa pomorandžom i brusnicom nema podataka (10). Neka istraživanja pokazala su da crveno vino može i do 30% smanjiti koncentraciju CsA (33).

Tabela 1. Interreakcije KNI sa drugim lekovima.

Lek	Efekat na CYP3A	Efekat na P-glikoprotein	Efekat na dozu KNI
<b>Antiaritmici</b> Amiodarone Dronedarone Quinidine	inhibitor inhibitor inhibitor	inhibitor inhibitor inhibitor	smanjuje smanjuje nema podataka
<b>Antikancerski lekovi</b> Doxorubicin Vinblastin	inhibitor inhibitor	ne utiče inhibitor	nema podataka nema podataka
<b>Antidepresivi</b> Fluoxetine Fluvoxamine Nefazodone Paroxetine Sertraline	inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor	inhibitor ne utiče inhibitor inhibitor inhibitor	ne utiče smanjuje smanjuje ne utiče ne utiče
<b>Antigljivični lekovi</b> Clotrimazole Fluconazole Itraconazole Ketoconazole Voriconazole	inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor	inhibitor ne utiče inhibitor inhibitor ne utiče	smanjuje smanjuje smanjuje smanjuje smanjuje
<b>Blokatori Ca kanala</b> Amlodipine Diltiazem Felodipine Nicardipine Nifedipine Verapamil	inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor	ne utiče inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor	smanjuje smanjuje smanjuje smanjuje ne utiče smanjuje
<b>Inhibitori HIV proteaze</b>	inhibitor	Inhibitor	smanjuje
<b>Makrolidni antibiotici</b> Azithromycin Clarithromycin Erythromycin Roxithromycin	inhibitor inhibitor inhibitor inhibitor	ne utiče inhibitor inhibitor ne utiče	ne utiče smanjuje smanjuje smanjuje
<b>Antikonvulzivni lekovi</b> Carbamazepine Phenobarbital Phenytoin	induktor induktor induktor	ne utiče induktor ne utiče	povećava povećava povećava
<b>Kortikosteroidi</b> Dexamethasone Methylprednisolone	induktor induktor	induktor ne utiče	nema podataka povećava
<b>Rifampicin</b>	induktor	induktor	povećava

Modifikovano prema Vanhove et al., 2016.

## **1.4. GENSKI POLIMORFIZMI ZNAČAJNI ZA METABOLIZAM KALCINURINSKIH INHIBITORA**

KNI, pored uskog terapijskog opsega i sklonosti ka interreakciji s drugim lekovima, pokazuju i veliku intraindividualnu i interindividualnu varijabilnost. Ove osobine rezultat su razlika u aktivnosti enzima i transportera koji učestvuju u njihovom metabolizmu, a u osnovi tih razlika stoje polimorfizmi gena odgovornih za njihovu sintezu (34). Najčešće genske varijacije su pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (single nucleotide polymorphisms, SNPs), koji podrazumevaju zamenu jednog nukleotida drugim, što može ali ne mora da rezultira zamenom jedne aminokiseline drugom u procesu translacije.

### **1.4.1. CYP3A genski polimorfizmi**

Polimorfizam CYP3A5 gena na poziciji 6986, u intronu 3 (rs776746), koji podrazumeva zamenu adenina (A) guaninom (G), najznačajniji je polimorfizam za metabolizam TAC. Samo ovaj polimorfizam objašnjava oko 39% interindividualne varijabilnosti TAC (35). Mutacija na ovoj poziciji usko je povezana za ekspresijom CYP3A5 enzima. Osobe koje su nosioci tzv. divljeg alela, kod kojih se na poziciji 6986 nalazi A, odnosno imaju bar jedan CYP3A5\*1 alel, pripadaju grupi CYP3A5 ekspresora. Homozigoti za CYP3A5\*3 alel, tzv. varijant aleli, kod koji je A zamenjen sa G, ekspimiraju značajno manje funkcionalnog CYP3A5 enzima i pripadaju grupi CYP3A5 neekspresora. Mnogobrojne studije pokazale su nesumnjivo da CYP3A5 ekspresori zahtevaju i do 50% veće doze TAC za postizanje ciljnog nivoa leka u odnosu na neekspresore. Ovakve razlike u doznim zahtevima potvrđene su nakon transplantacije i drugih organa, ne samo bubrega, i u adultnoj i pedijatrijskoj populaciji (34, 36, 37). Epidemiološke studije pokazuju da samo 5-15% pripadnika bele rase pripada grupi CYP3A5 ekspresora, oko 30% Azijata i čak 70% Afrikanaca (38). Povezanost polimorfizma CYP3A5 sa metabolizmom CsA je bez sigurnih dokaza.

Gen koji kodira sintezu CYP3A4 enzima ima najmanje 28 SNPs. Najvažniji među njima je na poziciji -392, ali nema jasnih dokaza o značaju ovog polimorfizma za metabolizam KNI. I studije koje su pokazale da su „varijant aleli“ zahtevali veće doze TAC su opovrgnute jer je to bila posledica povezanosti sa CYP3A5\*1 alelom (14).

U posljednje vreme sve više naučnu pažnju privlači CYP3A\*22 polimorfizam. Pokazano je da TT homozigoti za ovaj SNP zahtevaju manje doze TAC za postizanje ciljnog nivoa u odnosu na „divlje homozigote“ i heterozigote, i to nezavisno od CYP3A5 polimorfizma (39).

#### 1.4.2. MDR1 genski polimorfizmi

MDR1 gen (engleski termin „multidrug resistance gene 1“) lokalizovan je na hromozomu 7, krak q21, i ima 28 eksona. Prema imenu svog proteinskog produkta, naziva se i ABCB1 gen (18). Veoma je polimorfan, a do sada je identifikovano oko 100 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama u kodirajućem regionu ovog gena (15). Za metabolizam KNI najznačajnija su sledeća tri SNPs.

C1236T (rs1128503) polimorfizam lokalizovan je na egzonu 12 i podrazumeva zamenu citozina (C) timinom (T) na poziciji 1236. Ovaj polimorfizam ne dovodi do promene aminokiseline, pa pripada „tihim mutacijama“.

Drugi polimorfizam je troalelski i lokalizovan je na egzonu 21 (G2677T/A, rs2032582). Na poziciji 2677 G može biti zamenjen T ili A. Kao rezultat zamene baza dolazi i do promene aminokiselina u kodonu 983, umesto alanina sintetise se serotonin ili triptofan.

Treći SNP je C3435T (rs1045642), lokalizovan na egzonu 26. Podrazumeva zamenu C sa T na poziciji 3435 i ne dovodi do zamene aminokiseline (40).

Rezultati ispitivanja o povezanosti ova tri pojedinačna nukleotidna polimorfizma sa metabolizmom KNI još uvek su bez jasnih zaključaka. Najviše podataka sa najjačim dokazima potiče iz studija koje su ispitivale C3435T polimorfizam, zbog čega je on i dalje najviše ispitivan SNP MDR1 gena. TT homozigoti na ovoj poziciji povezani su sa smanjenim nivoom informacione RNK i posledično smanjenom ekspresijom P-glikoproteina (41), što bi teorijski značilo povećanu apsorpciju i povećanu koncentraciju KNI u sistemskoj cirkulaciji. Međutim, u tumačenju uticaja genskih polimorfizama na fiziološke procese, treba imati u vidu da SNPs mogu uticati međusobno jedni na druge, što se definiše pojmom „linkage disequilibrium“ i kao takvi imati određene efekte na naš metabolizam (14).

SNPs se ne nasleđuju samostalno. Češće se nasleđuju kao cela sekvenca DNK, odnosno kao haplotip ili set bliskih gena koji se dobijaju zajedno od predaka. U tom kontekstu i

polimorfizme C1236T, G2677T/A i C3435T ne nasleđujemo pojedinačno, već u obliku haplotipa. Shodno tome, haplotip ova tri polimorfizma značajniji je genski marker njihovog uticaja na metabolizam KNI nego bilo koji od polimorfizama pojedinačno (42).

### **1.4.3. Ostali polimorfizmi važni za metabolizam KNI**

Teorijski, polimorfizam gena bilo kojeg proteina koji učestvuje u metabolizmu KNI može imati i uticaj na njega.

Identifikovana su dva SNPs na genu koji kodira sintezu ciklofilina A i povezana su sa povećanim rizikom nefrotoksičnog efekta CsA (43).

Značajan uticaj na metabolima TAC pridaje se polimorfizmu gena za NADPH-CYP oksidoreduktazu (POR\*28), enzim koji učestvuje u procesu CYP-posredovane oksidacije. Studija de Jonge i saradnika pokazala je da su TT homozigoti za polimorfizam POR\*28 zahtevali 25% veće doze TAC u odnosu na CC homozigote kod CYP3A5 ekspresora (44).

## **1.5. FARMAKODINAMIKA KALCINEURINSKIH INHIBITORA I POVEZANOST SA GENSKIM POLIMORFIZMIMA**

Balans između optimalnog imunosupresivnog efekta i minimalne toksičnosti KNI predstavlja uslov uspešne transplantacije bubrega. To podrazumeva održavanje koncentracije ovih lekova u uskom terapijskom opsegu, različito definisanom za određeni vremenski period nakon transplantacije (45, 46). Zahvaljujući terapijskom monitoringu KNI, vreme u kome je bolesnik izložen subterapijskim ili supratherapijskim koncentracijama leka svodi se na minimum. Na taj način korigujemo i genetski determinisane razlike u potrebnoj dozi leka za postizanje ciljnog nivoa. Međutim, povezanost genskih polimorfizama i farmakodinamike KNI još uvek nije jasno definisana. Ne zna se zašto se kod nekih bolesnika javljaju neželjeni efekti KNI i pored terapijske koncentracije ovih lekova, odnosno zašto dolazi do akutnog odbacivanja i kada je koncentracija KNI supratherapijska (47).

### **1.5.1. Akutno odbacivanje**

Akutno odbacivanje (AO) je komplikacija nakon transplantacije bubrega koja ima najveći uticaj na funkciju alografta, kako u ranom tako i u kasnijem posttransplantacionom periodu. Genetska AO alografta, iako intenzivno ispitivana, još uvek nije jasno definisana. Dosadašnja istivanja nisu dokazala povezanost učestalosti AO i polimorfizama MDR1 gena (48, 49). Ipak, rezultati nekih studija ukazuju da recipijenti sa CGT haplotipom imaju veći rizik nastanka AO nego bolesnici sa CGC ili TTT genotipom (42).

### **1.5.2. Neželjeni efekti kalcineurinskih inhibitora**

KNI imaju mnogobrojne neželjene efekte koji, s jedne strane, mogu oštetiti funkciju i skratiti preživljavanje alografta, a s druge strane, negativno uticati na komorbiditet i kvalitet života primaoca. U najtežim slučajevima neophodno je isključiti KNI iz terapije i ukoliko je moguće zameniti ih nekim drugim imunosupresivnim lekom.

#### **1.5.2.1. Nefrotoksičnost**

Nefrotoksičnost je najčešći neželjeni efekat KNI. Manifestuje se kao akutni nefrotoksični efekat i hronična insuficijencija alografta.

##### **1.5.2.1.1. Akutna nefrotoksičnost**

Akutni nefrotoksični efekat KNI doznno je zavisna reverzibilni porast koncentracije serumskog kreatinina koji može biti praćen oligoanurijom. Rezultat je konstrikcije aferentne arteriole i posledičnog smanjenja jačine glomerulske filtracije. U osnovi ovog poremećaja je disbalans metabolizma azot-monoksida i prostaglandina kao vazodilatatora s jedne, i tromboksana i endotelina kao vazokonstriktora s druge strane, ali i pojačana aktivnost simpatičkog nervnog sistema (50). Moguće je da KNI u patofiziologiji ovog stanja učestvuju i konstriktornim efektom na mezangijumske ćelije, menjajući permeabilnost glomerulske bazalne membrane, kao i

ometanjem normalne tubulske funkcije u smislu retencije natrijuma i vode, smanjene ekskrecije kalijuma i mokraćne kiseline, pojačane ekskrecije magnezijuma i hiperhloremijske metaboličke acidoze (51, 52). Vazokonstriktorni efekat, kao i retencija natrijuma, izraženiji su kod primene CsA nego TAC (1). Akutni nefrotoksični efekat KNI može produžiti trajanje odložene funkcije alografta i ovaj entitet važno je razlikovati od drugih uzroka disfunkcije grafta u ranom posttransplantacionom periodu, najpre od AO. Za sada nema dokaza o povezanosti genskih polimorfizama i TAC izazvane akutne nefrotoksičnosti, dok se neki SNPs na genima CYP2C9, PAX4, MTRR, GAN i XPC dovode u vezu sa ciklosporinskom akutnom nefrotoksičnošću (53).

#### 1.5.2.1.2. Hronična insuficijencija alografta

Dugotrajna upotreba KNI može biti uzrok hronične insuficijencije bubrega. Ovaj neželjeni efekat KNI viđa se nakon transplantacije bubrega, ali i nakon transplantacije drugih organa, kao i prilikom upotrebe KNI u lečenju autoimunih bolesti (54, 55, 56). Za razliku od akutne nefrotoksičnosti, nije dozno zavisna. U histološkoj slici bubrega nakon dugotrajne upotrebe KNI vidamo hijalinizaciju arteriola, sklerozu glomerula, intersticijalnu fibrozu i tubularnu atrofiju (IF/TA). Patofiziološki mehanizam nastanka ovog neželjenog efekta najverovatnije je dugotrajna ishemija zbog smanjenja lumena vaskularnog korita usled hijalinizacije i konstrikcije aferentne arteriole. Mogući doprinoseći faktor je i pojačana produkcija profibrotskog transformišućeg faktora rasta (TGF- $\beta$ ), kao i oštećena regenerativna sposobnost endotelnih ćelija (1, 56).

Pojava hronične insuficijencije alografta nije u korelaciji sa koncentracijama KNI u sistemskoj cirkulaciji, pa se nameće pitanje da li je ona posledica lokalnog efekta KNI na bubrežima i da li postoji individualna predispozicija za nastanak ovog neželjenog događaja. Rezultati studija o povezanosti polimorfizama MDR1 gena i hronične nefrotoksičnosti su kontradiktorni. Naesens i saradnici su pokazali da je TT genotip i davaoca i primaoca C3435T polimorfizma faktor rizika za nastanak hronične insuficijencije alografta, dok Moore i saradnici pokazuju da povećan rizik za nastanak ovog neželjenog efekta imaju CC homozigoti (56, 57).

### **1.5.2.2. Dijabetes melitus**

Posttransplantacioni dijabetes melitus česta je komplikacija nakon transplantacije bubrega. Prema nekim podacima, tokom prve godine nakon transplantacije javlja se kod čak 20–40% bolesnika (58). Kao i u opštoj populaciji, dijabetes melitus značajno povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti, mortaliteta i gubitka grafta u odnosu na primaocce bez dijabetesa (59). Faktori rizika za nastanak posttransplantacionog dijabetesa su gojaznost, starost, hipertrigliceridemija, pozitivna porodična anamneza, muški pol, rasa i hepatitis C virusna infekcija. Nastanku ove bolesti značajno doprinose i imunosupresivni lekovi. Dijabetogeni efekat imaju kortikosteroidi, mTOR inhibitori, ali i KNI, i to TAC više nego CsA. TAC dovodi do hiposekrecije insulina, direktnim toksičnim efektom na  $\beta$ -ćelije pankreasa i smanjenjem ekspresije gena za insulin. Ovaj neželjeni efekat TAC delimično je reverzibilan i dozno zavisian (60). Nesumnjivo je da dijabetogeni efekat TAC ima i genetsku osnovu, ali je značaj genskih polimorfizama verovatno mali u odnosu na prethodno pomenute demografske i kliničke faktore rizika, i svakako više gena ima uticaj na pojavu ove bolesti. Dosadašnja ispitivanja nisu pokazala jasnu povezanost polimorfizama CYP3A i MDR1 gena sa nastankom postransplantacionog dijabetesa (61, 62).

### **1.5.2.3. Hipertenzija**

KNI uzrokovana hipertenzija čest je neželjeni efekat terapije ovim imunosupresivnim lekovima. Njena patogeneza objašnjava se vazokonstriktornim efektom KNI na aferentnu arteriolu, zbog čega se u lečenju najčešće koriste blokatori kalcijumskih kanala iz grupe dihidripiridinskih derivata. Ovi lekovi inhibiraju CYP3A posredovan metabolizam KNI i njihova upotreba može značajno povećati koncentraciju KNI u krvi, naročito kod CYP3A5 ekspresora (63). Međutim, novija ispitivanja ukazuju i na moguću genetsku osnovu KNI indukovane hipertenzije. Smatra se da je u osnovi ove hipertenzije prevelika aktivnost natrijum-hloridnog kotransportera, koja u osnovi ima polimorfizam gena odgovornog za njegovu sintezu. Nesumnjivi dokazi ove hipoteze postoje na nivou eksperimentalnog modela, a u kliničkoj praksi je pokazano da je terapija hidrohloriazidom, blokatorom ovog transportera, bila efikasna u terapiji hipertenzije kod bolesnika koji su primali TAC (64).



#### **1.5.2.4. Neurotoksičnost**

Neurotoksični efekti KNI izraženiji su kod primene TAC nego CsA. Mogu biti dozno zavisni. Najčešće se manifestuju u vidu tremora, koji se javlja u oko 40% bolesnika. Neretko se mogu javiti glavobolja i nesanica. Vrlo retki, ali i klinički značajniji poremećaji su periferna polineuropatija, vizuelne halucinacije, epileptički napadi, kortikalno slepilo, psihoza i koma (65). Patogeneza neurotoksičnosti KNI nije sasvim jasna, ali pretpostavlja se da P-glikoprotein, kao ključni transporter na nivou krvno-moždane barijere, ima važnu ulogu u njoj. Neke studije pokazale su da se neurotoksični efekat TAC javlja nakon oštećenja krvno-moždane barijere (66). Iako postoje brojni dokazi o povezanosti polimorfizama MDR1 gena i KNI neurotoksičnosti, oni su nekonzistentni i obuhvataju mali broj ispitanika (67, 68).

#### **1.5.2.5. Hiperlipidemija**

*De novo* hiperlipidemija javlja se u oko 2/3 bolesnika nakon transplantacije bubrega, dominantno u vidu hiperholesterolemije. Izraženija je pri primeni CsA u odnosu na TAC. Polimorfizmi MDR1 gena, pored indirektnog uticaja preko metabolizma KNI, i na druge načine mogu uticati na metabolizam lipida. P-glikoprotein je transporter i nekih endogenih lipida kao što su holesterol, fosfolipidi, sfingolipidi, steroidi, pa teorijski, polimorfizmi gena koji kodira njegovu sintezu mogu biti povezani za različitim dislipidemijama (69). Ali P-glikoprotein transportuje i statine, i pokazano je da je terapijski efekat ovih lekova usko povezan sa C3435T polimorfizmom MDR1 gena (70).

#### **1.5.2.6. Ostali neželjeni efekti KNI**

Neželjeni efekti primene KNI ne završavaju se sa prethodno opisanim, ali je manje poznata njihova povezanost sa genskim polimorfizmima. Mogući poremećaji vezani za gastrointestinalni trakt su oštećenje jetre sa prolaznim, dozno zavisnim porastom transaminaza, hiperbilirubinemija, mučnina, povraćanje, poremećaji crevnog pražnjenja. Upotreba CsA povezana je sa povećanom incidencom holelitijaze. Takođe, hiperprolaktinemija i posledična ginekomastija neželjeni su efekti primene KNI koji se registruju kod određenog broja bolesnika nakon transplantacije

bubrega. Povećana incidenca infekcija i malignih tumora posledica je primene praktično svih imunosupresivnih lekova, samim tim i KNI (1).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje učestalosti genotipova pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (C1236T, G2677T/A i C3435T) MDR1 gena i njihovih haplotipova.
2. Ispitivanje uticaja genotipova i haplotipova MDR1 gena na farmakokinetiku KNI.
3. Ispitivanje uticaja genotipova i haplotipova MDR1 gena na
  - učestalost akutnog odbacivanja
  - učestalost odložene funkcije alografta
  - funkciju alografta.
4. Ispitivanje uticaja genotipova i haplotipova MDR1 gena na koncentraciju glukoze, kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola, triglicerida i aminotransferaza u serumu.
5. Ispitivanje uticaja polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova na nastanak insuficijencije alografta.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. DIZAJN STUDIJE I ISPITANICI**

Studija je dizajnirana je kao neinterventno retrospektivno opservaciono ispitivanje. Sprovedena je u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije i Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U ispitivanje je uključeno 152 bolesnika sa presađenim bubregom, koji su lečeni u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije. Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su:

- da su bolesnici u okrviru imunosupresivne terapije primali KNI;
- da nisu primali mTOR inhibitore;
- da imaju CYP3A5\*3\*3 genotip;
- da je od transplantacije bubrega prošlo najmanje dve godine;
- da tokom perioda posmatranja nisu primali makrolidne antibiotike, propafen, antikonvulzivne lekove ni tuberkulostatike;
- da su bili hepatitis B, C i HIV negativni.

Svim ispitanicima je, pre ulaska u studiju, predocen protokol ispitivanja i potpisali su informisani pristanak.

Istraživanje su odobrili Etički komitet Kliničkog centra Srbije i Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

#### **3.2. IZOLACIJA DNK I DETEKCIJA POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA I HAPLOTIPOVA MDR1 GENA**

Za određivanje genskih polimorfizama ispitanicima je uzimano 5 ml periferne krvi u odgovarajuće epruvete (Becton Dickinson, Nju Džersi, SAD) sa antikoagulansom – EDTA, i unutar 4 h transportovano do Laboratorije za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju. Molekul DNK izolovan je iz uzoraka pune krvi standardnom metodom kolonice (Fermentas Thermo Fisher Scientific Inc, St. Leon-Rot, Germany). Čistoća dobijene DNK određivana je merenjem apsorbancije na 260 i 280 nm, prihvatljivi opsezi/vrednosti su bili između 1,65 i 1,85. U suprotnom, ponavljana je izolacija DNK iz uzorka krvi. Iz izolovane DNK uzimani

su uzorci od 500 ng i dopunjavani vodom do zapremine od 125  $\mu$ l čime su dobijana razblaženja od 4 ng/ $\mu$ l koja su korišćena za određivanje polimorfizama. Za detekciju polimorfizama pojedinačnih nukleotidnih sekvenci MDR1 gena korišćen je TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Korišćene su komercijalne probe za rs1128503, rs2032582 и rs1045642 (C\_7586662\_10, C\_7586657\_20, C\_11711720C\_30 и C\_11711720D\_40).

### **3.3. IMUNOSUPRESIVNI PROTOKOLI I TERAPIJSKI MONITORING KALCINEURINKIH INHIBITORA**

Podaci o imunupresivnoj terapiji dobijeni su iz medicinske dokumentacije (karton bolesnika sa presađenim bubregom). Svi ispitanici kao terapiju održavanja primali su kortikosteroide i KNI, uz antiproliferativne lekove poput preparata mikofenolične kiseline (mikofenolat mofetil ili mikofenolat natrijum) ili azatioprin. KNI primenjivani su peroralno od dana transplantacije, odnosno dva dana pre transplantacije u slučaju transplantacije od živog davaoca, dva puta dnevno (08:00 h i 20:00 h). TAC je primenjivan u početnoj dozi 0,3 mg/kg telesne težine, a CsA 8,0 mg/kg telesne težine. Doza je zatim korigovana prema ciljnom nivou. Prema imunopresivnom protokolu centra, ciljni nivo TAC prve dve nedelje nakon transplantacije bio je između 15 i 20 ng/ml, 10–15 ng/ml do kraja prvog meseca, 7–10 ng/ml od kraja prvog do kraja šestog meseca, i 5–7 ng/ml posle šestog meseca od transplantacije. Prvih mesec dana od transplantacije ciljni nivo CsA je bio 100–150 ng/ml, između drugog i šestog meseca 150–200 ng/ml, zatim 100–150 ng/ml do kraja prve godine i 80–100 ng/ml nakon prve godine od transplantacije. Nivoi CsA i TAC su određivani pomoću hemiluminiscentne metode (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) ARCHITECT Tacrolimus assay (Abbot Laboratories Diagnostics Division Abbot park, IL 60064 USA). Beležene su u doze i nivoi lekova u sedam vremenskih tačaka nakon transplantacije – 10, 20, 30. dan, 3, 6, 12 i 24. mesec. Odnos nivoa i doze (N/D) određivan je kao količnik koncentracije KNI u krvi i dnevne doze leka.

