



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Ana A. Kundalić**

**FARMAKOKINETIČKA ISPITIVANJA  
MIKOFENOLNE KISELINE KOD  
PACIJENATA SA PRESADENIM BUBREGOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Ana A. Kundalić**

**PHARMACOKINETIC ANALYSIS OF  
MYCOPHENOLIC ACID IN RENAL  
TRANSPLANT RECIPIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

**Prof. dr Aleksandra Catić-Đorđević,**  
vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Naslov:

**Farmakokinetička ispitivanja mikofenolne kiseline kod pacijenata sa presađenim bubregom**

Rezime:

Mikofenolna kiselina (MPA) predstavlja sastavni deo većine imunosupresivnih protokola nakon presađivanja bubrega. Varijabilna farmakokinetika MPA i različit individualni odgovor pacijenta, naglašavaju potrebu za individualizacijom doznog režima leka. Ciljevi ovog istraživanja bili su razvoj i validacija metode za kvantitativnu analizu MPA, identifikacija faktora koji doprinose interindividualnoj varijabilnosti MPA, procena učestalosti i intenziteta neželjenih efekata MPA, ispitivanje povezanosti koncentracije leka u salivi ( $C_{SAL}$ ) sa ispoljenim neželjenim efektima, kao i povezanosti koncentracije MPA u plazmi i salivi u odnosu na nivo serumskog albumina kod pacijenata sa presađenim bubregom.

U istraživanju je ukupno učestvovalo 102 odrasla pacijenta sa presađenim bubregom. Koncentracije MPA u plazmi i salivi određivane su validiranom HPLC metodom i LC-MS. Za populacionu analizu korišćen je softver NONMEM®. Dobijeni model je dalje ispitivan pomoću Monte Carlo (MC) modelovanja. Podaci o neželjenim efektima prikupljeni su putem validiranog upitnika. Metodom najmanjih kvadrata uspostavljena je korelacija između koncentracija MPA u plazmi i salivi.

Populacionom farmakokinetičkom analizom identifikovani su starost pacijenata, dnevna doza MPA i primena nifedipina u terapiji kao značajni faktori varijabilnosti MPA klirensa. Primenom metode eksterne validacije potvrđena je validnost razvijenog populacionog modela, a zatim je model upoređivan MC metodom sa drugim modelima dostupnim u literaturi, čime je dodatno potvrđena njegova validnost. Kod pacijenata ženskog pola zabeležena je veća učestalost neželjenih efekata, sa statistički značajnom razlikom u pojavi gastrointestinalnih neželjenih efekata i promenama na koži. Vrednosti gastrointestinalnog skora bile su značajno veće kod pacijenata koji koriste MMF u odnosu na EC-MPS. Dodatno, ustanovljena je veza između  $C_{SAL}$  i estetskog skora kod pacijenata sa nižim koncentracijama albumina.

Dobijeni populacioni farmakokinetički model daje osnovu za individualizaciju terapije MPA kod pacijenata sa prisutnim faktorima

varijabilnosti. Prilikom optimizacije režima doziranja leka treba uzeti u obzir polne razlike u cilju postizanja efikasne i bezbedne imunosupresivne terapije kod pacijenata sa presađenim bubregom. Praćenje koncentracije MPA u salivi može doprineti bezbednosti terapije.

Naučna  
oblast:  
Naučna  
disciplina:

Farmaceutske nauke

Farmakokinetika i klinička farmacija

Ključne reči:

Mikofenolna kiselina, validacija analitičke metode, populaciona farmakokinetička analiza, neželjeni efekti, optimizacija terapije, Monte Carlo modelovanje, presađivanje bubrega

UDK:

615.015:616.61-089.84(043.3)

CERIF  
klasifikacija:

B 740

Tip licence  
kreativne  
zajednice:

**CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

**Prof. dr Aleksandra Catić-Dorđević,**  
Associate professor, Faculty of Medicine, University of Nis

Title:

**Pharmacokinetic Analysis of Mycophenolic Acid in Renal  
Transplant Recipients**

Abstract:

Mycophenolic acid (MPA) is frequently prescribed as a part of immunosuppressive protocols following kidney transplantation. Significant variability in MPA pharmacokinetics and the different individual response emphasize the need for individualized dosing regimens. The goals of this research were the development and validation of HPLC method for the quantitative analysis of MPA, the identification of factors that contribute to the interindividual variability of MPA, the assessment of the frequency and intensity of adverse effects, the examine association of the salivary concentration ( $C_{SAL}$ ) with the manifested adverse effects, as well as the association of the plasma and salivary concentration in relation to serum albumin levels in kidney transplant patients.

This research included 102 adult kidney transplant patients. Plasma and salivary MPA concentrations were determined by a validated HPLC method and LC-MS. The NONMEM® software was used for the population analysis. The obtained model was further investigated using Monte Carlo (MC) modeling. Adverse effects of the applied therapy were collected through a validated questionnaire. A correlation between plasma and salivary MPA concentrations was established using the least squares method.

Population pharmacokinetic analysis identified patient age, MPA daily dose, and nifedipine co-therapy as significant factors in the variability of MPA clearance. Using external validation method, the validity of the obtained population model was confirmed. Furthermore, the model was compared with similar models available in the literature using the MC method, which confirmed its validity. A higher frequency of adverse effects was recorded in female patients, with a statistically significant difference in the occurrence of gastrointestinal adverse effects and skin changes. Besides, gastrointestinal score was significantly higher in patients using MMF compared to EC-MPS. Additionally, a relationship was established between  $C_{SAL}$  and aesthetic score in patients with lower albumin levels.

The obtained population pharmacokinetic model provides a basis for individualized MPA dosing in patients with the presence of variability

factors. Gender differences should be taken into account when optimizing dosing regimens in order to achieve the efficacy and safety of immunosuppressive therapy in kidney transplant patients. The results showed that  $C_{SAL}$  MPA monitoring may contribute to management of adverse effects.

Scientific  
Field:

Pharmaceutical sciences

Scientific  
Discipline:

Pharmacokinetic and clinical pharmacy

Key Words:

Mycophenolic acid, analytical method validation, population pharmacokinetic analysis, adverse effects, therapy optimization, Monte Carlo modeling, kidney transplantation

UDC:

615.015:616.61-089.84(043.3)

CERIF  
Classification:

B 740

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

## **Zahvalnica**

*Najiskreniju zahvalnost dugujem timu vrhunskih stručnjaka koji su svojim ličnim zalaganjem i naučnim kompetencijama pomogli realizaciju ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Aleksandri Catić-Đorđević, na ukazanom poverenju, strpljenju i velikoj podršci koju mi je pružila tokom dugogodišnjeg zajedničkog rada, kao i tokom izrade ove disertacije. Njeni saveti i usmeravanja uvek su bili neiscrpan podsticaj u mom radu.*

*Prof. dr Radmili Veličković-Radovanović najtoplije zahvaljujem na prenetom znanju, podršci, kao i na korisnim sugestijama u fazi pisanja rada.*

*Prof. dr Tatjani Cvetković upućujem zahvalnost za nesebičnu pomoć, podršku i korisne savete tokom eksperimentalnog rada i biohemijskih analiza.*

*Zahvaljujem se prof. dr Branki Mitić i doc. dr Radiši Pavloviću na saradnji i učešću u oceni ove disertacije.*

*Prof. dr Slobodanu Jankoviću sa Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu zahvaljujem na pomoći oko populacione farmakokinetičke analize.*

*Prof. dr Ivanu Pavloviću sa Mašinskog fakulteta Univerziteta u Nišu zahvaljujem na velikoj pomoći u obradi i tumačenju rezultata dobijenih Monte Carlo analizom.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz Laboratorije za hromatografiju Naučno-istraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, posebno dr Slavoljubu Živanoviću, kao i svim tehničarima iz Biohemijske laboratorije Klinike za nefrologiju UKC Niš, na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom i laboratorijskom radu.*

*Prof. dr Nikoli Stefanoviću, prof. dr Ivani Damnjanović i svim kolegama i prijateljima sa Katedre Farmacija zahvaljujem na prijatnoj i konstruktivnoj radnoj atmosferi u kojoj je savladavanje svih prepreka bilo lakše.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici koja mi je svojom bezuslovnom ljubavlju i podrškom ulila samopouzdanje i dala mi krila.*

*Jasen i Sava su moj vetar u leđa, njihova ljubav sve čini mogućim i dostižnim.*

*Istraživanja u okviru doktorske disertacije su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru projekta III41018 do 2019. godine, 451-03-68/2020-14/200113 za 2020. godinu, 451-03-9/2021-14/200113 za 2021. godinu i 451-03-68/2022-14/200113 za 2022. godinu.*

*Autor*

## Lista skraćenica

ACE inhibitori	inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima
AcMPAG	acil-glukuronid
ALB	nivo serumskih albumina
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
AUC	površina ispod krive (engl. <i>area under the curve</i> )
AUC <sub>0-12</sub>	dvanaestočasovna AUC
BCRP	protein rezistencije raka dojke (engl. <i>breast cancer resistance protein</i> )
C <sub>0</sub>	minimalna plazma koncentracija MPA (engl. <i>Trough</i> )
CL/F	oralni klirens leka
CL <sub>CR</sub>	klirens kreatinina
C <sub>max</sub>	maksimalna plazma koncentracija
CNI	kalcineurinski inhibitori
CNS	centralni nervni sistem
C <sub>P</sub>	plazma koncentracija MPA
CsA	ciklosporin
C <sub>SAL</sub>	koncentracija MPA u salivi
DD	dnevna doza MPA
dGTP	deoksiguanozin trifostat
DM	šećerna bolest ( <i>diabetes mellitus</i> )
DSA	donor specifična antitela (engl. <i>donor-specific antibodies</i> )
DV	izmerena koncentracija MPA
EC-MPS	natrijumova so MPA (engl. <i>enteric-coated mycophenolate sodium</i> )
EDTA	etilendiamino tetrasirćetna kiselina
eGFR	glomerularna filtracija (engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i> )
EHC	enterohepatična cirkulacija



EMA	Evropska agencije za lekove
EST	estetski
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
GCP	dobra klinička praksa (engl. <i>Good Clinical Practice</i> )
GIT	gastrointestinalni trakt
GLP	dobra laboratorijska praksa (engl. <i>Good Laboratory Practice</i> )
GMP	guanozin monofosfat
GTP	guanozin trifosfat
HDL	lipoproteini velike gustine (engl. <i>high density lipoprotein</i> )
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HQC	engl. <i>high quality control</i>
ICH	engl. <i>International Conference of Harmonisation</i>
IL	interleukin
IMP	inozin monofosfat
IMPDH	inozin monofosfat dehidrogenaza
IPP	inhibitori protonske pumpe
IPRED	individualna predviđena koncentracija MPA za datog pacijenta
IS	interni standard
KDIGO	engl. <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
$K_{res}$	konstanta brzine resorpcije
LC-MS	kombinacija tečnog hromatografa i masenog spektrometra
LLOQ	limit kvantifikacije (engl. <i>lower limit of quantitation</i> )
LOD	limit detekcije (engl. <i>limit of detection</i> )
LQC	engl. <i>low quality control</i>
MMF	mikofenolat mofetil
MPA	mikofenolna kiselina (engl. <i>mycophenolic acid</i> )
MPAG	fenil- $\beta$ -D-glukuronid MPA
MPE	srednja greška predviđanja (engl. <i>mean prediction error</i> )

MQC	engl. <i>medium quality control</i>
MRP2	protein povezan sa rezistencijom na veći broj lekova 2 (engl. <i>multidrug resistance-associated protein 2</i> )
NIF	nifedipin
NO	azot monoksid
NONMEM	nelinearno modelovanje kombinovanih efekata (engl. <i>NONlinear Mixed Effects Modelling</i> )
NSAIL	nesteroidni antiinflamatorni lekovi
OATP	organski anjonski transportni polipeptidi (engl. <i>organic anion-transporting polypeptide</i> )
OFV	objektivna vrednost funkcije (engl. <i>objective function value</i> )
OME	omeprazol
PP	propil paraben
PRED	predviđena koncentracija MPA
PRPP	5 fosforibozil-1-pirofosfat
QC	kontrola kvaliteta (engl. <i>quality control</i> )
R	engl. <i>recovery</i>
RMSE	rezidualna srednja greška predviđanja (engl. <i>root mean squared error</i> )
RSD	relativna standardna devijacija
Scr	nivo serumskog kreatinina
SD	standardna devijacija
SE	standardna greška (engl. <i>standard error</i> )
$t_{1/2}$	poluvreme eliminacije
TAC	takrolimus
TDM	terapijski monitoring (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i> )
$t_{lag}$	vreme odlaganja (engl. <i>lag time</i> )
TM	telesna masa
$t_R$	vreme zadržavanja (engl. <i>retention time</i> )
UGT	uridin difosfat glukuronil transferaza

Vd	volumen distribucije
Vd/F	oralni volumen distribucije
VSS/F	oralni volumen distribucije u stanju ravnoteže
WRES	rezidualna varijabilnost između predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija MPA
XMP	ksantozin monofosfat
$\theta_1$	tipična, populaciona vrednost klirensa

## Objavljeni i saopšteni rezultati

### Radovi u časopisima međunarodnog značaja:

- Catić-Đorđević A, Stefanović N, Pavlović I, Pavlović D, Živanović S, **Kundalić A**, Veličković-Radovanović R, Mitić B. Utility of salivary mycophenolic acid concentration monitoring: Modeling and Monte Carlo validation approach. *Pharmacol Res Perspect* 2022; 10(6): e01034.
- Catić-Đorđević A, Pavlović I, **Spasić A**, Stefanović N, Pavlović D, Damnjanović I, Mitić B, Veličković-Radovanović R. Assessment of pharmacokinetic mycophenolic acid clearance models using Monte Carlo numerical analysis. *Xenobiotica* 2021; 51(4): 387-93.
- **Spasić A**, Catić-Đorđević A, Veličković-Radovanović R, Stefanović N, Džodić P, Cvetković T. Adverse effects of mycophenolic acid in renal transplant recipients: gender differences. *Int J Clin Pharm* 2019; 41(3): 776-84.
- Veličković-Radovanović R, Janković M, Milovanović J, Catić-Đorđević A, **Spasić A**, Stefanović N, Džodić P, Šmelcerović A, Cvetković T. Variability of mycophenolic acid elimination in the renal transplant recipients-population pharmacokinetic approach. *Renal Failure* 2015; 37(4): 652-58.

### Рад у националном часопису:

- Džodić P, Veličković-Radovanović R, Šmelcerović A, Catić-Đorđević A, Stefanović N, **Spasić A**, Ilić D, Živanović S, Ilijev I. Validation of HPLC method for the determination of mycophenolic acid in human plasma obtained from renal transplant recipients. *Acta Medica Medianae* 2016; 55(4): 28-36.

### Saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima:

- **Kundalić A**, Stefanović N, Živanović S, Veličković-Radovanović R, Catić-Đorđević A. Saliva as an alternative biological fluid for therapeutic drug monitoring of mycophenolic

acid in renal transplant recipients. VIII Congress of Pharmacists of Serbia with international participation, Arhiv za farmaciju 2022; 72(4): S436-S437.

- **Kundalić A**, Stefanović N, Veličković-Radovanović R, Catić-Đorđević A. Adverse effects of immunosuppressive drugs in renal transplant recipients. Prvi Kongres PharmaNaissa, Acta Medica Medianae 2022; 61(3): 79-80.
- Catić-Đorđević A, Veličković-Radovanović R, **Spasić A**, Mitić B, Paunović G, Damnjanović I. Gender-related differences in gastrointestinal adverse effects after mycophenolic acid therapy in renal transplant recipients. 14th Serbian congress of farmacologists and 4th Serbian congress of clinical pharmacology with international participation, 18-21 September 2019, Novi Sad: 82-83.
- Veličković Radovanović R, Catić-Đorđević A, Stefanović N, Mitić B, Paunović G, **Spasić A**, Džodić P, Cvetković T. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in patients with transplanted kidney. 14th Serbian congress of farmacologists and 4th Serbian congress of clinical pharmacology with international participation, 18-21 September 2019, Novi Sad: 106-107.
- **Spasić A**, Catić-Đorđević A, Stefanović N, Veličković-Radovanović R. The influence of mycophenolic acid formulation on the adverse effects in renal transplant recipients. VII Serbian Congress of Pharmacy with international participation, Arhiv za farmaciju 2018; 68(3): 658-659.
- **Spasić A**, Veličković-Radovanović R, Catić-Đorđević A, Stefanović N, Cvetković T. Effect of mycophenolate mofetil on the hematopoietic system in renal transplant recipients. 75th FIP Centennial Congress, 30 September - 3 October 2015, Düsseldorf.
- **Spasić A**, Veličković-Radovanović R, Stefanović N, Janković M, Milovanović J, Catić-Đorđević A, Džodić P. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. 18th International research conference: Fundamental sciences and clinical medicine – man and health, 18 April 2015, Sankt-Peterburg: 638-639.

# Sadržaj

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Opšti deo .....</b>	<b>4</b>
2.1. Mikofenolna kiselina .....	4
2.1.1. Mehanizam dejstva .....	5
2.1.2. Farmakokinetika mikofenolne kiseline .....	7
2.1.3. Faktori koji utiču na farmakokinetiku mikofenolne kiseline .....	11
2.1.4. Terapijski monitoring mikofenolne kiseline .....	16
2.1.5. Bezbednosni profil mikofenolne kiseline.....	17
2.2. Farmakokinetička analiza .....	19
2.2.1. Populaciona farmakokinetička analiza.....	20
2.2.2. Građenje populacionog modela-pristup NONMEM.....	21
2.2.3. Validacija populacionog modela.....	24
<b>3. Hipoteze .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Ciljevi .....</b>	<b>26</b>
<b>5. Pacijenti i metode.....</b>	<b>27</b>
5.1. Protokol ispitivanja .....	27
5.2. Pacijenti.....	28
5.3. Metode .....	30
5.3.1. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi .....	30
5.3.2. Validacija HPLC metode za kvantitativnu MPA analizu.....	31
5.3.3. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u salivi .....	33
5.3.4. Populaciona farmakokinetička analiza.....	34
5.3.5. Monte Carlo simulacija.....	35
5.3.6. Neželjeni efekti .....	37
5.3.7. Matematičko modelovanje (Regresiona analiza).....	38
5.3.8. Statistička obrada podataka.....	39
<b>6. Rezultati.....</b>	<b>40</b>
6.1. Razvoj HPLC metode .....	40
6.2. Validacija HPLC metode .....	44
6.2.1. Ispitivanje selektivnosti HPLC metode.....	44
6.2.2. Ispitivanje linearnosti metode .....	45

6.2.3. Ispitivanje tačnosti i preciznosti metode .....	47
6.2.4. Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije.....	48
6.2.5. Ispitivanje stabilnosti .....	49
6.3. Rezultati populacione farmakokinetičke analize mikofenolne kiseline kod pacijenata sa presađenim bubregom .....	52
6.3.1. Monte Carlo simulacija.....	58
6.4. Procena neželjenih efekata.....	63
6.5. Značaj praćenja koncentracije mikofenolne kiseline u salivi .....	69
<b>7. Diskusija .....</b>	<b>75</b>
7.1. Razvoj HPLC metode .....	76
7.2. Validacija HPLC metode .....	78
7.3. Populaciona farmakokinetička analiza mikofenolne kiseline kod pacijenata sa presađenim bubregom .....	80
7.4. Validacija populacionog modela primenom Monte Carlo simulacije.....	86
7.5. Procena neželjenih efekata.....	87
7.6. Značaj praćenja koncentracije mikofenolne kiseline u salivi .....	91
<b>8. Zaključak.....</b>	<b>95</b>
<b>9. Literatura.....</b>	<b>97</b>
<b>Prilog 1 – Upitnik o neželjenim dejstvima .....</b>	<b>140</b>
<b>Prilog 2 – Saglasnost za primenu upitnika.....</b>	<b>143</b>

# 1. Uvod

Presadivanje bubrega je složena medicinska intervencija koja zahteva precizno određen farmakoterapijski tretman. Iako predstavlja najbolju terapiju za pacijente u terminalnoj fazi bubrežne insuficijencije, uspostavljanje i održanje normalne funkcije presađenog bubrega u direktnoj je vezi sa izborom imunosupresivnog protokola, koji treba da obezbedi adekvatnu imunsku toleranciju organizma na presađeni organ (1).

Imunosupresivni lekovi treba da omoguće funkciju grafta, odnosno onemoguće reakciju odbacivanja, istovremeno ne ugrožavajući imunitet pacijenta, neophodan za odbranu organizma od mogućeg nastanka infekcija. Zbog specifične i veoma osetljive ravnoteže koju je potrebno uspostaviti između imunskog odgovora i imunske tolerancije, populacija pacijenata sa presađenim bubregom smatra se veoma vulnerabilnom, a ordiniranje imunosupresivne farmakoterapije kod transplantiranih pacijenata predstavlja veliki izazov za lekare i farmaceute (2). Odgovarajući izbor lekova i optimizacija terapijskog režima u skladu sa karakteristikama pacijenta su esencijalni faktori održanja funkcije presađenog bubrega kao željenog zdravstvenog ishoda.

Pri izboru imunosupresivnog leka neophodno je voditi računa o karakteristikama leka, mogućnostima primene, farmakokinetičkim karakteristikama leka, ali i o interakcijskom potencijalu, odnosno uticaju na ostalu terapiju i postojeće komorbiditete pacijenta (3). Karakteristike optimalnog imunosupresivnog leka opisao je Menon i sar. koristeći takozvano „pravilo 3S“ (4). Prema navođenju Menon i sar. neophodno je da lek pokazuje **selektivnost** ka T i B-ćelijama (što podrazumeva da ne ostvaruje efekat na ostale imunske ćelije). Izabrani imunosupresiv treba da ostvaruje efekat u **sinergizmu** sa ostalim lekovima koji čine imunosupresivni protokol. Takođe, neophodno je da lek ne poremeti **specifičnu toleranciju** organizma na antigene koji se nalaze u graftu (4). Vrlo je teško u kliničkoj praksi očekivati ispunjenje svih uslova u potpunosti, zbog čega su imunosupresivni protokoli sastavljeni od većeg broja lekova različitih farmakodinamičkih efekata, obezbeđujući optimalan odnos rizika i efikasnosti sprovedene terapije. Individualni pristup predstavlja neophodnost u procesu izbora



lekova, postavljanja doznog režima i sprovođenja terapije, zbog čega je značajna uloga farmaceuta u multidisciplinarnom timu koji zbrinjava transplantirane pacijente.

Osnovni mehanizam kojim imunosupresivni lekovi ostvaruju svoj efekat je smanjenje proliferacije limfocita tokom indukcione faze imunskog odgovora (5, 6). Prema mestu delovanja u procesu aktivacije T-limfocita moguća je podela na:

- inhibitore stvaranja i/ili dejstva interleukina-2 (IL-2) (princip mehanizma delovanja kalcineurinskih inhibitora od kojih su kod nas najčešće primenjivani ciklosporin (CsA) i takrolimus (TAC));
- inhibitore ekspresije gena za citokine, koji sprečavaju indukciju IL-1 i IL-6 u makrofagima, blokiraju produkciju IL-2 i IL-3 (princip dejstva kortikosteroida, od kojih se u praksi nakon transplantacije upotrebljavaju prednizon (PRE) i metilprednizolon);
- inhibitore sinteze purina i pirimidina (antiproliferativni lekovi – azatioprin, mikofenolna kiselina);
- inhibitore transdukcije signala u imunskoj reakciji (m-TOR inhibitori, od kojih su najpoznatiji sirolimus i everolimus).

Pored konvencionalnih lekova, savremena farmakoterapija uvela je biološke lekove u imunosupresivne protokole (7, 8). Monoklonska antitela koja se najčešće koriste predstavljaju lekove koji se vezuju za molekule na površini T ćelija koji su uključeni u proces prenosa signala, blokirajući transmisiju i stvaranje imunskih ćelija. Baziliksimumab je monoklono antitelo koje se koristi prvog i četvrtog dana nakon operacije presađivanja bubrega, kao deo standardnog protokola u našoj kliničkoj praksi (9).

U cilju postizanja optimalne imunosupresije odabir lekova za datog pacijenta podrazumeva individualni pristup koji uzima u obzir karakteristike transplantiranog organa, karakteristike pacijenta i vreme proteklo od transplantacije.

Sprovođenje farmakoterapije kod transplantiranih pacijenata predstavlja dinamičan i zahtevan proces kliničkog i biohemijskog monitoringa pacijenta uz kontinuirano prilagođavanje doza pojedinačnih lekova u protokolu u skladu sa odgovorom pacijenta. Interdisciplinarnim timom rukovodi nefrolog koji odluku o modifikaciji režima doziranja donosi sa ciljem održanja

presadenog organa uz očuvanje zadovoljavajućeg kvaliteta života pacijenta. Farmaceutska zdravstvena zaštita osetljive populacije transplantiranih pacijenata je deo ukupnog doživotnog lečenja, edukacije pacijenta, očuvanja adherentnosti, identifikacije i rešavanja problema vezanih za terapiju (1, 10).

Mikofenolna kiselina (MPA – engl. *mycophenolic acid*) je imunosupresivni lek koji se veoma često nalazi u protokolu za pacijente sa presađenim bubregom. Osnovna prednost MPA je relativno niska toksičnost. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da mikofenolna kiselina omogućava smanjenje doza kalcineurinskih inhibitora (CNI) i kortikosteroida uz zadržavanje efikasnosti imunosupresije. Pored toga, njeno prisustvo u terapiji smanjuje učestalost reakcije ranog odbacivanja grafta (11-13). Najčešće neželjene reakcije pri primeni mikofenolne kiseline su gastrointestinalne komplikacije. Niska toksičnost je bila razlog za primenu uobičajenih fiksnih doza MPA, bez uključivanja terapijskog monitoringa. Ipak, tokom dugogodišnjeg iskustva primene MPA, zapaženi su neočekivani odgovori na preporučene dozne režime, što je navelo na potrebu istraživanja varijabilnosti u farmakokinetici i farmakodinamici leka (14). Kod vulnerabilnih transplantiranih pacijenata racionalno sprovođenje terapije podrazumeva identifikaciju i kvantifikaciju faktora koji mogu da utiču na pojedine farmakokinetičke parametre MPA, kao i na pojavu i intenzitet neželjenih efekata. Literaturno dostupni podaci ukazuju na direktnu povezanost koncentracije MPA sa dužinom preživljavanja grafta, odnosno pojave znakova odbacivanja grafta, što opravdava kompleksan farmakokinetički pristup primeni MPA (15-17).

## 2. Opšti deo

### 2.1. Mikofenolna kiselina

Mikofenolna kiselina predstavlja proizvod fermentacije odabranih vrsta gljivica iz roda *Penicilium* – *Penicillium stoloniferum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium viridicatum* i drugih (18). Na osnovu prvih istraživanja sprovedenih sredinom prošlog veka, ustanovljeno je anitimikrobno dejstvo MPA. Ekspanzija upotrebe MPA nastala je kada su naučna istraživanja, pored antibakterijskog i antigljivičnog delovanja potvrdila antivirusno i imunosupresivno dejstvo, trideset godina od pronalaženja leka (19). Moderni imunosupresivni protokoli koji omogućavaju uspeh presađivanja organa, veoma često uključuju i MPA. Za pacijente podvrgnute presađivanju bubrega imunosupresija se praktično odvija u tri faze. U preoperativnoj pripremi pacijenta uključuju se visoke doze metilprednizolona, koji se nakon operacije zamenjuje prednizonom (20). Na dan transplantacije pacijentu se uključuje i monoklonalno antitelo koje treba da obezbedi imunotoleranciju vezivanjem za CD25 na membrani T-limfocita, što je sastavni deo primenjenog protokola. Nakon transplantacije uvodi se imunosupresivni protokol rane posttransplantacione faze koji podrazumeva primenu imunosupresiva iz grupe kalcineurinskih inhibitora ili mTOR inhibitora i MPA uz korekciju doze kortikosteroida. U ranom posttransplantacionom periodu, u najvećem broju slučajeva četvrtog dana nakon transplantacije, uvodi se druga doza monoklonalnog antitela (3, 6, 21).

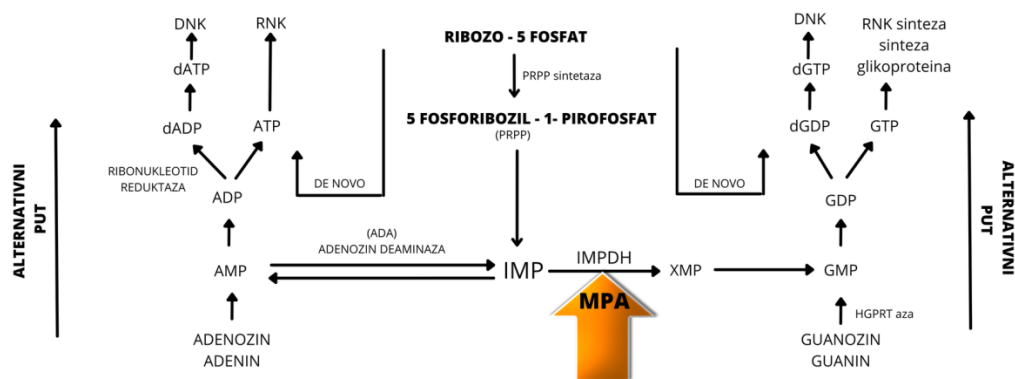
Mikofenolna kiselina se pored glavne indikacije (imunosupresivni protokol nakon presađivanja organa) primenjuje i van indikacijskog područja (engl. *off label*) (22). Mikofenolna kiselina daje pozitivne efekte u tretmanu većeg broja autoimunih bolesti (lupusa, reumatoidnog artritisa, multiple skleroze, idiopatske trombocitopenijske purpure), kod dermatoloških oboljenja (ekcem, psorijaza) i oboljenja krvnih sudova (23-28). Koristi se u adultnoj i pedijatrijskoj populaciji, najčešće u kombinaciji sa drugim imunosupresivnim lekovima, ali i kao monoterapija (16, 29-31).

Poslednjih decenija često se daje prednost MPA nad azatioprinom kao antiproliferativnim lekom koji je duže u primeni i koji se smatra farmakoekonomski opravdanim izborom. Osnovni razlog je dokazani niži nivo rizika pri primeni MPA i manja stopa akutnog odbacivanja grafta (32-34).

Imunosupresivni protokoli sa MPA omogućavaju optimalnu funkciju presađenog organa i bolji kvalitet života transplantiranih pacijenata (35). Savremeni farmakoterapijski menadžment podrazumeva sprovođenje efikasne i bezbedne terapije, uz održavanje farmakoekonomske isplativosti terapije i zadovoljavajući kvalitet života pacijenta.

### 2.1.1. Mehanizam dejstva

Farmakodinamički efekat MPA zasniva se na specifičnoj inhibiciji proliferacije T i B limfocita (36). Iako se sinteza purinskih baza može odvijati *de novo* i alternativnim putem (Slika 1), sinteza T- i B-limfocita je selektivno zavisna od *de novo* puta sinteze purina. Prvi korak u ovoj sintezi podrazumeva konverziju ribozo-5 fosfata u 5 fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP) koji se zatim transformiše u inozin monofosfat (IMP). Pod dejstvom enzima inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), IMP se preko ksantozin monofosfata (XMP) prevodi u guanozin monofosfat (GMP). Daljom konverzijom nastaju guanozin trifosfat (GTP) i deoksiguanozin trifosfat (dGTP) koji su neophodni za sintezu DNK i RNK molekula.



**Slika 1.** Mehanizam dejstva MPA

AMP – adenozin monofosfat; ADP – adenozin difosfat; ATP – adenozin trifosfat; dGTP –deoksiguanozin trifosfat; dGDP –deoksiguanozin difosfat; GMP – guanozin monofosfat; GDP – guanozin difosfat; GTP – guanozin trifosfat; IMP – inozin monofosfat; IMPDH – inozin monofosfat dehidrogenaza; MPA – mikofenolna kiselina; XMP – ksantozin monofosfat.

U organizmu se MPA vezuje za IMPDH, vršeci reverzibilnu, nekompetitivnu inhibiciju enzima. Na taj način, sprečena je sinteza DNK i RNK limfocita, što ometa njihovu proliferaciju i umanjuje reakciju organizma na prisustvo antigena, omogućavajući opstanak grafta. Pored direktnog uticaja na smanjeno stvaranje antitela, redukcijom GTP dolazi do smanjene ekspresije adhezivnih molekula koji su odgovorni za migraciju limfocita i monocita ka mestu inflamacije, čime MPA povećava **specifičnu imunotoleraciju** organizma (37, 38).

Mikofenolna kiselina primarno inhibira IMPDH tip II koji dominira u aktivisanim limfocitima, što rezultira snažnijim citostatičkim efektima na limfocite u odnosu na druge ćelije. Pored toga, činjenica da limfociti ne mogu koristiti alternativni put sinteze purina kao sve druge ćelije, objašnjava **selektivnost dejstva** MPA (39).

Zbog **sinergističkog delovanja** MPA i CNI, omogućeno je smanjenje doze i toksičnosti CNI bez kompromitovanja efikasnosti. Smanjenje učestalosti i intenziteta neželjenih efekata doprinosi boljem kvalitetu života transplantiranih pacijenata. (40, 41). Na taj način MPA ispunjava „pravilo 3S“ (4).

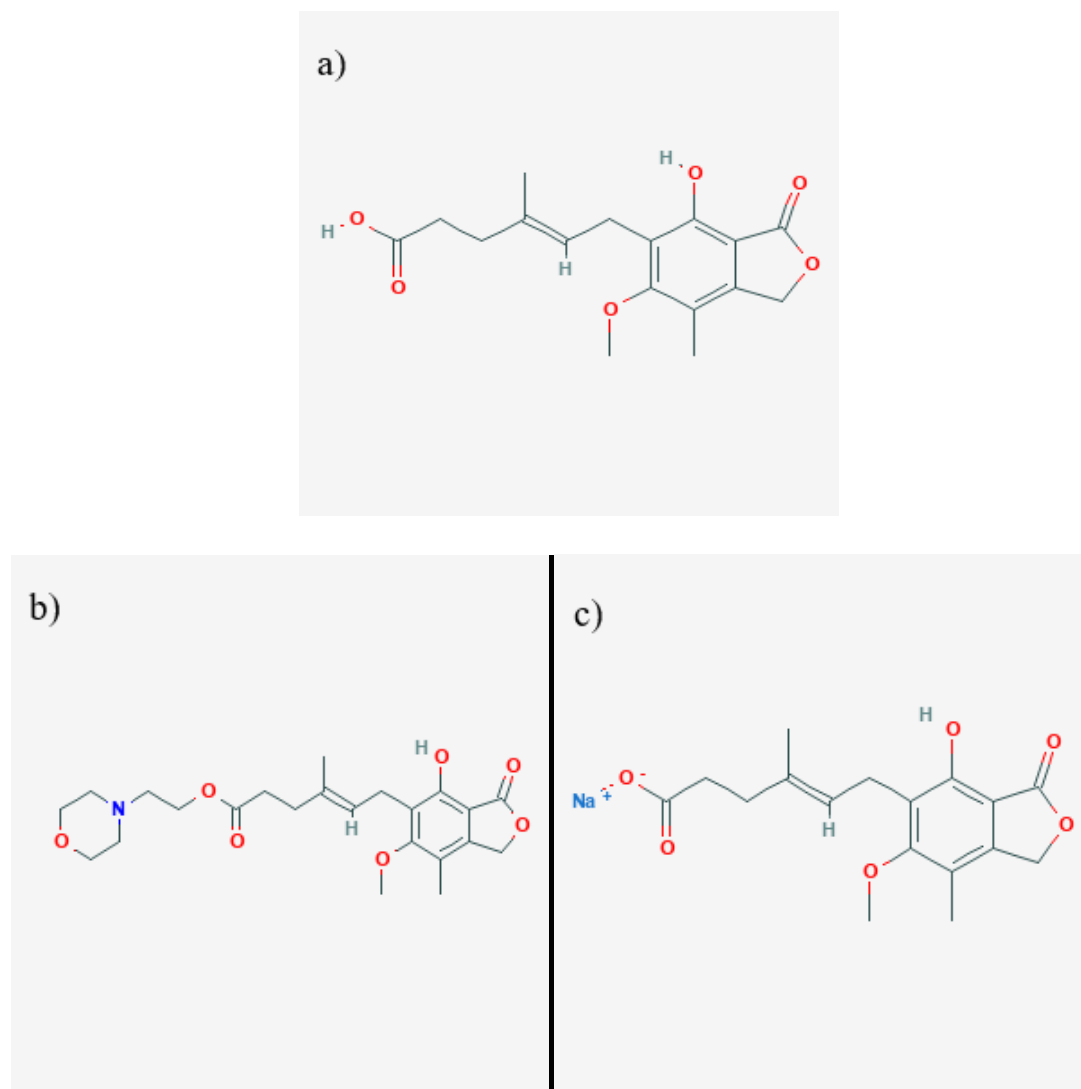
Najveći izazov u transplantaciji predstavlja preživljavanje grafta. Epizode odbacivanja ili disfunkcije presađenog bubrega mogu da se jave u ranom posttransplantacionom periodu (nekoliko dana do tri meseca nakon transplantacije). U tom slučaju, reč je o akutnoj reakciji odbacivanja koja je najčešće posledica primarne aktivacije T-limfocita. Nasuprot tome, hronično odbacivanje karakteriše spor, progresivan razvoj disfunkcije presađenog bubrega u toku nekoliko meseci ili godina. Odlikuje se vaskulopatijom, intersticijskom fibrozom i suženjem krvnih sudova (42). Hronično odbacivanje može biti uzrokovano toksičnim efektima primenjenih lekova, infekcijom i vaskularnim komplikacijama. Aktivirani makrofagi proizvode azot monoksid (NO) i superoksid anjon radikal formirajući peroksinitrit radikal, što doprinosi disfunkciji vaskularnog endotela i razvoju ateroskleroze koja predstavlja vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod transplantiranih pacijenata (43, 44).

U reakciji akutnog odbacivanja grafta presudno je antiproliferativno dejstvo MPA i smanjena ekspresija adhezivnih molekula, čime se odlaže početak i progresija ateroskleroze grafta. Pored toga, MPA dovodi do supresije produkcije antitela, smanjene oksidacije lipoproteina velike gustine (HDL – engl. *high density lipoprotein*) i inhibicije proliferacije

glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova čime se sprečava reakcija hroničnog odbacivanja. Takođe, MPA smanjuje sintezu NO koji proizvode aktivirani makrofagi, ne utičući na sintezu NO u endotelnim ćelijama, čime ispoljava antiinflamatornu aktivnost i prevenira akutno i hronično odbacivanja grafta (45, 46).

### 2.1.2. Farmakokinetika mikofenolne kiseline

U farmaceutskim preparatima dostupnim na našem tržištu MPA se nalazi u obliku estra – mikofenolat mofetila (MMF, Cellcept®, Roche Pharma) i natrijumove soli MPA (EC-MPS, Myfortic®, Novartis). Hemijske formule MPA, MMF i EC-MPS prikazane su na **Slici 2**.



**Slika 2.** Hemijske formule MPA (a), MMF (b), EC-MPS (c)

MMF – mikofenolat mofetil; MPA – mikofenolna kiselina; EC-MPS – natrijumova so MPA

Mikofenolat mofetil je dostupan u obliku kapsula (250mg), film tableta (500mg), oralne suspenzije (200mg/mL) i praška za infuzioni rastvor (500mg), dok se EC-MPS može naći u obliku enterosolventnih tableta jačine 180 i 360mg. Istraživanja su pokazala da je doza MMF od 1000mg ekvivalentna dozi EC-MPS od 720mg (47, 48). Poređenje doza postiže se množenjem doze MMF faktorom konverzije 0,72. U literaturi je dostupan veći broj komparativnih studija sa ciljem procene efikasnosti i bezbednosti ova dva oblika leka. Rezultati istraživanja sprovedenih u periodu od 2004. do 2007. godine nisu ukazali na postojanje značajne razlike u sistemske izloženosti MPA pri primeni ekvivalentnih doza MMF i EC-MPS (49-52). Sličnost u izloženosti organizma leku potvrđena je u narednom periodu odsustvom statistički značajne razlike u efikasnosti ova dva oblika, neželjenim efektima, kao i učestalosti reakcije odbacivanja (53-55). Osnovna razlika između ova dva oblika leka odnosi se na proces resorpcije, dok su, terapijski gledano, MMF i EC-MPS ekvivalentni, sa faktorom konverzije 0,72 (55-59).

#### **2.1.2.1. Resorpcija**

Peroralni preparati mikofenolne kiseline podležu brzom i kompletnom resorpciji, nakon čega se oslobađa aktivan oblik leka (60). Maksimalne koncentracije ( $C_{max}$ ) MPA u plazmi postižu se 0,5–1h ( $t_{max}$ ) nakon primene MMF (60-62). Biološka raspoloživost MMF, nakon per os primene iznosi 94% (63-65).

Resorpcija EC-MPS iz enterosolventnih tableta odvija se nešto sporije u odnosu na MMF, zbog čega je vreme za postizanje maksimalne koncentracije MPA produženo (49, 66, 67). Maksimalne vrednosti plazma koncentracija MPA postižu se 2–3h nakon primene leka, u skladu sa dužim vremenom odlaganja ( $t_{lag}$  – engl. *lag time*) (56, 57, 62, 68). Biološka raspoloživost EC-MPS kod pacijenata sa stabilnom funkcijom grafta nakon presađivanja bubrega iznosi 72% (69, 70).

#### **2.1.2.2. Distribucija**

Distribuciju MPA karakteriše centralni i periferni prostor, zbog čega se opisuje dvoprostornim farmakokinetičkim modelom. Prosečna vrednost volumena distribucije ( $V_d$ ) MPA kod pacijenata uvedenih u ravnotežno stanje iznosi  $54 \pm 25L$  (71, 72). U sistemske cirkulaciji mikofenolna kiselina pokazuje visok afinitet vezivanja za plazmatske albumine (97–

99%) (73-75). Zbog visokog stepena vezivanja za albumin postoji povećani rizik interakcije sa lekovima koji pokazuju afinitet vezivanja za albumin, posebno u situacijama kada je kod pacijenata prisutna prateća hipoalbuminemija.

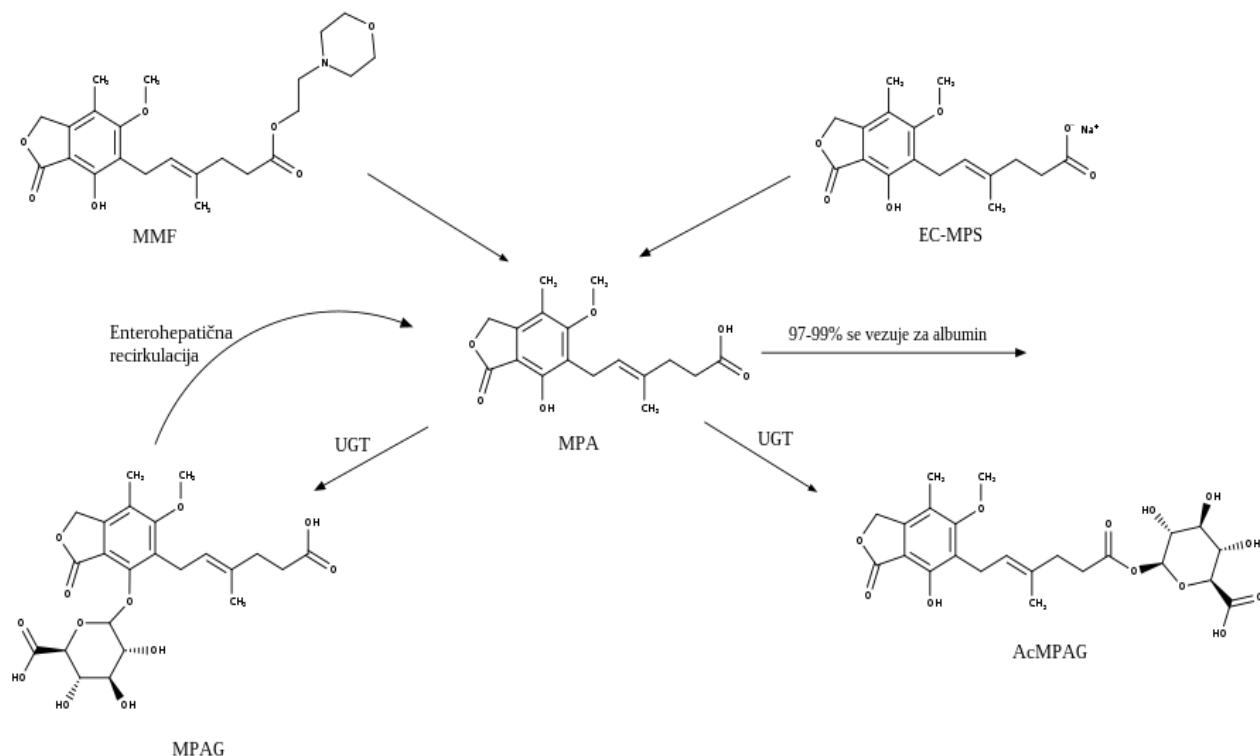
Koncentracija slobodne MPA može biti značajno povećana ukoliko se procenat vezane frakcije smanji, u sklopu same bolesti ili zbog prisustva drugih faktora kao što su: bubrežna ili insuficijencija jetre, pojava uremije ili hipoalbuminemija. Nekoliko procenata manje vezivanje može dovesti do višestrukog povećanja nivoa slobodne, aktivne MPA u plazmi (70, 76, 77).

