

# Farmakogenomička testiranja kandidata za transplantaciju bubrega i terapijski ishodi

---

**Smoljanović Resanović, Jelena**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:583667>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jelena Smoljanović Resanović  
FARMAKOGENOMIČKA TESTIRANJA KANDIDATA ZA  
TRANSPLANTACIJU BUBREGA I TERAPIJSKI ISHODI  
Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

PSS studij: Klinička farmacija

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med.

Specijalistički rad obranjen je dana 26. veljače 2021. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Karmela Barišić
2. izv. prof. dr. sc. Nada Božina
3. nasl. doc. dr. sc. Mila Lovrić

Rad ima 96 listova.

## PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad prijavljen je u okviru kolegija Farmakogenomika poslijediplomskog specijalističkog studija kliničke farmacije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nade Božina iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Odjel za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku.

Zahvaljujem na ukazanom povjerenju pri odabiru teme i izradi specijalističkog rada koje mi je pružila mentorica izv. prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med. Zahvalna sam joj što je svojim zanimljivim izlaganjima postigla već na prvom predavanju da mi farmakogenomika snažno privuče pažnju. Zahvaljujem i svojoj dragoj obitelji na razumijevanju i podršci.

## SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovoga rada jest procijeniti postoji li i koliki je potencijal farmakogenetike u području optimizacije imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega. Nadalje, cilj je i procijeniti ulogu farmakogenetike u ovom kliničkom području. Hipoteza je da genetičko nasljeđe može značajno izmijeniti međusobne interakcije imunosupresivnih lijekova i organizma.

Materijali i metode: Učinjen je pregled dostupne relevantne literature, a posebna je pozornost pri tome bila posvećena istraživanju udžbeničke literature i stručnih smjernica. Potom je slijedilo pretraživanje bibliografskih baza podataka (PubMed) i baza podataka sintetiziranog znanja (PharmGKB), koje je uključivalo sljedeće ključne pojmove u različitim kombinacijama: farmakogenomika, imunosupresivni lijekovi, transplantacija bubrega, polimorfizam, mikofenolat, CNI, ciklosporin, takrolimus, mTOR inhibitor, sirolimus, everolimus, CYP3A4, CYP3A5, farmakodinamika, prijenosnici. U obzir je uzimana literatura objavljena u razdoblju od 2010. do 2020., uz manje iznimke vezane za udžbenike i pojedina pionirska istraživanja.

Rezultati: Pregledana su značajnija istraživanja u kojima je metodologija temeljena na kombiniranju informacije o dozi lijeka s podacima dobivenima genotipizacijom primatelja bubrežnog presatka za polimorfizme pojedinačnih nukleotida (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) gena koji kodiraju metaboličke enzime i prijenosnike imunosupresivnih lijekova, kao i pregledni radovi koji se na takva i slična istraživanja referiraju. Pronađeno je kako smjernice konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, CPIC) otvaraju mogućnost da genotipom gena natporodice citokroma P450, porodica 3, potporodica A, člana 5 (engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5*, CYP3A5) usmjeravano doziranje takrolimusa poboljša kliničke ishode jer se njime može brže nakon transplantacije dostići ciljne koncentracije takrolimusa u krvi, čak i kada se primjenjuje titracija terapijskim praćenjem lijeka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM). Brže postizanje ciljnih koncentracija može potencijalno umanjiti rizik odbacivanja presatka uslijed premale ili toksičnosti uslijed prevelike izloženosti lijeku. U smjernicama se oprezno pristupa ideji zamjenjivanja TDM-a genotipizacijom CYP3A5, zbog toga što drugi faktori (poput demografskih, interakcija lijek-lijek, genetičkih varijacija koje bi utjecale na farmakodinamiku) također mogu utjecati na

doziranje takrolimusa. Takrolimus je jedini takav imunosupresiv, ukoliko zanemarimo smjernice za doziranje azatioprina (prema genotipu tiopurin metiltransferaze (engl. *thiopurine S-methyltransferase*, *TPMT*)) čija je primjena u transplantaciji već dugi niz godina zanemariva. Daleko je manje farmakogenetički istraživana farmakodinamika imunosupresiva primjenjivanih u transplantaciji bubrega, a po pitanju jedinog farmakodinamičkog polimorfizma koji je značajnije istraživan, onoga gena koji kodira enzim inozin-5'-monofosfat-dehidrogenazu (engl. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, *IMPDH*), nije postignut širi konsenzus po pitanju odabira farmakogenetičkog biljega i njegove kliničke primjene.

Zaključak: Trenutno postoje ograničenja za rutinsku kliničku primjenu farmakogenomike u odabiru imunosupresivnog liječenja za bolesnike kandidate za transplantaciju bubrega. Izazov u farmakogenomici imunosupresivnih lijekova nepostojanje je dostatnih kliničkih dokaza o prednosti provedbe doziranja na temelju testova genotipizacije. Da bi se znanstvene spoznaje o važnosti polimorfizama primijenile u individualizaciji terapije nužno je provesti dodatne kliničke studije o utjecaju farmakogenetike na preživljenje presatka ili na opće stanje bolesnika. Objašnjenje za poziciju koju farmakogenomika trenutno zauzima u području imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega, djelomično može biti u tomu da se većina najčešće upotrebljivanih imunosupresiva metabolizira putem enzima natporodice citokroma P450, porodica 3, potporodica A, član 4 (engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4*, *CYP3A4*) čija je ekspresija neovisno o genotipu vrlo varijabilna inter- i intraindividualno te je složenost predviđanja farmakokinetike neminovna. Na to, između ostalog, utječu lijek-lijek interakcije, varijacije u genima koji utječu na aktivnost CYP3A te epigenetski faktori.

## SUMMARY

**Objectives:** The aim of this thesis is to assess whether there is, and to what extent, a potential for pharmacogenetics in the field of immunosuppressive therapy optimization in kidney transplant recipients. The aim is also to determine what role pharmacogenetics currently plays in this area. The hypothesis is that genetic inheritance can significantly alter the interactions between immunosuppressive drugs and the organism.

**Materials and methods:** A review of the available relevant literature was made, and special attention was paid to the research of textbook literature and professional guidelines. This was followed by a search of bibliographic databases (PubMed) and synthesized knowledge databases (PharmGKB), which included the following key terms in different combinations: pharmacogenomics, immunosuppressive drugs, kidney transplantation, polymorphism, mycophenolate, CNI, cyclosporine, tacrolimus, mTOR inhibitor, sirolimus, everolimus, CYP3A4, CYP3A5, pharmacodynamics, transporters. The literature published in the period from 2010 to 2020 was taken into account, with minor exceptions related to textbooks and individual pioneering research.

**Results:** Significant studies in which the methodology is based on combining drug dose information with data obtained by renal graft recipients genotyping for Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in genes encoding metabolic enzymes and transporters of immunosuppressive drugs have been reviewed, as well as review papers referring to such and similar studies. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines have been found to open the possibility that Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5, *CYP3A5* genotype-directed dosing of tacrolimus improves clinical outcomes because it could help reach the target tacrolimus blood concentrations faster after transplantation, even when therapeutic drug monitoring (TDM) titration is applied. Achieving target concentrations faster can potentially reduce the risk of graft rejection due to too low or toxicity due to too high drug exposure. The guidelines cautiously approach the idea of replacing TDM with *CYP3A5* genotyping, because other factors (such as demographics, drug-drug interactions, genetic variations that would affect the

pharmacodynamics) may also affect tacrolimus dosing. Tacrolimus is the only immunosuppressive drug for which guidelines on dosing according to genotype exist, disregarding the guidelines for dosing of azathioprine (according to thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) genotype), use of which in transplantation has been negligible for many years. The pharmacodynamics of immunosuppressants used in kidney transplantation is far less researched, and for the only pharmacodynamic polymorphism that has been significantly researched, the inosine-5'-monophosphate dehydrogenase gene (*IMPDH*), a consensus on the choice of pharmacogenetic marker and its clinical application has yet to be reached.

Conclusion: Currently, significant limitations exist for the routine application of pharmacogenomics in the selection of immunosuppressive treatment for kidney transplant recipients. A challenge in the pharmacogenomics of immunosuppressive drugs is the lack of sufficient clinical evidence on the benefit of dosing based on genotyping tests. In order to apply scientific knowledge about the importance of polymorphisms in therapy individualization of kidney transplant candidates, it is necessary to conduct additional clinical studies on the impact of pharmacogenetics on graft survival or general patient condition. The explanation for the current position of pharmacogenomics in the field of immunosuppressive therapy in renal transplantation may be partly consequence of the fact that most commonly used immunosuppressants are metabolized by the enzyme Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4, CYP3A4, since expression of this enzyme is, regardless of genotype, highly variable inter- and intraindividually. This is influenced, among other things, by drug-drug interactions, variations in genes that affect CYP3A activity, and epigenetic factors.



|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....   | 10 |
| 1.1.   | Povijest i razvoj transplantacije bubrega.....  | 11 |
| 1.2.   | Nefrološka transplantacijska medikacijska klinička praksa.....  | 12 |
| 1.2.1. | Medikacijski protokoli kod transplantiranih nefroloških bolesnika.....  | 13 |
| 1.2.2. | Nuspojave posttransplantacijske imunosupresivne farmakoterapije .....   | 14 |
| 1.3.   | Farmakogenomičke metode .....   | 15 |
| 1.3.1. | Osnove genetike, povijest i osnove farmakogenetike .....  | 15 |
| 1.3.2. | „State of the art“ ili najnovije informacije s područja farmakogenomike i farmakogenetičke baze podataka.....                         | 20 |
| 1.4.   | Terapijsko praćenje lijeka u krvi (engl. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , TDM).....   | 25 |
| 2.     | CILJ ISTRAŽIVANJA.....  | 26 |
| 3.     | MATERIJALI I METODE .....   | 29 |
| 4.     | REZULTATI .....   | 30 |
| 4.1.   | Lijekovi koji se primjenjuju u imunosupresiji.....  | 30 |
| 4.1.1. | Glukokortikoidi.....  | 30 |
| 4.1.2. | Monoklonska i poliklonska protutijela.....  | 32 |
| 4.1.3. | Azatioprin .....  | 33 |
| 4.1.4. | Mikofenolatna kiselina.....   | 35 |
| 4.1.5. | Inhibitori kalcineurina .....   | 39 |
| 4.1.6. | mTOR inhibitori .....   | 47 |
| 4.2.   | Enzimi, transporteri i ciljne molekule djelovanja lijekova koji su uključeni u farmakološke mehanizme djelovanja imunosupresiva ..... | 52 |
| 4.2.1. | Enzimi .....  | 53 |
| 4.2.2. | Prijenosnici .....  | 55 |
| 4.2.3. | Ciljne molekule djelovanja imunosupresiva .....   | 57 |
| 4.3.   | Pregled istraživanja .....  | 58 |
| 4.3.1. | Pregled po skupinama: utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku ili farmakodinamiku ..   | 58 |
| 4.3.2. | Mehanizam lijekom potaknute nefrotoksičnosti u transplantiranih bolesnika.....  | 62 |
| 4.3.3. | Farmakogenetika takrolimusa .....   | 66 |
| 4.3.4. | Farmakogenomika i prijenosnici .....  | 71 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.3.5. | Specifičnosti polimorfizama ciljnih molekula – farmakodinamički polimorfizmi .....  | 72 |
| 4.4.   | Klinička ispitivanja i farmakogenomika .....  | 74 |
| 5.     | RASPRAVA .....  | 76 |
| 5.1.   | Rezultati istraživanja i klinička primjena .....  | 76 |
| 5.2.   | Pitanje politerapije .....  | 77 |
| 5.3.   | Dostupnost farmakogenetičkih informacija i preporuke u smjernicama .....  | 78 |
| 5.4.   | Pitanje praktičnosti i isplativosti farmakogenomičkih testiranja kroz prizmu različitih dionika u akademskoj zajednici i zdravstvenom sustavu ..... | 78 |
| 6.     | ZAKLJUČAK .....   | 81 |
| 7.     | LITERATURA .....  | 84 |
| 8.     | POPIS OZNAKA, POKRATA I SIMBOLA .....   | 91 |
| 9.     | ŽIVOTOPIS .....   | 95 |

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Cilj koji se želi postići transplantacijom bubrega jest postizanje maksimalne funkcije presatka uz minimalne komplikacije liječenja imunosupresivnim lijekovima. Prije odabira imunosupresivnog protokola potrebno je odrediti imunosni rizik pojedinog bolesnika, pri čemu bolesnici s povećanim imunosnim rizikom zahtijevaju intenzivniju imunosupresivnu terapiju.

Napravljen je pregled literature u svrhu ispitivanja potencijala farmakogenomike, znanstvene discipline usredotočene na otkrivanje genetičkih različitosti koje utječu na učinkovitost i sigurnost primjene lijeka, u vođenju kliničara pri individualizaciji terapije imunosupresivima.

Kroz povijest transplantacije bubrega uvođenjem novih imunosupresiva mijenjali su se i protokoli pa su tako neki lijekovi danas gotovo potpuno istisnuti, npr. azatioprin.

Suvremeni imunosupresivi o kojima je poznato najviše farmakogenetičkih informacija su: takrolimus i ciklosporin metabolizirani putem polimorfnih enzima natporodice citokroma P450, porodica 3, potporodica A, članova 4 i 5, engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Members 4 and 5* (CYP3A4 i CYP3A5), s ciljnom molekulom enzimom fosfatazom kalcineurina, koji pripadaju skupini inhibitora kalcineurina (engl. *calcineurin inhibitor*, CNI); antimetabolit mikofenolatna kiselina metabolizirana putem polimorfnog enzima uridin-difosfat-glukuroniltransferaze (UGT), a ciljna molekula djelovanja je enzim inozin-5'-monofosfat-dehidrogenaza (engl. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) te najnoviji, sirolimus i everolimus, metabolizirani putem CYP3A4, a ciljna molekula je receptor za lijekove mTOR inhibitore nazvan prema načinu na koji je otkriven (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR).

Iako je dobro poznato da su djelovanje lijeka i nuspojave koje se javljaju pri njegovoj primjeni kod bolesnika uvjetovane, između ostaloga, individualnim karakteristikama bolesnika, individualizacija terapije još nije do te mjere napredovala da je nuspojave moguće unaprijed izbjeći.

Dostupna su brojna istraživanja na temu farmakogenomike u imunosupresiji. Unatoč brojnim radovima objavljenim u transplantacijskoj literaturi, koji ukazuju na povezanost između genskih polimorfizama i

farmakokinetičkih podataka o imunosupresivnim lijekovima, spoznaje još uglavnom nisu zaživjele u kliničkoj praksi.

Farmakogenetički uvjetovane varijabilnosti u djelovanju niza imunosupresiva bit će iznesene u obliku pregleda. Fokus ovog rada su također i interakcije imunosupresivnih lijekova koje mogu biti značajno modulirane genetičkim varijabilnostima.

### **1.1. Povijest i razvoj transplantacije bubrega**

O modernoj su transplantaciji akumulirana opsežna znanja jer se kontinuirano razvija kroz protekla preko tri desetljeća, značajno potaknuta i razvojem novih lijekova iz skupine imunosupresiva. Put do današnjeg transplantacijskog sustava još je duži jer je do danas prošlo više od stotinu godina istraživanja i eksperimentiranja (1). Prva uspješna transplantacija bubrega obavljena je 1954. godine, na jednojajčanim blizancima kako bi se zaobišao imunosni odgovor (1, 2). Jedan od liječnika koji su sudjelovali u tom zahvatu, Joseph Murray, za svoj rad na području transplantacije bubrega nagrađen je 1990. Nobelovom nagradom za medicinu. Međutim, da bi postupak naišao na mogućnost šire primjene, bilo je još potrebno pričekati. Za povijest imunosupresije značajan je bio početak primjene azatioprina i glukokortikoida, koji su u primjenu uvedeni početkom 1960.-ih, a omogućili su transplantaciju među imunosno različitim osobama (1). Kasnije je došlo do otkrića poliklonskih protutijela, a 1983. u primjenu ulazi ciklosporin te 1993. takrolimus. Potonja dva lijeka omogućila su veliki napredak u transplantaciji, posebice ciklosporin čiji utjecaj na transplantacijsku medicinu nazivaju revolucionarnim zbog značajnog smanjenja stope akutnih odbacivanja i povećanja preživljenja presatka (1). Mikofenolatna kiselina ušla je u primjenu 1997., a pripadnici posljednje generacije imunosupresiva, mTOR inhibitori, sirolimus i everolimus, uvedeni su u primjenu 1999., odnosno 2010. (1).

Područje transplantacije vrlo je kompleksno jer uspjeh u njemu podrazumijeva multidisciplinarnost, tj. za razliku od brojnih drugih područja medicine gdje je suradnja različitih specijalnosti na razini preporuke, ovdje je ona *conditio sine qua non*. Naime, skrb za transplantirane bolesnike zahtijeva specijalizirana znanja iz područja imunologije, farmakologije, nefrologije, endokrinologije i infektologije (2).

Mehanizmi djelovanja imunosupresiva su različiti. Tako glukokortikoidi ostvaruju učinke na imunosni sustav stabilizacijom lizosomske membrane, inhibicijom proizvodnje različitih citokina i imunomodulatora, otežanom migracijom leukocita, ali i redukcijom broja imunosnih stanica (3).

Protutijela se dijele u puno podskupina s obzirom na porijeklo i intenzitet imunosnoga odgovora, a

mehanizam je u osnovi prepoznavanje određenog antigena i vezanje za isti te ostvarivanje učinaka na stanicu (T-limfocit) tim putem (1, 2). Inhibitori kalcineurina, iako strukturno različiti, dijele mehanizam djelovanja koji se sastoji u vezanju za proteine u citosolu imunskih aktivnih stanica (T-limfocita), koji se nazivaju imunofilini (3). Ciklosporin se veže za ciklofilin, a takrolimus na vezujuće proteine iz natporodice imunofilina FK 506 (engl. *FK506 binding protein*, FKBP), od kojih se glavnim posrednikom njegove immunosupresivne aktivnosti smatra FK vezni protein 12 (FKBP-12) (1). Ti kompleksi dalje ulaze u kaskadu reakcija, čiji je konačni ishod smanjenje izraženosti (ekspresije) interleukina 2 (IL-2), koji je jedan od čimbenika rasta T-stanica, tj. TCGF (engl. *T-cell growth factor*) (1). Antimetaboliti ostvaruju učinak interferiranjem sa sintezom nukleotida, a mehanizmi dva antimetabolita značajnih za immunosupresiju u transplantaciji, azatioprina i mikofenolata, međusobno su različiti (3). Djelovanje mTOR inhibitora temelji se na inhibiciji serinsko-treoninske proteinaze, ključnog elementa u signalnoj regulaciji unutarstaničnog ciklusa, a djeluje kao nosač drugih proteinskih molekula (1). Još uvijek nije u potpunosti poznat mehanizam kojim sirolimus i everolimus mijenjaju aktivnost mTOR kompleksa (1).

## **1.2. Nefrološka transplantacijska medikacijska klinička praksa**

Transplantacija bubrega terapija je izbora kod kronične bubrežne bolesti stadija 5. Rizik od smrti je upola manji kod transplantiranih pacijenata u usporedbi s onima na dijalizi, a ukoliko se u analizu uključe svi različiti immunosupresivni medikacijski protokoli, tj. uzmu u obzir razlike u preživljenju vezani za razlike u protokolima, one su daleko manje od razlike u preživljenju između pacijenata na dijalizi i transplantiranih (2).

Preporuke za immunosupresivnu terapiju neizbježno su složene jer se primjenjuju kombinacije lijekova iz više različitih skupina kako bi se što pozitivnije utjecalo na omjer koristi i rizika kod pojedinog bolesnika. U osnovi, veći stupanj immunosupresije može smanjiti rizik od odbacivanja, ali povećati rizik od infekcije ili karcinoma (2).

Cilj koji se želi postići transplantacijom bubrega postizanje je maksimalne funkcije presatka uz minimalne komplikacije liječenja immunosupresivnim lijekovima (1). Izazov u tomu je što su većina immunosupresiva lijekovi uskog terapijskog raspona, tj. malog terapijskog indeksa.

Terapija se u transplantaciji može okvirno podijeliti na dva dijela: indukcijsku koja se primjenjuje prije i tijekom transplantacije, tj. u perioperativnom razdoblju i terapiju održavanja koju bolesnik primjenjuje sve dok ima presađeni organ (1). Za uspjeh u ovom području važni su i svi postupci koji prethode

transplantaciji, a tiču se odabira bolesnika i obuhvaćeni su pojmom pretransplantacijske skrbi, što je složeno područje koje izlazi iz opsega ovoga rada. Također važno područje koje zbog objektivnih razloga neće biti obrađeno je skrb za bolesnika po eventualnom odbacivanju presatka.

Praksa se do određene mjere razlikuje među transplantacijskim centrima, ali postupanje je u najznačajnijim dijelovima obuhvaćeno smjernicama, kojih je nekoliko. Za potrebe ovoga rada korištene su smjernice o skrbi za primatelje bubrežnog presatka jedne globalne neprofitne organizacije (engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, KDIGO) iz 2009., namijenjene liječnicima, medicinskim sestrama, koordinatorima transplantacijskih timova i farmaceutima. Kreirane su suradnjom Američkog društva za transplantaciju (engl. *American Society of Transplantation*, AST) i Američkog društva transplantacijskih kirurga (engl. *American Society of Transplant Surgeons*, ASTS). Razlog za ovakav odabir je što autori navode kako su pisane s namjerom da budu primjenjive širom svijeta, tj. osvrću se na izazove na koje se nailazi pri skrbi za transplantiranog bolesnika u razvijenim zemljama, kao i u onima u razvoju, a pri tome je posebice uzeto u obzir kako u potonjima neće niti doći do transplantacije ukoliko troškovi nisu prihvatljivi (2).

#### 1.2.1. Medikacijski protokoli kod transplantiranih nefroloških bolesnika

Prije odabira imunosupresivnog protokola treba odrediti imunosni rizik pojedinog bolesnika, pri čemu bolesnici s povećanim imunosnim rizikom zahtijevaju intenzivniju imunosupresivnu terapiju (1).

Mnogo je godina tzv. trojna imunosupresivna terapija smatrana „zlatnim standardom“ imunosupresije. Obično su se kombinirala dva imunosupresiva iz različitih skupina, tj. različitih mehanizama djelovanja, s glukokortikoidom, a to koji su lijekovi bili od interesa ovisilo je o povijesnom razdoblju u kojemu je transplantacija provedena. Naprimjer, inhibitori kalcineurina osnova su imunosupresivnih protokola još od 80-ih godina kada su zahvaljujući ciklosporinu napravljeni revolucionarni pomaci u transplantacijskoj medicini (1).

Najnoviji protokoli se, kada je to moguće, vrlo često temelje na primjeni mTOR inhibitora u kombinaciji s inhibitorom kalcineurina i glukokortikoidom, s postupnim smanjivanjem doze CNI-a te nastojanjem da se potpuno ukloni iz terapije. Naime, mTOR inhibitori u kombinaciji s inhibitorom kalcineurina omogućuju postupno smanjivanje doze CNI-a kako odmiče posttransplantacijska terapija, čime se umanjuje nefrotoksični učinak CNI-a (1, 2). Postoje i pokušaji održavanja imunosupresije isključivo mTOR

inhibitorima (bez CNI-a) i to s dobrim rezultatima, ali potrebno je provesti još istraživanja kako bi se vidjela dugoročna pouzdanost ovakvog načina primjene imunosupresije (1).

#### 1.2.2. Nuspojave posttransplantacijske imunosupresivne farmakoterapije

Ozbiljne komplikacije su infekcije, zloćudne bolesti, nefrotoksičnost i srčanožilne bolesti. Navedene komplikacije nisu jednako izražene za sve skupine imunosupresiva, a opširniji osvrt biti će u dijelovima 4.1 i 4.3.2.

Temelj navedenih komplikacija, tj. ove skupine nuspojava, jest u mehanizmu djelovanja lijekova. Radi se o takozvanoj B skupini nuspojava, govoreći farmakovigilancijskim rječnikom, tj. prenaplašenom učinku lijeka.

Mehanizam djelovanja lijekova sastoji se u utjecaju na krvne stanice, tj. temelji se na supresiji obrambenih stanica, stoga su anemija, trombocitopenija i leukopenija kod većine imunosupresiva česte ili vrlo česte nuspojave. Također se mogu pojaviti neutropenija, pancitopenija, poremećaji koagulacije, trombotične mikroangiopatije.

Zbog snažnog utjecaja na krvne stanice pojavljuju se i oportunističke infekcije pa su tako kod većine imunosupresiva zabilježene sljedeće nuspojave: infekcije (virusne, bakterijske, gljivične), upala gornjega dišnog sustava, infekcije donjega dišnog sustava i pluća (uključujući pneumoniju), infekcije mokraćnih puteva, sepsa, pijelonefritis, infekcija citomegalovirusom, herpes zoster uzrokovan virusom varicella zoster.

Nuspojave će detaljnije biti obrađene u sklopu opisa primjene pojedinih skupina lijekova. Ipak, važno je navesti kako je neke nuspojave moguće očekivati kod svih skupina, kako je prethodno opisano.

Prema nekim autorima, najmanje izraženu nefrotoksičnost ima najnovija generacija lijekova, mTOR inhibitori (1). Pri tome treba uzeti u obzir kako je najmanje sigurnosnih informacija o lijeku dostupno za ove, najnovije, lijekove jer su najkraće na tržištu. Zasada se čine obećavajućima, što najbolje ilustrira tendencija da se u novijim protokolima transplantacije bubrega - u kojima se u kombinaciji primjenjuje inhibitor kalcineurina, najčešće takrolimus, s jednim mTOR inhibitorom - nastoji primijeniti prethodno opisano smanjivanje doze CNI-a, a takvi se protokoli nazivaju „Protokoli minimizacije i ukidanja“ (1). Iako mTOR inhibitori imaju širok spektar nuspojava, pokazano je da ne dovode do teških nuspojava

zabilježenih uz primjenu CNI-a, koje osim nefrotoksičnosti uključuju neurotoksičnost, rezistentnu hipertenziju i hiperplaziju desni (1).

Zloćudne bolesti su zabilježene kod primjene svih imunosupresiva pa su tako u kliničkim ispitivanjima dokumentirani nemelanomski rak kože, limfom, maligni melanom, posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaj, zloćudni tumori.

### 1.3. Farmakogenomičke metode

Spoznaje o bitnoj ulozi nasljeđa u odgovoru na farmakoterapiju dovele su do razvoja nove znanstvene discipline farmakogenetike, a potom i farmakogenomike. Do danas su napravljena mnoga istraživanja koja su pokazala da genski polimorfizmi metaboličkih enzima, transportnih sustava te receptora bitno određuju ne samo farmakološke i toksične učinke lijekova, nego i osjetljivost pojedinca na druge ksenobiotike (3). Učinak lijeka je pod utjecajem ne samo kliničkih i okolišnih čimbenika, već je određen i genetičkim ustrojstvom pojedinca (4).

#### 1.3.1. Osnove genetike, povijest i osnove farmakogenetike

##### 1.3.1.1. Osnove genetike

O farmakogenetici bi izlaganje bilo dobro započeti definicijama vezanim za područje genetike, kako bi se područjem moglo kompetentno baviti te će se stoga predstaviti kratki opis terminologije, preuzet iz priručnika Nizozemske radne skupine za farmakogenetiku (engl. *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*, DPWG) (5): „**Genotip** je nasljedna informacija o specifičnim karakteristikama osobe. Ova informacija smještena je u genima, u DNA koja se sastoji od nukleotida. Dio DNA koji nosi informaciju za jednu specifičnu nasljednu osobinu naziva se **gen**. DNA je razdijeljena u kromosome, koji dolaze u paru. Osoba ima dvije kopije (**alela**) gena, jednu na svakom kromosomu jednog kromosomskog para. **Fenotip** upućuje na to što je konačna manifestacija (fenotipsko stanje) određenog genotipa. Ovo može uključivati funkcionalnost proteina (npr. enzima ili receptora), ali također fizičku manifestaciju bolesti. Fenotip je rezultat genotipa koji osoba posjeduje, stupnja **ekspresije** (izražaja) gena koji je u pitanju i kombinacije okolišnih faktora kao što su terapija, prehrana i različite bolesti. U populaciji mogu postojati **varijacije** DNA koja kodira određeni protein, a mogu rezultirati alelima koji kodiraju proteine s umanjenom/povećanom aktivnošću ili bez aktivnosti. Najjednostavniji oblik varijacije su polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphisms*, **SNP**), u kojima se određeni dio gena razlikuje samo u jednom nukleotidu. Ukoliko se genska varijacija dogodi u barem 1 % populacije, onda se ona



opisuje kao **genski polimorfizam**. **Divlji tip** (engl. *wild-type*) je naziv dan onom alelu koji je uobičajen/čest. Može postojati više različitih polimorfizama za određeni alel. Većina ljudskih gena sastoji se od kodirajućih regija (**eksona**) među kojima su razasute nekodirajuće regije (**introni**). Varijacije u eksonima obično rezultiraju varijacijama u proteinskom proizvodu, a varijacije u intronima obično ne. Međutim, introni i s ovim regijama povezane varijacije, mogu utjecati na stupanj stvaranja proteina.“

U genetici, **haplotip** opisuje kombinaciju alela koji su smješteni na jednom kromosomu i naslijeđeni zajedno. Pojam se također koristi kako bi se opisali svi SNP-evi na kromosomu koji su statistički povezani jedan s drugim, a to je upravo način na koji se ovaj pojam koristi u farmakogenetici, primjenjujući se često na manje regije gena od interesa, cijeli gen ili čak nekoliko gena smještenih unutar određenog lokusa na kromosomu (6).

