



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Nikola Z. Stefanović

**ZNAČAJ GENSKOG POLIMORFIZMA CITOHROMA
P450 3A5 I ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE
KOD PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM
BUBREGOM NA TERAPIJI TAKROLIMUSOM**

doktorska disertacija

Niš, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Nikola Z. Stefanović

**THE SIGNIFICANCE OF CYTOCHROME P450 3A5
AND ANTIOXIDATIVE ENZYMES GENE
POLYMORPHISMS IN KIDNEY TRANSPLANT
PATIENTS ON TACROLIMUS TREATMENT**

doctoral thesis

Niš, 2015.

Mentor: **Prof. dr Tatjana Cvetković**, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof dr Radmila Veličković Radovanović, predsednik

Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu

Prof. dr Tatjana Cvetković, mentor i član

Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu

Prof. dr Momir Mikov, član

Medicinski fakultet Univerzitet u Novom Sadu

Prof. dr Milan Jokanović, član

Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu

Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov, član

Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu

Datum odbrane: _____

Zahvalnost

Iako doktorska disertacija predstavlja originalan i lični rad pojedinca, njena izrada zahteva učešće i pomoć velikog broja ljudi. Veliku zahvalnost dugujem svima koji su na bilo koji način učestvovali u ovom istraživanju i bez čijeg doprinosa ne bi bilo moguće izraditi ovu disertaciju.

*Na prvom mestu zahvalnost za izradu ove disertacije dugujem svom mentoru, **prof. dr Tatjani Cvetković**, na nesebičnoj pomoći, savetima i razumevanju, ali i na podršci, poverenju i prijateljstvu tokom godina zajedničkog rada. Moj naučno-istraživački rad obeležen je njenim višegodišnjim iskustvom, znanjem i datom slobodom.*

***Prof. dr Radmili Veličković Radovanović** dugujem veliku zahvalnost za neprestanu i stručnu podršku koju mi je pružala od samog početka mog istraživačkog rada. Svojim vrednim savetima i mišljenjima značajno je doprinela izradi ove disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem **prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov** na pruženoj podršci, vremenu i znanju.*

*Zahvaljujem se **prof. dr Momiru Mikovu i prof. dr Milanu Jokanoviću** na saradnji i učešću u oceni ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem **prof. dr Dušici Pavlović**, rukovodiocu projekta III41018, bez čije finansijske podrške ovo istraživanje ne bi bilo moguće. Takođe se zahvaljujem **asistentu dr Dijani Stojanović i Nataši Živković**, kojima dugujem zahvalnost za pomoć i prijatne trenutke druženja tokom zajedničkog rada. Zahvaljujem se asistentu **dr Aleksandri Ignjatović** na stručnoj pomoći u statističkoj obradi podataka. Koristim priliku da se zahvalim **dr Liliki Zvezdanović Čelebić i Predragu Vlahoviću** iz Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra u Nišu, na velikoj pomoći i sprovedenim laboratorijskim ispitivanjima. Iskreno se zahvaljujem lekarima, **doc. dr Branki Mitić i prim. dr Goranu Paunoviću** sa Klinike za nefrologiju, koji su svojim razumevanjem i savetima doprineli izradi ove disertacije. Takođe zahvaljujem se svim sestrama i tehničarima iz Biohemijske laboratorije Klinike za nefrologiju, koji su mi svesrdno pomogli u laboratorijskom radu. Veliku zahvalnost dugujem kolegicama i kolegama iz Laboratorije za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučno - istraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu na razumevanju i pomoći. Takođe bih se zahvalio kolegama sa Katedre Farmacija, koji su me podržavali i motivisali u radu na izradi doktorske disertacije.*

***Svojim roditeljima i sestri** dugujem zahvalnost što su me uvek podržavali i verovali u mene.*

***Najveću zahvalnost dugujem suprizi Ani**, za ljubav, razumevanje i oslonac u toku zajedničkog života.*

Istraživanje je podržano od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru projekata III41018.

Autor

I Autor

<i>Ime i prezime:</i>	Nikola Z. Stefanović
<i>Datum i mesto rođenja:</i>	21.01.1984. godine, Niš, Srbija
<i>Sadašnje zaposljenje:</i>	Asistent na UNO Farmacija - Klinička farmacija i Farmakokinetika

II Doktorska disertacija

<i>Naslov:</i>	Značaj genskog polimorfizma citohroma P450 3A5 i enzima antioksidativne zaštite kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom
<i>Broj stranica:</i>	156
<i>Broj slika:</i>	7
<i>Broj grafikona:</i>	14
<i>Broj tabela:</i>	35
<i>Broj bibliografskih podataka:</i>	326
<i>Ustanova i mesto gde je rad izrađen:</i>	Laboratorija za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučno - istraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu; Klinika za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu
<i>Naučna oblast:</i>	Klinička farmacija, Farmakologija, Toksikologija
<i>Mentor:</i>	Prof. dr Tatjana Cvetković

III Ocena i odbrana

<i>Datum prijave teme:</i>	12.11.2013.
<i>Datum prihvatanja doktorske disertacije:</i>	26.02.2014.
<i>Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:</i>	Prof dr Radmila Veličković Radovanović, predsednik Prof. dr Tatjana Cvetković, mentor i član Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov, član
<i>Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:</i>	Prof dr Radmila Veličković Radovanović, predsednik Prof. dr Tatjana Cvetković, mentor i član Prof. dr Momir Mikov, član Prof. dr Milan Jokanović, član Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov, član
<i>Datum odbrane doktorske disertacije:</i>	

IV Naučni doprinos doktorske disertacije

Stefanović N, Cvetković T, Veličković – Radovanović R, Jevtović – Stoimenov T, Vlahović P, Stojanović I, Pavlović D. The pharmacogenetics may influence tacrolimus daily dose, but not urinary tubular damage markers in long - term period after renal transplantation. J Med Biochem 2015; In press, DOI: 10.1515/jomb-2015-001

Stefanović N, Cvetković T, Jevtović – Stoimenov T, Lilika Zvezdanović – Čelebić L, Stojanović D, Ignjatović A, Živković N, Veličković – Radovanović R. Potential role of tacrolimus in erythrocytes'antioxidative capacity in long - term period after renal transplantation. Eur J Pharm Sci 2015; 70: 132- 139. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.01.013

Stefanović N, Cvetković T, Jevtović – Stoimenov T, Ignjatović A, Paunović G, Veličković – Radovanović R. Are the CYP 3A5 and ABCB1 gene polymorphisms important players in long – term period after renal transplantation: effects on the tacrolimus exposure and kidney function? Exp Ther Med 2015; In press

Stefanović N, Cvetković T, Veličković-Radovanović R, Jevtović-Stoimenov T, Stojanović D, Živković N. Significance of CYP3A5 gene polymorphism in Serbian renal transplant patients. Acta medica Medianae. 2013; 52(1):33-38.

Značaj genskog polimorfizma citohroma P450 3A5 i enzima antioksidativne zaštite kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom

Rezime

Uvod. Takrolimus predstavlja osnovu većine imunosupresivnih protokola nakon transplantacije bubrega u svetu. Njegovu kliničku primenu komplikuje izražena interindividualna varijabilnost u farmakokinetici i hronična nefrotoksičnost, koja može doprineti nefropatiji transplantiranog organa. Prethodnih godina ostvaren je značajan napredak u kratkoročnim ishodima nakon transplantacije bubrega, ali nije bio praćen i istovremenim poboljšanjem dugoročnih komplikacija. Oksidativni stres doprinosi endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi, koje se nalaze u osnovi kardiovaskularne bolesti i hronične nefropatije grafta kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Međutim, nije u potpunosti razjašnjeno da li takrolimus ispoljava uticaj na oksidativni status i na taj način ostvaruje efekat na smanjenje bubrežne funkcije. Cilj ovog istraživanja bila je procena uticaja genskih polimorfizama, citohrom P450 (CYP) 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T, na dozni režim i izloženost takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Sprovedeno istraživanje je imalo za cilj poređenje parametara oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, koncentracije dimetilarginina u plazmi i enzima markera oštećenja tubula u urinu u odnosu na dozni režim takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genotip pacijenata. Pored toga, ispitivan je uticaj oksidativnog stresa, dnevne doze takrolimusa CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na funkciju bubrega. Dodatno, cilj sprovedenog istraživanja je procena uticaja genskih polimorfizama superoksid dizmutaze (SOD) 2 Ala -9 Val i glutation peroksidaze (GPX) 1 Pro200Leu na parametre oksidativnog stresa i funkciju bubrega.

Metode. U ispitivanju su učestvovali pacijenti sa transplantiranim bubregom na takrolimus baziranoj imunosupresiji, koji su imali post-transplantacioni period od najmanje godina dana i zdravi ispitanici. Ispitivani polimorfizmi CYP 3A5 i ABCB1 gena su detektovani alel – specifičnim PCR metodom, dok su polimorfizmi SOD2 i GPX1 gena detektovani PCR – RFLP metodom kod pacijenata i zdravih ispitanika. Takođe, svim ispitanicima određivani su parametri oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, koncentracija asimetričnog (ADMA) i simetričnog (SDMA) dimetilarginina u plazmi i aktivnost enzima markera oštećenja tubula u urinu. U plazmi su određivani sledeći parametri oksidativnog stresa: koncentracija tiobarbituratna kiselina reaktivnih supstanci (TBARS), uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP), ukupnih sulfhidrilnih grupa (USH), aktivnost

katalaze (KAT) i SOD. U eritrocitima su određivani: koncentracija TBARS, redukovan glutation (GSH), aktivnost SOD, GPX i glutation reduktaze (GR). U urinu su određivani: koncentracija TBARS, USH i reaktivnih karbonilnih grupa (RCD) i aktivnost enzima, N – acetil – β – D glukozaminidaze (NAG), dipeptidil peptidaze IV (DPP IV), aminopeptidaze N (APN) i gama-glutamil transpeptidaze (GGT). Procenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR) je preračunata na osnovu MDRD formule.

Rezultati. Dobijeni rezultati pokazuju da je CYP 3A5 A6986G, ali ne i ABCB1 C3435T genski polimorfizam nezavisan prediktor izloženosti takrolimusa. Nosioци CYP 3A5 *1/*3 genotipa zahtevaju veće doze leka u poređenju sa nosiocima CYP 3A5*3/*3 genotipa, kako bi održali optimalnu terapijsku koncentraciju leka u krvi, dve godine nakon transplantacije bubrega. Pokazano je da CYP 3A5 polimorfizam predstavlja nezavisan prediktor varijabilnosti u eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega, pri čemu su pacijenti sa CYP 3A5*1/*3 genotipom imali slabiju bubrežnu funkciju. Pacijenti sa transplantiranim bubregom imali su povećan oksidativni stres, veće koncentracije dimetilarginina i više aktivnosti enzima markera oštećenja tubula u poređenju sa kontrolnom grupom. Koncentracija ADMA i SDMA je korelirala pozitivno sa eGFR, dok je samo SDMA prediktor varijabilnosti u eGFR. Dnevna doza takrolimusa je pokazala pozitivnu korelaciju sa parametrima antioksidativne zaštite organizma u eritrocitima. Međutim, dnevna doza takrolimusa i sistemski oksidativni stres pokazali su nezavisan i negativan uticaj na eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Dodatno, parametri oksidativnog stresa u urinu pozitivno su korelirali sa enzimskim markerima oštećenja tubula. Ispitivani polimorfizmi Ala –9 Val u genu za SOD2 i Pro200Leu u genu za GPX1 imaju aditivan efekat kada je u pitanju smanjenje bubrežne funkcije u periodu između prve i druge godine nakon transplantacije. Nosioци istovremeno SOD2 Val i GPX1 Leu alela pokazuju značajno smanjenje bubrežne funkcije u poređenju sa ostalim transplantiranim pacijentima.

Zaključak. Ovo istraživanje je potvrdilo uticaj CYP 3A5 genskog polimorfizma na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da ispitivani polimorfizam nema značaja samo u ranom, već i u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, predstavljajući važan prediktor dnevne doze leka. Određivanje genotipa CYP 3A5 u kliničkoj praksi omogućuje individualizaciju doznog režima takrolimusa i sprovođenje personalizovane medicine kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Prilagođavanje doze na osnovu genotipa CYP 3A5 doprinelo bi smanjenju farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa i rizika za razvoj toksičnih efekata. Iako transplantacija bubrega rešava mnoge komplikacije, koje prate hroničnu bubrežnu

insuficijenciju i pokazuje prednost u odnosu na dijalizni tretman, povećan oksidativni stres još uvek predstavlja nerešivu enigmu u post–transplantacionom periodu. Sprovedeno istraživanje je pokazalo potencijalno antioksidativno delovanje takrolimusa na nivou eritrocita. Ipak, takrolimus može doprineti smanjenju bubrežne funkcije u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, ali očigledno taj efekat nije posredovan oksidativnim stresom. Dobijeni rezultati pokazuju da bi SDMA mogao biti značajan marker bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Dodatno, ispitivanje polimorfizama u genima enzima antioksidativne zaštite može biti značajno, jer doprinose boljem uvidu u ulogu oksidativnog stresa i ispoljavaju efekat na smanjenje funkcije transplantiranog bubrega. Uvođenje terapijskih strategija, koje bi imale za cilj smanjenje ukupne izloženosti takrolimusa s jedne, i oksidativnog oštećenja s druge strane, kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, predstavlja izazov i potrebu u godinama koje slede.

Ključne reči: transplantacija bubrega, takrolimus, citohrom P450 3A5, P - glikoprotein, farmakogenetika, oksidativni stres, antioksidativni enzimi, dimetilarginini, nefrotoksičnost, bubrežna funkcija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Klinička farmacija, Farmakologija, Toksikologija

UDK: 615.033

The significance of cytochrome P450 3A5 and antioxidative enzymes gene polymorphisms in kidney transplant patients on tacrolimus treatment

Summary

Introduction. Tacrolimus is the backbone of the most immunosuppressive protocols after renal transplantation in the world. Its clinical use is complicated by inter-individual variability in pharmacokinetics and chronic nephrotoxicity as well. In the previous period, a significant progress in short-term outcomes after renal transplantation was accomplished, but it was not followed by the parallel improvement of the long-term complications. Oxidative stress contributes to the endothelial dysfunction and atherosclerosis, which are the basis of the cardiovascular disease and chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients. However, it is not fully understood, whether or not tacrolimus has an effect on oxidative status and therefore on the deterioration of renal function. The goal of this research was the evaluation of the influence of cytochrome P450 (CYP) 3A5 A6986G and ABCB1 C3435T gene polymorphisms on tacrolimus dosage regimen and exposure in the renal transplant recipients. The conducted research aimed to compare oxidative stress parameters in plasma, erythrocytes and urine, the level of dimethylarginines in plasma and enzyme markers of tubular damage in urine with respect to tacrolimus dosage regimen, CYP 3A5 and ABCB1 3435 genotype of the patients. Also, this study analyzed the influence of the oxidative stress, daily dose of tacrolimus and CYP 3A5 and ABCB1 3435 genotype on renal function. In addition, the goal of conducted research was the evaluation of the superoxide dismutase (SOD) 2 Ala -9 Val and glutathione peroxidase (GPX) 1 Pro 200 Leu gene polymorphisms effect on oxidative stress parameters and renal function.

Methods. This research included renal transplant recipients on tacrolimus based immunosuppression, who were at least one year post-transplants and healthy examinees. The polymorphisms in CYP 3A5 and ABCB1 gene were detected by allele-specific PCR method, while polymorphisms in SOD2 and GPX1 gene were analyzed by PCR – RFLP method in renal transplant recipients and healthy examinees as well. Also, all examinees had oxidative stress parameters in plasma, erythrocytes and urine, levels of dimethylarginine in plasma and the activity of enzyme markers of tubular damage in urine determined. The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), advanced oxidation protein products (AOPP), total sulfhydryl groups (USH), activity of catalase and SOD were determined in

plasma. The level of TBARS, reduced glutathione (GSH), activity of SOD, GPX and glutathione reductase (GR) were determined in erythrocytes. The level of TBARS, USG, reactive carbonyl derivatives (RCD) and the activity of the enzymes, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), aminopeptidase N (APN) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) were determined in urine. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by MDRD formula.

Results. The obtained results showed that CYP 3A5 A6986G, but not ABCB1 C3435T, gene polymorphism was an independent predictor of tacrolimus exposure. The carriers of CYP 3A5*1/*3 genotype required higher daily dose of a drug than the carriers of the CYP 3A5*3/*3 genotype, in order to maintain the optimal therapeutic drug concentration, in the following two years after transplantation. It is shown that CYP 3A5 gene polymorphism represents an independent predictor of eGFR variability in a two - year period after renal transplantation, whereas the patients with CYP 3A5*1/*3 genotype had reduced renal function. Renal transplant recipients had higher oxidative stress, levels of dimethylarginine and activities of the enzyme markers of tubular damage compared to control group. The asymmetric (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) concentration correlated positively with eGFR, while only SDMA is a predictor of eGFR variability. Tacrolimus daily dose showed positive correlation with the parameters of antioxidative defense in erythrocytes. However, tacrolimus daily dose and systemic oxidative stress showed independent and negative effect on eGFR in a long – term period after renal transplantation. In addition, the parameters of the oxidative stress in urine correlated positively with enzyme markers of tubular damage. The polymorphism Ala –9 Val in SOD2 and Pro 200 Leu in GPX1 gene had synergic effect on deterioration of the renal function between the first and the second post-transplant year. The carriers of both SOD 2 Val and GPX1 Leu allele showed a significant reduction in renal function compared to other patients.

Conclusion. This research confirmed the influence of the CYP 3A5 gene polymorphism on tacrolimus dosage regimen in renal transplant recipients. Furthermore, the conducted study showed that the investigated polymorphism was significant, not only in early, but in late period after renal transplantation as well, representing an important predictor of tacrolimus daily dose. The determination of CYP 3A5 genotype in clinical practice contributes to the individualization of tacrolimus dosage regimen and provides the personalized medicine within renal transplant recipients. Dose adjustments based on the CYP 3A5 genotype contributes to the reduction in pharmacokinetic variability of tacrolimus and the risk of the adverse effects development. Although renal transplantation solves a number of

complications associated with chronic kidney disease, and shows the advantage compared to dialysis treatment, an increased oxidative stress is still unsolved enigma in a post-transplantation period. The conducted research showed potential antioxidative characteristics of tacrolimus in the erythrocytes. Tacrolimus may contribute to the reduction of renal function in long-term period after transplantation, but obviously this effect was not mediated by oxidative stress. The obtained findings suggest that SDMA may be an important marker of the renal function in patients with transplanted kidney. In addition, the investigation of the polymorphisms in antioxidative enzymes genes may be significant due to their contribution to better insight concerning the role of the oxidative stress and their influence on a transplanted kidney function. The implementation of therapeutic strategies that will reduce the overall exposure of tacrolimus and oxidative damage in renal transplant recipients as well, represents the challenge and need in years to come.

Key words: kidney transplantation, tacrolimus, cytochrome P450 3A5, P - glycoprotein, pharmacogenetics, oxidative stress, antioxidative enzymes, dimethylarginine, nephrotoxicity, renal function

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Clinical pharmacy, Pharmacology, Toxicology

UDC: 615.033

Lista skraćenica

ADMA	asimetrični dimetilarginin
AGE	krajnji produkti glikacije (engl. advanced glycation end products)
ALG	antilimfocitni globulin
AMR	odbacivanje posredovano antitelima (engl. antibody - mediated rejection)
AOPP	uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. <i>advanced oxidation protein products</i>)
APN	aminopeptidaza N
AT II	angiotenzin II
ATG	antitimocitni globulin
AZA	azatioprin
CAN	hronična nefropatija transplantiranog organa (engl. <i>chronic allograft nephropathy</i>)
CMIA	hemiluminiscentno imunoodređivanje na mikročesticama (engl. <i>chemiluminescent microparticle immunoassay</i>)
CsA	ciklosporin A
CYP	citohrom P450
DAG	diacilglicerol
DDAH	dimetilarginin dimetilaminohidrolaza
DNPH	2,4 dinitrofenilhidrazinom
DPP IV	dipeptidil peptidaza IV
DTNB	5,5 - ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina
eGFR	procenjena GFR na osnovu izračunavanja klirensa kreatenina
EMT	epitelijalna mezenhimska tranzicija
ESRD	terminalni stadijum hronične bubrežne insuficijencije (engl. <i>end – stage renal disease</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FKBP12	FK – vezujući protein 12 (engl. <i>FK - binding protein 12</i>)
GFR	glomerularna filtracija
GGT	γ -glutamil transferaza
GPX	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	redukovani glutation
GST	glutation – S – transferaza
GST M1	glutation – S – transferaza M1
HCSH	homocistein
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IF/TA	intersticijalna fibroza i tubularna atrofija
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL – 2R	interleukin- 2 receptor
INF- γ	interferon – γ
IP3	inositol - 1,4,5-trifosfat
KAT	katalaza
KNI	kalcineurinski inhibitor
KOMT	katehol – O – metiltransferaza
KT	kadaverična transplantacija
MAPK	mitogen – aktivirana proteinska kinaza
MDA	malondialdehid

MFK	mikofenolna kiselina
MHC	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MMF	mikofenolat - mofetil
MP	metilprednololon
MYH9	ne – mišićni miozin IIA teški lanac
NAG	N-acetil-β-D-glukozaminidaza
NF-κB	nuklearni faktor - κB
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih T - limfocita
NO	azot monoksid
NOS	azot oksid sintaza
PCR	lančana reakcija polimeraze
PCR - RFLP	analiza dužine restrikcionih fragmenata DNK nakon PCR umnožavanja (engl. <i>polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism</i>)
PGP	P – glikoprotein
PIK	površina ispod C-t krive
PPAR	peroksizmalni proliferativni aktivirani receptor
PPARA	peroksizmalni proliferativni aktivirani receptor - α
POR	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat – CYP oksidoreduktaza
PRE	prednizon
PTDM	post–transplantacioni diabetes mellitus
PXR	pregnan X receptor
RAAS	renin – angiotenzin – aldosteron sistem
RCD	reaktivne karbonilne grupe
RCS	reaktivne vrste ugljenika (engl. <i>reactive carbonyl species</i>)
RNS	reaktivne vrste azota, ugljenika (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSS	reaktivne vrste sumpora (engl. <i>reactive sulfur species</i>)
SDMA	simetrični dimetilarginin
SH	sulfhidrilna grupa
SNP	zamene jednog nukleotida u molekulu DNK (engl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SOD	superoksid dismutaza
SRL	sirolimus
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBARS	tiobarbituratna kiselina reaktivne supstance
TDM	terapijski monitoring
TGF - β	transformišući faktor rasta – β (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
Th -1	T helper - 1
TLR	T – limfocit receptor
TNF-α	faktor tumorske nekroze - α (engl. <i>tumor necrosis factor -α</i>)
USH	ukupne SH (sulfhidrilne) grupe
VDR	vitamin D receptor
XOD	ksantin oksidaza
ZAP	70 - ζ-udruženog proteina (engl. <i>zeta associated protein</i>)
ŽST	živa srodnička transplantacija

Lista slika

Slika 1. Ciljna mesta delovanja imunosupresivnih lekova.....	4
Slika 2. Mehanizam dejstva takrolimusa.....	11
Slika 3. Takrolimus	12
Slika 4. Primarni metaboliti takrolimusa.....	15
Slika 5. Detekcija CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama na 3% agaroznom gelu.....	42
Slika 6. Detekcija SOD2 Ala -9 Val genskog polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu...	43
Slika 7. Detekcija GPX1 Pro 200 Leu genskog polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu	44

Lista tabela

Tabela 1. Demografske karaktertistike pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika.....	51
Tabela 2. Osnovni hematološki parametri pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika.....	51
Tabela 3. Biohemijski parametri pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika.....	52
Tabela 4. Demografski i klinički podaci pacijenata na takrolimusu u različitim periodima nakon transplantacije bubrega.....	56
Tabela 5. Dnevna doza takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije.....	57
Tabela 6. Koncentracija C0 takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije.....	58
Tabela 7. Odnos C0/D takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije	58
Tabela 8. Dnevna doza takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije.....	59
Tabela 9. Koncentracija C0 takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije.....	60
Tabela 10. Odnos C0/D takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije.....	61
Tabela 11. Uticaj CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na C0/D odnos takrolimusa u toku dve godine nakon transplantacije bubrga.....	61
Tabela 12. Uticaj CYP 3A5 i ABCB1 genskog polimorfizma na eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega.....	62
Tabela 13. Parametri oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.....	64
Tabela 14. Korelaciona analiza između parametara oksidativnog stresa u plazmi, ADMA, SDMA i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	66
Tabela 15. Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.....	67
Tabela 16. Korelaciona analiza između parametara oksidativnog stresa u eritrocitima i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	67
Tabela 17. Parametri oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata s transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika	68
Tabela 18. Korelaciona analiza parametara oksidativnog stresa, aktivnosti ektoenzima u urinu i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	69
Tabela 19. Dnevna doza, koncentracija C0 i C0/D odnos takrolimusa kod pacijenata s različitim CYP3A5 i ABCB1 3435 genotipom	70
Tabela 20. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa, koncentracijom ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	71

Tabela 21. Vrednosti parametara oksidativnog stresa, koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip.....	73
Tabela 22. Vrednosti parametara oksidativnog stresa, koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip	73
Tabela 23. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom	74
Tabela 24. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip	75
Tabela 25. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip.....	76
Tabela 26. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa i aktivnošću ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom	76
Tabela 27. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip.....	78
Tabela 28. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip	78
Tabela 29. Korelaciona analiza između farmakokinetičkih parametara takrolimusa eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	79
Tabela 30. Efekat parametara oksidativnog stresa u plazmi, koncentracije dimetilarginina, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.....	80
Tabela 31. Efekat parametara oksidativnog stresa u eritrocitima, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega	81
Tabela 32. Efekat parametara oksidativnog stresa u urinu, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.....	82
Tabela 33. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i koncentracije redukovano glutationa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na SOD2 genotip.....	83
Tabela 34. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i koncentracije redukovano glutationa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na GPX1 genotip.....	84
Tabela 35. Pojedinačni i udruženi efekat polimorfizama SOD2 i GPX1 gena na eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega.....	88

Lista grafikona

Grafikon 1. Učestalost genotipova i alela polimorfizama CYP3A5 A6986G kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=91) i zdravih ispitanika (n=106)	53
Grafikon 2. Učestalost genotipova i alela polimorfizama ABCB1 C3435T kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=91) i zdravih ispitanika (n=106)	54
Grafikon 3. Učestalost genotipova i alela polimorfizama SOD2 Ala -9Val kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=95) i zdravih ispitanika (n=96)	54
Grafikon 4. Učestalost genotipova i alela polimorfizama GPX1 Pro200Leu kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=85) i zdravih ispitanika(n=110)	55
Grafikon 5. Vrednosti eGFR u odnosu na CYP 3A5 genotip pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije bubrega	63
Grafikon 6. Koncentracija serumskog kreatinina u odnosu na CYP 3A5 genotip pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije bubrega	63
Grafikon 7. Koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika	65
Grafikon 8. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u plazmi u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	72
Grafikon 9. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	75
Grafikon 10. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	77
Grafikon 11. Vrednosti TBARS u plazmi, eritrocitima i urinu u odnosu na SOD2 genotip ..	83
Grafikon 12. Vrednosti TBARS u plazmi, eritrocitima i urinu u odnosu na GPX1 genotip ..	84
Grafikon 13. Vrednosti eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega u odnosu na SOD2 i GPX1 genotip (posmatrani ponaosob)	86
Grafikon 14. Vrednosti GFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega u odnosu na SOD2 i GPX1 genotip (posmatrani zajedno)	87

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	3
2.1. Imunosupresivni lekovi u kliničkoj praksi.....	3
2.2. Takrolimus-osnova savremene imunosupresivne terapije.....	10
2.2.1. Mehanizam dejstva takrolimusa.....	10
2.3. Farmakokinetičke karakteristike takrolimusa.....	12
2.3.1. Resorpcija.....	13
2.3.2. Raspodela.....	14
2.3.3. Metabolizam i eliminacija.....	14
2.3.4. Faktori koji utiču na farmakokinetiku takrolimusa.....	16
2.3.5. Farmakokinetičke interakcije takrolimusa.....	17
2.4. Polimorfizam citohrom P450 3A5 i ABCB1 gena.....	18
2.4.1. Citohrom P450 3A5.....	18
2.4.2. P – glikoprotein (ABCB1, MDR - 1).....	20
2.4.3. Ostali značajni polimorfizmi koji mogu doprineti farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa.....	21
2.5. Neželjeni efekti i toksičnost takrolimusa.....	21
2.6. Hronična nefrotoksičnost takrolimusa.....	23
2.7. Enzimski markeri oštećenja tubula bubrega.....	25
2.8. Oksidativni stres i transplantacija bubrega.....	27
2.8.1. Slobodni radikali.....	28
2.8.2. Antioksidativna zaštita.....	29
2.8.3. Polimorfizam gena za mangan zavisnu superoksid dizmutazu (Ala -9Val).....	33
2.8.4. Polimorfizam gena za glutation peroksidazu 1 (Pro200Leu).....	34
2.9. Uloga azot monoksida i dimetilarginina kod bubrežnih bolesti.....	34
3. Ciljevi istraživanja.....	36
4. Pacijenti i metode istraživanja.....	37
4.1. Pacijenti.....	37
4.1.1. Imunosupresivni protokol kod pacijenata na takrolimusu.....	38
4.1.2. Materijal pacijenata i zdravih ispitanika.....	39
4.1.3. Farmakokinetički podaci.....	39
4.2. Metode.....	40
4.2.1. Metoda detekcije CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama.....	41
4.2.2. Metoda detekcije SOD2 Ala -9Val genskog polimorfizma.....	42
4.2.3. Metoda detekcije GPX1 Pro200Leu genskog polimorfizma.....	43
4.2.4. Određivanje koncentracije TBARS u plazmi.....	44
4.2.5. Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima.....	45
4.2.6. Određivanje koncentracije TBARS u urinu.....	45
4.2.7. Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina u plazmi.....	45
4.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa u plazmi i urinu (USH).....	45
4.2.9. Određivanje koncentracije karbonilnih grupa u urinu.....	46

4.2.10. Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi.....	46
4.2.11. Određivanje koncentracije asimetričnog i simetričnog dimetilarginina u plazmi ..	46
4.2.12. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi	47
4.2.13. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u eritrocitima.....	48
4.2.14. Određivanje aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima.....	48
4.2.15. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze u eritrocitima	48
4.2.16. Određivanje koncentracije redukovano glutationa u punoj krvi	48
4.2.17. Određivanje aktivnosti enzima markera tubulskog oštećenja u urinu i serumu ...	49
4.2.18. Statistička obrada rezultata	50
5. Rezultati	51
5.1. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika	51
5.2. Ispitivanje učestalosti genotipova i alela CYP3A5, ABCB1, SOD2 i GPX1 genskih polimorfizama.....	53
5.3. Ispitivanje uticaja CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama na dozni režim i izloženost takrolimusa.....	55
5.4. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa, koncentracije dimetilarginina i enzimskih markera oštećenja tubula kod transplantiranih pacijenata i zdravih ispitanika	64
5.5. Ispitivanje uticaja takrolimusa i polimorfizma CYP 3A5 i ABCB1 gena na parametare oksidativnog stresa, koncentraciju dimetilarginina i enzimske markere oštećenja tubula kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	69
5.6. Ispitivanje uticaja dnevne doze takrolimusa, polimorfizma CYP 3A5 i ABCB1 gena, parametara oksidativnog stresa i koncentracije dimetilarginina, na brzinu eGFR nakon transplantacije bubrega.....	79
5.7. Ispitivanje uticaja SOD2 Ala –9 Val i GPX1 Pro 200 Leu genskih polimorfizama na parametre oksidativnog stresa i bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	82
6. Diskusija	89
6.1. Uloga genetskih faktora u nastanku i progresiji hronične bubrežne insuficijencije...89	
6.2. Mesto takrolimusa u savremenim imunosupresivnim protokolima	93
6.3. Značaj genskih polimorfizama CYP 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T kod pacijenata sa transplantiranim bubregom	97
6.4. Parametri oksidativnog stresa, dimetilarginini i enzimski markeri tubularnog oštećenja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.....	104
6.5. Uticaj doznog režima takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 genotipa na parametre oksidativnog stresa i enzimske markere tubularnog oštećenja.....	108
6.6. Uticaj doznog režima takrolimusa, oksidativnog stresa i dimetilarginina na eGFR ..	110
6.7. Značaj ispitivanja genskih polimorfizama antioksidativnih enzima kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	116
7. Zaključak.....	121
8. Literatura.....	125

1. Uvod

Hroničnu bubrežnu insuficijenciju (HBI) karakteriše progresivno slabljenje bubrežne funkcije, koje posledično dovodi do brojnih poremećaja i oštećenja organskih sistema u ljudskom organizmu. Terminalni stadijum hronične bubrežne insuficijencije (ESRD, prema engl. *end – stage renal disease*) manifestuje se potpunim ili skoro potpunim gubitkom bubrežne funkcije, stanjem uremije, ali i nemogućnošću pacijenta da preživi bez dijalize ili transplantacije bubrega. Transplantacija ili presađivanje bubrega predstavlja terapiju izbora za pacijente u terminalnom stadijumu HBI, jer pacijent sa uspešno transplantiranim bubregom živi dva do tri puta duže u poređenju sa odgovarajućim pacijentom na hroničnom programu dijalize. Hospitalizacije pacijenata sa transplantiranim bubregom su ređe, a pored toga oni imaju bolji kvalitet života u odnosu na pacijente na dijalizi. Renalna anemija i osteoporoza, koje su udružene sa HBI, ne predstavljaju problem većini pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega [1,2]. Međutim, iako transplantacija bubrega omogućava duže preživljavanje u odnosu na dijalizni tretman, stopa smrtnosti pacijenata sa transplantiranim bubregom je i dalje veća u odnosu na opštu populaciju [3]. Kardiovaskularne (KV) bolesti, infekcije i maligniteti su tri najvažnija uzroka smrti pacijenata sa transplantiranim bubregom [1].

Uspeh transplantacije kao metode lečenja pacijenata sa HBI, omogućava primena imunosupresivnih lekova, koji sprečavaju odbacivanje transplantiranog organa. Proces odbacivanja transplantata je imunološki fenomen i posledica zapaljenskih reakcija, koji dovode do oštećenja presađenog organa. Odbacivanje transplantiranog organa može biti akutno i hronično. Akutno odbacivanje je glavni razlog ranog neuspeha transplantacije, a može sa javiti nekoliko dana ili nedelja nakon hirurške intervencije. Ono je posredovano citotoksičnim T - limfocitima, koji direktno uništavaju ćelije transplantata ili T - limfocitima koji deluju protiv ćelija krvnih sudova transplantiranog bubrega. Pored toga, akutno odbacivanje može biti posredovano i antitelima. Hronično odbacivanje predstavlja progresivni gubitak funkcije bubrega i može se javiti mesecima i godinama nakon transplantacije. Manifestuje se fibrozom presađenog tkiva i aterosklerotskim promenama u krvnim sudovima, koje dovode do njihovog sužavanja. U osnovi ovih procesa je aktiviranje

citokina, oslobođenih od strane T - limfocita, koji stimulišu proliferaciju i aktivnost fibroblasta, kao i ćelija glatke muskulature krvnih sudova bubrega [4]. Status koji transplantacija danas ima može se pripisati uvođenju kalcineurinskih inhibitora (KNI) u kliničku praksu i njihovim korisnim efektima u prevenciji odbacivanja grafta. Kalcineurinski inhibitori su lekovi malog terapijskog ideksa, čiji neželjeni i toksični efekti ograničavaju uspeh transplantacije kao metode lečenja [1]. U skladu s tim, postoji stalna težnja ka uvođenju novih terapijskih strategija i tehnika, koje će doprineti poboljšanju ishoda u post-transplantacionom periodu.

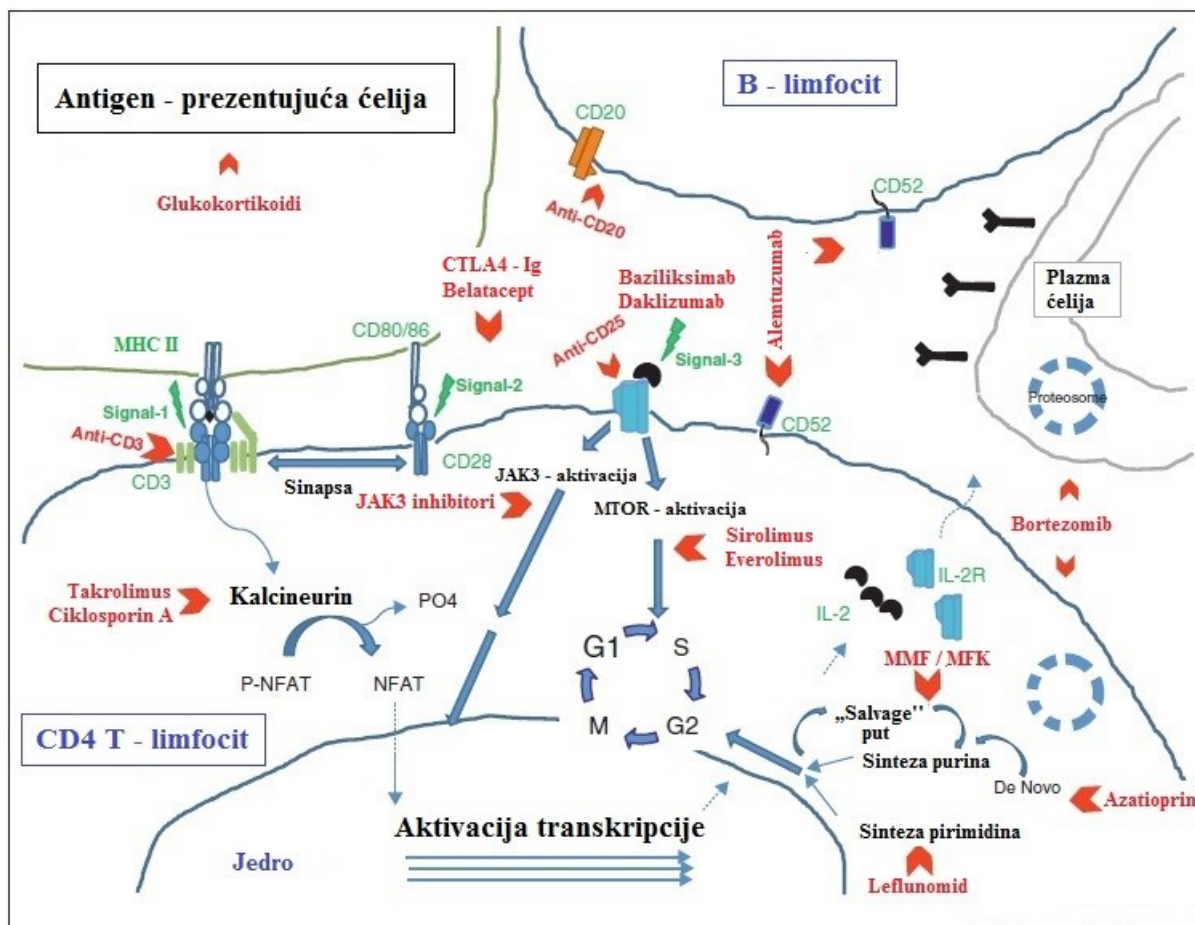
Tokom protekle dve decenije, načinjen je značajan napredak u preživljavanju presađenog organa u ranom periodu nakon transplantacije, međutim on nije bio praćen istovetnim napretkom u poboljšanju dugoročnih komplikacija. Pacijente sa transplantiranim bubregom karakteriše veća produkcija slobodnih radikala u poređenju sa opštom populacijom [5]. Povećan oksidativni stres je jedan od glavnih medijatora nepovoljnih ishoda u post-transplantacionom periodu, jer doprinosi razvoju ateroskleroze i KV morbiditeta, ali i nastanku i razvoju hronične nefropatije transplantiranog organa (CAN, prema engl: *chronic allograft nephropathy*), vodećeg uzroka gubitka grafta u kasnijim periodima nakon transplantacije bubrega [6,7].

2. Pregled literature

2.1. Imunosupresivni lekovi u kliničkoj praksi

Transplantacija bubrega omogućava predvidljivije ishode danas u poređenju sa periodom pre 20 ili 30 godina. Ovaj napredak transplantacije je omogućen kroz unapređenje tehnoloških procedura i uvođenjem novih imunosupresivnih lekova [1]. Imunosupresivni lekovi, koji se koriste u transplantaciji bubrega inhibiraju jedan ili više ključnih mehanizama u imunom odgovoru transplantiranog organa, sprečavajući njegovo odbacivanje. Eksperimentalna i klinička istraživanja su pokazala da T – limfociti predstavljaju ključne činioce koji doprinose odbacivanju transplantiranih organa. Stoga, supresija funkcije ovih ćelija predstavlja osnovu terapijske strategije [8]. Centralnu ulogu u kordinaciji imunog odgovora imaju CD4 limfociti i meta su imunosupresivnih lekova koji se koriste u kliničkoj praksi [9]. Jednu od najranijih strategija u imunosupresiji predstavljali su agensi koji su prouzrokovali neselektivno uništavanje svih T – limfocita. Međutim, dalja istraživanja i bolje razumevanje funkcije pojedinih podklasa T – limfocita omogućili su selektivnije razaranje ovih ćelija. Napredak u razjašnjenju signalnih puteva i aktivacije T – limfocita doprineo je pronalaženju novih molekularnih ciljeva imunosupresivne terapije. Naime, pored razaranja T – limfocita, postoje još 4 glavne komponente biologije T – limfocita, koje predstavljaju potencijalne ciljeve terapijskih strategija: T – limfocit receptor (TLR); takozvani ko – stimulatorni i drugi pomoćni receptori; signalni putevi u kojima učestvuju citokini; faktori koji regulišu kretanje i migraciju T – limfocita [8]. Imunosupresivni agensi mogu ometati prenos signala nakon interakcije TLR i antigen – prezentujuće ćelije i ispoljiti delovanje na nivou transmembranskog sprovođenja signala putem CD3 kompleksa (**Slika 1, Signal 1**). Osim toga, imunosupresivi mogu blokirati kostimulatorni signal, koji nastaje interakcijom CD80/86 (B7) molekula na antigen – prezentujućoj ćeliji sa CD28 molekulom na T - limfocitu (**Slika 1, Signal 2**). Ova dva signala (Signal 1 i Signal 2) aktiviraju intracelularne mehanizme koji dovode do lučenja interleukina (IL) - 2 i drugih citokina i aktiviranja IL – 2 receptora (IL -2R). Stimulacija IL -2R dovodi do aktivacije mTOR (prema engl. *mammalian*

target of rapamycin), što daje signal 3, koji pokreće proliferaciju T – limfocita, koja se takođe može inhibirati primenom imunosupresivnih lekova [9].



Slika 1. Ciljna mesta delovanja imunosupresivnih lekova (preuzeto i adaptirano iz Menon i sar. [9])

Osnovni cilj imunosupresivne terapije je sprečavanje akutnog odbacivanja u ranom periodu nakon transplantacije i obezbeđivanje dugoročnog preživljavanja transplantiranog organa. Stoga, imunosupresivni tretman pacijenata sa transplantiranim bubregom obuhvata nekoliko koraka: indukciju imunosupresivne terapije (indukciona terapija), terapiju održavanja i tretman akutnih epizoda odbacivanja. Najčešće propisivani imunosupresivni protokol uključuje kombinaciju KNI, mikofenolne kiseline (MFK) ili mikofenolat mofetila (MMF) i kortikosteroida (glukokortikoida). U ranoj fazi nakon transplantacije, indukcionoj terapiji može se dodati indukciono agens, monoklonsko antitelo protiv IL -2R ili depleciono antitelo protiv T - limfocita [10]. Terapiju održavanja najčešće čini kombinacija KNI i antiproliferativnih lekova (MMF ili MFK) sa ili bez kortikosteroida. Postoje protokoli koji u terapiji održavanja uključuju mTOR inhibitore i kostimulacione blokatore.

Uvođenje inhibitora kalcineurina – ciklosporina A (CsA), kasnih 70 godina prošlog veka, načinio je revoluciju u transplantacionoj medicini i doprineo da transplantacija bubrega bude tretman izbora kod pacijenta sa ESRD [11]. Tokom 1984. godine, otkriven je takrolimus, KNI sa potentnim imunosupresivnim osobinama, koji se do danas uspešno koristi u terapiji pacijenata sa transplantiranim bubregom, jetre, srca i pankreasa [12]. Trenutno, preko 90 % pacijenata u post-transplantacionom periodu koristi KNI, kao osnovni imunosupresivni protokol. Iako imaju slične mehanizme dejstva, čini se da je takrolimus potentniji, efikasniji i bezbedniji lek zbog čega je zamenio CsA u većini protokola [13]. Mehanizam dejstva KNI uključuje inhibiciju aktivnosti kalcineurina i time posledičnu inhibiciju transkripcije IL - 2 i drugih citokina koji promovišu aktivaciju i proliferaciju T – limfocita, pojačavajući imuni odgovor domaćina i sprečavajući akutno odbacivanje transplantiranog organa. *In vivo*, takrolimus je potentniji u suzbijanju T – limfocit zavisnog odgovora B – ćelija u proizvodnji antitela i reaktivnosti domaćina protiv transplantiranog organa (engl. *graft-vs-host reactivity*), kao i u redukciji kasnih reakcija preosetljivosti [14,15]. U poređenju sa CsA, takrolimus pokazuje manju stopu akutnih epizoda odbacivanja, uključujući i epizode kortikosteroidne rezistencije [13]. Pored toga, takrolimus je efikasniji u tretmanu akutnog odbacivanja nakon transplantacije bubrega, jetre i kostne srži, a efikasno se primenjuje i kod hroničnog odbacivanja. Zamena ciklosporina A takrolimusom može doprineti boljoj funkciji transplantiranog organa, smanjenjem prosečne vrednosti serumskog kreatinina i odsustvom akutnih epizoda odbacivanja [16].

Kortikosteroid kao sastavni deo inicijalnog imunosupresivnog protokola nakon transplantacije organa, nezaobilazan je deo savremene imunosupresivne terapije. Oni inhibiraju urođeni i stečeni imuni odgovor, blokirajući ekspresiju gena za citokine i citokinske receptore koji posreduju u funkciji antigen prezentujućih ćelija, Th – 1 (engl. *T helper - 1*) diferencijaciji i proliferaciji T – limfocita. Oni smanjuju lučenje IL - 1, IL - 2, IL - 3, IL - 6, faktora tumorske nekroze - α (TNF- α , prema engl. *tumor necrosis factor - α*) i interferona - γ (INF - γ), a time inhibiraju sve nivoe aktivacije T – limfocita [9]. Uprkos značajnom imunosupresivnom efektu pojedini savremeni imunosupresivni protokoli isključuju kortikosteroide u cilju smanjenja kumulativne imunosupresije i karakterističnih metaboličkih neželjenih efekata [17]. Studije su pokazale da obustava kortikosteroida (rano i kasno isključivanje) može smanjiti KV faktore rizika, kao što su: hiperlidemija, hipertenzija, insulin zavisni post-transplantacioni diabetes mellitus (PTDM) i gojaznost. Međutim,

isključivanje kortikosteroida iz imunosupresivnih protokola može dovesti do istovremenog povećanja stope akutnih epizoda odbacivanja [9, 18,19].

Sastavni deo većine savremenih imunosupresivnih protokola čini MMF, odnosno MFK. Mikofenolat mofetil je pro-lek, koji se nakon oralne primene i pod dejstvom esteraza, brzo i potpuno biotransformiše u MFK, njegov aktivni metabolit. Lek i njegov aktivni metabolit su antiproliferativni agensi, koji svoje efekte ostvaruju reverzibilnom inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze, ključnog enzima u *de novo* biosintezi purina, guanina, što vodi ka smanjenoj proliferaciji T i B limfocita [20]. Kombinacija MMF i KNI se primenjuje u transplantacionim centrima širom sveta u cilju smanjenja doze KNI i posledične toksičnosti ovih lekova [9]. Takođe, studije su pokazale da upotreba MMF u imunosupresivnim režimima poboljšava preživljavanje transplantiranog organa i smanjuje epizode odbacivanja [21, 22]. Mikofenolna kiselina pokazuje sličan farmakokinetički profil i terapijsku efikasnost kao MMF [23]. Mikofenolat mofetil je zamenio azatioprin (AZA), kao dominantni antimetabolitni lek, u imunosupresivnim protokolima nakon transplantacije bubrega. Rezultati multicentrične, randomizirane, kliničke studije, sprovedene 90 – tih godina prošlog veka, pokazali su značajno smanjenje stope akutnih epizoda odbacivanja u toku primene MMF u poređenju sa AZA ili placebo u kombinovanoj imunosupresivnoj terapiji [24]. Novije studije su pokazale prednost MMF u odnosu na AZA [25], međutim ima autora, koji smatraju da je njihova efikasnost uporediva daju prednost AZA s obzirom na cenu lečenja [26]. Inače, AZA je dobijen iz 6 – merkaptopurina i svoje dejstvo ostvaruje kao antimetabolit, inhibirajući sintezu purina, a time i sintezu DNK i RNK, što za posledicu ima imunosupresivno delovanje [2].

Savremeni indukcionim protokolima pored KNI, MMF/MFK i kortikosteroida uključuju primenu antitela protiv receptora IL-2, tj. nedeplecione agense, daklizumab ili baziliksimumab. Daklizumab i baziliksimumab sprečavaju proliferaciju T - limfocita i koriste se za prevenciju ranog odbacivanja alogenih transplantata bubrega. Baziliksimumab je himerno čovek/miš (75 % / 25 %) monoklonsko antitelo, dok je daklizumab humanizovano antitelo sa 90% humanih konstatnih domena imunoglobulina G1 (IgG1). Ovom genetskom modifikacijom smanjena je njihova imunogenost i promenjene su farmakokinetičke karakteristike. Baziliksimumab ima veći afinitet za receptore, a daklizumab duže poluvreme eliminacije (20 dana prema 7 dana). Baziliksimumab se primenjuje kao i.v. infuzija 2h pre transplantacije i 4. dana nakon operacije. Oni se vezuju za alfa lanac IL-2 receptora, antigen CD 25, na membrani aktiviranih T – limfocita i na taj način blokiraju prenos signala preko IL – 2R [2].

Kod imunološki visoko rizičnih bolesnika mogu se primeniti deplecioni agensi kao što su poliklonska antitela, antitimocitni globulin (ATG) i antilimfocitni globulin (ALG). Ova antitela se daju u 10 – 20 % bolesnika sa jače izraženim akutnim reakcijama odbacivanja nakon transplantacije bubrega, a ređe u indukciji transplantacije. Antitimocitni globulin se dobija imunizacijom zečjeg i konjskog seruma humanim T - limfocitima. On sadrži antitela prema humanim T - limfocitima, što za posledicu ima oslabljen imuni odgovor. Mehanizam dejstva kojima se uklanjaju T – limfociti uključuje Fc receptorom - posredovanu fagocitozu i komplementom - posredovanu lizu. Antilimfocitni globulin je sličan ATG - u, konjskog je porekla, ali nije specifičan prema T - limfocitima, već napada i B - limfocite. Glavna prepreka u primeni ovih antitela je u velikoj incidenci neželjenih efekata, prvenstveno anafilaktičkih reakcija, uključujući hipotenziju, groznicu i urtikariju, pri čemu su reakcije češće nakon primenjene prve doze [2].

OKT3 ili muromonab-CD3 je depleciono i modulirajuće monoklonsko antilimfocitno antitelo, koje se dobija hibridizacijom mišjih B – limfocita, koji proizvode antitela sa mijelomskom ćelijskom linijom, pri čemu se omogućava stalno lučenje antitela. OKT3 se vezuje za CD3 receptor T – limfocita i uzrokuje endocitozu TLR, opsonizaciju T – limfocita i odstranjivanje iz cirkulacije. On može prouzrokovati ozbiljne neželjene reakcije, koje su posledica oslobađanja citokina i aktivacije komplementa. Antilimfocitni globulin i OKT3 se primenjuju ukoliko dođe do akutnog odbacivanja, a da prethodno pulsne doze metilprednizolona (MP) nisu dale efekta [9].

Kalcineurinski inhibitori su unapredili preživljavanje transplantiranog organa i samog pacijenta u ranom periodu nakon transplantacije bubrega i time značajno smanjili učestalost epizoda akutnog odbacivanja transplantiranog organa. Međutim, oni mogu prouzrokovati neželjene efekte i razviti toksičnost koja može imati dugoročne negativne posledice po pacijenta. Primena CsA je udružena sa povišenom incidencom hipertenzije i hiperlipidemije, dok je terapija takrolimusom povezana sa povećanim rizikom od diabetes mellitusa (DM) i neurotoksičnosti [27]. Glavni dugoročni neželjeni efekat oba KNI je razvoj progresivne nefrotoksičnosti, koja može dovesti do gubitka transplantiranog organa [13,28]. U skladu s tim, postoje stalna nastojanja da se KNI zamene novim, jednako efikasnim, ali pre svega bezbednijim lekovima, među kojima je sirolimus (SRL) najčešće zastupljen u imunosupresivnim protokolima bez KNI.

Sirolimus (rapamicin) je mTOR inhibitor, mikrociklični lakton, izolovan iz *Streptomyces hygroscopicus* i predstavlja mogući alternativni imunosupresivni tretman koji

bi prevenirao nefrotoksičnost, virusne infekcije i malignitete udružene sa primenom KNI [29]. mTOR je serin/treonin kinaza, koja kontroliše ćelijski rast i metabolizam u odgovoru na hranljive sastojke, faktore rasta, energetske potrebe i stres, pri čemu ispoljava i pleiotropne efekte. Postoje 2 mTOR kompleksa, 1 i 2, pri čemu se dejstvo leka ostvaruje preko mTOR 1, ali ne i mTOR 2 kompleksa [30]. Nakon vezivanja kompleksa FKBP12 – SRL za mTOR, dolazi do njegove inhibicije, čime se posledično ostvaruje uticaj na proliferativne efekte IL – 2 prema limfocitima [31]. Ovim mehanizmom se blokira citokinima stimulirana progresija T - limfocita iz G1 u S fazu ćelijske deobe, pri čemu dolazi do inhibicije proliferacije i diferencijacije imunih ćelija [30, 32]. Međutim upotreba SRL je udružena sa izraženom učestalošću neželjenih efekata i visokom stopom odbacivanja transplantata [33].