### **2.1.2.3. Metabolizam i ekskrecija**

Osnovni put eliminacije MPA je metabolička transformacija, pri čemu se metaboliše više od 99% unete doze, a ostatak izlučuje urinom u nepromenjenom obliku (78-81).

Glavna mesta za biotransformaciju MPA su jetra, bubrezi i gastrointestinalni trakt (GIT). Mikofenolna kiselina se biotransformiše pod dejstvom uridin difosfat glukuronil transferaze (UGT) pri čemu se kao glavni metabolit stvara fenil- $\beta$ -D-glukuronid MPA (MPAG) koji ne pokazuje farmakološku aktivnost. Ovaj metabolit se, takođe, u visokom stepenu vezuje za albumine plazme, nešto manje nego MPA (približno 82%) (70, 74, 82). Pored glavnog metaboličkog proizvoda, MPAG, tokom metaboličkih reakcija nastaju najmanje još dva metabolita, 7-O-glukozid i acil-glukuronid (AcMPAG). Acil-glukuronid zadržava deo farmakološke aktivnosti MPA, iako nastaje u znatno manjoj količini, dok 7-O-glukozid ne pokazuje inhibitorni efekat na IMPDH (60, 83, 84). Metabolizam MPA prikazan je na **Slici 3**.





**Slika 3. Metabolizam MPA**

MMF – mikofenolat mofetil; MPA – mikofenolna kiselina; MPAG – fenil-β-D-glukuronid MPA; AcMPAG – acilglukuronid; EC-MPS – natrijumova so MPA; UGT – uridin difosfat glukuronil transferaza

Izo forme enzima UGT, UGT1A9 i UGT2B7 smatraju se glavnim izoenzimima za biotransformaciju MPA, zbog visoke ekspresije u jetri i bubrezima (80, 82). Pored njih, u MPA glukuronidaciju uključeni su i UGT1A7, 1A8 i 1A10, koji su zastupljeni u bubrezima i gastrointestinalnom traktu. Izoenzim UGT2B7 omogućava nastanak AcMPAG u većim količinama (85, 86).

Nastali metaboliti se primarno izlučuju urinom, mehanizmom aktivne tubularne sekrecije, dok se manji udeo MPAG (oko 13%) izlučuje putem žuči. U procesu ekskrecije MPA učestvuju protein povezan sa rezistencijom na veći broj lekova 2 (MRP2 – engl. *multidrug resistance-associated protein 2*), organski anjonski transportni polipeptidi (OATP – engl. *organic anion-transporting polypeptide*) i protein rezistencije raka dojke (BCRP – engl. *breast cancer resistance protein*) (87-90).

Deo unete MPA koji se kao konjugat MPAG preko žuči izlučuje u lumen creva podleže enterohepatičnoj cirkulaciji. Delovanjem crevnih glukuronidaza dolazi do dekonjugacije,

odvajanja glukuronskog dela, oslobađanja MPA i njene ponovne resorpcije. Usled enterohepatične cirkulacije (EHC) dolazi do pojave takozvanog „drugog pika“ u funkciji koja pokazuje zavisnost plazma-koncentracije MPA u funkciji vremena, približno 6–12h nakon primene MMF, odnosno 6–8h nakon primene EC-MPS (91-93).

Literaturni podaci o prosečnim vrednostima poluvremena eliminacije ( $t_{1/2}$ ) MPA razlikuju se u zavisnosti od primenjenog oblika leka i iznose:  $17,9 \pm 6,5$ h, posle primene MMF i 12h (8–16h) nakon primene EC-MPS (49, 94-96).

### **2.1.3. Faktori koji utiču na farmakokinetiku mikofenolne kiseline**

Prethodne studije su pokazale postojanje farmakokinetičke varijabilnosti MPA (15, 97, 98). Izražena interindividualna varijabilnost u farmakokinetici MPA javlja se kao posledica različitog obima resorpcije (bioraspoloživosti) i stepena eliminacije (posmatrane preko klirensa leka) (99, 100).

Rezultati sprovedenih kliničkih studija pokazali su da pol i rasa pacijenata predstavljaju demografske faktore sa velikim uticajem na farmakokinetičke parametre MPA (79, 101, 102). Kod pacijenata ženskog pola pokazana je značajno veća vrednost minimalne plazma koncentracije MPA ( $C_0$ , engl. *Trough*) nakon postizanja ravnotežnog stanja, u odnosu na pacijente muškog pola sa primenom iste doze MPA (78). Saglasno ovim rezultatima, Kobayashi i sar. su istakli pozitivnu korelaciju između muškog pola i klirensa MPA. Kod pacijenata muškog pola zabeležena je za 11% veća vrednost klirensa MPA u poređenju sa pacijentima ženskog pola (79), što govori u prilog prethodnim navodima. Ispitivanjem uticaja etničke pripadnosti na farmakokinetiku MPA primećena je statistički značajno veća učestalost akutnog odbacivanja kod pacijenata afroameričkog porekla (crna rasa) sa presađenim bubregom (31,8%), u poređenju sa pacijentima kavkaskog porekla (bela rasa) sličnih osobina i sa istim režimom doziranja (15,7%) (101). Uticaj telesne mase na farmakokinetičke parametre MPA i dalje je nedovoljno razjašnjen. Rezultati Yu i sar. (103) pokazuju da je telesna masa identifikovana kao kovarijata sa značajnim uticajem na oralni klirens ( $CL/F$ ) MPA, dok drugi smatraju da nema statističku značajnost u razmatranju doziranja (78, 101).

Funkcionalna sposobnost bubrega je esencijalna za procenu zadržavanja MPA u organizmu (104). Kod pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom (glomerularna filtracija manja od

25mL/min) značajno je smanjeno izlučivanje metabolita MPAG urinom, što dovodi do povećanja njegove koncentracije u plazmi 3 do 6 puta (105). Visoka koncentracija MPAG može uticati na kompleks MPA-albumin (zbog visokog afiniteta vezivanja – 82%), što može da dovede do značajnog povećanja nevezane frakcije leka (74). Porast slobodne frakcije MPA može se javiti i kao posledica hipoalbuminemije, genetičkih faktora ili u stanju uremije kada je dvostruko smanjeno vezivanje MPA za albumin (76, 106-108). Saliva može predstavljati biološki materijal izbora u slučajevima kada određivanje nevezane frakcije MPA može biti značajno za modifikaciju doznog režima MPA (109).

Bioraspoloživost peroralnih preparata MPA takođe pokazuje varijabilnost, a prisustvo hrane može uticati na pojavu interindividualne i intraindividualne varijabilnosti. Ne postoje dokazi koji potvrđuju da prisustvo hrane utiče na stepen resorpcije MMF i EC-MPS, kao ni na sistemsku izloženost MPA (procenjena na osnovu površine ispod krive – AUC). Ipak, prisustvo hrane u toku procesa resorpcije dovodi do smanjenja brzine resorpcije, a time i vrednosti  $C_{max}$  MPA za 40% (nakon primena MMF), odnosno 33% (nakon primene EC-MPS) u poređenju sa koncentracijom koja se postiže pri primeni na prazan stomak. Pored toga, vreme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi nakon primene MMF i EC-MPS je produženo oko 5h zbog čega se preporučuje njihova primena na prazan stomak, naročito u ranom posttransplantacionom periodu (69, 110).

Pored demografskih, patofizioloških faktora i faktora spoljašnje sredine, interakcija lekova u složenim farmakoterapijskim protokolima za transplantirane pacijente takođe predstavlja mogućnost pojave varijabilnosti u farmakokinetičkim procesima MPA.

Imunosupresivni protokoli sa MPA uglavnom sadrže lekove koji mogu da stupe u interakciju sa MPA. Pored toga, transplantirani pacijenti često imaju pridružene bolesti koje zahtevaju hroničnu primenu odgovarajućih lekova. Naravno, treba imati na umu da se kod ovih pacijenata može javiti akutni zdravstveni problem koji zahteva uvođenje novog leka/lekova, što dodatno potencira lek–lek, lek–bolest i lek–hrana interakcije. Interakcije se najčešće dešavaju na nivou distribucije (zbog promene u vezivanju za albumine) i na nivou metabolizma (zbog promene aktivnosti glukuronidaze koja učestvuje u dekonjugaciji MPA ili promene na nivou enterohepatične cirkulacije) (62).

Najčešće interakcije MPA prikazane su u **Tabeli 1**.

**Tabela 1.** Najčešće interakcije MPA

<b>Lekovi</b>	<b>Mehanizam</b>	<b>Preporuka</b>
<b>Takrolimus, sirolimus</b>	↑ koncentracija MPA kao rezultat inhibicije konverzije MPA u MPAG	Monitoring ukupne koncentracije MPA
<b>Ciklosporin</b>	↓ MPA AUC inhibicijom EHC	Monitoring ukupne koncentracije MPA
<b>Antibiotici (Ciprofloksacin, Rifampicin + klavulanska kiselina, Metronidazol)</b>	↓ MPA AUC inhibicijom EHC	Monitoring ukupne koncentracije MPA
<b>NSAIL (ibuprofen, diklofenak, naproksen, ketoprofen); Fenofibrat</b>	↑ koncentracija MPA kao rezultat kompeticije za proteine plazme	Monitoring slobodne frakcije MPA
<b>Inhibitori DNK polimeraze (aciklovir, ganciklovir)</b>	↑ koncentracija MPA kao rezultat kompeticije za tubularnu sekreciju.	Monitoring ukupne koncentracije MPA
<b>IPP (pantoprazol, omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol); Antagonisti H<sub>2</sub> receptora (ranitidin, famotidin); Antacidi koji sadrže Al i Mg</b>	↓ koncentracija MPA zbog smanjene rastvorljivosti, resorpcije usled povećanja pH vrednosti želudačnog soka	Monitoring ukupne koncentracije MPA
<b>Lekovi u terapiji hiperfosfatemije Sevelamer</b>	↓ koncentracija MPA zbog smanjene resorpcije	Monitoring ukupne koncentracije MPA

MPA – mikofenolna kiselina; MPAG – fenil glukuronid mikofenolne kiseline; AUC – površina ispod krive; EHC – enterohepatična cirkulacija; NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi; IPP – inhibitori protonske pumpe

Prilikom zajedničke primene MPA i CsA može doći do inhibicije proteina MRP2 i OATP u hepatocitima koji su značajni za ekskreciju MPAG u žuč, što dalje za posledicu ima smanjenje koncentracije MPA u plazmi (111-113). Prisustvo CsA se pored nivoa albumina i klirensa kreatinina pokazao kao značajna varijabla korišćenjem populacionog farmakokinetičkog pristupa (114-116). Sa druge strane, u prisustvu TAC može doći do povećanja koncentracije MPA u plazmi inhibicijom konverzije MPA u MPAG (117, 118). Kasnija istraživanja su pokazala da su razlike u koncentraciji MPA između grupe pacijenata na terapiji CsA i TAC sa sličnim funkcionalnim stanjem bubrega prvenstveno posledica interakcije MPA sa CsA. Kao rezultat inhibicije enterohepatične cirkulacije MPA izazvane CsA, zabeležena je značajno niža (40%)

MPA AUC kod pacijenata čiji je imunosupresivni režim zasnovan na CsA u poređenju sa TAC (111, 119-123).

Istovremena primena PRE može da dovede do smanjenja bioraspoloživosti MPA zbog čega savremeni farmakoterapijski protokoli preporučuju smanjenje doze PRE u ranom posttransplantacionom periodu i smanjenje ukupne dužine primene kortikosteroidne terapije (124, 125).

Smanjena gastrointestinalna podnošljivost MPA može rezultovati uključivanjem inhibitora protonske pumpe (IPP), koji povećanjem pH vrednosti želudačnog soka dovode do promene (smanjenja) rastvorljivosti MPA u želudačnom soku, što smanjuje obim resorpcije leka i dovodi do nižih vrednosti  $C_{max}$  i ukupne izloženosti organizma leku (MPA AUC) (126, 127). Prema rezultatima iz literature, prisustvo IPP u terapiji ostvaruje manji uticaj na enterosolventi oblik MPA (128, 129). Ista istraživanja potvrdila su da antacidi na bazi magnezijum i aluminijum-hidroksida negativno utiču na rastvorljivost, resorpciju i EHC MMF (128, 129). Interakcija lekova koji menjaju pH želudačnog soka i MPA može biti prevenirana pravilnom primenom MPA, odnosno razdvajanjem primene ovih lekova minimum dva sata, čime je moguće ostvariti nezavisnu resorpciju i zadovoljavajući efekat oba leka (130, 131).

Antibiotici posredno mogu da utiču na metaboličku transformaciju MPA, promenom u crevnoj mikrobioti, što može rezultovati smanjenjem broja određenih sojeva korisnih mikroorganizama važnih za očuvanje aktivnosti glukuronidaza koje učestvuju u EHC MPA (posledica je smanjenje koncentracije MPA) (111, 132). Rezultati Naesens i sar. ukazuju da rifampicin, mehanizmom indukcije glukuronidacije, takođe smanjuje obim EHC, što za posledicu ima smanjenje MPA AUC<sub>0-12</sub> za 17,5%. Značaj promene u EHC treba posebno imati u vidu u ranom posttransplantacionom periodu (132). Pad koncentracije MPA uočen je i u slučaju istovremene primene MMF/EC-MPS sa ciprofloksacinom, metronidazolom ili fiksnom kombinacijom amoksicilina i klavulanske kiseline (101, 133, 134). Po prestanku antibiotske terapije (u roku od 3 dana) koncentracije MPA su dostigle prvobitne vrednosti (133). Rezultati potvrđuju važnost kontinuiranog monitoringa terapije kod osetljivih transplantiranih pacijenata.

Međutim, ne stupaju svi antibiotici u klinički značajne interakcije sa MPA. U retrospektivnoj studiji intravenski dat vankomicin, karbapenem i piperacilin-tazobaktam nisu značajno uticali na  $C_0$  MPA (135).

Primena antibiotika kod pacijenata na imunosupresivnoj terapiji je od velike važnosti za preživljavanje grafta i pacijenta i zahteva dodatna ispitivanja sa ciljem utvrđivanja uticaja antibiotika, ali i načina primene na AUC MPA, kako bi se omogućio efikasan i bezbedan antimikrobni tretman (136).

Dodatno, potrebno je razmotriti suplementaciju preparatima gvožđa koji su čest pratilac imunosupresivne terapije. Sideropenijska anemija je česta komplikacija kod pacijenata sa presađenim bubregom (137). Uticaj gvožđa na AUC MPA je do sada nedovoljno razjašnjen. Rezultati Morii i sar. ukazuju na značajno smanjenje  $AUC_{0-12}$  i  $C_{max}$  MPA (skoro 90%) u slučaju istovremene primene gvožđe sulfata sa produženim oslobađanjem i MMF. Mehanizam koji tome doprinosi je formiranje nerastvorljivih kompleksa gvožđa sa lekom (138). Sa druge strane, kasnije studije nisu utvrdile značajne promene u farmakokinetičkim parametrima MPA nakon oralne primene suplemenata gvožđa (139-142). Kao mogući razlog neslaganja navode se analitički postupak i primena indometacina kao internog standarda (138).

U slučaju oslabljene funkcije grafta, smanjeno je izlučivanje fosfata i može doći do hiperfosfatemije. Prisutna hiperfosfatemija doprinosi daljem smanjenju bubrežne funkcije (143, 144). Za kontrolu hiperfosfatemije kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom bolešću koristi se sevelamer koji vezuje fosfatne anjone. Pri njegovoj istovremenoj primeni sa preparatima mikofenolne kiseline, koncentracija MPA može biti smanjena do 25% zbog smanjene gastrointestinalne resorpcije (145).

Lekovi sa visokim afinitetom vezivanja za albumine plazme – nesteroidni antiinflamatorni lekovi (ibuprofen, diklofenak, naproksen, ketoprofen), fenofibrat, oralni kontraceptivi, mogu da stupe u interakciju sa MPA na nivou distribucije sa posledičnim povećanjem slobodne frakcije leka (146, 147). Na nivou ekskrecije karakterističan primer je interakcija na nivou bubrežnih tubula (sa aciklovirom, probenecidom), gde se kompeticijom smanjuje izlučivanje metabolita MPAG. Ovo je naročito izraženo kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega (148).

#### 2.1.4. Terapijski monitoring mikofenolne kiseline

Prema farmakoterapijskim protokolima koji se oslanjaju na smernice aktuelnog vodiča za primenu imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega – KDIGO (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*), preporučena doza MMF iznosi 1000mg dva puta dnevno, odnosno EC-MPS 720mg dva puta dnevno kod odraslih pacijenata sa presađenim bubregom u ranom posttransplantacionom periodu (60, 70, 149). U daljem posttransplantacionom periodu, doza se menja ukoliko dođe do pojave neželjenih efekata ili odbacivanja grafta. Ipak, s obzirom na savremene rezultate istraživanja, sve više se uočava potreba za individualnim pristupom. Pozitivna korelacija pojave neželjenih efekata i plazma koncentracije MPA opravdava terapijski monitoring (TDM – engl. *Therapeutic drug monitoring*) i kontinuirano praćenje primene leka.

Kontinuirano praćenje koncentracije MPA omogućava titriranje doze u zavisnosti od faktora varijabilnosti leka i individualnih karakteristika pacijenta i osigurava optimalno lečenje uz značajno smanjenje rizika od pojave neželjenih efekata ili odbacivanja grafta (126, 150, 151). Praćenje koncentracije mora biti isplanirano i podržano pravilnim uzorkovanjem biološkog materijala i odgovarajućim, prethodno validiranim analitičkim postupkom (16, 62).

Plazma je najčešće korišćeni biološki materijal za terapijski monitoring MPA. U zavisnosti od primenjenog CNI i populacije pacijenata razlikuje se terapijski opseg koncentracija MPA. Za pacijente sa presađenim bubregom čiji je imunosupresivni režim zasnovan na CsA, terapijske koncentracije MPA iznose 1–3,5mg/L. U kombinaciji sa TAC preporučene ciljne koncentracije MPA nalaze se u opsegu 1,9–4,0 mg/L (152). Istraživanja ukazuju da određivanje jedne koncentracije MPA u toku doznog intervala nije uvek adekvatan parametar za predviđanje kliničkih ishoda. Adekvatnost primenjene doze može se pratiti i određivanjem površine ispod krive MPA u plazmi u prvih 12h nakon primene (MPA AUC<sub>0-12</sub>). Predloženi terapijski opseg MPA AUC<sub>0-12</sub> iznosi 30–60mg/L nakon primene MMF (odnosno 40–60mg/L kada je primenjen EC-MPS) (58, 106, 153-155). Zbog učestalosti uzorkovanja krvi i invazivnosti postupka venepunkcije, plazma ne predstavlja najpogodniji biološki materijal za terapijsko praćenje leka kod dece i pacijenata sa nepristupačnim venama.

Poslednjih godina se saliva sve više koristi kao biološki materijal za terapijsko praćenje MPA (109, 156). Mogućnost primene salive je značajna jer ona predstavlja prirodni ultrafiltrat

plazme, deproteinizovanu tečnost (procenat proteina manji od 1%) u kojoj se nalazi samo slobodna frakcija leka. Istovremeno, koncentracija leka u salivi dobro korelira sa koncentracijom slobodne frakcije leka u plazmi (17). Međutim, sastav i količina salive podložne su promenama pod uticajem mnogih faktora, što može zakomplikovati upotrebu salive u farmakokinetičkim studijama. Step en hidratacije, položaj tela, izlaganje visokim temperaturama u velikoj meri utiču na izlučivanje salive. Zabeleženo je 100% smanjenje protoka salive usled gubitka telesnih tečnosti od 8% (157). Osim toga, značajni su i mirisni stimulansi, stanje pacijenta, upotreba lekova, dnevne i sezonske promene. Da bi se izbegao potencijalni uticaj pomenutih faktora na rezultate istraživanja, potrebno je standardizovati način i vreme prikupljanja salive (158, 159).

### 2.1.5. Bezbednosni profil mikofenolne kiseline

Neželjeni efekti mikofenolne kiseline su jedan od glavnih razloga za neuspeh terapije i bitno utiču na kvalitet života transplantiranih pacijenata (160). **Tabela 2** sadrži neželjene reakcije za koje se smatra da su moguće ili verovatno povezane sa primenom MMF (Sažetak karakteristika leka). Zabeležene su u kontrolisanim kliničkim ispitivanjima kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, srcem ili jetrom gde je MMF primenjivan u kombinaciji sa CsA i kortikosteroidima (161).

**Tabela 2.** Neželjene reakcije MMF

Klase sistema organa		Neželjene reakcije
Infekcije i infestacije	Veoma često	Sepsa, gastrointestinalna kandidijaza, infekcije urinarnog trakta, herpes simplex, herpes zoster
	Često	Pneumonija, grip, infekcija respiratornog trakta, respiratorna monilijaza, gastrointestinalna infekcija, kandidijaza, gastroenteritis, bronhitis, faringitis, sinusitis, gljivična infekcija kože, kandidijaza kože, vaginalna kandidijaza, rinitis
Neoplazme - benigne, maligne i neodređene (uključujući i ciste i polipe)	Veoma često	/
	Često	Melanom, benigne neoplazme kože
Poremećaji imunskog sistema	Veoma često	Leukopenija, trombocitopenija, anemija
	Često	Pancitopenija, leukocitoza
Poremećaji metabolizma i ishrane	Veoma često	/
	Često	Acidoza, hiperkalemija, hipokalemija, hiperglikemija, hipomagnezemija, hipokalcemija, hiperholesterolemija, hiperlipidemija, hipofosfatemija, hiperurikemija, giht, anoreksija



Psihijatrijski poremećaji	Veoma često	/
	Često	Agitiranost, stanje konfuzije, depresija, anksioznost, abnormalne misli, nesanica
Poremećaji nervnog sistema	Veoma često	/
	Često	Konvulzije, hipertonija, tremor, somnolencija, mijastenični sindrom, omaglice, glavobolja, parestezija, poremećaj čula ukusa
Kardiološki poremećaji	Veoma često	/
	Često	Tahikardija
Vaskularni poremećaji	Veoma često	
	Često	Hipotenzija, hipertenzija, vazodilatacija
Respiratorni, torakalni i medijastinalni poremećaji	Veoma često	/
	Često	Pleuralna efuzija, dispneja, kašalj
Gastrointestinalni poremećaji	Veoma često	Povraćanje, bol u stomaku, dijareja, mučnina
	Često	Gastrointestinalna hemoragija, peritonitis, ileus, kolitis, čir na želucu, čir na dvanaestopalačnom crevu, gastritis, ezofagitis, stomatitis, konstipacija, dispepsija, flatulencija, eruktacije, hiperplazija gingive, pankreatitis
Hepatobilijarni poremećaji	Veoma često	/
	Često	Hepatitis, žutica, hiperbilirubinemija
Poremećaji kože i potkožnog tkiva	Veoma često	/
	Često	Hipertrofija kože, osip, akne, alopecija
Poremećaji mišićno-koštanog sistema i vezivnog tkiva	Veoma često	/
	Često	Artralgija
Poremećaji bubrega i urinarnog sistema	Veoma često	/
	Često	Oštećena funkcija bubrega
Opšti poremećaji i reakcije na mestu primene	Veoma često	/
	Često	Edem, pireksija, drhtavica, bol, slabost, astenija

U praksi se pacijenti tokom primene MPA najčešće susreću sa neželjenim efektima na nivou GIT – dijareja, bol u stomaku, mučnina, povraćanje, blage konstipacije. Ređe se javljaju dispepsija, gastrointestinalno krvarenje, ulceracija, gastritis, duodenitis, ishemijski kolitis, ezofagitis. Gastrointestinalni neželjeni efekti češći su kod pacijenata koji koriste MMF u dozi većoj od 2000mg dnevno i mogu biti uzrok nižeg stepena adherence i prekida terapije (13, 162, 163). Usled dugotrajne primene MPA prisutni su i hematološki neželjeni efekti – anemija, leukopenija, trombocitopenija. Pancitopenija i agranulocitoza su veoma retke (164, 165). Redukcijom doze ili prekidom terapije većina pomenutih neželjenih efekata se povlači (166, 167).

Imunosupresija, primarni efekat MPA, čini pacijenta imunokompromitovanim i povećava rizik od pojave infekcija. Studije su ukazale na povećanu učestalost i ozbiljnost

citomegalovirusne infekcije, a zabeležene su i učestale mikoze i infekcije izazvane herpes virusima (168, 169). Učestalost infekcija tokom primene MPA slična je kao i kod primene drugih immunosupresivnih lekova. Rezultati istraživanja pokazali su da su hematološki neželjeni efekti i pojava infekcija izraženiji kod pacijenata na terapiji EC-MPS, dok su gastrointestinalne smetnje učestalije tokom primene MMF (55, 170).

Povećana učestalost maligniteta nakon transplantacije, posledica je dugotrajne primene immunosupresivnih lekova (171). U cilju smanjenja rizika od karcinoma kože, treba ograničiti izlaganje sunčevoj svetlosti. Učestalost karcinoma tokom terapije MPA ne razlikuje se u odnosu na druge immunosupresivne lekove. Ipak, uočena je nešto veća učestalost limfoproliferativnih bolesti (172, 173).

Neki od retkih neželjenih efekata koji mogu da prate primenu MPA su: generalizovana urtikarija, oticanje zglobova, bol u leđima i mišićima, vrtoglavica, nesаница, tahikardija (174, 175). MPA ima izraženo teratogeno dejstvo. Upotreba leka tokom trudnoće (posebno u prvom tromesečju) povećava rizik od spontanih pobačaja i kongenitalnih malformacija (srčane mane, malformacije lica (rascep usne, nepca), malformacije spoljašnjeg uha, prstiju, nervnog sistema) (176, 177).

## **2.2. Farmakokinetička analiza**

Farmakokinetička analiza predstavlja matematički izraz kretanja leka u organizmu u funkciji vremena i delovanja organizma na primenjeni lek. Farmakokinetička analiza se vrši na osnovu izmerenih koncentracija leka u odabranom, odgovarajućem biološkom materijalu. Uslov je da koncentracija leka u izabranom biološkom materijalu oslikava koncentraciju leka na mestu delovanja. Obrada podataka i izbor farmakokinetičkog pristupa zavise od karakteristika ispitivanog leka, vrste biološkog materijala, načina i broja uzorkovanja, broja podataka i cilja analize. Osnovu farmakokinetičkih ispitivanja predstavlja prostorna (kompartmentalna, model-zavisna) analiza (178, 179).

U prostornoj farmakokinetičkoj analizi ispitivanja se vrše u maloj, homogenoj grupi zdravih dobrovoljaca ili odabranoj grupi pacijenata. Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje strogo su definisani. Time je mogućnost ispitivanja varijabilnosti farmakokinetičkih parametara

u velikoj meri ograničena (180, 181). Da bi se dobio što veći broj informacija i izradio validan individualni farmakokinetički profil leka, neophodan je pravilan izbor optimalnog biološkog materijala i dovoljno često uzorkovanje u tačno definisanim vremenskim intervalima.

Zbog ograničenja koja prate prostornu analizu, sve veći značaj imaju drugi pristupi poput neprostorne analize i farmakokinetičko-farmakodinamičkog modelovanja. Veliki napredak ostvaren je razvojem i primenom populacione farmakokinetičke analize.

### **2.2.1. Populaciona farmakokinetička analiza**

Osnovu populacione analize čini prostorna farmakokinetička analiza, uz dodatno definisanje varijabilnosti među ispitanicima. Populaciona analiza nije razvijena sa ciljem da zameni model-zavisnu analizu, već da postojeće podatke o leku dopuni novim informacijama. U najširem smislu, populaciona farmakokinetička analiza podrazumeva ispitivanje farmakokinetičkih karakteristika leka u populaciji ispitanika koji primenjuju lek kako bi se opisali i objasnili izvori varijacija u koncentracijama leka (182, 183).

Razumevanje i predviđanje farmakokinetike leka i određivanje optimalnog režima doziranja omogućeno je na osnovu matematičkih i statističkih modela koje populaciona analiza obuhvata. Široko se primenjuje u gerijatrijskoj, pedijatrijskoj i onkološkoj populaciji, kod pacijenata sa oslabljenom funkcijom bubrega i jetre, a posebno je važna kod vulnerabilnih transplantiranih pacijenata (184, 185). Značaj populacione analize prepoznat je i od strane regulatornih tela poput Evropske agencije za lekove (EMA) i Američke uprave za hranu i lekove (FDA). Njihove smernice daju preporuke za prihvatanje rezultata populacionih studija u toku razvoja i odobravanja lekova (186, 187).

U populacionoj analizi postoje tri osnovna statistička pristupa:

- pristup objedinjenih podataka (engl. *naive pooled data approach*);
- dvostepeni pristup (engl. *two-stage approach*);
- pristup nelinearnog modelovanja kombinovanih efekata (engl. *NONlinear Mixed Effects Modelling approach* – NONMEM) (188).

Pristup nelinearnog modelovanja kombinovanih efekata je danas najčešće primenjivan u praksi, a podrazumeva simultanu analizu podataka svih ispitanika, pri čemu se procenjuju populacione vrednosti farmakokinetičkih parametara i kvantitativno opisuju izvori farmakokinetičke varijabilnosti. Ovaj pristup omogućava obradu podataka dobijenih tokom rutinskog praćenja lekova. Pojedinaac nije u fokusu ispitivanja, već grupa ispitanika i dobijanje populacionog profila leka, čime je omogućeno da grupa ispitanika na terapiji ispitivanim lekom bude heterogena po starosti, polu, režimu doziranja, koterapiji, komorbiditetima. Složenom interakcijom velikog broja istovremeno prisutnih faktora omogućena je procena varijabilnosti. Prednost NONMEM u odnosu na dvostepeni pristup ogleda se i u tome što je moguće koristiti mali i neujednačen broj uzoraka biološkog materijala po ispitaniku (185, 189). Iz tih razloga primena NONMEM pristupa je dominantna u poslednje vreme (190).

Modelovanje se zasniva na kombinovanju stalnih (engl. *fixed effect*) i slučajnih (engl. *random effect*) efekata. U ispitivanoj populaciji stalni efekti su konstantni i imaju jednu vrednost parametra (doza, vreme). Parametri stalnih efekata definišu populacione (tipične) vrednosti farmakokinetičkih parametara (TVCL – engl. *typical value of CL* i TVV – engl. *typical value of Vd*). Oni kvantifikuju uticaj određenog faktora varijabilnosti (kovarijate) i obeležavaju se grčkim slovom  $\theta$  (*teta*) (99, 191, 192). Nasuprot tome, slučajni efekti su nemerljivi. Oni kvantifikuju interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost farmakokinetičkih parametara, preuzimajući po jednu vrednost za individuu ili za svako merenje (191). Pored toga, moguće su razlike kod jedne individue u različitim vremenima (engl. *interoccasion variability*). Razlika individualnog parametra u odnosu na tipičnu vrednost predstavlja interindividualnu varijabilnost i obeležava se slovom  $\eta$  (*eta*). Intraindividualna (ili rezidualna) varijabilnost se obeležava  $\varepsilon$  (*epsilon*) i opisuje razliku između izmerenih i modelom predviđenih vrednosti zavisne promenljive (99, 191, 193).

### **2.2.2. Građenje populacionog modela – pristup NONMEM**

Uspeh populacionog modelovanja zavisi od adekvatne pripreme, prikupljanja, obrade podataka i plana analize.

Proces populacionog modelovanja obuhvata:

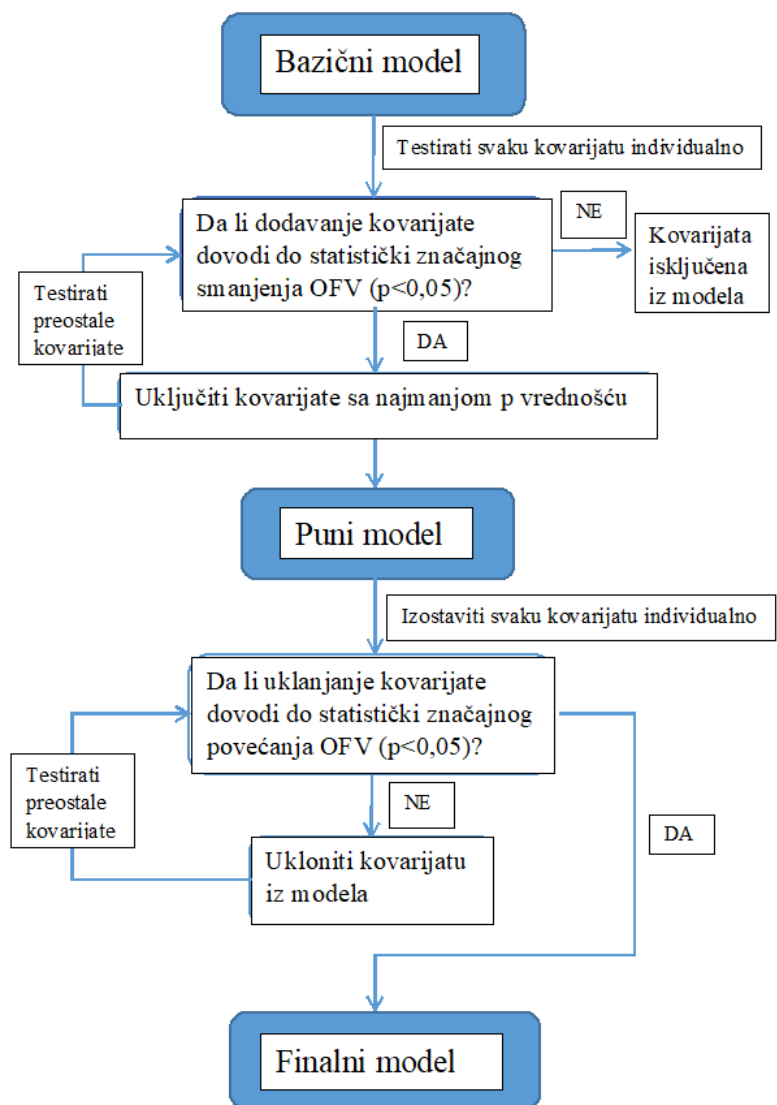
- razvoj bazičnog modela;

- odabir kovarijata i dobijanje finalnog modela;
- procenu i validaciju modela (191).

Razvoj bazičnog modela obuhvata opšte i tipične farmakokinetičke karakteristike leka (194, 195). Prostorni farmakokinetički model određuje se preko konstanti brzine procesa, najčešće preko  $V$  i  $CL$ . Prilikom definisanja modela, potrebno je voditi računa da li se radi o procesu prvog reda (brzina proporcionalna koncentraciji, a parametri konstantni) ili dolazi do saturacionih fenomena (196). Iako bazični populacioni farmakokinetički model ne uključuje efekat faktora, u nekim okolnostima kovarijate sa velikim statističkim značajem bitno utiču na proces dobijanja odgovarajućeg bazičnog modela (191, 192).

Uključivanjem kovarijata u formirani bazični model dobija se nova jednačina potpunog, a zatim i finalnog modela. Prema načinu uključivanja u model, vrši se podela kovarijata na kategoričke i kontinuirane. Kategoričke kovarijate su kvalitativne i mogu biti binarne (postoje samo dva moguća nivoa) i multiple. Kontinuirane kovarijate su kvantitativne promenljive. Kovarijate obuhvataju demografske karakteristike ispitanika (pol, godine, telesna masa, rasa), spoljašnje faktore (alkohol, pušenje, dijeta), mogu da se odnose na prisutnu koterapiju, patofiziološke faktore pacijenta (oštećenje jetre, bubrega, gastrointestinalnog trakta, druge akutne i hronične bolesti), genetičke faktore i ostale faktore (farmaceutsko-tehnološki oblik leka, adherenca) (188, 193, 197).

Stepenovano građenje modela je najčešće primenjivan postupak pri izboru kovarijata. Odvija se u dve faze: uključivanje unapred (engl. *forward inclusion*) i isključivanje unazad (engl. *backward elimination*) što je prikazano na **Slici 4** (191, 198).



**Slika 4.** Stepenovano građenje modela

OFV – objektivna vrednost funkcije

Metode procene zasnivaju se na principu maksimalne verovatnoće (engl. *maximum likelihood*). Uticaj kovarijata prati se preko objektivne vrednosti funkcije (OFV – engl. *objective function value*). Ona je proporcionalna negativnom dvostrukom (prirodnom) logaritmu verovatnoće podataka (196, 199, 200). Svako ponavljanje procene parametara zahteva ponovno izračunavanje vrednosti OFV (191). Kovarijata će biti uključena u model ukoliko dovodi do statistički značajne razlike u vrednosti OFV. S obzirom na to da razlika između dve OFV vrednosti ima hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) raspodelu sa određenim brojem stepena slobode (df), moguće je primeniti statističke testove za poređenje modela (191, 192, 201). Finalni model koji se konačno

dobija predstavlja najjednostavniji model u kome su ispitane i zadržane sve relevantne kovarijate (191, 198). Dodatni zahtevi za formiranje finalnog modela su smanjenje interindividualne i rezidualne varijabilnosti, kao i što niže vrednosti standardnih grešaka (SE – engl. *standard error*) parametara modela (196, 200).

### 2.2.3. Validacija populacionog modela

Radi potvrde ispravnosti dobijenog populacionog modela neophodna je validacija koja podrazumeva testiranje i procenu prediktivnih karakteristika dobijenog modela (187, 202). U ovu svrhu se mogu koristiti eksterne i interne metode validacije. Za eksternu validaciju koristi se set podataka dobijen od ispitanika iste populacije koji nisu učestvovali u građenju modela. Metode interne validacije obuhvataju dijagnostičke grafike, tehnike reuzorkovanja (engl. *bootstrap*), ukrštenu validaciju (engl. *cross validation*), deljenje podataka (engl. *data splitting*). Za validaciju se poslednjih godina sve češće upotrebljavaju i simulacione tehnike (202, 203).

Simulacione tehnike prate razvoj računara i softvera, što je dovelo do ekspanzije njihove primene i razvoja i učinilo ih veoma aktuelnim. Mogućnost da se simulacione metode koriste za modelovanje složenih sistema omogućilo je njihovu primenu u različitim oblastima i disciplinama, uključujući i medicinu.

U naučnim istraživanjima posebno se izdvojila Monte Carlo (MC) metoda zbog jednostavne i sveobuhvatne primene. Razvijena je 1940. godine, a ime je dobila prema gradu u Monaku poznatom po mnogobrojnim kazinima. Zasnovana je na generisanju novih setova podataka pomoću simulacija i daljoj proceni validnosti modela u odnosu na simulirane podatke (191, 198, 204). Ova metoda je veoma značajna u kliničkoj praksi jer omogućava predviđanje individualnog farmakokinetičkog profila leka iz već postojećih populacionih modela, simuliranjem većeg broja podataka čime se izbegava često i invazivno uzorkovanje biološkog materijala kod vulnerabilnih transplantiranih pacijenata (205).

Efikasna, brza i jednostavna obrada podataka prednosti su MC metode. Uz to, stalni razvoj i nadogradnja čine je vrlo aktuelnom. Nedostatak MC metode je generisanje velikog broja uzoraka i rasipanje resursa. Definisanje svih uslova i ograničenja relevantnih za rešavanje određenog problema predstavlja ključni faktor pouzdanosti i efikasnosti Monte Carlo modelovanja.

### 3. Hipoteze

Na osnovu pregleda postojeće literature i obavljenih pilot-istraživanja, postavljene su sledeće hipoteze:

H1: Postoji interindividualna varijabilnost u klirensu MPA kod pacijenata sa presađenim bubregom.

H2: Postoji razlika u intenzitetu ispoljenih neželjenih efekata MPA kod pacijenata sa presađenim bubregom u odnosu na pol.

H3: Nivo serumskih albumina (ALB) je povezan sa bezbedonosnim profilom i ispoljenim neželjenim efektima MPA kod pacijenata sa presađenim bubregom.



## 4. Ciljevi

Ciljevi istraživanja su:

- Razvoj analitičke metode za kvantitativnu analizu MPA;
- Validacija metode za određivanje koncentracije MPA u plazmi pacijenata sa presađenim bubregom radi primene u farmakokinetičkoj analizi;
- Populaciona farmakokinetička analiza MPA kod pacijenata na kombinovanom imunosupresivnom tretmanu primenom *NONMEM*® (engl. *nonlinear mixed-effect modeling*) softvera;
- Identifikacija faktora koji doprinose farmakokinetičkoj interindividualnoj varijabilnosti MPA. Faktori koji će biti razmatrani uključuju demografske karakteristike pacijenata, biohemijske parametre za procenu funkcije bubrega i jetre, nivo serumskog albumina, uticaj doze leka, kao i uticaj komedikacije – prednizona, kalcineurinskog inhibitora, bisoprolola, karvedilola, nifedipina i omeprazola;
- Provera validnosti dobijenog populacionog modela MPA CL primenom Monte Carlo simulacije;
- Ispitivanje podnošljivosti MPA i identifikacija faktora koji utiču na intenzitet neželjenih efekata kod pacijenata sa presađenim bubregom;
- Formulisanje matematičke korelacije između ukupne i slobodne koncentracije MPA u odnosu na nivo albumina kod pacijenata sa presađenim bubregom.

## 5. Pacijenti i metode

Istraživanje je sprovedeno u formi prospektivne studije i studije preseka kod pacijenata koji su nakon operacije presađivanja bubrega lečeni na Klinici za nefrologiju, Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu. Istraživanje je sprovedeno u saglasnosti sa Helsinškom deklaracijom i prema načelima Dobre kliničke prakse (GCP – engl. *Good Clinical Practice*) i Dobre laboratorijske prakse (GLP – engl. *Good Laboratory Practice*), sa odobrenjem Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (rešenje broj: 12-10580-2/6). Prvi deo istraživanja obavljen je 2014. godine razvojem analitičke metode za određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi, kao preduslov za populacionu farmakokinetičku analizu. Nakon definisanja populacionih farmakokinetičkih parametara, dalja ispitivanja bila su usmerena ka validaciji populacionog modela primenom Monte Carlo simulacije, proceni vrste i intenziteta neželjenih efekata mikofenolne kiseline i komparativnoj analizi koncentracija leka u plazmi i salivi. Rezultati pojedinačnih faza istraživanja sukcesivno su publikovani u nacionalnim i međunarodnim časopisima.

### 5.1. Protokol ispitivanja

Tokom standardnog biohemijskog monitoringa pacijenata, prikupljani su uzorci salive i krvi u biohemijskoj laboratoriji Klinike za nefrologiju oko 8.00 časova, neposredno pre primene jutarnje doze leka. Iz uzoraka krvi određeni su standardni biohemijski i hematološki parametri, dok su koncentracije MPA u biološkim tečnostima određivane u Laboratoriji za hromatografiju Naučno-istraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Populaciona farmakokinetička analiza izvršena je na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu. Rezultati dobijeni praćenjem neželjenih efekata obrađeni su na Katedri za farmaciju, UNO Farmakokinetika i klinička farmacija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Validacija populacionog farmakokinetičkog modela izvršena je u saradnji sa Mašinskim fakultetom Univerziteta u Nišu.

U okviru planiranog protokola ispitivanja, prikupljeni su sledeći podaci:

- karakteristike pacijenata (pol, starost, telesna masa, komorbiditeti);
- medicinski podaci (datum i tip transplantacije, pol donora);
- podaci o terapiji (farmaceutsko-tehnološki oblik MPA, doza, interval doziranja, kao i podaci o istovremeno primenjenim lekovima);
- neželjeni efekti primenjene terapije (popunjavanjem upitnika).