#### 1.3.1.2. Povijest farmakogenetike

Jedan od osnivača farmakogenetike, kirurg dr. Werner Kalow, autor prvog priručnika o farmakogenetici „Pharmacogenetic: Heredity and the Response to Drugs“ objavljenog 1962., dao je doprinos na području farmakogenetike genotipizacijom 135 pacijenata podijelivši ih u ekstenzivne, intermedijarne i slabe metabolizatore na temelju aktivnosti kolinesteraze (6). Naime, kroz svoj rad susreo se sa slučajem smrti dva pacijenta od uobičajene doze lokalnog anestetika prokaina te je pronašao da enzim serumska kolinesteraza, koja osim acetilkolina metabolizira i lokalne anestetike, kod nekih ljudi ima smanjenu aktivnost (6). Kako je dalje radio na ovom području, tj. bavio se serumskom kolinesterazom, pronašao je i da je produljena paraliza skeletnih mišića pod utjecajem sukcinilkolina u pacijenata također uzrokovana deficijencijom kolinesteraze te je pojavu, u koautorstvu s dr. Natalie Staron, opisao 1957. (6). Ovaj rad je bio daleko važniji u farmakogenomičkom smislu od prethodnog jer su rezultati pokazali da nije koncentracija enzima, nego nizak afinitet enzima za supstrate uzrok ovomu, a budući da afinitet ovisi o strukturi enzima, koja pak ovisi o slijedu aminokiselina, razlike moraju biti genetičkog porijekla (7).

Ostali za povijest važniji autori su Friedrich Vogel koji je pojam farmakogenetike prvi puta upotrijebio 1959. te Arno G. Motulsky koji je 1957. objavio svoj vrlo značajan rad u kojemu je povezo nekoliko genetičkih stanja s toksičnim odgovorima na lijekove nastalim kao posljedica mutacija enzima koji metaboliziraju lijekove („*Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics*“) (6).

Unatoč ovako ranom početku, relativno brzo nakon otkrića strukture DNA, područje se razvijalo sporo do 1980-ih godina, kada je dostupnost boljih analitičkih metoda omogućila brži razvoj (6).

Pojam različitog reagiranja organizma na tvar unesenu izvana u povijesti je prvi puta opisao Pitagora prije 2500 godina, kada je uočio da konzumiranje bobica može dovesti do slabosti i umora te je zabranio svojim učenicima konzumaciju, a danas je poznato da se radi o manjku glukoza-6-fosfat dehidrogenaze koji dovodi do hemolitičke anemije u nositelja gena za ovaj enzimski deficit vezanog za X kromosom (6).

Od početaka prikupljanja znanja o osnovama nasljeđivanja do dekodiranja genoma prošao je dugi niz godina u kojemu je ostvaren veliki napredak te su mogućnosti koje danas nudi genomika, transkriptomika i proteomika, a uz njih i farmakogenomika, bile teško zamislive prije samo pola stoljeća. Napredak od početka ovog stoljeća, kada je mapiran kompletan ljudski genom, do danas, kada je brzina kojom je moguće dobiti cjelovite informacije o genomu pojedine osobe znatno povećana, a cijena tog postupka značajno smanjena, također predstavlja veliki napredak primijenjene znanosti.

#### 1.3.1.3. Osnove farmakogenetike

Farmakogenetika/farmakogenomika je znanstvena disciplina usredotočena na otkrivanje genetičkih različitosti koje utječu na učinkovitost lijeka te otkrivanje pojedinaca s povećanim rizikom za podložnost razvoju nuspojava. Farmakogenetika najčešće ispituje jednu ili nekoliko genetičkih varijanti, a farmakogenomika se bavi istodobnim ispitivanjem mnogih gena s utjecajem na učinkovitost i nuspojave lijeka (4).

Farmakogeni su geni koji kodiraju funkcionalne proteine povezane s odgovorom na lijek i mogu kodirati enzime koji metaboliziraju lijekove, prijenosnike lijeka, receptore za lijek i druge ciljne molekule. U tekstu su nazivi gena italicizirani, tj. prikazani *italic* fontom, dok nazivi proteina sintetiziranih prema zapisu tog gena nisu.

Nomenklatura predstavlja važan dio istraživanja i komuniciranja farmakogenomičkih informacija. Način prikaza alela sa zvjezdicom/asteriskom (engl. *star-allele*) rezultat je napora vezanih za standardizaciju označivanja polimorfizma za gene citokroma P450, a kako klinička farmakogenetička ispitivanja postaju široko rasprostranjena te kako se obim genomičkih istraživanja povećava, važno je da ovaj sustav učinkovito komunicira pacijentov genotip i predviđeni klinički fenotip, a podjednako je važno da sustav ostane vrijedan alat široj zajednici istraživača na području genetike kako bi iskoristili našu sve bolju sposobnost katalogiziranja varijabilnosti u ljudskom genomu (8).

Način prikazivanja gena zvjezdicom; natporodica – porodica - potporodica - izoforma\*alel/haplotip:

## **CYP3A4\*22**

Gore navedeni način prikazivanja gena sa zvjezdicom pojednostavljeni je način prikazivanja SNP-a, u kojemu je uobičajeno da \*1 oznaka najčešće upućuje na onaj oblik gena koji se najčešće pojavljuje u određenoj populaciji, tj. divlji tip koji se odnosi na potpuno funkcionalan gen. Svako drugo označavanje, npr. \*2 ili \*3 odnosi se na druge oblike gena, zvane varijante ili polimorfni aleli. Međutim, kada se radi o različitim genima, ne može se pretpostaviti jednaka funkcija sukladno oznaci, tj. \*2 kod jednog gena može označavati izostanak funkcije, a kod drugog smanjenu ili, čak, normalnu funkciju.

Način prikazivanja gena na SNP način; (gen) regija DNA.pozicija SNP-a - Originalna baza > Varijantna baza:

### **(*ABCB1*) c.3435C>T**

SNP označavanje je preciznije, a najčešće je potrebno naznačiti regiju DNA, tj. treba naznačiti broji li se pozicija SNP-a od početka gena (g.) ili od početka kodirajuće regije (c.), potom se naznači pozicija SNP-a, originalna baza i varijantna baza.

Označavanje putem referentne sekvence - radi se o *CYP3A5*\*3 polimorfizmu:

### **rs776746**

Najprecizniji način prikaza je putem referentne sekvence (rs) jer je jedinstvena i konzistentna te referira na određeni SNP-a točno određenog gena, stoga njegov naziv nije potrebno niti navoditi.

Premda je ustanovljena jasna poveznica između određenih genskih polimorfizama i učinkovitosti te toksičnosti ispitivanih lijekova, implementacija farmakogenomike u kliničkoj praksi zaostaje za tim saznanjima, a jaz između jasnih dokaza te prihvaćanja i primjene novih farmakogenetičkih testova nastoji se prebroditi razvojem na konsenzusu temeljenih uputa i smjernica te edukacijom zdravstvenih profesionalaca (4).

Prethodno opisane genske varijacije mogu dovesti do promjene fenotipa pa će se u ovom radu često koristiti pojmovi koji opisuju fenotip. Normalna situacija, divlji tip (engl. *wild-type*) s određenom sposobnošću metaboliziranja naziva se ekstenzivnim metabolizatorima (engl. *extensive metabolizer*, EM); fenotip srednje brzog metaboliziranja, smanjene metaboličke aktivnosti (jedan alel bez ili s umanjenom aktivnošću, a jedan s normalnom) naziva se intermedijarni metabolizator (engl.

*intermediate metabolizer*, IM); pojačani metabolizam javlja se u ultrabrzog metabolizatora (engl. *ultrarapid metabolizer*, UM), a obično je rezultat više aktivnih alela, dok se značajno smanjeni/dokinuti metabolizam javlja kod sporog metabolizatora (engl. *poor metabolizer*, PM) i obično je rezultat mutacija ili delecija gena što dovodi do smanjene ili dokinute ekspresije ili funkcije odgovarajućih enzima (5, 8).

U smjernicama Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) za provođenje genomičkih studija iz 2018. opisuje se uloga i način fenotipizacije te se navodi kako je fenotipiziranje specifičnog metabolizirajućeg enzima, npr. terapijskim praćenjem lijeka u različitim vremenskim intervalima nakon primjene, valjana metoda za mjerenje utjecaja genske varijacije na metabolizam (9). Navodi se kako, u usporedbi s isključivo genotipiziranjem, ovaj pristup ima prednost u neposrednoj procjeni funkcionalnosti, uključujući doprinos nekoliko različitih genskih varijacija ili rijetkih mutacija važnih za farmakokinetiku. Nadalje, navodi se kako *in vivo* procjena fenotipa ovisi o uporabi specifičnih lijekova (engl. *probe drugs*), a za istodobno određivanje aktivnosti više CYP enzima preporučuje se upotreba tzv. koktela fenotipiziranog lijeka, u kojem se različiti metaboliti nastali djelovanjem različitih CYP enzima pojedinačno kvantificiraju u krvi ili urinu. Metabolički fenotip može tijekom vremena kod iste osobe značajno varirati zbog fizioloških, patoloških ili dijetalnih čimbenika koji se moraju uzeti u obzir prilikom terapijskog praćenja lijeka (9). Genotipizacija daje stabilan, cjeloživotni uvid u funkcionalni status enzima koji je u pitanju, međutim, zbog važnog doprinosa rijetkih genetičkih varijanti kod svakog pojedinca, terapijsko praćenje lijeka uzima u obzir sve genetičke varijacije od važnosti za farmakokinetiku koje se ocjenjuju, dok se ciljanim genotipiziranjem mogu propustiti pojedine specifične genske varijacije, koje nisu bile dio panela za testiranje (9).

U kontekstu ograničenja primjene metode potrebno je spomenuti i fenomen fenokonverzije, koji rezultate farmakogenetičke analize može učiniti upitnim (10). Naime, radi se o pretvaranju genotipski jedne vrste metabolizatora (npr. ekstenzivnog/brzog metabolizatora, EM) u fenotipski drugačiji metabolizator (npr. slabi metabolizator, PM) (10). Fenomen je najviše proučavan kod enzima CYP2D6, a najbolji primjer fenokonverzije je onaj gdje se radi o posljedici komedikacije, tj. prateće terapije i interakcije lijekova (10).

U smjernicama EMA-e navodi se i kako je povećanje razine znanja o mehanizmima koji se nalaze u pozadini nastanka nuspojava zbog farmakogenetičkih varijacija u metabolizmu i prijenosu lijeka bitno za učinkovitu i sigurnu primjenu lijekova, a isto tako i za uspješan razvoj novih lijekova (9). Prepoznaje se i

uloga farmakogenomike u individualizaciji i optimizaciji terapije navođenjem pronalaska genskih biljega za farmakogenetički profil — fenotip odgovora na farmakoterapiju, tj. primjenu genetičkih informacija za stvaranje postupnika za odabir najprikladnijeg lijeka za svakoga pojedinog bolesnika ili skupine bolesnika, kao krajnjeg cilja (9).

### 1.3.2. „State of the art“ ili najnovije informacije s područja farmakogenomike i farmakogenetičke baze podataka

Najnovije informacije mogu se pronaći u dokumentaciji s informacijama o pojedinim lijekovima, tj. sažetku opisa svojstava lijeka i uputi o lijeku te u smjernicama društava koji se bave ovim područjem.

Na stranicama Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) nalazi se tablica koja se redovito ažurira, u kojoj se može pronaći popis lijekova i tekst vezan za farmakogenomički sadržaj označavanja u dokumentaciji tih lijekova (11).

Većinu informacija u području kojim se bavi ovaj rad moguće je preuzeti s glavne baze podataka o farmakogenetici i farmakogenomici: PharmGKB (engl. *Pharmacogenomics Knowledgebase*) gdje su prikazani lijekovi i klinički relevantni geni (s pojedinim alelima i genotipovima) koji mogu utjecati na farmakokinetiku i farmakodinamiku tih lijekova (8). Još neke genetičke baze podataka s interneta u kojima su dostupne informacije i o polimorfizmima su GeneCards (baza podataka koja sadrži sve zabilježene ljudske gene prikupljene iz oko 150 izvora) i SNPedia (slobodna enciklopedija koja sadrži genetičke informacije).

Važan podatak koji ukazuje na napredak genetike je velika dostupnost cjelogenomskih studija (engl. *genome-wide association study*, GWA study, GWAS) u kojima su ispitivani mehanizmi kompleksnih oboljenja ili odgovora na lijek u povezanosti s genetičkim polimorfizmima uzimajući u obzir kompletan genom. Dostupni podaci upućuju na to da je 2010. bilo provedeno preko 1200 ovakvih studija (6), a danas je vjerojatno da je taj broj višestruko premašen, iako se točnih podataka ne nalazi.

#### 1.3.2.1. PharmGKB

PharmGKB je baza informacija iz područja farmakogenomike, koja obuhvaća kliničke informacije uključujući smjernice za doziranje i informacije o lijekovima, potencijalne klinički relevantne veze između gena i lijeka te odnose genotipa i fenotipa. Između ostalog, sažima važne farmakogenomičke gene, poveznice između genetičkih varijanti i lijekova te puteve razgradnje i djelovanja lijeka u organizmu

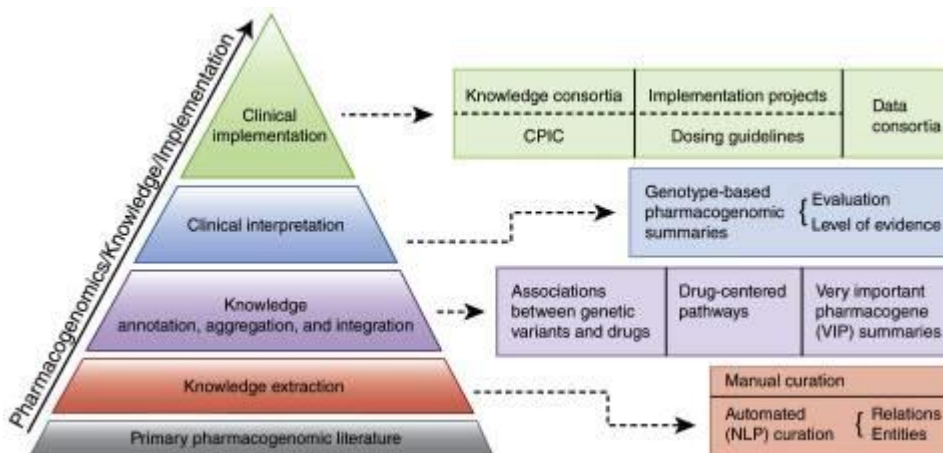
(engl. *pathway*, kasnije u ovom kontekstu će se koristiti pojam put lijeka), a potonji su, u kontekstu ove stranice, dijagrami utemeljeni na dokazima, koji prikazuju farmakokinetiku i/ili farmakodinamiku lijeka s relevantnim (ili potencijalnim) farmakogenetičkim poveznicama (8).

PharmGKB prikuplja, organizira i komunicira znanje o utjecaju ljudskih genskih varijacija na odgovore pojedinca na primijenjeni lijek kroz slijedeće aktivnosti (8):

- bilježenje (i tumačenje) genetičkih varijanti i gen-lijek-bolest veze putem pregleda literature
- sažimanje važnih farmakogenomičkih gena, poveznica između genetičkih varijanti i lijekova te puteva razgradnje i djelovanja lijeka u organizmu, a primjer je put lijeka za takrolimus/ciklosporin prikazan u dijelu 4.1.5;
- organiziranje informacija FDA-a o lijekovima koji sadrže farmakogenomičke informacije;
- omogućavanje konzorcijskog ispitivanja važnih pitanja u farmakogenomici;
- organiziranje i sudjelovanje u pisanju smjernica doziranja za lijekove temeljem farmakogenomike;
- doprinos kliničkoj implementaciji projekata za farmakogenomiku kroz suradnje;
- objavljivanje smjernica za doziranje temeljem farmakogenomike;
- prikazivanje svih informacija na mrežnim stranicama i omogućavanje dostupnosti razumljivih dokumenata za preuzimanje s istih.

Tražilica ove baze podataka omogućuje pretragu prema ključnim pojmovima te kao rezultate daje sve dostupne podatke s naznačenom pripadajućom skupinom kojoj pripada informacija. Naprimjer, ukoliko se u tražilicu upiše "CYP3A4" te se ne primijeni niti jedan od dostupnih filtera za sužavanje pretrage, dobiva se rezultat s dostupnim informacijama kategoriziranim u propisivačke informacije, kliničke oznake (o parovima genetička varijacija-lijek) i puteve lijekova.

Javno je dostupna internetska baza znanja čiji je cilj pomoći istraživačima u razumijevanju kako genetička varijacija među pojedincima doprinosi razlikama u reakcijama na lijekove. U PharmGKB piramidi, na slici 1, prikazan je vizualni sažetak dostupnih podataka te kako su isti integrirani u PharmGKB (12).



Slika 1: Informacije koje su dostupne u ovoj bazi organizirane su u skupine; lijekovi s označenim varijantama (engl. *drugs with variant annotations*), putevi metabolizma i djelovanja lijeka, smjernice za doziranje, lijekovi s pridruženim označivanjem (12).

Sporo prihvaćanje farmakogenetičkih testova u kliničkoj praksi djelomično se može pripisati i nedostatku jasnih smjernica o tome kako prilagoditi liječenje na osnovi rezultata genetičkih testova. Međutim, u novije se vrijeme osniva mreža društava poput one u Sjedinjenim Američkim Državama sačinjene od istraživačke mreže PGRN (*The National Institutes of Health's Pharmacogenomics Research Network* (PGRN, <http://www.pgrn.org>) i gore opisane baze *The Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB)*, <http://www.pharmgkb.org>) koje su ustanovile konzorcij pod nazivom **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium** (CPIC) za implementaciju kliničke farmakogenetike. Glavni je cilj CPIC-a izdavanje recenziranih, ažuriranih, na dokazima temeljenih, slobodno dostupnih uputa i smjernica za doziranje lijeka prema rezultatu genetičkih testova. Slijedom američkih aktivnosti na europskoj su razini također formirane radne skupine, a među vrlo aktivnima su već spomenuta DPWG i *The European Research Network Pharmacogenetics /Pharmacogenomics (U-PGx)*. Objavljene će smjernice svakako pomoći u prijenosu znanja iz farmakogenomike do kreveta bolesnika (8).

O povijesti američkog PharmGKB-a zanimljivo je znati da je osnovana 2000. godine kao jedna od prvih „post-genomičkih“ baza podataka. U to vrijeme nije postojao standardni format za opis i pohranu podataka o genotipu i fenotipu iz farmakogenetičkih studija. Važan izazov bilo je održavanje kvalitete podataka bez ugrožavanja privatnosti ispitanika. Kako su napredovale metode prikupljanja podataka i

farmakogenomika nadmašila farmakogenetiku, PharmGKB se razvijao prilagođavajući se povećanju količine podataka i novim načinima njihovog prikazivanja (8).

U prikupljanju znanja se PharmGKB koristi bibliografskim bazama podataka, naprimjer PubMed-om, iz kojih prikuplja publikacije iz kojih izdvaja podatke, koje potom organizira i povezuje gradeći karakterističnu „piramidu“. Radi se zapravo o postupku izrade preglednih članaka, čiji je cilj doći do kliničke interpretacije i, u konačnici, kliničke primjene znanja temeljenog na analiziranju i povezivanju osnovnih izvora farmakogenomičkih informacija. Tako se u vrhu PharmGKB piramide, podržana razinama ispod, nalazi klinička primjena farmakogenomike. To uključuje informacije koje su relevantne za kliniku, poput odobrenih od strane FDA-a, ali i međunarodno odobrenih informacija o lijekovima s istaknutim PGx podacima. PharmGKB surađuje sa skupinama koje provode farmakogenomička istraživanja kako bi odgovorile na važna pitanja ili koje uvode farmakogenomiku u kliničku primjenu. CPIC piše smjernice o doziranju lijekova temeljene na genotipu pojedinca, a dostupne su na web-stranicama PharmGKB. Slično rade i druge radne skupine, npr. DPWG (8).

Bitno je naglasiti kako CPIC kod izrade smjernica upozorava na ograničenje odgovornosti pri primjeni istih pa se tako u smjernicama za doziranje takrolimusa nalazi sljedeće upozorenje, tzv. *disclaimer*, koji stoji i u ostalim smjernicama napisanim od strane CPIC-a, a slično upozorenje se nalazi i u drugim smjernicama za doziranje objavljenim na PharmGKB-u (8):

„Smjernice konzorcija za primjenu kliničke farmakogenetike (CPIC) odražavaju stručni konsenzus temeljen na kliničkim dokazima i stručnoj recenziji literature dostupnoj u trenutku kada su napisani i namijenjene su samo pružanju pomoći kliničarima u odlučivanju kao i utvrđivanju pitanja za daljnja istraživanja. Novi dokazi mogu se pojaviti od trenutka kada je smjernica poslana za objavljivanje. Smjernice su ograničenog dosega i nisu primjenjive na intervencije ili bolesti koje nisu posebno identificirane. Smjernice ne uzimaju u obzir sve pojedinačne varijacije među pacijentima i ne može se smatrati da uključuju sve odgovarajuće metode liječenja ili da isključuju druge načine liječenja. Ostaje odgovornost pružatelja zdravstvene usluge da odredi najbolji tijek liječenja za pacijenta. Pridržavanje bilo koje smjernice je dobrovoljno, s konačnom odlukom da o njezinoj primjeni odluče isključivo liječnik i pacijent. CPIC ne preuzima nikakvu odgovornost za bilo kakve ozljede ljudi ili štetu na imovini koja se odnosi na bilo kakvu upotrebu smjernica CPIC-a ili za bilo kakve pogreške ili propuste. ”



Za znanstvenu zajednicu bitan je jedinstven način prikazivanja novootkrivenih informacija te postoje konzorciji koji se bave isključivo time da su kriteriji prijave novih varijacija jasno određeni. Tako je glavna uloga PharmVar konzorcija (engl. *Pharmacogene Variation Consortium*) da služi kao repozitorij za varijacije alela, pružajući službeni i unificirani sustav označavanja alela za zajednicu znanstvenika koji se bave farmakogenetikom, olakšavajući prevođenje genotipa u fenotip te kliničku provedbu farmakogenomike. Dok se za većinu farmakogena u PharmVaru koristi nomenklatura sa zvjezdicom za opisivanje varijacija, kod nekih gena prednost se daje prikazu varijanti pojedinačnih nukleotida (SNV), a ne haplotip (13).

#### 1.3.2.2. Nizozemska radna skupina za farmakogenetiku - DPWG

Unutar Europe također postoji relevantna baza farmakogenomičkih podataka i to u Nizozemskoj. DPWG je skupina koja je osnovana od strane ljekarničke organizacije The Royal Dutch Pharmacists Association s ciljem implementiranja terapijskih doza u računalne sustave za propisivanje lijekova, doziranje i automatsko praćenje terapije bazirano na farmakogenetičkim podacima iz literature (8).

Do sada su uspostavljene preporuke za više od 80 lijekova i ažuriraju se svaka 3 mjeseca (14). U Nizozemskoj su smjernice DPWG dostupne svim liječnicima i ljekarnicima i integrirane u sustave podrške kliničkim odlukama, a jedan od glavnih ciljeva baze podataka koju je radna skupina kreirala, *Ubiquitous Pharmacogenomics*, UPGx-a je pretvaranje farmakogenetičkih smjernica DPWG-a u europske farmakogenetičke smjernice, koje bi bile općeprihvaćene (14).

U Nizozemskoj je postignut veliki napredak u razvoju smjernica od strane DPWG-a, iako u primjeni postoji prostor za poboljšanje. Načelo preporuka u smjernicama utemeljeno je na sistematskom pregledu literature (14).

Za kliničkog farmaceuta bi vezano za nizozemska nastojanja na povezivanju farmakogenomike s farmaceutskom praksom moglo biti zanimljivo jedno istraživanje (15), opisano u nastavku teksta. Provedeno je tijekom 2017. i 2018. u 50 nizozemskih ljekarni na 215 pacijenata, koji su u terapiji imali 249 lijekova za koje su smjernicama preporučena farmakogenetička testiranja. Ista su potom provedena te su ispitani učinci, a rezultati prikazani obzirom na ishod, odnosno učestalost intervencija. Pokazano je kako je u 28,5 % slučajeva ljekarnik poduzeo određenu intervenciju, koja pripada u jednu od tri skupine: promjena farmakoterapije, smanjenje doze lijeka ili povećanje doze lijeka. Među navedenih 14 lijekova

koji su predstavljali poticaj ljekarniku da se pacijentu ponudi testiranje nije bio niti jedan imunosupresiv, nego su većinom pripadali lijekovima N skupine po ATK klasifikaciji. Rezultati ovoga rada su važan pokazatelj da u ljekarničkoj struci u Europi postoji interes, mogućnosti i sredstva za doprinos primarnoj zdravstvenoj skrbi u segmentu genetičkog testiranja.

#### **1.4. Terapijsko praćenje lijeka u krvi (engl. *Therapeutic Drug Monitoring, TDM*)**

Metoda terapijskog praćenja razine lijeka u krvi obuhvaća nekoliko komponenti. Vjerojatno najvažniji aspekt je mjerenje koncentracije lijeka u krvi, ali ne i jedini. Naime, terapijsko praćenje lijeka u krvi uključuje prikupljanje svih podataka o pacijentovim kliničkim karakteristikama (16):

- dob, tjelesna težina, spol, izloženost nikotinu, bubrežna i jetrena funkcija, konkomitantna terapija;
- klinička stanja koja mogu utjecati na bioraspodjivu – dijareja, anomalije kratkog crijeva;
- dozirni oblik, brzina primjene, metabolizam prvog prolaza, vezivanje proteina, volumen distribucije, „*loading dose*“.

Dakle, radi se o složenom postupku, a povrh toga u interpretaciji rezultata treba uzeti u obzir brojne faktore (16):

- vrijeme uzorkovanja obzirom na dozu;
- povijest primjene lijeka (u smislu je li ili nije postignuto stanje ravnoteže);
- pacijentov odgovor i željene kliničke ciljeve;
- moguće propuštene doze.

U ocjeni točnosti, isplativosti i jednostavnosti metode TDM-a, a s obzirom na farmakogenomička ispitivanja, treba uzeti sve gorenavedene stavke u obzir.

Problematičnost metode s obzirom na uspješnost transplantacije bubrega, prema nekim istraživanjima, sastoji se u slaboj povezanosti između doze, koncentracije u krvi i terapijskog odgovora, zbog čega je važno koristiti komplementarne metode u kontroli terapije (8). S obzirom na dugoročni uspjeh terapije važno je izbjeći kroničnu disfunkciju presatka, koja je najviše povezana s kroničnom nefrotoksičnošću određenih imunosupresiva. Na potonju utjecaj imaju brojni faktori, a jedan od onih koji igraju važnu ulogu je tkivna koncentracija imunosupresiva i njihovih metabolita (8).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Na mrežnim stranicama Mayo klinike iz SAD-a stoje sljedeća pitanja u svrhu predstavljanja farmakogenomičkih testiranja pacijentima (17):

„Jeste li se ikada zapitali zašto Vam neki lijekovi ne pomažu koliko i drugi?

Jeste li ikada promijenili dozu ili prestali uzimati lijek zbog toga što ste mislili da ne djeluje ili Vam se nije svidio način na koji se zbog primjene lijeka osjećate?

Jeste li ikada poželjeli znati kako će lijek utjecati na Vas prije no što ga uzmete?“

Ovim citatom započinje poglavlje o cilju istraživanja jer je u istome jednostavnim jezikom predstavljeno polazište ovoga rada, tj. nastojanje da se kompleksna problematika prikaže na jednostavan način, baš onako kako bi klinički farmaceut i trebao moći komunicirati s pacijentima o svrsi svojega rada. Također, brojna pitanja koja je nužno postaviti u svrhu kvalitetne i, ne manje važno, pravovremene individualizacije terapije, sadrže u korijenu upravo gore navedena tri pitanja.

S obzirom da je određena znanstvena područja i kliničke prakse potrebno opisati kako bi se temeljito obradila tema, u ovom radu se nastoji:

- 1) prikupiti i sustavno prikazati podatke o kliničkoj praksi u području transplantacije bubrega s osvrtom na optimiranje pristupa liječenju na principima individualizacije terapije;
- 2) pružiti temeljne informacije o farmakogenomici te objasniti utjecaj genotipa i fenotipa na farmakodinamiku i farmakokinetiku lijeka;
- 3) objasniti što veći broj mehanizama koji su u podlozi specifičnih djelovanja pojedinih imunosupresiva, kao i procijeniti gdje postoji potencijal farmakogenomike u pravovremenoj (što ranijoj) individualizaciji terapije;
- 4) opisati potencijal farmakogenetike/farmakogenomike u razvoju lijekova;
- 5) pružiti informacije o izvorima ažurnih farmakogenomičkih podataka (baze podataka) u svrhu poticanja kliničke primjene najnovijih spoznaja vezanih uz farmakogenetiku/farmakogenomiku;

6) opisati lijekove koji predstavljaju temelj imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega s pregledom mehanizama djelovanja i osvrtom na sigurnosne profile;

7) osvrnuti se na pitanje odgovornosti pri liječenju pacijenata primjenom informacija koje nisu dostupne u sažetku opisa svojstava lijeka uz osvrt na ulogu proizvođača lijeka i regulatora u tom kontekstu.

Cilj ovoga završnoga rada je i procijeniti postoji li i koliki je potencijal farmakogenetike u području optimizacije imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega, a prethodno utvrditi koju ulogu trenutno ima farmakogenetika u ovom području.

Hipoteza jest sljedeća: genetičko nasljeđe može značajno modulirati međusobne interakcije imunosupresivnih lijekova i organizma.

Uzimanje u obzir važnosti genetičkog nasljeđa pri razvoju lijeka daje i europska regulatorna mreža u smjernicama za proizvođače lijekova te se preporučuje da se, iako utjecaj nasljeđa nema jednaku važnost kod svakog lijeka, ukoliko imaju potencijal utjecaja na omjer koristi i rizika pojedinog lijeka, farmakogenetička testiranja uključe u razvoj lijeka, tj. trebaju utjecati na dizajn tog procesa (9). Tako se prenose osnovna znanja, tj. navodi da se u području farmakogenetike proučava interindividualna varijabilnost gena koji utječu na ishod liječenja lijekovima ili ga predviđaju (npr. geni koji kodiraju transportere lijekova, enzime koji metaboliziraju lijekove, ciljne molekule lijekova, biljege), u odnosu na učinkovitost liječenja lijekovima i štetne reakcije lijekova te navodi kako je nešto od ove interindividualne varijabilnosti uzrokovano genskim varijacijama, tj. pojavom višestrukih alelnih stanja u istoj populaciji i daju primjeri istih koji uključuju SNP-ove, umetanje/brisanje i varijacije u broju kopije gena ili niza (engl. *copy number variation*, CNV) (18). Navodi se kako se 30-50 % svih klinički korištenih lijekova metabolizira funkcionalno polimorfnim enzimima, uključujući enzime citokroma P450 faze I (npr. CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6) i enzimima faze II (npr., UDP-glukuroniltransferaze, N-acetiltransferaza-2 i neke metiltransferaze), kao i podaci o velikoj zastupljenosti metabolizirajućih enzima u dokumentacijama lijekova u kontekstu farmakogenetičkih podataka, čak 80 %, a isto tako je dobro poznato koji polimorfizmi imaju potencijal utjecati na omjer koristi i rizika lijeka (18).