Kako bi smanjenje ili potpuno ukidanje KNI iz terapije bilo ostvareno, istraživanja idu u smeru uvođenja novih lekova bez nefrotoksičnog potencijala. Međutim, nastojanja da se takrolimus zameni jednako efikasnim, ali manje toksičnim imunosupresivnim lekovima za sada imaju ograničen uspeh. Pored toga, rezultati studija su pokazali da je smanjenje ukupne izloženosti takrolimusa praćeno povećanjem stope odbacivanja grafta u ranom periodu nakon transplantacije bubrega [34]. Pored mikofenolat – mofetila, antiproliferativnog agensa i sirolimusa, koji su uvedeni tokom 90 – tih godina prošlog veka, poslednjih 10 godina predstavljeni su novi imunosupresivni agensi, **everolimus** – analog sirolimusa, **alemtuzumab** – anti CD52 antitelo, **vosklosporin (ISA 247)** - analog ciklosporina, **sotrastaurin** (AEB071) – inhibitor protein kinaze C (PKC), **tofacitinib** (CP-690,550) – inhibitor janus kinaze 3 (JAK - 3), **belatacept** – blokator CD28 ko-stimulacije, anti adhezioni molekuli (**efalizumab** i **alefacept**), inhibitori komplementa (**ekulizumab**), **rituksimab** - anti-CD20 monoklonsko antitelo protiv B - limfocita, **bortezomib** – inhibicija proteozoma, **FTY 720 (Fingolimod)** – agens koji sekvstrira limfocite i **ASKP1240** – anti CD-40 molekul [35]. Neki od njih se primenjuju nakon transplantacije, poput everolimusa, belatacepta i alemtuzumaba, dok se ostali nalaze u određenim fazama kliničkih ispitivanja.

Everolimus je razvijen kao semi - sintetički analog SRL sa sličnim antiproliferativnim imunosupresivnim osobinama, ali kraćim poluvremenom eliminacije i većom bioraspoloživošću u odnosu na SRL [9,35]. Međutim, još uvek nema čvrstih dokaza o njegovoj prednosti u poređenju sa takrolimusom [34].

Signalni putevi kostimulacije, koji se odvijaju naročito preko CD28/B7 (CD80 i 86), pokazali su se kritičnim za optimalnu i održivu aktivaciju „naivnih“ T - limfocita i predstavljaju važno polje istraživanja u transplantacionoj imunologiji, uzimajući u obzir

potencijalne terapijske mogućnosti. Kao kompetitivni antagonist CD 28 receptora kod vezivanja za CD80/86, najpre je uveden abatecept u terapiji reumatoidnog artritisa. To je receptor protein CTLA4-Ig, dobijen fuzijom eksternog domena humanog CTLA4 i konstantnih domena teških lanaca humanog IgG1 [36]. Belatacept je noviji CTLA4-Ig, koji se karakteriše većim afinitetom za vezivanje za CD 86 i većom potentnošću u odnosu na svog prethodnika. Belatacept je razvijen sa ciljem da se primenjuje u transplantacionoj medicini [37].

Alemtuzumab (Campath-1H®) je humanizovano monoklonsko antitelo protiv IgG1 specifičnog CD52. Krajnji efekat leka je liza ćelija ostvarena kroz antitelo - zavisano, komplementom posredovan citotoksični efekat, koji je usmeren direktno prema CD52 antigenu, prisutnom na svim mononuklearnim ćelijama krvi, poput T i B limfocita, monocita, makrofaga i eozinofila. On može prouzrokovati limfopeniju, koja može biti prisutna duže vremena nakon njegove primene. Naime, broj B - limfocita postaje normalan tokom 3 – 12 meseci, dok broj CD4+ i CD8+ limfocita ostaje smanjen do 3 godine. Pored toga, on uništava T- limfocite iz periferne krvi, tokom 7 meseci. Najslabiji efekat ispoljava na CD34+ (nezrele) hematopoetskim stem ćelijama [38,39]. Literaturni podaci pokazuju da je stopa akutnog odbacivanja značajno manja kod primene alemtuzumaba u odnosu na konvencionalnu terapiju u toku prve godine nakon transplantacije [40,41].

Voklosporin (ISA247) i sotrastaurin (AEB071) nisu odobreni za primenu u transplantaciji od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA, prema engl. *Food and Drug Administration*). Ispitivanja CP-690550 (inhibitor JAK), antiadhezionih molekula, efalizumaba i alefacepta, i FTY720 su obustavljena zbog izraženih neželjenih efekata u toku njihovih kliničkih ispitivanja [35, 42]. Ekulizumab je humano monoklonsko antitelo, specifično za C5a komponentu komplementa i trenutno je odobren za primenu u paroksizmalnoj noćnoj hemoglobinuriji. Pretklinički modeli alo-antigen senzitivizacije su pokazali da njegova primena može biti značajna za transplantaciju, pre svega kod odbacivanja koje je posredovano antitelima (AMR, prema engl. *antibody - mediated rejection*) [43,44]. Takođe, rituksimab i bortezomib su pokazali potencijal za tretman AMR [43,45,46,47].

ASKP1240 je novi imunosupresivni lek, koji predstavlja humano monoklonsko antitelo, anti CD – 40 molekul. Rezultati dobijeni tokom faze I ispitivanja su obećavajući, pri čemu se u fazi II očekuje poređenje protokola, koji uključuju ovaj lek i standardnih protokola koji se trenutno primenjuju [48].

2.2. Takrolimus-osnova savremene imunosupresivne terapije

Takrolimus (Fudžimicin; Prograf; Protopik; Anhidrovani takrolimus; Advagraf; FK 506), prvi put izolovan iz bakterijskog soja *Streptomyces tsukubaensis*, otkriven je 1984., a danas čini osnovu većine imunosupresivnih protokola u transplantaciji solidnih organa. Američka agencija za hranu i lekova odobrila je takrolimus prvi put 1994. za primenu kod transplantacije jetre. Ova dozvola je kasnije proširena na primenu kod transplantacije bubrega, srca, tankog creva, pankreasa, pluća, traheje, kože, kornee, kostne srži i ekstremiteta. On se propisuje u cilju prevencije akutnog odbacivanja transplantiranog organa. Takrolimus je u potpunosti potisnuo CsA zbog veće efikasnosti i boljeg profila neželjenih efekata. Pretpostavlja se da će takrolimus biti okosnica imunosupresivne terapije i u narednih 10 godina [2,9].

2.2.1 Mehanizam dejstva takrolimusa

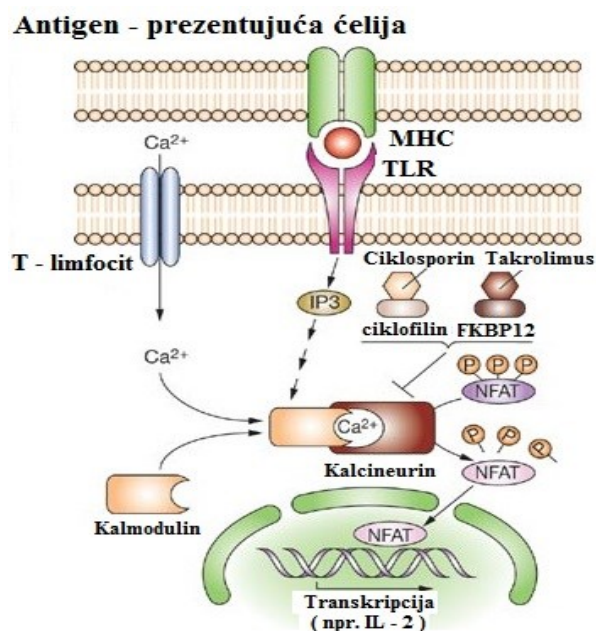
Aktivacija T – limfocita nalazi se u osnovi odbacivanja transplantiranog bubrega pri čemu je prvi korak aktiviranje TLR. Naime, TLR, koji se aktivira od strane kompleksa srodnih peptida na antigen – prezentujućoj ćeliji i glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*), vodi ka aktivaciji udruženih tirozin kinaza. Rezultat ovog procesa je mobilizacija intracelularnog kalcijuma i aktivacija intracelularnih signalnih puteva: put mitogen – aktivirane proteinske kinaze (MAPK), familiju nuklearnih faktora aktiviranih T – limfocita (NFAT) i nuklearni transkripcioni faktor - κ B (NF- κ B). Signalni put NFAT se nalazi u osnovi imunosupresivnog delovanja takrolimusa - inhibitora kalcineurina, kalcijum i kalmodulin zavisne fosfataze, koja se drugačije obeležava kao: protein fosfataza 3, PPP3C, ili ranije PP2B. Pored aktivacije TLR, proces odbacivanja uključuje i druge neophodne komponente: esencijalne kostimulatorne i pomoćne molekule, koji pojačavaju proces proliferacije T – limfocita, dovodeći do ushodne regulacije nastanka citokina i ekspresije citokinskih receptora, dok odgovor na dejstvo citokina rezultuje migracijom limfocita prema mestu zapaljenja [49].

Citokini su mali kratkodelujući proteini, koji pojačavaju i usmeravaju imuni odgovor, a produkuju ih različite ćelije uključujući limfocite, antigen – prezentujuće ćelije i parenhimske ćelije. Interleukin - 2 je najvažniji citokin, koji doprinosi proliferaciji T – limfocita, a uključen je i u proces apoptoze. Pored njega, IL -1, TNF – α i IFN - γ su pro-

inflamatorni citokini, koji su uključeni u procese ćelijske imunosti i proces odbacivanja transplantiranih organa. Antiinflamatorni citokini, gde spadaju IL-4, IL-6 i IL-10, regulišu ćelijske i humoralne odgovore i doprinose zaštiti transplantiranog organa [49, 50].

Normalno u toku aktivacije T – limfocita, najpre dolazi do fosforilacije ζ -udruženog proteina (ZAP - 70, prema engl. *zeta associated protein*), koji uzrokuje fosforilaciju fosfolipaze $C\gamma 1$, koja hidrolizuje membranski fosfatidilinozitol - 4,5 - bifosfat u inozitol - 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Inozitol - trifosfat dovodi do porasta intracelularne koncentracije kalcijuma, koji se vezuje za kalmodulin, mali kalcijum – vezujući protein, koji dalje aktivira kalcineurin. Nakon toga sledi defosforilacija NFAT proteina od strane aktiviranog kalcineurina, što vodi ka njihovoj translokaciji i indukciji NFAT posredovane transkripcije gena. NFAT se vezuje za promotor IL-2, reguliše transkripciju IL – 2, a time i aktivaciju T – limfocita. Inače, aktivnost NFAT je pored kalcineurina, regulisana kalcijumom i NFAT kinazama [51].

Takrolimus ostvaruje dejstvo vezujući se za imunofilin FKBP12 (engl. *FK – binding protein 12*) unutar ćelije, a stvoreni kompleks takrolimus – FKBP12 inhibira fosfataznu aktivnost kalcineurina, nakon čega dolazi do smanjene defosforilacije i translokacije NFAT, što vodi ka smanjenju transkripcije IL – 2, a time i posledičnom smanjenju aktivacije T – limfocita (**Slika 2**).

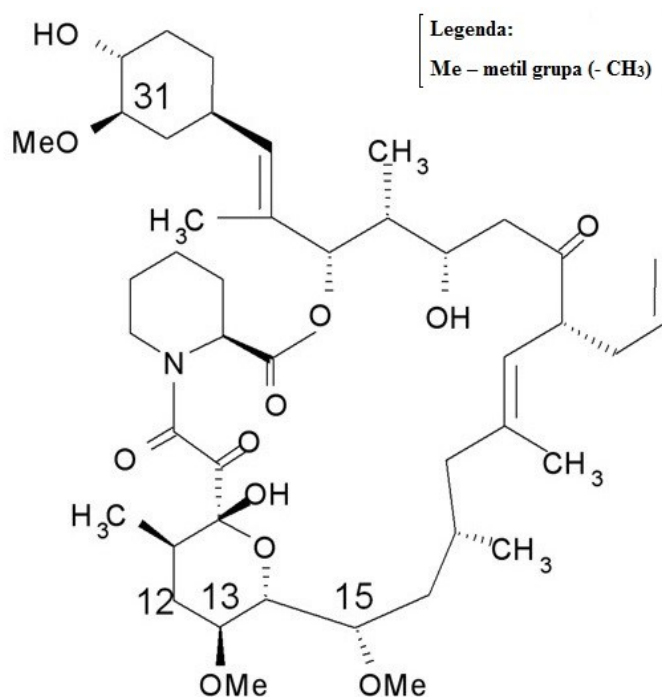


Slika 2. Mehanizam dejstva takrolimusa (preuzeto i adaptirano iz Fantini i sar. [50])

Pored inhibicije transkripcije IL – 2, KNI utiču i na ekspresiju gena za IL-4, IFN- γ i TNF- α , CD154 (CD40L) i protoonkogeni H-ras i c-myc [52]. NFAT proteini, označeni od 1 do 4, regulisani su kalcijum i kalcineurin signalizacijom, dok se NFAT5 aktivira u odgovoru na osmotski stres. Dodatno, NFAT signalni put nije odgovoran samo za imunosupresivni efekat, već može dovesti do ispoljavanja toksičnosti takrolimusa [51].

2.3. Farmakokinetičke karakteristike takrolimusa

Takrolimus je dvadesettročlani makrolidni antibiotik, molekulske formule $C_{44}H_{69}NO_{12}$, i molekulske mase 804 g / mol (ne – hidratisan oblik) (**Slika 3**). Njegove fizičko – hemijske osobine, visoka lipofilnost i nerastvorljivost u vodi, dovode do velikih varijacija u bioraspoloživosti nakon oralne primene i izraženog metabolizma leka [53].



Slika 3. Takrolimus

Takrolimus karakteriše izražena interindividualna varijabilnost u farmakokinetičkim parametrima i mali terapijski indeks leka. U skladu s tim, adekvatna primena leka u toku prvih dana i nedelja nakon transplantacije je od naročitog značaja u cilju sprečavanja akutnog odbacivanja transplantiranog organa. U cilju optimalne imunosupresije, terapijski monitoring (TDM) takrolimusa se rutinski sprovodi radi poboljšanja efikasnosti i smanjenja toksičnosti

leka. Smanjena izloženost leku, a time i smanjena imunosupresija može dovesti do imunološki posredovanog odbacivanja i posledičnog gubitka transplantiranog organa, dok prekomerna imunosupresija povećava rizik od pojave toksičnosti leka i drugih neželjenih efekata i komplikacija (PTDM, maligniteta i infekcija) [54,55]. Nemogućnost prilagođavanja doze takrolimusa za svakog pacijenta ponaosob u prva 2 – 3 dana nakon transplantacije je ključno ograničenje u primeni ovog pristupa [56,57]. Stoga je potrebno uvesti dodatne tehnike u cilju adekvatnog prilagođavanja doze leka i imunosupresije (56,58,59).

Takrolimus se najčešće primenjuje u početnoj dozi 0,15–0,3 mg/kg/dnevno. Doze održavanja se prilagođavaju na osnovu vrednosti koncentracije takrolimusa u punoj krvi, izmerenoj na kraju doznog intervala, najčešće neposredno pre primene jutarnje doze leka (C₀, C_{min}, C_{trough}). U cilju optimalne imunosupresije, C₀ treba da bude u terapijskom opsegu u zavisnosti od perioda nakon transplantacije: 10 – 12 ng/mL do kraja prvog meseca, 8 – 10 ng/mL, do kraja trećeg meseca i 6 – 8 ng/mL nakon tog perioda [60]. Nedavno se na tržištu pojavio novi preparat takrolimusa sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance iz farmaceutskog oblika, koji se primenjuje jednokratno [61].

2.3.1. Resorpcija

Takrolimus ima nizak stepen biološke raspoloživosti, koji je u proseku 25%, (5 – 93%), pri čemu maksimalne koncentracije leka u krvi (C_{max}, C_{peak}) dostižu 2 sata nakon primene leka kod većine pacijenata. Međutim, kod nekih pacijenata, lek se resorbuje sporo, vreme dostizanja maksimalne koncentracije u krvi je produženo, vreme odlaganja je izraženo (vreme nepojavljivanja, lag faza), a mogu se javiti i sekundarne „pik (engl. *peak*)” koncentracije. Smanjena bioraspoloživost takrolimusa je zapažena u toku pre – transplantacione primene, kod pacijenata sa otvorenim stomama na tankom crevu, crne i ne – kavkaske rase, sa DM i kod unosa hrane sa umerenim sadržajem masti [62].

Takrolimus je supstrat za citohrom P450 (CYP) 3A izoenzime, CYP 3A4 i CYP 3A5, ali i za P – glikoprotein (PGP), efluks pumpu, koja je proizvod ABCB1 gena (ranije MDR - 1 gen). Ovi izoenzimi i PGP su odgovorni za izražen pre - sistemski metabolizam takrolimusa, koji se odvija na nivou gastrointestinalnog trakta (GIT) i jetre [62,63]. P - glikoprotein izbacuje apsorbovani lek nazad u lumen GIT-a, smanjujući njegovu intraćelijsku koncentraciju. Inače, PGP pripada adenozin – tri fosfat - zavisnim transporterima i pokazuje značajno preklapanje u substratnoj specifičnosti, što predstavlja potencijal za interakcije

između takrolimusa i drugih lekova [64]. Varijabilna intestinalna ekspresija PGP može biti odgovorna za razlike u resorpciji leka među pacijentima [65].

2.3.2. Raspodela

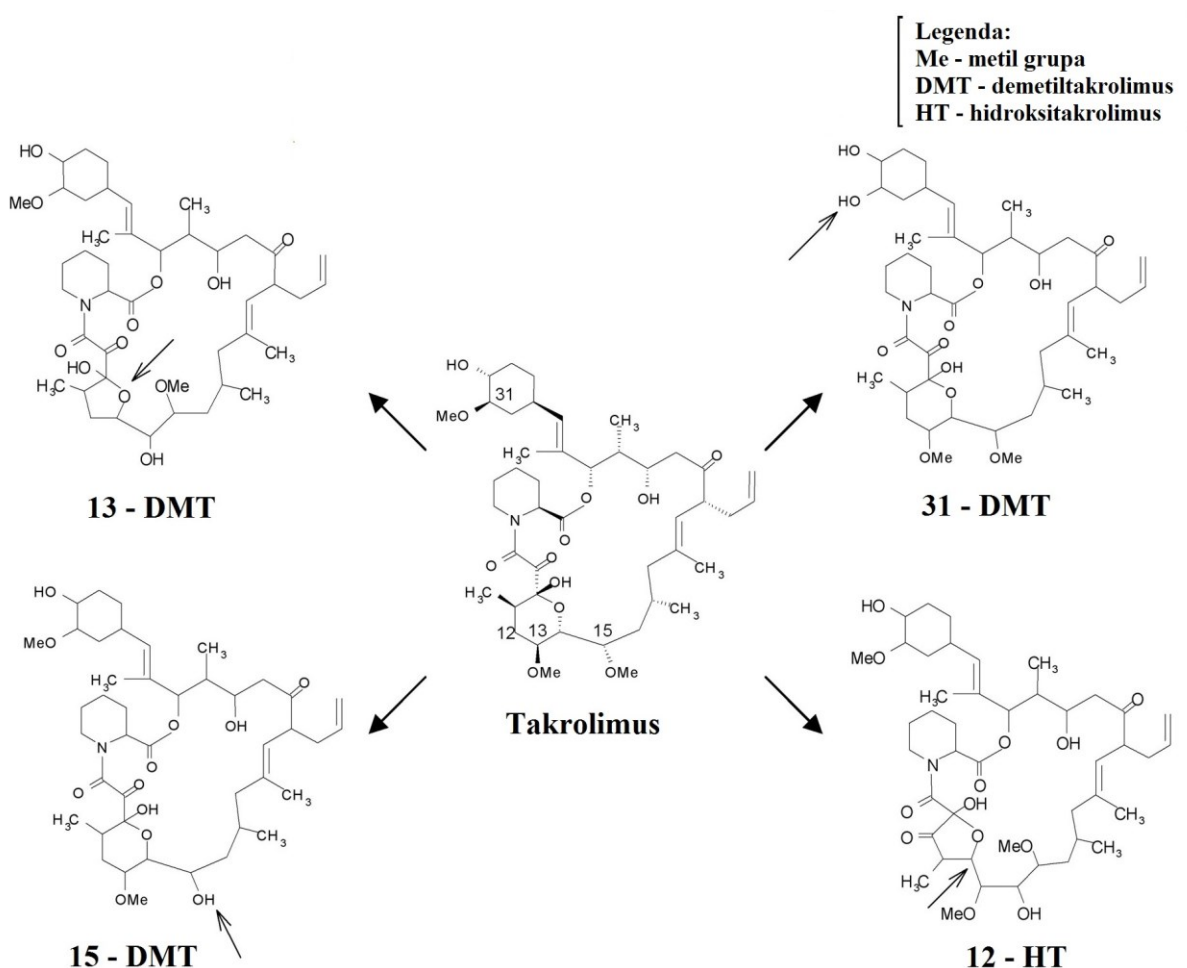
Takrolimus se značajno preuzima od strane eritrocita, koji sadrže visoke koncentracije FK – vezujućeg proteina (receptor za takrolimus), zbog čega se 15 puta (opseg 4 - 114) više koncentracije leka nalaze u punoj krvi nego u plazmi. U plazmi je takrolimus preko 90% vezan za proteine, uglavnom α_1 - kiseli glikoprotein, lipoproteine, globuline i albumin. Raspodela takrolimusa između krvi i plazme *ex vivo* je zavisna od hematokrita, koncentracije leka, temperature uzorka i koncentracije proteina plazme [63]. Pored eritrocita, takrolimus se raspodeljuje u drugim tkivima, pri čemu na njegovu raspodelu utiče ekspresija PGP. Pored GIT – a, PGP je eksprimiran na kanalikularnoj površini hepatocita, apikalnoj membrani proksimalnih i distalnih tubula, luminalnoj površini kapilarnih endotelnih ćelija u mozgu, površini limfocita, gde kontroliše pristup takrolimusa do mesta njegovog delovanja [66]. Prosečna vrednost volumena distribucije (V_d) takrolimusa je 0,9 – 1,6 L/kg, dok je kod pedijatrijskih pacijenata do 1.8 puta veći nego kod odraslih. Veći V_d takrolimusa kod dece je posledica povećane propustljivosti membrane eritrocita i smanjene količine i afiniteta proteina plazme za koje se lek vezuje. Dodatno, takrolimus prolazi placentu, a raspodeljuje se i u mleku majke [63].

2.3.3. Metabolizam i eliminacija

Takrolimus se uglavnom metaboliše u jetri preko već pomenutih CYP3A4 i CYP 3A5 izoenzima, pri čemu nastaje veći broj metabolita (do 15 metabolita). Pored jetre, metabolizam takrolimusa u GIT – u značajno doprinosi eliminaciji leka. Funkcionalni CYP 3A4 se nalazi u jetri i tankom crevu svih pojedinaca, dok se funkcionalno aktivni CYP 3A5 eksprimira samo kod nekih ljudi (ekspresori) i to u jetri, tankom crevu i bubrezima. Međutim za razliku od CsA, koji se prevashodno metaboliše preko CYP 3A4 izoenzima, CYP 3A5 ima značajniju ulogu u metabolizmu takrolimusa, kod pojedinaca koji ga ekspimiraju. Intrinzički klirens (CL) takrolimusa je 2 puta veći za CYP 3A5 nego za CYP 3A4 [53,67]. Ekspresija CYP 3A4 je varijabilna među pojedincima, pri čemu se razlike u aktivnosti kreću od 10 do 100 puta kada je reč o ekspresiji u jetri i do 30 puta kada je reč o tankom crevu. Gen za CYP 3A5 je

polimorfan, pri čemu pojedinci mogu pokazivati relativno nizak ili relativno visok nivo ekspresije, pa se stoga menja i sadržaj ovog enzima u jetri i tankom crevu (osobe koje ga eksprimiraju poseduje relativno visok sadržaj ovog izoenzima, koji se kreće od 6 do 99%, ukupnog sadržaja CYP 3A proteina u jetri) [56,67].

Svi metaboliti takrolimusa koji su identifikovani do danas pokazuju značajno manju aktivnost u odnosu na polazno jedinjenje, mada su neophodna dalja istraživanja u pogledu efikasnosti i toksičnosti metabolita takrolimusa [53]. Iz krvi transplantiranih pacijenata izolovano je 5 različitih metabolita takrolimusa i to: demetil, demetilhidroksi, didemetil, didemetilhidroksi i hidroksi – takrolimus. U toku biotransformacije nastaju 4 primarna metabolita: 3 nastala reakcijom O - demetilacije u položajima 13, 15 i 31, dok je 4 - ti nastao u reakciji hidroksilacije u položaju 12 (**Slika 4**).



Slika 4. Primarni metaboliti takrolimusa (preuzeto i adaptirano iz Dai i sar. [67])

CYP 3A5 katalizuje nastanak sva četiri metabolita, dok CYP 3A4 katalizuje reakciju O – demetilacije i nastanka demetilovanih metabolita, pri čemu ostaje nepoznanica da li se putem istog izoenzima formira hidroksil metabolit. Glavni metabolički put je nastanak metabolita M1 reakcijom demetilovanja u položaju 13 (13 – O - demetilacija) [63], dok je izlučivanje metabolita u žuč glavni put eliminacije leka (90%). Pored izlučivanja u žuči, manje od 5% takrolimusa i njegovih metabolita se eliminiše urinom, dok se takrolimus kao nepromenjen lek u procentu manjem od 1 izlučuje renalnim putem. Klirens takrolimusa je oko 0,06 L / kg sa terminalnim polu - vremenom eliminacije oko 12h (opseg 4 – 41h). Ekspresija PGP u jetri kontroliše izlučivanje leka i metabolita u žuč, dok PGP ekspresija na četkastoј membrani proksimalnih tubularnih epitelnih ćelija može doprineti bubrežnoj eliminaciji [62]. Aktivnost intestinalnog i hepatičnog CYP 3A5 se povećava odmah nakon transplantacije, da bi se na kraju prve godine transplantacije vratila na početni nivo. Ovaj efekat se objašnjava indukcijom aktivnosti metaboličkih enzima zbog primene većih doza kortikosteroida neposredno nakon transplantacije. Kasnije, tokom post-transplantacionog perioda doza kortikosteroida se smanjuje, a time i njihov uticaj na aktivnost enzima. Aktivnost PGP se ne menja u funkciji vremena nakon transplantacije [68,69].

2.3.4. Faktori koji utiču na farmakokinetiku takrolimusa

Istraživanja su pokazala da na farmakokinetičke parametre takrolimusa može uticati tip transplantacije, funkcija jetre i bubrega, lekovi (kortikosteroidi), vreme nakon transplantacije, starost pacijenata, rasa, hematokrit, albuminemija, cirkadijalni ritam, hrana, dijeta i nivo ekspresije CYP 3A i PGP [63]. Naime, klirens takrolimusa je veći kod odraslih pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na pacijente sa transplantiranom jetrom ili zdrave ispitanike. Razlog ovakvoj pojavi mogu biti niže vrednosti hematokrita i nivoa albumina kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, ali i razlike u doziranju kortikosteroida [63,70]. Pacijenti sa DM imaju manje vrednosti površine ispod C-t krive (PIK) takrolimusa u odnosu na pacijente bez šećerne bolesti, kada je lek primenjen pre - transplantaciono. Pored toga, pacijenti sa smanjenom funkcijom jetre imaju za dve trećine manji CL leka, dok stanje bubrega ne utiče značajno na farmakokinetičke parametre leka. Doza takrolimusa potrebna za održavanje njegove koncentracije, smanjuje se tokom post-transplantacionog perioda, zbog smanjenja klirensa leka tokom vremena [63]. Deca zahtevaju 2 do 4 puta veće doze leka u poređenju sa odraslim pacijentima. Za razliku od pola, koji

značajno ne utiče na farmakokinetičke parametre takrolimusa, rasa pacijenta je od velike važnosti, s obzirom da afro – amerikanci zahtevaju 2 puta veće doze kako bi održali sličnu koncentraciju leka kao pacijenti bele rase [71]. Hematokrit i nivo albumina značajno utiču na koncentraciju takrolimusa u krvi, pri čemu niže vrednosti hematokrita i koncentracije albumina, doprinose nižim koncentracijama leka. Pored toga, pokazano je da cirkadijalni ritam doprinosi većim vrednostima PIK, neznatno kraćem vremenu dostizanja C_{max} i višoj C_{max} takrolimusa nakon jutarnje doze leka [63]. Istraživanja su pokazala uticaj hrane na smanjenje biološke raspoloživosti takrolimusa [72]. Međutim, ima autora koji su pokazali da hrana nema uticaja na koncentraciju leka u krvi [73]. Doza kortikosteroida može imati uticaja na CL takrolimusa, s obzirom da su kortikosteroidi supstrati za CYP 3A i PGP, pri čemu mogu ubrzati metabolizam takrolimusa [74,75]. Između ostalih faktora koji doprinose farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa, prijavljeno je nekoliko slučajeva pacijenata sa dijarejom, gde je došlo do povećanja C_{min} leka. Genska varijabilnost, izražena u polimorfizmima prisutnim u genima za CYP 3A5 i PGP, u značajnoj meri može ispoljiti uticaj na farmakokinetiku takrolimusa [76].

2.3.5. Farmakokinetičke interakcije takrolimusa

Pacijentima sa transplantiranim bubregom se propisuje više vrsta lekova, što uslovljava i moguće interakcije među njima. Interakcije takrolimusa i drugih lekova na nivou farmakokinetičkih procesa su od posebne važnosti, jer mogu dovesti do povećanja ili smanjenja koncentracije takrolimusa u krvi, koji ima mali terapijski indeks. Prokinetici, cisaprid i metoklopramid mogu povećati resorpciju takrolimusa, dok antacidi i natrijum – bikarbonat mogu dovesti do intestinalne degradacije leka [70]. Međutim, klinički veoma značajne interakcije lekova su posledica inhibicije ili indukcije CYP3A izoenzima, čiji je takrolimus supstrat. Ketokonazol je najpotentniji inhibitor CYP 3A4/5 izoenzima. Pored njega, klinički značajne interakcije sa takrolimusom mogu ispoljiti CsA, diltiazem, eritromicin i flukonazol [53]. Takođe je pokazano da bromokriptin, klaritromicin, klotrimazol, itrakonazol, etinil-estradiol, nifedepin i nefazodon mogu inhibirati metabolizam takrolimusa. Određeni lekovi mogu indukovati metaboličke enzime i na taj način ubrzati eliminaciju takrolimusa, pri čemu se smanjuje bioraspoloživost i efikasnost leka. Između ostalih, rifampicin može indukovati metabolizam takrolimusa, pri čemu nastaje klinički značajna interakcija. Kortikosteroidi su induktori enzima u jetri, međutim određene studije su

pokazale da ne dolazi do povećanja već do smanjenja doze takrolimusa u cilju održanja optimalne koncentracije leka. Pretpostavlja se da ovom fenomenu doprinosi redukcija doze kortikosteroida u toku post-transplantacionog perioda [53,70]. Osim prethodno navedenih lekova, takrolimus može stupiti u interakciju sa omeprazolom i diureticima [77]. Takođe, mnoga istraživanja su se bavila interakcijom takrolimusa i mikofenolne kiseline, ali rezultati nisu konzistentni [78 - 81].

2.4. Polimorfizam citohrom P450 3A5 i ABCB1 gena

Istraživanja su pokazala da se različita ekspresija jetrih i intestinalnih CYP 3A5 i PGP, demografski faktori i lek – lek interakcije nalaze u osnovi interindividulne varijabilnosti u farmakokinetici takrolimusa. Genetski faktori uslovljavaju 20 – 95% varijabilnosti u dispoziciji i efektima lekova [56]. Zamene jednog nukleotida u molekulu DNK (SNP, prema engl. *single nucleotide polymorphism*) prisutne u genima enzima koji učestvuju u metabolizmu lekova, efluks pumpama i ciljnim mestima delovanja lekova, mogu biti odgovorni za njihovu različitu individulnu aktivnost i funkciju. Farmakogenetičke studije razmatraju efekte pojedinačnih gena, dok farmakogenomske studije razmatraju uticaj celokupnog genoma na farmakokinetiku i farmakodinamiku leka. Primena farmakogenetike u rutinskoj kliničkoj praksi omogućava razvoj personalizovane medicine, gde je svaki lek i/ili kombinacija lekova prilagođena genetici svakog pojedinca [76]. Inače, SNP imaju učestalost veću od 1% u opštoj populaciji i mogu biti prisutni u kodirajućim sekvencama gena, nekodirajućim regionima, ali i u regionima među genima (engl. *inter-genic region*) [76]. Razumevanje uticaja genetskih faktora na farmakokinetiku i farmakodinamiku takrolimusa omogućiće individualizaciju imunosupresivnih režima za svakog pojedinca, iniciranje početne i prilagođavanje doze održavanja leka, ali i identifikovanje pacijenata sa povećanim rizikom za suboptimalnu terapiju, ili neželjene efekte i toksičnost.

2.4.1. Citohrom P450 3A5

Citohrom P450 3A izoenzimi obuhvataju prosečno 30% ukupnog CYP sadržaja u jetri i odgovorni su za oksidativni metabolizam preko 50% lekova, koji su u upotrebi. Postoje 3 funkcionalna enzima CYP 3A: CYP 3A4, CYP 3A5 i CYP 3A7. CYP 3A7 je ekprimiran u jetri fetusa i verovatno nema ulogu kod odraslih pojedinaca. S druge strane, svi pojedinci

sintetišu funkcionalni CYP3A4, dok suprotno njemu, svaki pojedinac može biti ili funkcionalni ekspresor ili funkcionalni ne – ekspresor CYP3A5 gena. Do sada je otkriveno 11 SNP - ova u genu za CYP 3A5 [76]. Međutim najviše proučavani polimorfizam uključuje zamenu (tranziciju) adenina (A) guaninom (G) u poziciji 6986 u intronu 3 (rs776746) gena za CYP3A5. Ovaj polimorfizam, koga su otkrili Kuehl i sar. pre više od 10 godina, odgovoran je za funkcionalnu ekspresiju ili ne – ekspresiju CYP3A5 proteina, tj. za prisustvo ili odsustvo CYP3A5 aktivnosti [82]. Naime, nosioci bar jednog A alela, divljeg – tipa alela (engl. *wild-type allele*), ekspimiraju funkcionalno aktivni enzim (ekspresori) i poseduju jedan od dva genotipa: CYP3A5*1/*1, ukoliko je osoba homozigot za A alel ili CYP3A5*1/*3, ukoliko je osoba heterozigot, tj. poseduje po jedan A i G alel. Suprotno, ne – ekspresori su homozigoti za G tip alela, mutirani – tip alela (engl. *mutant – type allele*) i ne poseduju značajne količine funkcionalno aktivnog enzima i nosioci su CYP 3A5 *3/*3 genotipa [56,62,76]. CYP3A5*3 alel uzrokuje izmenjeno, odnosno alternativno iskrajanje introna ili splajsovanje (engl. *splicing*), što rezultuje skraćenom informacionom RNK (iRNK) i ozbiljnim smanjenjem količine funkcionalnog CYP3A5 proteina. Nosioci CYP3A5*1 stvaraju u većoj količini potpunu iRNK, što posledično vodi do viših nivoa CYP 3A5 funkcionalnog proteina kod ekspresora u odnosu na ne – ekspresore [82]. Učestalost CYP3A5 6986A>G polimorfizma u velikoj meri zavisi od etničke pripadnosti, tako da su 85% pojedinaca, koji pripadaju sub – Saharskom genskom poreklu (crna rasa) ekspresori, dok tek 15 % Kavkaske populacije (bela rasa) poseduju aktivni enzim. Stanovnici južnog dela Azije nalaze se između ovih dveju populacija u pogledu zastupljenosti ekspresora, otprilike 50% učestalosti [76,83]. Pored toga, CYP3A5 ekspresija je udružena sa ekspresijom CYP3AP1 pseudogena, koji je u tesnoj neravnoteži vezivanja alela (engl. *linkage disequilibrium*) sa CYP3A5*1/*3 genotipom [76]. Jedna od prvih studija koja se bavila uticajem varijabilnosti CYP 3A5 aktivnosti na farmakokinetiku takrolimusa, pokazala je da SNP (A/G(44)) u CYP3A5AP1 pseudogenu može imati efekte na aktivnost hepatične CYP3A5 [84].

Prethodna istraživanja su pokazala da A6986G polimorfizam u genu za CYP 3A5 izoenzim predstavlja najznačajniji faktor koji doprinosi farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa [76,85,86]. Skoro sve studije su pokazale da nosioci CYP3A5*1 alela (CYP3A5*1/*1 ili *1/*3 genotip) imaju i do 50% veći klirens takrolimusa i zahtevaju veće doze leka u odnosu na nosioce CYP3A5*3/*3 genotipa kako bi održali koncentraciju leka u optimalnom terapijskom opsegu (5 – 15 ng/mL) [67,76,87]. U skladu s tim, doze takrolimusa, potrebne za dostizanje iste izloženosti leka, veće su u proseku za 50% kod nosioca

CYP3A5*1 alela u poređenju sa ne – ekspresorima. Pri standardnom doziranju (normalno 0.1 mg/kg/dan podeljeno u dve doze), nosioci CYP 3A5 *1 alela mogu biti skloni subterapijskim koncentracijama leka u ranoj fazi nakon transplantacije bubrega i povećanom riziku od akutnog odbacivanja transplantiranog bubrega. Pored toga, pokazano je da CYP3A5 ekspresori zahtevaju više vremena kada je u pitanju dostizanje ciljne izloženosti takrolimusa, uprkos sprovođenju TDM [62,88]. Prethodne studije su nedvosmisleno pokazale uticaj CYP3A5 polimorfizma na farmakokinetiku takrolimusa u ranom periodu nakon transplantacije bubrega. Međutim, kada je reč o njegovom značaju u dugoročnom periodu nakon transplantacije (> 12 meseci), postoje neslaganja [76]. Većina studija nije pokazala udruženost CYP3A5 polimorfizma i kliničkih efekata takrolimusa, uključujući toksičnosti leka [89], ali ima autora koji su pokazali povezanost ispitivanog polimorfizma sa razvojem hronične nefrotoksičnosti leka [90].

2.4.2. P – glikoprotein (ABCB1, MDR - 1)

Značaj varijabilnosti u ABCB1 genu (kodira PGP) jos uvek nije u potpunosti razjašnjen kod primene takrolimusa u kliničkoj praksi [91,92]. Inače, ABCB1 gen ili MDR -1 gen je polimorfno eksprimiran, sa najmanje 50 SNP – ova poznatih do danas. Međutim za razliku od CYP 3A5, nijedan SNP ne dovodi do potpunog gubitka funkcije proteina. Polimorfizam, koji uključuje zamenu citozina(C) timinom(T) u poziciji 3435 u egzonu 26 (rs1045642) je najčešće i najviše ispitivan polimorfizam ABCB1 gena. Pored njega još dva polimorfizma ABCB1 gena su detaljno ispitivana: zamena C sa T u poziciji 1236 u egzonu 12 (rs1128503) i zamena G sa T ili A u poziciji 2677 u egozonu 21 (rs2032582) [76, 93]. Polimorfizam ABCB1 G2677T/A rezultira zamenom aminokiselinske sekvence, usled promena u kodirajućem delu gena proteina, dok to nije slučaj sa ABCB1 C3435T i C1236T polimorfizmima. Funkcionalni značaj ovih polimorfizama je kontraverzan, iako je nekoliko studija pokazalo povezanost ABCB1 3435 TT genotipa (T alel je mutirani – tip alela, C alel je divlji – tip alela kod ovog polimorfizma) i smanjene intestinalne PGP ekspresije ili aktivnosti *in vivo* [94]. Ovo znači da pacijente sa TT genotipom karakteriše neefikasno uklanjanje takrolimusa iz ćelija, što može voditi ka povećanoj resorpciji leka iz GIT – a i većim koncentracijama leka u krvi, što su neke studije potvrdile [91, 95].

Neravnoteža vezivanja alela karakteristična je za nasleđivanje odgovarajućih alela ABCB1 genskih polimorfizama. Naime, 3435T, 1236T i 2677T (mutirani – tipovi) aleli su

obično prisutni zajedno kod istog pojedinca, što implicira da su genski povezani. Haplotip ABCB1 1236T-2677T-3435T (T-T-T) je prisutan kod prosečno 32% populacije bele rase [76]. Inače, dosadašnja istraživanja su pokazala da je za farmakokinetiku takrolimusa od posebne važnosti ABCB1 3435C>T polimorfizam u čijoj osnovi je smanjenje stabilnosti i nivoa iRNK ABCB1 gena. Ovo dovodi do produženja vremena, koje je potrebno da se PGP uklopi i insertuje u membranu, pri čemu se na taj način smanjuje i supstratna specifičnost [96,97].

2.4.3. Ostali značajni polimorfizmi koji mogu doprineti farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa

CYP3A5 genotip je trenutno najači prediktor interindividulanih razlika u doziranju takrolimusa, ali on ne objašnjava sveukupnu varijabilnost u farmakokinetici leka. Pored ABCB1 polimorfizama koji su prethodno pomenuti, još nekoliko SNP je ispitivano do danas: CYP3A4*1B, CYP3A4*22, POR*28, CYP3A4*1G, polimorfizmi u NR1I2 genu, koji kodira humani pregnan X receptor (PXR), genski polimorfizmi u genu za peroksizmalni proliferativni aktivirani receptor (PPAR) – α (PPARA, prema engl. *peroxisome proliferator activated receptor alpha*), kao i genski polimorfizmi u genu za katehol – O – metiltransferazu (KOMT) [62]. Iako bi svi pomenuti polimorfizmi mogli imati uticaja na farmakokinetiku takrolimusa, jedino je polimorfizam POR*28 (rs1057868; C>T) u genu za nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) – CYP oksidoreduktazu (POR) pokazao povezanost sa farmakokinetikom leka. Nosioi POR*28 T alela imaju veće zahteve u pogledu doze takrolimusa u poređenju sa nosiocima CC genotipa. Međutim POR*28 nema uticaja na koncentraciju takrolimusa kod pacijenata koji ne eksprimiraju CYP3A5 izoenzim [98, 99].

2.5. Neželjeni efekti i toksičnost takrolimusa

Terapijski monitoring takrolimusa se rutinski sprovodi u cilju održavanja koncentracija leka u krvi u odgovarajućem opsegu, koji neće dovesti do odbacivanja transplantiranog organa, odnosno ispoljavanja neželjenih efekata i toksičnosti leka. Međutim, pojedini pacijenti mogu ispoljiti neželjene efekte takrolimusa, pri optimalnim koncentracijama leka u krvi ili može doći do odbacivanja, odnosno ne – odbacivanja organa pri koncentracijama višim, odnosno nižim od željenih. Pored toga, savremeni imunosupresivni protokoli smanjili su incidencu akutnih epizoda odbacivanja i doprineli

uspešnosti preživljavanja grafta od 90 % nakon prve godine posle transplantacije u većini transplantacionih centara. Shodno tome, identifikovanje i predviđanje individualne osetljivosti prema neželjenim efektima i toksičnosti takrolimusa je od velike važnosti za postizanje odgovarajućih dugoročnih ishoda [62]. Neželjeni efekti takrolimusa mogu uticati na kvalitet života pacijenta i na pozitivne ishode kod dugoročne primene ovog leka, dok toksičnost leka u nekim slučajevima može doprineti gubitku transplantiranog organa. Prekomerna izloženost leku udružena je sa razvojem nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti, pojavom PTDM, hipertenzije, povećanim rizikom za malignitete i infekcije [58,62]. Pored toga, takrolimus može izazvati dijareju, mučninu, povraćanje i osteopeniju. Dizatrija se javlja idiosinkratski, zahteva više faktora kako bi se ispoljila i ne povlači se smanjenjem koncentracije leka [100].

Takrolimus može prouzrokovati akutnu nefrotoksičnost i insuficijenciju transplantiranog organa usled dugoročne primene (hronična KNI nefrotoksičnost) [52]. Akutna nefrotoksičnost se ispoljava akutnom oligoanurijom ili anurijom i/ili porastom vrednosti serumskog kreatinina. Glavni mehanizmi koji doprinose nastanku akutne nefrotoksičnosti su konstrikcija aferentne arteriole i/ili direktni toksični efekat na tubule bubrega. Ovaj toksični efekat je dozno – zavisna i nastaje uglavnom u ranoj fazi nakon transplantacije, kada se propisuju velike doze leka [62]. Histološki nalazi transplantiranih bubrega koji su pretrpeli hroničnu nefrotoksičnost karakterišu se arteriolarnom hijalinizacijom, glomerularnom sklerozom, intersticijalnom fibrozom i tubularnom atrofijom (IF/TA). Mogući mehanizam koji dovodi do ovih promena je produžena arteriolarna vazokonstrikcija, posledica ishemije i nagomilavanja hijalina u zidu krvnog suda, ali i direktno tubulo - toksično i profibrotsko delovanje leka [52].

Neurotoksičnost takrolimusa se ispoljava u vidu manjih neuroloških događaja, koji uključuju nesanicu, blagi tremor, glavobolju, fotofobiju, pojavu noćnih mora, perifernu neuropatiju i promene raspoloženja. Ozbiljne komplikacije podrazumevaju epileptične napade, vizualne halucinacije, psihoze, komu i delirijum. Tremor je najčešći neurotoksični neželjeni efekat leka, koji se javlja kod 40% pacijenata. Pojava neželjenih efekata je udružena sa povećanim koncentracijama leka u punoj krvi, ali se oni mogu javiti i pri terapijskim koncentracijama leka [62,63]. Pored toga, PGP koji je eksprimiran na luminalnoj površini endotelijalnih ćelija u mozgu i važna komponenta krvno – moždane barijere, može imati značaja za ispoljavanje neurotoksičnih efekata takrolimusa, naročito kod osoba sa smanjenom aktivnošću ovog proteina [62].

Post-transplantacioni dijabetes melitus je jedan od najozbiljnijih neželjenih efekata takrolimusa. Njegova pojava je udružena sa starošću, rasom, ideksom telesne mase (BMI, prema engl. *body mass index*), infekcijom hepatitis C virusom, visokim koncentracijama takrolimusa, visokim dozama kortikosteroida, ali i genetskom predispozicijom. Ovaj efekat je kod nekih pacijenata reverzibilan [62,63].

Takrolimus može uticati na razvoj hipertenzije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom usled aktivacije natrijum hlorid kotransportera u bubregu [101]. Takođe, u patofiziologiji hipertenzije može biti uključen genski polimorfizam CYP 3A5, jer ovaj izoenzim, ukoliko je prisutan, reguliše metabolizam 6β – hidrokortizola i transport aldosterona, i na taj način promet natrijuma u bubregu [62].

Inače, upotreba takrolimusa je češće udružena sa pojavom DM, tremorom, glavoboljom, GIT tegobama, i hipomagnezijemijom u poređenju sa upotrebom CsA. Suprotno tome, upotreba CsA je češće udružena sa hirzuitizmom, hiperplazijom desni, višim nivoima LDL holesterola i triglicerida [27, 102]. Pored toga, svi imunosupresivni lekovi povećavaju rizik za pojavu infekcija i maligniteta, naročito limfoma. Tokom prve godine nakon transplantacije, prosečno 75% pacijenata ima jednu ili više infekcija [63].

2.6. Hronična nefrotoksičnost takrolimusa

Pored interindividualne varijabilnosti u farmakokinetici takrolimusa i hronična nefrotoksičnost komplikuje sprovođenje post-transplantacione imunosupresivne terapije, dovodeći do hronične nefropatije transplantiranog organa. Hronična nefropatija grafta se klinički definiše kao progresivno smanjenje bubrežne funkcije, koga može pratiti proteinurija i hipertenzija [103]. Iako postoje razlike u strukturi takrolimusa i CsA, slični su molekularni mehanizmi, koji se nalaze u osnovi nefrotoksičnih efekata, s tim da je slabiji potencijal takrolimusa, da izazove ove efekte. Kalcineurinski inhibitori mogu dovesti do akutne tubularne toksičnosti, ispoljene kroz smrt tubularnih ćelija i citoplazmatičnim vakuolizacijama. Ukoliko se funkcionalne promene otkriju rano, isključivanjem KNI iz terapije ili njihovom minimizacijom, efekti mogu biti reverzibilni. Međutim, permanentna vazokonstrikcija aferentne arteriole i posledična ishemija mogu na kraju dovesti do ireverzibilnih tubulo – intersticijalnih oštećenja i glomeruloskleroze, što zapravo predstavlja hroničnu KNI nefrotoksičnost [104]. Takrolimus i CsA ispoljavaju toksične efekte na krvnim sudovima bubrega (arteriolarna hijalinoza), na tubulama (tubularna atrofija i intersticijalna

fibroza) i glomerulima (zadebljanje i fibroza Boumanove kapsule i glomerularna fibroza). Histološke promene se obično primećuju između 3 i 12 meseci nakon transplantacije kod pacijenata na KNI protokolu, pri čemu pored arteriolarne hijalinizacije, koja je najosetljiviji marker nefrotoksičnih efekata, uključuju i prugastu kortikalnu fibrozu i tubularne mikrokalCIFIKACIJE [52].

Vaskularni efekti KNI karakterišu se depozitima hijalina u mediji aferentne arteriole. Naime, dolazi do zamene nekrotičnih glatko mišićnih ćelija hijalinskim depozitima na periferiji zida aferentne arteriole, što za krajnji efekat ima suženje lumena krvnog suda [52]. Efekti na nivou tubula (proksimalnih) se manifestuju kao tubularna atrofija i intersticijalna fibroza, a posledica su sužavanja lumena krvnih sudova bubrega. Pored toga, proces fibrogeneze indukuju KNI, uz učešće tubularnog epitela. Takrolimus povećava ekspresiju transformišućeg faktora rasta – β (TGF – β , prema engl. *transforming growth factor beta*) u epitelnim ćelijama tubula, nezavisno od hemodinamskih efekata koji su posledica kalcineurinske inhibicije [52,123]. Ushodna regulacija TGF – β ima fundamentalnu ulogu u renalnoj fibrogenezi i progresiji bubrežne bolesti [52, 104]. Inače, fibrogeneza se karakteriše produkcijom TGF – β , koji povećava sintezu i smanjuje razgradnju ekstracelularnih matriks proteina. Dodatno, TGF – β indukuje epitelijalnu mezenhimsku tranziciju (EMT), glavni mehanizam koji dovodi do intersticijalne fibroze, u čijoj osnovi je transformacija epitelnih tubularnih ćelija u ćelije sa mezenhimskim karakteristikama. Ovo uključuje razaranje morfologije epitelijalne ćelije, povećanu ekspresiju mezenhimskih markera (vimentina, fibroblast – specifičnog proteina – 1 i aktina α – glatkih mišićnih ćelija), smanjenu ekspresiju epitelnih markera (E – kadherin), gubitak adhezije među ćelijama, razaranje bazalne membrane i povećanu migraciju i invaziju ćelija [52]. Angiotenzin II (AT II) doprinosi razvoju hronične nefrotoksičnosti KNI, ispoljavajući pleotropne efekte uključujući oslobađanje aldosterona, stimulaciju tubularnog transporta, proinflamatorne i profibrotske efekte, koji su posredovani AT1 receptorima, ali indukuje sintezu TGF – β .

Oksidativni stres i formiranje slobodnih radikala doprinosi razvoju intersticijalne fibroze i tubularne atrofije, kroz proces EMT - a, apoptoze i inflamacije [104]. Pored toga, lokalna hipoksija i/ili ishemija, koje rezultuju vazokonstrikcijom krvnih sudova, dovode do renalne hipoperfuzije i formiranja slobodnih radikala [106], koji mogu dovesti do oštećenja ćelija i ćelijske smrti posredovane apoptozom. Međutim, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li takrolimus doprinosi povećanom formiranju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS prema engl. *reactive oxygen species*) i drugih slobodnih radikala [52]. Hronična upotreba

KNI može dovesti do toksičnih efekata na nivou glomerula. Kao i kod tubulo – intersticijskog oštećenja u osnovi glomerularne skleroze nalaze se promene na arteriolama i glomerularna ishemija. Pored toga, prisutno oštećenje tubula, može uzrokovati raskidanje veze između glomerula i proksimalnog tubula. Glomerul se smanjuje i pokazuje periglomerularnu, kapsularnu fibrozu [52, 107]. Takrolimus može ispoljiti efekte i na funkciju tubula, kao i na homeostazu pojedinih jona, prouzrokujući hiperkalijemiju, hipomagnezijemiju, metaboličku acidozu i hiperurikemiju [52,108]. Faktori rizika za nastanak takrolimusne nefrotoksičnosti obuhvataju sistemsku izloženost leka, uticaj farmakokinetike – farmakogenetike, lokalnu izloženost leka na nivou bubrega, starost transplantiranog organa, upotrebu NSAIL, upotrebu diuretika, genski polimorfizam određenih gena (TGF – β , ACE) [52]. Međutim, u potpunosti nije razjašnjeno u kojoj meri farmakokinetička varijabilnost takrolimusa doprinosi razvoju hronične nefrotoksičnosti [62].

Istraživanje nefrotoksičnosti, koja je izazvana primenom KNI, CsA i takrolimusom, otežano je postavljanjem tačne dijagnoze, tj. njenim razlikovanjem u odnosu na hroničnu insuficijenciju transplantiranog organa, koja može imati i druge uzroke. Histološke tehnike, koje predstavljaju zlatni standard, i opadanje bubrežne funkcije imaju ograničen dijagnostički potencijal kada je u pitanju nefrotoksičnost izazvana KNI [109]. Iznalaženje novih biomarkera, koji bi olakšali dijagnozu hronične KNI nefrotoksičnosti, omogućilo bi detaljnije ispitivanje uticaja ovih lekova i pridruženih faktora rizika, poput genske varijabilnosti.