### **3.4. AKUTNO ODBACIVANJE**

Akutno odbacivanje definisano je kao pogoršanje funkcije grafta koje se oporavilo nakon primene pulsni doza kortikosteroida, ili je dijagnostikovano na osnovu patohistološkog nalaza bioptiranog alografta.

### **3.5. ODLOŽENA FUNKCIJA ALOGRAFTA**

Odložena funkcija alografta (OFA) definisana je kao neuspostavljanje adekvatne funkcije alografta i potreba za lečenjem hemodijalizama tokom prvih 15 dana nakon transplantacije.

### **3.6. LABORATORIJSKI I KLINIČKI PARAMETRI PRAĆENJA**

Iz medicinske dokumentacije beleženi su podaci o funkciji presađenog bubrega, i to vrednost serumskog kreatinina (sCr), klirens kreatinina (CCr) i dvadesetčetvoročasovna proteinurija (prt) 1, 3, 6 i 12. meseca, a zatim na godinu dana do kraja praćenja. Normalna funkcija alografta definisana je vrednošću serumskog kreatinina  $\leq 177 \mu\text{mol/l}$ , a na osnovu podataka iz Evropskog vodiča dobre kliničke prakse (71).

Pored parametara funkcije presađenog bubrega, praćene su i vrednosti glikemije, hemoglobina, hematokrita, mokraćne kiseline, kalijuma, aspartat- i alaninaminotransferaze, ukupnog holesterola i triglicerida. Takođe, analizirano je i eventualno prisustvo posttransplantacionog dijabetes melitusa i arterijske hipertenzije.

### **3.7. STATISTIČKA ANALIZA**

Normalnost raspodele kontinuiranih numeričkih obeležja posmatranja testirana je Kolmogorov–Smirnov testom i njihove vrednosti izražene su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija, odnosno kao medijana i interkvartilni opseg, zavisno od oblika raspodele. Značajnost razlike između dve nezavisne grupe kontinuiranih numeričkih varijabli analizirana je Student's t testom ili Mann-Whitney U testom ukoliko varijable nisu zadovoljile pretpostavku normalnosti raspodele. Značajnost razlike između tri i više nezavisnih grupa ispitivana je jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) ili Kruskal–Wallis jednofaktorskom analizom varijanse sa

rangovima, u zavisnosti od oblika raspodele kontinuiranih numeričkih obeležja posmatranja. Za post hoc analizu korišćen su Tukey-ev i Mann-Whitney-ev test. Jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjima korišćena je za ponovljena merenja u više od dva vremenska intervala.

Kategorijske varijable prikazane su apsolutnim brojem i procentom. Značajnost razlike između grupa je ispitivana  $\chi^2$  testom ili Fisher-ovim testom tačne verovatnoće ukoliko nisu zadovoljene pretpostavke upotrebe  $\chi^2$  testa.

Univarijatna linearna regresiona analiza korišćena je za procenu odnosa između različitih kliničkih i genetskih varijabli sa dozama TAC. Varijable koje su pokazale značajnu korelaciju na novou alfa greške  $\leq 10\%$  testirane su u multivarijatnom modelu radi definisanja nezavisnih prediktora doza TAC. Zavisni i nezavisni prediktori nastanka insuficijencije alografta tokom vremena praćenja određivani su upotrebom Cox-ove univarijatne i multivarijatne proporcionalne regresione analize. Varijable koje su u univarijantnoj analizi imale alfa grešku  $\leq 10\%$  testirane su u multivarijantnoj Cox-ovoj proporcionalnoj regresionoj analizi u kojoj je korišćen metod forward stepwise unosa podataka. Kaplan–Meier-ovom krivom prikazano je preživljavanje bez indeksnog događaja, a značajnost razlike preživljavanja između grupa testirana je Log rank testom. Nivo značajnosti za odbacivanje nulte hipoteze definisan je kao  $p < 0,05$ . Statistička obrada podataka vršena je u programu SPSS, verzija 17 (SPSS, Chicago, III).

Za analizu haplotipova tri pojedinačna polimorfizma MDR1 gena korišćen je Arlequin softver, verzija 3.5.1.3. Svi rezultati su testirani za Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum, kalkulatorom dostupnim na internet mreži (Michael H. Court (2005-2008)).

## 4. REZULTATI

### 4.1. OSNOVNI PODACI

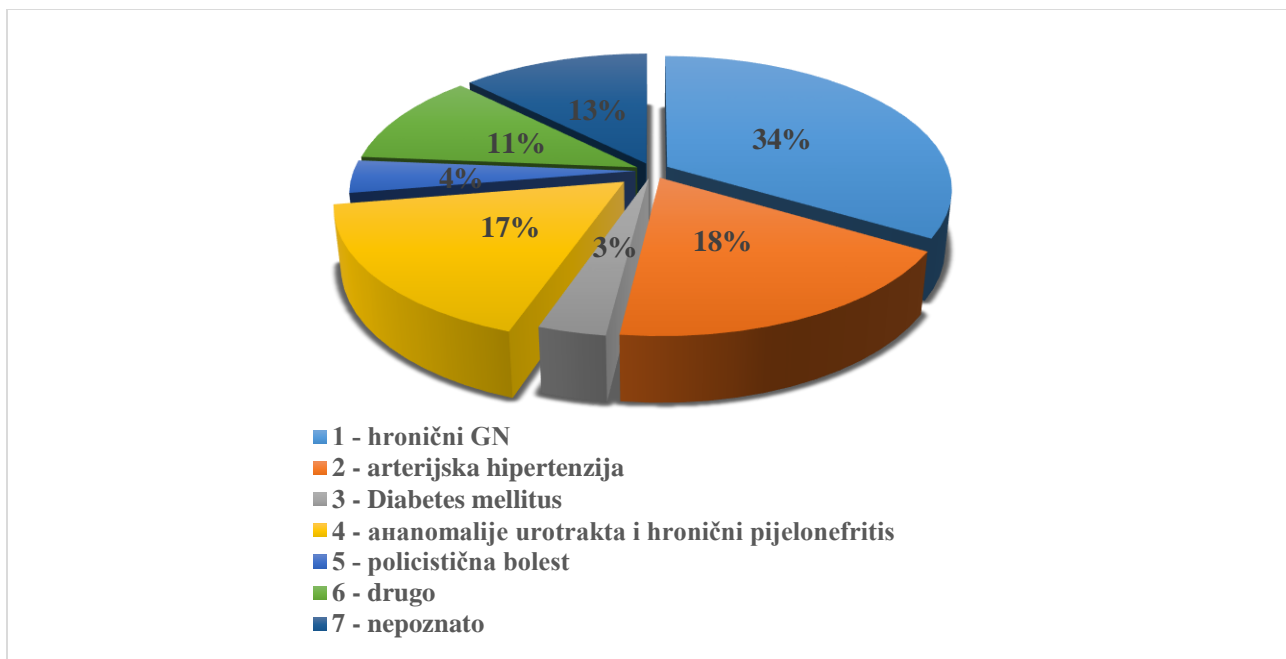
Ispitivanjem su obuhvaćena 152 bolesnika (92 muškarca) sa presađenim bubregom, prosečne starosti  $36,30 \pm 12,88$  godina. Tri petine bolesnika dobilo je bubreg od živog srodnog davaoca, a 60 od moždano mrtvog davaoca. TAC, kao KNI, primao je 91 bolesnik (Tabela 2). Svi bolesnici su uz KNI primali kortikosteroide, 118 bolesnika i preparat mikofenolične kiseline, a 34 bolesnika su, uz CsA i kortikosteroide, primala azatioprin.

Tabela 2. Demografski podaci ispitivanih bolesnika

Ukupan broj	152
Pol (m/ž)	92/60
Godine (srednja vrednost $\pm$ SD)	$36,30 \pm 12,88$
Živi/moždano mrtav donator (broj)	92/60
KNI (TAC/CsA, broj)	91/61

Etiologija hronične bubrežne insuficijencije ispitivanih bolesnika prikazana je na grafikonu 1. Najčešći uzrok terminalne bubrežne slabosti bio je glomerulonefritis (34%), zatim slede arterijska hipertenzija (18%), anomalije urinarnog trakta i hronični pijelonefritis (17%). Kod 13% bolesnika osnovno bubrežno oboljenje nije bilo je poznato.





Grafikon 1. Uzroci hronične bubrežne insuficijencije ispitivanih bolesnika

Najveći broj ispitivanih bolesnika imao je tri HLA nepodudarnosti sa davaocem (48,03%). Jedan bolesnik imao je potpunu podudarnost na sva tri lokusa, a kod pet bolesnika transplantacija je učinjena sa samo jednom podudarnošću (Tabela 3). Nijedan bolesnik nije imao preko 5 % PRA (Panel Reactive Antibody).

Tabela 3. Broj HLA nepodudarnosti kod ispitivanih primalaca bubrega

HLA A/B/DR nepodudarnost	Broj bolesnika (%)
0	1 (0,66%)
1	13 (8,55%)
2	32 (21,05%)
3	73 (48,03%)
4	28 (18,42%)
5	5 (3,29%)

#### 4.2. UČESTALOST GENOTIPOVA POJEDINAČNIH NUKLEOTIDNIH POLIMORFIZAMA (C1236T, G2677T/A I C3435T) MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA

Ispitivana su tri pojedinačna nukleotidna polimorfizma MDR1 gena sa najvećim značajem za metabolizam KNI (C1236T, G2677T/A i C3435T), lokalizovana na egzonu 12, 21 i 26. Najveći broj bolesnika bili su heterozigoti za sva tri polimorfizma (Tabela 4). Samo jedan ispitanik bio je TT homozigot za C1236T polimorfizam, pa je isključen iz dalje analize. Četiri bolesnika su za troalelski polimorfizam na egzonu 21 imali TA genotip i u daljoj analizi su pridruženi GT heterozigotima.

Tabela 4. Učestalost genotipova C1236T, G2677T/A i C3435T MDR1 gena

SNP	genotip	broj (%)
C1236T	CC	44 (28,95)
	CT	107 (70,39)
	TT	1 (0,66)
G2677T/A	GG	45 (29,61)
	GT	79 (51,97)
	TT	24 (15,79)
	TA	4 (2,63)
C3435T	CC	41 (26,97)
	CT	77 (50,66)
	TT	34 (22,37)

Genotipovi se međusobno nisu značajno razlikovali u odnosu na pol, starost, ni vrstu transplantacije, što je prikazano u tabeli 5.

Tabela 5. Demografski podaci bolesnika u odnosu na genotipove

SNP		godine	muški rod	živa transpl.
C1236T	CC	36,68 ± 13	26 (59,09%)	26 (59,09%)
	CT	36,10 ± 13	66 (61,68%)	65 (60,74%)
	p	0,803	0,767	0,850
G2677T/A	GG	38,07 ± 14	28 (62,22%)	25 (55,55%)
	GT	35,75 ± 13	50 (56,28%)	51 (61,45%)
	TT	35,04 ± 11	14 (58,33%)	16 (66,67%)
	p	0,587	0,949	0,646
C3435T	CC	35,29 ± 13	26 (63,41%)	27 (65,85%)
	CT	36,08 ± 13	46 (59,74%)	43 (55,84%)
	TT	38,03 ± 11	20 (58,82%)	22 (64,70%)
	p	0,645	0,903	0,486

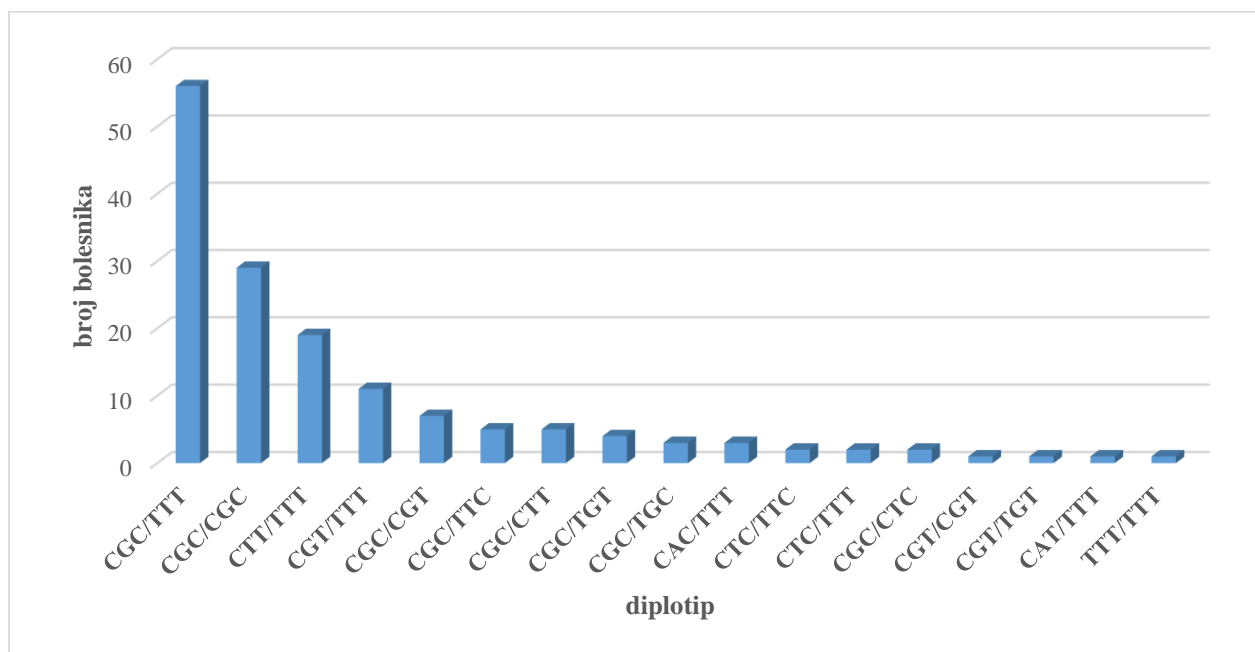
Učestalosti genotipova za polimorfizme G2677T/A i C3435T bile su u Hardi - Vajnebergovom ekvilibrijumu ( $p = 0,16$  za G2677T/A,  $p = 0,85$  za C3435T), ali ne i za genotipove C1236T polimorfizma ( $p < 0,01$ ).

U tabeli broj 6 prikazani su haplotipovi dobijeni na osnovu identifikovanih genotipova pojedinačnih polimorfizama. Dva haplotipa sa najvećom učestalošću bili su CGC (45,38%) i TTT (30,01%). Zatim slede CTT (8,42%) i CGT (7,12%), dok je preostalih šest imalo učestalost manju od 5%.

Tabela 6. Učestalost haplotipova MDR1 gena ispitivanih bolesnika

Haplotip	C1236T	G2677T/A	C3435T	učestalost (%)
CGC	C	G	C	45,38
TTT	T	T	T	30,01
CTT	C	T	T	8,42
CGT	C	G	T	7,12
TTC	T	T	C	2,75
CTC	C	T	C	1,92
TGT	T	G	T	1,79
TGC	T	G	C	1,30
CAC	C	A	C	0,95
CAT	C	A	T	0,36

Kombinacijom deset haplotipova dobijeno je 17 diplotipova, ali samo četiri su sa učestalošću većom od 5% (Grafikon 2), i oni su korišćeni u daljoj analizi za ispitivanje uticaja diplotipova na metabolizam KNI. Diplotip CGC/TTT imao je 56 bolesnika, CGC/CGC 29, CTT/TTT 19, a CGT/TTT 11, što je ukupno činilo 75,66% svih ispitanika.



Grafikon 2. Učestalost diplotipova MDR1 gena ispitivanih bolesnika

### 4.3. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA FARMAKOKINETIKU KALCINEURINSKIH INHIBITORA

#### 4.3.1. Uticaj polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova na farmakokinetiku TAC

Prvi korak u analizi uticaja polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku TAC bio je ispitivanje povezanosti pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama i doze TAC. Ispitali smo uticaj polimorfizama na dozu TAC izraženu u mg/kg na dan, kao i na odnos nivoa i doze TAC (N/D).

Heterozigoti za polimorfizam C1236T zahtevali su veće doze TAC tokom celog perioda praćenja da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi u odnosu na CC homozigote. Ta razlika u potrebnim dozama bila je značajna u šestom mesecu i drugoj godini nakon transplantacije (Tabela 7).

Tabela 7. Uticaj C1236T polimorfizma MDR1 gena na dozu TAC

Vreme nakon transplantacije	Doza TAC (mg/kg/dan)		p
	CC genotip	CT genotip	
10. dan	0,20 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,40
20. dan	0,19 ± 0,06	0,22 ± 0,08	0,06
1. mesec	0,17 ± 0,06	0,20 ± 0,07	0,07
3. mesec	0,10 (0,05)	0,12 (0,09)	0,36
6. mesec	0,07 (0,06)	0,10 (0,05)	<b>0,04</b>
12. mesec	0,05 (0,03)	0,07 (0,06)	0,05
24. mesec	0,05 (0,04)	0,06 (0,04)	<b>0,03</b>

U tabeli 8 prikazan je uticaj polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze TAC. Bez obzira na genotip, ispitivani bolesnici nisu se razlikovali u pogledu odnosa nivoa i doze TAC.

Tabela 8. Uticaj C1236T polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze TAC

Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze TAC [(ng/ml) / (mg/dan)]		p
	CC genotip	CT genotip	
10. dan	0,82 (0,41)	0,79 (0,56)	0,50
20. dan	1,02 (0,70)	0,84 (0,38)	0,08
1. mesec	1,02 (0,64)	1,04 (0,54)	0,38
3. mesec	1,29 (0,83)	1,25 (0,84)	0,97
6. mesec	1,42 (1,24)	1,14 (0,81)	0,06
12. mesec	1,65 (1,04)	1,46 (0,88)	0,27
24. mesec	1,48 (0,81)	1,36 (0,95)	0,39

Analiziran je i troalelski polimorfizam MDR1 gena lokalizovan na egzonu 21. Nosioi TT genotipa zahtevali najveće doze TAC u odnosu na „divlje homozigote“ i heterozigote tokom celog perioda praćenja da bi dostigli ciljni nivo leka, što je prikazano u tabeli 9.

Tabela 9. Uticaj G2677T/A polimorfizma MDR1 gena na dozu TAC

Vreme nakon transplantacije	Doza TAC (mg/kg/dan)			p
	GG genotip	GT genotip	TT genotip	
10. dan	0,2 ± 0,09	0,21 ± 0,08	0,26 ± 0,07	<sup>a</sup> <b>0,04</b>
20. dan	0,19 ± 0,07	0,21 ± 0,07	0,27 ± 0,07	<sup>b</sup> <b>0,01</b>
1. mesec	0,17 ± 0,07	0,18 ± 0,06	0,24 ± 0,07	<sup>c</sup> <b>0,001</b>
3. mesec	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,17 ± 0,07	<sup>d</sup> <b>0,002</b>
6. mesec	0,08 ± 0,05	0,09 ± 0,05	0,13 ± 0,07	<sup>e</sup> <b>0,008</b>
12. mesec	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,09 ± 0,05	<sup>f</sup> <b>0,012</b>
24. mesec	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,05	<sup>g</sup> <b>&lt;0,001</b>

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>GT vs. TT p=0,048

<sup>b</sup>GG vs. TT p=0,001, GT vs. TT p=0,005

<sup>c</sup>GG vs. TT p=0,004, GT vs. TT p=0,003

<sup>d</sup>GG vs. TT p=0,004, GT vs. TT p=0,003

<sup>e</sup>GG vs. TT p=0,006, GT vs. TT p=0,032

<sup>f</sup>GG vs. TT p=0,010, GT vs. TT p=0,038

<sup>g</sup>GG vs. TT p<0,001, GT vs. TT p=0,001

TT homozigoti imali su i manji skor N/D u odnosu na druga dva genotipa. Značajnost razlike dostignuta je desetog ( $p = 0,004$ ) i dvadesetog dana ( $p = 0,005$ ), na kraju prvog ( $p = 0,005$ ) i šestog meseca ( $p = 0,022$ ) nakon transplantacije (Tabela 10).

Tabela 10. Uticaj G2677T/A polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze TAC

Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze TAC [(ng/ml) / (mg/dan)]			p
	GG genotip	GT genotip	TT genotip	
10. dan	0,81 (0,42)	0,88 (0,62)	0,60 (0,33)	<sup>a</sup> <b>0,004</b>
20. dan	1,05 (0,78)	0,9 (0,3)	0,67 (0,26)	<sup>b</sup> <b>0,005</b>
1. mesec	1,04 (0,53)	1,08 (0,56)	0,65 (0,65)	<sup>c</sup> <b>0,005</b>
3. mesec	1,13 (0,92)	1,25 (0,70)	1,32 (1,06)	0,45
6. mesec	1,43 (1,31)	1,30 (0,79)	0,93 (0,90)	<sup>d</sup> <b>0,022</b>
12. mesec	1,65 (1,08)	1,56 (0,92)	1,17 (1,0)	0,06
24. mesec	1,47 (0,87)	1,48 (0,83)	1,13 (1,1)	0,06

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>GG vs. TT  $p=0,005$ , GT vs. TT  $p=0,002$

<sup>b</sup>GG vs. TT  $p=0,005$ , GT vs. TT  $p=0,002$

<sup>c</sup>GG vs. TT  $p=0,003$ , GT vs. TT  $p=0,003$

<sup>d</sup>GG vs. TT  $p=0,007$ , GT vs. TT  $p=0,039$

Ispitivan je i uticaj najviše istraživanog polimorfizma MDR1 gena na dozu TAC, C3435T. Iz tabela 11 i 12 vidi se da su i za ovaj SNP „varijant homozigoti“ zahtevali najveće doze leka i imali najmanji odnos N/D. Značajna razlika u potrebnim dozama bila je u 12. mesecu nakon transplantacije ( $p = 0,042$ ), a u odnosu N/D desetog ( $p = 0,008$ ), dvadesetog dana ( $p = 0,043$ ) i u šestom mesecu ( $p = 0,02$ ).

Tabela 11. Povezanost C3435T polimorfizma MDR1 gena i doze TAC

Vreme nakon transplantacije	Doza TAC (mg/kg/dan)			p
	CC genotip	CT genotip	TT genotip	
10. dan	0,21 ± 0,08	0,2 ± 0,09	0,24 ± 0,06	0,14
20. dan	0,21 ± 0,07	0,20 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,07
1. mesec	0,19 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,21 ± 0,08	0,12
3. mesec	0,11 (0,06)	0,10 (0,07)	0,13 (0,10)	0,25
6. mesec	0,07 (0,08)	0,08 (0,05)	0,10 (0,07)	0,11
12. mesec	0,05 (0,06)	0,06 (0,04)	0,07 (0,04)	<sup>a</sup> <b>0,04</b>
24. mesec	0,05 (0,04)	0,05 (0,03)	0,07 (0,06)	0,06

Post Hoc analiza: <sup>a</sup>CT vs. TT  $p = 0,016$

Tabela 12. Uticaj C3435T polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze TAC

Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze TAC [(ng/ml) / (mg/dan)]			p
	CC genotip	CT genotip	TT genotip	
10. dan	0,81 (0,37)	0,93 (0,55)	0,66 (0,35)	<sup>a</sup> <b>0,01</b>
20. dan	0,91 (0,63)	0,99 (0,46)	0,71 (0,32)	<sup>b</sup> <b>0,04</b>
1. mesec	1,01 (0,57)	1,11 (0,52)	0,84 (0,70)	0,17
3. mesec	1,40 ± 0,62	1,49 ± 0,64	1,16 ± 0,63	0,14
6. mesec	1.43 (1.30)	1.32 (0.89)	1.01 (0.8)	<sup>c</sup> <b>0.02</b>
12. mesec	1.40 (1.16)	1.62 (0.85)	1.33 (1.0)	0,21
24. mesec	1.47 (1.03)	1.48 (0.8)	1.23 (1.14)	0,31

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>CT vs. TT p=0,002

<sup>b</sup>CC vs. TT p=0,045, CT vs. TT p=0,018

<sup>c</sup>CC vs. TT p=0,009, CT vs. TT p=0,024

Kako farmakokinetika TAC ne zavisi samo od polimorfizama MDR1 gena, ispitivali smo i uticaj telesne težine i godina bolesnika, hematokrita i vrednosti aminotransferaza kao pokazatelja funkcije jetre, na dozu TAC. Varijable koje su u univarijantnoj analizi pokazale značajnu korelaciju testirane su u multiregresionom modelu. G2677T/A polimorfizam izdvojio se kao nezavisan prediktor doze TAC od dvadesetog dana nakon transplantacije pa do kraja perioda praćenja, dok je telesna težina bolesnika bila nezavisan prediktor doze TAC tokom prvih mesec dana od transplantacije. Pošto su u pitanju višestruka poređenja, alfa greška je korigovana po Bonferoniju, i nakon korekcije, G2677T/A polimorfizam jedini je nezavisan prediktor doziranja TAC, što je prikazano u tabeli 13.