S obzirom na složenost i skupoću postupaka kroz koje prolazi (potencijalni) transplantirani bolesnik, nameće se pitanje mogu li se jednostavnije, racionalnije (uz manje pretraga) i vremenski prikladnije isplanirati terapijski protokoli za ove pacijente.

Vezano za racionalnost TDM metode, iako pretpostavlja česta uzorkovanja, prednost je što se ne temelji samo na razini lijeka u krvi, nego uzima u obzir sve podatke o pacijentovim kliničkim karakteristikama (16), a budući da kod transplantiranog bolesnika postoji postupna uspostava bubrežne funkcije, ovisno o farmakokinetici lijeka, to može upućivati na to da nema boljeg načina za izračun doze od TDM-a. S druge strane, neki autori ističu kako se argument nedostatka poboljšanja kliničkih ishoda kod pacijenata podvrgnutih farmakogenetičkom testiranju ne primjenjuje jednako na TDM, za koje su dokazi (da poboljšava kliničke ishode) slabi, a to nije spriječilo široku prihvaćenost metode TDM u kliničkoj praksi (19). Dodatno treba obratiti pažnju na pitanje suradljivosti pacijenata, koja se sa sigurnošću teško može utvrditi primjenom samo jedne metode (2).

Uzevši u obzir prethodno navedeno i dalje ostaje nejasno mogu li na farmakogenomici temeljene metode za individualizaciju terapije biti upotrebljive u kliničkom okruženju, uz uključivanje nalaza za glomerularnu filtraciju pacijenta u dostupnu tablicu doziranja. Stoga je prikazano kako izgledaju i u kliničkoj praksi funkcioniraju postojeće smjernice stručnih društava iz područja farmakogenetike te one regulatornih tijela.

Pri analizi utjecaja, pozitivnih i negativnih, zbog kojih primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi (moguće) nije zadovoljavajuća, u ovom radu nadalje se prikazuje i koji su pravni okviri za primjenu, tj. postoje li i kakve su smjernice regulatornih tijela za farmaceutsku industriju te kako se primjenjuju. EMA je propisala brojne smjernice iz područja farmakogenomike, a njihova primjena je u području razvoja lijekova i njihovog praćenja nakon stavljanja u promet, stoga služi farmaceutskoj industriji u razvoju lijeka i ima potencijal utjecati na kliničku praksu (9, 20). Stoga, iako tema utjecaja regulatora na proces istraživanja lijekova i, posljedično, na informacije koje se mogu naći u sažetku opisa svojstava lijeka, nije obuhvaćena istraživačkim pitanjima ovoga rada, smjericama EMA-e će biti posvećena određena pozornost zbog korisnog uvida u metode o kojima govore. To se ponajprije odnosi na metode primijenjene u okviru kliničkih ispitivanja.

### 3. MATERIJALI I METODE

Budući da je ovaj specijalistički rad baziran na teorijskim osnovama, sva se metodologija zasnivala na pretraživanju relevantne literature i prikupljanju podataka.

Posebna je pozornost pri tome bila posvećena istraživanju udžbeničke literature i stručnih smjernica. Potom je slijedilo pretraživanje bibliografskih baza podataka (PubMed) i baza podataka sintetiziranog znanja (PharmGKB) koje je uključivalo sljedeće ključne pojmove u različitim kombinacijama: farmakogenomika, imunosupresivni lijekovi, transplantacija bubrega, polimorfizam, mikofenolat, CNI, ciklosporin, takrolimus, mTOR inhibitor, sirolimus, everolimus, CYP3A4, CYP3A5, farmakodinamika, prijenosnici. U obzir je uzimana literatura objavljena u razdoblju od 2010. do 2020., uz manje iznimke vezane za udžbenike i pojedina pionirska istraživanja.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Lijekovi koji se primjenjuju u imunosupresiji

Lijekovi koji se primjenjuju u većini terapija pa tako i u imunosupresivnoj često ne zadovoljavaju uvjete idealnog lijeka. Prema nekim autorima koji se bave područjem razvoja lijekova takav bi lijek trebao posjedovati sljedeće karakteristike: dobra oralna bioraspodjivaost, mali do umjeren klirens iz krvi, idealan volumen distribucije (veći od volumena plazme), mali potencijal za lijek-lijek interakcije, malu o metabolizmu ovisnu toksičnost (relevantnu za ljude), poželjan poluživot, tj. vrijeme polueliminacije koje omogućuje doziranje u skladu s očekivanjima dobre suradljivosti pacijenata (21). Većina imunosupresiva ne zadovoljava nekoliko ovih kriterija. Naime, potencijal za interakcije je velik svima onima koji se metaboliziraju putem enzima CYP3A4, a o metabolizmu ovisna toksičnost posljedica je kombinacije ovisnosti o metaboliziranju putem enzima preko kojih stupaju u interakcije i uskog terapijskog raspona.

Imunosupresivi su vrlo moćni lijekovi, bez kojih moderna transplantacija ne bi bila moguća. Prvi su pokušaji tog postupka i bili skromnih dosega, sve dok nije došlo do razvoja imunologije, koja je omogućila razvoj imunosupresivnih lijekova. Njihova klinička upotreba osim prevencije odbacivanja transplantiranih organa ili tkiva, uključuje i liječenje autoimunih bolesti (brojne endokrinopatije, reumatoidni artritis, miastenija gravis, multipla skleroza, sistemski eritemski lupus) (3).

U ovom dijelu će biti riječi i o drugim faktorima osim genskih koji utječu na farmakoterapijsku varijabilnost imunosupresiva, tj. koji utječu na ponašanje organizma prema lijeku, a to su dob, spol, rasa, oštećenja nekih organa (posebice jetre i bubrega), životne navike i ostalo što će se zajednički nazvati kliničkim varijablama.

#### 4.1.1. Glukokortikoidi

##### 4.1.1.1. Primjena u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Dugi niz desetljeća, glukokortikoidi su bili nezaobilazni dio terapije u transplantiranih bolesnika, a i nakon otkrića novih imunosupresiva ostaju u upotrebi, samo se nastoji da to bude u manjim dozama (1). Međutim, smjernice prenose i preporuke o mogućnosti primjene protokola bez glukokortikoida (engl. „*steroid-free*“ protocols), a ukoliko to nije prikladno, postoji mogućnost povlačenja glukokortikoida nakon prvog posttransplantacijskog tjedna (engl. „*steroid withdrawal*“) (2).

U brojnim autoimunim bolestima često su dio terapije upravo lijekovi iz ove skupine, a povrh toga važni su i u terapiji brojnih upalnih sistemskih i nesistemskih bolesti koje zahvaćaju gotovo sve organe i/ili organske sustave (22).

#### 4.1.1.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje

Nije pronađen.

#### 4.1.1.3. Mehanizam djelovanja

Glukokortikoidi posredno suprimiraju staničnu imunost. U citoplazmi stanice glukokortikoid s glukokortikoidnim receptorom čini tzv. glukokortikoid-receptorni kompleks koji premještanjem u jezgru stanice utječe na transkripciju, a u limfocitima se taj učinak sastoji u inhibiciji gena koji kodiraju proupalne citokine, većinom interleukine (engl. *interleukins*) - IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 - i faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF $\alpha$ ). Najvažniji je učinak na IL-2. Dobro djeluju na limfocite T, dok im je djelovanje na stanice koje proizvode protutijela, odnosno zrele stanice B, bitno slabije. Tako im je imunosupresivno djelovanje jače izraženo na staničnim, nego u humoralnim oblicima imunosne reakcije (3).

#### 4.1.1.4. Farmakokinetika

Za lijek prednizon, jedan od češće korištenih glukokortikoida, poznato je da se nakon oralne primjene brzo i gotovo u potpunosti apsorbira, maksimalna se serumska koncentracija dostiže za 1-2 sata, a pri prvom prolasku kroz jetru 80-100 % prednizona metabolizira se do prednizolona (22). Reverzibilno se veže na transkortin i plazmatski albumin. Prednizolon se dominantno metabolizira u jetri, glukuronidacijom (oko 70 %) i sulfatacijom (oko 30 %) (22).

Farmakogenomika glukokortikoida nema mjesta u kliničkoj primjeni, iako su na temu smanjenog ili, s druge strane, toksičnog odgovora, rađena određena istraživanja kod nekih bolesti (steroidima induciran glaukom, upalne bolesti crijeva, pedijatrijski idiopatski nefrotski sindrom) te je utvrđena genetička podloga takvih reakcija (23, 24, 25). Međutim, glukokortikoidi potiču kaskadu signalnih reakcija u organizmu čime utječu na ekspresiju stotina gena te je moguće da upravo to napore u tom smjeru čini izuzetno složenima (23). Naime, radi se o djelovanju na receptore na koje djeluju endogeno prisutni glukokortikoidi.



#### 4.1.1.5. Sigurnosni profil lijekova iz skupine

Poput ostalih imunosupresiva mogu povećati rizik od bakterijskih, virusnih, gljivičnih, parazitskih i oportunističkih infekcija (22). Mogu se očekivati i poremećaji metabolizma i prehrane (retencija natrija s pojavom edema, povećano izlučivanje kalija, dobivanje na težini, smanjena tolerancija glukoze, šećerna bolest, hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija), krvožilni poremećaji (hipertenzija, povećan rizik od tromboze i arterioskleroze, vaskulitis (također u obliku simptoma apstinencije nakon dugotrajnog liječenja), povećana krhkost kapilara te poremećaji na brojnim drugim organskim sustavima, što se očekuje obzirom na veliku rasprostranjenost glukokortikoidnih receptora u organizmu (22).

#### 4.1.2. Monoklonska i poliklonska protutijela

##### 4.1.2.1. Primjena lijekova iz skupine u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Protutijela se primjenjuju u transplantaciji u svrhu indukcijske terapije, a radi se o primjeni neposredno prije ili pri samoj transplantaciji bubrega (1, 2). Svrha ovog tipa terapije je umanjiti ili modulirati odgovor T-stanica u vrijeme prezentacije antigena (2).

Primjena protutijela nije nužna, tj. postoji razlika među kliničkim centrima u primjeni, ali istraživanja pokazuju da smanjuje stopu akutnih odbacivanja i poboljšava preživljenje presatka (2). Za njihovo djelovanje karakteristična je intenzivna imunosupresija. Osim protutijela, u ovu se svrhu mogu primjenjivati i drugi imunosupresivi, a razlika je u tomu da se protutijela primjenjuju isključivo u svrhu indukcije (1).

Dvije su skupine protutijela u primjeni obzirom na homogenost sastava protutijela, monoklonska i poliklonska, a međusobno se razlikuju u više elemenata: načinu proizvodnje, sastavu, strukturi, mehanizmu djelovanja, specifičnosti i varijabilnosti (1).

Poliklonska protutijela povijesno su imala puno veći značaj jer su se u indukcijskoj terapiji upotrebljavala kako bi smanjila stopu akutnih odbacivanja i potrebu za velikim dozama glukokortikoida, dok ciklosporin još nije bio dostupan, a nakon toga su se počela sve više odbacivati zbog velikog rizika od razvoja infekcija i zloćudnih bolesti (2). Otkriće monoklonskih protutijela omogućilo je određeni napredak zbog njihove specifičnosti te je riješen problem varijabilnosti među proizvodnim serijama (1). Usmjerena su prema točno definiranim antigenima, stoga uzrokuju manje nuspojave (3). Monoklonska protutijela mogu biti deplecijska i nedeplecijska, a razlika je u tomu što za razliku od nedeplecijskih, deplecijska dovode do deplecije CD4+ T-stanica što može dovesti do produljenih perioda nespecifične

imunosupresije (1). Smatra se da bi prva linija indukcijske imunosupresije s protutijelima trebala biti provedena s nedeplecijskim IL-2 receptorskim (IL2Ra) monoklonskim protutijelima, dok bi se deplecijska protutijela trebala primjenjivati samo kod primatelja s velikim rizikom od odbacivanja (iako odnos koristi i rizika nije u potpunosti jasan), a za korist primjene deplecijskih u usporedbi s nedeplecijskim protutijelima, dokazi su nepotpuni, tj. njihova kvaliteta je umjerena (1, 2).

#### 4.1.2.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje lijeka

Nije pronađen.

#### 4.1.2.3. Mehanizam djelovanja

Protutijela u ljudskom organizmu djeluju vezanjem na antigene na limfocitima, modificirajući imunski odgovor.

#### 4.1.2.4. Farmakokinetika

Obzirom da se radi o imunoglobulinima, ne treba očekivati metaboličke interakcije među lijekovima.

#### 4.1.2.5. Sigurnosni profil lijekova iz skupine

Do nuspojava poliklonskih protutijela dolazi zbog intenzivne imunosupresije te one mogu biti ozbiljne i brojne. Najčešće su vrućica, urtikarija, glavobolje i osip. Može se pojaviti plućni edem, hipertenzivna reakcija, hipotenzija, a zabilježena je i teška anafilaksija (1). Utječu na sve limfocite i uzrokuju opću imunosupresiju koja može dovesti do posttransplantacijskih limfoproliferativnih poremećaja ili ozbiljnih infekcija (3). Napretkom antivirusne profilakse, tj. boljom dostupnošću iste, nisu više toliko rizična za primjenu te se primjenjuju kada je to nužno. Naprimjer, još uvijek imaju jasnu indikaciju za primjenu u kategoriji bolesnika s akutnim odbacivanjem rezistentnim na glukokortikoide (1).

### 4.1.3. Azatioprin

#### 4.1.3.1. Primjena lijeka u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Azatioprin se koristi već gotovo 50 godina u transplantacijskoj medicini (1) i u liječenju imunskih bolesti (26). Prije dvadesetak godina ga je mikofenolat zbog bolje učinkovitosti potisnuo u drugi plan, ali je još uvijek prisutan u smjernicama (1, 2). Naime, do 2009. godine primjena azatioprina je pala na 0,6 % kod novotransplantiranih pacijenata, dok je primjena mikofenolata porasla na 89,9 % (19).

#### 4.1.3.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje lijeka

Postoje podaci da dob utječe na farmakokinetiku azatioprina na način da je kod djece mlađe od 10 godina potrebno primijeniti 3,5 puta veću dozu, no što se primjenjuje kod djece starije od 10 godina, ukoliko se računa u mg/kg/dan (27), ali sažetak opisa svojstava lijeka s aktivnom tvari azatioprin ne potvrđuje tu informaciju (26). Bolesti bubrega mijenjaju doziranje jer akutna i kronična bubrežna insuficijencija mogu umanjiti eliminaciju, a od ostalih varijabli treba obratiti pažnju na: spol, ali vrlo specifično jer je veća aktivnost tiopurin metiltransferaze (engl. *thiopurine S-methyltransferase*, TPMT), zabilježena kod brazilskih muškaraca te rasu jer je kod afroameričkih i japanskih pacijenata češće zabilježena veća aktivnost enzima TPMT (27).

#### 4.1.3.3. Mehanizam djelovanja

Azatioprin pripada u skupinu antimetabolita, kao i mikofenolatna kiselina. Tiopurinski je lijek koji za postizanje terapijskoga učinka treba konverziju u tiogvaninske nukleotide.

Azatioprin je prekursor 6-merkaptopurina (6-MP), koji je također neaktivan, ali se nakon unutarstanične aktivacije ponaša kao antagonist purina (8, 26). To znači da bi 6-MP imao imunosupresivno djelovanje, mora ući u stanicu, gdje se unutarstaničnim anabolizmom pretvara u nukleotide tiogvanina (TGN), koji uz druge metabolite (npr. 6-metil-merkaptopurinski ribonukleotid) inhibiraju sintezu purina *de novo* i interkonverziju purinskih nukleotida (26). TGN se ugrađuju i u nukleinske kiseline, što pridonosi imunosupresivnim učincima lijeka, a drugi mehanizmi djelovanja azatioprina uključuju inhibiciju različitih puteva biosinteze nukleinskih kiselina, čime se sprječava proliferacija stanica koje određuju i pojačavaju imunوسي odgovor (8, 26).

#### 4.1.3.4. Farmakokinetika

Za metabolizam azatioprina važan je enzim II. faze, TPMT, koji katalizira metilaciju nekih metabolita azatioprina, inaktivirajući ih time (8, 26). Za brojne je polimorfizme u kodirajućim regijama, intronima i u promotorskoj regiji dokazano da odgovaraju smanjenoj ili odsutnoj aktivnosti enzima TPMT. Mala aktivnost javlja se kod heterozigota i pronađena je kod 11 % populacije. Najčešći polimorfizam je *TPMT\*3A*, koji predstavlja kombinaciju dva SNP-a na eksonima 7 i 10 (27). Nedostatak ili mala aktivnost enzima TPMT, zabilježena je kod svake trisote osobe (homozigoti za varijantne alele) i primjena standardnih doza ima za posljedicu porast izloženosti aktivnim metabolitima azatioprina, tiogvaninskim

nukleotidima, što može rezultirati ozbiljnom pa i smrtonosnom mijelosupresijom (4). Moguća je i povećana ekspresija enzima TPMT, što za posljedicu može imati odbacivanje organa (27).

#### 4.1.4. Mikofenolatna kiselina

##### 4.1.4.1. Primjena lijeka u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Mofetilmikofenolat (engl. *mycophenolate mofetil*, MMF) se upotrebljava kao imunosupresiv prve linije u transplantaciji i uobičajeno primjenjuje s inhibitorima kalcineurina, kao što su takrolimus i ciklosporin (28). Međutim, trendovi se u transplantaciji bubrega mijenjaju pa se primjenjuju i protokoli koji ga potpuno izostavljaju (1). Osim u transplantaciji bubrega, primjenjuje se u transplantaciji srca i jetre (8).

##### 4.1.4.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje lijeka

Dob djelomično utječe na farmakokinetiku mofetilmikofenolata i to na način da mala djeca (0-5 god.) trebaju veće doze ( $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dan}$ ) od adolescenata (15-20 god.) (27). Bolesti bubrega mijenjaju doziranje jer kronična bubrežna insuficijencija može povećati udio nevezane, aktivne frakcije i tako utjecati na toksičnost. Od ostalih varijabli, treba obratiti pažnju na spol jer je kod muškaraca glukuronidacija ili neizmijenjena ili povećana (27). Zanimljiv utjecaj pripadnosti azijskoj populaciji na farmakokinetiku i nuspojave mikofenolata opisan je u dijelu 4.3.1.4 kroz rezultate japanskog istraživanja (29).

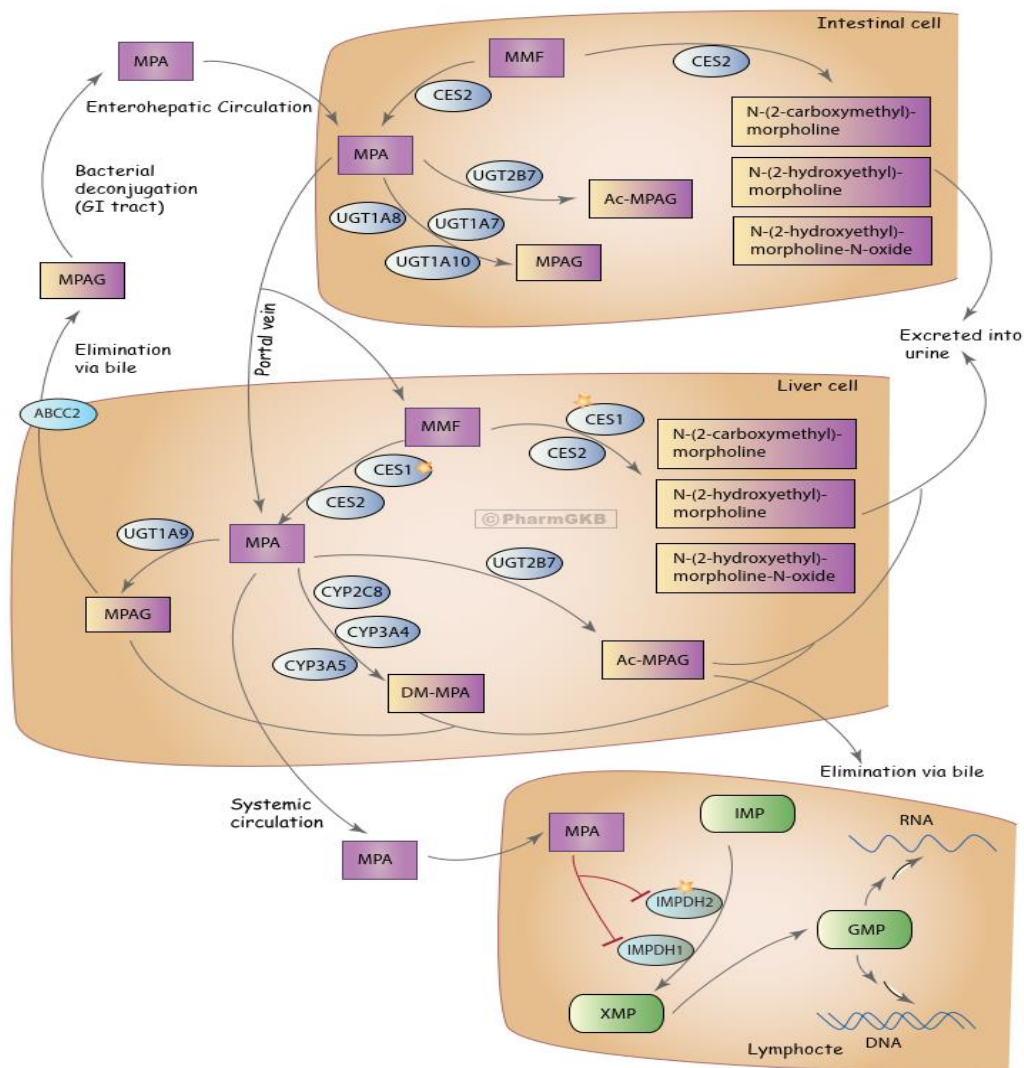
##### 4.1.4.3. Mehanizam djelovanja

Mikofenolatna kiselina (engl. *mycophenolic acid*, MPA), aktivni oblik MMF-a, je nekompetitivni, selektivni i reverzibilni inhibitor enzima IMPDH (30), ključnog enzima koji sudjeluje u sintezi purina i ograničava joj brzinu, a prevodi inozin-5'-monofosfat (engl. *inosine-5'-monophosphate*, IMP) u gvanozin-5'-monofosfat (engl. *guanosine-5'-monophosphate*, GMP) (8). Detaljniji prikaz mehanizma nalazi se na slici 2 (8).

Mikofenolat ostvaruje učinak inhibicijom enzima IMPDH jer tako zaustavlja stvaranje DNA u stanicama, što se posebice očituje na limfocitima jer se sprječavanjem nastajanja nove DNA usporava proliferacija limfocita i na taj način oni postaju manje učinkoviti pri prepoznavanju i napadanju transplantiranog organa čime se smanjuje rizik od odbacivanja (30).

Točan mehanizam sastoji se u interferiranju s kaskadom reakcija koje dovode do sinteze GMP-a potrebnog za sintezu DNA i to tako da se inhibicijom enzima IMPDH onemogućuje pretvorba IMP-a u

ksantozin-5'-monofosfat (engl. *xantosine-5'-monophosphate*, XMP), zbog čega s vremenom pada razina unutarstaničnog GMP-a i posljedično izostaje DNA sinteza jer zahtijeva gvanozin-5'-trifosfat (GTP) te je



Slika 2: Put lijeka mikofenolata – farmakokinetika i farmakodinamika. Glukuronidacija MPA, glavni metabolički put MPA, događa se prvenstveno u jetri, ali donekle i u crijevima i bubrezima. Primarni enzimi koji sudjeluju u MPA glukuronidaciji su enzimi uridindifosfat-glukuroniltransferaze (engl. *uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*, UGT), točnije UGT1A8 i UGT1A9 s manjom ulogom za UGT1A1, 1A7 i 1A10. MPAG se uglavnom izlučuje urinom aktivnom tubularnom sekrecijom i glomerularnom filtracijom. UGT1A8 i UGT1A10 izražavaju se samo ekstrahepatično i stoga su odgovorni za metabolizam MPA u gastrointestinalnom traktu. (Na slici pri vrhu je prikazana stanica crijeva.) Ukoliko je lijek primijenjen u obliku mofetilmikofenolata (MMF), dolazi do brze presustavne aktivacije u mikofenolatnu kiselinu karboksilesterazama (CES), uglavnom CES-1 i CES-2. Drugi metabolit MPA je oblik acilglukuronida, Ac-MPAG, generiran enzimom UGT2B7, koji ima djelovanje usporedivo s MPA. Ac-MPAG je sporedni metabolit, koji inducira oslobađanje citokina iz mononuklearnih leukocita, što je

vjerojatni uzrok nuspojava MMF-a. Pri dnu slike je limfocit, gdje je prikazan osnovni mehanizam djelovanja MPA - selektivna inhibicija proliferacije T-limfocita u S fazi inhibicijom enzima IMPDH. PharmGKB omogućuje upotrebu svojih podataka i sadržaja pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) (8).

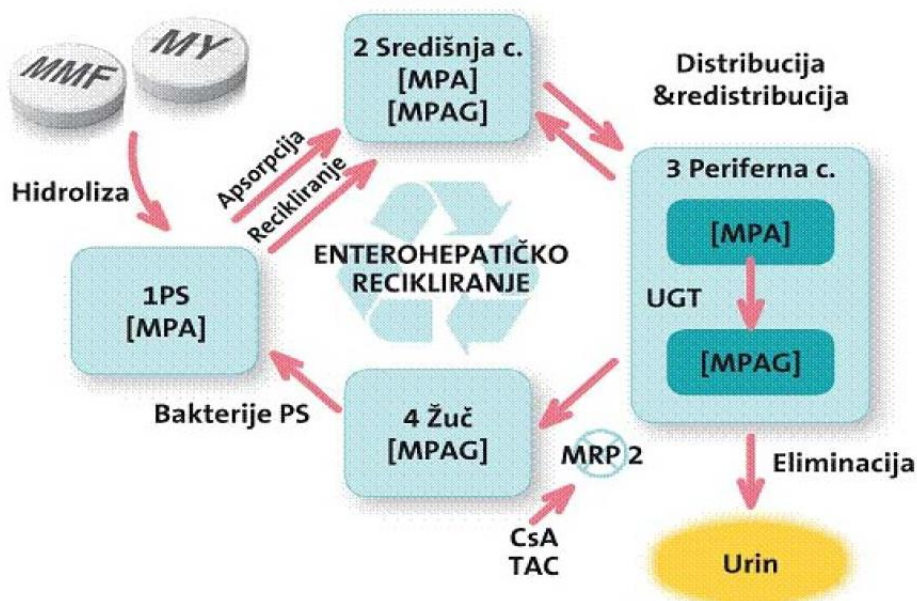
time inhibirana stanična proliferacija temeljena na ovom izvoru GTP-a (28). Međutim, u stanicama se GTP ne sintetizira samo kroz *de novo* put preko enzima IMPDH, nego također i preko alternativnog puta. Iznimka tomu su T- i B-limfociti, koji mogu koristiti samo put sinteze preko IMPDH, stoga mikofenolat selektivno inhibira proliferaciju limfocita (28).

#### 4.1.4.4. Farmakokinetika

Mikofenolatna kiselina, aktivni oblik mofetilmikofenolata, u organizmu se metabolizira u neaktivni metabolit fenolni glukuronid mikofenolatne kiseline (engl. *mycophenolic acid glucuronide*, MPAG) putem enzima II. faze razgradnje, glukuroniltransferaze (30).

Mikofenolat je snažno vezan za proteine plazme, preko 95 %, stoga svi faktori koji utječu na promjenu tog vezivanja mogu drastično izmijeniti udio slobodne frakcije i klinički učinak, a zbog velike vezanosti za plazmatske proteine, pri kliničkim koncentracijama se ni mikofenolat niti MPAG, ne izlučuju hemodijalizom, već se jedino pri velikim koncentracijama metabolita MPAG u plazmi uklanjanju male njegove male količine (30). Metabolit MPAG se hidrolizira u crijevima i u značajnom udjelu enterohepatičkom cirkulacijom vraća u krv te je zbog toga ovaj proces važan za učinak (30); kada izostaje enterohepatička recirkulacija, smanjuje se i učinak (31).

Enterohepatičko kruženje je glavno obilježje MPA farmakokinetike te je ono, kao što je već rečeno, važno za izloženost mikofenolatu. MPAG se opsežno stvara u jetri, djelomično izlučuje u žuč i značajno hidrolizira u MPA u tankom crijevu, što vodi reapsorpciji za koju se procjenjuje da doprinosi 10-60 % ukupnoj izloženosti. Ovdje je važno to što aktivni transport cirkulirajućeg MPAG-a u hepatocite značajno doprinosi enterohepatičkoj cirkulaciji i time sistemskoj izloženosti (31).



Slika 3: Čimbenici bioraspoloživosti mikofenolatne kiseline u procesu enterohepatičkog recikliranja potpomognutog metaboličkim enzimima UGT i prijenosnim proteinom natporodice ABC, potporodica B, član 2 (engl. *ATP-binding cassette sub-family C member 2*, *ABCC2*), starijeg naziva MRP2. MPA - mikofenolatna kiselina, MPAG - glukuronid mikofenolatne kiseline (prema Shaw LM, Clin J Am Soc Nephrol, 2007.) (4).

*Objašnjenje:* Na bioraspoloživost MPA utječu prijenosnici: organski anionski transportni polipeptidi (engl. *organic anion-transporting polypeptide*, *OATP*), protein povezan s rezistencijom na više lijekova tipa 2 (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*, *MRP2*) i protein koji uzrokuje rezistenciju raka dojke na lijekove (engl. *breast cancer resistance protein*, *BCRP* (*ABCG2*)).