2.7. Enzimski markeri oštećenja tubula bubrega

Ciklosporin A i takrolimus mogu dugoročno štetno delovati na funkciju transplantiranog bubrega, ispoljavajući toksične efekte na proksimalne tubularne ćelije i endotelnu funkciju [28]. Prethodne studije su pokazale da mali tubularni proteini i enzimi, mogu biti markeri oštećenja proksimalnih tubula [110,111].

Koncentracije tubularnih proteina i aktivnosti tubularnih enzima (ektoenzima) u urinu, pri fiziološkom radu bubrega, nisu visoke. Usled povećane filtracije kroz glomerule koja nadmašuje maksimum tubularne reapsorpcije ili kod oštećenja tubula dolazi do porasta njihove koncentracije i aktivnosti [112]. Određivanje aktivnosti enzima „brush border” membrane proksimalnih tubula u urinu pacijenata mogli bi predstavljati pouzdane markere tubularnog oštećenja, nastalim kao posledica primenjene imunosupresivne terapije [110,113].

N-acetil- β -D-glukozaminidaza (NAG) je lizozomalni enzim „brush border” membrane proksimalnih tubula, ima dve izoforme, A i B, i ulogu u razlaganju glikoproteina. Njegova molekulska masa iznosi 140 kDa, usled čega se normalno ne filtrira kroz glomerule. Stoga, njegovo izlučivanje u urinu može biti udruženo sa povećanom tubularnom lizozomalnom aktivnošću, povećanim oštećenjem tubula i indirektno sa povećanom proteinurijom [114]. On je jedan od najosetljivijih i najranijih markera oštećenja proksimalnih tubularnih ćelija. Ove promene u funkciji tubula mogu biti rezultat bolesti bubrega, akutne bubrežne slabosti ili delovanja nefrotoksičnih lekova. N-acetil- β -D-glukozaminidaza se koristi godinama, zbog svoje stabilnosti u urinu i specifičnosti svoje lokalizacije u proksimalnim tubulima. U skorije vreme, NAG ponovo postaje predmet istraživanja i potencijal na koji se može računati [114].

Aminopeptidaza N (EC 3.4.12.2, APN, CD13) je ektopeptidaza molekulske mase 150 kDa i velike substratne specifičnosti [110]. Ukoliko su alanin, leucin, metionin ili fenilalanin ostaci pretposlednjeg peptida, ona dovodi do kidanja aminokiseline ili oligopeptida sa N – terminalnog kraja [115]. Aminopeptidaza N ima najveću aktivnost na „brush border” membrani proksimalnih tubularnih ćelija, ali pored toga široko je distribuirana i na membranama humanih limfocita, kako onih u stanju mirovanja, tako i kod onih, koji su već stimulisani od strane odgovarajućeg antigena. Ova ektopeptidaza je predstavljena ranih 70 – ih godina prošlog veka, kao urinarni marker bubrežnog oštećenja [110,116].

Dipeptidil peptidaza IV (EC 3.4.14.5, DPP IV, CD26) je membranski vezana serin proteaza prisutna na „brush border” membranama različitih epitela, uglavnom proksimalnih tubula, žučnih puteva u jetri, acinarnih ćelija, endotelnih ćelija krvnih sudova i drugih organa uključujući slezinu, pluća i mozak. Ovaj glikoprotein, integralni tip 2, ima molekulska masu 110 kDa i oslobađa X – Pro i X-Ala dipeptide sa N – terminalnog kraja različitih polipeptida uključujući hormone, citokine, hemokine i neuropeptide [117,118]. Pored toga, DPP IV se nalazi na površini molekula T – limfocita, B – limfocita i ćelija prirodnih ubica, ali postoji i u solubilnoj formi u plazmi i serumu [118].

Gama-glutamil transferaza ili gama-glutamil transpeptidaza (γ -glutamil transferaza, GGT, EC 2.3.2.2) je prisutna u membranama mnogih tipova ćelija uključujući bubrege, žučne kanale, pankreas, slezinu, srce, mozak i semene kesice. Ovaj enzim učestvuje u mnogim procesima u kojima se vrši transfer aminokiseline, ali i u metabolizmu glutaciona, gde vrši transfer gama – glutamil grupe glutaciona na različite akceptore [119]. U cilju ispitivanja toksičnosti lekova i drugih ksenobiotika, od značaja je prisustvo ovog enzima na „brush

border” membrani proksimalnih tubula, jer usled njihovog oštećenja aktivnost ovog enzima u urinu raste [28].

2.8. Oksidativni stres i transplantacija bubrega

Transplantacija bubrega doprinela je značajnom napretku u pogledu kratkoročnih ishoda, naročito kada je reč o akutnom odbacivanju i metaboličkim poremećajim udruženim sa uremijom. Međutim, povećani oksidativni stres i njegova uloga, naročito u kasnijim periodima nakon transplantacije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni [120]. Naime, nivo oksidativnog stresa se smanjuje tokom prve nedelje nakon transplantacije i postaje manji u poređenju sa pacijentima na hemodijalizi, ali ostaje povišen tokom post-transplantacionog perioda u poređenju sa zdravim dobrovoljcima [5]. Oksidativno oštećenje nakon transplantacije bubrega može biti posledica: oksidativnog stresa udruženog sa terminalnim stadijumom HBI, imunog odgovora prema transplantiranom organu, ishemijsko – reperfuzionog oštećenja, oportunističkih infekcija i imunosupresivne terapije [120].

Ciklosporin A povećava produkciju slobodnih radikala, indirektno usled vazokonstrikcije, koja je udružena sa hipoksijom i/ili svojim direktnim delovanjem [121,122]. Međutim, u pogledu takrolimusa studije nemaju jedinstven zaključak da li on i/ili njegovi različiti režimi povećavaju ili smanjuju formiranje ROS [123, 124,125]. Takođe, poznato je da CYP 3A5 A6986G genski polimorfizam predstavlja glavnu determinantu farmakokinetičke varijabilnosti, koja uslovljava različite dnevne doze leka među pojedincima. Međutim, nije u potpunosti razjašnjeno da li ovaj polimorfizam, kao i ABCB1 C3435T genski polimorfizam u genu za PGP, imaju uticaja na oksidativni stres [62].

Oksidativni stres nema uticaja samo u ranoj fazi nakon transplantacije, već može dovesti do dugoročnih štetnih ishoda među pacijentima sa transplantiranim bubregom. Hronična nefropatija transplantiranog organa je glavni uzrok gubitka grafta u kasnijim periodima nakon transplantacije, u čijoj osnovi je narušena ravnoteža između formiranja ROS i antioksidativne zaštite organizma, što doprinosi endotelnoj disfunkciji i razvoju ateroskleroze [120, 126]. Pored toga, oksidativni stres ima značajnu ulogu kod sistemske inflamacije, hipertenzije, KV bolesti, metaboličkog sindroma i nastanku neoplazmi kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [120]. Kardiovaskularni mortalitet je vodeći uzrok smrti kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Tome pored tradicionalnih, doprinose ne - tradicionalni KV faktori rizika, pre svega povećano oksidativno oštećenje [120,127].

2.8.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni, koje karakteriše prisustvo nesparenog elektrona u njihovoj spoljnoj orbiti, što im omogućava da deluju kao oksidanti. Oni pripadaju široj grupi jedinjenja koje se nazivaju reaktivne vrste, koje u zavisnosti od vrste atoma mogu biti reaktivne vrste kiseonika (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*), azota (RNS, prema engl. *reactive nitrogen species*), ugljenika (RCS, prema engl. *reactive carbonyl species*) i sumpora (RSS, prema engl. *reactive sulfur species*). Slobodni radikali su glavna klasa reaktivnih vrsta, međutim one uključuju i ne – radikale, poput vodonik – peroksida (H_2O_2) i peroksinitrit jona ($ONOO^-$), koji nemaju nesparene elektrone, ali reaguju sličnim mehanizmom u organizmu [128]. Male količine slobodnih radikala, pre svega ROS, uključujući, hidroksil radikal, superoksid anjon radikal i vodonik – peroksid, konstantno se formiraju u aerobnim organizmima kao odgovor na unutrašnje i spoljne stimuluse (izlaganje teškim metalima, jonizaciji, UV radijaciji, pušenju, ali i lekovima i drugim ksenobioticima). U zavisnosti od koncentracije, lokalizacije i intracelularnih uslova, ROS mogu izazvati toksičnost i/ili delovati kao signalni molekuli [129]. Shodno tome, u fiziološkim uslovima, ROS su prisutni u niskim koncentracijama u mnogim biohemijskim procesima, uključujući procese ćelijskog disanja u mitohondrijama, intracelularnu signalizaciju tokom ćelijske diferencijacije i ćelijske progresije, tokom apoptoze, imunog odgovora i odbrane protiv mikroorganizama [128,130]. Međutim, tokom različitih ćelijskih procesa može doći do predominacije ROS nad ćelijskim antioksidativnim kapacitetom, što rezultira oksidativnim oštećenjem ćelijskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina, oštećenjem tkiva i organskom disfunkcijom. Povećana lipidna peroksidacija stvara epoksidge koji spontano reaguju sa nukleofilnim centrima u ćeliji i kovalentno se vezuju za DNK, RNK i proteine, vodeći ka citotoksičnosti, alergiji, mutagenosti i / ili karcinogenezi [130]. Uticaj slobodnih radikala na nezasićene masne kiseline ćelijskih membrana dovodi do kaskadnog niza reakcija procesa lipidne peroksidacije, koji remeti strukturni integritet ćelije i smanjuje kapacitet za transport i proizvodnju energije u ćeliji. Pored membrana, ciljna mesta osetljiva na lipidnu peroksidaciju su lipoproteini i molekuli koji sadrže lipide.

Kao krajnji proizvodi ovog procesa nastaju malondialdehid (MDA) i druge reaktivne supstance. Oni reaguju sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA), i daju konjugate koji se nazivaju TBA reaktivne supstance (TBARS), koji pri tom služe kao markeri oksidativnog oštećenja ćelije [123]. Prevencija lipidne peroksidacije je esencijalni proces jer njeni produkti

mogu oštetiti DNK i inhibirati proteine kao što su Na, K – ATPaza i glutamatni transporteri. Određivanjem TBARS u plazmi i eritrocitima može se proceniti nivo sistemskog oksidativnog stresa, dok njihovim određivanjem u urinu možemo pratiti oksidativni stres na nivou bubrega.

Uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP, prema engl. *advanced oxidation protein products*) su krajnji produkti oksidacije proteina i predstavljaju uremične toksine koji nastaju u prisustvu oksidativnog stresa. Nivoi AOPP su povišeni kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću i predstavljaju proteinske biomarkere oksidativnog stresa [131,132]. Pored toga, nivoi AOPP u plazmi rastu sa progresijom HBI i tesno su povezani sa krajnjim produktima glikacije (AGE, prema engl. *advanced glycation end products*). Uznapredovali produkti oksidacije proteina mogu delovati kao inflamatorni medijatori kod bolesnika sa HBI i pogoršati bubrežnu funkciju, kroz sintezu inflamatornih citokina u neutrofilima i monocitima [133].

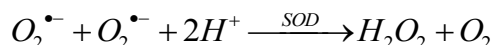
Pored AOPP, kao marker oksidativne modifikacije proteina mogu se koristiti reaktivne karbonilne grupe (RCD). One mogu biti marker oksidativnog oštećenja na nivou bubrega, ukoliko su određene u urinu pacijenata [110, 134].

Tiolna jedinjenja, kao što su glutation, cistein i homocistein (HCSH) sadrže sulfhidrilnu (SH) grupu, koja determiniše hemijske karakteristike ovih jedinjenja i omogućava njihovo uključanje u vrlo važne metaboličke puteve. Dok SH grupe glutaciona i cisteina olakšavaju neutralizaciju toksičnih komponenti i čine prirodni rezervoar antioksidativnog kapaciteta ćelije, HCSH u sebi sadrži takozvane “loše” SH grupe, koje su udružene sa kardiovaskularnim bolestima, HBI i poremećajima nervnog sistema [135,136,137]. Koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa (USH) određene u plazmi i urinu predstavljaju markere oksidativnog stresa [110].

2.8.2. Antioksidativna zaštita

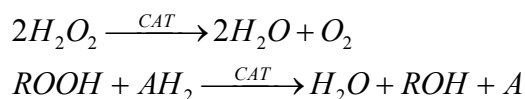
Sistem antioksidativne zaštite čine enzimi, superoksid dismutaza (SOD), katalaza (KAT), glutation peroksidaza (GPX), glutation reduktaza (GR), ali i ne – enzimske komponente, redukovani glutation (GSH), askorbinska kiselina (vitamin C), α - tokoferol (vitamin E) i β - karoten. Komponente antioksidativne zaštite svoje efekte ostvaruju kroz sprečavanje formiranja slobodnih radikala, uklanjajući postojeće slobodne radikale i reparacijom oštećenih ćelija i intracelularnih komponenti [128,130].

Superoksid dizmutaza (EC 1.15.1.1) je enzim antioksidativne zaštite koji katalizuje reakciju dizmutacije visoko – reaktivnog superoksid anjon radikala do O_2 i H_2O_2 (138).



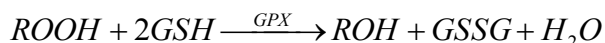
Kod ljudi postoje tri izoenzima SOD: citozolna (Cu/Zn – SOD ili SOD1), mitohondrijalna (Mn – SOD ili SOD2) i ekstracelularna SOD (EC – SOD ili SOD3). Sva tri izoenzima ispoljavaju slične funkcije, ali se razlikuju u pogledu strukture proteina, metalnom kofaktoru i lokalizaciji gena na hromozomu. Genska poređenja ukazuju da postoje sličnosti između SOD1 i SOD3 gena u pogledu podudarnosti aminokiselinske sekvence, dok se SOD2 gen razlikuje [129]. SOD1 je izoenzim sačuvana kroz evoluciju, homodimer, čije subjedinice imaju masu 32 kDa, dok je ukupna masa enzima 88 kDa. Pored toga, gen za SOD1 se nalazi 21q22 hromozomu. Enzim se nalazi intracelularno, u citoplazmi, jedru i u mitohondrijalnoj membrani. Svaka subjedinica poseduje metalni klaster, aktivni centar, sačinjen od atoma bakra i cinka, koji su spojeni histaminskim ostatkom. Jon bakra je katalitički aktivan, dok jon cinka održava stabilnost enzima. Smatra se da ova forma SOD ima glavnu ulogu u prvoj liniji antioksidativne odbrane [129,130]. SOD2 je homotetramer (96kDa) koji sadrži atom mangana u svakoj subjedinici, pri čemu dolazi do promene oksidacionog stanja od Mn (III) do Mn (II) i obrnuto za vreme dvo – stepene reakcije dizmutacije [139]. Ovaj izoenzim se nalazi u mitohondrijalnom matriksu, u velikoj meri se može indukovati i inhibirati citokinima, dok je uticaj oksidanasa na nju umeren [139,140]. Humani SOD2 gen je lokalizovan na 6q25 hromozomu i ima jedinstvenu gensku strukturu i vrlo malo sličnosti sa ostala dva izoenzima. Za razliku od SOD1 izoenzima, SOD2 je esencijalna za život [129]. SOD3, enzim mase 135 kDa, je sekretorna i tetramerna forma, glikoprotein koji sadrži bakar i cink. Kao i kod SOD1 izoenzima, jon bakra odgovoran je za katalitičku aktivnost, a jon cinka za enzimsku stabilnost. Gen za SOD3 izoenzim je lokalizovan na 4 hromozomu [129]. Ekstracelularna SOD se nalazi u intersticijalnom prostoru, ekstracelularnim tečnostima i u najvećem procentu doprinosi aktivnosti SOD u plazmi, limfi i sinovijalnoj tečnosti [130]. Osim toga, SOD3 nije indukovana od strane substrata ili drugih oksidanasa, tako da je regulacija njene ekspresije primarno kordinisana od strane citokina [141]. Mnoge studije su pokazale da genski polimorfizmi prisutni u genima za SOD enzime, a naročito u genu za SOD2 izoenzim, imaju poseban značaj za nastanak i progresiju pojedinih bolesti [129, 142,143], među kojima je i HBI [144].

Katalaza (EC 1.11.1.6) je važan antioksidativni enzim, koji vrlo efikasno razlaže vodonik – peroksid do molekularnog kiseonika i vode. Pored toga KAT, može razložiti i donore vodonika (metanol, etanol, mravlja kiselina ili fenoli):



Katalaza je tetramerni enzim, koji se sastoji od četiri identične subjedinice (60 kDa), raspoređene u obliku tetraedra i svaka subjedinica sadrži feriprotoporfirinsku grupu, (240 kDa). Ovaj detoksikacioni mehanizam štiti ćelije od vodonik – peroksida koji se formira u samim ćelijama, pri čemu on nije značajan za sve tipove ćelija pri fiziološkim uslovima. Katalaza je vrlo potentna i efikasna kada dolazi do stvaranja velike količine vodonik peroksida, kao u slučaju postignute tolerancije prema oksidativnom stresu, što predstavlja adaptivni odgovor ćelije [140]. Katalaza ima veliki značaj za transplantaciju bubrega, s obzirom na to da ovaj enzim može umanjiti oštećenje tubularnih ćelija izazvano CsA [52].

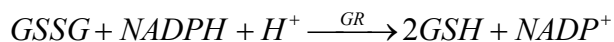
Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.19), enzim molekulske mase 80 kDa, sadrži pojedinačni selenocistein ostatak u svakoj subjedinici, što je ključno za njegovu enzimsku aktivnost. Ova peroksidaza vrši redukciju hidroperoksida pomoću GSH i na taj način štiti ćelija sisara od oksidativnog oštećenja.



Kod sisara je pronađeno 5 različitih izoenzima GPX, čija aktivnost varira zavisno od vrste tkiva, iako je ekspresija svih izoformi prisutna u svim tkivima. GPX1 – 3 su tetrameri, tj. sadrže 4 identične subjedinice, dok je GPX4 monomer. Citozolna i mitohondrijalna GPX1 i fosfolipidhidroperoksid GPX (GPX4) se nalaze u većini tkiva, za razliku do citozolne GPX2 i ekstracelularne GPX3, koje su značajno prisutne u jetri, GIT – u (GPX2) i bubrezima (GPX3). Osim toga, GPX4 je visoko eksprimirana u epitelnim ćelijama bubrega i u testisima. Skoro otkrivena, GPX5 je specifično eksprimirana u mišjem epididimisu i selen je nezavisna [155]. GPX1 je dominantno prisutna u eritrocitima, bubrezima i jetri, smanjujući hidroperokside masnih kiselina i vodonik – peroksid na račun GSH. Za razliku od KAT, GPX je glavna zaštita kada je nivo vodonik – peroksida i oksidativnog stresa nizak. Zapravo, GPX ima manju Km vrednost za vodonik - peroksid u odnosu na KAT što omogućava njeno veće uključivanje u procese detoksikacije ćelija. Glutation peroksidaza podleže oksidativnoj modifikaciji i inaktivaciji posebno u prisustvu H₂O₂, koji preuzima ulogu suicidalnog substrata, dok redukujući agensi štite enzim od inaktivacije [130]. Kao, i SOD, mnogo studije

su se bavile značajem aktivnosti GPX1 i polimorfizama GPX1 gena kod različitih bolesti, među kojima su HBI, ali i PTDM [144,145].

Glutation reduktaza (EC 1.6.4.2.) je NADPH zavisan flavoenzim, koji omogućava prevođenje oksidovane forme glutaciona u redukovanu:



Enzim je homodimer, sastoji se od dve identične subjedinice (110 kDa), koje sadrže flavin adenin dinukleotid (FAD) mesto za vezivanje. Flavinsko adenin dinukleotid izoaloksazinski prsten odvajala različita mesta za vezivanje supstrata, tj. za NADPH i GSSG. U toku reakcije između enzima i oksidovanog glutaciona, najpre dolazi do redukcije enzima sa NADPH, a zatim do reoksidacije enzima sa GSSG. Pored uloge u održanju glutaciona u redukovanom stanju, GR može biti uključena i u redoks cikluse u kojima se u prisustvu aromatičnih nitro - jedinjenja mogu stvoriti superoksid anjon i vodonik – peroksid [146].

Glutation (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicin) je neproteinsko tiolno jedinjenje koje se nalazi u svim ćelijama aerobnih organizama. S obzirom da se njegova koncentracija kreće između 0,5 i 10 mmola, u zavisnosti od tipa ćelije, svrstava se u red najzastupljenijih tiolskih jedinjenja i endogenih antioksidanasa. Sulfhidrilna grupa cisteina obezbeđuje redukujuća svojstva GSH, tj. ona donira jedan elektron drugim molekulima. Usled toga, GSH postaje nestabilan i visoko reaktivan, te dolazi do vezivanja dva molekula GSH i stvaranja oksidovane forme, GSSG, koja je elektrostabilnija [147]. Jetra, bubrezi i tanko crevo su najvažniji organi koji učestvuju u preraspodeli GSH. Jetra predstavlja izvor GSH i za druga periferna tkiva, dok se u bubregu vrši degradacija glutaciona jer se pri jednom prolasku kroz bubrege ekstrahuje više od 80% GSH. U enterocitima, GSH uklanja egzogene ksenobiotike. Eritrociti predstavljaju transportni sistem za glutacion i njegove konjugate u kojima se GSH nalazi u nekoliko oblika, redukovanom, oksidovanom, disulfidnom obliku, koji nastaje u reakciji GSH i proteina ili neproteinskih tiolnih jedinjenja, dok četvrti oblik čine glutacion S konjugati. Glutation ima mnoštvo uloga: depoi je cisteina, učestvuje u sintezi eikosanoida, u sintezi nukleinskih kiselina, održavanju integriteta ćelijskih membrane, redukciji i izomerizaciji disulfidnih veza, uloga koenzima, održavanje redoks puferskog sistema ćelije, održavanje esencijalnog tiolskog statusa, modulacija ćelijske proliferacije, detoksikaciona uloga i antioksidativna uloga [147,148]. Njegova antioksidativna uloga odnosi se na sposobnost redukcije endogeno produkovanog vodonik – peroksida u prisustvu selen zavisne GPX, pri čemu se on oksidiše u GSSG, da bi potom uz pomoć enzima GR došlo do njegove redukcije, uz utrošak NADPH [148]. Merenjem koncentracije GSH u punoj krvi smatra se

esencijalnim indeksom statusa GSH u celom organizmu i predstavlja koristan marker stepena oksidativnog oštećenja kod različitih bolesti kod čoveka. U krvi mnogih pacijenata sa različitim oboljenjima nađene su niske vrednosti GSH i visok odnos GSSG / GSH [149]. U skladu s tim, dostupnost GSH u redukovanoj formi može biti ključni faktor očuvanja zdravlja.

2.8.3. Polimorfizam gena za mangan zavisnu superoksid dizmutazu (Ala -9 Val)

Poseban značaj za nastanak i / ili progresiju mnogih oboljenja imaju mutacije u genima koji kodiraju enzime antioksidativne zaštite. Mangan – zavisna SOD je prisutna u mitohondrijama i veoma je važna zbog činjenice da su mitohondrije glavno mesto produkcije ROS za vreme normalnog ćelijskog metabolizma. Prema tome, veliki broj studija je posvećen ispitivanju polimorfizama prisutnim u genu za SOD2 [144]. Jedan od najznačajnijih i najviše ispitivanih SNP je Ala -9 Val ili Ala16Val (rs4880) u egzonu 2, a karakteriše ga zamena C > T na poziciji 2734, što vodi zameni aminokiseline alanina (Ala, GCT) s valinom (Val, GTT) u poziciji 16, što predstavlja 9 aminokiselinu ushodno od mesta kidanja signalne sekvence. Naime, Ala – tip signalnog peptida ima alfa – helikoidnu strukturu, što je uobičajena konformacije za mitohondrijalne signalne peptide, koji imaju ulogu vodilje, dok Val – tip ima konformaciju beta – ploče sa početkom u poziciji 16. [150]. Ova promena konformacije vodi ka tome da se Val – forma manje efikasno transportuje u mitohondrije, jer se signalna sekvenca slabo prepoznaje od strane receptora na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani, što rezultuje pogrešnom usmerenju unutar ćelije, neefikasnom razlaganju signalne sekvence i samim tim smanjenju aktivnosti SOD2 u mitohondrijama. Bazalni nivo aktivnosti SOD2 najveći je kod Ala / Ala genotipa, zatim Ala / Val i na kraju Val / Val [143]. U ovakvoj raspodeli aktivnosti enzima, znači da nosioci Val/Val genotipa imaju nižu zaštitu od oksidativnog stresa u poređenju sa drugim genotipovima. Veliki broj studija je ispitivao povezanost navedenog polimorfizma i raznih bolesti, među kojima su karcinom dojke, karcinom prostate, DM, kardiovaskularne bolesti, bolesti jetre, neurološke i mentalne bolesti [144]. Pored toga progresija bubrežne bolesti izraženija je kod pacijenata sa Ala / Val i Val / Val genotipom u poređenju sa Ala / Ala genotipom, iako pomenuti polimorfizam nije udružen sa nastankom HBI [151].

2.8.4. Polimorfizam gena za glutathion peroksidazu 1 (Pro200Leu)

Glutathion peroksidaza 1 je citozolni enzim, koji se nalazi u svim tkivima, najviše u eritrocitima, bubrezima i jetri [130]. Gen za GPX1 ima 4 SNP – a, međutim samo je ispitivan Pro200Leu (rs1050450) i njegova povezanost sa različitim bolestima. Ovaj SNP uključuje 599C>T zamenu, koja vodi ka supstituciji prolina (Pro) leucinom (Leu) u poziciji 200 (mada u zavisnosti od baze genoma koja se koristi, položaj može biti i 197 ili 198, pa se ispitivani polimorfizam može označiti Pro197Leu ili Pro198Leu). Pomenuti polimorfizam se nalazi u egzonu 2 gena za GPX1, i manifestuje se u smanjenoj transkripciji gena i posledično smanjenoj aktivnosti enzima [152]. Značaj ovog polimorfizma ispitivan je kod karcinoma dojke i DM [144]. Takođe, Leu / Leu genotip ispitivanog polimorfizma udružen je sa smanjenom bubrežnom funkcijom kod pacijenata sa HBI, ali ne i sa progresijom bolesti [151].

Ispitivanje polimorfizama gena enzima antioksidativne zaštite dodatno objašnjava ulogu oksidativnog stresa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Pored toga, omogućava razjašnjenje genske osnove pojedinih ishoda, koji su udruženi s povećanom produkcijom ROS, među kojima je i propadanje funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije. Pored toga, ispitivani polimorfizmi mogu biti potencijalni prediktori nepovoljnih ishoda nakon transplantacije i na taj način moguća je identifikacije rizičnih pacijenata i primena odgovarajućeg terapijskog pristupa.

2.9. Uloga azot monoksida i dimetilarginina kod bubrežnih bolesti

Endotel ima ključnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa i strukture, pri čemu azot monoksid (NO) predstavlja glavni endotelni vazoaktivni medijator, koji nastaje iz L – arginina, putem azot oksid sintaze (NOS). On je uključen u veliki broj regulatornih mehanizama u kardiovaskularnom sistemu, među kojima su endotel zavisna vazodilatacija, inhibicija proliferacije glatkih mišićnih ćelija, inhibicija adhezije i agregacije trombocita, inhibicija adhezije monocita, ali predstavlja i endogeni aterosklerotski molekul [153]. Asimetrični dimetilargin (ADMA) i simetrični dimetilarginin (SDMA), koji nastaju proteolitičkom degradacijom proteina sa metilargininskim ostacima, mogu smanjiti raspoloživost NO. Asimetrični dimetilarginin je inhibitor NOS i na taj način može umanjiti vaskularnu produkciju NO, dok SDMA smanjuje bioraspoloživost NO, jer se kompetitivno

vezuje za L – arginin celularni transporter [153,154,155]. Dodatno slobodni radikali, naročito superoksid anjon radikal, inaktiviraju NO i smanjuju njegovu bioraspoloživost i formirajući peroksinitrit radikal. Smanjenje bioraspoloživosti NO, vodi ka endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi, koja se nalazi u osnovi KV morbiditeta, vodećeg uzroka smrti pacijenata na hemodijalizi i sa transplantiranim bubregom [120, 153]. Pored toga, aterosklerotske lezije uobičajena su histološka karakteristika CAN [120]. Asimetrični dimetilarginin se uglavnom eliminiše biotransformacijom putem dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (DDAH) u bubregu i jetri, dok se SDMA isključivo izlučuje putem bubrega [156]. Ispitivanje dimetilarginina može biti značajno kod pacijenata sa trasplantiranim bubregom, na osnovu rezultata prethodnih studija, koje su pokazale da je ADMA prediktor KV mortaliteta kod pacijenata sa bubrežnom bolesti [157,158,159]. Za razliku od ADMA, SDMA predstavlja marker GFR, čije vrednosti dobro koreliraju sa slabošću bubrega i nespecifični je indikator akumulacije uremijskih toksina [167, 156].

3. Ciljevi istraživanja

Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da polimorfizmi u genu za CYP 3A5 i P – glikoprotein mogu imati uticaja na farmakokinetiku takrolimusa. Pokazano je da oksidativni stres predstavlja jedan od glavnih patofizioloških mehanizama, koji se nalazi u osnovi komplikacija nakon transplantacije bubrega. Polimorfizmi prisutni u genima enzima antioksidativne zaštite, koji smanjuju njihovu aktivnost, mogu doprineti povećanom oksidativnom stresu pacijenata sa transplantiranim bubregom. U skladu s tim, definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati učestalost polimorfizama, A6986G na genu za citohrom P450 3A5, C3435T na ABCB1 genu, Ala -9 Val na genu za Mn – zavisnu superoksid dizmutazu (SOD2) i Pro200Leu na genu za glutathion peroksidazu 1 (GPX1) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.
2. Ispitati uticaj genskih polimorfizama citohrom P450 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u različitim periodima nakon transplantacije bubrega
3. Odrediti vrednosti parametara oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, koncentraciju dimetilarginina u plazmi i aktivnost enzima markera tubulskog oštećenja u urinu kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i kod zdravih ispitanika.
4. Ispitati međusobnu povezanost ispitivanih parametara oksidativnog stresa, enzima markera oštećenja tubula i parametara funkcije bubrega u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.
5. Ispitati povezanost ispitivanih parametara oksidativnog stresa, enzima markera oštećenja tubula i parametara funkcije bubrega sa doznim režimom takrolimusa, citohrom P450 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskim polimorfizmima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.
6. Ispitati uticaj SOD2 Ala -9 Val i GPX1 Pro200Leu genskih polimorfizama na parametre oksidativnog stresa i funkcije bubrega kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

4. Pacijenti i metode istraživanja

4.1. Pacijenti

Istraživanje je sprovedeno u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučno - istraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu. Istraživanje je sprovedeno u periodu od januara 2012. do decembra 2013 godine, na materijalu dobijenom od pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika (kontrolne grupe). Ispitivani pacijenti sa transplantiranim bubregom su redovne kontrole i lečenje sprovodili na Klinici za nefrologiju. Zdravi dobrovoljci se nisu bitno razlikovali u odnosu na transplantirane pacijente u pogledu starosti i polne strukture. Istraživanje je odobreno do strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (rešenje broj: 01 – 10204 – 13). Istraživanje je obuhvatalo ukupno 95 pacijenata sa transplantiranim bubregom, 63 muškog i 32 pacijenta ženskog pola, prosečne starosti 43 ± 11 godina. Od ukupnog broja pacijenata koji su učestvovali u istraživanju, 72 je kao osnov imunosupresivne terapije primalo takrolimus, 15 pacijenata je koristilo CsA, 6 je koristilo SRL, dok su dva pacijenta u okviru imunosupresivnog protokola bili na monoterapiji prednizonom (PRE) i AZA. U zavisnosti od vrste i ciljeva svakog pojedinačnog ispitivanja razlikovao se broj ispitanika koji su u njemu učestvovali. U određivanju CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama učestvovao je 91 pacijent i 106 zdravih ispitanika, u ispitivanju SOD2 Ala -9 Val polimorfizma, 95 pacijenata i 96 zdravih ispitanika i u ispitivanju GPX1 Pro200Leu polimorfizma 85 pacijenata i 110 zdravih ispitanika. Takođe, u istraživanjima koja su podrazumevala farmakogenetička ispitivanja, ispitivanja parametara oksidativnog stresa i markera oštećenja tubula, uključeni su samo pacijenti na terapiji takrolimusom. Ostali pacijenti su bili isključeni iz daljeg toka istraživanja. Pored toga, zadati isključujući kriterijumi dodatno su ograničavali broj pacijenata koji je učestvovao u određenoj vrsti ispitivanja. U skladu s tim, pacijenti sa znacima hroničnog odbacivanja grafta, sa pridruženom bolešću ili stanjem, koje može da interferira sa određenim tipom ispitivanja, pacijenti na terapiji lekovima koji stupaju u klinički značajne interakcije sa takrolimusom poput ketokonazola, flukonazola, diltiazema, eritromicina, rifampicina nisu bili uključeni u istraživanje. Od 72 pacijenta, koji su lečeni

takrolimusom, 48 su bili muškarci. Osim toga, živa srodnička transplantacija (ŽST) je bila zastupljena u 78% slučajeva, dok je 22% pacijenata bilo podvrgnuto kadaveričnoj transplantaciji bubrega (KT). U trenutku kada su uključeni u istraživanje, starost pacijenata na takrolimus baziranoj imunosupresiji bila je 41 ± 11 godina, dok je vreme proteklo od transplantacije bubrega bilo u proseku 3 godine (1 – 12 godina). Hronični glomerulonefritis je u najvećem broju slučajeva bio osnovna bubrežna bolest koja je dovela do terminalne faze HBI. Kada su u pitanju komorbiditeti, većina pacijenata je imala arterijsku hipertenziju, koja je bila regulisana lekovima, dok je 16 pacijenata imalo DM (11 DM tipa 1). Virus hepatitisa B je bio dijagnostikovao kod 3 pacijenta, koji su bili uključeni u istraživanje. Od ukupnog broja ispitanika, 16 su bili pušači.

4.1.1. Imunosupresivni protokol kod pacijenata na takrolimusu

Pacijentima je propisivan četvorostruki imunosupresivni protokol nakon operacije transplantacije bubrega. On je pored takrolimusa (Prograf®, Astellas, Irska) uključivao: intravenski aplikovan metilprednizolon (MP) u početnoj dozi od 0,5 g / dan, koji je nakon 2 ili 3 dana zamenjen PRE, u inicijalnoj dozi od 1 mg / kg / dan, zatim MMF u dozi od 1,5 g / dan ili MFK u dozi 1080 mg / dan per os i 20 mg monoklonsko antitelo, baziliksimumab, koji je primenjen prvog i četvrtog dana nakon transplantacije. Takrolimus, je inicijalno primenjen petog dana nakon transplantacije, u početnoj dozi 0,1 mg / kg / dan, podeljeno u dve doze. Nakon toga, takrolimus je primenjivan dva puta dnevno (u 08:00 h i 20:00 h), a doza je bila prilagođena prema koncentraciji leka u krvi, izmerenoj neposredno pre primene jutarnje doze leka (C_{min} , C_0). Cilj primene TDM – a je bio održanje C_0 koncentracije takrolimusa u prihvatljivom terapijskom opsegu u zavisnosti od perioda nakon transplantacije: 10 – 12 ng/mL do kraja prvog meseca, 8 – 10 ng/mL, do kraja trećeg meseca i 6 – 8 ng/mL nakon tog perioda.

Pored lekova koji su činili standardni imunosupresivni protokol, pacijenti su dobijali dodatno kardiološku terapiju, uglavnom lekove za kontrolu krvnog pritiska i zaštitu sluznice GIT –a (omeprazol, pantoprazol ili ranitidin). Beta blokatori su bili najčešće propisivana grupa lekova za kontrolu krvnog pritiska: bisoprolol u dnevnoj dozi 2,5 mg (1,25 – 10 mg), karvedilol u dnevnoj dozi 12,5 mg (6,25 – 25 mg) i metoprolol u dnevnoj dozi od 100 mg (50 – 100 mg), zatim blokatori kalcijumovih kanala, amlodipin u dnevnoj dozi od 10 mg (5 – 15 mg), kao i nifedipin u dnevnoj dozi 40 mg (30 – 60 mg). Nifedipin je najčešće primenjivan po potrebi od strane pacijenta, kada uspostavljenom terapijom, kontrola krvnog pritiska nije bila

zadovoljavajuće regulisana. Takođe, manjem broju pacijenta su bili propisani ACE inhibitor, enalapril u dnevnoj dozi od 20 mg i metildopa u dnevnoj dozi od 750 mg. Antihipertenzivni lekovi su primenjivani u monoterapiji ili u kombinaciji dva ili više leka. Pacijenti sa DM tipa 1 i DM tipa 2, koji je bio sekundarno insulin – zavisna, primenjivali su insulin po šemi, dok su pacijenti sa DM tipa 2 dodatno imali propisane oralne hipoglikemike. Pacijenti sa virusom hepatitis B dobijali su lamivudin.

4.1.2. Materijal pacijenata i zdravih ispitanika

U istraživanju su korišćeni plazma, serum, eritrociti, DNK i urin pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Plazma, serum, eritrociti i DNK izolovane su iz uzoraka krvi koja je korišćena za rutinske kontrole pacijenata na Klinici. Zdravi dobrovoljci davali su krv u zakazanom terminu. Krv je uzimana u epruvetama (3 mL) sa EDTA kao antikoagulansom i u epruvetama (9 mL) bez antikoagulansa. Iz svih pojedinačnih uzoraka pune krvi, odvojeno je 200 µL pune krvi koja je korišćena za izolaciju DNK i 150 µL pune krvi koja je korišćena za određivanje glutaciona. DNK je izolovana uz pomoć komercijalnog kita za izolaciju DNK (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga, uzorak krvi je centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti (rpm), nakon čega je izdvojena i zamrznuta plazma na -80°C. Nakon izdvajanje plazme, ostatak krvi je korišćen za izdvajanje eritrocita. Epruvete sa krvlju bez antikoagulansa korišćene su za dobijanje seruma. Urin, 24 – časovni, koji pacijenti donose prilikom redovnih laboratorijskih kontrola, korišćen je u svrhu istraživanja, a zdravi ispitanici su donosili urin u zakazanom terminu.

4.1.3. Farmakokinetički podaci

Farmakokinetički podaci korišćeni u svrhu istraživanja bili su dnevna doza takrolimusa, podeljena sa telesnom težinom pacijenta, koncentracija takrolimusa u punoj krvi izmerena neposredno pred primenu jutarnje doze leka (C₀) i odnos koncentracije C₀ i dnevne doze leka (C₀/D), koji predstavlja indeks bioraspoloživosti leka. Vrednost dnevne doze leka, dobijena je iz otpusnih listi pacijenata ili u direktnom razgovoru sa pacijentima, dok je C₀ bila izmerena u punoj krvi pomoću metode u čijoj je osnovi hemiluminiscentno imunoodređivanje na mikročesticama (CMIA, prema engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*) po uputstvu proizvođača (Architect, Abbott, Abbott Park, IL, USA). Vrednost C₀/D izračunavana je deljenjem C₀ (ng / mL) sa dozom leka (mg/kg/dan).

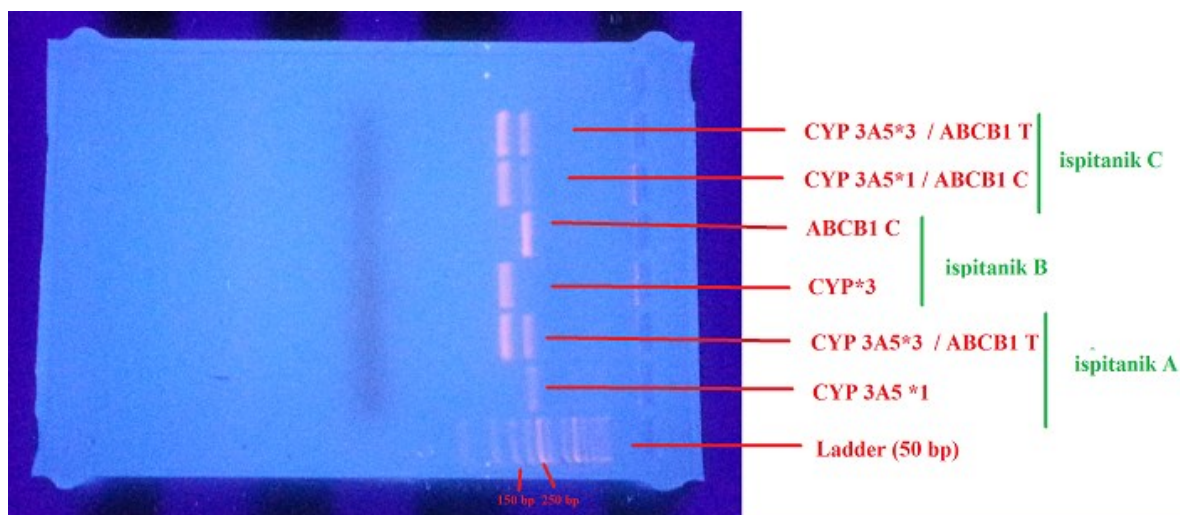
4.2. Metode

Sprovedeno istraživanje obuhvatilo je određivanje polimorfizama metodom analize dužine restrikcionih fragmenata DNK nakon PCR umnožavanja (PCR-RFLP, prema engl. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*) i alel – specifičnom PCR metodom na uzorcima DNK dobijenim od strane pacijenata i zdravih ispitanika. Pored, određivanja polimorfizama, određivani su parametri oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, plazma koncentracije dimetilarginina, markeri tubulskog oštećenja u urinu i parametri bubrežne funkcije. U plazmi su određivani sledeći parametri oksidativnog stresa: koncentracija TBARS, AOPP, USH, aktivnost KAT i SOD. Takođe, u plazmi je određivana koncentracija dimetilarginina, tj. ADMA i SDMA. U eritrocitima je merena koncentracija TBARS, aktivnost SOD, GPX i GR, a u urinu: koncentracija TBARS, USH i RCD. U urinu su određivane aktivnosti enzimskih markera tubulskog oštećenja, NAG, APN, DPP IV i GGT. Glutation je određivan u punoj krvi. Pacijentima i zdravim ispitanicima određivani su hematološki parametri: broj eritrocita (Er), leukocita (Le) i trombocita (Tr) i koncentracija hemoglobina (HGB); biohemijski parametri: koncentracija glukoze (GLU), ukupnog holesterola (HOL), LDL holesterola (LDL hol), HDL holesterola (HDL hol), triglicerida (TG), albumina (ALB), ukupnih proteina (UP), uree (URE), kreatinina (KRE), aktivnost enzima aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT) i GGT, u serumu i koncentracija kreatinina u urinu. Određivanje hematoloških i biohemijskih parametara vršeno je standardnim metodama u Biohemijskoj laboratoriji na Klinici za Nefrologiju. Analize hematoloških parametara su vršene na aparatu NINHON KOHDEN CELLTAC MEK - 6318K (NINHON KOHDEN CORPORATION, Tokijo, Japan), dok su biohemijske analize vršene na automatskom analizatoru ERBA XL – 600 (ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Pored toga, ispitanicima su izmerene aktivnosti NAG, APN i DPP IV u serumu. Glomerularna filtracija je procenjena (eGFR, prema engl. *estimated glomerular filtration rate*) na osnovu MDRD formule [160]:

$$\text{eGFR (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 32788 \times (\text{KRE u } \mu\text{mol / L})^{-1,154} \times (\text{Starost u godinama})^{-0,203} \times \\ (0,742 \text{ za žene}) \times (1,212 \text{ za ispitanike crne rase})$$

4.2.1. Metoda detekcije CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama

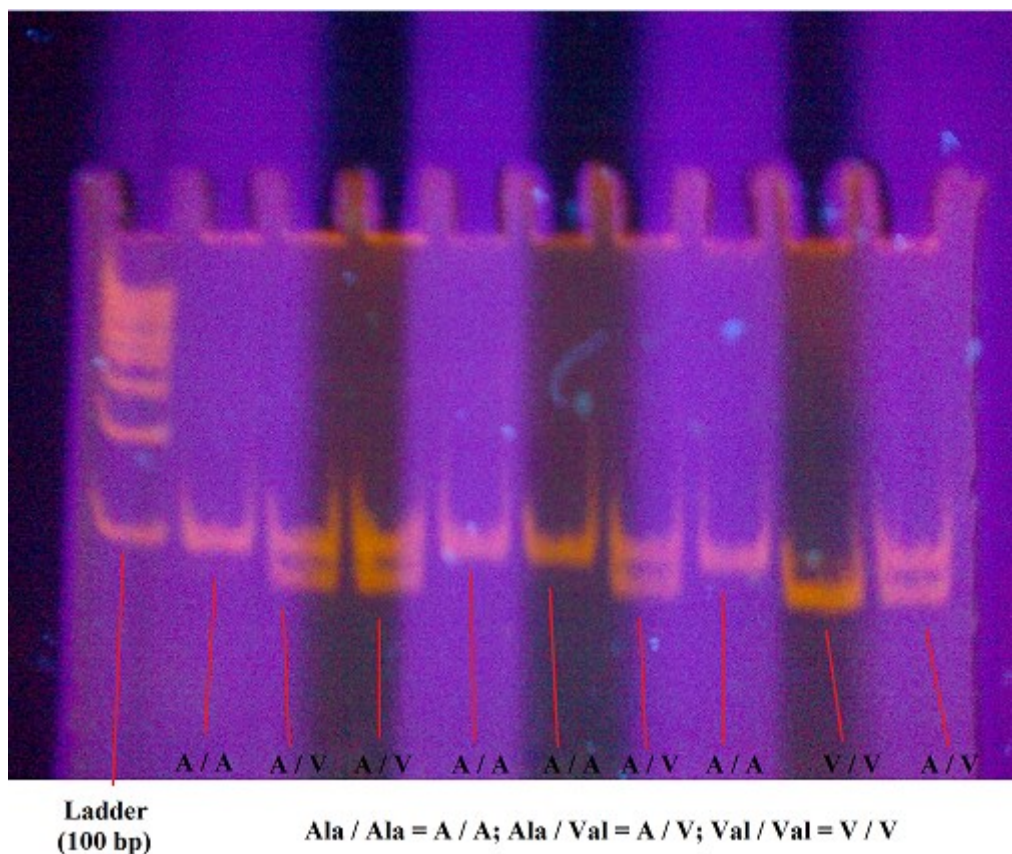
U cilju određivanja polimorfizama na CYP 3A5 i ABCB1 genu korišćen je modifikovani alel - specifični PCR metod Ashavaid i sar. [161]. Reakciona smeša (za svakog pojedinog ispitanika) je pripremana u duplikatu – jedna za određivanje divljeg tipa alela (CYP3A5*1 i ABCB1 3435C) i druga za određivanje mutiranog tipa alela (CYP3A5*3 i ABCB1 3435T) oba ispitivana polimorfizma. Shodno tome, kako bi odredili ispitivane polimorfizme, jedan nishodni prajmer (engl. *Forward primer*) i dva ushodna prajmera (engl. *Reverse primer*) su korišćena za oba ispitivana polimorfizma. Nishodni prajmer je zajednički za obe reakcione smeše (za ispitivanje divljeg tipa i mutiranog tipa alela), dok se ushodni prajmer razlikuje. Sekvence nishodnih prajmera: CYP3A5: 5'- CAC TTG ATG ATT TAC CTG CCT TC – 3', ABCB1: 5'- ACT ATA GGC CA GAGA GGC TGC – 3'. Sekvence ushodnih prajmera: CYP3A5 (divlji - tip): 5'- GGT CCA AAC AGG GAA GAG ATA T – 3', CYP3A5 (mutirani - tip): 5'- GGT CCA AAC AGG GAA GAG ATA C – 3', ABCB1 (divlji - tip): 5' - GTG GTG TCA CAG GAA GAG CTC – 3', ABCB1 (mutirani - tip): 5' - GTG GTG TCA CAG GAA GAG CTT – 3'. Svaka reakciona smeša u ukupnom volumenu od 25 µL, sadržala je 12,5 µL komercijalnog miksa KAPA2G ReadyMix-a (KAPA2G ReadyMix FastHotStart, KapaBiosystems, Boston, USA), koji je u sebi već sadržao Hot Start DNK polimerazu, dNTP – ove, MgCl₂ i stabilizatore. Pored, komercijalnog miksa, smeši je dodato po 0,5 µL prajmera, 10,5 µL dejonizovane vode i 1 µL izolovane DNK (prosečne koncentracije 50 ng/µL). Za umnožavanje je korišćen sledeći program: inicijalna denaturacija na 95°C, za 2 minuta, 35 ciklusa denaturacije na 95 °C za 15 sekundi, vezivanje prajmera na 60 °C za 15 sekundi i produženje na 72 °C sa 15 sekundi, sa finalnim produženjem na 72 °C za 30 sekundi. Produkti umnožavanja su detektovani na 3% agaroznom gelu, bojeni etidijum bromidom i posmatrani pod UV svetlošću. Dužina amplifikovanog produkta u determinaciji genetskog polimorfizma za CYP3A5 je 218 bp, a za ABCB1 je 134 bp. Ukoliko je reakciona smeša u kojoj su dodati prajmeri za divlji tip alela, na gelu pokazala traku, a reakciona smeša u kojoj su dodati prajmeri za detekciju mutiranog tipa alela nije pokazala traku, ispitanik je bio homozigot za divlji tip i obrnuto. Ako su obe smeše pokazivale trake na agaroznom gelu pacijent je heterozigot. Svaki od ispitivanih polimorfizama se tumačio pojedinačno (**Slika 5**).



Slika 5. Detekcija CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama na 3% agaroznom gelu

4.2.2. Metoda detekcije SOD2 Ala -9 Val genskog polimorfizma

Genski polimorfizam (C/T zamena), tj. zamena alanina (GCT) valinom (GTT) na poziciji -9 u signalnom peptidu humane Mn – SOD ispitan je PCR-RFLP metodom. Nishodni: 5' – CCAGCAGGCAGCTGGCACCG – 3' i ushodni: 5' – TCCAGGGCGCCGTAGTCGTAGG – 3' prajmer korišćeni su za umnožavanje polimorfnog Ala (-9) Val regiona. Svaka reakciona smeša u ukupnom volumenu od 25 μ L sadržala je 12,5 μ L komercijalnog miksa (KAPA2G Readymix FastHotStart, KapaBiosystems, Boston, USA), koji je već sadržao Hot Start DNA polimerazu, dNTPs, $MgCl_2$ i stabilizatore. Komercijalnom miksu dodato je po 0,5 μ L oba prajmera (nishodni i ushodni, koncentracije 10 pmol / μ L), 10,5 μ L dejonizovane vode i 1 μ L izolovane DNA prosečne koncentracije 50 ng / μ L). Za umnožavanje PCR produkta (91 bp) korišćen je program: inicijalna denaturacija na 95°C za 2 minuta, 35 ciklusa, denaturacije na 95°C za 15 sekundi, vezivanja prajmera na 66°C za 15 sekundi i produženje na 72°C za 15 sekundi sa finalnim produženjem na 72°C za 30 sekundi. Za identifikaciju Ala(-9)Val polimorfizma, restriktivna digestija dobijenih PCR produkata vršena je pomoću enzima BshTI (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany) na 37°C preko noći, a dobijeni fragmenti bili su detektovani na 8% poliakrilamidnom gelu pomoću vertikalne elektroforeze pod UV svetlošću, jer su pre toga bojeni etidijum – bromidom. Ukoliko je -9 kodon GTT (Val), detektovana su dva DNK fragmenta, 74 i 17 bp na gelu. U suprotnom, ako je -9 kodon, GCT (Ala), nije došlo do digestije i PCR produkt je ostao u dužini od 91 bp (**Slika 6**).