## 5.2. Pacijenti

U istraživanju je učestvovalo ukupno 102 pacijenta sa presađenim bubregom.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u istraživanje bili su sledeći:

- odrasli pacijenti (>18 godina) sa stabilnom funkcijom grafta nakon presađivanja bubrega;
- nepromenjeni režim doziranja imunosupresiva (najmanje tri meseca);
- kasni posttransplantacioni period (>12 meseci).

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz istraživanja bili su sledeći:

- oslabljena funkcija bubrega (klirens kreatinina <15mL/min);
- znaci hroničnog odbacivanja grafta;
- promena terapije (prelazak na drugi CNI);
- nedostatak podataka o režimu doziranja MPA (doza, interval doziranja, dužina lečenja), izmerenoj koncentraciji ili primenjenoj koterapiji.

Od 102 pacijenta, 95 je ispunilo uslove za učešće u populacionoj farmakokinetičkoj studiji. Nakon informisanja i dobrovoljnog potpisivanja saglasnosti za učešće u istraživanju, izvršena je randomizacija. Ispitanici su podeljeni u dve grupe (75 je bilo u grupi za građenje modela, dok je 20 pacijenata predstavljalo grupu za validaciju).

Podaci o neželjenim efektima tokom primene MPA prikupljeni su putem prilagođenog upitnika. Upitnik o neželjenim efektima terapije popunilo je 77 od ukupno 102 pacijenta.

Pacijentima sa presađenim bubregom koji su uključeni u istraživanje propisan je trostruki imunosupresivni protokol koji je uključivao MMF ili EC-MPS, PRE i CNI (TAC ili CsA). Izabrani CNI dozirani su dva puta dnevno u inicijalnoj dozi 0,1mg/kg/dan (za TAC), odnosno

10–15mg/kg/dan (za CsA). Režim doziranja CNI je bio modifikovan na osnovu kliničkog odgovora i pratećeg biohemijskog i terapijskog monitoringa leka. Cilj je bio postizanje i održanje koncentracija u preporučenom opsegu u odnosu na posttransplantacioni period. Inicijalna doza PRE iznosila je 1mg/kg/dan, a tokom nekoliko meseci doza je sukcesivno redukovana do minimalne efektivne doze (5–15mg/dan). Doza EC-MPS kod ispitivanih pacijenata varirala je u opsegu od 720 do 1440mg/dan, dok je doza MMF bila u opsegu od 1000 do 2000mg/dan. Prema preporukama, doziranje je vršeno u dve pojedinačne doze, u 8.00 i 20.00 časova. Odabir formulacije zasnivao se na kliničkoj proceni nefrologa. Tokom perioda istraživanja nije dolazilo do promena doznog režima.

Najzastupljeniji komorbiditeti kod ispitivanih pacijenata bili su arterijska hipertenzija (kod 94,12% pacijenata) i šećerna bolest – *diabetes mellitus* (kod 14,71% pacijenata). U antihipertenzivnoj terapiji su najzastupljeniji bili lekovi iz grupe beta blokatora (karvedilol, bisoprolol i nebivolol), blokatora kalcijumovih kanala (nifedipin, amlodipin i lerkandipin) i inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE inhibitori – enalapril, fosinopril i ramipril). Insulin i/ili oralni hipoglikemici predstavljali su deo terapije pacijenata sa dijabetesom. U cilju prevencije gastrointestinalnih smetnji, pacijentima je propisivan IPP (omeprazol ili pantoprazol, kod 80,52% pacijenata) ili H2 blokator (ranitidin, kod 19,48% pacijenata).

### **Sakupljanje uzoraka**

Uzorci krvi i salive odraslih pacijenata sa presađenim bubregom prikupljeni su istovremeno, na kraju doznog intervala, sa ciljem određivanja  $C_0$  koncentracije. Uzorci krvi (3mL) sakupljeni su u epruvete sa antikoagulansom etilendiamino tetrasirćetnom kiselinom (EDTA). Saliva (2mL) je sakupljana u sterilne bočice pod nestimulisanim uslovima. Pacijentima je naglašeno da ne puše, unose hranu i piće, ili peru zube najmanje 15 minuta pre uzorkovanja. Prikupljeni uzorci krvi i salive su centrifugirani 15 minuta na 3000 obrtaja/min i čuvani na temperaturi -80°C do izvođenja analize. Prikupljanjem plazme i salive deset zdravih dobrovoljaca formirani su kontrolni, „blank“ uzorci krvne plazme i salive.

## 5.3. Metode

Hematološki i biohemijski parametri određivani su u Biohemijskoj laboratoriji Klinike za nefrologiju. Određivanje hematoloških parametara (broj eritrocita, leukocita i trombocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit) vršeno je aparatom NINHON KOHDEN CELLTAC MEK – 6318K (NINHON KOHDEN CORPORATION, Tokio, Japan). Biohemijske analize (koncentracija serumskog albumina (ALB), uree, kreatinina (Scr), aktivnost enzima aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) obavljene su analizatorom ERBA XL – 600 (ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim, Nemačka). Koristeći 4-faktornu MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*) jednačinu procenjena je glomerularna filtracija (e-GFR, engl. *estimated glomerular filtration rate*) (206).

### 5.3.1. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi

Koncentracije MPA u uzorcima plazme ( $C_P$ ) pacijenata sa presađenim bubregom su određivane validiranom metodom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC – engl. *High performance liquid chromatography*).

#### Priprema rastvora za razvoj i optimizaciju HPLC metode

Standardni osnovni rastvori MPA i internog standarda (IS) pripremljeni su u acetonitrilu u koncentraciji od 10mg/mL. Kao interni standard korišćen je propil paraben (PP) (207). Standardni osnovni rastvori MPA i PP su razblaženi acetonitrirom do koncentracije 1mg/ml, odnosno 10 $\mu$ g/mL i korišćeni kao radni rastvori. Standardni osnovni rastvori čuvani su na -20°C, a standardni radni rastvori na 4–8°C tokom jednog meseca, u skladu sa stabilnošću rastvora.

Da bi se postiglo adekvatno razvajanje i što kraće trajanje analize, eksperimentalno je ispitivan uticaj acetonitrila u opsegu od 20 do 50%. Pored toga, u procesu razvoja metode ispitivan je i uticaj neorganske komponente mobilne faze (voda, fosforna kiselina, acetatni i fosfatni pufer), a zatim i njene *pH* vrednosti na retencione parameter (u opsegu 2,0–4,0). Uticaj temperature kolone je ispitivan u opsegu od 30 do 40°C.

Za pripremu mobilne faze, uzoraka i ispiranje posuđa korišćena je dejonizovana voda dobijena pomoću sistema *Smart 2 Pure* (TKA, Niederelbert, Germany). Pre upotrebe, mobilna

faza je oslobođena gasnih primesa u ultrazvučnom kupatilu i prečišćena vakuum filtracijom pomoću celuloznih membranskih filtera veličine pora 0,45 $\mu$ m (Agilent, Nemačka).

### **Priprema uzoraka**

Precipitacija proteina plazme postignuta je na sledeći način: u 200 $\mu$ L uzorka plazme dodato je 10 $\mu$ L internog standarda koncentracije 1mg/mL u acetonitrilu i 490 $\mu$ L 0,3% trifluorosirćetne kiseline u acetonitrilu (v/v). Sadržaj svake mikrotube je homogenizovan, a zatim centrifugiran tokom 10 min na 10000 obrtaja/min i temperaturi od 4°C. Izdvojeni supernatant je filtriran i 10 $\mu$ L je injektovano u HPLC sistem radi analize.

### **5.3.2. Validacija HPLC metode za kvantitativnu MPA analizu**

Validacija HPLC metode za određivanje  $C_P$  MPA vršena je prema FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i ICH (engl. *International Conference of Harmonisation*) zahtevima i smernicama (208, 209). U okviru postupka validacije ispitivana je selektivnost, opseg metode, linearnost, tačnost, preciznost, limit detekcije, limit kvantifikacije i stabilnost. Traženi zahtev za parametre validacije je predstavljao neophodan preduslov za primenu metode u farmakokinetičkim ispitivanjima (210).

#### **Ispitivanje selektivnosti RP–HPLC metode**

Selektivnost metode je ispitivana injektovanjem blank plazme (bez analita i PP) dobijene od 10 zdravih dobrovoljaca, nultih uzoraka plazme (blank plazma sa PP  $c=50\mu$ g/mL) i plazme koja je opterećena MPA  $c=25\mu$ g/mL i PP  $c=50\mu$ g/mL.

#### **Ispitivanje linearnosti metode**

Za procenu linearnosti metode posmatran je odnos površine pikova standarda MPA i PP u zavisnosti od koncentracije. Standardni rastvori MPA za konstruisanje kalibracione krive (kalibratori) dobijeni su razblaživanjem rastvora koncentracije 1mg/mL, odnosno 10 $\mu$ g/mL blank plazmom. Za pripremu kalibratora u posebne mikrotube odmeravano je 4 $\mu$ L i 12 $\mu$ L rastvora MPA koncentracije 10 $\mu$ g/mL, odnosno 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 19 $\mu$ L i 20 $\mu$ L koncentracije

1mg/mL, sukcesivno. U svaku mikrotubu dodavana je količina od 10 $\mu$ L PP koncentracije 1mg/mL, a zatim dopunjavano blank plazmom do 200 $\mu$ L. Na taj način su pripremljeni rastvori MPA sledećih koncentracija: 0,2 $\mu$ g/mL, 0,6 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL, 25 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 95 $\mu$ g/mL i 100 $\mu$ g/mL. Svi rastvori sadržali su PP u koncentraciji od 50 $\mu$ g/mL. Za konstruisanje kalibracione krive MPA korišćena je srednja vrednost tri nezavisna merenja. Linearnost je ispitana u opsegu 0,2–100 $\mu$ g/mL.

### **Ispitivanje tačnosti i preciznosti metode**

Kontrola kvaliteta (QC – engl. *Quality Control*) primenjene metode podrazumeva procenu tačnosti i preciznosti rezultata dobijenih određenim analitičkim postupkom. Izvodi se pomoću kontrolnih uzoraka (QCs) koji predstavljaju uzorke opterećene poznatom količinom MPA. Prema smernicama FDA u svaku analizu treba uključiti najmanje tri QCs različitih koncentracija u triplikatu (211). Koncentracije QCs treba pripremiti tako da jedna bude blizu donjeg limita kvantifikacije – LLOQ (nizak QC – LQC, engl. *Low Quality Control*), druga je blizu gornje granice opsega očekivanih koncentracija (visok QC – HQC, engl. *High Quality Control*) i treća je na sredini opsega (srednji QC – MQC, engl. *Medium Quality Control*).

Tačnost i preciznost merenja uvrđena je za QCs na tri koncentraciona nivoa: LQC–0,6 $\mu$ g/mL, MQC–50 $\mu$ g/mL i HQC–95 $\mu$ g/mL. Svi QCs sadržali su PP u koncentraciji od 50 $\mu$ g/mL. Svi uzorci su injektovani po pet puta dnevno u toku tri dana. Tačnost je izražena procentualno (R – engl. *recovery*) kao slaganje između izmerenih i stvarnih koncentracija, dok je preciznost izražena preko standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD %). Da bi rezultati bili prihvatljivi, *recovery* vrednost i RSD treba da budu  $\pm 15\%$  (212).

Kontrolni uzorci su pripremani svakodnevno, a mala zapremina (1mL) svih LQC i HQC uzoraka je odvojena i čuvana na temperaturi -20°C, radi naknadnog ispitivanja dugoročne stabilnosti i stabilnosti nakon tri ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja.

### **Ispitivanje stabilnosti uzoraka**

Stabilnost uzoraka MPA u plazmi ispitivana je u kratkoročnim (6h na sobnoj temperaturi) i dugoročnim (90 dana na temperaturi -80°C) temperaturnim studijama i na autosempleru

(pripremljen uzorak nakon 24h stajanja na sobnoj temperaturi). Pored toga, ispitana je i stabilnost nakon tri ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja (zamrzavanje na  $-80^{\circ}\text{C}$  i odmrzavanje na sobnoj temperaturi tokom tri dana). Sva ispitivanja su vršena sa dve koncentracije LQC– $0,6\mu\text{g/mL}$  i HQC– $95\mu\text{g/mL}$ . Za svaku koncentraciju pripremljeno je po tri uzorka. Na osnovu razlike između izmerenih i inicijalnih koncentracija QCs, izračunate su *recovery* vrednosti i RSD, i dalje vršena procena stabilnosti.

### 5.3.3. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u salivi

Za određivanje koncentracije MPA u salivi ( $C_{\text{SAL}}$ ) pacijenata sa presađenim bubregom korišćen je LC-MS sistem, kombinacija tečnog hromatografa Dionex Ultimate 3000 UHPLC i masenog spektrometra TSQ Quantum Access MAX sa trostrukim kvadrupolom (Thermo Scientific, Nemačka).

Hromatografsko razdvajanje vršeno je na koloni Hypersil GOLD, dimenzija  $100 \times 2,1\text{mm}$  i veličinom čestica sorbenta  $1,9\mu\text{m}$  (Thermo Scientific, Nemačka). Mobilnu fazu su činili  $0,1\%$  vodeni rastvor mravlje kiseline (komponenta A) i metanol (komponenta B). Pri protoku mobilne faze  $0,2\text{mL/min}$  primenjen je izokratski režim elucije sa odnosom faza 20:80 (A:B). Temperatura kolone iznosila je  $30^{\circ}\text{C}$ , a injekcioni volumen  $5\mu\text{L}$ .

Maseni spektri snimani su u pozitivnom modu (ESI+). Tokom snimanja masenih spektara korišćeni su sledeći parametri: napon na kapilari  $5\text{kV}$ , temperatura vaporajzera  $195^{\circ}\text{C}$ , pritisak glavnog gasa  $45\text{bar}$ , pritisak pomoćnog gasa  $5\text{bar}$ , temperatura kapilare  $353^{\circ}\text{C}$ , kapilarni otklon  $35\text{V}$ . Podaci su prikupljeni i obrađivani pomoću softvera *Xcalibur* 3.0.63 (ThermoFisher Scientific, Nemačka). Identifikacija MPA je sprovedena u režimu praćenja odabrane reakcije fragmentacije (SRM, engl. *Selected reaction monitoring*) praćenjem prelaza  $m/z$   $321,23 \rightarrow 207,05$ .

Standardni rastvori MPA za konstruisanje kalibracione krive dobijeni su razblaživanjem rastvora koncentracije  $5\mu\text{g/mL}$  blank salivom. Na taj način pripremljeni su rastvori MPA sledećih koncentracija:  $5\text{ng/mL}$ ,  $25\text{ng/mL}$ ,  $50\text{ng/mL}$ ,  $100\text{ng/mL}$  and  $500\text{ng/mL}$ . Dobijena kalibraciona kriva ( $y=2682,8x-28700$ ) pokazala je linearnost metode u ispitivanom opsegu koncentracija, sa korelacionim koeficijentom  $r^2=0,9995$ .



## Priprema uzoraka

Uzorci salive pripremljeni su na sledeći način: u 150 $\mu$ L uzorka salive dodato je 300 $\mu$ L 0,3% trifluorosirćetne kiseline u metanolu (v/v). Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 12000 obrtaja/min i pri temperaturi od 4°C, a izdvojeni supernatant korišćen je za analizu.

### 5.3.4. Populaciona farmakokinetička analiza mikofenolne kiseline

Za populacionu farmakokinetičku analizu korišćen je softver *NONMEM*® (verzija 6, nivo 1.1) sa *FORTRAN G77* programskim jezikom (213). Za opisivanje farmakokinetike MPA korišćen je dvoprostorni farmakokinetički model sa resorpcijom prvog reda i  $t_{lag}$ . Na osnovu strukture modela odabrana je ADVAN4 TRANS3 programska subrutina.

U prvoj fazi modelovanja razvijen je bazični populacioni model. Daljom analizom ispitivan je uticaj kovarijata (telesna masa, starost, pol, ukupna doza MPA, klirens kreatinina, nivo albumina u plazmi, vreme nakon transplantacije, tip donora, pol donora, AST, ALT, koterapija omeprazolom i nifedipinom, doza CsA, TAC i PRE) na MPA CL/F. Kovarijate su testirane u odnosu na bazični model, a u model su uključene one sa najvećim uticajem. Statistički značajnim uticajem smatrana je redukcija OFV za minimum 3,841 ( $\chi^2=3,841$  za  $p<0,05$ ,  $df=1$ ) (214). Prvo su uključene kovarijate sa najvećim smanjenjem OFV u odnosu na bazični model, a zatim redom sve one koje su ispunile ovaj kriterijum. Na taj način dobijen je puni model u kome je dalje testiran uticaj odabranih kovarijata po strožijem kriterijumu. Postepeno su uklanjane jedna po jedna kovarijata, počev od one sa najmanjim uticajem i praćena je promena OFV vrednosti u odnosu na puni model. U modelu su zadržane kovarijate čijim privremenim uklanjanjem dolazi do promene OFV za 6,63 jedinice ( $\chi^2=6,63$  za  $p<0,01$ ,  $df=1$ ). Brisanjem i/ili zadržavanjem određenih kovarijata na kraju ovog procesa dobijen je finalni farmakokinetički model. Treću fazu farmakokinetičke analize predstavljala je validacija finalnog modela. Validacija modela je izvršena eksternom metodom (koristeći novi set podataka i MC simulacijom).

Podaci pacijenata iz validacione grupe korišćeni su za procenu pouzdanosti i predvidivosti finalnog modela. Pristrasnost i preciznost dobijenog modela MPA CL/F procenjeni su izračunavanjem srednje greške predviđanja (MPE – engl. *Mean prediction error*) i rezidualne

srednje greške predviđanja (RMSE – engl. *Root mean squared error*) (215). Pored toga, model je i grafički procenjen (*scatter plots*) pri čemu je predstavljen odnos predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija (PRED naspram DV), individualnih predviđenih i izmerenih koncentracija (IPRED naspram DV), kao i odnos utvrđene rezidualne varijabilnosti i predviđenih koncentracija (WRES naspram PRED).

### 5.3.5. Monte Carlo simulacija

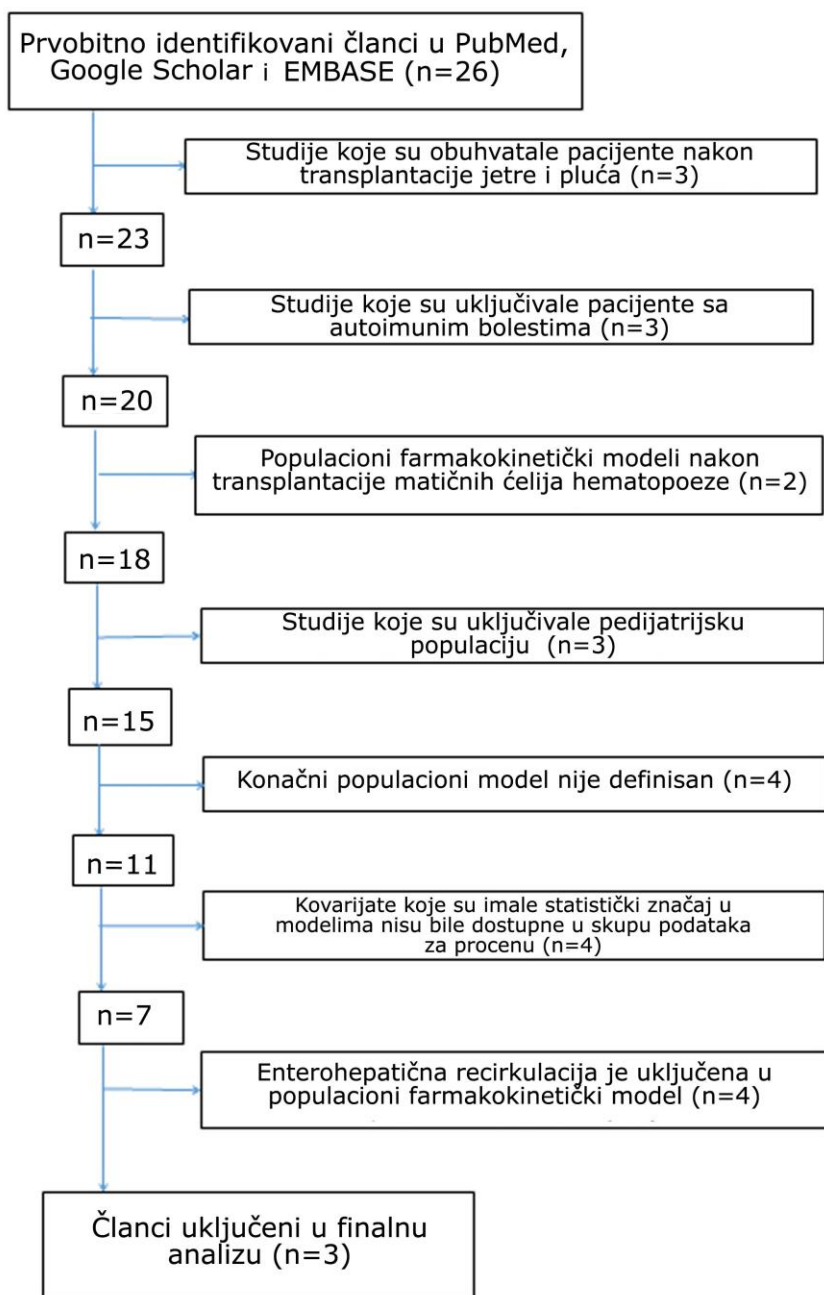
Da bi se potvrdila validnost populacionog modela MPA CL/F primenjen je i Monte Carlo numerički pristup (MC), pri čemu je dobijena jednačina (**model (1)**) procenjena u odnosu na modele sličnih studija. Provereno je kako se podaci sličnih studija uklapaju u dobijeni model, i obrnuto, kako dobijeni rezultati odgovaraju objavljenim modelima sličnih studija. Cilj MC analize je izračunavanje očekivanih vrednosti CL/F virtuelno simuliranih pacijenata (216).

U cilju pronalaženja sličnih populacionih farmakokinetičkih modela MPA kod odraslih pacijenata sa transplantiranim bubregom, pregledana je literatura objavljena na engleskom jeziku do oktobra 2019. godine. Pretražene su elektronske baze podataka: *PubMed*, *Google Scholar* i *EMBASE*. Korišćena je kombinacija ključnih reči (*mycophenolic acid*, *MPA*, *mycophenolate mofetil*, *MMF*, *enteric-coated mycophenolate sodium salt*, *EC-MPS*, *Cellcept*, *Myfortic*, *population pharmacokinetics*, *pharmacokinetic*, *NONMEM*, *renal transplantation*, *kidney transplantation*).

Inicijalno je pronađeno 26 članaka. Na osnovu pregleda naslova, sažetaka i ako je potrebno celog članka, odabrani su originalni naučni radovi koji opisuju populacione analize MPA kod odraslih pacijenata (>18 godina) sa presađenim bubregom.

Izuzete su studije sprovedene kod pacijenata nakon transplantacije jetre (217), pluća (218, 219), matičnih ćelija hematopoeze (220, 221), kod pacijenata sa autoimunim bolestima (16, 222, 223) i u pedijatrijskoj populaciji (190, 224, 225). Takođe, studije su isključene ukoliko konačni populacioni model nije formulisan (226-229), ukoliko kovarijate koje su bile značajne u nađenim modelima nisu bile dostupne u skupu podataka za procenu (230-233) i ukoliko je ECH inkorporirana u populacioni farmakokinetički model (74, 234-236).

U konačnu analizu uključene su 3 populacione farmakokinetičke studije koje su ispunjavale sve kriterijume (103, 114, 115) (**Slika 5**).



**Slika 5.** Izbor članaka i kriterijumi za isključivanje

U radu de Winter i sar. (115), nivo albumina u serumu izdvojio se kao najvažnija kovarijata u populacionom modelu MPA:

$$CL/F = 15,3 \times (ALB / 40)^{-0,69} \quad \text{(model 2)}$$

Slično tome, Staatz i sar. (114), pokazali su da CL/F MPA tokom prve nedelje nakon transplantacije bubrega zavisi od nivoa serumskog albumina:

$$CL/F = 25,4 \times [1 - 0,042 \times (ALB - 26)] \quad \text{(model 3)}$$

Populaciona farmakokinetička analiza sprovedena kod odraslih pacijenata sa presađenim bubregom u Kini (103) rezultirala je modelom:

$$CL/F = 0,0916 \times TM + 0,0417 \times Scr + 7,98 \quad \text{(model 4)}$$

gde je TM telesna masa, a Scr označava nivo serumskog kreatinina.

Numerička analiza dobijenog modela (1) i modela izabranih studija (2), (3), (4) izvršena je primenom MC simulacije. Na osnovu objavljenih kliničkih podataka, za MC simulaciju korišćene su nasumične vrednosti u opsegu standardnih devijacija ovih parametara za svaki analizirani model. Izvedeno je 1000 numeričkih simulacija za svaki analizirani model kako bi se dobio opseg očekivanih vrednosti MPA CL/F. MC analiza je izvršena korišćenjem softvera Matlab R2017b (*MathWorks*).

### 5.3.6. Neželjeni efekti

Podaci o vrsti, učestalosti i intezitetu ispoljenih neželjenih efekata MPA kod ispitivanih pacijenata prikupljeni su pomoću upitnika (**Prilog 1**) koji su razvili:

- *Calvin J. Meaney - Immunosuppressive Pharmacology Research Program, Translational pharmacology Core, NYS Center of Excellence in Bioinformatics and Life Sciences, P701 Ellicott Street, Buffalo, New York 14203, USA; Pharmacy Practice, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, 201 Kapoor Hall, Buffalo, New York 14214, USA;*
- *Ziad Arabi - Medicine, Nephrology Division; School of Medicine and Biomedical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA;*
- *Rocco C. Venuto - Medicine, Nephrology Division; School of Medicine and Biomedical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA; Erie County Medical Center, Buffalo, NY, USA;*

- *Joseph D. Consiglio - Biostatistics; School of Public Health, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA;*
- *Gregory E. Wilding - Biostatistics; School of Public Health, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA;*
- *Kathleen M. Tornatore - Immunosuppressive Pharmacology Research Program, Translational Pharmacology Core, NYS Center of Excellence in Bioinformatics and Life Sciences, 701 Ellicott Street, Buffalo, New York 14203, USA; Pharmacy Practice, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, 201 Kapoor Hall, Buffalo, New York 14214, USA; Medicine, Nephrology Division; School of Medicine and Biomedical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA (13).*

Uspostavljena je korespondencija sa profesorom Roccom C. Venutom koji je dao saglasnost za primenu upitnika (**Prilog 2**). Upitnik je formulisan sa ciljem da ispita neželjene efekte MPA, koji su grupisani prema prirodi simptoma u četiri grupe (gastrointestinalni (GIT), neurološki (CNS), estetski (EST) i ostali (raznovrsni-OST). Upitnik sadrži 18 pitanja koja su u korelaciji sa mogućim neželjenim efektima. Pacijenti su ocenjivali intenzitet svakog neželjenog efekta (0 → nema neželjenih efekata; 1 + → blagi do 3 + → teške manifestacije). Za svakog pacijenta izračunata je ukupna ocena neželjenih efekata sabiranjem pojedinačnih odgovora. Zatim je izračunat kumulativni skor kao količnik ukupne ocene svakog pacijenta i maksimalne ocene svih simptoma. Kumulativni skor pokazuje broj prisutnih neželjenih efekata sa odgovarajućom ocenom težine simptoma. Formirani su i skorovi neželjenih efekata (GIT, CNS, EST) za procenu neželjenih efekata koji se odnose na određene sisteme organa. Skorovi neželjenih efekata procenjeni su u odnosu na primenjeni oblik, pol pacijenta, dozni režim MPA, C<sub>SAL</sub>. Dodatno je ispitan uticaj prisutne koterapije, pola i primenjene doze MPA na učestalost pojedinih neželjenih efekata.

### **5.3.7. Matematičko modelovanje (Regresiona analiza)**

Da bi se analizirala povezanost ukupne i nevezane koncentracije MPA (koncentracije MPA u salivi), primenjena je metoda najmanjih kvadrata (engl. *least squares method*). Metoda najmanjih kvadrata je široko primenjivana statistička procedura za obradu eksperimentalno

dobijenih rezultata. Cilj ove metode je dobijanje jednačine regresione prave, koja najmanje odstupa od tačaka iz datog seta podataka (237). U analizu je uključen i nivo albumina (ALB), koji utiče na dispoziciju i farmakološki aktivnu koncentraciju MPA. Pored toga, analiziran je i uticaj eGFR, TM i starosti pacijenata. U cilju testiranja uticaja pomenutih parametara na  $C_{SAL}$ , predložen je sledeći matematički model:

$$y = y(\mathbf{x}; a_1, a_2, \dots, a_n).$$

Cilj metode najmanjih kvadrata je da minimizira funkciju:

$$\chi^2(a_1, a_2, \dots, a_n) = \sum_{i=1}^m (y_i - y(\mathbf{x}_i; a_1, a_2, \dots, a_n))^2$$

Gde su  $a_1, a_2, \dots, a_n$  nezavisne konstante. U našem slučaju  $n=3$ , ulazni vektor  $x$  uzima vrednosti  $C_P$ , ALB, TM, starost i eGFR, a izlazni  $y$  predstavlja  $C_{SAL}$ . Za formulisanje modela uzeto je u obzir  $n=77$  poznatih parametara ( $C_{SAL}$ ,  $C_P$ , TM...) dobijenih u prethodnom istraživanju. Validacija dobijenih modela sprovedena je primenom MC analize koristeći podatke pacijenata iz validacione grupe ( $n=23$ ). U te svrhe korišćen je softver Matlab R2017b (*MathWorks*).

### 5.3.8. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu podataka korišćeni su programi SPSS (verzija 20) i *Microsoft Office Excel 2003*. Distribucija vrednosti kvantitativnih varijabli izražena je u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije (SD), medijane i interkvartilne razlike. Kvalitativni podaci prikazani su apsolutnim i relativnim brojevima (brojem pacijenata uz procenat).

*Studentov t-test* i *ANOVA* test su korišćeni za poređenje dve, odnosno više grupa kada je zadovoljena normalnost distribucije podataka. Suprotno, *Mann-Whitney U* test i *Kruskal Wallis* test su primenjeni u slučajevima nepravilne distribucije podataka za poređenje dve ili više grupa. Za procenu uticaja pola, prisutne koterapije i doze MPA na učestalost individualnih neželjenih efekata korišćen je  $\chi^2$ -test. Statistička značajnost je utvrđena za vrednost  $p < 0,05$ . Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

## 6. Rezultati

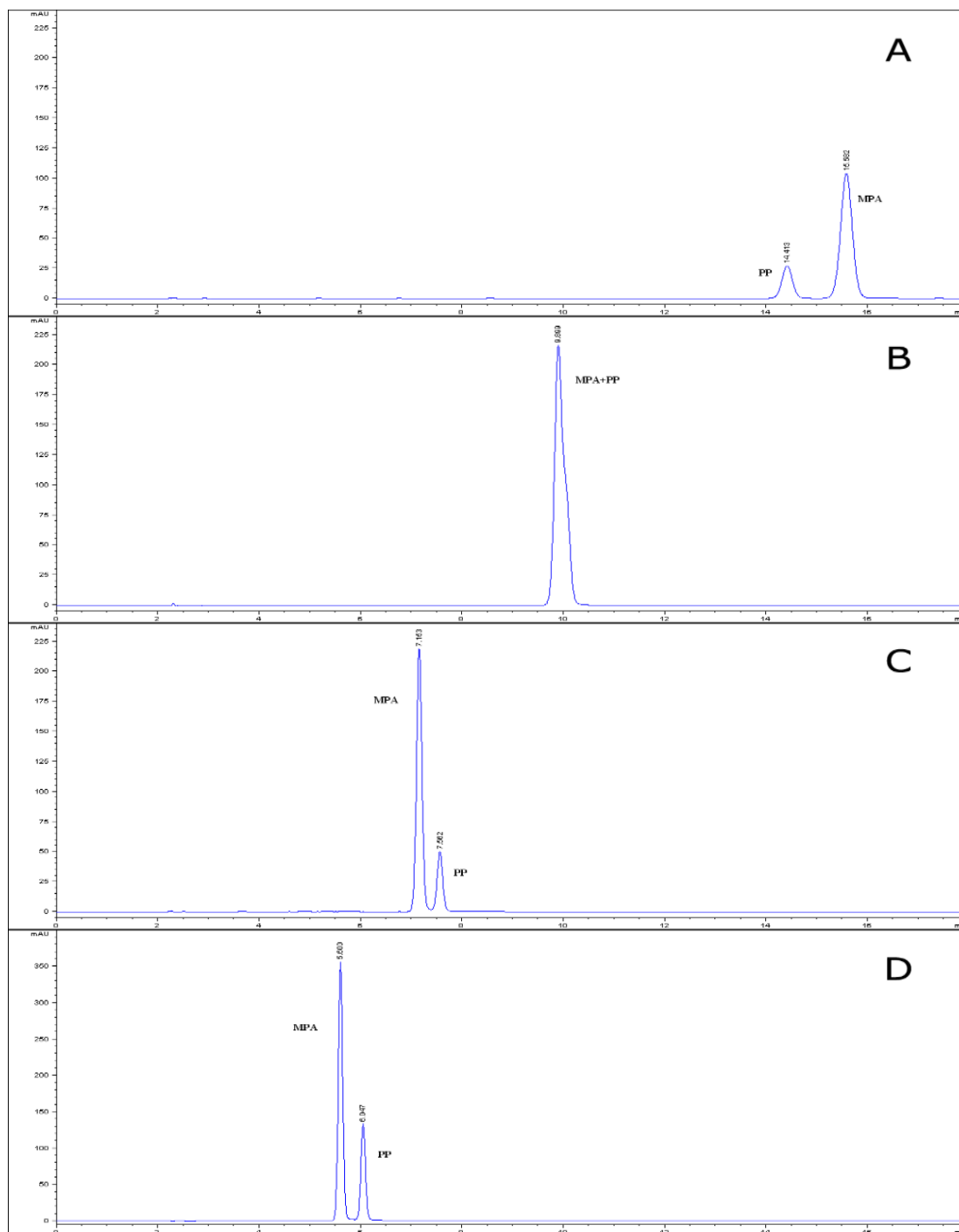
### 6.1. Razvoj HPLC metode

Proces optimizacije metode obuhvatio je ispitivanje varijabli koje mogu uticati na hromatografsko ponašanje MPA.

Odabir hromatografske kolone izvršen je na osnovu osobina (pre svega, lipofilnosti) MPA. Mikofenolna kiselina je trobazna kiselina koju karakterišu dve  $pK_a$  konstante,  $pK_{a1} = 4,6$  i  $pK_{a2} = 8,5$  koje odgovaraju karboksilnoj i fenolnoj grupi (238). Pravidni koeficijent raspodele ( $\log P$ ) iznosi 1,6 (238). S obzirom na to da je MPA slaba kiselina, njena lipofilnost se smanjuje porastom  $pH$  vrednosti rastvora. Pri vrednostima  $pH$  većim od 8,5 dominantan je jonizovani oblik (preko 50%), dok je lipofilnost MPA izražena pri  $pH$  vrednosti manjoj od 8,5. Na osnovu navedenih osobina doneta je odluka da se za određivanje koncentracije MPA koristi reverzno-fazna (RP) C18 kolona. Među dostupnim kolonama izabrana je Bakerbond-BDC RP-C18 kolona, 250 x 4,6mm, veličine čestica 5 $\mu$ m, koja omogućava relativno brzu analizu i zadovoljavajuću efikasnost i simetriju pikova.

U procesu razvoja metode ispitivan je uticaj sastava neorganske faze. Ispitivani su voda, fosforna kiselina, acetatni i fosfatni pufer. Dodatak fosfatnog pufera (dobijen mešanjem 10mM ortofosforne kiseline i 1M NaOH) značajno je poboljšao simetriju pikova ispitivanih supstanci. Koncentracija pufera nije pokazala značajan uticaj na retencione parametre. Uticaj  $pH$  vrednosti neorganske faze ispitivan je u opsegu 2,0–4,0. Pri  $pH > 4,0$  nije dolazilo do separacije, dok je  $pH$  neorganske faze  $< 2,0$  produžavao trajanje analize. Pri  $pH$  vrednosti neorganske faze od 2,5 dobijeni su pikovi najbolje simetrije (0,93 za MPA i 0,95 za PP) i najmanje širine (0,0933 min za MPA i 0,0967 min za PP), pa je ova  $pH$  vrednost i izabrana.

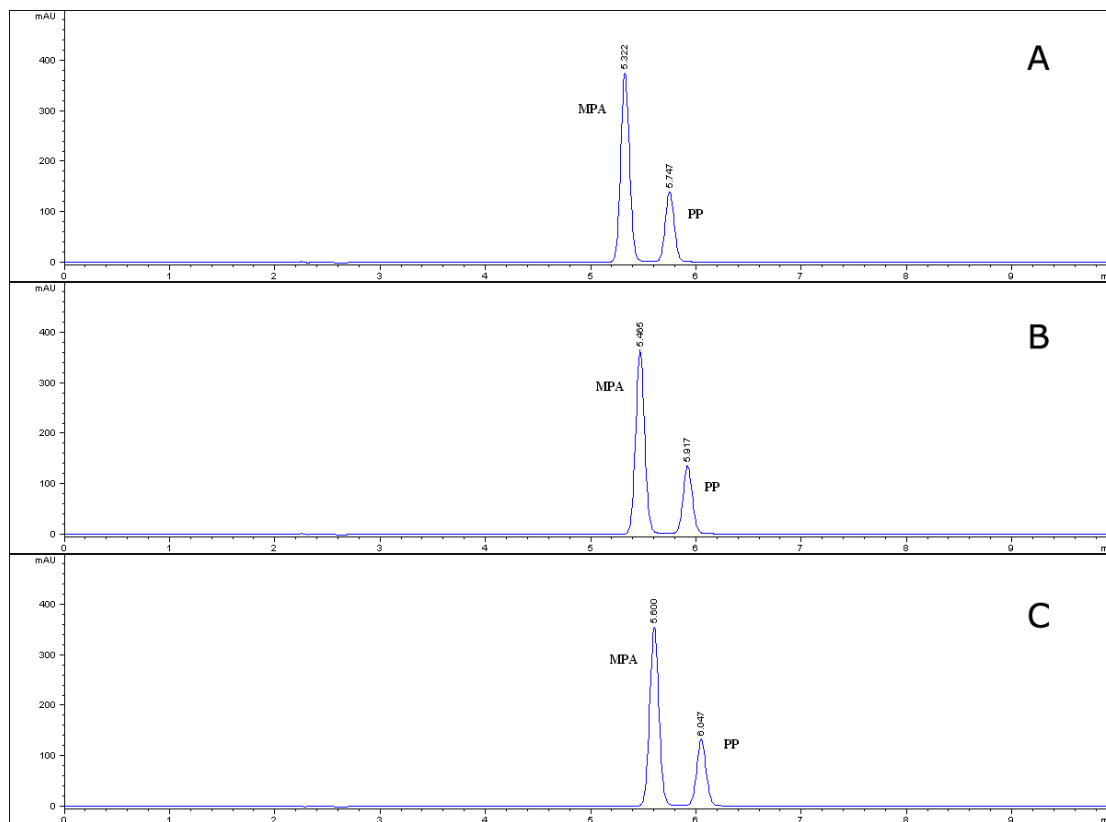
Uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi na razdvajanje standarda MPA i PP ispitivan je u opsegu od 20 do 50% pri protoku mobilne faze 1mL/min. Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi  $\leq 35\%$ , uslovljavao je produženje vremena analize ( $> 15$  minuta). Sa druge strane, 40% acetonitrila nije omogućilo adekvatnu separaciju. Potpuno razdvajanje standarda MPA i IS i zadovoljavajuća simetrija pikova postignuti su sa mobilnom fazom koja sadrži 50% acetonitrila (**Slika 6**).



**Slika 6.** Uticaj acetonitrila na razdvajanje standarda MPA  $c=25\mu\text{g/mL}$  i PP  $c=25\mu\text{g/mL}$ : ACN – 35% (A), ACN – 40% (B), ACN – 45% (C), ACN – 50% (D)

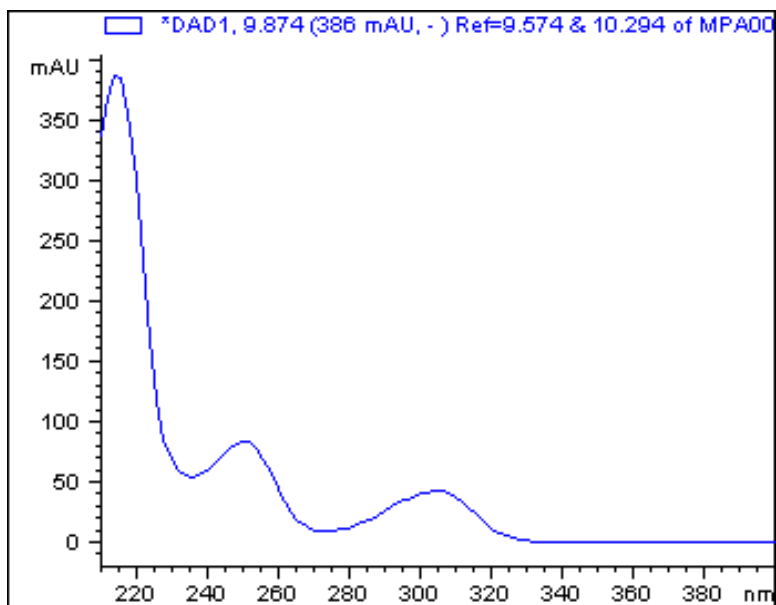
Uticaj temperature kolone je ispitivan u opsegu 30–40°C. S obzirom na to da je simetrija pikova bila lošija pri višim temperaturama, za hromatografsku analizu odabrana je temperatura kolone 30°C (Slika 7).





**Slika 7.** Uticaj temperature kolone na razdvajanje standarda MPA  $c=25\mu\text{g/mL}$  i PP  $c=25\mu\text{g/mL}$  kada je udeo acetonitrila 50% : 40°C (A), 35°C (B), 30°C (C)

Identifikacija MPA iz uzoraka izvršena je na osnovu retencionog vremena ( $t_R$  – vreme zadržavanja, engl. *Retention Time*) standardnog rastvora MPA, koje predstavlja konstantu za analit pri određenim hromatografskim uslovima (239). Kvantitativna analiza vršena je poređenjem intenziteta odgovora (visina ili površina pika na hromatogramu) MPA iz uzoraka sa intenzitetom odgovora standardnog rastvora MPA poznate koncentracije pod istim eksperimentalnim uslovima (240). Na osnovu spektra MPA koji je prikazan na **Slici 8**, detekcija i kvantifikacija MPA je vršena na talasnoj dužini 215nm. Koncentracija MPA izražena je u jedinicama  $\mu\text{g/mL}$ .