#### 4.1.4.5. Sigurnosni profil lijeka

U kliničkim ispitivanjima zabilježeno je da su proljev, leukopenija, sepsa i povraćanje bile neke od najčešćih i/ili najozbiljnijih nuspojava primjene lijeka mofetilmikofenolata u kombinaciji s ciklosporinom i glukokortikoidima. Također je dokazana veća učestalost određenih vrsta infekcija (30). Iako neki autori drže da je za sigurnosni profil mikofenolata karakterističan izostanak nefrotoksičnosti (31), značenje tih zapažanja u transplantacijskoj praksi je upitno obzirom na nuspojave MMF-a zabilježene u kliničkim ispitivanjima i po stavljanju lijeka s ovom aktivnom tvari u promet, tj. može se govoriti jedino o smanjenju učestalosti oštećenja bubrega pri primjeni MMF-a u okviru imunosupresivnih protokola liječenja (30).

#### 4.1.4.6. Utjecaj formulacije na djelovanje lijeka

Mikofenolatna kiselina (MPA) je imunosupresivni lijek dostupan kao natrijeva sol ili kao prolijek u obliku estera, MMF, 2-morfolinoetil esterskog prolijeka MPA formuliranog kako bi se poboljšala bioraspoloživost (8). Mikofenolat natrij je u obliku formulacije s odgođenim otpuštanjem koji otpušta MPA tek u tankom crijevu (30).

#### 4.1.5. Inhibitori kalcineurina

##### 4.1.5.1. Primjena lijekova u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Najrašireniju primjenu u ovoj skupini lijekova, prema nekim istraživanjima, u većini transplantacijskih centara ima takrolimus, a osim njega na tržištu su dostupni još i ciklosporin i voklosporin.

Kao što je opisano u dijelu 1.2.1., imunosupresivno djelovanje se kada je to moguće često temelji na primjeni mTOR inhibitora u kombinaciji s inhibitorom kalcineurina i glukokortikoidom u okviru protokola minimizacije i ukidanja. Sažetak opisa svojstava lijeka s aktivnom tvari sirolimus, navodi kako se u bolesnika u kojih ukidanje ciklosporina nije bilo uspješno ili izvedivo, kombinaciju ciklosporina i sirolimusa ne smije nastaviti duže od 3 mjeseca nakon transplantacije te se u takvih bolesnika mora, kada je to klinički pogodno, prekinuti liječenje sirolimusom te započeti zamjenski imunosupresivni protokol (32).

##### 4.1.5.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje

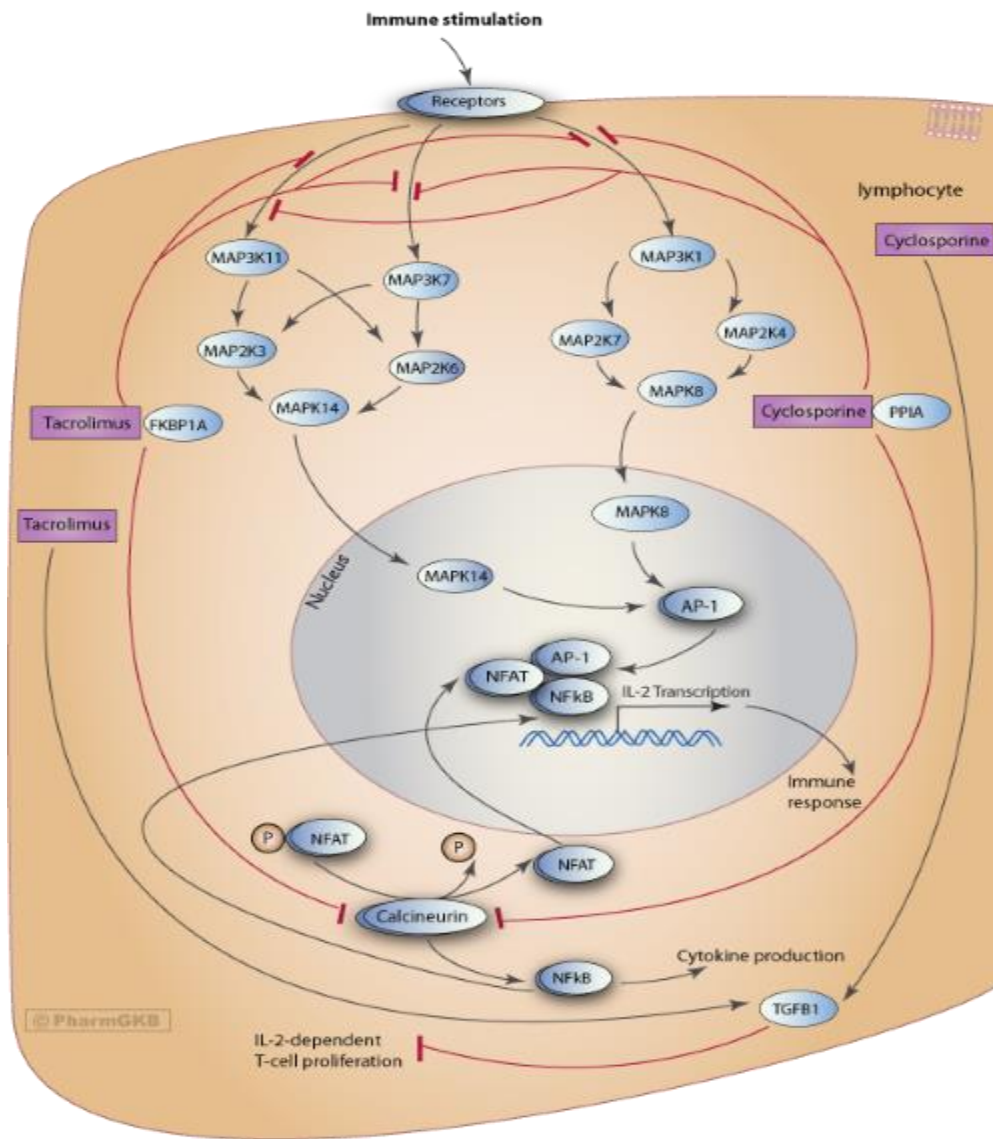
Dob utječe na farmakokinetiku ciklosporina i to, prema nekim izvorima, na način da djeca trebaju 3,4–5 puta veću dozu (mg/kg/dan) od odraslih, a mala djeca (2-5 god.) trebaju još veće doze (mg/kg/dan) u usporedbi s adolescentima (stariji od 10 god.) (27), a sažetak opisa svojstava lijeka s aktivnom tvari ciklosporin navodi da su u dječjoj populaciji potrebne veće doze no u odrasloj, ali ne i koliko (33). Kod takrolimusa se navodi da se radi o 3 puta većoj dozi (mg/kg/dan) kod djece nego kod odraslih, a kod male djece (mlađa od 3 god.) o još većim dozama (mg/kg/dan) u usporedbi s djecom starijom od 3 godine (27), ali sažetak opisa svojstava lijeka s aktivnom tvari takrolimus navodi da u djece svih dobnih skupina započeti treba s do 2 puta većom dozom (mg/kg/dan), no u odraslih (34). Dijabetička gastropareza utječe na bioraspoloživost ciklosporina ovisno o obliku lijeka, cistična fibroza mijenja doziranje takrolimusa na način da je potrebna 1,4 puta veća oralna doza (korigirana tjelesnom masom) kod ovih pacijenata, a od ostalih varijabli, treba obratiti pažnju na dodatke prehrani i hranu jer gospina trava, sok od grejpa, post i masni obroci mogu imati utjecaj na bioraspoloživost i ciklosporina i



takrolimusa (27) te je uočeno da je masna hrana smanjila za oko 13 % AUC odnosno za 33 % C<sub>max</sub> ciklosporina, kada se ovaj lijek primjenjivao uz obrok s visokim udjelom masnoća (33). Spol nema značajnijeg utjecaja, iako studije koje su uzele u obzir rasu pokazuju da je moguća smanjena bioraspoloživost ciklosporina kod Afroamerikanki, a pripadnost rasi, bez obzira na spol, utječe na bioraspoloživost takrolimusa jer je zabilježena smanjena bioraspoloživost kod Afroamerikanaca u usporedbi s bijelom rasom (27).

#### 4.1.5.3. Mehanizam djelovanja

Dva se lijeka iz ove skupine vrlo često primjenjuju pri transplantaciji bubrega, a to su već spomenuti ciklosporin i takrolimus. Osim njih, u toj skupini je još i voklosporin, koji nije odobren u Hrvatskoj. Imaju istovjetan mehanizam djelovanja – sprječavaju aktivaciju T-stanica ovisnih o IL-2 u ranom stadiju staničnog ciklusa. Ciklosporin i takrolimus aktivnim transportom ulaze u stanicu, u citoplazmi se spajaju sa staničnim proteinima iz porodice imunofilina – ciklosporin s ciklofilinima, a takrolimus s imunofilin FK506 vezujućim proteinima, tj. već spomenutim proteinom FKBP. Postoji pet tipova ciklofilina i pet tipova imunofilina FKBP, a samo se jedan tip, FKBP-12, smatra glavnim posrednikom imunosupresivne aktivnosti takrolimusa (3). Detaljniji mehanizam je prikazan na slici 4. Na staničnoj razini inhibiraju proizvodnju i oslobađanje limfokina, uključujući IL-2. Čini se da ciklosporin blokira limfocite u mirovanju u fazama G<sub>0</sub> ili G<sub>1</sub> staničnog ciklusa te inhibira antigenom potaknuto otpuštanje limfokina iz aktiviranih T-stanica, a djelovanje je specifično i reverzibilno (33).



Slika 4: Put lijekova inhibitora kalcineurina – shematski prikaz mehanizma djelovanja ciklosporina i takrolimusa, kao i gena kandidata na koje se misli da ovi lijekovi imaju učinak. Kaskadom reakcija dolazi do suzbijanja proliferacije T-limfocita posredovanog proteinom IL-2, inhibicijom kalcineurina. Kalcineurin je o kalcmodulinu ovisna fosfataza, koja se stimulira tijekom aktivacije T-limfocita, potom se aktiviran povezuje sa i defosforilira članove porodice nuklearnog faktora aktiviranih T-limfocita (engl. *nuclear factor of activated T cells*, NFAT), aktivirajući na taj način te proteine. Po aktivaciji se proteini NFAT translociraju u jezgru, gdje se povezuju s drugim faktorima transkripcije, poput članova porodice aktivacijskog proteina 1 (AP-1) i vežu za DNA kako bi potaknuli transkripciju interleukina-2. Uz članove porodice NFAT i AP-1, pojačivač nuklearnog faktora kapa-lakog lanca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) također je uključen u indukciju transkripcije IL-2. TGF-β1 je citokin kritičan za regulaciju stanica imunskog sustava, za koji je pokazano da inhibira proliferaciju T-limfocita ovisnih o IL-2, kao i da vrši niz drugih imunosupresivnih učinaka unutar T stanica. Put protein kinaze aktivirane mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) signalna je kaskada uključena u širok

spektar procesa, posebno unutar stanica imunskog sustava. Sastoji se od tri proteinske kinaze: MAPK, MAPKK i MAPKK-K. Pokazano je da ciklosporin i takrolimus (u kompleksu sa svojim imunofilinima) inhibiraju putove JNK (MAPK8) i p38 (MAPK14). PharmGKB omogućuje upotrebu svojih podataka i sadržaja pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](#) (8).

#### 4.1.5.4. Farmakokinetika i interakcije

Unatoč istom mehanizmu djelovanja ciklosporina i takrolimusa, kao i istim transporterima lijeka i sličnim metabolizirajućim enzimima, ipak postoje razlike u farmakokinetici jer je takrolimus supstrat CYP3A5, a ciklosporin nije u značajnom opsegu, stoga na metabolizam ciklosporina ne utječe polimorfizam CYP3A5 (8, 19) (Detaljniji opis je uz sliku 5).

Na oba lijeka tijekom biotransformacije značajno utječu polimorfni enzimi i polimorfni transporteri. Povrh toga, kao i većina imunosupresiva, imaju mali terapijski indeks te je njihovu primjenu potrebno vrlo pomno nadzirati. Također, zbog toga što se radi o utjecaju molekula, ponajprije enzima citokroma CYP3A4, koje izuzetno velikim udjelom sudjeluju u metabolizmu lijekova općenito, terapiju dodatno usložnjava stupanje u brojne interakcije. Zbog svih ovih razloga, nešto detaljnije biti će opisan utjecaj organizma primatelja, kao i drugih često primjenjivanih lijekova, na složenost terapije inhibitorima kalcineurina, premda takav pristup moguće izlazi iz opsega i primarnih ciljeva ovog rada.

Poznati su razni agensi koji povećavaju ili smanjuju razinu ciklosporina u plazmi ili punoj krvi, obično inhibicijom ili indukcijom enzima uključenih u metabolizam ciklosporina, osobito CYP3A4, a s druge strane, ciklosporin je inhibitor CYP3A4, P-glikoproteina (efluksni/izbacivački transporter za protok više lijekova) i organskih anionskih prijenosnih proteina (engl. *organic anion-transporting polypeptide*, OATP) te može povećati razine istodobno primijenjenih lijekova koji su supstrati ovih enzima i/ili prijenosnika (33). U transplantiranih bolesnika potrebno je učestalo mjerenje razina ciklosporina te, ako je nužno, prilagođavanje doze ciklosporina, osobito tijekom uvođenja ili ustezanja pridruženih lijekova. U netransplantiranih bolesnika odnos između razine u krvi i kliničkih učinaka nije tako dobro utvrđen. Zanimljivo je da, s druge strane, postoje i preporuke da se pri uvođenju lijekova za koje se zna da povećavaju razine ciklosporina, a primjenjuju se istodobno, može učestalim ocjenama bubrežne funkcije i pažljivim praćenjem nuspojava povezanih s ciklosporinom primjerenije pratiti terapija od mjerenja razine u krvi (33).

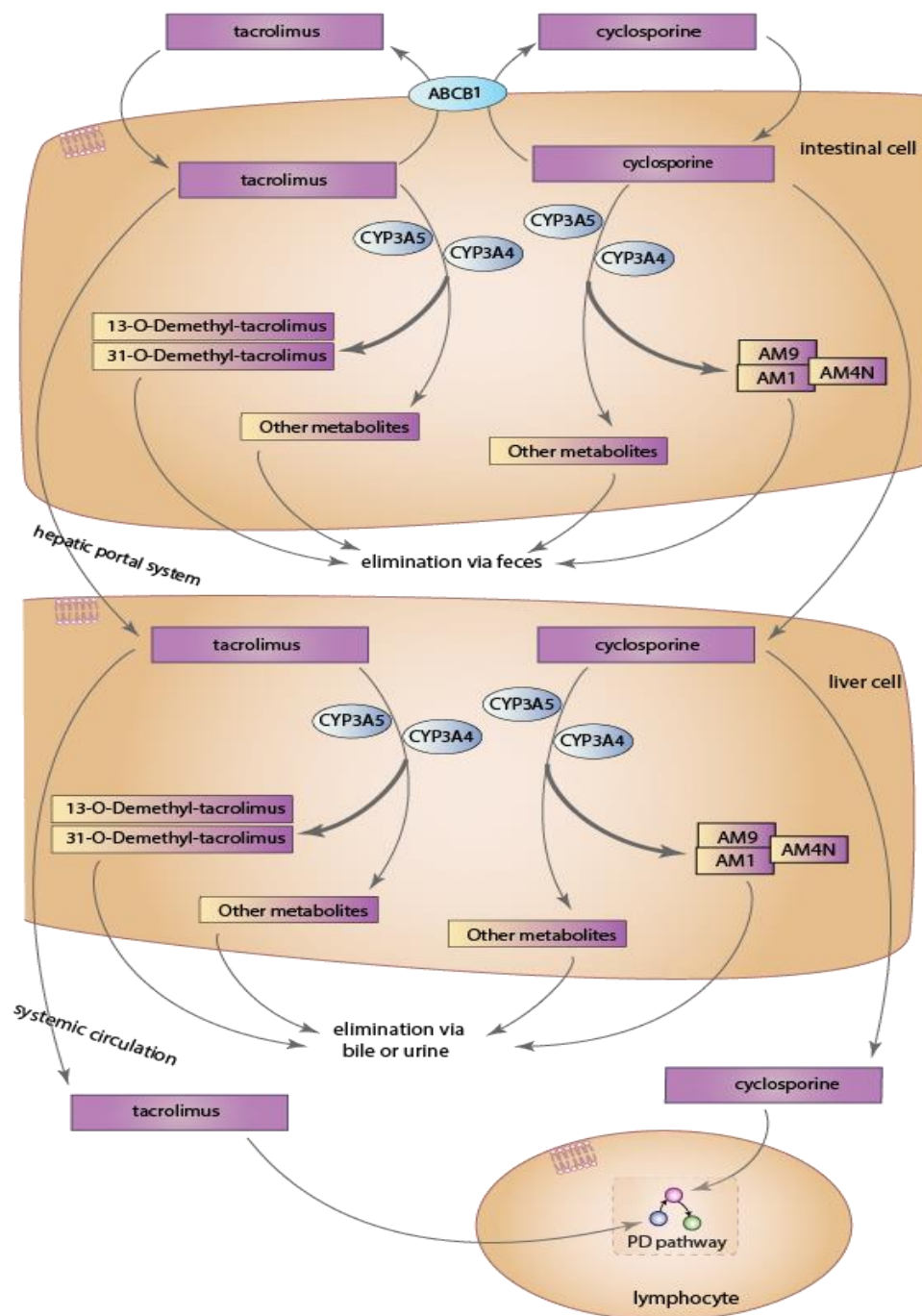
Naročit oprez se preporučuje kod takrolimusa prilikom istodobne primjene tvari koje mogu promijeniti metabolizam CYP3A4, kada se osim pomne kontrole razine takrolimusa u krvi preporučuje provjera je li

došlo do produljenja QT intervala (EKG-om), jednako kao i funkcije bubrega i ostalih nuspojava, kako bi se na prikladan način prekinula ili prilagodila doza takrolimusa (34).

Za sve induktore CYP3A4 i/ili P-glikoproteina očekuje se da će smanjiti razine ciklosporina i takrolimusa. Primjeri takvih lijekova su: neki barbiturati, karbamazepin, fenitoin i *Hypericum perforatum* (gospina trava) (33, 34).

Za inhibitore CYP3A4 i/ili P-glikoproteina očekuje se da mogu dovesti do povećanih razina ciklosporina i takrolimusa pa su tako opažene jake interakcije s antimikoticima poput ketokonazola, flukonazola, itrakonazola, vorikonazola i izavukonazola, makrolidnim antibiotikom eritromicinom, inhibitorima proteaze HIV-a (npr. ritonavinom, nelfinavirom, sakvinavirom) i inhibitorima proteaze HCV-a (npr. telaprevirom, boceprevirom i kombinacijom ombitasvira i paritaprevira s ritonavinom, primijenjenom s dasabuvirom ili bez njega) (33,34). Također su opažene interakcije s klaritromicinom, nikardipinom, diltiazemom, verapamilom, amiodaronom, danazolom, oralnim kontraceptivima, nefazodonom, imatinibom i još nekim lijekovima (33, 34).

Od ostalih interakcija s češće primjenjivanim lijekovima još je zabilježeno da: azitromicin povećava razine ciklosporina za oko 20 %, doze održavanja glukokortikoida smanjuju razinu takrolimusa u krvi, a velike doze prednizolona ili metilprednizolona koje se daju u liječenju akutnog odbacivanja mogu povećati ili smanjiti razinu takrolimusa u krvi (33, 34).



Slika 5: Put lijekova inhibitora kalcineurina – shematski prikaz farmakokinetike ciklosporina i takrolimusa. Po ulasku u enterocite, oba se lijeka metaboliziraju gastrointestinalnim izoenzimima CYP3A, pretežno putem CYP3A4 i CYP3A5. Prevladavajući enzim za metabolizam takrolimusa je CYP3A5, a CYP3A4 mu doprinosi s manjom učinkovitošću katalitičkog djelovanja. Nasuprot tomu, ciklosporin se primarno metabolizira putem CYP3A4. Lijek koji neizmijenjen prođe metabolizam u crijevima, ulazi u portalni sustav i jetru, gdje se metaboliziranje CNI-a nastavlja jetrenim enzimima CYP3A4 i CYP3A5. Metabolizmom takrolimusa nastaje do 15 metabolita, a

najzastupljeniji je 13-O-demetil-takrolimus, koji ima jednu desetinu aktivnosti takrolimusa, dok sporedni metabolit, 31-O-demetil-takrolimus, ima imunosupresivno djelovanje usporedivo s takrolimusom. Preostali metaboliti imaju slabo ili zanemarivo farmakološko djelovanje. Metabolizmom ciklosporina nastaje ~ 25 metabolita. Glavni metaboliti su AM1 i AM9, produkti hidroksilacije te AM4N, produkt *N*-demetilacije. Metabolizmom putem CYP3A4 nastaju AM1, AM9 i AM4N, a putem CYP3A5 samo AM9. Čini se da svi do sada proučeni metaboliti imaju smanjenu aktivnost u usporedbi s ciklosporinom, s tim da je ona AM1 najveća. Izbacivački transporter P-glikoprotein također ima važnu ulogu u farmakokinetici takrolimusa i ciklosporina. Radi se o prijenosniku natporodice ABC, potporodice B, članu 1, kodiran je genom *ABCB1* (engl. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*) i izbacuje ksenobiotike iz stanice, a prisutan je u velikim koncentracijama u vilima enterocita tankog crijeva. P-glikoprotein transportira lijekove i preko membrane hepatocita i bubrežnih stanica te ima ulogu u transportu unutar limfocita. Međutim, bolje je opisana uloga ovog izbacivačkog transportera u enterocitima te je isti zato i prikazan u sklopu tog tipa stanica na ovoj slici. PharmGKB omogućuje upotrebu svojih podataka i sadržaja pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](#) (8).

#### 4.1.5.5. Sigurnosni profil lijekova iz skupine

Kod oba lijeka postoji rizik od nefrotoksičnosti. Međutim, istraženo je da se evaluacijom učinaka genskih polimorfizama na interindividualne razlike u odgovorima i određivanjem rizika za razvoj inhibitorima kalcineurina izazvane nefrotoksičnosti i progresiju kronične disfunkcije alografta, može optimizirati individualna terapija s minimizacijom nuspojava (35). Više riječi o nefrotoksičnosti inhibitora kalcineurina biti će u dijelu 4.3.2.

Neke kombinacije s lijekovima koji su supstrati P-glikoproteina ili prijenosnika OATP, za koje su povećane koncentracije u plazmi povezane s ozbiljnim i/ili po život opasnim događajima su kontraindicirane, a kao primjer se navode bosentan i aliskiren (33).

Nuspojave koje se očekuju uslijed terapije CNI-ima tiču se posljedica imunosupresije i uključuju leukopeniju, anemiju, trombocitopeniju, pancitopeniju i druge poremećaje krvne slike (33, 34).

Paradoksalno, ovi lijekovi koji služe nadomještanju bubrežne funkcije, mogu manifestirati brojne nuspojave iz skupine poremećaja bubrega i mokraćnog sustava, a to su: oštećenje funkcije bubrega, zatajenje bubrega, akutno zatajenje bubrega, oligurija, nekroza bubrežnih tubula, toksična nefropatija, urinarni poremećaji te simptomi vezani za mokraćni mjehur i mokraćovod (33, 34).

Zabilježeni su i učinci na krvožilni sustav pa je tako hipertenzija vrlo česta nuspojava ciklosporina, a osim nje se kod takrolimusa još pojavljuju i krvarenje, tromboembolijski i ishemijski događaji, vaskularni periferni poremećaj te vaskularni hipotenzivni poremećaji (33, 34).

Među poremećajima metabolizma i prehrane vrlo je česta hiperlipidemija, a javljaju se hiperglikemija, šećerna bolest, anoreksija, hiperuricemija, hiperkalijemija, hipomagnezijemija (33, 34).

Inhibitor kalcineurina takrolimus temelj je složene imunosupresivne strategije liječenja koja se primjenjuje za smanjenje rizika pojave bolesti nastale uslijed reakcije davatelja protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*, GVHD). Povećana učestalost s liječenjem povezane nefrotoksičnosti povezana je sa suprat terapijskim razinama takrolimusa unutar prva 2 tjedna posttransplantacijskog liječenja (36), o čemu ima više riječi u dijelu 4.3.3.2. Ovaj podatak upućuje na važnost rane uspostave optimalnog doziranja, tj. izbjegavanja neindividualiziranog pristupa. Povrh više puta navedenog uskog terapijskog raspona, takrolimus karakterizira i značajna interindividualna farmakokinetička varijabilnost ukoliko se primjenjuje standardno doziranje temeljeno na tjelesnoj masi. Standard kliničke skrbi u ovakvoj terapiji je neizbježna primjena TDM-a, međutim važno je naglasiti kako postizanje ciljnih razina u krvi neposredno prije primjene sljedeće doze, tj. ciljne „trough“ koncentracije (engl. *trough level*) takrolimusa (5-15 ng/mL) može biti problematično, unatoč tzv. reaktivnim prilagodbama doze u skladu s rezultatima čestih određivanja putem TDM-a (36). Na to koliko su ta određivanja česta ukazuje standard u nekim hrvatskim kliničkim centrima temeljen na smjernicama KDIGO-a, a to je određivanje svaki drugi dan poslije presađivanja bubrega i to dvije koncentracije: 2 sata i „trough“ određivanje, tj. 12 sati nakon primjene (2). Diskutabilno je koliko su tako česta uzorkovanja praktična i kakav je njihov utjecaj na pacijenta, a postoji mogućnost da se unatoč čestim promjenama doze, unutar tih kritičnih dva tjedna ne postigne željeni odgovor. Uzevši ovo u obzir, a imajući u vidu i eventualne politerapije transplantiranih pacijenata, važno je razmotriti bi li farmakogenetički profil mogao pomoći u određivanju prve doze, tj. manjim odstupanjima na početku i bržoj uspostavi ciljne koncentracije takrolimusa u krvi.

Na sigurnosni profil lijeka utječe varijabilan profil apsorpcije takrolimusa nakon oralne primjene, s prosječnom bioraspoloživostu od 25 %, koja se kreće od samo 5 do čak 93 %. Lijek prolazi kroz značajnu izmjenu u jetri te se samo manje od 1 % lijeka izlučuje neizmijenjeno. Izoforme citokroma P450 3A4 i 3A5 su primarni enzimi prve faze metabolizma odgovorni za jetreni klirens ovog lijeka. Supstrat je i P-glikoproteina, koji doprinosi značajno farmakokinetičkoj varijabilnosti takrolimusa. I, u konačnici, interindividualna varijabilnost takrolimusa može se barem djelomično objasniti kliničkim i demografskim faktorima, uključujući dob, rasu, jetrenu i bubrežnu funkciju te konkomitantnu terapiju (36).

Obzirom na navedene detaljne podatke koji ukazuju na to da farmakogenetika ima mjesta u kliničkoj primjeni takrolimusa izrađene su smjernice CPIC-a, kojima će se u ovom radu posvetiti dosta prostora, a o čemu će biti više riječi u dijelu 4.3.3.

Prije toga, bitno je obratiti pažnju na dosta opreznu formulaciju preporuka o doziranju proizvođača jednog od lijekova s aktivnom tvari takrolimus registriranom na hrvatskom tržištu (radi se o originatoru), a to je da navedena početna doza služi isključivo kao smjernica te da se doziranje u prvom redu mora temeljiti na kliničkoj procjeni odbacivanja i podnošljivosti kod svakog pojedinog bolesnika, uzimajući u obzir i kontrole razine u krvi. Također se navodi kako je u slučaju pojave kliničkih znakova odbacivanja, potrebno razmotriti promjenu imunosupresivnog režima (34).

#### 4.1.6. mTOR inhibitori

Postoje brojni dokazi o prednostima mTOR inhibitora obzirom na starije generacije imunosupresiva u transplantaciji, posebice ukoliko se u obzir uzme očuvanje bubrežne funkcije. Unatoč tomu, njihova potrošnja u Hrvatskoj ne ukazuje na značajan porast, naročito u usporedbi s inhibitorima kalcineurina. Točnije, potrošnja everolimusa polako raste, dok sirolimusa stagnira, a kroz isto razdoblje (od 2014. do 2018.) vidi se kako, u usporedbi s mTOR inhibitorima višestruko veća potrošnja ciklosporina i takrolimusa, dodatno raste (37).

##### 4.1.6.1. Primjena u transplantaciji bubrega i ostale indikacije

Sirolimus (SRL) je bio prvi lijek na tržištu ovog mehanizma djelovanja, inhibicije mTOR-a, a otkriven je kao proizvod bakterije *Streptomyces hygroscopicus*. Everolimus (EVR) je dobiven iz sirolimusa, a sadrži 2-hidroksi-etilni lanac na 40. mjestu, što čini lijek hidrofilnijim od SRL, čime je postignuta veća oralna bioraspoloživost (38).

Primjenjuju se u transplantaciji bubrega i u onkologiji. Onkološke indikacije everolimusa su uznapredovali rak dojke pozitivan na hormonske receptore, neuroendokrini tumori s primarnim sijelom u gušterači, neuroendokrini tumori s primarnim sijelom u probavnom sustavu ili plućima i karcinom bubrežnih stanica (39). I drugi lijekovi iz skupine, temsirolimus (u liječenju karcinoma bubrežnih stanica i limfoma plaštenih stanica) te deforolimus našli su primjenu u području onkologije (38, 40).



#### 4.1.6.2. Utjecaj kliničkih varijabli na djelovanje lijeka

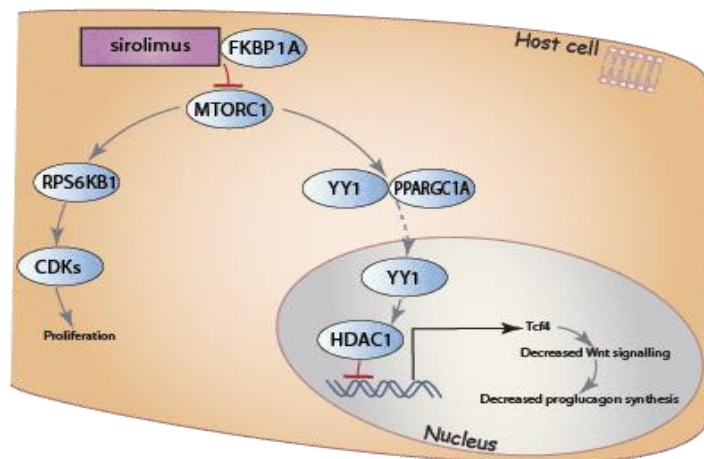
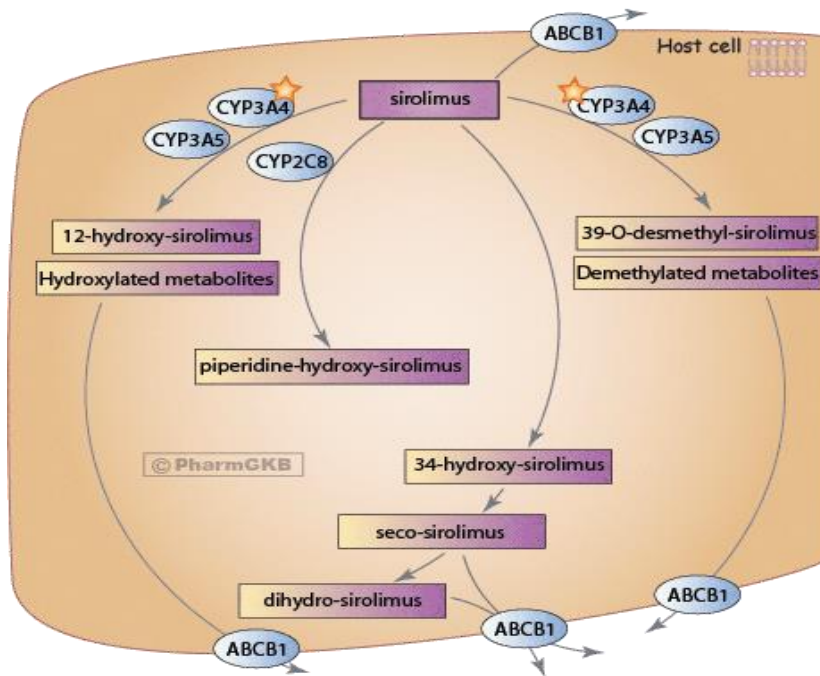
Dob utječe na farmakokinetiku sirolimusa, prema nekim izvorima, tako da je 90 % veći klirens kod pedijatrijskih pacijenata, dok se kod everolimusa, ukoliko se provede prilagodba doze prema površini tijela, ne uočava razlika između djece i odraslih (27). Međutim, klinička ispitivanja ovih lijekova na pedijatrijskoj populaciji nisu provedena te službene preporuke doziranja stoga ne postoje (32, 41). Bolesti jetre mijenjaju doziranje značajno; kod sirolimusa je potrebno umanjiti dozu na otprilike polovinu (32) ili čak trećinu (27) preporučene doze kod blage do umjerene disfunkcije jetre, a pri primjeni everolimusa poremećaj rada jetre umanjuje klirens za 53 %, a doziranje se umanjuje sukladno težini oštećenja (41). Od ostalih varijabli, treba obratiti pažnju: na obroke jer pri primjeni sirolimusa visokomasni obroci povećavaju apsorpciju, na spol jer je kod zdravih žena zabilježen 20 % veći klirens sirolimusa te na rasu jer je kod afroameričkih pacijenata zabilježen veći klirens i sirolimusa i everolimusa (27).

#### 4.1.6.3. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja ovih lijekova je inhibicija enzima serin-treonin kinaze, nazvanog mTOR temeljem načina na koji je otkriven, koji je uključen u unutarstanične reakcije kao jedan od regulatora brojnih ključnih procesa: sinteze proteina, sinteze lipida, angiogeneze, staničnog ciklusa, biogeneze i funkcije mitohondrija te autofagije. Većina enzima, poput ovoga, uključena u ovaj tip procesa regulirana je brojnim, strogo reguliranim, genima. U ovom slučaju taj poligenski utjecaj na učinke ovih lijekova na stanične procese još nije u potpunosti definiran (38).

Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali poznato je kako se radi o inhibiciji mTOR kompleksa 1. Na molekularnom nivou, everolimus stvara kompleks s citoplazmatskim proteinom FKBP-12. U prisutnosti everolimusa inhibirana je fosforilacija p70 S6 kinaze stimulirana faktorom rasta. Kako je fosforilacija p70 S6 kinaze pod kontrolom FRAP-a (engl. *FKBP and Rapamycin-Associated Protein*) - drugi naziv za mTOR - to upućuje da se kompleks everolimus-FKBP-12 veže na, odnosno interferira s funkcijom FRAP-a (41). Radi se o zastoju u G1 fazi staničnog ciklusa (38). Detaljniji prikaz mehanizma djelovanja je prikazan na slici 6.

Poligenski utjecaj na učinke sirolimusa i everolimusa unutar stanice još nije u potpunosti definiran te postoji potreba za određenim pregledom glavnih dokaza o utjecaju genetike na biologiju i farmakologiju mTOR inhibitora (38).



Slika 6: Put lijeka sirolimusa – farmakokinetika i farmakodinamika. Farmakokinetika - pojmovi: prijenosnik ABCB1; metaboliziranje putem CYP3A4 i CY3A5. Farmakodinamika: nakon ulaska u stanice, sirolimus tvori inhibitorski kompleks s imunofilinom FKBP-12 (kodiran genom *FKBP1A*) koji cilja mTORC1, inhibirajući kaskadom reakcija posljedične učinke. Prikazan je i mehanizam zbog kojega djelovanje sirolimusa dovodi do određenih nuspojava: U citosolu se proteinski kompleks mTORC1 heterodimerizira s YY1 i PGC-1 $\alpha$  da bi stvorio transkripcijski kompleks koji se podvrgava nuklearnoj translokaciji, kako bi aktivirao ekspresiju mitohondrijskog gena. Međutim, ovaj transkripcijski kompleks također može aktivirati histon-deacetilazu (engl. *histone deacetylase*, HDAC) u promotora *TCF7L2*, gena koji kodira transkripcijski faktor Tcf4 koji olakšava ekspresiju ciljnih gena Wnt uzrokujući smanjenu sintezu proglukagona. Tako sirolimus pridonosi poremećajima homeostaze glukoze i dijabetesu nakon transplantacije (engl. *new-onset diabetes after transplantation*, NODAT). PharmGKB omogućuje upotrebu svojih podataka i sadržaja pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (8).

#### 4.1.6.4. Farmakokinetika i interakcije

Sirolimus i everolimus uglavnom se metaboliziraju putem CYP3A4. Također, mTOR inhibitori su supstrati membranskih prijenosnika, među kojima je i P-glikoprotein (P-gp) (32, 41).

U sažecima opisa svojstava lijeka navodi se kako se sirolimus i everolimus uglavnom metaboliziraju preko CYP3A4 u jetri i u određenoj mjeri u stijenci crijeva te su supstrati za pumpu za izbacivanje različitih lijekova, prijenosnik P-glikoprotein (P-gp). Stoga, na apsorpciju i posljedičnu eliminaciju sistemski apsorbiranog everolimusa mogu djelovati lijekovi koji imaju utjecaj na CYP3A4 i/ili P-glikoprotein. Istodobna primjena sa snažnim CYP3A4/P-gp-inhibitorima ne preporučuje se osim ako korist ne premašuje rizik, a primjeri lijekova iz ove skupine snažnih inhibitora su neki antimikotici triazolne strukture (ketokonazol, vorikonazol, itrakonazol), neki antibiotici (telitromicin ili klaritromicin), antivirusni lijekovi i drugi. Pri takvoj primjeni preporučuje se oprez pa se tako navodi da najmanje koncentracije imunosupresiva u punoj krvi treba pratiti kada se istodobno primjenjuju inhibitori CYP3A4/P-gp te nakon prestanka njihove primjene. S druge strane, induktori CYP3A4 pojačavaju metabolizam i smanjuju razinu ovih imunosupresiva. Također se navodi kako se istodobna primjena sa snažnim i umjerenim CYP3A4 induktorima ne preporučuje osim ako korist ne premašuje rizik, a primjeri ovih lijekova su rifampicin, fenitoin, karbamazepin, fenobarbital i drugi (32, 41). Radi se o stupanju u interakcije koje je vrlo slično onomu CNI-a.

#### 4.1.6.5. Sigurnosni profil lijekova iz skupine

Uključenje ove skupine lijekova u terapiju značajno je smanjilo učestalost virusnih infekcija (citomegalovirus i BK-virus) (1), ali bolesnici su ipak izloženi povećanom riziku od oportunističkih infekcija (bakterijskih, gljivičnih, virusnih te onih uzrokovanih protozoama) (41).

Uvođenjem mTOR inhibitora u terapiju smanjile su se i kardiovaskularne komplikacije kod bolesnika primatelja presatka.

Primijećeno je kako je antikarcinogeni učinak mTOR inhibitora ograničen na citostatsku i slabu citotoksičnu aktivnost, čime je klinički učinak stabilizacija, a ne regresija karcinoma. To se smatra dodanom vrijednošću kod imunosupresivnog liječenja zbog toga što je taj učinak poželjan kod pacijenata sklonih razvoju maligniteta poslije transplantacije. Uistinu, studijom je dokazana manja učestalost karcinoma 5 godina nakon transplantacije u sirolimusom liječenih pacijenata. U drugoj studiji, rano povlačenje ciklosporina A (3 mjeseca poslije transplantacije), nakon kojeg je slijedilo uvođenje

sirolimusa, dovelo je do manje pojave maligniteta u usporedbi s protokolom kombinirane primjene ciklosporina A i sirolimusa (38). Osim utjecaja na malignitet, smatraju se boljim izborom kod pacijenata s posttransplantacijskom inkapsulirajućom peritonejskom sklerozom, CMV i BK virusnom infekcijom.

Lijekovi iz skupine mTOR inhibitora primjenjuju se u transplantaciji preko dva desetljeća. Od uvođenja su se primjenjivali u različitim kombinacijama imunosupresiva za skupine pacijenata malog rizika od odbacivanja presatka. Primjenjivani su u različitim protokolima bez inhibitora kalcineurina, bilo od početka terapije, bilo po ukidanju CNI-a u kasnijoj fazi terapije. Primijećena je usporediva učestalost odbacivanja presatka i bolja funkcija bubrega ustanovljena mjerenjem glomerularne filtracije, u usporedbi sa standardnim CNI protokolima, ali potrebno je provesti još istraživanja kako bi se vidjela dugoročna pouzdanost ovakvog načina imunosupresije. Ukoliko se mTOR inhibitori i koriste s CNI-ima, omogućuju primjenu manjih doza CNI-a s posljedičnim smanjenjem s CNI-ima povezanih nuspojava, a bez ozbiljnog ugrožavanja ishoda po presadak (42). Koliko je za sada poznato, nemaju za posljedicu terapije nefrotoksičnost (1), odnosno nuspojave iz skupine poremećaja bubrega i mokraćnog sustava su rjeđe pri primjeni protokola koji sadrže ovu skupinu lijekova (32, 41).

Međutim, treba uzeti u obzir kako je puno manje iskustva s ovakvim protokolima u pacijenata s velikim rizikom odbacivanja presatka, a i ta su iskustva s varijabilnim ishodom. Kao moguć odraz ograničenja primjene mTOR inhibitora je i pad njihove primjene posljednjih godina te povezanost s brojnim nuspojavama (42).

Zabilježene su brojne neugodne nuspojave mTOR inhibitora vezane za kožu i sluznicu (otežano cijeljenje rane nakon transplantacije, formiranje limfokela, pojava osipa, ulceracije sluznice usne šupljine), hiperkolesterolemija, vrlo česta pojava hipertrigliceridemije te proteinurija (1, 32, 41). Među poremećajima metabolizma i prehrane osim već spomenute vrlo česte hiperlipidemije, javljaju se hiperglikemija, šećerna bolest, anoreksija, hiperuricemija, hiperkalijemija te hipomagnezijemija (32, 41). Krvne diskrazije su zabilježene, ali su rijetke i mogu se riješiti modifikacijom terapije jer su ovisne o dozi. Poremećaji krvi i limfnog sustava koji se viđaju kod drugih skupina imunosupresiva zabilježene su i u ovoj skupini: trombocitopenija, anemija, leukopenija, hemolitičko-uremijski sindrom, neutropenija, a rjeđe i pancitopenija (32, 41). Od ozbiljnijih nuspojava je osim krvnih diskrazija zabilježen pneumonitis (1).

#### **4.2. Enzimi, transporteri i ciljne molekule djelovanja lijekova koji su uključeni u farmakološke mehanizme djelovanja imunosupresiva**

U ovom dijelu rada bit će opisana svojstva i mehanizmi djelovanja te polimorfizme onih enzima, transportera i ciljnih molekula za koje je utvrđeno da imaju ulogu u varijabilnosti odgovora organizma na imunosupresive.

Uvodno, bitno je sažeti osnove: proces transformacije kroz koju lijekovi prolazi u organizmu zove se metabolizam lijeka, a reakcije do kojih dolazi služe tomu kako bi se lijek lakše izlučio iz organizma te može uključivati nekoliko reakcija, koje se uobičajeno dijele na reakcije I. i II. faze. Osnovna uloga tih reakcija je lipofilan lijek učiniti hidrofilnijim, a obzirom na to da je većina lijekova lipofilna, većina ih i prolazi kroz biotransformaciju.

Reakcije prve faze su reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize, a reakcije druge faze metabolizma uključuju konjugacijske reakcije kroz koje prolaze neki lijekovi koji, nakon što su prošli kroz reakcije I. faze, nisu dovoljno polarni da bi se mogli učinkovito izlučiti.

Reakcije prve faze velikim se dijelom u ljudskom organizmu provode putem citokroma P450 (CYP), koji uključuje porodicu enzima odgovornih za oko tri četvrtine svih reakcija metabolizma lijekova koji se pojavljuju u ljudskoj populaciji.

Od enzima putem kojih se metaboliziraju lijekovi, dominantnu ulogu imaju enzimi CYP450, potom uridin-difosfat-glukuroniltransferaze te esteraze, koji zajedno pokrivaju otprilike 95 % reakcija u metabolizmu lijekova (21). Dakle, svi drugi enzimi odgovorni su za metaboliziranje 5 % lijekova koji su na tržištu. Citokrom P450 su velika skupina enzima smještena u membrani endoplazmatskog retikuluma i pripadaju natporodici hemoproteina, koji pretežno kataliziraju oksidacijske reakcije, ali sudjeluju i u nekim redukcijским reakcijama (3). CYP450 su pronađeni u većini živih sustava, od bakterija do čovjeka, s više od 11500 gena prijavljenih do danas, a svrstani su u porodice i potporodice sukladno homologiji njihovog slijeda aminokiselina (21).

Nomenklatura za citokrom P450 (CYP) koristi oznaku „CYP“ koji označava natporodicu, slijedi broj koji označava porodicu gena (da bi gen bio u istoj porodici, njegov amino-kiselinski slijed trebao bi biti identičan u više od 40 %), potom slijedi slovo koje označava potporodicu (preko 55 % identične sekvence aminokiselina) te broj gena koji označava izoformu. Isti broj gena, tj. ista izoforma znači da geni imaju

istu funkciju i visoko su očuvani. Sekvence ljudskog genoma otkrile su oko 107 humanih P450 gena: 59 aktivnih i oko 48 pseudogena (31). Većina enzima metabolizma u jetri su polimorfni. Smatra se da je gen polimorfan kada je učestalost varijante alela u normalnoj populaciji najmanje 1 % (43).

Da bi se smanjili neželjeni događaji i "personaliziralo" pacijentovo liječenje, uloženi su naponi da se otkrije status metabolizma lijeka za pojedinog pacijenta. Ovo zahtijeva poznavanje fenotipa subjekta u vrijeme kliničke obrade. Kako su takva ispitivanja kompleksna, dugotrajna i skupa, zalaže se za jednostavniji pristup putem genotipizacije. Međutim, korelacija između genotipa i fenotipa je kompleksna i ponekad nije dobra. U 50 % slučajeva bilo je pogrešnih predviđanja pa se predviđanja genotipa ne mogu uvijek pouzdano primijeniti bez određivanja fenotipa. Faktori koji utječu na tako veliki odklon fenotipa od genotipa su „gene splicing“ (spajanje gena), SNP, epigenetika i mikro RNA, regulacija transkripcije i višestruke kopije gena (44).

Osim ovih metaboličkih reakcija, važni za ponašanje lijeka u organizmu i utjecaj na isti mogu su i procesi transportiranja lijeka kroz različite membrane, tj. barijere u organizmu.

#### 4.2.1. Enzimi

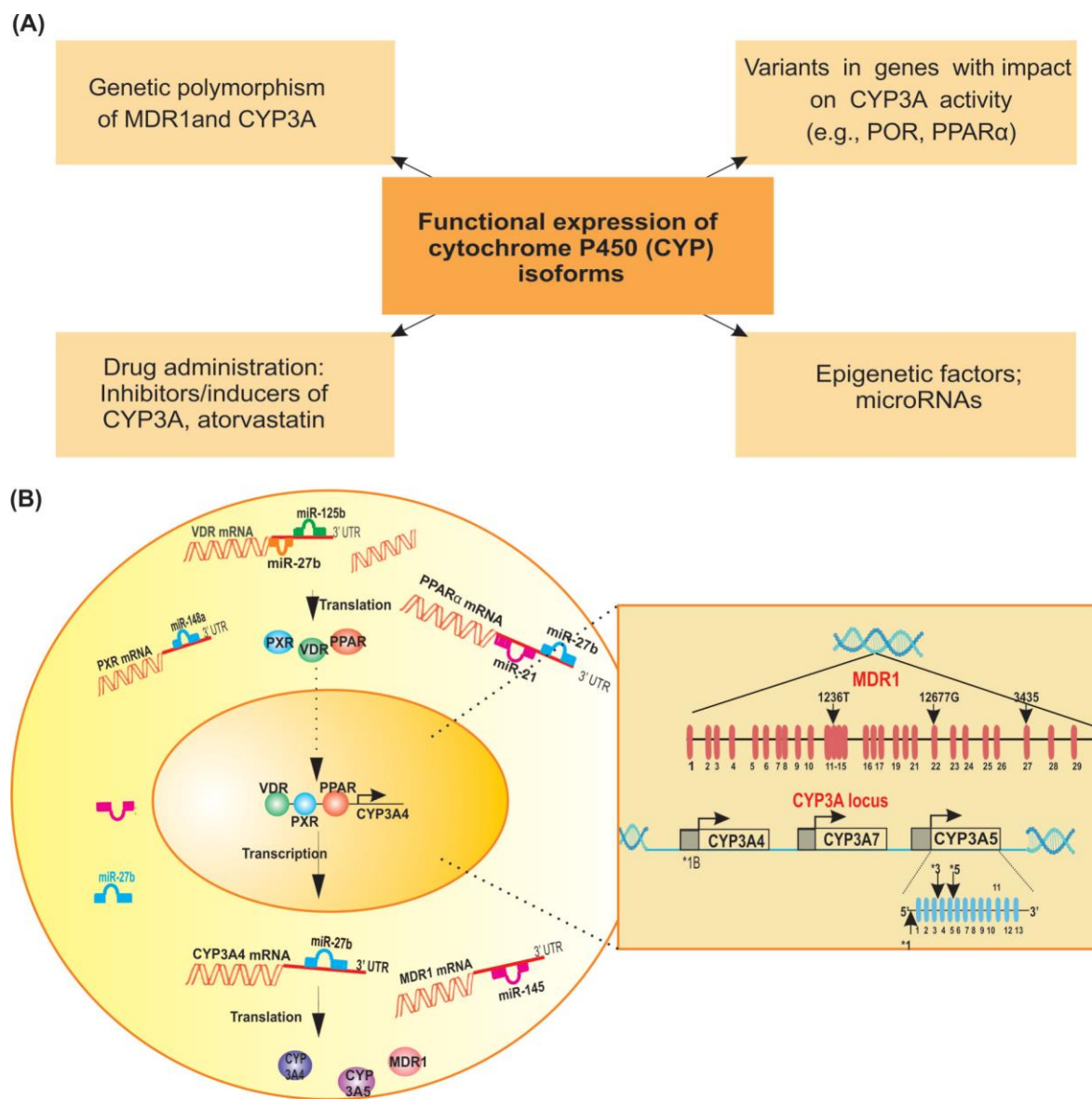
##### 4.2.1.1. CYP3A4/A5

CYP3A4 je najzastupljeniji enzim citokroma P450 u ljudskim hepatocitima, a potporodica CYP3A kod ljudi sastoji se od nekoliko enzima i čini ~ 28 – 40 % ukupnog jetrenog P450 sadržaja. Porodica CYP3A klinički je vrlo važna jer se pokazalo da katalizira metaboliziranje velikog broja strukturno različitih molekula iz gotovo svake terapijske skupine lijekova. Procjenjuje se da CYP3A podskupina sudjeluje u metabolizmu 35 – 50 % svih lijekova na tržištu. CYP3A4 je glavni humani jetreni enzim CYP3A potporodice, dok je CYP3A5 prisutan samo u ~ 20 % ljudske jetre. CYP3A4 i 3A5 također su izraženi u želucu, plućima, tankom crijevu i bubrežnom tkivu. Supstrati enzima CYP3A4 kreću se od malih (etilen, MW = 28) do vrlo velikih (ciklosporin, MW = 1201) molekula. Većina supstrata CYP3A4 također se metabolizira putem CYP3A5 (36).

Iako su identificirani mnogi polimorfizmi pojedinačnih nukleotida unutar lokusa *CYP3A*, studije genetičke povezanosti do sada nisu uspjele objasniti veliki dio fenotipske varijabilnosti pa jedno istraživanje koristi izraz „nestabilna nasljednost“ da bi opisala taj fenomen. Korišten je da bi označio jaz između očekivanog i poznatog genetičkog doprinosa, primjerice za složene bolesti (45). Za neke enzime poput CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 genski čimbenici određuju glavninu aktivnosti i genotipizacija može biti korisna u

predviđanju interakcija. U slučaju drugih enzima, poput CYP3A4 i CYP1A2, za aktivnost su važniji utjecaji okoliša i prehrane uz manji doprinos genetike. U tim slučajevima fenotipizacija pruža bolji uvid u potencijal interakcija putem navedenih enzima u odnosu na genotipizaciju (4).

Prema nekim izvorima, u bjelačkoj populaciji u samo otprilike 10 % ispitanika postoji ekspresija i aktivnost enzima CYP3A5. Ta populacija treba značajno drugačije doze lijekova koji su supstrati CYP3A5, što će detaljnije biti opisano u dijelu 4.3.3.1. (46). Složenost različitih utjecaja na ekspresiju CYP3A4 prikazana je na slici 7.



Slika 7: Faktori koji utječu na ekspresiju i aktivnost CYP3A4/5 i protein višestruke rezistencije (multirezistencije) tipa 1 (engl. *Multi-Drug Resistance protein*, MDR1). A) Genski polimorfizam *MDR1*, *CYP3A* i nekih drugih gena s neizravnim utjecajem na aktivnost CYP3A, epigenetski mehanizmi posebice miRNA-e skupa s, primjerice, interakcijama lijekova uključeni su u varijabilnu ekspresiju enzima CYP. B) MDR1 i CYP3A4/5 polimorfizmi gena i njihova mRNA regulacija od strane miRNA su naznačeni, a eksoni gena MDR1 istaknuti. Također su prikazani: P450 reduktaze - POR (engl. *P450 oxidoreductase*), PPAR-alfa (engl. *nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), VDR (engl. *vitamin D receptor*) (35).

#### 4.2.1.2. UDP-glukuroniltransferaze (UGT)

UDP-glukuroniltransferaze (engl. *uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*, UGT) su jedna od najčešćih porodica enzima uključenih u reakcije II. faze metabolizma. Glukuronidacija je vrlo važan metabolički put kataliziran ovom porodicom enzima. Uz lijekove, ti enzimi kataliziraju i metabolizam brojnih endogenih tvari različitih struktura poput bilirubina, steroidnih hormona, vitamina topljivih u mastima i biogenih amina (4). Geni koji kodiraju enzime UGT imaju različite izoforme podijeljene u dvije porodice, UGT1 i UGT2 (3). Vrijednosti serumskog bilirubina ovise o izoformama UGT1, a izoforma UGT1A1 je glavni enzim odgovoran za konjugaciju bilirubina s glukuronskom kiselinom te se njegova nedostatna aktivnost enzima (polimorfizam *UGT1A1\*28*) očituje u nekonjugiranim hiperbilirubinemijama koje se klinički dijele na Gilbertov sindrom i Crigler-Najjarovu bolest (3).

Primjerice, mikofenolatna kiselina se u organizmu metabolizira u neaktivni metabolit putem enzima II. faze razgradnje, UDP-glukuroniltransferaze, UGT1A8, čiji polimorfizmi su u korelaciji sa sljedećim nuspojavama: proljev, poremećaji krvne slike i infekcije. Genetičkom analizom su otkriveni polimorfizmi gena koji mogu utjecati na kliničke ishode u pacijenata na terapiji mofetilmikofenolatom, o čemu će više riječi biti u dijelu 4.3.1.4. (47).

#### 4.2.1.3. Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT)

Istraživanjima enzima TPMT dokazano je da brojni polimorfizmi u kodirajućim regijama, intronima i promotorskoj regiji odgovaraju smanjenoj ili odsutnoj aktivnosti enzima TPMT.

#### 4.2.2. Prijenosnici

Membranski transporteri ili prijenosnici su proteini koji kontroliraju ulazak važnih nutrijenata i iona u stanicu, a izbacuju stanični otpad i toksine iz okoliša (48). Preko mehanizama unosa i izbacivanja membranski prijenosnici kontroliraju izloženost stanice kemijskim karcinogenima i toksinima iz okoliša te lijekovima. Ovisno o smjeru prijenosa preko stanične membrane prijenosnici se dijele na prijenosnike koji unose (engl. *influx*) ili izbacuju (engl. *efflux*) iz stanice. Razlikuju se i prema načinu prijenosa ovisno o



utrošku energije jer mogu prenositi supstrate aktivnim putem (uz utrošak energije) ili olakšanim putem (bez utroška energije). U prijenosu lijekova važnu ulogu imaju dvije glavne natporodice membranskih prijenosnika: ABC (engl. *ATP Binding Cassette*) i SLC (engl. *Solute Carrier*) prijenosnici (19).

Ukoliko govorimo o jetri, prijenosnici OATP izraženi su na bazolateralnoj membrani stanice (sinusoidna strana), a amfifilni anioni i njihovi konjugati koje oni tu preuzmu, mogu se izlučiti u žuč putem proteina povezanog s višestrukom rezistencijom tipa 2 (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*, MRP2) smještenog na apikalnoj membrani (29). Ukoliko se radi o tankom crijevu, apikalna je membrana ona okrenuta lumenu crijeva.

#### 4.2.2.1. ABC natporodica: ABCB1, ABCC1, ABCC2

Većina membranskih proteina ABC primarni su aktivni prijenosnici, ATP hidrolaze, i aktivno crpe svoje supstrate preko membrane iz stanice u izvanstanični medij, često protiv difuzijskog gradijenta. Poznato je 49 gena koji kodiraju proteine ABC, grupirane u sedam podrazreda i porodica (ABCA do ABCG) (4).

Najpoznatiji membranski prijenosnik u natporodici ABC je P-glikoprotein (engl. *permeability glycoprotein*, P-gp), ranije zvan i protein višestruke rezistencije (multirezistencije) tipa 1 (engl. *Multi-Drug Resistance protein*, MDR1), noviji naziv je prijenosnik natporodice (superporodica) ABC, potporodica B, član 1, kodiran genom *ABCB1* (engl. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*), a jedan je od najvažnijih prijenosnika s utjecajem na farmakokinetiku u ovom radu obrađenih imunosupresiva.

Izbacivački prijenosnici (prijenos iz stanice prema van) za različite lijekove, kao što je P-glikoprotein (P-gp, ABCB1), prvotno su opisani kao jedan od uzroka rezistencije tumora na kemoterapiju. P-glikoprotein je izražen u mnogim tkivnim barijerama kao što su crijeva, jetra, bubrezi, krvno-moždana brana, posteljica, testisi, limfociti, tumorske stanice i stvara dominantno lipofilni spoj/vezu iz unutrašnjosti stanice kroz apikalnu membranu epitelne ili endotelne stanice (4).

P-glikoprotein u gastrointestinalnom sustavu ograničava apsorpciju oralno unesenih lijekova, dok u jetri i bubrezima pomaže eliminaciju supstrata (27). Stoga je smješten na apikalnoj strani crijevnog epitela, žučnim kanalima, tubularnim stanicama bubrega, posteljici i luminalnoj površini kapilarnih endotelnih stanica u mozgu i testisima. Zbog djelovanja P-gp/MDR1 kao crpke koja izbacuje različite tvari iz stanice kako bi je zaštitila, supstrati P-gp/MDR1 znatno variraju u veličini, strukturi i funkciji pa su to: organski

kationi, ugljikohidrati, aminokiseline, neki antibiotici, makromolekule kao što su polisaharidi i proteini (4).

Ekspresija ABCB1 pokazuje velike interindividualne varijabilnosti pa su tako poznate pedeseterostruke razlike u koncentraciji P-gp u jetri, a u osnovi je znatnih interakcija lijekova.

Čini se da je polimorfizam gena koji kodira prijenosnik natporodice ABC, potporodica C, član 2 (engl. *ATP-binding cassette sub-family C member 2, ABCC2*), starijeg naziva MRP2, manjeg kliničkog značaja od onoga *ABCB1*, ali ima određeni utjecaj na metabolizam takrolimusa, o čemu će detaljnije biti riječi u dijelu 4.3.3.3. Polimorfizam *ABCC2* utječe i na farmakokinetiku mikofenolatne kiseline, o čemu će više biti riječi u dijelu 4.3.4. (35, 49).

#### 4.2.2.2. OATP

Natporodica *SLC* uključuje gene koji kodiraju proteine za olakšani prijenos, a jedan od važnijih prijenosnika kodiranih genima natporodice *SLC* je onaj iz skupine prijenosnika organskih aniona (engl. *solute carrier organic anion transporter, SLCO*) (4).

Membranski prijenosnici kodirani genima *SLCO*, polipeptidi za prijenos organskih aniona (OATP), uključeni su u unos velikih ( $MM > 450$  Da) i relativno hidrofobnih organskih aniona u stanicu. Supstrati specifični za prijenosnike OATP pokrivaju široki raspon amfipatskih organskih spojeva, uključujući soli, konjugate steroida, tiroidne hormone i različite lijekove. Dosadašnje spoznaje upućuju da ovi prijenosnici djeluju kao organski anionski izmjenjivači. Pretpostavlja se da prijenosnik OATP djeluje kao o pH-u ovisan prijenosnik u oba smjera, potaknut kiselim izvanstaničnim medijem. Raspodjela prijenosnika OATP u tkivima razlikuje se za svaku izoformu, neki su izraženi posvuda u organizmu dok su drugi izraženi samo u jednom organu. Prijenosnik OATP1A2 je izražen u bubregu, probavi i žučnom mjehuru, prijenosnici OATP1B1 i OATP1B3 nađeni su samo u jetrima, OATP2B1 ima široku raspodjelu u tkivima, a OATP4C1 se smatra specifičnim za bubreg. Raspon strukturno suprotnih spojeva koje prijenosnik OATP prepoznaje snažno nameće prisutnost brojnih mjesta vezanja supstrata, a dokazi o tome stalno se dopunjuju (4).

#### 4.2.3. Ciljne molekule djelovanja imunosupresiva

##### 4.2.3.1. IMPDH – inozin-5'-monofosfat-dehidrogenaza

Ovaj enzim dolazi u dvije izoforme, a značaj ovog enzima u imunosupresivnoj terapiji temelji se na tome što je isti ciljna molekula mikofenolatne kiseline. Ovakav mehanizam djelovanja sugerira da razina

mikofenolatne kiseline u krvi slabo predviđa učinkovitost lijeka te većina transplantacijskih centara ne provodi TDM za MPA. S druge strane, smanjenje aktivnosti enzima puno je pouzdaniji parametar. Na to upućuju neki autori koji su pronašli korelaciju između aktivnosti enzima IMPDH prije transplantacije s akutnim posttransplantacijskim odbacivanjem bubrega.

Stoga je razvijanjem testa za mjerenje aktivnosti IMPDH postignut farmakodinamički nadzor aktivnosti IMPDH, koji je teorijski bolji prediktor obzirom na praćenje razine MPA u krvi. Ipak, unatoč dostupnosti različitih sustava testiranja, neki autori drže da bi trebalo doći do reproducibilnijeg sustava testiranja ne bi li ovim putem validirana aktivnost IMPDH postala biljeg koji usmjerava liječenje s MPA (19).

### 4.3. Pregled istraživanja

4.3.1. Pregled po skupinama: utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku ili farmakodinamiku  
Iako su neki od ovih polimorfizama kroz rad već spominjani, ovim pregledom imunosupresiva cilj je detaljnije opisati sve prikupljene informacije kroz istraživanja te time ukazati na sličnosti i razlike među lijekovima obzirom na način primjene i važnost preporuka farmakogenomike.

#### 4.3.1.1. Glukokortikoidi

Farmakogenomika glukokortikoida nema mjesta u kliničkoj primjeni, iako postoji genetička podloga neočekivanog odgovora na terapiju, kao što je opisano u dijelu 4.1.1.4.

#### 4.3.1.2. Monoklonska protutijela

Preporuke za farmakogenomička testiranja nalaze se pri primjeni terapije monoklonskim protutijelima, ali ne u transplantaciji (npr. nema ih za basiliximab koji se koristi isključivo u ovoj indikaciji), nego kod nekih onkoloških skupina bolesnika te su u tom slučaju navedene u sažecima opisa svojstava lijeka. Radi se uglavnom o farmakodinamičkim, tj. na ciljno mjesto djelovanja lijeka usmjerenim testiranjima.

Primjeri su: obavezno testiranje gena za CD20 antigen (*MS4A1*, engl. *Membrane-Spanning 4-Domains Subfamily A Member 1*) prije primjene rituksimaba u terapiji odraslih bolesnika s CD20 pozitivnim difuznim B-velikostaničnim ne-Hodgkinovim limfomom; upozorenje o mogućnosti smanjenog odgovora kod CC i CT te pojačanog kod genotipa TT pronađenih pri testiranju gena *CXCL12* (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 12*) pri liječenju kronične limfocitne leukemije alemtuzumabom te upozorenje o perifernoj neuropatiji ranog (genotip GG) i kasnog (genotipovi AA i AG) nastupa pri terapiji bortezomibom, koje je moguće predvidjeti ukoliko je u bolesnika provedeno farmakogenetičko testiranje na gen *CTLA4* (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) (8). Treba napomenuti da su

neki od ovih lijekova primjenjivani ili se još uvijek primjenjuju u transplantaciji, ali se sada koriste *off-label*, primjerice rituksimab, daklizumab, alemtuzumab (8).

#### 4.3.1.3. Azatioprin

Do sada najdetaljnije istražen gen koji određuje metabolizam tiopurina je gen koji kodira TPMT, a njegove varijante utječu na farmakokinetiku i razvoj toksičnosti tiopurinskih lijekova. Dva su puta inaktivacije azatioprina, a onaj putem enzima tiopurin metiltransferaze predstavlja prevladavajući inaktivacijski put azatioprina (4).

Određivanjem genotipa može se utvrditi kombinacija alela kod bolesnika. Trenutno se zna da su 3 alela – *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* i *TPMT\*3C* – odgovorna za smanjenu razinu aktivnosti enzima TPMT u približno 95 % osoba. Približno 0,3 % (1:300) bolesnika ima dva nefunkcionalna alela (homozigoti) gena *TPMT* i krajnje slabu ili nemjerljivu aktivnost enzima (8). Približno 11 % bolesnika ima jedan nefunkcionalni alel za TPMT (heterozigoti), posljedica čega je mala ili srednja aktivnost enzima TPMT, a 89 % osoba ima normalnu aktivnost enzima TPMT s dva funkcionalna alela (27). Može postojati i skupina od približno 2 % osoba koje imaju vrlo veliku aktivnost enzima TPMT (26). Već je bilo riječi u dijelu 4.1.3.4. o ozbiljnosti mijelosupresije koja bi se javila ukoliko bi se standardne doze azatioprina primijenile kod nositelja homozigota na varijantne alele.

Testiranje se provodi kako bi se prije primjene azatioprina utvrdio genotip i/ili fenotip bolesnika.

Smjernice preporučuju intervencije u terapiji sukladno rezultatima na sljedeći način (50):

- TPMT PM (slabi metabolizator) – preporuka je odabrati zamjenski lijek ili smanjiti dozu azatioprina za 90 %, a dozu se kasnije može povećati sukladno hematološkom nadzoru i učinkovitosti lijeka;
- TPMT IM (intermedijarni metabolizator) - preporuka je odabrati zamjenski lijek ili smanjiti dozu azatioprina za 50 %, a dozu se kasnije može povećati sukladno hematološkom nadzoru i učinkovitosti lijeka.

#### 4.3.1.4. Mikofenolatna kiselina

Do sada je otkriveno nekoliko SNP-eva koji imaju utjecaj na djelovanje mikofenolata, a zahvaćaju gene *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT2B7*, *IMPDH1* i *IMPDH2* (28).

Svoj učinak antimetabolitski imunosupresiv mofetilmikofenolat ostvaruje nakon hidrolize esterazama u mikofenolat, koji inhibira enzim IMPDH, važan za sintezu DNA u stanicama, osobito u limfocitima. Postoje dva izoenzima, IMPDH1 i IMPDH2 (8, 27), različito distribuirani i inducibilni u tijelu; IMPDH2 se pretežno nalazi u limfocitima i tamo dominira nad IMPDH1 (19), dok je IMPDH1 prisutan u svim stanicama, a MPA ima 4 - 5 puta veći učinak na IMPDH2 nego na IMPDH1 (8). Dokazan je polimorfizam u djelovanju mikofenolata na ovaj enzim te se radi o primjeru farmakodinamičkog genskog polimorfizma.

Mikofenolat se u organizmu metabolizira u neaktivni metabolit putem enzima II. faze razgradnje, UDP-glukuroniltransferaze, a polimorfizmi tog enzima su u korelaciji s određenim nuspojavama, koje možemo očekivati kod bolesnika sa smanjenom aktivnošću ovog enzima. Studija koja se bavila utjecajem polimorfizama ovog enzima na nuspojave, prikazala je kako su genetičkom analizom otkriveni određeni polimorfizmi gena *UGT1A8* (-999C>T, kodon 255A>G i kodon 277G>A), koji mogu utjecati na pojavnost proljeva, poremećaja krvne slike i infekcija u pacijenata na terapiji mofetilmikofenolatom te da postoji mogućnost utjecaja na kliničke ishode (47). Polimorfizmi *UGT1A9* (-2152C>T i -275T>A), kako je prikazano u tablici 6, povezani su s vjerojatno klinički značajnom smanjenom izloženošću MPA u ranoj fazi transplantacije (19).

U istraživanju koje se bavilo povezanošću između farmakokinetike mikofenolatne kiseline (MPA) i članova natporodice polipeptida prijenosnika organskih aniona (*OATP/SLCO1B1*, *SLCO1B3* i *SLCO2B1*) te polimorfizama prijenosnika *MRP2* (*ABCC2*) u japanskih primatelja presatka, ukazano je po prvi puta na povezanost polimorfizma *SLCO1B3* i farmakokinetike MPA (29). (U ovom istraživanju svi su pacijenti bili na protokolu takrolimus, MMF i steroidi s ili bez basiliksimaba.) Polimorfizam *SLCO1B3* T334G GG (ili G699A AA), povezan je s povećanom enterohepatičkom cirkulacijom MPA u usporedbi s nositeljima alela TT jer je kod tih bolesnika ustanovljeno veće izlučivanje MPA u žuč, zbog čega se očekuje veća bioraspoloživost (izražena kroz  $AUC_{6-12}$ ), a za polimorfizam *ABCC2* C-24T (genotip -TT) pokazano je da utječe na enterohepatičko kruženje MPA u nositelja genotipa *SLCO1B3* 334GG (T334G) (29). Pokazano je i to da polimorfizam *SLCO1B3*, skupa s varijantama transportera *ABCC2* može imati veći utjecaj od polimorfizama enzima UGT na plazmatsku koncentraciju MPA, međutim, pri tumačenju ovog rezultata potrebno je imati na umu da u azijskoj populaciji nije pronađen polimorfizam *UGT1A9* (29), čiji su polimorfizmi povezani s povećanim rizikom od odbacivanja, kao što je prikazano u tablici 6 (19). Nadalje, u ispitivanoj populaciji pronađeno je da nijedan od polimorfizama *SLCO1B1*, *SLCO2B1* i *ABCC2* nije bio povezan s farmakokinetikom MPA i dijarejom (29).

U istraživanju u populaciji Hrvatske koje se bavilo ispitivanjem farmakokinetike MPA u stanju ravnoteže u ispitanika s bubrežnim presatkom u odnosu na genotip *ABCC2* donora i primatelja, uz druge kliničke kovarijable uključujući komedikaciju s ciklosporinom ili takrolimusom, pronađeno je da je farmakokinetika MPA pod značajnim utjecajem polimorfizama *ABCC2* donora i primatelja te prisutnosti ciklosporina u istodobnoj terapiji te da to može biti od kliničkog značaja (48).

Određivanje razine mikofenolatne kiseline u krvi, kao što je već navedeno u dijelu 4.2.3., nije pokazalo klinički boljitak. Većina bolesnika ne uspijeva postići ciljne vrijednosti bez obzira na povećanje doze lijeka. Ipak, izloženost mikofelnoj kiselini se s vremenom, tj. trajanjem terapije, povećava (1). To je u skladu sa sažetkom opisa svojstava lijeka gdje se navodi kako je u ranom razdoblju nakon presađivanja (< 40 dana nakon presađivanja) srednja vrijednost AUC-a MPA kod bolesnika s presađenim bubregom, srcem ili jetrom bila otprilike 30 % manja, dok je Cmax bio otprilike 40 % manji u odnosu na kasnije razdoblje nakon presađivanja (3 - 6 mjeseci nakon presađivanja) (30). Također, specifičnost farmakokinetike mikofenolata, u usporedbi s ostalim imunosupresivima za koje se rutinski određuje koncentracija u krvi metodom terapijskog praćenja lijeka, je i u tomu što se u bolesnika kod kojih nakon presađivanja dolazi do odgođene funkcije presađenog bubrega srednja vrijednost AUC-a (0 – 12 h) MPA mogla usporediti s AUC-om MPA bolesnika kod kojih nakon presađivanja nije došlo do odgođene funkcije presađenog bubrega, dok je s druge strane srednja vrijednost AUC-a (0 - 12 h) MPAG-a u plazmi bolesnika s odgođenom uspostavom funkcije bila 2 - 3 puta veća, nego kod bolesnika kod kojih nakon presađivanja nije došlo do odgođene funkcije presatka, a primijećeno je da kod bolesnika s odgođenom funkcijom presatka može doći i do kratkotrajnog povećanja slobodnog udjela i koncentracije MPA u plazmi (30).

Iz navedenoga se može zaključiti da razina lijeka u krvi neposredno prije primjene sljedeće doze ne odražava farmakodinamičke učinke mikofenolata, što potvrđuje navedeno u dijelu 4.2.3. da postoji potreba za razvojem farmakodinamičkog biljega, koji bi točnije odražavao biološki učinak lijeka (28).

#### 4.3.1.5. Inhibitori kalcineurina

Opsežno je opisan utjecaj polimorfizama na nefrotoksičnost CNI-a, a o tome će opširnije biti riječi u dijelovima 4.3.2. i 4.3.3.

Postoje dobro dokumentirane spoznaje o snažnom inhibitornom potencijalu ciklosporina ne samo prema metaboličkim enzimima faze I (CYP) i faze II (UGT), već i prema različitim transportnim proteinima

iz natporodice ABC (npr. *ABCC2* i P-glikoprotein - *ABCB1*) ili onima natporodice OATP (npr. prijenosnik kodiran genom *SLCO1B1*). Ono što se najčešće primjećuje u kliničkoj praksi je upravo sinergistički učinak interakcija lijek/lijek/gen.

Oprez je potreban i pri primjeni standardnih protokola transplantacijske terapije kod bolesnika s polimorfizmima transportera jer su ispitivanja u populaciji Hrvatske pokazala da je inhibitorski potencijal ciklosporina prema prijenosniku MRP2 snažno određen upravo varijantama gena *ABCC2* (48). Naime, protokoli koji uključuju inhibitor kalcineurina, mikofenolatnu kiselinu i glukokortikoid zastupljeni su u smjernicama i kliničkoj praksi, iako je uključivanje mTOR inhibitora sve češće.

#### 4.3.1.6. mTOR inhibitori

Farmakogenetika je vezano za mTOR inhibitore uglavnom u središtu interesa imala učinke SNP-a u genima *CYP3A4*, *CYP3A5* i *ABCB1* na farmakokinetiku ovih lijekova. Prikupljeni su podaci o utjecaju genotipa *CYP3A4* na omjer koncentracije u krvi i doze lijeka i to na način da je on veći kod divljeg genotipa (*CYP3A4*\*1/\*1) u usporedbi s nositeljima alela *CYP3A4*\*1B, koji pokazuju veću enzimsku aktivnost. S druge strane, pronađeno je da polimorfizam gena *CYP3A5* (SNP u intronu 3 (*CYP3A5*\*3)) nema jasan klinički značaj. Naime, u nositelja *CYP3A5*\*3/\*3 koji rezultira neaktivnim enzimom, pronađen je veći omjer koncentracije i doze za sirolimus u usporedbi s nositeljima *CYP3A5*\*1 koji rezultira aktivnim enzimom. Međutim, drugim studijama nije dokazan utjecaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku everolimusa, kao ni sirolimusa kada je u terapiji kombiniran s inhibitorima kalcineurina (38). Studije koje su se bavile utjecajem polimorfizma *ABCB1* (SNP 3435C>T) također su pokazale oprečne rezultate u smislu utjecaja na omjer koncentracije i doze (38).

Poligeni utjecaj vezano za farmakodinamiku mTOR inhibitora nije značajnije istraživano. Pronađeno je da postoji povezanost jednog haplotipa *mTOR*, AGAAA, sa smanjenjem razina hemoglobina u transplantiranih bolesnika po prelasku sa CNI-a na sirolimus (38).

#### 4.3.2. Mehanizam lijekom potaknute nefrotoksičnosti u transplantiranih bolesnika

Unatoč brojnim prednostima imunosupresiva koji su u posljednja četiri desetljeća, počevši s ciklosporinom ranih 1980-ih, uvođenjem u terapiju bolesnika s presađenim bubregom polučila velike uspjehe i razvoj transplantacijske medicine, ostaje nekoliko ozbiljnih izazova s kojima se zdravstveni sustavi i sami bolesnici i dalje teško nose. Jedan od njih je i kronična disfunkcija presatka ili kronična nefropatija alografta (engl. *chronic allograft dysfunction*, CAD). CAD je glavna poteškoća u dugoročnom

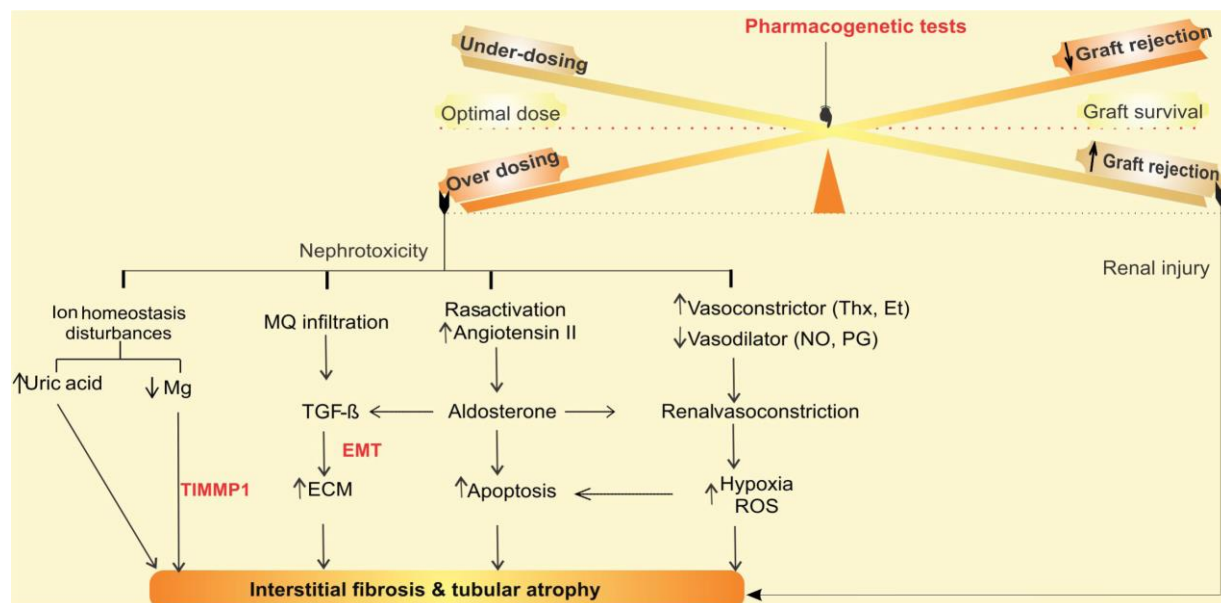
preživljenju presatka, a na nju utječe nekoliko parametara od kojih je glavni kronična inhibitorima kalcineurina posredovana nefrotoksičnost (35). Prikaz fenomena je na slici 8.

Paradoksalno je da se u sprječavanju akutnog odbacivanja transplantiranog bubrega rabe lijekovi koji u konačnici dovode do njegova propadanja, a CNI imaju akutno (uzrokovano vazokonstrikcijom aferentne arteriole) i kronično (uzrokovano nepovratnim promjenama bubrežnog parenhima s tubularnom atrofijom i intersticijskom fibrozom) nefrotoksično djelovanje (1).

Na osjetljivost bolesnika na razvoj inhibitorima kalcineurina posredovane nefrotoksičnosti utječu različiti faktori: polimorfizmi gena metaboličkih enzima (CYP3A4/3A5) ili transportera (P-gp) CNI-a, transformirajući faktor rasta  $\beta 1$  (engl. *transforming growth factor- $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$ ), kemokinski receptor CCR5 i konvertaza angiotenzina (ACE), tkivne koncentracije CNI-a i njihovih metabolita, starija dob bubrega, deplecija soli i primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova. Ovdje vidimo kako je etiologija CAD-a vrlo složena, a objašnjenje mehanizma temelji se na načelima ishemijske ozljede bubrežnog tkiva uslijed složene reakcije. Kaskada reakcija dovodi do otpuštanja proupalnih medijatora, poremećaja omjera vazokonstrikcije i vazodilatacije uslijed povećane razine endotelina, tromboksana i angiotenzina II te smanjene razine prostaciklina i dušikovog oksida. Uz to dolazi do povećane ekspresije TGF- $\beta 1$ , pojačane imunogenosti i neprikladne apoptoze. Ciklosporin povrh navedenoga dovodi do aktivacije renin-angiotenzin sustava, što dovodi do bubrežne intersticijske fibroze. Uz navedene mehanizme, dolazi do aktivacije još nekih koji u podlozi imaju poremećaj stimulacije rasta, a ulogu u procesu ima i hipoksija koju uzrokuju CNI (35).

Drugo objašnjenje naslanja se na prethodno, ali veću pažnju poklanja oksidativnom stresu. Temelji se na pretpostavci da se CNI-ima posredovana nefrotoksičnost odvija uglavnom uslijed, u prethodnom mehanizmu spomenutog, oksidativnog stresa koji je u podlozi CNI-ima posredovane nefropatije, čime je proces sličan onomu starenja. Istraživanja koje su se bavila proteinom Klotho koji ima zaštitnu ulogu u oksidativnom stresu, pokazala su kako CNI dugoročnom primjenom smanjuju ekspresiju Klotho proteina, koji je prisutan u brojnim tkivima, ali visoko izražen u tkivu bubrega (51). Koncept kronične CNI-ima posredovane nefropatije je, dakle, proces starenja koji se događa polako jer se tijekom terapije CNI-ima malo-pomalo događa ishemijska ozljeda uslijed polaganog padanja aktivnosti Klotho proteina (51).





Slika 8: Utjecaj ciklosporina na nefrotoksičnost i bubrežnu intersticijsku fibrozu i tubularnu atrofiju (engl. *interstitial fibrosis and tubular atrophy*, IF/TA). Ciklosporin doprinosi razvoju bubrežne IF/TA preko nekoliko puteva. Potiče bubrežnu fibrozu putem bubrežne vazokonstrikcije i hipoksije. Štoviše, aktivira sustav renin-angiotenzin i infiltraciju makrofaga. Izlučivanje aldosterona potaknuto angiotenzinom II sudjeluje u razvoju IF/TA putem povećane bubrežne vazokonstrikcije, ekspresije TGF- $\beta$  i apoptoze. Ciklosporin A također remeti homeostazu iona i vodi do IF/TA. Slijedi opis kratica. CsA: ciklosporin, PG: prostaglandini, NO: dušikov oksid, Thx: tromboksan, Et: endotelin, ROS: reaktivni spojevi kisika, RAS: sustav renin – angiotenzin, EMT: epitelno-mezenhimalni prijelaz, MQ: makrofag, TIMMP1: tkivni inhibitor matriksne metaloproteinaze (35).

Inhibitori kalcineurina poboljšali su kratkoročne ishode, ali kronična nefrotoksičnost ovih lijekova ostaje veliki izazov imunosupresivnih protokola koji ih uključuju (8). Neka istraživanja procjenjuju da se nefrotoksičnost kao posljedica primjene CNI-a događa kod 76-94 % primatelja presatka (35). Pri tome treba uzeti u obzir da je jednogodišnje preživljenje presatka uvođenjem CNI-a poraslo na 90 %, međutim dugogodišnje preživljenje je izazov te većina presađaka pokazuje znakove kalcineurinske nefrotoksičnosti unutar 10 godina od transplantacije (1).

Farmakogenetički parametri u ovom procesu imaju ulogu na nekoliko razina pa se pretpostavlja da osim utjecaja na enzime CYP3A4/A5, transportere (uglavnom P-gp), mogu imati utjecaj i na nefrotoksičnost i tkivnu fibrozu. Zabilježeno je da su ekspresori genotipa *CYP3A4\*1/CYP3A5\*1* značajno više osjetljivi na razvoj biopsijom potvrđene takrolimusom posredovane nefrotoksičnosti, nego oni koji nisu nositelji tih alela, tj. imaju genotip *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3*, ali s druge strane pacijenti koji su slabi metabolizatori putem enzima CYP3A4/5 imaju najveći rizik da budu izloženi suprat terapijskim koncentracijama

takrolimusa rano nakon transplantacije (35). Više o ovome biti će riječi u dijelu 4.3.3. Stoga neke studije genotipa *CYP3A5* ukazuju na da je zabilježena veća incidencija nefrotoksičnosti kod primatelja s genotipom *CYP3A5\*3/\*3* liječenih takrolimusom, a na tom su tragu i rezultati koji upućuju na to da funkcionalna ekspresija *CYP3A5* u bubregu ima zaštitnu ulogu obzirom na razvoj disfunkcije presatka, najvećim dijelom zbog toga što smanjuje izloženost bubrežnih stanica CNI-u (35).

U homozigotnih nositelja alela *CYP3A5\*3* prisustvo SNP 6986A>G u intronu 3 gena *CYP3A5* rezultira nefunkcionalnim proteinom *CYP3A5*, dok je velika ekspresija *CYP3A5* ustanovljena u homozigotnih i heterozigotnih nositelja alela divljeg tipa, tj. nukleotida 6986A (*CYP3A5\*1*), a ishod toga je da metabolizam i klirens CNI-a mogu biti pojačani kod nositelja alela *CYP3A5\*1* (19, 35).

Pri tome treba imati na umu kako pacijent posjeduje dva različita genetička entiteta pa se tako lijek koji uzima primatelj metabolizira/prenosi, osim od strane primatelja (npr. jetra, crijevo) i od strane darovatelja (presađeni bubreg). Čini se da genotip donora bubrega, u odnosu na genotip primatelja, ima važniju ulogu u razvoju nefrotoksičnosti među bolesnicima s presađenim bubregom (35).

U važne rizike povećanja nefrotoksičnosti pripadaju i interakcije s inhibitorima kalcineurina, na razini enzima *CYP3A*, niza različitih lijekova koje bolesnici s presađenim bubregom koriste, a pri tome neki, iako povećavaju koncentraciju CNI-a, ujedno mogu imati i zaštitnu ulogu, kao npr. blokatori kalcijevih kanala koji mogu smanjiti vazokonstrukciju uzrokovanu inhibitorom kalcineurina (1).

Dio rješenja problema nefrotoksičnosti počeo se pojavljivati sve većim uključivanjem novije skupine lijekova u posttransplantacijske protokole, mTOR inhibitora, kao što je već ranije navedeno. Uvođenje ove skupine lijekova u transplantaciju solidnih organa imalo je pozitivan učinak na bubrežnu funkciju, uglavnom posljedično smanjenju udjela CNI-a u terapiji. U pacijenata s kroničnom disfunkcijom presatka, stanja u kojemu najmanje 3 - 6 mjeseci poslije transplantacije dolazi do funkcionalnog i anatomskeg propadanja bubrega, povlačenje CNI-a i njihova zamjena mTOR inhibitorima dovelo je do boljeg preživljenja presatka, a pronađen je i protein čiju ekspresiju unutar presađenog bubrega smanjuju i time ostvaruju povoljan učinak na renalnu fibrozu; radi se o *α-smooth muscle actin* (*α-SMA*) (38).

#### 4.3.3. Farmakogenetika takrolimusa

Biotransformacija takrolimusa odvija se uglavnom putem enzima CYP3A5 i CYP3A4, a budući da se primarno metabolizira putem CYP3A5 (8, 19, 52), ovaj polimorfizam ima značajan utjecaj na terapiju. Osim enzima, na bioraspoloživost takrolimusa utjecaj pokazuju i transporteri ABCB1 i ABCC2.

##### 4.3.3.1. Polimorfizam CYP3A5 i takrolimus

Unutar potporodice CYP3A relevantna su prethodno spomenuta dva enzima, CYP3A4 i CYP3A5 koji imaju visok stupanj sekvencijske homologije i stoga često preklapanje supstrata. Razlika među njima je značajna; dok su CYP3A4 slabi metabolizatori rijetki, odsustvo CYP3A5 je norma u mnogim populacijama. Osobe kod kojih postoji ekspresija CYP3A5 su ekstenzivni (homozigoti za funkcionalni alel) i intermedijarni (heterozigoti za funkcionalni alel) metabolizatori, a osobe kod kojih nema ekspresije CYP3A5 su slabi metabolizatori.

Razlika obzirom na ekspresiju CYP3A5 postoji među rasama. Odsustvo ekspresije CYP3A5 norma je u bjelačkoj populaciji – postoje podaci da je 80-85 % homozigotna za CYP3A5\*3 – dok je u populaciji koja je porijeklom bliže ekvatoru ekspresija CYP3A5 češća. Općenito, tipično je i za druge CYP enzime, a ne samo za CYP3A4, da je ekstenzivni metabolizator normalan i podrazumijeva uobičajeno doziranje, dok je za CYP3A5 i takrolimus tipično da je slabi metabolizator normalan/češći. Primjeri diplotipova povezani s vjerojatnim fenotipom prikazani su u tablici 1. Prema ovdje prikazanim smjernicama CPIC-a, koje se redovito (periodički) ažuriraju na stranicama „Pharmacogenomics Knowledgebase“, uputa o doziranju je slijedeća: CYP3A5\*1/\*1 i CYP3A5\*1/\*3 zahtijevaju 1,5-2 puta veću dozu, u odnosu na slabe metabolizatore, tzv. nonekspresore CYP3A5\*3/\*3 (tablica 2) (46). Potrebno je naglasiti da preporuke o doziranju imunosupresivnih lijekova koje se navode, nisu uključene u sažetak opisa svojstava lijeka (34).

Tablica 1: Predviđanje metaboličkih fenotipova temeljem CYP3A5 diplotipova (46)

| Vjerojatni CYP3A5 fenotip                       | Genotipovi  | Primjeri diplotipova <sup>a</sup>        |
|---|---|--|
| Ekstenzivni metabolizator (CYP3A5 ekspresor)    | Osoba je nositelj dva funkcionalna alela                              | *1/*1                                    |
| Intermedijarni metabolizator (CYP3A5 ekspresor) | Osoba je nositelj jednog funkcionalnog i jednog nefunkcionalnog alela | *1/*3, *1/*6, *1/*7                      |
| Slabi metabolizator (CYP3A5 nonekspresor)       | Osoba je nositelj dva nefunkcionalna alela                            | *3/*3, *6/*6, *7/*7, *3/*6, *3/*7, *6/*7 |

*Objašnjenje:* <sup>a</sup>Mogu se naći dodatne rijetke varijante, poput *CYP3A5*\*2, \*8 i \*9, koje su nepoznatog funkcionalnog značaja. Međutim, ako je prisutna kopija \*1, očekivani fenotip bi bio intermedijarni metabolizator.

Obzirom da je kroz ovaj rad nekoliko puta istaknuto kako je terapijsko praćenje lijeka u primjeni imunosupresiva norma – preporuka se nalazi u smjernicama te je navedena u dokumentaciji o lijeku – zanimljivi su slijedeći zaključci preneseni u smjernicama CPIC-a: Iako se doziranje takrolimusa rutinski usmjerava putem TDM-a, ukoliko bolesnik ima rezultat testiranja genotipa *CYP3A5*, njime vođenim doziranjem može se brže nakon transplantacije dostići ciljne koncentracije takrolimusa u krvi, čak i kada se primjenjuje TDM titracija (46). Brže postizanje ciljnih koncentracija može potencijalno umanjiti rizik odbacivanja presatka uslijed premale ili toksičnosti uslijed prevelike izloženosti lijeku.

Ipak, ovakve rezultate treba dodatno potvrditi te su stoga potrebna prospektivna klinička ispitivanja kako bi se utvrdilo da li genotipom *CYP3A5* usmjeravana doziranja poboljšavaju kliničke ishode. U smjernicama se oprezno pristupa ideji zamjenjivanja terapijskog praćenja lijeka genotipizacijom *CYP3A5*, tj. izražava se sumnja u mogućnost takve zamjene u budućnosti zbog toga što drugi faktori (poput demografskih, interakcija lijek-lijek, genetičkih varijacija koje bi utjecale na farmakodinamiku takrolimusa) također mogu utjecati na doziranje takrolimusa. Uz to se još navodi kako s ovim, kao i s bilo kojim drugim genetičkim testom, postoji rizik pogrešne interpretacije rezultata genotipizacije, a u obzir treba uzeti i rizik od greške pri samoj genotipizaciji (46). Obzirom da je takrolimus trenutno jedini imunosupresiv za kojega postoje preporuke početne doze temeljene na *CYP3A5* fenotipu, niže navedena tablica 2 prenesena je iz smjernica CPIC-a.

Tablica 2: preporuke doziranja temeljene na CYP3A5 fenotipu (46)

| <b>CYP3A5 fenotip<sup>a</sup></b>               | <b>Implikacije za određivanje takrolimusa</b>  | <b>Terapijske preporuke<sup>b</sup></b>  | <b>Klasifikacija preporuke<sup>c</sup></b> |
|---|--|--|--|
| Ekstenzivni metabolizator (CYP3A5 ekspresor)    | Manje "trough" koncentracije takrolimusa prilagođene dozi i umanjena vjerojatnost postizanja ciljnih koncentracija takrolimusa             | Povećajte početnu dozu 1,5-2 puta preporučene početne doze. <sup>d</sup> Ukupna početna doza ne bi trebala prijeći 0,3 mg/kg/dan. Primijenite terapijsko praćenje lijeka kako biste proveli prilagodbe doze. | Snažna                                     |
| Intermedijarni metabolizator (CYP3A5 ekspresor) | Manje "trough" koncentracije takrolimusa prilagođene dozi i umanjena vjerojatnost postizanja ciljnih koncentracija takrolimusa             | Povećajte početnu dozu 1,5-2 puta preporučene početne doze. <sup>d</sup> Ukupna početna doza ne bi trebala prijeći 0,3 mg/kg/dan. Primijenite terapijsko praćenje lijeka kako biste proveli prilagodbe doze. | Snažna                                     |
| Slabi metabolizator (CYP3A5 nonekspresor)       | Veće („normalne“) "trough" koncentracije takrolimusa prilagođene dozi i povećana vjerojatnost postizanja ciljnih koncentracija takrolimusa | Započnite terapiju standardnom preporučenom dozom. Primijenite terapijsko praćenje lijeka kako biste proveli prilagodbe doze.  | Snažna                                     |

**Objašnjenje:**

<sup>a</sup>Uobičajeno bi, kada se radi o drugim CYP enzimima, ekstenzivni metabolizator bio klasificiran kao "normalan" metabolizator te se stoga doza lijeka ne bi mijenjala temeljem pacijentovog genotipa. Međutim, u slučaju CYP3A5 i takrolimusa, CYP3A5 ekspresor (npr. CYP3A5 ekstenzivni ili intermedijarni metabolizator) bi trebali veću početnu dozu, a CYP3A5 nonekspresor (slabi metabolizator) bi trebao standardnu preporučenu početnu dozu.

<sup>b</sup>Ova preporuka uključuje primjenu takrolimusa u bolesnika s presađenim bubregom, srcem, plućima i hematopoetskim matičnim stanicama te bolesnika s presađenom jetrom ukoliko su genotipovi davatelja i primatelja identični.

<sup>c</sup>Schema ocjenjivanja opisana je u dodatnim podacima koji su mrežno dostupni.

<sup>d</sup>Dalje prilagođavanje doze ili odabir zamjenske terapije može biti neophodno zbog drugih kliničkih faktora, kao što su interakcije lijekova ili jetrena funkcija.

#### 4.3.3.2. Polimorfizam CYP3A4 i takrolimus

Osim polimorfizma CYP3A5, za koji je izrađena smjernica za doziranje, pronađen je utjecaj točno određenog SNP-a CYP3A4 na metabolizam takrolimusa, a radi se o polimorfizmu CYP3A4\*1B. Naime, meta-analizom iz 2015. godine nađeno je da taj polimorfizam utječe na doziranje i omjer „trough“ koncentracije/tjelesnom težinom korigirane dnevne doze takrolimusa unutar prve godine nakon presađivanja bubrega, posebice u Europljana bijele rase (53). Naime, u usporedbi s genotipom CYP3A4\*1/\*1, kod polimorfizma CYP3A4\*1B bila je potrebna veća tjelesnom težinom korigirana dnevna doza. Osim toga, istaknuto je kako bi se ovaj polimorfizam trebalo uzeti u obzir pri određivanju početne doze takrolimusa, a također i pri prilagođavanju doze održavanja, što može biti od pomoći u postizanju ciljnih koncentracija u kraćem vremenu i umanjiti fluktuacije razine takrolimusa u krvi (53). Imajući ovo u vidu bitno je osvrnuti se na već spomenutu kritičnu ulogu početnog razdoblja, tj. prva dva tjedna, po presađivanju bubrega na preživljenje presatka.

Drugi, relativno čest SNP (rs35599367, 3 % – 8 % MAF (engl. *minor allele frequency* - učestalost minornog alela), koji može promijeniti hepaticku ekspresiju enzima CYP3A4 za 2 – 6 puta, za koji je potvrđen utjecaj na doziranje imunosupresivnih lijekova je CYP3A4\*22 (4). Spomenuti SNP umanjuje aktivnost CYP3A4 te je potrebno smanjiti dozu takrolimusa kako bi se izbjegla izloženost bolesnika suprat terapijskim razinama lijeka (19).

Tako se na PharmGKB testiranje na CYP3A5\*3 i CYP3A4\*22 alele preporučuje kod bolesnika kandidata za transplantaciju bubrega, srca i pluća, a to potvrđuje i RNP Gx (fra. *Réseau national de pharmacogénétique*), Francuska nacionalna mreža za farmakogenetiku.

Zanimljiva je mogućnost predviđanja fenotipa temeljem dostupnih genotipova CYP3A4 i CYP3A5. Iako genotip CYP3A5 ima snažan utjecaj na metabolizam takrolimusa, vidljivo je da CYP3A4\*22 SNP može promijeniti fenotip, kako je prikazano u tablici 3 (54).

Tablica 3: Prediktivni fenotip CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4*\*22 i *CYP3A5*\*3 (54)

| Fenotip CYP3A | Genotip <i>CYP3A4</i> *22 | Genotip <i>CYP3A5</i> *3 | Bjelačka populacija* | Azijatska populacija* | Afrička populacija* |
|---------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| PM            | *1/*22                    | *3/*3                    | 8                    | -                     | -                   |
|               | *22/*22                   | *3/*3                    |                      |                       |                     |
| IM            | *1/*1                     | *3/*3                    | 72                   | 50                    | 10                  |
|               | *1/*22                    | *1/*3                    | 2                    | -                     | -                   |
|               | *1/*22                    | *1/*1                    |                      |                       |                     |
|               | *22/*22                   | *1/*1                    |                      |                       |                     |
| NM            | *1/*1                     | *1/*1                    | 18                   | 50                    | 90                  |
|               | *1/*1                     | *1/*3                    |                      |                       |                     |

*Objašnjenje:* PM – slabi metabolizator, IM – intermedijarni metabolizator, NM – normalni metabolizator; \*učestalosti *CYP3A4*\*22 i *CYP3A5*\*3 u bijeloj, azijskoj i afričkoj populaciji prema 1000 Genomes database (<http://www.1000genomes.org/>).

#### 4.3.3.3. Polimorfizmi transportera i takrolimus

U konačnici, za bioraspodjelu takrolimusa važan je i P-gp, stoga se očekuje njegova smanjena sinteza/aktivnost uslijed genske promjene na *ABCB1* (*MDR1*), što rezultira smanjenim izbacivanjem takrolimusa u gastrointestinalni lumen, a to znači da bi osobe sa smanjenom aktivnošću izbacivačkih prijenosnika trebale manje doze za postizanje ciljnih koncentracija (55). Istraživanja su se dosta bavila sljedećim polimorfizmima *MDR1*: 1236C>T, *MDR1* 2677G>T/A i *MDR1* 3435C>T. U nekima od studija pronađeno je da je kod *MDR1* 2677 G>T/A homozigota bila potrebna manja prema tjelesnoj težini prilagođena dnevna doza takrolimusa i da su imali veću dozi prilagođenu koncentraciju u krvi, nego što je slučaj kod nositelja divljeg tipa, dok u drugim studijama nije primijećena takva razlika za takrolimus i polimorfizam *MDR1* 2677G > T/A te se ispostavilo kako je to bila posljedica dizajna studije, tj. načina raspodjele pacijenata u skupine pa je nakon ponovljenog istraživanja s drugačijim dizajnom pronađeno kako ipak nema potrebe za korekcijom doze u nositelja *MDR1* 2677G > T/A (56).

Kao što je već navedeno u dijelu 4.2.2., značaj za metabolizam takrolimusa ima i polimorfizam *ABCC2* te su primatelji s velikom aktivnošću prijenosnika MRP2 (*ABCC2* H2/H2 i H1/H2) pokazali značajno smanjenje razine takrolimusa (35). Pri tome treba imati na umu da je farmakokinetika ovog lijeka opisana putem modela dva odjeljka te ekspresori CYP3A5 i velika aktivnost MRP2 značajno utječu na nju. S druge strane, smanjena ekspresija P-gp-a (*MDR1*) povezana je sa

znakovima inhibitorima kalcineurina posredovane toksičnosti (35).

#### 4.3.4. Farmakogenomika i prijenosnici

Kao što je već navedeno u dijelu 4.2.2., ukoliko se govori o jetri, prijenosnici OATP izraženi su na bazolateralnoj membrani stanice, a izbacivački prijenosnici smješteni su na apikalnoj membrani žučnih kanalića, dok su, ukoliko se radi o tankom crijevu na apikalnoj (okrenuta lumenu crijeva) i bazolateralnoj membrani, smješteni i unosni i izbacivački prijenosnici. Zanimljivo je da unosni i izbacivački prijenosnici u enterocitima imaju ulogu u apsorpciji, ali je manje toga poznato o njihovom specifičnom utjecaju na farmakokinetičke parametre, što se djelomično može protumačiti činjenicom da će se gastrointestinalni i hepatički metabolizam fenotipski ponašati na isti način jer je DNA ista kod enterocita i hepatocita, s iznimkom bolesnika kojemu je transplantirana jetra (55). Ipak, bitno je imati na umu dokaze koji upućuju na to da, primjerice, metabolizam takrolimusa u tankom crijevu značajno doprinosi njegovoj bioraspoloživosti (53). Radi preglednosti je smještaj prijenosnika u enterocitima, odnosno hepatocitima, prikazan u tablicama 4 i 5.

Tablica 4: Primjeri nekih unosnih i izbacivačkih prijenosnika pronađenih u enterocitima prema lokaciji (apikalna ili bazolateralna strana) (55)

| Apikalna membrana |              | Bazolateralna membrana |             |
|-------------------|--------------|------------------------|-------------|
| Unos              | Izbacivanje  | Unos                   | Izbacivanje |
| PEPT1             | P-gp         | OATP3A1                | MRP1        |
| OATP2B1           | MRP2         | OATP4A1                | MRP3        |
| OCT3              | BCRP (ABCG2) | OCT1                   | MCT1        |

Tablica 5: Primjeri nekih unosnih i izbacivačkih prijenosnika pronađenih u hepatocitima prema lokaciji (apikalna ili bazolateralna strana) (4, 29)

| Apikalna membrana | Bazolateralna membrana |
|-------------------|------------------------|
| Izbacivanje       | Unos                   |
| P-gp              | OATP1B1                |
| MRP2              | OATP1B3                |
| BCRP (ABCG2)      | OATP2B1                |



Indukcija P-glikoproteina može ubrzati izlučivanje lijeka i smanjiti njegovu bioraspoloživost, a događa se i suprotno: inhibicija prijenosnika za unos dovodi do smanjene bioraspoloživosti. Ciklosporin može inhibirati prijenos putem različitih prijenosnika ABCB1, ABCC2, ABCG2. Tim mehanizmom može bitno modulirati bioraspoloživost drugih lijekova. Poznat je primjer varijabilne bioraspoloživosti mikofenolatne kiseline pri istodobnoj primjeni s ciklosporinom koja ovisi i o polimorfizmu metaboličkih enzima UGT i prijenosnih proteina, prvenstveno ABCC2 (MRP2) (4).

Među imunosupresivnim lijekovima na koje utječu polimorfizmi transportera ili lijekovi utječu na aktivnost transportera, ističe se ciklosporin, za kojega je pronađeno da mu je crijevna apsorpcija značajno povezana s ekspresijom P-gp te da ista ima veći utjecaj na farmakokinetiku u odnosu na CYP3A4, premda je ciklosporin supstrat obaju proteina (4).

O utjecaju varijacija *ABCB1* i *ABCC2* već na farmakokinetiku takrolimusa već je bilo riječi u dijelu 4.3.3.3. Postoji određeni utjecaj polimorfizama *ABCC2* na metabolizam/kinetiku mikofenolatne kiseline, koji je vezan za domete enterohepatičkog recikliranja (49) te sklonost gastrointestinalnim nuspojavama (29). U radu u kojemu je istraživana utjecaj dva jednonukleotidna polimorfizma *MRP2* (*ABCC2* -24C>T i *ABCC2* 1249G>A) donora i primatelja presatka na raspodjelu mikofenolatne kiseline, pronađena je povezanost između SNP-a *ABCC2* 1249G>A donora i povećanog klirensa MPA (uz smanjenje izloženost MPA). Također je pronađeno kako ciklosporin u terapiji značajno pojačava ovaj učinak jer inhibira *MRP2* u crijevima i jetri (SNP primatelja) te u bubregu (SNP donora) (49).

#### 4.3.5. Specifičnosti polimorfizama ciljnih molekula – farmakodinamički polimorfizmi

Kroz obradu ove teme uočava se predominantna dostupnost podataka o polimorfizmima koji imaju utjecaj na farmakokinetiku lijeka te je stoga očito kako se o eventualnoj varijabilnosti u odgovoru na lijek koja bi bila posljedica farmakodinamičkih procesa još nedovoljno zna. Općenito možemo zaključiti kako se o farmakogenetici ciljnih molekula-proteina manje zna i razumije u usporedbi s proteinima uključenim u eliminaciju lijeka iz organizma (57). Mogući su brojni razlozi za takvo stanje; od toga da farmakodinamički polimorfizmi nisu toliko zastupljeni ili rjeđe imaju takav utjecaj kao farmakokinetički, preko složenosti ili neisplativosti određivanja aktivnosti određenog receptora do nedostatka istraživanja u tom području. Međutim, kada je liječenje izuzetno skupo, a genetika ključna za ishode takvog liječenja,

kao kod primjerice Herceptina i HER2 receptora, onda je očito da genotipizacija brzo nađe svoj put do kliničke primjene.

U području imunosupresiva do sada je nedvojbeno pronađen jedan farmakodinamički polimorfizam, a radi se o prethodno već spomenutoj aktivnosti IMPDH i terapiji mikofenolatnom kiselinom. Uočena je značajna interindividualna varijabilnost u aktivnosti IMPDH u perifernim mononuklearnim stanicama. Ta varijabilnost je povezana s kliničkim ishodima, na način da kod primatelja bubrežnog presatka s malom aktivnošću IMPDH dolazi do više neželjenih ishoda pri terapiji MMF-om, dok se kod skupine pacijenata s povećanom aktivnošću IMPDH češće događa akutno odbacivanje organa (27). Drugi izvori, pak, donose drugačije rezultate vezano za utjecaj nekih polimorfizama gena *IMPDH2* na klinički ishod, kao što je vidljivo u tablici 6 (19).

Tablica 6: Polimorfizmi gena i njihov učinak na aktivnost proteina i klinički odgovor (19)

| Lijek               | Gen           | Polimorfizam <sup>a</sup> | rs broj    | Učinak na aktivnost proteina                | Klinički odgovor   |
|---------------------|---------------|---------------------------|------------|---|--|
| Mofetil-mikofenolat | <i>UGT1A9</i> | -2152C>T                  | rs17868320 | Smanjena izloženost mikofenolatnoj kiselini | Povećan rizik od odbacivanja   |
|                     |               | -275T>A                   | rs6714486  |   |  |
|                     | <i>IMPDH2</i> | 3757T>C                   | rs11706052 | Povećana aktivnost IMPDH                    | Nema utjecaja na rizik od odbacivanja. Nema povezanosti s funkcijom i preživljenjem presatka |

U jednoj farmakogenetičkoj studiji pronađeno je da je *IMPDH* tip II 3757T>C polimorfizam povezan s povećanom aktivnošću IMPDH kod MMF-om liječenih bolesnika primatelja presatka, ali taj polimorfizam objašnjava samo 8 % varijabilnosti među pacijentima i zato je malo vjerojatno da će imati značajan utjecaj na klinički ishod (19).

Izloženost mikofelnoj kiselini se s vremenom, tj. trajanjem terapije, povećava, a dosezanjem ravnotežnog stanja (engl. steady state) *IMPDH2* mRNA ekspresija može se održavati malom i učinkovito odražavati biološki odgovor neovisno u unosu MMF-a, stoga neki autori predlažu testiranje *IMPDH2* mRNA ekspresije kao mogući farmakodinamički biljeg (28).

#### 4.4. Klinička ispitivanja i farmakogenomika

Smjernice regulatornih tijela – EMA-e i FDA-a - u pravilu obuhvaćaju farmakogenomičke preporuke nositeljima odobrenja, tj. preporuke postupaka koje je potrebno uvrstiti u dizajn kliničkog ispitivanja kako bi se prikupile farmakogenomičke informacije za uvrštenje u dokumentaciju o lijeku.

Primjer su preporuke iz EMA-inih smjernica o genotipizaciji glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti (engl. *human leukocyte antigen, HLA*) vezano za opasne idiosinkratične reakcije jer su rijetke pa se obično ne otkrivaju u kliničkim ispitivanjima tijekom razvoja, stoga postaju očigledne tek nakon što veliki broj bolesnika nakon uvođenja lijeka u primjenu postane izložen. Tako je preventivno genotipiziranje nekih alela *HLA* obavezno za upotrebu određenih lijekova bilo u kliničkim studijama bilo u praksi, a uključuje testiranje na: genotip *HLA-B\*57:01* prije početka abakavira, genotip *HLA-B\*15:02* kod Azijata prije započinjanja liječenja karbamazepinom i genotip *HLA-B\*58:01* prije početka liječenja alopurinolom (9).

Prema prethodno navedenim preporukama možemo zaključiti da se dio poteškoća u nedostatku uključivanja farmakogenomičkih testiranja u dizajn studija nalazi i u smjernicama regulatornih tijela. Naime, ona uglavnom nisu obavezna, tj. slučajevi kada jesu su rijetki.

Ipak, podsjećaju na obavezu uvrštavanja kroz životni ciklus lijeka sakupljenih farmakogenomičkih podataka u dokumentaciju o lijeku. Obzirom da se istraživanjima dobiva sve veća količina informacija vezano za farmakogenomičke biljege od značaja za specifično liječenje lijekovima, uključujući imunosupresivne lijekove, informacije o lijeku kontinuirano se trebaju osvježavati novim informacijama pa se od nositelja odobrenja očekuje da relevantne nove informacije predoče regulatorima u svrhu uvrštavanja u dokumentaciju o lijeku. Pri tome posebnu pažnju treba obratiti pri opisivanju utjecaja varijanti gena na učinkovitost ili sigurnost lijeka te je potrebno uključiti specifične varijante gena kako bi se omogućilo kliničko odlučivanje temeljeno na tim informacijama. To znači da bi nositelji odobrenja trebali imati za cilj unijeti relevantne farmakogenomičke podatke u sažetak opisa svojstava lijeka temeljem farmakovigilancijskih podataka, rezultata novih studija ili informacija iz drugih izvora. Takva ažuriranja mogu inicirati i regulatorna tijela (9).

Iz ovdje navedenog se vidi da je prenošenje novih relevantnih farmakogenomičkih podataka u dokumentaciju o lijeku moguće bez obzira na dizajn kliničkog ispitivanja određenog lijeka, a važno je jer

ažuriranje sažetka opisa svojstava lijeka povećava dostupnost tih podataka najširem krugu zdravstvenih djelatnika te se tako povećava vjerojatnost primjene u kliničkoj praksi.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Rezultati istraživanja i klinička primjena

Trenutno rad s transplantiranim bolesnicima u svrhu individualizacije terapije obuhvaća: usklađivanje terapije od strane kliničkog farmaceuta, što je vidljivo na primjeru francuske studije (58), TDM i kontrolu terapije od strane multidisciplinarnog transplantacijskog tima. Međutim, mali broj istraživanja bavi se ovom temom kod bolesnika s transplantiranim bubregom, a to se posebno odnosi na temu usklađivanja terapije od strane multidisciplinarnog tima.

Dostignuća u području farmakogenomike u posljednjem su desetljeću značajno prenesena u kliničku praksu, ali je primjena još uvijek nedovoljna obzirom na potencijal. Također, očekivanja od farmakogenetike su početkom ovog tisućljeća bila velika, obzirom da je predviđano kako će dovesti do revolucije u farmakoterapiji jer pacijenti više neće biti liječeni jednako, nego će genetički test biti uzet u obzir prije odabira lijeka i doze, za svakog pacijenta. To se, dakako, do danas nije dogodilo (19).

Primjerice, farmakogenetička istraživanja u početku su bila usmjerena na povezanosti polimorfizama CYP450 i mnogih ozbiljnih toksičnih reakcija na lijekove, ali je kroz istraživanja GWAS ustanovljena važnost imunskog sustava za brojne ozbiljne nuspojave. Uz to idu i saznanja kako genetika nije sve, nego možda puno manje no što je očekivano, uzmemo li u obzir da za neke fenotipove negenetička komponenta može imati i preko 60 % utjecaja (6). Istraživanja fenokonverzije, kako je spomenuto u dijelu 1.3.1.2., idu tomu u prilog (10). Također je danas dostupan i značajan broj istraživanja koja se bave utjecajem epigenetskih čimbenika. Asocijacijske studije na razini cijelog epigenoma (engl. *epigenome wide association study*, EWAS) omogućuju predviđanje kako epigenomski faktori utječu na DNA i time predviđanje nekih fenotipskih odgovora.

Pristup genetičkoj analizi nije sveobuhvatan jer trenutno rutinske analize uobičajenih alelnih varijanti ne predviđaju sveukupnu interindividualnu varijabilnost farmakokinetike ili farmakodinamike lijeka (9). To se posebice odnosi na one imunosupresive koji se uglavnom metaboliziraju putem porodice enzima CYP3A, budući da uzroci varijabilnosti CYP3A4 većinom nisu genetički (5).

Daleko je manje farmakogenetički istraživana farmakodinamika imunosupresiva primjenjivanih u transplantaciji bubrega, a kod jedinog farmakodinamičkog polimorfizma koji je značajnije istraživan, onoga gena *IMPDH*, nije postignut širi konsenzus po pitanju odabira farmakogenetičkog biljega i njegove

kliničke primjene. U tom su kontekstu zanimljive spoznaje o mikofenolatnoj kiselini, kako je prikazano u dijelu 4.3.1.4., da razina u krvi neposredno prije primjene sljedeće doze ne odražava farmakodinamičke učinke mikofenolata, stoga još nisu ustanovljene smjernice za doziranje temeljene na koncentraciji lijeka koja je značajno modulirana vrlo varijabilnim genetički determiniranim aktivnostima prvenstveno enzima UGT, ali i transportnih proteina ABC i SLC.

U kontekstu kliničke primjene farmakogenomike potrebno je uzeti u obzir da, kako je navedeno u dijelu 2, neki autori drže da se argument nedostatka poboljšanja kliničkih ishoda kod pacijenata podvrgnutih farmakogenetičkom testiranju ne primjenjuje jednako na metodu TDM, za koju su dokazi slabi, a to nije spriječilo prihvaćenost metode TDM u kliničkoj praksi (19).

## 5.2. Pitanje politerapije

Specifičnost transplantiranih bolesnika je u tomu što je primjena politerapije vrlo česta, a pogledamo li kliničku praksu uviđamo kako se pri formiranju terapije ponegdje radi i o „namjernim“ interakcijama, često putem enzima CYP3A4. U iste se ulazi:

- zbog nužnosti; imunosupresija koja se postiže s dva ili više lijekova kako bi se osigurala učinkovita imunosupresija, ali i smanjile doze pojedinačnih imunosupresiva te tako umanjila vjerojatnost nastajanja nuspojava;
- zbog racionalizacije troškova; gdje se primjerice jedan antihipertenziv (diltiazem) primjenjuje kako bi se inhibicijom enzima CYP3A4 omogućila primjena manje doze imunosupresiva te tako smanjio ukupni trošak terapije;
- zbog prevencije oportunističkih infekcija, koja je vrlo važna u zaštiti pacijenta, a radi se o antifungicima i antiviroticima koji su česti inhibitori CYP3A4, što se opisuje u dijelovima 4.1.5.4. i 4.1.6.4.

Obzirom da se većina najčešće upotrebljavanih imunosupresiva metabolizira putem CYP3A4, a ekspresija bez obzira na genotip vrlo je varijabilna inter- i intraindividualno, složenost predviđanja farmakokinetike je neminovna. Naravno, osim lijek-lijek interakcija, kako je prikazano u dijelu 4.2.1.1., utjecaj na tu varijabilnost imaju i varijacije u genima koji utječu na aktivnost CYP3A, primjerice *POR*, *PPAR-alfa* te epigenetski faktori (slika 7).

### **5.3. Dostupnost farmakogenetičkih informacija i preporuke u smjernicama**

Trenutno je u bazi FDA-a 275 lijekova, a u bazi EMA-e preko 80 lijekova (odobrenih centralnim postupkom) za koje se u službenoj dokumentaciji lijeka navodi farmakogenetička informacija i/ili mogućnost testiranja (11, 59).

Pogledamo li preporuke u smjernicama KDIGO-a, kojima se stručnjaci u kliničkoj praksi često vode, nema nigdje preporuka o farmakogenomičkim testiranjima, unatoč tomu što jedan od autora smjernica navodi kako mu je farmakogenomika u transplantaciji jedan od stručnih interesa (2). Europske smjernice, koje su proučene, ali nisu bile izvor u ovom radu zbog opsežnijeg pretransplantacijskog sadržaja i izostavljene teme imunosupresivnog liječenja, također ne spominju mogućnost farmakogenomičkih testiranja, iako preporučuju obavezu testiranja u svrhu tipizacije HLA (60). Ni hrvatska udžbenička literatura, koja temeljito obrađuje područje imunosupresije u presađivanju bubrega, ne spominje mogućnosti farmakogenomičkog testiranja (1).

Teško je očekivati da se u kliničkoj praksi primjenjuje nešto čega u smjernicama stručnih društava nema, a uz to se još niti ne nalazi u sažetku opisa svojstava lijeka. Stoga ne čudi da se ravnotežna koncentracija ponekada kod pacijenata postiže tjednima te možemo zaključiti kako se kompleksnost postizanja željene koncentracije imunosupresiva u krvi uzima normalnom.

Takrolimus je trenutno jedini imunosupresiv za kojega postoje preporuke početne doze temeljene na *CYP3A5* fenotipu, kako je prikazano u dijelu 4.3.3.1. temeljem smjernica CPIC-a, ukoliko zanemarimo azatioprin čija je primjena u transplantaciji već dugi niz godina zanemariva. Ipak, u smjernicama se oprezno pristupa ideji zamjenjivanja terapijskog praćenja lijeka genotipizacijom *CYP3A5*, zbog utjecaja drugih faktora. Također, kako je navedeno u dijelu 4.3.3.2., iako genotip *CYP3A5* ima snažan utjecaj na metabolizam takrolimusa, vidljivo je da SNP *CYP3A4\*22* može promijeniti fenotip.

### **5.4. Pitanje praktičnosti i isplativosti farmakogenomičkih testiranja kroz prizmu različitih dionika u akademskoj zajednici i zdravstvenom sustavu**

Prema nekim autorima, postoje oskudni dokazi za opravdanje prospektivnih „screening“ PGx testiranja koji bi obuhvatili širu populaciju. Najpoznatiji slučaj obaveznog testiranja prije samog propisivanja lijeka je ono vezano za trastuzumab, tj. primjena terapije samo kod HER2 pozitivnih pacijentica s karcinomom dojke. Postoji dosta primjera genetičkih testiranja usmjerenih na receptore prije onkološke terapije, ali se često radi o parcijalnom slučaju, tj. samo u nekim indikacijama. Ipak, postoje indikacije da su pacijenti

s ne-divljim genotipom pod povećanim rizikom od neočekivanog odgovora na lijek te je stoga korisno stvoriti preporuke kako bi oni pacijenti koji već prethodno imaju određen genotip, imali mogućnost u kliničkoj praksi dobiti optimiziranu terapiju. Broj takvih pacijenata je ograničen i uglavnom se radi o onima koji su genotipizirani nakon neobjašnjive reakcije na uobičajeno preporučenu, tj. "normalnu" dozu nekog lijeka. Hoće li broj takvih pacijenata biti veći djelomično ovisi o opremljenosti laboratorija za genotipizaciju, ali i o padu cijene testiranja, koje se uočavaju s razvojem novih tehnologija.

Iz perspektive osiguravatelja financijski vid testiranja vrlo je bitan za odluku o farmakogenetičkom testiranju pacijenata. Europskih primjera u ovom području manjka, ali u SAD-u je trenutno situacija takva da osiguravatelji prije odluke o uključivanju ovog tipa testiranja u rutinsku praksu, žele znati što time dobivaju u odnosu na sadašnju kliničku praksu. Iako su izvori oskudni u kontekstu teme ovog rada, tj. transplantacije bubrega, daju koristan uvid u područje jer se bave isplativošću farmakogenetičkih testiranja općenito. Tema izlazi iz okvira ovog rada, ali to pitanje ne treba zanemariti jer utječe na poziciju koju metoda ima u kliničkoj praksi. Opet, relevantnih analiza u našoj zemlji se ne nalazi, ali u SAD-u se osiguravatelji vode praktičnim argumentima pri kritici preventivnog farmakogenetičkog testiranja te ih zanima sljedeće: koliko testiranja trebaju platiti kako bi spriječili jednu hospitalizaciju do koje je došlo uslijed nuspojava; zašto farmaceutska industrija nije pod većim pritiskom regulatora da takva testiranja provodi unaprijed te da se do puštanja lijeka u promet zna koliko je djelotvoran kod određenog profila pacijenata; ishodi u konkretnim slučajevima, tj. je li rezultat farmakogenetičkog testiranja utjecao na promjenu lijeka, njegove doze ili ranije otpuštanje pacijenta iz bolnice (61).

Zanimljivo je kako veliki broj osiguravatelja iz navedene studije nije bio upoznat sa smjernicama CPIC-a, ali su se nakon što su informirani o prednostima većinom izrazili vrlo pozitivno o mogućnosti testiranja. Međutim, izražavaju zabrinutost vezano za, kako su ga nazvali „sivo područje“ primjene farmakogenetičkih informacija, a to je što im dobiveni rezultati testiranja ne pružaju definitivan odgovor o utjecaju lijeka na pacijenta te navode kako uvijek postoji vjerojatnost da će pacijent odreagirati ili neće – ovisi o tome na što je test usmjeren - na lijek na određeni način bez obzira na to kako je test dizajniran (61).

S druge strane, testovi s kojima je većina osiguravatelja upoznata i uglavnom ih pokriva, su sredstva za dijagnostiku vezana za primjenu vrlo skupih lijekova za karcinome za koje ne postoje generičke opcije ili jednostavno jeftinije mogućnosti liječenja. Zbog toga teško zamišljaju, imajući na umu uvijek pitanje



isplativosti, farmakogenetičko testiranje za relativno jeftine lijekove. Točnije, brine ih nedovoljna klinička relevantnost testova ponuđenih u panelu ovog ispitivanja mišljenja osiguravatelja (61).

Smatram bitnim ovdje ukazati na to kako se vrlo često po pitanju izdvajanja sredstava u svrhu individualizacije terapije općenito, a ne samo u području farmakogenomike, uvijek susrećemo s istim problemom, a to je zanemarivanje cijene koju pacijent “plaća” dok prolazi kroz iskustvo nuspojave te eventualni troškovi zbrinjavanja posljedica nuspojave. Stavovi osiguravatelja, kako se vidi iz gore navedenih primjera, ne moraju biti u skladu s perspektivom javnozdravstvene dobiti ili dobiti za pojedinog bolesnika.

## 6. ZAKLJUČAK

Trenutno postoje ograničenja za rutinsku primjenu farmakogenomike u odabiru imunosupresivnog liječenja za bolesnike kandidate za transplantaciju bubrega. Izazov u farmakogenomici imunosupresivnih lijekova nepostojanje je dostatnih kliničkih dokaza o prednosti provedbe doziranja na temelju testova genotipizacije. Da bi se znanstvene spoznaje o važnosti polimorfizama, najčešće u obliku promjene jednog nukleotida, primijenile u individualizaciji terapije bolesnika kandidata za transplantaciju nužno je provesti dodatne kliničke studije o utjecaju farmakogenetike na preživljenje presatka ili na opće stanje pacijenta.

Do sada su smjernice za doziranje imunosupresiva ovisno o genotipu utvrđene za takrolimus, a otvaraju mogućnost da genotipom *CYP3A5* usmjeravano doziranje takrolimusa poboljša kliničke ishode jer se njime može brže nakon transplantacije dostići ciljne koncentracije takrolimusa u krvi, čak i kada se primjenjuje TDM titracija. Brže postizanje ciljnih koncentracija može potencijalno umanjiti rizik odbacivanja presatka uslijed premale ili toksičnosti uslijed prevelike izloženosti lijeku. Ovakve rezultate treba dodatno provjeriti te su stoga potrebna prospektivna klinička ispitivanja kako bi se utvrdilo da li genotipom *CYP3A5* usmjeravana doziranja poboljšavaju kliničke ishode. U smjernicama se oprezno pristupa ideji zamjenjivanja terapijskog praćenja lijeka genotipizacijom *CYP3A5*, tj. izražava se sumnja u mogućnost takve zamjene u budućnosti zbog toga što drugi faktori također mogu utjecati na doziranje takrolimusa. Pri dizajnu studije kojom bi se ocijenili klinički ishodi doziranja pri kojemu su iskorišteni podaci o genotipu *CYP3A5*, mogao bi se posebno uzeti u obzir i analizirati učinak na, kako je navedeno u dijelu 4.1.5.6., kritičnu ulogu početnog razdoblja, tj. prva dva tjedna po presađivanju bubrega, na preživljenje presatka.

Potencijal sigurnije terapije lijekovima iz skupine CNI-a je i u evaluaciji učinaka genskih polimorfizama na interindividualne razlike u odgovorima i određivanju rizika za razvoj inhibitorima kalcineurina izazvane nefrotoksičnosti i progresije kronične disfunkcije alografta te se tako može optimizirati individualna terapija s minimizacijom nuspojava.

Korisno bi bilo i sveobuhvatno istraživanje farmakogenetičkog biljega na farmakodinamičkoj razini, koji bi omogućio točnije procjene bioloških učinaka lijeka poput aktivnosti enzima IMPDH. Nadalje, tijekom rada na istraživačkim pitanjima na kojima se temelji ovaj rad, pronađen je vrlo mali broj radova koji se

bave farmakogenetičkim polimorfizmima koji se odražavaju na farmakodinamiku imunosupresiva primjenjivanih u području transplantacije te je iz toga moguće zaključiti kako to područje ostavlja prostor za dodatna istraživanja, što se vidi na primjeru mTOR inhibitora, kako je istaknuto u dijelu 4.3.1.6.

Objašnjenje za poziciju koju farmakogenomika trenutno zauzima u području imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega, kao što je već spomenuto, djelomično može biti u tomu da se većina najčešće upotrebljivanih imunosupresiva metabolizira putem enzima CYP3A4, čija je ekspresija neovisno o genotipu vrlo varijabilna inter- i intraindividualno te je složenost predviđanja farmakokinetike neminovna. Na to, između ostalog, utječu lijek-lijek interakcije, varijacije u genima koji utječu na aktivnost CYP3A te epigenetski faktori.

Razmatranje uloge farmakogenetike u personaliziranoj medicini daleko nadilazi okvir ovog rada, a na primjeru radova nekih autora prikazano je da bi opsežnije promjene organiziranja i korištenja prethodno dostupnih genetičkih podataka u sustavu doprinijele puno učinkovitijoj upotrebi. Naprimjer, povezivanje DNA biobanke s elektroničkom medicinskom evidencijom. To bi značilo da bi podaci o kompletnom genomu svakog pacijenta trebali biti učinjeni i dokumentirani samo jednom za pojedinog osiguranika te bi se onda po potrebi tijekom života koristili pri formiranju terapije. Dakle, trošak testiranja bi bio potreban samo jednom. Naravno, tumačenje i primjena podataka ne bi bila moguća bez tumačenja stručnjaka, uzimanja u obzir podataka o pacijentu, njegovom stanju i ostaloj terapiji, ali to su parametri koji se i u trenutnoj kliničkoj praksi uzimaju u obzir.

Prethodno spomenuto je također bitno i zbog toga što je iz perspektive osiguravatelja financijski aspekt vrlo bitan za odluku o farmakogenetičkom testiranju pacijenata. Stavovi osiguravatelja, kako je već raspravljeno, ne moraju biti u skladu s perspektivom javnozdravstvene dobiti ili dobiti individualnog bolesnika. Potrebno je razlučiti da li je u odabiru terapije prihvatljiv princip pokušaja i pogreške ili se vrijeme koje prođe od uvođenja terapije do postizanja optimalne terapije ipak smatra bitnim? Autori u tom kontekstu suprotstavljaju dva pristupa: "strategija testiranja prije liječenja nasuprot liječenja i praćenja" (engl. „*testing and treating strategy over treating and monitoring*“).

Potrebno je zapitati se koja je vrijednost izbjegavanja nuspojave ne samo za pojedinog pacijenta u pojedinom slučaju, nego u kontekstu adherencije u širem smislu. Naime, može se postaviti pitanje kakav je utjecaj većeg povjerenja pacijenta u ispravnost (i neškodljivost) terapije na njegov pristup terapiji te

može li se očekivati i veću suradljivost ukoliko to povjerenje postoji. Možda bi trebalo raditi procjenu isplativosti ove metode testiranja i na način da se uzme u obzir pitanje globalnih gubitaka financijskih sredstava iz zdravstvenih sustava diljem svijeta uslijed nesuradljivosti, što izlazi iz okvira ovog rada, ali literature u tom području ne manjka.

Konačno, treba se pitati je li moguće zamisliti personaliziranu medicinu i individualiziranu terapiju, bez nastojanja da se odgovor bolesnika na lijek poveže s njegovim genomom? Spomenute smjernice EMA-e tako govore o interesu farmaceutske industrije, akademske zajednice, kliničara i regulatora da se u ovoj eri personalizirane medicine usredotoče na ljudski genom kao ishodište odgovora bolesnika na terapiju (9).

Potrebno je ukazati na važnost edukacije i spremnosti prepoznavanja mogućnosti farmakogenomičkog testiranja u okviru primarne zdravstvene zaštite, a povezano s praćenjem sigurnosti lijekova, čega su važan dio magistri farmacije. Korist za bolesnike na imunosupresivnoj terapiji od angažmana magistara farmacije u području individualizacije terapije nije značajnije istražena. Osim toga, ovi bolesnici su u pravilu pod intenzivnijim nadzorom - u usporedbi s ostalim bolesnicima - u okviru sekundarne i tercijarne zdravstvene zaštite. Međutim, što opsežnija edukacija svih zdravstvenih djelatnika važna je zbog toga što novi lijekovi stalno dolaze na tržište. Povrh toga, sve veći broj lijekova prelazi u režim izdavanja bez recepta što otvara mogućnost novih interakcija, posebice u slučaju postojanja klinički značajnih polimorfizama u bolesnika. U prilog tomu ide i to što su novi lijekovi koji dolaze na tržište vrlo često biološki lijekovi, a to je trenutno skupina lijekova za koju je razvijen najveći broj farmakodinamičkih genetičkih testiranja. Moguće je i da će imunosupresivi budućnosti biti biološki lijekovi, s potrebom testiranja bolesnika na prisutnost gena i izraženost receptora koje isti kodiraju te kao takvi manje zanimljivi, ako uopće, za primjenu metode terapijskog praćenja lijeka u krvi, a puno više za onu (farmakodinamičkog) genetičkog testiranja.

Ukoliko se osvrne na trenutnu ulogu magistara farmacije u prepoznavanju važnosti sigurne primjene lijekova i sudjelovanju u farmakovigilanciji u Hrvatskoj, vidi se da je ona sve važnija jer dugi niz godina značajno raste broj prijavitelja nuspojava među ljekarnicima, uz manju stagnaciju i pad posljednjih godina. To se može tumačiti kao znak da svijest o sigurnosti lijekova među njima raste pa i očekivati od njih da su spremni educirati se i primijeniti znanja iz farmakogenomike u svom svakodnevnom radu. Na primjeru studije iz Nizozemske u kojoj su sudjelovali ljekarnici (15), a koja je opisana u dijelu 1.3.2.2.,

vidi se kako stjecanje takvih znanja - osim doprinosa sigurnoj primjeni lijekova kod bolesnika, posebice onih sa složenijim terapijama kakvi su često bolesnici s presađenim bubregom - otvara mogućnost opsežnijeg istraživanja u području farmaceutskih znanosti.

## 7. LITERATURA

1. Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. ur. Transplantacija bubrega. Medicinska naklada; 2016.
2. 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-S155. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x
3. Sertić J ur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Medicinska naklada; 2008., str.306-321.
4. Božina N, Macolić Šarinić V. ur. Farmakogenomika i farmakovigilancija – sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije-upute i smjernice. Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
5. General backround text Pharmacogenetics – CYP3A4 – DPWG guidelines; last updated: 11 October 2019. <https://www.knmp.nl/downloads/g-standaard/farmacogenetica/english-background-information/cyp3a4-english-background.pdf/view>. - pristupljeno 27.6.2020.
6. Joseph S. Bertino, Angela Kashuba, Joseph D. Ma, Uwe Fuhr, C. Lindsay DeVane. Pharmacogenomics – An Introduction and Clinical Perspective. McGraw-Hill Medical; 2013.
7. Jones, D. S. 2013. “How Personalized Medicine Became Genetic, and Racial: Werner Kalow and the Formations of Pharmacogenetics.” Journal of the History of Medicine and Allied Sciences 68, no. 1: 1– 48.
8. Pharmgkb, The Pharmacogenomics Knowledgebase, <https://www.pharmgkb.org>.
9. Guideline on good pharmacogenomic practice. EMA/CHMP/718998/2016 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 22 February 2018: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-pharmacogenomic-practice-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-pharmacogenomic-practice-first-version_en.pdf). Pristupljeno 28. veljače, 2019.

10. Shah RR, Smith RL. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(2):222-240. doi:10.1111/bcp.12441
11. US Department of Health and Human Services: Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labeling. <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>. Pristupljeno 25. svibnja 2020.
12. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-417. doi:10.1038/clpt.2012.96
13. [www.pharmvar.org](http://www.pharmvar.org). Pristupljeno 18. lipnja 2020.
14. <http://upgx.eu/guidelines/>. Pristupljeno 27.6.2020.
15. Pharmacogenomics: Making an impact on patients. Ilse Boekweg, Henk Vermaat, Inge Holsappel, Fong Sodihardjo-Yuen. Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP), The Hague, The Netherlands. Poster istraživanja 2017.-2018. pronađen pod poveznicom <https://www.knmp.nl/downloads/poster-pharmacogenomics.pdf>.
16. Wiffen P, Mitchell M, Snelling M, Stoner N. Oxford handbook of clinical pharmacy. Oxford university press, 2012.
17. <https://www.mayo.edu/research/centers-programs/center-individualized-medicine/patient-care/pharmacogenomics/pgx-profile-service>. Pristupljeno 4. srpnja 2020.
18. Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 12 December 2011: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacogenetic-methodologies-pharmacokinetic-evaluation-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacogenetic-methodologies-pharmacokinetic-evaluation-medicinal-products_en.pdf). Pristupljeno 27. veljače, 2019.
19. van Gelder T, van Schaik RH, Hesselink DA. Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(12):725-731. doi:10.1038/nrneph.2014.172

20. Guideline on key aspects for the use of pharmacogenomics in the pharmacovigilance of medicinal products. EMA/CHMP/281371/2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 24 September 2015: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-key-aspects-use-pharmacogenomics-pharmacovigilance-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-key-aspects-use-pharmacogenomics-pharmacovigilance-medicinal-products_en.pdf). Pristupljeno 27. veljače, 2019.
21. Zhang D, Surapaneni S, editors. ADME-enabling technologies in drug design and development. John Wiley & Sons, Incorporated; 2012 Apr 13., str. 545 – 565.
22. Sažetak opisa svojstava lijeka Decortin 20 mg tablete. <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Decortin-20-mg-tablete/13535/>. Pristupljeno 16. srpnja 2020.
23. Fini ME, Schwartz SG, Gao X, Jeong S, Patel N, Itakura T et al. Steroid-induced ocular hypertension/glaucoma: Focus on pharmacogenomics and implications for precision medicine. Prog Retin Eye Res. 2017;56:58-83. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.09.003
24. Gabryel M, Skrzypczak-Zielinska M, Kucharski MA, Slomski R, Dobrowolska A. The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD. Scand J Gastroenterol. 2016;51(6):654-665. doi:10.3109/00365521.2015.1132336
25. Cuzzoni E, De Iudicibus S, Franca R, Stocco G, Lucafò M, Pelin M et al. Glucocorticoid pharmacogenetics in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. Pharmacogenomics. 2015;16(14):1631-1648. doi:10.2217/pgs.15.101
26. Sažetak opisa svojstava lijeka Imuran 50 mg filmom obložene tablete. <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Imuran-50-mg-filmom-oblozene-tablete/13796/>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.
27. Warrington JS, Shaw LM. Pharmacogenetic differences and drug-drug interactions in immunosuppressive therapy. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2005;1(3):487-503. doi:10.1517/17425255.1.3.487
28. Kim S, Lee W, Chun S, Um TH, Min WK. Expression of IMPDH mRNA after mycophenolate administration in male volunteers. Biomed Res Int. 2014;2014:870209. doi:10.1155/2014/870209

29. Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T et al. Influence of *SLCO1B1*, *1B3*, *2B1* and *ABCC2* genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63(12):1161-1169. doi:10.1007/s00228-007-0380-7
30. Sažetak opisa svojstava lijeka CellCept.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000082/WC500021859.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000082/WC500021859.pdf). Pristupljeno 17. svibnja 2017.
31. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM et al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(1):100-108. doi:10.1038/clpt.2009.205
32. Sažetak opisa svojstava lijeka Rapamune.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000273/WC500046437.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000273/WC500046437.pdf). Pristupljeno 27.5.2020.
33. Sažetak opisa svojstava lijeka Sandimmun Neoral 100 mg meke kapsule.  
<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Sandimmun-Neoral-100-mg-meke-kapsule/12404/>. Pristupljeno 14. lipnja 2020.
34. Sažetak opisa svojstava lijeka Prograf 5 mg tvrde kapsule. <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Prograf-5-mg-tvrde-kapsule/12227/>. Pristupljeno 14. lipnja 2020.
35. Zununi Vahed S, Ardalani M, Samadi N, Omid Y. Pharmacogenetics and drug-induced nephrotoxicity in renal transplant recipients. *Bioimpacts* 2015;5(1):45-54
36. Zhu J, Patel T, Miller JA, Torrice CD, Aggarwal M, Sketch MR et al. Influence of Germline Genetics on Tacrolimus Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Int J Mol Sci*. 2020. Feb; 21(3): 858. Published online 2020 Jan 29. doi: 10.3390/ijms21030858
37. Izvješće o potrošnji lijekova 2014. - 2018. Halmed.  
<http://www.halmed.hr/fdsak3jnFsk1Kfa/publikacije/Potrosnja-lijekova-u-Hrvatskoj-2014-2018.pdf>. Pristupljeno 21.7.2020.



38. Granata S, Dalla Gassa A, Carraro A, Brunelli M, Stallone G, Lupo A et al. Sirolimus and Everolimus Pathway: Reviewing Candidate Genes Influencing Their Intracellular Effects. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):735. Published 2016 May 14. doi:10.3390/ijms17050735
39. Sažetak opisa svojstava lijeka Afinitor. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information_hr.pdf). Pristupljeno 21.7.2020.
40. Sažetak opisa svojstava lijeka Torisel. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/torisel-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/torisel-epar-product-information_hr.pdf). Pristupljeno 21.7.2020.
41. Sažetak opisa svojstava lijeka Certican 0,25 mg tablete. [https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Sazetak-opisa-svojstava-lijeka\\_103.pdf](https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Sazetak-opisa-svojstava-lijeka_103.pdf). Pristupljeno 27.5.2020.
42. Mekki M, Bridson JM, Sharma A Halawa A. m-TOR Inhibitors in Kidney Transplantation: A Comprehensive Review. *J Kidney.* 2017, 3:3 doi: 10.4172/2472-1220.100014
43. Božina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60(2):217-242. doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1885
44. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica.* 2020;50(1):9-18. doi:10.1080/00498254.2019.1648911
45. Kathrin Klein and Ulrich M. Zanger. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. *Front Genet.* 2013; 4: 12. Published online 2013 Feb 25. doi: 10.3389/fgene.2013.00012
46. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Therapy.* 2015 July, 98(1): 19-24. doi:10.1002/cpt.113
47. Betônico GN, Abbud-Filho M, Goloni-Bertollo EM, Alvarenga MP, Guillemette C, Villeneuve L et al. Influence of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms on mycophenolate mofetil-induced side effects in kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2008;40(3):708-710. doi:10.1016/j.transproceed.2008.03.007

48. Lalić Z. Utjecaj farmakogenetičkih varijacija transportnog proteina ABCC2 na biodostupnost mikofenolne kiseline u bolesnika s presađenim bubregom. Doktorski rad, Zagreb, 2015.
49. Božina N, Lalić Z, Nađ-Škegro S, Borić-Bilušić A, Božina T, Kaštelan Ž et al. Steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients: exploratory analysis of the effects of cyclosporine, recipients' and donors' ABCC2 gene variants, and their interactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017;73(9):1129-1140. doi:10.1007/s00228-017-2285-4
50. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H et al. Pharmacogenetics: from bench to byte-an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):662-673. doi:10.1038/clpt.2011.34
51. Luo K, Lim SW, Quan Y, Cui S, Shin YJ, Ko EJ et al. Role of Klotho in Chronic Calcineurin Inhibitor Nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1825018. Published 2019 Oct 17. doi:10.1155/2019/1825018
52. Larriba J, Imperiali N, Groppa R, Giordani C, Algranatti S, Redal MA. Pharmacogenetics of immunosuppressant polymorphism of CYP3A5 in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2010;42(1):257-259. doi:10.1016/j.transproceed.2009.11.028
53. Shi WL, Tang HL, Zhai SD. Effects of the CYP3A4\*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127995. Published 2015 Jun 3. doi:10.1371/journal.pone.0127995
54. Božina N. ur. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini – priručnik. Medicinska naklada, Zagreb, 2019., str. 147-152.
55. David F. Kisor, David R. Bright, Thomas R. Smith, Kristin Wiisanen ur.. Pharmacogenomics: Foundations, Competencies, and the Pharmacists' Patient Care Process. American Pharmacists Association Publications; 2020.
56. Li L, Li CJ, Zheng L, Zhang YJ, Jiang HX, Si-Tu B et al. Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant recipients: a population-based pharmacogenetics study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011;67(8):787-795. doi:10.1007/s00228-011-1010-y

57. Pouché L, Stojanova J, Marquet P, Picard N. New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics*. 2016.
58. Flamme-Obry F, Belaiche S, Hazzan M, Ramdan N, Noël C, Odou P et al. Impact du pharmacien clinicien sur la iatrogénie médicamenteuse chez le patient greffé rénal [Clinical pharmacist and medication reconciliation in kidney transplantation]. *Nephrol Ther*. 2018;14(2):91-98. doi:10.1016/j.nephro.2017.04.004
59. Ehmann F, Caneva L, Papaluca M. European Medicines Agency initiatives and perspectives on pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):612-7. doi: 10.1111/bcp.12319.
60. Smjernice ERBP o evaluaciji darivatelja i primatelja bubrežnog transplantata i perioperativnoj skrbi. Prijevod: Zavod za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, KBC Rijeka, Hrvatska (Original: European Renal Best Practice Transplantation Guideline Development Group. ERBP Guideline on the Management and Evaluation of the Kidney Donor and Recipient. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Aug;28 Suppl 2:ii1-71. doi: 10.1093/ndt/gft218.)
61. Keeling NJ, Rosenthal MM, West-Strum D, Patel AS, Haidar CE, Hoffman JM. Preemptive pharmacogenetic testing: exploring the knowledge and perspectives of US payers. *Genet Med*. 2019.

## 8. POPIS OZNAKA, POKRATA I SIMBOLA

ABCB1 (engl. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*) – prijenosnik natporodice ABC, potporodica B, član 1; drugi naziv P-glikoprotein

ABCC2 (engl. *ATP-binding cassette sub-family C member 2*) - prijenosnik natporodice ABC, potporodica B, član 2

BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*), (ABCG2) – protein koji uzrokuje rezistenciju raka dojke na lijekove

CAD (engl. *chronic allograft dysfunction*) - kronična disfunkcija presatka ili kronična nefropatija alografta

CNI (engl. *calcineurin inhibitor*) – inhibitori kalcineurina

CNV (engl. *copy number variation*) - varijacija broja kopije

CPIC (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) – konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike

CYP = CYP450 (engl. *Cytochrome P450*; CYPs) – natporodica enzima citokroma P450; sadrže hem kao kofaktor

CYP3A4 (engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4*) – enzim natporodice citokroma P450, porodica 3, potporodica A, član 4

CYP3A5 (engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5*) - enzim natporodice citokroma P450, porodica 3, potporodica A, član 5

DPWG (engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) - Nizozemska radna skupina za farmakogenetiku

EM (engl. *extensive metabolizer*) - ekstenzivni/brzi metabolizator

EMA (engl. *European Medicines Agency*) – Europska agencija za lijekove

EWAS (engl. *epigenome wide association study*) – cjeloepigenomska asocijacijska studija, tj. asocijacijska studija na razini cijelog epigenoma

FDA (engl. *Food and Drug Administration*) – Američka uprava za hranu i lijekove

FKBP (engl. *FK506 binding protein*) - FK506 vezujući proteini, proteini s enzimskom aktivnošću, skupina imunofilina-12 – jedan od pet tipova FKBP imunofilina, smatra glavnim posrednikom za djelovanje takrolimusa

GMP (engl. *guanosine-5'-monophosphate*) - gvanozin monofosfat

GTP (engl. *guanosine-5'-triphosphate*) - gvanozin trifosfat

GVHD (engl. *graft versus host disease*) - bolest nastala uslijed reakcije davatelja protiv primatelja

GWAS (engl. *genome wide association study*) – cjelogenomska asocijacijska studija; tj. asocijacijska studija na razini cijelog genoma

HLA (engl. *human leukocyte antigen*) - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti

IF/TA (engl. *interstitial fibrosis and tubular atrophy*) – bubrežna intersticijska fibroza i tubularna atrofija

IL (engl. *interleukins*) – interleukini, proteini signalne molekule iz skupine citokina

IL-2 – interleukin 2, citokin, luče ga T-limfociti

IL2Ra (engl. *interleukin 2 Receptor Subunit Alpha IL-2*) – segment IL-2 receptora

IM (engl. *intermediate metabolizer*) - srednje brzi metabolizator

IMP (engl. *inosine-5'-monophosphate*) - inozin-5'-monofosfat

IMPDH (engl. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*) - enzim inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza

KDIGO (engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) – neprofitna organizacija, razvija smjernice za liječenje bubrežne bolesti

MAF (engl. *minor allele frequency*) – učestalost minornog alela

MMF (engl. *mycophenolate mofetil*) - mofetilmikofenolat, prolijek, ester mikofenolatne kiseline

MPA (engl. *mycophenolic acid*) – mikofenolatna kiselina

MPAG (engl. *mycophenolic acid*) – glukuronid mikofenolatne kiseline

MDR1 (engl. *multidrug resistance protein 1*) – protein višestruke rezistencije tipa 1, stariji naziv za prijenosnik ABCB1

MRP1 (engl. *multidrug resistance-associated protein 1*) – protein povezan s višestrukom rezistencijom tipa 1, stariji naziv za prijenosnik ABCC1

MRP2 (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*) – protein povezan s višestrukom rezistencijom tipa 2, stariji naziv za prijenosnik ABCC2

mTOR (engl. *mammalian target of rapamycine*) – receptor za lijekove mTOR inhibitore nazvan prema načinu na koji je otkriven

NFAT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) - nuklearni faktor aktiviranih T-limfocita

NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) - pojačivač nuklearnog faktora kapa-lakog lanca aktiviranih B stanica

NODAT (engl. *new-onset diabetes after transplantation*) – dijabetes nastao nakon transplantacije

OATP (engl. *Organic Anion Transporting Polypeptide*) – natporodica polipeptida prijenosnika organskih aniona

PharmGKB – (engl. *Pharmacogenomics Knowledgebase*) – baza informacija iz područja farmakogenomike

PharmVar (engl. *Pharmacogene Variation Consortium*) – konzorcij za prikupljanje varijanti alela

PM (engl. *poor metabolizer*) – slabi/spori metabolizator

SNP (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*) – polimorfizam pojedinačnog nukleotida

SLCO (engl. *solute carrier organic anion transporter*) – geni koji kodiraju proteine - OATP natporodicu

TCGF (engl. *T-cell growth factor*) - čimbenik rasta T-stanica

TDM (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*) – terapijsko praćenje lijeka

TGF- $\beta$ 1 (engl. transforming growth factor- $\beta$ 1) - transformirajući faktor rasta  $\beta$ 1

TNF = TNF $\alpha$  (engl. tumor necrosis factor) – faktor nekroze tumora, stanični signalni protein (citokin)  
uključen u upalni proces akutne faze

TPMT (engl. *thiopurine S-methyltransferase*) – tiopurin metiltransferaza

UGT (engl. *uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*) – uridindifosfat-glukuroniltransferaza

UM (engl. *ultrarapid metabolizer*) – vrlo brzi metabolizator

U-PGx (*The European Research Network Pharmacogenetics /Pharmacogenomics*) – Europska istraživačka mreža za farmakogenomiku