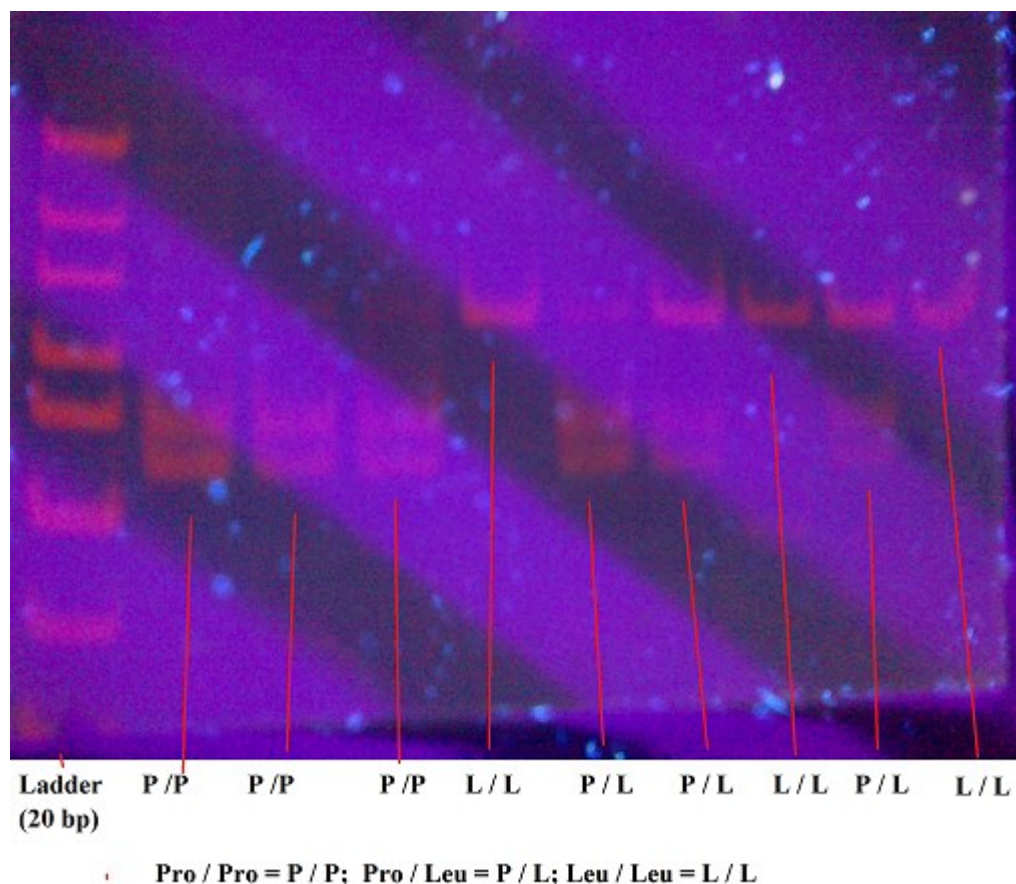


Slika 6. Detekcija SOD2 Ala -9 Val genskog polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu

4.2.3. Metoda detekcije GPX1 Pro200Leu genskog polimorfizma

Genski polimorfizam (C/T zamena), tj. zamena prolina (CCC) leucinom (CTC) na poziciji 200 u GPX1, ispitan je PCR-RFLP metodom. Nishodni: 5'-GCCGCCGCTTCCAGACCAT-3' i ushodni: 5'-CCCCCGAGACAGCAGCACT-3' prajmer korišćeni su u cilju umnožavanje polimorfnog Pro200Leu regiona. Svaka reakciona smeša u ukupnom volumenu od 12,5 μ L sadržala je 6,25 μ L komercijalnog miksa (KAPA2G Readymix FastHotStart, KapaBiosystems, Boston, USA), koji je već sadržao Hot Start DNA polimerazu, dNTPs, $MgCl_2$ i stabilizatore. Komercijalnom miksu bilo je dodato 0,25 μ L oba prajmera (nishodni i ushodni, koncentracije 10 pmol / μ L), 5,25 μ L dejonizovane vode i 0,5 μ L izolovane DNA prosečne koncentracije 50 ng / μ L). Za umnožavanje PCR produkta (128 bp), korišćen je program: inicijalna denaturacija na 95°C za 2 minuta, 35 ciklusa denaturacije na 95°C za 15 sekundi, vezivanja prajmera na 68°C za 15 sekundi i produženja na 72°C za 15 sekundi sa finalnim produženjem na 72°C za 30 sekundi. Restriktivna digestija dobijenih PCR produkata vršena je pomoću enzima ApaI (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany) na 37°C preko noći, a dobijeni fragmenti su analizirani na 8% poliakrilamidnom gelu,

pomoću vertikalne elektroforeze pod UV svetlošću, jer su pre toga bojeni etidijum – bromidom. Ukoliko je u polimorfnom regionu bila prisutna sekvenca CCC (Pro), detektovana su dva DNK fragmenta, 67 i 61 bp. U suprotnom, ako je prisutna CTC (Leu) nije došlo do digestije i PCR produkt je ostao u dužini od 128 bp (Slika 7).



Slika 7. Detekcija GPX1 Pro 200 Leu genskog polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu

4.2.4. Određivanje koncentracije TBARS u plazmi

Kao jedan od parametara oksidativnog stresa korišćeno je određivanje koncentracije tiobarbituratna kiselina reaktivnih supstanci (TBARS), u najvećem procentu malondialdehida (MDA), kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije. On u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), koja se odvija pri visokoj temperaturi u kiseloj sredini, stvara hromogen - kondenzacioni produkt, koji se sastoji od jednog molekula MDA i dva molekula TBA. Sadržaj TBARS u plazmi je određivan spektrofotometrijski prema metodi Andreev i sar. [162]. Uz korišćenje 0,3 ml plazme i dodatak FeSO_4 u inkubacioni medijum, radi povećanja osetljivosti, nastali obojeni produkt je čitan na OD 535 nm i preračunavan preko molarog ekstinkcionog koeficijenta $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za MDA, a koncentracija je izražena u $\mu\text{mol/L}$.

4.2.5. Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima

Za određivanje sadržaja TBARS u eritrocitima korišćena je metoda Jain i sar. [163]. Korišćeno je 0,4 mL opranih eritrocita koji su resuspendovani u 1,6 mL 0,1 M fosfatnom puferu (pH=7,4) i koji su posle dodatka 1 mL 30 % tri – hlorsirćetne kiseline (TCA) držani na ledu tokom 1 sata. Nakon centrifugiranja na 4000 rpm, u prisustvu TBA, vršeno je kuvanje, a nastalo obojeno jedinjenje je čitano na 532 nm. Predhodno je određena koncentracija hemoglobina u suspenziji eritrocita, a dobijene vrednosti TBARS izražene su u nmoL/gr Hb.

4.2.6. Određivanje koncentracije TBARS u urinu

Za određivanje sadržaja TBARS u urinu korišćena je modifikovana metoda po Siciarz i sar. [164]. U urin pacijenata i zdravih ispitanika dodat je 5 % rastvor butilhidroksitoluena (BHT) i rastvora 0,7 % TBA (0,7 % u 0,05 M NaOH). Nakon inkubacije na 100°C, apsorbanca uzoraka je čitana na 532 nm. Koncentracija TBARS je preračunata preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta i izražena na $\mu\text{mol} / \text{mM}$ kreatinina u urinu.

4.2.7. Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina u plazmi

Za određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP) u plazmi korišćena je metoda Witko – Sarsat i sar. [131]. Uznapredovali produkti oksidacije proteina spektrofotometrijski su određivani u plazmi pomešanoj sa vodom, sirćetnom kiselinom i kalijum – jodidom. Apsorbanca je čitana na 340 nm i upoređivana sa rastvorom hloramina - T rastvorenog u istom puferu. Rezultati su izraženi u mikromolima hloramin – T ekvivalenata na litar plazme i u odnosu na ukupne proteine plazme.

4.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa u plazmi i urinu (USH)

Sadržaj ukupnih (proteinskih i ne - proteinskih) sulfhidrilnih grupa određivan je u plazmi i urinu, spektrofotometrijski na osnovu redukcije 5,5 - ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB). Apsorbanca je čitana na 412 nm. Određivanje je vršeno prema metodi, Hu – a [165] i metodi Sedlak – a i Lindsday – a [166].

4.2.9. Određivanje koncentracije karbonilnih grupa u urinu

Određivanje karbonilnih grupa u amino kiselinskim ostacima je važan pokazatelj oksidativne modifikacije proteina. U spektrofotometrijskom određivanju karbonilnih grupa, korišćena je metoda Levine i sar., u čijoj je osnovi kolorimetrijska reakcija sa 2,4 dinitrofenilhidrazinom (DNPH), koji po tipu Schiff - ove baze obrazuje 2,4 dinitrofenilhidrazon reaktivne karbonilne derivate (RCD) [167]. Proteini u urinu su precipitirani sulfosalicilnom kiselinom, nakon čega je uzorak centrifugiran i inkubiran u rastvoru koji sadrži DNPH tokom 50 minuta na 37°C. Rezultati su preračunati korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za DNPH – RCD na 370 nm i izraženi u $\mu\text{mol} / \text{mM}$ kreatinina u urinu.

4.2.10. Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi

Aktivnost katalaze (KAT) u plazmi ispitanika određivana je prema metodi Goth –a, bazirana na mogućnosti H_2O_2 da formira stabilni obojeni kompleks sa solima molibdena, tj. amonijum – molibdatom [168]. Žuti, stabilni kompleks koji je formiran na taj način određivan je spektrofotometrijski, čitanjem na 410 nm, čime se posredno određuje sadržaj H_2O_2 . Polazeći od pretpostavke da je aktivnost KAT proporcionalna količini utrošenog H_2O_2 u jedinici vremena, taj utrošak se izračunava iz razlike apsorbance „standarne epruvete”, u kojoj se nalazi samo smeša H_2O_2 i amonijum – molibdata i epruvete kojoj je pored H_2O_2 i amonijum – molibdata dodata plazma ispitanika. Razlika u apsorbanci predstavlja meru katalazne aktivnosti. Stoga se aktivnost enzima izražava kao količina KAT neophodna da razloži 1 μmol H_2O_2 u jedinici vremena pod primenjenim uslovima. Na početku, 40 μL seruma ispitanika je pomešano sa 1,2 mL H_2O_2 , nakon čega je smeša inkubirana na 37°C tokom 10 min. Nakon toga, dodata je 0,8 mL 10% TCA i smeša je centrifugirana na 3000 rpm tokom 10 minuta. Potom je od svakog pojedinog uzorka odvojeno 200 μL supernatanta i pomešano sa 100 μL amonijum – molibdata i čitano na spektrofotometru. Istovremeno su pripremani standardni rastvori i slepa proba, koji su neophodni za preračunavanje rezultata.

4.2.11. Određivanje koncentracije asimetričnog i simetričnog dimetilarginina

Asimetrični dimetilarginin i simetrični dimetilarginin su određivani hromatografski po metodi Paroni i sar. [169] uz izvesne modifikacije. Interni standard (monometilarginin, 50 μL , 10 μM) se dodaje uzorku plazme (0,2mL) koji se zatim podvrgava “solid phase” ekstrakciji

koristeći katjono - izmenjivačke kolone (SPE cartridge, Supelco Discovery® DSC-MCAX, 100 mg/mL). Kolone se najpre aktiviraju metanolom (1 mL) i 2% trihlor-sirćetnom kiselinom (TCA, 2 mL). Nakon ispiranja (TCA 2%, 150mmol/L fosfatni pufer pH 8.0, metanol), aminokiseline su eluirane sa 1,2 mL 2% rastvora trietilamina (TEA) u metanolu i vodi (70:30, v:v). Eluat se uparava do suvog gasnim azotom, a suvi ostatak se zatim rastvara u 0,4 mL pufera (mobilna faza A) i na kraju se vrši derivatizacija *orto*-ftaldialdehidom (OPA) pre nego što je 20 µL injektovano u tečni hromatograf.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC, prema engl. High Performance Liquid Chromatography) je vršena na instrumentu “Agilent 1200 Series” (Agilent Technologies, Inc. Headquarters, Santa Clara CA 95051 United States) koji je opremljen autosemplerom, binarnom pumpom i fluorescentnim detektorom. Hromatografsko odvajanje je postignuto uz upotrebu kolone Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm) i odgovarajućeg gradijenta dve mobilne faze: A – (fosfatni pufer, 40mmol/L, pH 6,2) i B - (acetonitril:metanol (50:50, v:v). Odvajanje metilarginina je postignuto gradijentom dve mobilne faze A i B pri protoku od 1,5mL/min. Analiza je počela pri gradijentu od 15% faze B, u narednih 10 min gradijent je porastao na 25% mobilne faze B. Zatim je rastao linearno do 80% tokom 3 minuta održavajući taj nivo naredna 3 minuta, nakon čega je vraćen na početni nivo, što ujedno predstavlja i kraj separacije. Sa vremenom uravnotežavanja od 2 minuta, ceo postupak traje 20 minuta. Retenciono vreme metalarginina bilo je: za interni standard 8,20 minuta, ADMA 9,25 minuta i SDMA 9,63 minuta.

4.2.12. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi

Aktivnosti SOD u plazmi je određivana pirogalolskom metodom, tj. modifikovanom metodom Minami i Yoshikawa [170]. Metoda je bazirana na uklanjanju superoksid anjon radikala iz plazme od strane SOD, koja pri tome inhibira reakciju oksidacije NBT (engl. *nitro blue tetrasolium*). Naime, pirogalol je oksidovao NBT, pri čemu je došlo do akumulacije oksidisanog hromogena ljubičaste boje. Brzina oksidacije NBT u prisustvu pirogalola praćena je spektrofotometrijski preko promene apsorbanace na 540 nm. Ukoliko je bila prisutna SOD, došlo je do pada apsorbanace, jer je sprečila autooksidaciju pirogalola. Procenat inhibicije je korišćen kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Aktivnost SOD je izračunata iz brzine autooksidacije pirogalola i stvaranja hromogena u odsustvu enzima i nakon dodatka plazme, tj. u prisustvu SOD. Jedna jedinica aktivnosti SOD predstavlja onu količinu enzima

koja može da ostvari 50% inhibicije oksidacije NBT u prisustvu pirogalola. Rezultati su izraženi U / mL.

4.2.13. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u eritrocitima

Aktivnost SOD u eritrocitima određivana je pomoću komercijalnog kita RANSOD (Randox Labs, Crumlin, UK). Metoda je bazirana na reakciji dizmutacije superoksid anjon radikala, koji se stvara tokom oksidativnih energetske procesa, u vodonik – peroksid i molekularni kiseonik. Ova metoda zahteva ksantin i ksantin oksidazu (XOD) koja će generisati superoksid anjon radikal, koji će reagovati sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (INT) i formirati formazansku boju. Aktivnost SOD je određivana stepenom inhibicije reakcije, pri čemu jedna internacionalna jedinica SOD-a, prouzrokuje 50 % inhibicije redukcije INT-a pod uslovima analize.

4.2.14. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze u eritrocitima

Aktivnost enzima je merena prema metodi Paglia i Valentine [171]. Glutathion peroksidaza katalizuje oksidaciju GSH u GSSG pomoću Kumil – hidroperoksida (engl. *Cumyl Hydroperoxide*). U prisustvu glutathion reduktaze i NADPH, oksidisani glutathion je odmah kovertovan u redukovanu formu, a došlo je do oksidacije NADPH u NADP⁺. Mereno je smanjenje apsorbance na 340 nm. Za ovu analizu je korišćen komercijalni kit RANSEL (Randox Labs, Crumlin, UK).

4.2.15. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze u eritrocitima

Aktivnost enzima je merena pomoću komercijalnog kita RANDOX laboratorije (Randox Labs, Crumlin, UK). U osnovi primenjene metode bila je reakcija redukcije GSSG u prisustvu NADPH, koji je potom oksidovan do NADP⁺. Smanjenje apsorbance je mereno na 340 nm.

4.2.16. Određivanje koncentracije redukovanog glutathiona u punoj krvi

Koncentracija glutathiona u punoj krvi je merena prema metodi Beutler i sar. [172]. Redukovani glutathion, neproteinsko tiolno jedinjenje sa značajnom ulogom u zaštiti ćelija i

tkiva od delovanja slobodnih radikala, određivan je pomoću Elmanovog reagensa (5,5 - ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB). Posle taloženja proteina precipitirajućom solucijom koja je sadržala metafosfornu kiselinu, NaCl i Na EDTA, DTNB je reagovao sa neproteinskim SH grupama, pri čemu je nastao obojeni produkt dianjon 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina. Glutation je određivan u punoj krvi odmah nakon uzimanja, a dobijeni obojeni produkti nastali posle dodavanja DTNB-a su čitani posle 5 minuta i u periodu od 15 minuta na OD 412 nm. Preračunavanje je vršeno na osnovu molarnog ekstinkcionog koeficijenta produkata reakcije ($13,6 \text{ M cm}^{-1}$). Vrednost koncentracije glutaciona je izražena u mmol / gr HGB.

4.2.17. Određivanje aktivnosti enzima markera tubulskog oštećenja u urinu i serumu

Aktivnost N – acetil – β – D glukozaminidaza (NAG) urinu i serumu određivana je prema metodi *Horak* i sar [173]. Sadržaj p – nitrofenola određivan je spektrofotometrijski na 405 nm. Aktivnost se iskazuje kao nmol p – nitrofenola koji se formira u minuti.

Aktivnost APN u urinu i serumu određivana je u baznom fosfatnom puferu, 3 mM KCl 140, mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 9 mM NaH_2PO_4 kome je dodat 1 mM MgCl_2 , pH 7.4 i koristeći 1,5 mM alanin – p – nitroanilid kao hromogeni supstrat. Aktivnost DPP IV u urinu i serumu određivana je u 50 mol / L TRIS – HCl, pH 7,8 koji je sadržao 130 mmol / L NaCl i 1 mmol / L MgCl_2 sa 1.5 mmol / L gly – pro – p – nitroanilida kao supstrata. Nakon inkubacije na 37°C tokom 20 minuta, aktivnost oba enzima je kinetički čitana na 405 nm (Multiskan Ascent, Thermo LabSystem, Finland). Aktivnost enzima određivana je na osnovu količine p – nitroanilida, koji se određuje spektrofotometrijski. Jedinica aktivnosti enzima definiše se kao količina enzima koja oslobađa 1 nmol / L substrata u minuti pod primenjenim uslovima. APN i DPP IV se određuju prema metodi *Stefanović* i sar. [174].

Ekskrecija NAG, APN i DPP IV u urinu iskazana je kao U / mM kreatinina u urinu kako bi se isključio uticaj razblaženja ili koncentrisanja urina, dok je aktivnost u serumu iskazana kao U/L.

4.2.18. Statistička obrada rezultata

U okviru deskriptivne statistike određena je aritmetička sredina, standardna devijacija, medijana i interkvartila razlika za ispitivane parametre. Za procenu odstupanja učestalosti alela i genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže korišćen je hi - kvadrat (χ^2) test. Takođe, χ^2 i Fisher's exact test korišćeni su za testiranje postojanja statistički značajne razlike u učestalosti alela i genotipova između populacije pacijanata sa transplantiranim bubregom i zdravih dobrovoljaca. Za poređenje farmakokinetičkih, parametara oksidativnog stresa i oštećenja tubula bubrega, između eksperimentalne i kontrolne grupe i/ili dve različite grupe pacijenata, korišćen je Studentov t-test za neuparene uzorke (kod normalne distribucije vrednosti parametara), ili Mann - Whitney U test (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara). Za poređenje parametara u okviru iste grupe ispitanika u različitim vremenskim periodima nakon transplantacije bubrega (najmanje tri različita perioda), korišćen je General Linear Model, Repeated Measures, sa Bonferroni Post Hoc testom (kod normalne distribucije vrednosti parametara) ili Friedman Test sa Wilcoxon Test, kao Post Hoc testom (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara). Multivarijantna linearna regresiona analiza korišćena je za utvrđivanje postojanja veze između ispitivanih parametara i odgovarajućih genotipova ispitivanih polimorfizama. Pearson (kod normalne distribucije vrednosti parametara) i Spearman (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara) korelaciona analiza korišćene su za ispitivanje jačine veze između ispitivanih parametara. Statističke analize urađene su pomoću softverskog paketa SPSS (verzija 16) na nivou značajnosti $p < 0,05$.

5. Rezultati

5.1. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

U **Tabeli 1.** prikazane su demografske karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika.

Tabela 1. Demografske karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika

	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z* / χ^2_{**}	p
Pol (M / Ž)	48 / 24	36 / 26	1,054**	0,305
Starost (godine)	41,83 ± 10,89 41,00(34,50-51,00)	42,63 ± 12,59 44,00(32,00-49,00)	- 0,060*	0,952
Telesna težina (kg)	76,26 ± 14,28 73,00(67,00-83,50)	77,13 ± 18,82 82,00(64,50-91,00)	- 0,596*	0,551
BMI (kg / m ²)	25,98 ± 4,03 25,56(23,14-29,09)	24,72 ± 4,15 24,10(21,62-28,08)	1,269	0,208
Tip transplantacije (ŽST / KT)	56 / 16	/		
Period nakon transplantacije (godine)	3,45 ± 2,48 3,00 (1,50-4,00)	/		

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika) ili brojem. p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; **: vrednosti parametara su upoređivane Hi – kvadrat testom;

Nisu utvrđene razlike u starosti, telesnoj težini i BMI između pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika. U **Tabeli 2.** su prikazani osnovni hematološki parametri pacijenata i zdravih ispitanika, koji su učestvovali u istraživanju.

Tabela 2. Osnovni hematološki parametri pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika

	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z*	p
Er ×10 ¹² /L	4,86 ± 0,71 4,70(4,35-5,42)	4,80 ± 0,48 4,78(4,52-5,13)	0,467	0,642
HGB (g / L)	139,47 ± 21,97 138,00(122,00-152,50)	140,32± 14,24 140,00(130,50-150,00)	- 0,235	0,815
Le ×10 ⁹ /L	7,93±1,48 8,20 (6,60-8,70)	7,26±1,74 7,00 (5,85-8,90)	- 1,812*	0,070
Tr ×10 ⁹ /L	252,43 ± 65,87 244 (200,00-279,00)	250,32 ± 60,09 242 (200,00-287,00)	- 0,113*	0,910

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

p vrednost manja od 0,05 smatrane je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima osnovnih hematoloških parametara između pacijenata i kontrolne grupe ispitanika.

Biohemijski parametri pacijenata s transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika prikazani su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Biohemijski parametri pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom i zdravih ispitanika

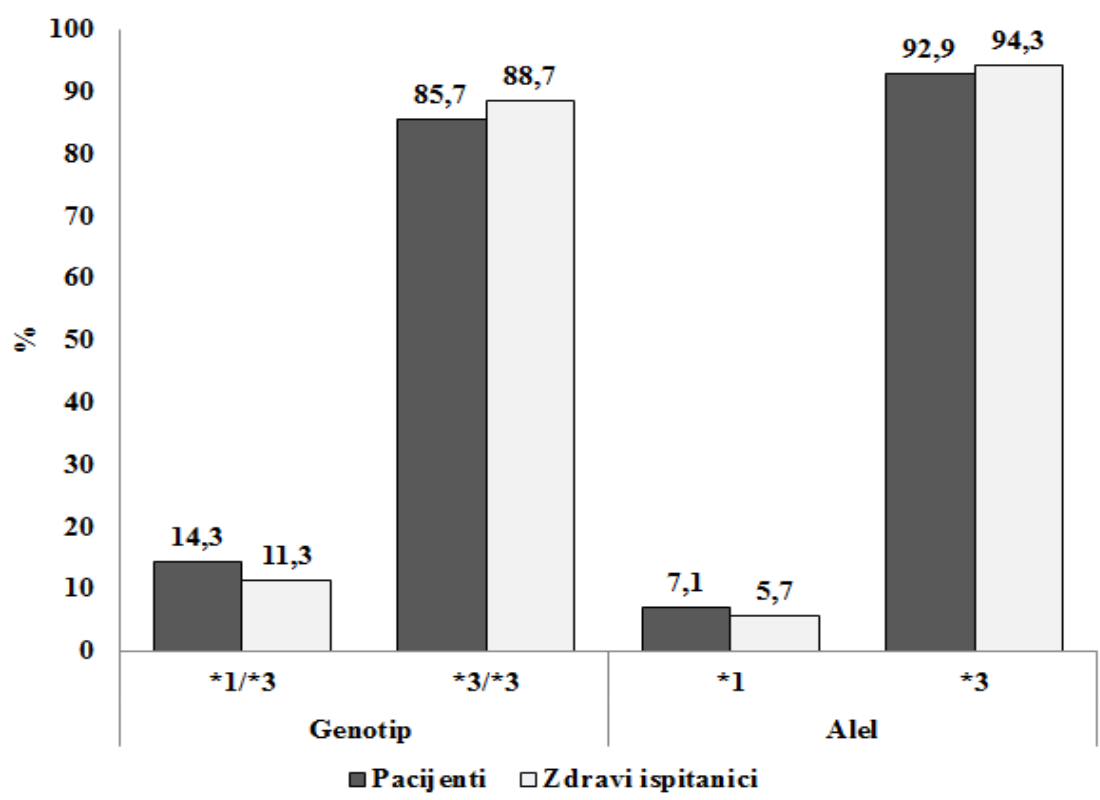
	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z*	p
KRE ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	137,97 $\pm$ 47,52 122,00 (105,55-158,00)	90,92 $\pm$ 11,23 92,90 (83,55-98,00)	- 6,804*	< 0,001
eGFR ($\text{mL} / \text{min} / 1,73\text{m}^2$)	53,18 $\pm$ 16,80 54,69(41,43-62,61)	72,49 $\pm$ 10,05 72,23(65,00-73,00)	- 6,497	< 0,001
URE (mmol / L)	8,59 $\pm$ 3,79 8,20 (5,60-10,10)	4,53 $\pm$ 1,13 4,45 (3,90-5,30)	- 7,169*	< 0,001
GLU (mmol / L)	5,29 $\pm$ 0,77 5,20 (4,70-5,70)	4,93 $\pm$ 0,64 4,94(4,54-5,27)	2,629	0,01
HOL (mmol / L)	6,33 $\pm$ 1,50 6,10 (5,19-7,11)	5,46 $\pm$ 0,98 5,24 (4,74-6,14)	- 3,153*	0,002
LDL hol (mmol / L)	3,64 $\pm$ 1,07 3,58(2,92-4,22)	3,39 $\pm$ 0,78 3,19(2,79-3,91)	- 1,198*	0,231
HDL hol (mmol / L)	1,34 $\pm$ 0,34 1,29(1,15-1,58)	1,32 $\pm$ 0,27 1,29(1,14-1,50)	- 0,405	0,686
TG (mmol / L)	2,62 $\pm$ 1,62 2,15 (1,60-3,10)	1,63 $\pm$ 0,99 1,36 (0,96-1,84)	- 4,337*	< 0,001
ALB (g / L)	43,57 $\pm$ 3,98 43,00(41,00-45,50)	42,41 $\pm$ 2,38 42,00(40,50-44,00)	1,806	0,075
UP (g/L)	73,30 $\pm$ 13,89 73,00 (70,00-76,45)	72,92 $\pm$ 4,69 72,55 (69,25-76,45)	- 0,533*	0,594
ALT(U/L)	31,25 $\pm$ 27,65 21,00 (14,00-32,00)	20,17 $\pm$ 6,76 21,10 (16,10-25,00)	- 0,995*	0,320
AST(U/L)	20,88 $\pm$ 13,10 18,00 (13,00-23,00)	20,80 $\pm$ 4,73 20,80 (16,50-24,60)	- 1,472*	0,141
GGT (U/L)	25,38 $\pm$ 15,00 21,00 (14,00-32,50)	21,71 $\pm$ 12,32 18,00 (15,60-22,30)	- 0,644*	0,519
NAG (U / L)	22,61 $\pm$ 8,44 21,53 (17,30 - 27,72)	19,93 $\pm$ 8,88 17,68 (15,23 - 22,15)	- 2,525*	0,012
DPP IV (U / L)	20,97 $\pm$ 10,80 19,17 (14,05 - 25,94)	16,70 $\pm$ 7,52 15,78 (11,94 - 19,66)	- 2,154*	0,031
APN (U / L)	23,47 $\pm$ 7,15 21,81 (18,42 - 28,72)	22,37 $\pm$ 5,45 21,75 (19,21- 25,27)	0,851	0,397

Podaci su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika). eGFR – procenjena GFR, na osnovu klirensa kreatinina izračunatog na osnovu MDRD formule; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

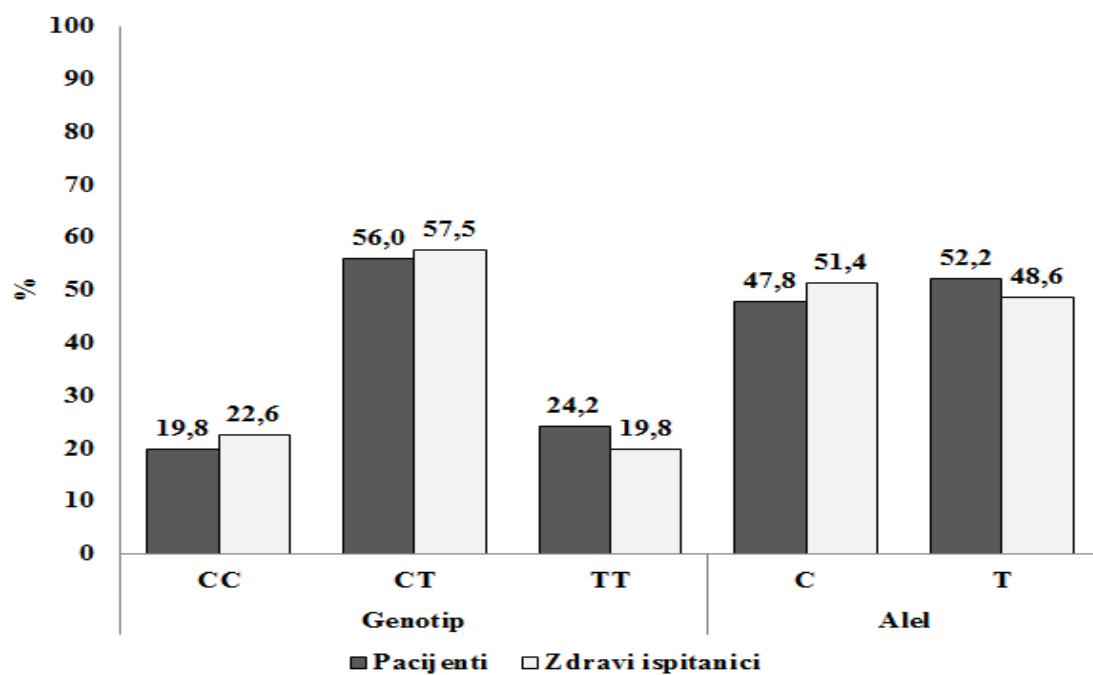
Vrednosti serumskih koncentracija KRE, URE, HOL, TG, GLU, NAG i DPP IV bile su značajno veće, dok je vrednost eGFR bila manja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u poređenju sa zdravim ispitanicima. U ostalim biohemijskim parametrima nije bilo razlike među ispitivanim grupama.

5.2. Ispitivanje učestalosti genotipova i alela CYP3A5, ABCB1, SOD2 I GPX1 genskih polimorfizama

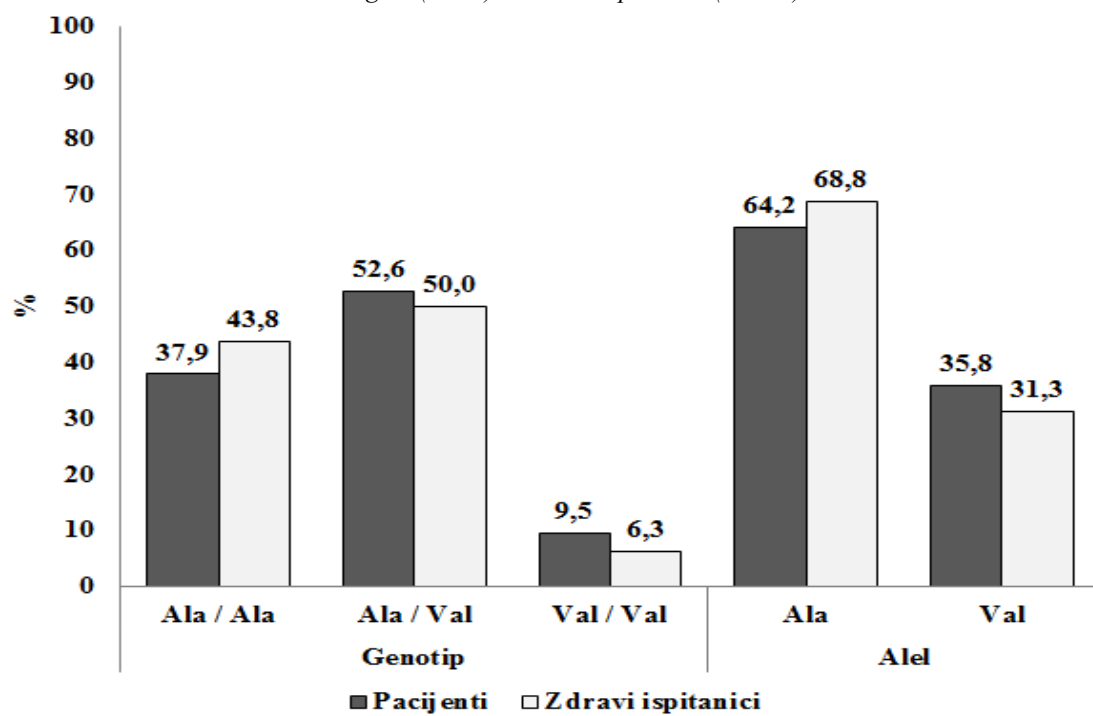
Ispitivanje distribucije genotipova i alela genskih polimorfizama CYP3A5 A6986G, ABCB1 C3435T, SOD2 Ala – 9 Val i GPX1 Pro200Leu sprovedeno je kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih dobrovoljaca. Pored pacijenata na takrolimusu, istraživanje je obuhvatilo i pacijente na CsA i SRL. Rezultati genotipizacije su pokazali da genotipovi i aleli ispitivanih polimorfizama u populaciji pacijenata i zdravih ispitanika nisu odstupali od Hardy - Weinbergove ravnoteže. Učestalost genotipova i alela ispitivanih polimorfizama CYP3A5, ABCB1, SOD2 i GPX1 gena u populaciji pacijenta i zdravih dobrovoljaca prikazana je na **Grafikonima 1, 2, 3 i 4.**



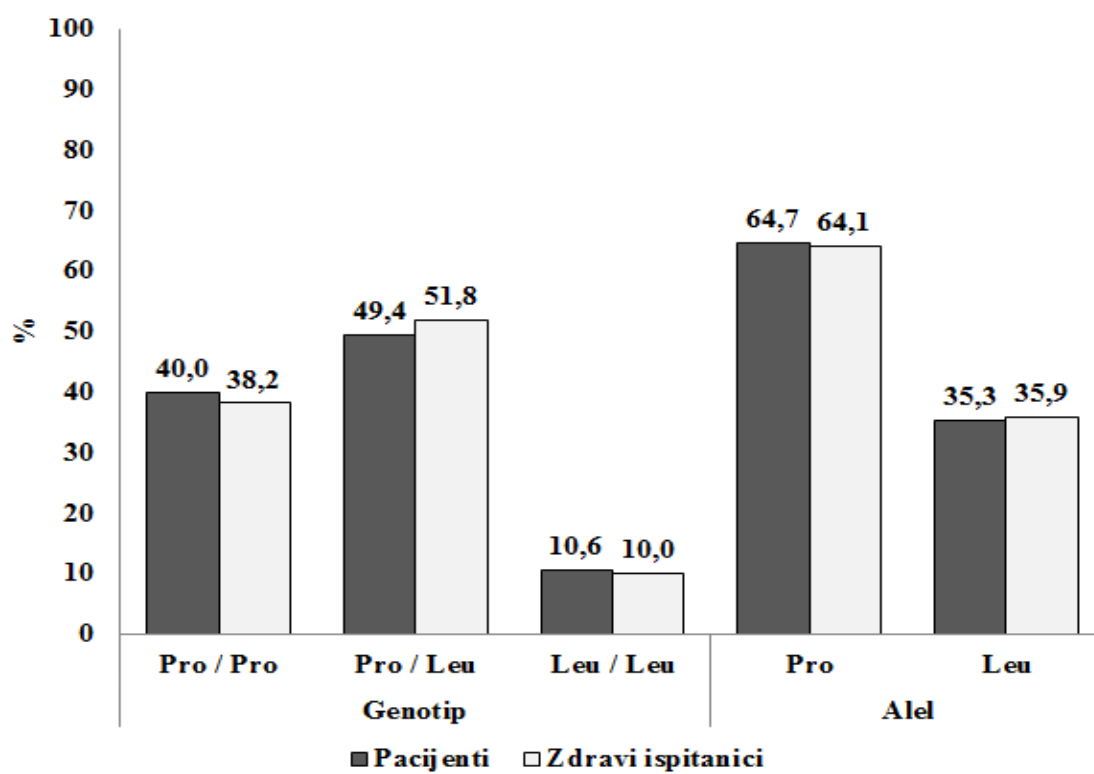
Grafikon 1. Učestalost genotipova i alela polimorfizama CYP3A5 A6986G kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=91) i zdravih ispitanika (n=106)



Grafikon 2. Učestalost genotipova i alela polimorfizama ABCB1 C3435T kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=91) i zdravih ispitanika (n=106)



Grafikon 3. Učestalost genotipova i alela polimorfizama SOD2 Ala-9Val kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=95) i zdravih ispitanika (n=96)



Grafikon 4. Učestalost genotipova i alela polimorfizama GPX1 Pro200Leu kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=85) i zdravih ispitanika (n=110)

Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti genotipova svih ispitivanih polimorfizama između pacijenata i kontrola (CYP 3A5: $\chi^2 = 0,388$, $p = 0,533$; ABCB1 3435: $\chi^2 = 0,635$, $p = 0,728$; SOD2: $\chi^2 = 1,097$, $p = 0,578$; GPX1: $\chi^2 = 0,112$, $p = 0,946$). Genotip CYP 3A5 *1 / *1 nije bio detektovan u ispitivanim populacijama. Takođe, nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti alela ispitivanih polimorfizama između pacijenata i kontrola (CYP 3A5: $\chi^2 = 0,362$, $p = 0,548$; ABCB1 3435: $\chi^2 = 0,511$, $p = 0,475$; SOD2: $\chi^2 = 0,818$, $p = 0,368$; GPX1: $\chi^2 = 0,016$, $p = 0,899$).

5.3. Ispitivanje uticaja CYP3A5 A6986G i ABCB1 C3435T genskih polimorfizama na dozni režim i izloženost takrolimusa

U ispitivanju je učestvovalo 53 pacijenta sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom. Ispitanici su praćeni retrospektivno i prospektivno tokom 2 godine nakon transplantacije bubrega, a njihove demografske i kliničke karakteristike prikazane su u **Tabeli 4.**

Tabela 4. Demografski i klinički podaci pacijenata na takrolimusu u različitim periodima nakon transplantacije bubrega

PARAMETRI	PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)			
	1	6	12	24
Pol (M/ Ž)	35/18	35/18	35/18	35/18
Tip transplantacije (ŽST/KT)	41/12	41/12	41/12	41/12
Starost (godine)	39,28 ± 10,11 38,50 (32,25 – 47,75)	39,78 ± 10,11 39,00 (32,75 – 48,25)	40,28 ± 10,11 39,50 (33,75 – 49,25)	41,28 ± 10,11 40,50 (34,25 – 49,75)
Telesna težina (kg)	70,75 ± 14,95 68,00 (61,38 – 75,75)	73,23 ± 14,19 72,00 (65,50 – 77,50)	74,45 ± 13,92 73,00 (66,00 – 80,00)	76,13 ± 14,48 73,50 (66,25 – 84,00)
KRE (μmol / L)	138,62 ± 44,20 131,55 (110,25 – 166,25)	141,59 ± 42,28 135,00 (114,43 – 155,50)	136,09 ± 46,9 121,50 (108,75 – 154,00)	151,66 ± 79,93 140,50 (113,75 – 157,00)
eGFR (mL/min / 1,73m ²)	52,90 ± 19,00 49,41 (40,73 – 59,69)	51,49 ± 18,68 49,42 (41,77 – 58,63)	55,20 ± 22,94 51,69 (44,46 – 59,02)	49,35 ± 16,34 48,48 (41,70 – 56,65)
URE (mmol / L)	9,70 ± 3,78 9,45 (7,25 – 11,35)	8,35 ± 3,36 8,15 (6,70 – 9,63)	8,40 ± 3,20 7,70 (6,48 – 10,13)	9,02 ± 4,13 8,00 (5,90 – 11,00)
Doza takrolimusa (mg/kg/dan)	0,12 ± 0,05 0,11 (0,08 – 0,17)	0,07 ± 0,04 0,06 (0,05 – 0,09)	0,06 ± 0,03 0,06 (0,04 – 0,07)	0,05 ± 0,03 0,04 (0,03 – 0,07)
C0 takrolimusa (ng/mL)	9,20 ± 2,45 9,20 (7,03 – 11,00)	7,71 ± 2,42 7,40 (6,20 – 8,90)	7,30 ± 1,84 7,25 (5,68 – 8,45)	6,54 ± 1,47 6,45 (5,50 – 7,80)
C0/D takrolimusa (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)	86,38 ± 36,16 79,49 (62,02 – 105,54)	133,81 ± 78,79 110,92 (82,69 – 164,81)	175,50 ± 141,00 129,10 (85,72 – 207,91)	174,13 ± 123,78 146,44 (114,31 – 204,43)
Doza PRE (mg/kg/dan)	0,32 ± 0,14 0,31 (0,19 – 0,45)	0,16 ± 0,04 0,15 (0,14 – 0,17)	0,14 ± 0,03 0,14 (0,13 – 0,16)	0,13 ± 0,04 0,14 (0,11 – 0,15)
Doza MMF / MFK (g/dan)	1,15 ± 0,32 1,44 (0,72 – 1,44)	1,06 ± 0,33 1,08 (0,72 – 1,44)	1,05 ± 0,31 1,08 (0,72 – 1,44)	0,98 ± 0,31 1,08 (0,72 – 1,08)
CYP 3A5 genotip (*1*3 / *3*3)	11/42	11/42	11/42	11/42
ABCB1 genotip (CC / CT / TT)	11/32/10	11/32/10	11/32/10	11/32/10

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

Tabela 4. pokazuje da se tokom post–transplantacionog perioda doza takrolimusa, potrebna da se koncentracija leka u krvi održi u optimalnom terapijskom opsegu, smanjuje dok se bioraspoloživost leka povećava, što je izraženo kroz povećanje C0/D odnosa koji predstavlja indeks bioraspoloživosti leka. Takođe, koncentracije C0 su bile u željenom opsegu za odgovarajući period nakon transplantacije bubrega.

Poređenje dnevne doze takrolimusa između pacijenata sa različitim CYP 3A5 genotipom prikazano je u **Tabeli 5.**

Tabela 5. Dnevna doza takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
Doza (mg/kg/dan)				
CYP 3A5*1/*3	0,15 ± 0,04 0,15 (0,13-0,18)	0,11 ± 0,05 0,09 (0,08-0,15)	0,08 ± 0,05 0,08 (0,05-0,09)	0,07 ± 0,04 0,07 (0,04-0,10)
CYP 3A5*3/*3	0,11 ± 0,05 0,10 (0,07-0,16)	0,07 ± 0,03 0,05 (0,04-0,08)	0,05 ± 0,02 0,05 (0,04-0,07)	0,05 ± 0,02 0,04 (0,03-0,06)
t/Z*	- 1,980*	- 2,488*	- 1,983*	- 1,826*
p vrednost	0,046	0,013	0,047	0,068

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

U sprovedenom istraživanju nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa zahtevali su veće dnevne doze takrolimusa u cilju održanja optimalne koncentracije leka u svim posmatranim periodima, osim nakon druge godine nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa.

U **Tabeli 6.** prikazane su C0 koncentracije takrolimusa između pacijenata sa različitim CYP 3A5 genotipom.

Tabela 6. Koncentracija C0 takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
C0 (ng/mL)				
CYP 3A5*1/*3	9,04 ± 2,51 9,00 (8,10-11,10)	7,77 ± 2,62 7,60 (6,40-9,10)	6,47 ± 1,29 7,10 (5,50-7,30)	6,12 ± 1,72 5,10 (4,60-7,50)
CYP 3A5*3/*3	9,15 ± 2,49 8,80 (7,00-10,90)	7,88 ± 2,42 7,60 (6,25-8,95)	7,43 ± 1,91 7,60 (5,65-8,60)	6,57 ± 1,33 6,50 (5,65-7,70)
t/Z*	- 0,207	0,071	- 1,521	- 0,945
p vrednost	0,837	0,944	0,135	0,350

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Nije bilo razlike u ispitivanom farmakokinetičkom parametru između pacijenata sa različitim CYP 3A5 genotipom u toku dve godine nakon transplantacije bubrega.

Poređenje C0/D odnosa takrolimusa između pacijenata sa različitim CYP 3A5 genotipom prikazano je u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Odnos C0/D takrolimusa u zavisnosti od CYP 3A5 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
C0/D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)				
CYP 3A5*1/*3	64,92 ± 23,44 62,15 (54,67-71,31)	90,50 ± 62,09 52,31 (49,82-103,13)	94,85 ± 39,80 81,59 (64,80-121,50)	111,41 ± 49,81 115,24 (75,38-151,30)
CYP 3A5*3/*3	92,60 ± 37,97 88,40 (63,61-111,11)	148,63 ± 81,20 126,00 (92,18-173,08)	194,11 ± 149,53 135,88 (93,97-216,45)	189,38 ± 131,82 150,75 (115,58-227,52)
t/Z*	- 2,112	- 2,244*	- 2,470*	- 2,035*
p vrednost	0,040	0,025	0,014	0,042

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

U sprovedenom istraživanju nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa imali su značajno niže vrednosti C0/D takrolimusa u svim posmatranim periodima nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa. Ovaj rezultat ukazuje da su nosioci CYP

3A5 *1/*3 genotipa s istom dnevnom dozom takrolimusa postizali niže C0 koncentracije leka u krvi, odnosno da su zahtevali veće dnevne doze leka kako bi postigli slične koncentracije takrolimusa u krvi, kao nosioci CYP 3A5 *3/*3 genotipa.

Rezultati poređenja dnevne doze takrolimusa među pacijentima sa različitim ABCB1 3435 genotipom prikazani su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Dnevna doza takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
Doza (mg/kg/dan)				
CC+CT	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,03
	0,12 (0,08-0,17)	0,08 (0,05-0,10)	0,06 (0,04-0,07)	0,05 (0,03-0,07)
TT	0,11 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02
	0,10 (0,07-0,13)	0,05 (0,04-0,06)	0,05 (0,04-0,06)	0,04 (0,03-0,04)
t / Z*	0,768	- 2,111*	- 1,048*	- 1,898*
p vrednost	0,447	0,035	0,294	0,058
CYP *3/*3, CC+CT [#]	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02
	0,09 (0,08-0,16)	0,06 (0,05-0,08)	0,06 (0,04-0,07)	0,05 (0,03-0,07)
CYP *3/*3, TT [#]	0,11 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02
	0,10 (0,07-0,13)	0,05 (0,04-0,06)	0,05 (0,04-0,06)	0,04 (0,03-0,04)
t / Z*	0,289	0,790	- 0,273*	- 1,158*
p vrednost	0,775	0,435	0,785	0,247

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; [#] Pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom su isključeni

Nosioci najmanje jednog C alela (CC ili CT genotip) imali su veće dnevne doze takrolimusa šest meseci nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima TT genotipa. Međutim, razlika u dozi među ispitivanim grupama pacijenata se izgubila posle isključivanja nosioca CYP 3A5 *1/*3 genotipa iz ispitivanja, tj, kada poredimo nosioce CYP 3A5 *3/*3 genotipa i ABCB1 3435 C alela sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 i ABCB1 TT genotipa.

Poreg toga, u sprovedenom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima C0 takrolimusa između pacijenata sa različitim ABCB1 3435 genotipom (**Tabela 9**).

Tabela 9. Koncentracija C0 takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
C0 (ng/mL)				
CC+CT	8,99 ± 2,24	7,77 ± 2,57	7,35 ± 1,84	6,35 ± 1,53
	8,90 (7,15-10,98)	7,65 (6,05-9,18)	7,25 (5,78-8,35)	6,30 (5,10-7,80)
TT	10,19 ± 3,30	7,49 ± 1,74	7,11 ± 1,93	6,52 ± 0,90
	10,25 (6,93-12,28)	7,20 (7,10-7,60)	7,50 (5,38-8,60)	6,30 (5,83-6,68)
t / Z*	- 1,264	0,308	0,424	- 0,638*
p vrednost	0,213	0,759	0,674	0,524
CYP *3/*3, CC+CT [#]	8,97 ± 2,19	7,77 ± 2,61	7,62 ± 1,92	6,55 ± 1,61
	8,80(7,00-10,90)	7,70 (6,00-9,20)	7,60 (6,40-8,60)	6,50 (5,30-7,90)
CYP *3/*3, TT [#]	10,19 ± 3,30	7,49 ± 1,74	7,11 ± 1,93	6,52 ± 0,90
	10,25 (6,93-12,28)	7,20 (7,10-7,60)	7,50 (5,38-8,60)	6,30 (5,83-6,68)
t / Z*	- 1,239	0,301	0,724	- 0,306*
p vrednost	0,223	0,765	0,474	0,760

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; [#] Pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom su isključeni

U sprovedenom istraživanju, nosioci najmanje jednog C alela (CC ili CT genotipa) ABCB1 3435 polimorfizma imali su manje vrednosti C0 / D takrolimusa dve godine nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima TT genotipa. Međutim, kao i u slučaju dnevne doze takrolimusa, ova razlika se izgubila posle isključivanja nosioca CYP 3A5 *1/*3 genotipa iz ispitivanja, tj, kada poredimo nosioce CYP 3A5 *3/*3 genotipa i ABCB1 3435 C alela sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 i ABCB1 TT genotipa (**Tabela 10**).

Tabela 10. Odnos C0/D takrolimusa u zavisnosti od ABCB1 3435 genotipa pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije

PERIOD NAKON TRANSPLANTACIJE (MESECI)				
	1	6	12	24
C0/D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)				
CC+CT	82,75 ± 31,07	129,19 ± 81,49	178,93 ± 152,24	143,50 ± 74,95
	73,62 (61,33-105,06)	110,13 (80,27-156,60)	129,10 (82,97-177,53)	128,57 (83,58-182,24)
TT	107,40 ± 53,08	153,30 ± 66,73	162,45 ± 91,08	200,08 ± 88,05
	92,24 (76,54-137,13)	150,11 (107,10-189,93)	138,00 (92,45-216,61)	159,57 (149,34-274,36)
t / Z*	- 1,268	- 1,271*	- 0,416*	- 1,976*
p vrednost	0,240	0,204	0,677	0,048
CYP *3/*3, CC+CT [#]	88,28 ± 31,38	141,20 ± 83,93	205,03 ± 164,92	176,44 ± 144,65
	85,16 (65,00-105,69)	121,71 (85,44-158,60)	135,88 (104,27-214,65)	136,03 (111,83-207,20)
CYP *3/*3, TT [#]	107,40 ± 53,08	153,30 ± 66,73	162,45 ± 91,08	200,08 ± 88,05
	92,24 (76,54-137,13)	150,11 (107,10-189,93)	138,00 (92,45-216,61)	159,57 (149,34-274,36)
t / Z*	- 0,973	- 0,807*	- 0,322*	- 1,480
p vrednost	0,358	0,420	0,748	0,139

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; [#] Pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom su isključeni

Dodatno, multivarijantna linearna regresiona analiza pokazala je da CYP 3A5, ali ne i ABCB1 3435 genski polimorfizam, predstavlja nezavisan prediktor C0/D odnosa takrolimusa u periodu od 6 meseci do 2 godine posle transplantacije bubrega (**Tabela 11**). Predloženi model je prilagođen u odnosu na pol, starost i dnevnu dozu PRE. Nosioci CYP 3A5 *1 alela imali su manje vrednosti C0/D takrolimusa.

Tabela 11. Uticaj CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na C0/D odnos takrolimusa u toku dve godine nakon transplantacije bubrga

Prediktor	Beta	p vrednost	Model
CYP 3A5 (*1)	- 0,285	0,001	R = 0,35 R ² = 0,13
ABCB1 (TT)	- 0,055	0,537	p < 0,01

Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije

R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (C0/D), koja se može objasniti predloženim modelom; Model je prilagođen u odnosu na pol, starost ispitanika i dnevnu dozu PRE;

Pored efekata na C0 / D takrolimusa, ispitivan je uticaj CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na eGFR u istom vremenskom periodu nakon transplantacije bubrega (**Tabela 12**).

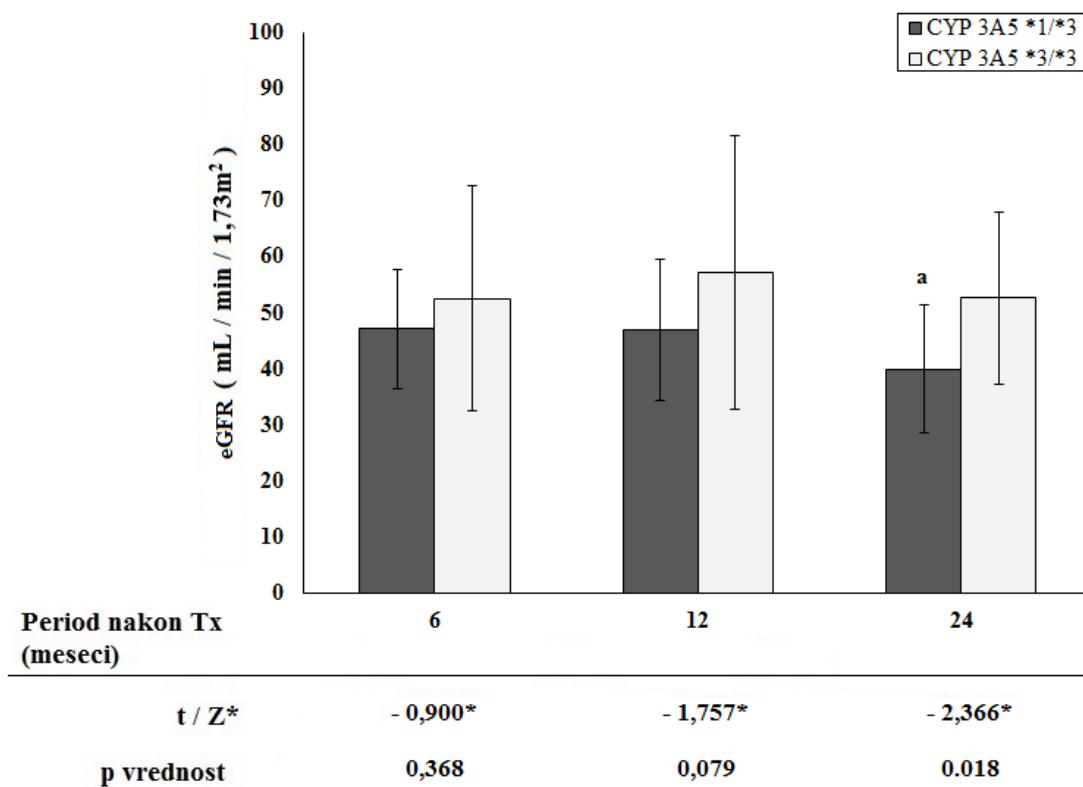
Tabela 12. Uticaj CYP 3A5 i ABCB1 genskog polimorfizma na eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega

Prediktor	Beta	p vrednost	Model
CYP 3A5 (*1)	- 0,256	0,003	R = 0,31 R ² = 0,096
ABCB1 (TT)	- 0,110	0,238	p < 0,009

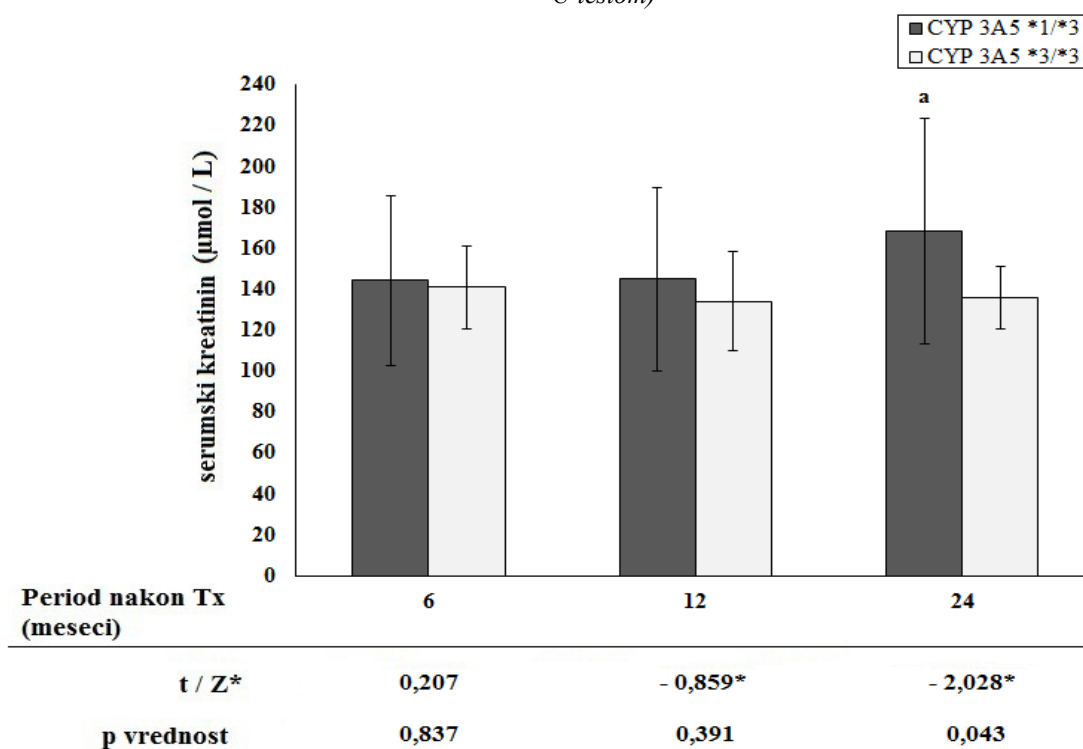
Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije; R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (eGFR), koja se može objasniti predloženim modelom; Model je prilagođen u odnosu na pol i starost ispitanika;

Rezultati multivarijantne linearne regresione analize pokazali su da CYP 3A5, ali ne i ABCB1 genski polimorfizam, može objasniti deo varijabilnost u eGFR vrednostima među pacijentima u periodu od 6 meseci do 2 godine nakon transplantacije. Predloženi model je prilagođen u odnosu na pol i starost ispitanika. Rezultati su pokazali da su nosioci CYP3A5 *1 alela imali slabiju bubrežnu funkciju u odnosu na ne – ekspresore (nosioce CYP 3A5 *3/*3) u posmatranom periodu.