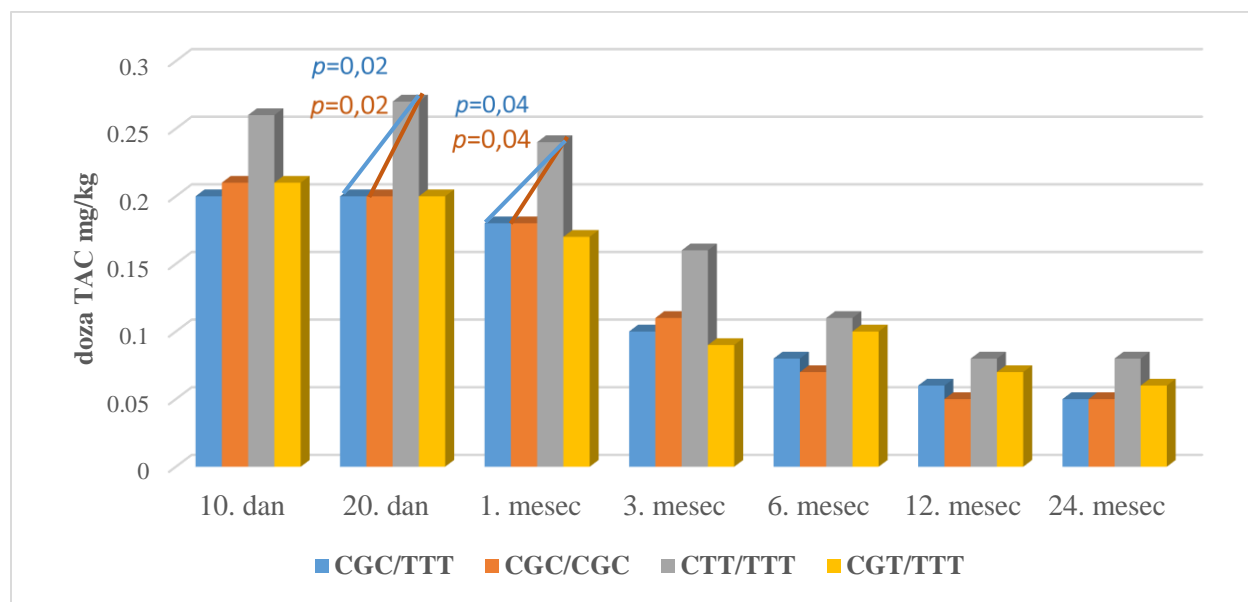


Tabela 13. Faktori koji utiču na doziranje TAC

Vreme nakon transplantacije	varijabla	B	p	95%CI
10. dan	telesna težina	0.113	0.008	0.030-0.195
20. dan	G2677T/A	2.614	<0.001	1.289-3.940
	telesna težina	0.092	0.008	0.025-0.159
1. mesec	G2677T/A	2.313	<.0001	1.066-3.560
	telesna težina	0.071	0.035	0.005-0.137
3. mesec	G2677T/A	1.847	0.001	0.753-2.940
	AST	-0.097	0.036	-0.188- -0.006
6. mesec	G2677T/A	1.906	<0.001	0.894-2.919
12. mesec	G2677T/A	1.430	0.001	0.635-2.225
	hematokrit	-13.020	0.013	-23.191- -2.848
24. mesec	G2677T/A	1.183	0.001	0.494-1.871

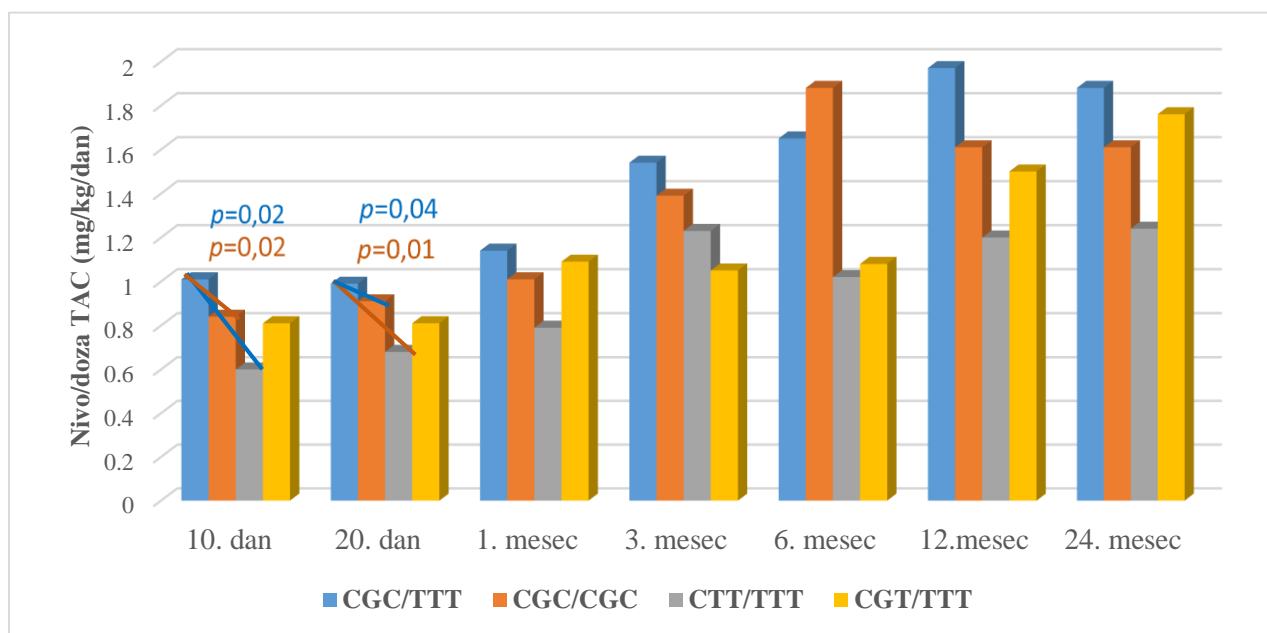
Nivo značajnosti definisan je kao  $p = 0.007$  ( $\alpha$  - greška korigovana je po Bonferoniju)

Uticaj haplotipova na doziranje TAC prikazan je na grafikonu 3. Analiza je pokazala da su bolesnici koji su bili TT homozigoti na poziciji G2677T/A i C3435T zahtevali veće doze leka u odnosu na ostale, i to u ranom posttransplantacionom periodu (20. dana CGC/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,02$ , CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,02$ ; 30. dana CGC/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,04$ , CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,04$ ).



Grafikon 3. Uticaj diplotipova na dozu TAC

Razlika u potrebnim dozama za postizanje ciljnog nivoa potvrđena je i razlikom N/D odnosa (Grafikon 4). Bolesnici sa CTT/TTT genotipom imali su manji N/D odnos tokom celog perioda posmatranja, osim u trećem mesecu u odnosu na ostale diplotipove. Razlika u odnosu N/D dostigla je statističku značajnost 10. dana (CGC/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,02$ , CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,02$ ) i 20. dana (CGC/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,01$ , CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,04$ ).



Grafikon 4. Uticaj diplotipova na N/D odnos TAC

#### 4.3.2. Uticaj polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova na farmakokinetiku CsA

Ispitivanje uticaja polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku CsA podrazumevalo je najpre ispitivanje uticaja pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama, a zatim i njihovih haplotipova na dozu CsA i odnos N/D.

U tabeli 14 prikazani su rezultati analize uticaja genotipova C1236T polimorfizma na dozu CsA. Nije bilo razlike u potrebnim dozama CC homozigota u odnosu na heterozigote u cilju dostizanja ciljnog nivoa leka u krvi.

Tabela 14. Uticaj C1236T polimorfizma MDR1 gena na dozu CsA

Vreme nakon transplantacije	Doza CsA (mg/kg/dan)		p
	CC genotip	CT genotip	
10. dan	6,83 (3,0)	6,00 (2,69)	0,26
20. dan	5,79 (3,4)	5,41 (1,92)	0,40
1. mesec	5,28 (2,92)	5,00 (2,06)	0,39
3. mesec	4,97 ± 1,79	4,22 ± 1,47	0,13
6. mesec	3,80 (1,95)	3,85 (1,9)	0,47
12. mesec	3,79 ± 1,37	3,44 ± 1,47	0,46
24. mesec	3,16 ± 1,19	2,70 ± 1,1	0,27

Kao ni u slučaju uticaja genotipova na dozu CsA, razlika nije pokazna ni u N/D odnosu CsA dva genotipa C1236T polimorfizma (Tabela 15).

Tabela 15. Uticaj C1236T polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze CsA

Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze CsA [(ng/ml) / (mg/dan)]		p
	CC genotip	CT genotip	
10. dan	51,67 (37,68)	55,30 (45,80)	0,74
20. dan	80,58 (38,77)	64,00 (46,42)	0,38
1. mesec	70,14 ± 37,68	67,10 ± 29,98	0,76
3. mesec	56,70 (23,57)	63,31 (33,38)	0,29
6. mesec	60,04 (20,63)	55,47 (50,44)	0,64
12. mesec	57,4 (34,13)	52,50 (45,59)	0,50
24. mesec	60,00 (27,64)	50,00 (27,66)	0,08

TT homozigoti za polimorfizam G2677T/A u najvećem delu praćenja zahtevali su najveće doze CsA da bi dostigli ciljni nivo leka, ali razlika nije bila statistički značajna (Tabela 16), i nije potvrđena nižim odnosom N/D (Tabela 17).

Tabela 16. Uticaj G2677T/A polimorfizma MDR1 gena na dozu CsA

Vreme nakon transplantacije	Doza CsA (mg/kg/dan)			p
	GG genotip	GT genotip	TT genotip	
10. dan	6,52 (3,13)	5,99 (2,26)	6,32 (4,92)	0,52
20. dan	5,48 (3,30)	5,46 (1,65)	6,09 (2,70)	0,93
1. mesec	5,28 (2,78)	4,65 (1,85)	5,26 (2,45)	0,63
3. mesec	4,80 ± 1,70	4,10 ± 1,40	4,70 ± 1,90	0,32
6. mesec	3,80 (1,51)	3,58 (1,64)	4,63 (3,21)	0,53
12. mesec	3,25 (1,75)	2,97 (1,64)	4,67 (4,07)	0,49
24. mesec	2,90 ± 1,30	2,80 ± 1,00	3,10 ± 1,20	0,79

Tabela 17. Uticaj G2677T/A polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze CsA

Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze CsA [(ng/ml) / (mg/dan)]			p
	GG genotip	GT genotip	TT genotip	
10. dan	56,30 ± 33,70	58,40 ± 27,00	81,80 ± 50,20	0,18
20. dan	67,34 (56,9)	64,14 (41,97)	84,21 (108,80)	0,91
1. mesec	65,60 ± 27,30	67,5 ± 30,30	75,00 ± 46,80	0,89
3. mesec	57,30 (34,30)	62,30 (31,81)	65,80 (58,14)	0,35
6. mesec	59,30 (40,90)	56,50 (35,20)	46,40 (61,10)	0,88
12. mesec	48,10 (43,20)	55,80(39,90)	57,40 (60,85)	0,99
24. mesec	60,60 (36,20)	50,00 (25,20)	62,50 (53,70)	0,21

Slično genotipovima prethodnih polimorfizama, ni genotipovi C3435T polimorfizma nisu se značajno razlikovali u doznim zahtevima CsA, kao ni u odnosu N/D, što je prikazano u tabelama 18 i 19.

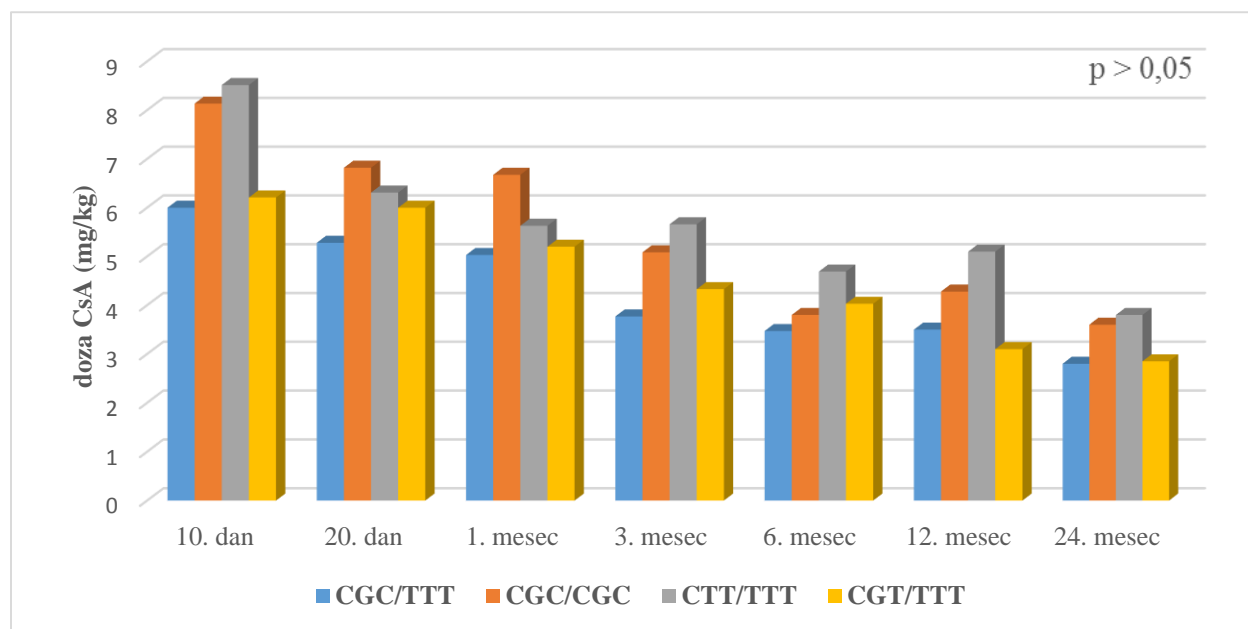
Tabela 18. Uticaj C3435T polimorfizma MDR1 gena i doze CsA

Vreme nakon transplantacije	Doza CsA (mg/kg/dan)			p
	CC genotip	CT genotip	TT genotip	
10. dan	6,83 (3,16)	5,93 (2,26)	6,25 (3,15)	0,53
20. dan	5,79 (3,03)	5,09 (1,93)	6,00 (1,29)	0,55
1. mesec	4,82 (2,86)	4,60 (2,23)	5,26 (1,27)	0,65
3. mesec	4,50 ± 1,90	4,20 ± 1,50	4,70 ± 1,40	0,67
6. mesec	3,90 ± 1,70	3,70 ± 1,30	4,50 ± 1,00	0,34
12. mesec	3,13 (2,37)	2,97 (1,56)	4,12 (2,05)	0,18
24. mesec	3,00 ± 1,20	2,70 ± 1,00	3,30 ± 1,20	0,26

Tabela 19. Uticaj C3435T polimorfizma MDR1 gena na odnos nivoa i doze CsA

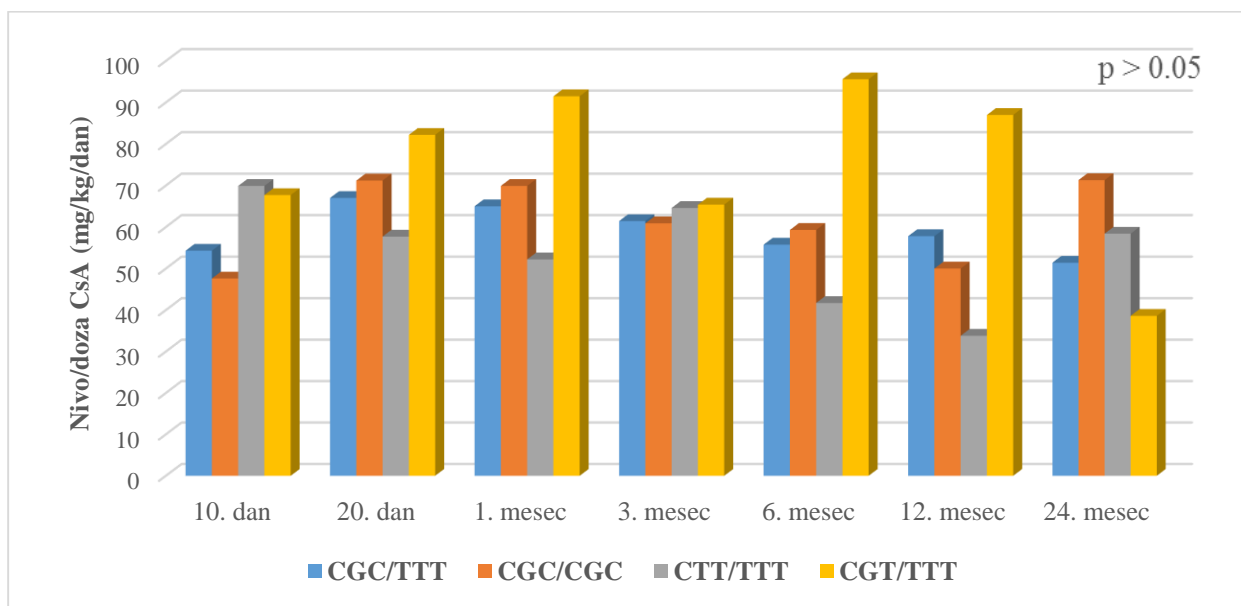
Vreme nakon transplantacije	Odnos nivoa i doze CsA [(ng/ml) / (mg/dan)]			p
	CC genotip	CT genotip	TT genotip	
10. dan	53,15 (49,83)	54,30 (30,97)	77,11 (86,87)	0,74
20. dan	75,24 (40,46)	61,25 (40,46)	74,28 (55,85)	0,75
1. mesec	71,70 ± 35,10	65,10 ± 18,90	70,60 ± 39,60	0,76
3. mesec	61,88 (25,70)	60,67 (36,50)	65,80 (30,70)	0,81
6. mesec	59,30 (45,30)	56,50 (29,10)	50,40 (58,20)	0,99
12. mesec	50,42 (30,74)	55,60 (37,00)	36,70 (77,80)	0,74
24. mesec	53,80 (30,60)	50,55 (25,65)	54,29 (44,27)	0,45

Analizom diplotipova i doze CsA, uočava se da tendenciju ka najmanjoj dozi leka za dostizanje ciljnog nivoa imaju bolesnici koji su bili heterozigoti za sva tri pojedinačna polimorfizma, odnosno nosioci CGC/TTT diplotipa, što je u saglasnosti sa doznim zahtevima pojedinačnih polimorfizama (Grafikon 5).



Grafikon 5. Uticaj diplotipova na dozu CsA

Uticaj diplotipova na odnos N/D prikazan je na grafikonu 6. Manje doze CsA potrebne za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi kod nosioca CGC/TTT diplotipa nisu potvrđene višim odnosom N/D.



Grafikon 6. Uticaj diplotipva na N/D odnos CsA

#### 4.4. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA UČESTALOST AKUTNOG ODBACIVANJA

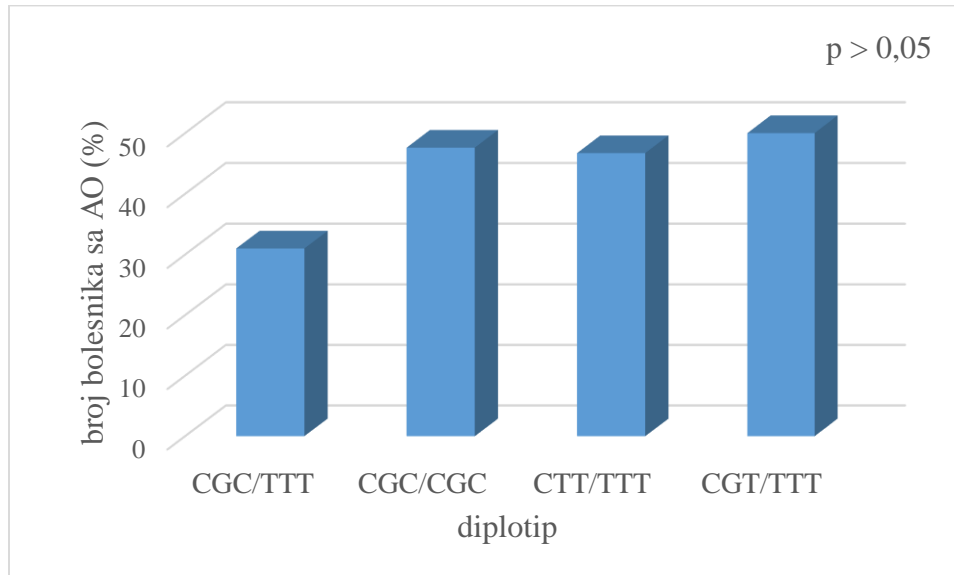
Od 152 analizirana bolesnika njih 50 je imalo AO. Jedan bolesnik je imao dve, jedan tri, a ostali po jednu epizodu AO. Kod 10 bolesnika AO potvrđeno je biopsijom alografta. Patohistološki nalazi bioptiranog alografta ukazali su na akutno celularno odbacivanje u osam slučajeva, jednom na humoralno, a jednom na kombinovano celularno i humoralno odbacivanje.

U grupi bolesnika koji su primali TAC, 35 njih imalo je AO. Bez obzira na genotipove SNPs MDR1 gena, učestalost AO je bila slična (Tabela 20).

Tabela 20. Uticaj SNPs MDR1 gena na učestalost AO bolesnika koji su primali TAC

SNP	genotip	AO (%)	p
C1236T	CC	15 (46,9%)	p = 0,258
	CT	20 (34,5%)	
G2677T/A	GG	12 (38,7%)	p = 0,960
	GT	16 (37,2%)	
	TT	7 (41,2%)	
C3435T	CC	11 (44,0%)	p = 0,487
	CT	13 (31,7%)	
	TT	11 (44,0%)	

Među bolesnicima koji su imali genotip CGC/TTT zabeleženo je devet epizoda AO (31,0%), CGC/CGC bolesnici su imali 10 (47,6%), CTT/TTT sedam (46,7%), a CGT/TTT četiri (50%) AO. Bez obzira na genotipove, učestalost AO se nije statistički značajno razlikovala (Grafikon 7).