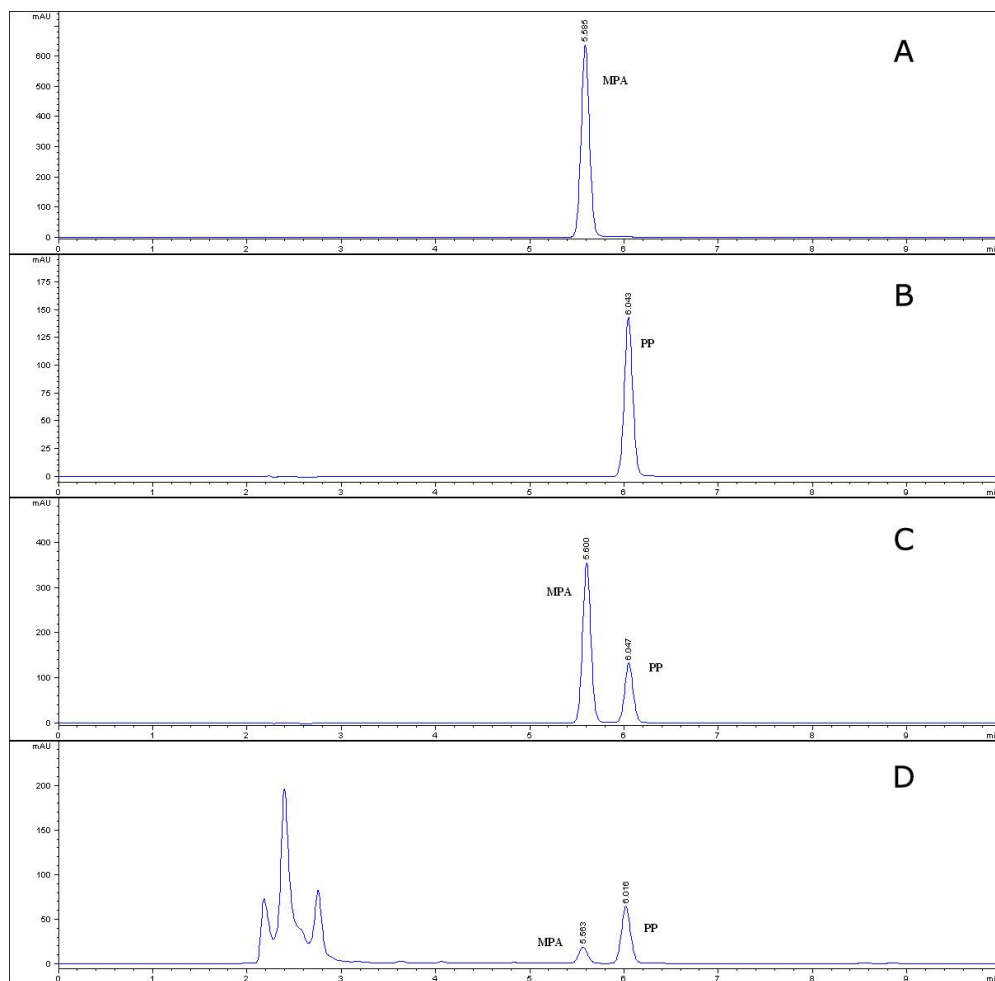


**Slika 8.** UV spektar mikofenolne kiseline

Analizom uticaja promene parametara na trajanje analize, razdvajanje, širinu i simetriju pikova, definisani su optimalni hromatografski uslovi:

Kolona	Bakerbond-BDC RP-C18, 250 x 4,6mm, veličina 5 $\mu$ m
Mobilna faza	10mM fosfatni pufer pH 2,5 – acetonitril (50:50, V/V)
Temperatura	30°C
Talasna dužina	215nm
Protok	1 mL min <sup>-1</sup>
Zapremina injektovanja	10 $\mu$ l

Na **slici 9** prikazani su dobijeni hromatogrami pri izabranim hromatografskim uslovima.



**Slika 9.** Dobijeni hromatogrami pri izabranim hromatografskim uslovima: Standard MPA  $c=50\mu\text{g/mL}$  (A), standard PP  $c=25\mu\text{g/mL}$  (B), smeša standarda MPA  $c=25\mu\text{g/mL}$  i PP  $c=25\mu\text{g/mL}$  (C), uzorak pacijenta sa presađenim bubregom opterećen internim standardom

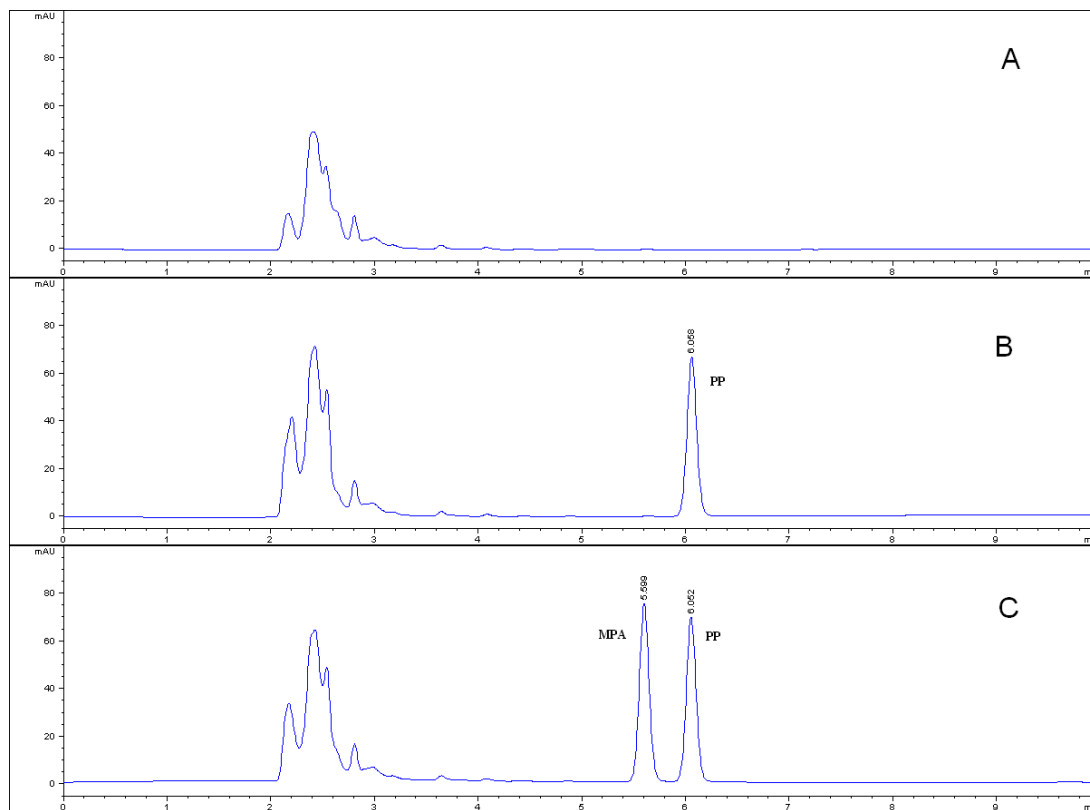
## 6.2. Validacija HPLC metode

Predložena metoda je validirana prema smernicama FDA i ICH (208, 209).

### 6.2.1. Ispitivanje selektivnosti HPLC metode

Selektivnost metode je procenjena praćenjem odgovora potencijalno interferirajućih supstanci pri optimalnim hromatografskim uslovima nakon injektovanja blank plazme, blank plazme sa PP i plazme koja je opterećena MPA i PP. Nisu uočeni interferirajući pikovi na

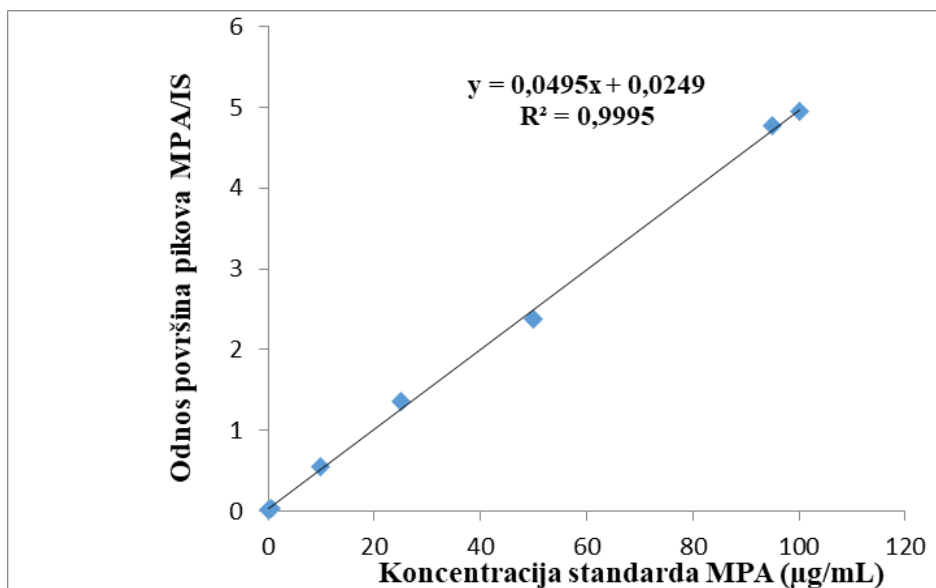
retencionim vremenima koji odgovaraju MPA i PP, što ukazuje na zaključak da je metoda odgovarajuće selektivnosti (**Slika 10**).



**Slika 10.** Provera selektivnosti metode: Blank plazma 10 zdravih dobrovoljaca (bez analita i internog standarda) (A), nulti uzorak plazme (blank plazma sa internim standardom)  $c=50\mu\text{g/mL}$  (B), plazma opterećena MPA  $c=25\mu\text{g/mL}$  i PP  $c=50\mu\text{g/mL}$  (C)

### 6.2.2. Ispitivanje linearnosti metode

Procena linearnosti metode vršena je na osnovu odnosa površine pikova MPA i IS u zavisnosti od koncentracije kalibratora. Kalibraciona kriva mikofenolne kiseline prikazana je na **Slici 11**.



**Slika 11.** Kalibraciona kriva mikofenolne kiseline

U **Tabeli 3** su prikazani parametri za procenu linearnosti, kao i opseg koncentracija.

**Tabela 3.** Rezultati regresione analize za procenu linearnosti

Parametri	MPA
<b>Opseg koncentracija</b>	0,2–100µg/mL
<b>y = ax + b</b>	y=0,0495x+0,0249
<b>r</b>	0,9995
<b>S<sub>a</sub></b>	0,0007
<b>S<sub>b</sub></b>	0,0403
<b>t</b>	0,6174

x – koncentracija mikofenolne kiseline

r – koeficijent korelacije

S<sub>a</sub> – standardna devijacija nagiba prave

S<sub>b</sub> – standardna devijacija odsečka

t – izračunata vrednost devijacije za odsečak

Regresionom analizom dobijenih podataka pokazano je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, sa koeficijentom linearnosti dobijene kalibracione krive 0,9995. Pored toga, analiza značajnosti odsečka na y osi izvršena je pomoću *Studentovog t-testa*, poređenjem izračunate i tabelarne *t* vrednosi ( $p=0,05$  i  $T_{tab}=2,37$ ). Rezultat poređenja ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima *t* i dužini odsečka na y osi funkcije  $y=0,0495x+0,0249$ .

### 6.2.3. Ispitivanje tačnosti i preciznosti metode

Metoda standarda je korišćena pri određivanju koncentracija MPA. Procena tačnosti i preciznosti vršena je u toku jednog dana (intradnevna) i tokom tri dana (interdnevna). Tačnost je izražena preko *recovery* vrednosti, a preciznost preko standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD). Intradnevna i interdnevna preciznost i tačnost merenja kontrolnih uzoraka na tri koncentraciona nivoa nakon 5 ponavljanja prikazane su u **Tabelama 4 i 5**.

**Tabela 4.** Intradnevna tačnost i preciznost merenja kontrolnih uzoraka

Pripremljena koncentracija (µg/mL)	P(MPA)/P(IS)	Izmerena koncentracija (µg/mL)	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,60	100,00
	0,03	0,55	91,04
	0,03	0,50	83,24
	0,03	0,53	89,02
	0,03	0,50	83,24
	<b>srednja</b>	<b>0,03</b>	<b>0,54</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>6,91</b>
<b>RSD %</b>			<b>7,74</b>
50	2,38	50,00	100,00
	2,44	51,20	102,40
	2,51	52,75	105,51
	2,51	52,75	105,51
	2,36	49,62	99,24
	<b>srednja</b>	<b>2,44</b>	<b>51,27</b>
<b>SD</b>	<b>0,07</b>	<b>1,48</b>	<b>2,96</b>
<b>RSD %</b>			<b>2,88</b>
95	4,78	95,00	100,00
	5,15	102,43	107,82
	4,67	92,81	97,70
	4,27	84,84	89,31
	4,27	84,84	89,31
	<b>srednja</b>	<b>4,63</b>	<b>91,99</b>
<b>SD</b>	<b>0,37</b>	<b>7,43</b>	<b>7,82</b>
<b>RSD %</b>			<b>8,08</b>

**Tabela 5.** Interdnevna tačnost i preciznost merenja kontrolnih uzoraka

Pripremljena koncentracija (µg/mL)	P(MPA)/P(IS)	Izmerena koncentracija (µg/mL)	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,60	100,00
	0,03	0,55	91,04
	0,03	0,50	83,24
	0,03	0,53	89,02
	0,03	0,60	100,00
	<b>srednja</b>	<b>0,03</b>	<b>0,56</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>7,29</b>
<b>RSD %</b>			<b>7,86</b>
50	2,38	50,00	100,00
	2,44	51,20	102,40
	2,51	52,75	105,51
	2,38	50,00	100,00
	2,36	49,62	99,24
	<b>srednja</b>	<b>2,41</b>	<b>50,71</b>
<b>SD</b>	<b>0,06</b>	<b>1,29</b>	<b>2,57</b>
<b>RSD %</b>			<b>2,53</b>
95	4,78	95,00	100,00
	4,50	89,44	94,14
	4,27	84,84	89,31
	4,78	95,00	100,00
	4,67	92,81	97,70
	<b>srednja</b>	<b>4,60</b>	<b>91,42</b>
<b>SD</b>	<b>0,22</b>	<b>4,32</b>	<b>4,55</b>
<b>RSD %</b>			<b>4,73</b>

Potvrđena je zadovoljavajuća tačnost i preciznost hromatografske metode, sa relativnom standardnom devijacijom nižom od 8,64. Tačnost metode kretala se u opsegu od 89,31% do 107,67%.

#### 6.2.4. Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Limiti detekcije i kvantifikacije dobijeni su eksperimentalnim putem. Utvrđeno je da limit detekcije (LOD – engl. *Limit of detection*) iznosi 0,025µg/mL, a limit kvantifikacije (LLOQ – engl. *Lower limit of quantitation*) MPA 0,2µg/mL. Kontrolni uzorci (n=5) pripremljeni u

koncentraciji 0,2 $\mu$ g/mL (LLOQ) korišćeni su za procenu intradnevne i interdnevne varijabilnosti, a dobijena tačnost i preciznost prikazana je u **Tabeli 6**. Sva merenja su bila u skladu sa ICH kriterijumom  $RSD \leq 20\%$ .

**Tabela 6.** Intradnevna i interdnevna tačnost i preciznost merenja LLOQ

<b>Pripremljena koncentracija (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>P(MPA)/P(IS)</b>	<b>Izmerena koncentracija (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Tačnost (R, %)</b>
intradnevna 0,2	0,01	0,20	100,00
	0,01	0,21	105,83
	0,01	0,22	110,00
	0,01	0,20	100,00
	0,01	0,25	122,50
<b>srednja</b>	<b>0,01</b>	<b>0,22</b>	<b>107,67</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>9,31</b>
<b>RSD %</b>			<b>8,64</b>
interdnevna 0,2	0,01	0,20	100,00
	0,01	0,17	85,50
	0,01	0,18	91,17
	0,01	0,20	100,00
	0,01	0,18	90,33
<b>srednja</b>	<b>0,01</b>	<b>0,19</b>	<b>93,40</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>6,40</b>
<b>RSD %</b>			<b>6,85</b>

### 6.2.5. Ispitivanje stabilnosti

Provera stabilnosti uzoraka izvršena je poređenjem koncentracija QCs na dva koncentraciona nivoa (LQC i HQC) nakon čuvanja na različitim temperaturama u različitom vremenskom periodu sa koncentracijama sveže pripremljenih kontrolnih rastvora. Rezultati su prikazani tabelarno. Odnos površine pikova MPA i IS, izmerene koncentracije MPA i tačnost merenja testiranih uzoraka QC pri testu kratkotrajne stabilnosti prikazani su u **Tabeli 7**. Isti parametri procenjeni su testom dugotrajne stabilnosti (**Tabela 8**), na autosempleru (**Tabela 9**) i nakon tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (**Tabela 10**).



**Tabela 7.** Ispitivanje kratkotrajne stabilnosti

Pripremljena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	P(MPA)/P(IS)	izmerena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,55	91,62
	0,04	0,62	103,18
	0,03	0,56	93,93
	<b>0,03</b>	<b>0,58</b>	<b>96,24</b>
	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>6,12</b>
<b>srednja</b>			<b>6,36</b>
95	5,04	100,13	105,40
	4,95	98,38	103,56
	5,35	106,33	111,92
	<b>5,11</b>	<b>101,61</b>	<b>106,96</b>
	<b>0,21</b>	<b>4,18</b>	<b>4,40</b>
<b>srednja</b>			<b>4,11</b>
<b>SD</b>			
<b>RSD %</b>			

**Tabela 8.** Ispitivanje dugotrajne stabilnosti

Pripremljena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	P(MPA)/P(IS)	izmerena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,60	100,00
	0,03	0,55	91,04
	0,03	0,49	82,08
	<b>0,03</b>	<b>0,55</b>	<b>91,04</b>
	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>8,96</b>
<b>srednja</b>			<b>9,84</b>
95	4,78	95,00	100,00
	4,67	92,81	97,70
	5,38	106,88	112,51
	<b>4,94</b>	<b>98,23</b>	<b>103,40</b>
	<b>0,38</b>	<b>7,57</b>	<b>7,97</b>
<b>srednja</b>			<b>7,71</b>
<b>SD</b>			
<b>RSD %</b>			

**Tabela 9.** Ispitivanje stabilnosti na autosempleru

Pripremljena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	P(MPA)/P(IS)	izmerena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,59	99,13
	0,03	0,52	86,13
	0,04	0,62	103,76
	<b>0,03</b>	<b>0,58</b>	<b>96,34</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>9,14</b>
<b>RSD %</b>			<b>9,49</b>
95	4,61	91,62	96,44
	4,35	86,45	91,00
	4,10	81,49	85,77
	<b>4,35</b>	<b>86,52</b>	<b>91,07</b>
<b>SD</b>	<b>0,26</b>	<b>5,07</b>	<b>5,34</b>
<b>RSD %</b>			<b>5,86</b>

**Tabela 10.** Ispitivanje stabilnosti nakon tri ponovljena ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja

Pripremljena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	P(MPA)/P(IS)	izmerena koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tačnost (R, %)
0,6	0,03	0,50	83,82
	0,03	0,55	92,49
	0,03	0,59	98,27
	<b>0,03</b>	<b>0,55</b>	<b>91,52</b>
<b>SD</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>7,27</b>
<b>RSD %</b>			<b>7,95</b>
95	5,32	105,73	111,30
	5,10	101,36	106,69
	4,90	97,38	102,51
	<b>5,11</b>	<b>101,49</b>	<b>106,83</b>
<b>SD</b>	<b>0,21</b>	<b>4,18</b>	<b>4,39</b>
<b>RSD %</b>			<b>4,11</b>

### 6.3. Rezultati populacione farmakokinetičke analize mikofenolne kiseline kod pacijenata sa presađenim bubregom

Prospektivna studija obuhvatila je 95 pacijenata (64 muškog i 31 ženskog pola) koji su lečeni na Klinici za nefrologiju, Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu. Karakteristike ispitivanih pacijenata prikazane su u **Tabeli 11**.

Pacijenti su podeljeni u dve grupe, radi populacione farmakokinetičke analize – grupa za građenje populacionog modela (70 pacijenata) i grupa za validaciju dobijenog modela (25 pacijenata). Starost i telesna masa ispitanika između grupa nisu pokazale statistički značajnu razliku (42,97 godine i 75,33kg u grupi za građenje modela naspram 43,53 godine i 75,16kg u grupi za validaciju).

**Tabela 11.** Karakteristike ispitivanih pacijenata

Karakteristike	Grupa za građenje modela srednja vrednost (opseg)	Grupa za validaciju srednja vrednost (opseg)
Broj pacijenata	70	25
Broj posmatranja	90	25
Pol (muški/ženski)	48/22	16/9
Diabetes	15	4
Tip donora (živi/kadaverični)	49/21	20/5
MPA+takrolimus	61	23
MPA+ciklosporin A	9	2
MPA+prednizon>10mg	30	9
MPA+omeprazol	36	14
MPA+bisoprolol	21	7
MPA+karvedilol	24	8
MPA+nifedipin	23	11
Masa (kg)	75,33 (53–113)	75,16 (51–117)
Starost (godine)	42,97 (21–70)	43,53 (26–68)
Vreme nakon transplantacije (meseci)	51,14 (12–204)	45,28 (12–96)
Ukupna MPA doza (mg/dan)	1028,57 (720–1440)	943,2 (540–1440)
MPA koncentracija (µg/mL)*	3,61 (0,14–19,13)	4,06 (0,08–15,21)
Hemoglobin(g/L)	139,27 (97–186)	139,4 (114–173)
AST (U/L)	23,87 (9–202)	23,26 (10–51)

<b>ALT (U/L)</b>	31,48 (0,9–423)	27,63 (10–81,2)
<b>Serumski kreatinin (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	141,43 (66–307)	144,11 (86,9–261,9)
<b>Klirens kreatinina (mL/min)</b>	67,71 (21,24–144,76)	64,61 (42,08–121,73)
<b>Albumin (g/L)</b>	42,11 (36–49)	42,36 (37–49)
<b>Urea (mmol/L)</b>	8,4 (2,8–19,7)	7,91 (3,4–15,7)
<b>Le (G/L)</b>	7,9 (3,7–16,6)	8,2 (2,9–12,3)

\* Koncentracije MPA u plazmi ( $C_0$ ) određene su validiranom HPLC metodom.

MPA – mikofenolna kiselina; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; Le – leukociti

Za populacioni farmakokinetički pristup korišćene su minimalne plazma koncentracije MPA. Pacijentima su koncentracije MPA određivane tokom biohemijskog i kliničkog monitoringa pri čemu su praćeni biohemijski parametri važni za procenu funkcije grafta i kontrolu rizika od odbacivanja (koncentracija serumskog albumina, uree, kreatinina, aktivnost enzima aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze).

Populaciona farmakokinetička analiza podataka obavljena je primenom NONMEM softvera, subrutine ADVAN4/TRANS3. Za opisivanje farmakokinetike MPA je korišćen dvoprostorni model sa resorpcijom prvog reda i  $t_{lag}$ .

U prvoj fazi ove analize definisan je bazični model sa tipičnim populacionim vrednostima farmakokinetičkih parametara: oralnog klirensa ( $CL/F$ ), oralnog volumena distribucije ( $Vd/F$ ), oralnog volumena distribucije u stanju ravnoteže ( $VSS/F$ ), oralnog klirensa periferne distribucije ( $Q/F$ ), konstante brzine resorpcije ( $K_{res}$ ), vremena odlaganja pojavljivanja leka u sistemskoj cirkulaciji ( $t_{lag}$ ). Objektivna vrednost funkcije (OFV) bila je 307,523.

Druga faza izrade populacionog modela sastojala se od serije uzastopnih univarijantnih modela koji su sukcesivno uključivali različite kovarijate (**Tabela 12**). Uključivanjem kovarijata (starost pacijenta, ukupna dnevna doza MPA, klirens kreatinina, nivo serumskog albumina, tip i pol donora i prisutna koterapija – primena nifedipina i takrolimusa) u bazični model razvijen je puni populacioni model MPA, sa značajno manjom vrednošću OFV – 261,383. Ostale kovarijate (telesna masa, pol, vreme nakon transplantacije, nivo aspartat i alanin transaminaze, primena omeprazola, ciklosporina i prednizona) nisu pokazale značaj za uključivanje u puni model.

**Tabela 12.** Poređenje vrednosti OFV bazičnog modela, univarijantnih modela i punog farmakokinetičkog modela MPA

MODEL	OFV	Razlika u OFV	P-vrednost **	Zaključak
<b>BAZIČNI MODEL</b>				
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1))	<b>307,523</b>			
<b>UNIVARIJANTNI MODELI</b>				
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_2$ * TM	307,520	0,003	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_3$ * GODINE	285,725	21,798	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_4$ * POL	307,523	0	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_5$ * DD	287,576	19,947	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_6$ * CL <sub>CR</sub>	281,158	26,365	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_7$ * ALB	274,899	32,624	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_8$ * VREME	307,324	0,199	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_9$ * TIP donora	284,684	22,839	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{10}$ * POL donora	300,516	7,007	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{11}$ * AST	306,049	1,474	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{12}$ * ALT	305,974	1,549	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{13}$ * OME	307,523	0	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{14}$ * NIF	283,482	24,041	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{15}$ * CsA doza	307,422	0,101	>0,05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{16}$ * TAC doza	292,045	15,478	<0,05	SZ
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{17}$ * PRE doza	307,523	0	>0,05	NS ‡
<b>PUNI MODEL</b>				
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_3$ * GODINE + $\theta_5$ * DD + $\theta_6$ * CL <sub>CR</sub> $\theta_7$ * ALB $\theta_9$ * TIP donora $\theta_{10}$ * POL donora $\theta_{14}$ * NIF $\theta_{16}$ * TAC doza			<b>261,383</b>	

CL – klirens (L/h);

$\theta_1$  – tipična, populaciona vrednost klirensa;

ETA (1) – interindividualna varijabilnost klirensa;

$\theta_2$  -  $\theta_{17}$  – izabrane kovarijate;

TM – telesna masa (kg);

POL – uzima vrednost 1 za muškarce, 0 za žene;

DD – ukupna dnevna doza MPA (mg/dan);

CL<sub>CR</sub> – klirens kreatinina (L/h);

ALB – nivo serumskog albumina;

Vreme – broj meseci nakon transplantacije bubrega;

TIP donora – uzima vrednost 1 za živu transplantaciju i 0 za kadaveričnu;

POL donora – uzima vrednost 1 za muškarce, 0 za žene;

AST – aspartat aminotransferaza;

ALT – alanin aminotransferaza;

OME i NIF – koterapija omeprazolom i nifedipinom, (uzimaju vrednost 1 kada jesu i 0 kada nisu prisutni);

CsA doza – doza ciklosporina A; uzima vrednost 1 ako je dnevna doza  $\geq 2$ mg/dan ili 0 ako  $< 2$ mg/dan;

TAC doza – doza takrolimusa; uzima vrednost 1 ako  $> 3$ mg/dan ili 0 ako  $\leq 3$ mg/dan;

PRE doza – doza prednizona; uzima vrednost 1 ako  $\geq 10$ mg/dan ili 0 ako  $< 10$ mg/dan

\*\*P – vrednost OFV razlike između bazičnog i testiranog modela

‡ NS: bez statističkog značaja

SZ: statistički značajno

Finalni populacioni farmakokinetički model MPA dobijen je postupkom „isključivanja unazad“ kovarijata koje su imale nedovoljnu značajnost u punom modelu. Na taj način dobijene su kovarijate koje su ispunile neophodne statističke kriterijume za finalni model: godine starosti, ukupna dnevna doza MPA i koterapija nifedipinom.

Finalni model predstavljen je sledećom jednačinom:

$$CL/F (L/h) = 0,741 + 0,0804 \times \text{starost} + 0,00165 \times DD + 1,12 \times NIF \quad (\text{model 1})$$

DD – dnevna doza MPA i

NIF – prisustvo nifedipina u terapiji

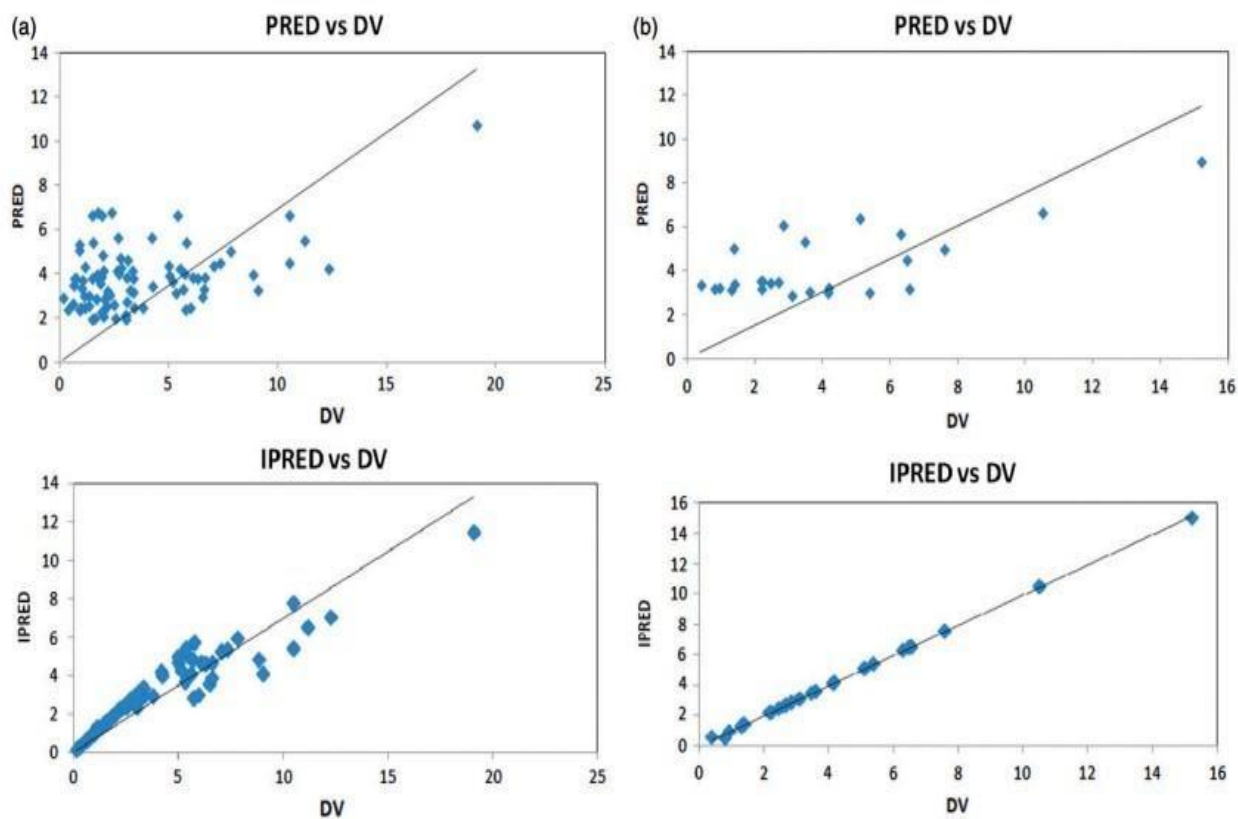
Procenjene vrednosti populacionih farmakokinetičkih parametara sa izraženom standardnom greškom finalnog modela prikazane su u **Tabeli 13**. Interindividualna varijabilnost CL/F smanjila se sa 48,3% na 25,1%.

**Tabela 13.** Procenjene vrednosti farmakokinetičkih parametara finalnog modela

Parametri	Procenjena vrednost (Standardna greška)
Oralni klirens (L/h) CL/F	0,741 (0,037)
Oralni volumen distribucije (L) Vd/F	0,653 (0,073)
Oralni volumen distribucije u stanju ravnoteže (L) VSS/F	801 (174,13)
Oralni klirens periferne distribucije (L/h) Q/F	52,1 (4,102)
Konstanta brzine resorpcije (h <sup>-1</sup> ) K <sub>res</sub>	4,07 (0,42)
Vreme odlaganja (h) t <sub>lag</sub>	0,21 (0,03)
Interindividualna varijabilnost	
Oralni klirens (L/h) CL/F	0,061 (0,013)
Oralni volumen distribucije (L) Vd/F	0,059 (0,017)
Oralni volumen distribucije u stanju ravnoteže (L) VSS/F	154,04 (23,34)
Oralni klirens periferne distribucije (L/h) Q/F	4,67 (1,46)
Konstanta brzine resorpcije (h <sup>-1</sup> ) K <sub>res</sub>	2,08 (0,1)
Vreme odlaganja (h) t <sub>lag</sub>	0,12 (0,024)
Intraindividualna varijabilnost σ <sup>2</sup>	0,123 (0,023)

Prediktivna sposobnost dobijenog finalnog modela ispitana je uključivanjem podataka pacijenata validacione grupe (karakteristike ove grupe date su u **Tabeli 9**). Za prikaz rezultata

korišćeni su grafici zavisnosti (*scatter-plots*) između predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija (PRED naspram DV), individualnih predviđenih i izmerenih koncentracija (IPRED naspram DV), kao i utvrđene rezidualne varijabilnosti i predviđenih koncentracija (WRES naspram PRED) (Slika 12 i 13).

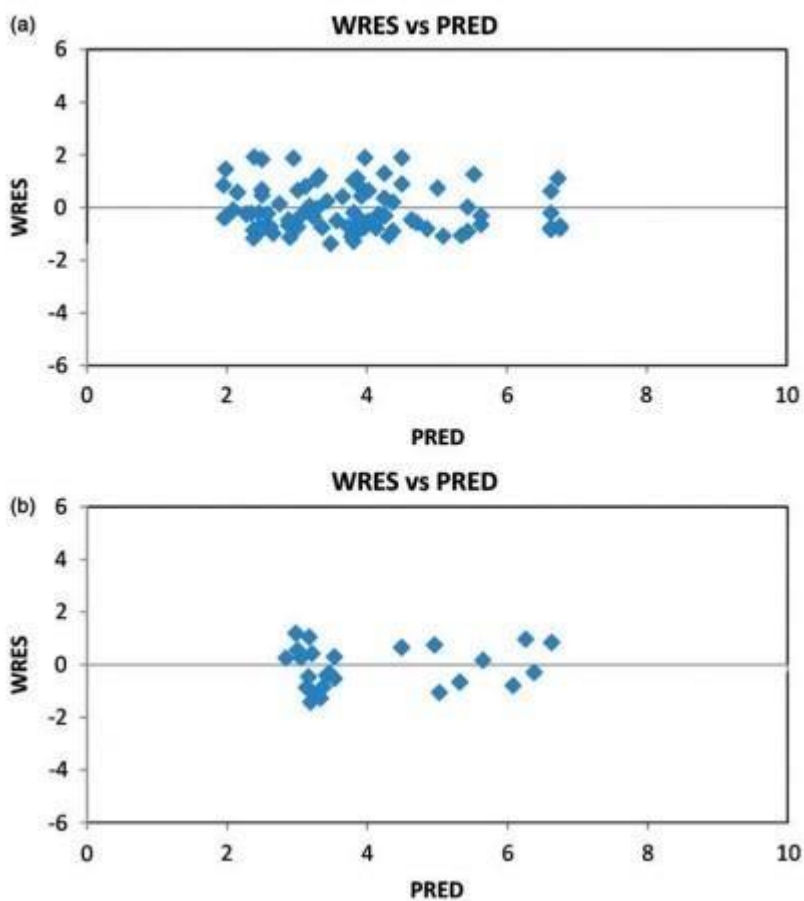


PRED – predviđena koncentracija MPA

DV – izmerena koncentracija MPA

IPRED – individualna predviđena koncentracija MPA za datog pacijenta

**Slika 12.** Odnos predviđenih (PRED) i individualnih predviđenih koncentracija (IPRED) prema izmerenim koncentracijama MPA primenom finalnog modela u ispitivanoj grupi (a); u validacionoj grupi (b)



WRES – rezidualna varijabilnost između predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija MPA  
 PRED – predviđena koncentracija MPA

**Slika 13.** Odnos utvrđene rezidualne varijabilnosti (WRES) i predviđenih koncentracija (PRED) MPA primenom finalnog modela u ispitivanoj grupi (a); u validacionoj grupi (b)

Grafički prikaz pokazuje visok stepen slaganja između PRED naspram DV i IPRED naspram DV, kao i to da postoji uniformna raspodela oko prave  $y=x$ . Za odnos WRES naspram PRED je dobijena ravnomerna raspodela WRES oko prave  $y=0$  (odstupanja su u opsegu od -2 do 2).

Preciznost i pristrasnost dobijenog finalnog populacionog modela MPA, kao i njegova validnost procenjeni su izračunavanjem grešaka u predviđanju (**Tabela 14**).



**Tabela 14.** Izračunate greške za procenu preciznosti i validnosti finalnog modela MPA

Greška	Finalni model
Srednja greška predviđanja (MPE)	0,1172 (-0,8522–1,0866)
Rezidualna srednja greška predviđanja (RMSE)	2,4256 (1,6096–3,0293)

Rezultati populacionog farmakokinetičkog pristupa u sagledavanju farmakokinetičke varijabilnosti MPA objavljeni su u časopisu *Renal Failure* 2015. godine (241).

### 6.3.1. Monte Carlo simulacija

Nakon pretraživanja dostupne literature (objavljene do oktobra 2019. godine) u eksternu evaluaciju uključena su tri farmakokinetička populaciona modela MPA (103, 114, 115). Jedna studija (103) rađena je kod pacijenata azijske rase, a ostale kod kavkaske rase. Uporedni prikaz modela dat je **Tabelom 15**.

**Tabela 15.** Uporedni podaci izabranih studija

Model	Albumin (g/L)	Telesna masa (kg)	Scr (μmol/L)	Starost (godine)	MPA doza (mg/dan)	Jednačina/model
1	42,11 (36–49)	75,33 (53–113)	141,43 (66–307)	42,97 (21–70)	1028,57 (720–1440)	$CL/F = 0.741 + 0.0804 \times \text{starost} + 0.00165 \times DD + 1.12 \times NIF$
2	34 (25–40)	79 (44–112)	48 (10–154)*	50 (19–75)	720 (288–1584)	$CL/F = 15.3 \times (ALB/40)^{-0.69}$
3	26 (6–44)	81 (37–134)	150 (60–1030)	50 (19–72)	1440 (720–1440)	$CL/F = 25.4 \times [1 - 0.042 \times (ALB - 26)]$
4	33,5±5,9 (4,8–49)	58,0±9,33 (39–82)	141,2±128,5 (61–915)	41,4±11,2 (18–68)	1296 (360–1800)	$CL/F = 0.0916 \times TM + 0.0417 \times Scr + 7.98$

MPA – mikofenolna kiselina; CL/F – oralni klirens (L/h); DD – MPA dnevna doza; NIF – koterapija nifedipinom; ALB – nivo serumskog albumina; TM – telesna masa; Scr – nivo serumskog kreatinina

\*klirens kreatinina (mL/min)

Za modele (1), (2), (3) rezultati su izraženi kao medijana (i opseg), a za model (4) kao srednja vrednost±standardna devijacija (i opseg)

U modelu Staatz i sar. vrednosti CL/F razlikovale su se u zavisnosti od primenjenog kalcineurinskog inhibitora (114). Model (3) je prepoznat kao optimalan za validaciju, zbog takrolimusa koji predstavlja CNI izbora kod većine pacijenata koji su učestvovali u našoj populacionoj farmakokinetičkoj analizi.

Determinacija MPA plazma koncentracije u svim izabranim studijama vršena je HPLC metodom, a za opis sistema je korišćen dvoprostorni farmakokinetički model, što je u skladu sa našim pristupom. Značajan uticaj na CL/F MPA u dve studije (114, 115) ostvario je nivo albumina, dok su telesna masa i koncentracija serumskog kreatinina prepoznate u modelu Yu i sar. (103).

Ograničenje izabranih studija je što su analizirale podatke iz ranog posttransplantacionog perioda, uglavnom do mesec dana nakon presađivanja bubrega (103, 114, 115), dok su u našem istraživanju učestvovali pacijenti kod kojih je transplantacija obavljena pre najmanje godinu dana. Drugo ograničenje izbora modela za poređenje odnosi se na nifedipin koji je identifikovan kao značajna kovarijata u dobijenom modelu, a pacijenti u odabranim studijama nisu imali nifedipin u sklopu antihipertenzivne terapije.

### Validacija dobijenog modela primenom Monte Carlo simulacije

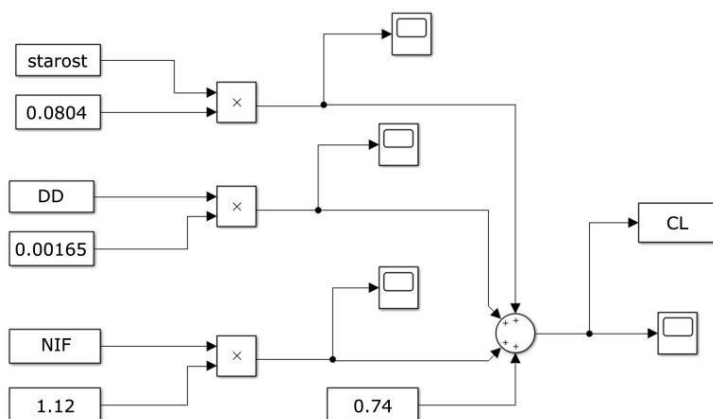
Za validaciju dobijenog modela primenjen je MC simulacioni pristup koristeći modele izabranih sličnih studija. Za svaku ulaznu varijablu prikazan je opseg simulacije (**Tabela 16**). Granice simulacije dobijene su na osnovu izračunatih srednjih vrednosti i standardnih devijacija.

**Tabela 16.** Opseg simulacije varijabli izabranih modela

Model	1	2	3	4
Starost (godine)	47,3±10,2	/	/	
Telesna masa (kg)	69,36±14,4	/	/	58±9,33
Scr (µmol/L)	129,23±21,5	/	/	141,2±128,5
Albumin (g/L)	41,7±2,65	32,5±7,5	25±19	

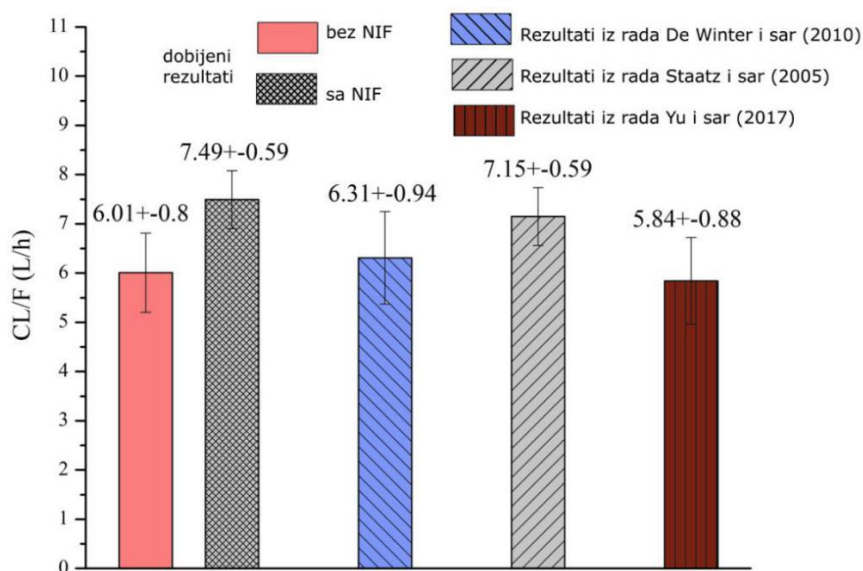
Scr – koncentracija serumskog kreatinina

Jednostavna simulaciona šema za model (1) napravljena je u softveru Matlab R2017b (**Slika 14**). Svaka promenljiva sa slike 14 nasumično se generiše 1000 puta u opsegu njene standardne devijacije za 1000 simulacija. Izlazne vrednosti iz simulacija (CL/F) se dalje predstavljaju u vidu srednje vrednosti i standardne devijacije na osnovu 1000 dobijenih numeričkih podataka za CL/F.



**Slika 14.** Šema simulacije modela (1)

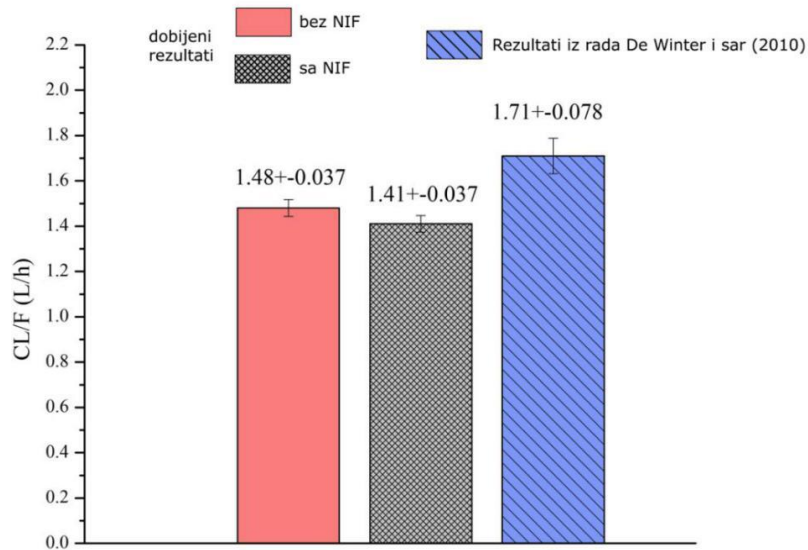
**Slika 15** prikazuje očekivane vrednosti MPA CL/F dobijene testiranjem modela (1), koristeći objavljene podatke izabranih studija (103, 114, 115).



**Slika 15.** Testiranje na modelu (1)

Testiranjem na modelu (1) primenom MC metode, dobijene su najverovatnije vrednosti MPA CL/F u rasponu od  $5,84 \pm 0,88$  (podaci iz Yu i sar. (103)) do  $7,49 \pm 0,59$  (podaci ispitivanih pacijenata na terapiji NIF). Prisustvo NIF povećava vrednosti MPA CL/F.

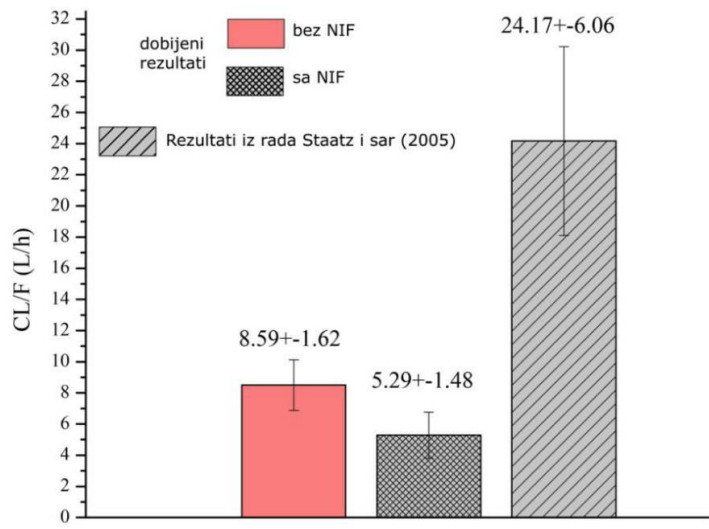
Dalje, rezultati dobijeni ovim istraživanjem testirani su na modelu (2) (115) i upoređeni sa rezultatima inicijalnog modela (2) (**Slika 16**).



**Slika 16.** Testiranje na modelu (2)

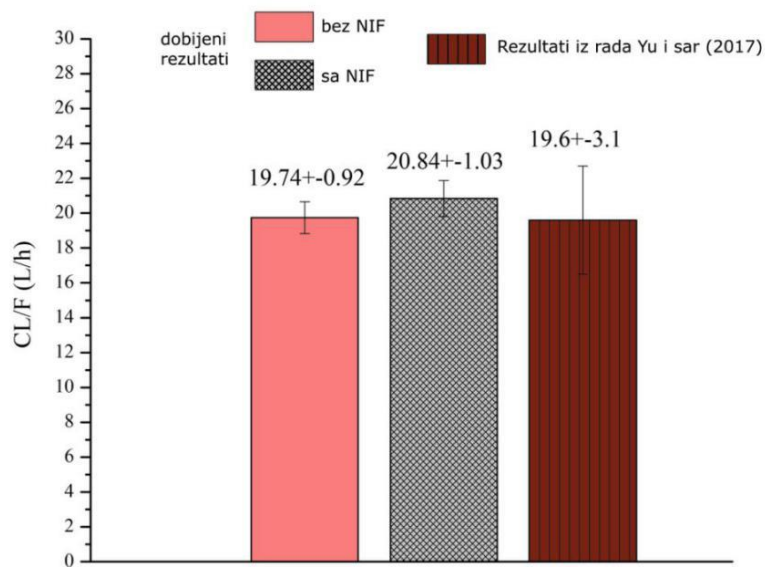
Koristeći podatke ove dve studije, uočena je mala razlika između numerički dobijenog  $CL/F$ , sa napomenom da je razlika bila manja u grupi pacijenata koji nisu imali nifedipin u terapiji.

Slične promene u vrednostima  $CL/F$  primećene su testiranjem dobijenih rezultata na modelu (3). Pokazane su značajne razlike u vrednostima  $MPA$   $CL/F$  kod pacijenata koji su imali nifedipin u antihipertenzivnoj terapiji (**Slika 17**).



**Slika 17.** Testiranje na modelu (3)

Na **Slici 18** predstavljen je model (4) i poređenje dobijenih rezultata sa podacima iz originalne studije (103).

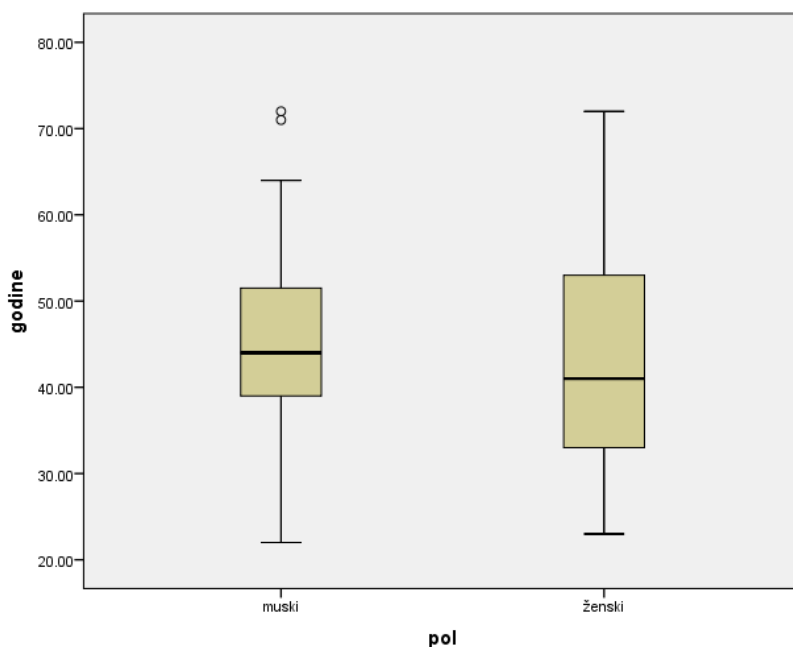


**Slika 18.** Testiranje na modelu (4)

Na slici se uočava da su vrednosti CL/F pacijenata uključenih u ovo istraživanje slične rezultatima koje su dobili Yu i sar. (103). Uticaj prisustva nifedipina na vrednosti CL/F u ovom modelu predstavljen je grafikom.

## 6.4. Procena neželjenih efekata

U istraživanju je učestvovalo 77 pacijenata sa transplantiranim bubregom, 53 (68,83%) muškog i 24 (31,17%) ženskog pola. Prosečna starost ispitivane populacije bila je  $44,38 \pm 10,37$  godina. Starosna struktura prema polu se nije statistički značajno razlikovala (muškarci:  $44,89 \pm 9,70$  naspram žene:  $43,08 \pm 11,85$ ) (**Slika 19**).



**Slika 19.** Distribucija starosti ispitanika

Presadivanje bubrega sa živog donora obavljeno je kod 59 (76,62%) pacijenta, a kadaveričnoj transplantaciji bilo je podvrgnuto 18 (23,38%) pacijenata. Prosečno vreme nakon transplantacije iznosilo je  $78,25 \pm 46,55$  meseci. Demografske karakteristike pacijenata, njihovi biohemijski i hematološki parametri prikazani su u **Tabeli 17**.

**Tabela 17.** Demografske karakteristike pacijenata

Pol		Muški (n=53)	Ženski (n=24)
Starost (godine)		44,89±9,70	43,08±11,85
Vreme nakon transplantacije (meseci)		80,75±49,34	73,88±35,37
Tip donora	živi	40 (75,47%)	19 (79,17%)
	kadaverični	13 (24,53%)	5 (20,83%)
Broj lekova u terapiji	<5	6 (11,32%)	3 (12,50%)
	≥5	47 (88,68%)	21 (87,50%)
Doza MPA	720mg	37 (69,81%)	12 (50,0%)
	>720mg	16 (30,19%)	12 (50,0%)
Doza prednizona	<10mg	38 (71,70%)	15 (62,50%)
	≥10mg	15 (28,30%)	9 (37,50%)
CNI	TAC	45 (84,90%)	23 (95,83%)
	CsA	8 (15,10%)	1 (4,17%)
Hematokrit	<referentne	13 (24,53%)	11 (45,83%)
	referentne	40 (75,47%)	11 (45,83%)
Albumin (g/L)	>referentnih	0 (0,0%)	2 (8,33%)
		39,75±0,25	38,95±0,27
Le (G/L)		8,3±1,67	7,0±1,88
Serumski kreatinin (µmol/L)		132,55±19,35	126,78±23,69
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )		55,09±11,37	49,95±10,45

MPA – mikofenolna kiselina; CNI – kalcineurinski inhibitori; TAC – takrolimus; CsA – ciklosporin A; Le – leukociti; eGFR – glomerularna filtracija

Prikaz doze, plazma koncentracija i vrste MPA predstavljen je **Tabelom 18.**

**Tabela 18.** Formulacija, doza, koncentracija C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D odnos MPA u odnosu na pol

	Pol pacijenta		Z	p
	Muški (n=53)	Ženski (n=24)		
EC-MPS/MMF	47/6	21/3		
Doza MPA (mg)**	849,06±212,91	990±304,92	-2,014	0,044*
	720 (720-1440)	900 (720-1440)		
Koncentracija C <sub>0</sub> MPA (µg mL <sup>-1</sup> )	2,71±2,26	4,31±3,19	-2,082	0,037*
	2,10 (0,08-12,33)	3,05 (1,36-11,21)		
C <sub>0</sub> /D (µg mL <sup>-1</sup> / mg)	0,0032±0,0025	0,0046±0,004	-1,454	0,146
	0,0027 (0,0-0,11)	0,0034 (0,001-0,016)		

Podaci su izraženi kao srednja vrednost±standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika).

MMF – Mikofenolat mofetil; EC-MPS – natrijumova so mikofenolne kiseline; Z – Mann Whitney U test;

\*p<0,05; \*\*MMF doza je preračunata kao MPA ekvivalent

Kod pacijenata ženskog pola zabeležene su značajno veće doze MPA i plazma koncentracije  $C_0$  MPA u odnosu na pacijente muškog pola sa presađenim bubregom ( $p < 0,05$ ). Nije bilo razlike u odnosu  $C_0/D$  MPA među ispitivanim grupama (**Tabela 18**).

Neželjeni efekti MPA su skorovani prema metodi koju su razvili Meaney i sar. (13), što je detaljno objašnjeno u poglavlju 5.3.6. U **Tabeli 19** su prikazane prosečne vrednosti i standardne devijacije grupnih skorova neželjenih efekata (GIT, EST, CNS i kumulativni skor) u odnosu na primenjeni oblik leka.

**Tabela 19.** Skorovi neželjenih efekata u odnosu na primenjeni oblik MPA

	MMF (n=9)	EC-MPS (n=68)	Z	p
<b>GIT skor</b>	0,18±0,15	0,09±0,11	2,041	0,045
<b>EST skor</b>	0,13±0,13	0,18±0,15	1,012	0,312
<b>CNS skor</b>	0,22±0,18	0,16±0,15	0,844	0,399
<b>KUMULATIVNI skor</b>	0,19±0,17	0,10±0,16	1,639	0,101

MMF – Mikofenolat mofetil; EC-MPS – natrijumova so mikofenolne kiseline; GIT – gastrointestinalni; EST – estetski; CNS – centralni nervni sistem; Z – Mann Whitney U test

Vrednosti GIT skora bile su značajno veće kod pacijenata koji koriste MMF u odnosu na EC-MPS ( $Z=2,041$ ;  $p=0,045$ ).

Radi dalje analize dobijenih rezultata i ispitivanja uticaja pola na stepen ekspresije neželjenih efekata tabelarno su prikazani skorovi neželjenih efekata u odnosu na dozni režim MPA kod oba pola (**Tabela 20**).

**Tabela 20.** Skorovi neželjenih efekata u odnosu na dozni režim MPA kod oba pola

Skorovi neželjenih efekata	Doza MPA			
	720mg		>720mg	
	Muškarci (n=37)	Žene (n=12)	Muškarci (n=16)	Žene (n=12)
<b>Koncentracija MPA</b>	2,37±1,65	4,12±3,63	3,51±3,24	4,17±2,83
<b>GIT</b>	0,17±0,15	0,21±0,17	0,12±0,12 <sup>c</sup>	0,20±0,12
<b>EST</b>	0,16±0,15 <sup>a</sup>	0,20±0,10	0,06±0,11	0,10±0,11
<b>CNS</b>	0,23±0,17 <sup>b</sup>	0,30±0,18	0,12±0,15	0,18±0,19
<b>Kumulativni</b>	0,19±0,12 <sup>a</sup>	0,24±0,12	0,10±0,07	0,16±0,11



a: Muškarci (720mg) naspram Muškarci (> 720mg), p < 0,01

b: Muškarci (720mg) naspram Muškarci (>720mg), p < 0,05

c: Muškarci (>720mg) naspram Žene (>720mg), p < 0,05

MPA – Mikofenolna kiselina; GIT – gastrointestinalni; EST – estetski; CNS – centralni nervni sistem

Ženski pol se pokazao kao determinanta za ispoljavanje neželjenih efekata. Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su da je GIT skor bio značajno niži kod muškaraca koji su primali dozu MPA veću od 720mg u poređenju sa ženama. Kod pacijenata muškog pola koji su koristili MPA u dozi od 720mg zabeleženi su statistički značajno veći EST, CNS i kumulativni skor u poređenju sa muškarcima koji su koristili veću dozu MPA.

**Tabela 21** prikazuje distribuciju i ukupnu frekvencu individualnih neželjenih efekata u odnosu na pol ispitanika.

**Tabela 21.** Učestalost individualnih neželjenih efekata u odnosu na pol

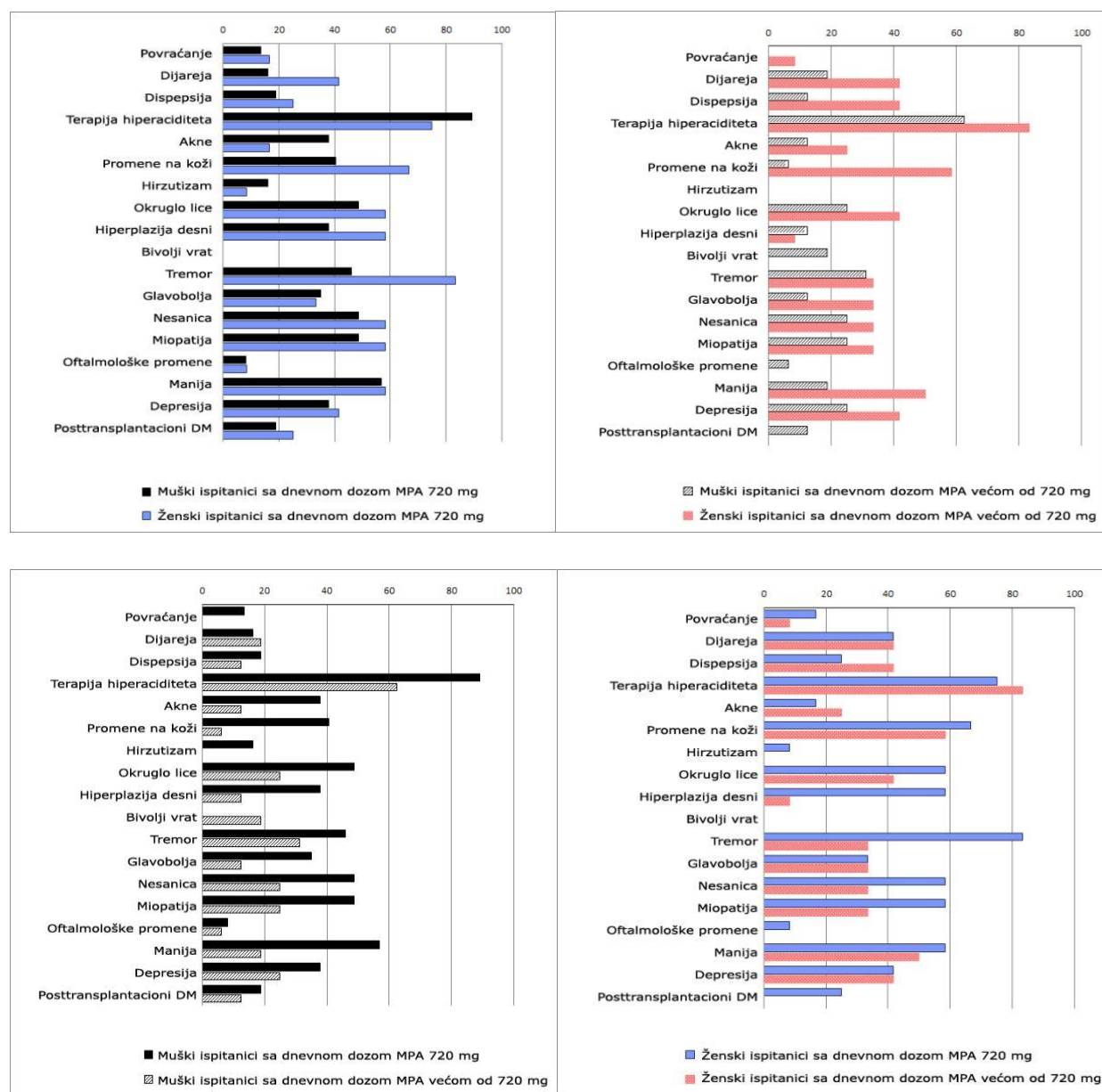
NEŽELJENI EFEKTI	0	1+	2+	3+	Ukupna frekvencija (%)	P
	M/Ž	M/Ž	M/Ž	M/Ž	M/Ž	
<b>Povraćanje</b>	48/21	5/3	0/0	NA	9,4/12,5	NS
<b>Dijareja</b>	44/14	9/9	0/1	NA	17,0/41,7	0,038
<b>Dispepsija</b>	44/16	6/6	2/1	1/1	17,0/33,3	NS
<b>Hiperaciditet želuca</b>	10/5	39/18	4/1	NA	81,1/79,2	NS
<b>Akne</b>	37/19	6/4	8/1	2/0	30,2/20,8	NS
<b>Promene na koži</b>	37/9	12/10	4/4	0/1	30,2/62,5	0,037
<b>Hirzutizam</b>	47/23	4/1	2/0	0/0	11,3/4,2	NS
<b>Okruglo lice</b>	31/12	18/8	3/4	1/0	41,5/50,0	NS
<b>Hiperplazija desni</b>	37/16	13/4	3/4	NA	30,2/33,3	NS
<b>Bivolji vrat</b>	50/24	3/0	NA	NA	5,7/0,0	NS
<b>Tremor</b>	31/10	17/11	4/2	1/1	41,5/58,3	NS
<b>Glavobolja</b>	38/16	15/8	NA	NA	28,3/33,3	NS
<b>Nesanica</b>	31/13	16/8	5/3	1/0	41,5/45,8	NS
<b>Miopatija</b>	31/13	17/5	5/6	0/0	41,5/45,8	NS
<b>Oftalmološke promene</b>	49/23	4/1	NA	NA	7,5/4,2	NS
<b>Manija</b>	29/11	19/12	5/1	NA	45,3/54,2	NS
<b>Depresija</b>	35/14	17/9	1/1	0/0	34,0/41,7	NS
<b>Posttransplantacioni DM</b>	44/21	9/3	NA	NA	17,0/12,5	NS

Sveukupna frekvencija je data u vidu % zastupljenosti neželjenih efekata (odnos 1+,2+,3+ i 4+ efekata prema svim ispitanicima iz grupe)

M/Ž – muškarci/žene; DM – *diabetes mellitus*; NA – nije primenljivo; NS – nema statističke značajnosti

Kod pacijenata ženskog pola zabeležena je veća učestalost individualnih neželjenih efekata u odnosu na pripadnike muškog pola, pri čemu je statistički značajna razlika primećena kod pojave dijareje (41,7 naspram 17,0;  $p = 0,038$ ) i promena na koži (62,5 naspram 30,2;  $p = 0,037$ ).

Učestalost individualnih neželjenih efekata kod oba pola u odnosu na režim doziranja MPA prikazan je na **Slici 20**.



**Slika 20.** Individualni neželjeni efekti u odnosu na dozni režim MPA i pol

Individualni neželjeni efekti bili su učestaliji kod ispitanika ženskog pola u okviru istog režima doziranja MPA. Primećena je značajna razlika u pojavi tremora između muškaraca i žena koji su koristili MPA u dozi od 720mg. Promene na koži su značajno češće bile prijavljene kod ispitanika ženskog pola u poređenju sa pripadnicima muškog pola koji su koristili MPA u dozi većoj od 720mg.

U **Tabeli 22** je prikazana ukupna frekvencija i distribucija individualnih neželjenih efekata u odnosu na primenjeni CNI.

**Tabela 22.** Učestalost individualnih neželjenih efekata kod pacijenata na terapiji MPA+TAC (n=68) i MPA+CsA (n=9)

NEŽELJENI EFEKTI	0	1+	2+	3+	ukupna
	Tac/CsA	Tac/CsA	Tac/CsA	Tac/CsA	frekvencija (%) Tac/CsA
<b>Povraćanje</b>	59/9	9/0	0/0	NA	13,2/0,0
<b>Dijareja</b>	51/7	16/2	1/0	NA	25,0/22,2
<b>Dispepsija</b>	54/8	8/1	4/0	2/0	20,6/11,1
<b>Hiperaciditet želuca</b>	15/4	50/4	3/1	NA	77,9/55,6
<b>Akne</b>	47/7	12/1	7/1	2/0	30,9/22,2
<b>Promene na koži</b>	51/8	21/5	10/0	0/1	37,8/42,9
<b>Hirzutizam</b>	72/12	9/1	1/1	0/0	12,2/14,3
<b>Okruglo lice</b>	47/5	30/55	4/4	1/0	42,7/64,3
<b>Hiperplazija desni</b>	61/8	14/5	7/1	NA	25,6/42,9
<b>Bivolji vrat</b>	66/8	2/1	NA	NA	2,9/11,1
<b>Tremor</b>	36/7	22/2	8/0	2/0	47,1/22,2
<b>Glavobolja</b>	49/5	19/4	NA	NA	27,9/44,4
<b>Nesanica</b>	33/6	25/3	9/0	1/0	51,5/33,3
<b>Miopatija</b>	37/7	20/2	10/0	1/0	45,6/22,2
<b>Oftalmološke promene</b>	63/9	5/0	NA	NA	7,4/0,0
<b>Manija</b>	30/6	30/2	8/1	NA	55,9/33,3
<b>Depresija</b>	42/7	23/2	3/0	0/0	38,2/22,2
<b>Posttransplantacioni DM</b>	54/14	8/1	NA	NA	20,6/11,1

Sveukupna frekvencija je data u vidu % zastupljenosti neželjenih efekata (odnos 1+,2+,3+ i 4+ efekata prema svim ispitanicima iz grupe)

Tac – takrolimus; CsA – ciklosporin A; DM – *diabetes mellitus*; NA – nije primenljivo

## 6.5. Značaj praćenja koncentracije mikofenolne kiseline u salivi Matematičko modelovanje

Za potrebe ovog istraživanja fitovani su modeli linearne regresije koji predstavljaju  $C_{SAL}$  u funkciji  $C_P$  i jednog od sistemskih parametara ALB, eGFR, TM i starost (karakteristike pacijenata prikazane su u **Tabeli 23**). Najbolji rezultat dobijen je za funkciju datu u sledećem obliku:

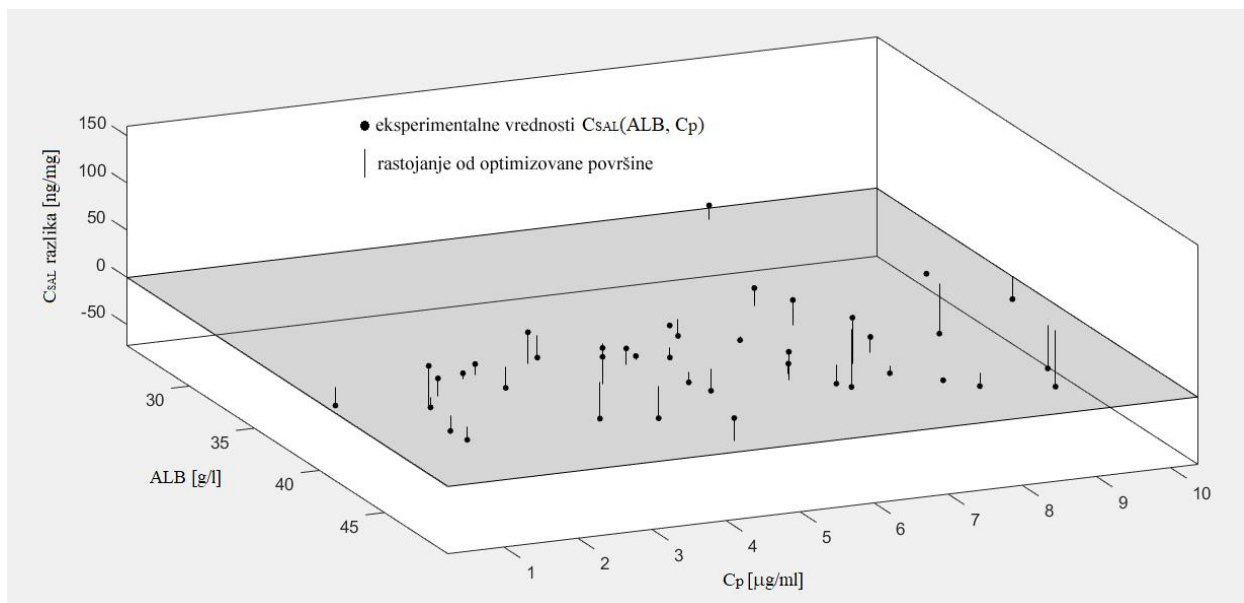
$$C_{SAL}=f(ALB, TM, starost, eGFR, C_P)=a_{00}+a_{10} \times (ALB, TM, starost, eGFR)+a_{01} \times C_P \quad (\text{model 5})$$

**Tabela 23.** Karakteristike ispitivane populacije

Karakteristike pacijenata		Grupa za građenje modela (n=77)	Validaciona grupa (n=23)
Pol	muški	53 (68,83%)	16 (69,56%)
	ženski	24 (31,17%)	7 (30,44%)
Starost (godine)		44,38±10,37	50,3±6,91
Vreme proteklo nakon transplantacije (meseci)		78,25±46,55	35,28±20,42
Tip donora	živi	59 (76,62%)	20 (86,96%)
	kadaverični	18 (23,38%)	3 (13,04%)
$C_{SAL}$ (ng/mL)		62,93±25,82	100,03±48,1
$C_P$ (µg/mL)		5,22±2,28	8,3±6,15
Albumin (g/L)		39,98±3,71	39,33±3,1
Telesna masakg)		74,77±11,93	81,21±12,38
eGFR (mL/min/1.73m2)		52,52±10,91	38,18±19,11

$C_{SAL}$  – koncentracija MPA u salivi;  $C_P$  – MPA plazma koncentracija; eGFR – glomerularna filtracija

Regresioni model, koji predstavlja zavisnost  $C_{SAL}$  u funkciji ALB i  $C_P$ , dobijen je na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti ALB,  $C_P$  i  $C_{SAL}$ , fitovanjem u softveru MATLAB R2017b. Dobijeni su sledeći parametri  $a_{00}=54,96$ ;  $a_{10}=-1,64$ ;  $a_{01}=13,4$ , a rezultati optimizacije prikazani su na **Slici 21**.



**Slika 21.** Rezultati fitovanja za model (5). Matematički pristup: fitovanje zasnovano na metodi najmanjih kvadrata (n=77)

ALB – nivo albumina u serumu;  $C_p$  – MPA plazma koncentracija MPA;  $C_{SAL}$  – koncentracija MPA u salivi.

Rastojanje između tačaka i površine predstavlja razliku između eksperimentalne vrednosti  $C_{SAL}$  prema ALB i  $C_p$  za svakog pacijenta i optimizovane površine regresije.

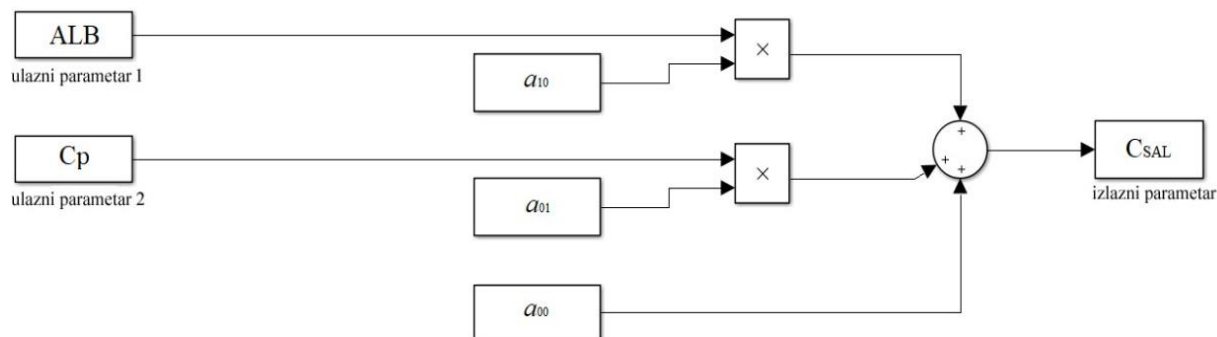
Koristeći sličan postupak, dobijeni su i ostali modeli u funkciji TM, starosti i eGFR:

$$C_{SAL}=f(TM,C_p) = 50,62 + 0,09 \times TM + 5,18 \times C_p, \quad \text{(model 6)}$$

$$C_{SAL}=f(starost,C_p) = 65,38 - 0,15 \times starost + 5,172 \times C_p, \quad \text{(model 7)}$$

$$C_{SAL}=f(eGFR,C_p) = 77,91 - 0,365 \times eGFR + 4,858 \times C_p. \quad \text{(model 8)}$$

U cilju validacije prethodnih modela, primenjen je MC simulacioni pristup upotrebom podataka pacijenata iz validacione grupe. Primer procesa validacije za model (5) prikazan je putem jednostavne simulacione šeme (**Slika 22**).

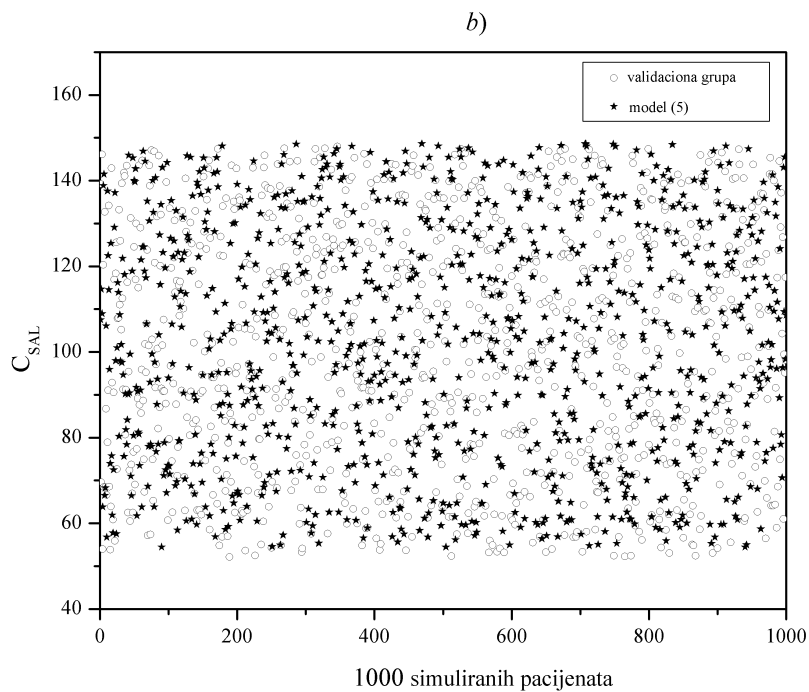
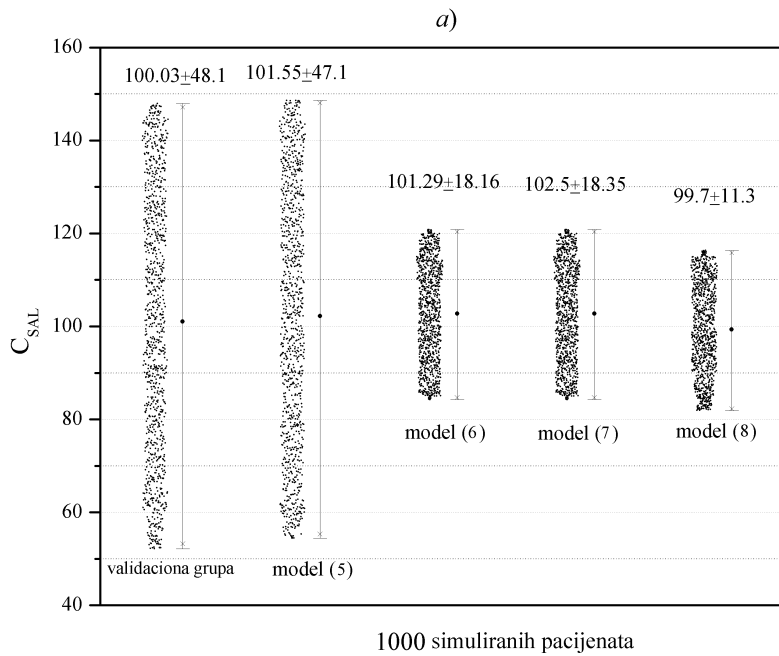


**Slika 22.** Šema simulacije modela (5)

ALB – nivo albumina u serumu;  $C_P$  – MPA plazma koncentracija;  $C_{SAL}$  – koncentracija MPA u salivi ;  $a_{00}$ ,  $a_{01}$ ,  $a_{10}$  – koeficijenti iz datog modela.

Vrednosti ulaznih parametara ALB i  $C_P$  validacione grupe (**Slika 22**) su nasumično generisane 1000 puta u opsegu pripadajućih standardnih devijacija:  $C_{SAL}=100,03\pm 48,1\text{ng/mL}$ ,  $C_P=8,3\pm 6,15\mu\text{g/mL}$  i  $ALB=39,33\pm 3,1\text{g/L}$ . Za svaki od ulaznih parova ALB i  $C_P$ , izračunata je vrednost  $C_{SAL}$  prema šemi sa **Slike 22**, koji predstavlja izlazni parametar u ovoj simulaciji. Nakon 1000 simulacija sa različitim vrednostima ulaznih parametara, izračunato je 1000 vrednosti  $C_{SAL}$  i upoređeno sa  $C_{SAL}$  iz validacione grupe.

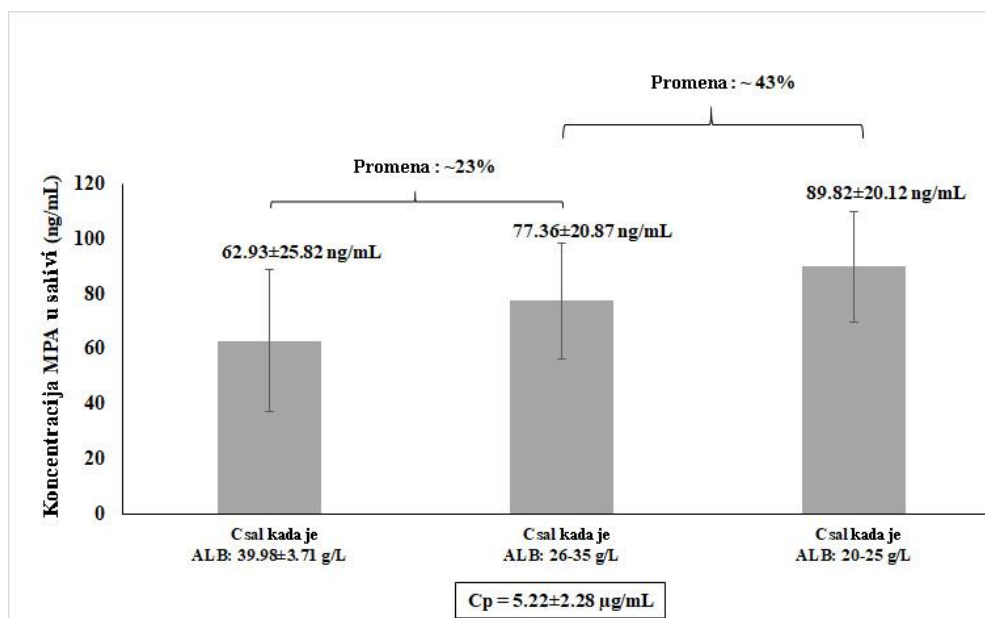
Isti postupak validacije sproveden je i za modele (6), (7) i (8) pri čemu su korišćeni odgovarajući parametri validacione grupe ( $TM=81,21\pm 12,38$ ,  $starost=50,3\pm 6,91$  i  $eGFR=38,18\pm 19,11$ ). Izračunate vrednosti  $C_{SAL}$  iz modela (5–8) zatim su upoređene sa vrednostima  $C_{SAL}$  iz grupe za validaciju i predstavljene na **Slici 23a**. Model sa najvećim slaganjem rezultata izdvojen je na **Slici 23b**.



**Slika 23.** (a) Validacija datih modela – poređenje simulacionih podataka (izračunatih vrednosti  $C_{SAL}$ ) i validacionih eksperimentalnih podataka (b) Primer validacije modela (5) Validacija MC simulacijom (1000 simuliranih pacijenata);  $C_{SAL}$  – koncentracija MPA u salivi.

Na **Slici 23a** prikazan je opseg  $C_{SAL}$  validacione grupe u poređenju sa simulacionim podacima (izračunatim vrednostima  $C_{SAL}$ ) iz modela (5–8). Najbolje slaganje poređenih vrednosti uočeno je za model (5), što je detaljnije prikazano na **Slici 23b**. Rezultati sa **Slike 23b** u potpunosti opravdavaju primenu modela (5) za korelaciju između parametara  $C_{SAL}$ , ALB i  $C_P$  i dalje određivanje i predviđanje između ovih parametara.

Odgovarajućom simulacijom izvršena je analiza uticaja različitih vrednosti ALB (kao što su hipoalbuminemija i značajna hipoalbuminemija) na promenu  $C_{SAL}$  (**Slika 24**). Rezultati pokazuju porast  $C_{SAL}$  za 23% sa opsegom vrednosti ALB 26–35g/L, odnosno za 43% za ALB 20–25g/L.



**Slika 24.** Koncentracija MPA u salivi u odnosu na vrednosti albumina: MC simulacija  
ALB – nivo albumina u serumu;  $C_P$  – MPA plazma koncentracija;  $C_{SAL}$  – koncentracija MPA u salivi

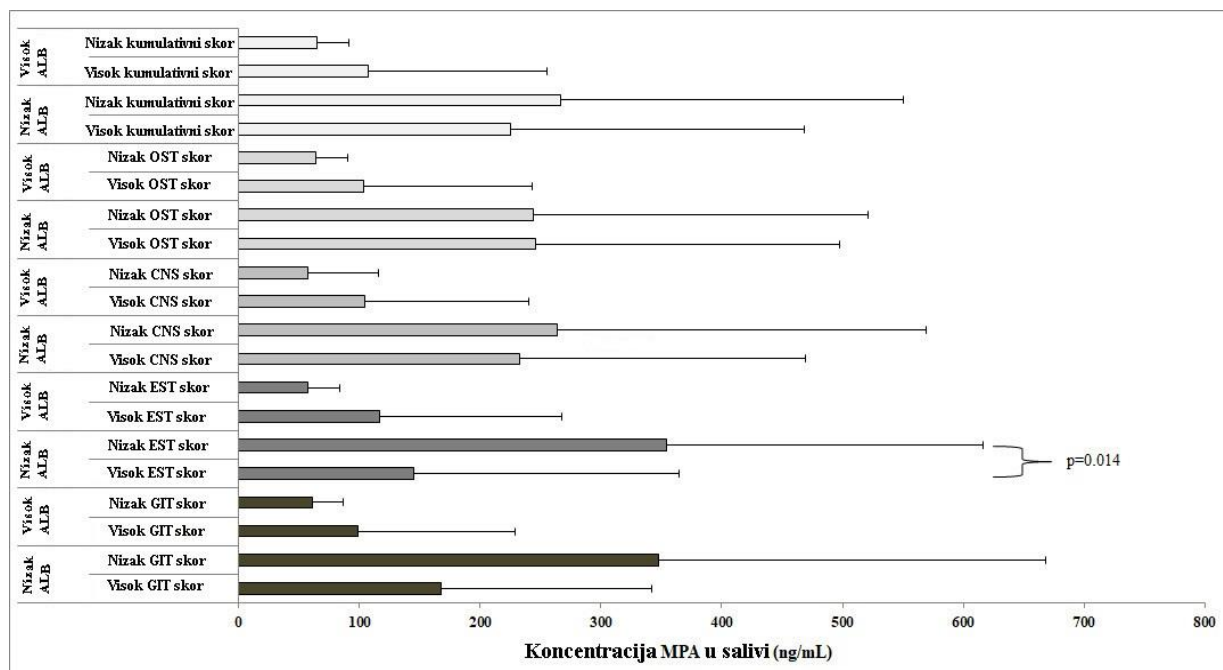
Analizom rezultata dobijenih nakon procene neželjenih efekata terapije (**Tabela 19**) uočen je visok intenzitet neželjenih efekata koji se odnose na promene na koži – estetske promene (EST skor), efekte na nivou centralnog nervnog sistema – tremor, nesanicu i poremećaje ponašanja (CNS skor).

Uzimajući u obzir dobijenu povezanost između  $C_{SAL}$  i ALB, dalja analiza je bila usmerena na uticaj koncentracije farmakološki aktivne-nevezane MPA na pojavu i intenzitet neželjenih efekata leka u odnosu na ALB (**Slika 25**). Vrednosti albumina su podeljene u dve grupe: nizak ALB (26,30–38,50g/L) i visok ALB (38,60–48,80g/L). Pacijenti su podeljeni na osnovu



dobijenih skorova neželjenih efekata u dve grupe: nizak skor (bez simptoma ili jedan uočen znak/simptom) i visok skor (dva ili više primećenih znakova/simptoma). Pored toga, upoređena je  $C_{SAL}$  u odnosu na skorove neželjenih efekata unutar različitih ALB grupa.

Dobijeni rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u EST skoru, pri čemu je viši EST skor bio povezan sa većom  $C_{SAL}$  u grupi sa nižim nivoom albumina ( $145,41 \pm 219,02$  naspram  $354,08 \pm 262,19$ ;  $p=0,014$ ). Takođe, veće vrednosti GIT skora bile su povezane sa većom  $C_{SAL}$ , ali nije postignuta statistička značajnost ( $167,69 \pm 174,79$  naspram  $347,55 \pm 320,95$ ;  $p=0,247$ ). Sa druge strane, nije uočena statistička značajnost između  $C_P$  i bilo kog od posmatranih skorova neželjenih efekata.



**Slika 25.** Povezanost koncentracije MPA u salivi i skorova neželjenih efekata unutar grupa sa različitim nivoom albumina  
Mann-Whitney U test ( $n = 77$ ); CNS – centralni nervni sistem; EST – estetski; GIT – gastrointestinalni; OST – ostalo

## 7. Diskusija

Mikofenolna kiselina, primenjena kao MMF ili EC-MPS, predstavlja sastavni deo većine imunosupresivnih protokola nakon transplantacije bubrega, najčešće u kombinaciji sa TAC (242). Procenjuje se da 79% pacijenata sa transplantiranim bubregom, 48% pacijenata sa transplantiranom jetrom i 75% pacijenata nakon transplantacije srca prilikom otpusta iz bolnice dobije MPA (70). Kada je MMF odobren za primenu pre više od 2 decenije, proizvođač je preporučio fiksno doziranje. U narednim godinama, rasla je svest o potrebi za personalizovanim doziranjem ovog leka u svim indikacijama, pre svega zbog uočene značajne farmakokinetičke varijabilnosti (243-245). Iz perspektive terapijskog praćenja lekova, određivanje koncentracije leka u plazmi ili serumu je najčešći metod i predstavlja praksu u nekim transplantacionim centrima (246, 247). Ipak, MPA pokazuje nelinearnu kinetiku, zbog čega male promene doze mogu dovesti do značajne promene koncentracije u plazmi. Varijabilnosti MPA doprinose i drugi faktori uključujući vezivanje za proteine plazme, enterohepatičnu cirkulaciju, bubrežnu funkciju, istovremeno primenjene lekove, funkciju GIT, unos hrane. Ovo može objasniti zašto određivanje jedne koncentracije u toku doznog intervala nije dovoljno adekvatno u predviđanju kliničkih ishoda (230). Procena izloženosti MPA na osnovu površine ispod krive (AUC), pokazala se uspešnijom u smislu korelacije sa ishodom i identifikacije terapijskih opsega (57, 248). Predloženi terapijski opseg MPA  $AUC_{0-12}$  iznosi 30–60mg $\cdot$ h/L (14, 107). Prateći ove preporuke, terapijski monitoring može biti koristan u smanjenju interindividualne varijabilnosti u izloženosti MPA, optimizaciji imunosupresivne terapije i prevenciji odbacivanja grafta u rutinskoj kliničkoj praksi (243).