Na osnovu rezultata multivarijantne analize, upoređivana je vrednost eGFR i koncentracija serumskog kreatinina u 6 - om, 12 - om i 24 - om mesecu nakon transplantacije bubrega u odnosu na CYP 3A5 genotip (**Grafikon 5 i Grafikon 6**). Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija; Procenjena GFR izračunata je korišćenjem MDRD formule.



Grafikon 5. Vrednosti eGFR u odnosu na CYP 3A5 genotip pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije bubrega (a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Man – Whitney U testom)



Grafikon 6. Koncentracija serumskog kreatinina u odnosu na CYP 3A5 genotip pacijenata u različitim periodima nakon transplantacije bubrega (a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

Dobijeni rezultati istraživanja su pokazali da su pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom imali nižu eGFR ($39,92 \pm 11,46$ mL/min/1,73m² vs. $52,64 \pm 15,32$ mL/min/1,73m², $p < 0,05$) i više vrednosti koncentracije serumskog kreatinina ($168,11 \pm 55,20$ µmol / L vs. $135,79 \pm 39,03$ µmol / L, $p < 0,05$) u poređenju sa pacijentima sa CYP 3A5 *3/*3 genotipom dve godine nakon transplantacije, ali ne posle šest ($47,07 \pm 10,66$ mL/min/1,73m² vs. $52,57 \pm 20,12$ mL/min/1,73m², $p = ns$; $144,23 \pm 41,30$ µmol / L vs. $140,94 \pm 43,05$ µmol / L, $p = ns$) i dvanaest meseci ($47,00 \pm 12,67$ mL/min/1,73m² vs. $57,09 \pm 24,45$ mL/min/1,73m², $p = ns$; $144,82 \pm 44,62$ µmol / L vs. $134,07 \pm 47,74$ µmol / L, $p = ns$) nakon transplantacije organa.

5.4. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa, koncentracije dimetilarginina i enzimskih markera oštećenja tubula kod transplantiranih pacijenata i zdravih ispitanika

U ispitivanju povezanosti parametara oksidativnog stresa, koncentracije dimetilarginina, enzimskih markera oštećenja tubula i parametara funkcije bubrega bili su uključeni pacijenti u kasnom post-transplantacionom periodu na terapiji takrolimusom i zdravi ispitanici (**Tabela 1**).

Rezultati poređenja parametara oksidativnog stresa u plazmi između pacijenata i kontrola prikazani su u **Tabeli 13**.

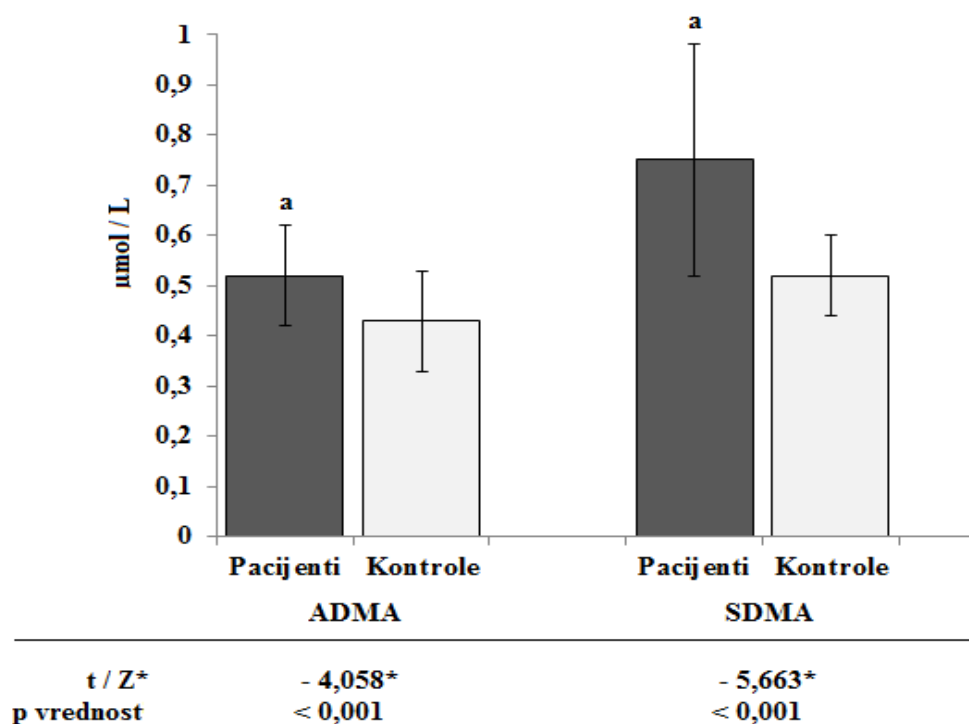
Table 13. Parametri oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z*	p
TBARS (µmol / L)	$7,10 \pm 1,90$ 6,63 (6,13 – 7,21)	$6,37 \pm 0,84$ 6,27 (5,84 – 6,54)	- 2,477*	0,013
AOPP (µmol / L)	$78,38 \pm 41,44$ 60,47 (50,57-98,29)	$32,53 \pm 12,21$ 29,10 (26,33-33,36)	- 6,121*	< 0,001
USH (µmol / L)	$406,22 \pm 165,92$ 359,11 (276,21-520,06)	$238,19 \pm 31,52$ 235,36 (212,31-264,48)	- 5,005*	< 0,001
SOD (U / mL)	$4,33 \pm 0,95$ 4,43 (3,56 – 5,06)	$4,73 \pm 1,21$ 4,71 (4,08 – 5,52)	- 1,544	0,127
KAT (kU/L)	$99,60 \pm 25,80$ 108,92 (82,53-121,91)	$81,64 \pm 34,28$ 69,52 (51,11-119,39)	- 2,275*	0,023

Podaci su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Koncentracije TBARS, USH i AOPP, kao aktivnost KAT u plazmi bile su statistički značajno veće kod pacijenata u poređenju sa kontrolama. Nije bilo razlike u aktivnosti SOD u plazmi među ispitivanim grupama ispitanika.

Takođe, pacijenti su imali više plazma koncentracije ADMA ($0,52 \pm 0,10$ vs. $0,43 \pm 0,10$) i SDMA ($0,75 \pm 0,23$ vs. $0,52 \pm 0,08$) u odnosu na zdrave ispitanike (**Grafikon 7**).



Grafikon 7. Koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika (a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

U **Tabeli 14.** je prikazana korelaciona analiza između parametara oksidativnog stresa u plazmi, koncentracije ADMA, SDMA i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom.

Tabela 14. Korelaciona analiza između parametara oksidativnog stresa u plazmi, ADMA, SDMA i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

	AOPP	USH	SOD	KAT	ADMA	SDMA	eGFR
TBARS	0,133 (0,388)	0,168 (0,254)	- 0,049 (0,734)	0,062 (0,691)	0,180 (0,221)	0,107 (0,467)	0,043 (0,763)
AOPP		- 0,230 (0,128)	0,138 (0,371)	- 0,231 (0,122)	- 0,206 (0,175)	- 0,220 (0,177)	- 0,097 (0,522)
USH			0,046 (0,756)	- 0,105 (0,492)	0,070 (0,631)	0,082 (0,572)	0,069 (0,631)
SOD				- 0,028 (0,857)	- 0,036 (0,806)	- 0,032 (0,831)	- 0,127 (0,375)
KAT					- 0,091 (0,553)	- 0,319* 0,032	0,218 (0,146)
ADMA						0,504** (< 0,001)	- 0,344* (0,013)
SDMA							- 0,680** (< 0,001)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: p < 0,05; **: p < 0,01

Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da parametri oksidativnog stresa u plazmi ne koreliraju između sebe, sa koncentracijama dimetilarginina i eGFR. Jedino je aktivnost KAT značajno korelirala sa SDMA. Suprotno, vrednosti ADMA i SDMA su pokazale značajnu negativnu korelaciju s parametrom funkcije bubrega.

Poređenje parametara oksidativnog stresa u eritrocitima između pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika prikazano je u **Tabeli 15.**

Tabela 15. Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z*	p
TBARS (nmol / g HGB)	46,93 ± 11,69 44,24 (40,25 – 51,62)	42,30 ± 10,17 40,11 (35,04 – 46,75)	- 2,265*	0,023
SOD (U / g HGB)	1751,72 ± 835,85 1539,87 (1295,80-1912,20)	1395,62 ± 273,42 1361,14 (1177,60-1504,60)	- 2,261*	0,008
GPX (U / g HGB)	59,95± 18,46 59,93 (44,86 – 74,11)	73,66± 13,69 72,15 (65,16 – 79,48)	- 4,048*	< 0,001
GR (U / g HGB)	15,27± 4,59 15,07 (11,83 – 18,35)	17,20± 4,19 16,57 (13,50 – 19,99)	- 2,026	0,046
GSH (μmol / g HGB)	14,98± 3,40 14,45 (12,61 – 17,00)	9,91± 1,13 9,93 (9,15 – 10,73)	- 7,097*	< 0,001

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da pacijenti sa transplantiranim bubregom u dugoročnom periodu nakon transplantacije imaju statistički značajno više koncentracije TBARS i GSH, kao i značajno višu aktivnost SOD u eritrocitima u poređenju sa zdravim ispitanicima. Nasuprot tome, aktivnosti GPX i GR u eritrocitima je bila niža kod pacijenata u odnosu na kontrole.

Pored toga, korelaciona analiza je pokazala da parametri oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom pokazuju značajnu međusobnu povezanost, kao i sa vrednostima eGFR (**Tabela 16**).

Tabela 16. Korelaciona analiza između parametara oksidativnog stresa u eritrocitima i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

	SOD	GPX	GR	GSH	eGFR
TBARS	0,306 (0,029)*	0,412 (0,003)**	0,194 (0,172)	0,379 (0,009)**	- 0,292 (0,037)*
SOD		- 0,113 (0,427)	0,361 (0,009)**	0,459 (0,001)**	- 0,413 (0,002)**
GPX			0,458 (0,001)**	0,205 (0,166)	- 0,057 (0,686)
GR				0,183 (0,218)	0,045 (0,752)
GSH					- 0,171 (0,251)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: p < 0,05; **: p < 0,01

Naime, koncentracija TBARS u eritrocitima korelirala je pozitivno sa aktivnošću SOD, GPX i koncentracijom GSH u eritrocitima, ali negativno sa vrednostima eGFR. Pored toga, eritrocitna aktivnost SOD je korelirala pozitivno sa aktivnošću GR i koncentracijom GSH u eritrocitima i negativno sa eGFR, dok je aktivnost GPX u eritrocitima korelirala pozitivno sa aktivnošću GR.

U sprovedenom istraživanju određivani su parametri oksidativnog stresa u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Dodatno u cilju procene oštećenja tubula u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, izmerena je aktivnost ektoenzima (brush border enzima) u urinu (**Tabela 17**).

Tabela 17. Parametri oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata s transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

	PACIJENTI SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	ZDRAVI ISPITANICI	t / Z*	p
TBARS ($\mu\text{mol/mM KRE}$)	$1,39 \pm 0,52$ 1,34 (1,03 – 1,62)	$0,66 \pm 0,23$ 0,65 (0,51 – 0,76)	- 5,655*	< 0,001
USH ($\mu\text{mol/mM KRE}$)	$3,87 \pm 1,53$ 3,88 (2,88 – 4,81)	$2,32 \pm 0,89$ 2,26 (1,74 – 2,83)	5,066	< 0,001
RCD ($\mu\text{mol/mM KRE}$)	$30,12 \pm 13,30$ 28,42 (22,52 – 37,01)	$12,96 \pm 6,91$ 10,53 (9,03 – 17,21)	- 5,283*	< 0,001
NAG (U/mM KRE)	$1,66 \pm 1,28$ 1,34 (0,84 – 2,03)	$0,47 \pm 0,22$ 0,45 (0,30 – 0,65)	- 6,301*	< 0,001
DPP IV (U/ mM KRE)	$0,48 \pm 0,24$ 0,48 (0,29 – 0,60)	$0,27 \pm 0,21$ 0,18 (0,12 – 0,36)	- 4,381*	< 0,001
APN (U/ mM KRE)	$0,31 \pm 0,27$ 0,25 (0,18 – 0,33)	$0,15 \pm 0,11$ 0,10 (0,08 – 0,18)	- 4,607*	< 0,001
GGT (U/ mM KRE)	$4,43 \pm 2,65$ 3,70 (2,45 – 5,30)	$4,70 \pm 1,31$ 4,68 (4,50 – 5,22)	- 1,152*	0,249

Podaci su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da je koncentracija svih parametara oksidativnog stresa i aktivnost ektoenzima značajno viša kod pacijenata u poređenju s kontrolama, izuzev aktivnosti GGT u urinu, gde nije bilo razlike između ispitivanih grupa.

Takođe, sprovedena je i korelaciona analiza ispitivanih parametara u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom (**Tabela 18**).

Tabela 18. Korelaciona analiza parametara oksidativnog stresa, aktivnosti ektoenzima u urinu i eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

	USH	RCD	NAG	DPP IV	APN	GGT	eGFR
TBARS	0,784** (< 0,001)	0,654** (< 0,001)	0,335* (0,030)	0,776** (< 0,001)	0,812** (< 0,001)	- 0,311 (0,089)	0,329* (0,033)
USH		0,593** (< 0,001)	0,071 (0,658)	0,708** (< 0,001)	0,686** (< 0,001)	- 0,075 (0,687)	0,337* (0,031)
RCD			0,401** (0,008)	0,773** (< 0,001)	0,664** (< 0,001)	- 0,325 (0,075)	- 0,011 (0,946)
NAG				0,337* (0,027)	0,313* (0,041)	- 0,163 (0,372)	- 0,089 (0,571)
DPP IV					0,840** (< 0,001)	- 0,177 (0,332)	0,202 (0,195)
APN						- 0,238 (0,190)	0,262 (0,089)
GGT							0,292 (0,075)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Koncentracije TBARS korelirale su pozitivno s koncentracijma USH i RCD kao i sa aktivnostima NAG, DPP IV i APN u urinu pacijenata. Takođe, izmerene vrednosti TBARS u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom korelirale su pozitivno sa klirensom kreatinina. Vrednosti koncentracija USH i RCD u urinu korelirale su međusobno pozitivno, kao sa vrednostima DPP IV i APN, dok su dodatno koncentracije RCD pokazale značajnu korelaciju sa aktivnostima NAG u urinu. Koncentracija USH u urinu korelirala je pozitivno sa eGFR. Izmerene aktivnosti ektoenzima su međusobno pozitivno korelirale, osim GGT, koja nije pokazala značajnu povezanost sa ispitivanim parametrima.

5.5. Ispitivanje uticaja takrolimusa i polimorfizma CYP 3A5 i ABCB1 gena na parametare oksidativnog stresa, koncentraciju dimetilarginina i enzimske markere oštećenja tubula kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

U sprovedenom istraživanju bili su uključeni pacijenti u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega na terapiji takrolimusom (**Tabela 1**).

U **Tabeli 19.** su prikazani rezultati ispitivanja uticaja CYP 3A5 i ABCB1 3435 polimorfizama na dozni režim, koncentraciju C0 i C0/D odnos takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, koji su učestvovali u sprovedenom istraživanju.

Tabela 19. Dnevna doza, koncentracija C0 i C0/D odnos takrolimusa kod pacijenata s različitim CYP3A5 i ABCB1 3435 genotipom

CYP3A5 genotip	*1 / *3 (n = 11)	*3 / *3 (n = 61)	t / Z*	p
Doza (mg / kg / dan)	0,08 ± 0,06 0,06 (0,04 – 0,09)	0,04 ± 0,01 0,04(0,03 – 0,05)	- 2,010*	0,044
C0 (ng / mL)	6,28 ± 1,26 6,30(5,40 – 7,25)	6,73 ± 1,59 6,50(5,60 – 7,90)	- 0,746	0,460
C0/D (ng mL⁻¹ / mg kg⁻¹dan⁻¹)	113,57 ± 50,68 104,13(73,08 – 151,15)	179,88 ± 76,08 173,49(118,08 – 221,10)	- 2,331	0,025
ABCB1 3435 genotip	CC(16) + CT (41)	TT (15)	t / Z*	p
Doza (mg / kg / dan)	0,05 ± 0,03 0,04(0,03 – 0,06)	0,03 ± 0,01 0,03(0,02 – 0,04)	- 2,093*	0,036
C0 (ng / mL)	6,80 ± 1,55 6,50(5,70 – 7,90)	5,98 ± 1,36 6,00(4,95 – 6,85)	1,383	0,174
C0/D (ng mL⁻¹ / mg kg⁻¹dan⁻¹)	157,22 ± 68,82 150,48(105,62 – 193,05)	207,04 ± 95,0588 225,01(113,71 – 260,80)	- 1,701	0,097

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; n – broj pacijenata određenog genotipa, koji su uključeni u ispitivanje

Pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom imali su veću dnevnu dozu i manju vrednosti C0 / D takrolimusa u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa. Takođe, pacijenti sa ABCB1 3435 TT genotipom imali su manju dnevnu dozu takrolimusa u odnosu na ostale pacijente. Nije bilo razlike u koncentraciji C0 takrolimusa među ispitivanim grupama pacijenata.

Ovo farmakogenetičko ispitivanje prethodilo je istraživanju, koje je imalo za cilj da proceni uticaj dnevne doze, koncentracije C0 i C0/D odnosa takrolimusa, kao i polimorfizama CYP3A5 i ABCB1 gena na parametre oksidativnog stresa, oštećenja tubula i koncentraciju dimetilarginina.

U **Tabeli 20.** je prikazana korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i C0/D odnosa takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa i koncentracijom ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Dobijeni rezultati su pokazali da jedino aktivnost SOD u plazmi pozitivno korelira sa dnevnom dozom takrolimusa, ukazujući na potencijalni antioksidativni potencijal ovog leka. Nije bilo drugih značajnih korelacija među ispitivanim parametrima.

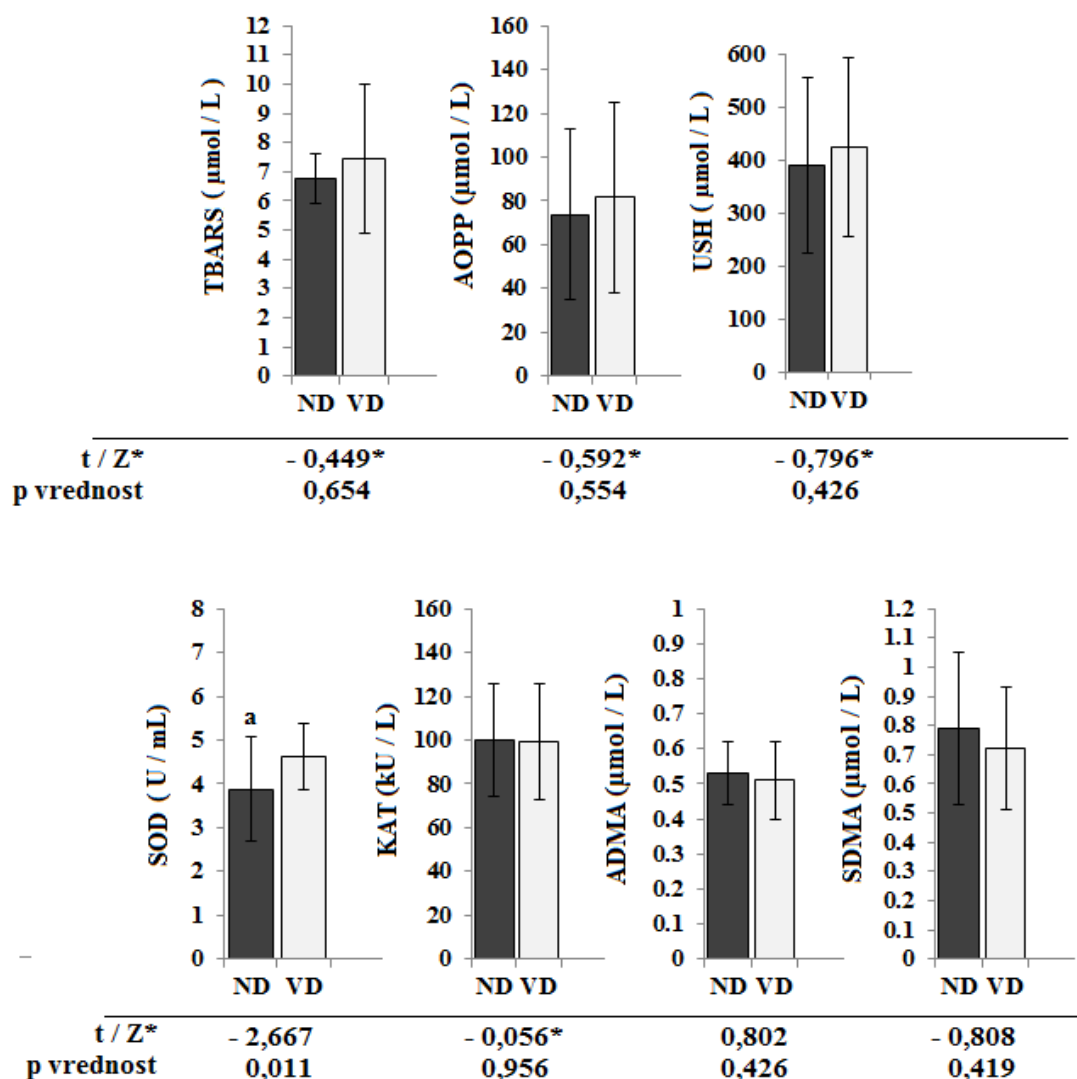
Tabela 20. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa, koncentracijom ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom

	TBARS	AOPP	USH	SOD	KAT	ADMA	SDMA
Doza (mg / kg / dan)	0,097 (0,496)	0,048 (0,748)	0,141 (0,330)	0,316* (0,023)	- 0,172 (0,248)	0,026 (0,858)	0,262 (0,072)
C0 (ng / mL)	0,164 (0,246)	- 0,010 (0,946)	- 0,160 (0,268)	0,176 (0,211)	0,162 (0,275)	0,191 (0,189)	0,050 (0,733)
C0 / D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)	- 0,045 (0,751)	- 0,054 (0,718)	- 0,135 (0,352)	- 0,219 (0,119)	0,242 (0,102)	0,053 (0,721)	- 0,129 (0,384)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: p < 0,05;

U sprovedenom istraživanju kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u dugoročnom periodu nakon transplantacije i stabilnom funkcijom grafta, nije bilo značajnih promena u dozi takrolimusa u toku perioda posmatranja. Pacijenti kod kojih su promene dnevne doze bile značajne isključeni su iz ispitivanja, koja su podrazumevala dozu ili koncentraciju leka. U skladu s tim, medijana dnevne doze takrolimusa pacijenata je bila nepromenjena i iznosila je 0,04 mg / kg. Na osnovu vrednosti medijane dnevne doze takrolimusa pacijenti su podeljeni u dve grupe: grupa ND - pacijenti sa nižom dozom takrolimusa, < 0,04 mg/kg / dan i grupa VD - pacijenti sa višom dozom takrolimusa, ≥ 0,04 mg/kg/dan.

Na **Grafikonu 8.** su prikazani parametri oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom na osnovu dnevne doze takrolimusa.



Grafikon 8. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u plazmi u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da su pacijenti sa višom dozom takrolimusa imali i veću plazma aktivnost SOD ($4,61 \pm 0,76$ vs. $3,87 \pm 1,19$; $p = 0,011$), što je potvrdilo rezultate korelacione analize.

Pored toga upoređivani su parametri oksidativnog oštećenja u plazmi u odnosu na CYP 3A5 i ABCB1 3435 genotip pacijenta sa transplantiranim bubregom, ali nije bilo statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa (**Tabela 21 i Tabela 22**).

Tabela 21. Vrednosti parametara oksidativnog stresa, koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip

	CYP 3A5 *1 / *3	CYP 3A5 *3 / *3	t / Z*	p
TBARS ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	7,81 $\pm$ 2,64 7,07 (6,42-7,86)	6,97 $\pm$ 1,75 6,56 (6,09-7,07)	- 1,269*	0,204
AOPP ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	88,90 $\pm$ 45,22 68,98(58,12-112,13)	76,54 $\pm$ 41,08 60,29(48,76-98,29)	- 0,956*	0,339
USH ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	511,06 $\pm$ 203,48 517,63(353,04 - 586,38)	386,71 $\pm$ 152,94 322,71(272,16 - 471,12)	- 1,787*	0,074
SOD (U/mL)	4,39 $\pm$ 1,22 4,66 (3,97-5,06)	4,21 $\pm$ 1,05 4,40 (3,54-5,00)	0,414	0,680
KAT (kU/L)	86,09 $\pm$ 35,65 86,82(53,20-124,42)	101,63 $\pm$ 23,93 110,70(86,61-121,91)	- 0,538*	0,590
ADMA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	0,52 $\pm$ 0,08 0,50(0,48-0,57)	0,52 $\pm$ 0,11 0,50(0,43-0,59)	- 0,071	0,944
SDMA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	0,75 $\pm$ 0,16 0,70(0,64-0,83)	0,75 $\pm$ 0,24 0,70(0,59-0,87)	- 0,460*	0,646

Podaci su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Tabela 22. Vrednosti parametara oksidativnog stresa, koncentracije ADMA i SDMA u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip

	ABCB1 3435 CC + CT	ABCB1 3435 TT	t / Z*	p
TBARS ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	7,19 $\pm$ 2,05 6,63 (6,20-7,21)	6,81 $\pm$ 0,82 6,56 (6,24-7,25)	- 0,104*	0,917
AOPP ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	80,72 $\pm$ 44,25 60,11(50,74-99,57)	72,50 $\pm$ 29,27 68,13(55,43-82,11)	- 0,069*	0,945
USH ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	424,40 $\pm$ 171,28 382,15(273,37 - 557,26)	321,36 $\pm$ 108,92 316,24(291,97 - 359,10)	- 1,310*	0,190
SOD (U/mL)	4,32 $\pm$ 0,96 4,43 (3,59-4,92)	3,76 $\pm$ 1,51 3,62 (2,65-5,15)	1,362	0,179
KAT (kU/L)	98,01 $\pm$ 25,73 103,05(82,53-121,91)	106,15 $\pm$ 26,53 117,09(114,57-121,07)	- 0,692*	0,489
ADMA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	0,52 $\pm$ 0,11 0,50(0,43-0,59)	0,53 $\pm$ 0,07 0,53(0,48-0,56)	- 0,162	0,872
SDMA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	0,75 $\pm$ 0,24 0,70(0,59-0,85)	0,74 $\pm$ 0,21 0,71(0,64-0,82)	- 0,250*	0,803

Podaci su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

U **Tabeli 23.** je prikazana korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i C0/D odnosa takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Tabela 23. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom

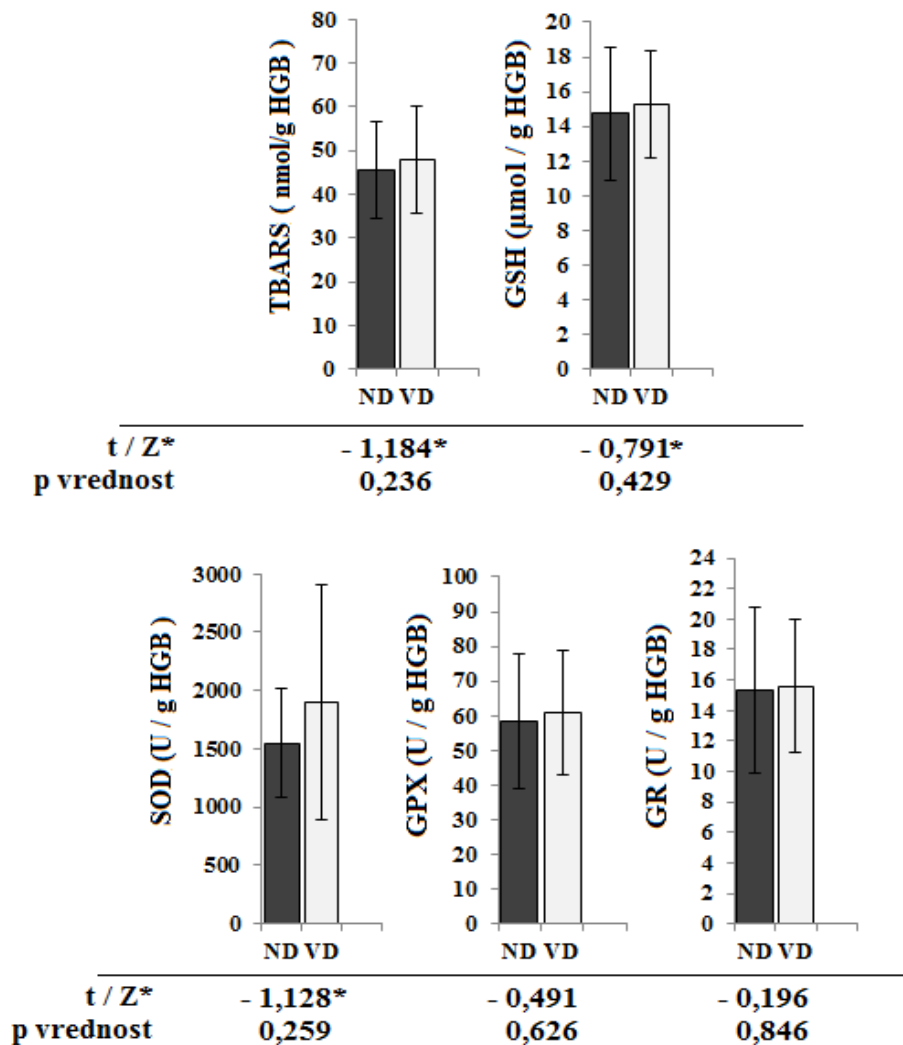
	TBARS	SOD	GPX	GR	GSH
Doza (mg / kg / dan)	0,166 (0,240)	0,038 (0,786)	0,193 (0,167)	- 0,071 (0,612)	0,325* (0,028)
C0 (ng / mL)	- 0,122 (0,388)	- 0,059 (0,673)	- 0,229 (0,100)	- 0,159 (0,254)	- 0,079 (0,603)
C0 / D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ day ⁻¹)	- 0,217 (0,122)	- 0,104 (0,458)	- 0,333* (0,015)	- 0,054 (0,699)	- 0,371* (0,011)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: p < 0,05;

Dobijeni rezultati pokazuju da dnevna doza takrolimusa pozitivno korelira sa nivoom GSH, dok C0 / D odnos negativno korelira sa aktivnošću GPX i GSH u eritrocitima.

Ovo znači da su pacijenti sa manjom vrednošću C0 / D takrolimusa, odnosno ispitanici kojima je bila potrebna veća doza takrolimusa kako bi održali optimalnu terapijsku koncentraciju leka u krvi imali veću aktivnost GPX i nivoe GSH u eritrocitima.

Rezultati dobijeni poređenjem parametara oksidativnog oštećenja u eritrocitima nisu bili statistički značajni između pacijenata sa različitim doznim režimima takrolimusa, < 0,04 mg/kg/dan i ≥ 0,04 mg/kg/dan (**Grafikon 9.**) i različitim CYP 3A5 (**Tabela 24.**) i ABCB1 3435 (**Tabela 25.**).



Grafikon 9. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (* : vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

Tabela 24. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip

	CYP 3A5 *1 / *3	CYP 3A5 *3 / *3	t / Z*	p
TBARS	46,57 ± 10,21	46,99 ± 12,04		
(nmol/g HGB)	45,48 (40,07-53,70)	43,64 (40,25-51,62)	- 0,273*	0,785
SOD	1406,82 ± 362,15	1811,70 ± 881,84		
(U / g HGB)	1365,62 (1112,60-1661,20)	1571,30 (1330,30-1965,50)	- 1,510*	0,131
GPX	64,42 ± 11,94	59,17 ± 19,36		
(U / g HGB)	67,85 (53,32-74,73)	59,49 (43,65-71,12)	0,739	0,463
GR	14,70 ± 5,64	15,62 ± 4,71		
(U / g HGB)	12,66 (10,58-19,48)	15,29 (11,91-18,35)	- 0,495	0,623
GSH	13,77 ± 3,79	15,18 ± 3,34		
(μmol / g HGB)	12,63 (11,62-14,71)	14,48 (12,95-17,53)	- 1,286*	0,199

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; * : vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Tabela 25. Vrednosti parametara oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip

	ABCB1 3435 CC + CT	ABCB1 3435 TT	t / Z*	p
TBARS (nmol/g HGB)	47,22 ± 12,29 43,93 (39,23-51,69)	45,50 ± 8,63 44,63 (43,03-47,55)	- 0,071*	0,943
SOD (U / g HGB)	1780,05 ± 897,59 1532,52 (1313,00-1938,80)	1627,08 ± 493,69 1564,11 (1289,00-1691,40)	- 0,067*	0,947
GPX (U / g HGB)	61,84 ± 18,69 60,52 (50,05-74,73)	51,64 ± 15,55 49,11 (38,51-66,00)	1,601	0,116
GR (U / g HGB)	15,86 ± 4,88 15,29 (12,03-18,49)	13,83 ± 4,36 13,08 (10,54-16,64)	1,210	0,232
GSH (μmol / g HGB)	15,18 ± 3,20 14,46 (13,12-16,64)	14,20 ± 4,21 11,83 (10,62-18,70)	- 1,240*	0,215

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

U Tabeli 26. je prikazana korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i C0 / D odnosa takrolimusa i parametara oksidativnog stresa i enzimskih markera oštećenja tubula u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom.

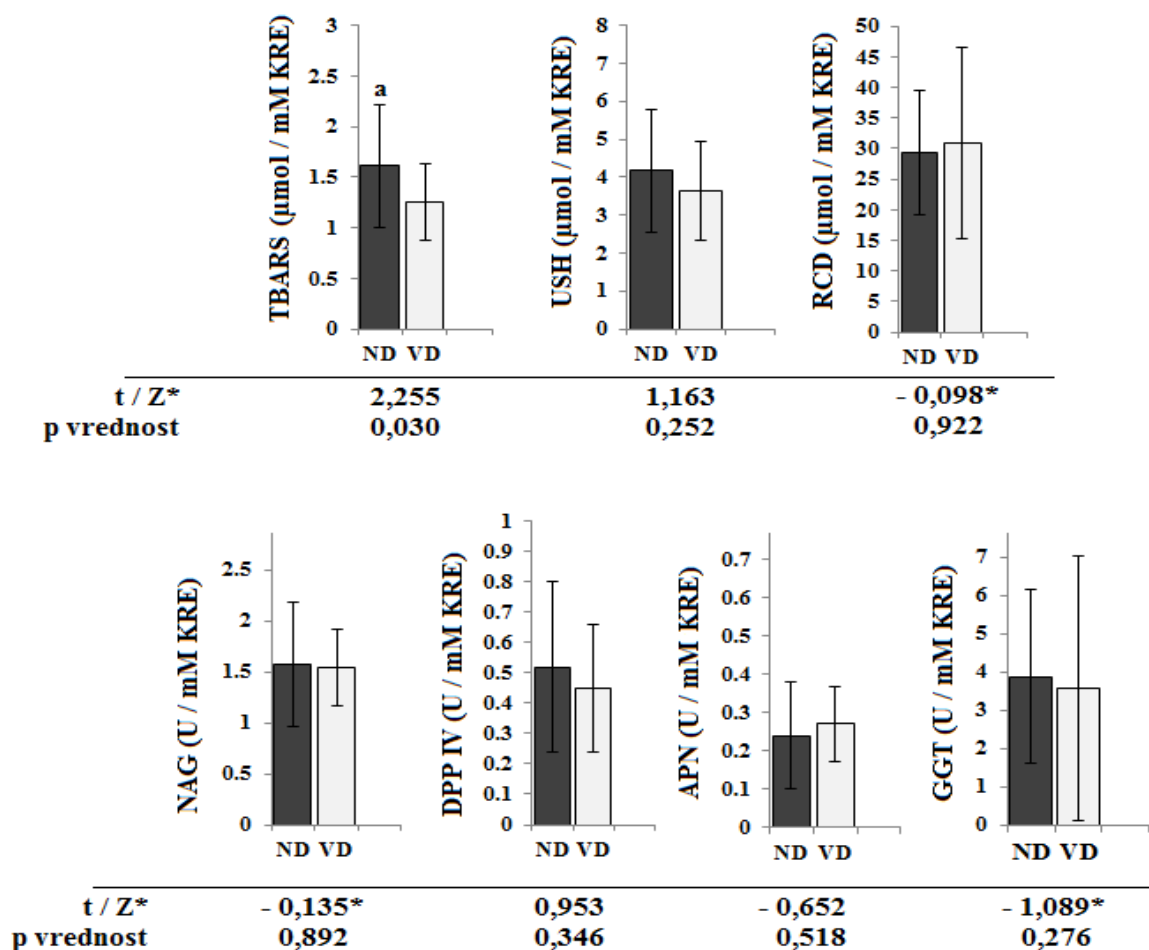
Tabela 26. Korelaciona analiza između dnevne doze, koncentracije C0 i odnosa C0 / D takrolimusa sa parametrima oksidativnog stresa i aktivnošću ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom

	TBARS	USH	RCD	NAG	DPP IV	APN	GGT
Doza (mg / kg / dan)	- 0,188 (0,245)	- 0,019 (0,906)	0,195 (0,217)	0,139 (0,372)	0,032 (0,835)	0,182 (0,249)	- 0,122 (0,466)
C0 (ng / mL)	- 0,134 (0,408)	- 0,098 (0,535)	- 0,121 (0,447)	- 0,159 (0,309)	- 0,137 (0,376)	- 0,031 (0,844)	0,007 (0,967)
C0 / D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)	0,018 (0,913)	- 0,141 (0,372)	- 0,285 (0,068)	- 0,163 (0,297)	- 0,166 (0,282)	- 0,204 (0,195)	0,106 (0,526)

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom;

Dobijeni rezultati pokazuju da nema značajnih korelacija između ispitivanih farmakokinetičkih parametara takrolimusa i parametara određenih u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Grafikon 10. prikazuje rezultate dobijene poređenjem parametara oksidativnog stresa i enzimskih markera oštećenja tubula u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na dozni režim takrolimusa.



Grafikon 10. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu u odnosu na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

Dobijeni rezultati pokazuju da pacijenti sa nižom dnevnom dozom takrolimusa (< 0,04 mg / kg / dan) imaju povećanu koncentraciju TBARS u urinu ($1,61 \pm 0,61$ vs. $1,25 \pm 0,38$ μmol / mM KRE; $p = 0,030$).

Poređenje urinarnih parametara kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 i ABCB1 3435 genotip prikazani su u **Tabeli 27.** i **28.** Međutim nije bilo značajnih razlika u vrednosti parametara između ispitivanih grupa pacijenata.

Tabela 27. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na CYP 3A5 genotip

	CYP 3A5 *1 / *3	CYP 3A5 *3 / *3	t / Z*	p
TBARS	1,34 ± 0,55	1,40 ± 0,52		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	1,37 (0,92 – 1,58)	1,33 (1,03 – 1,62)	- 0,230*	0,818
USH	4,10 ± 1,86	3,83 ± 1,49		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	4,13 (2,95 – 5,16)	3,88 (2,92 – 4,51)	0,423	0,674
RCD	28,68 ± 12,52	30,40 ± 13,60		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	29,19 (21,84 – 36,54)	28,09 (22,52 – 37,01)	- 0,033*	0,974
NAG	1,29 ± 1,10	1,61 ± 1,06		
(U / mM KRE)	1,19 (0,80 – 1,24)	1,36 (0,87 – 2,03)	- 1,124*	0,261
DPP IV	0,42 ± 0,24	0,50 ± 0,24		
(U / mM KRE)	0,42 (0,21 – 0,53)	0,50 (0,32 – 0,61)	- 0,860	0,395
APN	0,25 ± 0,15	0,26 ± 0,11		
(U / mM KRE)	0,22 (0,14 – 0,34)	0,26 (0,18 – 0,33)	- 0,481*	0,630
GGT	3,41 ± 2,02	3,91 ± 3,00		
(U / mM KRE)	2,37 (2,19 – 5,02)	3,07 (2,10 – 5,11)	- 0,169*	0,865

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

Tabela 28. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i aktivnosti ektoenzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na ABCB1 3435 genotip

	CYP 3A5 *1 / *3	CYP 3A5 *3 / *3	t / Z*	p
TBARS	1,37 ± 0,53	1,49 ± 0,49		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	1,33 (1,03 – 1,60)	1,42 (1,09 – 1,81)	- 0,624*	0,533
USH	3,92 ± 1,54	3,69 ± 1,58		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	3,93 (2,88 – 4,81)	3,81 (3,04 – 4,85)	0,379	0,706
RCD	30,54 ± 14,21	28,27 ± 8,73		
($\mu\text{mol} / \text{mM KRE}$)	29,19 (22,17 – 37,16)	25,51 (22,91 – 32,95)	- 0,312*	0,755
NAG	1,63 ± 1,13	1,22 ± 0,63		
(U / mM KRE)	1,32 (0,84 – 2,12)	1,29 (0,78 – 1,68)	- 0,562*	0,574
DPP IV	0,49 ± 0,25	0,45 ± 0,20		
(U / mM KRE)	0,51 (0,29 – 0,61)	0,41 (0,33 – 0,51)	0,436	0,665
APN	0,26 ± 0,13	0,27 ± 0,09		
(U / mM KRE)	0,24 (0,17 – 0,33)	0,25 (0,19 – 0,35)	- 0,279	0,781
GGT	3,94 ± 2,96	3,48 ± 1,86		
(U / mM KRE)	3,21 (2,10 – 5,13)	2,75 (2,35 – 4,60)	- 0,101*	0,920

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom;

5.6. Ispitivanje uticaja dnevne doze takrolimusa, polimorfizma CYP 3A5 i ABCB1 gena, parametara oksidativnog stresa i koncentracije dimetilarginina, na brzinu eGFR nakon transplantacije bubrega

U **Tabeli 29.** je prikazana korelaciona analiza između farmakokinetičkih parametara takrolimusa i eGFR pacijenata u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Rezultati ispitivanja su dobijeni na osnovu podataka sakupljenim u periodu od dve godine praćenja pacijenata.

Table 29. Korelaciona analiza između farmakokinetičkih parametara takrolimusa eGFR kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

	Doza (mg / kg / dan)	C0 (ng / mL)	C0 / D (ng mL ⁻¹ / mg kg ⁻¹ dan ⁻¹)
eGFR mL / min / 1,73 m ²	- 0,335 (0,017)*	- 0,136 (0,345)	0,281 (0,048)*

Podaci su izraženi kao korelacioni koeficijent (Pearson - ov ili Spearman - ov) sa vrednostima p prikazanim u zagradama „()” za svaku korelaciju među ispitivanim parametrima; p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, *: p < 0,05;

Dnevna doza i C0 / D odnos takrolimusa pacijenata u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega pokazuju statistički značajnu korelaciju sa eGFR. Pacijenti sa većom dnevnom dozom leka imali su slabiju bubrežnu funkciju.

Multivarijantna linearna regresiona analiza primenjena je u cilju procene uticaja dnevne doze takrolimusa i/ili CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama i/ili oksidativnog stresa na varijabilnost u eGFR među pacijentima. Parametri dobijeni iz različitih materijala (plazme, eritrocita i urina), posmatrani su pojedinačno. U istraživanju je učestvovalo 72 pacijenta sa transplantiranim bubregom (Tabela 1).

U **Tabeli 30.** su prikazani rezultati multivarijantne linearne regresione analize, koji su uključivali eGFR pacijenata kao zavisnu promenljivu i ispitivane parametre u plazmi, dnevnu dozu takrolimusa i CYP3A5 i ABCB1 genotip kao nezavisne promenljive.

Tabela 30. Efekat parametara oksidativnog stresa u plazmi, koncentracije dimetilarginina, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

Model	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
1	TBARS (μmol / L)	0,095	0,521	10,8	0,286
2	AOPP (μmol / L)	- 0,086	0,564	11,1	0,283
3	USH (μmol / L)	0,016	0,923	10,4	0,332
4	SOD (U / mL)	- 0,062	0,672	10,3	0,312
5	KAT (kU / L)	0,238	0,122	15,4	0,127
6	ADMA (μmol / L)	- 0,444	0,003	52,1	0,008
7	SDMA (μmol / L)	- 0,698	< 0,001	55,1	< 0,001
8	Dnevna doza takrolimusa(mg/kg)	- 0,387	0,005	24,8	0,011
9	CYP3A5 *1/*3 genotip	- 0,233	0,107	15,0	0,113
10	ABCB1 3435 TT genotip	0,161	0,284	12,2	0,200
	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
Krajnji model	ADMA	- 0,160	0,252		
	SDMA	- 0,567	< 0,001	65,4	< 0,001
	Dnevna doza takrolimusa (mg/kg)	- 0,329	0,004		

Modeli (1 – 10) i krajnji model bili su prilagođeni na pol, starost i period nakon transplantacije.

* nivo statističke značajnosti prediktora u okviru predloženog modela; **nivo statističke značajnosti predloženog modela; Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije; R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (eGFR), koja se može objasniti predloženim modelom;

U prvoj fazi, u modelima od 1 do 10, ispitivan je pojedinačni efekat svakog prediktora ponaosob na varijabilnost eGFR. Značajni prediktori iz prve faze bili su deo krajnjeg modela. Značajni prediktori iz prve faze bili su dnevna doza takrolimusa, koncentracija ADMA i SDMA. Krajnji model potvrdio je značajnost dnevne doze takrolimusa i SDMA, kao nezavisnih prediktora eGFR, dok ADMA nije pokazala značajnost u krajnjem modelu. Pored toga, dnevna doza takrolimusa i koncentracija SDMA imaju negativan efekat na GFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.

Rezultati multivarijantne linearne regresione analize, koji su uključivali eGFR pacijenata kao zavisnu promenljivu i ispitivane parametre u eritrocitima, dnevnu dozu takrolimusa i CYP3A5 i ABCB1 genotip kao nezavisne promenljive prikazani su u **Tabeli 31**.

Tabela 31. Efekat parametara oksidativnog stresa u eritrocitima, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

Model	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
1	TBARS (nmol / g HGB)	- 0,390	0,015	25,4	0,013
2	SOD (U / g HGB)	- 0,198	0,170	17,9	0,054
3	GPX (U / g HGB)	- 0,098	0,571	15,3	0,100
4	GR (U / g HGB)	0,007	0,967	14,5	0,119
5	GSH (μmol / g HGB)	- 0,271	0,081	17,5	0,035
6	Dnevna doza takrolimusa(mg/kg)	- 0,387	0,005	24,8	0,011
7	CYP3A5 *1/*3 genotip	- 0,233	0,107	15,0	0,113
8	ABCB1 3435 TT genotip	0,161	0,284	12,2	0,200
	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
Krajnji model	TBARS _{Er} (nmol / g HGB)	- 0,365	0,017	33,7	0,004
	Dnevna doza takrolimusa (mg/kg)	- 0,294	0,029		

Modeli (1 – 8) i krajnji model bili su prilagođeni na pol, starost i period nakon transplantacije.

* nivo statističke značajnosti prediktora u okviru predloženog modela; **nivo statističke značajnosti predloženog modela; Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije; R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (eGFR), koja se može objasniti predloženim modelom;

Značajni parametri u prvoj fazi (Modeli 1 - 8) bili su doza takrolimusa i TBARS, čija je značajnost kao nezavisnih prediktora eGFR, potvrđena u krajnjem modelu, Pored toga, oba parametra negativno utiču na eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.

U **Tabeli 32.** su prikazani rezultati multivarijantne linearne regresione analize, koji su uključivali eGFR pacijenata kao zavisnu promenljivu i ispitivane parametre u urinu, dnevnu dozu takrolimusa i CYP3A5 i ABCB1 genotip kao nezavisne promenljive.

Tabela 32. Efekat parametara oksidativnog stresa u urinu, dnevne doze takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 3435 genskih polimorfizama na varijabilnost eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

Model	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
1	TBARS (μmol / mM CRE)	0,338	0,032	23,1	0,036
2	USH (μmol / mM CRE)	0,406	0,011	27,6	0,015
3	RCD (μmol / mM CRE)	- 0,068	0,658	13,6	0,222
4	Dnevna doza takrolimusa(mg/kg)	- 0,387	0,005	24,8	0,011
5	CYP3A5 *1/*3 genotip	- 0,233	0,107	15,0	0,113
6	ABCB1 3435 TT genotip	0,161	0,284	12,2	0,200
	Prediktor	Beta	p *	R ² (%)	p **
Krajnji model	TBARS(μmol / mM CRE)	0,053	0,752	46,4	< 0,001
	USH(μmol / mM CRE)	0,341	0,046		
	Dnevna doza takrolimusa(mg/kg)	- 0,429	0,002		

Modeli (1 – 6) i krajnji model bili su prilagođeni na pol, starost i period nakon transplantacije.

* nivo statističke značajnosti prediktora u okviru predloženog modela; **nivo statističke značajnosti predloženog modela; Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije; R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (eGFR), koja se može objasniti predloženim modelom;

Značajni parametri iz prve faze (koncentracije TBARS i USH u urinu i dnevna doza takrolimusa) bili su uključeni u krajnji model. Krajnji model potvrdio je značajnost USH i dnevne doze takrolimusa, kao nezavisnih prediktora eGFR. Dnevna doza takrolimusa negativno utiče na GFR, dok postoji pozitivna povezanost USH određenih u urinu i funkcije bubrega.

5.7. Ispitivanje uticaja SOD2 Ala –9 Val i GPX1 Pro 200 Leu genskih polimorfizama na parametre oksidativnog stresa i bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

U sprovedenom istraživanju uključeni su pacijenti sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom (**Tabela 1**). Pacijenti su podeljeni u grupe na osnovu SOD2 Ala -9 Val i GPX1 Pro 200 Leu genotipa, tj na nosioce Ala / Ala genotipa i Val alela (Ala / Val i Val / Val genotip), odnosno Pro / Pro genotipa i Leu alela (Pro / Leu i Leu / Leu genotip)

Rezultati poređenja parametara oksidativnog stresa u eritrocitima u odnosu na SOD 2 genotip prikazani su u **Tabeli 33**.