Grafikon 7. Uticaj diplotipova na učestalost AO kod bolesnika koji su primali TAC

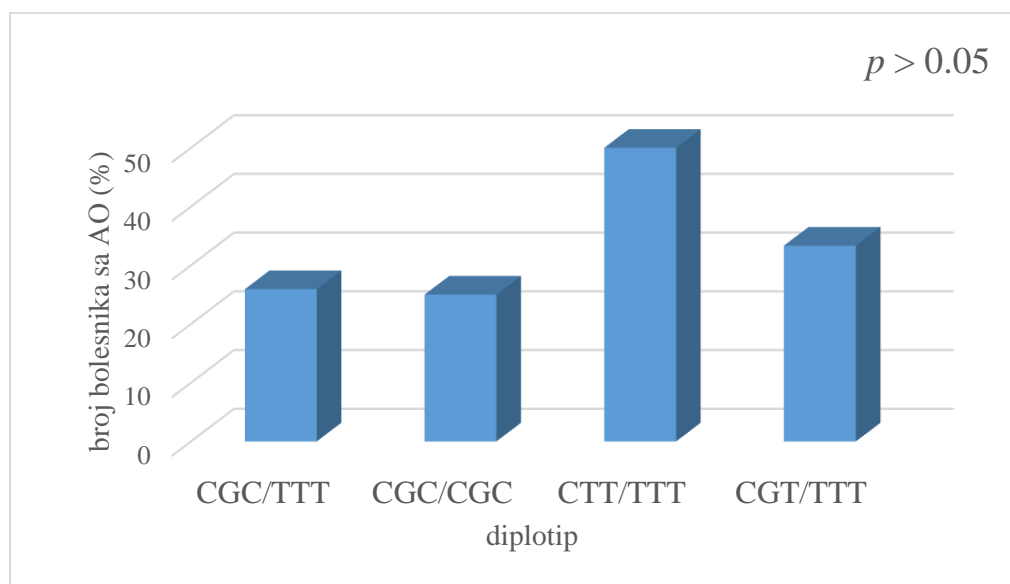
Ni među bolesnicima koji su primali CsA nije bilo značajne razlike u učestalosti AO u odnosu na genotipove pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama. Najviše AO bilo je kod TT

homozigota za SNPs G2677T/A (28,57%) i C3435T (44,44%), dok su za C1236T polimorfizam heterozigoti imali više AO u odnosu na „divlje homozigote“ (Tabela 21).

Tabela 21. Uticaj SNPs MDR1 gena na učestalost AO bolesnika koji su primali CsA

SNP	genotip	AO (%)	p
C1236T	CC	2 (16,67%)	p = 0.712
	CT	13 (26,53%)	
G2677T/A	GG	2 (14,29%)	p = 0.659
	GT	11 (27,50%)	
	TT	2 (28,57%)	
C3435T	CC	4 (25,00%)	p = 0.309
	CT	7 (19,44%)	
	TT	4 (44,44%)	

Posmatrano na nivou diplotipa, sedam epizoda AO zabeleženo je kod CGC/TTT bolesnika (25,93%), po dve epizode kod CGC/CGC i CTT/TTT (25% i 50%), a samo jedna kod bolesnika CGT/TTT genotipom (33,33%), kao što je prikazano na grafikonu 8.



Grafikon 8. Uticaj diplotipova na učestlost AO kod bolesnika koji su primali CsA



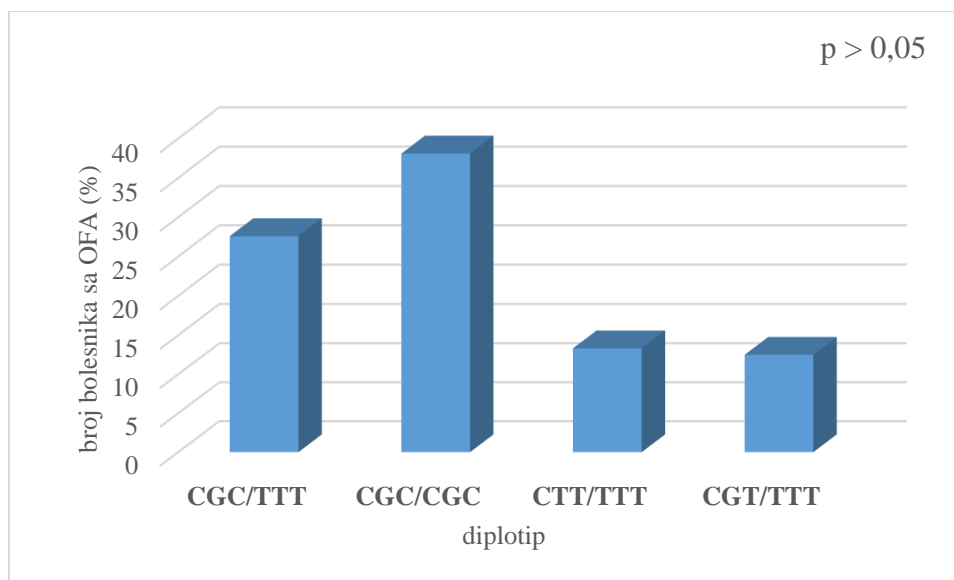
#### 4.5. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA UČESTALOST ODLOŽENE FUNKCIJE ALOGRAFTA

Od ukupnog broja ispitivanih bolesnika, OFA imalo je njih 38 (25%). U grupi bolesnika koji su primali TAC, OFA je zabeležena kod 26 bolesnika. Najviše OFA zabeleženo je kod divljih homozigota za sva tri polimorfizma, a razlika u učestalosti dostiže značajnost za troalelski polimorfizam G2677T/A (GG vs. GT  $p = 0,04$ , GG vs. TT  $p = 0,026$ ), što je prikazano u tabeli 22.

Tabela 22. Uticaj SNPs MDR1 gena na učestalost OFA bolesnika koji su primali TAC

SNP	genotip	OFA (%)	p
C1236T	CC	13 (40,62%)	p = 0,153
	CT	13 (22,41%)	
G2677T/A	GG	14 (45,16%)	p = 0,028
	GT	10 (23,25%)	
	TT	2 (11,76%)	
C3435T	CC	9 (36,00%)	p = 0,097
	CT	14 (34,15%)	
	TT	3 (12,00%)	

Po osam bolesnika sa CGC/TTT (27,59%) i CGC/CGC (38,09%) genotipom imalo je OFA, dva sa CTT/TTT (13,33%), i samo jedan bolesnik sa CGT/TTT genotipom (12,50%). Učestalost OFA nije se razlikovala u odnosu na diplotipove MDR1 gena (Grafikon 9).



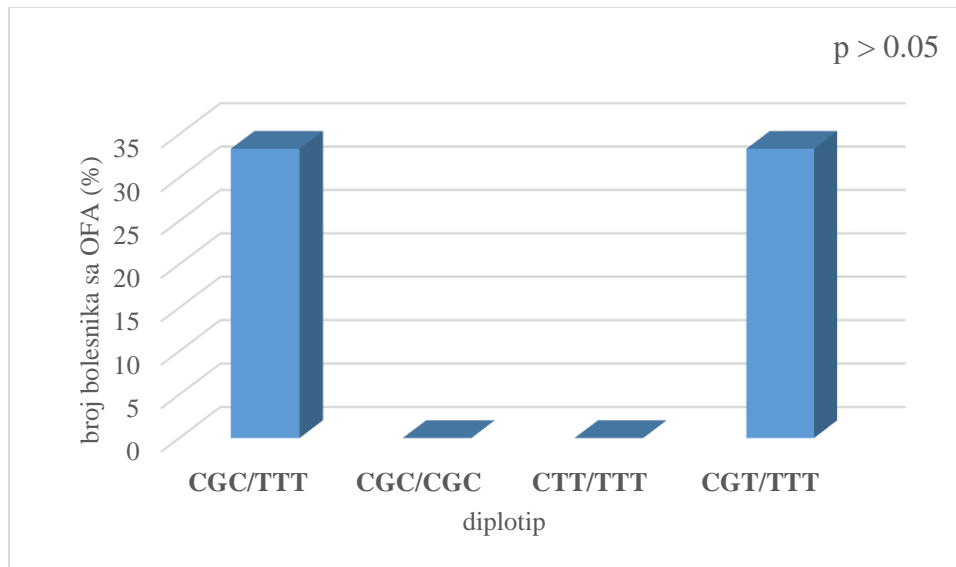
Grafikon 9. Uticaj diplotipova na učestlost OFA kod bolesnika koji su primali TAC

Analiza uticaja pojedinačnih polimorfizama na OFA kod bolesnika koji su primali CsA prikazana je u tabeli 23. Nijedan bolesnik sa genotipom CC i TT nije imao OFA, dok su bolesnici sa CT genotipom imali značajno više OFA u odnosu na „varijant homozigote“ za polimorfizam na egzonu 26.

Tabela 23. Uticaj SNPs MDR1 gena na učestalost OFA bolesnika koji su primali CsA

SNP	genotip	OFA (%)	p
C1236T	CC	0	p = 0,100
	CT	12 (24,49%)	
G2677T/A	GG	2 (14,29%)	p = 0,305
	GT	10 (25%)	
	TT	0	
C3435T	CC	0	p = 0,03
	CT	11 (30,55%)	
	TT	1 (11,11%)	

OFA nisu imali bolesnici sa genotipovima CGC/TTT i CGC/CGC, a ova komplikacija javila se sa jednakom učestalošću kod nosioca CTT/TTT i CGT/TTT genotipa (33,33%) koji su primali CsA (Grafikon 10).



Grafikon 10. Uticaj diplotipova na učestlost OFA kod bolesnika koji su primali CsA

#### 4.6. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA FUNKCIJU ALOGRAFTA

Funkcija alografta procenjavana je na osnovu vrednosti kreatinina u serumu, klirensa kreatinina i 24-časovne proteinurije.

U grupi bolesnika koji su primali TAC, „divlji homozigoti“ imali su najniže prosečne vrednosti serumskog kreatinina tokom prve dve godine nakon transplantacije, i to za sva tri polimorfizma. Za polimorfizam G2677T/A, TT homozigoti su imali više kreatinine u odnosu na heterozigote, dok su za polimorfizam C3435T heterozigoti imali najlošiju funkciju procenjenu vrednošću kreatinina u serumu, ali bez statistički značajne razlike (Tabela 24).

Tabela 24. Uticaj SNPs MDR1 gena na serumski kreatinin bolesnika koji su primali TAC

MDR1 SNPs	genotip	Serumski kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	149,5 (93)	139 (72)	143,5 (60)	127,5 (58)	130,5 (48)
	<b>CT</b>	157 (66)	152 (66)	144,5 (52)	141,5 (50)	140 (61)
	<b>p</b>	0,533	0,316	0,866	0,273	0,284
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	151 (117)	141 (65)	139 (56)	126 (52)	126 (46)
	<b>GT</b>	152 (63)	144 (69)	146 (52)	140 (45)	135 (54)
	<b>TT</b>	164 (75)	160 (55)	145 (59)	148 (87)	152 (75)
<b>p</b>		0,968	0,621	0,934	0,499	0,084
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	148 (59)	141 (61)	146 (46)	129 (53)	131 (38)
	<b>CT</b>	157 (89)	153 (81)	154 (60)	151 (61)	135 (70)
	<b>TT</b>	149 (93)	146 (60)	136 (53)	125 (50)	143 (63)
<b>p</b>		0,589	0,644	0,533	0,507	0,571

Funkcija presađenog bubrega nije se značajno razlikovala među genotipovima ni kada je merena klirensom kreatinina. Tendenciju ka boljem klirensu pokazivali su bolesnici koji su bili „divlji homozigoti“, ali samo u pojedinim periodima u toku prve dve godine nakon transplantacije (Tabela 25).

Tabela 25. Uticaj SNPs MDR1 gena na klirens kreatinina bolesnika koji su primali TAC

MDR1 SNPs	genotip	Klirens kreatinina (ml/min)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	52 ± 20,10	53 ± 15,80	61 ± 20,4	63 ± 23,5	55 ± 18,0
	<b>CT</b>	52 ± 21,60	53 ± 20,70	57 ± 21,3	62 ± 27,2	58 ± 27,7
	<b>p</b>	0,874	0,913	0,394	0,9	0,559
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	53 ± 21,5	53 ± 16,0	62 ± 21,6	64 ± 26,1	60 ± 22,4
	<b>GT</b>	51 ± 18,7	55 ± 21,6	58 ± 20,1	63 ± 28,3	58 ± 23,8
	<b>TT</b>	53 ± 25,9	47 ± 15,8	57 ± 24,6	59 ± 21,9	55 ± 34,9
<b>p</b>		0,878	0,313	0,594	0,848	0,805
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	57 ± 18,6	56 ± 18,3	61 ± 20,4	64 ± 26,9	57 ± 22,7
	<b>CT</b>	48 ± 21,0	51 ± 19,9	57 ± 21,6	63 ± 28,8	58 ± 22,5
	<b>TT</b>	54 ± 22,6	62 ± 17,9	60 ± 22,6	61 ± 21,8	58 ± 32,9
<b>p</b>		0,216	0,513	0,772	0,949	0,984

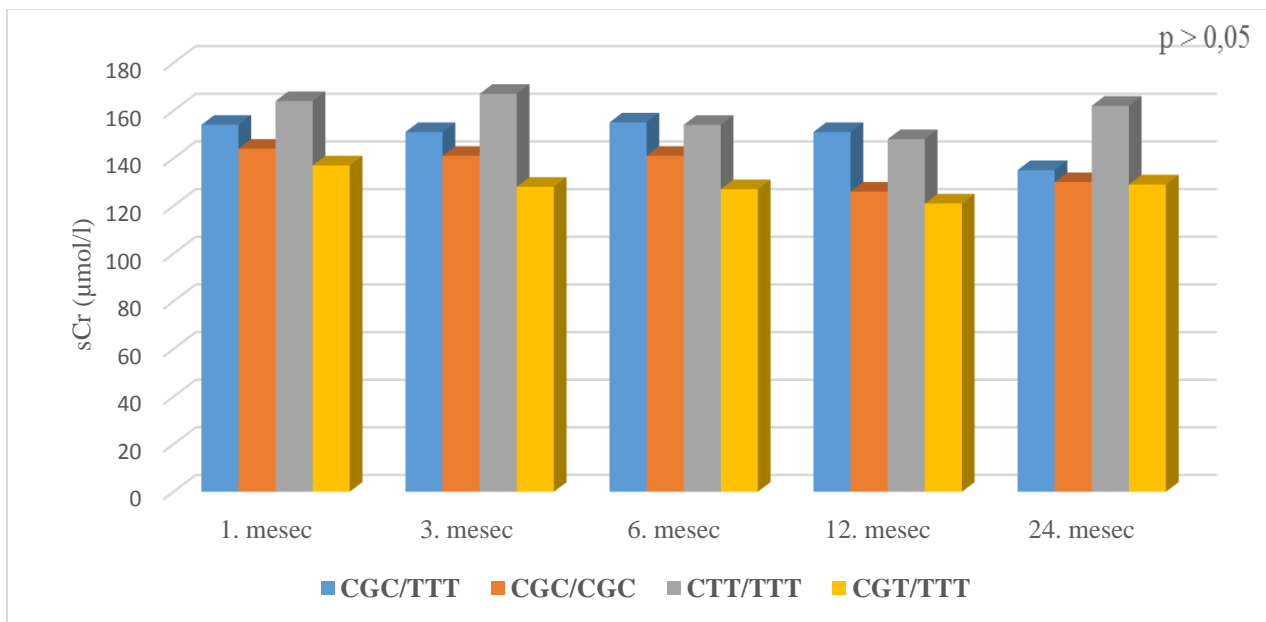
CC homozigoti za C1236T polimorfizam imali su manje vrednosti proteinurije u odnosu na heterozigote tokom celog perioda praćenja. Ta razlika je bila najizraženija godinu dana nakon

transplantacije. „Divlji homozigoti“ su i za polimorfizam G2677T/A imali najmanju proteinuriju u odnosu na heterozigote i TT homozigote, osim u prvom mesecu nakon transplantacije, a za C3435T tokom celog perioda praćenja. Bez obzira na genotip SNPs MDR1 gena, razlike u proteinuriji nisu bile statistički značajne (Tabela 26).

Tabela 26. Uticaj SNPs MDR1 gena na proteinuriju bolesnika koji su primali TAC

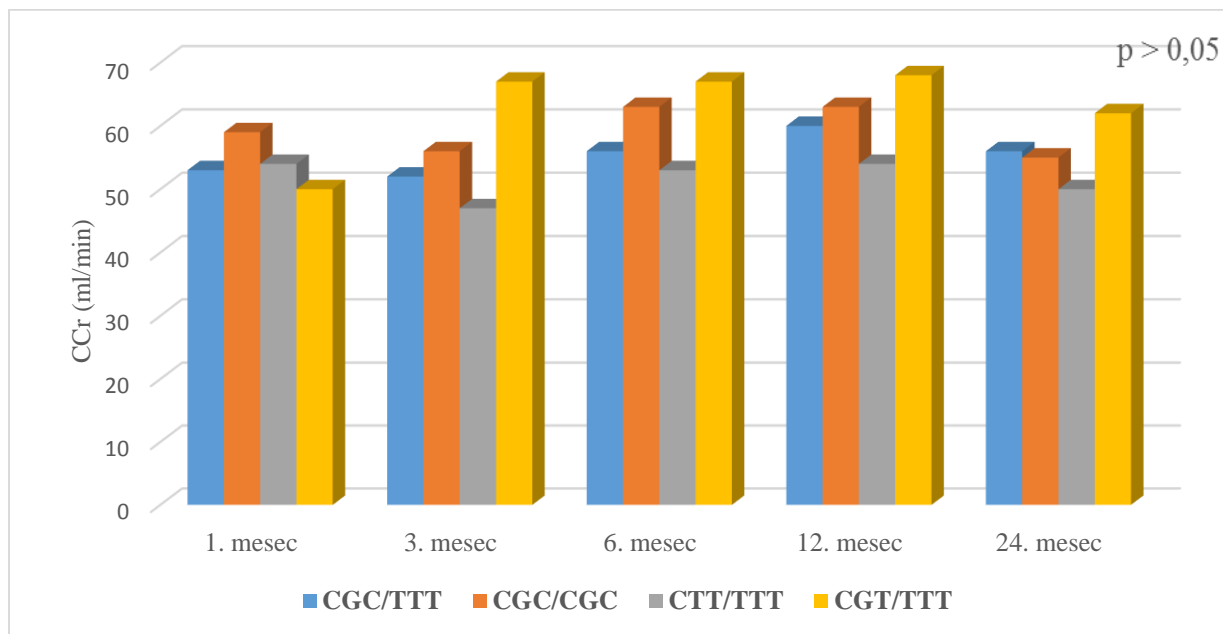
MDR1 SNPs	genotip	proteinurija (g/24 h)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	0,46 (0,41)	0,24 (0,44)	0,22 (0,24)	0,18 (0,19)	0,17 (0,27)
	<b>CT</b>	0,48 (0,56)	0,33 (0,52)	0,27 (0,26)	0,25 (0,38)	0,18 (0,41)
	<b>p</b>	0,676	0,225	0,152	0,074	0,953
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	0,50 (0,44)	0,26 (0,48)	0,28 (0,23)	0,18 (0,17)	0,17 (0,25)
	<b>GT</b>	0,45 (0,46)	0,28 (0,52)	0,24 (0,34)	0,21 (0,41)	0,18 (0,41)
	<b>TT</b>	0,47 (0,49)	0,32 (0,37)	0,27 (0,22)	0,29 (0,22)	0,31 (0,77)
<b>p</b>		0,903	0,827	0,871	0,166	0,635
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	0,40 (0,38)	0,22 (0,34)	0,21 (0,21)	0,17 (0,16)	0,15 (0,15)
	<b>CT</b>	0,46 (0,70)	0,37 (0,72)	0,25 (0,38)	0,20 (0,52)	0,20 (0,36)
	<b>TT</b>	0,50 (0,39)	0,32 (0,32)	0,27 (0,18)	0,29 (0,20)	0,20 (0,48)
<b>p</b>		0,686	0,565	0,272	0,118	0,336

Najveće koncentracije kreatinina u serumu tokom celog perioda praćenja imali su nosioci CTT/TTT genotipa, dok su CGT/TTT primaoci imali najbolju funkciju mereno vrednošću kreatinina u serumu, ali razlika nije bila statistički značajna (Grafikon 11).



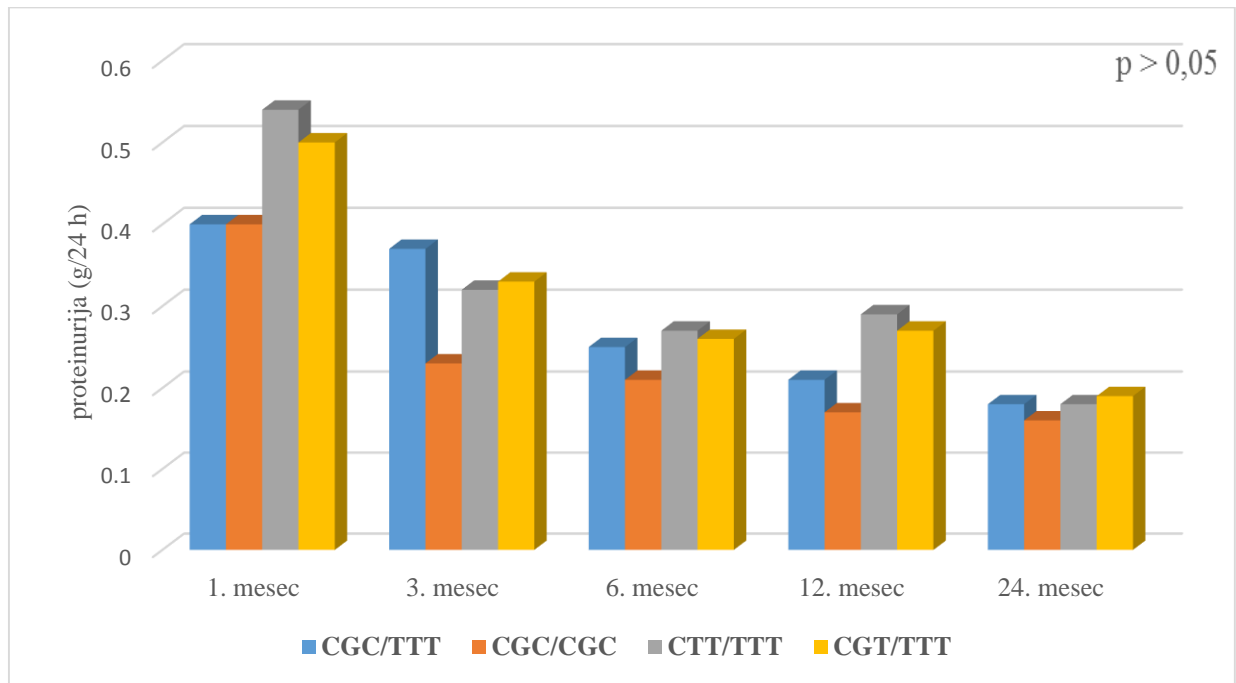
Grafikon 11. Uticaj diplotipova na koncentraciju kreatinina u serumu bolesnika koji su primali TAC.

Nosioci CTT/TTT genotipa su imali najlošiju a nosioci CGT/TTT genotipa najbilju funkciju i kada je izražena klirensom kreatinina. Mežutim, bez obzira na genotip, razlika u funkciji ponovi nije dostigla statističku značajnost (Grafikon 12).



Grafikon 12. Uticaj diplotipova na klirens kreatinina bolesnika koji su primali TAC

Analiza 24-časovne proteinurije pokazala je da su bolesnici sa CGC/CGC diplotipom imali najmanju proteinuriju u prve dve godine nakon transplantacije (Grafikon 13). Međutim, značajnost razlike u funkciji među diplotipovima nije pokazana.



Grafikon 13. Uticaj diplotipova na proteinuriju bolesnika koji su primali TAC

Analiza funkcije presađenog bubrega pokazala je veće razlike među genotipovima u grupi bolesnika koji su primali CsA. Najniže vrednosti serumskog kreatinina su imali „divlji homozigoti“ za sva tri genotipa. Za polimorfizam C1236T CC homozigoti imali su značajno niži kreatinin u odnosu na heterozigote u prvom ( $p = 0,007$ ), trećem ( $p = 0,013$ ), i 24. mesecu ( $p = 0,014$ ) nakon transplantacije. Najviše koncentracije kreatinina za polimorfizme G2677T/A i C3435T imali su „varijant homozigoti“. Razlika u vrednostima koncentracije kreatinina u serumu za polimorfizam G2677T/A bila je statistički značajna za gotovo ceo period praćenja, a za polimorfizam C3435T nakon godinu dana od transplantacije (Tabela 27).



Tabela 27. Uticaj SNPs MDR1 gena na serumski kreatinin bolesnika koji su primali CsA

MDR1 SNPs	genotip	Serumski kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	103 (29,5)	106 (30,5)	109 (36,3)	103,5 (34,7)	101,5 (21,7)
	<b>CT</b>	133 (51,5)	128 (44,5)	122 (36)	124 (35,5)	118 (39,5)
<b>p</b>		<b>0,007</b>	<b>0,013</b>	0,091	0,062	<b>0,014</b>
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	105,5 (21,8)	109 (42,5)	114,5 $\pm$ 27	113,5 (42)	106,8 $\pm$ 23,4
	<b>GT</b>	130 (44,8)	121,5 (44)	124,5 $\pm$ 29	119 (31)	128 $\pm$ 31,2
	<b>TT</b>	160 (63)	164 (86)	154,1 $\pm$ 70,7	158 (56)	154,1 $\pm$ 68,6
<b>p</b>		<sup>a</sup> <b>0,019</b>	<sup>b</sup> <b>0,041</b>	0,056	<sup>c</sup> <b>0,03</b>	<sup>d</sup> <b>0,018</b>
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	109,5 (39,3)	113,5 (43,3)	115,6 $\pm$ 22,5	114 $\pm$ 22,0	110,9 (24,3)
	<b>CT</b>	123,5 (43,5)	121,5 (44)	127 $\pm$ 28,3	122,2 $\pm$ 26,8	116 (36,5)
	<b>TT</b>	149 (76,5)	138 (99)	137,9 $\pm$ 71	149 $\pm$ 53,6	155 (76,5)
<b>p</b>		0,156	0,271	0,328	<sup>e</sup> <b>0,031</b>	0,124

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>GG vs. GT p=0,013, GG vs. TT p=0,025

<sup>b</sup>GG vs. TT p=0,031

<sup>c</sup>GT vs. TT p=0,012

<sup>d</sup>GG vs. TT p=0,015, GT vs. TT p=0,018

<sup>e</sup>CC vs. TT p=0,027

Bolja funkcija „divljih homozigota“ potvrđena je i višim vrednostima klirensa kreatinina. Razlika u klirensu među genotipovima bila je najizraženija nakon godinu dana od transplantacije za C1236T (p = 0,046) i C3435T (p = 0,047) polimorfizam, što je prikazano u tabeli 28.

Tabela 28. Uticaj SNPs MDR1 gena na klirens kreatinina bolesnika koji su primali CsA

MDR1 SNPs	genotip	Klirens kreatinina (ml/min)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	59,7 ± 18,1	63,3 (16,7)	70,3 ± 14,3	71,4 ± 24,2	66,9 ± 20,7
	<b>CT</b>	54,7 ± 21,2	60,0 (30,1)	63,3 ± 25,3	59,4 ± 16,6	61,0 ± 18,8
<b>p</b>		0,452	0,457	0,364	<b>0,046</b>	0,352
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	63,0 ± 16	67,8 (12,9)	72,1 ± 11,7	70,5 ± 17,9	72,6 ± 19,2
	<b>GT</b>	53,3 ± 22	59,4 (29,8)	63,6 ± 26,4	59,8 ± 18,5	59 ± 17,6
	<b>TT</b>	54,5 ± 18,7	47,2 (71,8)	26,4 ± 23,2	55,9 ± 18,8	59 ± 23,2
<b>p</b>		0,311	0,099	0,320	0,124	0,066
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	60,8 ± 16	65,3 (17,8)	70,4 ± 12,4	69,7 ± 19,5	69,5 ± 17,2
	<b>CT</b>	54,2 ± 22,8	61,9 (28,5)	62,1 ± 23,6	61,0 ± 18,8	61,6 ± 19,4
	<b>TT</b>	52,2 ± 18,3	54,2 (24,9)	65 ± 37,1	50,8 ± 11,6	51,6 ± 17,8
<b>p</b>		0,493	0,178	0,512	<b>*0,047</b>	0,077

Post Hoc analiza:

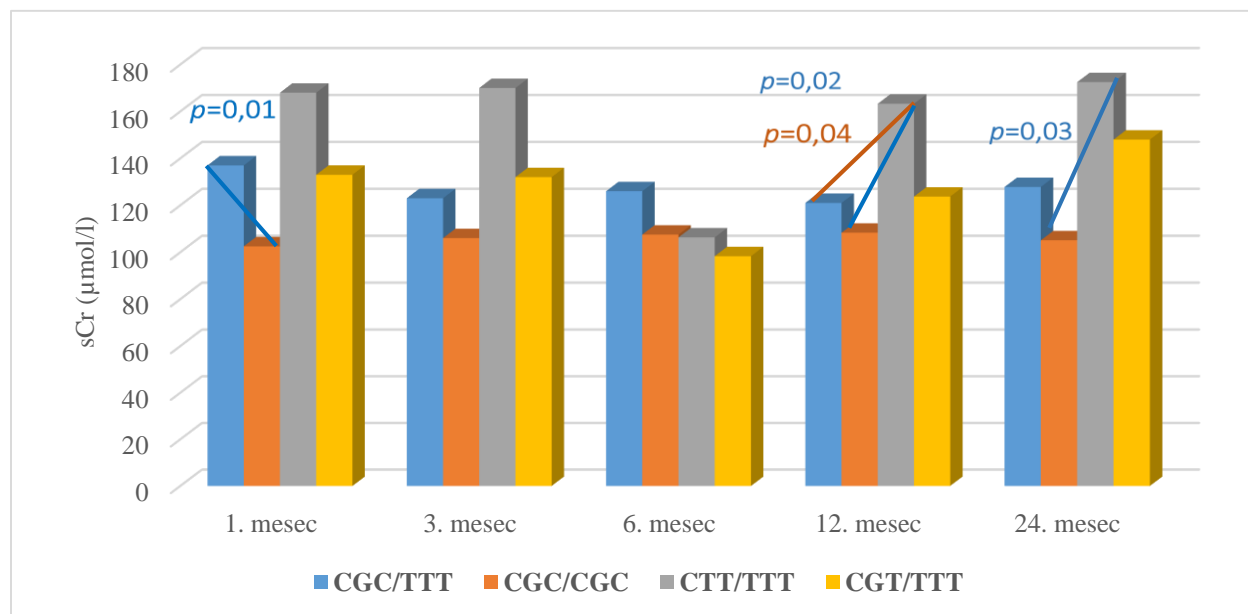
CC vs. TT p=0,039

U tabeli 29 prikazane su vrednosti 24-časovne proteinurije u grupi bolesnika koji su primali CsA. „Divlji homozogoti“ za polimorfizam C1236T imali su niže vrednosti 24-časovne proteinurije u odnosu na heterozigote u prvom mesecu nakon transplantacije (p = 0,034). U drugim periodima praćenja i među drugim genotipovima, kvantitativna proteinurija se nije razlikovala.

Tabela 29. Uticaj SNPs MDR1 gena na kvantitativnu proteinuriju bolesnika koji su primali CsA

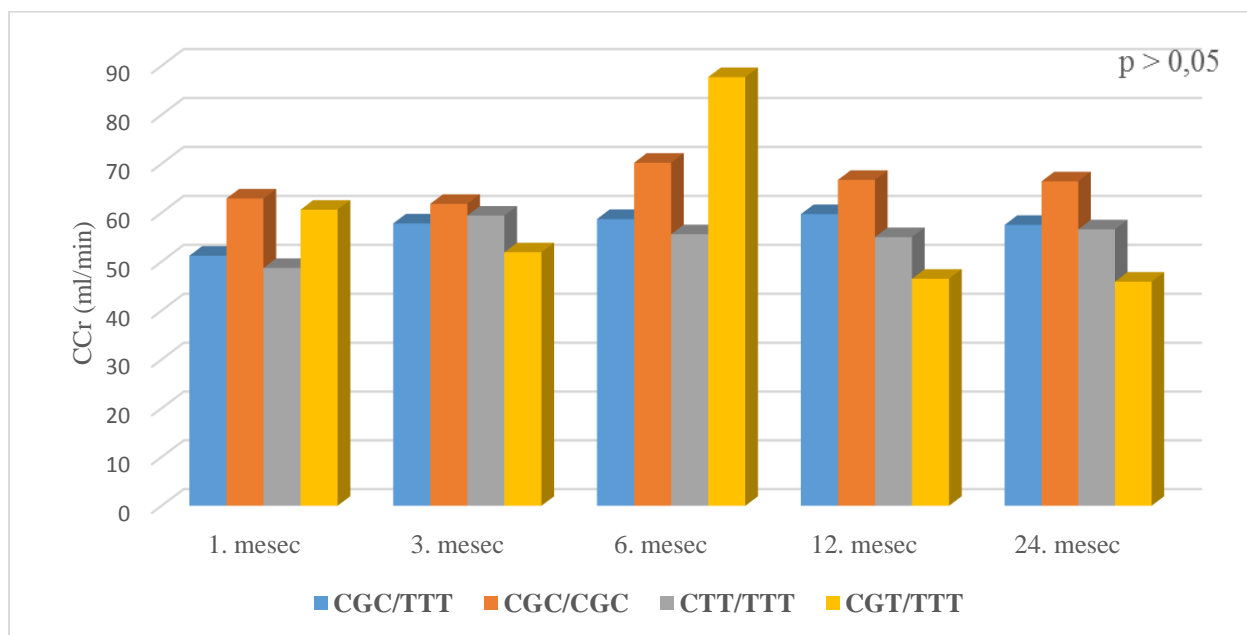
MDR1 SNPs	genotip	proteinurija (g/24 h)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	0,17 (0,20)	0,19 (0,22)	0,23 (0,19)	0,13 (0,08)	0,22 (0,29)
	<b>CT</b>	0,35 (0,68)	0,28 (0,45)	0,23 (0,32)	0,19 (0,24)	0,18 (0,22)
<b>p</b>		<b>0.034</b>	0.151	0.995	0.059	0.592
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	0,23 (0,26)	0,20 (0,26)	0,22 (0,25)	0,13 (0,07)	0,15 (0,18)
	<b>GT</b>	0,29 (0,64)	0,25 (0,47)	0,22 (0,29)	0,18 (0,25)	0,19 (0,33)
	<b>TT</b>	0,8 (0,89)	0,34 (0,42)	0,24 (0,47)	0,3 (0,25)	0,22 (0,12)
<b>p</b>		0,076	0,666	0,974	0,065	0,733
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	0,25 (0,48)	0,27 (0,36)	0,20 (0,21)	0,17 (0,11)	0,21 (0,15)
	<b>CT</b>	0,35 (0,75)	0,23 (0,33)	0,23 (0,33)	0,16 (0,25)	0,17 (0,36)
	<b>TT</b>	0,28 (0,70)	0,28 (0,36)	0,24 (0,25)	0,35 (0,51)	0,22 (0,50)
<b>p</b>		0,510	0,935	0,976	0,275	0,838

Analiziran je i uticaj diplotipova polimorfizama MDR1 gena na funkciju presađenog bubrega bolesnika koji su dobijali CsA. Bolesnici sa CGC/CGC genotipom imali su najniže vrednosti serumskog kreatinina tokom prve dve godine nakon transplantacije, osim u šestom mesecu (prvi mesec CGC/CGC vs. CGC/TTT  $p = 0,01$ ; godina dana CGC/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,04$ , CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,02$ ; dve godine CGC/CGC vs. CTT/TTT  $p = 0,03$ ), što je prikazano na grafikonu 14.



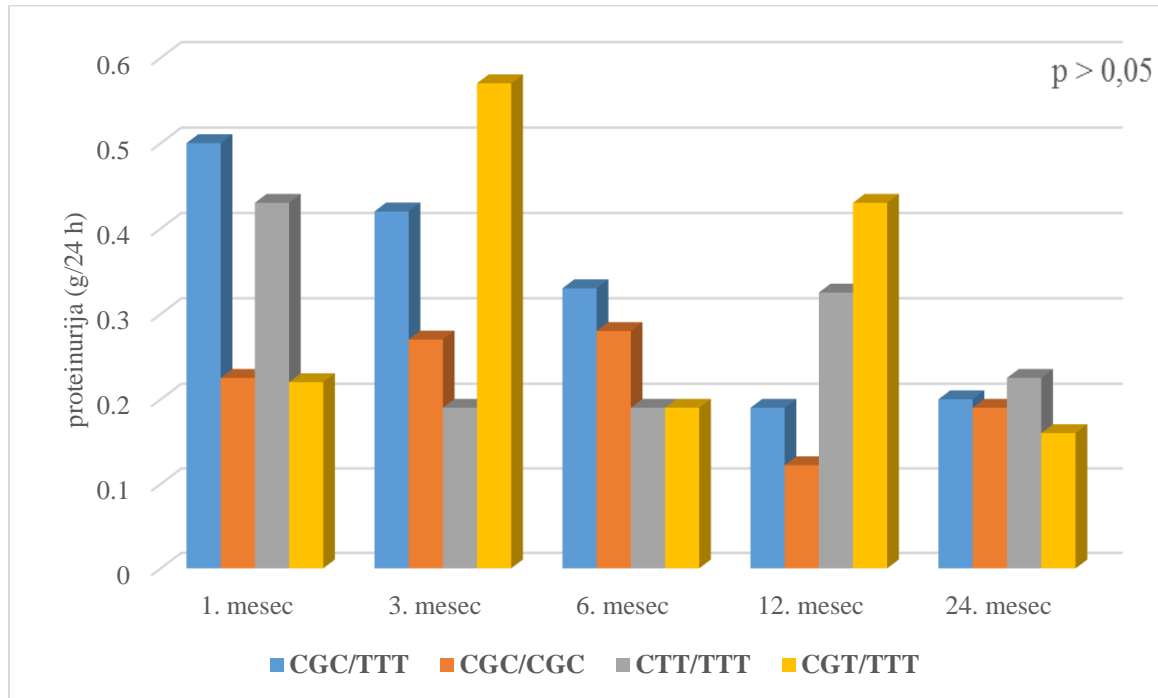
Grafikon 14. Uticaj diplotipova na koncentraciju kreatinina u serumu bolesnika koji su primali CsA

Funkcija presađenog bubrega izražena klirensom kreatinina nije se razlikovala među različitim diplotipova tokom prve dve godine nakon transplantacije, kao što je prikazano na grafikonu 15.



Grafikon 15. Uticaj diplotipova na klirens kreatinina bolesnika koji su primali CsA

Kvantitativne proteinurije bolesnika nisu se statistički značajno razlikovale bez obzira na diplotip MDR1 gena. Uticaj diplotipova na kvantitativnu proteinuriju prikazan je na grafikonu 16.



Grafikon 16. Uticaj diplotipova na proteinuriju bolesnika koji su primali CsA

#### 4.7. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE U KRVI

Imajuću u vidu mnogobrojne neželjene efekte KNI, ispitivali smo i uticaj polimorfizama MDR1 gena na koncentraciju glukoze, kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola, triglicerida, aspartat- i alaninaminotransferaze u serumu, kao laboratorijskih pokazatelja nekih od neželjenih efekata ovih lekova.

Nije bilo značajne razlike u koncentraciji glukoze u serumu među bolesnicima sa različitim genotipovima MDR1 gena ( $p > 0,05$ ). Nosioi CGT/TTT diplotipa, koji su primali TAC, na kraju prvog meseca nakon transplantacije imali su veće vrednosti glukoze u odnosu na druga tri diplotipa (CGT/TTT vs. CGC/TTT  $p = 0,02$ ; CGT/TTT vs. CGC/CGC  $p = 0,02$ ; CGT/TTT vs. CTT/TTT  $p = 0,03$ ). Posttransplantacioni dijabetes melitus razvio se kod 14 bolesnika, sedam koji su primali

TAC i sedam CsA, ali bez značajne razlike u odnosu na genotipove pojedinačnih polimorfizama, kao i diplotipove MDR1 gena ( $p > 0,05$ ).

Bolesnici sa različitim genotipovima i diplotipovima nisu se međusobno razlikovali ni po vrednostima kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola ni aminotransferaza ( $p > 0,05$ ).

Razlika među genotipovima postojala je u odnosu na vrednosti triglicerida. Bolesnici koji su primali TAC i bili CC homozigoti za polimorfizam C1236T imali su više vrednosti triglicerida u odnosu na heterozigote. TT homozigoti za polimorfizam G2677T/A imaju više trigliceride u odnosu na druga dva genotipa, osim u prvom mesecu. Ta razlika bila je najizraženija šest meseci nakon transplantacije (GG vs. GT  $p = 0,04$ ) Varijant homozigoti su i za polimorfizam C3435T imali najviše vrednosti triglicerida, izuzev prvog meseca i druge godine posle transplantacije (Tabela 30).

Tabela 30. Uticaj SNPs MDR1 gena na vrednosti triglicerida bolesnika koji su primali TAC

MDR1 SNPs	genotip	trigliceridi (mmol/l)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	1,82 (0,94)	1,99 (0,93)	1,82 (0,95)	1,6 (1,19)	1,86 (1,14)
	<b>CT</b>	1,7 (0,98)	1,94 (1,14)	1,8 (1,21)	1,8 (1,19)	1,7 (1,09)
	<b>p</b>	0,666	0,990	0,917	0,162	0,970
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	1,85 (0,84)	2,15 (0,93)	1,9 (0,87)	1,6 (1,02)	1,71 (1,10)
	<b>GT</b>	1,8 (0,99)	1,82 (1,38)	1,6 (0,85)	1,72 (1,23)	1,7 (1,03)
	<b>TT</b>	1,35 (1,26)	2,4 (1,16)	2,18 (1,18)	1,85 (1,5)	1,95 (1,25)
<b>p</b>		0,582	0,599	<sup>a</sup> <b>0,05</b>	0,398	0,895
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	1,76 (0,67)	2,15 (0,98)	1,83 (1,06)	1,6 (0,86)	1,86 (0,86)
	<b>CT</b>	1,81 (1,01)	1,9 (1,11)	1,6 (0,88)	1,7 (1,22)	1,6 (1,12)
	<b>TT</b>	1,5 (1,86)	2,19 (1,16)	2,14 (0,93)	1,9 (1,19)	1,7 (1,18)
<b>p</b>		0,998	0,568	0,140	0,251	0,973

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>GG vs. GT  $p=0,04$

Značajnije razlike u vrednostima triglicerida kod nosica različitih genotipova SNPs MDR1 gena postojale kod bolesnika koji su primali CsA. CC homozigoti za C1236T ponovo su imalu niže trigliceride od heterozigota, dok su „varijant homozigoti” i za G2677T/A i za C3435T polimorfizam imali najviše vrednosti triglicerida (Tabela 31).

Tabela 31. Uticaj SNPs MDR1 gena na vrednosti triglicerida bolesnika koji su primali CsA

MDR1 SNPs	genotip	trigliceridi (mmol/l)				
		1. mesec	3. mesec	6. mesec	12. mesec	24. mesec
<b>C1236T</b>	<b>CC</b>	1,39 (1,3)	1,5 (0,9)	1,37 (1,7)	1,4 (0,9)	1,6 (0,6)
	<b>CT</b>	2,05 (1,4)	2,07 (1,5)	1,97 (1,5)	2,1 (1,4)	2,2 (1,2)
	<b>p</b>	<b>0,034</b>	<b>0,028</b>	0,081	<b>0,043</b>	0,177
<b>G2677T/A</b>	<b>GG</b>	2,07 (1,5)	1,93 ± 0,9	1,99 (1,4)	1,86 ± 0,52	1,75 ± 0,52
	<b>GT</b>	1,8 (0,9)	2,11 ± 1,02	1,88 (1,5)	2,2 ± 1,29	2,15 ± 1,24
	<b>TT</b>	2,57 (1,4)	3,65 ± 2,04	3,05 (1,9)	2,34 ± 0,55	2,08 ± 1,10
<b>p</b>		0,181	<sup>a</sup> <b>0,01</b>	0,113	0,588	0,41
<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	2,07 ( )	2,26 ± 1,11	1,95 (1,6)	1,94 (0,9)	1,78 (0,6)
	<b>CT</b>	1,73 ( )	2,04 ± 0,93	1,87 (1,4)	1,83 (1,5)	2,09 (1,2)
	<b>TT</b>	3,02 ( )	2,98 ± 2,09	3,37 (2,1)	2,35 (1,3)	2,08 (1,1)
<b>p</b>		<sup>b</sup> <b>0,048</b>	0,140	0,086	0,236	0,235

Post Hoc analiza:

<sup>a</sup>GG vs. TT p=0,01; GT vs. TT p=0,01

<sup>b</sup>CC vs. TT p=0,03; CT vs. TT p=0,02

#### 4.8. UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA I NJIHOVIH HAPLOTIPOVA NA NASTANAK INSUFICIJENCIJE ALOGRAFTA

Uspostavljanje normalne funkcije i poboljšanje dugoročnog preživljavanja alografta su najvažniji ciljevi savremene transplantacione medicine. Zbog toga smo ispitali uticaj polimorfizma MDR1 gena i njihovih haplotipova na nastanak insuficijencije presađenog bubrega.

Na osnovu definicije normalne funkcije alografta, bolesnici koji su imali vrednost serumskog kreatinina > 177 µmol/l, označeni su kao bolesnici za insuficijentnom funkcijom alografta.

U grupi bolesnika koji su primali TAC medijana praćenja je bila 72 meseca (interkvantilni opseg 36 meseci). Devet bolesnika nikada nije uspostavilo normalnu funkciju alografta nakon transplantacije, a kod 20 bolesnika tokom praćenja nastala je insuficijencija alografta. Kako bi identifikovali potencijalne faktore rizika za nastanak insuficijencije alografta, ispitan je uticaj pojedinačnih polimorfizama MDR1 gena i drugih faktora rizika za nastanak insuficijencije alografta. Cox-ova univarijantna proporcionalna regresiona analiza nije pokazala pojedinačne nukleotidne polimorfizme, kao ni ispitivane faktore rizika, kao prediktore nastanka insuficijencije alografta (Tabela 32).

Tabela 32. Analiza faktora rizika za nastanak insuficijencije alografta bolesnika koji su primali TAC Cox-ovom univarijantnom proporcionalnom regresionom analizom

<b>Varijabla</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>CI95%</b>
godine	0.001	0.947	1.001	0.970-1.033
ženski pol	0.328	0.386	1.388	0.662-2.912
C1236T	0.449	0.240	1.567	0.740-3.318
G2677T/A	0.275	0.293	1.317	0.788-2.201
C3435T	0.088	0.720	1.092	0.676-1.764
vrsta Tx (1)	-0.155	0.688	0.856	0.401-1.828
AO	0.682	0.072	1.978	0.940-4.161
OFA	0.391	0.340	1.478	0.663-3.294
PTDM	0.425	0.487	1.529	0.461-5.071
HTA	0.163	0.762	1.177	0.406-3.387

(1) - transplantacija od moždano mrtvog donora

PTDM - posttransplantacioni dijabetes melitus

HTA - arterijska hipertenzija

Pored toga, ispitan je i uticaj diplotipova kao potencijalnih prediktora insuficijencije alografta. Medijana preživljavanja iznosila je 66 meseci (interkvantilni opseg 36), a insuficijencija alografta nastala je kod 24 bolesnika, od kojih šest nikada nije ni uspostavilo normalnu funkciju. Tabela 33 pokazuje da ni diplotipovi nisu bili značajni prediktori nastanka insuficijencije alografta kod bolesnika koji su kao KNI primali TAC.



Tabela 33. Analiza faktora rizika za nastanak insuficijencije alografta bolesnika koji su primali TAC Cox-ovom univarijantnom proporcionalnom regresionom analizom

<b>Varijabla</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>CI95%</b>
godine	0.001	0.956	1.001	0.967-1.036
ženski pol	0.389	0.350	1.475	0.652-3.335
diplo tip		0.770		
vrsta Tx (1)	-0.128	0.760	0.880	0.388-1.995
AO	0.825	0.048	2.282	1.008-5.168
OFA	0.002	0.996	1.002	0.396-2.534
PTDM	0.852	0.251	2.345	0.547-10.050
HTA	0.159	0.772	1.173	0.400-3.439

Bolesnici koji su primali CsA imali su duži period praćenja u odnosu na bolesnike sa TAC. Medijana vremena praćena iznosi 156 meseci (interkvantilni opseg 146). Tri bolesnika nisu uspostavili normalnu funkciju alografta, a kod samo 23 bolesnika tokom perioda praćenja dolazi do nastanka insuficijencije alografta. Tabela 34 prikazuje da ni pojedinačni nukleotidni polimorfizmi ni drugi ispitivani faktori nisu bili značajni prediktori nastanka insuficijencije grafta.

Tabela 34. Analiza faktora rizika za nastanak insuficijencije alografta bolesnika koji su primali CsA Cox-ovom univarijantnom proporcionalnom regresionom analizom

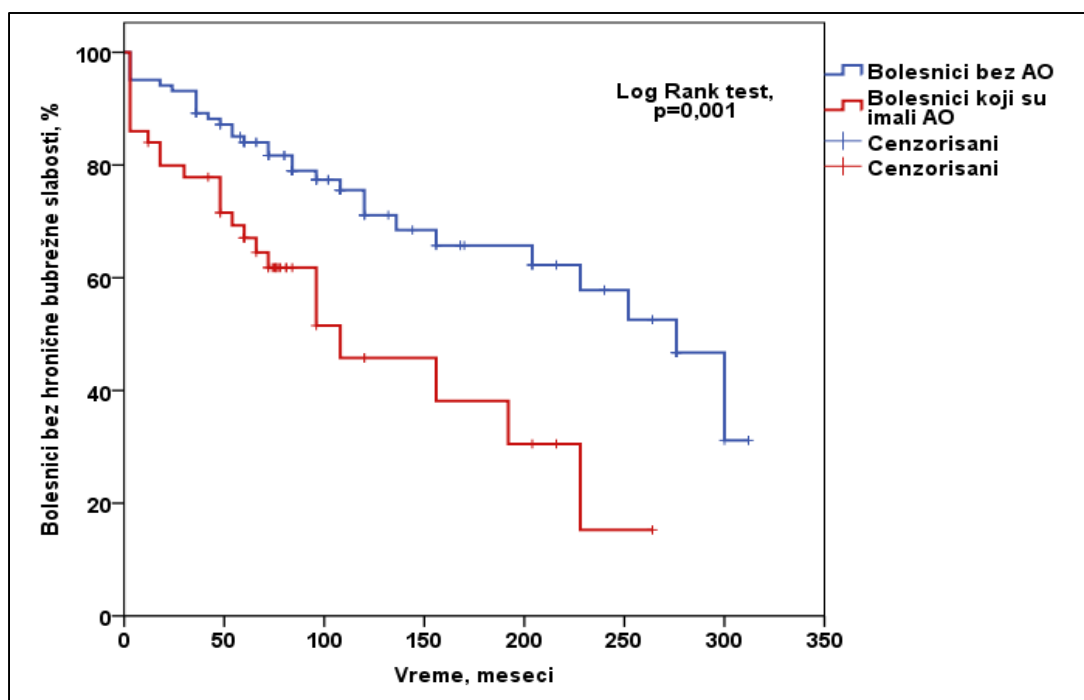
<b>Varijabla</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>CI95%</b>
godina	-0.015	0.336	0.985	0.956-1.015
ženski pol	-0.512	0.206	0.599	0.271-1.324
C1236T	1.044	0.158	2.839	0.667-12.082
G2677T/A	0.502	0.141	1.653	0.847-3.223
C3435T	0.348	0.271	1.416	0.762-2.633
vrsta Tx (1)	-0.021	0.961	0.980	0.433-2.215
AO	1.053	0.012	2.866	1.263-6.505
OFA	0.658	0.141	1.931	0.804-4.642
PTDM	0.460	0.402	1.584	0.540-4.650
HTA	-0.526	0.208	0.591	0.261-1.340

Analiza diplo tipova pokazuje da je medijana preživljavanja 134 meseca (interkvantilni opseg 171), a 18 bolesnika ima insuficijenciju grafta. Ni diplo tipovi ni drugi analizirani faktori nisu bili značajni prediktortori nastanka insuficijencije alografta (Tabela 35).

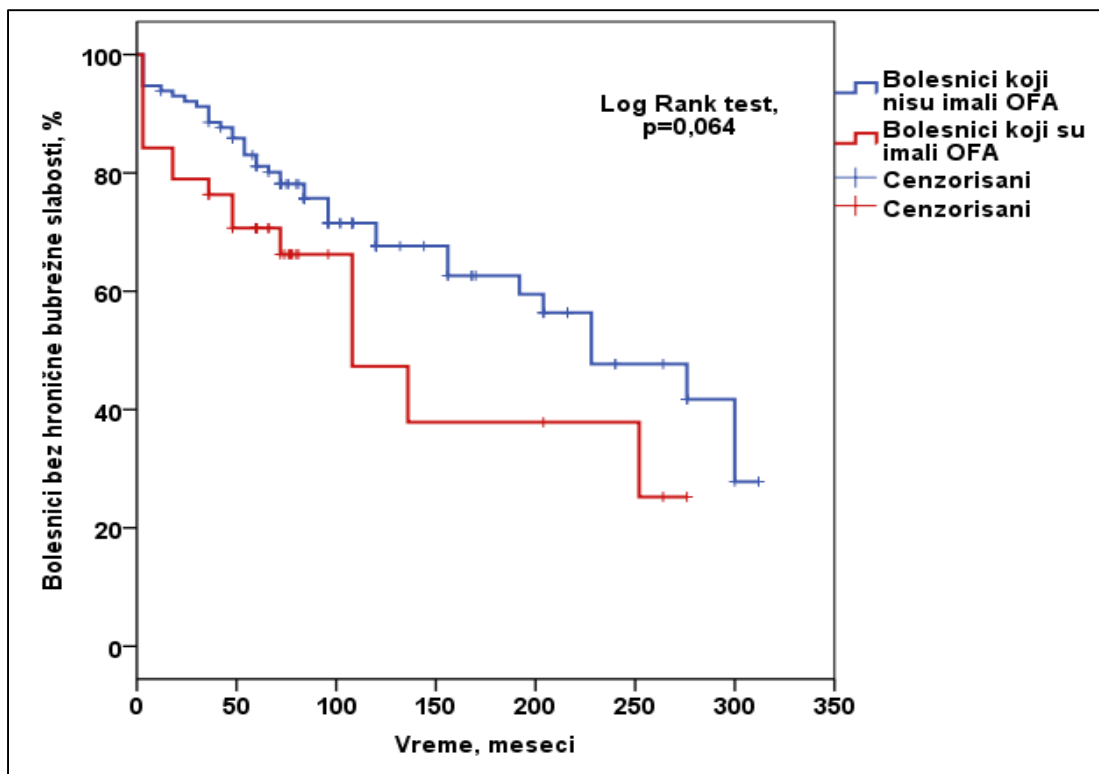
Tabela 35. Analiza faktora rizika za nastanak insuficijencije alografta bolesnika koji su primali CsA Cox-ovom univarijantnom proporcionalnom regresionom analizom

Varijabla	B	P	HR	CI95%
godine	-0.018	0.345	0.982	0.946-1.020
ženski pol	-0.402	0.396	0.669	0.265-1.692
diplo tip		0.690		
vrsta Tx (1)	-0.399	0.402	0.671	0.264-1.708
AO	0.839	0.100	2.315	0.583-6.284
OFA	1.040	0.036	2.828	1.071-7.466
PTDM	0.586	0.362	1.796	0.510-6.326
HTA	-0.300	0.577	0.714	0.258-2.125

Takodje, ispitivan je uticaj AO i OFA na nastanak insuficijencije alografta kod svih bolesnika, bez obzira na KNI koji su dobijali. Kaplan-Majerova kriva na grafikonu 17 pokazala je da je AO jedini značajan prediktor nastanka insuficijencije alografta ( $p = 0,001$ ), dok uticaj OFA nije dostigao statističku značajnost ( $p = 0,06$ ) (Grafikon 18).

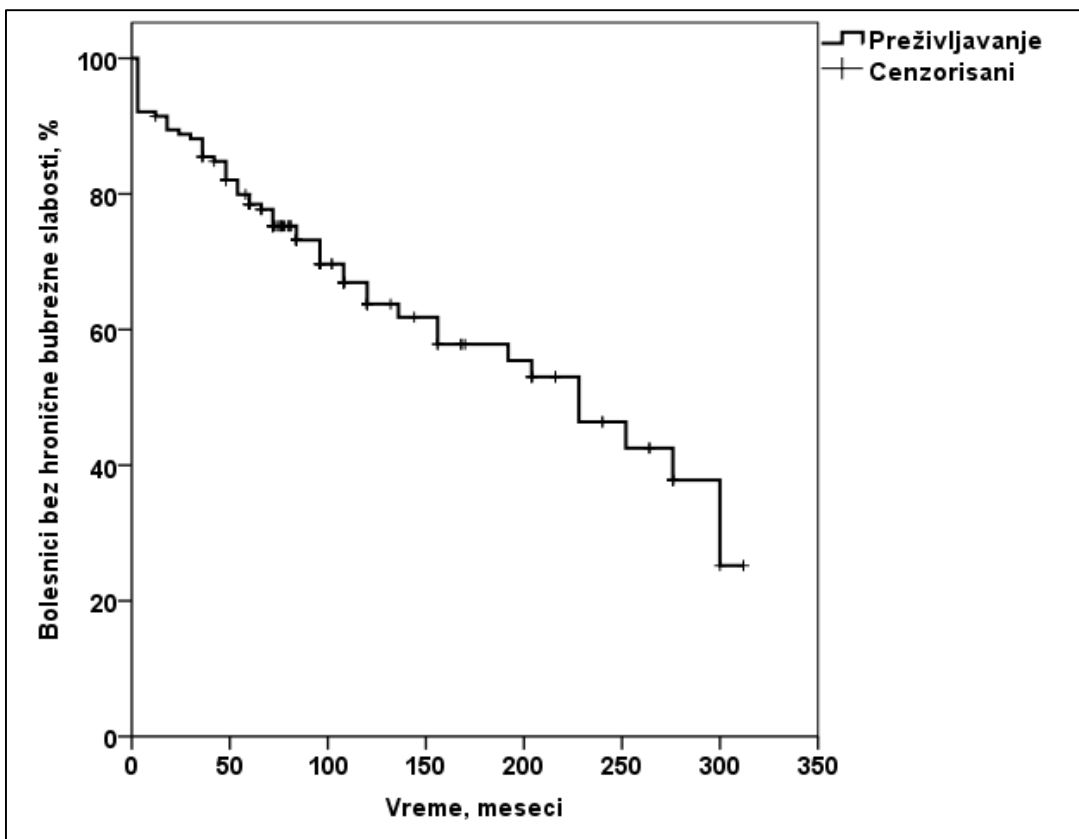


Grafikon 17. Kaplan-Majerova kriva nastanka insuficijencije alografta u zavisnosti od AO



Grafikon 18. Kaplan-Majerova kriva nastanka insuficijencije alografta u zavisnosti od OFA

Obzirom da se dugoročno preživljavanje alografta tokom posljednje dve decenije nije značajno poboljšalo uprkos napretku transplantacione medicine, analizirali smo koliko je naših ispitivanih bolesnika imao normalnu funkciju alografta tokom perioda praćenja. Kaplan-Majerova kriva na grafikonu 19 pokazala da je pet godina nakon transplantacije 70% naših bolesnika imalo normalnu funkciju alografta, a oko 40% njih i nakon 20 godina od transplantacije.



Grafikon 19. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja bolesnika sa normalnom funkcijom alografta

## 5. DISKUSIJA

Uvođenje KNI u imunosupresivne protokole jedan je od najvažnijih koraka u procesu razvoja transplantacije bubrega od šezdesetih godina prošlog veka do danas. Primenom ovih lekova učestalost AO smanjena je sa više od 80% na ispod 15%, a jednogodišnje preživljavanje alografta je višestruko povećano i sada je veće od 90% (72). Paralelno sa spoznajom i razumevanjem imunoloških procesa u transplantaciji organa i razvojem imunosupresivnih lekova, unapređene su i hirurške tehnike, a kao standard se primenjuju mere prevencije, rana dijagnostika i lečenje oportunističkih infekcija. Uprkos tome dugoročno preživljavanje alografta ostalo je nepromenjeno (73). Jedan od mogućih razloga izostanka poboljšanja dugoročnog preživljavanja alografta su i funkcionalne i morfološke promene koje KNI izazivaju na presađenom bubregu, a koje kao rezultat imaju insuficijenciju alografta. Međutim, rezultati multicentrične DeKAF studije pokazali su da patohistološki dokazane hronične promene alografta izazvane KNI nemaju loš prognostički značaj. Bolesnici sa dokazanom kalcinurinskom toksičnošću imali su bolje preživljavanje tokom 18 meseci praćenja nakon biopsije u odnosu na bolesnike sa hroničnim promenama alografta druge etiologije (74).

Optimalna terapija KNI podrazumeva balans između adekvatnog imunosupresivnog efekta i minimalne toksičnosti leka. Zahteva održavanje koncentracije leka u uskom terapijskom opsegu, što je naročito važno u ranom posttransplantacionom periodu (46). To je vreme kada je presađeni bubreg vulnerabilan, prvenstveno zbog izloženosti ishemijsko-reperfuzionom oštećenju koje indukuje inflamatorni odgovor, aktivaciju kiseoničnih slobodnih radikala, sa posledičnom endotelnom disfunkcijom, ekspresijom aloantigena i mogućim oštećenjem alografta (75). Visoke koncentracije KNI u ovom periodu nakon transplantacije mogu pogoršati proces oštećenja alografta, najvećim delom dozno zavisnom konstrikcijom aferentne arteriole. Zato se u nekim transplantacionim centrima KNI i ne uvode u terapiju u prvim danima nakon transplantacije.

Prvi korak u prevazilaženju mogućih toksičnih efekata KNI zbog neadekvatne koncentracije leka jeste praćenje njegove koncentracije u krvi. Merenje koncentracije KNI u krvi danas se rutinski primenjuje i smanjuje rizik oštećenja alografta zbog nedovoljne ili prevelike koncentracije leka u krvi. Neposredno nakon transplantacije koncentracija KNI se češće meri nego u kasnijem posttransplantacionom periodu, jer to je vreme kada je koncentracija KNI u krvi vrlo varijabilna

zbog uticaja više faktora kao što su visoke doze kortikosteroida, anemija, poremećaj apsorpcije lekova i sl. (76).

Važan korak u prevenciji toksičnosti KNI je poznavanje genske osnove farmakokinetike i farmakodinamske varijabilnosti KNI i individualizacija terapije u zavisnosti od genotipa primaoca i davaoca organa. Polimorfizam CYP3A5 gena na poziciji 6986 nesumnjivo ima najveći uticaj na metabolizam TAC. Prvi pokušaji individualizacije terapije na osnovu genotipa primaoca učinjeni su upravo u vezi sa ovim polimorfizmom. Međutim, rezultati studija o doziranju TAC baziranom na genotipu primaoca nisu pokazali značajne prednosti u odnosu na standardno doziranje leka prema telesnoj težini (77, 78). Multicentrična TacTic studija, sprovedena na 280 bolesnika sa presađenim bubregom, pokazala je da je više bolesnika koji su primali lek prema doziranju baziranom na genotipu primaoca dostigao ciljnu koncentraciju leka u krvi u prva tri dana od uvođenja leka u odnosu na bolesnike sa doziranjem prema telesnoj težini. Na taj način sprečene su posledice nedovoljne odnosno prevelike koncentracije TAC u krvi u ranom posttransplantacionom periodu. Ali razlike u preživljavanju alografta i bolesnika, učestalosti AO i OFA između ispitivanih grupa bolesnika nije bilo. Ovo je objašnjeno selekcijom bolesnika koji su imali nizak imunološki rizik, koji su dobili indukcionu terapiju i primali visoke doze preparata mikofenolične kiseline. Pretpostavlja se da bi podobnu grupu bolesnika za ovaj način doziranja TAC činili bolesnici sa visokim imunološkim rizikom, koji započinju terapiju KNI na dan transplantacije ili koji ne primaju indukcionu terapiju (78, 79). S druge strane, u studiji Shuker i saradnika nije pokazano ranije dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi u grupi bolesnika koji su primali TAC na osnovu genotipa CYP3A5 gena (79). Dakle, i pored dokazanog uticaja CYP3A5 polimorfizma, neki drugi polimorfizmi odgovorni su za deo varijabilnosti farmakokinetike TAC. Takođe, treba imati u vidu i mogućnost međusobnog uticaja polimorfizama. Rezultati nekih ispitivanja ukazuju da „linkage disequilibrium“ između divljeg tipa CYP3A5 gena i MDR1 gena može menjati uticaj polimorfizama MDR1 na metabolizam TAC (80).

Da bismo isključili uticaj polimorfizma CYP3A5 gena na metabolizam KNI, kao i na polimorfizme MDR1 gena, u dizajnu naše studije definisano je da svi bolesnici imaju isti CYP3A5 genotip. S obzirom na učestalost „varijant genotipa“ ovog polimorfizma u populaciji bele rase, definisali smo da svi bolesnici budu CYP3A5\*3\*3 homozigoti. Iako CsA i TAC imaju isti mehanizam delovanja i vrlo slične neželjene efekte, ipak to su dve različite hemijske supstance,

pa su sve analize u vezi sa farmakokinetikom lekova i polimorfizmima MDR1 gena rađene odvojeno za oba leka, što je značajno smanjilo broj ispitanika. Kako azatioprin nije supstrat P-glikoproteina, i s obzirom na to da je za njegov metabolizam odgovorna ksantin-oksidaza, a ne CYP3A enzimi, nije bilo razloga da i bolesnici koji su primali azatioprin ne budu uključeni u ispitivanje. Niko od ispitanika u prve dve godine nakon transplantacije nije primao makrolidne antibiotike, antiaritmike, antikonvulzante ni tuberkulostatike kao potencijalne inhibitore, odnosno induktore P-glikoproteina i CYP3A enzima. Cilj ovakve selekcije bolesnika bio je da se u što većoj meri eliminišu drugi poznati faktori odgovorni za varijabilnost kinetike KNI i da se akcentuje uticaj polimorfizama MDR1 gena (10).

Distribucija genotipova polimorfizama MDR1 gena je varijabilna i zavisi od rasne i etničke pripadnosti. Zbog toga je u ovom radu najpre određena učestalost genotipova SNPs MDR1 gena. Homogenost prema rasnoj pripadnosti u našem uzorku je zadovoljena jer su svi ispitanici bili bele rase.

„Divlji homozigoti“ za polimorfizam C1236T kod naših ispitanika javili su se sa učestalošću od 29%. Prema rezultatima drugih studija, njihova zastupljenost među evropskim narodima se kreće od 20% kod Turaka do 35% kod Nemaca (81, 82). Učestalost ovog genotipa u populaciji zdravih građana jugoistočne Srbije je 23% (83). Poznato je da su različiti delovi Srbije tokom istorije bili pod nejednakim uticajem Turske odnosno germanskih naroda. Svakako je veće naseljavanje Turaka bilo na jugoistoku u odnosu na sever Srbije, koji je dominantno bio pod uticajem Austrougarske, pa se na taj način može objasniti razlika u učestalosti ovog polimorfizma naše populacije u odnosu na populaciju zdravih građana jugoistočnog dela Srbije. Učestalost „varijant homozigota“ za polimorfizam C1236T u našoj ispitivanoj populaciji značajno odstupa od učestalosti ovog genotipa kod drugih evropskih naroda, kao i od učestalosti u zdravoj populaciji jugoistočnog dela Srbije. Samo jedan naš ispitanik imao je TT genotip. TT homozigoti među evropskim narodima zastupljeni su sa 16-29%, a u studiji Milojković i saradnika ovaj genotip je zabeležen kod 16% ispitanika (81, 82, 83). Naši rezultati za TT homozigote značajno odstupaju od očekivanih, a na osnovu Hardi–Vajnbergovog ekvilibrijuma. Zbog ovog odstupanja identifikaciju genotipova smo ponovili još dva puta kako bismo eliminisali moguću grešku u radu, ali rezultat je ostao identičan prethodnom, pa nemamo jasno objašnjenje za nađeni disekvilibrijum

među našim ispitanicima. Ostaje samo pretpostavka da je postojala neka vrsta selekcije u našoj grupi ispitanika koju nismo identifikovali.

Polimorfizam G2677T/A najranije je otkriven polimorfizam MDR1 gena i jedini je koji zamenom baza dovodi do sinteze tri različite aminokiseline. Rezultati našeg ispitivanja za učestalosti genotipova ovog SNP-a vrlo su slični rezultatima za druge evropske narode, kao i za populaciju zdravih građana jugoistočnog dela Srbije. Najzastupljeniji su bili nosioci GT genotipa sa učestalošću od 52%, TA genotip se javio sa učestalošću od 2,63%, a nijedan naš ispitanik nije imao GA ni AA genotip. Učestalost TA genotipa prema podacima iz literature za druge evropske narode ne prelazi 3%, dok AA genotip nije nađen ni kod drugih Evropljana (81, 82, 84).

Učestalosti genotipova za polimorfizam C3435T u našim rezultatima nisu značajno odstupale od očekivanih. CC genotip za ovaj polimorfizam imalo je 27% naših ispitanika, što je nešto više u odnosu na podatke iz literature za većinu drugih evopskih naroda i populaciju zdravih građana jugoistočnog dela Srbije, gde je učestalost ovog genotipa 12-24% (85, 86). S druge strane, slična zastupljenost CC genotipa kao u našim rezultatima zabeležena je u radovima sa španskim ispitanicima (87).

Znajući da se geni ne nasleđuju samostalno i da novija ispitivanja ukazuju da je haplotip tri SNPs MDR1 gena koje smo ispitivali značajniji genski marker aktivnosti P-glikoproteina nego bilo koji od polimorfizama pojedinačno, odredili smo i učestalosti haplotipova MDR1 gena. Na osnovu dobijenih genotipova SNPs identifikovali smo 10 haplotipova. Najviše ispitanika imalo je CGC haplotip, 45,38%. Da rasa primarno utiče na učestalost genskih polimorfizama, dokazuju i podaci iz literature za učestalost ovog haplotipa. On je bio prisutan, slično našim rezultatima, kod 44,1% pripadnika bele rase u studiji autora iz Pitsburga, ali kod 72,6% Afroamerikanaca i samo 23,1% Azijata (88, 89, 90). Drugi po učestalosti bio je TTT haplotip, prisutan kod 30,01% naših bolesnika, što je u saglasnosti sa 32% pripadnika bele rase u studiji Kroetz-a i saradnika (89).

KNI pokazuju veliku interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost. Imaju uzak terapijski opseg i izraženu sklonost ka interrekciji sa drugim lekovima. Imajući u vidu ovakve osobine KNI, cilj ove disertacije bio je i da se ispita uticaj SNPs i haplotipova MDR1 gena na farmakokinetiku KNI. S obzirom na to da su bolesnici primali jedan od dva KNI, analizirani su odvojeno bolesnici koji su primali TAC i oni koji su primali CsA.



U grupi bolesnika koji su primali TAC analiza uticaja C3435T polimorfizma na doziranje leka pokazala je da su za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi najveće doze leka bile potrebne TT homozigotima. Oni su imali i najmanji odnos N/D. Razlika u dozama TAC u odnosu na „divlje homozigote“ i heterozigote dostigla je statističku značajnost u prvoj godini nakon transplantacije, a odnos N/D u ranom posttransplantacionom periodu. Za ovaj polimorfizam znamo da utiče na nivo iRNK i ekspresiju P-glikoproteina, ali i pored toga rezultati ispitivanja njegovog uticaja na doziranje TAC u literaturi su različiti. Neke studije TT homozigote vezuju za niže dozne zahteve i veći odnos N/D, što se objašnjava nižim nivoom P-glikoproteina kod ovog genotipa (91, 92). Važna razlika naše u odnosu na ove studije je da su svi naši ispitanici bili CYP3A5\*3\*3 homozigoti, što nije bio slučaj kod dve navedene studije. S druge strane, rezultati Cheung-a i saradnika su u skladu s našim (93).

Za razliku od većine studija koje favorizuju uticaj C3435T polimorfizma na farmakokinetiku TAC, naši rezultati ukazuju da je G2677T/A polimorfizam najznačajniji SNP MDR1 gena za doziranje TAC. U našim rezultatima nosioci TT genotipa za ovaj polimorfizam u svakom trenutku posmatranja tokom prve dve godine nakon transplantacije zahtevali su značajno veće doze TAC u odnosu na druga dva genotipa da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi. U ranom posttransplantacionom periodu imali su i značajno niži odnos N/D u odnosu na „divlje homozigote“ i heterozigote. Podaci iz literature ni po pitanju ovog polimorfizma MDR1 gena nisu jedinstveni. U studiji koja je obuhvatila 103 kineska primaoca bubrega „divlji homozigoti“ imali su manje dozne zahteve u odnosu na heterozigote i „varijant homozigote“, kao što su pokazali i naši rezultati (93). S druge strane, studija Anglicheau-a i saradnika (94) pokazuje da su GG homozigoti primali veće doze TAC da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi. Analizirajući razliku pomenute studije u odnosu na naše rezultate, uočava se da je naša studija imala gotovo dva puta više ispitanika, da je razlika u doznim zahtevima u studiji francuskih autora bila na granici statističke značajnosti, kao i da je obuhvatila samo prvi mesec nakon transplantacije. Ali ova studija, slično našoj, ukazuje na veći značaj G2677T/A polimorfizma za doziranje TAC u odnosu na polimorfizme na egzonu 12 i 26. Imajući u vidu da farmakokinetika TAC zavisi od više faktora, a ne samo od polimorfizama MDR1 gena, ispitivali smo i uticaj telesne težine i godina bolesnika, vrednosti hematokrita i aminotransferaza na dozu TAC. Multivarijantnom regresionom analizom G2677T/A polimorfizam izdvojio se kao jedini nezavisan prediktor doze TAC od dvadesetog dana nakon transplantacije, pa do kraja perioda praćenja.

Najmanje dokaza o uticaju polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku TAC ima za SNP C1236 T. Prema našim rezultatima, heterozigoti za ovaj SNP imali su veće dozne zahteve u odnosu na divlje homozigote, ali je ta razlika dostigla statističku značajnost samo na kraju druge godine posle transplantacije. Ni druge studije nisu pokazale jasan uticaj ovog polimorfizma na doziranje TAC (80, 94). Jedan od razloga nekonzistentnih rezultata u vezi sa ovim polimorfizmom verovatno su i različite učestalosti genotipova pojedinačnih polimorfizama za različite etničke grupe, što potvrđuje i Hardy–Vajnbergov disekvilibrijum u našem uzorku.

Iako je haplotip MDR1 gena prepoznat kao važniji prediktor ekspresije P-glikoproteina u odnosu na SNPs, podaci o njegovom uticaju na doziranje TAC nisu dovoljno čvrsti. Nosioi CTT/TTT genotipa u našem uzorku, dakle TT homozigoti za G2677T/A i C3435T polimorfizam, imali su niži odnos N/D u odnosu na druge diplotipove, i ta razlika dostiže statističku značajnost 10. i 20. dana nakon transplantacije. Njihovi dozni zahtevi u skladu s tim bili su veći, najizraženije tokom prvog meseca nakon transplantacije. Ispitivanje Yu-a i saradnika (95), koje je obuhvatilo 62 bolesnika sa presađenom jetrom, pokazalo je da su TT homozigoti na poziciji C1236T i G2677T/A ili nosioi TTT haplotipa, zahtevali veće doze TAC da bi distigli ciljni nivo u krvi u odnosu na druge haplotipove. Međutim, Wang i saradnici (88), u studiji sa 81 bolesnikom sa presađenim plućima koji su imali CYP3A5\*3\*3 genotip, pokazuju da su nosioi TTT/TTT diplotipa imali 36–174% veći odnos N/D u odnosu na CGC/CGC primaocce pluća u prvih godinu dana nakon transplantacije. Važna razlika između naše i studije Wang-a i saradnika je u četiri najučestalija haplotipa, koji su konstituisali diplotipove. TTT haplotip je u našem uzorku zastupljen sa 30%, za razliku od skoro 41% u pomenutoj studiji, dok je zastupljenost CTT haplotipa zabeležena kod 8,42% naših ispitanika, a u studiji američkih autora čak i ne spada u četiri najučestalija haplotipa. Najzad, pri interpretaciji rezultata o uticaju genotipa na doziranje leka i analize razlika među studijama, uvek treba misliti i na moguću povezanost polimorfizama. Tako je u ispitivanju koje je obuhvatilo 206 bolesnika sa presađenim bubregom, dokazani uticaj TTT haplotipa na odnos N/D izgubio značaj kada je uzet u obzir i uticaj CYP3A5 polimorfizma (80).

Za razliku od TAC, rezultati naše studije nisu pokazali značajan uticaj polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku CsA. U našem radu nijedan polimorfizam MDR1 gena nije značajno uticao na dozu CsA, kao ni na odnos N/D. Za polimorfizam C1236T „divlji homozigoti“ pokazuju tendenciju za veće doze CsA u odnosu na heterozigote, dok su za polimorfizme G2677T/A i

C3435T veće doze leka zabeležene kod „varijant homozigota“, a najmanje kod heterozigota. Ni kombinacije pojedinačnih polimorfizama nisu imale uticaj na dozu i odnos N/D CsA. Bolesnici koji su bili heterozigoti za sva tri polimorfizma imaju potrebu za manjim dozama CsA u odnosu na homozigote, ali bez dostizanja statističke značajnosti. Ni rezultati drugih studija nisu pokazali jasan uticaj ni SNPs MDR1 gena ni njihovih haplotipova na farmakokinetiku CsA. Meta analiza, koja je obuhvatila 1036 bolesnika i 14 studija, nije pokazala da C3435T polimorfizam utiče na farmakokinetiku CsA (96), dok studija Fanta-e i saradnika ukazuje da bolesnici koji su „divlji homozigoti“ za polimorfizme na eksonu 12 i 21 imaju potrebu za većim dozama CsA u odnosu na druge alele (97). Studija čeških autora, sprovedena na 407 bolesnika, ne pokazuje uticaj haplotipova MDR1 gena na dozu CsA (42), dok neke druge studije ukazuju da je CGC haplotip povezan sa većim dozama CsA potrebnim za dostizanje ciljnog nivoa leka u krvi (97, 98).

AO je jedan od najznačajnijih prediktora gubitka alografta. Kao faktori rizika za nastanak AO prepoznate su HLA nepodudarnosti, prisustvo anti-HLA antitela, smanjena saradljivost bolesnika u pogledu pravilnog uzimanja propisanih imunosupresivnih lekova, dužina trajanja dijalize pre transplantacije, mlađa životna dob primaoca i dužina trajanja hladne ishemije (99). Imajući u vidu značaj AO za nastanak ne samo hronične insuficijencije već i gubitka alografta, mnoge studije bavile su se utvrđivanjem povezanosti AO sa genotipom MDR1 gena davaoca i primaoca bubrega (42, 50, 80).

Učestalost AO kod naših ispitanika bila je 33%. Prema podacima u literaturi, incidenca ove komplikacije nakon transplantacije bubrega kreće se oko 25–30%, mada ima podataka i o incidenci AO manjoj od 15% (72, 100). Ovako visoka učestalost AO kod naših ispitanika može se objasniti činjenicom da je kod malog broja bolesnika dijagnoza AO patohistološki potvrđena, ali i činjenicom da je u našu studiju uključen veliki broj bolesnika iz perioda kada nije primenjivana indukciona terapija. S druge strane, rezultati našeg ispitivanja nisu pokazali značajan uticaj ni SNPs ni haplotipova MDR1 gena na učestalost AO. Istovremeno, ni za CYP3A5 polimorfizam, za koji znamo da ima najveći uticaj na farmakokinetiku TAC, nema konzistentnih dokaza o uticaju na učestalost AO (50, 101, 102). Hesselink i saradnici nisu pokazali povezanost C3435T polimorfizma i patohistološki dokazanog AO tokom prvih godinu dana nakon transplantacije kod 136 bolesnika sa presađenim bubregom (50). Nije dokazan uticaj ovog polimorfizma, kao ni C1236T i G2677T/A polimorfizama, na učestalost AO ni u studiji Fredericks-a i saradnika u kojoj

je analizirano 206 primaoca bubrega (80). Međutim, ispitivanje sprovedeno na većem broju bolesnika (832 primaoca bubrega) pokazalo je da su nosioci CGT haplotipa MDR1 gena imali 1,4 puta veći rizik za nastanak AO u odnosu na TTT i CGC haplotipove, što ukazuje da je haplotip MDR1 gena značajniji genski marker u predikciji AO nego bilo koji od polimorfizama pojedinačno (42). Izostanak uticaja haplotipa MDR1 gena na učestalost AO koji je zabeležen u većini studija uključujući i našu, verovatno je posledica malog broja analiziranih ispitanika.

Jedna od najčešćih komplikacija u ranom posttransplantacionom periodu je OFA. Učestalost OFA povećava se sa povećanjem broja marginalnih donora. Kao najznačajniji faktori rizika za nastanak OFA navode se vreme i hladne i tople ishemije, terminalni kreatinin, body mass index i godine davaoca bubrega, kao i transplantacija bubrega od davaoca nakon srčane smrti (103). Dokazano je da OFA predstavlja faktor rizika za lošije kako kratkoročno tako i dugoročno preživljavanje alografta (104). Učestalost OFA u našem ispitivanju bila je 25%, uprkos činjenici da je 60% naših bolesnika dobilo bubreg od živog davaoca. Tome je verovatno doprinelo više neimunoloških faktora opisanih i u drugim studijama, kao što su godine davaoca bubrega, način prezervacije organa, vreme tople ishemije, hirurška tehnika i mnogi drugi (105, 106). Suprotno dobro poznatoj povezanosti između OFA i funkcije, odnosno preživljavanja alografta, povezanost OFA i polimorfizama MDR1 gena nije dovoljno ispitivana i u literaturi nema dokaza o značaju MDR1 gena na učestalost OFA. Naši rezultati pokazuju da su, među ispitanicima koji su kao KNI primali TAC, najveću učestalost OFA imali divlji homozigoti za troalelski polimorfizam, dok su kod bolesnika sa CsA heterozigoti za C3435T polimorfizam imali više OFA u odnosu na homozigote. Razlika u učestalosti OFA među haplotipovima nije bilo. Naši rezultati ukazuju na mogući uticaj polimorfizama MDR1 gena na nastanak OFA, ali je za definisanje tog uticaja svakako potreban veći broj ispitanika.

KNI imaju veliki broj neželjenih efekata. Neki od njih direktno utiču na funkciju alografta, dok drugi, pre svega metabolički poremećaji, predstavljaju faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Poznato je da hronična bolest bubrega predstavlja faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti u svim svojim stadijumima i da bolesnici na dijalizi imaju 10-20 puta veći rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti u odnosu na opštu populaciju. Ali ono što ne ohrabruje jeste podatak da i nakon uspešne transplantacije bubrega ostaje povećan rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti, od tri do pet puta veći u odnosu na opštu populaciju (107, 108). Kardiovaskularne bolesti su i najznačajniji uzrok mortaliteta bolesnika sa funkcionalnim

alografom (109). Nakon transplantacije bubrega pored tradicionalnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti i onih specifičnih za hroničnu bolest bubrega dodaju se i faktori rizika vezani za upotrebu imunosupresivnih lekova i malfunkciju presađenog bubrega (110). Dodatan problem predstavlja lečenje ovih oboljenja kod bolesnika sa presađenim bubregom zbog potencijalne interrekcije velikog broja lekova u čijem metabolizmu učestvuju P-glikoprotein i CYP3A enzimi sa KNI (111).

Dislipidemija, hiperurikemija i posttransplantacioni dijabetes melitus dobro su poznati metabolički poremećaji koji mogu nastati kao neželjeni efekat upotrebe KNI (110). Naši rezultati nisu pokazali povezanost ni SNPs ni haplotipova MDR1 gena sa nastankom posttransplantacionog dijabetes melitusa i hiperurikemije, što je u skladu sa literarnim podacima (61, 62).

Dislipidemija kao neželjeni efekat KNI češće se javlja pri upotrebi CsA u odnosu na TAC. Manifestuje se hiperholesterolemijom, hipertrigliceridemijom, povišenom koncentracijom LDL-a i sniženom koncentracijom HDL-a. Kod bolesnika sa presađenim bubregom hiperholesterolemija predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak ishemijske bolesti srca (111). Naši rezultati nisu pokazali uticaj polimorfizama MDR1 gena na koncentraciju ukupnog holesterola. Za razliku od toga, u grupi bolesnika koji su primali CsA postojale su razlike u koncentraciji triglicerida u serumu kod različitih genotipova MDR1 gena. CC homozigoti za polimorfizam na egzonu 12 imali su niže vrednosti triglicerida u serumu u odnosu heterozigote, i ta razlika dostiže statističku značajnost u prvom i trećem mesecu, kao i u prvoj godini nakon transplantacije bubrega. Za G2677T/A i C3435T polimorfizme „varijant homozogoti“ imaju niže vrednosti triglicerida u serumu u odnosu na „divlje homozigote“ i heterozigote, naročito u ranom posttransplantacionom periodu. U literaturi nema studija o direktnom uticaju polimorfizama MDR1 gena na nastanak dislipidemije kod bolesnika koji su primali KNI. Dislipidemija i polimorfizmi MDR1 gena bili su predmet istraživanja i drugih studija, ali u smislu ispitivanja uticaja polimorfizama MDR1 gena na terapijski odgovor bolesnika i hepatotoksičnost nakon upotrebe statina. Naime, pokazano je da nosioci G alela za polimorfizam G2677T/A imaju veći rizik za nastanak akutne hepatotoksičnosti pri upotrebi atorvastatina u odnosu na nosioce T i A alela, dok je genotip C3435T polimorfizma važan u predikciji terapijskog odgovora na upotrebu statina (70, 112). Uticaj polimorfizama MDR1 gena na metabolizam lipida nije jednostavan, znajući da se većina statina metaboliše preko CYP3A enzima i da je P-glikoprotein, pored KNI, transporter i nekih lipida kao i samih statina.

Stoga, naši rezultati samo ukazuju na moguću povezanost hipertrigliceridemije sa genotipom polimorfizama MDR1 gena. Moguća povezanost je pokazana kod bolesnika koji su primali CsA, a znajući da se naši bolesnici sa različitim genotipovima MDR1 gena nisu razlikovali po dozama CsA, onda je uticaj polimorfizama na nastanak dislipidemije značajniji jer nije posledica uticaja doze CsA već direktnog efekta na farmakodinamiku leka. Svakako, za izvođenje zaključaka o uticaju polimorfizama MDR1 gena na koncentraciju triglicerida u krvi bolesnika sa presađenim bubregom je potreban veći broj ispitanika i homogenost bolesnika po pitanju upotrebe statina.

Jedan od najčešćih neželjenih efekata KNI je nefrotoksičnost. Akutna nefrotoksičnost izazvana KNI reverzibilna je i dozno zavisna, a posledica je konstrikcije aferentne arteriole i posledičnog smanjenja jačine glomerulske filtracija. Međutim, hronične promene na bubrezima, izazvane dugotrajnom upotrebom KNI, koje dovode do insuficijencije alografta, javljaju se i pri adekvatnim koncentracijama KNI u krvi i pokazuju interindividualnu varijabilnost (113). Nasuprot velikom broju ispitivanja na temu povezanosti polimorfizama MDR1 gena i farmakokinetike KNI, vrlo malo studija i podataka ima o genskoj osnovi hronične insuficijencije alografta izazvane KNI (14, 114).

Za razliku od dokazane povezanosti polimorfizama MDR1 gena i doza TAC, rezultati našeg ispitivanja nisu pokazali uticaj ni SNPs ni haplotipova MDR1 gena na funkciju alografta u grupi bolesnika koji su primali TAC. Bez dokaza o uticaju genotipa MDR1 gena primaoca na funkciju alografta su i drugi radovi (50, 115). S druge strane, kod naših bolesnika koji su primali CsA funkcija alografta tokom prve dve godine od transplantacije razlikovala se u zavisnosti od genotipa MDR1 gena. Najbolju funkciju alografta, izraženo vrednošću kreatinina u serumu, imali su divlji homozigoti za sva tri SNP-a MDR1 gena. Razlika u funkciji bila je najizraženija za troalelski polimorfizam u egzonu 21. Nosioci „divljeg alela“ za sva tri polimorfizma imali su najniže kreatinine i na nivou diplotipa. Ove razlike u vrednostima kreatinina u serumu u grupi bolesnika koji su primali CsA ne možemo povezati sa uticajem doze i nivoa CsA jer među našim bolesnicima nije bilo značajne razlike u dozama i odnosu N/D CsA zavisno od genotipova MDR1 gena. Bolju funkciju „divlji homozigoti“ imaju i kada je izražavamo klirensom kreatinina za polimorfizme na egzonima 12 i 26, i to godinu dana nakon transplantacije. Uticaj polimorfizama MDR1 gena na funkciju alografta, za razliku od našeg ispitivanja, nije pokazan u drugim studijama (49, 116). Boumar i saradnici su ispitivali uticaj polimorfizama CYP3A i MDR1 gena na funkciju alografta

tokom prve godine od transplantacije bubrega kod 171 bolesnika koji su primali CsA. Nisu pokazali uticaj polimorfizama ovih gena na funkciju alografta (49). Za razliku od našeg ispitivanja, u studiji Boumara i saradnika funkcija alografta je izražena samo vrednošću klirensa kreatinina, a dužina praćenja je bila godinu dana, pa su to možda razlozi izostanka uticaja polimorfizama CYP3A i MDR1 na funkciju alografta.

I pored pokazanog uticaja polimorfizama MDR1 gena na funkciju alografta, kada smo analizirali uticaj SNPs i haplotipova MDR1 gena na nastanak insuficijencije alografta, Cox-ova univarijantna proporcionalna regresiona analiza nije pokazala ni SNPs ni haplotipove MDR1 gena kao prediktore nastanka insuficijencije alografta. Ni grupa nemačkih autora, koja je ispitala uticaj troalelskog polimorfizma G2677T/A na funkciju bubrega kod bolesnika sa presađenim srcem, a koji su primali KNI, ne nalazi povezanost genotipa ovog polimorfizma sa nastankom insuficijencije bubrega (117). Ova studija se razlikuje od naše po tome što njihovi bolesnici nisu bili homogeni za CYP3A5 polimorfizam, a ograničenost obe studije svakako je mali broj ispitanika. Naši rezultati pokazuju uticaj polimorfizma MDR1 gena na funkciju alografta tokom prve dve godine od transplantacije kod 61 bolesnika koji su primali CsA.

Znajući da je patološka proteinurija povezana sa lošijom funkcijom alografta, ali i nastankom kardiovaskularnih bolesti i lošijim preživljavanjem primaoca bubrega (118), u okviru ove disertacije ispitivan je i uticaj polimorfizama MDR1 gena na kvantitativnu proteinuriju. Nije bilo značajnog uticaja ni SNPs ni haplotipova MDR1 gena na kvantitativnu proteinuriju ni kod bolesnika koji su primali TAC kao ni kod onih koji su primali CsA. O uticaju polimorfizama MDR1 gena na proteinuriju nema podataka ni u literaturi.

Poznavanje genetske osnove samo genotipa primaoca bubrega nije dovoljno za predikciju funkcije alografta. U prilog tome govori sve veći broj studija koje ističu uticaj genotipa MDR1 gena davaoca bubrega na funkciju alografta (119, 120). Ali čak i ove studije, iako su neke sprovedene na velikom broju ispitanika, nisu jasno definisale genetsku osnovu nastanka hronične insuficijencije alografta. Studija Woilard-a i saradnika (119), koja je obuhvatila 227 bolesnika, pokazuje da je TT genotip C3435T polimorfizma davaoca bubrega rizik za lošiju funkciju alografta kod bolesnika koji su primali CsA. Suprotno tome, istraživanje sa 811 ispitanika pokazalo je da su bolesnici koji su dobili bubreg sa CC genotipom za pomenuti polimorfizam imali značajno veći rizik nastanka insuficijencije alografta u odnosu na druga dva genotipa (121). Otkrivanje genetske osnove

insuficijencije alografta verovatno podrazumeva poznavanje genotipa i davaoca i primaca organa, i ne samo polimorfizama MDR1 gena, nego i mnogih drugih gena čiji proteinski produkti učestvuju u metabolizmu KNI, ali i gena koji nisu povezani ni sa matabolizmom KNI ni sa drugim imunosupresivnim lekovima (121).

Danas znamo da AO, bez obzira na vreme nastanka, i da li je klinički manifestno ili otkriveno biopsijom, predstavlja faktor rizika za nastanak insuficijencije alografta i pogoršava njegovo dugoročno preživljavanje (72, 75, 122). Rezultati našeg ispitivanja nisu pokazali AO kao prediktora nastanka insuficijencije alografta ni kod bolesnika koji su primali TAC kao ni kod onih koji su primali CsA. Međutim, kada smo uticaj AO na nastanak insuficijencije alografta analizirali kod svih 152 bolesnika, bez obzira na KNI koji su dobijali, naši rezultati su potvrdili značaj AO za nastanak isuficijencije alografta. Naime, Kaplan–Majerova kriva pokazala je značajnu razliku u broju bolesnika i vremenu nastanka insuficijencije alografta kod onih koji su imali AO u odnosu na one koji ga nisu imali.

Prema podacima iz literature, petogodišnje preživljavanje alografta kreće se od 67% do 77%, a desetogodišnje između 43% i 56% (123). Pобољшanje dugoročnog preživljavanja alografta jedan je od najvažnijih ciljeva savremene transplantacione medicine. Dostizanje tog cilja otežava veliki broj faktora koji utiču na funkciju alografta, a povezani su i sa davaocima i sa primaocima bubrega.

Naša studija je dizajnirana kao retrospektivno opservaciono ispitivanje i selekcija bolesnika bila je takva da su u trenutku početka studije svi ispitanici imali funkcionalan alograft. Prikupljanje i analiza podataka trajali su oko dve godine, a u tom periodu mali broj bolesnika je razvio terminalnu insuficijenciju alografta. To je razlog zašto u okviru ove disertacije nismo analizirali dugoročno preživljavanje alografta, već samo hroničnu insuficijenciju alografta.

Pet godina nakon transplantacije oko 70% naših ispitanika imalo je normalnu funkciju alografta, a nakon 20 godina čak njih 40%. Nekoliko faktora koji se odnose na primaoce bubrega doprinelo je ovako dobroj funkciji alografta u našoj ispitivanoj populaciji. Među njima je svakako činjenica da su naši primaoci bili mlađji sa prosečnom starošću od oko 36 godina. Podaci iz literature ukazuju da je petogodišnje preživljavanje alografta 67,2% ako je primalac stariji od 65 godina, a čak 80,1% ako je mlađi od 65 (124). Drugi vrlo važan faktor koji je doprineo dobroj funkciji alografta u našoj sudiji je činjenica da je 60% naših ispitanika dobilo bubreg od živog davaoca.



Bolja funkcija alografta od živog u odnosu na moždano umrlog davaoca je bezrezervno pokazana u brojnim radovima (125, 126). Razlozi tome su višestruki. Kvalitet organa od živog davaoca je bolji jer su oni pre transplantacije sistematski pregledani i izabrani da budu davaoci samo ako su dobrog zdravstvenog stanja i očuvane funkcije bubrega, za razliku od moždano umrlih davaoca o čijem zdravstvenom stanju u trenutku odabira za transplantaciju znamo veoma malo, a pod uticajem različitih faktora terminalni kreatinin je neretko povišen. Čak i ako je moždano umrli davalac prethodno bio potpuno zdrav, sama moždana smrt dovodi do određenih oštećenja organa. Ta oštećenja su posledica hemodinamske nestabilnosti koja se gotovo po pravilu javlja tokom moždane smrti, hormonskog dizbalansa i sistemske inflamacije (127, 128). Oštećenja bubrega koja su počela tokom moždane smrti nastavljaju se za vreme trajanja hladne i tople ishemije, a zatim i reperfuzije nakon uspostavljanja vaskularnih anastomoza alografta. Činjenica da je vreme hladne ishemije značajno kraće kod transplantacije od živog davaoca u odnosu na moždano umrlog još je jedan faktor koji doprinosi boljem kvalitetu organa od živog davaoca (129, 130). Proces u bubregu koji nastaju tokom prethodno pomenutog ishemijsko-reperfuzionog oštećenja klinički se manifestuju OFA. Za OFA je pokazano da ima negativne i kratkoročne i dugoročne posledice na funkciju alografta i da je povezana sa većom ušestalošću AO (123). U studiji koja je obuhvatila 2161 primaoca bubrega pokazano je da OFA skraćuje poluzivot alografta za tri do pet godina (131). Relativno mala učestalost ove komplikacije među našim bolesnicima od 25% svakako je jedan od faktora odgovornih za dugoročnu dobru funkciju alografta naših bolesnika. Identifikacija faktora rizika za nastanak OFA, kao što su faktori vezani za oštećenje organa tokom moždane smrti, perfuziju organa i biomarkeri OFA, doprinosi smanjenju učestalosti OFA, a sve u cilju poboljšanja dugoročnog ishoda transplantacije bubrega.

## 6. ZAKLJUČCI

MDR1 gen kodira sintezu P-glikoproteina koji je nosač za KNI i na taj način učestvuje u metabolizmu lekova koji predstavljaju osnov imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega. Varijabilnost polimorfizama ovog gena je visoka. Ispitivanje učestalosti SNPs i haplotipova MDR1 gena je pokazalo da:

1. Heterozigoti su bili najčešći za sva tri SNPs MDR1 gena.
2. Najmanju učestalost su imali varijant homozigoti.
3. Učestalosti genotipova SNPs ne odstupaju od očekivanih za polimorfizme G2677T/A i C3435T, ali značajno odstupaju za polimorfizma C1236T.
4. Dva najčešća haplotipa bili su CGC i TTT haplotipovi .

Znajući da KNI imaju uzak terapijski opseg, veliku interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost, ispitivali smo i uticaj SNPs i haplotipova MDR1 gena na farmakokinetiku KNI. Dobijeni rezultati su pokazali da:

1. Polimorfizmi MDR1 gena nisu imali značajan uticaj na doze CsA radi dostizanja ciljnog nivoa leka u krvi.
2. „Varijant homozigotima“ su bile potrebne najveće doze TAC da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi.
3. Pokazalo se da je polimorfizam G2677T/A jedini nezavisni prediktor doziranja TAC.
4. Bolesnicima sa diplotipom CTT/TTT bile su potrebne najveće doze TAC da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi.

Naši rezultati vezani za ispitivanje uticaja polimorfizama MDR1 gena na farmakodinamiku KNI pokazali su sledeće:

1. Polimorfizmi MDR1 gena nisu uticali na učestalost AO i OFA.
2. Polimorfizmi MDR1 nisu uticali na funkciju alografta kod bolesnika koji su primali TAC.

3. Najbolju funkciju alografta među bolesnicima koji su primali CsA imali su „divlji homozigoti“ za sva tri SNPs.

Iako KNI imaju mnogobrojne neželjene efekte, rezultati našeg ispitivanja su pokazali da polimorfizmi MDR1 gena nisu uticali na koncentraciju glukoze, kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola i aminotransferaza u serumu.

S druge strane, naši rezultati su pokazali mogući uticaj polimorfizama MDR1 gena na nastanak hipertrigliceridemije kod bolesnika koji su primali CsA jer su:

1. CC homozigoti za polimorfizam C1236T imali značajno niže vrednosti triglicerida u odnosu na heterozigote.
2. „Varijant homozigoti“ imali značajno niže vrednosti triglicerida u odnosu na heterozigote i „divlje homozigote“ za polimorfizme G2677T/A i C3435T.

Imajući u vidu značaj dugoročno normalne funkcije alografta, ispitivali smo i faktore koji utiču na nastanak insuficijencije alografta. Analiza preživljavanja pokazala je da je AO jedini značajan prediktor nastanka insuficijencije alografta.

## 7. LITERATURA

1. Danovitch M. G. Handbook of Kidney Transplantation, 5<sup>th</sup> edition. Wolters Kluwer 2010;1:1-19.
2. Murray JE. The First Successful Organ Transplant in Man. J Am Coll Surg. 2005;200:5-9.
3. 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;4:378-383.
4. Murray JE, Balankura O, Greenburg JB, Dammnin GJ. Reversibility of the kidney homograft reaction by retransplantation and drug therapy. Ann NY Acad Sci. 1962;99:768-848.
5. Malvezzi P, Rostaing L. The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. Expert Opin Drug Saf. 2015;14:1531-1577.
6. Thell K, Hellinger R, Schabbauer G, Gruber CW. Immunosuppressive peptides and their therapeutic applications. Drug Discov Today. 2014;19:645-698.
7. Grinyó JM, Petruzzelli S. Once-daily LCP-Tacro MeltDose tacrolimus for the prophylaxis of organ rejection in kidney and liver transplantations. Expert Rev Clin Immunol. 2014;10:1567-1579.
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Osnovna imunologija, četrto izdanje. Data Status. 2013;93-117.
9. Halloran PF, Kung L, Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. Transplant Proc. 1998;30:2167-2237.
10. Vanhove T, Annaert P, Kuypers R. J. D. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review. Drug Metabolism Reviews. 2016;10-37.
11. Picard N, Marquet P. The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2011;7:731-774.
12. Jusko WJ, Piekoszewski W, Klintmalm GB, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. Clin Pharmacol Ther. 1995;57:281-290.
13. Akagi H, Reynolds A, Hjelm M. Cyclosporin A and its metabolites, distribution in blood and tissues. J Int Med Res. 1991;19:1-18.

14. 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;49:141-216.
15. Cascorbi I. P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;201:261-283.
16. Ieiri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012;27:85-105.
17. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 1989;3:2583-2592.
18. Gottesman MM, Hrycyna CA, Germann UA, Pastan I. Genetic analysis of multidrug transporter. *Annu. Rev Genet.* 1995;29:607-649.
19. Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, Schrenk D, Lennernäs H. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol Pharm.* 2007;4:252-259.
20. Fruhwirth M, Fischer H, Simma B et al. Rotavirus infection as cause of tacrolimus elevation in solid-organtransplanted children. *Pediatr Transplant.* 2001;5:88-92.
21. Tsunashima D, Kawamura A, Murakami M, Sawamoto T, Undre N, Brown M, Groenewoud A, Keirns JJ, Holman J, Connor A, Wylde H, Wilding I, Ogawara K, Sako K, Higaki K, First R. Assessment of tacrolimus absorption from the human intestinal tract: Open-label, randomized, 4-way crossover study. *Clin Ther.* 2014;36:748-759.
22. Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, Dijkstra G, Roskams TA, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:710-720.
23. Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P4503A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. *Am J Transplant.* 2005;5:1383-1391.
24. Fricker G, Miller DS. Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacology.* 2004;70:169-176.

25. Zheng S, Easterling TR, Hays K, Umans JG, Miodovnik M, Clark S, Calamia JC, Thummel KE, Shen DD, Davis CL, Hebert MF. Tacrolimus placental transfer at delivery and neonatal exposure through breast milk. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76:988-996.
26. Bourget P, Fernandez H, Bismuth H, Papiernik E. Transplacental passage of cyclosporine after liver transplantation. *Transplantation*. 1990;49:663.
27. von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivistö KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:172-255.
28. Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275:1011-1018.
29. Meier-Kriesche HU, Ojo A, Hanson J, Cibrik D, Lake K, Agodoa LY, Leichtman A, Kaplan B. Increased immunosuppressive vulnerability in elderly renal transplant recipients. *Transplantation*. 2000;69:885-889.
30. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmöller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1108-1114.
31. Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A. PET studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1493-1503.
32. Bistrup C, Nielsen FT, Jeppesen UE, Dieperink H. Effect of grapefruit juice on Sandimmun Neoral absorption among stable renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:373-377.
33. Tsunoda SM, Harris RZ, Christians U, Velez RL, Freeman RB, Benet LZ, Warshaw A. Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:462-467.
34. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit*. 2008;30:143-150.

35. 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;22:32-42.
36. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Büchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C, Marquet P. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:422-455.
37. 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;14:147-201.
38. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27:383-474.
39. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, van Schaik RH. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem*. 2011;57:1574-1657.
40. Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, Bates S.E, Fojo T. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood*. 1998;91:1749-1756.
41. Wang D, Johnson AD, Papp AC et al. Multidrug resistance polypeptide 1(MDR1. ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:693-704.
42. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008;86:1206-1219.

43. Moscoso-Solorzano GT, Ortega F, Rodríguez I, García-Castro M, Gómez E, Díaz-Corte C, Baltar JM, Alvarez V, Ortiz A, Coto E. A search for cyclophilin-A gene variants in cyclosporine A-treated renal transplanted patients. *Clin Transplant*. 2008;22:722-731.
44. 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;12:1281-1372.
45. Coto E, Távira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation*. 2009;88:62-69.
46. Murray B, Hawes E, Lee RA, Watson R, Roederer MW. Genes and beans: pharmacogenomics of renal transplant. *Pharmacogenomics*. 2013;14:783-798.
47. 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;53:123-162.
48. Saracino A, Muscaridola H, Cifarelli RA, Stallone G, Grandaliano G, Santarsia G. Multidrug-Resistance 1 Gene Single-Nucleotide Polymorphisms Do Not Influence Long-Term Graft Survival After Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2014;46:2214-2219.
49. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, et al. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 2011;33-178.
50. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers DR, Pisarski P, Le Meur Y, Mamelok RD, van Gelder T. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:339-387.
51. McNally PG, Feehally J. Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant*. 1992;7:791-804.
52. Morales JM, Andres A, Rengel M, Rodicio JL. Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:121-124.



53. Jacobson PA, Schladt D, Israni A, Oetting WS, Lin YC, Leduc R, Guan W, Lamba V. Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium. *Transplantation*. 2012;93:624-655.
54. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen J, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349:931-940.
55. Isnard Bagnis C, Tezenas du Montcel S, Beaufils H, Jouanneau C, Jaudon MC, Maksud P, Mallet A, LeHoang P, Deray G. Long-term renal effects of low-dose cyclosporine in uveitis-treated patients: follow-up study. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2962-2968.
56. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:481-508.
57. Moore J, McKnight AJ, Döhler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, Briggs D, Ball S, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Opelz G, Borrows R. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1879-90.
58. First MR, Dhadda S, Croy R, Holman J, Fitzsimmons WE. New-onset diabetes after transplantation (NODAT): an evaluation of definitions in clinical trials. *Transplantation*. 2013;96:58-64.
59. Yates CJ, Furlanos S, Hjelmessaeth J, Colman PG, Cohnsey SJ. New-onset diabetes after kidney transplantation-changes and challenges. *Am J Transplant*. 2012;12:820-828.
60. Heit JJ. Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays*. 2007;29:1011-1021.
61. Numakura K, Satoh S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Kakinuma H, Matsuura S, Saito M, Tada H, Suzuki T, Habuchi T. Clinical and genetic risk factors for posttransplant diabetes mellitus in adult renal transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 2005;80:1419-24.
62. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDRI single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82:711-747.

63. Li JL, Wang XD, Chen SY, Liu LS, Fu Q, Chen X, Teng LC, Wang CX, Huang M. Effects of diltiazem on pharmacokinetics of tacrolimus in relation to CYP3A5 genotype status in renal recipients: from retrospective to prospective. *Pharmacogenomics J.* 2011;11:300-306.
64. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Fürstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med.* 2011;17:1304-1313.
65. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int.* 2000;13:313-339.
66. Kaczmarek I, Groetzner J, Meiser B, Mueller M, Landwehr P, Ueberfuhr P, Bruning R, Reichart B. Impairment of the blood-brain barrier can result in tacrolimus-induced reversible leucoencephalopathy following heart transplantation. *Clin Transplant.* 2003;17:469-541.
67. 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;74:571-579.
68. Yanagimachi M, Naruto T, Tanoshima R, Kato H, Yokosuka T, Kajiwara R, Fujii H, Tanaka F, Goto H, Yagihashi T, Kosaki K, Yokota S. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms on calcineurin inhibitor-related neurotoxicity after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant.* 2010;24:855-916.
69. Honig SM, Fu S, Mao X, Yopp A, Gunn MD, Randolph GJ, Bromberg JS. FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J Clin Invest.* 2003;111:627-637.
70. Su J, Xu H, Yang J, Yu Q, Yang S, Zhang J, Yao Q, Zhu Y, Luo Y, Ji L, Zheng Y, Yu J. ABCB1 C3435T polymorphism and the lipidlowering response in hypercholesterolemic patients on statins: a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease.* 2015;14:122.
71. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.10. Pregnancy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:50-55.

72. de Fijter JW. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl.* 2010;38-41.
73. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am. J. Transplant.* 2011;11:450-512.
74. Gourishankar S, Leduc R, Connett J, Cecka JM, Cosio F, Fieberg A, Gaston R, Halloran P, Hunsicker L, Kasiske B, Rush D, Grande J, Mannon R, Matas A. Pathological and clinical characterization of the 'troubled transplant': data from the DeKAF study. *Am J Transplant.* 2010;10:324-354.
75. Koo DH, Fuggle V. Impact of ischemia/reperfusion injury and early inflammatory responses in kidney transplantation. *Transplantation Reviews.* 2000;14:210-224.
76. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufrond 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;31:139-151.
77. 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;87:721-727.
78. van Gelder T, Hesselink DA. Dosing tacrolimus based on CYP3A5 genotype: will it improve clinical outcome? *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:640-641.
79. Shuker N, Bouamar R, van Schaik RH, Clahsen-van Groningen MC, Damman J, Baan CC, van de Wetering J, Rowshani AT, Weimar W, van Gelder T, Hesselink DA. A Randomized Controlled Trial Comparing the Efficacy of Cyp3a5 Genotype-Based With Body-Weight-Based Tacrolimus Dosing After Living Donor Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2016;16:2085-2181.
80. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, MacPhee IA. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006;82:705-708.

81. Gumus-Akay G, Rustemoglu A, Karadag A, Sunguroglu A. Genotype and allele frequencies of *MDR1* gene C1236T polymorphism in a Turkish population. *Genet Mol Res.* 2008;7:1193–1199.
82. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:169–174.
83. Milojkovic M, Stojnev S, Jovanovic I, Ljubisavljevic S, Stefanovic V, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T *MDR1* gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacol Rep.* 2011;63(3):808–822.
84. Kurzawski M, Pawlik A, Górnik W, Drożdżik. Frequency of common *MDR1* gene variants in a Polish population. *Pharmacol Rep.* 2006;58:35–40.
85. Cavaco I, Gil JP, Gil-Berglund E, Ribeiro V. *CYP3A4* and *MDR1* alleles in a Portuguese population. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:1345–1350.
86. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. *MDR1* pharmacogenetics. Frequency of the C3435T mutation in exon 26 significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics.* 2001;11:217–221.
87. Vicente J, Sinues B, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Martinez-Jarreta B. Polymorphisms of the *MDR1* gene in Central Americans and Spaniards. *Mol Biol Rep.* 2008;35:473–478.
88. Wang J, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Zheng H, Iacono A, McDade K, Zaldonis D, Webber S, Watanabe RM, Burckart GJ. Impact of *ABCB1* (*MDR1*) haplotypes on tacrolimus dosing in adult lung transplant patients who are *CYP3A5* \*3/\*3 non-expressors. *Transpl Immunol.* 2006;15(3):235-275.
89. 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):481-575.

90. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*. 2002;12:437-487.
91. Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, Sheng Y. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl*. 2006;12:775-780.
92. Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, Boyle G, Law Y, Miller S, Lamba J, Burckart GJ. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am. J. Transplant*. 2003;3:477-483.
93. Cheung CY, Op den Buijsch RA, Wong KM, Chan HW, Chau KF, Li CS, Leung KT, Kwan TH, de Vrie JE, Wijnen PA, van Dieijen-Visser MP, Bekers O. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCBI genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2006;7:563-574.
94. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2003;14:1889-1896.
95. Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J, Yan S, Zheng S, Zhou L. Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese live transplant recipients. *PLoS ONE*. 2011;6:e25933.
96. Jiang ZP, Wang YR, Xu P, Liu RR, Zhao XL, Chen FP. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;103:433-477.
97. Fanta S, Niemi M, Jönsson S, Karlsson MO, Holmberg C, Neuvonen PJ, Hoppu K, Backman JT. Pharmacogenetics of cyclosporine in children suggests an age-dependent influence of ABCB1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:77-90.
98. Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics*. 2003;13:89-95.
99. 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. Reduced exposure to

- calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357:2562-2575.
100. Koo EH, Jang HR, Lee JE, Park JB, Kim SJ, Kim DJ, Kim YG, Oh HY, Huh W. The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation. *Kidney Res Clin Pract.* 2015;160-164.
101. 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;16:659-724.
102. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005;14;37-42.
103. Irish WD, Ilsley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC: A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transplant* 2010;10:2279-2286.
104. Maier HT, Ashraf MI, Denecke C, Weiss S, Augustin F, Messner F, Vallant N, Böcklein M, Margreiter C, Göbel G, Pratschke J, Öfner-Velano D, Aigner F. Prediction of delayed graft function and long-term graft survival by serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin during the early postoperative phase after kidney transplantation. *PLoS ONE* 2018;13.
105. Naumovic R, Djukanovic L, Marinkovic J, Lezaic V. Effect of donor age on the outcome of living-related kidney transplantation. *Transpl Int.* 2005;18:1266-1340.
106. Oppenheimer F, Aljama P, Asensio Peinado C, Bustamante J, Crespo Albiach JF, Guirado Perich LG. The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19-30.
107. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 2000;356:147-199.
108. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:112-131.
109. Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2015;28:10-21.
110. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet* 2011;378:1419-1427.

111. Piotti G, Gandolfini I, Palmisano A, Maggiore U. Metabolic risk profile in kidney transplant candidates and recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;1-13.
112. Spoto B, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Pizzini P, Cutrupi S, D'Arrigo G, Tripepi G, Zoccali C, Mallamaci F. Resistin and all-cause and cardiovascular mortality: effect modification by adiponectin in end-stage kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28:181-187.
113. Fukunaga K, Nakagawa H, Ishikawa T, Kubo M, Mushiroda T. ABCB1 polymorphism is associated with atorvastatin-induced liver injury in Japanese population. *BMC Genet*. 2016;17:79.
114. Saracino A, Muscaridola N, Cifarelli RA, Stallone G, Grandaliano G, Santarsia G. Multidrug-resistance 1 gene single-nucleotide polymorphisms do not influence long-term graftsurvival after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46:2214-2223.
115. 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;26:3046-3096.
116. Hebert MF, Dowling AL, Gierwatowski C, Lin YS, Edwards KL, Davis CL, Marsh CL, Schuetz EG, Thummel KE. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics*. 2003;13:661-735.
117. Klauke B, Wirth A, Zittermann A, Bohms B, Tenderich G, Körfer R, Milting H. No association between single nucleotide polymorphisms and the development of nephrotoxicity after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:741-749.
118. Fernández-Fresnedo G, Plaza JJ, Sánchez-Plumed J, Sanz-Guajardo A, Palomar-Fontanet R, Arias M. Proteinuria: a new marker of long-term graft and patient survival in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004:47-51.
119. Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Guillaudeau A, Munteanu E, Essing M, Drouet M, Le Meur Y, Marquet P. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in

- a cohort of renaltransplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88:95-100.
120. Moore J, McKnight AJ, Döhler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, Briggs D, Ball S, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Opelz G, Borrows R. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:1891-1899.
  121. Shabana MF, Mishriki AA, Issac MS, Bakhoun SW. Do MDR1 and SLCO1B1 polymorphisms influence the therapeutic response to atorvastatin? A study on a cohort of Egyptian patients with hypercholesterolemia. *Mol Diagn Ther.* 2013;17:299-309.
  122. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG et al. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient management and pathogenesis. *Am J Transplant* 2007;7:512-517.
  123. Gondos A, Döhler B, Brenner H, Opelz G. Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes. *Transplantation.* 2013 Jan 27;95:267-341.
  124. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Boyle G, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant.* 2015;15:1-34.
  125. Mannon RB. Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron.* 2018;13:1-5.
  126. Kim SJ, Lee HH, Lee DS, Lee KW, Joh JW, Woo DH, Kwon GY, Oh HY, Kim YG, Huh WS, Kim DJ, Kim GS, Lee SK, Lee BB. Prognostic factors affecting graft and patient survival in cadaveric and living kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36:2038-2047.
  127. Phongsamran PV. Critical care pharmacy in donor management. *Prog Transplant.* 2004;14:105-116.
  128. Schnuelle P, Yard BA, Braun C, Dominguez-Fernandez E, Schaub M, Birck R, Sturm J, Post S, van der Woude FJ. Impact of donor dopamine on immediate graft function after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4:419-426.
  129. Watts RP, Thom O, Fraser JF. Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *J Transplant.* 2013;52:1369.



130. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC: Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 2011;11:2279-2296.
131. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, D'Alessandro AM, Odorico S, Kaufman DB, Fernandez LA. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single center analysis. *Clin Transplant* 2018;32:e13190.

## SPISAK SKRAĆENICA

MDR1 – multidrug resistance 1

KNI – kalcineurinski inhibitori

CYP3A – citohrom P450

AO – akutno odbacivanje

OFA – odložena funkcija alografta

SNPs – single nucleotide polymorphisms

TAC – takrolimus

CsA – ciklosporin A

FKBP – FK-506 vezujući protein

IL-2 – interleukin-2

IL-4 – interleukin-4

IFN-  $\gamma$  – interferon- $\gamma$

TNF-  $\alpha$  – faktor nekroze tumora- $\alpha$

P-gp – P-glikoprotein

ABC – ATP binding cassette membrane transporter

CNS – centralni nervni sistem

A – adenin

T – timin

G – guanin

C – citozin

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

NADPH – nikotinamidadenindinukleotid fosfat

IF/TA – intersticijalna fibroza i tubularna atrofija

HLA – humani leukocitni antigen

PRA – Panel Reactive Antibody

## BIOGRAFIJA

Milica Kravljača je rođena 30. 05. 1982. godine u Sarajevu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,03.

Od 2009. godine je zaposlena u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije.

Akademsku specijalizaciju iz nefrologije odbranila je 2013. godine, a specijalistički ispit iz Interne medicine položila 2017. godine.

Autor je i koautor više radova publikovanih u stranim i domaćim časopisima i prezentovanih na domaćim i inostranim kongresima. Dobitnik je prve nagrade Kongresa nefrologa Srbije i nagrade Američkog transplantacionog kongresa za poster prezentaciju među deset najboljih iz oblasti.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani: Milica Kravljača

broj upisa NF-05/12

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

**UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA NA METABOLIZAM KALCINEURINSKIH  
INHIBITORA I FUNKCIJU PRESAĐENOG BUBREGA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. 12. 2018.

Milica Kravljača

## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milica Kravljača

Broj upisa: NF-05/12

Studijski program: Nefrologija

Naslov rada: UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA NA METABOLIZAM  
KALCINEURINSKIH INHIBITORA I FUNKCIJU PRESAĐENOG BUBREGA

Mentor: prof. dr Radomir Naumović

Komentor: prof. dr Vera Pravica

Potpisani: Milica Kravljača

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. 12. 2018.



### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ POLIMORFIZAMA MDR1 GENA NA METABOLIZAM KALCINEURINSKIH INHIBITORA I FUNKCIJU PRESAĐENOG BUBREGA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. 12. 2018.

  
\_\_\_\_\_

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.