Tokom poslednje decenije, objavljene studije bavile su se personalizovanom imunosupresijom MPA, sa posebnim osvrtom na analitičke metode, metode za procenu izloženosti (uključujući farmakometriju), potencijalni uticaj farmakogenetike i praktične aspekte postizanja ciljne koncentracije (246, 249-251). Može se dovesti u pitanje značaj ovih kontinuiranih istraživanja, s obzirom na relativno nisku incidencu odbacivanja grafta kod pacijenata na imunosupresivnim režimima koji uključuju MPA. Ipak, učestalost neželjenih efekata nakon primene MPA često može biti uzrok prekida terapije. Vanhove i sar. su pokazali

da je tokom prve godine nakon transplantacije bubrega kod polovine pacijenata došlo do redukcije doze ili prekida terapije MPA, uglavnom zbog gastrointestinalnih i hematoloških neželjenih efekata (166). Sprovedenjem personalizovanog tretmana, veći broj pacijenata mogao bi da nastavi sa primenom odgovarajuće doze MPA i osigura bolji kvalitet života (14). Pored učestalih neželjenih efekata nakon primene MPA, problem predstavlja i hronično odbacivanje grafta. Kod određenog broja transplantiranih pacijenata, hronično odbacivanje grafta uslovljeno je razvojem donor specifičnih antitela (DSA – engl. *donor-specific antibodies*). Rezultati koji pokazuju da su takva odbacivanja grafta povezana sa niskom izloženošću MPA, govore u prilog individualnom doziranju MPA, posebno imajući na umu doživotno trajanje imunosupresivne terapije. Postoje indicije da bi MPA svojim mehanizmom delovanja mogao sprečiti razvoj DSA (252-254).

Plazma je najčešće korišćena biološka tečnost za terapijsko praćenje lekova. Međutim, saliva se smatra pogodnijom za farmakometrijski pristup, s obzirom na njeno neinvazivno i isplativo uzorkovanje, posebno za praćenje nevezanih frakcija lekova. Novija istraživanja nastoje da razjasne faktore koji mogu uticati na odnos koncentracije MPA u plazmi i salivi (17, 109). Pristupi zasnovani na matematičkom modelovanju mogu biti od velike pomoći za donošenje ispravne odluke u vezi sa potencijalnim značajem određivanja koncentracije MPA u salivi ( $C_{SAL}$ ) kod pacijenata sa presađenim bubregom. Pored toga, izvedeni matematički modeli zasnovani na eksperimentalnim podacima, mogu se dalje validirati i simulirati kroz Monte Carlo pristup, što može povećati kredibilitet datih modela (255).

## 7.1. Razvoj HPLC metode

Analitičke metode za određivanje koncentracija MPA u plazmi mogu se podeliti u tri glavne grupe: (1) hromatografske metode (HPLC ili UHPLC sa UV/Vis spektrofotometrijskom, fluorescentnom ili masenom detekcijom); (2) imunološka određivanja (EMIT, *cloned enzyme donor immunoassay* (CEDIA) i *particleenhanced turbidimetric inhibition immunoassay* (PETINIA)); i (3) test inhibicije IMPDH. Prednosti i nedostaci različitih metoda variraju, pa izbor metode zavisi od mogućnosti laboratorije i zahteva ispitivanja. Metode koje pripadaju drugoj i trećoj grupi dostupne su za automatizovane analize u biohemijским laboratorijama (242, 251).

Hromatografske metode se koriste za terapijsko praćenje MPA više od 20 godina. Za to vreme omogućile su razjašnjenje farmakokinetike i farmakodinamskih efekata MPA (256-258). Oko 50% laboratorija i dalje koristi hromatografske procedure za TDM MPA, a većina njih podrazumeva primenu HPLC metoda razvijenih u laboratorijskim uslovima. Najveće prednosti hromatografskih postupaka su specifičnost za ispitivani analit, veoma širok opseg merenja i mogućnost simultanog određivanja MPA i njenih metabolita (259, 260). Dodatni argumenti koji idu u prilog konvencionalnoj HPLC metodi su bolja robusnost, niži troškovi ulaganja i održavanja i veća dostupnost instrumenata i obučenog osoblja.

Savremena farmaceutska analiza zahteva veliku efikasnost i kratko trajanje analize. HPLC razdvajanje u osnovi zavisi od fizičko-hemijskih osobina analita, karakteristika kolone, sastava i *pH* mobilne faze, a u manjoj meri i od brzine protoka mobilne faze i temperature kolone (261). U procesu razvoja metode ispitivan je uticaj sastava neorganske faze (voda, fosforna kiselina, acetatni i fosfatni pufer), njene *pH* vrednosti, sadržaja acetonitrila i temperature kolone. Dodatak fosfatnog pufera (dobijen mešanjem 10mM ortofosforne kiseline i 1M NaOH) značajno je poboljšao simetriju pikova ispitivanih supstanci, dok koncentracija pufera nije pokazala uticaj na retencione parametre. Očekivano je da će i *pH* vrednost neorganske faze imati veliki uticaj na retencione parametre. Veće *pH* vrednosti neorganske faze dovele su do povećanog uticaja promene sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi na posmatrani odgovor sistema. Ipak, najveći uticaj na razdvajanje standarda MPA i PP imao je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (**Slika 6**). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na lipofilni karakter MPA. Potpuno razdvajanje standarda MPA i IS, uz zadovoljavajuću simetriju pikova, postignuti su mobilnom fazom koja sadrži 50% acetonitrila. Acetonitril i metanol su najčešće korišćeni organski rastvarači za reverzno-faznu HPLC analizu, pre svega zbog rastvorljivosti i tačke ključanja (261). Među njima se acetonitril pokazao kao pogodniji na osnovu simetrije pikova i retencionih parametara supstanci. U procesu razvoja metode, ispitivan je i uticaj temperature kolone u opsegu od 30–40°C. Za hromatografsku analizu odabrana je temperatura kolone 30°C s obzirom na najbolju simetriju posmatranih pikova (**Slika 7**). Identifikacija MPA vršena je preko retencionih vremena i snimljenih UV spektara (**Slika 8**) pri definisanim hromatografskim uslovima (**Slika 9**). Kvantifikacija MPA u ispitivanim uzorcima izvršena je metodom standarda poređenjem površina izmerenih pikova sa vrednostima standardnog rastvora MPA poznate koncentracije pri istim eksperimentalnim uslovima.

Za razliku od drugih imunosupresivnih lekova, MPA se u krvi distribuira ekstracelularno (samo 0,01% nalazi se u ćelijskim elementima). Stoga su plazma ili serum odgovarajuće biološke tečnosti za određivanje koncentracije MPA (106). U pokušaju da se standardizuje prikupljanje uzoraka za TDM MPA u rutinskoj praksi, plazma (sa dodatkom EDTA) preporučena je kao biološka tečnost izbora. Da bi se kvantifikovala koncentracija slobodnog leka, deproteinizovana plazma se može dobiti ultrafiltracijom (262). Za određivanje koncentracije MPA, sve se češće koriste i drugi biološki materijali poput salive, izolovanih mononuklearnih ćelija periferne krvi, homogenata tkiva ili urina (263).

U pogledu stabilnosti analita, saliva se ponaša slično kao plazma (264, 265). Čuvanje uzoraka salive rezultiralo je stabilnim koncentracijama MPA tokom 60 dana na 25°C, 30 dana na 37°C, 2 dana na 50°C i 50 dana na -20°C (266). Nije primećena značajna promena koncentracija MPA i MPAG ni posle tri ponovljena ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja salive (265, 266).

Poznavanje vrednosti koncentracija MPA može pomoći u individualizaciji terapije osetljivih transplantiranih pacijenata (16, 62). Pacijenti sa niskom koncentracijom MPA izloženi su povećanom riziku od odbacivanja grafta, naročito u početnom periodu nakon transplantacije. Visoke koncentracije MPA mogu dovesti do pojave neželjenih efekata i toksičnosti (19, 57). Kompleksnost i vulnerabilnost transplantiranih pacijenata zahteva multidisciplinarnost u tumačenju rezultata izmerenih koncentracija MPA pri čemu klinički monitoring pacijenta uvek ima prednost nad dobijenim laboratorijskim vrednostima. Saradnja lekara kliničara-nefrologa, biohemičara i farmaceuta može doprineti optimalnim zdravstvenim ishodima pacijenta (1, 267).

## **7.2. Validacija HPLC metode**

Validacija predstavlja postupak utvrđivanja karakterističnih analitičkih parametara koji pokazuju u kojoj meri je ispitivana metoda pogodna za primenu na određenom uzorku (208).

Selektivnost metode opisuje mogućnost razdvajanja komponenti ispitivanog uzorka. Što je selektivnost veća, razdvajanje je bolje, a preklapanje hromatografskih pikova manje. Metoda se smatra selektivnom ukoliko je rezolucija između dva najbliža pika na hromatogramu veća od 1,5 (211). Predložena metoda je zadovoljavajuće selektivnosti, jer nisu uočeni interferirajući pikovi

na retencionim vremenima koji odgovaraju MPA i PP nakon injektovanja uzoraka plazme opterećene MPA i PP u poređenju sa blank plazmom dobijenom od 10 zdravih dobrovoljaca (**Slika 10**).

Linearnost metode predstavlja mogućnost detektovanja signala koji je direktno proporcionalan koncentraciji MPA u rastvoru (211). Linearnost metode je ispitivana serijom standardnih rastvora čija je koncentracija u opsegu 80–120% od očekivane koncentracije MPA. U ispitivanom opsegu (0,2–100µg/mL) procenjena je matematički i grafički. Dobijena kalibraciona kriva opisana jednačinom  $y=0,0495x+0,0249$  (**Slika 11**) pokazala je linearnost metode u ispitivanom opsegu MPA, sa koeficijentom linearnosti 0,9995. To je potvrđeno i analizom značajnosti odsečka na ordinati *Studentovim t-testom* ( $p<0,05$ ) (**Tabela 3**).

Ispitivanjem preciznosti metode proverava se stepen rasipanja dobijenih rezultata nakon višestrukog analitičkog određivanja istog homogenog uzorka. U zavisnosti od uslova određivanja preciznosti, prema ICH preporukama, razlikuju se: ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i reproduktivnost (engl. *reproducibility*) (212). Ponovljivost podrazumeva preciznost dobijenu za ponovljena merenja pod istim uslovima (isti analitičar, na istoj aparaturi i istim uzorcima) u kratkim vremenskim intervalima (intradnevna preciznost). Srednja preciznost procenjuje usaglašenost rezultata merenja dobijenih u okviru iste laboratorije pod različitim uslovima (više analitičara, različiti dani merenja, oprema, reagensi iz različitih boca). Na ovaj način je omogućeno praćenje uticaja slučajnih varijabli tokom rutinske primene metode u laboratoriji (interdnevna preciznost). Reprodutivnost (interlaboratorijska preciznost) predstavlja procenu preciznosti u različitim laboratorijama, na različitim aparatima, u više dana, od strane više analitičara. Prema smernicama ICH nije neophodno ispitivati reproduktivnost ukoliko je predhodno utvrđena srednja preciznost metode (268). Nakon ispitivanja intradnevne (**Tabela 4**) i interdnevne tačnosti i preciznosti (**Tabela 5**), primećeno je da su vrednosti RSD (%) i *recovery* (R, %) bile u skladu sa smernicama ICH: preciznost  $\leq 15\%$  i tačnost 85–115% na LQC, MQC i HQC nivou (212).

Najmanja koncentracija MPA koju je bilo moguće detektovati u vidu signala koji se razlikuje od bazne linije, pri čemu je odnos signal/šum  $>3$ , predstavljala je limit detekcije (LOD). Limitom kvantifikacije (LLOQ) smatrana je najmanja koncentracija MPA koju je bilo moguće kvantifikovati sa zadovoljavajućom preciznošću za ponovljena iniciranja (u toku tri dana), a da je

pri tome odnos signal/šum  $>10$  (211). Vrednosti limita detekcije i kvantifikacije dobijene su eksperimentalnim putem i iznosile su redom  $0,025\mu\text{g/mL}$  i  $0,2\mu\text{g/mL}$ , čime je potvrđena osetljivost metode. Ispitivanjem intradnevne i interdnevne tačnosti i preciznosti LLOQ (**Tabela 6**) zabeležene su vrednosti  $\text{RSD} \leq 20\%$  i R u rasponu 80–120% u skladu sa ICH kriterijumom (212).

Degradacija analita nije neuobičajena, pa je zato važno proveriti stabilnost MPA u periodu između sakupljanja uzoraka i njihove analize. U eksperimentima stabilnosti primenjuju se uslovi koji odražavaju realne situacije tokom analize i rukovanja uzorkom (212). Nakon izvođenja testova stabilnosti na LQC i HQC nivou (kratkotrajna stabilnost (**Tabela 7**), dugotrajna stabilnost (**Tabela 8**), stabilnost na autosempleru (**Tabela 9**) i stabilnost nakon tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (**Tabela 10**)), vrednosti RSD (%) za MPA bile su ispod 9,84%, dok je vrednost recovery (%) bila od 91,04% do 106,96%. Svim testovima dokazana je odgovarajuća stabilnost MPA.

### **7.3. Populaciona farmakokinetička analiza mikofenolne kiseline kod pacijenata sa presađenim bubregom**

Populaciona analiza ima za cilj karakterizaciju farmakokinetičkih karakteristika leka i kvantifikaciju izvora varijabilnosti procenom uticaja intrinzičkih i ekstrinzičkih kovarijata. Rezultati modelovanja su često uključeni u informacije o leku, kao podrška preporukama o doziranju u posebnim populacijama pacijenata (198). Velika interindividualna i intraindividualna varijabilnost uočena u farmakokinetici MPA pripisuje se intrinzičkim varijablama specifičnim za pacijenta i bolest (60, 269). Ovo istraživanje bilo je fokusirano na razvoj i validaciju klinički primenljivog populacionog farmakokinetičkog modela MPA kod pacijenata sa presađenim bubregom, kao i identifikaciju faktora koji doprinose interindividualnoj varijabilnosti MPA. Analizirana je veza između farmakokinetičkih parametara, demografskih karakteristika pacijenata i biohemijskih faktora (**Tabela 11**).

Tokom građenja populacionog modela, analizirane su kovarijate sa potencijalnim uticajem na MPA CL/F. Puni model pokazao je da na MPA CL/F značajno utiču starost, ukupna dnevna doza MPA, klirens kreatinina, nivo albumina, tip i pol donora i koterapija nifedipinom i takrolimusom. Posebno je interesantna činjenica da je koterapija nifedipinom bila značajna kovarijata i u finalnom modelu, pored starosti i ukupne dnevne doze MPA (**Tabela 12**).

Mikofenolna kiselina se uglavnom propisuje u fiksnoj dozi bez obzira na starost pacijenata (270). U sprovedenom istraživanju starost pacijenata prepoznata je kao faktor varijabilnosti MPA CL/F, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (271, 272). Wang i sar. pokazali su da je izloženost MPA bila značajno niža kod starijih pacijenata, uprkos tome što su koristili iste doze MMF (272). Potencijalno objašnjenje za nižu izloženost MPA su promene u procesu resorpcije izazvane starenjem. Pored toga, mnogi drugi faktori koji utiču na farmakokinetiku leka se menjaju sa godinama (bubrežna funkcija, telesna masa, hematokrit, volumen telesnih tečnosti, sadržaj masnog i mišićnog tkiva) i mogu usloviti korekciju doze leka (178, 197, 200). Iako je uticaj starosti ispitivan i u drugim studijama (93, 103, 147, 232, 236, 273-276), ova kovarijata nije uključena u finalne modele. Može biti posledica toga što su pomenute studije sprovedene kod odraslih pacijenata kod kojih su metabolički enzimi (npr. UGT1A9) i transporteri (npr. MRP-2) povezani sa MPA već u potpunosti eksprimirani (277, 278). Neki istraživači pokazali su da starost donora ima uticaj na kvalitet grafta pri transplantaciji, ali i u posttransplantacionom periodu jer utiče na histološku i funkcionalnu evoluciju grafta (279).

Epidemiološke studije pokazuju da prevalenca hipertenzije (definisana kao krvni pritisak  $\geq 140/90$  mmHg) među pacijentima sa transplantiranim bubregom iznosi 70–90% (280-282). Blokatori kalcijumovih kanala (iz grupe dihidropiridina) pored ACE inhibitora/ATII blokatora su lekovi prvog izbora u lečenju hipertenzije kod ovih pacijenata. Primena kalcijum antagonista iz grupe dihidropiridina preporučuje se zbog njihove dokazane efikasnosti u poboljšanju funkcije grafta i minimiziranju vazokonstriktornih efekata CNI (283-285). Oni povećavaju protok krvi kroz bubrege i glomerularnu filtraciju kroz povećanje glomerularnog hidrostatskog pritiska i filtracione frakcije (286, 287). U meta-analizi koja je objedinila podatke iz 71 randomizovane kliničke studije, primećeno je značajno smanjenje rizika od gubitka grafta za 42% kada se primenjuju blokatori kalcijumovih kanala (284). Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da je nifedipin (lek iz grupe dihidropiridina) deo antihipertenzivne terapije kod 32,85% pacijenata uključenih u istraživanje. Koterapija nifedipinom pokazala je značajan uticaj na MPA CL/F u finalnom modelu (**model (1)**). Pregledom literature uočeno je da su drugi autori testirali uticaj istovremeno primenjenih imunosupresivnih lekova (114, 122, 288). Pacijenti sa presađenim bubregom uključeni u populacione studije MPA su istovremeno koristili CNI (TAC ili CsA), sa ili bez kortikosteroida, ali informacije o drugim istovremeno primenjenim lekovima bile su



minimalne čime je potencijalno ograničena mogućnost identifikovanja komedikacije kao značajnih kovarijata u njihovim modelima.

Analizom objavljenih populacionih studija MPA, utvrđeno je da je oko dve trećine uključivalo pacijente sa presađenim bubregom. Većina studija sprovedena je kod odraslih pacijenata (74, 93, 103, 114, 147, 226-236, 273-276, 289), a manji broj uključuje pedijatrijsku populaciju (190, 224, 225, 290). U nekim studijama učestovala je mešovita populacija pacijenata (kombinujući više od jednog tipa transplantacije ili autoimune bolesti) (115, 225, 228), čime je potencijalno ograničena specifičnost njihovih rezultata. Sa druge strane, ovi mešoviti populacioni modeli omogućavaju procenu uticaja specifičnih tipova pacijenata na farmakokinetiku MPA (npr. karakterizacija vrednosti CL/F za svaku grupu pacijenata u studiji de Winter i sar.) u okviru istog modela (115).

Tokom poslednjih nekoliko decenija, predložene su različite metode modelovanja (291, 292). Koncept populacione analize zasnovan na pristupu nelinearnog modelovanja kombinovanih efekata koji je primenjen u sprovedenom istraživanju, uveden je od strane Sheiner i sar. 1972. godine (293), ali i dalje predstavlja zlatni standard (103, 115, 190, 227, 229, 231, 236, 273, 274, 276, 289). Većina studija bila je fokusirana na izgradnju populacionog farmakokinetičkog modela.

Većina studija pokušala je da karakteriše efekte fizioloških faktora (93, 103, 147, 229, 232, 235, 236, 273-276, 289) i genetskih polimorfizama (93, 103, 236, 273-275, 289) na MPA CL/F. Literaturni podaci pokazuju da telesna masa pozitivno korelira sa ukupnim MPA CL/F (103, 294). Može se pretpostaviti da bi povećana telesna masa mogla biti povezana sa pojačanom ekspresijom UGT proteina u jetri (295, 296), što dovodi do povišenog intrinzičkog klirensa MPA. U prilog tome govori podatak da su Quintairos i sar. vršili procenu populacione vrednosti CL/F na osnovu telesne mase (276). Pozitivna korelacija između telesne mase i MPA CL/F kod odraslih pacijenata sa presađenim bubregom prijavljena je i mnogo ranije od strane Le Guellec i sar. (297). Ipak, autori su pokazali da uključivanje TM u farmakokinetički model može dovesti do smanjenja varijabilnosti CL/F za jednu petinu (297). Stoga, doziranje MPA po kg TM ne bi u velikoj meri doprinelo optimizaciji tretmana MPA.

Takođe, zabeležena je pozitivna korelacija između serumskog kreatinina i ukupnog MPA CL/F, što se može pripisati hipoalbuminemiji, metaboličkoj acidozi i uremiji (103, 274).

Smanjenje serumskog kreatinina sa 500 na 200mmol/L rezultiralo je smanjenjem MPA CL/F sa 30 na 20L/h (103). U radu Van Hest i sar. klirens kreatinina od 25mL/min označen je kao granična vrednost za MPA CL/F kod pacijenata sa presađenim bubregom (298). Naime, pacijenti sa klirensom kreatinina manjim od 25mL/min pokazali su značajno veće srednje vrednosti MPA CL/F tokom prve tri nedelje nakon transplantacije u poređenju sa pacijentima kod kojih je zabeležen veći klirens kreatinina (298). Moguće je da povišeni nivoi serumskog kreatinina jednostavno odražavaju smanjenje bubrežne funkcije, što može dovesti do akumulacije MPAG i/ili uremijskih toksina (103, 274). Određeni uremijski toksini (indoksil sulfat ili p-krezol sulfat) su inhibitori hepatičnih i bubrežnih transportera (MRP-2, OATP1B1/3, OAT-3) koji su odgovorni za bilijarno ili bubrežno izlučivanje MPAG (89, 113, 299, 300). Zajedno, ovi mehanizmi mogu potencijalno da objasne odnos između serumskog kreatinina i MPA CL/F. Istim mehanizmima bi se mogla objasniti i negativna korelacija između vremena nakon transplantacije i CL/F MPA, jer se funkcija bubrega postepeno poboljšava sa povećanjem vremena nakon transplantacije (226, 230, 289).

Zbog visokog afiniteta vezivanja MPA za albumin, slobodna frakcija MPA i MPA CL/F u velikoj meri zavise od nivoa albumina (114, 115). Smanjenje slobodne frakcije MPA dovodi do privremenog smanjenja MPA CL/F i posledično povećane AUC ukupne MPA (271). Koncentracije albumina manje od 31g/L povezane su sa značajno većim koncentracijama slobodne MPA kod pacijenata nakon transplantacije bubrega, što može dovesti i do pojave neželjenih efekata (76). Povišena izloženost nevezanoj MPA je prijavljena i kod pedijatrijskih pacijenata sa smanjenim nivoom serumskog albumina (73, 74, 301). Sprovedeno istraživanje nije pokazalo uticaj serumskog albumina na MPA CL/F, što se može objasniti činjenicom da pacijenti obuhvaćeni istraživanjem nisu imali hipoalbuminemiju; srednja vrednost nivoa albumina bila je 42,11g/L (raspon 36–49) u grupi za građenje modela i 42,36g/L (raspon 37–49), u grupi za validaciju (**Tabela 11**). Takođe, ozbiljnost bolesti, klinički status ili uticaj istovremeno primenjenih lekova na vezivanje albumina mogu objasniti nedostatak korelacije između izloženosti MPA i nivoa albumina u sprovedenom istraživanju.

Istovremeno primenjeni imunosupresivni lekovi imaju različit efekat na MPA CL/F. Zabeležen je 33% veći CL/F kod pacijenata koji su lečeni CsA+MPA u odnosu na pacijente koji su na terapiji TAC+MPA (80). Prethodno sprovedene studije pokazuju da CsA smanjuje

izloženost MPA (123, 298, 302, 303). Primećene su manje koncentracije MPA (1,2–4 puta) kod pacijenata sa presađenim bubregom koji istovremeno primenjuju CsA u odnosu na TAC (304, 305). Pored toga, drugi pik MPA koji se javlja kao rezultat enterohepatične cirkulacije je manje izražen kod ovih pacijenata u poređenju sa onima koji su na terapiji TAC+MPA (306). Logično objašnjenje ove korelacije može biti inhibitorni efekat CsA na enterohepatičnu cirkulaciju MPA (234, 307). Neki autori preporučuju upotrebu 50% niže doze MMF/EC-MPS u kombinaciji sa TAC u odnosu na CsA (114, 308, 309). Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju statističku značajnost doze TAC na MPA CL/F u punom modelu, ali su u finalnom populacionom modelu drugi faktori pokazali veći uticaj. Nije zabeležen statistički značaj doze CsA na MPA CL/F što se može objasniti nižom učestalošću CsA u protokolima pacijenata uključenih u istraživanje.

Van Hest i sar. uočili su negativnu korelaciju između nivoa hemoglobina i MPA CL/F (310). Međutim, novija istraživanja nisu potvrdila ovu povezanost (147, 236, 274). Slično tome, značajan uticaj pola na ukupni MPA/CL retko je prepoznat u populacionim farmakokinetičkim modelima (79, 97, 298) i trebalo bi ga dalje testirati s obzirom na ograničenu količinu podataka u literaturi. Kod pacijenata muškog pola zabeležena je za 11% veća vrednost MPA CL/F u poređenju sa pacijentima ženskog pola (79). Ispitivanjem uticaja etničke pripadnosti na farmakokinetiku MPA, primećen je manji MPA CL/F kod pacijenata iz Azije (žuta rasa) u poređenju sa pacijentima kavkaskog porekla (bela rasa) (116, 311). Ovaj efekat nije konačno dokazan u strogo kontrolisanom eksperimentu (312). Izostanak značajnog uticaja rase u ostalim istraživanjima može se objasniti ograničenim brojem studija koje su uključivale ispitanike različite etničke pripadnosti ili nedostatkom istraživanja rase kao kovarijate.

Prema navodima Okour i sar. na CL/F MPAG značajno su uticali pol donora i dijabetes u vreme transplantacije (93). Veće vrednosti MPAG CL/F uočene su kod donora muškog pola (93). Sa druge strane, pacijenti koji su bolovali od dijabetesa u vreme transplantacije ispoljili su manji ukupni MPAG CL/F, a autori su ovo zapažanje pripisali smanjenom izlučivanju MPAG putem žuči i bubrega preko oštećenih transportera (93). Efekti dijabetesa na ekspresiju/aktivnost proteina rezistencije raka dojke (BCRP, uključen u bilijarnu ekskreciju MPAG) i transportera MRP-2 dokumentovani su na životinjskim modelima (88, 313). Pored toga, pozitivna korelacija između klirensa kreatinina i ukupnog MPAG CL/F (289) i između procenjene brzine glomerularne filtracije i nevezanog MPAG CL/F (147) u skladu su sa utvrđenom ulogom

bubrega u izlučivanju MPAG (60). Konkretno, smanjeni klirens kreatinina i brzina glomerularne filtracije mogu ukazivati na oštećenje bubrežne funkcije, što može biti uzrok smanjene aktivne tubularne sekrecije MPAG (60).

Prethodne studije su pokazale da pored demografskih karakteristika i genetski faktori predstavljaju važne prediktore varijabilnosti u farmakokinetici MPA. Polimorfizam SLCO1B1 388A>G (rs2306283) pokazao je značajan uticaj na MPA CL/F kod odraslih korejskih pacijenata (231). Kako gen SLCO1B1 kodira OATP1B1, transporter odgovoran za unos MPAG u hepatocyte (89), Han i sar. sugerišu da ovaj genetski polimorfizam može doprineti bioraspoloživosti MPA (231). Ovaj polimorfizam je takođe testiran od strane Kim i sar. (korejska populacija) i Picard i sar., ali značajna povezanost nije uočena (89, 273). Pored toga, Kim i sar. navode da su nosioci UGT2B7 802 C>T (rs7439366) CT i TT genotipa pokazali smanjenu konstantu brzine metabolizma MPA do AcMPAG u poređenju sa kontrolama (273). Ovo zapažanje je u skladu sa smanjenjem intrinzičkog klirensa MPA u formiranju AcMPAG u *in vitro* humanim mikrozomima dobijenim od donora koji su nosioci UGT2B7 802 CT i TT genotipa (273, 314) i činjenicom da je UGT2B7 dominantni enzim odgovoran za nastanak AcMPAG (60). Pored toga, heterozigoti IMPDH-1 (rs2288553) pokazali su povećan ukupni MPAG CL/F (93), što može biti predmet daljih istraživanja.

Za procenu adekvatnosti dobijenih modela, autori objavljenih populacionih studija koristili su, uglavnom, metode interne validacije (engl. *bootstrapping*, *goodness-of-fit plots*) zajedno sa vizuelnom prediktivnom procenom (93, 103, 115, 147, 190, 227, 229, 231, 232, 236, 273-276, 289). Primena metoda interne validacije je uobičajena, ali je proveru bolje vršiti pomoću nasumično izabrane, eksterne grupe za validaciju, što je primenjeno i u sprovedenom istraživanju (202, 292).

Validacija dobijenog populacionog modela MPA uključivanjem podataka pacijenata validacione grupe potvrdila je dobru pouzdanost i odgovarajući stepen greške predviđanja (**Tabela 14**). Pored toga, preciznost procene parametara finalnog modela (**Tabela 13**) bila je u skladu sa preporukama (191, 196, 291). Analizom grafika uočen je visok stepen slaganja predviđenih koncentracija sa izmerenim vrednostima, i na populacionom i na individualnom nivou (**Slika 12**). Na graficima se vidi da su vrednosti uglavnom bile ravnomerno raspoređene oko prave  $y=x$ . Pored navedenih grafika, prikazana je zavisnost rezidualne varijabilnosti i

predviđenih koncentracija (**Slika 13**) za finalni model. Može se videti uniformna raspodela oko prave  $y=0$ , kao i to da je većina WRES raspoređena između vrednosti -2 i +2, što je u skladu sa preporukama (196).

## 7.4. Validacija populacionog modela primenom Monte Carlo simulacije

Monte Carlo simulaciona metoda primenjena je sa ciljem da se pojednostavi postupak verifikacije objavljenih populacionih farmakokinetičkih modela i istovremeno validira dobijeni model MPA. Prema ovoj metodi, nasumične vrednosti farmakokinetičkih parametara u opsegu njihovih standardnih devijacija korišćene su kao ulazni parametar u testiranim modelima (**Tabela 16**). Nakon MC numeričkih proračuna, opseg očekivanih vrednosti CL/F za sve analizirane modele su jasno predstavljeni na **Slikama 15–18**.

Populacioni farmakokinetički modeli MPA CL/F uključeni u eksternu validaciju pokazuju da su značajne kovarijate bile telesna masa, nivo albumina i klirens kreatinina (103, 114, 115). U studiji Yu i sar. (103), zabeležena je pozitivna korelacija između CL/F MPA i TM pacijenata sa presađenim bubregom ( $p=0,0065$ ). Isti autori pokazali su značajnu korelaciju između MPA CL/F i nivoa kreatinina u serumu. Smanjenje serumskog kreatinina sa 500 na 200mmol/L rezultiralo je smanjenjem MPA CL/F sa 30 na 20L/h. Nivo serumskog albumina predstavlja značajan faktor varijabilnosti MPA CL/F u studijama Staatz i sar. i de Winter i sar. (114, 115).

Dobijeni populacioni farmakokinetički **model (1)** pokazao je da su dnevna doza MPA, starost pacijenata i koterapija NIF bili značajni prediktori MPA CL/F, ali ne i nivo albumina, serumski kreatinin i telesna masa. Ovo se može objasniti sličnim karakteristikama naših pacijenata: prosečna telesna masa bila je  $75,33 \pm 13,7$ kg,  $CV\%=18,2\%$ , prosečni nivo albumina:  $42,11 \pm 2,9$ g/L,  $CV\%=6,9\%$  (pri čemu nije bilo pacijenata sa nivoom albumina ispod 31g/L) i prosečni serumski kreatinin  $141,43 \pm 44$ mmol/L (pri čemu je kod samo 10 pacijenata zabeležen serumski kreatinin iznad 180mmol/L). Međutim, studije čiji su modeli uključeni u eksternu validaciju bile su sprovedene u prvih mesec dana nakon transplantacije (studija Staatz i sar. (114) čak je sprovedena u prvih nedelju dana nakon transplantacije), što se prilično razlikuje u odnosu

na period koji je obuhvatilo sprovedeno istraživanje (1–204 meseca). Tokom prvih nedelja i meseci nakon transplantacije bubrega, zabeleženo je 30–50% porasta MPA AUC (60, 114, 309). Ovo povećanje izloženosti leku rezultat je smanjenja MPA CL/F tokom vremena koje može biti posledica brojnih faktora, uključujući povećanje nivoa serumskog albumina i hemoglobina, poboljšanje bubrežne funkcije i postepeno smanjenje doze CNI i doze kortikosteroida (57). Razlika u posttransplantacionom periodu objašnjava niži MPA CL/F u sprovedenom istraživanju u odnosu na posmatrane modele.

Koterapija nifedipinom identifikovana je kao značajna kovarijata MPA CL/F u finalnom modelu, ali poređenje dobijenih rezultata je ograničeno jer NIF nije bio deo antihipertenzivne terapije pacijenata u odabranim studijama. Testiranjem podataka naših pacijenata na numeričkim populacionim modelima odabranih studija (**model (2), model (3), model (4)**), uočen je veći nivo slaganja za podatke pacijenata koji nisu na terapiji NIF (**slike 16–18**). Najveći nivo slaganja dobijenih rezultata zabeležen je testiranjem na **modelu (4)**, u kome su telesna masa i nivo serumskog kreatinina prepoznati kao značajne kovarijate. Pored toga, testiranjem dobijenog **modela (1)** koristeći objavljene podatke izabranih studija, dobijene su najverovatnije vrednosti MPA CL/F, pri čemu se veće vrednosti uočavaju u prisustvu NIF (**Slika 15**). Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu da se detaljnije istraži potencijalni uticaj NIF na varijabilnost MPA CL/F i njegov interakcioni potencijal. Međutim, noviji blokatori kalcijumovih kanala češće su prisutni u savremenoj antihipertenzivnoj terapiji, pa interakcije između NIF i MPA nije lako prepoznati u kliničkoj praksi (315, 316).

## 7.5. Procena neželjenih efekata

U odnosu na druge imunosupresivne lekove, MPA pokazuje manju toksičnost. Iako nema uski terapijski indeks kao TAC, neželjeni efekti MPA su često razlog nižeg stepena adherence i značajno utiču na kvalitet života pacijenata u posttransplantacionom periodu (317, 318).

Objavljene studije pokazuju da pol i interakcije lekova mogu značajno uticati na farmakokinetiku TAC, ali i drugih imunosupresivnih lekova (70, 319, 320). Dobijeni rezultati pokazali su veće  $C_0$  koncentracije MPA kod pacijenata ženskog pola u poređenju sa pacijentima muškog pola (**Tabela 18**). Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjem u kojem je zabeležen 10% do 25% manji MPA CL/F kod pacijenata ženskog pola (97). Isti autori su

pokazali da i rasa pacijenata značajno utiče na farmakokinetiku MPA. Sprovedeno istraživanje nije analiziralo uticaj rase jer se pacijenti uključeni u istraživanje nisu razlikovali po ovom kriterijumu. Nasuprot dobijenim rezultatima, Pescovitz i sar. nisu pronašli vezu između pola i farmakokinetičkih parametara MPA (321). Takođe, Shaw i sar. pokazali su da etnička pripadnost i pol ne utiču značajno na farmakokinetičke parametre MPA (322). Međutim, ove studije su sprovedene u ranom posttransplantacionom periodu, za razliku od našeg istraživanja u kome je prosečno vreme nakon transplantacije iznosilo  $78,25 \pm 46,55$  meseci. Ovakvi rezultati sugerišu na potencijalni uticaj pola na farmakokinetiku MPA u kasnom posttransplantacionom periodu, doprinoseći njenoj varijabilnosti i ispoljavanju dugoročnih neželjenih efekata.

Sprovedeno istraživanje je pokazalo da je 57% pacijenata sa transplantiranim bubregom imalo gastrointestinalne smetnje, čak i kada su koristili IPP (najčešće omeprazol i pantoprazol) ili blokator histaminskih H<sub>2</sub> receptora (ranitidin). Slični rezultati su zabeleženi i u drugim studijama (323-325), mada je prijavljena veća učestalost GIT neželjenih efekata. Razlika u dobijenim rezultatima može biti posledica primenjene metodologije za procenu GIT simptoma u različitim istraživanjima, jer takvi simptomi često budu zanemareni od strane pacijenta i lekara. Pored toga, pacijenti koji su učestvovali u ovom istraživanju preventivno su koristili IPP ili blokator H<sub>2</sub> receptora. Pantoprazol je najčešće propisivan lek iz grupe IPP kod pacijenata nakon presađivanja bubrega u cilju smanjenja gastrointestinalnih neželjenih efekata, poput dijareje i mučnine (129). Intravenska primena MMF je povezana sa većom incidencom GIT neželjenih efekata u poređenju sa oralnom primenom, što sugeriše da sistemska izloženost MPA i/ili njegovim metabolitima doprinosi GIT neželjenim efektima (326).

Pacijenti ženskog pola uključeni u ovo istraživanje su prijavili ozbiljnije GIT simptome, naročito kada je reč o pojavi dijareje (**tabela 21**). Pored toga, kod njih su primećene statistički značajno veće doze MPA i C<sub>0</sub> u plazmi u poređenju sa pacijentima muškog pola (**Tabela 18**). Ovo je u skladu sa rezultatima drugih studija (15, 166). Literaturni podaci pokazuju da je incidenca dijareje u toku prve godine nakon transplantacije bubrega bila u opsegu od 15,6% do 32,5% nakon primene MMF u dnevnoj dozi od 2000mg u kombinaciji sa CsA (162, 327). Kod pacijenata koji koriste MMF u kombinaciji sa TAC, prijavljena incidenca dijareje je čak i veća (328, 329). Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju sličnu učestalost dijareje kod ispitivanih pacijenata: 25% kod pacijenata na terapiji MPA u kombinaciji sa TAC; 22,2% kod onih koji su

pored MPA koristili CsA (**Tabela 22**). Distribucija ostalih individualnih neželjenih efekata se nije statistički značajno razlikovala po grupama pacijenata.

Mehanizmi odgovorni za GIT smetnje i posebno za pojavu dijareje nakon primene MMF su još uvek nedovoljno razjašnjeni. Kod pacijenata kod kojih je primena MMF praćena dijarejom primećena je vilozna atrofija duodenuma i inflamacija u ileumu (330, 331). Neki autori smatraju da AcMPAG, koji se preko žuči izlučuje u lumen creva, može izazvati dijareju (332). Shodno tome, pacijenti koji primenjuju MPA u kombinaciji sa CsA i nosioci polimorfizma bilijarnog transportera koji smanjuje izlučivanje metabolita MPA mogu imati blaže simptome dijareje (333). Liapis i sar. sugerišu da MMF narušava funkciju enterocita indukcijom apoptoze na nivou kripte debelog creva (334). Pored toga, primećene su ulceracije na sluzokoži usta i debelog creva koje se mogu pripisati toksičnosti MMF (335-337). Dodatno, MPA koji ima antibakterijski efekat, može poremetiti osetljiv balans crevne flore, povećavajući rizik od crevnih infekcija (325, 338). Kod nekih pacijenata primena MMF je bila praćena enterokolitisom sličnim Kronovoj bolesti (339). Simptomi obično nestaju nakon smanjenja doze, privremenog prekida ili potpunog prekida uzimanja MMF (329).

Formulacija MPA u obliku enterosolventnih tableta, EC-MPS, razvijena je sa ciljem da smanji incidencu GIT neželjenih efekata. Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da su vrednosti GIT skora bile značajno veće kod pacijenata koji koriste MMF u odnosu na EC-MPS (**Tabela 19**). U skladu sa tim, u kliničkim studijama primećeno je poboljšanje gastrointestinalne podnošljivosti nakon konverzije sa MMF na EC-MPS (340-343). Shodno tome, EC-MPS bi mogao biti korisna alternativa kod pacijenata koji pate od GIT simptoma nakon primene MMF. Međutim, u dvostruko-slepim, uporednim studijama sa MMF primenjenim u ekvivalentnoj dozi, ukupna incidenca i profil GIT neželjenih efekata bili su slični kod pacijenata lečenih MMF i EC-MPS (344-346). Tokom 12 meseci, 15,0% pacijenata na terapiji EC-MPS i 19,5% pacijenata na terapiji MMF zahtevalo je smanjenje doze zbog prisutnih GIT neželjenih efekata (345).

Analizom dobijenih rezultata, uočava se veći GIT skor kod pacijenata ženskog pola u odnosu na pacijente muškog pola, sa statistički značajnom razlikom u grupi koja je koristila dozu MPA veću od 720mg (**Tabela 20**). Morissette i sar. proučavali su polne razlike u farmakokinetici MMF kod 100 pacijenata sa transplantiranim bubregom koristeći odnos koncentracije MPAG/MPA kao meru ukupne glukuronidacije (347). Gotovo dvostruka razlika u brzini i obimu



glukuronidacije posredovane UGT, ukazuje na to da muškarci imaju pojačanu glukuronidaciju u poređenju sa ženama ( $p < 0,0001$ ), što utiče na doziranje MPA (347).

Iako su kod pacijenata ženskog pola zabeležene veće srednje vrednosti skorova (GIT, estetski, CNS, kumulativni) u poređenju sa pacijentima muškog pola u okviru istog režima doziranja, ove razlike nisu bile statistički značajne (osim za već pomenuti GIT skor u grupi koja je koristila dozu MPA veću od 720mg) (**Tabela 20**). Svi analizirani skorovi bili su viši kod pacijenata koji su koristili MPA u dozi od 720mg u poređenju sa višom dozom MPA. Slično tome, Zhang i sar. istraživali su efikasnost i bezbednost intenziviranog EC-MPS režima kod pacijenata nakon transplantacije bubrega (348). Ovaj režim podrazumevao je za 50% veće doze EC-MPS tokom prve dve nedelje nakon transplantacije u odnosu na standardni režim doziranja. Kod pacijenata na ovom režimu doziranja nije zabeležena povećana učestalost neželjenih efekata, uključujući dijareju i leukopeniju (348). Nasuprot tome, Vanhove i sar. navode da su gastrointestinalni neželjeni efekti i hematološka toksičnost glavni razlog smanjenja doze MMF u prvoj godini nakon transplantacije (166). Bunnapradist i sar. potvrdili su doznu zavisnost gastrointestinalnih neželjenih efekata kod pacijenata lečenih MPA (349). Nesklad između doze MPA i učestalosti neželjenih efekata kod naših pacijenata verovatno leži u činjenici da je prosečno vreme nakon transplantacije bilo 6,7 godina u grupi koja je koristila MPA u dozi od 720mg u poređenju sa pacijentima koji su koristili veću dozu MPA gde je prosečno vreme nakon transplantacije bilo 5,5 godina. Pored toga, MPA u dozi od 720mg koristili su stariji pacijenti (46,7 nasuprot 41,7 godina) sa višestrukim komorbiditetima.

Individualni estetski neželjeni efekti poput promena na koži bili su češći kod žena ( $p = 0,037$ ) (**Tabela 21**). Promene na koži bile su statistički značajno češće kod žena koje su koristile MPA u dozi većoj od 720mg u poređenju sa muškarcima sa istim doznim režimom (**Slika 20**). Akne su prijavljene kod 30,2% muškaraca i 20,8% žena sa presađenim bubregom i uglavnom su bile lokalizovane na licu i trupu, što je u skladu sa drugim istraživanjima (288, 350). Veća učestalost akni kod muških pacijenata ukazuje na mogućnost da je ovaj neželjeni efekat uslovljen hormonima (12). Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da je posttransplantacioni dijabetes registrovan kod 17% muškaraca i 12,5% žena sa presađenim bubregom. Učestalost dijabetesa u našem istraživanju je slična onoj koja je zabeležena u drugim studijama (351, 352).

Prevalenca anemije (izazvana nedostatkom gvožđa) nakon presađivanja bubrega varira u zavisnosti od vremena proteklog od transplantacije. U grupi od 700 pacijenata sa presađenim bubregom kod kojih je prošlo najmanje godinu dana od transplantacije (srednja vrednost: 5,4 godine, interkvartilna razlika: 1,9–12,0 godina), prevalenca anemije definisana kao nivo feritina  $<300\mu\text{g/L}$  i saturacija transferina  $<20\%$  bila je 30% (353). Druge studije, sa srednjim vremenom nakon transplantacije od najmanje 4 godine, otkrile su prevalencu između 6% i 47% (354-358). Pojedini autori pokazali su da je prisustvo anemije udruženo sa povećanim rizikom od mortaliteta (353, 359-361). Pored toga, nedostatak gvožđa i niži nivo feritina i transferina u plazmi negativno utiču na kognitivne funkcije (pamćenje, pažnja, rasuđivanje) pacijenata sa presađenim bubregom (362). Statistički značajna povezanost između MPA  $\text{AUC}_{0-12}$  i hematoloških neželjenih efekata prijavljena je kod 34% pacijenata (14). U prospektivnoj studiji koja je obuhvatala 100 pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji MPA u kombinaciji sa TAC, pacijenti sa leukopenijom i anemijom imali su značajno veći MPA  $\text{AUC}_{0-12}$  i  $\text{C}_0$  nakon 3 i nakon 12 meseci od transplantacije (363). Druga prospektivna studija kod 31 pacijenta sa presađenim bubregom na terapiji MPA i CsA izvestila je da je MPA AUC bila značajno veća ( $62,1\pm 21,1$  naspram  $39,8\pm 15,2$ ;  $p=0,0005$ ) kod pacijenata koji su imali neželjene efekte (leukopeniju, anemiju, dijareju) (364).

## **7.6. Značaj praćenja koncentracije mikofenolne kiseline u salivi**

U kliničkoj praksi postoji stalna težnja za unapređenjem terapije, posebno u osetljivoj grupi pacijenata. Stoga su specijalisti farmakoterapije fokusirani na poboljšanje zdravstvenih ishoda i kvalitet života pacijenata sa presađenim bubregom (106, 309, 365). Iz tog razloga, sve se češće koriste matematički alati i simulacije u cilju uspostavljanja veze između izloženosti lekovima i njihovog odnosa korist/rizik (14). U praksi je režim doziranja MPA pojednostavljen zbog nižeg toksičnog potencijala u poređenju sa kalcineurinskim inhibitorima (TAC ili CsA). Ipak, neke studije su naglasile potrebu za individualnim pristupom MPA praćenjem koncentracije u plazmi ili salivi, posebno kod pacijenata sa nižim ALB (58, 366). Stoga, praćenje  $\text{C}_{\text{SAL}}$  MPA može biti značajno u proceni nivoa nevezane MPA.

Tönshoff i sar. ukazuju na klinički značaj praćenja koncentracije MPA u cilju prevencije odbacivanja grafta, posebno kod pacijenata sa visokim imunološkim rizikom u ranom

posttransplantacionom periodu. Pomenuti autori su kao najrizičnije istakli pedijatrijsku i adolescentnu populaciju koji su lečeni imunosupresivnim protokolima koje karakteriše minimizacija ili potpuna eliminacija CNI i/ili kortikosteroida (58). Nasuprot tome, u našoj kliničkoj praksi nisu zastupljeni režimi potpune eliminacije CNI i/ili kortikosteroida.

Ne postoje stroge preporuke za monitoring MPA, ali je dokazana korist nakon praćenja koncentracije MPA u pogledu efikasnosti i bezbednosti terapije (10). U populacionom farmakokinetičkom modelu, de Winter i sar. jasno su ukazali na povezanost doze MPA i ukupne i nevezane izloženosti (74). Takođe, ista studija je pokazala da promene u vezivanju za proteine usled izmenjene funkcije bubrega ili koncentracije albumina u plazmi utiču na ukupnu izloženost MPA, dok je uticaj na nevezanu izloženost bio manji (74). Ovaj rezultat je suprotan našim nalazima, gde je ALB uticao na nevezani MPA (**model (5)**). Utvrđena korelacija između nevezane i ukupne koncentracije MPA može biti povezana sa efikasnošću i neželjenim efektima. Jednačina (**model (5)**) dobijena fitovanjem eksperimentalnih podataka i verifikovana MC simulacijom (**Slika 23**), može biti korisna u proceni uticaja hipoalbuminemije na farmakokinetiku MPA na osnovu promena u nevezanoj koncentraciji MPA, s obzirom na to da je koncentracija u plazmi simulirana unutar eksperimentalno izmerenog opsega. Dobijeni model je pokazao značajno povećanje nevezane frakcije MPA (za 43%) ukoliko je  $ALB < 25\text{g/L}$  (**Slika 24**) što se smatra klinički značajnom hipoalbuminemijom (367). Ovakvi rezultati mogu sugerisati da se terapijsko praćenje MPA treba razmotriti u odnosu na vrednosti ALB. U skladu sa tim, alternativni farmakokinetički (tj. nevezana frakcija MPA i metaboliti) i farmakodinamički pristupi pokazali su kliničku korisnost za predviđanje efikasnosti i toksičnosti leka (368-370). Nasuprot tome, neki autori nisu dokazali vezu između  $C_{SAL}$  i ukupne ili slobodne koncentracije MPA u plazmi. Stoga su sugerisali da saliva nije pouzdan marker nivoa  $C_P$  MPA (156, 371).

Sprovedeno istraživanje je imalo za cilj da uspostavi vezu između ispoljenih neželjenih efekata i koncentracije nevezane MPA. Rezultati su pokazali veću učestalost GIT neželjenih efekata (dijareja,  $p=0,038$ ) i EST neželjenih efekata (promene na koži,  $p=0,037$ ) kod pacijenata ženskog pola (**Tabela 21**). Iako su GIT neželjeni efekti MPA detaljno istraženi, profil EST efekata još uvek nije razjašnjen, ali bi se mogli razmotriti sa aspekta adherence pacijenata. Poznato je da kortikosteroidi mogu izazvati EST neželjene efekte (31). Ipak, imajući u vidu pacijente uključene u ovo istraživanje i veoma nisku dozu prednizona (5–10mg/dan) u kasnom

posttransplantacionom periodu, njihov doprinos je minimalan. Štaviše, ustanovljena je veza između  $C_{SAL}$  MPA i EST skora kod pacijenata sa različitim nivoom ALB (Slika 25). U grupi sa nižim nivoom ALB pokazana je povezanost između višeg EST skora i veće  $C_{SAL}$ , što znači da povećanje  $C_{SAL}$  može dovesti do povećanog intenziteta neželjenih efekata. Pored toga, ovakav rezultat ukazuje na potrebu preciznijeg praćenja MPA u kliničkoj praksi zbog povećanog rizika od neželjenih efekata kod pacijenata sa hipoalbuminemijom. Pregledom literature uočena su brojna istraživanja koja su ispitivala povezanost MPA AUC i  $C_0$  sa rizikom odbacivanja i pojavom neželjenih efekata. Međutim, mali broj studija se bavio istraživanjem veze između koncentracije nevezane MPA i kliničkih ishoda (efikasnost i neželjeni efekti) (57, 369). Iako se praćenje koncentracije nevezane MPA ne koristi često, primećeno je bolje predviđanje kliničkih ishoda, budući da je samo nevezana MPA farmakološki aktivna i sposobna da inhibira IMPDH (267). Značajno veće vrednosti nevezane MPA AUC<sub>0-6</sub> primećene su kod pacijenata koji su imali jedan ili više neželjenih efekata (leukopenija, trombocitopenija ili infekcija) u prvih mesec dana nakon transplantacije ( $p=0,004$ ) (372). Slična zapažanja su zabeležena kod pedijatrijskih pacijenata nakon transplantacije bubrega (373). Vrednost nevezane MPA AUC<sub>0-12</sub>  $>0,4\text{mg}/\text{L}$  (osetljivost 92% i specifičnost 61%) označena je kao granična za razlikovanje pacijenata sa leukopenijom ili infekcijom, što dodatno podržava korisnost merenja nevezane koncentracije MPA u poređenju sa ukupnim koncentracijama.

Potencijalna ograničenja ovog istraživanja odnose se na mali broj pacijenata i činjenicu da su svi bili u kasnom posttransplantacionom periodu. U skladu sa kliničkim okolnostima bilo je moguće određivanje ukupne MPA u plazmi i koncentracije u salivi, ali ne i koncentracije nevezane MPA u plazmi ili metabolita MPAG. Pored toga, pacijenti su samostalno popunjavali upitnik o neželjenim efektima, koji nije uključivao verifikaciju lekara. Dodatno, zbog istovremeno primenjenih lekova, moguće je preklapanje neželjenih efekata. Potencijalno značajni polimorfizmi gena nisu razmatrani u fazi izgradnje populacionog modela, što ostaje kao jedan od ciljeva u budućnosti. Veliki doprinos ovog istraživanja ogleda se u dobijenoj jednačini populacionog modela koja daje osnovu za individualizaciju terapije MPA kod pacijenata sa prisutnim faktorima varijabilnosti. Dodatno, validirani model se može upotrebiti i za odgovarajuće simulacije radi ispitivanja potencijalnih kliničkih stanja. Glavni doprinos ove studije je dokazana povezanost koncentracije u salivi sa ispoljenim neželjenim efektima MPA kod pacijenata sa presađenim bubregom. Buduća istraživanja imaće za cilj kreiranje optimalnog

matematičkog modela MPA CL/F koji će zameniti ili dopuniti terapijsko praćenje MPA i poboljšati zdravstvene ishode. Takođe, modele treba potvrditi i validirati u velikoj grupi pacijenata, uključujući i šire indikaciono područje, kao što su transplantacija jetre i autoimune bolesti.

## 8. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Razvijena je nova HPLC metoda za analizu MPA u plazmi pacijenata. Širok opseg metode, visoka osetljivost i kratko trajanje analize omogućavaju primenu metode u kliničkoj praksi.
- Validirana metoda je pogodna za rutinsku analizu MPA u plazmi pacijenata nakon transplantacije bubrega. Može se koristiti za terapijsko praćenje lekova, kao i za farmakokinetičke studije.
- Populacionom farmakokinetičkom analizom su identifikovani značajni faktori varijabilnosti MPA CL/F kod pacijenata sa presađenim bubregom. Najveći uticaj na MPA CL/F pokazali su starost pacijenata, dnevna doza MPA i koterapija nifedipinom.
- Primenom metoda eksterne validacije (koristeći novi set podataka i Monte Carlo simulaciju) potvrđena je validnost razvijenog populacionog farmakokinetičkog modela.
- Veće doze i  $C_0$  koncentracije MPA utvrđene su kod transplantiranih pacijenata ženskog pola. U istoj populaciji zabeležena je veća učestalost individualnih neželjenih efekata u odnosu na pripadnike muškog pola, pri čemu je statistički značajna razlika ustanovljena kod pojave dijareje i promena na koži.
- Utvrđen je značajno veći GIT skor kod transplantiranih pacijenata ženskog pola koje su koristile doze MPA > 720mg u poređenju sa muškarcima na istom režimu doziranja leka.
- Vrednosti GIT skora bile su značajno veće kod pacijenata koji koriste MMF u odnosu na EC-MPS.
- Dokazana je povezanost između koncentracije MPA u plazmi i salivi koristeći matematički pristup (metodu najmanjih kvadrata i Monte Carlo simulaciju).
- Ustanovljena je veza između koncentracije MPA u salivi i EST skora kod pacijenata sa nižim nivoom albumina u plazmi.

Budući da MPA ne zahteva rutinski monitoring koncentracije, dobijeni populacioni farmakokinetički model daje osnovu za individualizaciju terapije kod transplantiranih pacijenata sa prisutnim faktorima varijabilnosti. Prilikom optimizacije režima doziranja MPA treba uzeti u obzir polne razlike u cilju postizanja efikasne i bezbedne terapije kod pacijenata sa presađenim bubregom. Praćenje koncentracije MPA u salivi može doprineti bezbednosti imunosupresivne terapije kod pacijenata sa presađenim bubregom.

## 9. Literatura

1. Metalidis C, Kuypers D. Immunosuppressive therapy after kidney transplantation: current and new strategies. *Minerva Urol Nefrol* 2011; 63(1): 1-19.
2. Wang HY, Chan AL, Chen MT, Liao CH, Tian YF. Effects of pharmaceutical care intervention by clinical pharmacists in renal transplant clinics. *Transplant Proc* 2008; 40(7): 2319-23.
3. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev (Orlando)* 2017; 31(1): 10-7.
4. Menon MC, Murphy B. Maintenance immunosuppression in renal transplantation. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13(4): 662-71.
5. Steward-Tharp SM, Song YJ, Siegel RM, O'Shea JJ. New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 123-48.
6. Jasiak NM, Park JM. Immunosuppression in Solid-Organ Transplantation: Essentials and Practical Tips. *Crit Care Nurs Q* 2016; 39(3): 227-40.
7. Parlakpınar H, Gunata M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2021; 43(6): 651-65.
8. Viklicky O, Slatinska J, Novotny M, Hrubá P. Developments in immunosuppression. *Curr Opin Organ Transplant* 2021; 26(1): 91-6.
9. Cunningham KC, Hager DR, Fischer J, D'Alessandro AM, Levenson GE, Kaufman DB, et al. Single-dose basiliximab induction in low-risk renal transplant recipients. *Pharmacotherapy* 2016; 36(7): 823-9.



10. Chambord J, Couzi L, Merville P, Moreau K, Xuereb F, Djabarouti S. Benefit of a pharmacist-led intervention for medication management of renal transplant patients: a controlled before-and-after study. *Ther Adv Chronic Dis* 2021; 12: 20406223211005275.
11. Sun Q, Liu L-H, Cheng Z, Chen J, Ji S, Zeng C, et al. Treatment of early mixed cellular and humoral renal allograft rejection with tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Kidney Int* 2007; 71:24–30.
12. Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 403280.
13. Meaney CJ, Arabi Z, Venuto RC, Consiglio JD, Wilding GE, Tornatore KM. Validity and reliability of a novel immunosuppressive adverse effects scoring system in renal transplant recipients. *BMC Nephrol* 2014; 15: 88.
14. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, et al. Personalized therapy for mycophenolate: Consensus report by the International association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2021; 43(2): 150-200.
15. Momper JD, Misel ML, McKay DB. Sex differences in transplantation. *Transplant Rev* 2017; 31(3): 145–50.
16. Abd Rahman AN, Tett SE, Abdul Gafor HA, McWhinney BC, Staatz CE. Development of improved dosing regimens for mycophenolate mofetil based on population pharmacokinetic analyses in adults with lupus nephritis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2017; 42(6): 993-1004.
17. Ferreira PCL, Thiesen FV, de Araujo TT, D'Ávila DO, Gadonski G, de Oliveira CSA, et al. Comparison of plasma and oral fluid concentrations of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite by LC-MS in kidney transplant patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2019; 75(4): 553-9.
18. Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C, Nielsen J. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(9): 3035–43.

19. Siebert A, Prejs M, Cholewinski G, Dzierzbicka K. New analogues of Mycophenolic Acid. *Mini Rev Med Chem* 2017; 17(9): 734-45.
20. Delucchi BA, Valenzuela AM, Ferrario BM, Lillo DAM, Guerrero GJL, Rodríguez SE, et al. Early steroid withdrawal in pediatric renal transplantation. *Rev Med Child* 2006; 134(11): 1393-401.
21. Lang P, Pardon A, Audard V. Long-term benefit of mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation* 2005; 79 (3 Suppl): S47-8.
22. Bandeira M, Vieira A, Guimarães V, Bento T, Amoura Z, Arnaud L, et al. Off-label use of mycophenolate mofetil in the treatment of rare and complex rheumatic connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2022; 40 Suppl 134(5): 32-9.
23. Zhou Y, Rosenthal D, Dutz J, Ho V. Mycophenolate mofetil (CellCept) for psoriasis: a two-center, prospective, open-label clinical trial. *J Cutan Med Surg* 2003; 7(3): 193-7.
24. Kapitsinou PP, Boletis JN, Skopouli FN, Boki KA, Moutsopoulos HM. Lupus nephritis: treatment with mycophenolate mofetil. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(3): 377–80.
25. Frohman EM, Brannon K, Racke MK, Hawker K. Mycophenolate mofetil in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 2004; 27(2): 80–3.
26. Provan D, Moss AJ, Newland AC, Bussel JB. Efficacy of mycophenolate mofetil as singleagent therapy for refractory immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 2006; 81(1): 19–25.
27. Heller M, Shin HT, Orlow SJ, Schaffer JV. Mycophenolate mofetil for severe childhood atopic dermatitis: experience in 14 patients. *Br J Dermatol* 2007; 157(1): 127–32.
28. Walkiewicz-Pielaszek K, Swacha M, Bułło-Piontecka B, Rutkowski B, Olesińska M. Mycophenolate mofetil-20 years of experience in treatment of rheumatic diseases. *Postepy Hig Med Dosw* 2015; 69: 176-87.

29. Choi MJ, Eustace JA, Gimenez LF, Atta MG, Scheel PJ, Sothinathan R, et al. Mycophenolate mofetil treatment for primary glomerular diseases. *Kidney Int* 2002; 61(3): 1098–114.
30. Mayer DF, Kushwaha SS. Transplant immunosuppressant agents and their role in autoimmune rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(3): 219–25.
31. Strathie Page SJ, Tait CP. Mycophenolic acid in dermatology a century after its discovery. *Australas J Dermatol* 2015; 56(1): 77-83.
32. Satoh S, Tada H, Murakami M, Tsuchiya N, Inoue T, Togashi H, et al. The influence of mycophenolate mofetil versus azathioprine and mycophenolic acid pharmacokinetics on the incidence of acute rejection and infectious complications after renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(4): 1751-3.
33. Remuzzi G, Cravedi P, Costantini M, Lesti M, Ganeva M, Gherardi G, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of chronic allograft dysfunction in renal transplantation: the MYSS follow-up randomized, controlled clinical trial. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(6): 1973-85.
34. Knight SR, Russell NK, Barcena L, Morris PJ. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review. *Transplantation* 2009; 87: 785-94.
35. Wagner M, Earley AK, Webster AC, Schmid CH, Balk EM, Uhlig K. Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 12: CD007746.
36. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47(2-3): 85-118.
37. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 2005a; 14 (1): s2-8.

38. Pelletier RP, Akin B, Henry ML, Bumgardner GL, Elkhammas EA, Rajab A, et al. The impact of mycophenolate mofetil dosing patterns on clinical outcome after renal transplantation. *Clin Transplant* 2003; 17(3): 200–5.
39. Bentata Y. Mycophenolates: the latest modern and potent immunosuppressive drugs in adult kidney transplantation: what we should know about them? *Artif Organs* 2020; 44: 561-76.
40. Ponticelli C, Scolari MP. Calcineurin inhibitors in renal transplantation still needed but in reduced doses: a review. *Transplant Proc* 2010; 42(6): 2205-8.
41. Zivčić-Ćosić S, Trobonjača Z, Rački S. Immunosuppressive treatment for kidney transplantation. *Prilozi* 2011; 32(2): 87-103.
42. Abbas AK, Lichtman AH, Palle S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 365-88.
43. Nafar M, Sahraei Z, Salamzadeh J, Samavat S, Vaziri N. Oxidative stress in kidney transplantation: causes, consequences, and potential treatment. *Iran J Kidney Dis* 2011; 5(6): 357-72.
44. Cvetković T, Pavlović R, Đorđević VB, Stojanović I, Veličković-Radovanović R, Ignjatović A, et al. Dimethylarginine - biomarkers in progression of kidney disease. *J Med Biochem* 2012; 31: 301–9.
45. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2005b; 80(2S – p): S181-S190. B
46. Van Leuven S, Kastelein J, Hayden M, Stroes E. Mycophenolate mofetil as an immunomodulatory silver bullet in atherogenesis? *Lupus* 2006; 15(11 suppl): 11-7.
47. Nashan B, Suwelack B, Ivens K, Arns W, Lhotta K, Bourbigot B, et al. Conversion to enteric-coated mycophenolate sodium from various doses of mycophenolate mofetil: results of a prospective international multicenter trial in maintenance renal transplant patients receiving cyclosporine. *Transplant Proc* 2006; 38(9): 2856-9.

48. Budde K, Bauer S, Hambach P, Hahn U, Röblitz H, Mai I, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic comparison of enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant* 2007; 7(4): 888-98.
49. Arns W, Breuer S, Choudhury S, Taccard G, Lee J, Binder V, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 2005; 19(2): 199-206.
50. Budde K, Glander P, Krämer BK, Fischer W, Hoffmann U, Bauer S, et al. Conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in maintenance renal transplant recipients receiving tacrolimus: clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic outcomes. *Transplantation* 2007; 83(4): 417-24.
51. Sollinger H. Enteric-coated mycophenolate sodium: therapeutic equivalence to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl): 517S-20S.
52. Lu XY, Huang HF, Sheng-Tu JZ, Liu J. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese kidney transplant patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6(9): 885-91.
53. Rutkowski B, Bzoma B, Dębska-Ślizień A, Chamienia A. Immunosuppressive regimens containing generic mycophenolate mofetil (Myfenax) in de novo renal transplant recipients--preliminary results of 6-month observation. *Ann Transplant* 2011; 16(4): 74-80.
54. Sunder-Plassmann G, Reinke P, Rath T, Wiecek A, Nowicki M, Moore R, et al. Comparative pharmacokinetic study of two mycophenolate mofetil formulations in stable kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2012; 25(6): 680-6.
55. Danguilan RA, Lamban AB, Luna CA. Pilot study on the efficacy and safety of generic mycophenolate mofetil (Mycept) compared with Cellcept among incident low-risk primary kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2014; 46(2):415-7.
56. Figurski MJ, Korecka M, Fields L, Waligórska T, Shaw LM. High-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy method for simultaneous quantification

of total or free fraction of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites. *Ther Drug Monit* 2009; 31(6):717-26.

57. Tett SE, Saint-Marcoux F, Staatz CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M, et al. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transpl Rev (Orlando)* 2011; 25(2): 47–57.

58. Tönshoff B, David-Neto E, Ettenger R, Filler G, van Gelder T, Goebel J, et al. Pediatric aspects of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in renal transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2011; 25(2): 78-89.

59. Watson CJ, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth* 2012; 108 Suppl 1: i29-42.

60. Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46 (1):13-58.

61. Cattaneo D. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolic Acid: Different Formulations in Stable Renal Transplant Patients. *Trends in Transplant* 2008; 2: 51-61.

62. Zhang D, Chow DS-L, Renbarger JL. Simultaneous quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma by an UPLC-MS/MS assay. *Biomed Chromatogr* 2016; 30(10): 1648-55.

63. Pescovitz MD, Conti D, Dunn J, Gonwa T, Halloran P, Sollinger H, et al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin Transplant* 2000; 14(3): 179–88.

64. Braun KP, Glander P, Hambach P, Böhler T, Waiser J, Mai I, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate mofetil under oral and intravenous therapy. *Transplant Proc* 2002; 34(5): 1745–7.

65. Fernández A, Villafruela J, Amezquita Y, Caldés S, Marcen R, Galeano C, et al. Mycophenolate mofetil absorption quotient: interest to clinical practice. *Transplant Proc* 2009; 41(6): 2317-9.
66. Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem* 2007; 40(11): 752-64.
67. Opelz G, Döhler B. Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 87(6): 795-802.
68. De Winter BC, van Gelder T, Glander P, Cattaneo D, Tedesco-Silva H, Neumann I, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: a comparison between enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47(12): 827-38.
69. Arns W, Gies M, Choi L, Zhu W, Cooper P, Yeh CM, et al. Absorption characteristics of EC-MPS--an enteric-coated formulation of mycophenolic sodium. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006; 44(8): 375-85.
70. Staatz CE, Tett SE. Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: an update. *Arch Toxicol* 2014; 88(7): 1351-89.
71. Thi MT, Mourad M, Capron A, Tshinanu FM, Vincent MF, Wallemacq P. Plasma and intracellular pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of mycophenolic acid in de novo kidney transplant patients. *Clin Biochem* 2015; 48(6): 401-5.
72. Łuszczynska P, Pawiński T, Kunicki PK, Sikorska K, Marszałek R. Free mycophenolic acid determination in human plasma ultrafiltrate by a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Biomed Chromatogr* 2017; 31(10).
73. Van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, Shaw LM, Mathot RA. Pharmacokinetic modelling of the plasma protein binding of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(7): 463-76.

74. De Winter BC, van Gelder T, Sombogaard F, Shaw LM, van Hest RM, Mathot RA. Pharmacokinetic role of protein binding of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in renal transplant recipients. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009; 36(6): 541–64.
75. Ensom MH, Partovi N, Decarie D, Dumont RJ, Fradet G, Levy RD. Pharmacokinetics and protein binding of mycophenolic acid in stable lung transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2002; 24(2): 310–4.
76. Atcheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, Duffull SB, Mudge DW, Pillans PI, et al. Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther Drug Monit* 2004; 26(3): 284–6.
77. Kirpalani A, Rothfels L, Sharma AP, Cuellar CR, Filler G. Nephrotic state substantially enhances apparent mycophenolic acid clearance. *Clin Nephrol* 2019; 91(3): 162-71.
78. Hesselink DA, van Gelder T. Genetic and nongenetic determinants of between-patient variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78(4): 317–21.
79. Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T. Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309(3): 1029–35.
80. Zhao W, Fakhoury M, Deschênes G, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal-transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2010; 50(11): 1280-91.
81. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78(4): 351–61.



82. Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(1): 139–46.
83. Tedesco-Silva H, Bastien MC, Choi L, Felipe C, Campestrini J, Picard F, et al. Mycophenolic acid metabolite profile in renal transplant patients receiving enteric-coated mycophenolate sodium or mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 2005; 37(2): 852-5.
84. Ferreira PCL, Thiesen FV, Pereira AG, Zimmer AR, Fröhlich PE. A short overview on mycophenolic acid pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Transplant* 2020; 34(8): e13997.
85. Basu NK, Kole L, Kubota S, Owens IS. Human UDP-glucuronosyl-transferases show atypical metabolism of mycophenolic acid and inhibition by curcumin. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(7): 768–73.
86. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(8): 775–8.
87. Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC. Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(2): 261-6.
88. Miura M, Kagaya H, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T, et al. Influence of drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008; 30(5): 559-64.
89. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, et al. The role of organic aniontransporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87(1): 100-8.
90. Geng F, Jiao Z, Dao YJ, Qiu XY, Ding JJ, Shi XJ, et al. The association of the UGT1A8, SLCO1B3 and ABCC2/ABCG2 genetic polymorphisms with the pharmacokinetics of

mycophenolic acid and its phenolic glucuronide metabolite in Chinese individuals. *Clin Chim Acta* 2012; 413(7-8): 683-90.

91. Shum B, Duffull SB, Taylor PJ, Tett SE. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(2): 188–97.

92. Knight SR, Morris PJ. Does the evidence support the use of mycophenolate mofetil therapeutic drug monitoring in clinical practice? A systematic review. *Transplantation*. 2008; 85(12): 1675-85.

93. Okour M, Jacobson PA, Ahmed MA, Israni AK, Brundage RC. Mycophenolic acid and its metabolites in kidney transplant recipients: A semimechanistic enterohepatic circulation model to improve estimating exposure. *J Clin Pharmacol* 2018; 58(5): 628-39.

94. Ettenger R, Bartosh S, Choi L, Zhu W, Niederberger W, Campestrini J, et al. Pharmacokinetics of enteric-coated mycophenolate sodium in stable pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2005; 9(6): 780–7.

95. Holt DW. Monitoring mycophenolic acid. *Ann Clin Biochem* 2002; 39(Pt 3): 173–83.

96. Gabardi S, Tran JL, Clarkson MR. Enteric-coated mycophenolate sodium. *Ann Pharmacother* 2003; 37(11): 1685–93.

97. Tornatore KM, Meaney CJ, Wilding GE, Chang SS, Gundroo A, Cooper LM, et al. Influence of sex and race on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable African American and Caucasian renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2015; 54(4): 423–34.

98. Tönshoff B. Immunosuppressants in Organ Transplantation. *Handb Exp Pharmacol* 2020; 261: 441-69.

99. Wright DF, Winter HR, Duffull SB. Understanding the time course of pharmacological effect: a PKPD approach. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71: 815–23.

100. Holford N. Concentration controlled therapy. In: Breckenridge A, ed. Esteve Foundation Workshop. Amsterdam, The Netherlands; Elsevier Science; 2001.
101. Naderer OJ, Dupuis RE, Heinzen EL, Wiwattanawongsa K, Johnson MW, Smith PC. The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(2): 219-26.
102. Katz-Greenberg G, Shah S. Sex and gender differences in kidney transplantation. *Semin Nephrol* 2022; 42(2): 219-29.
103. Yu ZC, Zhou PJ, Wang XH, Françoise B, Xu D, Zhang WX, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in Chinese adult renal transplant recipients. *Acta Pharmacol Sin* 2017; 38(11): 1566-79.
104. Cortinovis M, Gotti E, Pradini S, Gaspari F, Perico N. Renal graft function and low-dose cyclosporine affect mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplantation. *Transplantation* 2011; 92(5): 550-6.
105. Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, et al. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7(11): 2496-503.
106. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(2): 341–58.
107. Chen H, Chen B. Clinical mycophenolic acid monitoring in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 10715-128.
108. Md Dom ZI, Coller JK, Carroll RP, Tuke J, McWhinney BC, Somogyi AA, et al. Mycophenolic acid concentrations in peripheral blood mononuclear cells are associated with the incidence of rejection in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84(10): 2433-42.

109. Alsmadi MM, Alfarah MQ, Albderat J, Alsalaita G, AlMardini R, Hamadi S, et al. The development of a population physiologically based pharmacokinetic model for mycophenolic mofetil and mycophenolic acid in humans using data from plasma, saliva, and kidney tissue. *Biopharm Drug Dispos* 2019; 40(9): 325-40.
110. Patel CG, Richman K, Yang D, Yan B, Gohh RY, Akhlaghi F. Effect of diabetes mellitus on mycophenolate sodium pharmacokinetics and inosine monophosphate dehydrogenase activity in stable kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2007; 29(6): 735–42.
111. Kuypers DR, Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, Vincenti F, Snell P, et al. Mycophenolic acid exposure after administration of mycophenolate mofetil in the presence and absence of ciclosporin in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(5): 329-41.
112. Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T. Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 27(4): 368-78.
113. El-Sheikh AA, Koenderink JB, Wouterse AC, van den Broek PH, Verweij VG, Masereeuw R, et al. Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus. *Transl Res* 2014; 164(1): 46-56.
114. Staatz CE, Duffull SB, Kiberd B, Fraser AD, Tett SE. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid during the first week after renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61(7): 507-16.
115. De Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, Neumann I, van Hest RM, Doorduijn JK, et al. Differences in clearance of mycophenolic acid among renal transplant recipients, hematopoietic stem cell transplant recipients, and patients with autoimmune disease. *Ther Drug Monit* 2010; 32(5): 606-14.

116. Li P, Shuker N, Hesselink DA, van Schaik RH, Zhang X, van Gelder T. Do Asian renal transplant patients need another mycophenolate mofetil dose compared with Caucasian or African American patients? *Transpl Int* 2014; 27(10): 994-1004.
117. Meiser BM, Pfeiffer M, Schmidt D, Reichenspurner H, Ueberfuhr P, Paulus D, et al. Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of MPA monitoring. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(2): 143-9.
118. Hübner GI, Eismann R, Sziegoleit W. Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 1999; 21(5): 536-9.
119. Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW, van Gelder T. Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 2005; 5(5): 987-94.
120. Brown NW, Aw MM, Mieli-Vergani G, Dhawan A, Tredger JM. Mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide pharmacokinetics in pediatric liver transplant recipients: effect of cyclosporine and tacrolimus comedication. *Ther Drug Monit* 2002; 24(5): 598-606.
121. Naito T, Shinno K, Maeda T, Kagawa Y, Hashimoto H, Otsuka A, et al. Effects of calcineurin inhibitors on pharmacokinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite during the maintenance period following renal transplantation. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 275-80.
122. Huang HF, Yao X, Chen Y, Xie WQ, Shen-Tu JZ, Chen JH. Cyclosporine A and tacrolimus combined with enteric-coated mycophenolate sodium influence the plasma mycophenolic acid concentration - a randomised controlled trial in Chinese live related donor kidney transplant recipients. *Int J Clin Pract Suppl* 2014; (181): 4-9.
123. van Gelder T. How cyclosporine reduces mycophenolic acid exposure by 40% while other calcineurin inhibitors do not. *Kidney Int* 2021; 100(6): 1185-9.

124. Ueda K, McCague KM, Wiland A, Peddi VR. Early corticosteroid withdrawal in the real world: a long-term analysis of kidney transplant recipients from the Mycophenolic Acid Observational Renal Transplant Registry. *Ann Transplant* 2014; 19: 84-92.
125. Nourbakhsh N, Ekberg J, Skov K, Peters CD, Øzbay A, Lindner P, et al. Effects of corticosteroid treatment on mycophenolic acid exposure in renal transplant patients-results from the SAILOR Study. *Front Pharmacol* 2021; 12: 742444.
126. Doesch AO, Mueller S, Konstandin M, Celik S, Erbel C, Kristen A, et al. Proton pump inhibitor comedication reduces active drug exposure in heart transplant recipients receiving mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 2010; 42(10): 4243-6.
127. Schaier M, Scholl C, Scharpf D, Hug F, Bönisch-Schmidt S, Dikow R, et al. Proton pump inhibitors interfere with the immunosuppressive potency of mycophenolate mofetil. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(11): 2061-7.
128. Kees MG, Steinke T, Moritz S, Rupprecht K, Paulus EM, Kees F, et al. Omeprazole impairs the absorption of mycophenolate mofetil but not of enteric-coated mycophenolate sodium in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2012; 52(8): 1265-72.
129. Xu L, Cai M, Shi BY, Li ZL, Li X, Jin HL. A prospective analysis of the effects of enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil comedicated with a proton pump inhibitor in kidney transplant recipients at a single institute in China. *Transplant Proc* 2014; 46(5): 1362-5.
130. Kiberd BA, Wrobel M, Dandavino R, Keown P, Gourishankar S. The role of proton pump inhibitors on early mycophenolic acid exposure in kidney transplantation: evidence from the CLEAR study. *Ther Drug Monit* 2011; 33(1): 120-3.
131. Kofler S, Wolf C, Shvets N, Sisic Z, Müller T, Behr J, et al. The proton pump inhibitor pantoprazole and its interaction with enteric-coated mycophenolate sodium in transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30(5): 565-71.

132. Naesens M, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers D. Effects of gastric emptying on oral mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal allograft recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63(5): 541-7.
133. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Van Tromp J, Cairns T, et al. The magnitude and time course of changes in mycophenolic acid 12-hour predose levels during antibiotic therapy in mycophenolate mofetil-based renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2007; 29(1): 122- 6.
134. Kodawara T, Masuda S, Yano Y, Matsubara K, Nakamura T, Masada M. Inhibitory effect of ciprofloxacin on  $\beta$ -glucuronidase-mediated deconjugation of mycophenolic acid glucuronide. *Biopharm Drug Dispos* 2014; 35(5): 275-83.
135. Borrows R, Chusney G, James A, Stichbury J, Van Tromp J, Cairns T, et al. Determinants of mycophenolic acid levels after renal transplantation. *Ther Drug Monit.* 2005; 27(4): 442-50.
136. Dasgupta A. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid. *Adv Clin Chem* 2016; 76: 165-84.
137. Vanrenterghem Y. Anaemia after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(Suppl 5): V54-8.
138. Morii M, Ueno K, Ogawa A, Kato R, Yoshimura H, Wada K, et al. Impairment of mycophenolate mofetil absorption by iron ion. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(6): 613-16.
139. Lorenz M, Wolzt M, Weigel G, Puttinger H, Hörl WH, Födinger M, et al. Ferrous sulfate does not affect mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant patients. *Am J Kidney Dis* 2004; 43(6): 1098-103.
140. Mudge DW, Atcheson B, Taylor PJ, Sturtevant JM, Hawley CM, Campbell SB, et al. The effect of oral iron administration on mycophenolate mofetil absorption in renal transplant recipients: a randomized, controlled trial. *Transplantation* 2004; 77(2): 206-9.

141. Ducray PS, Banken L, Gerber M, Boutouyrie B, Zandt H. Absence of an interaction between iron and mycophenolate mofetil absorption. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62(4): 492-5.
142. Gelone DK, Park JM, Lake KD. Lack of an effect of oral iron administration on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant recipients. *Pharmacotherapy* 2007; 27(9): 1272-8.
143. Kestenbaum B, Belozeroff V. Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease. *European Journal of Clinical Investigation* 2007; 37: 607-22.
144. Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Bone and mineral disorders in pre-dialysis CKD. *Int Urol Nephrol* 2008; 40: 427-40.
145. Pieper AK, Buhle F, Bauer S, Mai I, Budde K, Haffner D, et al. The effect of sevelamer on the pharmacokinetics of cyclosporin A and mycophenolate mofetil after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(10): 2630-3.
146. Alvarez PA, Egozcue J, Sleiman J, Moretti L, Di Girolamo G, Keller GA. Severe neutropenia in a renal transplant patient suggesting an interaction between mycophenolate and fenofibrate. *Curr Drug Saf* 2012; 7(1): 24-9.
147. Sheng C, Zhao Q, Niu W, Qiu X, Zhang M, Jiao Z. Effect of protein binding on exposure of unbound and total mycophenolic acid: A population pharmacokinetic analysis in Chinese adult kidney transplant recipients. *Front Pharmacol* 2020; 11: 340.
148. Benjanuwattra J, Pruksakorn D, Koonrunsesomboon N. Mycophenolic acid and its pharmacokinetic drug-drug interactions in humans: review of the evidence and clinical implications. *J Clin Pharmacol* 2020; 60(3): 295-311.
149. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 Suppl 3: S1-155.
150. Rupperecht K, Schmidt C, Raspé A, Schweda F, Shipkova M, Fischer W, et al. Bioavailability of mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium is



differentially affected by pantoprazole in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2009; 49(10): 1196-201.

151. Van Gelder T, Hesselink DA. Mycophenolate revisited. *Transpl Int* 2015; 28(5): 508-15.

152. Mathis AS, Egloff G, Ghin HL. Calcineurin inhibitor sparing strategies in renal transplantation, part one: Late sparing strategies. *World J Transplant* 2014; 4(2): 57-80.

153. Jeong H, Kaplan B. Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 184–91.

154. Van Gelder T, Silva HT, de Fijter JW, Budde K, Kuypers D, Tyden G, et al. Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation* 2008; 86(8): 1043-51.

155. Sobiak J, Resztak M, Głyda M, Szczepaniak P, Chrzanowska M. Pharmacokinetics of mycophenolate sodium coadministered with tacrolimus in the first year after renal transplantation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2016; 41(4): 331-8

156. Cossart AR, Staats CE, Gorham G, Barraclough KA. Comparison of free plasma versus saliva mycophenolic acid exposure following mycophenolate mofetil administration in adult kidney transplant recipients. *Clin Biochem* 2022; 100: 78-81.

157. Walsh NP, Montague JC, Callow N, Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004; 49(2): 149-54.

158. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85(2): 162-9.

159. Kumar T, Kishore J, Kumari M, Rai A, Rai S, Jha A. Evaluation of salivary flow rate, pH, and buffer capacities in end-stage renal disease patients versus control – A prospective comparative study. *J Family Med Prim Care* 2020; 9(6): 2985-9.

160. Halleck F, Friedersdorff F, Fuller TF, Matz M, Huber L, Dürr M, et al. New perspectives of immunosuppression. *Transplant Proc* 2013; 45(3): 1224e31.
161. Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation* 1998; 65(11): 1450-4.
162. Lucan VC, Berardinelli L. Gastrointestinal side effects of post-transplant therapy. *J Gastrointest Liver Dis* 2016; 25(3): 367-73.
163. Dall'Agnol DJR, Corá LA, Teixeira MDCB, de Lima MB, Gama LA, Miranda JRA, et al. Gastrointestinal disorders after immunosuppression: an experimental model to evaluate the influence of monotherapy on motility parameters. *Exp Physiol* 2017; 102(8): 924-33.
164. Savvidaki E, Kazakopoulos P, Papachristou E, Karavias D, Zavvos V, Voliotis G, et al. Replacement of mycophenolate acid with everolimus in patients who became neutropenic after renal transplant. *Exp Clin Transplant* 2014; 12(1): 31-6.
165. Jung HY, Lee S, Jeon Y, Choi JY, Cho JH, Park SH, et al. Mycophenolic Acid Trough Concentration and Dose Are Associated with Hematologic Abnormalities but Not Rejection in Kidney Transplant Recipients. *J Korean Med Sci* 2020; 35(24): e185.
166. Vanhove T, Kuypers D, Claes KJ, Evenepoel P, Meijers B, Naesens M, et al. Reasons for dose reduction of mycophenolate mofetil during the first year after renal transplantation and its impact on graft outcome. *Transpl Int* 2013; 26(8): 813–21.
167. Dave V, Polkinghorne KR, Leong KG, Kanellis J, Mulley WR. Initial mycophenolate dose in tacrolimus treated renal transplant recipients, a cohort study comparing leukopaenia, rejection and long-term graft function. *Sci Rep* 2020; 10(1): 19379.
168. Feng JJ, Zhang LW, Zhao P, Bow LM, Tian J. Enteric-coated mycophenolate sodium given in combination with tacrolimus has a lower incidence of serious infections in Asian renal-transplant recipients compared with mycophenolate mofetil. *Int J Clin Pract Suppl.* 2015; (183): 1-7.

169. Hiramoto LL, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Felipe CR. Tolerability of mycophenolate sodium in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharm* 2018; 40(6): 1548-58.
170. Behrend M, Braun F. Enteric-coated mycophenolate sodium: tolerability profile compared with mycophenolate mofetil. *Drugs* 2005; 65(8): 1037–50.
171. Saleeb R, Faragalla H, Yousef GM, Stewart R, Streutker CJ. Malignancies in a renal transplant population: The St. Michael's Hospital experience. *Urol Ann* 2016; 8(2): 163-7.
172. Dantal J, Pohanka E. Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (1): i4-10.
173. Lee A, Bridges LR, Lloyd M, Barker R, Wren DR, Galtrey CM. Epstein-Barr virus associated CNS lymphoproliferative disorder after long-term immunosuppression. *Pract Neurol* 2020; 20(1): 83-6.
174. Orvis AK, Wesson SK, Breza TS Jr, Church AA, Mitchell CL, Watkins SW. Mycophenolate mofetil in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60(2): 183-99; quiz 200-2.
175. Nguyen T, Park JY, Scudiere JR, Montgomery E. Mycophenolic acid (cellcept and myfortic) induced injury of the upper GI tract. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(9): 1355-63.
176. Rao S, Ghanta M, Moritz MJ, Constantinescu S. Long-term functional recovery, quality of life, and pregnancy after solid organ transplantation. *Med Clin N Am* 2016; 100(3): 613–29.
177. Le HL, Francke MI, Andrews LM, de Winter BCM, van Gelder T, Hesselink DA. Usage of tacrolimus and mycophenolic acid during conception, pregnancy, and lactation, and its implications for therapeutic drug monitoring: a systematic critical review. *Ther Drug Monit* 2020; 42(4): 518-31.
178. Pokrajac M. *Farmakokinetika*, 3 ed. Beograd: Biograf, 2007.
179. Ahmad AM. Recent advances in pharmacokinetic modeling. *Biopharm Drug Dispos* 2007; 28(3): 135-43.

180. Rescigno A. Compartmental analysis and its manifold applications to pharmacokinetics. *AAPS J* 2010; 12(1): 61-72.
181. Patel K, Kirkpatrick CM. Pharmacokinetic concepts revisited--basic and applied. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12(12): 1983-90.
182. Bauer LA. *Applied Clinical Pharmacokinetics*. SAD: The McGraw-Hill Companies Inc 2008.
183. Pokrajac M, Miljković B, Vučićević K. *Farmakokinetika*. Beograd: Farmaceutski fakultet, 2019.
184. Williams PJ, Ette EI. The role of population pharmacokinetics in drug development in light of the Food and Drug Administration's 'Guidance for Industry: population pharmacokinetics'. *Clin Pharmacokinet* 2000; 39(6): 385-95.
185. Pokrajac M. Population pharmacokinetics. In: Pokrajac M, editor. *Pharmacokinetics*. Beograd: Grafolik, 2002. p. 185–6. (Serbian)
186. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Guideline on Reporting the Results of Population Pharmacokinetic Analysis*, June 2007. (<http://www.ema.europa.eu>), pristupljeno oktobar 2021.
187. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry on Population Pharmacokinetics*. US Food and Drug Administration; Washington, DC, 1999. (<http://www.fda.gov/regulatory information/guidances/default.html>), pristupljeno maj 2021.
188. Vučićević K, Miljković B, Pokrajac M, Petronijević M. Karakteristike populacionog farmakokinetičkog pristupa analizi podataka i njegov značaj u razvoju i primeni lekova. *Arh.farm* 2005; 55: 483-96.
189. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1907-15.

190. Premaud A, Weber LT, Tonshoff B, Armstrong VW, Oellerich M, Urien S, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in pediatric renal transplant patients using parametric and nonparametric approaches. *Pharmacol Res* 2011; 63(3): 216–24.
191. Owen JS, Fiedler-Kelly J. Introduction to population pharmacokinetic/ pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models. John Wiley & Sons, Hoboken; 2014.
192. Vučićević K, Miljković B, Vezmar Kovačević S, Todorović Z, Prostran M, Grabnar I. Population pharmacokinetic analysis of therapeutic drug monitoring in optimizing pharmacotherapy of antiepileptic drugs. In: Foyaca-Sibat H. (Ed.) Novel treatment of epilepsy. InTech, Rijeka, Croatia; 2011, p. 95-111.
193. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1702-6.
194. Ette, EI, Williams PJ. Pharmacometrics: the science of quantitative pharmacology. John Wiley & Sons, Hoboken; 2007.
195. Wade JR, Edholm M, Salmonson T. A guide for reporting the results of population pharmacokinetic analyses: a Swedish perspective. *AAPS J* 2005; 7: 45.
196. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2013; 2: e38.
197. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. Concepts and applications, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2011.
198. Byon W, Smith MK, Chan P, Tortorici MA, Riley S, Dai H, et al. Establishing best practices and guidance in population modeling: an experience with an internal population pharmacokinetic analysis guidance. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2013; 2(7): e51.

199. Pillai GC, Mentre F, Steimer JL. Non-linear mixed effects modeling - from methodology and software development to driving implementation in drug development science. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2005; 32(2): 161-83.
200. Bonate PL. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation. Springer, New York 2006.
201. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2012; 1: e6.
202. Sherwin CM, Kiang TK, Spigarelli MG, Ensom MH. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: validation methods. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(9): 573–90.
203. Brendel K, Dartois C, Comets E, Lemenuel-Diot A, Laveille C, Tranchand B, et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46(3): 221-34.
204. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 17-20.
205. Woillard JB, Saint-Marcoux F, Debord J, Åsberg A. Pharmacokinetic models to assist the prescriber in choosing the best tacrolimus dose. *Pharmacological research* 2018; 130: 316–21.
206. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130(6): 461–70.
207. Živanović L, Licanski A, Zecević M, Jocić B, Kostić M. Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47(3): 575-85.
208. Food and Drug Administration (FDA). Drugs and Biologics. Draft Guidance, 2015, <http://www.fda.gov/> (pristupljeno decembar 2022).

209. ICH harmonised tripartite guideline Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology. Fed Regist 1997; 62(96): 27463-7.
210. Ruiz-Angel MJ, García-Alvarez-Coque MC, Berthod A, Carda-Broch S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? J Chromatogr A 2014; 1353: 2-9.
211. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry: bioanalytical method validation. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, US Department of Health and Human Services, Rockville, MD, USA, 2001. [updated 2016 Nov]. Available from: [www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf).
212. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, version 4, 2005, <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>.
213. Beal SL, edited by Ludden T, Boeckmann A. NONMEM Users Guide: Introduction to version VI 2006. In, San Francisco: NONMEM Project Group, University of California at San Francisco, 2006.
214. Milovanović JR, Janković SM. Factors influencing carbamazepine PK in children and adults: Population PK-analysis. Int J Clin Pharmacol Ther 2011; 49(7): 428–36.
215. Bauer RJ, Guzy S, Ng C. A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamic models with examples. AAPS J 2007; 9(1): E60-83.
216. Catić-Đorđević A, Pavlović I, Pavlović D, Stefanović N, Mikov M, Cvetković T, et al. Evaluation of gender-based limited sampling methods for tacrolimus exposure after renal transplantation using the Monte Carlo simulation. Pharmazie 2018; 73(8): 482-5.
217. Langers P, Press RR, Inderson A, Cremers SC, den Hartigh J, Baranski AG, et al. Limited sampling model for advanced mycophenolic acid therapeutic drug monitoring after liver transplantation. Ther Drug Monit 2014; 36(2): 141–7.

218. Wang XX, Feng MR, Nguyen H, Smith DE, Cibrik DM, Park JM. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in lung transplant recipients with and without cystic fibrosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2015; 71(6): 673–9.
219. Wang XX, Liu W, Zheng T, Park JM, Smith DE, Feng MR. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in lung transplant recipients with and without cystic fibrosis. *Xenobiotica* 2017; 47(8): 697-704.
220. Yoshimura K, Yano I, Yamamoto T, Kawanishi M, Isomoto Y, Yonezawa A, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid using the prospective data in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53(1): 44-51.
221. Li H, Mager DE, Sandmaier BM, Storer BE, Boeckh MJ, Bemer MJ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of inosine monophosphate dehydrogenase activity in hematopoietic cell transplantation recipients treated with mycophenolate mofetil. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20(8): 1121–9.
222. Saint-Marcoux F, Guignonis V, Decramer S, Gandia P, Ranchin B, Parant F, et al. Development of a Bayesian estimator for the therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pharmacol Res* 2011; 63(5): 423–31.
223. Woillard JB, Bader-Meunier B, Salomon R, Ranchin B, Decramer S, Fischbach M, et al. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in children with lupus and clinical findings in favour of therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 78(4): 867–76.
224. Dong M, Fukuda T, Cox S, de Vries MT, Hooper DK, Goebel J, et al. Population pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of mycophenolic acid in paediatric renal transplant recipients in the early post-transplant period. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 78(5): 1102–12.



225. Zeng L, Blair EY, Nath CE, Shaw PJ, Earl JW, Stephen K, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in children and young people undergoing blood or marrow and solid organ transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70(4): 567–79.
226. Lamba M, Tafti B, Melcher M, Chan G, Krishnaswami S, Busque S. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid coadministered with either tasocitinib (CP-690,550) or tacrolimus in adult renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2010; 32(6): 778–81.
227. Musuamba FT, Mourad M, Haufroid V, Demeyer M, Capron A, Delattre IK, et al. A simultaneous d-optimal designed study for population pharmacokinetic analyses of mycophenolic acid and tacrolimus early after renal transplantation. *J Clin Pharmacol* 2012; 52(12): 1833–43.
228. De Winter BC, Monchaud C, Premaud A, Pison C, Kessler R, Reynaud-Gaubert M, et al. Bayesian estimation of mycophenolate mofetil in lung transplantation, using a population pharmacokinetic model developed in kidney and lung transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(1): 29–39.
229. Chen B, Shao K, An HM, Shi HQ, Lu JQ, Zhai XH, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid exposure in Chinese renal allograft recipients after administration of EC-MPS. *J Clin Pharmacol* 2019; 59(4): 578-89.
230. De Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, Vulto AG, van Gelder T. Nonlinear relationship between mycophenolate mofetil dose and mycophenolic acid exposure: implications for therapeutic drug monitoring. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(3): 656–63.
231. Han N, Yun HY, Kim IW, Oh YJ, Kim YS, Oh JM. Population pharmacogenetic pharmacokinetic modeling for flip-flop phenomenon of enteric-coated mycophenolate sodium in kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2014; 70(10): 1211–9.
232. Rong Y, Mayo P, Ensom MHH, Kiang TKL. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid co-administered with tacrolimus in corticosteroid-free adult kidney transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2019; 58(11): 1483-95.

233. Rong Y, Mayo P, Ensom MHH, Kiang TKL. Population pharmacokinetic analysis of immediate-release oral tacrolimus co-administered with mycophenolate mofetil in corticosteroid-free adult kidney transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2019; 44(3): 409-422.
234. Cremers S, Schoemaker R, Scholten E, den Hartigh J, KonigQuartel J, van Kan E, et al. Characterizing the role of enterohepatic recycling in the interactions between mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitors in renal transplant patients by pharmacokinetic modelling. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60(3): 249–56.
235. Colom H, Lloberas N, Andreu F, Caldés A, Torras J, Oppenheimer F, et al. Pharmacokinetic modeling of enterohepatic circulation of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2014; 85(6): 1434–43.
236. Colom H, Andreu F, van Gelder T, Hesselink DA, de Winter BCM, Bestard O, et al. Prediction of free from total mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients: a population based approach. *Clin Pharmacokinet* 2018; 57(7): 877–93.
237. Féménias JL. Fitting models to correlated data III: A comparison between residual analysis and other methods. *J Mol Spectrosc* 2005; 232 (1): 80-101.
238. Mycophenolic acid sc-200110 Product Information. Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas USA [Online]. Available from: [www.scbt.com/datasheet-200110.html](http://www.scbt.com/datasheet-200110.html).
239. Nikolin B, Imamović B, Medanhodžić-Vuk S, Sober M. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci* 2004; 4(2): 5-9.
240. Wada M, Alkhalil SM, Nakashima KN. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. *Jordan J Pharm Sci* 2008; 1(1): 1-27.
241. Veličković-Radovanović RM, Janković SM, Milovanović JR, Catić-Đorđević AK, Spasić AA, Stefanović NZ, et al. Variability of mycophenolic acid elimination in the renal transplant recipients – population pharmacokinetic approach. *Ren Fail* 2015; 37(4): 652-8.

242. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Castro S, et al. OPTN/SRTR 2018 annual data report: kidney. *Am J Transpl* 2020; 20(suppl s1): 20–130.
243. Van Gelder T. Therapeutic drug monitoring for mycophenolic acid is value for (little) money. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90(2): 203–4.
244. Van Gelder T, Berden JH, Berger SP. To TDM or not to TDM in lupus nephritis patients treated with MMF? *Nephrol Dial Transpl* 2015; 30(4): 560–4.
245. Muranushi H, Kanda J, Arai Y, Shindo T, Hishizawa M, Yamamoto T, et al. Drug monitoring for mycophenolic acid in graft-vs-host disease prophylaxis in cord blood transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 2020; 86(12): 2464–72.
246. Metz DK, Holford N, Kausman JY, Walker A, Cranswick N, Staatz CE, et al. Optimizing mycophenolic acid exposure in kidney transplant recipients: time for target concentration intervention. *Transplantation* 2019; 103(10): 2012–30.
247. Lassailly G, Dumortier J, Saint-Marcoux F, El Amrani M, Boulanger J, Boleslawski E, et al. Real life experience of mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplant patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2021; 45(1): 101451.
248. Saint-Marcoux F, Vandierdonck S, Premaud A, Debord J, Rousseau A, Marquet P. Large scale analysis of routine dose adjustments of mycophenolate mofetil based on global exposure in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2011; 33(3): 285–94.
249. Brunet M, Shipkova M, van Gelder T, Wieland E, Sommerer C, Budde K, et al. Barcelona consensus on biomarker-based immunosuppressive drugs management in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* 2016; 38(suppl 1): S1–S20.
250. Picard N, Bergan S, Marquet P, van Gelder T, Wallemacq P, Hesselink DA, et al. Pharmacogenetic biomarkers predictive of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 2016; 38(suppl 1): S57–69.

251. Seger C, Shipkova M, Christians U, Billaud EM, Wang P, Holt DW, et al. Assuring the proper analytical performance of measurement procedures for immunosuppressive drug concentrations in clinical practice: recommendations of the international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology immunosuppressive drug scientific committee. *Ther Drug Monit* 2016; 38(2): 170–89.
252. O’Leary JG, Samaniego M, Barrio MC, Potena L, Zeevi A, Djamali A, et al. The influence of immunosuppressive agents on the risk of de novo donor-specific HLA antibody production in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2016; 100(1): 39–53.
253. Filler G, Todorova EK, Bax K, Alvarez-Elías AC, Huang SH, Kobrzynski MC.. Minimum mycophenolic acid levels are associated with donor-specific antibody formation. *Pediatr Transpl* 2016; 20(1): 34–8.
254. Strommen AM, Moss MC, Goebel J, Bock M. Donor-specific antibodies in a pediatric kidney transplant population-Prevalence and association with antiproliferative drug dosing. *Pediatr Transpl* 2019; 23(6): e13511.
255. Van Gelder T, Vinks AA. Machine learning as a novel method to support therapeutic drug management and precision dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2021; 110(2): 273-6.
256. Barten MJ, Shipkova M, Bartsch P, Dhein S, Streit F, Tarnok A, et al. Mycophenolic acid interaction with cyclosporine and tacrolimus in vitro and in vivo: evaluation of effects on rat blood lymphocyte function. *Ther Drug Monit.* 2005; 27: 123–31.
257. Sam WJ, Joy MS. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and metabolites in patients with glomerulonephritis. *Ther Drug Monit* 2010; 32(5): 594–605.
258. Laverdiere I, Caron P, Couture F, Guillemette C, Lévesque E. Liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry based assay to evaluate inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells from stem cell transplant recipients. *Anal Chem* 2012; 84(1): 216–23.

259. Vethe NT, Ali AM, Reine PA, Andersen AM, Bremer S, Line PD, et al. Simultaneous quantification of IMPDH activity and purine bases in lymphocytes using LC-MS/MS: assessment of biomarker responses to mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2014; 36(1): 108–18.
260. Weißbarth G, Wiesen MHJ, Fietz C, Streichert T, Ehren R, Weber LT, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolic acid therapy: improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measuring inosin-5'-monophosphate dehydrogenase activity. *Ther Drug Monit* 2020; 42(2): 282–8.
261. Breitzkreitz MC, Jardim ICS, Bruns RE. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. *J Chromatogr A* 2009; 1216(9): 1439-49.
262. Rebollo N, Calvo MV, Martin-Suarez A, Domínguez-Gil A. Modification of the EMIT immunoassay for the measurement of unbound mycophenolic acid in plasma. *Clin Biochem* 2011; 44(2-3): 260–3.
263. Velghe S, Capiiau S, Stove CP. Opening the toolbox of alternative sampling strategies in clinical routine: a key-role for (LC-)MS/MS. *Trac-Trends Anal Chem* 2016; 84: 61–73.
264. Shen B, Li S, Zhang Y, Yuan X, Fan Y, Liu Z, et al. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50(3): 515–21.
265. Wiesen MH, Farowski F, Feldkötter M, Hoppe B, Müller C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva collection device. *J Chromatogr A* 2012; 1241: 52–9.
266. Koster RA, Niemeijer P, Veenhof H, Hateren KV, Alffenaar JC, Touw DJ. A volumetric absorptive microsampling LC-MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects. *Bioanalysis* 2019; 11(6): 495–508.

267. Smits TA, Cox S, Fukuda T, Sherbotie JR, Ward RM, Goebel J, et al. Effects of unbound mycophenolic acid on inosine monophosphate dehydrogenase inhibition in pediatric kidney transplant patients. *Ther Drug Monit* 2014; 36(6): 716-23.
268. International Harmonized Tripartite Guideline (ICH)/World Health Organization (WHO): Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology, Q2(R1), current step 4 version, parent guidelines on methodology dated November 6 1996, incorporated in November 2005.
269. Kiang TKL, Ensom MHH. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: An update. *Clin Pharmacokinet* 2018; 57(5): 547-58.
270. Cheungpasitporn W, Lentine KL, Tan JC, Kaufmann M, Caliskan Y, Bunnapradist S, et al. Immunosuppression Considerations for Older Kidney Transplant Recipients. *Curr Transplant Rep* 2021; 8(2): 100-10.
271. Zhou PJ, Xu D, Yu ZC, Wang XH, Shao K, Zhao JP. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and estimation of exposure using multiple linear regression equations in Chinese renal allograft recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 389–401.
272. Wang CX, Meng FH, Chen LZ, Ren B, Li SX, Fei JG, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in senile Chinese kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39 (5): 1392-5.
273. Kim JH, Han N, Kim MG, Kim YW, Jang H, Yun HY, et al. Model based development of tacrolimus dosing algorithm considering CYP3A5 genotypes and mycophenolate mofetil drug interaction in stable kidney transplant recipients. *Sci Rep* 2019; 9(1): 11740.
274. Reséndiz-Galván JE, Romano-Aguilar M, Medellín-Garibay SE, Milán-Segovia RDC, Niño-Moreno PDC, Jung-Cook H, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in adult kidney transplant patients under prednisone and tacrolimus regimen. *Eur J Pharm Sci* 2020; 150: 105370.

275. Riglet F, Bertrand J, Barrail-Tran A, Verstuyft C, Michelon H, Benech H, et al. Population pharmacokinetic model of plasma and cellular mycophenolic acid in kidney transplant patients from the CIMTRE study. *Drugs R D* 2020; 20(4): 331-42.
276. Quintairos L, Colom H, Millan O, Fortuna V, Espinosa C, Guirado L, et al. Early prognostic performance of miR155-5p monitoring for the risk of rejection: Logistic regression with a population pharmacokinetic approach in adult kidney transplant patients. *PLoS One* 2021; 16(1): e0245880.
277. Strassburg CP, Strassburg A, Kneip S, Barut A, Tukey RH, Rodeck B, et al. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 2002; 50(2): 259-65.
278. Mooij MG, Schwarz UI, de Koning BA, Leeder JS, Gaedigk R, Samsom JN, et al. Ontogeny of human hepatic and intestinal transporter gene expression during childhood: Age matters. *Drug Metab Dispos* 2014; 42(8): 1268-74.
279. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal p-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(11): 2468-80.
280. Ponticelli C, Cucchiari D, Graziani G. Hypertension in kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2011; 24(6): 523-33.
281. Pisano A, Mallamaci F, D'Arrigo G, Bolignano D, Wuerzner G, Ortiz A, et al. Assessment of hypertension in kidney transplantation by ambulatory blood pressure monitoring: a systematic review and meta-analysis. *Clin Kidney J* 2021; 15(1): 31-42.
282. Alexandrou ME, Ferro CJ, Boletis I, Papagianni A, Sarafidis P. Hypertension in kidney transplant recipients. *World J Transplant* 2022; 12(8): 211-22.
283. Mangray M, Vella JP. Hypertension after kidney transplant. *Am J Kidney Dis* 2011; 57: 331-41.

284. Pisano A, Bolignano D, Mallamaci F, D'Arrigo G, Halimi JM, Persu A, et al. Comparative effectiveness of different antihypertensive agents in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2020; 35(5): 878-87.
285. Halimi JM, Ortiz A, Sarafidis PA, Mallamaci F, Wuerzner G, Pisano A, et al. Hypertension in kidney transplantation: a consensus statement of the 'hypertension and the kidney' working group of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2021; 39: 1513-21.
286. Iñigo P, Campistol JM, Lario S, Piera C, Campos B, Bescós M, et al. Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF- $\beta$ 1 plasma levels in a crossover trial in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 822–7.
287. Cross NB, Webster AC, Masson P, O'connell PJ, Craig JC. Antihypertensives for kidney transplant recipients: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Transplantation* 2009; 88(1): 7–18.
288. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A, Griffiths CEM. Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2001; 145(3): 438–45.
289. Yang CL, Sheng CC, Liao GY, Su Y, Feng LJ, Xia Q, et al. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: A population analysis. *J Clin Pharm Ther* 2021; 46(6): 1564-75.
290. Wang G, Ye Q, Huang Y, Lu J, Xu H, Li Z. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in pediatric patients with juvenile dermatomyositis and optimization of limited sampling strategy. *Xenobiotica* 2021; 51(2): 167-76.
291. Ette EI, Williams PJ, Lane JR. Population pharmacokinetics III: Design, analysis, and application of population pharmacokinetic studies. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 2136-44.
292. Kiang TK, Sherwin CM, Spigarelli MG, Ensom MH. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: modelling and software. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(8): 515–25.



293. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res* 1972; 5(5): 411-59.
294. Guillet BA, Simon NS, Purgus R, Botta C, Morange S, Berland Y, et al. Population pharmacokinetics analysis of mycophenolic acid in adult kidney transplant patients with chronic graft dysfunction. *Ther Drug Monit* 2010; 32(4): 427-32.
295. Rong Y, Jun H, Kiang TKL. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in paediatric patients. *Br J Clin Pharmacol* 2021; 87(4): 1730-57.
296. McLeay SC, Morrish GA, Kirkpatrick CM, Green B. The relationship between drug clearance and body size: systematic review and meta-analysis of the literature published from 2000 to 2007. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(5): 319-30.
297. Le Guellec C, Bourgoin H, Büchler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(4): 253-66.
298. Van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, Mathot RA. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 1083-96.
299. Uwai Y, Motohashi H, Tsuji Y, Ueo H, Katsura T, Inui K. Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(1): 161-8.
300. Prokopienko AJ, Nolin TD. Microbiota-derived uremic retention solutes: perpetrators of altered nonrenal drug clearance in kidney disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018; 11(1): 71-82.
301. Kim H, Long-Boyle J, Rydholm N, Orchard PJ, Tolar J, Smith AR, et al. Population pharmacokinetics of unbound mycophenolic acid in pediatric and young adult patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol* 2012; 52(11): 1665–75.

302. Trkulja V, Lalić Z, Nađ-Škegro S, Lebo A, Granić P, Lovrić M, et al. Effect of cyclosporine on steady-state pharmacokinetics of MPA in renal transplant recipients is not affected by the MPA formulation: analysis based on therapeutic drug monitoring data. *Ther Drug Monit* 2014; 36(4): 456-64.
303. Meaney CJ, Sudchada P, Consiglio JD, Wilding GE, Cooper LM, Venuto RC, et al. Influence of calcineurin inhibitor and sex on mycophenolic acid pharmacokinetics and adverse effects post-renal transplant. *J Clin Pharmacol* 2019; 59(10): 1351-65.
304. Malvezzi P, Rostaing L. The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. *Expert Opin Drug Saf.* 2015; 14(10): 1531-46.
305. Kamar N, Del Bello A, Belliere J, Rostaing L. Calcineurin inhibitor-sparing regimens based on mycophenolic acid after kidney transplantation. *Transpl Int* 2015; 28(8): 928-37.
306. Kuriata-Kordek M, Boratynska M, Falkiewicz K, Porazko T, Urbaniak J, Wozniak M, et al. The influence of calcineurin inhibitors on mycophenolic acid pharmacokinetics. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2369-71.
307. Sun SS, Shao K, Lu JQ, An HM, Shi HQ, Zhou PJ, et al. Influence of calcineurin inhibitors and genetic polymorphism of transporters on enterohepatic circulation and exposure of mycophenolic acid in Chinese adult renal allograft recipients. *J Clin Pharmacol* 2023; 63(4): 410-20.
308. Filler G, Zimmering M, Mai I. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil are influenced by concomitant immunosuppression. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(2): 100–4.
309. Van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, Gordon R, Mamelok RD, van Gelder T. Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3): 871-80.

310. Van Hest RM, van Gelder T, Bouw R, Goggin T, Gordon R, Mamelok RD, et al. Time-dependent clearance of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63(6): 741-52.
311. Funaki T. Enterohepatic circulation model for population pharmacokinetic analysis. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51(10): 1143-8.
312. Barraclough KA, Metz D, Staatz CE, Gorham G, Carroll R, Majoni SW, et al. Important lack of difference in tacrolimus and mycophenolic acid pharmacokinetics between Aboriginal and Caucasian kidney transplant recipients. *Nephrology (Carlton)* 2022; 27(9): 771-9.
313. Yang Y, Liu X. Imbalance of drug transporter-CYP450s interplay by diabetes and its clinical significance. *Pharmaceutics* 2020; 12(4): 348.
314. Djebli N, Picard N, Rerolle JP, Le Meur Y, Marquet P. Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and comedications on Acyl-MPAG production in vitro and in adult renal transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17(5): 321-30.
315. Severova-Andreevska G, Danilovska I, Sikole A, Popov Z, Ivanovski N. Hypertension after kidney transplantation: Clinical significance and therapeutical aspects. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7(7): 1241-5.
316. Rossi GP, Rossitto G, Maifredini C, Barchitta A, Bettella A, Cerruti L, et al. Modern management of hypertensive emergencies. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2022; 29(1): 33-40.
317. Langone A, Shihab F, Pankewycz O, Doria C, Wiland A, McCague K, et al. Long-term dosing patterns of enteric-coated mycophenolate sodium or mycophenolate mofetil with tacrolimus after renal transplantation. *Clin Transplant* 2014; 28(9): 961-7.
318. Deng J, Lu Y, He L, Ou J, Xie H. A comparison of mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitor as maintenance immunosuppression for kidney transplant recipients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Turk J Med Sci* 2021; 51(3): 1080-91.

319. Veličković-Radovanović R, Mikov M, Paunović G, Djordjević V, Stojanović M, Cvetković T, et al. Gender differences in pharmacokinetics of tacrolimus and their clinical significance in kidney transplant recipients. *Gend Med* 2011; 8(1): 23–31.
320. Veličković-Radovanović R, Mikov M, Catić-Đorđević A, Stefanović N, Stojanović M, Jokanović M, et al. Tacrolimus as a part of immunosuppressive treatment in kidney transplantation patients: sex differences. *Gend Med* 2012; 9(6): 471–80.
321. Pescovitz MD, Guasch A, Gaston R, Rajagopalan P, Tomlanovich S, Weinstein S, et al. Equivalent pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in African-American and Caucasian male and female stable renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3(12): 1581–6.
322. Shaw LM, Korecka M, Aradhya S, Grossman R, Bayer L, Innes C, et al. Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. *J Clin Pharmacol* 2000; 40(6): 624–33.
323. Savvidaki E, Papachristou E, Kazakopoulos P, Papatotiriou M, Vardoulaki M, Goumenos DS. Gastrointestinal disorders after renal transplantation. *Transplant Proc* 2014; 46(9): 3183–6.
324. Sterneck M, Settmacher U, Ganten T, Sarrazin C, Speidel N, Broering D. Improvement in gastrointestinal and health-related quality of life outcomes after conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2014; 46(1): 234–40.
325. García-Martínez Y, Borriello M, Capolongo G, Ingrosso D, Perna AF. The Gut Microbiota in Kidney Transplantation: A Target for Personalized Therapy? *Biology (Basel)* 2023; 12(2): 163.
326. Meier-Kriesche HU, Davies NM, Grinyo J, Heading R, Mamelok R, Wijngaard P, et al. Mycophenolate sodium does not reduce the incidence of GI adverse events compared with mycophenolate mofetil. *Am J Transplant* 2005; 5(5): 1164.
327. Tielemans MM, van Boekel GAJ, van Gelder T, Tjwa ET, Hilbrands LB. Immunosuppressive drugs and the gastrointestinal tract in renal transplant patients. *Transplant Rev (Orlando)* 2019; 33(2): 55-63.

328. Squifflet JP, Backman L, Claesson K, Dietl KH, Ekberg H, Forsythe JL, et al. Dose optimization of mycophenolate mofetil when administered with a low dose of tacrolimus in cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72(1): 63-9.
329. Gioco R, Corona D, Ekser B, Puzzo L, Inserra G, Pinto F, et al. Gastrointestinal complications after kidney transplantation. *World J Gastroenterol* 2020; 26(38): 5797-811.
330. Maes BD, Dalle I, Geboes K, Oellerich M, Armstrong VW, Evenepoel P, et al. Erosive enterocolitis in mycophenolate mofetil-treated renal-transplant recipients with persistent afebrile diarrhea. *Transplantation* 2003; 75(5): 665-72.
331. Kamar N, Faure P, Dupuis E, Cointault O, Joseph-Hein K, Durand D, et al. Villous atrophy induced by mycophenolate mofetil in renal-transplant patients. *Transpl Int* 2004; 17(8): 463-7.
332. Heller T, van Gelder T, Budde K, de Fijter JW, Kuypers D, Arns W, et al. Plasma concentrations of mycophenolic acid acyl glucuronide are not associated with diarrhea in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7(7): 1822-31.
333. Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Drouet M, Munteanu E, et al. Risk of diarrhoea in a long-term cohort of renal transplant patients given mycophenolate mofetil: the significant role of the UGT1A8 2 variant allele. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69(6): 675-83.
334. Liapis G, Boletis J, Skalioti C, Bamias G, Tsimaratou K, Patsouris E, et al. Histological spectrum of mycophenolate mofetil-related colitis: association with apoptosis. *Histopathology* 2013; 63(5): 649-58.
335. Naranjo J, Poniachik J, Cisco D, Contreras J, Oksenberg D, Valera JM, et al. Oral ulcers produced by mycophenolate mofetil in two liver transplant patients. *Transplant Proc* 2007; 39(3): 612-4.
336. Plana-Pla A, Solé LC, Garcia AB, Valdemoros RL. Mycophenolate mofetil-induced mouth ulcers in a kidney transplant patient: Case report and literature review. *Nefrologia* 2019; 39(1): 80-3.

337. Gaied H, Bacha MM, Mesbahi T, Ounissi M, Aoudia R, Jerbi M, et al. Mycophenolate mofetil-induced oral ulcerations in a kidney transplant recipient. *Curr Drug Saf* 2020; 15(1): 73-6.
338. Calmet FH, Yarur AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Ann Gastroenterol* 2015; 28: 366-73.
339. Dost D, van Leerdam ME, van Dekken H, Weimar W, Kuipers EJ, Bijl AH, et al. Crohn's-like enterocolitis associated with mycophenolic acid treatment. *Gut* 2008; 57(9): 1330.
340. Burg M, Saemann MD, Wieser C, Kramer S, Fischer W, Lhotta K. Enteric-coated mycophenolate sodium reduces gastrointestinal symptoms in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2009; 41(10): 4159-64.
341. Sabbatini M, Capone D, Gallo R, Pisani A, Polichetti G, Tarantino G, et al. EC-MPS permits lower gastrointestinal symptom burden despite higher MPA exposure in patients with severe MMF-related gastrointestinal side-effects. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23(5): 617-24.
342. Reinke P, Budde K, Hugo C, Petersen P, Schnuelle P, Fricke L, et al. Reduction of gastrointestinal complications in renal graft recipients after conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium. *Transplant Proc* 2011; 43(5): 1641-6.
343. Ortega F, Sanchez-Fructuoso A, Cruzado JM, Gomez-Alamillo JC, Alarcon A, Pallardo L, et al. Gastrointestinal quality of life improvement of renal transplant recipients converted from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium drugs or agents: mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium. *Transplantation* 2011; 92(4): 426-32.
344. Budde K, Curtis J, Knoll G, Chan L, Neumayer HH, Seifu Y, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium can be safely administered in maintenance renal transplant patients: results of a 1-year study. *Am J Transplant* 2004; 4(2): 237-43.
345. Salvadori M, Holzer H, de Mattos A, Sollinger H, Arns W, Oppenheimer F, et al. ERL B301 Study Groups. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant* 2004; 4(2): 231-6.

346. Kamar N, Oufroukhi L, Faure P, Ribes D, Cointault O, Lavayssiere L, et al. Questionnaire-based evaluation of gastrointestinal disorders in de novo renal-transplant patients receiving either mycophenolate mofetil or enteric-coated mycophenolate sodium. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(10): 2231-6.
347. Morissette P, Albert C, Busque S, St-Louis G, Vinet B. In vivo higher glucuronidation of mycophenolic acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2001; 23(5): 520–5.
348. Zhang H, Liu L, Li J, Fu Q, Wan J, Deng R, et al. The efficacy and safety of intensified enteric-coated mycophenolate sodium with low exposure of calcineurin inhibitors in Chinese de novo kidney transplant recipients: a prospective study. *Int J Clin Pract* 2016; 70(S185): 22–30.
349. Bunnapradist S, Ambuhl PM. Impact of gastrointestinal-related side effects on mycophenolate mofetil dosing and potential therapeutic strategies. *Clin Transplant* 2008; 22(6): 815–21.
350. Mahé E, Morelon E, Lechaton S, Sang KH, Mansouri R, Ducasse MF, et al. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation* 2005; 79(4): 476–82.
351. Sinangil A, Celik V, Barlas S, Sakaci T, Koc Y, Basturk T, et al. New-onset diabetes after kidney transplantation and pretransplant hypomagnesemia. *Prog Transplant* 2016; 26(1): 55–61.
352. Mourad G, Glyda M, Albano L, Viklický O, Merville P, Tydén G, et al. Incidence of posttransplantation diabetes mellitus in de novo kidney transplant recipients receiving prolonged-release tacrolimus-based immunosuppression with 2 different corticosteroid minimization strategies: advance, a randomized controlled trial. *Transplantation* 2017; 101(8): 1924–34.
353. Eisenga MF, Minović I, Berger SP, Kootstra-Ros JE, van den Berg E, Riphagen IJ, et al. Iron deficiency, anemia, and mortality in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2016; 29(11): 1176–83.

354. Molnar MZ, Czira M, Ambrus C, Szeifert L, Szentkiralyi A, Beko G, et al. Anemia is associated with mortality in kidney-transplanted patients - A prospective cohort study. *Am J Transplant* 2007; 7: 818–24.
355. Molnar MZ, Mucsi I, Macdougall IC, Marsh JE, Yaqoob M, Main J, et al. Prevalence and management of anaemia in renal transplant recipients: data from ten European centres. *Nephron Clin Pract* 2011; 117(2): c127–34.
356. Przybylowski P, Malyszko J, Glowinska I, Malyszko J, Kozłowska S, Mysliwiec M. Prevalence of iron deficiency in heart and kidney allograft recipients. *Trans Proc* 2011; 43(10): 3885–7.
357. Jeong JC, Ro H, Yang J, Huh KH, Park JB, Cho JH, et al. Characteristics of anemia and iron deficiency after kidney transplant. *Transpl Proc* 2019; 51(5): 1406–9.
358. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood* 2019; 133: 30–39.
359. Winkelmayr WC, Lorenz M, Kramar R, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Percentage of hypochromic red blood cells is an independent risk factor for mortality in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4(12): 2075-81.
360. Schechter A, Gafter-Gvili A, Shepshelovich D, Rahamimov R, Gafter U, Mor E, et al. Post renal transplant anemia: severity, causes and their association with graft and patient survival. *BMC Nephrol* 2019; 20(1): 51.
361. Vinke JSJ, Francke MI, Eisenga MF, Hesselink DA, de Borst MH. Iron deficiency after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2021; 36(11): 1976-85.
362. Vinke JSJ, Ziengs AL, Buunk AM, van Sonderen L, Gomes-Neto AW, Investigators T, et al. Iron deficiency and cognitive functioning in kidney transplant recipients: findings of the TransplantLines biobank and cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2023: gfad013.



363. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(5): 434-47.
364. Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, De Meyer M, Konig J, Schepers R, et al. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2001; 47(1): 88-94.
365. Oremus M, Zeidler J, Ensom MH, Matsuda-Abedini M, Balion C, Booker L, et al. Utility of monitoring mycophenolic acid in solid organ transplant patients. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2008; (164): 1-131.
366. Kiang TKL, Ensom MHH. Exposure-toxicity relationships of mycophenolic acid in adult kidney transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2019; 58(12): 1533-52.
367. Gatta A, Verardo A, Bolognesi M. Hypoalbuminemia. *Intern Emerg Med* 2012; 7(3): S193–9.
368. De Jonge H, Naesens M, Kuypers DRJ. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* 2009; 31(4): 416-35.
369. Monchaud C, Marquet P. Pharmacokinetic optimization of immunosuppressive therapy in thoracic transplantation: part I. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(7): 419-62.
370. Zhang HX, Sheng CC, Liu LS, Luo B, Fu Q, Zhao Q, et al. Systematic external evaluation of published population pharmacokinetic models of mycophenolate mofetil in adult kidney transplant recipients co-administered with tacrolimus. *Br J Clin Pharmacol* 2019; 85(4): 746-61.
371. Brooks E, Tett SE, Isbel NM, McWhinney B, Staatz CE. Investigation of the Association Between Total and Free Plasma and Saliva Mycophenolic Acid Concentrations Following Administration of Enteric-Coated Mycophenolate Sodium in Adult Kidney Transplant Recipients. *Clin Drug Investig* 2019; 39(12): 1175-84.

372. Atcheson BA, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59(3): 271-80.

373. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schutz E, Mehls O, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the German study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(3): 759-68.

# Prilog 1 – Upitnik o neželjenim dejstvima

---

## GASTROINTESTINALNI NEŽELJENI EFEKTI

---

- 1.1. Povraćanje**  
**0:** Nikada  
**1+:** Povremeno  
**2+:** Često povraćanje koje zahteva simptomatsku terapiju
- 1.2. Dijareja**  
**0:** Nikada  
**1+:** Jedna retka stolica dnevno  
**2+:** Dve do pet retkih stolica dnevno
- 1.3. Dispepsija**  
**0:** Nema  
**1+:** Pojava probavnih smetnji u prvih sat vremena nakon primene imunosupresivne terapije  
**2+:** Višečasovne probavne smetnje  
**3+:** Probavne smetnje koje su vrlo česte i zahtevaju simptomatsku terapiju
- 1.4. Hiperaciditet želuca**  
**0:** Nema  
**1+:** Svakodnevna primena blokatora H2 receptora ILI inhibitora protonske pumpe  
**2+:** Svakodnevna primena blokatora H2 receptora I inhibitora protonske pumpe
- 

---

## ESTETSKI NEŽELJENI EFEKTI

---

- 2.1. Akne**  
**0:** Nema  
**1+:** Lezije ograničene na licu, bez specifičnog tretmana  
**2+:** Brojne lezije na licu i gornjem delu leđa  
**3+:** Step II i lokalni tretman  
**4+:** Step II i sistemski tretman
- 2.2. Promene na koži**  
**0:** Bez promena  
**1+:** Bez velikih promena, pojava modrica  
**2+:** Oštećenja kože i česta pojava krvnih podliva  
**3+:** Step II i pojava strija, pucanje kože
- 2.3. Hirzutizam**  
**0:** Nema  
**1+:** Pojačan rast kose  
**2+:** Primetno povećanje rasta kose  
**3+:** Step II i neophodna upotreba epilatora i brijanja
- 2.4. Okruglo lice (mesečevo lice)**  
**0:** Bez promena  
**1+:** Jedva primetno zaokrugljivanje vilica
-

---

**2+:** Zaokrugljivanje sa приметnim promenama u izgledu

**3+:** Veoma izražene promene

**2.5. Hiperplazija desni**

**0:** Nema

**1+:** Blago uvećanje desni

**2+:** Ozbiljno uvećanje desni i krvarenje

**2.6. Bivolji vrat**

**0:** Bez promena

**1+:** Prisutne promene

---

---

**NEŽELJENI EFEKTI NA CNS**

---

**3.1. Tremor**

**0:** Nema

**1+:** Blagi tremor ispruženih ruku

**2+:** Izraženi tremor ispruženih ruku

**3+:** Tremor u stanju mirovanja i/ili tremor koji narušava normalno funkcionisanje

**3.2. Glavobolja**

**0:** Nema

**1+:** Prisutna

**3.3. Nesanica**

**0:** Nema

**1+:** Teškoće pri uspavlivanju

**2+:** Česte nesanice koje zahtevaju farmakoterapiju

**3+:** Težak poremećaj sna uprkos farmakoterapiji

---

---

**OSTALI NEŽELJENI EFEKTI**

---

**4.1. Miopatija**

**0:** Nema

**1+:** Smanjena snaga ili slabost u mišićima

**2+:** Očigledna slabost pri ustajanju ili u čučućem položaju

**3+:** Gubitak mišićne mase i ozbiljno ograničenje pokreta

**4.2. Oftalmološke promene**

**0:** Nema katarakte

**1+:** Katarakta prisutna ili je hirurški uklonjena

**4.3. Manija**

**0:** Nema

**1+:** Nagle promene raspoloženja, brz govor

**2+:** Veoma eksplozivno ponašanje, govor i aktivnosti

**4.4. Depresija**

**0:** Nema

**1+:** Depresivne misli koje ne utiču na svakodnevne aktivnosti pacijenta (bez antidepresiva)

**2+:** Depresivne misli koje ne utiču na svakodnevne aktivnosti pacijenta (sa antidepresivima)

---

---

**3+: Depresivne misli koje utiču na svakodnevne aktivnosti pacijenta (neredovna lična higijena, nemogućnost da se sam obuče i dr.), i na terapiji antidepresivima**

**5.1. Posttransplatacioni *diabetes mellitus***

	<b>Simptomi <i>diabetesa</i> i vrednosti glukoze <math>\geq 11,1</math>mmol/L</b>	<b>ILI</b>
	<b>Glikemija našte <math>\geq 7</math> mmol/L</b>	<b>ILI</b>
<b>(2 kriterijuma su obavezna)</b>	<b>Vrednosti glukoze <math>\geq 11,1</math> mmol/L dva sata nakon OGTT testa</b>	<b>ILI</b>
	<b>Glikozilirani hemoglobin A1C <math>&gt; 7\%</math></b>	<b>ILI</b>
	<b>Upotreba antijabetika</b>	

**0: Nema**

**1+: Prisutan**

---

## Prilog 2 – Saglasnost za primenu upitnika

**A** **ana spasic** <anaspasic88@gmail.com> Feb 21, 2018, 8:56AM ☆ ↶ ⋮  
to rcvenuto ▾  
Dear professor,

My name is Ana Spasic.  
I'm pharmacist and phd student on Medical Faculty, University of Nis, Serbia. I'm interested in your work, "Validity and reliability of a novel immunosuppressive adverse effects scoring system in renal transplant recipients" because I researched the use of mycophenolate mofetil in patients after renal transplantation. If you give me permission, I'd like to apply your adverse effects scoring system in our patients. I tried to get the answer from your colleague Calvin J Meaney several times, but I did not succeed.  
Of course, I will cite your work as a source of the questionnaire. Maybe our results will be of interest to you, so we will be able to continue further cooperation. I hope that you will answer soon.

Best regard,  
Ana Spasic

---

 Virus-free. [www.avast.com](http://www.avast.com)

**V** **Venuto, Rocco** <rcvenuto@buffalo.edu> Feb 21, 2018, 1:05PM ☆ ↶ ⋮  
to me ▾

We developed our scoring system because we think it was an effective way and largely objective way to assess drug adverse effects. You have are enthusiastic support to apply these metrics to your patients. Of course we would be interested in the outcomes.

**Rocco C Venuto, M.D.**  
Professor of medicine

## Biografija autora

Ana Kundalić (rođ. Spasić) rođena je 9. avgusta 1988. godine u Nišu. Osnovnu i srednju medicinsku školu „Dr Milenko Hadžić“ (smer farmaceutski tehničar) u Nišu završila je kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet u Nišu, odsek farmacija, upisala je školske 2007/2008. godine. Fakultet je završila avgusta 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,29 i diplomskim radom iz Kliničke farmacije na temu „Značaj adherence u racionalnoj farmakoterapiji arterijske hipertenzije“.

Nakon pripravničkog staža koji je obavila u apotekarskoj ustanovi „Apoteke Niš“, položila je stručni ispit septembra 2013. godine. Doktorske akademske studije - smer toksikologija upisala je školske 2012/2013. godine. Ana Kundalić je kao student doktorskih studija i stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja od 2013. do 2017. godine bila angažovana na projektu „Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi biohemijских markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka“ (evidencioni broj TR 31060). Radni odnos na Medicinskom fakultetu u Nišu zasnovala je 01.05.2018. godine kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Preventivni, terapijski i etički pristup u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“ (evidencioni broj III 41018). Februara 2020. izabrana je u zvanje saradnik u nastavi za UNO Farmakokinetika i klinička farmacija, a marta 2022. izabrana je za asistenta na istim predmetima. Autor je i koautor više naučnih radova publikovanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### **ФАРМАКОКИНЕТИЧКА ИСПИТИВАЊА МИКОФЕНОЛНЕ КИСЕЛИНЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ПРЕСАЂЕНИМ БУБРЕГОМ**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:



Ана А. Кундалић



**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ФАРМАКОКИНЕТИЧКА ИСПИТИВАЊА МИКОФЕНОЛНЕ КИСЕЛИНЕ  
КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ПРЕСАЂЕНИМ БУБРЕГОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

*A. Kundalić*

Ана А.Кундалић

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

### **ФАРМАКОКИНЕТИЧКА ИСПИТИВАЊА МИКОФЕНОЛНЕ КИСЕЛИНЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ПРЕСАЂЕНИМ БУБРЕГОМ**

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:



Ана А. Кундалић