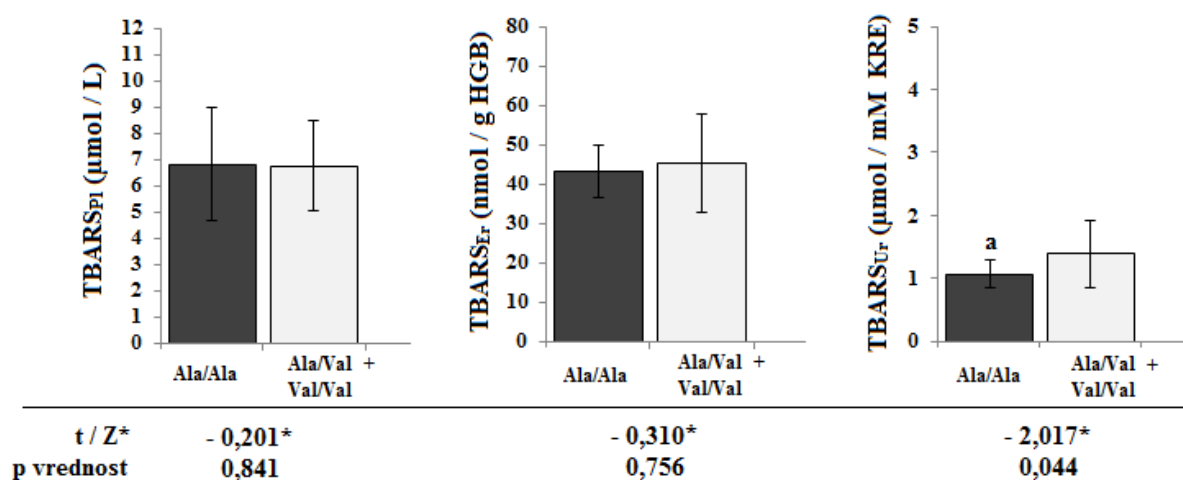
Tabela 33. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i koncentracije redukovano glutationa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na SOD2 genotip

	Ala/Ala (n=27)	Ala/Val (n=40)+ Val/Val (n=5)	t / Z*	p
SOD (U / g HGB)	1585,80 ± 431,64 1502,80 (1182,80-1912,20)	1720,40 ± 754,58 1532,52 (1313,00-1849,70)	- 0,222*	0,824
GPX (U / g HGB)	52,90 ± 13,64 56,82 (43,65-61,60)	62,42 ± 19,41 62,57 (49,76-75,88)	- 1,689	0,097
GR (U / g HGB)	13,69 ± 4,59 12,29 (10,85-14,31)	16,11 ± 4,78 16,37 (12,63-18,56)	- 1,855*	0,064
GSH (μmol / g HGB)	14,60 ± 3,00 14,10 (12,93-14,99)	15,09 ± 3,54 14,58 (12,46-17,53)	- 0,416	0,680

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; n – broj pacijenata određenog genotipa, koji su uključeni u ispitivanje

Rezultati istraživanja su pokazali da nije bilo značajnih razlika u ispitivanim parametrima kod pacijenta sa različitim SOD2 genotipom.

Na **Grafikonu 11.** su prikazane vrednosti koncentracije TBARS u plazmi (TBARS_{Pl}), eritrocitima (TBARS_{Er}) i urinu (TBARS_{Ur}) u odnosu na SOD2 genotip.



Grafikon 11. Vrednosti TBARS u plazmi, eritrocitima i urinu u odnosu na SOD2 genotip

(a: statistički značajna razlika, *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom)

Dobijeni rezultati su pokazali da pacijenti sa Ala / Ala genotipom imaju niže vrednosti TBARS u urinu u odnosu na nosioce Val alela ($1,13 \pm 0,24$ vs. $1,46 \pm 0,55$ μmol / mM KRE; p = 0,044).

Poređenje parametara oksidativnog stresa u eritrocitima u odnosu na GPX1 genotip prikazano je u **Tabeli 34**.

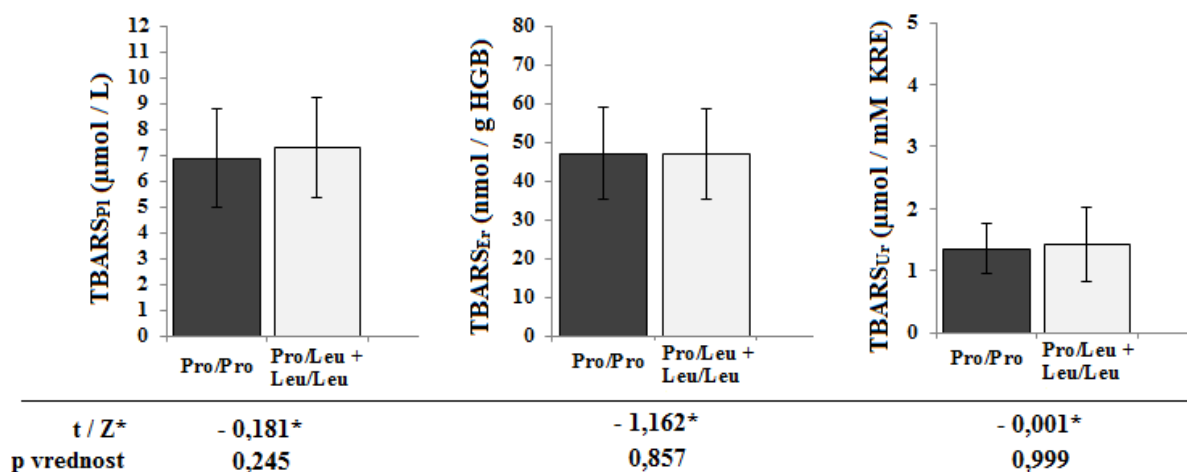
Tabela 34. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i koncentracije redukovano glutationa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na GPX1 genotip

	Pro/Pro (n=25)	Pro/Leu (n=35)+Leu/Leu (n=8)	t / Z*	p
SOD (U / g HGB)	1688,70 ± 789,44 1407,50 (1292,30-1849,60)	1798,40 ± 878,61 1568,90 (1382,90-1940,80)	- 0,796*	0,426
GPX (U / g HGB)	61,02 ± 21,17 59,59 (45,84-76,52)	59,15 ± 16,48 60,27 (46,76-72,12)	0,365	0,716
GR (U / g HGB)	13,96 ± 4,45 13,67 (10,53-16,74)	16,61 ± 4,82 16,42 (12,63-19,58)	- 2,062	0,044
GSH (μmol / g HGB)	14,77 ± 3,41 14,20 (12,53-16,11)	15,12 ± 3,45 14,87 (12,63-17,53)	- 0,488*	0,625

Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija i medijana (interkvartilna razlika); p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom; *: vrednosti parametara su upoređivane Mann – Whitney U testom; n – broj pacijenata određenog genotipa, koji su uključeni u ispitivanje

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da pacijenti sa najmanje jednim Leu alelom imaju višu aktivnost GR u eritrocitima u odnosu na pacijente sa Pro / Pro genotipom.

Na **Grafikonu 12** su prikazane vrednosti koncentracije TBARS u plazmi (TBARS_{Pl}), eritrocitima (TBARS_{Er}) i urinu (TBARS_{Ur}) u odnosu na GPX1 genotip.



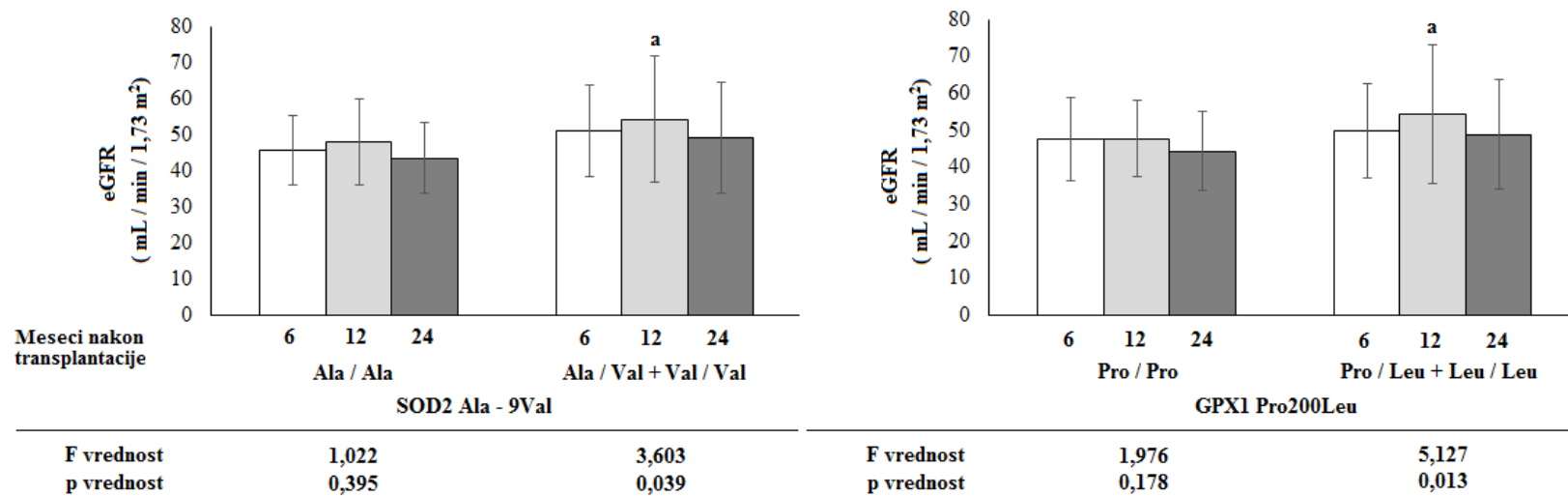
Grafikon 12. Vrednosti TBARS u plazmi, eritrocitima i urinu u odnosu na GPX1 genotip

Nije bilo značajnih razlika u vrednostima ispitivanih parametara između ispitivanih grupa pacijenata.

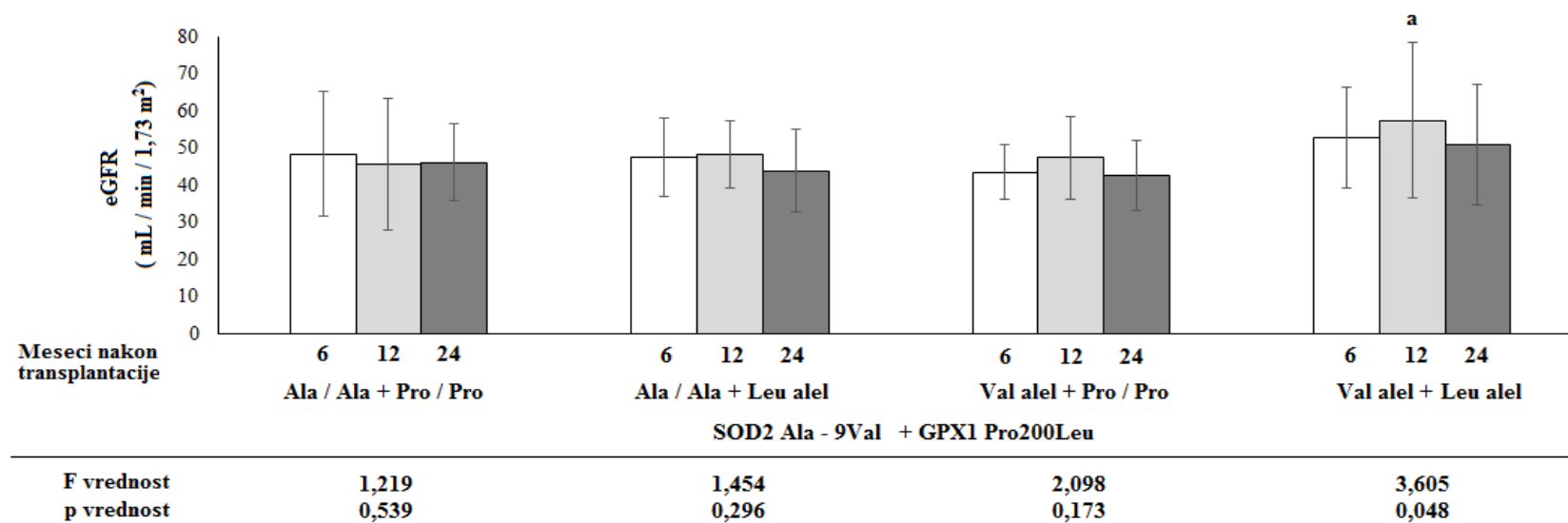
U ispitivanju uticaja SOD2 Ala – 9 Val i GPX1 Pro 200 Leu genskih polimorfizama na propadanje bubrežne funkcije, pacijenti su praćeni retrospektivno i prospektivno u toku dve godine nakon transplantacije bubrega (**Tabela 4**). Pacijenti su podeljeni prema SOD2 genotipu: nosioci Ala / Ala genotipa (n=18) i nosioci Val alela (n=35), tj. Ala / Val ili Val / Val genotipa. Pored toga, pacijenti su bili podeljeni i na osnovu GPX1 genotipa, nosioci Pro / Pro genotipa (n=17) i nosioce Leu alela (n=36), tj. Pro / Leu ili Leu / Leu genotipa.

Kada su ispitivani polimorfizmi posmatrani pojedinačno, dobijeni rezultati su pokazali da su nosioci Val alela, doživeli statistički značajno pogoršanje bubrežne funkcije, ali ne i nosioci Ala / Ala genotipa u toku dve godine nakon transplantacije bubrega (**Grafikon 13**). Post Hoc analizom je utvrđeno značajno pogoršanje bubrežne funkcije u periodu između prve i druge godine nakon transplantacije ($54,08 \pm 17,53$ vs. $49,01 \pm 15,36$; $p = 0,034$). Takođe, pacijenti sa najmanje jednim Leu alelom GPX1 genotipa su imali značajno smanjenje eGFR u istom posmatranom periodu, ali ne i nosioci Pro / Pro genotipa (**Grafikon 13**). Post Hoc analiza je pokazala da je statistički značajna razlika u eGFR pacijenata bila između prve i druge godine nakon transplantacije bubrega ($54,26 \pm 18,84$ vs. $48,78 \pm 14,78$; $p = 0,009$).

U cilju ispitivanja udruženih efekata SOD2 i GPX1 genskih polimorfizama, pacijenti su najpre podeljeni u 4 grupe: nosioci Ala / Ala + Pro / Pro genotipa, nosioci Ala / Ala genotipa + Leu alela, nosioci Val alela + Pro / Pro genotipa i nosioci Val alela + Leu alela. Dobijeni rezultati su pokazali da je efekat Val alela SOD2 i Leu alela GPX1 polimorfizama udružen. Nosioci oba alela zajedno (Val i Leu), pokazuju značajno smanjenje bubrežne funkcije u toku dve godine nakon transplantacije bubrega u odnosu na ostale grupe pacijenata (**Grafikon 14**). Post Hoc analiza je pokazala statistički značajnu razliku u eGFR pacijenata između prve i druge godine nakon transplantacije bubrega ($57,41 \pm 20,91$ vs. $50,69 \pm 16,22$; $p = 0,009$).



Grafikon 13. Vrednosti eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega u odnosu na SOD2 i GPX1 genotip (posmatrani ponaosob)
(a: značajna razlika)



Grafikon 14. Vrednosti GFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega u odnosu na SOD2 i GPX1 genotip (posmatrani zajedno)
(a: značajna razlika)

Iako su pacijenti s Val alelom SOD2 genskog polimorfizma i Leu alelom GPX1 genskog polimorfizma imali značajno propadanje bubrežne funkcije u periodu između prve i druge godine nakon transplantacije bubrega odnosu na ostale pacijente, multivarijantna linearna regresiona analiza nije pokazala da ispitivani polimorfizmi utiču na varijabilnost u vrednostima eGFR među pacijentima između 6 meseci i 2 godine nakon transplantacije (Tabela 35).

Tabela 35. Pojedinačni i udruženi efekat polimorfizama SOD2 i GPX1 gena na eGFR u toku dve godine nakon transplantacije bubrega

Model	Prediktor	Beta	p*	R ² (%), p **
1	SOD2 (Val)	0,095	0,269	11,1%; p = 0,002
2	GPX1 (Leu)	- 0,122	0,170	7,5%; p = 0,013
3	SOD2 (Val) + GPX1 (Leu)	- 0,072	0,452	10,7%; p = 0,002

Model 1 i 2- pojedinačni efekat SOD2 i GPX1 genskih polimorfizama; Model 3: udruženi efekat SOD2 i GPX1 genskih polimorfizama; * nivo statističke značajnosti prediktora u okviru predloženog modela; **nivo statističke značajnosti predloženog modela;

Beta – standardizovani koeficijent linearne regresije; R²: deo varijanse oko srednje vrednosti zavisne promenljive (eGFR), koja se može objasniti predloženim modelom; Model je prilagođen na starost i pol ispitanika;

6. Diskusija

Istraživanja ukazuju na sve veću prevalencu i incidencu bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, pri čemu je pokazano da je bolest prisutna kod 5 – 16 % svetske populacije. Poznato je da su DM i hipertenzija glavni faktori rizika za razvoj HBI. Međutim, zbog činjenice da se simptomi ispoljavaju tek kada je funkcija bubrega značajno pogoršana, HBI često brzo napreduje do terminalnog stadijuma, kada je neophodno primeniti neku od metoda zamene bubrežne funkcije [175]. Transplantacija bubrega je danas metoda izbora za lečenje poremećaja koji su posledica HBI. Ona omogućava duže preživljavanje, ređe hospitalizacije i bolji kvalitet života pacijenata u odnosu na dijalizni tretman. Međutim, stopa mortaliteta pacijenata sa transplantiranim bubregom je i dalje veća u poređenju sa opštom populacijom. Pacijenti sa transplantiranim bubregom imaju u odnosu na populaciju zdravih 35-50% veću učestalost kardiovaskularnih komplikacija i oko 4 puta veći rizik za smrtni ishod [1]. Pored toga, transplantaciju bubrega karakterišu brojne komplikacije koje su udružene sa: hiruškom traumom u toku operacije, ishemijsko – reperfuzionim oštećenjem grafta i nemogućnošću da se u potpunosti zadovolje funkcionalni zahtevi organizma. Toksični i neželjeni efekti imunosupresivnih lekova dodatno pogoršavaju kvalitet života pacijenata u post–transplantacionom periodu i skraćuju život transplantiranog organa [1 - 3].

6.1. Uloga genetskih faktora u nastanku i progresiji hronične bubrežne insuficijencije

Patofiziološki mehanizmi i faktori rizika nastanka HBI, nisu u potpunosti razjašnjeni uprkos rastućem procentu prevalence u svetu. Istraživanja sprovedena poslednjih godina usmerena su ka identifikaciji genetskih faktora koji doprinose nastanku HBI [176]. Ipak, patogenezi i progresiji HBI i ESRD doprinose faktori životne sredine, interakcija između životne sredine i gena, ali i netradicionalni faktori, kao što su oksidativni stres, inflamacija i imuni procesi. Međutim, razmatranje genetskih faktora i njihove povezanosti sa ostalim faktorima rizika koji doprinose razvoju HBI, pružiće bolju osnovu za razumevanje patofizioloških mehanizama, izdvojiti pojedince sa rizikom za nastanak HBI, omogućiće ranu

dijagnozu i usporiti progresiju bolesti, ili u najboljem slučaju sprečiti njen nastanak. Pojedini geni mogu indirektno doprineti razvoju HBI i ESRD, ostvarujući svoju ulogu u patogenezi i progresiji hipertenzije, gojaznosti i DM [175]. Posebna važnost ovih istraživanja leži u činjenici da u pojedinim slučajevima insuficijencija grafta ima isti patofiziološki mehanizam, koji se nalazi u osnovi nastanka HBI.

Značaj polimorfizma A6986G u genu za CYP 3A5 pokazan je nakon transplantacije bubrega, jer je značajan prediktor dnevne doze takrolimusa. Funkcionalno aktivan CYP 3A5 protein (nosioci *1/*1 ili *1/*3 genotipa) pored GIT –a i jetre, nalazi se i na nivou bubrega, gde ima potencijalnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska, vršeći biotransformaciju kortizola u 6-β-hidroksikortizol. Pretpostavlja se da je ekspresija CYP3A5 gena udružena sa fenotipom odgovornim za zadržavanje natrijuma, što je korisno u predelima sa veoma toplom klimom u cilju održavanja zapremine vode i elektrolita. Međutim, isti fenotip može doprineti razvoju hipertenzije, oblika koga karakteriše povećano zadržavanje natrijuma i koji je čest kod pripadnika crne rase [177]. Predpostavlja da bi CYP 3A5 mogao biti uključen u patofiziologiju HBI, pre svega zbog činjenice da hipertenzija predstavlja drugi najvažniji faktor rizika za nastanak HBI [177, 178]. Ipak, zbog nedovoljnog broja studija sprovedenih na ljudima, ova hipoteza još uvek nije potvrđena. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da nema statistički značajne razlike u učestalosti CYP 3A5 *1 alela među pacijentima sa transplantiranim bubregom i zdravim ispitanicima (**Grafikon 1**). Shodno tome, dobijeni rezultati pokazuju da ne postoji povezanost ispitivanog polimorfizma CYP 3A5 gena sa nastankom HBI i/ili ESRD u ispitivanoj populaciji. Dodatno, Coto i sar. su ispitivali povezanost genske varijabilnosti CYP 3A5 gena i pojavu hipertenzije u trudnoći, ali dobijeni rezultati nisu potvrdili postavljenu hipotezu [179].

Učestalost brojnih SNP u velikoj meri zavisi od etničke pripadnosti. Ovo je značajno sa aspekta povezanosti genskih polimorfizama i određenih oboljenja ili farmakokinetike i farmakodinamike nekog leka u okviru jedne populacije dok kod drugih ta povezanost nije značajna [76]. Prethodna istraživanja su pokazala izraženu etničku zavisnost učestalosti CYP3A5*1 alela. U Kavkaskoj populaciji (bela rasa) ispitivani alel je prisutan sa učestalošću od 5 – 15 % [76], što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (pacijenti 7,1 %, kontrole 5,7 %). U ostalim populacijama, ispitivani alel je prisutan sa učestalošću od 45 - 73% u Afro – američkoj populaciji (crna rasa), 15% kod Japanaca, 27 - 35% kod Kineza, 30% kod Koreanaca, 25% kod Meksikanaca, 27% kod Marokanaca i 26% kod Brazilaca [76, 91, 180 - 182]. Kod Evropljana, studije populacione genetike pokazale su procentualnu učestalost CYP

3A5 *1 alela: 5,6 % kod Grka, 6% kod Britanaca, 7,9% kod Finaca, 8,3% kod Holanđana i 13% kod Francuza [183 - 187]. Dodatno, određivanje CYP3A5 genotipa kod pripadnika crne rase može biti otežana usled prisustva CYP3A5*6 i *7 alela. Njihova učestalost je 10 – 20%, pri čemu ovaj fenomen nije prisutan kod drugih populacija [188].

Pored CYP 3A5, studije su ispitivale značaj polimorfizama ABCB1 gena (kodira PGP) kod pacijenata sa HBI i transplantiranim bubregom. Nosioci TT genotipa, tri najčešće ispitivana polimorfizma, C3435T, G2677T i C1236T, pokazuju nižu aktivnost PGP, pri čemu se praktični značaj ovih nalaza ogleda u smanjenoj eliminaciji lekova van ćelija [76, 91, 189]. U istraživanju sprovedenom kod pacijenata sa HBI, ABCB1 C3435T polimorfizam korelirao je sa bubrežnom funkcijom i krvnim pritiskom u dvema kineskim populacijama. Naime, pacijenti sa TT genotipom pokazali su povećan rizik za HBI, veći sistolni i pulsni krvni pritisak. Naročit značaj ispitivanog polimorfizma pokazan je u starijoj populaciji pacijenata sa HBI i većim rizikom za progresiju HBI i hipertenziju [190]. Eap i sar. su pokazali da CYP3A5 i ABCB1 genski polimorfizmi imaju udruženi efekat na krvni pritisak i menjaju odgovor na terapiju lizinoprilom. Autori su pokazali da nosioci istovremeno CYP 3A5 *1 i ABCB1 3435T alela ispoljavaju antagonistički efekat na krvni pritisak. CYP 3A5 povećava tubularnu reapsorpciju natrijuma, dok je najverovatniji mehanizam kojim PGP utiče na krvni pritisak interakcija natrijum / renin – angiotenzin – aldosteron sistem. Naime, prisustvo 3435 T i 2677T alela udruženo je sa povećanim krvnim pritiskom [191]. Dodatno, isti autori su pokazali da ispitivani polimorfizmi menjaju odgovor na terapiju lizinoprilom, koji se ne metabiliše putem CYP 3A5 i nije substrat za PGP. Ovo potvrđuje hipotezu da ispitivani polimorfizmi ispoljavaju efekte na RAAS, ali ne posredstvom primenjene antihipertenzivne terapije [191]. Međutim, pored ovih nalaza još uvek nema čvrstih dokaza o uticaju ABCB1 3435 polimorfizma na patofiziologiju krvnog pritiska i progresiju HBI. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ne postoji razlika u učestalosti genotipova i alela ABCB1 C3435T polimorfizma između pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika (**Grafikon 2**).

Zastupljenost alela ispitivanog ABCB1 polimorfizma bila je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima među evropskim populacijama [192, 193]. Učestalost C i T alela u turskoj populaciji bila je 58,5%, odnosno 41,5% kod zdravih ispitanika [194]. Ispitivanja sprovedena u kineskoj populaciji pokazala su izraženu varijabilnost u učestalosti alela C3435T polimorfizma [192-195]. U radu Balram i sar., zastupljenost C alela među različitim azijskim populacijama bila je: 46% (39 – 53%) kod Kineza, 48 % (42 – 55%), kod Maležena

i 38% (31 – 45%) kod Indijaca [196]. Ipak, ima studija sa znatno većom učestalošću C alela [192, 195]. U istraživanjima sprovedenim kod pripadnika afričkih nacija i Afro – amerikanca, učestalost C alela bila je izuzetno visoka, preko 80%. [197].

Polimorfizmi gena enzima antioksidativne zaštite mogu imati značaja kod bolesti, koje su udružene sa povećanim oksidativnim stresom, poput malignih bolesti, DM, Alchajmerove i drugih neurodegenerativnih bolesti, KV bolesti i HBI. Literaturni podaci pokazuju da je Ala alel, Ala -9Val polimorfizma u genu za SOD2, udružen sa većom mitohondrijalnom aktivnošću SOD i time doprinosi boljoj zaštiti od oksidativnog oštećenja, što za posledicu može imati povoljniji efekat na progresiju bolesti, uključujući i HBI [198]. Rezultati sprovedenog istraživanja nisu pokazali razliku u učestalosti alela i genotipova SOD2 Ala -9 Val genskog polimorfizma između pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika (**Grafikon 3**). Dobijeni rezultat ukazuje da ispitivani polimorfizam nije nezavisan faktor rizika za nastanak HBI, koja je inače i dovela do transplantacije organa. U skladu s ovim rezultatima, Crawford i sar. su pokazali da ispitivani SOD2 polimorfizam nije udružen sa nastankom HBI [199]. Međutim, ista grupa autora je pokazala da su nosioci Val alela suočeni sa izraženijom progresijom HBI u poređenju sa nosiocima Ala / Ala genotipa [144]. Pretpostavlja se da brža progresija HBI kod nosioca Val alela može biti udružena sa postojećom vaskularnom bolešću i/ili DM, koji su primarni uzroci HBI, što je slučaj kod 22 odnosno 37% pacijenata, koji boluju od ove bolesti [144].

Pored SOD2, i GPX1 Pro 200 Leu polimorfizam može imati značaja u bolestima udruženim sa povećanim oksidativnim stresom. Međutim, rezultati istraživanju nisu potvrdili uticaj ispitivanog polimorfizma na nastanak HBI (**Grafikon 4**). Prethodna istraživanja su pokazala da smanjena bubrežna funkcija kod pacijenata sa HBI može biti udružena sa Leu / Leu genotipom, ali konkretni polimorfizam ne utiče na progresiju bolesti [199].

Genski polimorfizam u genu za KAT, koji se karakteriše supstitucijom C > T u poziciji –262 (rs1001179) od početnog mesta transkripcije, je najčešće ispitivan SNP ovog gena. Međutim, ima studija koje nisu pokazale povezanost sa bubrežnom funkcijom ili progresijom HBI [151]. Suprotno, Hishida i sar. su pokazali da su nosioci dva T alela umesto jednog imali smanjen rizik za razvoj HBI [200]. Glutation – S - transferaza M1 (GST M1) „null” alel je posledica polimorfizma, koga karakteriše delecija u GST M1 genu i udružen je sa izraženom progresijom HBI usled smanjenog antioksidativnog kapaciteta. Naime, pacijenti na hemodijalizi, koji su homozigoti za GST M1 „null” alel imaju povećan rizik od smrtnog ishoda u poređenju sa ostalim pacijentima [201].

Pored ispitivanih polimorfizama u ovoj studiji, polimorfizmi u genu za ACE, vitamin D receptor (VDR), PXR i ne – mišićni miozin IIA teški lanac (MYH9) mogu imati uticaja na nastanak i/ili progresiju HBI [175]. Polimorfizmi u VDR genu mogu uticati na bubrežnu funkciju i krvni pritisak. Međutim nema ubedljivih dokaza, koji bi potvrdili ovu povezanost. Pored toga, FokI genski polimorfizam (rs10735810) VDR udružen je sa DM, koji predstavlja glavni faktor rizika za nastanak HBI, pri čemu njegov efekat na bubrežnu funkciju može biti posredan. Yokoyama i sar. su pokazali da više koncentracije 1,25 - dihidroksivitamina D mogu biti udružene sa ranijim stadijumom HBI među pacijentima sa DM tip 2. Ispitivani polimorfizam nije pokazao povezanost sa odgovarajućim stadijumom HBI, ali jeste sa koncentracijom vitamina D [202]. Pored toga, rezultati randomiziranih kliničkih studija su pokazali da agonisti VDR mogu imati renoprotektivan efekat kod ljudi [203 - 205]. Humani PXR gen nije razmatran u kontekstu povezanosti sa krvnim pritiskom i/ili bubrežnom funkcijom, međutim njegova uloga u regulaciji ekspresije ABCB1 i CYP 3A5 gena, učešće u metabolizmu steroidnih hormona, efekat na lipidni i energetske metabolizam, efekat na proces inflamacije, kao i interakcija sa VDR ukazuje da PXR može imati značajnu ulogu u bubrežnoj bolesti [175].

Dodatno, genetski faktori u određenom stepenu mogu objasniti pojavu komplikacija koje prate transplantaciju bubrega i upotrebu imunosupresivnih lekova u ranom i / ili kasnom post-transplantacionom periodu. Naime, SNP su prisutni u genima, koji kodiraju enzime odgovorne za metabolizam lekova, efluks pumpe i ciljna mesta delovanja lekova [76], ali i u genima enzima antioksidativne zaštite organizma [145]. Ovo je od posebne važnosti, jer je povećani oksidativni stres udružen sa razvojem brojnih komplikacija nakon transplantacije organa, naročito u ishemijsko – reperfuzionom oštećenju, odloženoj funkciji grafta, ali i akutnom i hroničnom odbacivanju presađenog organa [120,145].

6.2. Mesto takrolimusa u savremenim imunosupresivnim protokolima

Transplantacija bubrega je nesumnjivo metoda izbora za lečenje poremećaja koji su posledica HBI, bez obzira na etiologiju HBI ili genetsku osnovu, koja doprinosi njenom nastanku i/ili progresiji. Međutim, značajan napredak u transplantaciji organa, načinjen tokom protekle dve decenije, može se pripisati uvođenju KNI u kliničku praksu i njihovim pozitivnim efektima na stopu preživljavanja grafta. Oni istovremeno mogu ispoljiti

dugoročnu nefrotoksičnost, koja vodi ka insuficijenciji i smrti presađenog organa i odatle postoji stalna težnja za prevazilaženjem ove barijere.

Takrolimus je osnova većine savremenih imunosupresivnih protokola u svetu [62]. Međutim, postoje nastojanja da se i takrolimus zameni novim, jednako efikasnim i bezbednijim imunosupresivnim agensom, ali dosadašnji pokušaji su imali ograničen uspeh. Uprkos očekivanjima u prethodnim godinama da će sirolimus u potpunosti zameniti CsA i takrolimus, sprovedene randomizirane studije to nisu pokazale. Neželjeni efekti ograničavaju upotrebu SRL, a kod 30 – 50% pacijenata dolazi do prekida terapije. On može prouzrokovati GIT tegobe, hiperpireksiju, periferne edeme, anemiju, trombocitopeniju, povišene vrednosti serumskih lipida, elektrolitni disbalans (hipokalijemiju i hipofosfatemiju), bolove u zglobovima, stomatitis, dispneju, kašalj, infektivne bolesti i probleme sa kožom. Jedan od najozbiljnijih neželjenih efekata je SRL – izazvan intersticijalni pneumonitis, za koji je pokazano da je udružen sa povišenom dozom i nivoima leka [33,206]. Iako se SRL smatra ne-nefrotoksičnim imunosupresivnim lekom, njegova primena može pogoršati KNI nefrotoksičnost i dovesti do veće učestalosti odložene funkcije grafta, kada se poređenje vrši sa drugim klasama lekova. Osim toga, prevođenje pacijenta sa KNI na SRL može biti praćeno proteinurijom *de novo* [32]. „ELITE–SYMPHONY” studija je pokazala da režimi sa indukcijom daklizumabom, MMF - om, kortikosteroidom i niskom dozom takrolimusa obezbeđuju adekvatnu imunosupresiju sa boljom bubrežnom funkcijom i manjom stopom akutnih epizoda odbacivanja u poređenju sa protokolom koji je uključivao indukciju daklizumabom sa niskom dozom CsA ili niskom dozom SRL. Dodatno, režimi sa niskom dozom takrolimusa obezbeđuju bolje preživljavanje transplantiranog organa u odnosu na režime sa standardnom dozom CsA ili niskom dozom SRL [207]. Nasuprot tome, „CONVERT” studija je pokazala da konverzija pacijenata sa KNI na SRL, kod vrednosti GFR većim od 40 mL/min, doprinosi većoj stopi preživljavanja transplantiranog organa i pacijenata, pri čemu je poređenje vršeno sa odgovarajućim pacijentima na terapiji KNI. Studija nije pokazala značajnu razliku u stopi akutnih epizoda odbacivanja potvrđenih biopsijom i u urinarnoj ekskreciji proteina među ispitivanim grupama. Međutim, incidenca maligniteta bila je niža u SRL grupi. Ova studija je uključila 830 pacijenta, koji su randomizacijom raspoređeni u dve grupe: pacijenti kojima je izvršena konverzija KNI sa SRL i pacijenti koji su nastavili sa primenom KNI (takrolimus ili CsA). Poređenje parametara je vršeno nakon 12 i 24 meseca od trenutka konverzije [208].

Takođe, everolimus, analog SRL sa boljim farmakokinetičkim osobinama, predstavlja potencijalnu zamenu KNI u imunosupresivnim protokolima nakon transplantacije bubrega. „ZEUS” studija je pokazala prednost everolimusa u odnosu na CsA u pogledu postizanja boljih vrednosti GFR, dok je stopa smrtnosti presađenog organa bila uporediva između pacijenata na everolimusu i CsA. Studija je sprovedena metodom randomizacije, pri čemu je deo pacijenata uključenih u studiju posle 4,5 meseci preveden sa terapije CsA na terapiju everolimusom, dok su ostali pacijenti nastavili sa primenom CsA. Nakon 12 i 36 meseci od početka studije izvršena su poređenja odgovarajućih parametara. U grupi pacijenata na everolimusu došlo je do istovremenog povećanja stope akutnih epizoda odbacivanja. Pored toga, primena everolimusa bila je povezana sa povišenim vrednostima srednjih koncentracija lipida, povećanom urinarnom ekskrecijom proteina i smanjenim vrednostima koncentracije hemoglobina, kao i povećanom učestalošću dijareje. [209,210].

Pored everolimusa, očekivanja su velika kada je reč o belataceptu i alemtuzumabu. Dve velike multicentrične studije III faze kliničkog ispitivanja, „BENEFIT-EXT” i „BENEFIT”, pokazale su da je upotreba belatacepta udružena sa poboljšanjem funkcije transplantiranog bubrega u toku 12 meseci primene u poređenju sa CsA [211,212]. Međutim, posle 3 godine praćenja pacijenata, obe studije su pokazale slično poboljšanje funkcije presađenog organa i stopu akutnog odbacivanja kada se porede belatacept i CsA [9,213,214]. Goring i sar. su pokazali da je poboljšanje bubrežne funkcije nakon transplantacije slično kod primene CsA, takrolimusa i belatacepta, dok je stopa akutnih epizoda odbacivanja bila veća kod primene CsA i belatacepta. Dodatno, belatacept je dao bolje rezultate u pogledu preživljavanja transplantiranog organa, preživljavanja pacijenta i poboljšanja bubrežne funkcije, dok je takrolimus pokazao bolje rezultate u odnosu na akutno odbacivanja grafta [215].

Indukcijom alemtuzumabom omogućuje se povlačenje KNI iz imunosupresivnih protokola u kratkom do srednje - dugom periodu nakon transplantacije. Međutim, terapija održavanja bazirana na primeni KNI se pokazala efikasnijom u odnosu na alternativu. Međutim, kombinovana primena alemtuzumaba i takrolimusa pokazala se korisnom u pogledu kratkoročnog preživljavanja transplantiranog bubrega i pacijenta, sa manjom stopom akutnih epizoda odbacivanja i smanjenjom incidencom virusnih komplikacija [47,48]. Pored toga, Sutherland i sar. su pokazali da uvođenjem alemtuzumaba u indukcioni protokol, konverzija pacijenata sa takrolimusa na SRL prolazi bez neželjenih efekata i povećane incidence akutnog odbacivanja, što nije bio slučaj sa prethodnim protokolima [41].

Gledano hronološki, savremeni režimi bazirani na KNI obezbeđuju manje koncentracije leka u organizmu nego nakon njihovog inicijalnog uvođenja u kliničku praksu. U skladu s tim, minimizacija izlaganja KNI, a prema tome i takrolimusa je korak koji doprinosi boljem bezbedonosnom profilu u kasnijim periodima nakon transplantacije bubrega.

Sharif i sar. su u meta analizi, koja je obuhvatila 11337 pacijenata u 56 randomiziranih kliničkih studija, uporedili prednosti različitih protokola u odnosu na standardni protokol sa KNI [34]. Retrospektivno su upoređivani režimi potpune eliminacije KNI iz protokola, režimi minimiziranja KNI (režimi koji su uključivali primenu doznih režima KNI, koji su trebali da omoguće nižu optimalnu koncentraciju leka u poređenju sa standardnim protokolom), kao i režimi sa odloženim uvođenjem KNI (KNI se ne uvodi prvog dana nakon transplantacije, već kasnije u toku prve nedelje). Analiza je pored protokola s KNI uključivala i protokole s drugim imunosupresivnim lekovima: SRL, everolimus, belatacept, tofacitinib, FTY720, sotrastaurin i alemtuzumab. Studije sa takrolimusom, (20) i CsA (35) i 1 studija koja je uključivala oba KNI, korišćene su kao kontrola prilikom analize. Rezultati ove metaanalize ukazuju da režimi minimiziranja KNI imaju prednost u odnosu na standardni (kontrolni) režim KNI u pogledu sveobuhvatne slabosti transplantiranog bubrega, odložene funkcije transplantiranog organa, poboljšanja bubrežne funkcije i stope pojave PTDM, dok u pogledu stope mortaliteta nije bilo razlike. Režimi sa potpunom eliminacijom KNI iz imunosupresivnog protokola, kao i režimi koji su uključivali kombinaciju mTOR inhibitora i MMF nisu pokazali prednost u pogledu bubrežne slabosti i stope mortaliteta u odnosu na kontrolne režime. Protokoli koji su uključivali odloženo uvođenje KNI pokazali su poboljšanje bubrežne funkcije, ali ne i prednosti u pogledu bubrežne slabosti i stope mortaliteta u poređenju sa standardnim protokolima. Pored toga, standardni režimi se nisu razlikovali u stopi epizoda odbacivanja u poređenju s režimima koji su uključivali minimiziranje KNI, odloženo uvođenje KNI, kombinaciju mTOR inhibitora i MMF i kombinaciju MMF i novih imunosupresiva (belatacept ili tofacitinib). Meta – analiza je pokazala sveobuhvatnu prednost KNI - minimizacionih režima (engl. *CNI-sparing/minimization strategies*), ali ne i protokola bez KNI, u odnosu na standardne protokole s KNI, što ukazuje da će takrolimus biti osnova imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega i u godinama koje slede [34]. Pacijentima, uključenim u ovo istraživanje, takrolimus je bio uveden petog post-transplantacionog dana, što je smanjilo rizik

za nastanak ranih neželjenih efekata imunosupresivne terapije, poput akutne nefrotoksičnosti i PTDM.

Klinička primena takrolimusa karakteriše se malim terapijskim indeksom i izraženom interindividualnom varijabilnošću u farmakokinetici leka. Ova varijabilnost može dovesti do smanjene efikasnosti leka i akutnog odbacivanja presađenog organa ili do prekomerne imunosupresije, koja može biti potencijalno vrlo opasna i rezultirati neželjenim efektima i ispoljenom toksičnošću leka. U skladu s tim, primena TDM je neophodna u cilju smanjena toksičnosti i poboljšanje efikasnosti leka [55,58]. Međutim, uvođenje potentnih indukcionih agenasa u imunosupresivne protokole nakon transplantacije bubrega, umanjilo je značaj postizanja adekvatnih koncentracija KNI, kada se razmatranje vrši u pogledu pojave akutnog odbacivanja ili ispoljavanja toksičnosti [58,59]. Pored toga, nedavno se na tržištu pojavio preparat takrolimusa, koji se za razliku od standardnog preparata, karakteriše modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance iz farmaceutskog oblika i primenjuje jednokratno. Ovaj preparat omogućuje sporiju resorpciju takrolimusa i 15 % manju ukupnu ekspoziciju leka, nakon konverzije sa standardnog preparata leka (konverzija: 1 mg za 1 mg novog leka). Ovaj preparat je razvijen u cilju povećanja komplijanse pacijenata, koja je naročito važna kod primene lekova sa malim terapijskim indeksom [61].

Nedavno su eksperti u oblasti nefrologije predstavili nove ciljne vrednosti koncentracije C₀ leka u zavisnosti od post-transplantacionog perioda. Rezultati koncenusa ukazuju da bi koncentracija C₀ takrolimusa trebala biti u sledećem opsegu: od 10 do 15 ng / mL, u toku prva tri meseca, od 8 do 12 ng / mL između 6 i 12 i od 5 do 10 ng / mL u periodu nakon prve godine posle transplantacije bubrega [216]. Pacijenti, uključeni u ovo istraživanje, imali su izmerene koncentracije C₀ takrolimusa, koje su bile u skladu sa ovim preporukama (**Tabela 4**). Međutim, određeni pacijenti mogu biti izloženi neželjenim efektima ili smanjenoj efikasnosti terapije pri optimalnim koncentracijama takrolimusa, što ukazuje da su neophodne dodatne studije faktora varijabilnosti farmakokinetike i farmakodinamike leka.

6.3. Značaj genskih polimorfizama CYP 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

Prethodne studije su pokazale da su genetski faktori, demografski faktori i interakcije lekova važni prediktori varijabilnosti u farmakokinetici takrolimusa [56,69]. Polimorfizam A6986G u genu za CYP 3A5 izoenzim je označen kao glavna determinanta farmakokinetičke

varijabilnosti takrolimusa [76]. Nosioi CYP 3A5 *3/*3 genotipa, imaju učešće CYP 3A5 izoenzima u ukupnom sadržaju CYP 3A frakcije od 4,2% u jetri, odnosno od 2,7% u jejunumu, što praktično znači da ovi pojedinci ne ekspimiraju izoenzim (ne – ekspresori). Međutim kod heterozigota, nosioca CYP 3A5*1/*3 genotipa, doprinos ovog izoenzima ukupnom sadržaju CYP 3A frakcije je 50% u jetri i 61% u jejunumu [217]. U skladu s tim, rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da su nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa zahtevali veće doze leka u različitim periodima nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa (**Tabela 5**). Dodatno, pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom imali su manje vrednosti C0/D takrolimusa u poređenju sa nosiocima CYP3A5 *3/*3 genotipa (**Tabela 7**). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno sprovedenim istraživanjima, koja su pokazala da konkretni polimorfizam utiče na dozu i izloženost takrolimusa. Naime, nosioci CYP 3A5 *1 alela zahtevali su veće doze leka u cilju održavanja njegove koncentracije u krvi u terapijskom opsegu [76, 87, 91, 218, 219, 220]. Međutim, prethodne studije su uglavnom ispitivale uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku takrolimusa u ranom periodu nakon transplantacije i/ili u toku prve godine nakon transplantacije bubrega, ističući njegov potencijalni značaj u određivanju inicijalne doze leka [76,221,222, 223]. «TacTic» (engl. *TACrolimus in renal transplantation individualization through pharmacogeneTIC*) je multicentrična, randomizirana, kontrolisana studija sprovedena u Francuskoj, koja je ispitivala značaj uvođenja genotipizacije CYP 3A5 u kliničku praksu. U njoj je učestvovalo 280 pacijenata sa transplantiranim bubregom *de novo*, koji su bili podeljeni u dve grupe: sa standardnom početnom dozom takrolimusa (0,1 mg / kg dva puta u toku dana) i početnom dozom baziranom na CYP 3A5 genotipu (0,075 ili 0,15 mg / kg dva puta u toku dana, kod ne – ekspresora i ekspresora, naizmenično). Rezultati TacTic studije su pokazali da doziranje bazirano na CYP 3A5 genotipu omogućava da veći procenat pacijenata postigne željene koncentracije takrolimusa unutar tri dana od započinjanja terapije u poređenju sa standardnim doziranjem (43,2 % prema 29,1 % pacijenata). Dodatno, u grupi pacijenata sa genotip baziranim doziranjem takrolimusa, bio je neophodan manji broj prilagođavanja doza u cilju postizanja željenih koncentracija leka. U skladu s tim, doziranje prilagođeno CYP 3A5 genotipu pacijenta može sprečiti ranu nedovoljnu ili prekomernu izloženost takrolimusu. Međutim, studija nije pokazala razlike u pogledu učestalosti akutnog odbacivanje grafta, odložene funkcije grafta ili ispoljavanje toksičnosti leka. Razlog ovome može biti činjenica da su većina pacijenata uključenih u ovo istraživanje primili indukcionu terapiju sa ATG i visokim početnim dozama MMF [223]. Na osnovu rezultata TacTic studije,

Hesselink i sar. smatraju da doziranje takrolimusa bazirano na CYP 3A5 genotipu, može biti značajno kod pacijenata sa normalnim do visokim imunološkim rizikom, kada se takrolimus uvodi prvog dana nakon transplantacije, ali ne i kod odloženog uvođenja leka, što je bio slučaj sa ovom studijom [62].

Međutim, sprovedeno istraživanje je pokazalo da polimorfizam u genu za CYP 3A5 može ispoljiti uticaj na farmakokinetiku takrolimusa u dugoročnom periodu nakon transplantacije, što je od posebnog značaja u razmatranju efekata njegove hronične izloženosti. Glowacki i sar. su takođe pokazali uticaj ispitivanog polimorfizma na farmakokinetiku takrolimusa dve godine nakon transplantacije bubrega, ističući manje vrednosti C₀/D ekspresora u poređenju sa ne - ekspresorima. Pored toga, isti autori su pokazali da samo genotip primaoca ima uticaja na farmakokinetičke parametre, ali ne i genotip donora [224]. Dodatno, Wu i sar. su pokazali da prisustvo CYP 3A5 *1 alela može imati značaja kod konverzije preparata takrolimusa, koji se primenjuje dva puta dnevno, na preparat koji se primenjuje jednom dnevno. Ekspresori su pokazali manju varijabilnost u izloženosti leka nakon konverzije, što može biti od posebnog značaja kod populacija sa visokom učestalošću ekspresora [225].

Dodatno, značaj CYP 3A5 polimorfizma i njegov uticaj na farmakokinetiku takrolimusa ispitivan je kod transplantacije jetre i srca. U radu Barrera-Pulido i sar. pokazano je da nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa, koji su primili jetru CYP 3A5 *1/*3 donora, nisu uspeali da dostignu minimalnu koncentraciju takrolimusa u krvi u ranom periodu nakon transplantacije. Pored toga, isti pacijenti su zahtevali veće doze takrolimusa u periodu između 30 i 60 dana nakon transplantacije u cilju održanja optimalne koncentracije leka u krvi [226]. Takođe, Shi i sar. su pokazali da su nosioci CYP 3A5 *1 alela imali veće zahteve u pogledu doze leka i imali niže vrednosti C₀ / D takrolimusa u odnosu na nosioce CYP 3A5 *3/*3 genotipa nakon transplantacije jetre [227]. Takođe, nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa zahtevali su veće dnevne doze takrolimusa u cilju održanja optimalne koncentracije leka u krvi u poređenju sa ne – ekspresorima u toku prve godine nakon transplantacije srca [228,229].

Prethodne studije su ispitivale doprinos ABCB1 3435 genskog polimorfizma farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa, ali su dobijeni rezultati kontradiktorni [76, 83, 91, 230,231]. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da su nosioci ABCB1 3435 TT genotipa imali manju dnevnu dozu u prvih 6 meseci i veću vrednost C₀/D takrolimusa dve godine nakon transplantacije bubrega u poređenju sa nosiocima ABCB1 3435 C alela, tj. ABCB1 CC

i ABCB1 CT genotipa. Međutim, kada su iz ispitivanja isključeni nosioci CYP 3A5 *1 alela, uticaj ovog polimorfizma na dozu i C₀ / D odnos leka nestaje, što može ukazati da efekat ABCB1 3435 polimorfizma nije nezavisan od CYP 3A5 genotipa (**Tabela 8 i Tabela 10**).

Većina istraživanja nije pokazala razliku u dozi ili izloženosti takrolimusa među nosiocima različitih ABCB1 3435 genotipa [82, 231, 232]. Ipak, ima autora koji su pokazali da je ABCB1 3435 TT genotip udružen sa smanjenom aktivnošću PGP i time smanjenom eliminacijom takrolimusa van ćelija [91, 230]. Naime, studije su pokazale značaj ABCB1 3435 polimorfizma za farmakokinetiku leka u ranoj fazi, ali i 6 meseci nakon transplantacije [95,233,234]. Li i sar. su pokazali da su nosioci ABCB1 3435 CC genotipa imali nižu vrednost C₀ / D takrolimusa u poređenju sa nosiocima CT / TT genotipa [235]. Pored toga, Capron i sar. su pokazali 1,3 puta veće koncentracije takrolimusa u limfocitima kod nosioca ABCB1 3435 T alela u poređenju sa nosiocima ABCB1 3435 CC genotipa [236]. Efekat PGP na farmakokinetiku takrolimusa može biti indirektan. Benet i sar. su pokazali da PGP može regulisati pristup takrolimusa do CYP3A izoenzima i na taj način sprečava da kapacitet ovih izoenzima bude nadvladan velikim koncentracijama leka u crevima [64]. Takrolimus se na taj način ponovljeno resorbuje iz GIT-a, pri čemu ovo kontinuirano izlaganje leka može dovesti do efikasnijeg metabolizma. U skladu s tim, pacijenti sa funkcionalno aktivnijim PGP, tj. nosioci C alela ispitivanog polimorfizma ABCB1 gena, imali bi izraženiji metabolizam na nivou GIT – a. Multivarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da CYP 3A5 polimorfizam, ali ne ispitivani ABCB1 polimorfizam, predstavlja nezavisan prediktor izloženosti leka (C₀ / D odnos) u toku dve godine nakon transplantacije bubrega (**Tabela 11**). Ovaj efekat CYP 3A5 polimorfizma, nezavisan je od doze kortikosteroida, pola i starosti pacijenta.

Različitom učestalošću CYP 3A5 *1 alela među populacijama mogu se objasniti njihove razlike u farmakokinetičkim parametrima takrolimusa među tim populacijama [62,76, 237]. Pripadnici crne rase imaju veću zastupljenost CYP 3A5 *1 alela, što se minifestuje nižom bioraspoloživošću takrolimusa i C_{max} nakon oralne primene leka u odnosu na belu rasu [71]. Pored toga, nosioci ABCB1 3435 T alela kod pripadnika bele rase imaju veće koncentracije lekova, a samim tim i takrolimusa u plazmi, dok kod pripadnika određenih populacija u Aziji ovaj efekat češće vezan za C alel. Ovo može ukazati na mogućnost nasleđivanja različitih haplotipova kod ovih populacija [238].

Dodatno, metabolizam takrolimusa, posredovan putem CYP 3A može se menjati pod uticajem drugih lekova, kao što su kortikosteroidi ili antigljivični lekovi, ali i pod uticajem

fizioloških poremećaja, poput uremije. Međutim, studije su pokazale da su potencijalnom uticaju ovih faktora izloženi pre svega CYP3A5 ne – ekspresori [56,239,240,241].

Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da CYP 3A5 polimorfizam predstavlja nezavisan prediktor varijabilnosti u vrednostima eGFR među pacijentima u toku dve godine nakon transplantacije bubrega. Takođe, rezultati su pokazali da nosioci CYP 3A5 *1/*3 genotipa imaju smanjenu funkciju bubrega u odnosu na ostale pacijente (**Tabela 12**). Najverovatnije objašnjenje ovih nalaza je da nosioci CYP 3A5*1/*3 genotipa u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa, kontinuirano zahtevaju veće doze takrolimusa, koje dovode do progresivnog propadanja bubrežne funkcije u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Međutim, nije u dovoljnoj meri razjašnjeno kako veće doze leka vode ka pogoršanju bubrežne funkcije, bez značajne promene u C0 leka. Moguće je da objašnjenje uključuje metabolite leka, koji se u većoj količini formiraju u jetri i potencijlno izazivaju toksične efekte. Povećana hepatična i gastrointestinalna CYP 3A5 enzimaska aktivnost može dovesti do većeg sistemskog klirensa leka i na taj način većih zahteva u pogledu dnevne doze leka, pri čemu istovremeno nastaju veće količine metabolita leka [241]. Oni mogu dospeti u transplantirani organ i izazvati KNI – udruženu vazokonstrikciju arteriola i posledično smanjenje bubrežne funkcije [52, 241]. Dodatno, upoređivane su vrednosti eGFR i koncentracije serumskog kreatinina između pacijenata sa različitim genotipom za CYP 3A5 izoenzim posle 6, 12 i 24 meseca nakon transplantacije bubrega (**Grafikon 5 i Grafikon 6**). Rezultati su pokazali da su pacijenti sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom imali manje vrednosti eGFR u poređenju sa nosiocima CYP 3A5 *3/*3 genotipa, tek nakon dve godine posle transplantacije bubrega. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnom pretpostavkom da kontinuirano veće doze takrolimusa mogu prouzrokovati izraženije pogoršanje bubrežne funkcije. Suprotno ovim rezultatima, većina prethodno sprovedenih istraživanja nije pokazala vezu između ispitivanih polimorfizama i kliničkih efekata takrolimusa, toksičnosti leka i/ili efekata na smanjenje bubrežne funkcije [62, 89, 224]. Međutim u većini prethodnih slučajeva, period praćenja pacijenata bio je do jedne godine posle transplantacije bubrega [89, 224]. Ipak, ima autora koji su pronašli vezu između toksičnih efekata takrolimusa i CYP 3A5 genotipa pacijenta, ukazujući da nosioci CYP 3A5 *1 alela, zbog većih zahteva u dnevnoj dozi leka, imaju veći rizik za razvoj takrolimus – udružene nefrotoksičnosti nakon transplantacije bubrega [241]. Pored toga, Chen i sar. su pokazali da CYP 3A5 *1/*1 genotip može biti udružen sa češćom pojavom akutnih epizoda odbacivanja, dok nosioce CYP 3A5

*3/*3 genotipa karakteriše izraženija intersticijalna fibroza, intersticijalna inflamacija i tubularna vakuolarna degeneracija [242].

Osim efekta na bubrežnu funkciju, smatra se da su CYP 3A5 i PGP uključeni u patofiziologiju hipertenzije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. U svom radu, Hesselink i sar., su ukazali na povezanost CYP3A5 *1/*3 genotipa i povišenog krvnog pritiska kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji KNI [62]. Dodatno, Ferraresso i sar. smatraju da CYP 3A5 *1 alel doprinosi težini hipertenzije u post-transplantacionom periodu, bez obzira na period merenja. Studija je sprovedena kod pacijenata na takrolimusu i CsA [243]. Međutim, ima podataka u literaturi, koji ne potvrđuju ovu hipotezu. Torio i sar. nisu pokazali da ispitivani polimorfizam CYP 3A5 gena utiče na nastanak post-transplantacione hipertenzije, iako je bilo razlika u visini krvnog pritiska između pacijenata sa različitim CYP 3A5 genotipom [244]. Takođe, istraživanja nisu pokazala udruženost CYP 3A5 i ABCB1 3435 polimorfizama sa pojavom PTDM kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [245].

Nedavno su Naesens i sar. pokazali da primena takrolimusa kod pacijenta nosioca ABCB1 3435 TT genotipa, može biti povezana sa povećanim rizikom od hroničnog oštećenja transplantiranog organa, koje se karakteriše intersticijalnom fibrozom i tubularnom atrofijom. Ovaj efekat je dodatno pojačan, ako su i donori organa bili nosioci ABCB1 3435 TT genotipa. Međutim, isti autori nisu pokazali da pomenuti polimorfizam utiče na farmakokinetiku takrolimusa [246]. Ovakav rezultat navodi na pretpostavku da je efekat ispitivanog polimorfizma na funkciju bubrega lokalna, uslovljen različitom ekspresijom PGP, a time i različitim koncentracijama takrolimusa na nivou bubrega [246, 247].

Literaturni podaci pokazuju da postoje drugi genski polimorfizmi koji bi mogli biti od značaja za farmakokinetiku takrolimusa i njegovu kliničku primenu. CYP3A4*1B polimorfizam (rs2740574) uključuje A > G izmenu u poziciji – 392 u „nifedipin – specifičnom elementu”, koji se nalazi u 5' - bočnom promotor regionu CYP3A4 gena i udružen je sa povećanom aktivnošću izoenzima. Nosioci ovog polimorfizma zahtevaju veće doze takrolimusa u cilju održanja optimalne imunosupresije, ali ovaj efekat se u uglavnom objašnjava kroz udruženost prilikom nasleđivanja sa CYP3A5*1 alelom. U skladu s tim, genotipizacija CYP3A4*1B alela je nepotrebna sa kliničkog aspekta [62,76].

U poslednje vreme, polimorfizam CYP3A4*22 (rs35599367, C>T) u intronu 6 se razmatra kao potencijalni prediktor farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa, koji bi mogao uticati na doziranje takrolimusa. On se karakteriše učestalošću od oko 5% u populaciji

belaca. T alel se povezuje sa smanjenom ekspresijom iRNK i smanjenom CYP3A4 aktivnošću, što je pokazano u *in vitro* uslovima [248]. Dodatno, istraživanja su pokazala da nosioci T alela zahtevaju niže doze, kako bi održali optimalnu koncentraciju leka, pri čemu je ovaj efekat nezavisan od CYP3A5 genotipa [249]. Pored toga, pacijenti sa CYP3A5*1 alelom i CYP3A4*22 CC genotipom zahtevaju veće doze leka u odnosu na nosioce CYP3A5*1 i CYP3A4*22 T alela ili nosioce CYP3A5*3/*3 i CYP3A4 *22 CC genotipa [249,250]. Međutim, studija Santoro i sar. nije potvrdila značaj ovog polimorfizma za farmakokinetiku takrolimusa [251].

Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) – CYP oksidoreduktaza (POR) predstavlja elektron donor za enzime, koji pripadaju CYP monooksigenazama, uključujući i CYP3A i prema tome je značajan za CYP - posredovanu oksidaciju lekova. Dosadašnja istraživanja su pokazala da postoji preko 100 SNP u genu za POR, koji mogu da utiču na POR – CYP interakciju lekova i menjaju aktivnost CYP-a. Polimorfizam označen kao POR*28 (rs1057868; C>T) dovodi do zamene alanina valinom u položaju 503, ima učestalost od oko 28% i može ispoljiti efekat na farmakokinetiku takrolimusa [62]. Naime, istraživanje je pokazalo da ekspresori za CYP3A5 i nosioci POR*28 T alela imaju 25% veće zahteve u pogledu doze leka u odnosu na CYP3A5 ekspresore, koji su ujedno i nosioci POR*28 CC genotipa. Pored zahteva za većom dozom takrolimusa, nosiocima POR*28 T alela potrebno je više vremena da dostignu željenu koncentraciju leka, što kao posledicu ima češće ispoljenu suboptimalnu imunosupresiju u ranoj fazi nakon transplantacije [98]. Međutim, POR*28 nema uticaja na koncentraciju takrolimusa kod pacijenata koji ne eksprimiraju CYP3A5 [99]. Prema tome, prethodna istraživanja su pokazala da POR*28 ima uticaja na CYP 3A5 posredovani metabolizam takrolimusa, ali ne i na CYP 3A4 posredovani metabolizam leka [62].

Humani PXR, kodiran od strane NR1I2 gena, je nuklearni transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju CYP3A i ABCB1 gena. Nekoliko polimorfizama je identifikovano u NR1I2 genu, ali rezultati nisu bili konzistentni kada je u pitanju njihov uticaj na farmakokinetiku takrolimusa. Dodatno, odsustvo čvrstih dokaza postoji i kod razmatranja povezanosti farmakokinetike takrolimusa i polimorfizma CYP3A4*1G [62]. Obećavajuću gensku determinantu CYP3A4 aktivnosti predstavljaju polimorfizmi u genu za PPARA. Međutim, studije koje bi ispitivale efekte ovih polimorfizama na terapiju takrolimusom nisu sprovedene do danas [62, 252]. Jacobson i sar. su pokazali da polimorfizmi u genu za KOMT

moгу biti razmatrani kao potencijalni faktori, koji doprinose farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa [253].

U najvećoj meri, farmakogenetska istraživanja su imala za cilj da pokažu uticaj genskih polimorfizama na farmakokinetiku takrolimusa, dok je manji broj ispitivao efekte na farmakodinamiku leka, molekularne procese u osnovi kliničkih ishoda i same kliničke ishode, naročito u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.

6.4. Parametri oksidativnog stresa, dimetilarginini i enzimske markeri tubularnog oštećenja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

U toku prethodnih godina učinjeno je značajno poboljšanje u kratkoročnim ishodima nakon transplantacije bubrega, uključujući preživljavanje grafta i metaboličke poremećaje udružene sa uremijom. Međutim, uspeh je ograničen kada je reč o dugoročnim komplikacijama i neželjenim ishodima, poput povećanog oksidativnog stresa, KV morbiditeta i mortaliteta i razvoja hronične nefropatije grafta [7, 52]. Ispitivanje i određivanje parametara i faktora koji doprinose povećanom oksidativnom stresu, ima naročiti značaj u post-transplantacionom periodu, jer je pokazano da se u osnovi mnogih, ranih i kasnih, komplikacija nakon transplantacije nalazi oksidativno oštećenje [120].

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su da pacijenti sa transplantiranim bubregom imaju povećani oksidativni stres u dugoročnom periodu nakon transplantacije u poređenju sa zdravim ispitanicima (**Tabela 13, Tabela 15, Tabela 17**). Dobijeni rezultat je u skladu sa istraživanjem Vostálová i sar. koji su pokazali da u toku prve nedelje nakon transplantacije bubrega dolazi do značajnog smanjenja nivoa oksidativnog stresa, ali da on ostaje povišen i u kasnijem post-transplantacionom periodu u poređenju sa zdravim ispitanicima [5]. Poznato je da povećani oksidativni stres predstavlja rezultat neravnoteže između formiranja slobodnih radikala i antioksidativnih mehanizama organizma, što vodi ka nastanku i razvoju ateroskleroze, koja se nalazi u osnovi KV morbiditeta i mortaliteta. Dodatno, slobodni radikali svoje efekte ostvaruju direktno i / ili kroz inaktivaciju i redukciju NO bioraspoloživosti, što rezultira endotelnom disfunkcijom, koja se nalazi u osnovi KV bolesti [7, 254].

Iako, parametri određeni u plazmi ukazuju na povišen sistemski oksidativni stres kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (**Tabela 13**), oni međusobno značajno ne koreliraju (**Tabela 14**). Međutim, kako su eritrociti najbrojnije ćelije krvi, čiji su makromolekuli

posebno osetljivi na delovanje slobodnih radikala, ispitivanje parametara oksidativnog stresa u njima na odgovarajući način reflektuje sistemsko oksidativno oštećenje. Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da je koncentracija TBARS u eritrocitima pacijenta sa transplantiranim bubregom viša u poređenju sa kontrolama (**Tabela 15**). Pored toga, vrednosti parametara antioksidativnog sistema u eritrocitima, SOD i GSH, bile su više, dok su GPX i GR bile niže kod pacijenata u poređenju sa kontrolama. Viša aktivnost SOD i koncentracija GSH mogu biti rezultat kompenzatornog odgovora organizma na povećano formiranje slobodnih radikala. Naime, dobijeni rezultat je u skladu sa nalazima Perez Fernandez i sar., koji su pokazali da se aktivnost SOD povećava nakon transplantacije bubrega [255]. Suprotno, Zahmatkesh i sar. su pokazali da je aktivnost SOD bila niža kod pacijenata u poređenju sa kontrolama, dok razlike nije bilo u vrednosti GSH [256]. Međutim, obe studije su bile sprovedene u prvih dve nedelje nakon transplantacije, što se prilično razlikuje u odnosu na period koji je obuhvatilo sprovedeno istraživanje ($3,45 \pm 2,48$ godina). Dodatno, povećana koncentracija GSH u eritrocitima kod pacijenata u odnosu na kontrole može biti rezultat smanjene aktivnosti GPX, koji se verovatno inaktivira u prisustvu većih količina vodonik – peroksida, suicidalnog substrata GPX enzima, formiranog u reakciji dizmutacije superoksid anjon radikala [130]. Povećan oksidativni stres nalazi se u osnovi ateroskleroze, za koje je potvrđeno da predstavlja značajan faktor rizika KV morbiditeta i mortaliteta, ali i hronične nefropatije grafta [120]. U skladu s tim, korelaciona analiza je pokazala da pacijenti sa višim vrednostima TBARS u eritrocitima imaju nižu eGFR, što može da ukaže da se u osnovi CAN i / ili mogućeg odbacivanja nalazi povećan oksidativni stres (**Tabela 16**).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pacijenti sa transplantiranim bubregom imaju značajno više vrednosti ADMA i SDMA u poređenju sa zdravim ispitanicima (**Grafikon 7**). Prethodne studije su pokazale da koncentracije dimetilarginina značajno rastu neposredno nakon transplantacije bubrega, najverovatnije zbog: povećane degradacije metilovanih proteina u toku operacije i/ili kataboličkog efekta kortikosteroida [257, 258], ishemijsko – reperfuzionog oštećenja, hiperglikemije i/ili oksidativnog stresa u ranom periodu nakon transplantacije, koji mogu smanjiti aktivnost DDAH [257, 259, 260]. Ovaj efekat je prisutan i kod odsustva akutnog odbacivanja presađenog organa. Međutim, sa uspostavljanjem funkcije transplantiranog organa vrednosti dimetilarginina se smanjuju [257], ali ostaju povišene u toku post-transplantacionog perioda u poređenju sa opštom populacijom [261, 262]. Na taj način, ADMA, koji predstavlja uremijski toksin i endogeni

inhibitor NOS, smanjuje produkciju NO i može posredovati u endotelnoj disfunkciji, hipertenziji i vaskularnom remodelovanju pacijenata sa transplantiranim bubregom. Ovo je od izuzetnog značaja, ako se zna da NO relaksira glatke mišiće vaskulature i suprimira procese proliferacije glatko – mišićnih ćelija, adheziju leukocita i agregaciju trombocita [263].

Prethodna istraživanja su pokazala da su povišene vrednosti ADMA udružene sa DM, hipertenzijom, hipertrofijom leve komore, povišenim vrednostima LDL holesterola, zadebljanjem intima – medije u arterijama i povišenim KV rizikom kod pacijenta sa HBI [258, 264, 265, 266]. Povišene vrednosti ADMA doprinose smanjenju bioraspoloživosti NO i na taj način pogoršavaju funkciju endotela. Yilmaz i sar. su pokazali da dolazi do smanjenja koncentracije ADMA već od prvog post-transplantacionog dana sa istovremenim poboljšanjem funkcije endotela [267]. Simetrični dimetilarginin, takođe interferira sa sudbinom NO u organizmu, smanjujući njegovu bioraspoloživost, usled kompeticije sa argininom za celularni transporter. Naime, NO nastaje oksidacijom amino kiseline L-arginina, delovanjem enzima NOS, u prisustvu kofaktora tetrahidrobiopterina. Za razliku od ADMA, koji se uglavnom eliminiše biotransformacijom putem DDAH, SDMA se u potpunosti izlučuje renalnim putem i predstavlja rani marker promena u GFR [153]. Međutim, iako je katabolizam glavni put eliminacije ADMA, njene vrednosti su povišene kod svih pacijenata sa oslabljenom funkcijom bubrega, ukazujući na povećan KV rizik. U skladu s tim, prethodna istraživanja, sa ograničenim brojem ispitanika, ukazala su na neophodnost ispitivanja ADMA u post-transplantacionom periodu zbog moguće povezanosti ADMA i gubitka transplantiranog organa [268]. Claes i sar. su pokazali da se vrednosti ADMA i SDMA smanjuju nakon transplantacije bubrega. Međutim, vrednosti ADMA ostaju veće u toku prve godine nakon transplantacije, dok su vrednosti SDMA bili slične u poređenju sa odgovarajućim pacijentima sa HBI [258]. Pored toga, Sahin i sar. ukazuju da endotelna disfunkcija, prikazana kroz povišene vrednosti ADMA može prouzrokovati trombotičke događaje kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [269]. Abedini i sar. ukazuju da su povišene vrednosti ADMA udružene sa povećanim KV morbiditetom, mortalitetom, ali i propadanjem bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [268]. U skladu s ovim nalazima su i rezultati sprovedenog istraživanja, koji pokazuju da ADMA značajno negativno korelira sa eGFR pacijenata u dugoročnom periodu nakon transplantacije (**Tabela 14**). Iako aktivnost DDAH može biti smanjena u sredini sa povećanim oksidativnim stresom [155, 159, 260], nije bilo korelacije između koncentracije ADMA i parametara oksidativnog

stresa u plazmi. Visok stepen korelacije između SDMA i eGFR ($r = -0,7$) može potvrditi potencijalni značaj SDMA, kao parametra bubrežne funkcije.

Razmatrajući parametre oksidativnog stresa u urinu, rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali pozitivnu korelaciju između aktivnosti ektoenzima s koncentracijom TBARS, USH i RCD (**Tabela 18**). Na prvi pogled kontradiktorno, sprovedeno istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju između TBARS u urinu i eGFR. Objašnjenje ovog fenomena može se sagledati kroz pretpostavku da pacijenti sa boljom bubrežnom funkcijom imaju i povećanu filtraciju TBARS kroz glomerule u konačni urin. Takođe, ovo znači da TBARS određen u urinu ne predstavlja samo parametar oksidativnog stresa, koji se generiše na nivou bubrega, već ujedno predstavlja i doprinos sistemskog oksidativnog stresa. Drugo objašnjenje ovog fenomena može se naći u radu Locatelli i sar. [270], gde TBARS na nivou bubrega predstavlja samo lokalno oksidativno oštećenje, nezavisno od sistemskog oksidativnog stresa i bubrežne funkcije, a pronađena značajna korelacija samo posredni rezultat. Međutim, poslednje objašnjenje je manje verovatno. Urinarni nivoi TBARS, USH i RCD u određenom stepenu svakako pokazuju oksidativno oštećenje na nivou bubrega [110]. Naime, proces lipidne peroksidacije membrane može prouzrokovati oštećenje proksimalnih tubula i voditi ka povećanoj aktivnosti membranskih enzima u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom (NAG, APN, DPP IV, GGT). U skladu s tim, ektoenzimi prisutni u renalnim proksimalnim tubulama bubrega imaju veću aktivnost kod pacijenata u poređenju s kontrolama. Određeni u urinu, ektoenzimi mogu predstavljati senzitivne markere oštećenja tubula [28,271,272]. Bone i sar. su pokazali da je aktivnost NAG u urinu pacijenata na terapiji KNI veća u poređenju sa pacijentima, koji boluju od urođenih nefropatija ili kod zdravih ispitanika, ukazujući da je NAG senzitivan marker oštećenja proksimalnih tubula [111]. Marchewka i sar. su pokazali veću aktivnost NAG, ali ne APN, kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji takrolimusom u poređenju sa zdravim ispitanicima. Isti autori nisu pokazali značajnu razliku između pacijenata na terapiji takrolimusom i CsA u pogledu aktivnosti NAG, ukazujući da nema razlike u nefrotoksičnim efektima ova dva leka [28]. Inače, postoje stalna nastojanja da se pronađu specifični biomarkeri, koji bi ukazali na potencijalnu nefrotoksičnost imunosupresivnih lekova, što bi u mnogome olakšalo dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Histološke tehnike predstavljaju zlatni standard za dijagnozu nefrotoksičnosti izazvanu primenom KNI. Međutim, postoji sumnja u specifičnost histoloških tehnika, jer su podaci iz protokolarnih biopsija pokazali da se histološke karakteristike udružene s fibrozom

grafta, mogu detektovati već u trećem mesecu nakon transplantacije bubrega, iako se negativni uticaj na funkciju grafta može meriti tek kasnije u toku post-transplantacionog perioda [109, 112]. Takođe, studije su pokazale da su kod velikog broja pacijenata pronađeni hijalinski depoziti u mišićnim slojevima arteriola, a da pacijenti prethodno nisu bili na terapiji CsA ili takrolimusom. Prugasta fibroza i tubularne mikrokalcifikacije su fokalne lezije, i teško ih je videti u svakom bioptatu, što često može rezultovati negativnim nalazom [109]. U skladu s tim, iznalaženje novih dijagnostičkih biomarkera ranog oštećenja tubula, bilo bi od velike važnosti za moguće preventivno delovanje, ali i detaljnije istraživanje ovog negativnog ishoda imunosupresivne terapije. Pronalazak odgovarajućih biomarkera, koji bi pokazali oštećenje tubula izazvano primenom imunosupresivnih lekova, omogućilo bi raniju intervenciju u cilju poboljšanja bezbednosti imunosupresivne terapije i doprinelo dužem preživljavanju grafta i poboljšanju kvaliteta života pacijenata sa transplantiranim bubregom.

6.5. Uticaj doznog režima takrolimusa, CYP 3A5 i ABCB1 genotipa na parametre oksidativnog stresa i enzimske markere tubularnog oštećenja

Oksidativni stres nakon transplantacije bubrega je posledica: oksidativnog stresa udruženog sa ESRD, imunog odgovora na prisustvo grafta, ishemijsko – reperfuzionog oštećenja, oportunističkih infekcija i imunosupresivne terapije [59, 273]. Prethodne studije su pokazale da pacijenti na terapiji CsA imaju povećan oksidativni stres u poređenju sa pacijentima na terapiji takrolimusom [123]. Međutim, Cvetković i sar. smatraju da nema razlike u vrednosti parametara oksidativnog stresa među pacijenatima na terapiji različitim KNI [274]. Ipak, rezultati prethodnih studija su kontradiktorni kada je reč o tome da li takrolimus povećava [275], smanjuje [276] ili nema efekta na oksidativno oštećenje [277]. Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da dnevna doza takrolimusa pozitivno korelira sa aktivnošću SOD u plazmi, što može ukazati na potencijalne antioksidativne osobine leka (**Tabela 20**). Dodatno, pokazano je da pacijenti sa višim dnevnim dozama takrolimusa ($\geq 0,04$ mg/kg) u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, imaju višu aktivnost SOD u plazmi (**Grafikon 8**). Studija nije pokazala uticaj doznog režima takrolimusa na koncentraciju dimetilarginina u plazmi. Međutim, kako se takrolimus u krvi znatno vezuje za eritrocite, dostižući u proseku 15 puta više koncentracije u poređenju sa odgovarajućim koncentracijama u plazmi [63], procena parametara oksidativnog oštećenja u eritrocitima

adekvatnije može reflektovati uticaj takrolimusa na nivo sistemskog oksidativnog stresa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

U skladu s tim, dobijeni rezultati ukazuju da dnevna doza takrolimusa korelira pozitivno sa GSH, a C0/D odnos takrolimusa korelira negativno sa aktivnošću GPX i koncentracijom GSH u eritrocitima (**Tabela 23**). Ovi rezultati ukazuju da takrolimus može delovati potencijalno kao eritrocitni antioksidans, a ne kao prooksidans, što je u skladu sa tvrdnjama Kędzińska i sar. [276]. U prilog ovim tvrdnjama idu rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa u urinu, koji pokazuju da pacijenti sa dnevnom dozom takrolimusa većom od 0,04 mg/kg imaju niže koncentracije TBARS (**Grafikon 10**). Međutim nema značajnih korelacija farmakokinetičkih parametara takrolimusa i parametara oksidativnog stresa i enzimskih markera oštećenja tubula u urinu. Razlog odsustva korelacije dnevne doze takrolimusa i parametara oksidativnog stresa u urinu, može se naći u činjenici da parametri iz urina pokazuju i lokalno oksidativno oštećenje, a ne samo sistemski oksidativni stres, tj poreklo TBARS u urinu nije samo rezultat filtracije ovih supstanci kroz glomerule, već i lokalne lipidne peroksidacije.

Imunosupresivni tretman može doprineti formiranju slobodnih radikala nakon transplantacije bubrega što je pokazano za CsA u eksperimentalnim istraživanjima [123, 278]. Katalaza, enzim antioksidativne zaštite, koji prevodi vodonik peroksid u vodu i kiseonik, smanjuje starenje epitalnih tubularnih ćelija udruženo sa primenom CsA. Pored toga, na životinjskom modelu je pokazano da CsA može direktnim putem dovesti do stvaranja slobodnih radikala, što je takođe udruženo sa promenom redoks stanja glutaciona [52]. Osim toga, pokazano je da CsA može indukovati produkciju slobodnih radikala *in vitro* i *in vivo* aktivacijom CYP 3A4 i NADPH oksidaze, ali i inhibicijom sinteze glutaciona [104, 277]. Dodatno, moguće je da inhibicija kalcineurina direktno aktivira gene za apoptozu i indukuje proces u tubularnim i intersticijalnim ćelijama, prouzrokujući tubularnu atrofiju, što je pokazano na miševima tretiranim CsA [279]. Pojedini autori smatraju da se zbog sličnih mehanizama dejstva, takrolimus može razmatrati kao prooksidans. Ranije studije su pokazale da takrolimus doprinosi povećanoj produkciji ROS kroz smanjenje aktivnosti KAT [275, 280]. Naime, Tada i sar. su ukazali da takrolimus može povećati produkciju MDA, što je u suprotnosti sa rezultatima sprovedenog istraživanja [275]. Pored toga, pokazano je da se u osnovi akutne nefrotoksičnosti takrolimusa nalazi endotelna disfunkcija, koja je posredovana inhibicijom sinteze NO, vodeći ka inhibiciji NO – posredovane vazodilatacije u bubrezima [52].

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da CYP 3A5 i ABCB1 3435 genski polimorfizam utiču na dozu takrolimusa (**Tabela 19**), međutim nemaju efekta na parametre oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, koncentraciju dimetilarginina u plazmi i aktivnost ektoenzima u urinu. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima većine prethodnih istraživanja, koja su pokazala da ispitivani polimorfizmi ne utiču na farmakodinamiku takrolimusa, ispoljavanje toksičnosti i neželjenih efekata [62, 89]. Suprotno ovim nalazima, Kuypers i sar. su pokazali da CYP 3A5 *1 alel doprinosi nefrotoksičnim efektima takrolimusa [90]. Međutim, dnevne doze takrolimusa koje su primali pacijenti sa ispoljenom nefrotoksičnošću leka, bile su znatno veće, u proseku 0,20 mg/kg. Ovo je dva puta veća količina leka u poređenju sa dozama pacijenata uključenim u ovo istraživanje ($0,08 \pm 0,04$ mg/kg kod pacijenata sa CYP 3A5 *1/*3 genotipom). Naesens i sar. u svom preglednom radu navode da uticaj sistemske izloženosti takrolimusa na nastanak i razvoj nefrotoksičnosti leka nije u punoj meri razjašnjen, s obzirom da određene studije nisu pokazale povezanost veće izloženosti leku i njegove hronične toksičnosti [52].

Dodatno, rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali negativnu korelaciju dnevne doze takrolimusa i eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega (**Tabela 29**). Ovaj nalaz ukazuje da pacijenti sa kontinuirano većim dozama takrolimusa imaju smanjenu funkciju transplantiranog organa.

6.6. Uticaj doznog režima takrolimusa, oksidativnog stresa i dimetilarginina na eGFR

Dugoročna primena KNI može dovesti do hronične nefrotoksičnosti, koja doprinosi razvoju nefropatije transplantiranog bubrega i manifestuje se progresivnim smanjenjem njegove funkcije. [28, 281]. Pored toga, poznato je da se u osnovi CAN nalazi narušena ravnoteža između formiranja ROS i antioksidativne zaštite organizma, što se manifestuje aterosklerotskim lezijama [120]. Međutim, da li su nefrotoksični efekti takrolimusa posredovani oksidativnim stresom, još uvek je nepoznanica. Sprovedena multivarijantna linearna regresiona analiza, koja je uključivala dnevnu dozu takrolimusa, polimorfizme CYP 3A5 i ABCB1 gena i parametre ispitivane u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom, pokazala je da su dnevna doza leka i SDMA, nezavisni prediktori eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije (**Tabela 30**). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno sprovedenim istraživanjima, koji ukazuju da bi SDMA mogla biti novi i pouzdani marker

promena funkcije bubrega [156]. Literaturni podaci ukazuju da bi SDMA mogao biti rani marker oštećenja bubrega, s obzirom da njegove koncentracije rastu paralelno sa koncentracijom kreatinina. Međutim, pojedini autori smatraju da je SDMA raniji marker od porasta serumskog kreatinina, što je pokazano u prethodnim istraživanjima [282]. Kielstein i sar. su pokazali da SDMA može biti rani marker promene u GFR, jer njegova vrednost raste već 6h nakon smanjenja GFR za 50%, a maksimalnu vrednost dostiže u toku 24h. Međutim, isti autori smatraju da nije odgovarajuću selektivnost i specifičnost SDMA, kao markera bubrežne funkcije [283]. Međutim, za razliku od cistatina C, na čije vrednosti može uticati primena kortikosteroida, koja povećava koncentraciju cistatin C [284], visoke doze kortikosteroida nemaju uticaja na vrednost SDMA, što je pokazano kod pacijenata sa IgA nefropatijom [285]. Pored toga, akutna inflamacije ne utiče na SDMA vrednosti, dok je vrednost cistatina C zavisna od sistemske inflamacije [286, 287]. Na osnovu izloženog, moglo bi se pretpostaviti da bi SDMA bila adekvatniji marker bubrežne funkcije u poređenju sa cistatinom C kod transplantiranih pacijenata. Takođe, pojedini autori su pokazali da vrednost SDMA može biti povećana u nekim bolestima nezavisno od bubrežne funkcije [288]. Pihlstrøm i sar. su pokazali da su povišene koncentracije SDMA nezavisno udružene sa povećanim rizikom od mortaliteta, bez obzira na uzrok i gubitkom grafta kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [289]. Zapravo, smatra se da SDMA može inicirati vaskularno oštećenje kroz povećanu produkciju ROS, ispoljavajući na taj način proinflamatorni efekat [290]. Prethodne studije ukazuju da je SDMA uključen u zapaljenske puteve kod pacijenata sa HBI, aktivirajući NF – κ B i povećavajući ekspresiju TNF – α i IL – 6 [289, 291]. Prema tome, SDMA može doprineti zapaljenskim procesima, koji značajno utiču na preživljavanje transplantiranog bubrega [292]. Naime, odmah nakon transplantacije dolazi do izražene inflamacije, koja se kasnije smanjuje u toku post–transplantacionog periodu. Međutim, istovremeno sa inflamacijom dolazi do razvoja intersticijalne fibroze transplantiranog organa. Protokolarne biopsije su pokazale 4 moguća nalaza: normalnu histologiju, inflamaciju bez prateće fibroze, fibrozu bez istovremenih zapaljenskih procesa i fibrozu udruženu sa inflamacijom. U slučaju fibroze praćene inflamacijom dolazi do smanjenog preživljavanja grafta u post-transplantacionom periodu [292, 293]. Protokolarne biopsije su takođe pokazale da je prevalenca ove subkliničke inflamacije veća kod pacijenata tretiranih CsA u poređenju sa pacijentima tretiranim takrolimusom [292]. Ipak, Kielstein i sar. smatraju da je SDMA više marker bubrežne funkcije nego medijator inflamacije [283].

Smanjenje vrednosti ADMA i SDMA u post-transplantacionom periodu može značajno ukazati i doprineti poboljšanju funkcije endotela. Naime, pokazano je da upotreba statina može ispoljiti efekat na koncentraciju SDMA i njegove biološke efekte, tj. doprineti poboljšanju funkcije endotela [294]. Najverovatnije mehanizam koji je u osnovi ovog efekta, je ushodna regulacije endotelijalne NOS [295]. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da su pojedini korisni efekti statina posredovani dimetilargininima.

Nalaz da veća dnevna doza takrolimusa u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega istovremeno odgovara smanjenoj bubrežnoj funkciji, u skladu je sa prethodnim studijama da ispoljavanjem hronične nefrotoksičnosti, takrolimus može dovesti do CAN i gubitka transplantiranog organa [52, 90, 296]. Ipak mehanizam kojim takrolimus doprinosi ovom ishodu nije razjašnjen u potpunosti, ali se pretpostavlja da je zamena nekrotičnih glatko – mišićnih ćelija hijalinskim depozitima na periferiji zida aferentne arteriole u osnovi hronične nefrotoksičnosti, koja se karakteriše histološkim promenama svih delova bubrega, uključujući glomerule, arteriole i tubulo-intersticijum [52, 296]. Suprotno našim rezultatima, Naesens i sar. su pokazali da dnevna doza takrolimusa i sistemska izloženost nisu udružene sa pojavom nefrotoksičnosti, ukazujući na druge faktore koji se nalaze u osnovi nefrotoksičnih efekata takrolimusa. Međutim, ista studija nije ispitivala uticaj doze ili izloženosti leka na GFR [297]. U sprovedenom istraživanju kao prediktor varijabilnosti eGFR uključena je dnevna doza takrolimusa, pre nego C0. Razlog ovome je što se C0 uglavnom nalazio u optimalnom opsegu kod pacijenata uključenim u ovo istraživanje, a time su i njihove razlike male. Međutim, doza neophodna da se koncentracija leka održi u optimalnom opsegu, značajno se razlikuje među pacijentima. Čak i kada bi došlo do izlaženja vrednosti C0 iz terapijskog opsega, vrlo brzo se ona prilagodi promenom doze leka. Shodno tome, dnevna doza takrolimusa predstavlja adekvatniji farmakokinetički parametar u cilju ispitivanje interindividualne varijabilnost u eGFR.

Prethodno je pokazano da CYP 3A5 genotip predstavlja nezavisan prediktor eGFR kod pacijenta u periodu između 6 meseci i 2 godine nakon transplantacije bubrega (**Tabela 12**). Međutim, u ovom istraživanju CYP 3A5 genotip se nije pokazao značajnim prediktorom bubrežne funkcije, najverovatnije zbog manjeg broja uzoraka nosioca CYP 3A5 *1/*3 genotipa. Ipak, potrebe u dnevnoj dozi takrolimusa značajno su se razlikovale među pojedincima sa različitim CYP 3A5 genotipom (**Tabela 19**), čime je još jednom potvrđen značaj ispitivanog polimorfizma CYP 3A5 gena na farmakokinetičku varijabilnost takrolimusa.

Rezultati regresione analize, koja je uključivala dnevnu dozu takrolimusa, polimorfizme CYP 3A5 i ABCB1 gena i parametre oksidativnog stresa u eritrocitima, ukazuju da dnevna doza takrolimusa i TBARS u eritrocitima predstavljaju nezavisne prediktore varijabilnosti eGFR (**Tabela 31**). Ovo je u skladu sa prethodnim nalazima da je oksidativni stres jedan od glavnih medijatora, koji doprinosi nastanku CAN. Prethodno je takođe pokazano da su aterosklerotske lezije uobičajena histološka karakteristika CAN [123]. Ha i sar. su pokazali da produkti intracelularne oksidacije lipida i proteina, kao što je MDA, mogu biti povećani u CAN – u [298]. Prethodna istraživanja su pokazala odbacivanje i toksičnost takrolimusa zavisno od primenjene koncentracije leka [52,299]. Većina objavljenih istraživanja u pogledu nefrotoksičnosti KNI odnosi se na CsA, pri čemu je pokazana povezanost izloženosti CsA sa nastankom nefrotoksičnih efekata. Iako mnogi autori smatraju da su mehanizmi toksičnosti CsA i takrolimusa isti ili slični, još uvek postoji malo sumnje u pogledu istovetnosti mehanizama, koji posreduju u nefrotoksičnosti izazvanoj takrolimusom. U osnovi takrolimusa i CsA su efekti posredovani renalnom ishemijom, koja nastaje usled vazokonstrikcije, što navodi na pretpostavku da su mehanizmi nefrotoksičnih efekata oba leka slični [104]. Takrolimus i CsA ispoljavaju toksične efekte na krvnim sudovima bubrega (arteriolarna hijalinoza), na tubulama (tubularna atrofija i intersticijalna fibroza) i glomerulima (zadebljanje i fibroza Boumanove kapsule i glomerularna fibroza). Vaskularni efekti KNI karakterišu se depozitima hijalina u mediji aferentne arteriole. Na životinjskim modelima je pokazano da proces uključuje vakuolizaciju glatkih mišićnih ćelija i taloženje hijalinskih depozita u zidu krvnog suda [300]. Molekularni mehanizmi koji su u osnovi ovog efekta nisu još uvek razjašnjeni, ali se smatra da postoji povezanost sa funkcijom NFAT – kalcineurina u glatkim mišićnim ćelijama [301]. Međutim, hijelinizaciju arterioala mogu potencijalno uzrokovati nezavisni činioci poput DM, starenja, hipertenzije i dislipidemije [104]. Taloženje hijalina dovodi do vazokonstrikcija arteriola, koja može biti prouzrokovana imunosupresivnim lekovima i uzrokovati lokalnu hipoksiju u tkivu i povećanje produkcije slobodnih radikala [52]. Ipak, ima autora koji smatraju da je takrolimus manje potentan u pogledu ispoljavanja nefrotoksičnosti. Prema njima, takrolimus prouzrokuje slabiji vazokonstriktivni efekat i ima manji fibrogeni potencijal [52, 302, 303]. Potencijalno objašnjenje ovog fenomena može biti i u njegovim potencijalnim antioksidativnim karakteristikama u poređenju s CsA, za koji je dokazano da deluje kao prooksidans [276].

Pored sistemske izloženosti leka, ima hipoteza da se nefrotoksični efekti KNI ostvaruju putem njihove lokalne izloženosti (na nivou bubrega). Sprovedena istraživanja

ukazuju da bi interindividualna varijabilnost u lokalnoj izloženosti takrolimusa mogla doprineti razvoju hronične nefrotoksičnosti kod nekih pacijenata [52]. Izvesne studije su ispitivale uticaj polimorfizama CYP3A5 i ABCB1 gena donora, koji kodiraju odgovarajuće proteine na nivou bubrega, ali rezultati nisu konzistentni [304, 305, 306, 307]. Međutim, istraživanja na ljudima su pokazala da je niska ekspresija PGP udružena sa nastankom hronične nefrotoksičnosti kod primene CsA [304].

Pored, sistemske i lokalne izloženosti nepromenjenom leku, jedna od hipoteza je da metaboliti takrolimusa mogu doprineti razvoju hronične nefrotoksičnosti, ali metaboliti koji se stvaraju u jetri, a ne lokalno na nivou bubrega [308]. Inače sami bubrezi doprinose vrlo malo nastanku metabolita takrolimusa u poređnju sa doprinosom jetre [67]. Ipak, rezultati u pogledu značaja metabolita takrolimusa na razvoj hronične nefrotoksičnosti leka za sada su u domenu kontraverzi [52]. Takođe, u kojoj meri polimorfizmi u genima enzima i transportera lekova doprinose nefrotoksičnim lekovima, još uvek nije razjašnjeno u potpunosti.

Multivarijantna linearna regresiona analiza koja je uključivala dnevnu dozu takrolimusa, ispitivani CYP 3A5 i ABCB1 polimorfizam i parametre oksidativnog stresa u urinu, kao nezavisne prediktore, potvrdila je da na varijabilnost eGFR (zavisna promenljiva) utiče doza i USH u dugoročnom periodu nakon transplantacije (**Tabela 32**). Rezultati sprovedenog istraživanja ukazuju da postoji pozitivna povezanost parametra USH u urinu i eGFR. Kako je već pretpostavljeno, ovaj fenomen može biti objašnjen na način da pacijenti sa boljom bubrežnom funkcijom imaju povećanu filtraciju TBARS i USH u konačni urin.

Ukoliko pretpostavimo da su pacijenti sa smanjenom bubrežnom funkcijom pod većim rizikom za razvoj CAN, koja će na kraju rezultovati afunkcijom transplantiranog organa, predloženo je nekoliko potencijalnih terapijskih strategija, koje bi trebalo da utiču na faktore rizika. Ovo uključuje minimizaciju KNI u okviru imunosupresivnih protokola, tj. primenu KNI u manjim dnevnim dozama, zatim protokole, koji bi podrazumevali isključivanje KNI u kasnijem periodu nakon transplantacije i protokole bez inicijalnih KNI [309]. Međutim, u ovim slučajevima neophodna je rigorozna selekcija pacijenata, kako bi se izbegle posledice neadekvatne imunosupresije. Drugi pristup, bi uključivao razvoj ne – nefrotoksičnih imunosupresiva, poput belatacepta [34,35].

Pored toga, ima autora koji u skladu sa našim istraživanjem smatraju da bi trebalo smanjiti nivo oksidativnog stresa u post–transplantacionom toku [120]. Adekvatan pristup je naročito značajan kod kadaveričnih transplantacija, kada su donori pretrpeli srčanu ili moždanu smrt, jer povećanju oksidativnog stresa doprinosi trajanje ishemije. Naime,

skraćivanje vremena trajanja hladne i tople ishemije i odgovarajuća perfuzija organa i ekstrakorporalna membranska oksigenacije mogu pružiti zadovoljavajuće rezultate u pogledu smanjenja produkcije ROS [310]. Primena dopamina može doprineti smanjenju oksidativnog oštećenja izazvanog ishemijsko – reperfuzionom povredom [120]. Sildenafil, koji se koristi u terapiji erektilne disfunkcije, može povećati koncentraciju NO i poboljšati protok krvi u bubrezima, čime se smanjuje oštećenje izazvano reperfuzijom i toplom ishemijom [311]. Vitamin C, vitamin E, niacin, melatonin i koenzim Q10 mogu ispoljiti povoljne efekte na oksidativni stres nakon transplantacije bubrega, što je pokazano u studijama na životinjama i ljudima [120]. Pored njih, karvedilol, beta – blokator, ima antioksidativne osobine i potencijalnu protektivnu ulogu kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Studije su pokazale da može smanjiti oksidativni stres indukovani primenom CsA [312, 313]. Nebivolol povećava bioraspoloživost NO i ispoljava antioksidativni, antiapoptotički i antiinflamatorni efekat. U studiji na pacovima, primena nebivolola 15 dana pre ishemijsko – reperfuzionog oštećenja, poboljšala je bubrežnu funkciju i smanjila inflamaciju [314]. Takođe, primena blokatora sistema renin – angiotensin – aldosteron, tj. sartana i ACE inhibitora može doprineti smanjenju nivoa oksidativnog stresa. Losartan značajno smanjuje koncentraciju TGF – β i mokraćne kiseline u plazmi, proteinuriju, dok je za ramipril pokazano da smanjuje CsA – indukovani oksidativni stres [315,316]. Statini mogu ispoljiti antiinflamatorno delovanje i smanjiti nivo oksidativnog stresa, ograničavajući aktivaciju NADPH oksidaze i produkciju ROS. Ispoljavanjem pleiotropnih efekata, oni mogu imati povoljan efekat na progresiju CAN. Dodatno, pokazano je da statini mogu povećati aktivnost GPX kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u toku prvih 6 meseci nakon transplantacije, pri čemu nije bilo promena u vrednosti serumskog kreatinina ili GFR [317]. Međutim, ima studija koje su pokazale da primena statina može usporiti pogoršanje bubrežne funkcije [120]. Primena N – acetilcisteina može smanjiti vrednosti parametara oksidativnog stresa nakon reperfuzije, ali bez značajnog uticaja na histopatološke lezije, što je pokazano na pacovima [318]. Takođe, on može suprimirati lipidnu peroksidaciju i povećati koncentraciju glutaciona nakon reperfuzije kod pacova [120]. Međutim, tretman N – acetilcisteinom, koji omogućava produkciju redukovano glutaciona, nije pokazao promenu u parametrima oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom. Međutim njegova primena poboljšava procenjeni eGFR i povećava koncentraciju HDL holesterola, koji pozitivno korelira sa aktivnošću GPX [319]. Dodatno, primena N –acetilcisteina može umanjiti nefrotoksične efekte CsA, što je pokazano kod pacova [320]. U prethodnim

studijama, autori su na životinjskom modelu pokazali da kombinacija N – acetilcisteina sa natrijum – nitroprusidom (donor NO) i fosforamidonom (inhibitor endotelin konvertujućeg enzima), smanjuje bubrežno ishemija – reperfuziono oštećenje, štiteći ćelije od oksidativnog oštećenja [311].

6.7. Značaj ispitivanja genskih polimorfizama antioksidativnih enzima kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

Oksidativni stres je udružen sa progresijom mnogih bolesti, uključujući različite tipove karcinoma, DM, KV oboljenja, neurodegenerativna oboljenja i HBI. Povećan oksidativni stres je rezultat povećane produkcije slobodnih radikala i / ili smanjene antioksidativne zaštite organizma. Brojni faktori doprinose smanjenoj efikasnosti antioksidanasa, uključujući promene na enzimima, toksine ili osnovnu bolest, koja dovodi do njihove degradacije [144]. Ispitivanje povezanosti mutacija prisutnih u genima enzima antioksidativne zaštite i raznih oboljenja od posebne je važnosti, jer omogućavaju identifikovanje pojedinaca, sklonih nekom oboljenju, udruženom sa povećanim oksidativnim stresom. Na osnovu rezultata autora, koji su pokazali povezanost polimorfizama u genima za SOD2 i GPX1 sa HBI, pretpostavljeno je da isti genski polimorfizmi mogu imati značaja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [151]. Od posebne važnosti su genski polimorfizmi prisutni u genu za SOD2, s obzirom da je to jedini antioksidativni enzim, koji je prisutan unutar mitohondrija, glavnom mestu formiranja ROS za vreme ćelijskog metabolizma u fiziološkim uslovima. Polimorfizam Ala –9 Val u genu za SOD2 je najviše ispitan SNP do sada, a karakteriše ga zamena Ala sa Val u poziciji 9 ushodno od mesta raskida veze sa signalnim peptidom [150]. Inače, Val alel ovog polimorfizma rezultuje nestabilnom iRNK, koja posledično menja transport SOD2 proteina u mitohondrije i njihovom smanjenom antioksidativnom zaštitom [142].

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su da se aktivnost SOD, GPX i GR, kao i koncentracija GSH u eritrocitima nije razlikovala u odnosu na SOD2 genotip (**Tabela 33**). Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjima Crawford i sar., koji su takođe ispitali povezanost ovog genskog polimorfizama i eritrocitnu aktivnost antioksidativnih enzima, ali kod pacijenata sa HBI [144]. Međutim, nalazi sprovedenog istraživanja pokazali su da su pacijenti sa Ala / Ala genotipom imali niže vrednosti TBARS u urinu u poređenju sa nosiocima Val alela (Ala / Val i Val / Val genotip) (**Grafikon 11**). U skladu s tim dobijeni

rezultati istraživanja pokazuju da ispitivani polimorfizam u genu za SOD2 može imati uticaja na oksidativno oštećenje, koje je ispoljeno na nivou bubrega. Iako, se vrednosti TBARS u plazmi i eritrocitima nisu razlikovale među nosiocima različitog SOD2 genotipa, vrednosti TBARS na nivou bubrega, zapravo pokazuju i sistemski i lokalni nivo oksidativnog stresa.

Sistem glutation peroksidaza / glutation je glavni mehanizam odbrane protiv povećanog oksidativnog stresa. Glutation peroksidaza 1 je citozolni enzim, uglavnom prisutan u eritrocitima, bubrezima i jetri. Genski polimorfizam, Pro200Leu, karakteriše zamena Pro sa Leu u poziciji 200, i rezultuje smanjenom aktivnošću GPX1 enzima. Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da pacijenti sa Leu alelom imaju povišene aktivnosti GR u eritrocitima, dok nije bilo razlike u aktivnosti drugih antioksidativnih enzima i koncentraciji GSH među pacijentima sa različitim GPX1 genotipom (**Tabela 34**). Dobijeni rezultat može biti objašnjen kompezatornim odgovorom i povećanjem aktivnosti GR na potencijalno niske vrednosti GPX.

Dobijeni rezultati su pokazali da su pacijenti, nosioci istovremeno Val alela, SOD2 Ala -9Val i Leu alela, GPX1 Pro200Leu genskog polimorfizma imali izraženije smanjenje bubrežne funkcije u periodu između prve i druge godine nakon transplantacije (**Grafikon 14**). Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjima Crawford i sar. koji su pokazali da nosioci Val alela imaju značajnije smanjenje bubrežne funkcije kod pacijenata sa HBI [151]. Smatra se da je efekat ovih polimorfizama udružen sa postojećom vaskularnom bolešću ili DM, koji su najčešći primarni uzroci HBI, koja posledično vodi do transplantacije. Mnoge studije potvrdile su povezanost Ala -9Val polimorfizma, uključujući KV bolest i DM [142, 321, 322]. Takođe, u studiji koja je uključivala veliki broj ispitanika pokazano je da Val alel kod žena udružen sa većim nivoom LDL holesterola [323]. Mohammedi i sar. su pokazali udruženost Val alela sa izraženijim pogoršanjem nefropatije kod pacijenata sa DM tipa 1 [324]. S druge strane, ima autora koji nisu pokazali povezanost ispitivanog SOD2 polimorfizma i odložene funkcije grafta, akutnog ili hroničnog odbacivanja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [325].

Ispitivani, GPX1 Pro200Leu polimorfizam, može uticati na vrednost eGFR kod pacijenata sa HBI, ali nije pokazano da utiče na progresiju HBI [144]. Smatra se da ovaj polimorfizam ostvaruje efekte na bubrežnu funkciju kod transplantiranih pacijenata utičući na proces ateroskleroze. Ista studija smatra da je GPX1 ključni enzim u zaštiti krvnih sudova od štetnog delovanja oksidativnog stresa [145]. Dodatno, oba ispitivana polimorfizma svoje efekte na funkciju bubrega ostvaraju kada su odgovarajući aleli, Val, odnosno Leu prisutni

zajedno u genomu pojedinca sa transplantiranim bubregom Iako, ispitivani polimorfizmi utiču na propadanje bubrežne funkcije, rezultati multivarijantne regresione analize pokazuju da ispitivani polimorfizmi nemaju uticaja na vrednosti i varijabilnost eGFR među pacijentima (**Tabela 35**). Ovo je suprotno rezultatima Caword i sar. koji su pokazali da GPX1 polimorfizam, tj. nosioci Leu / Leu genotipa imaju niže vrednosti glomerularne filtracije kod pacijenata sa HBI [199].

Pored toga, Dutkiewicz i sar. su ispitivali uticaj GPX1 polimorfizma na pojavu odložene funkcije grafta, akutnog odbacivanja, ali i razvoj hronične nefropatije grafta. Međutim nije bilo značajne povezanosti, ovih post-transplantacionih komplikacija i varijabilnosti GPX1 gena [326]. S druge, strane pokazano je da bi ispitivani polimorfizam mogao biti u osnovi PTDM. Naime, autori su pokazali da su nosioci Leu alela skloniji razvoju ove komplikacije [145]. Od posebnog značaja je genotipizacija pacijenata na takrolimusu, jer on ima izraženiji dijabetogeni potencijal u poređenju sa CsA.

Takrolimus je okosnica savremene imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega. Međutim, to je lek malog terapijskog indeksa i izražene interindividulne varijabilnosti u farmakokinetici, pa je sprovođenje terapijskog monitorniga od izuzetne važnosti u ciju održanja koncentracije leka u odgovarajućem terapijskom opsegu. Međutim, uprkos primeni TDM, određeni pacijenti teško postižu ciljne koncentracije takrolimusa u krvi, ili su pri optimalnim koncentracijama leka izloženi toksičnosti leka ili odbacivanju grafta. Sprovedeno istraživanje je potvrdilo rezultate prethodnih studija, koje su pokazale da je polimorfizam A6986G, prisutan u genu za CYP 3A5, značajan prediktor dnevne doze i izloženosti takrolimusa. Prethodno sprovedene studije ukazale su da bi uvođenje genotipizacije CYP 3A5 kod pacijenta sa transplantiranim bubregom bilo od naročitog značaja za uspostavljanje inicijalne doze takrolimusa. Međutim, ovo istraživanje je pokazalo da ispitivani polimorfizam može imati uticaj na farmakokinetiku takrolimusa, ne samo u ranom, već i u kasnijem periodu nakon transplantacije bubrega. To je od posebne važnosti prilikom razmatranja dugoročnih efekata primene leka. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pacijenti, koji eksprimiraju CYP 3A5 imaju smanjenu bubrežnu funkciju u dugoročnom periodu nakon transplantacije, najverovatnije zbog kontinuiranog izlaganja većim dozama takrolimusa. Ovo je od naročitog značaja, jer hronična nefrotoksičnost

takrolimusa može doprineti nefropatiji transplantiranog organa, koja se karakteriše progresivnim propadanjem bubrežne funkcije i posledičnim odbacivanjem grafta.

Transplantacija bubrega rešava mnoge poremećaje udružene sa HBI i pokazuje značajnu prednost u odnosu na dijalizni tretman, međutim nivo oksidativnog oštećenja je veći u poređenju sa opštom populacijom, što je ova studija potvrdila. Povećan oksidativni stres doprinosi endotelnoj disfunkciji, direktnim delovanjem ROS, i/ili indirektno kroz smanjenje bioraspoloživosti NO. Smanjenju bioraspoloživosti NO mogu doprineti i dimetilarginini, ADMA i SDMA, i na taj način posredovati u razvoju endotelne disfunkcije. Literaturni podaci su pokazali da je poremećena funkcija endotela u osnovi hronične nefropatije grafta, što je potvrđeno prisustvom aterosklerotskih lezija kod protokolarnih biopsija. U skladu s tim bi ispitivanje SDMA nakon transplantacije bubrega bi moglo biti od posebne važnosti, razmatrajući ga kao potencijalni rani marker promena u bubrežnoj funkciji. Ovo je od posebne važnosti kada se zna da pravovremeno identifikovanje promena u GFR, može biti osnov terapijske strategije, koja bi mogla preventivno delovati na potencijalno odbacivanje grafta. Rezultati sprovedenog istraživanja disertacije su pokazali da SDMA u velikom procentu objašnjava varijabilnost u eGFR među pacijentima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Dodatno, ovo istraživanje je pokazalo da parametri oksidativnog stresa u urinu pozitivno koreliraju sa enzimskim markerima oštećenja tubula, ukazujući da je ono posredovano povećanim oksidativnim stresom. Međutim, nije razjašnjeno u potpunosti da li takrolimus doprinosi oksidativnom oštećenju i na taj način ostvaruje efekat na smanjenje bubrežne funkcije. Ovo istraživanje je pokazalo da takrolimus ispoljava potencijalno antioksidativno delovanje u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom, kroz povećanje koncentracije redukovano glutatona i aktivnost glutation peroksidaze. Dodatno, rezultati sprovedenog istraživanja ukazuju da su dnevna doza takrolimusa i oksidativni stres nezavisni i negativni prediktori varijabilnosti eGFR među pacijenatima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Ovo znači da takrolimus može doprineti propadanju bubrežne funkcije u dugoročnom periodu nakon transplantacije, ali očigledno taj efekat nije posredovan oksidativnim stresom.

Pored toga, povećan oksidativni stres može biti rezultat smanjenog antioksidativnog kapaciteta organizma, između ostalog zbog prisutnih mutacije u genima enzima antioksidativne zaštite, koji mogu smanjiti njihovu aktivnost. Polimorfizmi Ala – 9 Val u genu sa mangan – zavisnu SOD i Pro 200 Leu u genu za GPX1u genu su najčešće ispitivani do danas. Prethodne studije su pokazale da su udruženi sa DM i KV bolesti, zbog čega se

smatra da bi mogli biti od značaja kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, jer je DM među glavnim faktorima rizika za nastanak HBI, a KV oboljenja su često pridružene bolesti transplantacije. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da su nosioci Val alela SOD2 i Leu alela GPX1 genskog polimorfizma skloniji izraženijem smanjenju bubrežne funkcije u dugoročnom periodu nakon transplantacije.

7. Zaključak

Na osnovu rezultata doktorske disertacije, može se zaključiti sledeće:

1. Dobijeni rezultati sprovedenog istraživanja ukazuju da nije bilo razlike u distribuciji polimorfizama, A6986G na genu za citohrom P450 3A5, C3435T na ABCB1 genu, Ala -9 Val na genu za Mn – zavisnu superoksid dizmutazu (Mn – SOD, SOD2) i Pro200Leu na genu za glutation peroksidazu 1 (GPX1) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Nosioi citohrom P450 3A5 *1/*3 genotipa za razliku od nosioca citohrom P450 3A5 *3/*3 genotipa zahtevaju veće doze takrolimusa u cilju održanja terapijske koncentracije leka u krvi u optimalnom opsegu u kratkoročnom (mesec dana) i dugoročnom periodu (od šest meseci do dve godine) nakon transplantacije bubrega.
3. Citohrom P450 3A5 A6986G genski polimorfizam predstavlja stalan i nezavisan prediktor izloženosti takrolimusa tokom perioda od dve godine nakon transplantacije.
4. ABCB1 C3435T genski polimorfizam može imati uticaja na dozni režim takrolimusa, ali efekat ovog polimorfizma nije stalan i nezavisan od efekta citohrom P450 3A5 A6986G genskog polimorfizma
5. Citohrom P450 3A5 A6986G genski polimorfizam predstavlja značajan prediktor brzine glomerularne filtracije u dugoročnom periodu (od šest meseci do dve godine) nakon transplantacije bubrega, pri čemu nosioci citohrom P450 3A5 *1/*3 genotipa za razliku od nosioca citohrom P450 3A5 *3/*3 genotipa su pokazali izraženije smanjenje bubrežne funkcije u periodu nakon dve godine od transplantacije bubrega.

6. Pacijenti u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega pokazuju veće vrednosti parametara oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, veće koncentracije dimetilarginina u plazmi i veće aktivnosti enzima markera oštećenja tubula u urinu u poređenju sa zdravim ispitanicima.
7. Parametri oksidativnog stresa određeni u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom ne koreliraju međusobno, niti sa brzinom glomerularne filtracije.
8. Koncentracije dimetilarginina u plazmi pokazuju negativnu korelaciju sa brzinom glomerularne filtracije, ali ne koreliraju sa parametrima oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom.
9. Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima pacijenata sa transplantiranim bubregom pokazuju međusobnu pozitivnu korelaciju, s tim da pacijenti sa većim vrednostima TBARS i SOD imaju i smanjenu bubrežnu funkciju.
10. Parametri oksidativnog stresa određeni u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom pokazuju međusobnu pozitivnu korelaciju, s tim da pacijenti sa većim vrednostima TBARS i RCD u urinu pokazuju izraženije oštećenje tubula prikazano kroz aktivnost enzima markera tubulskog oštećenja.
11. Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da dnevna doza takrolimusa pozitivno korelira sa koncentracijom GSH u eritrocitima, kao i da odnos koncentracije i doze leka pokazuje negativnu korelaciju sa koncentracijom GSH i aktivnošću GPX u eritrocitima.
12. Pacijenti sa većom dnevnom dozom takrolimusa su imali niže vrednosti TBARS u urinu u dugoročnom periodu nakon transplantacije
13. Iako takrolimus pokazuje antioksidativne osobine, primenjena multivarijantna linearna regresiona analiza ukazuju da dnevna doza takrolimusa i oksidativni

stres određen u eritrocitima, nezavisno i negativno utiču na glomerularnu filtraciju u dugoročnom periodu nakon transplantacije.

14. Multivarijantna linearna regresiona analiza ukazuje da ukupne SH grupe u urinu predstavljaju nezavisan i pozitivan prediktor brzine glomerularne filtracije u dugoročnom periodu nakon transplantacije.
15. Genski polimorfizmi citohrom P450 3A5 A6986G i ABCB1 C3435T ne pokazuju uticaj na ispitivane parametre oksidativnog stresa u plazmi, eritrocitima i urinu, na vrednosti ADMA i SDMA u plazmi, kao i na aktivnost enzima markera oštećenja tubula.
16. Nosioци Val alela, polimorfizma Ala -9 Val u genu za SOD2, pokazuju više vrednosti TBARS u urinu u dugoročnom periodu nakon transplantacije.
17. Nosioци istovremeno Val alela, genskog polimorfizma SOD2 Ala -9 Val i Leu alela genskog polimorfizma GPX1 Pro200Leu pokazuju značajnije smanjenje bubrežne funkcije u periodu između prve i druge godine nakon transplantacije u poređenju sa ostalim pacijentima.
18. Multivarijantna linearna regresiona analiza pokazuje da polimorfizmi Ala – 9Val u genu za SOD2 i Pro200Leu u genu za GPX1 nemaju efekta na varijabilnost bubrežne funkcije među pacijentima.

Ovo istraživanje je potvrdilo uticaj CYP 3A5 genskog polimorfizma na dozni režim takrolimusa kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da ispitivani polimorfizam nema značaja samo u ranom, već i u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, predstavljajući značajan prediktor dnevne doze leka. Određivanje genotipa CYP 3A5 u kliničkoj praksi omogućuje individualizaciju doznog režima takrolimusa i sprovođenje personalizovane medicine kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Prilagođavanje doze na osnovu genotipa CYP 3A5 doprinelo bi smanjenju farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa i rizika za razvoj toksičnih efekata. Iako transplantacija bubrega rešava mnoge komplikacije, koje prate HBI i pokazuje prednost

u odnosu na dijalizni tretman, povećan oksidativni stres još uvek predstavlja nerešivu enigm u post-transplantacionom periodu. Sprovedeno istraživanje je pokazalo potencijalno antioksidativno delovanje takrolimusa na nivou eritrocita. Takrolimus može doprineti smanjenju bubrežne funkcije u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, ali očigledno taj efekat nije posredovan oksidativnim stresom. Uvođenje terapijskih strategija, koje bi imale za cilj smanjenje ukupne izloženosti takrolimusa s jedne, i oksidativnog oštećenja s druge strane, kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, predstavlja izazov i potrebu u godinama koje slede.

8. Literatura

1. Chapman JR. What are the key challenges we face in kidney transplantation today? *Transplant Res* 2013; 2(Suppl 1): S1.
2. Marriot J, Cockwell P, Stringer S. Chronic kidney disease and end - stage renal disease. In: Walker R, Whittlesea C, editors. *Clinical pharmacy and therapeutics*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2012. p. 272-94.
3. Tapiawala S, Tinckam K, Cardella C, Schiff J, Cattran D, Cole E, et al. Delayed Graft Function and the Risk for Death with a Functioning Graft. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 153–61.
4. Abbas, AK, Lichtman AH, Pallai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 365-388
5. Vostálová J, Galandáková A, Svobodová AR, Orolinová E, Kajabová M, Schneiderka P, et al. Time-course evaluation of oxidative stress-related biomarkers after renal transplantation. *Ren Fail* 2012; 34: 413–9.
6. Ganji MR, Harririan A. Chronic allograft dysfunction: major contributing factors. *Iran J Kidney Dis* 2012; 6: 88-93.
7. Li X, Zhuang S. Recent advances in renal interstitial fibrosis and tubular atrophy after kidney transplantation. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2014; 7:15.
8. 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.
9. Menon MC, Murphy B. Maintenance immunosuppression in renal transplantation. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13: 662-71.
10. Kaufman DB, Shapiro R, Lucey MR, Cherikh WS, T Bustami R, Dyke DB. Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant* 2004; 4 (Suppl 9): 38-53.
11. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 2: 1323–7.
12. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 1989; 2: 1000-4.
13. Margreiter R, European tacrolimus vs ciclosporin microemulsion renal transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin

- microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 2002; 359: 741-6.
14. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 1978-80.
 15. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 584-91.
 16. Chamienia A, Biedunkiewicz B, Król E, Debska-Slizień A, Rutkowski B. One-year observation of kidney allograft recipients converted from cyclosporine microemulsion to tacrolimus. *Transplant Proc* 2006; 38: 81-5.
 17. Matas AJ. Minimization of steroids in kidney transplantation. *Transpl Int* 2009; 22: 38-48.
 18. Woodle ES, First MR, Pirsch J, Shihab F, Gaber AO, Van Veldhuisen P, et al. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial comparing early (7 day) corticosteroid cessation versus long-term, low-dose corticosteroid therapy. *Ann Surg* 2008; 248: 564-77.
 19. Pascual J, van Hooff JP, Salmela K, Lang P, Rigotti P, Budde K. Three-year observational follow-up of a multicenter, randomized trial on tacrolimus-based therapy with withdrawal of steroids or mycophenolate mofetil after renal transplant. *Transplantation* 2006; 82: 55-61.
 20. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*. 2005; 80 (2 Suppl): S181-90.
 21. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik D, Magee JC, et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000; 69: 2405-9.
 22. Lang P, Pardon A, Audard V. Long-term benefit of mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation* 2005; 79 (3 Suppl): S47-8.
 23. Salvadori M, Holzer H, de Mattos A, Sollinger H, Arns W, Oppenheimer F, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant* 2004; 4: 231-6.
 24. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. *The*

- International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 1997; 63: 39-47.
25. 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.
 26. 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: 1973-85.
 27. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 2005; 331:810.
 28. Marchewka Z, Kuźniar J, Zynek-Litwin M, Falkiewicz K, Szymańska B, Roszkowska A, et al. Kidney graft function in long-term cyclosporine and tacrolimus treatment: comparative study with nephrotoxicity markers. *Transplant Proc* 2009;41: 1660-1665.
 29. Gatault P, Lebranchu Y. Conversion to mTOR-inhibitor-based immunosuppression: which patients and when? *Transplant Res* 2013; 2 (Suppl 1): S3.
 30. Rostaing L, Kamar N. mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field? *J Nephrol* 2010; 23: 133-42.
 31. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124: 471-84.
 32. Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (Suppl 8): viii61-viii65.
 33. Merkel S, Mogilevskaja N, Mengel M, Haller H, Schwarz A. Side effects of sirolimus. *Transplant Proc* 2006; 38: 714-5.
 34. Sharif A, Shabir S, Chand S, Cockwell P, Ball S, Borrows R. Meta-analysis of calcineurin-inhibitor-sparing regimens in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 2107-18.
 35. Hardinger KL, Brennan DC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *World J Transplant* 2013; 3: 68-77.

36. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003; 349:1907-15.
37. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant* 2005; 5: 443-53.
38. Knechtle SJ, Fernandez LA, Pirsch JD, Becker BN, Chin LT, Becker YT, et al. Campath-1H in renal transplantation: The University of Wisconsin experience. *Surgery* 2004; 136: 754-60.
39. Magliocca JF, Knechtle SJ. The evolving role of alemtuzumab (Campath-1H) for immunosuppressive therapy in organ transplantation. *Transpl Int* 2006; 19: 705-14.
40. Hanaway MJ, Woodle ES, Mulgaonkar S, Peddi VR, Kaufman DB, First MR, et al. Alemtuzumab induction in renal transplantation. *N Engl J Med* 2011; 364: 1909-19.
41. Sutherland AI, Akhtar MZ, Zilvetti M, Brockmann J, Ruse S, Fuggle SV, et al. Alemtuzumab and sirolimus in renal transplantation: six-year results of a single-arm prospective pilot study. *Am J Transplant* 2014; 14: 677-84.
42. Budde K, Schütz M, Glander P, Peters H, Waiser J, Liefeldt L, et al. FTY720 (fingolimod) in renal transplantation. *Clin Transplant* 2006; 20 (Suppl 17):17-24.
43. Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S. Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Options. *Pharmacotherapy* 2014; 34: 733-44.
44. Wang H, Arp J, Liu W, Faas SJ, Jiang J, Gies DR, et al. Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. *J Immunol* 2007; 179: 4451-63.
45. Flint SM, Walker RG, Hogan C, Haeusler MN, Robertson A, Francis DM, et al. Successful ABO-incompatible kidney transplantation with antibody removal and standard immunosuppression. *Am J Transplant* 2011; 11: 1016-24.
46. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody - and cell-mediated acute rejection. *Transplantation* 2008; 86: 1754-61.

47. Hota JK, Sarin A. Newer immunosuppressants in renal transplantation. *Apollo Medicine* 2012; 9: 44–9.
48. Goldwater R, Keirns J, Blahunka P, First R, Sawamoto T, Zhang W, et al. A phase 1, randomized ascending single-dose study of antagonist anti-human CD40 ASKP1240 in healthy subjects. *Am J Transplant* 2013; 13: 1040-6.
49. Liu EH, Siegel RM, Harlan DM, O'Shea JJ. T cell-directed therapies: lessons learned and future prospects. *Nat Immunol* 2007; 8: 25-30.
50. Fantini MC, Becker C, Kiesslich R, Neurath MF. Drug insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 633-44.
51. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:472-84.
52. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 481-508.
53. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22:328- 335.
54. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002; 24: 330-350.
55. Press RR, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Individualizing calcineurin inhibitor therapy in renal transplantation--current limitations and perspectives. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 176-86.
56. MacPhee IA. Pharmacogenetic biomarkers: cytochrome P450 3A5. *Clin Chim Acta* 2012; 413:1312–7.
57. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 296-8.
58. Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 184–198.
59. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 339-348.

60. Han N, Yun HY, Hong JY, Kim IW, Ji E, Hong SH, et al. Prediction of the tacrolimus population pharmacokinetic parameters according to CYP3A5 genotype and clinical factors using NONMEM in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 53-63.
61. Benkali K, Rostaing L, Premaud A, Woillard JB, Saint-Marcoux F, Urien S, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in renal transplant recipients on a new once-daily formulation. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49: 683-92.
62. Hesselink DA, Bouamar R, Elens L, van Schaik RH, van Gelder T. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2014; 53: 123-139.
63. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 623-53.
64. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wachter VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999; 62: 25-31.
65. Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 159-68.
66. Pauli-Magnus C, Kroetz DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res* 2004; 21: 904-13.
67. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 836-47.
68. Lemahieu WP, Maes BD, Verbeke K, Vanrenterghem YF. Alterations of CYP3A4 and P-glycoprotein activity in vivo with time in renal graft recipients. *Kidney Int.* 2004; 66: 433-40.
69. Veličković-Radovanovic R, Mikov M, Catić-Đordjević 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: 471-80.
70. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 813-51.

71. Uber PA, Mehra MR, Scott RL, Prasad AK, Park MH. Ethnic disparities in the pharmacologic characteristics of tacrolimus in heart transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33: 1581-2.
72. Kimikawa M, Kamoya K, Toma H, Teraoka S. Effective oral administration of tacrolimus in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2001; 15: 324-9.
73. van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Boots JM, van Hooff JP. Evidence that fasting does not significantly affect trough levels of tacrolimus in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2002; 34: 1723-5.
74. Veličković-Radovanović R, Catić-Đordjević A, Milovanović JR, Djordjević V, Paunović G, Janković SM. Population pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2010; 48: 375-82.
75. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 741-62.
76. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:141-75.
77. Vavić N, Rančić N, Dragojević-Simić V, Drašković-Pavlović B, Bokonjić D, et al. The influence of comedication on tacrolimus blood concentration in patients subjected to kidney transplantation: a retrospective study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 39: 243-53.
78. Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J, et al. Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 111: 217-23.
79. Pirsch J, Bekersky I, Vincenti F, Boswell G, Woodle ES, Alak A, et al. Coadministration of tacrolimus and mycophenolate mofetil in stable kidney transplant patients: pharmacokinetics and tolerability. *J Clin Pharmacol* 2000; 40: 527-32.
80. 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: 275-80.

81. Park SI, Felipe CR, Pinheiro-Machado PG, Garcia R, Fernandes FB, Casarini DE, et al. Tacrolimus pharmacokinetic drug interactions: effect of prednisone, mycophenolic acid or sirolimus. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23: 137-145.
82. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-91.
83. Macphee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation* 2008; 85:163–5.
84. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002; 74: 1486-9.
85. Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 835–849
86. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; 79:499–502.
87. Barry A, Levine M. A systematic review of the effect of CYP3A5 genotype on the apparent oral clearance of tacrolimus in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 708-14.
88. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 914-9.
89. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49: 207-21.
90. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 394-404.

91. Cusinato DA, Lacchini R, Romao EA, Moysés-Neto M, Coelho EB. Relationship of Cyp3a5 Genotype and Abcb1 Diplotype to Tacrolimus Disposition in Brazilian Kidney Transplant Patients. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 78: 364-72.
92. Kurzawski M, Dąbrowska J, Dziewanowski K, Domański L, Perużyńska M, Drożdżik M. CYP3A5 and CYP3A4, but not ABCB1 polymorphisms affect tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2014; 15: 179-88.
93. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-94.
94. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3473-8.
95. Li Y, Hu X, Cai B, Chen J, Bai Y, Tang J, et al. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435 polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 2012; 27: 12-8.
96. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 693-704.
97. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-8.
98. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011; 12: 1281-91.
99. Zhang JJ, Zhang H, Ding XL, Ma S, Miao LY. Effect of the P450 oxidoreductase 28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 807-12.

100. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(Suppl 3): S1–S157.
101. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Fürstenberg A, Yang CL, Roeschel T, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med* 2011; 17: 1304-9.
102. Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;4: CD005161.
103. Lo A. Strategies to prevent chronic allograft nephropathy in kidney transplantation: focus on calcineurin inhibitors. *Prog Transplant* 2004;14:157-64.
104. Pallet N, Djamali A, Legendre C. Challenges in diagnosing acute calcineurin-inhibitor induced nephrotoxicity: from toxicogenomics to emerging biomarkers. *Pharmacol Res* 2011; 64: 25-30.
105. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2002; 62: 2257-63.
106. Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F445-55.
107. Chevalier RL, Forbes MS. Generation and evolution of atubular glomeruli in the progression of renal disorders. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 197-206.
108. Heering P, Ivens K, Aker S, Grabensee B. Distal tubular acidosis induced by FK506. *Clin Transplant* 1998; 12: 465-71.
109. Snanoudj R, Royal V, Elie C, Rabant M, Girardin C, Morelon E, et al. Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2635-46.
110. Cvetković T, Vlahović P, Đorđević V, Zvezdanović L, Pavlović D, Kocić G, et al. The significance of urinary markers in the evaluation of diabetic nephropathy. *J Med Biochem* 2008; 27: 376-82.

111. Bone JM, Amara AB, Shenkin A, Hammad A, Sells RA, Alexander JL, et al. Calcineurin inhibitors and proximal renal tubular injury in renal transplant patients with proteinuria and chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79: 119-22.
112. Câmara NO, Williams WW Jr, Pacheco-Silva A. Proximal tubular dysfunction as an indicator of chronic graft dysfunction. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 229-36.
113. Kuźniar J, Marchewka Z, Krasnowski R, Boratyńska M, Długosz A, Klinger M. Enzymuria and low molecular weight protein excretion as the differentiating marker of complications in the early post kidney transplantation period. *Int Urol Nephrol* 2006; 38: 753-8.
114. Marrer E, Dieterle F. Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 243: 167-79.
115. Stefanović V, Vlahović P, Ardaillou N, Ronco P, Ardaillou R. Cell surface aminopeptidase A and N activities in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1992; 41: 1571-80.
116. Quesada A, Vargas F, Montoro-Molina S, O'Valle F, Rodríguez-Martínez MD, Osuna A, et al. Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PLoS One* 2012; 7: e40402.
117. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999; 85: 9-24.
118. Vlahović P, Avramović V, Stanković M, Savić S, Todorović M. Elevated serum dipeptidyl peptidase IV activity in patients with chronic tonsillitis. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 70-4.
119. Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1980;12: 1-58.
120. 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: 357-72.
121. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, et al. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol* 1998; 275: F595–F604.

122. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* 1994; 23: 957–961.
123. Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou MV, Vlachos IS, Papachristodoulou A, Kostakis AI. Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol* 2006; 38: 343-8.
124. Vural A, Yilmaz MI, Caglar K, Aydin A, Sonmez A, Eyileten T, et al. Assessment of oxidative stress in the early posttransplant period: comparison of cyclosporine A and tacrolimus-based regimens. *Am J Nephrol* 2005; 25:250-5.
125. Chrzanowska M, Kamińska J, Głyda M, Duda G, Makowska E. Antioxidant capacity in renal transplant patients. *Pharmazie*. 2010; 65: 363-6.
126. Raj DS, Lim G, Levi M, Qualls C, Jain SK. Advanced glycation end products and oxidative stress are increased in chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2004; 43:154-60.
127. Ruiz MC, Medina A, Moreno JM, Gómez I, Ruiz N, Bueno P, et al. Relationship between oxidative stress parameters and atherosclerotic signs in the carotid artery of stable renal transplant patients. *Transplant Proc* 2005; 37:3796-8.
128. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *J Med Biochem* 2008; 27: 409-425.
129. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 344-56.
130. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
131. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13.
132. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* 2003; (84): S11-4.
133. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-32.

134. Cvetković T, Mitić B, Lazarević G, Vlahović P, Antić S, Stefanović V. Oxidative stress parameters as possible urine markers in patients with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 2009; 23: 337-42.
135. Refsum H, Ueland P, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
136. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: Prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerosis outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20.
137. Eskes TKAB. Open or closed? A word of differences: A history of homocysteine research. *Nutr Rev* 1998; 56: 236-44.
138. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
139. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite- mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998; 37: 1613–22.
140. Stralin P, Marklund SL. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1994; 298: 347–52.
141. Buschfort C, Muller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* 1997; 57: 651-8.
142. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2008; 9:30.
143. Chistyakov DA, Savostanov KV, Zotova EV, Nosikov VV. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2001; 2: 4.
144. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK, et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 2012; 501: 89-103.

145. Dutkiewicz G, Domanski L, Pawlik A, Binczak-Kuleta A, Safranow K, Ciechanowicz A, et al. Polymorphisms of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase genes in patients with post-transplant diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2010; 41: 350-5.
146. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-312.
147. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39.
148. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3217-66.
149. Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, et al. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 2002; 48: 742– 53.
150. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 4471-3.
151. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2806-13.
152. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004; 53: 2455-60.
153. Cvetković T, Pavlović R, Đordjević VB, Stojanović I, Veličković-Radovanović R, Ignjatović A, et al. Dimethylarginine — biomarkers in progression of kidney disease. *J Med Biochem* 2012; 31:301–9.
154. Zocalli C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and atherosclerosis in end stage renal disease. *Blood Purif* 2003; 21: 29-36.
155. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl): 2842S-2847S.

156. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function-a metaanalysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2446–51.
157. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end stage renal disease; A prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-7.
158. Ignjatović AM, Cvetković TP, Pavlović RM, Đorđević VM, Milošević ZG, Đorđević VB, et al. Endothelial dysfunction, inflammation and malnutrition markers as predictors of mortality in dialysis patients: multimarker approach. *Int Urol Nephrol* 2013; 45: 1715-24.
159. Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Fukami K, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:115-21.
160. 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: 461-70.
161. Ashavaid TF, Raje HS, Shah BV, Shah SA. Design of Allele Specific PCR for Rapid Detection of CYP3A5 (A6986G) and Mdr-1 (C3435T) Polymorphisms. *Indian J Clin Biochem* 2011; 26: 18-21.
162. Andreeva IL, Kožemjakín AL, Kiškun AA: Modification of the method of measurement of lipid peroxides in test with thiobarbituric acid. (in Russian). *Lab Delo* 1988; 11:41-3.
163. Jain SK, Levine NS, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 39(9): 971-75.
164. Siciarz A, Weinberger B, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Urinary thiobarbituric acid-reacting substances as potential biomarkers of intrauterine hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155: 718-722.
165. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson J, Simon MI, eds. *Methods in Enzymology*. Academic Press, California, 1994, str. 380–382.

166. Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total protein bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
167. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346-357.
168. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-51.
169. Paroni R, Fermo I, Fiorina P, Cighetti G. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. *Amino Acids* 2005;28: 389-94.
170. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 1979; 92: 337-42.
171. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
172. Beutler E, Duron O, Kelly MB. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-8.
173. Horak E, Hopfer SM, Sunderman W. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-b-D-glucosaminidase activity. *Clin Chem* 1981; 27: 1180-5.
174. Stefanović V, Vlahović P, Savić V, Ilić S, Mitić-Zlatković M. Kidney ectopeptidases in gentamicin and mercuric chloride- induced acute renal failure. *Cell Physiol Biochem* 1998; 8: 278-284.
175. Padullés A, Rama I, Llaudó I, Lloberas N. Developments in renal pharmacogenomics and applications in chronic kidney disease. *Pharmacogenomics Pers Med* 2014; 7: 251-66.
176. Köttgen A, Pattaro C, Böger CA, Fuchsberger C, Olden M, Glazer NL, et al. New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* 2010; 42: 376 – 84.
177. Givens RC, Lin YS, Dowling AL, Thummel KE, Lamba JK, Schuetz EG, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* 2003; 95:1297-300.

178. Bochud M, Bovet P, Burnier M, Eap CB. CYP3A5 and ABCB1 genes and hypertension. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 477–87.
179. Coto E, Tavira B, Marín R, Ortega F, López-Larrea C, Ruiz-Ortega M, et al. Functional polymorphisms in the CYP3A4, CYP3A5, and CYP21A2 genes in the risk for hypertension in pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397: 576-9.
180. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1271-94.
181. Gervasini G, Vizcaino S, Gasiba C, et al. Differences in CYP3A5*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Ther. Drug Monit* 2005; 27: 819–21.
182. Elmachad M, Elkabbaj D, Elkerch F, Laarabi FZ, Barkat A, Oualim Z, et al. Frequencies of CYP3A5*1/*3 variants in a Moroccan population and effect on tacrolimus daily dose requirements in renal transplant patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 644-7.
183. Hilli J, Rane A, Lundgren S, Bertilsson L, Laine K. Genetic polymorphism of cytochrome P450s and P-glycoprotein in the Finnish population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 379-86.
184. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 419-26.
185. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin. Chem* 2002; 48: 1668–71.
186. King BP, Leathart JB, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype–genotype correlations in a British population. *Br. J. Clin. Pharmacol* 2003; 55: 625–9.
187. Quaranta S, Chevalier D, Bourgarel-Rey V, Allorge D, Solas C, Lo-Guidice JM, et al. Identification by single-strand conformational polymorphism analysis of known and new mutations of the CYP3A5 gene in a French population. *Toxicol. Lett* 2006; 164: 177–84.

188. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 773–9.
189. Llaudó I, Colom H, Giménez-Bonafé P, Torras J, Caldés A, Sarrias M, et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl Int* 2013; 26: 177-86.
190. Liu M, Li Y, Citterio L, Huang QF, Zeng WF, Sheng CS, et al. A functional common polymorphism of the ABCB1 gene is associated with chronic kidney disease and hypertension in Chinese. *Am J Hypertens* 2013; 26: 1428-36.
191. Eap CB, Bochud M, Elston RC, Bovet P, Maillard MP, Nussberger J, et al. CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt. *Hypertension* 2007; 49:1007–14.
192. Milojković M, Stojnev S, Jovanović I, Ljubisavljević S, Stefanović V, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacol Rep* 2011; 63: 808-14.
193. Pechandová K, Buzková H, Slanar O, Perlík F. Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52: 184-9.
194. Ciftci HS, Ayna TK, Caliskan YK, Guney I, Bakkaloglu H, Nane I, et al. Effect of MDR1 polymorphisms on the blood concentrations of tacrolimus in Turkish renal transplant patients. *Transplant Proc* 2013; 45: 895-900.
195. Li Y, Wang Y, Sun J, Li Y, Yang L. Distribution of the functional MDR1 C3435T polymorphism in the Han population of China. *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 377-82.
196. Balram C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 78-83.
197. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 217-21.
198. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for

- conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 561-5.
199. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, et al. Relationship between antioxidant enzyme genotype and activity and kidney function: a case-control study. *Clin Nephrol* 2012; 78: 135-44.
 200. Hishida A, Okada R, Naito M, Morita E, Wakai K, Hamajima N, et al. Polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes (SOD2, CAT, GPx, TXNRD, SEPP1, SEP15 and SELS) and risk of chronic kidney disease in Japanese - cross-sectional data from the J-MICC study. *J Clin Biochem Nutr*. 2013; 53: 15-20.
 201. Lin YS, Hung SC, Wei YH, Tarng DC. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 405-15.
 202. Yokoyama K, Nakashima A, Urashima M, Suga H, Mimura T, Kimura Y, et al. Interactions between serum vitamin D levels and vitamin D receptor gene FokI polymorphisms for renal function in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2012; 7: e51171.
 203. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008; 52: 249–55.
 204. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 1543–51.
 205. Levi M. Nuclear receptors in renal disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1061–7.
 206. Morath C, Schwenger V, Ksoll-Rudek D, Sommerer C, Beimler J, Schmidt J, et al. Four cases of sirolimus-associated interstitial pneumonitis: identification of risk factors. *Transplant Proc* 2007; 39: 99-102.
 207. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562-75.
 208. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in

- renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009; 87: 233-42.
209. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 837-47.
 210. Budde K, Lehner F, Sommerer C, Arns W, Reinke P, Eisenberger U, et al. Conversion from cyclosporine to everolimus at 4.5 months posttransplant: 3-year results from the randomized ZEUS study. *Am J Transplant* 2012; 12:1528-40.
 211. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 535-46.
 212. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 547-57.
 213. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; 12: 210-7.
 214. Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, Becker T, Campistol JM, Florman S, et al. Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: a phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant* 2012; 12: 630-9.
 215. Goring SM, Levy AR, Ghement I, Kalsekar A, Eyawo O, L'italien GJ, et al. A network meta-analysis of the efficacy of belatacept, cyclosporine and tacrolimus for immunosuppression therapy in adult renal transplant recipients. *Curr Med Res Opin* 2014; 30: 1473-8.
 216. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 139-52.
 217. Anglicheau D, Legendre C, Thervet E. Pharmacogenetics of tacrolimus and sirolimus in renal transplant patients: from retrospective analyses to prospective studies. *Transplant Proc* 2007; 39: 2142-4.

218. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:1730-2.
219. Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U, Cascorbi I. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 228-34.
220. García-Roca P, Medeiros M, Reyes H, Rodríguez-Espino BA, Alberú J, Ortiz L, et al. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res* 2012; 43: 283-7.
221. Vannaprasaht S, Reungjui S, Supanya D, Sirivongs D, Pongskul C, Avihingsanon Y, et al. Personalized tacrolimus doses determined by CYP3A5 genotype for induction and maintenance phases of kidney transplantation. *Clin Ther* 2013; 35: 1762-9.
222. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Bosó V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J* 2014; 15: 38-48.
223. Thervet E, Loriot MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87: 721–6.
224. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provôt F, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3046-50.
225. Wu MJ, Chang CH, Cheng CY, Shu KH, Chen CH, Cheng CH, et al. Reduced variability of tacrolimus trough level in once-daily tacrolimus-based Taiwanese kidney transplant recipients with high-expressive genotype of cytochrome P450 3A5. *Transplant Proc* 2014; 46: 403-5.
226. Barrera-Pulido L, Aguilera-García I, Docobo-Pérez F, Alamo-Martínez JM, Pareja-Ciuró F, Nuñez-Roldán A, et al. Clinical relevance and prevalence of polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes that encode tacrolimus

- biotransformation enzymes in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2008; 40: 2949-51.
227. Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B, et al. Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. *Gene* 2013;512: 226-31.
228. Díaz-Molina B, Tavira B, Lambert JL, Bernardo MJ, Alvarez V, Coto E. Effect of CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genotypes as determinants of tacrolimus dose and clinical outcomes after heart transplantation. *Transplant Proc* 2012; 44: 2635-8.
229. Jordán de Luna C, Herrero Cervera MJ, Sánchez Lázaro I, Almenar Bonet L, Poveda Andrés JL, Aliño Pellicer SF. Pharmacogenetic study of ABCB1 and CYP3A5 genes during the first year following heart transplantation regarding tacrolimus or cyclosporine levels. *Transplant Proc* 2011; 43: 2241-3.
230. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1889-96.
231. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 147-54.
232. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Webber S, Ristich J, et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005; 14: 37-42.
233. López-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltrán Catalán S, Milara Payá J, Pallardó Mateu LM, Jiménez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc* 2010; 42: 3031-3.
234. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 245-54.

235. Li D, Gui R, Li J, Huang Z, Nie X. Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant patients is related to MDR1 gene C3435T polymorphisms. *Transplant Proc* 2006; 38: 2850-2.
236. Capron A, Mourad M, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, Elens L, Haufried V, Wallemacq P. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 703-14.
237. Laftavi MR, Pankewycz O, Patel S, Nader N, Kohli R, Feng L, et al. African American renal transplant recipients (RTR) require higher tacrolimus doses to achieve target levels compared to white RTR: does clotrimazole help? *Transplant Proc* 2013; 45: 3498-501.
238. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 457-73.
239. Chandel N, Aggarwal PK, Minz M, Sakhuja V, Kohli KK, Jha V. CYP3A5*1/*3 genotype influences the blood concentration of tacrolimus in response to metabolic inhibition by ketoconazole. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 458-63.
240. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Vanrenterghem Y. Effects of CYP3A5 and MDR1 single nucleotide polymorphisms on drug interactions between tacrolimus and fluconazole in renal allograft recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 861-8.
241. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Vanrenterghem Y. A prospective, open-label, observational clinical cohort study of the association between delayed renal allograft function, tacrolimus exposure, and CYP3A5 genotype in adult recipients. *Clin Ther* 2010; 32: 2012-23.
242. Chen JS, Li LS, Cheng DR, Ji SM, Sun QQ, Cheng Z, et al. Effect of CYP3A5 genotype on renal allograft recipients treated with tacrolimus. *Transplant Proc* 2009; 41: 1557-61.
243. Ferrareso M, Turolo S, Ghio L, Tirelli AS, Belingheri M, Villa R, et al. Association between CYP3A5 polymorphisms and blood pressure in kidney transplant recipients receiving calcineurin inhibitors. *Clin Exp Hypertens* 2011; 33: 359-65,

244. Torio A, Auyanet I, Montes-Ares O, Guerra RM, Fernandez EJ, Perez MA, et al. Effect of CYP3A51/3 polymorphism on blood pressure in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012; 44: 2596-8.
245. Numakura K, Satoh S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Kakinuma H, et al. Incidence and risk factors of clinical characteristics, tacrolimus pharmacokinetics, and related genomic polymorphisms for posttransplant diabetes mellitus in the early stage of renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:1865-7.
246. 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: 2468–80.
247. Shuker N, Bouamar R, Weimar W, van Schaik RH, van Gelder T, Hesselink DA. ATP-binding cassette transporters as pharmacogenetic biomarkers for kidney transplantation. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1326-37.
248. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 2011; 11: 274-86.
249. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 2011; 57: 1574-83.
250. Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, et al. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011; 12: 1383-96.
251. Santoro AB, Struchiner CJ, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Suarez-Kurtz G. CYP3A5 genotype, but not CYP3A4*1b, CYP3A4*22, or hematocrit, predicts tacrolimus dose requirements in Brazilian renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94: 201-2.
252. Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, Bergan S, et al. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2014; 70: 685-93.

253. Jacobson PA, Oetting WS, Brearley AM, Leduc R, Guan W, Schladt D, et al. Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation* 2011; 91: 300-8.
254. Tain YL, Muller V, Szabo A, Dikalova A, Griendling K, Baylis C. Lack of long-term protective effect of antioxidant/anti-inflammatory therapy in transplant-induced ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol* 2006; 26: 213-7.
255. Pérez Fernandez R, Martín Mateo MC, De Vega L, Bustamante Bustamante J, Herrero M, Bustamante Munguira E. Antioxidant enzyme determination and a study of lipid peroxidation in renal transplantation. *Ren Fail* 2002; 24: 353-9.
256. Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Mahdavi-Mazdeh M, Ghaznavi R, Hemati M, Seifi B, Golab F, Hasani K, Lessan-Pezeshki M, Einollahi B. Oxidative stress status in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant* 2010; 8: 38-44.
257. Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Wilker S, Boedeker RH, Padberg W, Eickelberg O, et al. Dimethylarginine metabolism during acute and chronic rejection of rat renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 124-35.
258. Claes KJ, Bammens B, Kuypers DR, Meijers B, Naesens M, Sprangers B, et al. Time course of asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine levels after successful renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 1965-72.
259. Ellger B, Richir MC, van Leeuwen PA, Debaveye Y, Langouche L, Vanhorebeek I, et al. Glycemic control modulates arginine and asymmetrical-dimethylarginine levels during critical illness by preserving dimethylarginine-dimethylaminohydrolase activity. *Endocrinology* 2008; 149: 3148-57.
260. Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. *Hypertension* 2012; 59: 375-81.
261. Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003; 336: 1-12.
262. Cvetkovic TP, Stefanovic NZ, Velickovic-Radovanovic RM, Paunovic GJ, Djordjevic VM, Stojanovic DR, et al. Gender differences in oxidative and nitrosative stress parameters in kidney transplant patients on tacrolimus-based immunosuppression. *Int Urol Nephrol* 2014; 46:1217-24.

263. Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2008; 6: 52-60.
264. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62: 339-45.
265. Shi B, Ni Z, Zhou W, Yu Z, Gu L, Mou S, et al. Circulating levels of asymmetric dimethylarginine are an independent risk factor for left ventricular hypertrophy and predict cardiovascular events in pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 444-8.
266. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987-92.
267. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Ozgurtas T, Sonmez A, et al. Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80: 1660-6.
268. Abedini S, Meinitzer A, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellström B, et al. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2010; 77: 44-50.
269. Sahin G, Akay OM, Bal C, Yalcin AU, Gulbas Z. The effect of calcineurin inhibitors on endothelial and platelet function in renal transplant patients. *Clin Nephrol* 2011;76: 218-25.
270. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272-80.
271. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Chamienia A, Wojnarowski K, Zdrojewski Z, Aleksandrowicz E, et al. Renal allograft protection with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Transplant* 2007; 7: 243-8.

272. Oláh AV, Asztalos L, Ivády G, Varga E, Kovács AM, Kappelmayer J, et al. Monitoring of mycophenolic acid and kidney function during combined immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1849-53.
273. Campise M, Bamonti F, Novembrino C, Ippolito S, Tarantino A, Cornelli U, Lonati S, Cesana BM, Ponticelli C. Oxidative stress in kidney transplant patients. *Transplantation* 2003; 76: 1474-8.
274. Cvetković T, Veličković – Radovanović R, Stojanović D, Stefanović N, Ignjatović A, Stojanović I, et al. Oxidative and nitrosative stress in stable renal transplant recipients with respect to the immunosuppression protocol – differences or similarities? *J Med Biochem* 2015;.In press, DOI: 10.2478/jomb-2014-0047.
275. Tada H, Nakashima A, Awaya A, Fujisaki A, Inoue K, Kawamura K, Itoh K, Masuda H, Suzuki T. Effects of thymic hormone on reactive oxygen species-scavengers and renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. *Life Sci* 2002; 70: 1213-23.
276. Kędzierska K, Domański M, Sporniak-Tutak K, Dołęgowska B, Ciechanowski K. Oxidative stress and renal interstitial fibrosis in patients after renal transplantation: current state of knowledge. *Transplant Proc* 2011; 43: 3577-83.
277. Zadrazil J, Strebl P, Krejčí K, Horcicka V, Horák P, Vostálová J, et al. Effect of different calcineurin inhibitors on AOPP and TAS after kidney transplantation. *Clin Biochem* 2010; 43: 559-65.
278. Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, Manna C, et al. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1551-8.
279. Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, Christianson TA, Bagby GC, Jin DC, et al. Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant* 2002; 2: 391–399.
280. Długosz A, Srednicka D, Boratyński J. The influence of tacrolimus on oxidative stress and free-radical processes. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007; 61: 466-71.
281. Yates PJ, Nicholson ML. The aetiology and pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *Transpl Immunol* 2006; 16: 148-57.

282. Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Vollmer S, Bode-Böger SM. L-Arginine, ADMA, SDMA, creatinine, MDRD formula: detour to renal function testing. *J Nephrol* 2008; 21: 959-61.
283. Kielstein JT, Veldink H, Martens-Lobenhoffer J, Haller H, Burg M, Lorenzen JM, Lichtinghagen R, Bode-Böger SM, Kliem V. SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 324-8.
284. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem* 2001; 47: 2055-9.
285. Uchida HA, Nakamura Y, Kaihara M, Norii H, Hanayama Y, Sugiyama H, et al. Steroid pulse therapy impaired endothelial function while increasing plasma high molecule adiponectin concentration in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 3475-80.
286. Zoccali C, Maas R, Cutrupi S, Pizzini P, Finocchiaro P, Cambareri F, et al. Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 801-6.
287. Rule AD, Bergstralh EJ, Slezak JM, Bergert J, Larson TS. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations. *Kidney Int* 2006; 69: 399-405.
288. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1128-34.
289. Pihlstrøm H, Mjøen G, Dahle DO, Pilz S, Midtvedt K, März W, et al. Symmetric dimethylarginine as predictor of graft loss and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Transplantation* 2014; 98:1219-25.
290. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1429-35.
291. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, Glorieux G, Eloot S, Barreto FC, et al. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 2374-83.

292. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The Interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 750602.
293. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6:747-52.
294. Asberg A, Hartmann A, Fjeldså E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1920-4.
295. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-35.
296. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
297. Naesens M, Lerut E, Damme BV, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Tacrolimus exposure and evolution of renal allograft histology in the first year after transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2114-23.
298. Ha H, Park J, Kim YS, Endou H. Oxidative stress and chronic allograft nephropathy. *Yonsei Med J* 2004; 45: 1049-52.
299. Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 920-6.
300. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, et al. Cyclosporine A induced arteriolopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 431-8.
301. Amberg GC, Rossow CF, Navedo MF, Santana LF. NFATc3 regulates Kv2.1 expression in arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 2004; 279: 47326-34.
302. Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Tacrolimus has less fibrogenic potential than cyclosporin A in a model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2000; 87: 1563-8.

303. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation* 2004; 77: 1457-9.
304. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine - related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1501-11.
305. Hebert MF, Dowling AL, Gierwatowski C, Lin YS, Edwards KL, Davis CL, et al. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 661-74.
306. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickeleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1963-8.
307. Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation* 2011; 91: 1098-102.
308. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 711-25.
309. Jacquet A, Francois H, Frangie C, Ahmad L, Charpentier B, Durrbach A. Prevention of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in renal transplantation. *Transpl Immunol* 2008; 20: 29-31.
310. Hoogland ER, Snoeijs MG, van Heurn LW. DCD kidney transplantation: results and measures to improve outcome. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010; 15: 177-82.
311. Dobashi K, Singh I, Orak JK, Asayama K, Singh AK. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem* 2002; 240: 9-17.

312. Calò L, Giacon B, Davis PA, Pagnin E, Piccin A, Riegler P, et al. Oxidative stress and TGFbeta in kidney-transplanted patients with cyclosporin-induced hypertension. Effect of carvedilol and nifedipine. *Clin Nephrol* 2002; 58: 103-10.
313. Padi SS, Chopra K. Salvage of cyclosporine A-induced oxidative stress and renal dysfunction by carvedilol. *Nephron* 2002; 92: 685-92.
314. Gandhi C, Zalawadia R, Balaraman R. Nebivolol reduces experimentally induced warm renal ischemia reperfusion injury in rats. *Ren Fail* 2008; 30: 921-30.
315. el-Agroudy AE, Hassan NA, Foda MA, Ismail AM, el-Sawy EA, Mousa O, et al. Effect of angiotensin II receptor blocker on plasma levels of TGF-beta 1 and interstitial fibrosis in hypertensive kidney transplant patients. *Am J Nephrol* 2003; 23: 300-6.
316. Calò LA, Davis PA, Giacon B, Pagnin E, Sartori M, Riegler P, et al. Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 625-31.
317. Ruiz MC, Moreno JM, Ruiz N, Vargas F, Asensio C, Osuna A. Effect of statin treatment on oxidative stress and renal function in renal transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 2431-3.
318. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res* 2006; 34: 41-6.
319. Ruiz Fuentes MC, Moreno Ayuso JM, Ruiz Fuentes N, Vargas Palomares JF, Asensio Peinado C, Osuna Ortega A. Treatment with N-acetylcysteine in stable renal transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40: 2897-9.
320. Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A. N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 923-9.
321. Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 4: 691-703.
322. Valenti L, Conte D, Piperno A, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fraquelli M, et al. The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the

cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. *J Med Genet* 2004; 41: 946–50.

323. Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 168: 147–52.
324. Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Roussel R, Seta N, Fumeron F, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with type 1 diabetes. *PLoS One* 2014; 9: e96916
325. Dutkiewicz G, Domanski L, Binczak-Kuleta A, Pawlik A, Safranow K, Dziedziejko V, et al. Lack of association of polymorphisms 239+34A/C in the SOD1 gene and 47C/T in the SOD2 gene with delayed graft function and acute and chronic rejection of kidney allografts. *Transplant Proc* 2009; 41: 3701-3.
326. Dutkiewicz G, Binczak-Kuleta A, Pawlik A, Safranow K, Wisniewska M, Ciechanowicz A, et al. Lack of association of C599T polymorphism in the glutathione peroxidase (GPX1) gene with delayed graft function, acute kidney graft rejection and chronic allograft nephropathy. *Ann Transplant* 2010; 15: 30-4.

Biografija autora

Nikola Stefanović rođen je u 21.01.1984. godine u Nišu. Osnovnu školu i prirodno-matematički smer gimnazije „Stevan Sremac“ u Nišu završio je sa odličnim uspehom. Školske 2003/04. upisao je odsek Farmacija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. U toku studija dobio je EFG stipendiju za 100 najboljih studenata završnih godina fakulteta u Republici Srbiji. Diplomirao je marta 2009. sa prosečnom ocenom 9,73 i ocenom 10 na diplomskom ispitu, a iste godine izabran je studenta generacije odseka Farmacija. Doktorske akademske studije, smer Toksikologija na Medicinskom fakultetu u Nišu upisao je 2009 godine.

Od maja 2009 do avgusta 2010., radio u zdravstvenoj Ustanovi Apoteci DonaFarm iz Niša, gde je završio pripravnički staž za Farmaceuta. Od februara 2011 do novembra 2012. godine radio na Medicinskom fakultetu u Nišu, kao istraživač-pripravnik na projektu: „Preventivni, terapijski i etički pristup u prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“. Novembra 2012. izabran je za saradnika u nastavi na predmetima Klinička farmacija i Farmakokinetika, a Novembra 2014. izabran je za asistenta na istim predmetima. Pored rada u nastavi, angažovan je kao istraživač na projektu Ministarstva za nauku Republike Srbije. Autor je i koautor većeg broja radova objavljenih u domaćim i stranim časopisima: 17 radova kategorije M21-M23 (3 autorska rada), 4 rada kategorije M52 (1 autorski rad), 16 radova kategorija M33-M34 (4 autorska rada) i 5 radova kategorija M61 i M64 (2 autorska rada).

Rezultati naučno-istraživačkog rada:

Izabrane publikacije:

1. Stefanović N, Cvetković T, Veličković – Radovanović R, Jevtović – Stoimenov T, Vlahović P, Stojanović I, Pavlović D. The pharmacogenetics may influence tacrolimus daily dose, but not urinary tubular damage markers in long - term period after renal transplantation. *J Med Biochem* 2015; In press, DOI: 10.1515/jomb-2015-001
2. Stefanović N, Cvetković T, Jevtović – Stoimenov T, Lilika Zvezdanović – Čelebić L, Stojanović D, Ignjatović A, Živković N, Veličković – Radovanović R. Potential role of tacrolimus in erythrocytes'antioxidative capacity in long - term period after renal transplantation. *Eur J Pharm Sci* 2015; 70: 132- 139. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.01.013
3. Stefanović N, Cvetković T, Jevtović – Stoimenov T, Ignjatović A, Paunović G, Veličković – Radovanović R. Are the CYP 3A5 and ABCB1 gene polymorphisms important players in long – term period after renal transplantation: effects on the tacrolimus exposure and kidney function? *Exp Ther Med* 2015; In press
4. Cvetkovic T, Velickovic-Radovanovic R, Stojanovic D, Stefanovic N, Ignjatovic A, Stojanovic I, Sladojevic N, Pavlovic D. Oxidative and nitrosative stress in stable renal transplant recipients with respect to immunosuppression protocol- differences or similarities? *J Med Biochem* 2015; In press, DOI: 10.2478/jomb-2014-0047
5. Cvetkovic T, Stefanovic N, Velickovic - Radovanovic R, Paunovic G, Djordjevic V, Stojanovic D, Stojanovic I, Pavlovic D. Gender differences in oxidative and nitrosative stress parameters in kidney transplant patients on tacrolimus based immunosuppression. *Int Urol Nephrol* 2014; 46: 1217-1224
6. Stojanovic D, Cvetkovic T, Stojanovic M, Bojanic V, Stefanovic N, Radenkovic S, Ljubisavljevic S, Pavlovic D. Crosstalk of inflammatory mediators and lipid parameters as early markers of renal dysfunction in stable renal transplant recipients with regard to immunosuppression. *Ann Transplant*. 2013;18:414-23.
7. Velickovic-Radovanovic R, Mikov M, Catic-Djordjevic A, Stefanovic N, Stojanovic M, Jokanovic M, Cvetkovic T. Tacrolimus as a part of immunosuppressive treatment in kidney transplantation patients: sex differences. *Gend Med*. 2012; 9:471-80
8. Cvetkovic T, Pavlovic R, Stojanovic I, Veličković-Radovanović R, Topalovic A, Stefanovic N, Živanovic S. Dimethylarginines – biomarkers in progression of kidney disease. *J Med Biochem* 2012; 31: 301 - 308.
9. Stefanović N, Cvetković T, Veličković-Radovanović R, Jevtović-Stoimenov T, Stojanović D, Živković N. Significance of CYP3A5 gene polymorphism in Serbian renal transplant patients. *Acta medica Medianae*. 2013; 52(1):33-38.

Izabrana saopštenja na skupovima od nacionalnog i internacionalnog značaja:

Cvetkovic T, Pavlovic R, Topalovic A, Pavlovic D, Djordjevic V, Velickovic – Radovanovic R, Djordjevic V, Stefanovic N. Dimetilarginini i klasični inflamatorni markeri kod pacijenata na hemodijalizi. Kardionefrologija 2011; str. 27 – 33.

Stefanovic N, Velickovic – Radovanovic R, Catic – Djordjevic A, Cvetkovic T. Influence of immunosuppressive therapy on biochemical parameters in kidney transplant patients. 5th Congress of Pharmacy of Macedonia with international participation, 21-25 September, 2011, Macedonia: 329

Vlahovic P, Cvetkovic T, Djordjevic V, Velickovic – Radovanovic R, Stefanovic N, Ignjatovic A, Sladojevic N. The effect of different calcineurin inhibitors on oxidative stress parameters in renal transplant recipients. 49th ERA – EDTA Congress, 24-27 May, 2012, France: ii525

Cvetkovic T, Velickovic – Radovanovic R, Pavlovic R, Djordjevic V, Vlahovic P, Stefanovic N, Sladojevic N, Ignjatovic A. The level of arginine metabolic products in kidney transplant patients. 49th ERA – EDTA Congress, 24-27 May, 2012, France: ii523

Cvetkovic T, Stefanovic N, Jevtovic - Stoimenov T, Djordjevic V, Zvezdanovic - Celebic L, Velickovic - Radovanovic R, Mitic B, Zivkovic N, Pavlovic D. Antioxidative enzymes and ala- 9 val polymorphism of mn-sod gene in renal transplant patients. 21st meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, 25-28 September, 2013, Montenegro: 54

Cvetkovic T, Velickovic Radovanovic R, Djordjevic V, Stefanovic N, Paunovic G, Mitic B, Zivkovic N. Oxidative stress parameters in kidney transplant patients on tacrolimus based immunosuppression in comparison of gender. 11th Congress BANTAO, 26-29 September, 2013, Romania: 42

Stefanovic N, Cvetkovic T, Velickovic – Radovanovic R, Jevtovic – Stoimenov T, Vlahovic P. Potential influence of tacrolimus dosage regimen as well as CYP 3A5 and ABCB1 polymorphism on the urinary nephrotoxicity markers in renaltransplant patients 51st ERA – EDTA Congress, 31 May – 03 June, 2014, Holand: iii316

Veličković-Radovanović R, Cvetković T, Stefanović N. Značaj farmakogenetike kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. 3. Kongres nefrologa Srbije, 23 – 26 Oktobar, 2014, Srbija: 8 str.

Stefanović N, Cvetkovic T, Veličković – Radovanović R, Živković N, Stojanović D. Potencijalni uticaj doznog režima takolimusa na parametre oksidativnog i nitrozativnog stresa u plazmi u dogoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. 3. Kongres nefrologa Srbije, 23 – 26 Oktobar, 2014, Srbija: 69 str.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Значај генског доминорфизма цитохрома P450 3A5 и ензима антиоксидан-
тивне заштите код пацијената са трансилантираним бубрегом на
терапији импробузом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: НИКОЛА СТЕФАНОВИЋ

Потпис докторанда:



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: НИКОЛА СТЕФАНОВИЋ

Студијски програм: ДАС ТОКСИКОЛОГИЈА

Наслов рада: Викалнај генског полиморфизма цитохрома P450 3A5 и експресија анти-
оксидативне заштите код пацијената са хроничним бубрегом на терапији тацролизом

Ментор: Проф. др Татјана ЦВЕТКОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са 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, _____

Аутор дисертације: НИКОЛА СТЕФАНОВИЋ

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Значај тешког полиморфизма цитохрома P450 3A5 и ензима антиоксидативне заштите код пацијената са пратећим хроничним болестима на јетрици која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, 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
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, _____

Аутор дисертације:

Никола Стефановић

Потпис докторанда: