

# Učinak farmakogenetičkih varijacija UGT1A9, CYP3A4 i CYP3A5 na farmakokinetiku mikofenolne kiseline primijenjene s ciklosporinom ili takrolimusom u bolesnika s presađenim bubregom

---

**Borić Bilušić, Ana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*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:163:870924>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-09**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Borić Bilušić

**Učinak farmakogenetičkih varijacija  
UGT1A9, CYP3A4 i CYP3A5 na  
farmakokinetiku mikofenolne kiseline  
primijenjene s ciklosporinom ili  
takrolimusom u bolesnika s presađenim  
bubregom**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Borić Bilušić

**Učinak farmakogenetičkih varijacija  
UGT1A9, CYP3A4 i CYP3A5 na  
farmakokinetiku mikofenolne kiseline  
primijenjene s ciklosporinom ili  
takrolimusom u bolesnika s presađenim  
bubregom**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Nada Božina

Prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Ana Borić Bilušić

**Effect of pharmacogenetics variants of  
the UGT1A9, CYP3A4 and CYP3A5 on  
pharmacokinetic of mycophenolic acid  
administered in commedication with  
cyclosporine or tacrolimus in renal  
transplant recipients**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Associate Professor Nada Božina, PhD

Professor Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2023

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u *Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb*, u sklopu sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nade Božina i prof. dr. sc. Karmele Barišić.

## **ZAHVALA**

Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Božina, na pruženoj podršci, poticanju, razumijevanju i strpljenju te usmjeravanju u stručnom i znanstvenom napredovanju.

Zahvaljujem komentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na usmjeravanju i svim korisnim savjetima tijekom izrade doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji za pomoć u iscrpnoj statističkoj obradi podataka i savjetima za interpretaciju rezultata.

Zahvaljujem svim kolegama iz Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb na pruženoj pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Hvala mojim roditeljima Nikici i Anti na svemu što su mi pružili u životu, hvala mojoj sestri Marini koja je uvijek tu negdje, mom Hrvoju, mojoj djeci Niki i Anti na ljubavi i podršci koju su mi pružili tijekom ostvarenja ovog cilja.

## SAŽETAK

Cilj je ovoga istraživanja ispitati utjecaj polimorfizama metaboličkih enzima UGT i CYP te ABC transportera na bioraspoloživost mikofenolne kiseline (MPA) u stanju dinamičke ravnoteže primijenjene u kombinaciji s ciklosporinom (CsA) ili takrolimusom (TAC) kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Analizirana je povezanost genske varijabilnosti metaboličkog enzima UGT1A9 te membranskog prijenosnika ABCG2 s bioraspoloživosti MPA-a. Dodatno je provedena i analiza utjecaja genske varijabilnosti metaboličkih enzima CYP3A4 i CYP3A5 s koncentracijama CsA-a i TAC-a te su procijenjeni dometi interakcije MPA-a s CsA-om i TAC-om u odnosu na ispitane varijante gena *ABCG2* u bolesnika s transplantiranim bubregom.

U istraživanje je bilo uključeno 68 bolesnika ( $n=68$ , muškarci=35, dob 16-71) na standardnom imunosupresivnom protokolu koji uključuje MPA, CsA ili TAC te kortikosteroide. Uzorci krvi uzeti su tjedan dana nakon početnoga doziranja. Uzorak krvi za određivanje ostatnih koncentracija MPA, CsA i TAC-a, uzet je u 8 h ujutro prije jutarnje doze lijeka nakon čega je uslijedila standardna jutarnja doza. Tijekom 12-satnoga intervala doziranja za MPA je uzeto 6 uzoraka krvi za određivanje koncentracije MPA. MPA je analizirana HPLC metodom, a genotipizacija polimorfizama *UGT1A9 -2152C>T* i *-275 T>A*, *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*3*, *ABCG2 c.421C>A*, *ABCC2 24 C>T* i *1249 G>A*, *ABCB1 2677G>T/A*, *3435C>T*, *1236C>T*, *SLCO1B1 c.521T>C* je provedena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR). Bolesnici homozigoti divljega tipa i nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* ujednačeni su metodom egzaktinoga uparivanja u kombinaciji s optimalnim potpunim uparivanjem u odnosu na demografske, biofarmaceutske i genetičke varijable te je procijenjen učinak varijantnoga alela (frequentist, Bayes) usporedbom omjera geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) farmakokinetičkih parametara MPA ujednačenih prema dozi u stanju dinamičke ravnoteže. Dobiveni rezultati ukazuju na značajnu povezanost varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* i farmakokinetike MPA-a. Kod stabilnih bolesnika s transplantiranim bubregom koji su ujedno i nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A*, rezultati ukazuju na povećanu bioraspoloživost MPA ( $AUC_{\tau,ss} \approx 40\%$ ) u skladu s proporcionalno smanjenim klirensom ( $CL_{T/F,ss} \approx 30\%$ ). Dodatno je uočena značajna uloga polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* u moduliranju interakcije CsA-a i TAC-a s MPA-a. Rezultati upućuju na znatno izraženiji učinak varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* u skupini bolesnika na terapiji TAC-om kod kojih je zabilježena dva puta veća bioraspoloživost MPA, manji klirens i manja brzina apsorpcije u odnosu na skupinu bolesnika na terapiji CsA-om. Rezultati nisu pokazali utjecaj ispitivanih

polimorfizama metaboličkog enzima UGT1A9 na koncentracije MPA-a. Također nije zabilježen ni značajan utjecaj polimorfizama enzima CYP3A4 i CYP3A5 na koncentracije CsA-a i TAC-a, moguće zbog malog broja bolesnika nositelja varijantnih alela.

Ključne riječi: mikofenolna kiselina, ciklosporin, takrolimus, bolesnici s transplantiranim bubregom, *ABCG2* polimorfizam



## SUMMARY

### Introduction

Mycophenolic acid (MPA) is a standard component of immunosuppressant protocols in organ transplantation administered in concomitant therapy with calcineurin inhibitors cyclosporine (CsA) and tacrolimus (TAC). MPA is selective reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, potently suppresses T and B lymphocyte proliferation. Because of low MPA oral bioavailability, on the market is available in two forms, prodrug formulation an ester of mycophenolate mofetil (MMF) and enteric coated formulation of mycophenolate sodium (EC-MPS). MPA pharmacokinetic is very complex and variable hence it is subject to therapeutic drug monitoring (TDM). Different factors interfere with exposure to MPA, including age, body mass index, renal function, changes of gut microbioma, reduced albumin levels, interactions with food, drug-drug interactions mainly with CsA/TAC, MPA formulations and genetics. MPA (around 90% of bioavailable fraction) is extensively metabolised in liver (to some extent also in the intestine and kidneys) by glucuronidation to inactive MPA-phenyl-glucuronide (MPAG) and a minor acyl-glucuronide. Enzyme UGT1A9 plays a dominant role in hepatic metabolism of MPA by minor contribution of other UGT's. The primary inactive metabolite MPAG is transported from liver cells into bile through ATP-binding cassette transporter, multidrug resistance – associate protein 2 (MRP2, encoded by gene *ABCC2*). MPAG enters gastrointestinal tract where under catalytic action of glucuronidase from intestinal flora, is hydrolyzed back to MPA (deglycuronidation) which is then recycled into blood. This process is enterohepatic recirculation pathway accounting for 10 - 61 % of total MPA exposure resulting in second increase of MPA concentration 6-12 hours after oral administration. Final elimination of MPAG and MPA (negligible amounts) is by kidney by active secretion (possibly mediated by *ABCC2*) therefore reduced renal function reduces MPAG/MPA elimination and increases total circulating MPA. The most valuable pharmacokinetic parameter for MPA exposure estimation is area under concentration-time curve (AUC) hence is recommended that for optimal effectiveness in renal transplantation, MPA AUC should be within a narrow range between 30 - 60 mg/L/h. Available studies reported CsA effect on MPA AUC, results showed lower MPA AUC and trough concentrations in patients receiving CsA compared to those co-treated with TAC. MPA is substrate of efflux transporter multidrug resistance protein 1 (MDR-1/encoded by *ABCB1*), MRP2 and influx organic anion transporter polypeptides, OATP1B1 and OATP1B3 – these transporter proteins move MPAG in and out of hepatocytes and renal tubular cells. One more efflux transporter seems to be included in MPA exposure – breast

cancer resistance protein (BCRP, *encoded by ABCG2*) important for membrane transport of numerous drug in intestine, liver and kidney. ABCG2 is expressed on enterocytes apical membrane (intestinal absorption regulation) and on hepatocytes canalicular membrane (transport from liver to bile). Since its primary function is control of intestinal absorption and secretion of drugs from liver to bile, lower ABCG2 activity due to polymorphisms or drug interactions (transporter inhibition), can significantly change the pharmacokinetics of administered drugs. Polymorphism *ABCG2 c.421C>A* is associated with ABCG2 reduced activity that consequently causes increased systemic exposure of substrates and occurrence of side effects.

The aim of the proposed research was to analyse the influence of metabolic enzyme UGTs, CYPs and ABCs transporter polymorphism on steady-state mycophenolic acid (MPA) exposure applied in commedication with cyclosporine (CsA) or tacrolimus (TAC) in renal transplant recipients. Study is limited by lower number of *UGTs* and *CYPs* variant carriers therefore the focus will be on statistically significant results for the *ABCG2 c.421C>A* polymorphism association with PK of MPA.

#### Materials and Methods

Study included consecutive adult and adolescent de novo renal transplant recipients, a total of 68 patients (n=68, male=35, age 16-71) treated with mofetilmycophenolate (n=23, 2x500 do 2x1000 mg/day) or entero-cotaed mycophenolate sodium tablets (n=45, 2x720 mg/day), CsA or TAC and corticosteroids were submitted to routine therapeutic drug monitoring (TDM) of immunosuppressants after completion of initial week of treatment. All participants provided signed informed consent for genotyping of pharmacogenes. Patients on standard immunosuppressants protocol were closely monitored over 5-7 posttransplant days. On the subsequent day (steady-states of MPA, CsA and TAC achieved), after overnight fast, blood samples for quantification of MPA, CsA and TAC were taken at 8.00 h before the next morning dose. Treatments were administered and six blood samples were taken over 12 h dosing interval (at 0.5, 1, 2, 3, 8 and 12 h post-dose) for quantification of MPA. They were included in the present analysis if: 1) clinical status was considered stable during the observed period based on (i) lack of surgical complications and signs of graft dysfunction or rejection; (ii) no severe comorbidity (cardiovascular, hepatic, metabolic, infectious, gastrointestinal); (iii) low immunological risk, (iv) stably improving renal function (serum creatinine  $\leq 300$   $\mu\text{mol/L}$  and by at least 1/3 lower than on the 1<sup>st</sup> postoperative day, with stable diuresis at around 60

mL/hour); (v) serum albumin >31 g/L; 2) were not treated with drugs that affect exposure to MPA (proton pump inhibitors, antacids, phosphate binders, oral iron, magnesium or calcium, rifampicin or any antibiotics) during the pre-study period and for the study duration.

HPLC method was used for total plasma MPA analysis, polymorphisms genotyping of *UGT1A9* (-2152C>T, -275 T>A), *CYP3A4*\*22, *CYP3A5*\*3, *ABCG2* c.421C>A, *ABCB1* 2677G>T/A, 3435C>T, 1236C>T, *SLCO1B1*c.521T>C was performed on Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR method. Whole blood CsA and TAC were determined by a validated affinity chrome-mediated immunoassay (ACMIA, Siemens, Germany), creatinine clearance was estimated (Cockroft – Gault) based on serum creatinine quantified by an enzymatic assay on an automated analyzer (Cobas c 501; Roche, Germany) validated by isotope dilution mass spectrometry. Genotyping was performed on an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, CA, USA) using a validated TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for the following polymorphisms: *ABCG2* c.421C > A (rs2231142, ID C\_15854163\_70); *ABCC2* -24C>T (rs717620, ID C\_2814642\_10) and 1249G>A (rs2273697; ID C\_22272980\_20); *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149065, ID C\_30633906\_10); *UGT2B7*-161C>T (rs7668258, ID C\_27827970\_40); *UGT1A9*-275 T>A (rs6714486, ID C\_\_27843087\_10) and -2152C>T (rs17868320, ID C\_\_34418857\_10); *ABCB1* 3435C>T (rs1045642, ID C\_\_7586657\_20) and 1236C>T (rs1128503, ID C\_\_7586662\_10); *CYP3A4*\*22 (rs35599367, ID C\_\_59013445\_10 ) and *CYP3A5*\*3 (rs776746, ID C\_\_26201809\_30). Genotyping of *ABCB1* c.2677G > T/A (rs2032582) was performed by real-time PCR genotyping on the LightCycler® instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Standard MPA steady-state measures, peak exposure ( $C_{\max,ss}$  mg/L), area under the concentration-time curve over the dosing interval of 12 hours ( $AUC_{\tau,ss}$  mg × h/L), morning and evening pre-dose concentrations ( $C_0$ ,  $C_{12}$ , mg/L), apparent total body clearance ( $CL_{T/F,ss}$  mL/min/kg) were determined by the non-compartmental method (Kinetica 4.1, InnaPhase Corp., USA). We calculated also the  $C_{\max}/AUC_{\tau,ss}$  (1/h) ratio as an indicator of the absorption rate. The analysis was based on dose-normalized concentrations (per 1000 mg) accounting for the fact that 1000 mg of MMF corresponded to 739 mg of MPA and 1000 mg of EC-MPS corresponded to 936 mg of MPA.

*ABCG2* c.421C>A wild-type homozygotes versus variants were matched by full optimal combined with exact matching method with respect to demographic, biopharmaceutic and genetic variables. Variant allele *ABCG2* c.421C>A effect was evaluated (frequentist, Bayes) by

comparing dose-adjusted steady-state MPA pharmacokinetics estimates of geometric mean ratios (GMR).

## Results

Of the 68 included patients, 12 (17.7%) were *ABCG2 c.421C>A* variant allele carriers and 56 were wt subjects. Variants in *CYP3A4* and *CYP3A5* were rare. The *UGT1A9 -275T>A* and *UGT1A9 -2152C>T* SNPs were in complete LD. Consequently, patients were considered as having a wt or a variant diplotype. The three *ABCB1* SNPs were in a strong LD (pairwise  $D'=0.85-0.95$ ,  $r^2=0.615-0.687$ ). Therefore, patients were categorized in respect to the number of variant alleles: (i) all three genotypes are wt, or one is heterozygous (none or one variant allele); (ii) two to three variant alleles (any two or all three loci are heterozygous; or one variant homozygous and one heterozygous locus); (iii) four to six variant alleles. Variant carriers prevailed regarding *UGT2B7 -161 C>T* SNP, while wt homozygotes prevailed regarding *SLC01B1 521T>C* and *ABCC2 -24C>T* and *ABCC2 1249G>A* SNPs. In respect to these SNPs, patients were categorized as variant carriers or as wt homozygotes.

Raw data (12 variant versus 56 wild-type patients) indicated around 40% higher total MPA exposure (frequentist GMR=1.45, 95% CI 1.10-1.92; Bayes=1.38, 95% CrI 1.07-1.81) and around 30% lower body clearance (frequentist GMR=0.66, 95% CI 0.48-0.90; Bayes=0.71, 95% CrI 0.53-0.95) in *ABCG2 c.421C>A* variant allele carriers than in wild-type controls. The estimates were similar in matched data (11 variant versus 43 wild-type patients) and report around 41% (frequentist) and 39% (Bayes) higher MPA exposure (frequentist GMR=1.41, 95% CI 1.11-1.79; Bayes GMR=1.39, 95% CrI 1.05-1.81) associated with proportionally lower body clearance (27% frequentist; 29% Bayes). The effect was seen in TAC co-treated patients (adjusted GMRs for exposure GMRs 1.96 (1.35-2.84) and 1.95 (1.38-2.87); for clearance 0.47 (0.32-0.68) and 0.42 (0.28-0.60)) but not in CsA co-treated patients (all GMRs around 1.0). The overall effect of variant alleles *UGT1A9 (-2152C>T, -275 T>A)*, *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*3* was not demonstrated.

## Discussion

Present data strongly suggest that the variant *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) allele increases  $AUC_{\tau,ss}$  of MPA in stable renal transplant patients (by around 40%, with a high probability that the effect is > 20%) in agreement with proportionally reduced  $CL_{T/F,ss}$ . The effect is considerably more pronounced (2-fold increase in exposure) - only when CNI is TAC and is weak or lacking in CsA co-treated patients. The estimates are consistent based on raw data

(patients free of relevant interfering comorbidities and co-medication) and in matched/adjusted analysis, where a number of further potential confounders, “classical” and pharmacogenetic, were controlled for. The present sensitivity analysis suggests: even if it existed, and even if really marked, such a (hypothetical) cumulative confounding effect would not completely explain away the observed effect since GMR for the variant *ABCG2 c.421C>A* allele vs. wild type would still be 1.20. It is justified to state that present data reasonably validly document an effect of the *ABCG2 c.421C>A* variant allele on steady-state exposure to MPA in renal transplant patients. Discrepancy between the present results and earlier studies not detecting associations between exposure to MPA and *ABCG2 c.421C>A* SNP might, at least in part, be due to methodological differences. Our patients were co-treated with CsA or TAC (and matched for CNI and CNI troughs). Neither CsA nor tacrolimus are *ABCG2* substrates, but both are *ABCG2* inhibitors, and their inhibitory effect might differ, particularly under *c.421* SNP (with reduced transporter numbers). Present analysis reasonably supports a conclusion that the observed difference in  $AUC_{\tau,ss}$  between the *ABCG2 c.421C>A* variant and wt subjects is attributable to the fact of variant allele carriage. Present study is limited by a modestly sized single-center sample, the fact that MPAG was not measured (as not a part of routine TDM), and connected to that, by no insight into possible mechanisms of the observed effect. Nevertheless, present analysis reasonably supports a conclusion that the observed difference in  $AUC_{\tau,ss}$  between the *ABCG2 c.421C>A* variant and wt subjects is attributable to the fact of variant allele carriage.

## Conclusions

Loss-of-function polymorphism *ABCG2 c.421C>A* increases steady-state MPA exposure in stable renal transplant recipients on TAC therapy. Interaction between *ABCG2 c.421A* allele and MPA exposure was observed, which seems to depend on the calcineurin inhibitor type, since the MPA exposure was twice higher in patients treated with TAC not with CsA. Study failed to demonstrate overall association of polymorphism *UGT1A9 (-2152C>T, -275 T>A)*, *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*3* with MPA exposure, probably due to small sample size of variant transplant patients. In conclusion, present data strongly suggest that the variant *ABCG2 c.421C>A* allele increases steady-state exposure to MPA in stable renal transplant patients.

Key words: mycophenolic acid, cyclosporine, tacrolimus, transplant patients, *ABCG2* polymorphism

## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Farmakoterapija u transplantaciji</b>	1
1.1.1. Općenito o transplantaciji bubrega	1
1.1.2. Imunosupresivna farmakoterapija	3
1.1.3. Imunosupresivi	5
1.1.4. Mikofenolna kiselina	5
1.1.5. Ciklosporin	11
1.1.6. Takrolimus	14
<b>1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika</b>	18
1.2.1. Farmakogenetika/farmakogenomika i personalizirana medicina	18
1.2.2. Farmakogenetički biljezi u klinici	19
1.2.3. Odnos genotip – fenotip	21
1.2.4. Metabolizam lijekova	22
<b>1.3. Citokrom P450 (CYP)</b>	22
1.3.1. Polimorfizmi citokroma P450 3A (CYP3A) 3A4, 3A5	23
<b>1.4. Polimorfizmi enzima UGT (UGT1A9, UGT2B7)</b>	25
<b>1.5. Farmakogenetika prijenosnika lijekova</b>	28
1.5.1. Polimorfizmi ABCB1 (P-glikoprotein / MDR1)	29
1.5.2. Polimorfizam ABCG2	31
1.5.3. Polimorfizam SLCO1B1	36
<b>1.6. Farmakogenomika imunosupresiva</b>	38
1.6.1. Farmakogenetika mikofenolne kiseline	38
1.6.2. Farmakogenetika ciklosporina	41
1.6.3. Farmakogenetika takrolimusa	42
<b>1.7. Interakcije imunosupresiva</b>	51
<b>1.8. Terapijsko praćenje lijekova (TDM)</b>	53
1.8.1. TDM u kliničkoj praksi	53
1.8.2. TDM mikofenolne kiseline	55
1.8.3. TDM ciklosporina	57
1.8.4. TDM takrolimusa	58
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	60
2.1. Svrha rada	60
2.2. Hipoteza	61

2.3. Ciljevi rada	61
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	62
<b>3.1. Oblikovanje studije – opis</b>	62
3.2. Ispitanici	63
3.3. Imunosupresivni protokoli	64
<b>3.4. Bioanalitičke metode</b>	65
3.4.1. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline	65
3.4.2. Određivanje koncentracije ciklosporina i takrolimusa	67
3.4.3. Mjerenje kreatinina u serumu i procjena klirensa kreatinina	67
<b>3.5. Metode genotipizacije</b>	68
3.5.1. Izdvajanje DNA	68
3.5.2. Genotipizacija <i>ABCG2</i> , <i>UGT1A9</i> , <i>UGT2B7</i> , <i>ABCB1</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>ABCC2</i>	68
3.5.2.1. TaqMan metoda za qPCR	69
3.5.2.2. <i>LightCycler</i> metoda za qPCR - genotipizacija <i>ABCB1 2677G&gt;T/A</i>	72
3.6. Farmakokinetički parametri	74
3.7. Ishodi od interesa (zavisne varijable)	74
3.8. Koncept analize podataka	75
3.9. Mjere za postizanje uvjetovane izmjenjivosti	81
3.10. Statističke metode	86
3.11. Osjetljivost na (nemjereni) ostatni <i>confounding</i>	86
<b>4. REZULTATI</b>	90
4.1. Ispitanici	90
4.2. Učinak varijantnoga <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> alela na bioraspoloživost mikofenolne kiseline	93
4.3. Osjetljivost procijenjenih učinaka varijantnoga <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> alela na bioraspoloživost mikofenolne kiseline na ostatni (nemjereni) <i>confounding</i>	99
4.3.1. E-vrijednosti	99
4.3.2. Korekcija opaženih efekata za nemjereni <i>confounding</i>	100
4.3.2.1. Učinak polimorfizma <i>SLCO1B3 c.334T&gt;G</i> na bioraspoloživost mikofenolne kiseline	100

4.3.2.2. Učinak polimorfizma <i>UGT1A9 c.98T&gt;C</i> na bioraspoloživost mikofenolne kiseline	102
4.3.3. Prevalencija polimorfizama <i>SLCO1B3 c.334T&gt;G</i> i <i>UGT1A9 c.98T&gt;C</i> u bijelih Europljana	104
4.3.3.1. Korekcija procijenjenoga učinka varijantnoga <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> alela za (nemjereni) učinak TT/TG genotipa u polimorfizmu <i>SLCO1B3 c.334T&gt;G</i>	105
4.3.3.2. Korekcija procijenjenoga učinka varijantnoga <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> alela za (nemjereni) učinak varijantnoga alela u polimorfizmu <i>UGT1A9 c.98T&gt;C</i>	106
4.4. Dometi interakcija varijantnoga <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> alela s kalcineurinskim inhibitorima	108
<b>5. RASPRAVA</b>	114
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	125
<b>7. LITERATURA</b>	126
<b>8. POPIS KRATICA</b>	149
<b>9. ŽIVOTOPIS</b>	152
<b>10. PRILOG</b>	153

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**BASIC DOCUMENTATION CARD**



# 1. UVOD

## 1.1. Farmakoterapija u transplantaciji

### *1.1.1. Općenito o transplantaciji bubrega*

Transplantacija bubrega jest metoda izbora liječenja bolesnika u završnoj fazi kronične bubrežne bolesti. Radi se o postupku uzimanja stanica, tkiva ili organa jedne osobe i njihov prijenos u drugu osobu koja u većini slučajeva nije genski istovjetna darovatelju organa (alogenični presadak). Genska nejednakost darovatelja i primatelja organa dovodi do neželjenih reakcija imunosnoga sustava primatelja što u konačnici može dovesti do odbacivanja presatka. Suvremene metode molekularne biologije omogućile su bolje razumijevanje različitih staničnih i molekularnih mehanizama za prepoznavanje presatka i pokretanje reakcija imunosnoga sustava, a dodatno se i više pozornosti posvećuje postizanju bolje tkivne podudarnosti između darovatelja i primatelja organa (1).

Transplantacija organa jest jedno od najuspješnijih znanstvenih dostignuća 20. stoljeća. Započeo ju je David Hume 1951. koji je u periodu od 1951. do 1953. napravio devet transplantacija. Donori su bili pacijenti koji su preminuli tijekom operacija ili pacijenti kojima je dijagnosticiran hidrocefalus te im je bubreg odstranjen kako bi se omogućila drenaža likvora u mokraćnu cijev (2). Joseph Murray je 1954. u Bostonu izveo prvu uspješnu transplantaciju bubrega između jednojajčanih blizanaca čime je premostio barijeru odbacivanja presatka, a Murray je za svoje postignuće 1990. dobio Nobelovu nagradu. Pacijent je živio 8 godina nakon transplantacije, a u umro je od recidiva osnovne bolesti, kroničnoga glomerulonefritisa (3, 4).

Danas su na tržištu prisutni biološki lijekovi (monoklonska protutijela i fuzijske molekule) koje ciljano djeluju na stanice i molekule koje sudjeluju u aktivaciji imunosnoga sustava. Njihovo djelovanje smanjuje mogućnost akutnoga odbacivanja presatka što se događa kod oko 15 % pacijenata u prvoj godini nakon transplantacije, međutim ne utječe znatno na preživljavanje presatka pet godina nakon transplantacije. Reakcija primatelja protiv presatka cijelo je vrijeme prisutna što dovodi do gubitka funkcije presatka odnosno kronične nefropatije. Glavni cilj transplantacije bubrega jest postizanje tolerancije primatelja na presadak te smanjenje reakcija imunosnoga sustava primjenom imunosupresijske terapije koja također može imati neželjene reakcije u obliku infekcija ili tumora (1).

Glavni zadatak imunosnoga sustava jest prepoznavanje i uklanjanje potencijalnih opasnosti za organizam, a tu najvažniju ulogu ima prirodna imunost koja svojom aktivacijom daje upute za aktivaciju stečene imunosti (proizvodnja protuupalnih citokina, aktivacija stanica koje predočuju antigene). Kada se govori o imunosti, potrebno je kazati da ona obuhvaća prirodnu i stečenu imunost. Prirodnu imunost čine stanični i molekularni biokemijski mehanizmi koji u organizmu stalno postoje i aktiviraju se nakon pojave mikroba ili oštećenja vlastitih stanica. Njihov je odgovor nakon svake infekcije jednak i u tom odgovoru nema imunosnoga pamćenja (pamćenje označava brži i snažniji odgovor nakon ponovnog susreta s istim antigenom). To je prva linija obrane organizma, postoji prije kontakta s mikrobima i na sve reagira na isti način. Glavne komponente prirodne imunosti su fizičke i kemijske barijere infekcijama, fagociti, dendritične stanice, stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*) i molekule topljive u krvi (komplement, proteini akutne faze upale, citokini i prirodna protutijela). Stanice i molekule prirodne imunosti imaju receptore koji prepoznaju strukture karakteristične za mikrobe (npr. DNA i RNA bakterija i virusa) (1). Stečenu imunost karakterizira specifičan odgovor prema antigenima i sposobnost imunosnoga pamćenja što omogućava jači i brži odgovor nakon ponovnog izlaganja istim antigenima, razvija se tek nakon kontakta s antigenom (ne postoji prije prvoga kontakta) i potrebni su dani i mjeseci da bi se razvila. Stečena imunost može biti posredovana protutijelima (humoralni odgovor) ili stanicama (stanični odgovor) (1).

U Hrvatskoj je vrlo uspješan program transplantacije organa umrlih darovatelja, koji se češće primjenjuje nego transplantacija organa od živih darovatelja pri kojoj postoji mogućnost ugrožavanja zdravlja darovatelja (5).

Živi darovatelj organa je osoba koja daruje jedan parni ili dio neparnoga organa za transplantaciju, najčešće su to članovi uže obitelji ili supružnici, a rjeđe drugi rođaci ili osobe koje nisu u srodstvu s primateljem. Preživljenje primatelja je također bolje, 95 % nakon 5 godina dok je kod kadaverične transplantacije 90 %. Veća podudarnost u krvnoj grupi i sustavu humanih leukocitnih antigena (HLA) između darovatelja i primatelja daje bolje rezultate samoga postupka te omogućava primjenu nižih doza imunosupresivnih lijekova čime se smanjuje mogućnost pojave neželjenih učinaka lijekova (5). Nedostatak organa za transplantaciju veliki je javnozdravstveni problem kako u svijetu tako i u Hrvatskoj stoga se prilikom raspodjele organa moraju poštovati etička načela i načela jednakosti. Hrvatska je 2016. i 2017. imala najveći porast u broju darovatelja organa na milijun stanovnika što ju je svrstalo u vodeće zemlje transplantacijske medicine i darovatelja organa u svijetu (5).

Transplantacija bubrega ubraja se u najveća medicinska dostignuća 20. stoljeća kojom je omogućeno produljenje životnoga vijeka i poboljšanje kvalitete života primatelja. Eurotransplant je međunarodna neprofitna organizacija koja posreduje između bolnica (donori organa) i transplantacijskih centara, a sve u svrhu pružanja pomoći za pronalaženje donora i osiguranja što boljega podudaranja između organa za doniranje i pacijenata koji su na listama čekanja. Što je bolja podudarnost donora i primatelja, to je manji rizik za odbacivanjem presatka.

### *1.1.2. Imunosupresivna farmakoterapija*

Kod bolesnika u završnoj fazi bubrežne bolesti bolje ishode liječenja pokazuje kombinacija transplantacije i imunosupresivne terapije nego li dijaliza s obzirom da je rizik od smrti transplantiranih bolesnika upola manji nego kod bolesnika na dijalizi (6). Za većinu pacijenata transplantacija bubrega omogućava poboljšanje kvalitete života i produljenje životnoga vijeka (7). Bolesnici s transplantiranim bubregom moraju dugoročno uzimati imunosupresivnu terapiju zbog sprečavanja odbacivanja presatka i pogoršanja bubrežne funkcije. Preporuke za primjenu imunosupresivne terapije jako su složene s obzirom na primjenu više različitih lijekova različitih režima doziranja kako bi se postigao optimalni omjer rizika i koristi svih lijekova u terapiji. Svi bolesnici s transplantiranim bubregom, osim jednojačanih blizanaca, zahtijevaju imunosupresivnu terapiju kako bi se dugoročno spriječilo odbacivanje presatka. Iako dugoročna primjena imunosupresije smanjuje rizik od odbacivanja presatka, također može povisiti i rizik od nastanka infekcija i tumora (8).

Terapija u transplantaciji može se podijeliti na indukcijsku terapiju i terapiju održavanja.

**Indukcijska terapija** započinje se primjenjivati prije, tijekom i odmah nakon transplantacije (perioperativno razdoblje), a liječenje se provodi upotrebom bioloških lijekova (imunoglobulin protiv ljudskih timocita, imunoglobulin protiv ljudskih limfocita, monomurab-CD3, baziliksimumab i daklizumab) koji su primarno usmjereni na T- limfocite koji su glavne stanice u stanično posredovanoj reakciji odbacivanja presatka. Svrha indukcijske terapije jest poboljšati učinkovitost imunosupresije, smanjiti rizik od akutnoga odbacivanja te reducirati dozu drugih lijekova u konkomitantnoj terapiji, primjerice kalcineurinskih inhibitora (*engl. calcineurin-inhibitors*, CNI) ili kortikosteroida (8).

**Terapija održavanja** primjenjuje se dugoročno sve dok pacijent ima presadak, s primjenom se počinje prije ili tijekom transplantacije pri čemu se može, ali i ne mora propisati indukcijska terapija. Standardna imunosupresivna terapija sastoji se od kombinacije antimetaboličkoga lijeka mikofenolne kiseline (engl. *mycophenoloic acid*, MPA), ciklosporina (CsA) ili takrolimusa (TAC) i kortikosteroida s ili bez indukcijske terapije (8).

Primjenjuju se zajedno kako bi se postigla učinkovita razina imunosupresije i smanjila toksičnost povezana s individualnim čimbenicima pojedinoga bolesnika. Rizik od akutnoga odbacivanja presatka najveći je prva tri mjeseca nakon transplantacije pa se tada koriste veće doze imunosupresiva koje se tijekom vremena zbog minimizacije toksičnosti kod stabilnih bolesnika postepeno smanjuju. Kortikosteroidi su se tradicionalno primjenjivali u terapiji, međutim zbog brojnih neželjenih reakcija danas se sve manje koriste u liječenju transplantiranih bolesnika. Veliki broj dugoročnih randomiziranih kliničkih studija pokazuje da primjena indukcijske terapije zajedno s „dvojnomo terapijom“ (CNI + prednizon) ili „trojnom“ terapijom (CNI + MPA + prednizon) značajno smanjuje akutno odbacivanje presatka kod pacijenata s visokim imunosnim rizikom. Kombinirajući lijekove različitoga mehanizma djelovanja postiže se djelotvornost, a ujedno se i ograničava toksičnost terapije. Iz skupine lijekova mTOR inhibitora (engl. *mammalian target of rapamycin*) koji se koriste bez MPA-a i CNI-a ili u kombinaciji s CNI-om najčešće se primjenjuju sirolimus i everolimus, međutim zbog neželjenih reakcija (dislipidemija i supresije koštane srži) primjena je ograničena, a klinička ispitivanja pokazuju da u odnosu na druge imunosupresivne protokole ne utječu značajno na preživljenje pacijenta/presatka. Preporuča se izbjegavanje konkomitantne primjene mTOR-a i CNI-a zbog nefrotoksičnosti poglavito u ranoj fazi nakon transplantacije. Odabir prikladne imunosupresivne terapije ovisi o individualnom imunosnom riziku pojedinoga pacijenta pri čemu je potrebno uzeti u obzir rizik za odbacivanje presatka i rizik za nastanak neželjenih reakcija (8).

Terapija održavanja nakon transplantacije propisuje visoke doze imunosupresiva jer je tada rizik od akutnoga odbacivanja najveći nakon čega slijedi postupno smanjivanje doza u posttransplantacijskoj fazi koje se temelji na pretpostavci da se imunosni sustav primatelja presatka prilagodio prisustvu stranih antigena pa je prema tome moguće i reducirati primijenjene imunosupresivne doze. KDIGO (engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) smjernice preporučuju da se prvo započne s kombiniranom terapijom održavanja koja se sastoji od CNI-a i antiproliferirajućega lijeka, s ili bez kortikosteroida. Preporuka je da lijekovi izbora budu MPA (antiproliferirajući lijek) i TAC te da se tijekom prvoga tjedna nakon transplantacije

bolesnicima niskoga imunološkog rizika koji su na indukcijskoj terapiji ukine terapija kortikosteroidima (8). U većini transplantacijskih centara standardni imunosupresivni protokol sastoji se od MPA-a, CNI-a (CsA ili TAC) te kortikosteroida s ili bez indukcijske terapije.

### *1.1.3. Imunosupresivi*

Imunosupresivni lijekovi su skupina lijekova koja inhibira ili smanjuje intezitet imunosnoga odgovora organizma i najčešće se primjenjuju za suprimiranje imunosnoga odgovora nakon transplantacije bubrega, srca i jetre. Dijele se u četiri velike skupine (9):

- glukokortikoidi
- proteinski lijekovi (monoklonska antitijela)
- intravenski gamma globulini
- inhibitori proteaze

U ovoj doktorskoj studiji standardni se imunosupresivni protokol sastojao od MPA-a, CNI-a (CsA ili TAC) te kortikosteroida.

### *1.1.4. Mikofenolna kiselina*

MPA ima antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antitumorska i imunosupresivna svojstva, a izolirana je 1945. iz gljivice *Penicillium stoloniferum*. Na tržištu je dostupna u dvije formulacije: ester mofetilmikofenolat (engl. *mycophenolate mofetil*, MMF) je 2-morfolinoetil ester mikofenolne kiseline, dok je mikofenolatnatrij želučanootporni oblik natrijeve soli. Obje formulacije su prolijekovi koji se u organizmu pretvaraju u aktivni oblik MPA-a pa imaju isti mehanizam djelovanja, a dodatno se smatraju terapijskim ekvivalentima u smislu terapijske učinkovitosti i bioraspoloživosti MPA-a (10).

Mikofenolatnatrij sa želučanootpornom ovojnicom (engl. *enterocoated mycophenolate sodium*, EC-MPS) ima bolji profil podnošljivosti i bioraspoloživosti, a razvijen je s ciljem smanjenja gastrointestinalnih nuspojava. Zbog želučanootporne ovojnice potrebno je više vremena da lijek dođe do tankog crijeva što usporava proces apsorpcije i više je vremena potrebno za postizanje maksimalne koncentracije u krvi. Unatoč dobrom sigurnosnom profilu MPA-a mogu se pojaviti neželjene reakcije kao što su gastrointestinalni poremećaji, mijelotoksičnost i podložnost infekcijama ili tumorima (11). Najčešće prijavljene nuspojave su gastrointestinalni poremećaji,

supresija koštane srži i anemija pri čemu se prekida liječenje MMF-om, stoga je kod transplantiranih bolesnika važno provesti farmakogenetičko testiranje biljega koji mogu predvidjeti rizik nastanka nuspojava (12).

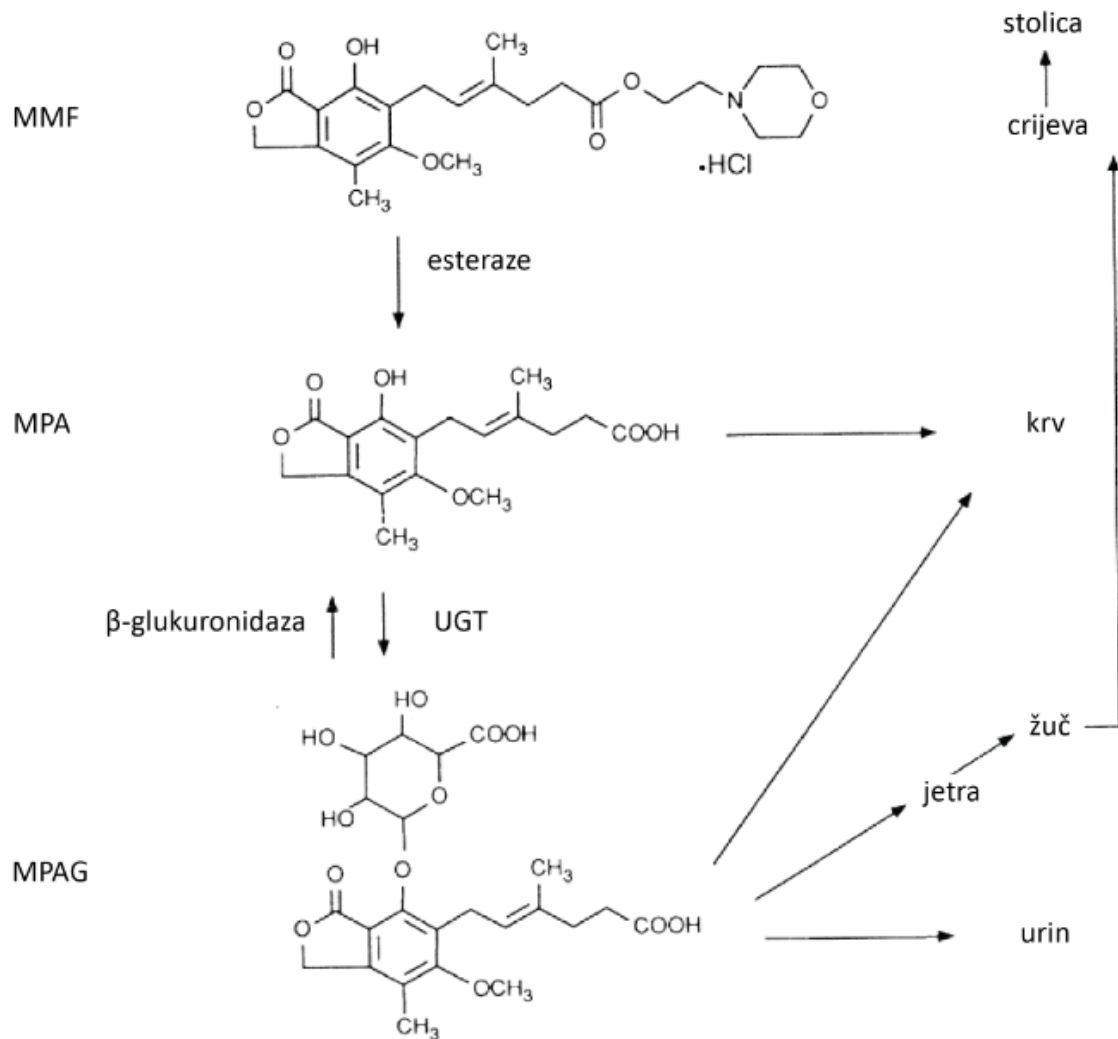
Iako su MMF i EC-MPS dva različita farmaceutska oblika njihov je zajednički aktivni metabolit MPA. MPA pokazuje varijabilna farmakokinetička svojstva poglavito tijekom apsorpcije lijeka stoga je za prilagodu terapije važno pratiti koncentracije MPA u krvi (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM). Ostalne koncentracije (engl. *through concentration*) tj. koncentracije MPA-a u krvi prije primjene sljedeće doze lijeka mogu pomoći prilikom optimizacije terapije, propisivanjem ispravne doze kojom će se postići najbolja učinkovitost imunosupresije. Klinički značaj praćenja koncentracije MPA i dalje je upitan jer su rezultati kliničkih ispitivanja dvosmisleni (13). TDM MPA-a u određenim vremenskim razmacima (bioraspoloživost, definirana kao površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme (AUC engl. *area under the curve concentration time*) omogućava kliničarima da ograniče varijabilnost bioraspoloživosti MPA-a čime se poboljšava klinički ishod transplantacije (14). Dakle, mjerenjem bioraspoloživosti MPA-a može se kontrolirati varijabilnost odnosa doza - koncentracija, a prema dobivenim rezultatima prilagoditi dozu lijeka te postići optimalni učinak primijenjene farmakoterapije (13).

MPA se pokazala kao učinkovit, siguran i potentan antiproliferirajući lijek koji se primjenjuje kao standardna imunosupresivna terapija kod pacijenata s transplantiranim bubregom. MPA djeluje kao reverzibilni inhibitor inozin-5'-monofosfat-dehidrogenaze (engl. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) koji je ključan za *de novo* sintezu purina, poglavito nukleotida gvanozin-fosfata koji je važan za sintezu DNA odnosno proliferaciju T i B limfocita. MPA inhibicijom sinteze gvanozina sprječava imunski odgovor organizma (humoralna i stanična stečena imunost) i sprječava odbacivanje presatka bubrega (11).

Dva izoenzima IMPDH1 i IMPDH2, kodirani genima *IMPDH1* i *IMPDH2*, nalaze se u svim tkivima. IMPDH2 je najviše izražen u aktiviranim T i B limfocitima i ima veći afinitet prema MPA-u usporedbi s IMPDH1 što MPA čini selektivnim i potentnim inhibitorom proliferacije T i B limfocita (11). U literaturi se opisuju dva stanična mehanizma sinteze purinskih nukleotida, *de novo* sinteza i put spašavanja metaboličkog „otpada“ (engl. *salvage pathway*) u kojem se radi o spasonosnom metaboličkom putu u kojem se recikliraju slobodne baze i nukleotidi nastali tijekom razgradnje nukleinskih kiselina. Umnažanje limfocita prvenstveno ovisi o *de novo* putu sinteze purina jer nemaju sporedni put sinteze. Stoga MPA ciljano

citostatski djeluje na limfocite sprječavajući odbacivanje presatka s minimalnim učinkom na druge organe i stanice (10).

MMF je 2-morfolinoetil ester MPA-a koji se nakon oralne primjene vrlo brzo hidrolizira u aktivni metabolit MPA djelovanjem enzima karboksietilesteraza, CES1 i CES 2 (engl. *carboxylesterases 1, 2*). Najveća je zastupljenost enzima CES1 u jetri, a mala u crijevima, dok se CES2 uglavnom eksprimira u crijevima, ali ga ima i u jetri (15).



**Slika 1.** Shematski prikaz strukture MMF-a, MPA-a, MPAG-a i metabolizma MMF-a (preuzeto i prilagođeno prema 16 uz dozvolu Elsevier)

MPA se procesom glukuronidacije deaktivira u jetri djelovanjem enzima uridin-difosfat-fosfoglukuronizil-transferaze (engl. *uridin 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*, UGT) pri čemu nastaje neaktivni metabolit MPA-7-O-glukuronid (engl. *mycophenolic acid glucuronide*,

MPAG) koji se izlučuje u žuč odakle odlazi u crijeva. Oko 90 % MPA-a se konvertira u MPAG u jetri, a manjim dijelom u crijevima i bubrezima. Glukuronidacija u jetri i bubrezima najčešće je posredovana enzimom UGT1A9, dok enzim UGT1A8 uz manju prisutnost i nekih drugih enzima UGT ima ključnu ulogu u crijevima (17). UGT2B7, uz manji doprinos UGT1A8, posreduje u biotransformaciji MPA-a u acil-glukuronid (engl. *acyl-glucuronide*, Ac-MPAG) koji je farmakološki aktivan jer može inhibirati IMPDH (18). Enzimi CYP450 (CYP3A4, CYP3A5 i u manjoj mjeri CYP2C8) također sudjeluju u biotransformaciji MPA-a pri čemu tijekom faze biotransformacije u jetri nastaje metabolit 6-O-desmetil-MPA (engl. *6-O-desmethyl-MPA*, DM-MPA) (19).

Varijabilnost farmakokinetike MPA-a ovisi o raznim čimbenicima te se povećava dužom primjenom lijeka (veća izloženost lijeku). Čimbenici koji mogu utjecati na varijabilnost su spol, koncentracija serumskog albumina, bubrežna funkcija, komedikacija i genetički polimorfizam. Dokazano je da CNI, CsA i TAC te genetički polimorfizam metaboličkih enzima i transportnih proteina, utječu na dispoziciju MPA-a s tim da rezultati dostupnih studija upućuju na značajni utjecaj CsA-a (20, 13).

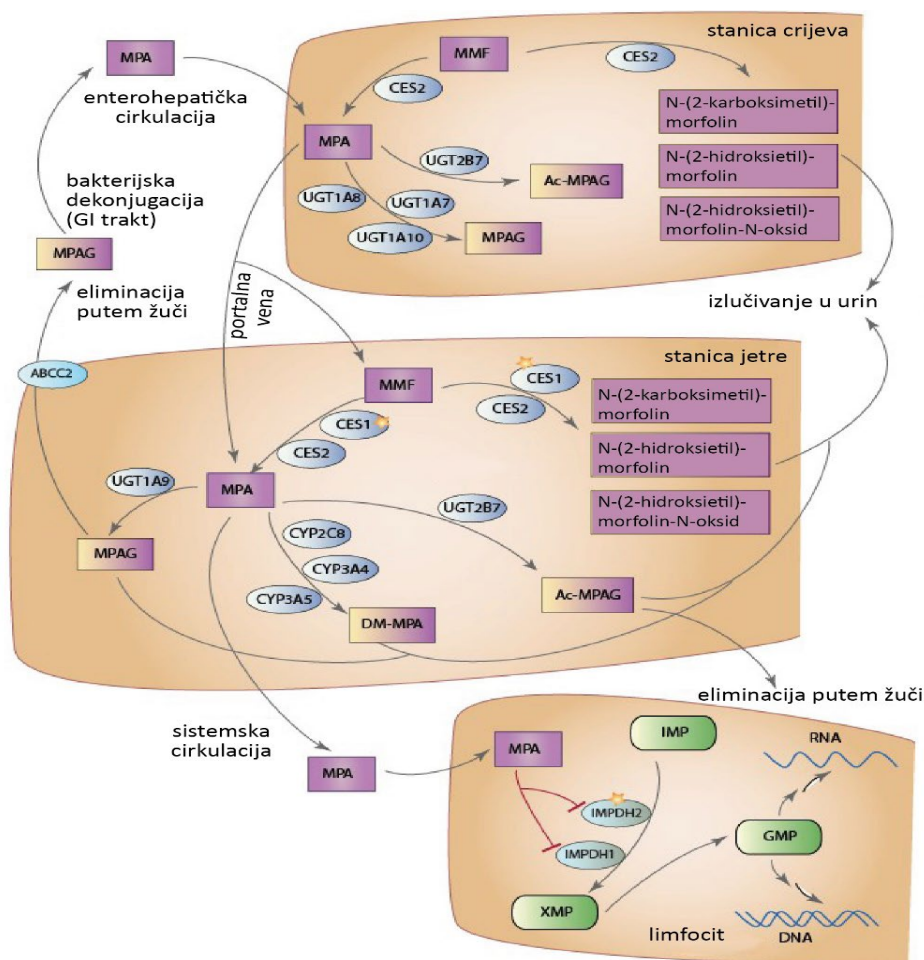
**Tablica 1.** Ključna farmakološka svojstva MMF-a i EC-MPS-a (preuzeto i prilagođeno prema 10 uz dozvolu Elsevier)

Lijek	Vršne koncentracije (h)	Bioraspoloživost (%)	Vežanje na proteine (%)	Poluvijek eliminacije (h)	Metabolizam	Izlučivanje
MMF	1-1,5	80,7-94	> 97 (na albumine)	18 (MPA)	MPA (aktivni metabolit) MPAG (neaktivni metabolit)	Urin < 1 %, feces 6 %, 87 % u urinu kao MPAG
EC-MPS	1,5-2,75	72	> 97 (na albumine)	MPA:8-16 MPAG: 13-17		Urin 3 %, feces, >60 % u urinu kao MPAG

Iz hepatocita MPAG i Ac-MPAG se u žuč prenose putem transportnoga proteina ABCC2, a djelovanjem bakterijskih enzima  $\beta$ -glukuronidaze MPAG se pretvara ponovno u aktivni oblik MPA koja se enterohepatičkom cirkulacijom ponovno vraća u sistemsku cirkulaciju. Enterohepatička cirkulacija je važna za održavanje razine MPA/MPAG u serumu. Nakon primjene lijeka, prve koncentracije u krvi postižu se nakon sat vremena, a zbog

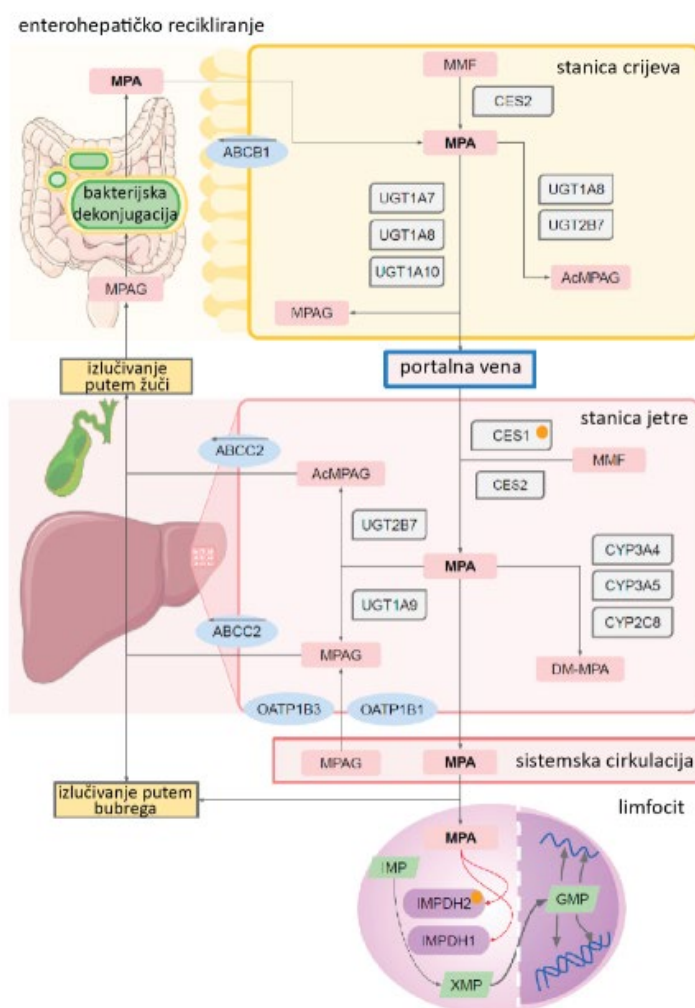


enterohepatičke cirkulacije sekundarne vršne vrijednosti MPA-a detektiraju 6 do 12 sati nakon oralne primjene. S obzirom na pojavu dviju vršnih vrijednosti, preporučuje se doziranje lijeka dva puta dnevno, a poluvijek života MPA-a kod zdrave populacije je 16 do 18 sati. MPAG i Ac-MPAG izlučuju se u žuč, a u stanice jetre ulaze preko ubacivačkih (influksnih) membranskih transportera OATP koji su kodirani genima *SLCO*. Oralna bioraspodivnost MPA-a nakon primjene MMF-a je 80,7 do 94 %, pri čemu je 97 % MPA-a u krvi vezano na albumine (21, 22). Oko 90 % oralne doze izlučuje se urinom u obliku MPAG-a posredovano prijenosnikom *ABCC2* te u vrlo malim količinama kao MPA (< 1 %). Oštećenje bubrežne funkcije nema značajan utjecaj na koncentraciju MPA-a i malo je vjerojatno da je u ovim slučajevima potrebno smanjiti dozu lijeka. S obzirom na to da je većina MPA-a i MPAG-a u serumu vezana na albumine, promjena koncentracije albumina moguća je tijekom bolesti bubrega i jetre ili primjenom politerapije kad se više lijekova natječe za vezna mjesta na albuminu što zahtjeva smanjenje doze MPA-a (22).



**Slika 2.** Metabolizam MPA-a (preuzeto i prilagođeno prema 22 uz dozvolu PharmGKB dostupnu pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/))

Rezultati objavljenih studija pokazali su da se stabilni pacijenti s transplantiranim bubregom mogu prebaciti s terapije MMF-om na EC-MPS bez ugrožavanja učinkovitosti liječenja (23). Iako su obje formulacije, ekvivalentne u terapijskoj učinkovitosti i izloženosti MPA-u, MMF formulacija poboljšava kratkoročne i dugoročne ishode transplantacije bubrega međutim povećava rizik gastrointestinalnih nuspojava što smanjuje kvalitetu života i adherenciju pacijenta prema propisanoj terapiji. Smanjenje doze i prestanak uzimanja MMF-a zbog gastrointestinalnih poremećaja usko je povezano s povećanim rizikom za akutno odbacivanje ili gubitak presatka. Zdravlje pacijenta može se očuvati prebacivanjem na terapiju EC-MPS-om koja pokazuje manju incidenciju gastrointestinalnih poremećaja (24, 25).

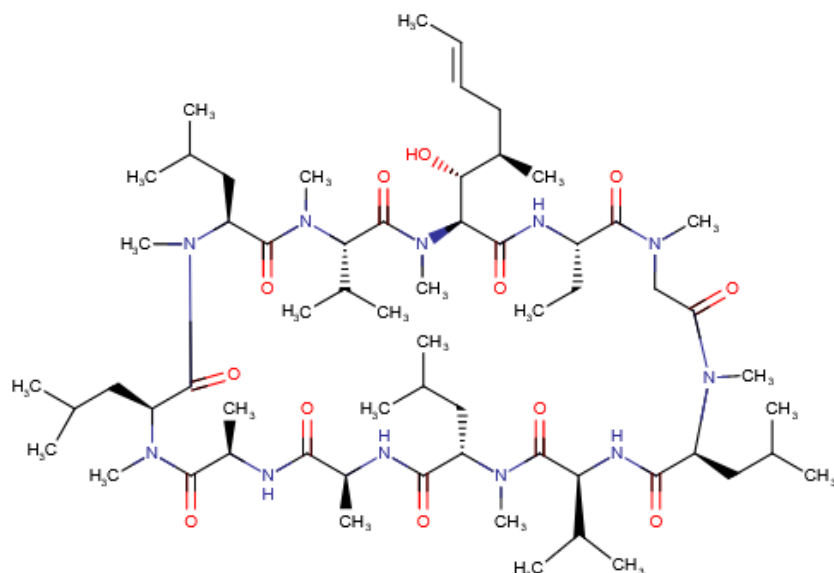


**Slika 3. Prikaz farmakokinetike i mehanizma djelovanja MPA** (preuzeto i prilagođeno prema 11 uz dozvolu dostupnu pod [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/))

Ac-MPAG: acil-MPA-glukuronid; DM-MPA: 6-O-desmetil MPA; GMP:gvanozin 5'-monofosfat; IMP:inozin 5'-monofosfat; MMF: mofetilmikofenolat; MPA:mikofenolna kiselina, MPAG:MPA-7-O-glukuronid; XMP:ksantozin 5'-monofosfat

### 1.1.5. Ciklosporin

CsA je smjesa hidrofobnih cikličkih peptida izoliranih iz gljivice *Tolypocladium inflatum gams* u Sandozovom laboratoriju u Baselu u Švicarskoj. Prvotno je pokazivao antifungalna svojstva te se s vremenom razvio kao imunosupresivni lijek koji nije pokazivao značajna citotoksična svojstva. CsA je peptid jedinstvene strukture sastavljen od 11 aminokiselina čijih je 7 (od 11) amidnih veza N-metilirano. Ekstenzivna metilacija i hidrofobni karakter aminokiselina pridonose izrazitoj krutosti cikličke strukture koja pridonosi vrlo niskoj topljivost CsA-a u vodi (26). Otkriće CsA te njegova uloga u imunosupresiji omogućila je značajno poboljšanje ishoda transplantacijske medicine. Ispitivanja provedena na životinjama i ljudima ukazala su na značajan klinički učinak kod bolesnika s presađenim bubregom i koštanom srži nakon čega je 1983. od strane Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) odobren kao imunosupresivni lijek za sprječavanje odbacivanja presatka solidnih organa bubrega, jetre, srca, pluća, kod transplantacije koštane srži i matičnih stanica te u prevenciji ili liječenju dokazane reakcije presatka protiv primatelja. U istim je transplantacijskim indikacijama (transplantacija solidnih organa i koštane srži) odobren za primjenu od strane Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), a dodatno se primjenjuje i za netransplantacijske indikacije primjerice u terapiji autoimunih bolesti (psorijaza, atopijski dermatitis, reumatoidni artritis), kod nefrotskoga sindroma i endogenoga uveitisa (27, 28).



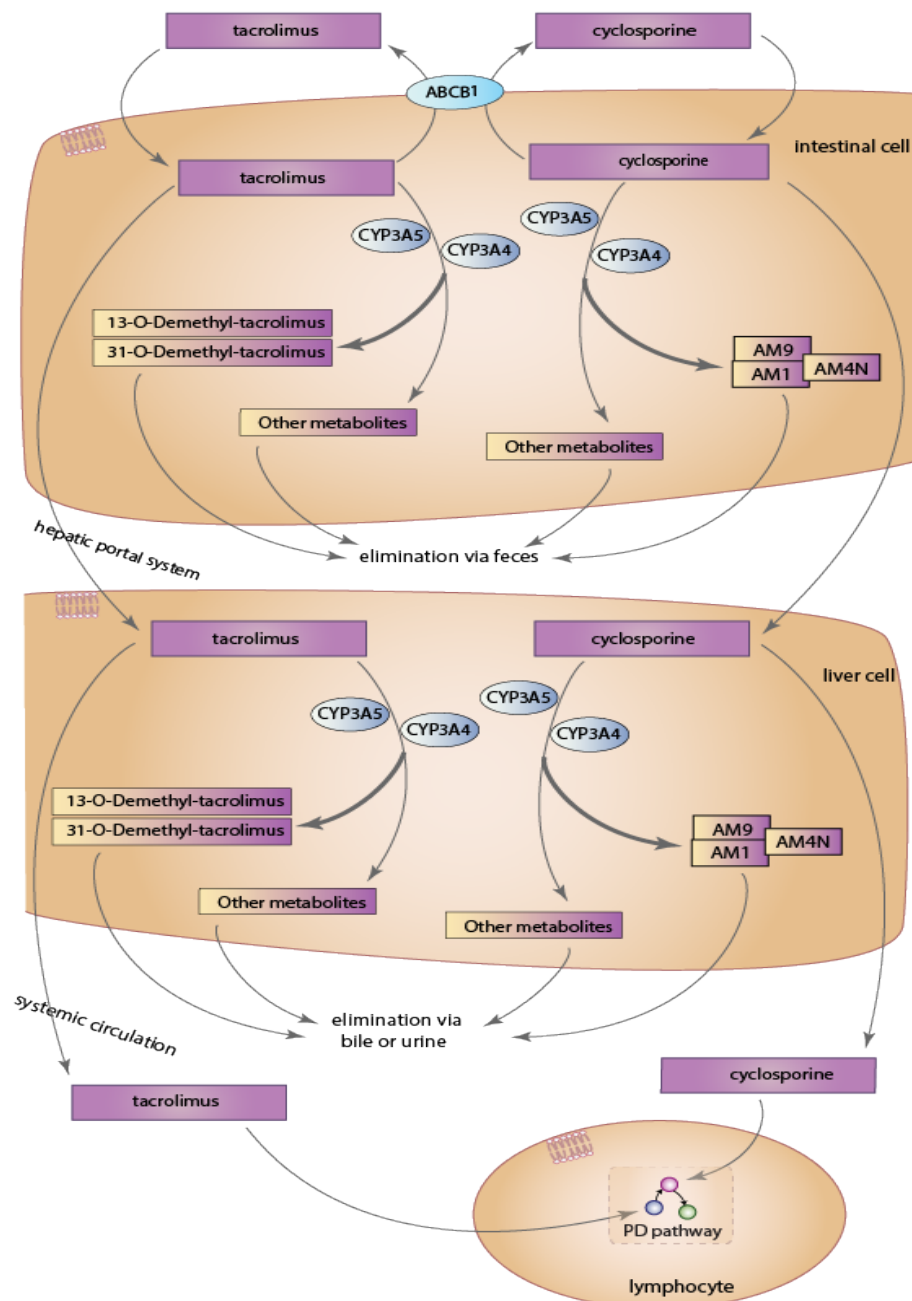
**Slika 4.** Kemijska struktura CsA (preuzeto sa [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca))

CsA djeluje tako da inhibira kalcineurin-fosfatazu (serin/treonin-fosfataza) koja se nalazi u citoplazmi i ovisna je o  $Ca^{2+}$  i kalmodulinu. Receptori T–stanica reagiraju na određeni antigen nakon čega u T-stanicama počinje proces aktivacije te dolazi do povećanja koncentracije unutarstaničnoga kalcija koji se veže za kalmodulin i aktivira kalcineurin. Ulaskom u ciljnu stanicu, CsA se veže za ciklofilin (unutarstanični proteini zajedničkoga naziva imunofilini), tvoreći kompleks imunofilin – CsA koji veže kalcineurin-fosfatazu čime se inhibira kalcijem stimulirana defosforilacija transkripcijskog faktora NFAT (engl. *Nuclear factor of activated T cells*). Kada je citoplazmatski NFAT defosforiliran odlazi u jezgru gdje nastaje niz reakcija koje aktiviraju T-limfocite (sinteze citokina interleukina IL-2, IL-4, CD40L). Sinteza IL-2 stimulira aktivaciju i diferencijaciju T-limfocita što je u slučaju primjene CsA-a onemogućeno inhibicijom kalcineurin-fosfataze (28, 29).

CsA pokazuje značajnu inter- i intraindividulanu farmakokinetiku varijabilnost te slabo prediktivnu bioraspoloživost, a na njegova farmakokinetička svojstva utječu i čimbenici kao što su dob, etnička pripadnost, varijabilnost u gastrointestinalnom traktu i prisutnost komorbiditeta (dijabetes i cistična fibroza) (28). Kao i TAC, slabe je oralne bioraspoloživosti zbog slabe apsorpcije, učinka metaboličkih enzima u crijevima te metabolizma prvoga prolaska kroz jetru koji se poboljšao primjenom formulacije lijeka oblika mikroemulzije umjesto ranije odobrene uljne formulacije (30). Značajna varijabilnost crijevnog apsorpcije bila je izražena kod prve uljne formulacije (Sandimmun) gdje je apsolutna bioraspoloživost varirala od 1 % do 89 % sa srednjom vrijednosti od 30 %. Razvojem formulacije oblika mikroemulzije (Neoral) poboljšala se bioraspoloživost i neovisnost o žučnoj sekreciji što je omogućilo i veće terapijske koncentracije CsA-a u krvi te smanjenje njegove farmakokinetičke intraindividualne varijabilnosti (31). Nakon peroralne primjene mikroemulzije (Sandimmun Neoral) vršne koncentracije u krvi postižu se nakon 1-2 sata, a apsolutna oralna bioraspoloživost iznosi 20-50 %. Primjenom farmaceutskog oblika mikroemulzije rezultiralo je za 59 % višim maksimalnim koncentracijama lijeka ( $C_{max}$ ) i otprilike za 29 % višom bioraspoloživosti. Nakon apsorpcije u crijevima, oko 90 % CsA-a u plazmi se uglavnom veže na lipoproteine zbog vrlo izraženih lipofilnih svojstava. Vrlo brzo napušta krvotok te se u velikoj mjeri distribuira izvan volumena krvi uz prosječan prividni volumen distribucije 3,5 L/kg. U krvi je 33 do 47 % CsA prisutno u plazmi, 4 do 9 % u limfocitima, 5 do 12 % u granulocitima, a 41 do 58 % u eritrocitima (27).

CsA se u najvećoj mjeri metabolizira u jetri putem enzima CYP3A4, a u manjoj mjeri preko CYP3A5, pri čemu nastaje približno 30-ak metabolita. Glavni putevi metabolizma su

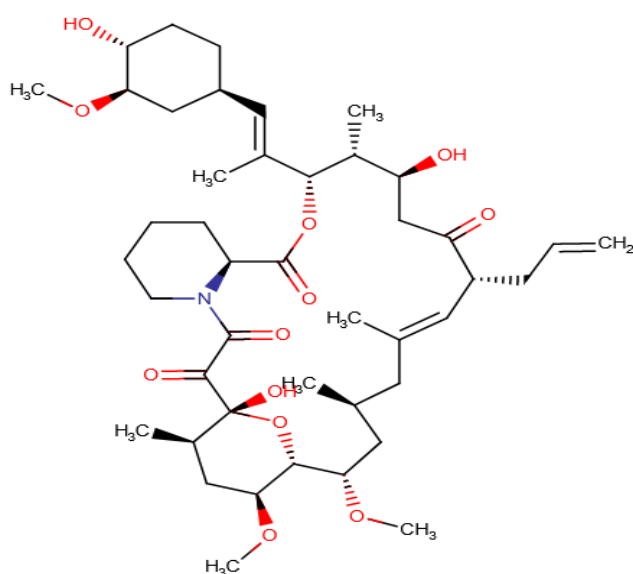
hidroksilacija, demetilacija, sulfatacija i ciklizacija. Metaboliti ne pokazuju imunosupresivnu aktivnost, poluvijek eliminacije u bolesnika s bubrežnim presatkom je otprilike 11 sati, s rasponom između 4 i 25 sati. Oko 90 % se izlučuje u žuč, a samo manje od 1% kao nepromijenjeni izvorni lijek. Putem urina izlučuje se samo 6 % oralne doze i to manje od 0,1 % u obliku nepromijenjenoga izvornog lijeka. Prolazi kroz placentu i izlučuje se u majčinom mlijeku (27, 28).



**Slika 5. Shematski prikaz metabolizma CsA-a i TAC-a** (preuzeto i prilagođeno prema 32 uz dozvolu PharmGKB dostupnu pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/))

### 1.1.6. Takrolimus

TAC je makrolidni antibiotik koji je prvotno odobren 1994. od strane FDA-a kao profilaksa odbacivanja presatka jetre, a danas je još dodatno odobren i za profilaksu odbacivanja bubrega ili srca te za liječenje odbacivanja presatka koje je rezistentno na konvenconalnu imunosupresivnu terapiju. TAC je otkriven 1984. kada su znanstvenici japanske tvrtke Fujisawa Pharmaceuticals testirali brojne produkte fermentacije bakterija roda *Streptomyces tsukubaensis* zbog njihovih inhibitornih svojstava prema limfocitima. Bakterije su proizvodele moćan imunosupresiv kojem je dan radni naziv FK506, a poslije takrolimus (akronim za Tsukuba macrolide immunosuppressive) (33).



**Slika 6. Kemijska struktura TAC-a** (preuzeto sa [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca), datum pristupa 25.04.2023.)

Iako je strukturno različit od CsA-a, oba imaju isti mehanizam djelovanja kojim blokiraju unutarstanične puteve čime suprimiraju imunosni odgovor organizma. TAC se unutar stanice veže za imunofilin nazvan FK506-vezujući protein-12 (engl. *FK-binding protein*, FKBP-12), kompleks TAC- FKBP-12 se veže na kalcineurin-fosfatazu i inhibira ju što uzrokuje inhibiciju o kalciju ovisnih puteva transdukcije T-signalu i dovodi do suprimiranja aktivacije T-stanica i proliferacije B-stanica (ovisnu o pomoćnim T-stanicama), stvaranje limfokina (interleukina 2, 3 i  $\gamma$ -interferona) te ekspresiju receptora za interleukin-2 (27, 28, 33).

Prema podacima u sažetku opisa svojstava lijeka terapija peroralnim TAC-om počinje s dozom od 0,20 do 0,30 mg/kg/dan podijeljeno u dvije doze unutar 24 sata nakon završetka

transplantacije. U periodu nakon transplantacije doze TAC-a se smanjuju, a poboljšanje stanja bolesnika nakon transplantacije može promijeniti farmakokinetiku TAC-a što treba uzeti u obzir i posljedično prilagoditi dozu lijeka (33).

TAC je lipofilan lijek, primijenjen oralno pokazuje svojstva varijabilne farmakokinetike zbog promjenjive apsorpcije i učinka prvoga prolaska kroz jetru, što može znatno mijenjati njegovu učinkovitost i toksičnost. Također je i supstrat transportnoga izbacivačkog proteina P-glikoproteina (P-gp) što može limitirati oralnu bioraspoloživost i distribuciju u organizmu. P-gp djeluje tako da u crijevima utječe na apsorpciju, a u jetri i bubrezima pospješuje transport u žuč i urin. U kliničkoj praksi najčešće ciljane koncentracije TAC-a u krvi su od 10-20 ng/ml, što naravno ovisi i o osobinama pacijenta, vrsti transplantiranoga organa i vremenu nakon transplantacije (34), s tim da se tijekom terapije održavanja razina TAC-a u krvi kreće 5 - 15 ng/ml (33). TAC se češće primjenjuje od CsA-a u kombinaciji s MPA-om i glukokortikoidima. Važno je održavati terapijsku koncentraciju lijeka u krvi kako bi se postigla optimalna imunosupresija, izbjeglo odbacivanje presatka zbog malih nedostatnih doza, te toksične reakcije zbog prevelikih doza lijeka (35).

Apsorpcija TAC-a odvija se u tankom crijevu i značajno je smanjena prisutnošću hrane. Nakon oralne primjene, najviše koncentracije ( $C_{max}$ ) u krvi postižu se nakon 1-3 sata. Bioraspoloživost je niska i pokazuje značajnu intra- i interindividulanu varijabilnost, u rasponu od 4 % do 89 % (srednja vrijednost u osoba s transplantiranim bubregom oko 25 %) zbog toga što je TAC pod snažnim utjecajem učinka prvoga prolaska kroz jetru zbog enzima CYP3A i transportera P-gp, koji su eksprimirani u jetri i crijevima. Metabolizam TAC-a odvija se putem enzima CYP3A5 i u manjoj mjeri CYP3A4, pri čemu nastaje 15-ak metabolita. Više od 95 % metabolita izlučuje se putem žuči (fecesom), a samo oko 2 % urinom, dok je u urinu i stolici nađeno manje od 1 % nepromijenjenoga lijeka što znači da se TAC gotovo potpuno metabolizira i da je žuč glavni put eliminacije. Lijek ima nisku stopu klirensa, dok je poluvijek eliminacije kod bolesnika s transplantiranim bubregom 15,6 sati (33, 36, 37). U plazmi je oko 99 % lijeka vezano na proteine (serumski albumin i  $\alpha$ -1-kiseli glikoprotein), a u sistemskoj cirkulaciji se snažno veže na eritrocite. S obzirom na to da ima veće koncentracije u punoj krvi nego u plazmi, praćenjem koncentracije u punoj krvi može se procijeniti sistemska izloženost lijeku (38). Lijek je uskoga terapijskog indeksa pa smanjenjem sistemske izloženosti raste i mogućnost odbacivanja presatka, a povećanje iste može uzrokovati nuspojave. Vrlo je velika mogućnost nastanka nuspojava koje se obično javljaju u prvih nekoliko mjeseci, a povlače se s vremenom trajanja terapije zbog smanjenja koncentracija. Najčešće nuspojave su nefrotoksičnost, neurotoksičnost,

šećerna bolest, gastrointestinalne tegobe te povećan rizik od razvoja infekcija (37). Zbog značajne individualne farmakokinetičke varijabilnosti i uske terapijske širine, u prvim tjednima nakon transplantacije važno je pratiti koncentracije lijeka u krvi kako bi se moglo intervenirati u režime doziranja. Postoje dvije oralne formulacije TAC-a, farmaceutski oblik kapsule (Prograf, Astellas) koja se primjenjuje dva puta dnevno, ili formulacija s produljenim odlobođanjem (Advagraf, Astellas) koja se primjenjuje jednom dnevno, a s terapijom treba započeti 24 sata nakon transplantacije (35).

TAC je postao lijek izbora u transplantaciji organa, učinkovit je u prevenciji akutnoga odbacivanja organa, ali je ujedno i toksičan te značajne farmakokinetičke varijabilnosti što ograničava njegovu primjenu. Smatra se da su genetički polimorfizmi koji utječu na režim doziranja i sistemsku izloženost važni prediktori učinkovitoga doziranja bolesnika. Iako se u kliničkoj praksi primjenjuje terapijsko praćenje koncentracije u krvi i dalje u praksi dolazi do odbacivanja presatka ili razvoja toksičnosti. Danas možemo reći da kamen temeljac ispravnoga personaliziranog doziranja predstavljaju farmakogenomska testiranja, međutim preventivna genotipiziranja se rijetko provode u kliničkoj praksi prvenstveno zbog financijskih razloga i nedostatnih dokaza o boljim terapijskim ishodima. Zadnjih se godina smanjuju troškovi genotipizacije, postaju dostupniji jeftiniji genetički testovi pa će tako i s vremenom genotipizacija transplantiranih pacijenata biti neupitna, a i više će se u kliničkoj praksi primijenjivati farmakogenetske preporuke (39). Konzorcij za implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC*) izdao je 2015. smjernice za doziranje TAC-a prema genotipu *CYP3A5* (40).

CsA i TAC spadaju u skupinu lijekova kalcineurinskih inhibitora koji su kamen temeljac imunosupresivne terapije kod transplantacije solidnih organa. Zbog uskoga terapijskog indeksa i varijabilne farmakokinetike teško je postići optimalno doziranje, a jedan od razloga su i promjene u genima koje utječu na promjenu aktivnosti metaboličkih enzima i klirensa lijeka. Potencijalno mogu izazvati ozbiljne nuspojave zbog poddoziranja ili predoziranja što se može kontrolirati i izbjeći primjenom TDM-a. Postoji nekoliko faktora kod primatelja organa koji utječu na bioraspoloživost kalcineurinskih inhibitora: dob, rasa, sastav tijela, tip presatka, bubrežna i jetrena funkcija, uporaba kortikosteroida (indukcija CYP3A, P-gp), unos hrane, koncentracija albumina i hematokrit uz dodatne osobine presatka: veličina, dob davatelja i vrijeme nakon transplantacije. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja su pokazala značajnu povezanost ovih faktora s funkcijom metaboličkih enzima i transportera koji su uključeni u metabolizam CNI-a, a nalaze se u jetri, crijevima i bubrezima (41). Danas se TAC više primjenjuje od CsA-



a, objavljeni podaci ukazuju na bolje preživljenje presatka i smanjenje epizoda odbacivanja presatka tijekom prve godine nakon transplantacije (42). U literaturi je objavljena *Symphony studija* koja je proučavala učinkovitost i toksičnost imunosupresivne terapije. Glavni je cilj bio smanjenje nefrotoksičnosti na način da se koriste imunosupresijski protokoli koji bi omogućavali smanjenje doza kalcineurinskih inhibitora i sirolimusa uz očuvanje optimalne imunosupresije i prihvatljive stope pojavnosti odbacivanja presatka. Rezultati studije pokazuju da je u promatranom periodu od 12 mjeseci primjena manjih doza TAC-a (ciljana koncentracija 3 - 7 ng/ml) s indukcijskom terapijom daklizumabom, MMF-om i kortikosteroidima rezultirala poboljšanom bubrežnom funkcijom i manjom pojavom odbacivanja presatka u usporedbi s primjenom daklizumaba s manjim dozama CsA-a ili sirolimusa ili s terapijom u kojoj se koristi standardna doza CsA-a bez uvođenja daklizumaba. Manje doze TAC-a omogućile su bolju imunosupresiju (poboljšano preživljavanje presatka) u odnosu na imunosupresiju koja uključuje standardne doze CsA-a ili manje doze sirolimusa (42).

S obzirom na to da se radi o lijekovima uskoga terapijskog indeksa i značajne farmakokinetičke varijabilnosti potrebno je mjeriti koncentraciju lijeka u krvi (TDM) te shodno tome regulirati doziranje kako bi postigli optimalnu djelotvornost i minimalnu toksičnost (43). CsA i TAC su najučinkovitiji imunosupresivni lijekovi koji imaju slična fizikalno-kemijska svojstva i isti mehanizam djelovanja, ali su različite kemijske strukture (CsA - ciklički polipeptid, TAC - makrolidni lakton). Nazvani su inhibitori kalcineurina jer inhibicijom citoplazmatske kalcineurin-fosfataze onemogućuju sintezu protuupalnih citokina, odnosno suprimiraju aktivaciju T-limfocita čime zaustavljaju imunosnu reakciju organizma na presadak. CsA i TAC imaju sličan farmakokinetički profil, slabu bioraspoloživost jer su supstrati P-gp transportnoga proteina u crijevima i podliježu metabolizmu prvoga prolaska kroz jetru gdje ih metabliziraju CYP450 enzimi što utječe na njihov složen farmakokinetički profil (44).

## **1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika**

### *1.2.1. Farmakogenetika/farmakogenomika i personalizirana medicina*

Farmakogenetika odnosno farmakogenomika jest disciplina koja proučava genetičke uzroke individualne varijabilnosti u odgovoru na lijek. Prema uvriježenoj definiciji, farmakogenetika proučava utjecaj pojedinoga gena na učinkovitost i nuspojave lijeka, dok farmakogenomika ispituje utjecaje mnogih gena pa i čitavog genoma na učinkovitost i nuspojave pojedinog lijeka

(45). Navedeni se termini često upotrebljavaju naizmjenično s istim značenjem iako farmakogenomika obuhvaća šire područje i proteže se na razvoj novih lijekova koji ciljano djeluju na gene odgovorne za nastanak bolesti (46, 47). U oba slučaja radi se o ispitivanju varijabilnosti u farmakokinetičkom (engl. *absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME*) i farmakodinamičkom aspektu učinkovitosti lijekova koje su posljedica genetičkih varijanti (47).

Danas se koristi naziv personalizirana medicina koja se može opisati sljedećim riječima „engl. *right drug, right dose, right patient*“ – „odnosno pravi lijek u prikladnoj dozi za pravoga pacijenta, jer je usmjerena prema individualnim potrebama pacijenta i minimizaciji nuspojava lijekova nastalih primjenom propisanih terapijskih doza. Veliki broj kliničkih ispitivanja ukazuje na mogućnost pojave različitoga odgovora bolesnika na lijek koji se kod svih primjenjuje na isti način i za istu bolest. Kako bi došla do važnih kliničkih postignuća personalizirana medicina u današnje doba koristi sve dostupne tehnologije za identifikaciju povezanosti bolesti odnosno odgovora na lijek s genetičkim varijantama. Cilj personaliziranje medicine je pohrana dobivenih saznanja u kliničke aplikacije, njihovo korištenje u kliničkoj praksi te dostupnost genetičkoga testiranja svim bolesnicima, poglavito onima u siromašnim područjima. Genetičkim testiranjem, dobija se informacija o učinkovitosti lijeka i terapijskoj dozi, a toksični učinci lijekova svode se na najmanju moguću razinu pojavnosti što predstavlja i dodatnu uštedu za zdravstveni sustav (48).

Važne prekretnice za razvoj bioloških znanosti pa tako i personalizirane medicine bili su otkriće strukture DNA 1953., otkriće lančane reakcije polimeraze (PCR) 1985. te uvođenje metoda sekvenciranja što je omogućilo pokretanje velikoga međunarodnog znanstvenog projekta sekvenciranja humanoga genoma (engl. *Human Genome Project, HGP*) koji je završen 2003. Kroz ovaj projekt izvršena je analiza i mapiranje cjelokupnoga genetičkog materijala, odnosno lociran je svaki ljudski gen i njegova specifična struktura. Sekvenciranje ljudskoga genoma omogućilo je razvoj znanstvene discipline genetike/genomike, a u kliničkoj praksi identifikaciju genskih varijanti bolesnika prema kojima se može propisati terapija prilagođena genetičkom nasljeđu. Korištenje znanja o genetičkom nasljeđu odnosno personalizirane medicine može pomoći prilikom razvoja učinkovitih i djelotvornih lijekova za različite fenotipske podskupine pacijenata što osigurava bolji izbor lijeka, veću učinkovitost terapije i minimizaciju rizika nastanka nuspojava lijeka (48).

### 1.2.2. Farmakogenetički biljezi u klinici

Sve veći fokus akademske zajednice, farmaceutske industrije, regulatornih tijela i zdravstvenih stručnjaka na istraživanje genetičke povezanosti individualnoga odgovora na farmakoterapiju daje uvid u nova saznanja o interindividulanim razlikama na razini sekvencije DNA, bolje razumijevanje povezanosti učinaka pojedinih lijekova s određenim varijantama gena te daljni rast individualizirane farmakoterapije (47).

Identifikacija genskih polimorfizama, pri čemu se najčešće primjenjuje identifikacija polimorfizma jednoga nukleotida (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) znatno pomaže u predviđanju terapijskoga odgovora pojedinca na lijek s obzirom na učinak lijeka i eventualne nuspojave. Baze podataka o povezanosti polimorfizama s učinkom lijeka stalno se nadopunjuju novim podacima, a u tu svrhu važne su cjelogenomske studije povezanosti (engl. *Genome Wide Association Study*, GWAS) koje se provode u različitim etničkim skupinama. GWAS istražuje genetičke varijante u genomu pojedinaca kako bi se identificirala povezanost genotipa s određenim fenotipom. Farmakogenomika postaje važna karika personalizirane medicine s naglaskom na genetičke čimbenike koji utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova, ali i na bolje razumijevanje interakcija lijekova. Personalizirana medicina bi trebala svakako postati dijelom kliničke prakse s obzirom na stalni porast kroničnih bolesnika koji istovremeno boluju od više različitih bolesti pa uzimaju i veći broj lijekova što je dodatni izazov za kliničare prilikom propisivanja djelotvorne farmakoterapije (47).

U smjernici Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) iz 2018. navode se preporuke za provođenje genomskih studija s ciljem dobivanja važnih informacija o utjecaju genetičke varijabilnosti metaboličkih enzima, transportera i mjesta djelovanja lijeka (engl. *drug target*) na učinkovitost i sigurnost primjene lijeka. Dobivanje informacija o genetičkoj varijabilnosti važno je i za razvoj novih lijekova. Najnovije informacije o farmakogenetičkim preporukama za lijekove mogu se pronaći u sažetku opisa svojstava lijeka i uputi o lijeku koji se konstantno trebaju obnavljati s novim saznanjima ukoliko su ista dostupna (49). Na internetskim stranicama FDA-a nalazi se tablica koja se redovito ažurira, u kojoj se mogu pronaći popis lijekova i tekst vezan za farmakogenomičke informacije koje je potrebno navesti u informacijama o lijeku (50).

Kako bi farmakogenetičke informacije bile što dostupnije i kako bi se što brže implementirale prilikom propisivanja terapije, osnovane su mreže farmakogenetičkih društava, kao što su *The Pharmacogenomics Knowledge Base* (PharmGKB, <http://www.pharmgkb.org>) te CPIC-a i

Nizozemske radne skupine za farmakogenetiku (engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*, DPWG). Glavni cilj društava je izdavanje ažuriranih, recenziranih i na dokazima temeljenh preporuka/smjernica za doziranje lijekova prema farmakogenetičkom testiranju (pharmGKB, clinical annotations). Na stranicama PharmaGKB može se pronaći popis lijekova za koje su pojedina farmakogenetička društva izdala preporuke za farmakogenetičko testiranje (51).

### 1.2.3. Odnos genotip - fenotip

Interindividulana varijabilnost odgovora na farmakoterapiju ovisi o utjecaju genskih i vanjskih čimbenika (primjerice dijeta, pušenje, bolesti, drugi istodobno primijenjeni lijekovi) na metabolizam lijeka. Genska je raznolikost izvorište međuindividualnih, međuetničkih i rasnih razlika u reakciji na lijek (52). Farmakogenetički polimorfizam je definiran kao monogensko svojstvo koje u određenoj populaciji nastaje zbog prisutnosti više od jednoga alela na istom lokusu i više od jednog fenotipa u odnosu na međudjelovanje lijeka i organizma, učestalost pojavljivanja određenog alela je najmanje 1% (52).

Genski polimorfizam određuje četiri kategorije fenotipova obzirom na intenzitet metabolizma (53, 54):

- slabi/spori metabolizator (engl. *poor metabolizer*, PM), dovodi do nakupljanja specifičnih lijekova supstrata u organizmu što uzrokuje toksične učinke, radi se o autosomnom recesivnom svojstvu; spori metabolizatori nemaju aktivne alele i imaju više nuspojava pri propisanim dozama zbog smanjenoga metabolizma što dovodi do povećane koncentracije lijeka u organizmu;
- normalni metabolizator (engl. *normal metabolizer*, NM) ili ekstenzivni metabolizator (engl. *extensive metabolizer*, EM) očekivana osobina normalne populacije; imaju dva potpuno aktivna alela i reagiraju na prosječne doze lijeka u skladu s očekivanjima (u literaturi se nazivaju i brzi metabolizatori); najčešće se definira kao fenotip divljega tipa;
- vrlo brzi metabolizator (engl. *ultrarapid metabolizer*, UM) rezultat je amplifikacije gena, odlikuje se ubrzanom razgradnjom lijekova supstrata te je autosomno dominantno svojstvo; imaju više od dvije kopije aktivnih gena, pokazuju ubrzani metabolizam, a pri primjeni prosječnih doza teško je postići terapijsku koncentraciju lijeka pa posljedično tome i potrebnu učinkovitost lijeka;

- srednje brzi ili intermedijarni metabolizator (engl. *intermediate metabolizer*, IM) s jednim funkcionalnim divljim i drugim varijantnim alelom, odnosno radi se o homozigotima s dva alela sa smanjenom aktivnosti ili heterozigotima koji su nositelji jednoga neaktivnog alela; nuspojave se pojavljuju u manjem opsegu nego kod sporih metabolizatora.

2017. izdane su od strane CPIC-a smjernice za standardizaciju farmakogenetičkih termina s obzirom na brzinu metabolizma, s ciljem uspostavljanja jedinstvene i svima razumljive nomenklature kako bi se smanjilo nerazumijevanje kod interpretacije farmakogenetičkih analiza. Na primjer, termin ekstenzivni metabolizator neće se više koristiti u CPIC smjernicama već će se koristiti termin NM. Smjernicom je uvedena peta kategorija fenotipa *rapid metabolizer* za metabolički enzim CYP2C19 koji ima veću aktivnost od normalne aktivnosti enzima, ali manju aktivnost od vrlo brze aktivnosti enzima (55). U tablici su prikazani primjeri fenotipova koji zahtijevaju prilagodbu terapije prema preporuci u CPIC smjernici.

**Tablica 2.** Primjeri fenotipova koji zahtijevaju prilagodbu terapije (preuzeto i prilagođeno prema 55 uz dozvolu PharmGKB dostupnu pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)))

Gen	Visokorizični fenotip	Visokorizični lijek	CPIC preporuka
<b>CYP2C19</b>	CYP2C19 UM	citalopram	niske koncentracije lijeka, povećan rizik smanjenja djelovanja; razmotriti primjenu drugoga lijeka
<b>CYP3A5</b>	CYP3A5 EM	takrolimus	niske koncentracije lijeka ako se primjenjuju standardne doze lijeka; potrebno početnu dozu povećati 1,5 do 2 puta; daljnja prilagodba doze ili promjena terapije ovisi o drugim čimbenicima, interakcijama lijekova, funkciji jetre i dr. Primijeniti TDM u svrhu prilagodbe doze
<b>CYP2C9</b>	CYP2C9 IM	fenitoin	povećan rizik od toksičnih reakcija, razmotriti smanjenje doze za 25% u odnosu na standardnu dozu održavanja; za daljnju prilagodbu doze primijeniti TDM
<b>HLA-B*57:01</b>	HLA-B*57:01 pozitivan	abakavir	visoki rizik pojave ozbiljnih reakcija preosjetljivosti na abakavir; ne preporučuje se propisivati ovaj lijek, već primijeniti drugi lijek

Nomenklatura, odnosno način prikazivanja gena vrlo je važan alat komuniciranja u farmakogenetici jer se radi o načinu prikazivanja genotipa prema kojem se može predvidjeti pacijentov fenotip. U ovom doktorskom radu koristit će se način prikazivanja gena zvjezdicom; nadporodica – porodica - podporodica – izoforma, \*alel/haplotip, npr. *CYP3A5\*1*, u kojem \*1 oznaka govori da se radi o divljem tipu gena (ranije se označavao *wt* engl. *wild type*), koji se odnosi na potpuno funkcionalan gen i koji se najčešće pojavljuje u populaciji. Oznake npr. \*2, \*3 se primjenjuju za druge oblike gena, tzv. varijantni ili polimorfni aleli, ali ako se radi o različitim genima, ne može se pretpostaviti da sukladno oznaci geni imaju jednaku funkciju (\*2 kod jednoga gena može označavati izostanak funkcije, a kod drugoga smanjenu funkciju).

Drugi precizniji način označavanja je pomoću SNP-a s naznakom regije DNA. Pri tome se navodi oznaka iz koje je razvidno odnosi li se pozicija SNP-a u odnosu na početak gena (g.) ili početak kodirajuće regije (c.), zatim slijedi pozicija SNP-a, originalna baza i varijantna baza, primjerice *ABCG2* c.421 C>A. Najprecizniji je način označavanje pomoću referentne sekvencije (rs17868320), jer je jedinstvena i odnosi se na određeni SNP određenoga gena.

#### 1.2.4. Metabolizam lijekova

Glavnu ulogu u detoksifikaciji lijekova, metabolizmu i njihovom izlučivanju imaju metabolički enzimi reakcija faze I. metabolizma (oksidacijske reakcije) i reakcija faze II. metabolizma (konjugacijske reakcije). Metaboliti koji nastaju u reakcijama faze I. su polarni (alkoholi, fenoli, ugljična kiselina) i mogu se izlučiti iz organizma, međutim većina spojeva prolazi kroz fazu II. u kojoj kroz reakcije konjugacije s  $\alpha$ -aminokiselinama i endogenim aminima, metilacije, acetilacije, sulfokonjugacije i glukuronidacije (funkcionalne skupine nastale u fazi I. dalje služe kao mjesta konjugacije). Većina lijekova ima lipofilna svojstva te se reakcijama biotransformacije pretvara u hidrofilnije oblike topljivije u vodi kako bi se lakše eliminirale iz organizma i to najčešće putem bubrega ili jetara (56).

#### 1.3. Citokrom P450 (CYP)

Sustav citokroma P-450 (CYP) je enzimski sustav za biotransformaciju endogenih i egzogenih supstrata uključujući i lijekove. Najvažnija je superporodica enzima koja se pojavljuje u 50 oblika, najčešće kao oksidaze, reduktaze i hidrolaze. Najveće količine nalaze se u membranama endoplazmatske mrežice (uglavnom u jetrima) iako se može naći i u drugim tkivima i organima

(crijeva, pluća, mozak, limfociti, placenta, bubrezi i posteljica). Danas je poznato 57 funkcionalnih gena i 58 pseudogena za CYP-ove (57). Samo desetak CYP enzima, koji pripadaju porodicama CYP1, CYP2 i CYP3 sudjeluje u metabolizmu lijekova (58). Od svih CYP enzima njih 12 katalizira oko 93 % metaboličkih reakcija, CYP1A2, 2D6, 2C9 i 2C19 sudjeluju u oko 40 % reakcija, a ako se pribroji i CYP3A4 onda kataliziraju oko 60 % reakcija (59). CYP enzimi su najvećim dijelom zaslužni za varijabilnu farmakokinetiku lijekova. Od 57 moguće funkcionalnih CYP enzima, njih negdje oko 12, najčešće su pripadnici porodica CYP 1, 2 i 3, sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika od čega najveći dio (oko 70-80 %) enzima sudjeluje u metabolizmu lijekova koji se koriste u farmakoterapiji. U jetri su najzastupljeniji CYP3A4, 2C9, 2C8, 2E1 i 1A2, u manjim količinama 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 i 3A5, a porodice CYP 2J2, 1A1 i 1B1 su najčešće prisutne u drugim organima (54, 60).

### 1.3.1. Polimorfizmi citokroma P450 3A (CYP3A) 3A4, 3A5

Enzimi CYP3A4 i CYP3A5 dominantno su izraženi u ljudskoj jetri i crijevima, dok se CYP3A5 nalazi i u drugim tkivima. Fiziološki supstrati ovih enzima su steroidi, masne kiseline, prostaglandini, leukotrieni i biogeni amini dok egzogene supstrate čine lijekovi, biljni toksini i toksične kemikalije iz okoline. CYP enzimi najčešće kataliziraju reakcije oksidacije, djelujući kao monooksigenaze, oksidaze i peroksidaze, ali mogu sudjelovati i u redukcijским reakcijama. (53). Podporodicu enzima CYP3A čine CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 i CYP3A43, a istoimeni geni su smješteni na kromosomu 7q22.1 (61). Danas postoje dokazi da je u klinici korisna primjena prediktivnoga fenotipa CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* (62) te je izrađena i smjernica CPIC-a kojom se daju preporuke za doziranje TAC-a na temelju rezultata genetičkoga testiranja (40.)

Prema podacima iz literature za *CYP3A4* do danas je poznato oko 46 SNP-ova, opisano je 25 različitih alela u odnosu na divlji tip *CYP3A4\*1*. Najzanimljivija i najviše proučavana inačica jest *CYP3A4\*22* (rs35599367, C>T, intron 6). Ona se povezuje sa smanjenim izražajem jetrene mRNA i smanjenom aktivnošću enzima (39), a njezina je pojavnost u bjelačkoj populaciji 5-7 % (62), kod Amerikanaca 3 % dok kod Azijata i Afrikanaca nije otkrivena (63).

Polimorfizam *CYP3A4\*1B* nalazi se u promotorskoj regiji i povezan je s povećanom aktivnošću enzima CYP3A4 (39). Najčešće istražen i u literaturi opisan je SNP *CYP3A4\*1B* (-392 A>G, rs2740574), a divlji tip alela je *CYP3A4\*1*. Učestalost *CYP3A4\*1B* alela ovisi o pripadnosti etničkim skupinama, velika kod Afrikanaca i Afroamerikanaca (50-80 %), vrlo rijetka kod

bijelaca (3-5 %), a nije zabilježena u kineskoj i japanskoj populaciji (54). Polimorfizam *CYP3A4\*1B* u snažnoj je neravnotežnoj vezi (LD, engl. *linkage disequilibrium*) s alelom *CYP3A5\*1* što otežava procjenu pojedinačnoga učinka ovih varijanti na varijabilnost *CYP3A* (64). Studija provedena u hrvatskoj populaciji promatrala je učestalost varijanti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3*, rezultati ukazuju na visoku prevalenciju varijante *CYP3A5\*3* (oko 90 % bolesnika je nositelj *CYP3A5\*3/\*3* varijante, *non-ekspresori*) te rijetku prisutnost alela *CYP3A4\*1B* (1,4 %) i *CYP3A4\*22* (2,7 %) što je u skladu s rezultatima u drugim europskim populacijama (65). Do danas je za *CYP3A5* otkriveno 26 SNP-ova (aleli \*1-\*9), divlji tip alela je *CYP3A5\*1*, a varijantni aleli (\*3, \*6 ili \*7) rezultiraju krnjom, skraćenom mRNA koja kodira sintezu proteina sa smanjenom funkcijom ili bez funkcije. Među svjetskom populacijom najzastupljeniji polimorfizam je *CYP3A5\*3*, polimorfizmi *CYP3A5\*6* i *CYP3A5\*7* su najčešći u afričkoj populaciji dok su vrlo rijetki ili ih uopće nema u azijskoj i bjelačkoj populaciji (39, 66).

Homozigotni i hetereoziotni nositelji divljega tipa alela *CYP3A5\*1* imaju normalne ili malo smanjene količine *CYP3A5* mRNA pa time i slične količine funkcionalnog enzima *CYP3A5* stoga ove osobe nazivamo ekspresori *CYP3A5*. Prema genotipu bolesnike se klasificira kao PM-ove (homozigoti *CYP3A5\*3/\*3*), IM-ove (heterozigoti *CYP3A5\*1/\*3*) ili EM-ove (homozigoti *CYP3A5\*1/\*1*) (67). Učestalost pojavljivanja divljega tip alela *CYP3A5\*1*, odnosno aktivnoga enzima u bjelačkoj je populaciji 3 do 15 %, 30 % u azijskim te 65 - 85 % u afričkim populacijama (68).

Najistraženiji i u literaturi najzastupljeniji polimorfizam je *CYP3A5\*3* (rs776746) kojega karakterizira supstitucija nukleotida A u G na poziciji 6986 *CYP3A5* gena u ntronu 3. Klinička značajnost ovoga polimorfizma je u njegovoj pojavnosti od 30 % u azijskoj populaciji i 65-85 % u afričkoj populaciji. Divlji se tip u bjelačkoj populaciji pojavljuje u manjoj učestalosti (3-15 %) od varijantnog alela što znači da je oko 90 % bjelačke populacije *non-ekspresor* enzima *CYP3A5*. Polimorfizam *CYP3A5\*3* dovodi do preranoga završetka procesa translancije proteina te se stvara „krnji“ nedovršeni enzim koji ima smanjenu aktivnost. Homozigotni nositelji alela *CYP3A5\*3* nemaju ili imaju vrlo male količine funkcionalnoga *CYP3A5* enzima i nazivaju se *non-ekspresori* i *CYP3A5* (39, 63).



#### 1.4. Polimorfizmi enzima UGT (UGT1A9, UGT2B7)

Porodice enzima koje sudjeluju u reakcijama konjugacije su uridin-difosfat-glukuronozil-transferaze (UGT), sulfotransferaze (SULT), glutation-S-transferaze (GST), N-acetiltransferaze (NAT) i tiopurin-metiltransferaze (TPMT) (56).

UGT enzimi ključni su enzimi koji sudjeluju u metabolizmu različitih egzogenih i endogenih spojeva. Reakcije konjugacije katalizirane UGT enzimima predstavljaju najznačajniji put detoksifikacije velikoga broja lijekova, kancerogena i njihovih oksidirajućih metabolita te različitih kemijskih tvari. Putem reakcije glukuronidacije kod ljudi se metabolizira otprilike 40-70 % lijekova. UGT-transferaze kataliziraju reakcije glukuronidacije u kojima se glikozilna skupina s uridindifosfat-glukuronske kiseline (UDPGK) prenosi na različite endogene i egzogene supstrate i njihove metabolite (69).

Danas je poznato 117 UGT superporodica enzima. Kod ljudi su na temelju sličnosti slijeda aminokiselina klasificirani u četiri porodice: UGT1, UGT2 (uključujući subporodicu UGT2A i UGT2B), UGT3 i UGT8 (69.). Najčešće su lokalizirani na membranama endoplazmatskoga retikula (69), a najzastupljeniji su u jetri, crijevima i bubrežima (70). Jetra je organ u kojem je najveći izražaj UGT enzima. Za konjugaciju ksenobiotika bitnu ulogu imaju UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7 i UGT2B15. UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10 su dominantno izraženi u izvanhepatičkim tkivima (69).

Za enzime UGT1A8 i UGT1A10 se smatra da nemaju utjecaj na bioraspoloživost oralno primijenjenih lijekova, jer nisu prisutni u jetri, ali se pretpostavlja da intestinalni enzimi UGT1A8 i UGT1A10 imaju važnu ulogu u metabolizmu prvoga prolaska budući da mogu uzrokovati nisku oralnu bioraspoloživost (70).

Enzim UGT1A9 se u najvećim količinama nalazi u jetri, jedan je od najaktivnijih UGT enzima te sudjeluje u metabolizmu velikoga broja lijekova i njihovih metabolita. Pokazuje veliku aktivnost u konjugaciji metabolita antitumorskoga lijeka irinotekana, a njegovi polimorfizmi smanjuju aktivnost enzima te posljedično ne dolazi do glukuronidacije metabolita što utječe na učinkovitost terapije (71). Što se tiče imunosupresivnih lijekova, UGT1A9 je najviše uključen u metabolizam MPA-a, te predstavlja najvažniji hepatički enzim za glukuronidaciju MPA-a u MPAG. Najznačajniji polimorfizmi su  $-2152 C>T$  i  $-275 T>A$  koji utječu na pojačanu aktivnost enzima u jetrenim mikrosomima. U studijama koje su proveli Girard i suradnici (2004. i 2005.) sudjelovali su bolesnici na terapiji MPA-om i TAC-om, a rezultati su pokazali da ova dva polimorfizma  $UGT1A9-2152 C>T$  (rs17868320) i  $UGT1A9-275 T>A$  (rs6714486) mogu

utjecati na smanjenje bioraspoloživosti MPA-a i eneterohepatičko recikliranje (72). Druge provedene studije također su potvrdile ovaj nalaz odnosno povezanost navedenih polimorfizama s pojačanom glukuronidacijom MPA-a u MPAG te posljedično smanjenjem koncentracije MPA-a u ranoj fazi nakon transplantacije bubrega (73, 74). Navedeni rezultati su dodatno potvrđeni studijom Van Schaika i suradnika koja bilježi povezanost polimorfizama *UGT1A9* sa smanjenom bioraspoloživosti MPA-a (za 20 %), što je konzistentno s pojačanom aktivnosti enzima, a time i s većim rizikom za akutno odbacivanje bubrega na terapiji MMF-om i TAC-om. Dodatno je uočeno da nositelji polimorfizma *UGT1A9\*3* (-98T>C) imaju veću bioraspoloživost MPA-a zbog smanjene aktivnosti enzima (75). Nasuprot ovim nalazima, neke studije u kojima su pacijenti uzimali CsA ili makrolidne lijekove, nisu našle povezanost polimorfizama gena *UGT1A9* i farmakokinetike MPA-a (76-78).

Za polimorfizam -331 T>C, koji je u promotorskoj regiji gena i u potpunoj je ravnotežnoj povezanosti (engl. *complete linkage*) s polimorfizmima -440C>T, 665C>T i -1818T>C, nalaze se kontradiktorni rezultati studija koje su proučavale njihov utjecaj na farmakokinetiku MPA-a i MPAG-a. U studiji koju je proveo Baldelli sa suradnicima sudjelovalo je 40 pacijenata (bjelačka populacija) koji su bili na terapiji CsA-om i MMF-om, bez kortikosteroida. Ispitali su utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku MPA-a te su dobili različite farmakokinetičke profile MPA-a na temelju čega su zaključili da MPA pokazuje značajnu farmakokinetičku varijabilnost među pojedinim pacijentima. Konačan zaključak studije je da je značajan utjecaj polimorfizama 440 C>T i -331 T>C na farmakokinetiku MPA-a kod pacijenata s transplantiranim bubregom, pri čemu varijante 440TT i 665CT utječu na povećanje bioraspoloživosti MPA-a, ali ne i MPAG-a (79). Nasuprot ovom nalazu, u kineskih ispitanika koji su uzimali TAC za genotip 440CT je zabilježeno povećanje MPAG AUC 0-12 h, dok su nositelji genotipa 1818CC imali manje vrijednosti AUC-a (80). Međutim neke druge studije nisu pokazale povezanost ovih polimorfizama s bioraspoloživosti MPA/MPAG-a (76).

U literaturi se nalaze podatci koji ukazuju na povezanost polimorfizama *UGT1A8* i *UGT2B7* s nuspojavama MPA-a (prvenstveno gastrointestinalne i hematološke komplikacije) (81-83) iako studija koja je provedena na japanskim bolesnicima s transplantiranim bubregom na terapiji MMF-om i TAC-om nije utvrdila utjecaj polimorfizama *UGT1A8\*2* i *UGT2B7\*2* na farmakokinetiku MPA-a (84). Hepatički enzim UGT2B7 najvažniji je enzim ove porodice koji se u najvećim količinama nalazi u jetri i crijevima, a uključen je u metabolizam MPA-a pri čemu nastaje metabolit Ac-MPAG (85), a sudjeluje i u metabolizmu velikog broja lijekova (uključujući opioide morfin i kodein, nesteroidne protuupalne lijekove (69) i zidovudin (86).

### 1.5. Farmakogenetika prijenosnika lijekova

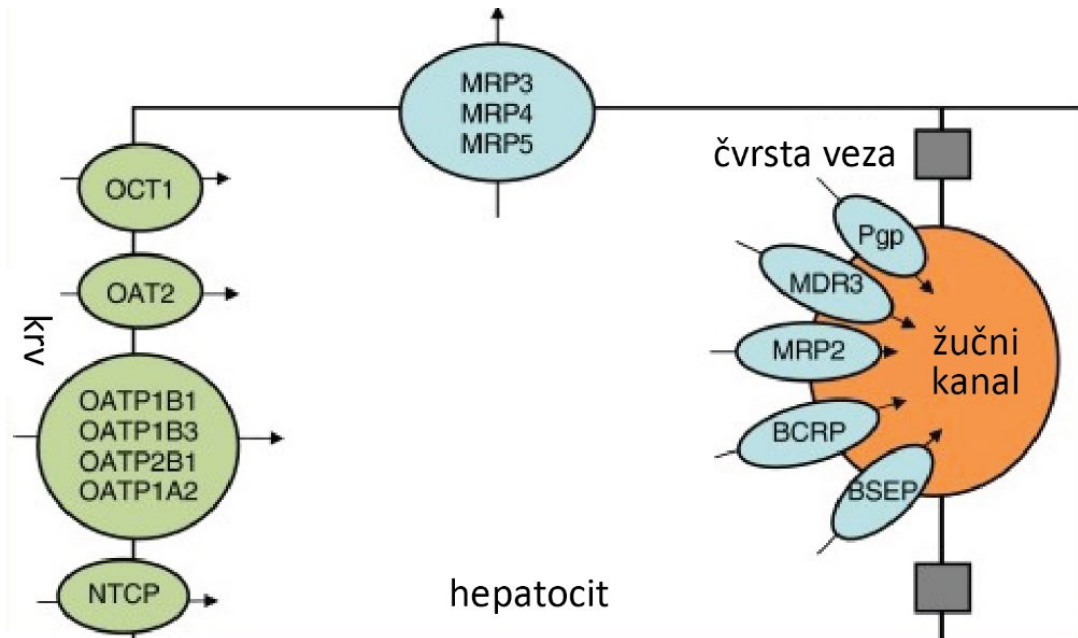
Uz ranije navedene dvije faze reakcija biotransformacije, posljednjih godina porasla je i važnost uloge transportnih proteina koji čine fazu III metabolizma i imaju važnu ulogu u prijenosu lijekova preko različitih staničnih membrana (87). Membranski proteinski prijenosnici (transporteri) jesu proteini specifični za prijenos lijekova, ksenobitka, metabolita i endogenih tvari, na način da reguliraju ulazak važnih nutrijenata i iona u stanicu, a iz stanice izbacuju toksine i stanični otpad. Sudjeluju u procesu intestinalne apsorpcije, transportu preko krvno-moždane barijere, jetrenom metabolizmu odnosno izučivanju u žuč i eliminaciji putem bubrega. (88). Imaju ključnu ulogu u reakcijama apsorpcije, distribucije i eliminacije lijekova pa utječu na koncentraciju lijekova u plazmi i tkivu te pojavu neželjenih učinaka lijekova (89).

Lokalizirani su u organima u kojima se odvijaju reakcije biotransformacije i izlučivanja lijekova (epitelne stanice tkiva jetre, bubrega i crijeva) te imaju funkciju tzv. čuvara prolaza jer kontroliraju pristup lijekova metaboličkim enzimima i putevima izlučivanja i tako sprečavaju da u krv dospiju toksične supstance (89). Osim u navedenim tkivima, nalazimo ih još na apikalnoj membrani krvno-moždane barijere, placente, testisa i limfocita, a sudjeluju u raspodjeli lijekova intracelularno, u plazmi i likvoru (90).

Faza metabolizma u kojoj sudjeluju transporteri zove se i faza III, a ovisno o smjeru prijenosa preko stanične membrane mogu biti prijenosnici koji unose supstrate u stanicu (engl. *influx*) ili transporteri koji iznose (engl. *efflux*) supstrate iz stanica aktivnim prijenosom uz korištenje energije (ATP-hidrolaze) ili olakšanim prijenosom bez utroška energije (91). Transporteri lokalizirani u crijevima i jetri kontroliraju dostupnost lijeka u sistemskej cirkulaciji tako što određuju količinu lijeka koja iz lumena crijeva ulazi u tijelo te utječu na količinu lijeka koja uspije izbjeći metabolizam u crijevima i jetri (92). Većina transportera su izbacivački, efluksni transporteri, prenose supstrate iz unutarstaničnoga u izvanstanični prostor, dok manji broj transportera pripada ubacivačkim, influksnim, koji ubacuju supstrate u stanicu. Farmakokinetički profil brojnih lijekova pod utjecajem je aktivnosti transportera, stoga se danas sve više pozornosti pridaje otkrivanju polimorfizama gena koji kodiraju sintezu transportera pa se sukladno tome razvija i područje farmakogenetike koje se bavi ulogom transportera (88).

U prijenosu lijekova najčešće sudjeluju dvije glavne nadporodice membranskih prijenosnika koji utječu na bioraspoloživost lijekova: ABC (engl. *ATP Binding Cassette*) i SLC (engl. *Solute Carrier*) prijenosnici. ABC su izbacivački transporteri, najveća skupina transportera koja je

ujedno i najviše istražena. Unutar ABC nadporodice razlikuju se dvije najvažnije skupine prijenosnika: to su proteini višestruke rezistencije na lijekove MRP (engl. *Multidrug Resistance Protein, MRP*) i protein rezistencije karcinoma dojke BCRP (engl. *Breast cancer Resistance protein*) (93). Najviše istraženi ABC transporteri jesu P-glikoprotein i transmembranski regulator cistične fibroze (CFTR, kodiran genom *ABCC7*) (91).



**Slika 7. Prikaz lokalizacije transportnih proteina na hepatocitima** (preuzeto i prilagođeno prema 89 uz dozvolu dostupnu pod [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/))

U ljudskom genomu poznato je 49 gena koji kodiraju ABC proteine i koji su podijeljeni u sedam podklasa i obitelji (ABCA do ABCG). Posljednjih godina otkrivene su brojne varijacije u genima koji kodiraju ABC transportere, razmatrana je njihova različita učestalost u pojedinim etničkim skupinama, a poseban naglasak je dan na specifične supstrate, na njihov značaj na mRNA i ekspresiju proteina te na njihovu ulogu u moduliraju metabolizma lijekova što u konačnici rezultira varijabilnim odgovorom na primijenjeni lijek (90).

Najpoznatiji ubacivački transportni proteini koji omogućuju ulazak malih molekula u stanicu pripadaju nadporodici prijenosnika SLC (engl. *solute carrier*) koja uključuje 52 porodice i 395 transportera. Najpoznatiji prijenosnici lijekova iz ove nadporodice jesu organski anionski transportni polipeptidi (OATP, engl. *organic anion transporters*), a klinički važni su OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 i OATP2B1 (94). Pojačana ekspresija transportera kod tumorskih stanica uzrokuje rezistenciju na lijekove. Polimorfizmi gena koji kodiraju

transportere značajno pridonose pojavi određenih nasljednih bolesti kao što su cistična fibroza, neurološke bolesti, degeneracija mreženice, poremećaji prijenosa kolesterola i poremećaji u žučnom transportu (91). U crijevima se nalaze izbacivački transporteri P-glikoprotein, MRP i BCRP. Njihova pojačana ekspresija na luminalnoj strani crijeva smanjuje bioraspoloživost lijekova supstrata. Od ubacivačkih transportera najčešće su u crijevima prisutni OATP3A1, OATP4A1, OCT1 i OCT2. Izbacivački transporteri mogu biti odgovorni za rezistenciju na lijekove pa posljedično tome i za nedjelotvornost primijenjene terapije (89).

#### 1.5.1. Polimorfizmi ABCB1 (P-glikoprotein / MDR1)

P-glikoprotein (engl. *Permeability-glycoprotein*, P-gp), u literaturi poznat i pod nazivom ABCB1/MDR1, kodiran genom *ABCB1/MDR1*, efluksni je prijenosnik koji energiju crpi iz ATP-a, izbacuje supstrate iz stanice u izvanstanični medij, često protiv koncentracijskoga gradijenta te tako modulira bioraspoloživost lijekova-supstrata. Nalazi se u stanicama crijeva, bubrega, jetre, gušterače, posteljice, krvno-moždane barijere, limfocitima te makrofagima. U crijevima kontrolira apsorpciju lijeka nakon primjene (95). Ekspresija i aktivnost P-gp-a ovise o polimorfizmima gena *ABCB1*. Najviše je istražen polimorfizam  $3435C>T$  koji je u snažnoj neravnotežnoj vezi s tihim polimorfizmom (engl. *silent polymorphisms*)  $1236C>T$  i s polimorfizmom  $2677 G>T/A$  zato se često proučavaju zajedno kao haplotip koji se obilježava kao *P-gp\*2* (96). Rezultati studija o utjecaju polimorfizma  $3435C>T$  nisu jednoznačni, odnosno jedni autori navode da ovaj SNP utječe na stabilnost molekule mRNA što rezultira smanjenom razinom mRNA i posljedično manjim količinama proteina, dok drugi ukazuju na povećanu količinu proteina i pojačanu aktivnost P-gp-a. Najčešći supstrati su antitumorski lijekovi, etopozid, tenipozid, doksorubicin, vinblastin, vinkristin, daunorubicin, irinotekan, paklitaksel i docetaksel (97).

P-gp je otkriven u tumorskim stanicama iz kojih je izbacivao antitumorske lijekove što je prouzročilo rezistenciju na lijekove i onemogućilo djelovanje antitumorskih lijekova odakle i potječe naziv *protein višestruke rezistencije na lijekove* (98). Polimorfizam  $3435C>T$  utječe na farmakokinetiku digoksina na način da nositelji ovog polimorfizma imaju za 38 % veće plazmatske koncentracije digoksina u odnosu na osobe koje su nositelji divljega tipa gena  $3435 CC$ . Veliki broj lijekova su supstrati P-gp-a i enzima CYP 450 poglavito CYP3A4. Promjena aktivnosti transportera dovodi do klinički značajnih interakcija lijekova supstrata što se pokazalo značajnim kod lijekova uske terapijske širine. Istraživanja pokazuju da telaprevir

(inhibitor virusne proteaze) značajno inhibira CYP metaboličke enzime i aktivnost P-gp-a što dovodi do značajne izloženosti visokim koncentracijama CsA-a i TAC-a (98).

P-gp ima važnu ulogu u farmakokinetičkoj varijabilnosti, raspodjeli i interakcijama lijek-lijek te je i dobar supstrat za lijekove koji se koriste u liječenju HIV-a (inhibitori HIV proteaze) (98). Otkrivena je njegova uloga u patogenezi neuropsihijatrijskih poremećaja, primjerice pokazuje smanjenu aktivnost kod pacijenata koji imaju Alzeihmerovu bolest (99).

Otkrićem uloge transportnih proteina u bolestima, povećao se interes za razvoj novih lijekova koji ih mogu inhibirati. Konkomitantna primjena supstrata i inhibitora P-gp-a može mijenjati farmakokinetiku lijekova povećavajući njihovu bioraspoloživost i sistemsku izloženost te uzrokovati neželjene nuspojave i toksičnost. Razumijevanje i identifikacija interakcija lijekova u konkomitantnoj terapiji, važan je alat za procjenu rizika tijekom propisivanja politerapije. U literaturi je opisan ozbiljan slučaj bolesnice koja je uzimala atorvastatin, esomeprazol i klaritromicin što je uzrokovalo rhabdomiolizu zbog inhibicije P-gp-a s esomeprazolom što je posljedično smanjilo metabolizam atorvastatina i njegovo izlučivanje (100). Hrana također stupa u interakciju s P-gp-om, primjerice sok grejpa, koji je poznati inhibitor CYP450 enzima i uzrokuje povećanu bioraspoloživost lijekova supstrata. Izbacivački proteini utječu na farmakokinetiku brojnih lijekova budući da moduliraju apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lijekova za razliku od CYP enzima koji sudjeluju samo u metaboličkim reakcijama lijekova (101). Objavljen je i slučaj 46-godišnje pacijentice koja je tijekom dvije godine istodobno uzimala diklofenak, atorvastatin, simvastatin/fenofibrat i nekoliko drugih lijekova, uključujući pantoprazol i furosemid što je uzrokovalo mialgiju te akutno zatajenje bubrega i jetre. Provedeno je farmakogenetičko testiranje metaboličkih enzima prve faze (CYP P450), enzima druge faze (UGT) te membranskih prijenosnika (ABC i SLC). Zaključak provedenoga ispitivanja je da su neželjene nuspojave posljedica interakcije lijekova i varijanti farmakogena koji kodiraju metaboličke enzime (CYP, UGT) i membranske prijenosnike ABCB1, ABCG2 i SLCO1B1. Polimorfni farmakogeni mogu značajno modulirati/povećavati raspon interakcija lijek-lijek, produžujući njihovu bioraspoloživost koja rezultira nastankom nuspojava (102).

Polimorfizam *ABCB1* u kombinaciji s varijantama gena niske aktivnosti *CYP3A4* i *CYP3A5* može značajno modificirati sistemsku i intrarenalnu izloženost kalcineurinskim inhibitorima, što može povećati rizik razvoja nefrotoksičnosti i odbacivanja presatka (95). Posljednjih godina sve je više spoznaja o transportnim proteinima koji imaju značajnu ulogu u metabolizmu lijekova (raspodjeli lijeka u organizmu), manifestaciji bolesti i terapijskom liječenju bolesti te

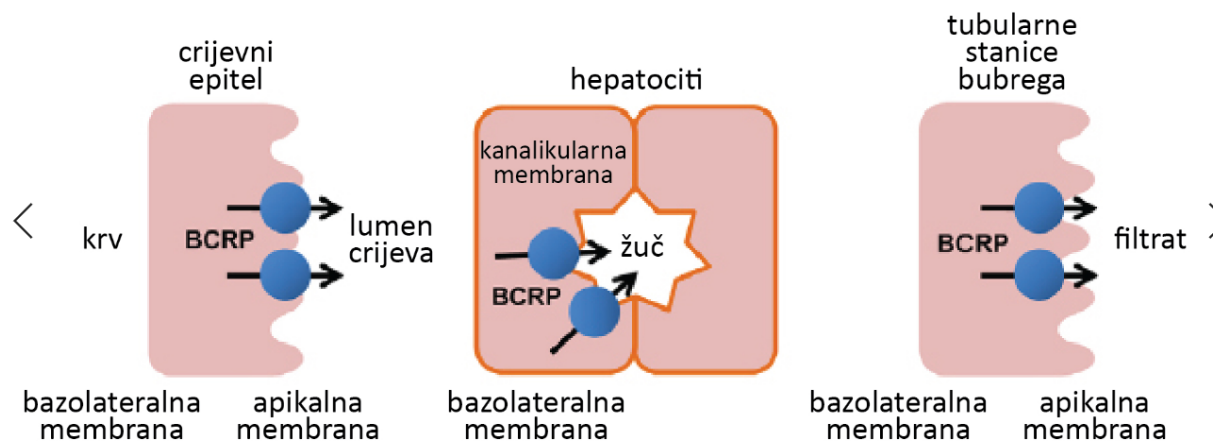
interakcijama lijekova. Nove spoznaje o ulogama transportnih proteina u organizmu, prvenstveno njihova uloga kao ciljnih mjesta na koje se lijek veže te uloga u prijenosu lijekova u specifična tkiva i organe, koriste se tijekom razvoja novih lijekova pri čemu je važno ustanoviti jesu li novi lijekovi supstrati i/ili inhibitori transportnih proteina.

### 1.5.2. Polimorfizam ABCG2

*ABCG2* je gen koji kodira sintezu efluksnoga prijenosnika BCRP-a (engl. *breast cancer resistance protein*), pripada ABC nadporodici i za svoju aktivnost crpi energiju iz ATP-a. Nalazi se na apikalnim stranama staničnih membrana placente, mozga, prostate, gastrointestinalnoga trakta, testisa, ovarija, hepatocita, bubrežnih tubula, matičnih stanica, adrenalnih žlijezda, uterusa, žuči, središnjem živčanom sustavu te endotelu vena i kapilara. BCRP sudjeluje u apsorpciji, distribuciji i eliminaciji endogenih i egzogenih supstarata. Od svih tkiva najviše je izražen u mozgu, cerviksu, tankom crijevu i uterusu te bubrezima i jetri gdje posreduje u eliminaciji supstrata iz krvi (103). ABCG2 je smješten na apikalnoj membrani stanica crijeva i bubrega i kanalikularnoj membrani žučnih kanalića gdje prenosi supstrate na luminalnu stranu organa. Ima funkciju izlazne crpke djelujući kao zaštitna barijera organizma sprječavajući apsorpciju ksenobitika i povećavajući ekskreciju toksina. Budući da mu je fiziološka funkcija reguliranje intestinalne apsorpcije te lučenje supstrata putem žuči i bubrega, smanjena aktivnost transportera zbog polimorfizma ili interakcije lijekova (inhibicija transportera) može značajno mijenjati farmakokinetiku primijenjenih lijekova (104). Veća ekspresija BCRP-a detektirana je kod solidnih i hematoloških tumora što ukazuje na važnost njegove uloge u rezistenciji na antitumorske lijekove budući da je većina antitumorskih lijekova supstrat transporta putem BCRP-a (105).

BCRP sudjeluje u prijenosu širokoga spektra lijekova, ima i dosta preklapanja u prijenosu jer mnogi ksenobiotici koji su supstrati BCRP također su i supstrati P-gp-a te proteina višestruke rezistencije na lijekove MRP2 (engl. *Multidrug Resistance Protein – 2*). S obzirom na navedeno, ova tri transportera imaju klinički značaj pa su i najviše ispitivani transporteri nadporodice ABC (106). Povećana aktivnost i ekspresija BCRP transportera, uzrokovana genskim varijacijama najčešće je povezana s rezistencijom na antitumorske lijekove pa je iz toga razloga *International Transporter Consortium* proglasio ABCG2 farmakogenom s klinički važnim polimorfizmima (107).

Danas je prepoznata njegova klinička važnost zbog uloge u apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijekova. Primarna uloga mu je funkcija izbacivačke pumpe na apikalnoj membrani enterocita, umanjujući intestinalnu apsorpciju slabo permeabilnih molekula te izbacivanje supstrata u kanaliće između stanica, transportirajući ih iz hepatocita u žuč. Dakle, intestinalni ABCG2 djeluje na razini apsorpcije tvari, dok prijenos na razini jetra-žuč ima glavnu ulogu u hepatičkom klirensu lijekova (103).



**Slika 8.** Izbacivački prijenosnici BCRP izraženi na membranama crijeva, jetre i bubrega iznose lijekove i njihove metabolite u lumen crijeva, žuč i filtrat (preuzeto i prilagođeno prema 108 uz dozvolu dostupnu pod [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/))

Slijedom navedenoga, može se zaključiti da transporter ABCG2 pokazuje značajnu ulogu u interakcijama lijek-lijek što je prepoznato i od strane regulatornih agencija, EMA-e i FDA-a, koje su izdale preporuke o važnosti polimorfizma *ABCG2*. Prema preporukama, tijekom razvoja novih lijekova potrebno je provesti ispitivanja koja će pokazati jesu li novi lijekovi supstrati ili inhibitori ABCG2 i stupaju li u interakcije na razini transporta putem ABCG2. Smjernice su važne kod onih lijekova koji imaju dobru topljivost, ali slabu propusnost zbog aktivnosti izbacivanja lijeka koje je posredovano prijenosnikom ABCG2 (109, 110). Interakcije lijek –lijek na razini BCRP mogu ozbiljno utjecati na učinkovitost BCRP supstrata, osobito onih lijekova s uskim terapijskim indeksom (111). Prilikom istovremene primjene lijeka supstrata BCRP s lijekom inhibitorom BCRP-a važno je uzeti u obzir sigurnost farmakoterapije budući da se povećava oralna bioraspoloživost lijeka supstrata (povećavaju se plazmatske koncentracije) i smanjuje se hepatički klirens lijeka supstrata, navedene interakcije mogu još nastati i zbog inhibicije transporta lijekova u hepatocite putem OATP prijenosnika (112).



Neaktivne se varijante gena *ABCG2* povezuju s povećanom bioraspoloživosti lijekova supstrata i nastankom nuspojava. Uporište za ovu tvrdnju nalazi se i u studiji Mirošević Skvrce i suradnika koja opisuje nuspojave atorvastatina povezane s polimorfizmima *ABCG2* (113). Studija je uvrštena u PharmGKB, bazu podataka iz koje se crpe saznanja za stvaranje uputa i smjernica za kliničku praksu. Tako su 2022. izdane upute i smjernice koje povezuju i polimorfizam *ABCG2* (uz *CYP2C9* i *SLCO1B1*) s primjenom statina (114). Studija Klarica Domjanović i suradnika iznosi važne dokaze o bitnoj ulozi varijabilne aktivnosti *ABCG2* na domete interakcije lijekova. Autori opisuju značajnu varijabilnost u dometu interakcija valproata i lamotrigina ovisnu o polimorfizmu *421 C>A* gdje valproat povisuje koncentraciju lamotrigina u nositelja divljega tipa alela (2,3 puta) te značajno više (5,3 puta) u nositelja varijantnog alela (115).

U metabolizmu lijekova koji su prepoznati kao supstrati ili inhibitori *ABCG2* prijenosnika sudjeluju i metabolički enzimi i drugi transporteri te je zbog mogućeg preklapanja s drugim metaboličkim i transportnim putevima klinički utjecaj prijenosnika *ABCG2* u interakcijama lijek-lijek teško odrediti, te stoga postoji potreba za definiranjem doprinosa pojedinih transportnih sustava u interakcijama lijekova (95).

U tablici 3. navedeni su lijekovi koji su supstrati i inhibitori *ABCG2*.

**Tablica 3.** Poznati supstrati i inhibitori prijenosnika *ABCG2* (preuzeto i prilagođeno prema 103 uz dozvolu Wolters Kluwert Health, Inc.)

<p><b><u>Supstrati</u></b> : 5-fluorouracil, abakavir, atorvastatin, azidopin, ciprofloksacin, daunorubicin doksorubicin, efavirenz, epirubicin, erlotinib, eritromicin, etopozid, flavopiridol, fluvastatin, folatna kiselina, ganciklovir, gefitinib, glutation, gliburid, homokaptotecin, imatinib, irinotekan, lamivudin, metotreksat, mitoksantron, nilotinib, pantoprazol, feoforbid A, heterociklički amini, pitavsatatin, porfirin, pravsatatin, riboflavin, rosuvastatin, sorafenib, sulfasalazin, sulfatni estrogeni, sunitinib, tamoksifen, tarikvidar, topotekan, urati, Vitamin K3, zidovudin, 7-etil-10-hidroksikamptotecin</p>
<p><b><u>Inhibitori</u></b> : atazanavir, derivati kromanona, kurkumin, ciklosporin A, delavirdin, fumitremorgin C (FTC) Kol143, itrakonazol, ketokonazol, lopinavir, nelfinavir, poloksamin, reserpin, ritonavir, sakvinavir, sirolimus, takrolimus</p>

U literaturi je opisano 38 polimorfizama gena *ABCG2*. Najviše istraženi jest polimorfizam V12M (*34 G>A*), s varijabilnom učestalosti u različitim populacijama. Najviše se pojavljuje

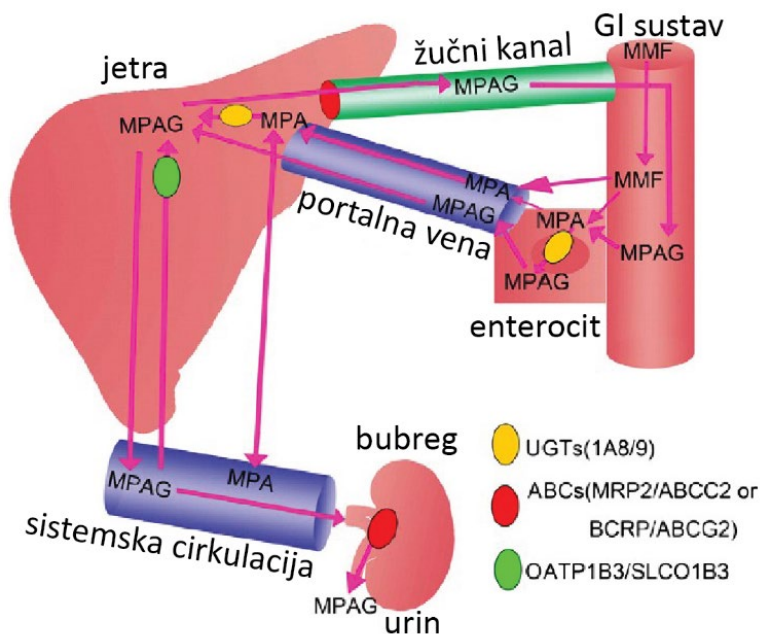
kod meksičkih Indijanaca (90 %), pacifičkih otočana (64 %), jugoistočnih Azijata (45 %), rjeđe u bijelaca (2 % do 10,3 %), Afroamerikanaca (8,3 %) i bliskoistočnih populacija (5 %). (116). Dostupne kliničke studije ukazuju na utjecaj ovoga polimorfizma na bioraspoloživost lijekova koji su inhibitori tirozin-kinaza. Prvotno je ova povezanost uočena kod gefitiniba. Ustanovljeno je da prisutnost varijantnog alela A uzrokuje za 1,5 puta povećanu akumulaciju gefitiniba u ravnotežnom stanju u usporedbi s divljim tipom gena, a time i vjerojatnost pojave dijareje tijekom uzimanja gefitiniba (117).

Q126X (376 C>T) je vrlo rijedak polimorfizam koji je najčešće prisutan kod Japanaca (0,9 % do 2,4 %). Istraživanja nisu pokazala prisutnost ovog polimorfizma u bijelaca i Afroamerikanaca. Uzrokuje prerani prestanak sinteze proteina odnosno u membranama nema ekspresije transportnoga proteina što je važno imati na umu pri ispitivanju farmakokinetike lijekova (116).

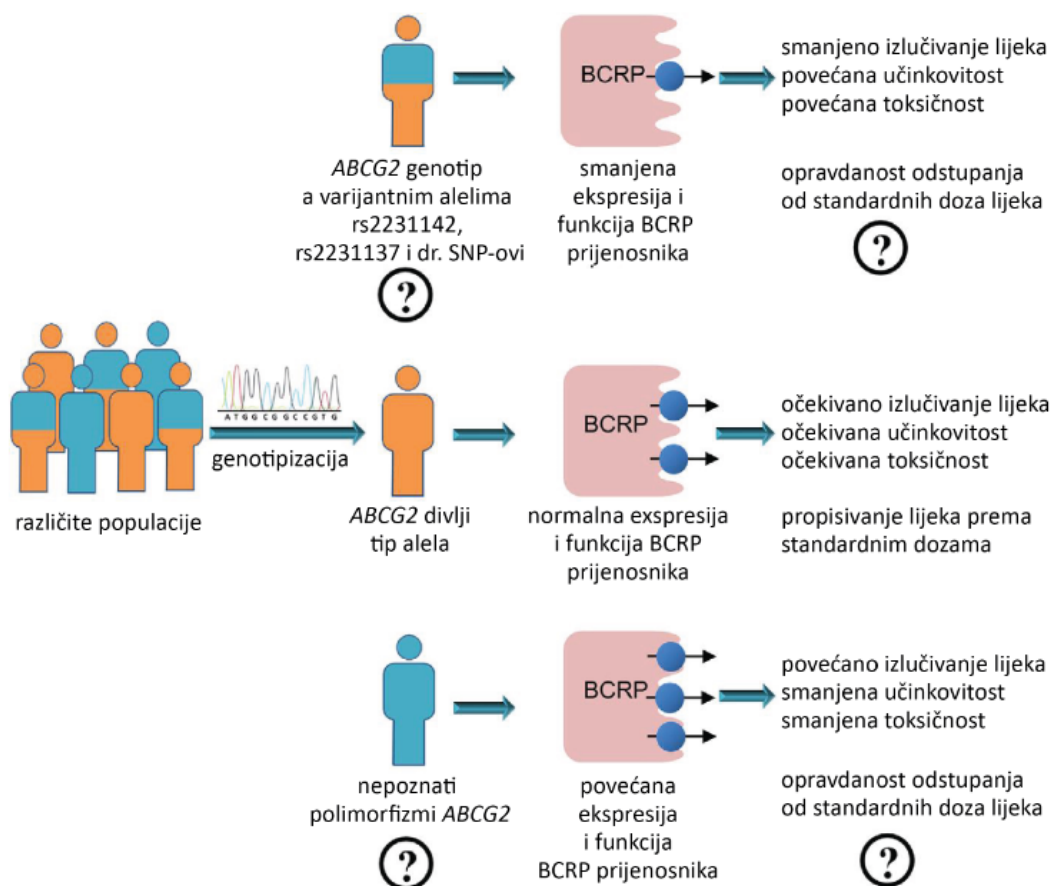
Polimorfizam Q141K (421 C>A) je varijanta koja se najčešće pojavljuje kod Japanaca (36 -41 %) i Kineza (34-45 %), a kod bijelaca je manja učestalost (11-17 %). Studije pokazuju da nositelji varijantnoga oblika gena imaju smanjenu ekspresiju prijenosnika, što na razini apsorpcije omogućuje olakšan ulazak lijeka u cirkulaciju, a na razini izlučivanja znači usporen izlazak lijeka iz tijela što ukupno rezultira povećanim koncentracijama lijeka u serumu i njegovoj produljenoj bioraspoloživosti (108). Objavljeno je više istraživanja koja su promatrala utjecaj polimorfizma na farmakokinetiku statina sa zaključkom da pacijenti nositelji genotipa 421CA i AA imaju znatno povišene plazmatske koncentracije statina, time i produljenu bioraspoloživost pa se učinkovitost terapije može postići smanjenjem doze statina (118).

BCRP ima funkciju izbacivačkoga transportera za MPAG, sa značajnim izražajem u jetri i crijevima. Do sada je samo jedna studija u japanskoj populaciji (80 ispitanika), transplantiranih pacijenata s presađenim bubregom dokazala da prisutnost alela 421A značajno smanjuje koncentraciju MPAG-a u usporedbi s bolesnicima nositeljima alela C (119). Studija (120) u kineskoj populaciji, uključila je 42 zdrava dragovoljca i 37 transplantiranih pacijenata kojima je napravljena genotipizacija varijantnih alela *UGT1A8\*2*, *SLCO1B3 T334G*, *ABCG2 C421A* i *ABCC2 C-24T*. Samo je jedan zdravi dragovoljac imao varijantni alel *SLCO1B3 334GG*. Autori su usporedili rezultate između homozigota 334GG i heterozigota 334TG gena *SLCO1B3* i primijetili tendenciju smanjenja (bez statističke značajnosti) bioraspoloživosti MPAG-a kod 334GG homozigota u odnosu na heterozigotne zdrave nositelje (120). Miura i suradnici su objavili rezultate studije koji pokazuju da je MPAG AUC<sub>0-12h</sub> kod nositelja *SLCO1B3 334GG*

veći u odnosu na nositelje varijante *SLCO1B3 334T* (121). Studija provedena na kineskoj populaciji objavljuje suprotne zaključke, varijantni alel *SLCO1B334G* rezultira povećanjem transporta MPAG-a u hepatocite (smanjene plazmatske koncentracije), povećanom enterohepatičkom recirkulacijom i bioraspodivnosti MPA-a kod zdravih dobrovoljaca 334GG homozigota u usporedbi s 334GT heterozigotima (120). Mogući razlog diskrepancije u rezultatima je primjena CsA-a ili TAC-a, budući da CsA interferira s transportom MPAG-a, smanjuje izloženost MPA-u, a povećava izloženost MPAG-u. Prestankom primjene CsA-a, MPAG-a iz tkiva prelazi u krv i i dalje u žuč, podliježe deglukoronidaciji u crijevima i reapsorpciji u obliku MPA što povisuje razine MPA-a u krvi stoga CsA može maskirati učinak polimorfizma gena *SLCO1B3* na metabolizam MPA-a i MPAG-a kod transplantiranih pacijenata (120).



**Slika 9. Prikaz transporta i metabolizma MPA-a i MPAG-a** (preuzeto i prilagođeno prema 120 uz dozvolu Elsevier)



**Slika 10. Prikaz prilagodbe doziranja prema polimorfizmu *ABCG2*** (preuzeto i prilagođeno prema 108 uz dozvolu dostupnu pod [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/))

### 1.5.3. Polimorfizam *SLCO1B1*

Nadporodica transportera SLC omogućuje ulazak molekula u stanice. Najpoznatiji prijenosnici iz ove skupine su organski anionski transportni polipeptidi (engl. *organic anion transporting polypeptides*, OATP) koji su većinom smješteni na bazolateralnoj membrani hepatocita i imaju ulogu prijenosa lijekova- supstrata u jetra (123). Poznato je 11 OATP transportera, od kojih su klinički najvažniji OATP1B1, OATP1B3 i OATP2B1 smješteni na sinusoidalnoj membrani hepatocita gdje posreduju pri transportu svojih supstrata iz krvi u hepatocite te predstavljaju važnu fazu koja prethodi eliminaciji lijekova, metaboličkim reakcijama ili izlučivanju u žuč (123).

OATP1A2 je smješten na luminalnoj membrani enterocita u tankom crijevu i krvnoj moždanoj membrani gdje omogućava prijenos molekula. Neki lijekovi su supstrati OATP prijenosnika

primjerice statini (OATP1B1) dok su drugi inhibitori prijenosnika OATP, primjerice CsA, što može rezultirati inetrakcijama lijek-lijek. Dodatno, varijabilnost gena koji kodiraju sintezu proteina također pridonosi interindividualnoj farmakokinetičkoj varijabilnosti. Polimorfizam gena *SLCO1B1 c.521T>C* kodira sintezu proteina OATP1B1 smanjene aktivnosti, što uzrokuje smanjeni transport lijeka u jetru čime se povećavaju plazmatske koncentracije lijeka supstrata. Navedeni polimorfizam smanjuje transport simvastatina posredovan OATP1B1 iz portalne cirkulacije u jetru čime se povećavaju plazmatske koncentracije simvastatina i posljedično rizik za razvoj simvastatinom inducirane miopatije. Generalno polimorfizam gena *SLCO1B1* mijenja aktivnost (smanjuje ili povećava) transporta putem OATP-a što može imati značajan utjecaj na klinički ishod farmakoterapije. Polimorfizmi ovoga transportera utječu na farmakokinetiku mnogih statina, antidijabetika repaglinida, antihistaminika feksofenadina, endotelinskog antagonista atrasentana (123), metotreksata (124) te nekih inhibitora tirozin-kinaze (TKI) erlotinib, gefitinib, imatinib, bosutinib (125 -127) itd.

Postoje saznanja da određeni lijekovi djeluju kao inhibitori OATP1B1 te stupaju u interakcije s drugim lijekovima. Međutim, i drugi mehanizmi mogu biti uključeni u ove interakcije budući da CsA inhibira i druge izbacivačke i ubacivačke prijenosnike, kao što su OATP1B3, OATP2B1, MDR1, MRP2 te metabolički enzim CYP3A4. Pretpostavlja se da je CsA odgovoran za povećanje plazmatske koncentracije atorvastatina i nekih drugih statina zbog inhibicije OATP1B1 (128).

Značajan broj SNP-ova detektiran je u genu *SLCO1B1*, a njihova učestalost značajno varira između populacija. Polimorfizam *c.388A>G* pojavljuje se u svim populacijama, a frekvencija varira od otprilike 40 % u Europljana do 80 % u subsaharskih Afrikanaca i istočnih Azijata dok je varijanta *c.521 T>C* relativno česta u Europljana i Azijata (učestalost otprilike 10-20 %), a rjeđa kod subsaharskih Afrikanaca (129). Procjena uloge pojedinih transportera u interakcijama lijek-lijek je izazovna u slučajevima kada su lijekovi supstrati OATP1B1 ujedno i supstrati drugih transportera te su često podložni i metabolizmu putem polimorfnih enzima CYP. U literaturi je opisan veliki broj polimorfizama, a dvije varijante *SLCO1B1 c.388 A>G* (rs 2306283) i *c.521 T>C* (rs 4149056) zajedno tvore četiri različita haplotipa: *SLCO1B1\*1A* (*c.388A-c.521T*), *\*1B* (*c.388G-c.521T*), *\*5* (*c.388A-c.521C*) i *\*15* (*c.388G-c.521C*) (123).

Dokazi u literaturi ukazuju na povezanost ovoga polimorfizma i farmakokinetike repaglinida (130), statina (inhibitori HMG-koenzim A-reduktaze) (131), antagonista angiotenzin II receptora npr. olmesartan i valsartan (132, 133), bosentana (134) i drugih.

Iako je utjecaj polimorfizama gena *SLCO* na farmakokinetiku lijekova istražen u pojedinim kliničkim studijama, rezultati istraživanja su različiti te zasada još nema čvrstog dokaza o utjecaju na farmakokinetiku MPA-a stoga još uvijek nema preporuka za farmakogenetičko testiranje prije propisivanja terapije lijekovima koji se transportiraju ovim prijenosnikom.

## 1.6. Farmakogenomika imunosupresiva

### 1.6.1. Farmakogenetika mikofenolne kiseline

Podaci dostupni u literaturi ukazuju na povezanost polimorfizama metaboličkog enzima UGT1A9, transportnih proteina MRP2, ABCG2 te OATP1B1 i OATP1B3 s farmakokinetikom MPA-a (135).

Među pojedincima postoje razlike u farmakokinetici MPA-a. Jetreni enzim UGT1A9 jest najvažniji enzim koji sudjeluje u glukuronidaciji MPA-a pa stoga SNP-ovi gena *UGT1A9* mogu biti odgovorni za individualne razlike u farmakokinetici MPA-a. Najveći broj objavljenih studija ispitivao je poveznost polimorfizama ovoga gena i metabolizma MPA-a, a dobiveni rezultati ukazuju na povećanu aktivnost enzima čime se pojačava glukuronidacija MPA-a te posljedično smanjuje koncentracija MPA-a u krvi, a time i imunosupresivno djelovanje (85). Farmakokinetika MPA-a je pod utjecajem polimorfizma gena *SLCO1B3 T334G* jer je MPAG je u većoj mjeri supstrat transportera OATP1B3 (*SLCO1B3*), što je zabilježeno kod bolesnika s transplantiranim bubregom koji nisu uzimali CsA (čini se da CsA inhibira transporter OATP1B3 čime maskira utjecaj polimorfizma). Nadalje, MPAG je u manjoj mjeri supstrat OATP1B1 (*SLCO1B1*), a MPA i MPAG nisu supstrati transportera OATP1A2 (*SLCO1A2*) (76).

Farmakokinetika MPA-a i MPAG-a značajno se mijenjala prisutnošću polimorfizama *SLCO1B3, 334T>G/699 G>A* kod transplantiranih pacijenata koji su bili na terapiji kombinacijom MMF-a i TAC-a ili sirolimusa dok se ovaj utjecaj nije primijetio kod pacijenata na terapiji MMF-om i CsA-om budući da CsA smanjuje transport MPAG-a inhibicijom ABCC2 i time smanjuje enterohepatičku cirkulaciju MPA-a što je neovisno o aktivnosti OATP1B3. Smanjena bioraspoloživost MPA-a je zabilježena kod nositelja alela *SLCO1B3 334G*, koji smanjuje transport MPAG-a u jetru, a time i smanjenim transportom u žuč i u konačnici smanjenom apsorpcijom MPA-a. Zaključak studije je da smanjenje sistemske raspoloživosti MPA-a te istovremeno povećanje metaboličkog omjera MPAG/MPA je konzistentno sa

smanjenjem enterohepatičke recirkulacije kod bolesnika koji su nositelji haplotipa OATP1B3 334 G-699 A. Utjecaj na enterohepatičku cirkulaciju MPA-a nastaje zasigurno zbog interakcija lijek-lijek i inhibicije transportera MRP2 CsA-om neovisno o aktivnosti OATP1B3, premda se ne isključuje mogućnost da CsA inhibira i prijenos putem OATP1B3 (76). Autori zaključuju da OATP transporteri utječu na farmakokinetiku MPA-a, ističući također i potrebu istraživanja utjecaja CsA-a na farmakokinetiku MPA-a i MPAG-a za koji se čini da ima isti ili slični učinak kao i polimorfizam *SLCO1B3*, 334T>G (76). Neke *in vitro* studije provedene ranije također potvrđuju tezu da je CsA snažan inhibitor OATP1B1 i OATP1B3 (147.). U literaturi možemo naći i studije provedene kod bolesnika s transplantiranim bubregom na terapiji makrolidima ili CsA-om koje nisu dokazale povezanost varijanti ili haplotipova *SLCO1B1* s farmakokinetikom MPA-a, MPAG-a ili Ac-MPAG-a (121, 136).

Polimorfizam gena *SLCO1B1*, odnosno alel 521C (*SLCO1B1*\*5) se povezuje sa smanjenom pojavnošću nuspojava uzrokovanih terapijom MPA-om (leukopenija, anemija, trombocitopenija, proljev, mučnina, povraćanje, infekcija) kod pacijenata koji nisu uzimali CsA. Možda je razlog tome što CsA inhibira OATP1B1 pa kod pacijenata na terapiji CsA-om, CsA maskira učinak polimorfizma *SLCO1B1* c.521C. Ispitivanja *in vitro* ukazuju na smanjeni transport MPAG-a i Ac-MPAG-a koji je povezan s polimorfizmom *SLCO1B1* c.521C, te ovi pacijenti imaju narušen transport u jetru, a time i smanjenu enterohepatičku recirkulaciju što rezultira smanjenom biorasploživosti MPA-a, a time i manju učestalost nuspojava (137).

Prijenosnik MRP2/ABCC2 nalazi se u epitelnim stanicama crijeva, placente i krvno moždane barijere, apikalnoj membrani hepatocita, luminalnoj membrani proksimalnih renalnih tubularnih stanica. MRP2 sudjeluje u enterohepatičkoj cirkulaciji MPA-a. Objavljene znanstvene studije pokazuju kontroverzne rezultate o povezanosti polimorfizma *MRP2* C-24T na farmakokinetiku MPA-a kod pacijenta s presađenim bubregom. Naesens i suradnici su u svojoj studiji pokazali da je *MRP2* C-24T polimorfizam povezan sa smanjenim oralnim klirensom MPA-a u pacijenata sa stabilnom funkcijom presatka. S druge strane, studije Baldelli i Geng nisu pokazale utjecaj ovoga polimorfizma na farmakokinetiku MPA-a (79, 120).

Meta-analiza i sistematski pregled dostupne literature u ovom članku uključio je pregled 10 studija koje su imale 1048 pacijenata, a nisu ustanovile značajnu povezanost polimorfizma *MRP2* i biorasploživosti MPA-a (138). Božina i suradnici su u svojoj studiji objavili da prisutvo alela *ABCC2* -24T smanjuje ekspresiju i funkciju MRP2 što se može povezati s nižim minimalnim koncentracijama MPA-a, nižom ostatnom koncentracijom MPA-a prije jutarnje i

većernje doze te većim oscilacijama u koncentraciji MPA-a. Studija je potvrdila i ranije pretpostavke da je CsA potentan inhibitor MRP2 te da stupa u interakciju s MPA-om na razini transporta i posljedično smanjuje njezinu bioraspoloživost, dok za TAC ovi učinci nisu potvrđeni (139). Rezultati studije potvrđuju ranija saznanja da CsA inhibira enterohepatičku recirkulaciju MPA-a inhibicijom transportera MRP2 i time smanjuje bioraspoloživost MPA-a. Isto tako rezultati pokazuju da prisutnost varijantnih alela *ABCC2 -24T>C* i *1249G>A* kod primatelja može mijenjati međudjelovanje CsA-a i MRP2. Smatra se da CsA utječe na bioraspoloživost MPA-a tako što i na bubrežnom nivou inhibira MRP2. Glavni zaključci studije su da polimorfizmi *ABCC2 -24T>C* i *1249G>A* primatelja i donora bubrega utječu na raspoloživost MPA-a, poglavito varijanta *1249G>A* koja smanjuje aktivnost transportera što povećava bubrežni klirens MPAG/MPA i smanjuje bioraspoloživost MPA. Ovaj učinak je sličan inhibitornim učincima CsA koji inhibicijom MRP2 u crijevima, jetri i bubrežima povećava klirens i smanjuje bioraspoloživost MPA. Dodatno se zaključuje da polimorfizam *ABCC2 1249G>A* donora pojačava učinak CsA a u bubrežima, a kod primatelja u jetri i crijevima (139).

**Tablica 4.** Povezanost polimorfizama ADME gena s farmakokinetikom imunosupresiva (++ jaka povezanost, + povezanost, (+) kontradiktorni podaci, - nema povezanosti (preuzeto i prilagođeno prema 140 uz dozvolu dostupnu pod [Creative Commons Attribution 4.0 International License](#))

Lijek	Enzimi faze I		Enzimi faze II	Ubacivački prijenosnici	ABC prijenosnici	
	CYP3A4	CYP3A5	UGT1A9	OATP1B1/3	ABCB1	ABCC2
	rs35599367	rs776746, rs10264272	rs17868320, rs6714486	rs41490556, rs4149117	rs1128503 rs2032582 rs1045642	rs717620
<b>MPA</b>	-	-	+	(+)	-	(+)
<b>CsA</b>	(+)	-	-	-	(+)	-
<b>TAC</b>	+	++	-	-	(+)	-



### 1.6.2. Farmakogenetika ciklosporina

CsA se uglavnom metabolizira preko gastrointestinalnih i jetrenih CYP3A enzima, glavni enzim za metabolizam je CYP3A4 stoga njegovi polimorfizmi utječu na farmakokinetiku CsA-a (140). Dostupni rezultati kliničkih studija o povezanosti polimorfizama metaboličkih enzima i transportera s farmakokinetikom CsA-a nisu jednoznačni. Hesselink i suradnici zaključuju da nijedan od ispitanih polimorfizama enzima *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*3*, *CYP3A5\*3* i *ABCB1 3435T* nije utjecao na ostatne koncentracije CsA-a u krvi prilagođene prema dozi (140). Studija Haufroida i suradnika ispitala je povezanost polimorfizama *CYP3A5* i *ABCB1* na koncentracije CsA-a i TAC-a. Iz dobivenih rezultata autori su zaključili da su ostatne koncentracije CsA-a i TAC-a bile više u bolesnika nositelja varijante *CYP3A5\*3* u usporedbi s nositeljima gena *CYP3A5\*1/\*3*. Uočili su da je kod TAC-a razlika u ostatnim koncentracijama bila izraženija jer su homozigotni nositelji varijantnog alela *CYP3A5\*1* imali 5,8 puta niže ostatne koncentracije u odnosu na nositelje genotipa *CYP3A5\*3/\*3* (142). Međutim u ovoj studiji (142), kao i ranije navedenoj studiji Hesselinka (141), nije nađena povezanost ostatnih koncentracija CsA -ai TAC-a s polimorfizmima gena *ABCB1*. Smanjenje bubrežne funkcije presatka ili gubitak presatka u poslijetransplantacijskom periodu, povezuje se s prisutnosti genotipa *ABCB1 3435TT* bilo kod donora ili primatelja presatka (143). Promjena aktivnosti transportera *ABCB1* može utjecati na koncentraciju CsA-a kod bolesnika s transplantiranim bubregom koji su nositelji polimorfizama *C3435T*, *G2677T* i *C1236T*, prvenstveno u homozigota za *3435T*, zbog slabije aktivnosti P-gp-a. Genotipizacija polimorfizama u ovoj studiji je pokazala da je ipak prisutnost varijantnoga alela (*TT*) uzrokovala povećanje intracelularne koncentracije CsA-a što povećava rizik za nastanak neželjenih reakcija (144).

Enzim CYP3A4 u jetri i u crijevima zajedno s prijenosnikom *ABCB1* modificira sistemsku raspoloživost CsA-a ovisnu o metabolizmu u jetri i izbacivačkim svojstvima *ABCB1* transportera koji utječe na apsorpciju CsA-a. Prva studija koja je objavila povezanost polimorfizma gena *ABCB1* s koncentracijom CsA-a bila je studija Crettola i suradnika koji su povezali smanjenje intracelularne koncentracije CsA-a u T-limfocitima s odbacivanjem presatka kod bolesnika s varijantom *ABCB1 1199A*, te povećanje intracelularne koncentracije CsA-a kod nositelja varijante *3435T*, dok ta povezanost nije uočena za koncentracije CsA u krvi kod nositelja varijanti *G2677T* i *C1236T* (145).

Polimorfizam *-392A>G* u promotorskoj regiji gena *CYP3A4* stvara varijanti alel *CYP3A4\*1B* koji povećava aktivnost enzima CYP3A4. Studija koja je provedena u Indiji ne ukazuje na

povezanost polimorfizma *CYP3A4\*1B* s farmakokinetikom CsA-a (146) za razliku od studije koju su proveli Zochowska i suradnici koji zaključuju da bolesnici s jednim funkcionalnim alelom *CYP3A5\*1* ili *CYP3A4\*1B* trebaju značajno više doze CsA-a kako bi se postigle ciljane koncentracije u krvi u usporedbi sa nositeljima *CYP3A4\*1* ili *CYP3A5\*3* (147).

Sličan nalaz, kao u spomenutoj studiji Zochowske i suradnika, proizlazi i iz studije koju su proveli Kotowski i suradnici, a koja je ispitala učinak polimorfizma *CYP3A4\*1B* i *ABCB1 3435 C>T* na koncentraciju CsA-a i na rizik od akutnoga odbacivanja bubrega. Rezultati su pokazali da bolesnici nositelji genotipa *CYP3A4\*1/\*1* trebaju manje doze CsA-a u usporedbi s nositeljima genotipa *CYP3A4\*1/\*1B*. Zaključuju da prisutnost polimorfizma *CYP3A4\*1B* i *ABCB1* ne može pružiti korisne smjernice za individualni pristup doziranju CsA-a kako bi se postigle optimalne doze lijeka bez izlaganja bolesnika neželjenim nuspojavama, primjerice nefrotoksičnosti (148). Znanstveni podatci koji govore o povezanosti varijantnih alela *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*22* s farmakokinetikom i farmakodinamikom CsA-a nisu jednoznačni, ali se iz dostupnih studija može zaključiti da varijanta *CYP3A5\*3* više utječe na farmakokinetiku TAC-a nego CsA-a dok *CYP3A4\*22* smanjuje klirens CsA-a za 15 % (63).

### 1.6.3. Farmakogenetika takrolimusa

SNP-ovi gena koji kodiraju sintezu metaboličkih enzima *CYP3A4/5* odgovorni su za varijabilnosti u ekspresiji enzima *CYP3A*, a time i za varijabilnu farmakokinetiku i doziranje TAC-a. Glavnu ulogu u metabolizmu TAC-a ima enzim *CYP3A5* koji je odgovoran za 40 do 50 % razlika u doziranju TAC-a. Izoenzimi *CYP3A4* i *CYP3A5* najvećim su dijelom odgovorni za metabolizam TAC-a, CsA-a, everolimusa i sirolimusa (39). Terapijsko praćenje koncentracije TAC-a u krvi je rađeno na 80 pacijenata s transplantiranim bubregom koji su bili na politerapiji TAC-om, indukcijskim lijekovima, MPA-om ili azatioprinom te steroidima. Za sve pacijente početna doza TAC-a je bila 0,20 mg/kg, izmjerene su ostatne koncentracije TAC-a u krvi nakon 12 sati te je provedeno genetičko testiranje. Nakon mjesec dana terapije i provedenoga genetičkog testiranja zaključeno je da su početne doze TAC-a varirale od 0,029 do 0,364 mg/kg/dan što potvrđuje značajnu varijabilnost farmakokinetike TAC-a. Rezultati ukazuju da pacijenti nositelji *CYP3A5\*1/\*1* imaju ubrzani hepatski i intestinalni metabolizam stoga trebaju i veće početne doze kako bi se postigla djelotvorna koncentracija TAC-a u krvi. Nositelji *CYP3A5\*1/1* alela trebaju početnu dozu od 0,30 mg/kg/dan, a nositelji *CYP3A5\*3/3* 0,15 mg/kg/dan. Rezultati su pokazali da je režim doziranja prema genotipu pouzdan

predskazatelj optimalne doze za pojedinoga bolesnika, budući da su primjenom ovoga režima doziranja bolesnici vrlo brzo postizali optimalne doze i bilo je manje intervencija u doziranje (151). Najveći broj studija analizira prisutnost alela *CYP3A5\*3*. Manje istražene varijante su *CYP3A5\*6* i *CYP3A5\*7* povezane sa smanjenom aktivnošću enzima *CYP3A5* slično kao i kod varijante *CYP3A5\*5*. Kada se govori o tipu fenotipa odnosno brzini metabolizma, onda je kod *CYP* enzima najčešće da EM-i imaju istu brzinu metabolizma kao i NM-i te se tada ne prilagođava režim doziranja genotipu pacijenta. Međutim, kod TAC-a i *CYP3A5* gena, bolesnici koji su *CYP3A5* ekspresori (EM i IM metabolizatori) trebaju veće početne doze TAC-a dok *CYP3A5 non-ekspresori* (PM) trebaju standardne preporučene doze TAC-a. Razlikuju se i u učestalosti u populacijama, *CYP3A5* ekspresori čine manjinu u europskoj populaciji, negdje oko 80 % bijelaca su PM-i (homozigoti za *CYP3A5\*3* alel), dok je većina crnačke populacije EM TAC-a (*CYP3A5\*1/\*1*) (152). Najviše je istražen polimorfizam *ABCB1 3435 C>T* čija je učestalost u europskoj populaciji 51,8 %, azijskoj 39,8 % i indijskoj 57,5 %. Rezultati dobivenih studija nisu jednoznačni po pitanju povezanosti ovih polimorfizama i učinkovite sistemske raspoloživosti TAC-a, iako je u literaturi objavljena meta analiza koja zaključuje da polimorfizmi gena *ABCB1* ipak utječu na farmakokinetiku TAC-a kod Indijaca i bjelačke populacije (150). Istraživanje provedeno u Francuskoj na 136 pacijenata s presađenim bubregom pokazalo je da bolesnici homozigoti za *CYP3A5\*1* imaju veći rizik od akutnoga odbacivanja presatka u odnosu na heterozigote *CYP3A5\*1/\*3* i homozigote *CYP3A5\*3/3* iz razloga što imaju veće količine aktivnog enzima *CYP3A5* te posljedično pojačan klirens TAC-a i manje ostatne koncentracije TAC-a pa su tim bolesnicima povećali dnevnu dozu TAC-a mjesec dana nakon transplantacije. To ukazuje da je ključno pratiti pacijente u ranom postransplantacijskom razdoblju jer je incidencija odbacivanja presatka najčešća mjesec dana nakon transplantacije. Dodatno su izvijestili da polimorfizam *CYP3A5* nije uzrok nefrotoksičnosti TAC-a te da polimorfizam *ABCB1* ne utječe na ishode transplantacije (153). Thervet i suradnici proveli su kontrolirano randomizirano istraživanje u kojem su pokazali da su se ciljne koncentracije TAC-a u krvi brže postigle kod transplantiranih pacijenata kod koji je režim doziranja propisan na temelju provedene genotipizacije *CYP3A5* polimorfizma nego kod pacijenata kod kojih je propisana standardna doza na temelju tjelesne mase. Tri dana nakon uvođenja terapije TAC-a 43,2 % bolesnika kojima je prema genotipu prilagođeno doziranje TAC-a brže su postigli ciljne koncentracije TAC-a, a značajno manje bolesnika (29,1 %) kojima se režim doziranja temeljio samo na tjelesnoj masi. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se zaključilo utječe li režim doziranja prilagođen prema genotipu na kliničke ishode primjerice odgođenu funkciju bubrega, incidenciju akutnoga odbacivanja bubrega te pojavu

nefrotoksičnosti uzrokovanu TAC-om. Autori zaključuju da prilagodbom doze prema genotipu brže se dostižu ciljne koncentracije nakon transplantacije i potrebne su manje modifikacije doza TAC-a (149). Ispitivanje koje je proveo Glowacki i suradnici na 209 transplantiranih pacijenata kod kojih se pratio klinički ishod nakon transplantacije (akutno odbacivanje presatka ili odgođena funkcije presatka) nije potvrdilo povezanost s polimorfizmima *CYP3A5*\*3 i *ABCB1* 3435 C>T (154) za razliku od meta analize koja zaključuje da polimorfizam *ABCB1* C3435T utječe na farmakokinetiku TAC-a (155). Pojačana ekspresija P-gp-a dovodi do rezistencije na lijekove te može izazvati odbacivanje presatka kod transplantiranih pacijenata. Pretpostavka je da su rezultati studija kontradiktorni iz tri razloga: C3435T nije jedini polimorfizam koji utječe na normalnu funkciju P-gp-a, limitirajućega broja bolesnika u studiji i promatranje farmakokinetičkih parametara u različitim vremenskim periodima nakon transplantacije. Međutim, iako rezultati studija nisu jednoznačni smatra se da ipak postoji povezanost polimorfizma C3435T s farmakokinetikom TAC-a. Polimorfizam 3435 TT povezan je smanjenom ekspresijom P-gp-a (manja aktivnost izbacivačke pumpe) i visokom apsorpcijom lijeka te u odnosu na CT homozigote u prvih 6 mjeseci nakon transplantacije pokazuje značajno veće prema dozi prilagođene koncentracije TAC-a. Suprotno od ovog nalaza, za genotip 3435 CC (veća ekspresija P-gp-a, veća aktivnost izbacivačke pumpe i slabija apsorpcija lijeka) pokazuju se manje vrijednosti prema dozi prilagođene koncentracije TAC-a u usporedbi s TT homozigotima u prvom tjednu nakon transplantacije. Kliničke studije pokazuju da homozigotni nositelji alela CC imaju manje vrijednosti omjera koncentracije i doze TAC-a te je veći rizik od odbacivanja presatka zbog poddoziranja u ranoj fazi nakon transplantacije, stoga trebaju više početne doze TAC-a od nositelja genotipa TT i CT. Nositelji varijante CT također trebaju veće doze TAC-a u odnosu na TT varijante. Nositelji genotipa TT trebaju manje početne doze TAC-a kako bi se izbjegle toksične reakcije, dok nositelji genotipa CC trebaju veće početne doze TAC-a kako bi izbjegli odbacivanje presatka (155).

Polimorfizam *CYP3A5*\*1/\*3 je odgovoran za 45 % varijabilnosti u doziranju TAC-a. Iako se CPIC preporukama savjetuje da osobe koje su EM-ovi (*CYP3A5*\*1/\*1) trebaju 1,5 do 2 puta veću dozu od standardnoga propisanoga režima doziranja, ali ne više od 0,3 mg/kg/dan zbog neželjenih reakcija kod suprat terapijskih koncentracija TAC-a (arterijska vazokonstrikcija, hipertenzija i nefrotoksičnost), prilikom doziranja treba uzeti u obzir konkomitatnu terapiju, funkciju jetre ili neka druga klinička stanja poput dijareje. Provođenje TDM-a, u kombinaciji s genotipizacijom bolesnika prije primjene lijeka znatno može pomoći prilikom određivanja režima doziranja kako bi što prije postigli terapijske koncentracije lijeka u krvi (40). Rojas i

suradnici su proveli meta analizu objavljenih studija o povezanosti učinka polimorfizma *CYP3A5* s doziranjem TAC-a i kliničkim ishodima te su ustanovili značajno povišen rizik od odbacivanja presatka kod transplantiranih pacijenata koji imaju *CYP3A5\*1/\*1* ili *CYP3A5\*1/\*3* polimorfizam. Bolesnici nositelji alela *CYP3A5\*3/\*3* imali su 1,8-2,5 puta veće ostatne koncentracije prilagođene prema dozi u odnosu na *CYP3A5* ekspresore tijekom prve godine nakon transplantacije (156). Istraživanje provedeno kod kineskih transplantiranih pacijenata je potvrdilo zaključak Rojasa i suradnika nositelji *CYP3A5\*3* su trebali više početne doze TAC-a kako bi izbjegli negativan ishod imunosupresije i odbacivanje presatka. Trijažom ovih polimorfizama moguće je odabrati adekvatnu imunosupresivnu terapiju i prikladnu dozu za svakoga pojedinog bolesnika (157). Međutim, studija koju su proveli Shuker i suradnici nije dokazala povezanost genotipa s bržim postizanjem optimalne koncentracije i boljih kliničkih ishoda u odnosu na standardno doziranje prema tjelesnoj masi. Diskrepanтни rezultati vjerojatno su povezani s vremenom primjene terapije (primjena lijeka odmah nakon transplantacije ili 7 dana poslije transplantacije) pa postoji mogućnost da je varijabilnost u koncentraciji TAC-a među pacijentima veća u prvim danima nakon transplantacije nego 7. dan nakon transplantacije (158). Hasselink i suradnici su objavili studiju u koju su uključili 64 bolesnika s transplantiranim bubregom koje bilježi ubrzani metabolizam kod nositelja polimorfizma *CYP3A4\*1B* i niže ostatne koncentracije TAC-a korigirane prema dozi u odnosu na nositelje varijantnoga alela *CYP3A4\*1/\*1* (141). U drugim studijama dobiveni su kontradiktorni rezultati u kojima nije nađena povezanost polimorfizma *CYP3A4\*1B* i koncentracija TAC-a (159, 160). Neki autori smatraju da povezanost nije nađena zbog niske prevalencije polimorfizma *CYP3A4\*1B* u populacijama iako bi teoretski genotip trebao utjecati na razlike u metabolizmu lijekova, ne etnička pripadnost, moguće je da neutvrđene genetske razlike (primjerice nasljedni SNP-ovi) između afričke, bjelačke i azijske populacije mogu pridonijeti varijabilnostima između genotipova (37).

Polimorfizam *CYP3A4\*1B* (-392 A>G) povezan je s pojačanom aktivnosti enzima *CYP3A4* što je i potvrđeno u španjolskoj studiji na 103 bolesnika s transplantiranim bubregom. Rezultati studije upućuju na povezanost polimorfizama *CYP3A4\*1B* i *CYP3A5\*1* te njihovom zajedničkom utjecaju na farmakokinetiku TAC-a. Bolesnici nositelji varijante *CYP3A4\*1B* imali su za 59 % niže koncentracije TAC-a u odnosu na nositelje *CYP3A4\*1/\*1*, ujedno, svi nositelji polimorfizma *CYP3A4\*1B* bili su i nositelji varijante *CYP3A5\*1* (161). Prisutnost genotipova *CYP3A4* i *CYP3A5* povezana je s 56-59 % varijabilnog režima doziranja te 25-30 % klirensa TAC-a (162).

Oko 40 % TAC-a se metabolizira preko CYP3A4, a rezultati studija donose kontradiktorne podatke. Neke studije govore o tome da polimorfizam *CYP3A4\*1B* povećava ekspresiju i aktivnost enzima pa su potrebne veće doze lijeka, dok druge studije ne potvrđuju utjecaj polimorfizma *CYP3A4* na primijenjene doze TAC-a. Kada se procjenjuju ova neslaganja u istraživanjima, važno je znati da većina populacije koji su nositelji *CYP3A4\*22* alela su i homozigotni nositelji *CYP3A5\*3* što otežava kvantificiranje njihovih pojedinačnih učinaka (35). Kod bolesnika s transplantiranim bubregom, varijantni alel T gena *CYP3A4\*22* utječe na metabolizam TAC-a povećavajući rizik od supratherapijskih koncentracija u ranom periodu nakon transplantacije ( $c_0 > 15 \mu\text{g/L}$ ) zbog smanjene aktivnosti enzima CYP3A4 i klirensa TAC-a. Transplantirani bolesnici nositelji varijantnoga T alela (CT ili TT genotip) trebaju značajno niže doze TAC-a u odnosu na genotip CC za postizanje ciljne koncentracije u krvi. Tijekom prve godine nakon transplantacije nositelji varijantnoga alela T su trebali 33 % manje doze TAC-a u usporedbi s divljim tipom. Polimorfizam *CYP3A4\*22* može biti značajan jer ima učestalost u bjelačkoj populaciji 2-7 %. Dodatno je uočena značajnost utjecaja genotipova *CYP3A4* i *CYP3A5* promatranih zajedno na farmakokinetiku TAC-a u odnosu kada se ovi genotipovi promatraju svaki zasebno. Zaključak studije je da predtransplantacijsko genotipiziranje *CYP3A4 C>T*, intron 6 (\*22), zajedno s *CYP3A5\*3* varijantnim alelom, potencijalno može biti dobar alat kliničarima za propisivanje optimalne doze TAC-a čime se smanjuje pojava supratherapijskih koncentracija TAC-a kod PM-ova (163). Ista povezanost potvrđena je i u studiji provedenoj od strane Gijsena i suradnika (164) što je u suprotnosti od rezultata studije Moesa i suradnika provedenoj na bjelačkoj populaciji (165).

*CYP3A5\*3* je za sada jedini polimorfizam povezan s TAC-om i jedini klinički relevantan za bolesnike s transplantiranim bubregom. Najčešće je prisutan kod bjelačke rase (94 %), a rjeđi u afričkoj populaciji (18 %). Pripadnici afričke populacije najčešće su *CYP3A5* ekspresori (70 %) (166). *CYP3A4\*22* je relevantan za predviđanje aktivnosti CYP3A4 enzima, ali je njegov klinički značaj ograničen, stoga se još uvijek istražuje relevantan prediktivni biljeg za varijabilnu aktivnost CYP3A4. Ipak neki autori upućuju da promjene u enzimima CYP3A4 i mogu biti glavne odrednice *in vivo* raspodjele TAC-a i njegove vrlo velike farmakokinetičke varijabilnosti. Elens i suradnici su u svojoj studiji pokazali da je kombinacija genotipova *CYP3A4* i *CYP3A5* bolji pokazatelj za prilagodbu doziranja u odnosu na pojedinačne genotipove (167) što je dodatno potkrijepljeno u studiji provedenoj 2017. u kojoj ističu potrebu da CPIC smjernica za TAC uz polimorfizam *CYP3A5\*3* uključi i preporuke za genotipizaciju polimorfizma *CYP3A4\*22* za bjelačku populaciju (168).

Opisan je i slučaj bolesnika s transplantiranim bubregom na terapiji standardnim imunosupresivnim protokolom kojem se i povećanjem doze TAC-a u odnosu na preporučenu dozu nisu mogle postići optimalne koncentracije TAC-a u krvi (10 ng/ml) što je uzrokovalo akutno celularno odbacivanje presatka te je provedena genotipizacija bolesnika. Rezultati genotipizacije su pokazali da je bolesnik heterozigotni nositelj polimorfizama *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*1B* koji uzrokuju pojačani metabolizam TAC-a i posljedično niže koncentracije u krvi. Nakon rezultata genetičkoga testiranja doziranje se prilagodilo te su optimalne koncentracije TAC-a u krvi postignute nakon primjene 15 mg TAC-a dva puta dnevno. Navedeni je slučaj primjer nastanka akutnoga odbacivanja presatka zbog nemogućnosti postizanja djelotvornih koncentracija TAC-a, iako se lijek primjenjivao u propisanim dozama. Farmakogenetičko testiranje koje bi prethodilo transplantaciji spriječilo bi akutno odbacivanje presatka zbog neadekvatne koncentracije TAC-a (169).

S obzirom na vrlo mali broj studija koje su dokazale povezanost polimorfizma *CYP3A4\*22* i *CYP3A4\*1B* s farmakokinetikom CNI-a još uvijek nisu propisani rutinski testovi za određivanje ovih genotipova. Do sada je samo objavljena CPIC smjernica koja preporučuje genotipizaciju *CYP3A5\*3* i doziranje prema genotipovima. Polimorfizam *CYP3A4\*22* je, neovisno o statusu *CYP3A5\*3*, povezan sa supratherapijskim koncentracijama TAC-a. Objavljene studije pokazuju da je *CYP3A4\*22* dobar predskazatelj aktivnosti CYP3A4 međutim novije preporuke (62, 170) idu korak dalje i predlažu definiciju statusa metabolizma na temelju dvije varijante *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* koje bi mogle biti korištene za poboljšanje prilagodbe doze TAC-a. Zaključuju da bi smjernice CPIC-a uz preporuke genotipizacije *CYP3A5\*3* trebale uključiti i preporuku za genotipizaciju *CYP3A4\*22*. EM-ovi bi bili nositelji kombinacije *CYP3A4\*1/\*1* i *CYP3A5\*1/\*1* ili *CYP3A4\*1/\*1* i *CYP3A5\*1/\*3*, a PM-ovi nositelji kombinacije *CYP3A4\*1/\*22* i *CYP3A5\*3/\*3* ili *CYP3A4\*22/\*22* i *CYP3A5\*3/\*3* (170). Doziranje TAC-a prema ovim kombinacijama genotipova prikazano je u tablici 5. (170).

**Tablica 5.** Preporučeno doziranje TAC-a prema fenotipu CYP3A (preuzeto i prilagođeno prema 170 uz dozvolu Wolters Kluvert Health, Inc)

Fenotip CYP3A	Genotip <i>CYP3A4*22</i>	Genotip <i>CYP3A5*3</i>	doza TAC-a
PM	*22/*22, *1/*22	*3/*3	0,14 mg/kg/dan
IM	*1/*1	*3/*3, *1/*3	0,2-0,25 mg/kg/dan
EM	*1/*1	*1/*1, *1/*3	0,3-0,4 mg/kg/dan

RNPGx (engl. *French National Network of Pharmacogenetics*) u svojim smjernicama preporuča provođenje genetičkoga ispitivanja polimorfizma *CYP3A5* prije transplantacije bubrega, srca i pluća kao i prije konačnoga odabira imunosupresivnoga lijeka. Iako je razina dokaza još uvijek niska, u skladu s ranijim literaturnim izvorima (167, 168) smjernice predlažu genotipizaciju *CYP3A4* zajedno s *CYP3A5* s ciljem točnijega predviđanja metaboličkoga statusa bolesnika. Farmakogenetičko je testiranje moguće u rutinskoj praksi u Francuskoj u većini laboratorija koji su članovi RNPGx (63). CPIC je 2015. objavio smjernicu za doziranje TAC-a kod nositelja *CYP3A5* polimorfizma s obzirom da je prisutnost nefunkcionalnoga *CYP3A5* genotipa („non-ekspresori“) vrlo česta u većini populacija, poglavito u bjelačkoj populaciji, u kojoj je oko 94 % nositelja *CYP3A5*\*3 varijantnoga alela (166).

Počevši od 2004. mnoge su studije dokazale povezanost pojačanog klirensa TAC-a i smanjene sistemske izloženosti lijeka s polimorfizmom *CYP3A5*\*1, čak su i CPIC smjernice s preporukama doziranja objavljene prije osam godina međutim još uvijek nisu u potpunosti primijenjene u kliničkoj praksi.

**Tablica 6.** Fenotipovi obzirom na intenzitet metabolizma (preuzeto i prilagođeno prema 40 uz dozvolu PharmGKB dostupnu pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/))

Fenotip	Genotip	Primjeri diplotipa <sup>a)</sup>
<b>EM (CYP3A5 ekspresori)</b>	nositelji oba funkcionalna alela	*1/*1
<b>IM (CYP3A5 ekspresori)</b>	nositelji jednoga funkcionalnoga i jednoga alela bez funkcije	*1/*3, *1/*6, *1/*7
<b>PM (CYP3A5 non-ekspresori)</b>	nositelji oba alela bez funkcije	*3/*3, *6/*6, *7/*7, *3/*6, *3/*7, *6/*7

a) dodatne rijetke varijante, kao što su *CYP3A5*\*2, \*8 i \*9 su nepoznatog funkcionalnog značenja, ukoliko je prisutna kopija alela \*1, očekivani fenotip je IM



**Tablica 7.** Preporučeno doziranje na temelju CYP3A5 fenotipa (preuzeto i prilagođeno prema 40 uz dozvolu PharmGKB dostupnu pod [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/))

CYP3A5 fenotip*	Implikacije za promjenu doziranja	Preporuke za doziranje**	Snaga preporuke
<b>EM/IM (CYP3A5 ekspresor)</b>	Niže ostatne koncentracije takrolimusa korigirane prema dozi i smanjena mogućnost postizanja ciljnih koncentracija takrolimusa	1,5-2 puta povećati početnu dozu.*** Ukupna početna doza ne smije biti veća od 0,3mg/kg/dan. Primijeniti TDM za prilagodbu doze	Snazna
<b>PM (CYP3A5 non-ekspresor)</b>	Veće (normalne) ostatne koncentracije takrolimusa korigirane prema dozi i povećana mogućnost postizanja ciljnih koncentracija takrolimusa	Početi terapiju sa standardnim preporučenim dozama. Primijeniti TDM za prilagodbu doze	Snazna

\* Kod ostalih CYP enzima uobičajeno je da je EM klasificiran kao „NM“ koji ne zahtjeva promjenu doziranja prema genotipu pacijenta. Međutim u slučaju CYP3A5 i TAC-a, CYP3A5 ekspresori (EM ili IM) trebaju veće početne doze TAC-a u odnosu na PM-ove koji trebaju standardne preporučene doze TAC-a. Daljnje prilagodbe doze ili alternativna terapija mogu biti potrebne ovisno o drugim kliničkim faktorima (primjerice interakcije lijekova ili jetrena funkcija).

\*\*Preporuke o doziranju odnose se na primjenu TAC-a kod transplantacije srca, pluća, bubrega i hematopoetskih matičnih stanica te kod transplantacije jetre kada su genotipovi donora i primatelja istovjetni.

Woillard i suradnici razvili su modele za prilagodbu početnoga doziranja TAC-a prema CYP3A4\*22/CYP3A5\*3, simulacije su rezultirale preporučenim početnim dozama od 0,07 mg/kg dva puta dnevno za PM-ove, 0,13 mg/kg dva puta dnevno za IM-ove i 0,2 mg/kg dva puta dnevno za EM-ove. Navedene su preporuke u skladu s preporukama CPIC-a i RNPgX-a s razlikom u odnosu na CPIC preporuke za smanjenje početne doze za PM-ove nositelje CYP3A4\*22-CYP3A5\*3 te povećanje do 0,4 mg/kg/dan za EM-ove. Za EM-ove se predlaže započeti terapiju s 0,35 mg/kg/dan te daljnje podešavanje doze pomoću TDM-a (63). Znanstveno je dokazana i prihvaćena u kliničkoj praksi važnost polimorfizma CYP3A5\*3 za početno doziranje TAC-a budući da može utjecati na individualne razlike u klirensu TAC-a i njegovoj distribuciji između stanica. Objavljen je veći broj studija populacijske farmakokinetike međutim u ovoj fazi osim za utjecaj polimorfizma CYP3A nisu rezultirale drugim značajnim zaključcima posebice zbog razlike u prevalenciji polimorfizma među različitim etničkim skupinama, nedostatnosti većih studija te pogrešaka u analizi podataka.

Modeli populacijske farmakokinetike koji su proučavali utjecaj *CYP3A5\*3* na farmakokinetiku ukazuju da je 30 % varijabilnosti klirensa TAC-a povezano s *CYP3A5\*3* polimorfizmom. Osim navedenog polimorfizma, čini se da su populacijski modeli koji razmatraju i utjecaj polimorfizma *CYP3A4\*22* precizniji od modela koji ne razmatraju polimorfizam *CYP3A4\*22*. Polimorfizam *CYP3A4\*22* je relevantan kod bijelaca koji su *non-ekspresori* *CYP3A5* (*CYP3A5\*3*) budući je u populacijskim modelima potvrđeno da *CYP3A4\*22* može mijenjati učinak TAC-a iako u manjoj mjeri nego *CYP3A5\*3* (170).

*ABCB1 3435 C>T* je tihi *silent* polimorfizam, homozigotni nositelji alela C3435T imaju dva puta manju ekspresiju P-gp-a u crijevima što se pripisuje uskoj povezanosti sa SNP-om na eksonu 21 (*2677 G>T*) koji mijenja slijed aminokiselina Ala893Ser u proteinu i rezultira sintezom transportera promijenjene aktivnosti (171). *ABCB1* štiti organizam od štetnih tvari na način da ksenobiotike izbacuje iz stanica u lumen crijeva ili žuč što može ograničiti oralnu bioraspoloživost i dispoziciju CNI-a. Tako u crijevima može ograničiti apsorpciju TAC-a, u jetri potaknuti izlučivanje TAC-a u žuč, a u bubrezima u urin (34). Ranije provedene studije uglavnom su ispitivale povezanost polimorfizma C3435T i farmakokinetike TAC-a, neke od njih su povezale prisutnost varijantnoga alela TT s nižim dozama TAC-a i većim omjerima L/D, što je objašnjeno slabom aktivnosti *ABCB1* prijenosnika kod nositelja varijantnih alela (172). Herrero i suradnici su u studiji provedenoj na 71 bolesniku s transplantiranim bubregom, zaključili da bolesnici s divljim tipom gena (CC) imaju stabilnije koncentracije TAC-a unutar terapijskoga raspona tijekom prva tri mjeseca nakon transplantacije dok su bolesnici koji su imali varijantni alel imali značajno više koncentracije TAC-a u krvi (oko 60 %) zbog smanjenoga izlučivanja lijeka iz tijela (173). Kuypers i suradnici u studiji na 304 bolesnika kojima je transplantiran bubreg, nisu pronašli povezanost utjecaja polimorfizma *ABCB1* na farmakokinetiku TAC-a (174). Isti je nalaz potvrđen u studiji na bjelačkoj populaciji bolesnika s presađenim bubregom ili jetrom, provedenoj od strane Provenzeni i suradnika koja je pokazala da kod bolesnika s presađenom jetrom nije uočena povezanost genotipa *3435 C>T* i *2677G>T* s farmakokinetikom TAC-a (175) što je zaključeno i u kineskoj studiji koja je proučavala utjecaj *3435 C>T* i *1236 C>T* polimorfizama na farmakokinetiku TAC-a (177). U literaturi se mogu pronaći znanstveni dokazi odnosno rezultati kliničkih ispitivanja koja ipak idu u prilog utjecaju polimorfizma gena *ABCB1* na koncentraciju i bioraspoloživost TAC-a (155, 171, 176) te je ovaj polimorfizam također potrebno uzeti u obzir prilikom propisivanja TAC-a kako bi se izbjegla neadekvatna imunosupresija.

Studija provedena na 48 pacijenata sa transplantiranom jetrom pokazala je da su polimorfizmi gena *ABCB1* i *CYP3A5* povezani s farmakokinetikom TAC-a te da genotipizacija ovih polimorfizama prije transplantacije jetre može biti od velike pomoći za individualizaciju terapije. Rezultati studije potvrđuju ranija istraživanja, pacijenti s *ABCB1* CC genotipom trebali su veće doze TAC-a od pacijenata s varijantnim alelom (CT ili TT). Dodatno je zapažen značajan porast omjera koncentracije/doze TAC-a kod nositelja *CYP3A5*\*3/\*3 u usporedbi sa nositeljima *CYP3A5*\*1/1 i \*1/\*3 te kod nositelja genotipa *ABCB1* CT i TT u odnosu na nositelje genotipa CC (178).

Danas je poznato da transmembranski prijenosnik *ABCB1* (P-gp) sudjeluje u metabolizmu TAC-a stoga se uz polimorfizme enzima *CYP3A4* i *CYP3A5* istražuje i utjecaj njegovih polimorfizma na farmakokinetiku TAC-a (150). Prema objavljenim istraživanjima, može se zaključiti da i polimorfizam *ABCB1* (uz polimorfizme koji uzrokuju nisku aktivnost enzima *CYP3A4* i *CYP3A5*) može modificirati sistemsku i intrarenalnu izloženost kalcineurinskim inhibitorima što povećava rizik za pojavu nefrotoksičnosti i odbacivanja presatka.

### *1.7. Interakcije imunosupresiva*

Značajan problem u farmakoterapiji jesu neželjene reakcije na lijekove koje su nepredvidive te mogu izazvati probleme kod bolesnika i biti životno ugrožavajuće. Nuspojave nastaju najčešće kod uzimanja više lijekova koji stupaju u međusobne interakcije i utječu na međusobni metabolizam. Smjernice EMA-e propisuju da se za svaki lijek u razvoju ispituju moguće interakcije ispitivanoga lijeka kao supstrata, inhibitora ili induktora enzima. Inhibitori enzima blokiraju funkciju enzima ili se natječu za vezno mjesto i zato se povećava koncentracija lijeka u organizmu, stoga treba prilagoditi/smanjiti dozu primijenjenoga lijeka. Induktori najčešće putem nuklearnih receptora povećavaju transkripciju gena čime se povećava količina enzima, a time i metabolizam lijeka što rezultira smanjenjem koncentracije u organizmu, stoga treba povećati dozu primijenjenoga lijeka (109). Mnoge tvari ili lijekovi mogu djelovati kao induktori ili inhibitori CYP enzima te posljedično mijenjati njihovu aktivnost. Istraživanja pokazuju da se vrlo ozbiljne neželjene reakcije javljaju kod određenoga broja bolesnika te da su osim primjerice dobi, bolesti jetre i bubrega uvjetovane i genetičkim polimorfizmom enzima/transportera.

Genetičke podloge za neželjene reakcije mogu se svrstati u dvije skupine (179):

- a) prvu skupinu čine geni (ADME geni) koji kodiraju enzime/transportere uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju lijeka, te geni koji kodiraju ciljna mjesta djelovanja lijeka (engl. *drug targets*).
- b) drugu skupinu su geni sustava HLA koji inducira alergijsku reakciju na lijek

Neželjene reakcije u prvoj skupini nastaju zbog prisustva inaktivirajućih alela metaboličkih enzima i prijenosnika lijekova (povećane koncentracije i nakupljanje lijeka na mjestu djelovanja te polimorfizama gena ciljnih molekula djelovanja lijeka (receptora) (180). U drugoj skupini neželjene reakcije nastaju aktivacijom imunostoga sustava zbog alergijskih reakcija izazvanih lijekovima, a povezanih s varijabilnosti sustava HLA (181).

Glavne nuspojave CsA-a zabilježene u kliničkim ispitivanjima jesu nefrotoksičnost, povećana podložnost infekcijama, zloćudne bolesti, hipertenzija, dislipidemija, hipokalemija, hipomagnezijemija, tremor i gastrointestinalni poremećaji (proljevi, mučnina, anoreksija i povraćanje). U usporedbi s TAC-om, pokazuje veću incidenaciju hiperlipidemije i hipertenzije, ali manji rizik za nastanak novoga dijabetesa nakon transplantacije (engl. *new-onset diabetes after transplantation*, NODAT), tremora i gastrointestinalnih poremećaja (30).

U sažetku opisa svojstava lijeka (27) navode se klinički značajne interakcije CsA-a s drugim lijekovima, primjerice CsA je inhibitor CYP3A4 i P-gp-a te OATP-a čime može povećati koncentraciju lijekova koji su supstrati enzima i/ili prijenosnika (npr. statini, digoksin, etopozid) (27). Lijekovi induktori CYP3A4 i/ili P-gp-a smanjuju koncentracije CsA-a, a kao takvi prepoznati su barbiturati, karbamzepin, gospina trava i dr. Inhibitori CYP3A4 i/ili P-gp-a koji povećavaju koncentraciju CsA-a u krvi jesu nikardipin, makrolidni antibiotici (eritromicin, azitromicin), metoklopramid, oralni kontraceptivi, imatinib, inhibitori proteaze i dr. Ne preporučuje se istodobna primjena TAC-a i CsA zbog mogućnosti razvoja nefrotoksičnosti i farmakokinetičke interakcije putem CYP3A4 i/ili P-gp (27).

Prema sažetku opisa svojstava lijeka (33), treba izbjegavati zajedničku primjenu TAC-a i grejpa, soka od grejpa, antifungalnih lijekova (npr. ketokonazol, itrakonazol, pozakonazol, vorikonazol), makrolidnih antibiotika (npr. klaritromicin, telitromicin, eritromicin), inhibitora HIV-proteaze (npr. ritonavir, nelfinavir), inhibitora proteaze HCV-a (npr. telaprevir, boceprevir), nefazodona, farmakokinetičkoga pojačivača kobicistata i inhibitora kinaze

(idelalisi, ceritinib) budući da mogu povisiti koncentracije TAC-a u krvi i povećati rizik nastanka nuspojava. Lijekovi koji su jaki induktori CYP3A4 i smanjuju koncentracije TAC-a u krvi jesu rifampicin, karbamzepin, apalutamid, enzalutamid, mitotan te gospina trava (33). Dodatno, treba paziti prilikom promjene terapije, zamjena CsA-a TAC-om, jer TAC ne utječe na enteroheptičko recikliranje MPA-a pa može doći do promjene biorasploživosti MPA-a (27, 33).

S obzirom da se radi o lijekovima uskoga terapijskog raspona koji pokazuju značajne varijabilnosti u farmakokinetici, obvezno je kod transplantiranih pacijenata kao sigurnosnu mjeru provoditi individualno praćenje koncentracije CsA-a i TAC-a u krvi kako ne bi došlo do razvoja nuspojava i odbacivanja presatka (27, 33). Najčešće zabilježene interakcije MPA-a su sa saciklovirom/ganciklovirom, antacidima, kolestiraminom i lijekovima koji vežu žučne kiseline. Kliničkim ispitivanjima je dokazano da u stanju dinamičke ravnoteže doze MPA-a ne utječu na farmakokinetiku CsA-a, međutim CsA utječe na farmakokinetiku MPA-a na način da smanjuje sistemsku biorasploživost MPA-a (182).

Lalić i suradnici su u svojoj studiji objavili da prisutvo 24T alela gena *ABCC2*, koji smanjuje ekspresiju i funkciju MRP2, ima slabiji učinak na koncentraciju MPA-a, ali ipak se može dovesti u vezu s nižim minimalnim koncentracijama MPA-a, nižom ostatnom koncentracijom MPA-a prije jutarnje i večernje doze te većim oscilacijama u koncentraciji MPA-a. Znanstvenici su potvrdili i ranije pretpostavke da je CsA potentan inhibitor MRP2 (139) te da stupa u interakciju s MPA-om na razini transporta i smanjuje biorasploživost MPA-a, dok TAC ne stupa u ovu interakciju (183).

## **1.8. Terapijsko praćenje lijekova (TDM)**

### *1.8.1. TDM u kliničkoj praksi*

Posljednjih 50-ak godina sve je veći naglasak na razvoju i primjeni praćenja koncentracija lijeka u krvi jer se tijekom godina pokazalo da je koncentracija lijeka u krvi povezana s farmakološkom aktivnosti te je bolji kandidat od primijenjene doze lijeka za mjerenje djelotvornosti i toksičnosti. TDM se primjenjuje u kliničkoj praksi, pri čemu se koncentracija lijeka može odrediti u krvi, urinu, likvoru i drugim biološkim tekućinama. Izmjerena koncentracija lijeka koristi se prilikom prilagođavanja režima doziranja kako bi se postigla ciljna koncentracija odnosno terapijski raspon koncentracija koji rezultiraju željenim učinkom

lijeka. Ovim se pristupom optimizira liječenje i poboljšava učinkovitost. TDM se najčešće provodi za sljedeće skupine lijekova: antikonvulzive, kardioaktivne lijekove (digoksin), respiratorne lijekove (bronhodilatatori), psihofarmake, imunosupresive, antineoplastike i antimikrobne lijekove. Važno je naglasiti da primjena TDM-a utječe pozitivno na ishode liječenja i smanjenje troškova zdravstvenoga sustava (184). Za provođenje je potreban prikladan laboratorijski test koji je odgovarajuće osjetljivosti, a lijek kandidat za TDM mora zadovoljiti nekoliko kriterija kako bi dobiveni rezultati mjerenja koncentracije pomogli prilikom odluke o farmakoterapiji (184):

- ne bi smio postojati nijedan drugi mjerljivi prediktor farmakološke učinkovitosti osim koncentracije (npr. krvni tlak kod antihipertenziva);
- mora postojati pouzdana korelacija između koncentracije analita i kliničkog ishoda;
- uski terapijski raspon;
- slabo predvidljiv odnos propisanog doziranja lijeka i koncentracije u krvi te značajna interindividulana razlika u farmakokinetici;
- dugoročna primjena lijeka kod pacijenta;
- poznate su ozbiljne neželjene reakcije u slučaju pod- ili predoziranja.

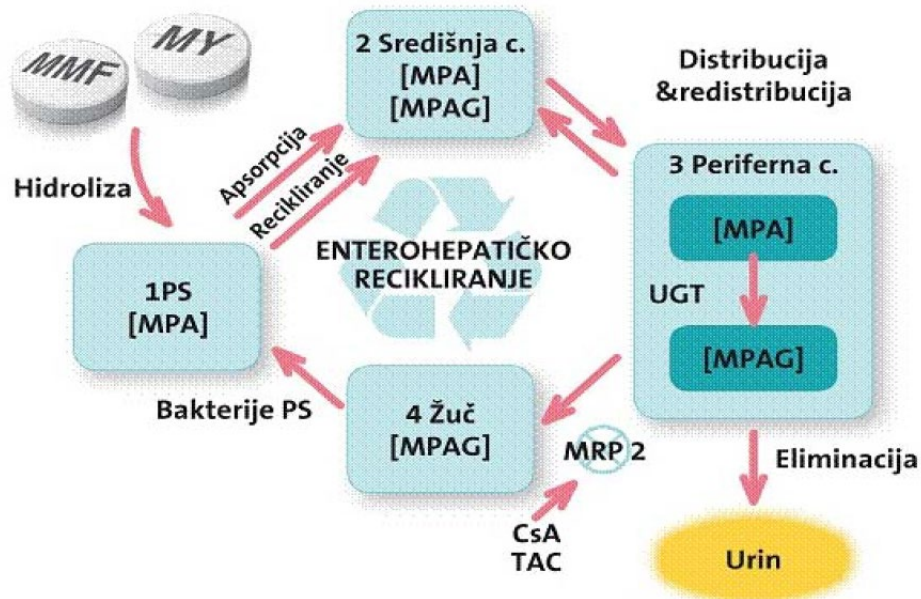
Farmakokinetika daje informacije o putu prolaska lijeka kroz organizam, dok TDM pomaže da se utvrdi status farmakokinetike u trenutku uzimanja uzorka. Primjenom matematičkih modela može se predvidjeti odražava li se izmjerena koncentracija u određenom vremenu raspodjelu i metabolizam karakterističan za određenu populaciju i pojedinoga bolesnika. Dakle, primjenom TDM-a može se procijeniti toksičnost i učinkovitost lijeka. Farmakokinetičke razlike upozoravaju na mogućnost prisutnosti genetičkih varijacija, interakcija lijek-lijek-hrana, oštećenja pojedinih organa i nesuradljivost pacijenta (185). Glavna pretpostavka TDM-a je da je promjena koncentracije lijeka u krvi u nekom vremenu razmjerna koncentraciji na receptorima i u tkivima te predstavlja osnovu za postavljanje terapijskih, referentnih i toksičnih koncentracija. Najčešće mjereni parametri su vršna koncentracija ( $C_{max}$ ) koja predstavlja maksimalnu koncentraciju lijeka u intervalu doziranja i ostatna koncentracija ( $C_{trough}$ ) koja je minimalna koncentracija lijeka prije sljedeće doze. Višestrukim doziranjem, odnosno primjenom lijeka svakih  $t_{1/2}$  (poluvrijeme eliminacije) postiže se stanje dinamičke ravnoteže (engl. *steady state*) u kojem je koncentracija lijeka u krvi u ravnoteži sa stupnjem primijenjene doze i stupnjem izlučivanja. Za većinu lijekova potrebno je 4-5  $t_{1/2}$  za postizanje stanja ravnoteže. U stanju ravnoteže, vršna koncentracija ne smije biti veća od minimalne toksične koncentracije, a ostatna koncentracija mora biti veća od minimalne učinkovite koncentracije.

Terapijski raspon je veza između minimalne toksične i minimalne učinkovite koncentracije. Kod lijekova uskoga terapijskog indeksa (primjerice imunosupresivni lijekovi) raspon je manji pa je i potreba za provođenjem TDM-a veća (185).

### *1.8.2. TDM mikofenolne kiseline*

MPA pokazuje značajnu varijabilnost odnosa doze i koncentracije u krvi, u kliničkoj praksi se pokazalo da primjena standardnih doza kod transplantiranih pacijenata pokazuje do 10 puta veće razlike u biorasploživosti stoga mjerenjem koncentracije MPA-a u organizmu i prilagođenim režimom doziranja možemo postići optimalne kliničke ishode liječenja i smanjiti rizik od odbacivanja presatka (16, 188). Prema literaturi, ciljane terapijske vrijednosti ostalih koncentracija MPA-a u kombinaciji s CsA-om su 1-3,5 mg/L te TAC-om 1,9 - 4,0 mg/L (16).

Farmakokinetika MPA pokazuje interindividulanu varijabilnost, izloženost lijeku povećava se s duljinom uzimanja terapije što je povezano i s biokemijskim parametrima u krvi (koncentracija albumina) te konkomitantnom terapijom CsA-om bilo da se započinje ili ukida liječenje CsA-om (16, 189). Obje formulacije MPA-a, MMF i EC-MPS, u organizmu prelaze u aktivni oblik MPA te iz tog razloga imaju isti mehanizam djelovanja. Nakon oralne primjene, maksimalne koncentracije MPA-a u krvi javljaju se u vremenu od 30 minuta do dva sata nakon uzimanja lijeka (16). EC-MPS je razvijen s ciljem smanjenja nuspojava u gastrointestinalnom traktu te se zbog svoje želučanootporne ovojnice MPA oslobađa iz formulacije tek u tankom crijevu pri neutralnom pH dok je želučanootporna ovojnica netopljiva pri pH 5 (190). Nakon oralne primjene EC-MPS-a vršne koncentracije u krvi mogu se izmjeriti 2 do 3 sata nakon uzimanja lijeka. Navedene razlike u formulaciji koje su odgovorne i za različita vremena postizanja maksimalnih koncentracija u krvi je potrebno uzeti u obzir prilikom interpretacije biorasploživosti MPA-a kod procjene farmakokinetičkoga profila obje formulacije (27).



**Slika 11.** Prikaz biorasploživosti MPA u procesu enterohepatičkoga recikliranja u kojem sudjeluju enzimi UGT i prijenosnici MRP2 (preuzeto i prilagođeno prema 191 uz dozvolu Wolters Kluvert Health, Inc.)

Oko 90 % oralne doze izlučuje se urinom u obliku MPAG-a posredovano je prijenosnikom ABCC2. Većina MPA-a i MPAG-a u serumu vezana je na albumine. Promjena koncentracije albumina moguća je tijekom bolesti bubrega i jetre ili primjenom politerapije kad se više lijekova natječe za vezna mjesta na albuminu te zahtijeva smanjenje doze MMF-a. Akumulacija MPAG-a uzrokuje povećanu koncentraciju slobodne MPA-a u plazmi jer MPAG istiskuje MPA s albumina što povećava klirens i smanjuje AUC MPA-a uz postizanje stabilne koncentracije slobodne MPA-e (192). Varijabilnost farmakokinetike MPA-a osim o razini albumina ovisi i o bubrežnoj funkciji, razini hemoglobina i ostatnim koncentracijama CsA-a koji kako što je ranije rečeno inhibira enterohepatičku recirkulaciju MPA-a (193).

Ostatne jutarnje koncentracije MPA-a nisu dobar predskazatelj izloženosti MPA-u (neovisno o formulaciji lijeka) već biorasploživost (AUC) koja je najbolji farmakokinetički parametar za procjenu izloženosti organizma MPA-u. Kod bolesnika s transplantiranim bubregom, potrebno je uzimanje uzoraka krvi 3-5 puta tijekom intervala doziranja od 2 do 6 sati kako bi se mogla procijeniti AUC. Iako su dokazi limitirani, AUC MPA-a između 30 i 60 mg/L/h je najučinkovitiji posttransplantacijski ciljani terapijski raspon dok se ravnotežne koncentracije



MPA-a trebaju održavati u rasponu od 1-4 mg/L. Važno je naglasiti da sistemska raspoloživost MPA-a ovisi i o primijenjenom CNI-u (14, 191).

U krvi je MPA distribuirana u plazmi gdje se veže na serumski albumin. Tijekom 12-satnoga intervala doziranja mjeri se koncentracija lijeka u odnosu na vrijeme,  $AUC_{0-12h}$ , i ovo razdoblje je vrijeme brze apsorpcije u kojem se maksimalne koncentracije postižu unutar 1 sata nakon čega slijedi brza distribucija u tkivima i pad koncentracije u plazmi (191). Hipoalbuminemija je jedan od faktora koji utječe na dostupnost MPA-a u organizmu jer nastaje manjak veznih mjesta na albuminu za MPA i MPAG, što dovodi do povećanja razine slobodne MPA-a pa posljedično tome povećava se i njezin klirens što smanjuje koncentraciju MPA-a u plazmi i bioraspoloživost (193). Hipoalbuminemija može imati značajan klinički učinak na klirens MPA-a pogotovo kada je razina albumina u krvi niža od 31 g/L. Iz navedenoga razloga pri ovoj ili nižoj koncentraciji albumina kliničari bi trebali razmotriti primjenu terapijskoga praćenja koncentracije MPA-a. Navedeno je zapažanje potvrđeno i u studiji provedenoj na 468 pacijenata s transplantiranim bubregom koja zaključuje da su razlike u izloženosti MPA-u, kada se uspoređuju pacijenti s ili bez odođene renalne funkcije presatka ili pacijenti različitih rasa, uzrokovane utjecajem bubrežne funkcije i razinom serumskoga albumina što je povezano i s klirensom MPA-a (138).

### *1.8.3. TDM ciklosporina*

CsA karakteriziraju svojstva varijabilnosti u brzini i vremenu apsorpcije kao i uski terapijski indeks, pa bi teoretski jedno mjerenje koncentracije u krvi 2 sata nakon primjene CsA-a ( $C_2$ ) bilo puno bolji pokazatelj sistemske raspoloživosti lijeka nego mjerenje koncentracije prije sljedeće doze. Međutim, postoji malo dokaza iz prospektivnih studija koji bi potkrijepili ovu činjenicu pa se u kliničkoj praksi primjenjuje mjerenje ostatne koncentracije u krvi prije sljedeće doze lijeka (186). Izloženost lijeku tijekom cijeloga razdoblja doziranja prikazuje se AUC-om i najbolji je pokazatelj bioraspoloživosti imunosupresivnih lijekova. Kako bi se dobila ova krivulja, potrebno je uzastopno uzorkovanje u točno određenim vremenskim intervalima, ali zbog visoke cijene višestrukoga uzorkovanja i uzastopnih analiza te nepraktičnosti postupka (primjerice za mjerenje  $C_2$  treba uzorak krvi uzeti unutar 15 min prije ili poslije intervala doziranja od 2 sata) u većini laboratorija ipak se rutinski provodi mjerenje  $C_{trough}$ . Iako je  $C_2$  u kliničkim ispitivanjima pokazala bolju korelaciju s djelotvornosti i toksičnosti CsA-a odnosno daje bolju mogućnost preciznijega doziranja i prepoznavanja pacijenata koji su pod rizikom od

akutnoga odbacivanja, ipak u praksi nije zaživjela primjena kao rutinskoga laboratorijskog postupka (187).

Prema podacima u sažetku opisa svojstava lijeka liječenje CsA-om treba započeti 12 sati prije operacije/transplantacije u dozi od 10 do 15 mg/kg dano u dvije doze tijekom dana (27). Dnevnu dozu treba održavati postoperativno tijekom 1-2 tjedna te postupno smanjivati u skladu s koncentracijama u krvi i lokalnim protokolima imunosupresije dok se ne postigne preporučena doza održavanja od oko 2 do 6 mg/kg dano u dvije podijeljene doze. U terapiji s drugim imunosupresivnim lijekovima (primjerice kortikosteroidi ili kao dio trostruke ili četverostruke terapije), mogu se primjenjivati niže doze (3 do 6 mg/kg dano u dvije podijeljene doze za uvođenje liječenja) (27). Maksimalne koncentracije u krvi postižu se 2 do 3 sata nakon doziranja, nakon čega se smanjuju zbog reakcija metabolizma dok se ne postigne ostatna koncentracija  $C_{\text{trough}}$ . Za CNI karakteristično je da se maksimalna farmakokinetička inter i intra-varijabilnost događa u fazi apsorpcije što je 2 sata nakon uzimanja lijeka. Uzorak za analizu  $C_{\text{trough}}$  uzima se neposredno prije sljedeće oralne doze, a budući da se CsA dozira 2 puta dnevno, uzorak krvi za analizu uzima se 12 sati nakon uzimanja večernje odnosno jutarnje doze lijeka (187).

#### *1.8.4. TDM takrolimusa*

Zbog varijabilne farmakokinetike, uskoga terapijskog indeksa, a u svrhu održavanja terapijskih koncentracija TAC-a u krvi, primjenjuje se TDM pri kojem se određuju ostatne koncentracije TAC-a u punoj krvi koje koleriraju s AUC-om odnosa koncentracije lijeka u krvi i vremenu. Terapijsko praćenje koncentracije TAC-a u krvi počinje nakon transplantacije i pomaže pri odabiru odgovarajuće doze čime osiguravamo raspoloživost lijeka u organizmu koja će biti djelotvorna i neće izazvati imunosnu reakciju ili odbacivanje presatka. Najčešće se danas u klinici prate ostatne koncentracije TAC-a u punoj krvi 12 sati nakon transplantacije ( $C_0$  through) koje dobro koleriraju s  $AUC_{0-12}$  (194). TDM može identificirati bolesnike koji imaju niske koncentracije TAC-a u krvi, a povećanjem doze može se postići optimalna koncentracija u krvi. Međutim za ovaj je učinak potrebno 7 do 10 dana, a subterapijske doze imunosupresiva u ranom posttransplantacijskom periodu povećavaju rizik od odbacivanja organa (195).

Odnos  $C_0$  i AUC-a je kontroverzan, jedne studije opisuju bolju korelaciju koncentracije nakon 5 sati ( $C_5$ ) i  $AUC_{0-6h}$ , druge studije potvrđuju bolju korelaciju između koncentracija  $C_3$ ,  $C_4$  i  $AUC_{0-12h}$ . TDM ne daje informaciju o optimalnoj početnoj dozi TAC-a. Bioraspoloživost TAC-

a ovisi i o složenom međusobnom djelovanju koje uključuje genske polimorfizme, etničko podrijetlo lijekovima, prehranu, endogene supstance, patologiju crijeva, bolesti jetre i bubrega, hipoalbuminemiju, anemiju, starenje te formulaciju (195). Prvih nekoliko dana terapije važno je praćenje  $C_0$  TAC-a te prema dobivenim vrijednostima prilagođavanje doze lijeka da vrijednosti  $C_0$  budu u rasponu 10-15 ng/ml u ranom postransplantacijskom periodu, 5-15 ng/ml tri mjeseca nakon transplantacije te 5-10 ng/ml dvanaest mjeseci nakon transplantacije (187). Bolesnici s transplantiranim bubregom dobivaju standardne početne doze izračunate prema tjelesnoj masi 0,20-0,30 mg/kg podijeljeno u dvije doze, doze se obično smanjuju u razdoblju nakon transplantacije odnosno prilagođavaju prema rezultatima TDM-a (33). Koncentracije TAC-a u krvi mjere se više puta tijekom prvih tjedana nakon početka terapije. Krv treba vaditi otprilike 12 sati nakon uzimanja lijeka, neposredno prije sljedeće doze. TDM može pomoći u prilagodbi doziranja pojedinom pacijentu, međutim nije dovoljno samo praćenje utjecaja koncentracije jer i drugi čimbenici kao što su dob, vrsta presatka, biljezi raspoloživosti TAC-a, vrijeme nakon transplantacije, konkomitantna terapija i suradljivost pacijenta mogu utjecati na učinkovitost TDM-a. Većina transplantacijskih centara za određivanje režima doziranja primjenjuje vrijednosti  $C_0$  međutim najbolji pokazatelj izloženosti lijeku je AUC. AUC se primjenjuje vrlo rijetko, prvenstveno iz financijskih i praktičnih razloga (potrebno je 8-12 uzoraka krvi) (196). Prema konsenzusu objavljenom od strane *International association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology* (IATDMCT), preporuka je da se liječenje započinje s inicijalnom dozom TAC-a od 0,15 mg/kg dva puta dnevno, za postizanje  $C_0$  u rasponu od 10-20 ng/ml tijekom prva dva mjeseca nakon transplantacije nakon čega se koncentracija treba održavati u terapijskom rasponu do 5-10 ng/ml. AUC se smatra najboljim pokazateljem farmakokinetike TAC-a koji je povezan s kliničkim ishodom terapije, stoga je konsenzualno predloženo monitoriranje AUC parametra (kada je to moguće). Ipak rutinsko praćenje  $C_0$  koncentracija TAC-a uobičajena je praksa za ambulantne pacijente (170).

**Tablica 8.** Terapijski raspon imunosupresiva (14, 187, 191)

Lijek	Spol	Dob	Terapijski raspon
MPA	M, Ž	Svi	1-4 mg/L
CsA	M, Ž	Svi	50-350 µg/L
TAC	M, Ž	Svi	5-15 ng/mL

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

### 2.1. Svrha rada

Transplantacija bubrega u posljednjih je 25 godina postala uobičajena terapija bolesnika u završnoj fazi bubrežne bolesti budući da predstavlja postupak kojim se značajno poboljšava kvaliteta života u odnosu na kvalitetu života bolesnika na dijalizi, a ujedno je i postupak koji omogućava dugoročno preživljenje bolesnika i produljenje njegovoga života. Danas se sa sigurnošću može reći da je uspjehu transplantacije značajno pridonio razvoj imunosupresivskih lijekova kojima se postiže suprimiranje imunosne reakcije organizma na presadak.

MPA se primjenjuje u konkomitatnoj terapiji s CsA-om ili TAC-om. Kombinacija MPA-a i CNI-a (s ili bez primjene kortikosteroida) predstavlja glavni oslonac imunosupresije za transplantirane bolesnike.

Interindividulana i intraindividulana farmakokinetička varijabilnost pojedinaca u odgovoru na imunosupresivske lijekove predstavlja značajan klinički problem koji može dovesti do neželjnih posljedica primjene ovih lijekova kao što su izostanak terapijskoga učinka, interakcije lijekova, razvoj ozbiljnih nuspojava (primjerice nefrotoksičnost) i u konačnici odbacivanje presatka. Metabolizam imunosupresivskih lijekova, odnosno njihova bioraspoloživost u organizmu, uz čimbenike kao što su spol, dob, trudnoća, bolesti bubrega i jetre, uvelike ovisi i o genetičkim polimorfizmima enzima i transportnih proteina koji sudjeluju u metaboličkim reakcijama lijekova. Polimorfizmi gena *UGT1A9*, *CYP3A4* i *CYP3A5* te transportnih proteina *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *SLCO1B1* uključenih u metabolizam imunosupresivskih lijekova mogu utjecati na njihovu farmakokinetiku i bioraspoloživost u organizmu što u konačnici može rezultirati varijabilnim ishodom liječenja bolesnika s transplantiranim bubregom.

Ispitivanje polimorfizama gena uključenih u sintezu metaboličkih enzima i transportnih proteina predstavlja alat koji se može koristiti u kliničkoj praksi kako bi pomoću dobivenih rezultata genetičkoga testiranja postigli optimalno doziranje, a time i optimalnu djelotvornost imunosupresivnih lijekova s ciljem smanjenja mogućnosti odbacivanja presatka.

U tu je svrhu provedena farmakogenetička analiza enzima *UGT1A9*, *CYP3A4/5* i prijenosnika *ABCG2* te je procijenjen njihov utjecaj na farmakokinetiku imunosupresiva.

## 2.2. Hipoteza

Polimorfizmi gena metaboličkih enzima UGT1A9, UGT2B7, CYP3A4, CYP3A5 i transportnih proteina ABCG2, ABCC2, ABCB1 i SLCO1B1 promatrani pojedinačno i u međusobnim interakcijama (gen-gen-lijek) utječu na farmakokinetičke parametre MPA-a pri konkomitantnoj primjeni s CsA-om ili TAC-om.

## 2.3. Ciljevi rada

Glavni cilj istraživanja jest ispitati utjecaj polimorfizama *UGT1A9* (-2152C>T, -275 T>A) i *ABCG2* c.421C>A na farmakokinetiku MPA-a te utjecaj polimorfizma *CYP3A4*\*22, *CYP3A5*\*3 na koncentracije CsA-a ili TAC-a kod bolesnika s transplantiranim bubregom.

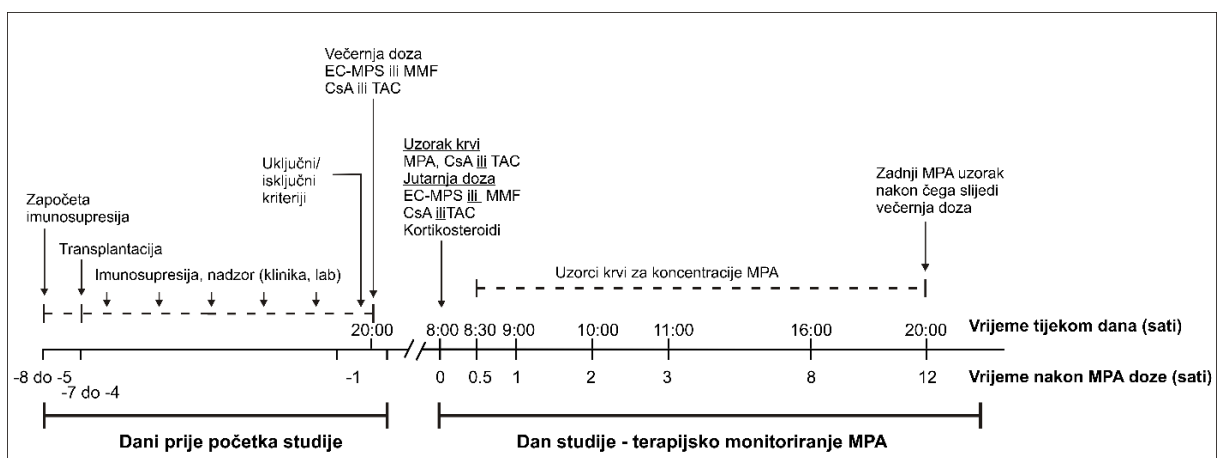
Specifični ciljevi obuhvaćaju ispitivanje :

- učestalosti i pojedinačne uloge polimorfizma gena metaboličkog enzima UGT1A9 na farmakokinetiku MPA
- učestalosti polimorfizama gena metaboličkih enzima CYP3A4 i CYP3A5 te utjecaja polimorfizama gena CYP3A4 i CYP3A5 na varijabilnost koncentracija CsA-a i TAC-a
- učestalosti pojedinih alela i genotipova *UGT2B7* -161C>T, *ABCG2* c.421C>A, *ABCB1* 2677G>T/A, 3435C>T, 1236C>T, *ABCC2* 24 C>T, 1249 G>A i *SLCO1B1* c.521T>C
- povezanosti polimorfizama gena *UGT2B7* -161C>T, *ABCG2* c.421C>A, *ABCB1* 2677G>T/A, 3435C>T, 1236C>T, *ABCC2* 24 C>T i *SLCO1B1* c.521T>C s farmakokinetikom MPA
- dometa interakcija CsA-a i TAC-a s MPA u odnosu na polimorfizme gena transportnog proteina *ABCG2* 421 C>A

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Oblikovanje studije-opis

Provedena je prospektivna opservacijska studija u trajanju od jednoga doznog intervala za MPA u stanju dinamičke ravnoteže u stabilnih odraslih i adolescentnih primatelja bubrežnih transplantata. Shema studije prikazana je na slici 12. Studija se temelji na TDM-u MPA-a te određivanju ostatnih koncentracija CsA-a ili TAC-a neposredno prije jutarnje ( $C_0$  ( $C_{\text{trough1}}$ )) odnosno neposredno prije večernje doze ( $C_{12}$  ( $C_{\text{trough2}}$ )) na kraju doznog intervala.



Slika 12. Shematski prikaz tijeka studije

Kandidati za uključenje bili su bolesnici podvrgnuti transplantaciji bubrega. U sklopu standardnih postupaka, 1-2 dana prije samoga studijskog razdoblja, započeta je imunosupresivna premedikacija, nakon koje je slijedila transplantacija. Tijekom idućih nekoliko dana, bolesnici su u sklopu standardnoga postupka nastavili primati imunosupresivnu terapiju i bili su praćeni (klinički i laboratorijski). Nakon 5-7 dana (vrijeme potrebno da se postigne dinamička ravnoteža rabljenih lijekova), na temelju razvoja kliničkog stanja i laboratorijskih parametara procijenjeno je udovoljavaju li uvjetima za uključenje u studiju. Uvečer toga dana primili su redovne doze MPA-a (u obliku MMF-a ili EC-MPA-a), te CNI (CsA ili TAC). Sljedećega jutra, u 8 sati, kao dio standardne rutinske procedure TDM-a imunosupresiva, uzeti su uzorci krvi za određivanje ostatnih koncentracija (engl. *trough concentration*) MPA-a, CsA-a ili TAC-a; nakon čega je slijedila standardna jutarnja doza lijeka. Tijekom idućih 12 sati (vrijeme doznog intervala za MPA), uzeto je 6 uzoraka krvi za

određivanje koncentracije MPA-a tijekom 12-satnog razdoblja: 0,5, 1, 2, 3, 8 i 12 sati nakon jutarnje doze. Dakle, posljednji je uzorak uzet u 20:00 sati istoga dana, neposredno prije iduće redovne doze (Slika 12). Koncentracije MPA-a korištene su za određivanje standardnih farmakokinetičkih parametara u stanju dinamičke ravnoteže. U studiju su uključeni samo oni ispitanici koji su udovoljili uključne-isključne kriterije. Uključeni ispitanici genotipizirani su za polimorfizam od primarnoga interesa, *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) (polimorfizam koji rezultira redukcijom funkcije ABCG2 transportera), te za daljnje polimorfizme za koje je u literaturi sugerirano da bi mogli biti povezani s bioraspoloživošću MPA-a:

- i) polimorfizme u genima koji kodiraju glavne metabolizirajuće enzime MPA-a, UGT1A9 (*UGT1A9 -275T>A* (rs6714486)) i *-2152C>T* (rs17868320)) i UGT2B7 (*UGT2B7 -161C>T* koji je u potpunoj neravnoteži vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) s polimorfizmom *UGT2B7 802C>T* (rs7439366));
- ii) tri najčešća polimorfizma u genu koji kodira P-gp (ABCB1 transporter) (*ABCB1 2677G>T/A* (rs2032582), *3435C>T* (rs1045642) i *1236C>T* (rs1128503));
- iii) polimorfizam u genu koji kodira OATP1B1 (*SLCO1B1 c.521T>C* (rs4149065)) koji je u potpunom LD s polimorfizmom *c.388A>G* (rs2306283));
- iv) polimorfizme u genima koji kodiraju CYP enzime 3A4 i 3A5 (*CYP3A4\*22* (rs35599367) i *CYP3A5\*3* (rs776746)) važne u metabolizmu inhibitora kalcineurina;
- v) dva polimorfizma u genu koji kodira protein višestruke rezistencije na lijekove ABCC2 (*ABCC2 -24C>T* (rs717620) i *1249G>A* (rs2273697)), koji je određen ne samo u primatelja već i u donora organa.

Analizom podataka nastojalo se procijeniti utjecaj varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* na bioraspoloživost MPA-a. S obzirom da je studija opservacijska, sve procjene učinka varijantnoga alela podvrgnute su analizi senzitivnosti na nemjereni (ostatni) *confounding*. (pogledati objašnjenje u dijelu Osjetljivost na nemjereni (ostatni) *confounding*).

### 3.2. Ispitanici

U studiju su uključeni ispitanici koji su zadovoljili sljedeće kriterije:

- i) dali su informirani pristanak za uporabu anonimiziranih medicinskih podataka u istraživačke svrhe i pristanak za genotipizaciju potencijalno važnih farmakogena (jedini postupak koji je odstupao od standardne procedure s primateljima bubrežnih presađaka);
- ii) dob  $\geq 16$  godina;

iii) tijekom 5-7 dana prije dana studije bili su klinički stabilni: (a) bez kirurških komplikacija; (b) bez znakova disfunkcije ili odbacivanja presatka; (c) bez teških komorbiditeta (kardiovaskularnih, jetrenih, metaboličkih, infektivnih, gastro-intestinalnih; (d) procijenjeni su kao pacijenti niskoga imunološkog rizika; (e) na dan prije dana studije, serumski kreatinin je bio  $\leq 300 \mu\text{mol/L}$  (ili procijenjena glomerularna filtracija  $>14 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ), ili barem za 1/3 niži od prvog postoperativnog dana, i imali su stabilnu diurezu od oko 60 mL/h; (f) serumski albumin  $>31 \text{ g/L}$ ;

iv) tijekom pred-studijskih dana i dana studije, nisu primali niti jedan od sljedećih lijekova: inhibitori protonske crpke, antacidi, vezivači fosfata, oralni pripravci željeza, magnezija ili kalcija, rifampicin ili bilo koji antibiotik (zbog moguće interakcije s bioraspoloživostu MPA-a).

Regrutacija bolesnika, uzorkovanje biološkoga materijala i kliničko praćenje bolesnika odvijalo se u Klinici za urologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb).

Laboratorijske analize i pohrana uzoraka odvijali su se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Provedba istraživanja je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ovo je istraživanje nastavak istraživanja koje je provedeno u sklopu doktorske dizertacije Z. Lalić (183) koje je istraživalo utjecaj genetičkoga polimorfizma transportnog proteina ABCC2 na bioraspoloživost MPA-a u komedikaciji sa CsA-om ili TAC-om te su u ovom proširenom istraživanju korišteni arhivirani ostatni uzorci DNA iz arhive Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, uz suglasnost pacijenta i odobrenje Etičkog povjerenstva za dodatno testiranje.

### *3.3. Imunosupresivni protokoli*

Kod ispitanika su primijenjeni standardni imunosupresivni protokoli, prema odluci nadležnih liječnika, koji obuhvaćaju: i) MPA u obliku natrijeve soli, formulirana kao želučanootporna tableta (EC-MPS, Myfortic®; Novartis, Švicarska) ili kao tablete MMF-a s trenutnim oslobađanjem (CellCept®; Roche, Švicarska). Prva je doza primijenjena prije transplantacije (1x720 mg EC-MPS ili 1x1000 mg MMF), te je nastavljena nakon transplantacije kao 720 mg



EC-MPS dva puta dnevno ili kao 500-1000 mg MMF dva puta dnevno, prema tjelesnoj težini; ii) CNI CsA (oralna mikroemulzija; Sandimmun Neoral®, Novartis, Švicarska) ili TAC (kapsule s trenutnim oslobađanjem; Prograf®, Astellas, Irska). Prva je doza primijenjena prije transplantacije (CsA, 1x3,0 mg/kg; TAC, 1x4,5 mg), a tretman je nastavljen nakon transplantacije kao CsA 3 mg/kg dva puta dnevno ili TAC dva puta dnevno, uz podešenje prema vrijednosti jutarnjih ostatnih koncentracija; i (iii) kortikosteroidi u dozi od 60 mg/dan prednizon-ekvivalenta tijekom tri dana, uz brzu redukciju na 30 mg/dan (predominantno prednizon; Decortin®, Merck, Njemačka; sporadično metilprednizolon; Medrol®, Pfizer, Italija).

### 3.4. Bioanalitičke metode

Koncentracije imunosupresijskih lijekova određene su na Odjelu za laboratorijsku farmakologiju i toksikologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije mikofenolne kiseline

Koncentracije MPA-a u plazmi izmjerene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) s UV detektorom te programskom podrškom Turbochrom (Perkin Elmer, SAD) uz primjenu komercijalno dostupnog HPLC kompleta za obradu uzoraka i kolonom za određivanje MPA-a u plazmi (Chromosystems, Njemačka).

#### HPLC sustav

#### Oprema, pribor i regensi:

Uređaj za automatsko uzorkovanje (Spark Holland, Nizozemska)

UV/VIS spektrofotometrijski detektor (UV/VIS Detector LC 290-Perkin Elmer, SAD)

Upravljački program (Turbochrom- Perkin Elmer, SAD)

Izokratična pumpa (LC pump 250-Perkin Elmer, SAD)

Međusklop (Nelson NCI 900 chromatography-Perkin Elmer, SAD)

Automatske podesive pipete: 100, 200, 1000 µl (Kartell, Italija)

Staklene graduirane menzure: 100, 200, 500 mL

HPLC kolona s predkolonom (Chromsystems, Njemačka)

Sistem za dobivanje vode visoke čistoće (TKA, Njemačka)

Centrifuga (MPW-Medical instruments, SAD)

Sistem za filtriranje (Millipore, SAD)

### **Reagensi:**

Komplet reagensa za ekstrakciju i kvantitativno određivanje MPA-a u plazmi metodom HPLC (Chromsystems, Njemačka)

Komercijalne kontrole MPA-a u plazmi (Chromsystems, Njemačka)

$L_1 = 1,94 (1,55-2,33) \text{ mg/L}$

$L_2 = 5,73 (4,58-6,87) \text{ mg/L}$

Metanol (Merck, Njemačka)

Radni uvjeti:

volumen injiciranoga uzorka: 20  $\mu\text{l}$

$\lambda = 215 \text{ nm}$

radni protok: 1 mL/min

temperatura: 25 °C

vrijeme trajanja analize: 8 minuta

### **Uzorkovanje analitičkog materijala**

Primarni uzorak: 3-5 ml pune venske krvi (epruveta s antikoagulantom Na-EDTA)

- za izdvajanje DNA i genotipizaciju polimorfizama od interesa
- za izdvajanje plazme i određivanje koncentracija MPA-a

Uzorci za određivanje koncentracije MPA-a pohranjuju se na + 4 °C, zatim se centrifugiraju 10 minuta na 860 x g, plazma se odvaja u drugu epruvetu i pohranjuje na -20 °C do određivanja koncentracija MPA-a.

### **Priprema uzorka za analizu MPA-a u plazmi metodom HPLC**

Uzorci plazme su nakon odmrzavanja ekstrahirani kolonskom ekstrakcijom na krutoj fazi (engl. *solid-phase extraction*). U 250  $\mu\text{l}$  plazme dodan je interni standard. Nakon centrifugiranja uzorak je nanesen na pripremljenu („ekvilibriranu”) kolonu. Propisani postupci (vezanje, pranje, eluiranje) provedeni su centrifugiranjem na 1200 x g, prema propisanim vremenskim rasponima s reagensima navedenoga proizvođača.

Uz svaku seriju analiziranih uzoraka korištene su prethodno otopljene komercijalne liofilizirane kontrole (L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub>).

### **Validacija analitičke metode**

U laboratoriju je provedena verifikacija komercijalno dostupne metode i provjerene su granica određivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) i granica kvantitativacije (engl. *Limit of quantitation*, LOQ), linearnost u radnom rasponu (do 30 mg/L), preciznost i srednja preciznost te ponovljivost. Verifikacijom metode dobivene su vrijednosti koje odgovaraju vrijednostima dobivenim tijekom validacije metode od strane proizvođača, a što potvrđuje da je metoda pouzdana za određivanje koncentracije MPA-a u definiranom rasponu. Rezultati MPA-a su bili uključeni u Međunarodni program vanjske procjene kvalitete (engl. *The United Kingdom National External Quality Assessment Service*, UK NEQAS).

#### *3.4.2. Određivanje koncentracije ciklosporina i takrolimusa*

Koncentracije CsA-a i TAC-a te biokemijski i klinički pokazatelji stanja bolesnika koristili su se iz pacijentove baze podataka KBC-a Zagreb.

Koncentracije CNI-a, CsA i TAC-a, mjerene su u punoj krvi imunokemijskom metodom (engl. *Antibody Conjugated Magnetic Immunoassay*, ACMIA), proizvođača Siemens, Njemačka.

Rezultati CsA i TAC-a su bili uključeni u Međunarodni program vanjske procjene kvalitete Diagnostic Rap/Tac/CsA proizvođača MORE DIAGNOSTIC Los, Osos, CA USA.

#### *3.4.3. Mjerenje kreatinina u serumu i procjena klirensa kreatinina*

Klirens kreatinina procijenjen je Cockcroft-Gault metodom, na temelju koncentracije kreatinina u serumu izmjerene enzimskim testom na mjernom uređaju Cobas c501, Roche, Njemačka koji je validiran izotopnom dilucijskom masenom spektrometrijom. Vrijednosti kreatinina za svakoga pojedinačnog bolesnika uzete su iz redovnih laboratorijskih pretraga provedenih tijekom ranoga posttransplantacijskog razdoblja.

Cockcroft-Gault jednadžba:

$$eGFR = \left[ \frac{(140 - dob) \times TT}{72 \times S} \right] \times F$$

Dob – starost bolesnika izražena u godinama; TT – tjelesna težina bolesnika izražena u kilogramima; S– koncentracija kreatinina ( $\mu\text{mol/L}$ ) u serumu; F – faktor, žene  $F=0,85$ , muškarci  $F=1$ .

### 3.5. Metode genotipizacije

Postupci izdvajanja i genotipizacije DNA provodili su se u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

#### 3.5.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA provodilo se iz 3-5 ml pune krvi s antikoagulantom Na-EDTA, korištenjem komercijalnoga reagensa BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

#### 3.5.2. Genotipizacija *ABCG2*, *UGT1A9*, *UGT2B7*, *ABCB1*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCC2*

Genotipizacija polimorfizama *ABCG2* c.421 C>A (rs2231142), *UGT1A9* -275 T>A (rs6714486), -2152C>T (rs17868320), *UGT2B7* -161 C>T (rs7668258) u potpunom LD s *UGT2B7* 802 C>T (rs7439366), *ABCB1* 2677G>T/A (rs2032582), 3435 C>T (rs1045642)), 1236 C>T (rs1128503), *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149065) u potpunom LD s polimorfizmom c.388 A>G (rs2306283), *CYP3A4*\*22 (rs35599367) i *CYP3A5*\*3 (rs776746), *ABCC2* -24C>T (rs717620), 1249 G>A (rs2273697) provedena je metodom PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR) (TaqMan, 7500 RealTime PCR System, Applied Biosystems, SAD) za otkrivanje i analizu SNP-a koristeći reagens TaqMan® SNP Genotyping prema šiframa (*TaqMan*®*SNP Assay ID*) navedenim u tablici 9. Određivanje polimorfizama provedeno je na uređaju za qPCR ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) analizom alelne diskriminacije.

Genotipizacija polimorfizma *ABCB1* c.2677 G> T/A (rs 2032582) provedena je na uređaju *LightCycler*<sup>®</sup> metodom za qPCR Roche Diagnostics, Njemačka).

### 3.5.2.1. *TaqMan* metoda za qPCR

Načelo metode: PCR metoda je metoda tijekom koje se od jedne kopije molekule DNA dobije nekoliko milijardi kopija ovisno o broju ciklusa umnažanja. Za provođenje reakcije umnažanja, potrebno je znati slijed nukleotida odsječka DNA od interesa i koji se želi umnožiti. Svaki ciklus obuhvaća nekoliko faza: a) denaturaciju dvostruke DNA molekule (temperatura 95 °C), b) hibridizaciju specifičnih oligonukleotidnih klica i sonda (fluorescentno obilježene oligonukleotidnesonde) te c) umnažanje ciljnjoga slijeda DNA. Sonde stvaraju fluorescentni signal zbog 5' nukleazne aktivnosti *Taq* DNA polimeraze za vrijeme amplifikacije.

Taq Man sonde sadrže:

- reporter boju VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup> na 5' kraju svake sonde
- nefluorescentni prigušivač (engl. *nonfluorescent quencher*, NFQ) na 3' kraju sonde

Taq Man sonda se veže na ciljnu slijed DNA, a nakon denaturacije dvostruke DNA vežu se i početnice. AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimeraza produžuje početnice i kida sonde koje su hibridizirane na ciljnu sekvenciju molekule DNA. Kidanje sonda odvaja prigušivač i reportersku boju pri čemu dolazi do emisije fluorescencije reporterske boje. Fluorescentni signal je detektiran CCD kamerom (engl. *charge – coupled device*) i analizira se pomoću računalnoga programa 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, SAD).

Analizom alelna diskriminacije koja koristi par fluorescentno obilježenih detektora VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup> (jedan detektor se poklapa s divljim tipom alela, a drugi s varijantnim alelom) određeno je radi li se o homozigotu za divlji alel, heterozigotu ili homozigotu za varijantni alel (slika 13.).

Oprema i pribor:

- uređaj za qPCR ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- sterilne mikroeprevete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10 µL
- stalak za mikrotitarske pločice ili *strip* mikroeprevete
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom ili *strip* mikroeprevete s poklopcima

- vrtložna miješalica (Cleaver Scientific Ltd, Velika Britanija)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Eppendorf 5810R (Eppendorf, Njemačka)
- mikrocentrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi:

- *TaqMan*<sup>®</sup> *Drug Metabolism Genotyping Assay* (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD)

Za analizu svakoga pojedinog polimorfizma korišten je odgovarajući *Taqman*<sup>®</sup> SNP reagens, *Taqman*<sup>®</sup> SNP Assay ID (tablica 9).

**Tablica 9.** Polimorfizmi analizirani *Taqman*<sup>®</sup> metodom PCR u stvarnom vremenu

Gen/alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> SNP Assay ID
<i>ABCG2</i>	rs2231142	421C>A	C_15854163_70
<i>UGT1A9</i>	rs17868320	-2152C>T	C_34418857_10
<i>UGT1A9</i>	rs6714486	-275 T>A	C_27843087_10
<i>UGT2B7</i>	rs7668258	-161 C>T	C_27827970_40
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1045642	3435 C>T	C_7586657_20
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1128503	1236 C>T	C_7586662_10
<i>SLCO1B1</i>	rs4149065	521 T>C	C_30633906_10
<i>CYP3A4*22</i>	rs35599367	15389C>T	C_59013445_10
<i>CYP3A5*3</i>	rs776746	6986 A>G	C_26201809_30
<i>ABCC2</i>	rs717620	-24 C>T	C_2814642_10
<i>ABCC2</i>	rs2273697	1249G>A	C_22272980_20

\* referentni broj SNP iz baze podataka *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*

### Postupak

Priprema reakcijske smjese (tablica 10.) i uvjeti PCR reakcije (tablica 11.) na uređaju ABI 7500 Real-time PCR System isti su za genotipizaciju svih polimorfizama, a izvedeni su prema uputama proizvođača.

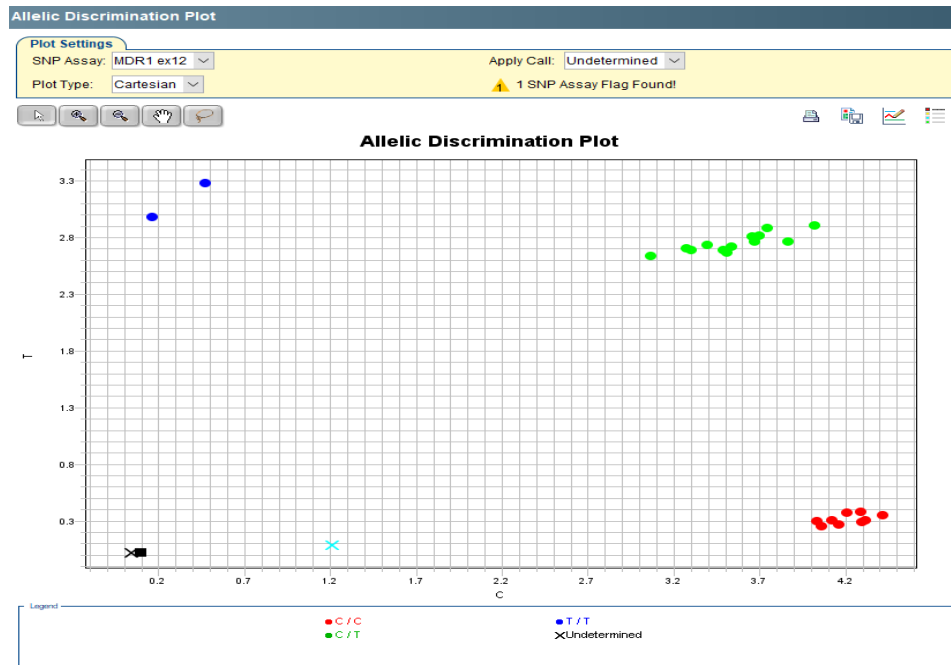
**Tablica 10.** Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju TaqMan® metodom

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5	1x
TaqMan® DME Assay Mix *	1,25	1x
DNA razrjeđenje	11,25	1-20 ng
Ukupni volumen reakcijske smjese	25	

\*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući *TaqMan® SNP Assay*

**Tablica 11.** Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System

Pre-PCR	INICIJACIJA	PCR (50 ciklusa)		Post-PCR
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
60 °C / 60 s	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	92 °C / 15 s	60 °C / 60 s	60 °C / 60 s



**Slika 13.** Analiza alelne diskriminacije *TaqMan®* metodom PCR u stvarnom vremenu. crvene točke - *wt* homozigoti; zelene točke – heterozigoti; plave točke – mutirani homozigoti

### 3.5.2.2. *LightCycler* metoda za qPCR - genotipizacija *ABCB1* 2677G>T/A

Genotipizacija trialelnog lokusa *ABCB1* 2677G>T/A (rs2032582) provedena je *LightCycler*<sup>®</sup> metodom za PCR u stvarnom vremenu na uređaju *LightCycler* v 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka). *LightCycler*<sup>®</sup> metodom umnaža se DNA ulomak od interesa, koji se detektiraju pomoću fluorescentno obilježenih hibridizacijskih sonda prijenosom energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) te analizom temperature taljenja (engl. *temperature melting*) specifične za pojedini alel (slika 14.) .

#### Oprema:

- uređaj *LightCycler* v 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikropruvete volumena 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- kapilare za uređaj *LightCycler* (Roche Diagnostics, Njemačka)
- hladni blok za kapilare (2-8 °C) (Roche Diagnostics, Njemačka)
- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za kapilare LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka)

#### Reagensi:

- Fast Start DNA Master HybProbe master mix (Roche Diagnostics, Njemačka)
- MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics, Njemačka)
- PBS (Merck KGaA, Njemačka)
- DMSO (Merck KGaA, Njemačka)
- početnice (TIB MOLBIOL, Njemačka):

f 5'-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG-3'

r 5'-CGCCTGCTTTAGTTTGA CTCA-3'

- hibridizacijske sonde (TIB MOLBIOL, Njemačka):

*anchor* 5'- LCRed640-CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTCC-ph

*sensor* 5'- TTCCCAGTACCTTCT-fluorescein

#### Uvjeti PCR reakcije:

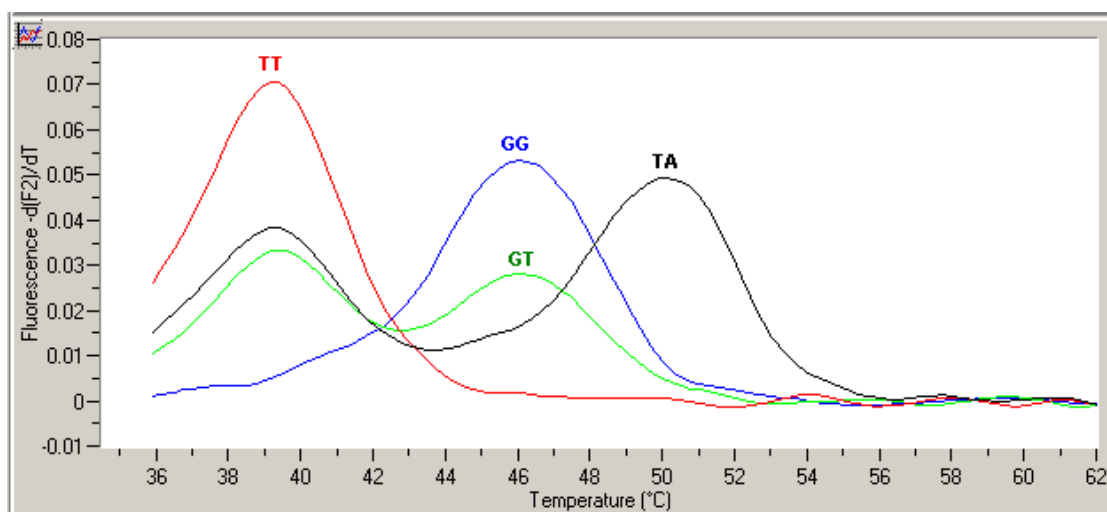
- denaturacija na 94 °C 10 min;
- amplifikacija u 45 ciklusa na 94 °C, 58 °C 10 s i 72 °C 15 s;



- analiza temperature taljenja na 94 °C 20 s, 32 °C 20 s, 70 °C;
- hlađenje 40 °C 30s.

**Tablica 12.** Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju *ABCBI 2677G>T/A*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)
Sterilna destilirana voda za PCR	4,3
FastStart DNA Master Hyb Probe master mix	1
Mg <sup>2+</sup> (25mM)	1,2
<i>r</i> - početnica	0,5
<i>f</i> - početnica	0,5
<i>anchor</i> hibridizacijska proba	0,5
<i>sensor</i> hibridizacijska proba	0,5
PBS	0,5
DMSO	0,5
DNA	0,5
<b>volumen reakcijske smjese</b>	<b>10</b>



**Slika 14.** Analiza trialelnog lokusa *ABCBI 2677G>T/A*; temperature taljenja prema genotipu: TT 39 °C, GT 39 °C i 46 °C, GG 46 °C, TA 39 °C i 51 °C

### 3.6. Farmakokinetički parametri

Za potrebe analize farmakokinetike MPA-a određeni su standardni farmakokinetički parametri MPA-a za razdoblje doznog intervala (12 sati) u stanju dinamičke ravnoteže:

1.  $C_{\max,ss}$  (mg/L) - najviša (vršna) koncentracija u stanju ravnoteže;
2.  $T_{\max,ss}$  (sati) - vrijeme u kojem je izmjerena vršna koncentracija;
3.  $C_0$  ili  $C_{\text{trough}1}$  (mg/L) - koncentracija MPA-a neposredno prije jutarnje doze odnosno ostatna koncentracija MPA-a prije jutarnje doze;
4.  $C_{12}$  ili  $C_{\text{trough}2}$  (mg/L) - koncentracija MPA-a neposredno prije večernje doze odnosno ostatna koncentracija MPA-a prije večernje doze;
5.  $C_{\text{trough},ss}$  (mg/L) - ponderirana prosječna (na temelju dvije (ponovljena mjerenja ostatnih koncentracija,  $C_1$  i  $C_{12}$ )), odnosno zbroj ostatnih koncentracija prije jutarnje i prije večernje doze u stanju ravnoteže;
6.  $AUC_{\tau,ss}$  (mg•hr/L) - površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme prema logaritamsko-linearnoj metodi tijekom cijelog intervala doziranja u stanju ravnoteže;
7.  $CL_{T/F,ss}$  (mL/min/kg) - prividan ukupni tjelesni klirens izražen kao: **doza** /  $AUC_{\tau,ss}$ ;
8.  $C_{\max,ss} / AUC_{\tau,ss}$  (1/h) - omjer vršne koncentracije i površine ispod krivulja koncentracija-vrijeme koji je indikator brzine apsorpcije

Farmakokinetički parametri  $C_{\max,ss}$  (mg/L),  $AUC_{\tau,ss}$  (mg•hr/L),  $C_0$ ,  $C_{12}$  (mg/L) i  $CL_{T/F,ss}$  (mL/min/kg) određeni su uporabom nekompartmentalne metode uz primjenu programske podrške Kinetica 4.1 (InnaPhaseCorp., SAD).

Za izračun svih parametara izmjerene koncentracije su ujednačene prema dozi uzimajući u obzir činjenicu da 1000 mg MMF-a odgovara 739 mg MPA-a, a 1000 mg EC-MPS-a odgovara 936 mg MPA-a.

Ostatne koncentracije CsA-a i TAC-a uzete su iz bolničke baze podataka.

### 3.7. Ishodi od interesa (zavisne varijable)

U kontekstu TDM-a imunosupresiva, MPA je specifična utoliko što za nju, za razliku od drugih imunosupresiva (npr. CNI-a kao što su CsA i TAC-a ili m-tor inhibitora poput sirolimusa ili everolimusa), ostatne koncentracije (*trough*) **nisu prediktivne** za učinak (prevenciju odbacivanja presatka/neželjene učinke), već je to ukupna bioraspoloživost tijekom doznoga intervala u stanju dinamičke ravnoteže što se kvantificira kao  $AUC_{0-t,ss}$ . Ukupna bioraspoloživost je upravo obrnuto proporcionalna ukupnom tjelesnom klirensu ( $CL_{T,ss}$ ) – što

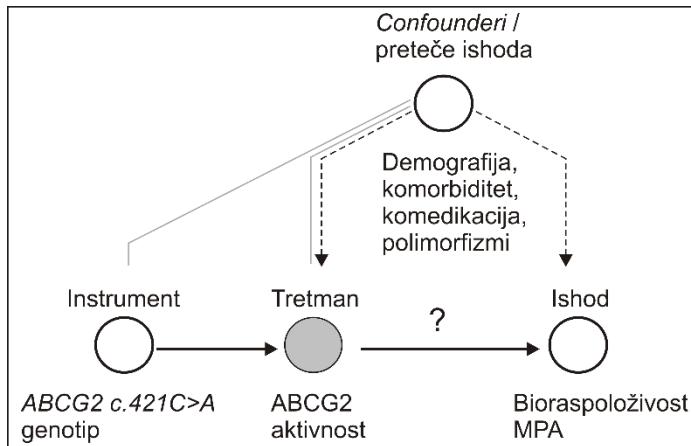
je klirens intenzivniji, ukupna izloženost lijeku tijekom doznoga intervala bit će manja. Stoga su ishodi od primarnoga interesa  $AUC_{0-t,ss}$  i  $CL_{T,ss}$ . Pojedinačne koncentracije, poput vršne ( $C_{max}$ ) ili ostatne ( $C_0$ ,  $C_{12}$ ) su u slučaju MPA-a pomoćni indikatori bioraspoloživosti. Potencijalno, osim o klirensu,  $AUC_{0-t,ss}$  može ovisiti i o brzini apsorpcije. Kako je stvarnu brzinu apsorpcije teško kvantificirati, kao indikator te veličine obično se koristi vršna koncentracija ( $C_{max}$ ) nakon jednokratne primjene lijeka, međutim u stanju dinamičke ravnoteže bolji je indikator omjer  $C_{max,ss}/AUC_{\tau,ss}$  (197). Svi navedeni parametri imaju log-normalnu distribuciju, pa su u analizi podataka sve transformirane na bazi  $e$ .

### 3.8. Koncept analize podataka

Analiza podataka koncipirana je u svrhu detekcije/kvantifikacije kauzalnog učinka varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na bioraspoloživost MPA-a. Slijedila se teorija kauzalnosti temeljena na strukturalnim kauzalnim modelima (engl. *structural causal models*, SCM) i usmjerenih acikličkih grafova (engl. *directed acyclic graphs*, DAG) (198). Slika 15. prikazuje pojednostavljeni DAG koji ocrtava „problem“ odnosno pitanje na koje se želi odgovoriti: **ima li *ABCG2 c.421C>A* varijantni alel učinak na bioraspoloživost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže?** Termini na slici 15. su termini teorije kauzalnosti. Prema činjeničnom znanju o problemu, stvarni *uzrok* ili *tretman* koji bi mogao utjecati na bioraspoloživost MPA-a jest aktivnost ABCG2 transportera, međutim, nju *in vivo* nije moguće izmjeriti. S druge strane, genotip *ABCG2 c.421C>A* se može odrediti. Poznato je da genotip CA ili AA (tj. prisustvo varijantnoga alela) rezultira smanjenom funkcijom transportera *in vitro* (199, 200). Sukladno navedenom, a imajući u vidu i činjenicu da su homozigotni nositelji varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela izrazito rijetki (103) što je prethodno potvrđeno i u hrvatskoj populaciji (115), instrument je dihotomiziran na *nositelji varijantnoga alela* (CA ili AA) i *homozigoti divljega tipa* (CC, *wt*). Tim razinama odgovaraju razine tretmana *snižena aktivnost ABCG2* i *normalna aktivnost ABCG2*.

Poznato je da genotip *ABCG2 c.421C>A* nema nikakvoga drugog *puta* ili *mehanizma* kojim bi mogao utjecati na bioraspoloživost MPA-a osim da utječe (mijenja) aktivnost transportera. Time su zadovoljena dva osnovna uvjeta za status *instrumenta* – relevantnost za (kauzalni učinak na) tretman i izostanak bilo kakvoga učinka na ishod mimo učinaka na tretman. Treći je uvjet da instrument i ishod nemaju **zajedničkih uzroka** – što ovdje i jest slučaj (genotip je zadan rođenjem). Aktivnost ABCG2 može na koncentracije MPA-a utjecati izravno (ako je, primjerice, MPA supstrat ABCG2 transportera, što za sada nije poznato) i/ili posredno (ako je

MPAG supstrat transportera, što je sugerirano u studiji japanskih pacijenata (119), može se odraziti na bioraspoloživost MPA). Međutim, u ovoj studiji cilj je bio procijeniti ukupni (totalni učinak) *ABCG2* genotipa, bez obzira je li izravan i/ili posredan: stoga, MPAG kao mogući *medijator* nije prikazan (slika 15.), a u studiji MPAG niti nije kvantificiran.

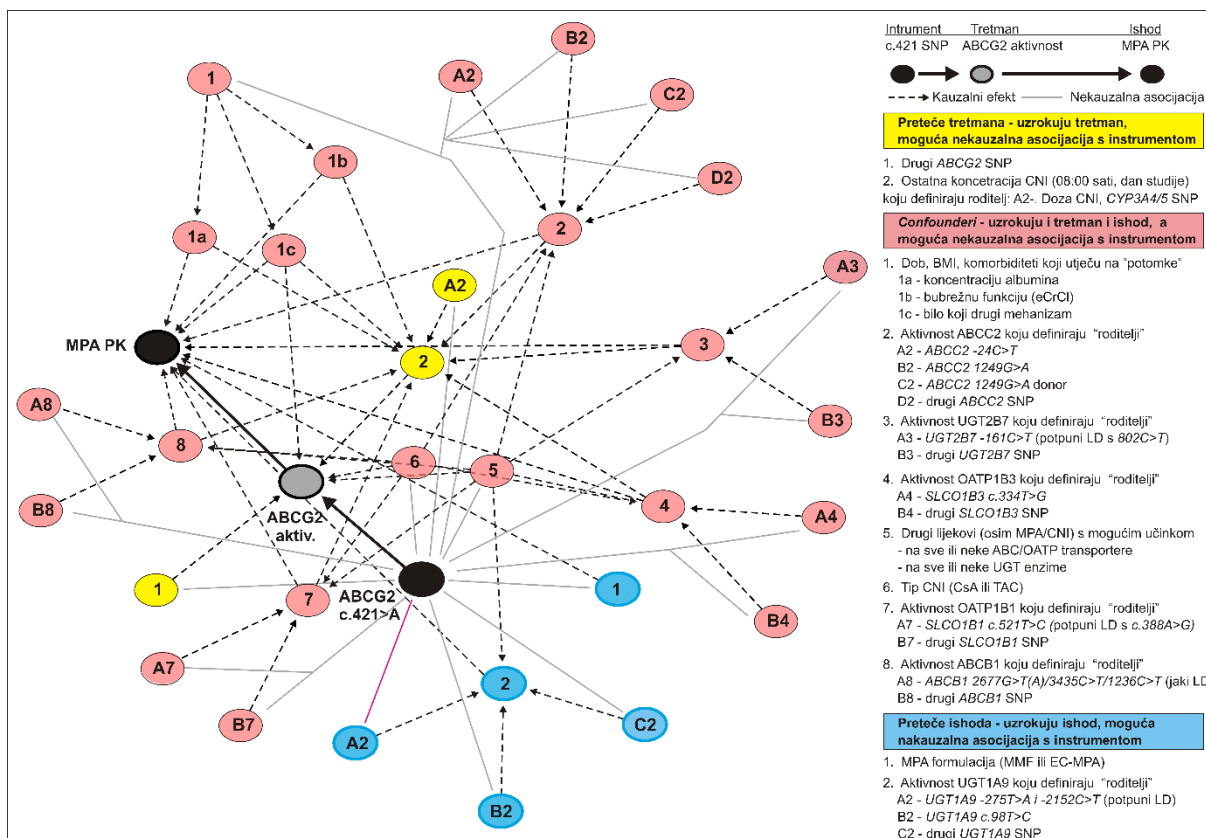


**Slika 15.** Prikaz pitanja na koje se želi odgovoriti (ima li polimorfizam *ABCG2*. c.421C>A učinak na bioraspoloživost MPA – naznačeno upitnikom) u obliku usmjerenoga acikličkog grafa (DAG): deblje crne strelice označavaju kauzalni put koji se evaluira, pri čemu je moguće kvantificirati genotip, ali ne i *stvarni tretman* – aktivnost ABCG2 transportera (sivi simbol). Genotip je instrument (ili *proksi* za tretman) – uzrokuje tretman i nema drugoga način utjecati na ishod. Stoga, učinak instrumenta na ishod = učinak tretmana na ishod. No, da bi to bilo moguće, treba *isključiti* niz remetilačkih faktora koji mogu uzrokovati i tretman i ishod (crne isprekidane strelice nazačuju učinak *confoundnera* i preteča ishoda, a sive crte označuju moguću nekauzalnu povezanost (asocijaciju) preteča ishoda s tretmanom, odnosno *confoundera* ili preteča ishoda s instrumentom). Budući da se postavljeno pitanje odnosi na totalni učinak ABCG2, nije prikazan mogući medijator, MPAG.

Za detekciju-kvantifikaciju kauzalnoga učinka instrument tj. genotip, (varijantni alel vs. *wt*) → tretman aktivnost ABCG2 (snižena vs. normalna) → ishod (bioraspoloživost MPA-a), treba procijeniti učinak instrument → ishod. To je moguće samo ako se *isključe* ili *kontroliraju* remetilački čimbenici: *confounderi* (varijable koje uzrokuju i tretman i ishod); npr. lijekovi koji inhibiraju ABCG2 (*uzroci* tretmana, tj. imaju učinak na tretman) i inhibiraju UGT enzime (*uzroci* ishoda, tj. imaju učinak na bioraspoloživost MPA-a jer inhibiraju glavne metabolizirajuće enzime), i tzv. *preteci* ishoda (varijable koje uzrokuju ishod, ali ne i tretman, ali s njime mogu biti, pukim slučajem, nekauzalno *povezane*). Tako npr. polimorfizmi enzima

za UGT utječu na ishod, ali ne i na tretman (aktivnost ABCG2), međutim, u ljudi s i bez varijantnoga *ABCG2* alela može biti slučajna neravnoteža u prevalenciji onih s UGT polimorfizmima. Moguće je, također, da između nekoga od *confoundera*/preteča ishoda i instrumenta postoji nekauzalna asocijacija: tj. da je među nositeljima varijantnoga alela pukim slučajem prevalencija onih s čimbenikom koji utječe na ishod veća nego među ljudima bez varijantnog alela. *Kontrolirati* remetilačke čimbenike/preteče ishoda doslovno znači *isključiti ih*, tj. dokinuti njihove učinke. Time se prevenira zabuna u kojoj se neka nekauzalna povezanost (*asocijacija*) između *tretmana* (ili *instrumenta*) i *ishoda* intepretira kao uzročno-posljedični odnos. U randomiziranom pokusu, randomizacija inherentno *kontrolira* sve *confoundere*/preteče ishoda – randomizacija inherentno omogućava **izmjenjivost jedinki** (ispitanika). Kada tretman nije randomiziran potrebno je i) na temelju poznavanja problematike identificirati i kvantificirati sve potencijalne *confoundere*/preteče ishoda i ii) *kontrolirati* ih alternativnim postupcima (201). To znači nastojati postići izmjenjivost jedinki nalik onoj u randomiziranom pokusu tako da se jedinke izložene tretmanu i kontrole *ujednači* za vrijednosti *confoundera*/preteča ishoda. Međutim, teorijski, *tretirani* i *kontrole* mogu se ujednačiti samo u odnosu na ona svojstva koja su nam o njima poznata – moguće *confoundere*/preteče ishoda koji nisu kvantificirani ili uopće ne postoji svijest o njihovom postojanju ne mogu se ujednačiti između tretiranih i kontrola. Stoga, nastoji se postići ujednačenost za poznate/mjerene čimbenike – tzv. **uvjetovana izmjenjivost** – a *a priori* se smatra da uvijek ostaje neka razina *ostatnog* (nemjerenog) *confoundinga*.

Računalni paket *daggity* (202) u programskom jeziku R primjenjuje postupke temeljene na SCM/DAG teoriji i omogućuje, sukladno unosu činjeničnih znanja o problemu, (i) konstrukciju odgovarajućeg DAG-a, (ii) identifikaciju *uloga* pojedinih varijabli u DAG-u i (iii) identifikaciju najmanjeg skupa varijabli koje treba *kontrolirati* kako bi se postigla uvjetovana izmjenjivost, odnosno mogao nepristrano procijeniti kauzalni učinak tretmana (ili, u ovom slučaju instrumenta) na ishod. Na temelju znanja o čimbenicima relevantnim za bioraspoloživost MPA-a primjenom paketa *daggitty* konstruiran je DAG na slici 16.



**Slika 16.** Usmjereni aciklički graf (DAG) koji ilustrira situaciju u kojoj se želi ocijeniti ukupni (totalni) kauzalni učinak (debele crne strelice) varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* (instrument, crni simbol), odnosno tretmana koji se međutim ne može mjeriti - aktivnost ABCG2 transportera (sivi simbol) - na farmakokinetiku (bioraspodjeljivost) MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže (farmakokinetika MPA, ishod, crni simbol). Tanke crtkane strelice označavaju *remetilačke* učinke, a sive crte nekauzalne asocijacije s instrumentom. Tri su skupine varijabli: (i) žutim simbolima naznačene preteče tretmana (izravno ili neizravno utječu na ABCG2 aktivnost, a mogu biti nekauzalno povezane s instrumentom); (ii) crvenim simbolima naznačeni *confounderi* (izravno ili neizravno uzrokuju tretman (aktivnost ABCG2) i ishod, a nekauzalno mogu biti povezane s instrumentom); (iii) plavim simbolima naznačene preteče ishoda (izravno ili neizravno utječu na ishod, a mogu biti nekauzalno povezane s instrumentom). Objašnjenje u tekstu.

Kauzalni put (učinak) koji se želi procijeniti *započinje* *ABCG2 c.421G>A* genotipom (instrument – crni simbol) i naznačen je debelom crnom strelicom – genotip određuje aktivnost ABCG2 (tretman, ne može se mjeriti, stoga naznačen sivim simbolom). Tanke crtkane strelice naznačuju *remetilačke* kauzalne učinke – izravne i/ili posredne – na tretman (ABCG2 aktivnost) i na ishod (bioraspoloživost MPA-a), a tanke sive crte naznačuju moguće nekauzalne asocijacije pojedinih varijabli s instrumentom. Prikazane su 3 vrste varijabli: 1. *preteče tretmana* (označeno žutim simbolima), 2. *confounderi* (označeno crvenim simbolima) i 3. *preteče ishoda* (označeno plavim simbolima).

1. Varijable –*preteče tretmana*, mogu, poput instrumenata, utjecati na tretman (ABCG2 aktivnost), a biti nekauzalno povezane s instrumentom. Tu pripadaju:

(i) drugi polimorfizmi *ABCG2* gena (osim c.421), jer je za nekolicinu daljnjih pokazano da *in vitro* rezultiraju smanjenom funkcijom transportera (103);

(ii) koncentracija CNI-a čiji su neposredni *pretci* (roditelji) - doza i mogući polimorfizmi (fenotip) CYP enzima, posebice CYP3A4/5, koju su važni za eliminaciju CNI-a (33). Koncentracija CNI-a može biti bitna za stupanj inhibicije ABCG2: CsA i TAC nisu ABCG2 supstrati, ali su potentni inhibitori (107, 203, 204). Ne postoji, dakle, kvalitativna razlika između CNI-a u smislu učinka na ABCG2 aktivnost, ali intenzitet inhibicije može ovisiti o koncentraciji (ostatne koncentracije). Budući da se sistemske koncentracije CsA-a i TAC-a razlikuju za red veličine, logaritmirane vrijednosti koncentracija TAC-a su linearnom transformacijom reskalirane u raspon logaritmiranih koncentracija CsA-a; kako bi se mogle usporediti.

2. Varijable *confounderi* obuhvaćaju:

**(i) tip CNI-a**

Zbog mogućih kvalitativnih razlika između CsA-a i TAC-a u učincima na tretman (ABCG2 aktivnost) i ishod (bioraspoloživost MPA-a). Naime, *in vitro*, CsA-a potentnije inhibira ABCG2 od TAC-a kad je broj transportera smanjen (204) (kao što je to situacija uz varijantni *ABCG2 c.421C>A* alel). S druge strane, učinci na MPA-a mogu se razlikovati jer CsA inhibira ABCC2 i OATP (moguće i 1B1 i 1B3 izoforme) transportere, a TAC ne – a MPAG je supstrat za ABCC2 i OATP (14, 205). Nadalje, i CsA i TAC su i induktori i inhibitori ABCB1, pri čemu im učinci mogu biti oprečni, a MPA je supstrat ABCB1 (206). Osim toga, CsA i TAC su supstrati ABCB1, pa se promjena aktivnosti ABCB1 (32) može odraziti i na njihove koncentracije (i učinak na ABCG2);

**(ii) aktivnost ABCC2 transportera i pretci**

U DAG je uključeno nekoliko varijabli koje nemaju drugog načina utjecati na tretman i ishod osim *putem* mogućeg utjecaja na aktivnost ABCC2 transportera. Za nekoliko ABCC2 polimorfizama je naznačeno da bi mogli utjecati na biorasploživost MPA-a (posredstvom MPAG-MPA recirkulacije) – *ABCC2 -24C>T* i *1249G>A* (11), a ovaj drugi polimorfizam i kada su u pitanju donori (139), dakle na razini eliminacije putem bubrega. Teorijski, nije moguće isključiti i utjecaj drugih *ABCC2* polimorfizama. Općenito, *ABCC2* se ne smatra bitnim za biorasploživost CsA-a i TAC-a, međutim *ABCC2 -24* i *1249* polimorfizmi mogli bi utjecati na TAC (207) iako je bubrežna eliminacija takrolimusa malog opsega (32) što bi se moglo odraziti i na učinak na ABCG2 aktivnost (tretman).

**(iii) aktivnost ABCB1 transportera i pretci**

U DAG je uključeno nekoliko varijabli koje nemaju drugog načina za utjecaj na tretman i na ishod mimo (pretpostavljenog) učinka na aktivnost ABCB1 transportera. To su polimorfizmi *ABCB1 2677G>T(A)*, *3435C>T* i *1236C>T* (koji su u jakom LD), te, moguće, neki drugi polimorfizmi. MPA je supstrat ABCB1 (14, 22). S druge strane, i CsA i TAC su ABCB1 supstrati što se može odraziti na njihove koncentracije i učinak na ABCG2 aktivnost (203).

**(iv) aktivnost UGT2B7 enzima i pretci**

U DAG je uključeno nekoliko varijabli koje nemaju drugog „načina“ utjecati na tretman i ishod osim moguće učinka na aktivnost UGT2B7. To je polimorfizam *UGT2B7 -161C>T* (11) (u potpunom LD s *802C>T*, (208), a moguće i neki drugi *UGT2B7* polimorfizmi. Aktivnost UGT2B7 utječe na biorasploživost MPA-a (14, 22). S druge strane, jedna je studija (209) ukazala na glukuronidaciju CsA-a i TAC-a putem UGT2B7, a time, posredno mogući učinak UGT2B7 na koncentraciju CNI-a i učinak na ABCG2 aktivnost.

**(v) aktivnost OATP1B3 transportera i pretci**

U DAG je uključeno nekoliko varijabli koji nemaju drugog načina utjecati na tretman i ishod osim (mogućeg) učinka na aktivnost OATP1B3 – polimorfizam *SLCO1B3 c.334T>G*, te mogući drugi polimorfizmi tog gena. MPA nije supstrat OATP1B3, ali MPAG jest (11) S druge strane, neke studije ukazuju da je i takrolimus supstrat OATP1B3 (210) što bi se moglo odraziti na njegove koncentracije i učinak na ABCG2 transporter.

**(vi) aktivnost OATP1B1 transportera i pretci**

U DAG je uključeno nekoliko varijabli koje nemaju drugog načina utjecati na tretman i ishod osim moguće učinka na aktivnost OATP1B1 - to je polimorfizam *SLCO1B1 c.521T>C* (u LD s *c.388A>G*) (11), a moguće i neki drugi *SLCO1B1* polimorfizmi.



MPAG je supstrat OATP1B1 (22, 14) sugerirano je da OATP1B1 može transportirati i TAC (210) što bi se moglo odraziti na njegove koncentracije i učinak na ABCG2 transporter

**(vii) razni lijekovi (osim MPA i CNI)**

Puno je različitih lijekova koji mogu utjecati na aktivnost ABCG2 transportera, odnosno na enzime i (druge) transportere važne za farmakokinetiku MPA-a i CNI-a, pa tako utjecati i na tretman i na ishod.

**(viii) standardni čimbenici**

Dob, indeks tjelesne mase (važno za MPA) i razni komorbiditeti mogu utjecati i na bioraspoloživost MPA-a, i na bioraspoloživost CNI-a, zbog npr. učinka na serumski albumin (važno i za MPA i za CNI), bubrežnu funkciju (eCrCl) ili bilo kojim drugim mehanizmom, te tako utjecati na tretman i na ishod.

**3. Varijable *preteče ishoda***

Ove varijable mogu imati kauzalni učinak na ishod, a moguća je nekauzalna asocijacija s instrumentom. Tu spadaju:

(i) **farmaceutski oblik** (formulacija) MPA (tablete mofetilmikofenolata s trenutnim oslobađanjem, MMF, ili želučano-otporne tablete natrijeve soli MPA, EC-MPA) koje nisu bioekvivalentne (13)

(ii) **aktivnost enzima UGT1A9** (koji može doprinijeti eliminaciji MPA-a (22)) i *pretci* U DAG je uključeno nekoliko varijabli koje nemaju drugog *puta* za učinak na MPA, osim putem mogućeg učinka na aktivnost enzima UGT1A9 – polimorfizmi *UGT1A9 -275T>A* i *-2152C>T* koji su u potpunom LD, te polimorfizam *UGT1A9 c.98T>C* (11), a moguće i neki drugi polimorfizmi *UGT1A9*.

Varijable koje **nisu prikazane** na slici 16. – nisu relevantne za bioraspoloživost MPA. Primjerice, hrana ne utječe na ukupnu bioraspoloživost MPA-a i CNI-a (27, 33, 182). Također glukokortikoidi nemaju relevantnog učinka na bioraspoloživost MPA-a (13, 14, 211), a njihov mogući učinak na bioraspoloživost CNI-a kontroliran je kontrolom koncentracije CNI-a.

**3.9. Mjere za postizanje uvjetovane izmjenjivosti**

Uvjetovana izmjenjivost (ili *kontrola confoundinga*) ili *ujednačenost* tretiranih i kontrolnih jediniki za *iznose* potencijalnih remetilacijskih čimbenika može se postići na razne načine. U ovom istraživanju, to je dijelom postignuto ključnim kriterijima, a druga se svojstva nastojalo ujednačiti metodom egzaktnog uparivanja (engl. *exact matching*) u kombinaciji s optimalnim potpunim uparivanjem (engl. *optimal full*), temeljeno na Mahalanobis udaljenosti.

*Exact matching* je postupak koji omogućuje da se jedna *tretirana jedinka* upari s jednom ili više *kontrolnih jedinki* (i obrnuto) na način da su potpuno identične po iznosima za određeni set varijabli (npr. istog su spola, genotipa na nekom lokusu, iste rase itd.). Ujednačenost tretiranih i kontrola koja se tako postiže odgovara potpuno stratificiranoj randomizaciji. *Optimal full* je postupak koji isto omogućuje *jedan – spram – više* uparivanje (tretirani vs. kontrola ili obrnuto) na temelju multivarijatne udaljenosti, i postiže ujednačenost približnu potpuno stratificiranoj randomizaciji. Postupak počinje egzaktnim *matchingom* u odnosu na kategorijske kovarijate (formiraju se stratumi unutar kojih se nalaze *tretirani* i *kontrole* egzaktno ujednačeni u odnosu na skupinu kovarijata). Zatim se koristi Mahalanobis udaljenost da dodatno minimizira udaljenost između *tretiranih* i *kontrola* unutar stratuma u odnosu na kovarijate koje nisu uključene u egzaktni *matching* (npr. kontinuirane varijable). Adekvatnost postupka provjerava se temeljem standardiziranih razlika između *tretiranih* i *kontrola* ( $d$ ) – vrijednosti.  $D < 0,1$  znače adekvatno ujednačavanje; vrijednosti  $\geq 0,1$  označavaju da *ujednačavanje* za predmetnu kovarijatu nije *idealno*. Kada su *tretirani* i *kontrole* adekvatno *ujednačeni* ( $d < 0,1$ ) za sve kovarijate (za egzaktni *matching*  $d = 0,000$ ), razlika među njima je jednostavna razlika srednjih vrijednosti ili proporcija (i slično). Ako za neku od kovarijata nije postignuto adekvatno *ujednačavanje* ( $d \geq 0,1$ ), onda se u analizi podataka uključi predmetna kovarijata. Za postupak *ujednačavanja*, korišten je paket MatchIt u programu R (212-214). Računalni paket *daggity* omogućuje identifikaciju *minimalnoga seta* varijabli (u kontekstu poznatih interferencija) koje treba *kontrolirati* kako bi se adekvatno procijenio totalni kauzalni učinak instrumenta na ishod. Međutim, svi ti predloženi setovi varijabli uključuju aktivnost pojedinih enzima i transportera – a kako njih nije moguće uživo mjeriti, to ih onda nije moguće niti *ujednačiti* u iznosu između tretiranih i kontrola (*kontrolirati*). U tablici 13. navedene su varijable (sa slike 16.) koje su u ovom istraživanju *kontrolirane* (na različite načine) i one koje nisu. Slika 17. prikazuje kako DAG sa slike 16. izgleda nakon *isključenja* interferirajućih faktora.

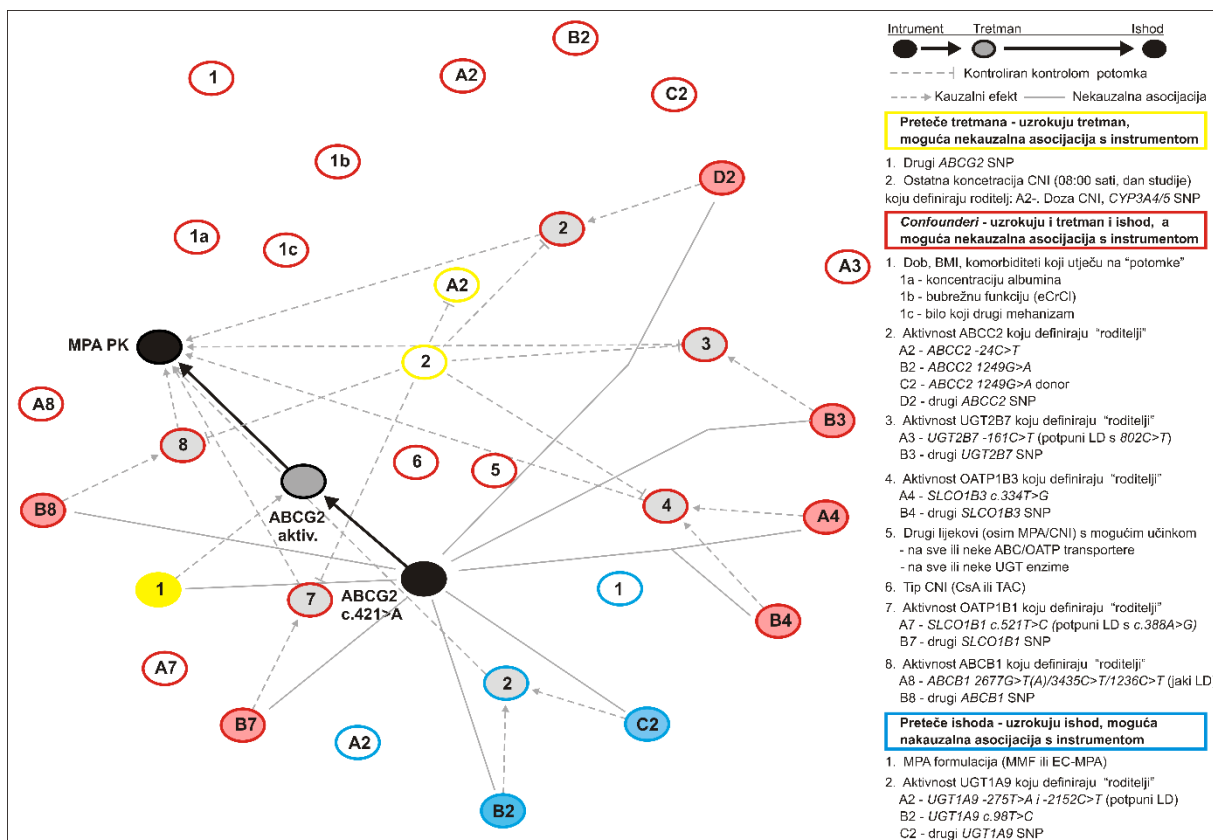
**Potpuno kontrolirane varijable** (tablica 13.) – su varijable za čije iznose su tretirani i kontrole potpuno ujednačeni. Primjerice, svi ispitanici su morali zadovoljiti uvjet za uključenje da imaju koncentraciju albumina  $> 31$  mg/L; *matchingom* upareni su tretirani i kontrole koji su koristili isti tip CNI-a, dob im je blisko slično itd.. Kad je varijabla potpuno (i izravno) *kontrolirana*, onda se prekidaju svi njeni *nizvodni* učinci (na druge varijable), a isto tako blokiraju se učinci njenih *predaka*, tj. varijabli koje utječu na kontroliranu varijablu koja je *posrednik* (medijator) njihovih učinaka na tretman ili ishod. Prekidaju se i sve nekauzalne asocijacije koje kontrolirana varijabla može imati (s tretmanom ili s instrumentom).

**Djelomično kontrolirane varijable** (tablica 13.) – ne mogu se potpuno kontrolirati, tj. nije im izravno ujednačen iznos između tretiranih i kontrola, primjerice, aktivnosti pojedinih transportera/enzima ne mogu se izravno mjeriti *in vivo*, pa ih onda nije niti moguće izravno i potpuno ujednačiti između tretiranih i kontrola. Međutim, potpuna kontrola njihovih neposrednih *predaka*, poput pojedinih polimorfizama, odnosno, potpuna kontrola drugih faktora koji na tu aktivnost mogu utjecati (npr. lijekovi, bolesti, koncentracija CNI-a i slično), kao i potpuna kontrola varijabli koji su *nizvodno* (i mogući su medijatori učinaka te aktivnosti) – omogućuje da se takve varijable djelomično kontroliraju, odnosno da se blokiraju njihove komunikacije s tretmanom ili ishodom, kauzalne ili nekauzalne. Nekomolirani dio odnosi se na to da drugi poznati ili nepoznati faktori mogu utjecati na aktivnost, a biti povezani (kauzalno ili nekauzalno) s tretmanom ili instrumentom. Djelomično kontrolirane i nekontrolirane varijable izvor su ostatnog *confoundinga*.

**Tablica 13.** Popis *preteča tretmana, confoundera* i *preteča ishoda* koje su kontrolirane u svrhu procjene učinaka *ABCG2 c.421C>A* varijantnoga alela na bioraspoloživost MPA.

<b>Potpuno kontrolirane</b>	<b>Metoda – komentar</b>
Bubrežna funkcija	<u>Uključni kriteriji</u> – stabilna funkcija (vidi 3.2. za kriterije); <i>Matching</i> – eCrCl, dob
Serumski albumin	<u>Uključni kriteriji</u> – svi imaju >31 g/L
Dob	<i>Matching</i>
MPA formulacija	<i>Matching</i>
Tip CNI-a	<i>Matching</i>
Komorbidity	<u>Uključni kriteriji</u> – stabilni ispitanici bez kroničnih ili akutnih komorbiditeta koji se na bilo koji način mogu odraziti na farmakokinetiku MPA (vidi 3.2. za kriterije)
Komedikacija	<u>Uključni kriteriji</u> – bez lijekova (vidi 3.2. za popis) koji imaju interakcije s MPA; isključenjem komorbiditeta, isključeni su i daljnji lijekovi koji se za njih koriste
Indeks tjelesne mase	<i>Matching</i>
Koncentracija CNI-a	<i>Matching</i>

<b>Potpuno kontrolirane</b>	<b>Metoda-komentar</b>
Doza CNI-a i polimorfizmi <i>CYP3A4/5</i>	<i>Matching</i> – kontrolom koncentracije CNI, učinci doze/polimorfizama se <i>brišu</i> , tj. i ta je varijabla <i>kontrolirana</i> (jer nema <i>drugog načina</i> utjecati bilo na tretman bilo na ishod)
SNP transportera: <i>ABCC2 - 24C&gt;T, 1249G&gt;A</i> (primatelj i donor); <i>SLCO1B1 c.521T&gt;C</i> ; <i>ABCB1 2677G&gt;T(A), 3435C&gt;T, 1236C&gt;T</i>	<i>Matching</i> – kontrolom za genotipizirane lokuse <i>kontroliraju</i> se i oni (poznati ili ne) koji su s njima u potpunom LD
SNP enzima: <i>UGT2B7 - 161C&gt;T; UGT1A9 - 275T&gt;A, -2152C&gt;T</i>	<i>Matching</i> – kontrolom za genotipizirane lokuse <i>kontroliraju</i> se i oni (poznati ili ne) koji su s njima u potpunom LD
<b>Djelomično kontrolirane</b>	<b>Metoda – komentar</b>
Aktivnost <i>ABCC2, OATP1B1</i> i <i>ABCB1</i> transportera, te <i>UGT2B7</i> i <i>UGT1A9</i> enzima	Kontrolom <i>SNP-predaka</i> , te kontrolom dobi, komedikacije i komorbiditeta koji na to mogu utjecati, kontrolira se aktivnost transportera/enzima. Kontrolom za koncentracije CNI-a (koji su mogući <i>potomak</i> ) blokira se dio <i>nizvodnog</i> učinka transportera. Nekomoliran ostaje dio koji (hipotetski) determiniraju ostali (poznati ili ne) polimorfizmi <i>ABCC2, SLCO1B1, ABCB1, UGT2B7</i> ili <i>1A9</i> gena.
Aktivnost <i>OATP1B3</i> transportera	Kontrolom dobi, komedikacije i komorbiditeta koji na to mogu utjecati, kontrolira se aktivnost transportera. Kontrolom koncentracije CNI –a (koji je mogući <i>potomak</i> ) blokira se dio <i>nizvodnog</i> učinka transportera. Nekomoliran ostaje dio koji (hipotetski) kontroliraju <i>SNP-pretci</i> (poznati ili nepoznati).
<b>Nisu kontrolirane</b>	<b>Komentar</b>
Ostali SNP <i>ABCG2</i> gena	Među <i>ostalim</i> (osim c.421) polimorfizmima <i>ABCG2</i> gena za nekoliko je <i>in vitro</i> utvrđeno da rezultiraju smanjenom aktivnošću transportera, no njihova kumulativna prevalencija procijenjena je na <1,0%



**Slika 17.** DAG – prikaz situacije u kojoj se nastoji procijeniti kausalni učinak *ABCG2 c.421C>A* varijantnoga alela na bioraspoloživost mikofenolne kiseline (MPA-PK) nakon kontrole interferirajućih varijabli kako je navedeno u tablici 13. (preteča tretmana (uokvireno/obojano žutim), ili ishoda (uokvireno/obojano plavim) i *confoundera* (uokvireno/obojano crvenim). Potpuno kontrolirane varijable naznačene su nebojanim (bijelim) simbolima, a djelomično kontrolirane varijable naznačene su sivim simbolima - boja okvira ovisi o tipu varijable. Varijable koje nisu kontrolirane ispunjene su odgovarajućom bojom. Od potpuno kontroliranih varijabli ne polaze nikakve strelice – to znači da su im *učinci isključeni*. Od nekontroliranih varijabli polaze sive crtkane strelice koje naznačuju njihove učinke, te sive crte koje naznačuju nekauzalnu asocijaciju s instrumentom. *Kontrolirani* dio djelomično kontroliranih varijabli naznačen je nedostatkom strelica od njihovih predaka/drugih varijabli koje na njih mogu utjecati, odnosno crtkanim *blokiran* crtama od njihovih potomaka koji su potpuno kontrolirani.

### 3.10. Statističke metode

Kako bi se procijenio učinak varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na bioraspoloživost MPA-a, razlike farmakokinetičkih parametara između nositelja varijantnoga alela (*tretirani*) i homozigota divljeg tipa (*wt, kontrole*) procijenjene su (i) prije *ujednačavanja* između tretiranih i kontrola za mjerene kovarijate (dakle, u situaciji u kojoj su kontrolirane samo kovarijate definirane uključenim kriterijima) i (ii) nakon *ujednačavanja* vrijednosti izmjerenih kovarijata. Budući su svi farmakokinetički parametri logaritmirani, razlike (učinak varijantnoga alela) su iskazane kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio*, GMR) – GMR je eksponent razlika aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritama:  $GMR = \exp[\bar{x} \ln(A) - \bar{x} \ln(B)]$ . Učinci procijenjeni prije *ujednačavanja* su jednostavne razlike između tretiranih i kontrola. Za procjenu učinaka nakon *ujednačavanja*, varijable koje nisu idealno *ujednačene* uključene su u multivarijatni model za analizu podataka. Podatci su analizirani u linearnim modelima, frekvencionističkim (s robustnim procjeniteljem varijance, obzirom na stratume formirane postupkom *matchinga*) i Bayes (4 lanca, 4000 iteracija, 8000 uzoraka posteriorne distribucije, s HPD intervalima pouzdanosi). Za Bayes modele, za učinak od interesa definiran je slabo informiran (engl. *vaguely informed*) *prior* centriran na 0 za  $\ln(GMR)$ , i sa skaliranom standardnom devijacijom 2,5 – sukladan je nul-hipotezi, ali ostavlja veliku vjerojatnost za učinak od GMR znatno <1,0 do znatno >1,0. Za frekvencionističke modele korišten je računalni program SAS 9.4 za Windows (SAS Inc., Cary, NJ), a za Bayes modele korišten je paket *rstanarm* (215) u računalnom programu R. Za svaki genotipizirani polimorfizam provjereno je odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže, a za polimorfizme istog gena provjereno je odstupanje od neravnoteže povezanosti alela (LD) (program CubeX) (216).

### 3.11. Osjetljivost na nemjereni (ostatni) *confounding*

Kako je prikazano na slici 17. i u tablici 13., neki potencijalno remetilački čimbenici nisu u potpunosti kontrolirani (aktivnosti transportera ABCC2, ABCB1, OATP1B1, OATP1B3, i enzima UGT2B7 i UGT1A9) ili nisu uopće kontrolirani (učinci *ostalih* polimorfizama *ABCG2* gena), pa postoji teorijska mogućnost da su opaženi učinci *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela dijelom ili u cijelosti posljedica ostatnog *confoundinga* (dakle, da se ne radi doista o učincima varijantnoga alela već o učincima remetilačkih čimbenika čime se stvara privid učinaka testiranog polimorfizma). Stoga su procjene učinaka varijantnog alela podvrgnute ocjeni osjetljivosti na ostatni *confounding*, odnosno ocjeni u kojoj se mjeri opaženi učinci doista mogu

pripisati testiranom polimorfizmu. U tu svrhu (i) određene su E-vrijednosti i (ii) opaženi učinci korigirani su za mogući učinak *confoundinga*.

### E-vrijednost

E-vrijednost (217) je najmanji učinak koji nemjereni remetilački faktor(i) (jedan ili više njih kumulativno) treba imati na uzrok i na ishod (ili samo na ishod) da bi u potpunosti *objasnio* opaženi učinak tretmana, u okolnostima kontrole za mjerene kovarijate. Visok iznos E-vrijednosti govori da bi učinak nemjerenih remetilačkih faktora morao biti izrazito visok kako bi u potpunosti *objasnio* izmjereni učinak odnosno *gurnuo* opaženi učinak do razine *nema učinaka* (odnosno do zaključka kako ono što je procijenjeno *pripada* nemjerenim remetilačkim faktorima, a ne tretmanu koji je evaluiran). Visoka E-vrijednost upućuje na to da je izmjereni učinak *otporan* na preostali *confounding*, tj. da ga je nemoguće ili vrlo teško u potpunosti *objasniti* djelovanjem nekih drugih, nepoznatih faktora, a ne samog tretmana. Niska E-vrijednost ukazuje na to da je potreban tek maleni učinak remetilačkih faktora kako bi se u potpunosti *objasnilo* opaženo - odnosno opaženi je učinak jako podložan učinku nepoznatih, nemjerenih faktora i najvjerojatnije se u potpunosti može *objasniti* istodobnim prisustvom nekog malog nemjerenog učinka (odnosno opaženo najvjerojatnije nije posljedica tretmana, već drugih, nepoznatih faktora). E-vrijednost se može izračunati (paket *Evalue* u programu R (217)) za različite mjere učinaka: za omjer rizika (engl. *relative risk*, *RR*), omjer izgleda (engl. *odds ratio*, *OR*), omjer hazarda (engl. *hazard ratio*, *HR*), omjer stopa događaja ili incidencije (engl. *incidence rate ratio*, *IRR*), razliku srednjih vrijednosti (engl. *mean difference*) ili regresijski koeficijent (engl. *regression coefficient*) iz *klasične* linearne regresije ili za standardiziranu razliku srednjih vrijednosti, no uvijek se (putem različitih konverzija) izražava na skali relativnog rizika (RR) (E-vrijednost od 2,0 znači nemjereni učinak u iznosu  $RR=2,0$ ). Mjera učinka u ovoj studiji je omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) tj. eksponirana razlika srednjih vrijednosti logaritama farmakokinetičkih parametara. No budući da su GMR i RR po svojoj numeričkoj prirodi i značenju blisko slični, u izračunu E-vrijednosti, GMR se može *tretirati* kao RR. Obje mjere učinaka (i) su eksponenti razlika aritmetičkih sredina logaritama određenih vrijednosti –  $\ln$  (rizika) ili  $\ln$  (kontinuirana varijabla s distribucijom *iskrivljenom* udesno); (ii) u oba su slučaja logaritmi normalno distribuirani; (iii) obje se mjere slično interpretiraju: daju informaciju o relativnoj razlici između tretmana i kontrole, odnosno između skupine bolesnika s varijantnim alelom i kontrolne skupine. Ako je za tretman-kontrola relativni rizik  $RR>1,0$ , npr. 1,5, to znači relativno 50 % veći rizik (nekog događaja) uz tretman; ako je  $RR<1,0$ , npr. 0,5, to znači relativno 50 % manji rizik. Slično vrijedi i za GMR. Primjerice, ako

je za tretman-kontrola omjer GMR >1,0, npr.1,5, to znači relativno 50 % višu vrijednost mjerene varijable (farmakokinetički pokazatelji) uz tretman, a ako je GMR<1,0, npr. 0,5, to znači relativno 50 % niže vrijednosti mjerene varijable uz tretman. Sličan je odnos između relativnog rizika s tzv. relativnom stopom događaja, odnosno omjerom stopa događaja (IRR) - za IRR E vrijednost se računa na isti način kao i za RR (217).

E-vrijednost se može izračunati u odnosu na bilo koju drugu vrijednost; npr. koliko mora iznositi učinak (GMR) nemjerenih *confoundera* da bi smanjio opaženi učinak za 10 % ili slično. U ovoj studiji je planirano E-vrijednosti odrediti:

- (a) u slučaju nekog opaženog GMR >1,0 – u odnosu na GMR 1,20; tj. odrediti najmanji iznos učinaka nemjerenih faktora potreban da „smanji“ GMR do razine 1,20;
- (b) u slučaju nekog opaženog GMR <1,0 – u odnosu na GMR 0,83; tj. odrediti najmanji iznos učinaka nemjerenih faktora potrebnog da „povisi“ GMR do razine  $1/1,20=0,83$ .

Vrijednosti GMR 0,83 i 1,20 nalaze se na granicama konvencionalnog raspona ekvivalentne raspoloživosti u farmakokinetici.

#### Korekcija opaženih GMR za nemjereni confounding

Bilo koji opaženi učinak može se korigirati za iznos nekog nemjerenog učinka (*confoundinga*) koji u procjeni nije kontroliran (218). Taj se postupak također odnosi na učinke mjerene na skali relativnog rizika, pa je i tu korištena analogija između RR i GMR, a rezultira korigiranim opaženim učinkom (paket *episensr* u programu R (219)). Za provođenje postupka potrebne su informacije o (i) veličini učinaka nemjerenog (nekontroliranog) čimbenika na ishod i (ii) neravnoteži prevalencije tog čimbenika u tretiranih i kontrola (ako je prevalencija identična, onda nemjereni čimbenik neće remetiti procjenu učinaka jer će podjednako „sudjelovati“ u vrijednostima ishoda u tretiranih i kontrolnih jedinki). Od svih varijabli na slici 17. koje nisu kontrolirane (npr. *ostali* polimorfizmi *UGT2B7*, *UGT1A9*, *ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1*, *SLCO1B3*) samo za dvije u literaturi postoje izvještaji da bi mogle imati utjecaja na bioraspoloživost MPA-a – to su polimorfizmi *SLCO1B3 c.334T>C* (rs4149117) i *UGT1A9 c.98T>C* (rs72551330). Stoga je pretražena literaturna baza PubMed i identificirane su studije koje su izvjestile o mogućoj povezanosti tih polimorfizama s bioraspoloživošću MPA-a u primatelja bubrežnih transplantata, kao i studije koje su izvjestile o prevalenciji tih polimorfizama u europskoj populaciji. Na temelju prikupljenih podataka, generirana je meta-analitička procjena efekata svakoga od tih polimorfizama u obliku *omjera srednjih vrijednosti* (engl. *ratio of means*, ROM) (220), što je mjera analogna GMR-u. Korišten je postupak *random-effects*, s REML procjeniteljem varijance i Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman



korekcijom. Također, generirana je meta-analitička procjena prevalencije tih polimorfizama. Korišten je postupak *random-effects* u generaliziranom mješovitom modelu s log-transformiranim proporcijama i ML procjeniteljem varijance. Za sve meta-analize korišten je paket *meta* u programu R (221). Na temelju generiranih procjena, kreirani su hipotetski scenariji sa znatnom neravnotežom prevalencije tih polimorfizama između nositelja varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela i *wt* kontrola i korigirane su opažene GMR za iznose ROM generirane meta-analizom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ispitanici

U studiju je uključeno ukupno 68 ispitanika, od kojih je 12 (17,7 %) bilo heterozigota – nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* (C/A), niti jedan varijantni homozigot (A/A) i 56 (82,3 %) homozigota divljeg tipa (C/C): u nastavku teksta, prvi se apostrofiraju kao *tretirani*, a zadnji kao *kontrole* (tablica 15.). Varijante *CPY3A4* i *CYP3A5* gena bile su tek sporadične (tablica 14.) – ispitanici su genotipizirani za ove polimorfizme zbog predmnijevane važnosti za bioraspoloživost CNI-a (što se posredno može odraziti na njihov učinak na bioraspoloživost MPA-a), međutim budući su varijante bile izrazito rijetke, ti polimorfizmi u daljnjem procesuiranju podataka više nisu razmatrani. Mogući utjecaj (učinak) *bioraspoloživosti CNI-a* na bioraspoloživost MPA-a kontroliran je na temelju ostalih koncentracija CNI-a.

Varijantni aleli *UGT1A9 -275T>A* i *-2152C>T* također su bili sporadični, a dva su polimorfizma u potpunom LD (tablica 14). Stoga, u daljnjem procesuiranju podataka, ispitanici su klasificirani kao oni s divljim diplotipom (TT/CC) ili oni s varijantnim diplotipom (TA/CT). Tri polimorfizma *ABCB1 (2677G>T/A, 3435C>T i 1236T>C)*, svaki s predominantnom prevalencijom heterozigota (tablica 14.), bila su u jakom LD (parne vrijednosti  $D'$ =od 0,85 do 0,95,  $r^2$ = od 0,615 do 0,687). Stoga su ispitanici u daljnjem postupku klasificirani prema broju varijantnih alela na tri lokusa: (i) 0 do 1 varijantni alel – homozigoti divljega tipa na sva tri polimorfizma, ili jedan heterozigotni; (ii) 2 do 3 varijantna alela – bilo koja dva ili sva tri lokusa su heterozigotna, ili jedan varijantno homozigotan i jedan heterozigotan; (iii) 4 do 6 varijantnih alela. U pogledu polimorfizma *UGT2B7 -161C>T*, prevladavali su heterozigoti i, ukupno, nositelji varijantnog alela, a u pogledu *ABCC2* polimorfizama *-24C>T* i *1249G>A* (primatelji i donori) prevladavali su homozigoti divljega tipa. U daljnjem postupku, u odnosu na ove polimorfizme, ispitanici su klasificirani kao nositelji varijantnoga alela ili homozigoti divljega tipa.

**Tablica 14.** Udio (%) pojedinih genotipova na genotipiziranim polimorfnim lokusima u 68 uključenih ispitanika.

<b>Primatelji</b>		<i>ABCB1 1236C&gt;T</i> (rs1128503)	
<i>ABCG2 421C&gt;A</i> (rs2231142)		CC	19 (28,0)
CC	56 (82,3)	CT	37 (54,4)
CA	12 (17,7)	TT	12 (17,6)
AA	0	<i>UGT2B7 -161C&gt;T</i> (rs7668258)	
<i>CYP3A4*22</i> (rs35599367)		CC	13 (17,6)
*1/*1	67 (98,5)	CT	40 (58,8)
*1/*22	1 (1,5)	TT	15 (22,1)
<i>CYP3A5*3</i> (rs776746)		<i>SLCO1B1 521T&gt;C</i> (rs4149065)	
*3/*3	59 (86,8)	TT	43 (63,2)
*1/*3	9 (13,2)	TC	24 (35,3)
<i>UGT1A9 -275T&gt;A</i> (rs6714486)		CC	1 (1,5)
TT	65 (95,6)	<i>ABCC2 -24C&gt;T</i> (rs717620)	
TA	3 (4,4)	CC	47 (69,1)
AA	0	CT	19 (27,9)
<i>UGT1A9 -2152C&gt;T</i> (rs17868320)		TT	2 (2,9)
CC	65 (95,6)	<i>ABCC2 1249G&gt;A</i> (rs2273697)	
CT	3 (4,4)	GG	41 (60,3)
TT	0	GA	22 (32,3)
<i>ABCB1 2677 G&gt;T/A</i> (rs2032582)		AA	5 (7,4)
GG	18 (26,5)	<b>Donori</b>	
GA	1 (1,5)	<i>ABCC2 1249G&gt;A</i> (rs2273697)	
GT	35 (51,5)	GG	41 (60,3)
TA	2 (2,9)	GA	21 (30,9)
TT	12 (17,6)	AA	6 (8,8)
<i>ABCB1 3435C&gt;T</i> (rs1045642)			
CC	13 (19,1)		
CT	37 (54,4)		
TT	18 (26,5)		

U tablici 15. sažeta su svojstva nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* (tretirani) i homozigota divljega tipa (kontrola). Dvije su skupine ispitanika bile približno slične u pogledu: udjela muškaraca, dobi, indeksa tjelesne mase, doze kortikosteroida (kao ekvivalenti prednizolona), dnevne diureze i procijenjenoga klirensa kreatinina (tablica 15.). Tretirani su nešto češće dobivali MPA u obliku EC-MPS (83,3 % vs. 62,5 %), a rjeđe u obliku MMF-a (16,7 % vs. 37,5 %) nego kontrola (tablica 15.). Osim toga, tretirani su nešto rjeđe primali CsA (50,0 % vs. 66,1 %), a nešto češće TAC (50,0 % vs. 33,9 %) nego kontrola (tablica 15.). Udio nositelja varijantnih alela *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*3*, *UGT2B7-161C>T*, *SLCO1B1 -521T>C*, te nositelja varijantnoga diplotipa *UGT1A9 -275/-2152* bio je podjednak u tretiranih i kontrola (tablica 15.), kao i udio ispitanika s različitim brojem *ABCB1 2677/3435/1236* varijantnih alela (tablica 15.). Manje razlike uočene su u udjelu nositelja varijantnih alela u polimorfizmima *ABCC2 -24C>T* i *1249G>A* (uključujući i donorski genotip) (tablica 15.).

**Tablica 15.** Svojstva nositelja varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela (tretirani) i homozigota divljega tipa (kontrola).

	Nositelji varijantnoga alela	Homozigoti divljega tipa
N	12	56
Muškarci	6 (50,0)	30 (53,6)
Dob (godine)	46,5±13,3 (26-68)	50,5±12,8 (16-71)
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	24,9±6,3 (17,7-39,5)	24,0±3,3 (14,5-30,4)
Mofetilmikofenolat	2 (16,7)	21 (37,5)
1000 mg dva puta dnevno	1	17
750 mg dva puta dnevno	0	2
500 mg dva puta dnevno	1	2
Želučanootporne tablete mikofenolata	10 (83,3)	35 (62,5)
Dnevna doza (mg)	svi 720 mg bid	svi 720 mg bid
Ciklosporin A	6 (50,0)	37 (66,1)
Jutarnja doza (mg/kg)	160 (144-175; 125-175)	150 (125-188; 75-250)
Večernja doza (mg/kg)	162 (125-181; 125-200)	150 (125-200; 75-250)
Ostatna koncentracija (jutro) (µg/L)	212±53 (169-311)	204±64 (70-341)
Takrolimus	6 (50,0)	19 (33,9)
Jutarnja doza (mg/kg)	2,0 (1,7-3,9; 1,0-5,0)	3,0 (2,5-3,0; 1,5-4,0)
Večernja doza (mg/kg)	3,3 (2,2-4,3; 1,5-5,0)	3,0 (3,0-4,0; 2,0-4,0)
Ostatna koncentracija (jutro) (µg/L)	11,0±3,2 (7,8-16,9)	10,8±5,8 (3,4-27,4)
Prednizonski ekvivalent (mg/dan)	40 (30-40; 30-60)	35 (30-47; 20-75)
Diureza (L/dan)	2,4 (2,1-2,6; 1,8-4,3)	2,6 (2,1-3,2; 1,1-5,7)
Procijenjeni klirens kreatinina (mL/min)	45±16 (29-84)	41±11 (23-74)

	Nositelji varijantnoga alela	Homozigoti divljega tipa
<i>CYP3A4</i> *22 genotip		
*1/*1	12 (100)	55 (98,2)
*1/*22	0	1 (1,8)
<i>CYP3A5</i> *3 genotip		
*3/*3	11 (91,7)	48 (85,7)
*1/*3	1 (8,3)	8 (14,3)
<i>UGT2B7</i> -161C>T genotip		
Varijantni alel	9 (75,0)	47 (83,9)
Divlji tip	3 (25,0)	9 (16,1)
<i>UGT1A9</i> -275 / -2152 diplotip		
Varijantni alel	0	3 (5,4)
Divlji tip	12 (100)	53 (94,6)
<i>ABCB1</i> 2677 / 3435 / 1236 diplotip		
Divlji tip ili 1 varijantni alel	3 (25,0)	15 (26,8)
2-3 varijantna alela	6 (50,0)	25 (44,6)
4-6 varijantnih alela	3 (25,0)	16 (28,6)
<i>SLC01B1</i> 521T>C genotip		
Varijantni alel	4 (33,3)	21 (37,5)
Divlji tip	8 (66,7)	35 (62,5)
<i>ABCC2</i> -24 C>T genotip		
Varijantni alel	2 (16,7)	19 (33,9)
Divlji tip	10 (83,3)	37 (66,1)
<i>ABCC2</i> 1249 G>A genotip		
Varijantni alel	4 (33,3)	23 (41,1)
Divlji tip	8 (66,7)	33 (58,9)
Donorov <i>ABCC2</i> 1249 G>A genotip		
Varijantni alel	6 (50,0)	21 (37,5)
Divlji tip	6 (50,0)	35 (62,5)

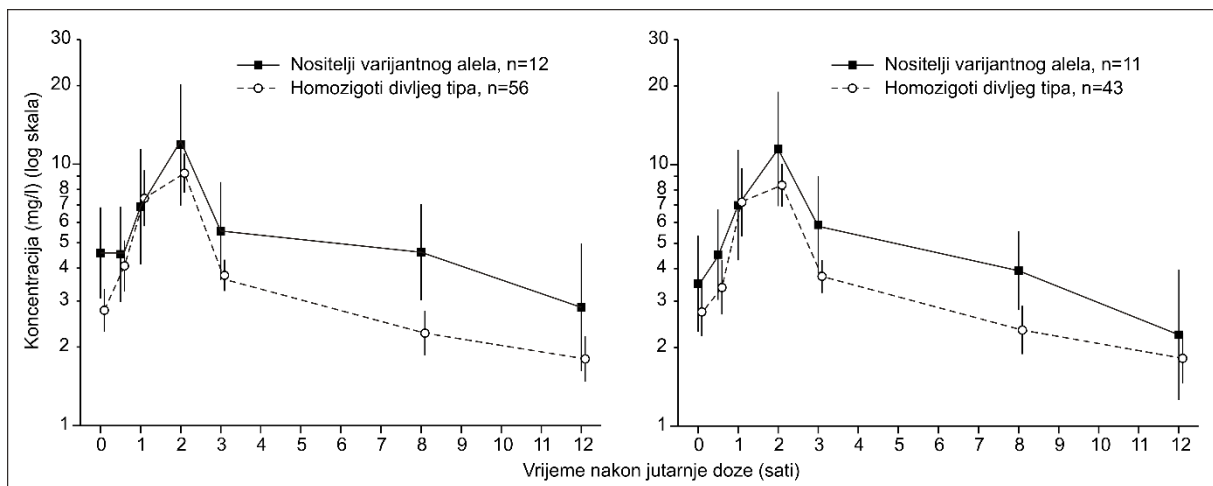
Podatci su brojevi (postotak), srednja vrijednost±SD (raspon) ili medijan (kvartile, raspon)

#### 4.2. Učinak varijantnoga *ABCG2* c.421C>A alela na bioraspoloživost mikofenolne kiseline

Učinak varijantnoga alela procijenjen je prije *ujednačavanja* tretiranih i kontrola za mjerene kovarijate – dakle, u okolnostima u kojima su tretirani i kontrolni ispitanici usporedivi u smislu čimbenika kontroliranih uključnim kriterijima (klinički stabilni, bez upalnih, infektivnih i drugih težih komorbiditeta, s *napredujućom* bubrežnom funkcijom, albuminom >31 g/l, i bez lijekova koji mogu utjecati na farmakokinetiku MPA-a, a s obzirom na izostanak bitnih komorbiditeta, i bez lijekova (osim imunosupresiva) s bitnim utjecajem na transportere i enzime) – a zatim i nakon *ujednačavanja* (za mjerene kovarijate) postupkom *matchinga*.

Ukupno, 11 od 12 nositelja varijantnog alela *upareno* je s 43 ispitanika divljega tipa (kontrola) (detalji postupka prikazani su u poglavlju 3.9., tablici 13. i slici 17.). To je posljedica činjenice

da su za egzaktno uparivanje (standardizirane razlike  $d=0,000$ ) odabrane varijable koje (na temelju dosadašnjeg znanja) imaju najizvjesniji utjecaj na farmakokinetiku MPA-a – tip CNI-a (CsA ili TAC), polimorfizmi gena glavnih metabolizirajućih enzima (*UGT1A9* -275 i -2152 kao diplotip i *UGT2B7* -161C>T u potpunom LD s 802C>T) i polimorfizmi *ABCC2* -24C>T i 1249 G>A (primatelji)). Dakle, nositelji varijantnoga *ABCG2* c.421C>A alela i kontrole u istom stratumu potpuno su identični za te varijable. Ostale mjerene varijable zatim su *ujednačene* postupkom optimalnoga potpunog *matchinga*. Slika 18. prikazuje koncentracije MPA-a tijekom doznoga intervala u nositelja varijantnoga alela i kontrola divljega tipa prije i nakon *uparivanja*: profili za svaku od skupina i njihov međusobni odnos posve su slični prije i nakon *matchinga* za mjerene kovarijate.



**Slika 18.** Prosječne (geometrijske srednje vrijednosti, 90 % CI) koncentracije MPA podešene za dozu tijekom doznog intervala u stanju dinamičke ravnoteže za nositelje ABCG2 c.421C>A varijantnoga alela i kontrole wt-a prije (lijevo) i nakon (desno) *matchinga*.

Tablica 16. sažima svojstva nositelja varijantnoga alela i divljega tipa, kontrola koje su uzete u obzir u procesu *matchinga*, te farmakokinetičke parametre u te dvije skupine ispitanika – prije i nakon *matchinga*. Numeričke razlike/sličnosti uočljive u tablici 15. i 16. su *kvantificirane* u obliku standardiziranih razlika ( $d$ ) ( $d=0,000$  znači potpunu istovjetnost, vrijednost  $d<0,1$  znači minimalne i beznačajne razlike, vrijednosti  $d$  oko 0,2-0,3 znače razlike koje su tek malo veće od *beznačajnih*, vrijednosti  $d$  oko 0,4-0,5 znače *umjerene razlike*, a vrijednosti  $\geq 0,6$  uobičajeno se smatraju *velikim razlikama*).

Prije *matchinga*, uočljiva je velika razlika ( $d>0,7$ ) između nositelja varijantnoga alela i kontrola u pogledu tipa formulacija MPA-a i tipa CNI-a (tablica 16.) dok su sve ostale razlike male, skoro beznačajne ( $d$  vrijednosti od oko 0,1 do oko 0,3) a tek sporadično umjerene ( $d$  oko 0,4) (tablica 16). Istodobno, ukupna bioraspoloživost MPA ( $AUC_{\tau,ss}$ ) je bila viša u nositelja varijantnoga alela ( $d=0,775$ ) uz istodobno niži klirens ( $CL_{T/Fss}$ ,  $d=-0,715$ ), uz tendenciju viših jutarnjih i večernjih ostatnih koncentracija MPA-a (tablica 16.). Također, omjer vršne koncentracije i totalne bioraspoloživosti je bio niži u nositelja varijantnih alela (tablica 16.). Nakon *matchinga*, vrijednosti svih kovarijata su identične ( $d=0,000$ ) ili s beznačajnim razlikama ( $d<0,1$ ) između nositelja varijantnoga alela i kontrola divljega tipa (tablica 16.), s izuzetkom: (i) udjela donora – nositelja varijantnoga alela *ABCC2 1249* ( $d=0,564$ ), (ii) manjih razlika u indeksu tjelesne mase ( $d=-0,121$ ) i (iii) manjih razlika u procijenjenom klirensu kreatinina ( $d=0,234$ ) – razlike tih varijabli između nositelja varijantnoga alela i kontrola divljega tipa postojale su, u sličnom opsegu, i prije *matchinga*, a postupak ih nije bitnije smanjio

odnosno *uklonio* (tablica 16.). Istodobno, nakon *matchinga*, ukupna bioraspoloživost ( $AUC_{\tau,ss}$ ) je u nositelja varijantnoga alela bila još nešto viša nego u kontrola divljega tipa ( $d=0,824$ ), klirens je i dalje bio niži, iako u manjem opsegu ( $d=-0,515$ ), razlike jutarnjih i večernjih ostatnih koncentracija su se bitnije smanjile, kao i razlika omjera vršne i ukupne bioraspoloživosti (tablica 16.). To je sukladno sličnosti profila koncentracija-vrijeme prije i nakon *matchinga* između nositelja varijantnoga alela i kontrola divljega tipa (slika 18.).

S obzirom na određene razlike između nositelja varijantnoga alela i kontrola divljega tipa u pogledu varijabli koje nisu idealno uravnotežene, razlike farmakokinetičkih parametara između dvije skupine procijenjene su uz dodatnu *korekciju* (u multivarijatnom modelu) za indeks tjelesne mase, procijenjeni klirens kreatinina i udio donora-nositelja varijantnoga alela *ABCC2 1249 G>A* (tablica 17.).

Prije *matchinga*,  $AUC_{\tau,ss}$  je u nositelja varijantnoga alela bio za oko 45% (frekvencionistička procjena), odnosno za oko 38 % (Bayes procjena) viši nego u kontrola divljega tipa (GMR=1,45; 95% CI 1,10-1,92; odnosno 1,38; 95 %CrI 1,07-1,81) (tablica 17.), uz istodobno proporcionalno niži klirens (tablica 17.). Taj je učinak ostao sličan i nakon *matchinga* (i *podešenja* za varijable koje nisu idealno ujednačene *matchingom*) (tablica 17.).



**Tablica 16.** Svojstva nositelja *ABCG2* varijantnog alela (tretirani) i homozigota divljega tipa (kontrola) prije i nakon *matchinga* za mjerene kovarijate. Podatci su brojevi (%), srednja vrijednost  $\pm$  SD ili geometrijska srednja vrijednost (geometrijski koeficijent varijacije, %) za farmakokinetičke ishode. Razlike su prikazane kao standardizirane razlike (*d*). Za farmakokinetičke ishode *d* je računat na temelju srednjih vrijednosti (SD) logaritama. Vrijednosti  $d < 0,1$  naznačuju irelevantne razlike. Zasjenje su varijable u odnosu na koje su tretirani i kontrola ujednačavani.

	Prije <i>matchinga</i>			Nakon <i>matchinga</i>		
	Varijantni	Divlji tip	<i>d</i>	Varijantni	Divlji tip	<i>d</i>
N	12	56	---	11	43	---
MMF	2 (16,7)	21 (37,5)	-0,715	3,3 (29,6)	12,9 (30,1)	-0,009
EC-MPS	10 (83,3)	35 (62,5)	0,715	7,7 (70,4)	30,1 (69,9)	0,009
Ciklosporin	6 (50,0)	37 (66,1)	-0,715	7,5 (68,5)	29,5 (68,5)	0,000
Takrolimus	6 (50,0)	19 (33,9)	0,715	3,5 (31,5)	13,5 (31,5)	0,000
<i>SLCO1B1</i> varijantni alel	4 (33,3)	21 (37,5)	-0,087	4,3 (38,9)	15,4 (35,8)	0,062
<i>SLCO1B1</i> divlji tip	8 (66,7)	35 (62,5)	0,087	6,7 (61,1)	27,6 (64,2)	-0,062
<i>ABCC2</i> -24 varijantni alel	2 (16,7)	19 (33,9)	-0,405	2,0 (18,5)	8,0 (18,5)	0,000
<i>ABCC2</i> -24 divlji tip	10 (83,3)	37 (66,1)	0,405	9,0 (81,5)	35,0 (81,5)	0,000
<i>ABCC2</i> 1249 varijantni alel	4 (33,3)	23 (41,1)	-0,161	4,7 (42,6)	18,3 (42,6)	0,000
<i>ABCC2</i> 1249 divlji tip	8 (66,7)	33 (58,9)	0,161	6,3 (57,4)	24,7 (57,4)	0,000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	9 (75,0)	47 (83,9)	-0,222	9,6 (87,0)	37,4 (87,0)	0,000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	3 (25,0)	9 (16,1)	0,222	1,4 (13,0)	5,6 (13,0)	0,000
<i>UGT1A9</i> varijantni diplotip	0	3 (5,4)	-0,336	0	0	0,000
<i>UGT1A9</i> divlji diplotip	12 (100)	53 (94,6)	0,336	11 (100)	43 (100)	0,000
<i>ABCB1</i> 0-1 varijantni alel	3 (25,0)	15 (26,8)	-0,041	3,9 (35,2)	14,4 (33,5)	0,035
<i>ABCB1</i> 2 -3 varijantna alela	6 (50,0)	25 (44,6)	0,108	4,1 (37,0)	17,4 (40,5)	-0,071
<i>ABCB1</i> 4 -6 varijantnih alela	3 (25,0)	16 (28,6)	-0,081	3,1 (27,8)	11,2 (26,0)	0,039
Donor <i>ABCC2</i> 1249 varijantni alel	6 (50,0)	21 (37,5)	0,282	7,7 (70,4)	18,7 (43,5)	0,564
Donor <i>ABCC2</i> 1249 divlji tip	6 (50,0)	35 (62,5)	-0,282	3,3 (29,6)	24,4 (56,5)	-0,564
Dob (godine)	46,5 $\pm$ 13,3	50,0 $\pm$ 12,8	-0,301	50,9 $\pm$ 11,7	50,7 $\pm$ 13,1	0,014
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	24,9 $\pm$ 6,3	24,0 $\pm$ 3,3	0,182	23,5 $\pm$ 5,6	24,1 $\pm$ 3,3	-0,121
eCrCl (mL/min)	45 $\pm$ 16	41 $\pm$ 11	0,315	44,3 $\pm$ 13,2	41,4 $\pm$ 11,1	0,234
Ln(CNI ostatna konc.) ( $\mu$ g/L) <sup>1</sup>	5,34 $\pm$ 0,21	5,26 $\pm$ 0,37	0,230	5,33 $\pm$ 0,20	5,31 $\pm$ 0,38	0,057
<i>Farmakokinetički ishodi</i>						
AUC <sub><math>\tau</math>,ss</sub> (mg•h/L)	73,2 (57,3)	50,3 (44,8)	0,775	67,8 (41,8)	48,9 (40,9)	0,824
C <sub>max,ss</sub> (mg/L)	16,1(64,9)	15,9 (60,5)	0,023	15,3 (50,2)	14,7 (64,4)	0,072
C <sub>0</sub> (mg/L)	4,6 (91,0)	2,8 (101)	0,625	3,5 (91,0)	2,7 (101)	0,307
C <sub>12</sub> (mg/L)	2,8 (149)	1,8 (101)	0,456	2,2 (143)	1,8 (106)	0,212
CL <sub>T/F,ss</sub> (mL/min/kg)	2,2 (77,0)	3,3 (48,0)	-0,715	2,7 (61,2)	3,4 (42,7)	-0,515
C <sub>max</sub> /AUC <sub><math>\tau</math></sub> (1/h)	0,22 (51,0)	0,32 (56,0)	-0,715	0,22 (49,5)	0,30 (60,8)	-0,559

AUC<sub>ss</sub> – površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme tijekom doznog intervala u stanju dinamičke ravnoteže; C<sub>max,ss</sub> – vršna koncentracija;

C<sub>0</sub> – jutarnja ostatna koncentracija; C<sub>12</sub> – večernja ostatna koncentracija; CL<sub>T/F,ss</sub> – prividni ukupni tjelesni klirens; CNI – inhibitor kalcineurina; EC-MPS – želučano otporne tablete mikofenolata; eCrCl – procijenjeni klirens kreatinina; MMF – mofetilmikofenolat

<sup>1</sup>Linearnom transformacijom logaritmirane koncentracije C<sub>sa</sub> i TAC-a su na istoj skali

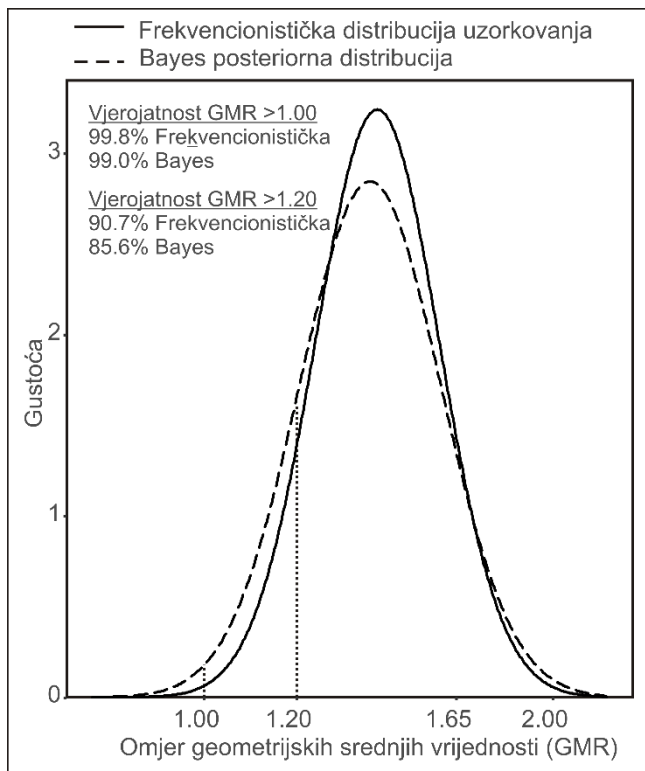
**Tablica 17.** Usporedba farmakokinetičkih parametara MPA-a između nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* i homozigota divljega tipa – procjena učinaka varijantnoga alela. Učinak je iskazan kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR), a procijenjen je frekvencionističkom i Bayes metodom, prije *matchinga* i nakon *matchinga* uz dodano „podešenje“ za kovarijate koje *matchingom* nisu idealno uravnotežene. Uz frekvencionističke procjene prikazana je i odgovarajuća P-vrijednost. Uz Bayes procjene, prikazana je Bayes vjerojatnost (P) da se GMR razlikuje od 1,0 te korespondirajuća frekvencionistička P-vrijednost.

	Prije <i>matchinga</i>			
	Frekvencionistička		Bayes	
	GMR (95 %CI)	P	GMR (95 %CrI)	P(GMR≠1,0); P
AUC <sub>τ,ss</sub> (mg•h/L)	1,45 (1,10-1,92)	0,009	1,38 (1,07-1,81)	99,2 %; 0,016
C <sub>max,ss</sub> (mg/L)	1,01 (0,71-1,44)	0,940	1,01 (0,74-1,39)	53,3 %; 0,934
C <sub>0</sub> (mg/L)	1,66 (0,99-2,79)	0,056	1,39 (0,91-2,11)	93,7 %; 0,126
C <sub>12</sub> (mg/L)	1,57 (0,88-2,81)	0,123	1,30 (0,84-2,06)	87,8 %; 0,243
CL <sub>T/F,ss</sub> (mL/min/kg)	0,66 (0,48-0,90)	0,010	0,71 (0,53-0,95)	98,9 %; 0,022
C <sub>max</sub> /AUC <sub>τ</sub> (1/h)	0,70 (0,50-0,96)	0,029	0,75 (0,55-0,99)	97,5 %; 0,050
	Nakon <i>matchinga</i> uz dodatno podešenje <sup>1</sup>			
	Frekvencionistička		Bayes	
	GMR (95 %CI)	P	GMR (95 %CrI)	P(GMR≠1,0); P
AUC <sub>τ,ss</sub> (mg•h/L)	1,41 (1,11-1,79)	0,011	1,39 (1,05-1,81)	99,0 %; 0,020
C <sub>max,ss</sub> (mg/L)	1,16 (0,80-1,68)	0,381	1,10 (0,78-1,52)	72,1 %; 0,557
C <sub>0</sub> (mg/L)	1,23 (0,62-2,41)	0,517	1,32 (0,86-2,08)	88,9 %; 0,222
C <sub>12</sub> (mg/L)	1,21 (0,60-2,41)	0,560	1,28 (0,81-2,06)	84,5 %; 0,310
CL <sub>T/F,ss</sub> (mL/min/kg)	0,73 (0,58-0,93)	0,016	0,71 (0,54-0,95)	98,8 %; 0,024
C <sub>max</sub> /AUC <sub>τ</sub> (1/h)	0,81 (0,57-1,14)	0,193	0,81 (0,60-1,15)	89,6 %; 0,208

<sup>1</sup>Dodatno podešeno (u multivarijantnom modelu) za indeks tjelesne mase, procijenjeni klirens kreatinina i udio donora-nositelja varijantnoga alela *ABCC2 1249 G>A*.

AUC<sub>t,ss</sub> – površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme tijekom doznog intervala u stanju dinamičke ravnoteže; C<sub>max,ss</sub> – vršna koncentracija; C<sub>0</sub> – jutarnja ostatna koncentracija; C<sub>12</sub> – večernja ostatna koncentracija; CL<sub>T/F,ss</sub> – prividni ukupni tjelesni klirens

Dakle, uz potpunu kontrolu za mjerene kovarijate, učinak varijantnoga alela na bioraspoloživost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže procijenjen je frekvencionističkom metodom kao 41 % veća AUC<sub>τ,ss</sub> (GMR=1,41; 95 %CI 1,11-1,71) i proporcionalno niži (27 % niži) totalni tjelesni klirens (GMR=0,73; 95 %CI 0,58-0,93); Bayes procjene iznose 39 % viši AUC<sub>τ,ss</sub> (GMR=1,39; 95 %CrI 1,05-1,81) i 29 % niži totalni tjelesni klirens (GMR=0,71; 95 % CrI 0,54-0,95) (tablica 17.). Kako je prikazano na slici 19., vjerojatnost da je GMR za AUC<sub>τ,ss</sub> >1,0 je gotovo 100 %, a vjerojatnost da je >1,20 je također visoka (oko 90 %).



**Slika 19.** Distribucija efekata (GMR) varijantnog alela. Na temelju srednjih vrijednosti i standardnih devijacija logaritmiranih efekata (GMR) varijantnog alela procijenjenih u frekvencionističkim i Bayes modelima, generirano je 40000 uzoraka distribucija uzorkovanja (engl. *sampling distribution*) i 40000 uzoraka posteriornih distribucija – prikazane su distribucije gustoće vjerojatnosti. Okomite točkaste crte označuju učinak GMR=1,0 i GMR=1,20 – površine ispod krivulje distribucije gustoće vjerojatnosti udesno od tih crta odgovaraju vjerojatnosti da je opaženi učinak >1,0 odnosno >1,20.

### 4.3. Osjetljivost procijenjenih učinaka varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na bioraspoloživost mikofenolne kiseline na ostatni (nemjereni) *confounding*

#### 4.3.1. E-vrijednosti

U poglavlju 3.9., tablica 13. i slika 17., prikazani su svi realno mogući izvori nemjerenog *confoundinga* koji je, potencijalno, mogao *iskriviti* procjene efekata varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na MPA  $AUC_{\tau,ss}$ . E-vrijednosti za frekvencionistički procijenjeni učinak od GMR=1,41, odnosno za Bayes procjenu od GMR=1,39, a u odnosu na GMR=1,20 iznose 1,63 odnosno 1,59. Drugim riječima: (i) svi potencijalni izvori *confoundinga* morali bi djelovati sinkrono, u istom smjeru (ii) i taj bi kumulativni učinak morao biti velik, tj. iznositi GMR=1,63, odnosno GMR=1,59, da bi opažene učinke smanjio na GMR=1,20. Dakle, potreban je značan kumulativni učinak svih *remetilačkih faktora* da bi objasnio znatan dio opaženih učinaka, pri

čemu bi učinak varijantnog, alela još uvijek bio na gornjoj granici ekvivalentne bioraspoloživosti (GMR=1,20). Da bi u potpunosti *objasnio* opažene učinke, tj. smanjio opažene GMR na 1,0, kumulativni učinak *remetilačkih faktora* morao bi biti iznimno velik, tj. GMR=2,17, odnosno GMR=2,12. Ukupno, procjene učinaka varijantnoga alela nisu pretjerano osjetljive na nemjereni *confounding*.

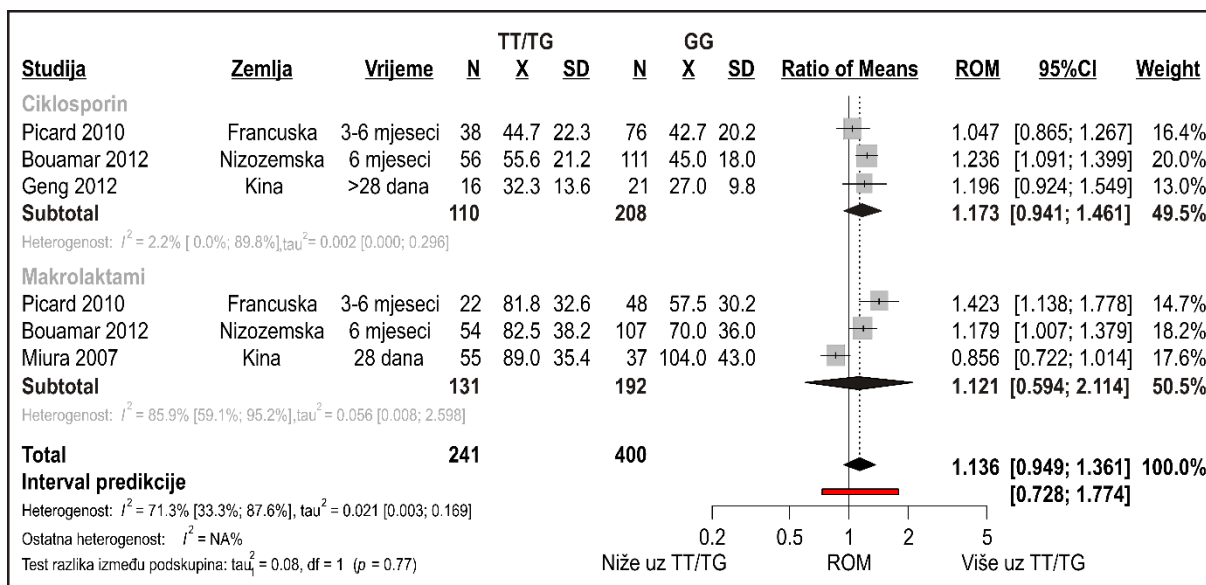
#### 4.3.2. Korekcija opaženih učinaka za nemjereni *confounding*

Od svih potencijalnih izvora nemjerenog *confoundinga* (tablica 13., slika 17.), samo za dva čimbenika postoje literaturni navodi (iako ne konzistentni) o mogućem učinku na bioraspoloživost MPA-a: polimorfizam gena za OATB1B3 transporter (*SLCO1B3 c.334T>G* (rs4149117)) i polimorfizam gena za enzim UGT1A9 (*UGT1A9 c.98T>C* (rs72551330)). Koristeći dva recentna sustavna pregleda literature (11, 222) i pregledom bibliografske baze PubMed, identificirane su studije koje su izvjestile o:

(i) povezanosti tih polimorfizama s bioraspoloživošću MPA-a te (ii) prevalenciji tih polimorfizama u europskoj populaciji (što se smatra relevantnim za prezentiranu studiju).

##### 4.3.2.1. Učinak polimorfizma *SLCO1B3 c.334T>G* na bioraspoloživost mikofenolne kiseline

Identificirano je ukupno 4 studije koje su izvjestile o ukupnoj ekspoziciji MPA-u u stanju dinamičke ravnoteže tijekom doznoga intervala od 12 sati ( $AUC_{0-12}$ ) u primatelja bubrežnih transplantata, temeljeno na koncentracijama korigiranim za dozu MPA-a. U svim su studijama ispitanici klasificirani kao homozigoti divljega tipa/heterozigoti (TT/TG) u usporedbi s varijantnim homozigotima (GG): (i) jedna francuska (76) i jedna nizozemska studija (136) u bolesnika koji su primali MMF objavile se podatke zasebno za bolesnike kotretirane CsA-om i za bolesnike tretirane makrolaktamima (naviše TAC, rjeđe sirolimus); (ii) jedna kineska studija (120) u bolesnika koji su primali MMF i CsA; i (iii) jedna japanska studija (121) u bolesnika na MMF-u i TAC-u. U svim su studijama prikazane *grube* (nepodešene) srednje vrijednosti (standardne devijacije)  $AUC_{0-12}$  određene u različitim vremenima nakon transplantacije (slika 20.).



**Slika 20.** Meta-analiza studija koje su izvjestile srednje vrijednosti (SD) za ukupnu ekspoziciju MPA-u tijekom doznoga intervala ( $AUC_{0-12}$ ) u stanju dinamičke ravnoteže u primatelja bubrežnih transplantata koji su primali MMF (tablete s trenutnim oslobađanjem) i CsA ili makrolaktame (TAC ili sirolimus) i genotipizirani su za polimorfizam *SLCO1B3 c.334T>G*. Bolesnici su klasificirani kao homozigoti divljega tipa ili heterozigoti (TT/TG), odnosno kao varijantni homozigoti (GG). Mjera učinka je omjer srednjih vrijednosti (engl. *ratio of means*, ROM).

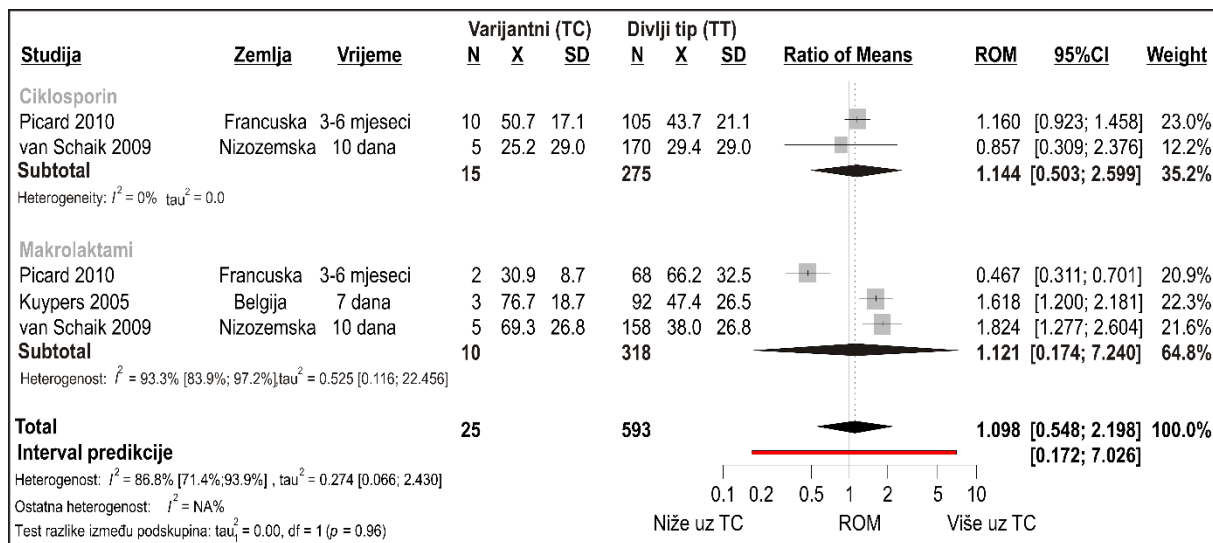
Što se tiče bolesnika u kojih je CNI bio CsA, u jednoj studiji nije uočena razlika između TT/TG i GG bolesnika, dok su dvije sugerirale nešto više vrijednosti  $AUC_{0-12}$  u bolesnika TT/TG (slika 20). Meta-analitička objedinjena procjena (ROM=1,173; 95 % CI 0,941-1,461) (slika 20.) naznačuje tendenciju nešto viših vrijednosti u TT/TG bolesnika (ukupno N=110) nego u GG bolesnika (ukupno N=208) (slika 20.).

U bolesnika u kojih je CNI bio makrolaktam, dvije studije sugerirale su nešto više vrijednosti AUC u TT/TG bolesnika nego u GG bolesnika (slika 20.), a jedna je ukazala na nešto niže vrijednosti (slika 20). Objedinjena meta-analitička procjena ROM=1,121 (95 %CI 0,594-2,114) nije ukazala na relevantne razlike između TT/TG (ukupno N=131) i GG bolesnika (ukupno N=192).

Sveukupna procjena, za obje razine CNI, (ROM=1,136; 0,949-1,361) (slika 20.) ukazuje na mogućnost nešto više ukupne ekspozicije u TT/TG bolesnika (ukupno N=241) nego u GG bolesnika (ukupno N=400). No, uslijed znatne heterogenosti (najbolje ocrtane širokim intervalom predikcije), nesigurnost te procjene je znanta.

#### 4.3.2.2. Učinak polimorfizma UGT1A9 c.98T>C na bioraspoloživost mikofenolne kiseline

Identificirane su ukupno 3 studije koje su izvjestile o ukupnoj ekspoziciji MPA-u u stanju dinamičke ravnoteže tijekom doznoga intervala od 12 sati ( $AUC_{0-12}$ ) u primatelja bubrežnih transplantata, temeljeno na koncentracijama korigiranih za dozu MPA-a. U svim su studijama ispitanici klasificirani kao homozigoti divljega tipa (TT) u odnosu na heterozigote (TC) (varijantni homozigoti nisu identificirani): (i) jedna francuska (76) i jedna nizozemska studija (75) u bolesnika koji su primali MMF izvjestile su podatke zasebno za bolesnike kotretirane CsA-om i za bolesnike tretirane makrolaktamima (najviše TAC, rjeđe sirolimus); (ii) jedna belgijska studija (73) u kojoj su bolesnici tretirani MMF-om i TAC-om. Dvije studije (francuska i belgijska) izvjestile su *grube* (nepodešene) srednje vrijednosti (standardne devijacije)  $AUC_{0-12}$  određene u različitim vremenima nakon transplantacije (73, 76). U nizozemskoj studiji, istraživači su koristili reducirani protokol uzimanja uzoraka (prije doze MMF, te 0,5 i 2 sata nakon doze) kako bi *projicirali*  $AUC_{0-12}$  u različitim vremenima: 3 i 10 dana, te 1, 3, 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije. U publikaciji (75) grafički su prikazane geometrijske srednje vrijednosti  $AUC_{0-12}$  u tim vremenskim točkama za 5 nositelja varijantnoga alela i 170 kontrola divljega tipa koji su primali CsA, te zasebno za 5 nositelja varijantnoga alela i 158 kontrola divljega tipa koji su primali TAC. Koristeći digitalizirajući *software*, s krivulja su očitane geometrijske srednje vrijednosti na dan 10 nakon operacije (što korespondira vremenu određivanja MPA-a u ovoj studiji), a koristeći p-vrijednosti izračunata je zajednička standardna devijacija. Te su vrijednosti iskorištene za meta-analizu na slici 21.



**Slika 21.** Meta-analiza studija koje su izvjestile srednje vrijednosti (SD) za ukupnu ekspoziciju MPA-u tijekom doznog intervala ( $AUC_{0-12}$ ) u stanju dinamičke ravnoteže u primatelja bubrežnih transplantata koji su primali MMF (tablete s trenutnim oslobađanjem) i CsA ili makrolaktame (takrolimus ili sirolimus) i genotipizirani su za polimorfizam *UGT1A9 c.98T>C*. Bolesnici su klasificirani kao nositelji varijantnoga alela (heterozigoti, TC) odnosno kao homozigoti divljega tipa (TT). Mjera učinka je omjer srednjih vrijednosti ROM.

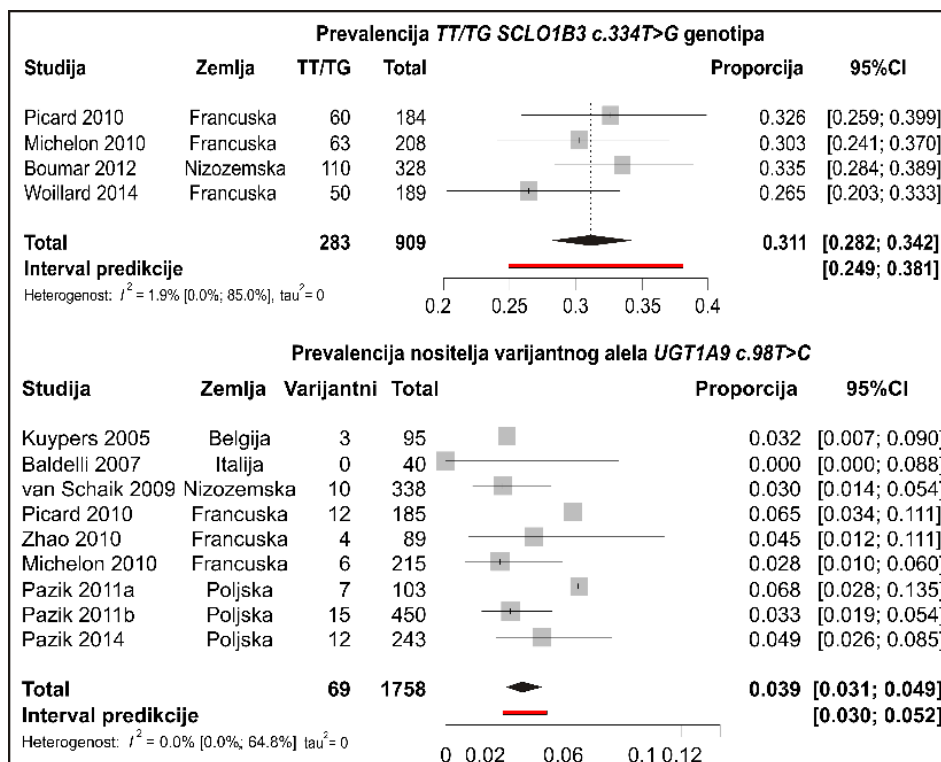
Broj nositelja varijantnoga alela (isključivo heterozigoti) u svim je studijama (i ukupno) bio vrlo nizak (slika 21.). U nizozemskoj studiji (75) autori su na temelju mješovitog modela za analizu ponovljeno mjerenih  $AUC_{0-12}$  (u 6 vremenskih točaka) zaključili: (i) u bolesnika koji su primali TAC, 5 nositelja varijantnoga alela (TC) imalo je prosječno 50 % višu AUC u odnosu na 158 homozigota wt-a (podešeno za dob, spol, klirens kreatinina, odgođeni nastup funkcije presatka i metodu kvantifikacije mikofenolata); (ii) isto je opaženo u bolesnika koji su primali CsA, za 5 nositelja varijantnoga alela u usporedbi s 170 homozigota divljega tipa. Međutim, vrijednosti na postoperativni dan 10 bile su nešto drugačije: (i) u bolesnika na TAC-u, razlika između nositelja varijantnoga alela i homozigota divljega tipa bila je i veća od 50 %; (ii) u bolesnika na CsA-u, međutim, praktično nije bilo razlike u  $AUC_{0-12}$  MPA-a između nositelja varijantnoga alela i homozigota divljega tipa (slika 21.). U belgijskoj studiji (73) (CNI je TAC)  $AUC_{0-12}$  je bila viša u 3 TC bolesnika nego u 92 homozigota divljega tipa (slika 21.); u francuskoj studiji (76) međutim, uz TAC,  $AUC_{0-12}$  je bila niža u 2 TC bolesnika nego u 68 homozigota divljega tipa (slika 21.), dok je uz CsA, AUC bila slična za 10 TC bolesnika i 105 homozigota divljega tipa (slika 21.). Kada se meta-analitički objedine, ovi oskudni podaci

razmjerno konzistentno ukazuju izostanak neke relevantne razlike između TC bolesnika (N=15) i homozigota divljega tipa (N=275) kad je CNI CsA (slika 21.). Kad se umjesto CsA-a rabe makrolaktami, rezultati individualnih studija su vrlo heterogeni, ali isto tako ne ukazuju na neku relevantnu razliku između TC bolesnika (N=10) i homozigota divljega tipa (N=318) (slika 21.). Sveukupna objedinjena procjena (slika 21.) također ne signalizira neku relevantnu (veliku) razliku između *UGT c.98T>C* heterozigota (N=25) i homozigota divljega tipa (N=593) – heterogenost podataka je, međutim, ekstremna – interval predikcije proteže se od 7 puta niže do oko 7 puta više AUC<sub>0-12</sub> u nositelja varijantnoga alela (slika 21.), odnosno, sugerira podjednaku vjerojatnost izrazito niže ili izrazito više ekspozicije u nositelja varijantnoga alela.

#### *4.3.3. Prevalencija polimorfizama *SLCO1B3 c.334T>G* i *UGT1A9 c.98T>C* u bijelih Europljana*

Identificirane su 4 studije na temelju kojih je moguće procijeniti prevalenciju TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3 c.334T>G* i 9 studija na temelju kojih je moguće procijeniti prevalenciju nositelja varijantnog alela u polimorfizmu *UGT1A9 c.98T>C* (73, 75-77, 79, 136, 137, 223-225), a koje su isključivo ili predominantno uključile bijele Europljane (slika 22.). Prevalencija genotipa TT/TG može se konzistentno (i razmjerno precizno) procijeniti na 31,1 % (95 % CI 28,2-34,2; predikcija 24,9-38,1), prevalencija nositelja varijantnoga *UGT1A9 c.98T>C* alela može se konzistentno (i razmjerno precizno) procijeniti na 3,9 % (95 % CI 3,1-4,9; predikcija 3,0-5,2) (slika 22.).





**Slika 22.** Meta-analiza proporcija genotipa TT/TG u polimorfizmu *SLCO1B3* c.334T>G i nositelja varijantnoga alela u polimorfizmu *UGT1A9* c.98T>C u bijelih Europljana.

#### 4.3.3.1. Korekcija procijenjenoga učinka varijantnoga *ABCG2* c.421C>A alela za (nemjereni) učinak TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3* c.334T>G

Ne postoji neki stvaran biološki razlog zbog kojeg bi trebalo očekivati bitno drugačiju prevalenciju TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3* c.334T>G između nositelja *ABCG2* c.421C>A varijantnoga alela i homozigota divljega tipa u bijelih Europljana (sveukupna prevalencija procijenjena na 31,1%, slika 22.). Međutim, mogao bi se pretpostaviti niz raznolikih neravnoteža koje nastanu pukim slučajem. U tablici 18. naznačeni su scenariji s takvim pretpostavljenim, slučajnim i znatnim neravnotežama: (i) prevalencija TT/TG genotipa (povezana s višim vrijednostima  $AUC_{0-12}$  MPA-a) među nositeljima varijantnoga *ABCG2* alela od 40 % (što odgovara gornjoj granici intervala predikcije na slici 22.), i prevalencija od 25 % (tako da je sveukupna prevalencija 31 %) među *ABCG2* homozigotima divljega tipa, što odgovara donjoj granici intervala predikcije na slici 22.; (ii) još veća neravnoteža u prevalenciji TT/TG genotipa, u omjeru 2,5:1 (50 % među nositeljima *ABCG2* varijantnog alela i 20 % među homozigotima divljega tipa) (tako da je ukupna prevalencija 31 %). Čak i kad bi učinak TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3* c.334T>G na  $AUC_{0-12}$  MPA-a bio znatno veći od procijenjenih  $ROM=1,14$  i iznosio  $ROM=1,25$ , korigirani učinak varijantnoga *ABCG2* c.421

alela još uvijek bi bio GMR=1,31 (naspram procijenjenih 1,40), tj. bio bi iznad konvencionalne gornje granice ekvivalentne bioraspoloživosti (tablica 18.).

**Tablica 18.** Analiza senzitivnosti učinka varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na AUC<sub>0-12</sub> MPA-a (procijenjen na GMR=1,40, tablica 16) – korekcija za hipotetski učinak nemjerenog *confoundera*, tj. učinak genotipa TT/TG u polimorfizmu *SLCO1B3 c.334*.

Prevalencija TT/TG u nositelja varijantnog <i>ABCG2</i> alela	Prevalencija TT/TG u <i>ABCG2</i> homozigota divljeg tipa	Učinak TT/TG genotipa (kao ROM ili GMR)	Korigirani učinak <i>ABCG2 c.421</i> varijantnog alela
40 %	25 %	1,15	1,37
40 %	25 %	1,20	1,36
40 %	25 %	1,25	1,35
50 %	20 %	1,15	1,34
50 %	20 %	1,20	1,32
50 %	20 %	1,25	1,31

U tablici 18. prikazani su korigirani učinci (GMR) *ABCG2* varijantnoga alela. Prevalencija genotipa TT/TG procijenjena je na 31,1 % (slika 22). Pretpostavljena je znatna neravnoteža toga genotipa među nositeljima varijantnoga *ABCG2* alela i kontrola divljega tipa (40 % vs. 25 % i 50 % vs. 20 %) i tri različita učinka TT/TG genotipa (sva tri veća od meta-analičke procjene, slika 20.).

#### 4.3.3.2. Korekcija procijenjenoga učinka varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela za (nemjereni) učinak varijantnoga alela u polimorfizmu *UGT1A9 c.98T>C*

Prevalencija varijantnoga alela *UGT1A9 c.98T>C* je vrlo niska. Niti jedna studija na slici 22. nije detektirala niti jednoga varijantnog homozigota – nositelji varijantnoga alela su isključivo heterozigoti (TC). Na slici 22. njihova je prevalencija (u bijelih Europljana) procijenjena na 3,9 %. To bi značilo da u uzorku od 54 bolesnika uključenih u analizu nakon *matchinga* treba očekivati 2 bolesnika heterozigota na tom lokusu. No, vjerojatnost da se opaze 2 heterozigota u ovom uzorku iznosi samo 27,4 %, vjerojatnost da se ne opazi niti jedan iznosi 11 %, vjerojatnost da se ne opazi niti jedan ili da se opazi jedan iznosi 35,8 %, a vjerojatnost da se opaze 2 ili više iznosi 36,7 %. Sveukupno, u prikupljenom je uzorku najvjerojatnije bilo svega nekoliko TC heterozigota i praktično je izvjesno da nisu mogli utjecati na opažene učinke (nakon *matchinga*) varijantnoga *ABCG2* alela. Nema nekoga biološkog razloga zašto bi prevalencija *UGT1A9 c.98T>C* heterozigota bila viša među nositeljima varijantnog *ABCG2*

*c.421C>A* alela nego među kontrolama divljega tipa, no, hipotetski je moguće pretpostaviti neravnoteže koje nastaju pukim slučajem.

Tablica 19. prikazuje dva tipa hipotetskih scenarija: (i) u prvome, *startni učinak* (tj. onaj koji treba korigirati za nemjereni *confounding*) varijantnoga *ABCG2* alela iznosi  $GMR=1,40$  (tablica 17.); (ii) u drugome, *startni učinak* varijantnoga *ABCG2* alela iznosi  $GMR=1,31$  – to je korigirani učinak, nastao korekcijom učinka  $GMR=1,40$  za nemjereni učinak TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3 c.334T>G* pod okolnostima izrazite neravnoteže u prevalenciji toga genotipa između nositelja *ABCG2* varijantnoga alela (50 %) i homozigota divljega tipa (20 %), te uz pretpostavljeni veliki učinak TT/TG genotipa od  $ROM=1,25$  (tablica 18.). Ovaj *scenario* slijedi logiku da je TT/TG genotip nešto češći, te da je njegov doprinos *remetilačkim čimbenicima* veći – stoga, nakon korekcije za taj nemjereni *confounder*, slijedi korekcija za manje vjerojatan *confounder* (zbog izrazito niske prevalencije), tj. učinak varijantnog *UGT1A9 c.98T>C* alela. U oba je scenarija pretpostavljena izrazita neravnoteža prevalencije varijantnoga *UGT1A9 c.98* alela između nositelja varijantnoga *ABCG2* alela i kontrola divljega tipa u omjeru 3:1 (kao 6 % vs. 2 %) ili 5:1 (5 % vs. 1 % ili 10 % vs. 2 %) (tako da je svezukupna prevalencija 3,9 %); a pretpostavljen je i učinak varijantnoga *UGT1A9 c.98* alela od  $ROM=1,10$  (kako je meta-analitički procijenjeno, slika 21.), te od  $ROM=1,50$  – što je sugerirani učinak u nizozemskoj studiji (75) na temelju ponovljenih evaluacija AUC<sub>0-12</sub> MPA-a tijekom 12 mjeseci uz kotreatman TAC-om ili CsA-om.

U *scenariju* gdje je početni učinak *ABCG2* varijantnoga alela koji treba korigirati  $GMR=1,40$ , i uz najnepovoljniju neravnotežu prevalencije varijantnoga *UGT1A9 c.98* alela od 10 % vs. 2 %, i njegov izraziti učinak od  $ROM=1,50$  korigirani učinak *ABCG2* varijantnoga alela iznosi  $GMR=1,35$  (tablica 19.). Slično, čak i ako *startni*  $GMR$  kojeg treba korigirati iznosi 1,31, i uz najnepovoljniju neravnotežu prevalencije varijantnoga *UGT1A9 c.98* alela od 10 % vs. 2 % i njegov učinak od  $ROM=1,50$ , korigirani učinak varijantnoga *ABCG2* alela još uvijek iznosi  $GMR=1,26$ , tj. iznad je gornje granice konvencionalnoga kriterija ekvivalente bioraspoloživosti (tablica 19.). Sveukupno, i ova analiza ukazuje da su procijenjeni učinci varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na bioraspoloživost MPA-a prilično *otporni* na nemjereni *confounding*.

**Tablica 19.** Analiza senzitivnosti učinka varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na AUC<sub>0-12</sub> MPA-a – korekcija za nemjereni učinak polimorfizma *UGT1A9 c.98T>C*.

Prevalencija TC u nositelja varijantnoga <i>ABCG2</i> alela	Prevalencija TC u <i>ABCG2</i> homozigota divljega tipa	Učinak varijantnoga <i>UGT1A9 c.98</i> alela (ROM ili GMR)	Korigirani učinak varijantnoga <i>ABCG2 c.421</i> alela (GMR)
<b>GMR koji treba korigirati za nemjereni <i>confounding</i> =1,40</b>			
6 %	2 %	1,10	1,40
5 %	1 %	1,10	1,40
10 %	2 %	1,10	1,39
6 %	2 %	1,50	1,37
5 %	1 %	1,50	1,37
10 %	2 %	1,50	1,35
<b>GMR koji treba korigirati za nemjereni <i>confounding</i> =1,31</b>			
6 %	2 %	1,10	1,31
5 %	1 %	1,10	1,31
10 %	2 %	1,10	1,30
6 %	2 %	1,50	1,29
5 %	1 %	1,50	1,28
10 %	2 %	1,50	1,26

Prevalencija TC genotipa procijenjena je na 3,9 % (slika 22.). Prikazani su korigirani učinci *ABCG2 c.421* varijantnoga alela uz pretpostavku izrazite neravnoteže u prevalenciji *UGT1A9 c.98* TC genotipa između nositelja varijantnoga *ABCG2 c.421* alela i kontrola, te uz pretpostavku učinka *UGT1A9* TC genotipa od ROM/GMR=1,10 (slika 21.) ili 1,50 (75). Učinak *ABCG2 c.421* varijantnoga alela koji se *korigira* iznosi GMR=1,40 (kako je procijenjeno u glavnoj analizi, tablica 17.), ili GMR=1,31 – ako je prvo korigiran za nemjereni učinak TT/TG genotipa u polimorfizmu *SLCO1B3 c.334T>G* uz pretpostavku velike neravnoteže u prevalenciji toga genotipa između *ABCG2* varijantnih bolesnika i kontrola divljega tipa (50 % vs. 20 %) i učinak TT/TG genotipa od ROM=1,25 (tablica 18.).

#### 4.4. Dometi interakcija varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela s kalcineurinskim inhibitorima

Bolesnici nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* na terapiji TAC-om (ne CsA-om) u odnosu na nositelje divljega alela imaju višu AUC<sub>τ,ss</sub> (skoro 2 puta), manji klirens CL<sub>T/F,ss</sub> (za 40-50 %) i omjer C<sub>max</sub>/AUC (za oko 35 %) prije (slika 23. A) i nakon postupka *matchinga* (slika 23. B). Prisutnost varijantnoga alela nije utjecala na C<sub>max</sub> što je u skladu sa smanjenim omjerom

$C_{max}/AUC$ . To ukazuje na smanjenje brzine apsorpcije. Visok iznos E-vrijednosti (E-vrijednost 8,14) je potreban kako bi u potpunosti objasnio izmjereni učinak varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* na  $AUC_{t,ss}$  bolesnika na TAC-u ili kako bi *gurnuo* donji interval pouzdanosti na  $GMR=1,0$  (E-vrijednost 3,27). Učinak remetilacijskih faktora bi trebao biti jako visok kako bi *gurnuo* opaženi učinak do razine nema učinka tj. do zaključka kako ono što je izmjereno pripada nemjerenim remetilacijskim faktorima, a ne tretmanu koji je evaluiran. Rezultati studije ukazuju da je bioraspoloživost MPA-a pod utjecajem polimorfizma *ABCG2 c.421C>A*, a dodatno se čini da je učinak varijantnoga alela znatno izraženiji (dva puta veća bioraspoloživost) u skupini bolesnika na terapiji TAC-om, a slab je ili ga uopće nema u bolesnika na terapiji CsA-om (slika 23.). Čini se da procjene nisu podložne pogreškama (komorbiditeti, drugi lijekovi, demografski, genetski i biofarmaceutski čimbenici su kontrolirani uključenim kriterijima i optimalnim/egzaktnim *matchingom*) i otporne su na nemjerene remetilacijske faktore (visoke E-vrijednosti), ali su dosta zahtjevne za interpretaciju osobito jer:

i) TAC i CsA *in vitro* inhibiraju ABCG2 (203);

ii) nije poznato je li MPA supstrat ABCG2;

iii) uočena interakcija genotipa i vrste CNI-a implicira da je od ranije poznati učinak CsA-a na smanjenje bioraspoloživosti MPA-a daleko izraženiji kod nositelja varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* nego kod kontrola divljeg tipa (vidljivo iz geometrijskih sredina na slici 23.) (11, 13, 14, 22, 211).

Međutim, ipak se mogu donijeti određeni razumni zaključci koji se zasnivaju na nekoliko objavljenih zapažanja i nekoliko pretpostavki:

(i) *in vitro* CNI i sirolimus podjednako snažno inhibiraju ABCG2 međutim još uvijek nije razjašnjen potencijal njihove inhibicije (203). U jednoj studiji (204), najizraženiji inhibični učinak CsA-a na prijenosnik ABCG2 je uočen kod staničnih linija koje imaju manji broj prijenosnika, a slabiji učinak kod stanica s većom ekspresijom prijenosnika;

ii) polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* smanjuje aktivnost proteina za oko 50-70 % smanjenjem broja aktivnih prijenosnika (222, 223);

iii) smanjenje bioraspoloživosti MPA-a djelovanjem CsA-a pripisuje se inhibiciji ABCC2 CsA-om i zaustavljanju enterohepatičkoga recikliranja MPA-a (koja nadilazi moguću inhibiciju ABCB1 u crijevima) (211);

iv) studija kod japanskih bolesnika sugerira da je MPAG supstrat ABCG2 i da je ABCG2 važan za izlučivanje MPAG-a u žuč (119)

v) učinak CsA-a na smanjenje biorasploživost MPA-a je skroman (11, 13, 14, 22, 211).

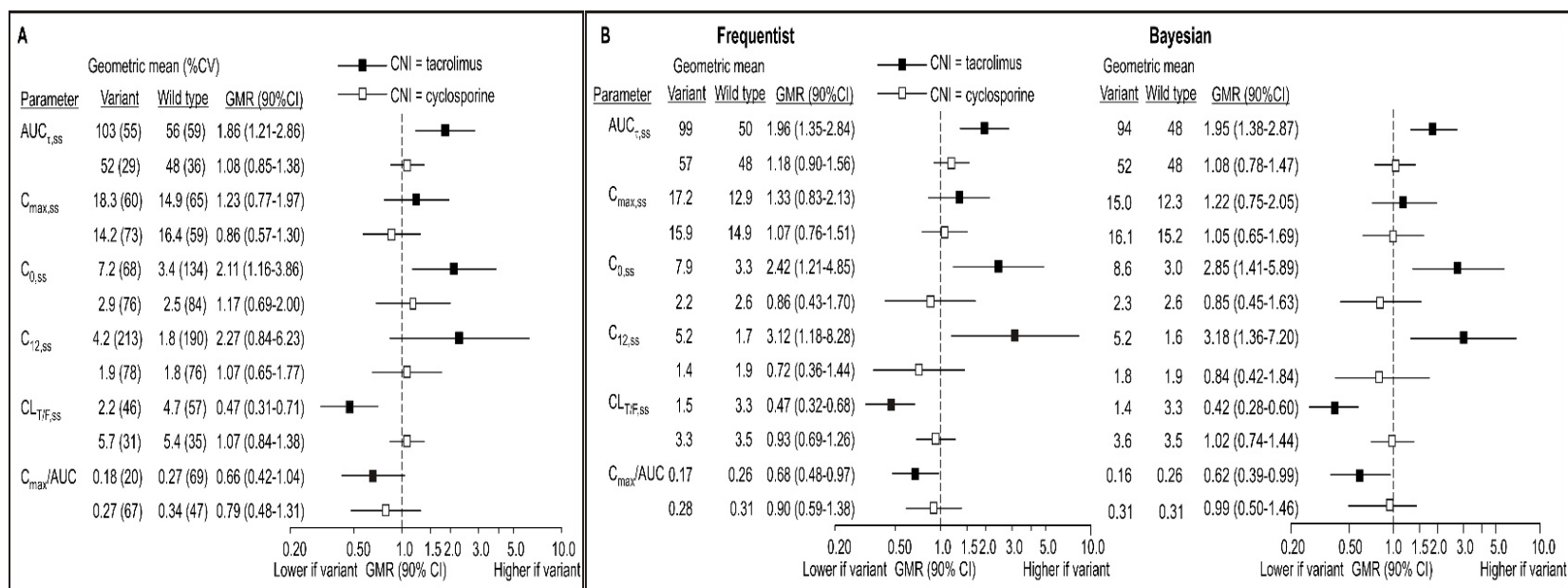
U ovim *grubim* neobrađenim podacima, ukupna razlika  $AUC_{\tau,ss}$  između bolesnika na CsA-u (n=43) i TAC-u (n=25) iznosi  $GMR=0,75$  (95 % CI 0,58-0,98), kod nositelja varijantnih alela *c.421C>A* (n=6 CsA; n=6 TAC)  $GMR=0,50$  (0,29-0,87), a kod kontrola wt-a  $GMR=0,86$  (0,65-1,14) (n=37 CsA vs. n=19 TAC).

Moguće je pretpostaviti da nije samo MPAG u jetri (119) supstrat ABCG2 (hepatobilijarni prijenos) već da bi MPAG i MPA koji se nalaze i u crijevima mogli biti supstrati ABCG2. U takvom scenariju, bilo bi razumno pretpostaviti da je učinak CsA-a (u odnosu na TAC) na smanjenje biorasploživost MPA-a rezultat:

i) snažnoga učinka CsA-a kod nositelja varijantnoga alela *c.421C>A* (u skladu s izraženijim inhibitorynim učinkom CsA na ABCG2 pri smanjenom broju prijenosnika *in vitro*) kod kojih smanjena aktivnost ABCG2 (varijantni aleli + CsA) i ABCC2 (CsA) zajedno pridonose smanjenoj recirkulaciji MPAG-a/MPA-a (smanjena biorasploživost MPA-a) do te mjere koja nadilazi učinak varijantnoga alela i CsA na ABCG2 u crijevima (što bi pogodovalo većoj biorasploživosti),

ii) slabijeg učinka CsA-a (u odnosu na TAC) na inhibiciju ABCC2 kod kontrola divljega tipa gena *ABCG2* kod kojih CsA i TAC podjednako inhibiraju ABCG2. Ovaj scenarij pruža mogućnost za hipotetsko objašnjenje uočenih razlika između bolesnika nositelja varijantnoga alela *c.421C>A* u odnosu na nositelje divljega tipa gena koji su na terapiji TAC-om, ali ne i kod bolesnika koji su na terapiji CsA-om. Kod bolesnika na terapiji TAC-om (pretpostavljena) inhibicija ABCG2 TAC-om u crijevima utjecala bi na povećanje biorasploživosti MPA, dok bi inhibicija u jetri pogodovala smanjenju biorasploživosti, ali funkcija ABCC2 u jetri se ne bi mijenjala jer TAC ne bi utjecao na nju. Stoga se može zaključiti da smanjena aktivnost ABCG2 (zbog varijantnih alela *421C>A*) ima izraženiji učinak u crijevima nego u jetri. Budući da je omjer ekstrakcije MPA-a iz jetre prilično visok (0,3-0,7) (226) brzina ulaska MPA u sistemsku cirkulaciju (apsorpcija) sporija je u odnosu na kontrole wt-a (niži omjer  $C_{max}/AUC$ ), ali i klirens je također smanjen što rezultira povećanom ukupnom izloženošću MPA-u. Takav profil prikazan je na slici 24., gdje su prikazane koncentracije MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže u intervalu doziranja kod bolesnika liječenih TAC-om (lijevi prikaz) i CsA-om (desni prikaz). Kod primjene CsA-a, zbog toga što CsA inhibira ABCC2 (jetra) i ABCG2 (vjerojatno

crijeva; jetra), učinak varijantnoga alela *ABCG2* na izloženost MPA-u (smanjenja aktivnost *ABCG2*) u crijevima mogao bi se izjednačiti s učincima koji uzrokuju smanjenje biorasploživosti u jetri (polimorfizam *ABCG2* u proturavnoteži s inhibicijom *ABCC2* CsA-om) i profili MPA koncentracija - vrijeme nositelja varijantnih alela i kontrola divljega tipa liječenih CsA-om bi se preklapali (slika 24.).

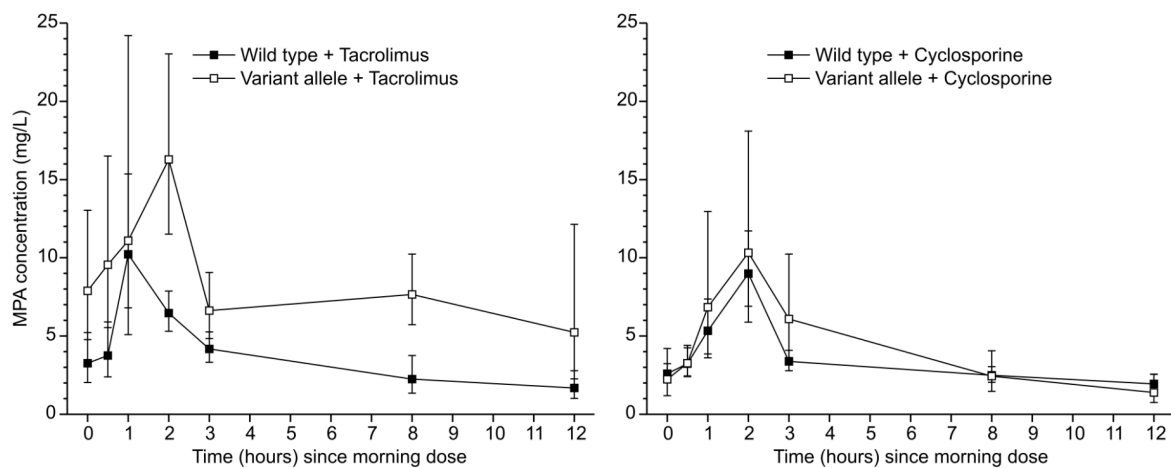


**Slika 23.** Učinak varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela na bioraspodjelivost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže kod bolesnika s transplantiranim bubregom čini se da ovisi o vrsti CNI-a – zabilježen kod bolesnika na terapiji TAC-om, a ne CsA-om.

**A:** analiza provedena prije *matchinga*: logaritamski transformirani farmakokinetički parametri prikazani su prema genotipu (varijantni aleli u odnosu na kontrole divljega tipa) kao geometrijske sredine, (% CV), a jednostavne razlike između varijantnih alela i kontrola divljega tipa izračunate su s 90 % CI (izražene kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti). 6 bolesnika na terapiji TAC-om nositelji su varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela, a 19 bolesnika nositelji su divljega tipa alela; 6 bolesnika na terapiji CsA-om nositelji su varijantnoga *ABCG2 c.421C>A* alela, a 37 bolesnika nositelji su divljega tipa alela.

**B:** procijenjene geometrijske sredine dobivene su iz modela u tablici 16.uz dodatak varijable za interakciju (engl. *interaction term*) između genotipa (varijantni aleli ili divlji tip) i CNI-a (TAC ili CsA) - razlike između varijantnih alela i divljih alela određene su za bolesnike na terapiji TAC-om i na terapiji CsA-om.





**Slika 24.** Profili MPA koncentracija - vrijeme nositelja varijantnih alela i kontrola liječenih CsA-om i TAC-om

## 5. RASPRAVA

U današnje se doba sve veći značaj pridaje personaliziranoj medicini odnosno individualnom pristupu liječenja pojedinoga bolesnika. Primjena farmakogenetičkoga testiranja i preporuka iz objavljenih smjernica, može poboljšati učinkovitost liječenja i smanjiti toksičnost imunosupresivnih lijekova te produljiti preživljenje presatka kod transplantiranih bolesnika. Glavni cilj kliničkih studija jest procjena utjecaja farmakogena metaboličkih enzima i prijenosnika na farmakokinetiku ispitivanih lijekova, poglavito na njihovu sistemsku raspoloživost koja je važan čimbenik učinkovitosti i sigurnosti primjene lijekova.

Cilj prezentiranoga istraživanja bio je potvrditi važnost genotipizacije bolesnika na imunosupresivnoj terapiji te dodatno istražiti interakciju imunosupresivnih lijekova i farmakogena koji kodiraju enzime i prijenosnike uključene u njihov metabolizam. Niz „klasičnih“ čimbenika kao što su dob, indeks tjelesne mase, funkcija bubrega i jetre, promjena crijevne mikrobiote, smanjenje razine albumina, interakcije s hranom, interakcije lijek-lijek na različitim razinama (osobito s CNI-om, ali i s drugim lijekovima) te formulacija MPA-a (MMF ili EC-MPS) utječu na bioraspoloživost MPA-a u organizmu (11, 13, 14, 22, 211). Budući da terapijski i neželjeni učinci MPA-a ovise o njoj koncentraciji, značajna intra- i interindividualna varijabilnost farmakokinetike MPA-a privukla je veliku pozornost kliničara te je opsežno analizirana u objavljenim literaturnim referencama (11, 13, 14, 22, 211). Svjesnost o potencijalu MPA-a za personalizirano doziranje rezultirala je razvojem metoda za procjenu AUC-a na temelju mjerenja koncentracije lijeka u samo nekoliko uzoraka krvi (TDM). Važnost TDM-a proizlazi iz činjenice mogućnosti provođenja u kliničkoj rutini, a pokazao se uspješnim i u smislu korelacije s ishodom liječenja (211).

U prezentiranom radu analizirana je povezanost genske varijabilnosti metaboličkoga enzima UGT1A9 i membranskog prijenosnika ABCG2 s bioraspoloživosti MPA-a te povezanost genske varijabilnosti metaboličkih enzima CYP3A4 i CYP3A5 s koncentracijama CsA-a i TAC-a. Dodatno su procijenjeni dometi interakcije MPA-a s CsA-om i TAC-om u odnosu na ispitane varijante gena *ABCG2* u bolesnika s transplantiranim bubregom.

Najznačajniji je nalaz prezentirane studije statistički značajna povezanost varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) i farmakokinetike MPA-a. Kod stabilnih bolesnika s transplantiranim bubregom koji su ujedno i nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A*, dobiveni rezultati ukazuju na povećanu MPA  $AUC_{\tau,ss}$  (oko 40 %) u skladu s proporcionalno smanjenim klirensom  $CL_{T/F,ss}$ . Dodatno je uočena značajna uloga polimorfizma *ABCG2 c.421*

$C>A$  u moduliranju interakcije CsA-a i TAC-a s MPA-a budući da rezultati upućuju na još jedan zaključak o znatno izraženijem učinku varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* u skupini bolesnika na terapiji TAC-om kod kojih je u stanju dinamičke ravnoteže zabilježena dva puta veća bioraspoloživost MPA, manji klirens i manja brzina apsorpcije u odnosu na skupinu bolesnika na terapiji CsA-om.

Rezultati istraživanja provedeni u okviru ovoga doktorskog rada nisu pokazali značajan utjecaj ispitivanih polimorfizama metaboličkog enzima UGT1A9 na koncentracije MPA-a. Također nije zabilježen ni značajan utjecaj polimorfizama enzima CYP3A4 i CYP3A5 na koncentracije CsA-a i TAC-a. Ograničavajući čimbenik ovog istraživanja jest mali broj nositelja varijantnih alela gena *UGT1A9 -275T>A* i *-2152C>T*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*1* koji nije omogućio relevantnu statističku analizu. Stoga će u diskusiji zbog opsežnosti podataka fokus biti na rezultatima za koje je ustanovljena statistički značajna povezanost, odnosno utjecaj polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* na farmakokinetiku MPA.

### ***Utjecaj genskog polimorfizama transportera ABCG2***

Danas je sve više poznat mehanizam modeliranja farmakokinetike lijekova i mehanizam stupanja u interakcije pa su posljednjih godina i membranski prijenosnici postali fokus interesa kliničkih studija kao važni sudionici procesa distribucije lijekova. *International Transporter Consortium* je u svojoj smjernici istaknuo farmakogene prijenosnika BCRP (*ABCG2 c.421 C>A*) i OATP1B1 (*SLO1B1 c.521T>C*) kao važne gene za koje postoji dosta kliničkih dokaza o utjecaju na farmakokinetiku i farmakodinamiku brojnih lijekova različitih terapijskih skupina (107). Regulatorne agencije EMA i FDA, su također izdale preporuke o utvrđivanju interakcijskoga potencijala novoga lijeka u razvoju i prijenosnika ABCG2 (109, 110).

Iako rezultati objavljenih literaturnih studija ne ukazuju na jaku povezanost polimorfizma gena *ABCG2 c.421 C>A* s koncentracijom MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže, istraživanje provedeno u sklopu ove doktorske studije upućuje na međudjelovanje navedenoga polimorfizma i bioraspoloživosti MPA-a. Do sada provedene studije nisu uspjele dokazati povezanost ovoga polimorfizma i bioraspoloživosti MPA-a (u obliku  $AUC_{\tau}$  i ostatnih koncentracija) (11). U literaturi je objavljena samo jedna studija na japanskim bolesnicima na komedikaciji TAC-om i MMF-om čiji rezultati ukazuju na povezanost varijantnoga alela *ABCG2 c.421 C>A* s većom bioraspoloživosti MPAG-a te smanjenim hepatobilijarnim prijenosom MPAG-a (119). Nedostatak dokaza o utjecaju varijantnoga alela *ABCG2 c.421 C>A* na metabolizam imunosupresivnih lijekova je najvjerojatnije povezan s relativno malom

učestalosti varijantnoga alela u bjelačkoj populaciji. Međutim, iako je učestalost u bjelačkoj populaciji manja, rezultati nekoliko studija provedenih u hrvatskoj populaciji ukazali su na važnost provođenja genotipizacije *ABCG2 c.421 C>A* jer je u ovim studijama ustanovljena povezanost varijantnoga alela A s moduliranjem farmakokinetike lamotrigina i valproata (115) te s toksičnosti atorvastatina (113). Slijedom navedenoga, može se zaključiti da ipak postoje klinički dokazi koji indiciraju da su polimorfizmi gena *ABCG2* značajni za učinkovitost i sigurnost primjene lijekova.

Ispitanici u ovoj doktorskoj studiji bili su na terapiji MPA-om, CsA-om ili TAC-om te su međusobno uspoređeni prema vrsti i ostatnim koncentracijama CNI-a. Prema objavljenim literaturnim referencijama CsA i TAC nisu supstrati *ABCG2*, ali su (*in vitro*) oba inhibitori *ABCG2* (203) s tim da je u većini studija inhibicijski učinak CsA-a izraženiji u prisustvu manjega broja transportera odnosno smanjene aktivnosti transportera (32, 204). Trenutno, u dostupnim literaturnim referencama, *ABCG2* se nije razmatrao u kontekstu utjecaja na farmakokinetiku MPA-a (ili MPAG-a) (22) i ne postoji eksplicitan dokaz da su MPA ili MPAG supstrati *ABCG2*, ali isto tako ne postoji niti eksplicitan dokaz da nisu (227). S obzirom na kontradiktorne rezultate objavljenih studija u kojima još nije potvrđeno jesu li MPAG ili MPA supstrati *ABCG2*, jesu li CsA i/ili TAC inhibitori *ABCG2* te događa li se interakcija MPA/MPAG-a s CNI-om u crijevima ili jetrima, rezultati ove doktorske studije koji ukazuju na dvostruko veću bioraspoloživost MPA-a u skupini bolesnika na TAC-u ipak upućuju na moguću ulogu varijantnih alela *ABCG2* u nastanku interakcije MPA-a s CNI-om. Na temelju dobivenih rezultata u ovoj doktorskoj studiji i hipotetskih scenarija koji su ranije obrazloženi, može se pretpostaviti da nije samo MPAG u jetri (119), već da su MPAG i MPA u crijevima također supstrati *ABCG2*. Stoga uzimajući u obzir veću bioraspoloživost MPA-a u skupini bolesnika s varijantnim alelima *ABCG2* i na terapiji TAC-om, može se pretpostaviti značajniji utjecaj varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* u skupini bolesnika na terapiji TAC-om, u odnosu na utjecaj varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* koji je slabiji ili ga uopće nema u skupini bolesnika na terapiji CsA-om. Povećana bioraspoloživost MPA-a u bolesnika nositelja varijantnih alela *ABCG2 c.421 C>A* i na terapiji TAC-om rezultat je moguće inhibicije prijenosnika *ABCG2* TAC-om u crijevima iz razloga što bi inhibicija *ABCG2* u jetri rezultirala smanjenjem bioraspoloživosti MPA-a. Rezultati ove doktorske studije impliciraju da prisutnost varijantnoga alela gena *ABCG2* ima izraženiji učinak u crijevima nego u jetri. Studija na japanskim bolesnicima (119) bilježi veće koncentracije MPAG-a u stanju dinamičke ravnoteže kod 44 nositelja polimorfizma *c.421C>A* u odnosu na 36 nositelja divljega alela što svakako

podupire činjenicu da je prijenosnik ABCG2 uključen u recirkulaciju MPAG-a. Nalaz studije na japanskim bolesnicima je u suprotnosti s nalazom studije na transplantiranim kineskim bolesnicima (n=37) na komedikaciji MMF-om, CsA-om i prednizonom koja bilježi nešto više vrijednosti MPA  $AUC_{\tau,ss}$  u 17 nositelja varijantnoga alela ABCG2 (CA+AA) u odnosu na 20 nositelja divljega tipa alela ( $30,9 \pm 13,0$  vs.  $27,7 \pm 10,7$  mg/L/h), međutim nije dokazala statistički značajnu povezanost s bioraspoloživosti MPA-a vjerojatno zbog maloga broja nositelja varijantnih alela kod zdravih dobrovoljaca (n=1) i transplantiranih bolesnika (n=2) (120). Dobiveni rezultati u okviru ovoga doktorskog rada su u suprotnosti i s nalazima studija na kineskim (n=408) i brazilskim primateljima bubrežnoga presatka (n=97) (228) koje nisu dokazale povezanost polimorfizma ABCG2 c.421C>A i koncentracije MPA-a. Međutim treba naglasiti da su u tim studijama provedena mjerenja samo ostatnih koncentracija MPA-a za razliku od istraživanja provedenih u okviru ovoga doktorskog rada u kojem je prikazan MPA  $AUC_{\tau,ss}$  koja je bolja mjera bioraspoloživosti MPA-a (229). U najnovijoj farmakokinetičkoj populacijskoj studiji na 24 transplantirana bolesnika na terapiji MMF-om, isključivo TAC-om i kortikosteroidima, prikazan je profil koncentracije MPA-a tijekom 12 sati u razdoblju od mjesec dana nakon transplantacije. Dodatno je analizirano 800 uzoraka krvi 167 bolesnika (od 7.-og dana do 10 godina nakon transplantacije) kako bi se izradio farmakokinetički populacijski model. Niti za jedan od 29 ispitanih polimorfizama ABCG2 c.421C>A, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, ABCB1, ABCC2, SLCO1B1 i SLCO1B3 nije nađena povezanost s bioraspoloživosti MPA-a (230).

Neslaganja između rezultata ovoga doktorskog istraživanja i rezultata ranijih studija (120, 228-231), koje ne otkrivaju povezanost varijantnoga alela ABCG2 c.421C>A s izloženosti MPA-u, mogla bi se barem djelomično objasniti razlikama u metodologiji studija. Teško je izravno usporediti rezultate opservacijskih studija koje se razlikuju u dizajnu, ispitivanim populacijama, veličini uzorka, ishodima i primijenjenim metodama kontrole nemjerenih *confoundera*.

Postavke ovog doktorskog istraživanja bile su prikladne za detekciju učinka polimorfizma ABCG2 c.421C>A kod bolesnika s transplantiranim bubregom zbog sljedećih činjenica:

- i) kriterijima uključivanja kontroliran je niz čimbenika mogućih komorbiditeta i tretmana za koje je poznato da potencijalno mogu interferirati s farmakokinetikom MPA-a (11, 13, 14, 22, 211) čiji bi utjecaj na farmakokinetiku MPA-a inače bilo nemoguće objasniti;

- ii) kovarijate (demografske, biofarmaceutske, ostali polimorfizmi enzima/transportera) korištene u postupku *matchinga* odabrane su na temelju prethodnih saznanja i biološke vjerodostojnosti, a ne na temelju kriterija *statističke značajnosti*. Budući da se ne čini biološki vjerojatnim da je na bilo koju od ovih varijabli utjecao *tretman* (polimorfizam od interesa) ili ishod (bioraspoloživost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže) ili istovremeno *tretman* i neki nemjereni remetilajući *confounder*, čini se vrlo malo vjerojatnim da su postavke studije temeljene na ovim kovarijatama uzrokovale pojavu sustavne pogreške (npr. *collider bias*, *selection bias*) (201).

Razmatrajući farmakogenetske čimbenike koji mogu utjecati na farmakokinetiku MPA-a, u svrhu procjene učinka varijantnoga alela *ABCG2 c.421 C>A* na bioraspoloživost MPA-u u okviru ovoga doktorskog istraživanja genotipizirani su polimorfizmi transportera *ABCC2 -24 C>T*, *1249 G>A* (primatelj i donor); *SLCO1B1 c.521 T>C*; *ABCB1 2677 G>T (A)*, *3435 C>T*, *1236 C>T* i polimorfizmi enzima *UGT2B7 -161 C>T*; *UGT1A9 -275 T>A*, *-2152 C>T*. Genotipizacijom ovih polimorfizama postignuta je potpuna kontrola njihovih učinaka odnosno blokiran je njihov učinak na tretman (aktivnost *ABCG2*) ili ishod (bioraspoloživost MPA-a). Djelomično kontrolirani učinci su aktivnosti transportera *ABCC2*, *OATP1B1*, *OATP1B3* i *ABCB1* te enzima *UGT2B7* i *UGT1A9*, međutim potpunom kontrolom njihovih polimorfizama, dobi, komedikacije, koncentracije CNI-a i komorbiditeta koji mogu utjecati na njihovu aktivnost, kontrolira se aktivnost transportera/enzima odnosno njihov utjecaj na tretman ili ishod, dok dio koji nije pod kontrolom uključuje ostale (poznate ili nepoznate) polimorfizme navedenih enzima i transportera. Farmakogenetski učinci koji nisu kontrolirani u ovoj doktorskoj studiji ostali su (hipotetski) polimorfizmi transportera *ABCG2* za koje je *in vitro* zabilježeno da uzrokuju smanjenu aktivnost transportera. Pregledom literaturnih podataka, može se zaključiti da smanjenje aktivnosti transportera *ABCG2* može biti posljedica prisutnosti i drugih polimorfizama, poput rs34783571, rs192169062 i rs34264773, dok za tri polimorfizma rs2231137, rs72552713 i rs140207606, nije dokazan utjecaj na aktivnost, a za preostale polimorfizme *ABCG2* nije poznato imaju li ikakav utjecaj na aktivnost prijenosnika *ABCG2* (103). Procjena globalne kumulativne prevalencije alela manje učestalosti svih SNP-ova gena *ABCG2* koji utječu na smanjene aktivnosti je 0,68 %, a ukupno za SNP-ove nepoznate i smanjene aktivnosti je 1,3 % (103). Navedene prevalencije navode na zaključak da bi se moglo očekivati da će najviše jedan od uključenih bolesnika u ispitivanoj skupini nositi neki od navedenih SNP-ova te je stoga vrlo malo izgledno da bi ovi dodatni SNP-ovi gena *ABCG2*, koji također smanjuju aktivnost prijenosnika, mogli biti značajni za procjenu utjecaja polimorfizma

*ABCG2 c.421C>A* na farmakokinetiku MPA-a u ovom doktorskom istraživanju. Svi ostali (hipotetski) polimorfizmi gena *ABCG2*, *ABCB1* i *ABCC3* koji nisu genotipizirani u opisanoj studiji, morali bi imati snažne i sinergističke učinke da bi mogli utjecati na dobivene rezultate (bioraspoloživost MPA-a), što nije vjerojatan scenarij jer sudeći prema nedavno objavljenom preglednom članku (232) većina njih nije pokazala relevantan utjecaj na farmakokinetiku lijekova. Utjecaj na farmakokinetiku MPA-a zabilježen je samo kod nositelja polimorfizma *ABCC2 1249 G>A* i *24C>T* koji je genotipiziran i u ovoj studiji, dok druge objavljene studije nisu uspjele dokazati povezanost izloženosti MPA-a i drugih polimorfizama gena *ABCC2* (rs3740066, rs8187710, rs1885301, rs7910642, rs113646094, rs8187694, rs17222723, rs3740066, rs2804402) i *ABCC3* (rs4793665, rs2277624) (11, 211, 232).

MPA je supstrat i prijenosnika *ABCB1* koji utječe na apsorpciju MPA-a u crijevima (233) te su u ovoj doktorskoj studiji genotipizirana tri polimorfizma gena *ABCB1 3435 C>T*, *1236 C >T*, *2677 G>T/A* (u snažnoj LD) koji u odnosu na druge polimorfizme gena *ABCB1* imaju najveću učestalost u bjelačkoj populaciji. Nije ustanovljena njihova povezanost s farmakokinetikom MPA-a. Prema rezultatima objavljenih studija provedenih na bolesnicima s transplantiranim bubregom također nije nađena povezanost haplotipa varijantnih alela gena *ABCB1* s bioraspoloživosti MPA-a, MPAG-a i Ac-MPAG-a (228, 136), neovisno o tome jesu li bolesnici na terapiji CsA-om ili TAC-om.

U okviru ovoga dokorskog istraživanja nije provedena jedino genotipizacija bolesnika za polimorfizme *SLCO1B3 c.334 T>G* i *UGT1A9\*3, c.98T>C* za koje postoje literaturni dokazi da utječu na farmakokinetiku MPA-a. Međutim, u obzir su uzeti i ovi polimorfizmi kako bi se eliminirao njihov potencijalni učinak na bioraspoloživost MPA-a te su u provedenoj meta-analizi obrađeni rezultati iz objavljenih studija u svrhu procjene utjecaja ovih polimorfizama na bioraspoloživost MPA-a. Za polimorfizam *SLCO1B3 c.334 T>G*, (LD s polimorfizmom *c.699 G>A*) *in vitro* je dokazana povezanost sa smanjenim prijenosom MPAG-a (ne MPA-a) u jetru (76). U literaturi su objavljene četiri studije važne za utjecaj polimorfizma *SLCO1B3 c.334 T>G* na farmakokinetiku MPA-a (76, 120, 121, 136) za koje je objedinjena procjena (za obje vrste CNI-a) provedena u ovom doktorskom istraživanju ukazala na veću izloženost MPA-u kod nositelja TT/TG alela u odnosu na nositelje varijantnoga alela GG, međutim procjena je dosta nesigurna zbog širokoga intervala predikcije.

Prisutnost polimorfizma *UGT1A9 c.98T>C*, prema studijama *in vitro*, uzrokuje smanjenje enzimske aktivnosti (17). Međutim, rezultati procjene utjecaja varijantnoga alela *UGT1A9\*3*

(*c.98T>C*) na bioraspoloživost MPA-a, nisu jednoznačni. Pregledom literature pronađene su tri studije (73, 75, 76) provedene na bolesnicima na terapiji MMF-om, CsA-om ili makrolaktamima koje bilježe nepodešene rezultate  $AUC_{\tau,ss}$  kod bolesnika nositelja varijantnih alela (heterozigoti TC) u odnosu na kontrole divljega tipa alela (homozigoti TT). Meta-analička objedinjena procjena rezultata provedena u okviru ove doktorske studije ne ukazuje na neku relevantnu razliku u bioraspoloživosti MPA između bolesnika nositelja divljega tipa alela u odnosu na bolesnike nositelje varijantnoga alela (blaga tendencija veće izloženosti oko 10 % kod TC bolesnika u odnosu na TT bolesnike).

Nastavno na navedeni mogući utjecaj polimorfizama *SLCO1B3 c.334 T>G* i *UGT1A9\*3* na bioraspoloživost MPA u ovoj doktorskoj studiji provedena je analiza osjetljivosti učinka varijantnoga alela *c.421C>A* (Tablica 18. i 19.) korigirana za nemjereni učinak navedenih polimorfizma. Analiza pokazuje da i u okolnostima izražene neravnoteže u prevalenciji genotipa TT/TG (*SLCO1B3*) i TC (*UGT1A9*) između nositelja varijantnih alela i alela divljega tipa *ABCG2 c.421C>A* te uz pretpostavku njihovoga maksimalnog učinka, korigirani učinak varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* bi i dalje bio veći od 1,25 tj. iznad gornje granice konvencionaloga kriterija ekvivalentne izloženosti. S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti da postoji vrlo mala vjerojatnost da je analiza procjene učinka varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* na bioraspoloživost MPA-a pod značajnim utjecajem pogreške zbog polimorfizama *SLCO1B3 c.334 T>G* i *UGT1A9 c.98T>C* iz sljedećih razloga: sve prijavljene vrijednosti AUC-a bile su grube i nepodešene; ne postoji biološki uvjerljiv razlog za očekivati tako veliku izraženu neravnotežu u prevalenciji dva genotipa između *ABCG2* varijantnih alela i alela wt; polimorfizam *UGT1A9 c.98T>C* je rijedak (razumno je u ovom uzorku očekivati 2-3 TC bolesnika), a populacijski farmakokinetički modeli kod francuskih (77) i kineskih bolesnika (230) nisu pronašli povezanost između ova dva polimorfizma i farmakokinetike MPA-a.

Od brojnih drugih polimorfizama enzima UGT (1A1, 1A7 i 1A8) (11, 211, 230) samo je za polimorfizam *UGT2B7 802 C>T* (77, 79) pokazana povezanost s farmakokinetikom MPA-a. Taj je polimorfizam kontroliran i u prikazanim rezultatima ovog dokorskog rada, s obzirom da je u potpunom LD-u s *UGT2B7 -161 C>T* koji je kod ispitanika genotipiziran.

U opservacijskim studijama, kao što je i ova doktorska studija, uzimanje u obzir svih poznatih i nepoznatih remetilacijskih čimbenika je nedostižan cilj. Međutim, sudeći prema GMR vrijednostima i uzimajući u obzir bolesnike na TAC-u, ovi hipotetski *nemjereni* čimbenici,



morali bi (kumulativno) imati izrazito značajan učinak na bioraspoloživost MPA-a kako bi se zapažanja iz provedenoga doktorskog istraživanja pripisala njima, a ne utjecaju polimorfizma *ABCG2 c.421C>A*. Nastavno na navedeno, opravdano je zaključiti da rezultati koji proizlaze iz ovoga istraživanja upućuju na značajnu povezanost varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* s izloženosti MPA-u u stanju dinamičke ravnoteže kod bolesnika s transplantiranim bubregom na terapiji TAC-om.

### ***Utjecaj genskih polimorfizama metaboličkog enzima UGT1A9***

UGT1A9 je glavni enzim odgovoran za metabolizam MPA-a u MPAG. Oko 50-70 % MPAG-a nastaje njegovim djelovanjem (14). Prema objavljenim literaturnim podacima najviše je istražen utjecaj polimorfizama *UGT1A9 c.-275T>A* i *c.-2152C>T* koji povećavaju ekspresiju enzima u jetri (72) što dovodi do pojačane glukuronidacije MPA-a u MPAG te posljedično smanjenom bioraspoloživosti i povećanim klirensom MPA-a (73, 76, 77, 11).

Rezultati analize provedeni u okviru doktorskoga istraživanja nisu mogli potvrditi značajnu korelaciju polimorfizama *UGT1A9 c.-275T>A* i *c.-2152C>T* s bioraspoloživosti MPA-a niti njihov utjecaj na domete interakcija CNI-a i MPA-a, zbog maloga broja uključenih ispitanika nositelja varijantnih alela 4,4 % (n=3). Slično je zabilježeno i u studiji na francuskim pedijatrijskim bolesnicima (učestalost 7,9 %,) (77) kod kojih je uočen smanjeni klirens MPA-a, međutim zbog maloga broja ispitanika nositelja varijantnog alela *-2152C>T* rezultati su nepouzdana.

U ispitivanoj skupini bolesnika, (n=68) varijantni aleli gena *UGT1A9* bili su vrlo sporadični, detektirano je 65 nositelja wt-a (diplotip) *UGT1A9 -275/-2152*, 3 nositelja varijantnoga alela TA i CT (učestalost 4,4 %), a nisu pronađeni varijantni homozigoti AA odnosno TT. Učestalost varijantnih alela bila je nedovoljna za provođenje daljnje analize. Nije bilo realno za očekivati da bi ove frekvencije pokazale statistički značajan utjecaj varijantnih alela *UGT1A9* na farmakokinetiku MPA što je u skladu i s učestalostima te rezultatima drugih studija koje su ispitivale povezanost ovih polimorfizama i farmakokinetike MPA-a.

### ***Utjecaj genskih polimorfizama metaboličkih enzima CYP3A***

CsA i TAC su lijekovi uske terapijske širine i značajne interindividulane farmakokinetičke varijabilnosti stoga je u kliničkoj praksi važno provođenje TDM-a određivanjem koncentracija prema kojima se prilagođava doziranje svakom pojedinačnom bolesniku (43). Dominantno se

metaboliziraju u crijevima i jetri enzimima CYP3A4 i CYP3A5 s tim da se CsA primarno metabolizira djelovanjem enzima CYP3A4 s limitirajućom ulogom enzima CYP3A5, što je u suprotnosti s metabolizmom TAC-a, koji se primarno metabolizira enzimom CYP3A5, a iz organizma se najvećim dijelom izlučuju putem žuči, fecesom (32).

Izražaj i aktivnost enzima CYP3A4 i CYP3A5 pokazuje izrazitu varijabilnost uzrokovanu genetičkom predispozicijom i/ili indukcijom odnosno inhibicijom enzima drugim lijekovima (62). Najviše istraženi jednonukleotidni polimorfizmi su *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3*.

U skupini bolesnika uključenih u analizu u okviru ove doktorske studije (n=68) veći je broj bolesnika bio na terapiji CsA-om (43 CsA vs. 25 TAC). Nije zabilježen značajan utjecaj polimorfizama *CYP3A4* i *CYP3A5* na metabolizam CsA-a i TAC-a budući da su varijantni aleli bili sporadični, odnosno učestalost varijantnoga alela je bila nedovoljna za provođenje analize koja bi rezultirala relevantnim zaključcima. Divlji tip gena *CYP3A4\*1/1* potvrđen je kod 67 bolesnika, varijantni alel *CYP3A4\*1/\*22* kod 1 bolesnika (učestalost 1,5 %), a nije nađen niti jedan homozigotni nositelj varijantnoga alela (*CYP3A4\*22/\*22*). Genotipizirano je 59 bolesnika nositelja *CYP3A5\*3/\*3* te 9 intermedijarnih metabolizatora, nositelja genotipa *CYP3A5\*1/\*3* (učestalost 13,2 %), a nije detektiran niti jedan ekspresor *CYP3A5\*1/1* što je u skladu s objavljenim manjim učestalostima divljega alela od 3-15 % u bjelačkoj populaciji (66).

Prema rezultatima objavljenih studija nositelji polimorfizma *CYP3A4\*22* imaju više ostatne koncentracije CsA-a i TAC-a (62, 64, 234), pri čemu je utjecaj polimorfizma *CYP3A4\*22* važniji za metabolizam CsA-a nego TAC-a (235). Nasuprot tome polimorfizmi gena *CYP3A5* su pokazali snažnu povezanost s metabolizmom TAC-a, poglavito polimorfizam *CYP3A5\*3* koji je glavni prediktor djelotvornosti primijenjene doze lijeka te glavni čimbenik varijabilnosti doziranja i oralnog klirensa TAC-a (142, 236). Bolesnici homozigotni nositelji varijantnoga alela *CYP3A5\*3* (*CYP3A5 non-ekspresori*) zbog smanjene aktivnosti enzima zahtijevaju manje doze TAC-a (oko 0,05 mg/kg) dok bolesnici nositelji alela *CYP3A5\*1* (ekspresori *CYP3A5*) zahtijevaju dvostruko veće doze TAC-a potrebnih za postizanje istih ostatnih koncentracija u stanju dinamičke ravnoteže koje imaju *CYP3A5 non-ekspresori* (141, 142, 151, 174). Značajna povezanost TAC-a i polimorfizma gena *CYP3A5* zabilježena u kliničkim ispitivanjima rezultirala je objavom CPIC smjernice koja prije početka terapije TAC-om predlaže genotipizaciju *CYP3A5* kako bi se liječenje započelo optimalnim terapijskim dozama (40).

Rezultati objavljenih studija ukazuju i na povezanost polimorfizma *CYP3A4\*1B* i *CYP3A4\*22* s bioraspoloživosti TAC-a. Nositelji polimorfizma *CYP3A4\*1B* (pojačana aktivnost) pokazuju 35 % niže ostatne koncentracije TAC-a u odnosu na nositelje divljega alela *CYP3A4\*1* (141)) dok nositelji polimorfizma *CYP3A4\*22* (smanjena aktivnost) trebaju za 33 % niže doze TAC-a da bi postigli iste koncentracije TAC-a kao i homozigoti divljega tipa (235). Rezultati jedne brazilske studije nisu potvrdili ove nalaze (237) dok je jedina provedena meta-analiza (uglavnom na bjelačkoj populaciji) potvrdila povezanost alela *CYP3A4\*1B* s koncentracijom TAC-a (237). Važna je činjenica i moguća neravnotežna povezanost alela *CYP3A4\*1B* s *CYP3A5\*1* koja dovodi do ubrzanoga klirensa TAC-a (235). S obzirom da je objavljen mali broj studija koje su razmatrale utjecaj ovoga haplotipa na ostatne koncentracije TAC-a teško je razlučiti pojedinačni doprinos svakog polimorfizma (62).

### ***Ograničenja provedene studije***

Provedeno doktorsko istraživanje ima nekoliko ograničenja. Veličina uzorka, odnosno broj ispitanika uključenih u studiju, te učestalost varijantnih alela *UGT1A9 c.-275T>A* i *c.-2152C>T*, *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*1* je bila nedostatna za relevantnu statističku analizu i potvrdu njihovog utjecaja na farmakokinetiku MPA-a. Stoga je vrlo detaljno opisana analiza i rezultati koji su smatrani značajnima za kliničku praksu o povezanosti polimorfizma transportera *ABCG2* s farmakokinetikom MPA-a.

Farmakokinetički podaci temelje se na mjerenju koncentracije MPA-a, bez metabolita MPAG-a iz razloga što je cilj studije bio procijeniti ukupni učinak polimorfizma, bez obzira je li izravan (MPA) ili neizravan (MPAG), stoga MPAG nije kvantificiran. Međutim, s druge strane u studiju su uključeni bolesnici koji su morali zadovoljiti uključne/isključne kriterije (multivarijantni model analize je uključio sve ispitivane polimorfizme i demografske podatke pacijenata osiguravajući kontrolu potencijalnih varijabli koje bi mogle utjecati na studiju). Studija se temelji na odgovarajućem vremenu uzorkovanja, analizi ostatnih koncentracija te na kontroli svih mogućih mjerenih i *nemjerenih confoundera* kako bi se isključili njihovi učinci na bioraspoloživost MPA-a i odredio samo značajan učinak varijantnoga alela *ABCG2* na bioraspoloživost MPA-a. Unatoč navedenim ograničenjima, analiza provedena na skupini bolesnika uključenih u doktorsko istraživanje, razumno podupire zaključak da se uočena razlika u  $AUC_{\tau,ss}$  između nositelja varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* i nositelja divljega gena može pripisati prisustvu varijantnoga alela A te da je barem teoretski pod ovim okolnostima moguće potvrditi povezanost bioraspoloživosti MPA-a i polimorfizma *ABCG2 c.421C>A*. Nastavno

na navedeno, rezultati istraživanja mogu se smatrati točnima i relevantnima te snažno impliciraju da prisutnost varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* povećava bioraspoloživost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže kod stabilnih bolesnika s transplantiranim bubregom na terapiji TAC-om uz proporcionalno smanjenje klirensa.

### ***Značaj za kliničku primjenu i preporuke za buduća istraživanja***

Genotipizacija (prije uzimanja terapije) gena za metaboličke enzime/prijenosnike u kombinaciji s TDM-om lijekova vrijedan je alat za identifikaciju visokorizičnih bolesnika kod kojih promjena režima doziranja prema nalazima genotipizacije može smanjiti pojavu nefrotoksičnosti i odbacivanja presatka. Što je više studija o povezanosti polimorfizama farmakogena s farmakokinetikom lijekova, to je više smjernica/preporuka (engl. *clinical annotations*) sadržano u bazi podataka mreže farmakogenetičkih društava, PharmaGKB, koje se mogu primjenjivati u kliničkoj praksi te za koje je određena „razina dokaza“ (engl. *level of evidence*) odnosno mjera koja govori o povezanosti polimorfizma i metabolizma lijeka, na temelju dobro definiranih dokaza u literaturi. Polimorfizmi uključeni u *clinical annotations* za koje postoje dokazi da su povezani s djelotvornosti i sigurnosti MPA-a su: *IMPDH2* (rs11706052), *ABCC2* (rs2273697, rs2740066, rs717620), *SLCO1B1* (rs2306283), *SLCO1B3* (rs4149117, rs7311358, rs4149117, rs7311358), *UGT1A9* (rs3832043).

Istraživanje provedeno u okviru ove doktorske studije ukazuje na važnost funkcije transportera *ABCG2* na farmakokinetiku MPA-a, međutim potrebne su daljnje studije kako bi se potvrdio ovaj nalaz i razjasnio temeljni mehanizam (mehanizmi) transporta MPA-a/MPAG-a posredovan prijenosnikom *ABCG2*. Dodatno, potrebno je provesti i veće kliničke studije s više uključenih nositelja varijantnoga alela kako bi se potvrdio doprinos farmakogenetičkoga testiranja polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* prije propisivanja MPA-a primijenjene u kombinaciji s CsA-om ili TAC-om. Isto tako, potreban je i značajno veći broj ispitanika da bi se mogao procijeniti utjecaj varijantnih alela *UGT1A9* na farmakokinetiku MPA-a te utjecaj polimorfizama *CYP3A4* i *CYP3A5* na interakcije MPA-a s CsA-om ili TAC-om.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizama gena za metaboličke enzime UGT1A9 -275T>A, -2152C>T i koncentracija MPA-a te na domete njihovih interakcija s CsA-om i TAC-om zbog nedovoljne zastupljenosti varijantnih alela u ispitivanoj populaciji.
2. Nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizama gena za metaboličke enzime CYP3A4 i CYP3A5 i koncentracija CsA-a i TAC-a te na domete njihovih interakcija s MPA-om zbog nedovoljne zastupljenosti varijantnih alela u ispitivanoj populaciji.
3. Glavni farmakokinetički nalaz ovog istraživanja ukazuje da prisutnost polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) kod bolesnika s transplantiranim bubregom povisuje bioraspoloživost MPA-a u stanju dinamičke ravnoteže uz proporcionalno smanjenje klirensa MPA-a.
4. Ispitivanje utjecaja interakcije varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* i CNI-a CsA-a ili TAC-a na bioraspoloživosti MPA-a (interakcija gen-lijek-lijek) upućuju na dvostruko povećanje bioraspoloživosti MPA-a kod bolesnika koji su nositelji varijantnoga alela i na terapiji TAC-om.
5. Konačno, rezultati upućuju na to da je farmakokinetika MPA-a kod bolesnika s transplantiranim bubregom pod značajnim utjecajem polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* te je uvjetovana i vrstom CNI-a koji se primjenjuju kao dio imunosupresivne terapije. Mehanizam inhibicije *ABCG2* nije potpuno jasan, stoga je navedeno međudjelovanje potrebno i dalje istraživati budući da ova povezanost može biti klinički značajna za odabir optimalne doze imunosupresivnih lijekova kod bolesnika s transplantiranim bubregom.
6. Rezultati mogu pridonijeti donošenju kliničkih smjernica za doziranje imunosupresivnih lijekova kod transplantiranih bolesnika koji nemaju zadovoljavajući odgovor na preporučene standardne doze, a što je često posljedica i istovremene primjene većega broja lijekova koji stupaju u interakcije i izazivaju neželjene nuspojave.

## 7. LITERATURA

1. Barbić J. Imunologija odbacivanja bubrežnog presatka. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž i suradnici, ur. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str.35-52.
2. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 1955;34 (2): 327-82.
3. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg forum* 1956;6:432-6.
4. Shampo MA, Kyle RA. Joseph E. Murray-Noble prize for organ transplantation. *Stamp Vignette on Medical Science* 2001;76(3):240.
5. Župan Ž. Živi darovatelji i presađivanje bubrega. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž i suradnici, ur. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 53-74.
6. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa Ly, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341:1725-30.
7. Muntean A, Lucan M. Immunosuppression in kidney transplantation. *Clujul Med* 2013; 86(3): 177-80.
8. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9 Suppl 3:S1-S157. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x
9. Yaseen H, Khan H. Immunosuppressive drugs. U: Rezaei N, ur. *Encyclopedia of infection and immunity* (first edition). Elsevier; 2022. str. 726-38.
10. Braue JA, Schadt CR, Zwerner JP. Mycophenolates. In: Wolverton SE, editor. *Comprehensive dermatologic drug therapy* (fourth edition). Elsevier, 2021: 178-86.
11. Dalla Vecchia Genvigir F, Cerda A, Dominguez Crespo Hirata T, Hirata MH, Dominguez Crespo Hirata R. Mycophenolic acid pharmacogenomics in kidney transplantation. *J Transl Genet Genom* 2020; 4:320-55.
12. Picard N, Marquet P. The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7(6):731-43.

13. Tett SE, Saint-Marcouy F, Staatz CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M, et al. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev* 2011; 25:45-57.
14. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46:13-58.
15. Fujiyama N, Miura M, Kato S, Sone T, Isobe M, Satoh S. Involvement of carboxylesterase 1 and 2 in the hydrolysis of mycophenolate mofetil. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 2210-17.
16. Allison Ac, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47:85-118
17. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004;32:775-8.
18. Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Wieland E. Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit* 2003; 25:1-16.
19. Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5 *Ther Drug Monit* 2004; 26:600-8.
20. Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, Perner F, Fabrizi V, Holzer H, et al. Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther Drug Monit* 2001; 23:69: 712-21.
21. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34(6):429-55.
22. Lamba V, Sanhavi K, Fish A, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway. *Pharmacogenet Genomics* 2014;24:73-9.
23. Budde K, Bauer S, Hambach P, Hahn U, Röblitz H, Mai I, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant* 2007; 7:888-98.

24. Salvadori M, Bertoni E, Budde K, Holzer H, Civati G, Lien B, et. al. Superior efficacy of enteric-coated mycophenolate vs mycophenolate mofetil in de novo transplant recipients: pooled analysis. *Transplant Proc* 2010;42:1325-28.
25. Cooper M, Salvadori M, Budde K, Oppenheimer F, Sollinger H, Zeier M. Enteric-coated mycophenolate sodium immunosuppression in renal transplant patients: efficacy and dosing. *Transplant Rev* 2012;26(4):233-40.
26. Czogalla A. Oral cyclosporine A-the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol Biol Lett* 2009;14:139-52.
27. Sažetak opisa svojstava lijeka Sandimmun Neoral 25 mg, 50 mg, 100 mg meke kapsule. Preuzeto s: [https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Sandimmun-Neoral-SPC\\_3.pdf](https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Sandimmun-Neoral-SPC_3.pdf) (pristupljeno 25. travnja 2023.)
28. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of Calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004; 36 (2S): 25S-32S.
29. Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without... *J Immunol* 2013;191: 5785-91.
30. Van Driest SL, Webber S. Personalizing pediatric heart transplantation. *Pharmacogenomics* 2015; 131 (5): 503-12.
31. Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K. Reduced inter and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from microemulsion formulation. *J Pharm Sci* 1994; 83(3): 444-6.
32. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:563-85.
33. Sažetak opisa svojstava lijeka Prograf kapsule 0,5 mg, 1 mg i 5 mg tvrde kapsule. Preuzeto s: <https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Prograf-SPC.pdf> (pristupljeno 25. travnja 2023.)
34. Provenzani A, Santeusano A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9156-73.
35. Tavira B, Diaz-Corte C, Coronel D, Ortega F, Coto E. Pharmacogenetics of tacrolimus: from bench to bedside?. *Nefrologia*, 2014: 34 (1):11-7.



36. Shrestha BM. Two decades of tacrolimus in renal transplant: Basic science and clinical evidences. *Experimental and Clinical Transplantation* 2017;15(1):1-9.
37. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:141-75.
38. Marfo K., Altshuler J, Lu A. Tacrolimus pharmacokinetic and pharmacogenomic differences between adults and pediatric solid organ transplant recipients. *Pharmaceutics* 2010;2(3):291-99.
39. Zhang X, Lin G, Tan L, Li J. Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: Pharmacogenetic consideration. *Biomed Pharmacother* 2018; 102:107-14.
40. 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 Ther* 2015.;98:19–24.
41. Knops N, Levtschenko E, van den Heuvel B, Kuypers D. From gut to kidney: Transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation. *Int J Pharma* 2013; 452: 14-35.
42. Ekberg H, Tedesc-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A. ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357 (25): 2562-75.
43. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation* 2009; 88(3):62-7.
44. Murray B, Hawes E, Lee RA, Watson R, Roederer MW. Genes and beans: pharmacogenomics of renal transplant. *Pharmacogenomics* 2013; 14 (7): 783-98.
45. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 345-47.
46. Daly AK. Pharmacogenetics: a general review on progress to date. *Br Med Bull* 2017; 24(1):65-79.
47. Božina N. Farmakogenomika i farmakovigilancija. *Medicus* 2017; 26(1):13-22.

48. Khodadadian A, Darzi S, Haghi-Daredeh S, Eshaghi FS, Babakhanzadeh E, Mirabutalebi SH, et. al. Genomics and Transcriptomics: The Powerful Tehnologies in Precision Medicine. *Int J Gen Med* 2020; 13:627-40.
49. European Medicines Agency. Guideline on good pharmacogenomic practice. EMA/CHMP/718998/2016 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 22 February 2018. Preuzeto s: [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 26.travnja 2023.)
50. US Food and drug administration. FDA. Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labelling. Preuzeto s: <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling> (pristupljeno 26.travnja 2023.)
51. The Pharmacogenomics Knowledgebase. PharmGKB. Preuzeto s: <https://www.pharmgkb.org/labelAnnotations>. (pristupljeno 26.travnja 2023.)
52. Božina N. Farmakogenomika-genski polimorfizam i primjena lijekova. U: Francetić I, Vitezic D. ur. Klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014: str. 247-74.
53. 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; 60:217-42.
54. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013; 138:103-41.
55. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carillo M, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med* 2017; 19: 215-23.
56. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005; 28:249-68.
57. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 2004;14(1): 1-18.

58. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 2008; 392(6):1093-108.
59. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S. Polymorphic cytochrome P450 Enzymes (CYPS) and their role in personalized therapy. *Plos one* 2013; 8(12): e82562.
60. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis* 2017; 21:1-20.
61. Zhang HF, Wang HH, Gao N, Wei JY, Tian X, Zhao Y, et al. Physiological content and intrinsic activities of 10 cytochrome P450 isoforms in human normal liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; 358(1):83-93.
62. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RHN. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* 2013; 14(1): 47-62.
63. Woillard JB, Mourad M, Neely M, Capron A, van Schaik RH, van Gelder T, et al. Tacrolimus updated guidelines through popPK modeling: how to benefit more from CYP3A pre-emptive genotyping prior to kidney transplantation. *Front Pharmacol* 2017; 8:358.
64. Elens L, Becker ML, Haufroid V, Hofman A, Visser LE, Uitterlinden AG, et al. CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin –mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(12):861-6.
65. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther* 2017; 32 (1):11-21.
66. Woillard JB, Chouchana L, Picard N, Lorient MA. Pharmacogenetics of immunosuppressants: state of art and clinical implementation-recommendations from the French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx). *Therapie* 2017; 72(2):285-99.
67. Egeland EJ, Robertsen I, Hermann M, Midtvedt K, Storset E, Gustavsen MT, et al. High tacrolimus clearance is risk factor for acute rejection in the early phase after renal transplantation. *Transplantation* 2017; 101(8): 273-79.

68. Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U. Božina N. ur. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 1-34.
69. Jančova P, Šiller M. Phase II Drug Metabolism. In. Paxton J, editor. Topics on Drug Metabolism. New York: InTech, 2012:35-60.
70. Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9 and 1A10. *Int J Pharm* 2009; 378 (1-2):140-1.
71. Olson KC, Dellinger RW, Zhong Q, Sun D, Amin S, Spratt TE, Lazarus P. Functional characterization of low-prevalence missense polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 1A9 gene. *Drug Metab Dispos* 2009; 37: 1999-2007.
72. Girard H, Court MH, Bernard O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, et al. Identification of common polymorphisms in the promoter of UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004; 14:501-15.
73. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. the impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78:351-61.
74. Hesselink DA, van Gelder T. Genetic and non-genetic determinants of between-patient variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78:317-321.
75. van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, et. al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:319-27.
76. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu X, 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; 87:100-8.

77. Zhao W, Fakhoury M, Deschenes G, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal- transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2010; 50:1280-91.
78. Kiang TKL, Partovi N, Shapiro RJ, Berman JM, Collier AC, Ensom MHH. Regression and genomic analyses on the association between dose-normalized mycophenolic acid exposure and absolute neutrophil count in steroid-free, de novo kidney transplant recipients. *Clin drug Investig* 2018; 38(11): 1011-22.
79. Baldelli S, Merlini S, Perico N, Nicastrì A, Cortinovis M, Gotti E, et al. C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 2007; 8:1127-41.
80. Xie XC, Li J, Wang HY, Li HL, Liu J, Fu Q, et al. Associations of UDP-glucuronosyltransferases polymorphisms with mycophenolate mofetil pharmacokinetics in Chinese renal transplant patients. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36:644-50.
81. Prausa SE, Fukuda T, Maseck D, Curtsinger KL, Liu C, Zhang K, et al. UGT genotype may contribute to adverse events following medication with mycophenolate mofetil in pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:495-500.
82. Varnell CD, Fukuda T, Kirby CL, Martin LJ, Warshaw BL, Patel HP, et al. Mycophenolate mofetil-related leukopenia in children and young adults following kidney transplantation: influence of genes and drugs. *Pediatr Transplant* 2017; 21 (7):e13033.
83. Yang JW, Lee PH, Hutchinson IV, Pravica V, Shah T, Min D. Genetic polymorphisms of MRP2 and UGT2B7 and gastrointestinal symptoms in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69:843-49.
84. Kagaya H, Inoue K, Miura M, Satoh S, Saito M, Tada H, et al. Influence of UGT1A8 and UGT2B7 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 279-88.
85. Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:139-46.

86. Xu C, Gao J, Zhang HF, Gao N, Guo Y, Fang Y, et al. Content and activities of UGT2B7 in human liver in vitro and predicted in vivo: a bottom-up approach. *Drug Metab Dispos* 2018; 46(9):1351-59.
87. Benedetti MS, Whomsley R, Poggesi I, Cawello W, Mathy FX, Delporte ML, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev* 2009; 41(3):344-90.
88. Schwenk MH, Barton Pai A. Drug transporter function-implications in CKD. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016; 23(2): 76-81.
89. Shugarts S, Benete LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res* 2009; 26(9): 2039-54.
90. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporter in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006; 112:457-73.
91. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001; 42: 1007–17.
92. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS:transport/absorption/elimination interplay and development of biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* 2005; 22(1):11-23.
93. de Lange ECM. Multidrug resistance P Glycoprotein and other Transporters. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress* (second edition). Amsterdam, Boston: Academic Press, 2007: 774-83.
94. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov* 2015;14 (1):29-44.
95. Božina T. Farmakogenetika prijenosnika lijekova. U: Božina N. ur. *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 1-34.
96. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70(2):189-99.
97. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Part 2: Pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist* 2011; 16(6):820-34.
98. Lai Y. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)/ABCB1. U: Lai Y. ur. *Transporters in drug discovery and development*. Woodhead Publishing Limited; 2013. str. 147-259.

99. Wei W, Bodles-Brakhop AM, Barger SW. A role of P-glycoprotein in clearance of Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide from the brain. *Curr Alzheimer Res* 2016; 3 (6): 615-20.
100. Sipe BE, Jones RJ, Bokhart GH. Rhabdomyolysis causing av blocade due to possible atorvastatin, esomeprazole and clarithromycin interaction. *Ann Pharmacother* 2003; 37 (6): 808-11.
101. Balayssac D, Authier N, Cayre A, Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? . *Toxicol Lett* 2005; 156:319-29.
102. Božina N, Ganoci L, Šimičević L, Gvozdanović K, Klarica Domjanović I, Fistrek Prlić M, Križ T, Borić Bilušić A, et al. Drug-drug-gene interactions as mediators of adverse drug reactions to diclofenac and statins: a case report and literature review. *Arh Hig Rada Toksikol* 2021; 71:114-28.
103. Fohner AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. PharmaKGB summary: very important pharmacogene information for ABCG2. *Pharmacogenet Genomics* 2017; 27(11):420-27.
104. Mo W, Zhang JT. Human ABCG2: structure, function and its role in multidrug resistance. *Int J Biocjem Mol Biol* 2012; 3 (1):1-27.
105. Calcagno AM, Ambudkar SV. The molecular mechanisms of drug resistance in single-step and multi-step drug-selected cancer cells. *Methods Mol Biol* 2010; 596:77-93.
106. Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR. Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance. *Mol Pharmacol* 2013; 84(5):655-69.
107. Giacomini KM, Balimane PV, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, et al. International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94(1): 23-6.
108. Chen L, Manautou JE, Rasmussen TP, Zhong X. Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2. *Acta Pharm Sin B* 2019; 9(4): 659-74.
109. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions, CPMP/EWP/560/95/Rev.1Corr.2\*\*, 2012.

110. US Food and Drug administration. Guidance for industry: drug interaction studies-study design, data analysis, implications for dosing and labelling recommendations 2017.
111. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, et al. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J* 2013; 15(3):629-45.
112. Mao Q, Unadkat J. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport-an update. *AAPS J* 2015; 17(1): 65-82.
113. Mirošević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Katanec Muačević D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics* 2015; 16(8): 803-15.
114. Cooper-DeHoff RM, Niemi M, Ramsey LB, Luzum JA, Tarkiainen EK, Straka RJ, et. al. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms. *Clin Pharmacol Ther* 2022;111(5):1007-21.
115. Klarica Domjanović I, Lovrić M, Trkulja V, Petelin-Gadže Ž, Ganoci L, Čajić I, et.al. Interaction between ABCG2 421 C>A polymorphism and valproate in their effects on steady-state disposition of lamotrigine in adults with epilepsy. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84(9): 2106-19.
116. Heyes N, Kapoor P, Kerr ID. Polymorphisms of the multidrug pump ABCG2: a systematic review of their effect on protein expression, function and drug pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* 2018; 46(12): 1886-99.
117. Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, et. al. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1739-42.
118. Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86:197-203.
119. Miura M, Kagaya H, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T, et. al. Influence on drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008; 30:559-64.



120. Geng F, Jiao Z, Dao YJ, Qiu XY, Ding JJ, Shi XJ, et al. The association of the UGT1A8, SLCO1B3 and ABCC2/ABCG2 genetic polymorphisms with the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide metabolite in Chinese individuals. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413: 683-90.
121. 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; 63:1161-9.
122. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006; 82 (8): 1074-84.123. Kalliokoski A, M Niemi. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 693-705.
124. Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Panetta JC, Cheng C, et al. Germline genetic variation in organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* 2009; 27:5972-78.
125. Minematsu T, Giacomini KM. Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol Cancer Ther* 2011; 10:531-9.
126. Garrison DA, Talebi Z, Eisenmann ED, Sparreboom A, Sharyn DB. Role of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions mediated by tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutics* 2020; 12 (9): 856.
127. Hussaarts KGAM, Veerman GDM, Jansman FGA, van Gelder T, Mathijssen RHJ, van Leeuwen RWF. Clinically relevant drug interactions with multikinase inhibitors: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2019; 11:1-34.
128. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80:565-81.
129. Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M. Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 2008; 9:19-33.
130. Niemi M, Leathart JB, Neuvonen M, Backman JT, Daly AK, et al. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77:468-78.

131. SEARCH Collaborative Group, Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genomewide study. *N Engl J Med* 2008; 359 (8):789-99.
132. Nakagomi-Hagihara R, Nakai D, Kawai K, Yoshigae Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T. OATP1B1, OATP1B3 and MRP2 are involved in hepatobiliary transport of olmesartan, a novel angiotensin II blocker. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(5):862-69.
133. Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor in humans. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(7):1247-54.
134. Treiber A, Schneider R, Hausler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interaction with cyclosporin A, rifampicin and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8):1400-7.
135. Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CDA, et al. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76(2): 167-77.
136. Boumar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, van der Heiden IP, de Fijter JW, et al. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLCO1B1 nor with ABCB1 in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22(6):399-407.
137. Michelon H, König J, Durrbach A, Quteineh L, Verstuyft V, Furlan V, et al. SLCO1B1 genetic polymorphism influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2010; 11:1703-13.
138. Liu K, Gu S, Liu X, Sun Q, Wang Y, Meng J, et al. Meta-analysis reveals a lack of association between MRP2 C-24T genetic polymorphism and the pharmacokinetics of mycophenolic acid in adult renal transplant recipients. *Meta Gene* 2017; 11: 91-7.
139. 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: 1129-40.
140. Salvadori M, Tsalouchos A. Pharmacogenetics of immunosuppressant drugs: A new aspect for individualized therapy. *World J Transplant* 2020;10(5): 90-103.

141. Hesselink DA, van Schaik RHN, van der Heiden IP, van der Werf M. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74(3):245-549.
142. Haufroid V, Mourad M, van Kerchove V, Wawrzyniak J, de Meyer M, Eddour DC, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14 (3): 147-54.
143. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DRJ. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2468-80.
144. Llaudo I, Colom H, Gimenez-Bonafe P, Torras J, Caldes A, Sarrias M, et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of pharmacogenomic substudy within symphony study. *Transpl Int* 2013; 26:177-86.
145. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Ansermot N, Fathi M, et al. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:307-15.
146. Singh R, Srivastava A, Kapoor R, Sharma RK, Mittal RD. Impact of CYP3A5 i CYP3A4 gene polymorphisms on dose requirement of calcineurin inhibitors, cyclosporine i tacrolimus, in renala allograft recipients of North India. *Naunyn Schiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380:169-77.
147. Zochowska D, Wyzgal J, Paczek L. Impact of CYP3A4\*1B and CYP3A5\*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann Transplant* 2012; 17:36-44.
148. Kotowski MJ, Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Tejchman K, Dziewanowski K, Ostrowski M, et al. Effect of miltidrug-resistant 1 (MDR1) and CYP3A4\*1B polymorphisms on cyclosporine-based immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. *Ann Transplant* 2019; 24: 108-14.
149. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin. Pharmacol Ther* 2010;87: 721-26.

150. Peng W, Lin Y, Zhang H, Meng K. Effect of ABCB1 3435 C>T genetic polymorphism on pharmacokinetic variables of tacrolimus in adult renal transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Therapeutics* 2020; 42(10): 2049-65.
151. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, et al. Impact of cytochrome P450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration to dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76 (8): 1233-35.
152. Dirks NL, Huth B, Yates CR, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective of ethnic differences. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42 (12):701-18.
153. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, et al. Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103 (6): 546-52.
154. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provot F, et al. CYP3A5 i ABCB1 polymorphisms in donor and recipient; impact on tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (9): 3046-50.
155. Li Y, Hu X, Cai B, Chen J, Bai Y, Tang J, et al. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435 polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transplant Immunology* 2012; 27(1): 12-18.
156. Rojas L, Neumann I, Jose Herrero M, Boso V, Reig J, Poveda JL, et. al. Effect of CYP3A5\*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta analysis of observational studies. *Pharmacogenomics* 2015;15:38-48.
157. Cheng Y, Li H, Meng Y, Liu H, Yang L, Xu T, et. al. Effect of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus and acute rejection in renal transplant recipients:experience at a single centre. *Int J Clin Pract* 2015; 183: 16-22.
158. Shuker N, Bouamar R, van Schaik RHN, Clahsen-van Groningen MC, Damman J, Baan CC, et al. A randomized controlled trial comparing the efficacy of CYP3A5 genotype-based with body-weight –based tacrolimus dosing after living donor kidney transplantation: *Am J Transplant* 2016;16:2085-96.
159. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(9): 659-65.

160. Cho JH, Yoon YD, Park JY. Impact of cytochrome P450 3A and ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms on tacrolimus dose-adjusted trough concentrations among Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012; 44:109-14.
161. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J, et al. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int* 2012; 25:471-80.
162. de Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrentghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92(3):366-75.
163. Elens L, Boumar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, van Schaik RH. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 2011; 57:1574-83.
164. Gijzen V, van Schaik RH, Elens L, Soldin OP, Soldin SJ, Koren G, et al. CYP3A4\*22 and CYP3A5 combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2013; 14:1027-36.
165. Moes DJAR, Swen JJ, den Hartigh J, van der Straaten T, van der Heide JJH, Sanders JS, et al. Effect of CYP3A4\*22, CYP3A5\*3 and CYP3A5 combined genotypes on cyclosporine, everolimus and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2014;3 (2): e100.
166. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale frequencies projects. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 102(4): 688-700.
167. Elens L, Boumar R, Shuker N, Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. Clinical implementation of pharmacogenetics in kidney transplantation: calcineurin inhibitors in the starting blocks. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 77(4): 715-28.
168. Elens L, Haufroid V. Genotype-based tacrolimus dosing guidelines: with or without CYP3A4\*22? *Pharmacogenomics* 2017; 18(16): 2017-131.
169. Šimičević L, Canjuga I, Zibar L, Borić Bilušić Ana, Ganoci L, Božina N. Rapid clearance of tacrolimus blood concentration triggered by variant pharmacogenes. *J Clin Pharm Ther* 2022; 00:1-5.

170. Brunet M, van Gelder T, Asberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman L, et al. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus-personalized therapy: second consensus report. *Ther Drug Monit* 2019; 41 (3):261-307.
171. Singh R, Srivastava A, Kapoor R, Mittal RD. Do drug transporter (ABCB1) influence cyclosporin and tacrolimus dose requirements and renal allograft outcome in the posttransplantation period? *J Clin Pharmacol* 2011; 51:603-15.
172. Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, et. al. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2006; 12 (5):775-80.
173. Herrero MJ, Sanchez-Plumed J, Galiana M, Bea S, Marques MR, Alino SF. Influence of pharmacogenetic polymorphisms in routine immunosuppression therapy after renal transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42:3134-36.
174. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *The Drug Monit* 2010; 32:394-404.
175. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Vizzini G, Salis P. et al. Effect of CYP3A5 i ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. *Ann Transplant* 2009; 14:23-31.
176. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Vizzini G, Salis P, et al. Influence of CYP3A5 i ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *INT J Mol Med* 2011;28:1093-102;
177. Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B et al. Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. *Gene* 2013; 512:226-31.
178. Helal M, Obada M, Elrazek WA, Safan M, El-Hakim TA, El-Said H. et al. Effect of ABCB1 (3435 C>T) and CYP3A5 (6989A>G) genes polymorphism on tacrolimus concentrations and dosage requirements in liver transplant patients. *Egypt J Med Hum Genet* 2017; 18:261-68.
179. Nakamura Y. Pharmacogenomics and drug toxicity. *N Engl J Med* 2008; 359: 856-58.

180. Tohkin M, Ishiguro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, Hasegawa R: Prediction of severe drug reactions using pharmacogenetics biomarkers; *Drug Metab Pharmacokinet* 2010; 25(2):122-23.
181. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCR's bind MHCs peptides and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 419-66.
182. Sažetak opisa svojstava lijeka Myfortic 180 mg, 360 mg želučanootporne tablete  
Preuzeto s: [https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Myfortic-SPC\\_1.pdf](https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Myfortic-SPC_1.pdf) (pristupljeno 26. travnja 2023.)
183. Lalić Z. Utjecaj genetičkih varijacija transportnog proteina ABCC2 na biodostupnost mikofenolne kiseline u bolesnika s presađenim bubregom. Doktorska dizertacija. Zagreb. 2015.
184. Ates HC, Roberts JA, Lipman J, Cass AEG, Urban GA, Dincer C. On-site therapeutic drug monitoring. *Trends Biotechnol* 2020; 38 (11):1262-77.
185. Lovrić M. Terapijsko praćenje lijeka i korelacija metaboličkog genotipa i fenotipa. U. Božina N. ur. *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 1-34.
186. van Gelder T, van Schaik RH, Hesselink D. Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10:725-31.
187. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic drug monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *CJASN* 2007; 2(2):374-84.
188. Cattaneo D, Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Del Priore L, Perico N, et al. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 2001; 15(6):402-9.
189. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, de Loor H, Halewijck E, Deckens M, et al. Current target ranges of mycophenolic acid exposure and drug-related adverse events: a 5-year, open-label, prospective, clinical follow-up study in renal allograft recipients. *Clin Ther* 2008; 30:673-83.
190. Arns W, Breuer S, Choudhury S, Taccard G, Lee J, Binder V, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 2005; 19:199-206.

191. Shaw LM, Figurski M, Milone MC, Trofe J, Bloom RD. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007; 2(5): 1062-72 .
192. Atcheson BA, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59(3):271-80.
193. van Hest RM, Mathot RAA, Pescovitz MD, Gordon R, Mamelok RD, van Gelder T, et al. Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3): 871-80.
194. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 596-601.
195. MacPhee IAM, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:914-9.
196. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 2009; 31(2): 139-52.
197. Endrenyl L, Fritsch S, Yan W. C<sub>max</sub>/AUC is a clearer measure than C<sub>max</sub> for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1991; 29:394-99.
198. Pearl J. Causality: models, reasoning and inference. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
199. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, et al. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res* 2004; 21 (10):1895-903.
200. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, et al. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteosomal degradations. *Pharm Res* 2009;26:469-79.
201. VanderWeele TJ, Rothman KJ, Lash TL. Confounding and confounders. In: Lash TL, VanderWeele TJ, Haneuse S, Rothman KJ, editors. *Modern epidemiology* 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2021: 610-67.



202. Textor J, van der Zander B, Gilthorpe MS, Liskiewicz M, Elliot GTH. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package “dagitty”. *Int J Epidemiol* 2016; 45:1887-94.
203. Gupta A, Dai Y, Vethanayagam RR, Herber MF, Thummel KE, Unadkat JD, et al. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2006; 58:374-83.
204. Bakshsheshian J, Hall MD, Robey RW, Hermann MA, Chen JQ, Bates SE, Gottesman MM. Overlapping substrate and inhibitor specificity of human and murine ABCG2. *Drug Metab Dispos* 2013; 41:1805-12.
205. Organic anion transporting polypeptide (OATP). Preuzeto s : <https://www.straighthealthcare.com/organic-anion-transporting-polypeptide.html> (pristupljeno 27. travnja 2023.)
206. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, et. al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21:152-61.
207. Ogasawara K, Chitnis SD, Gohh RY, Christians U, Akhlaghi F. Multidrug resistance-associated protein (MRP2/ABCC2) haplotypes significantly affect the pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52:751-62.
208. Hu DG, Meech R, Lu L, McKinnon RA, Mackenzie PI. Polymorphisms and haplotypes of the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Drug Metab Dispos* 2014; 42:854-62.
209. Strassburg CP, Barut A, Obermayer-straub P, Li Q, Nguyen N, Tukey RH, et. al. Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by differently expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J Hepatol* 2001; 34:865-72.
210. Tron C, Memaitre F, Cerstuyft C, Petitcollin A, Verdier MC, Bellissant E. Pharmacogenetics of membrane transporters of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2019; 58:593-613.
211. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, et al. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the International association on therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 2021; 43:150-200.
212. Hansen BB, Olsen Klopfer S. Optimal full matching and related designs via network flows. *J Computational Global Stat* 2006;15:609-27.

213. Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIT: nonparametric preprocessing for parametric causal inference. *J Stat Software* 2011;42:1-28.
214. King G, Nielsen R. Why propensity scores should not be used for matching. *Polit Anal* 2019; 27:435-54.
215. Goodrich B, Gabry J, Ali I, Brilleman S. rstanarm: Bayesian applied regression modeling via Stan. R package version 2.21.3, 2022, <https://mc-stan.org/rstanarm/>
216. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool “CubeX”. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(1):428.
217. VanderWeele TJ, Ding P. Sensitivity analysis in observational research: introducing the E-value. *Ann Intern Med* 2017;167: 268-74.
218. Schneeweiss S. sensitivity analysis and external adjustment for unmeasured confounders in epidemiological database studies of therapeutics. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15:291-303.
219. Haine D. The episensr package: basic sensitivity analysis of epidemiological results [doi:10.5281/zenodo.4554553](https://doi.org/10.5281/zenodo.4554553), R package version 1.1.0, <https://dhaine.github.io/episensr/>
220. Friedrich JO, Adhikari NKJ, Beyene J. The ratio of means method as an alternative to mean differences for analyzing continuous outcome variables in meta-analysis: a simulation study. *BMC Med Res Methodol* 2008;8:32
221. Balduzzi S, Rücker G, Schwarzer G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health* 2019; 22:153-160.
222. Takuathung MN, Sakuludomkan W, Koonrungsesomboon N. The impact of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid: systematic review and meta-analysis. *Clin Pharmacokinet* 2021; 60:1291-1302.
223. Woillard JB, Picard N, Thierry A, Touchard G, Marquet P. Associations between polymorphisms in target, metabolism or transport proteins of mycophenolate sodium and therapeutic or adverse effects in kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2014; 24:256-62.
224. Pazik J, Oldak M, Dabrowski M, Lewandowski Z, Sitarek E, Podgorska M, et al. Association of udp-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene polymorphism with kidney allograft function. *Ann Transplant* 2011; 16:69-73.

225. Pazik J, Oldak M, Lewandowski Z, Dabrowski M, Podgorska M, Sitarek E, et al. Recipient uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase UGT1A9 c.98T>C variant determines transplanted kidney filtration rate. *Transplant Proceedings* 2014; 46:2678-82.
226. Jeong H, Kaplan B (2007) Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin J Am Soc nephrol* 2:184-191.
227. Poirier A, Portman R, Cascais AC, Bader U, Wlatter I, Ullah M, Funk C. The need for human breast cancer resistance protein substrate nad inhibition evaluation in drug discovery and development: why, when and how?. *Drug Metab Dispos* 2014; 42: 1466-77.
228. Dalla Vecchia Genvigir F, Campus-Salazar AB, Rosso Felipe C, Tedesco-Silv Jr H, Medina-Pestana JO, de Quateli Doi S, et al. CYP3A5\*3 and CYP2C8\*3 variants influence exposure and clinical outcomes of tacrolimus-based therapy. *Pharmacogenomics* 2020; 21:7-21.
229. Knight SR, Morris PJ. Does the evidence support the use of mycophenolate mofetil therapeutic drug monitoring in clinical practice? A systematic review. *Transplantation* 2008; 85:1675-85.
230. Yang CI, Shen CC, Liao GY, Yong S, Feng LJ, Xia Q, et al. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: a population analysis. *J Clin Pharm Ther* 2021; 00:1-12.
231. Li LQ, Chen DN, Li CJ, Li QP, Chen Y, Fang P, et al. Impact of UGT2B7 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid metabolism in Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2018; 19:1323-34.
232. Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2 and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding. *Exp Opin Drug Metab Toxicol* 2021; 17:369-96.
233. Wang J, Figurski M, Shaw LM, Burckart GJ. The impact of P-glycoprotein and Mrp2 on mycophenolic acid levels in mice. *Transpl Immunol* 2008;19:192-6.
234. Pallet N, Jannot AS, El Bahri M, et al. Kidney transplant recipients carrying the CYP3A4\*22 allelic variant have reduced tacrolimus clearance and often reach supratherapeutic tacrolimus concentrations. *Am J Transplant* 2015;15(3): 800–5.

235. Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, et al. Effect of new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011; 12:1383-96.
236. Tavira B, Coto E, Diaz-Corte C et al. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation. Analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 852-33.
237. Santoro AB, Struchiner CJ, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Suarez-Kurtz G, CYP3A5 genotype, but not CYP3A4\*1b,CYP3A4\*22, or hematocrit, predicts tacrolimus dose requirements in Brazilian renal transplantpatients. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94: 201–2.
238. Shi WL, Tang HL, Zhai S Di. 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): 1–14.

## 8. POPIS KRATICA

ABC	nadporodica o ATP-u ovisnih prijenosnika (engl. <i>ATP-binding cassette</i> )
ABCB1	prijenosnik iz potporodice B1 koji je ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i> ), poznat i pod nazivom P-glikoprotein i MDR1 (engl. <i>multi-drug resistance protein 1</i> )
ABCC2	prijenosnik potporodice C2 koji je ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family C member 2</i> )
ABCG2	prijenosnik potporodice G2 koji je ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i> ), poznat kao i BCRP
Ac-MPAG	acil-glukuronid mikofenolne kiseline (engl. <i>acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid</i> )
AUC	površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme od početka do kraja intervala doziranja (engl. <i>area under the curve concentration time</i> )
ADME	kratica koja dolazi od: <b>A</b> psorpcija, <b>D</b> istribucija, <b>M</b> etabolizam, <b>E</b> liminacija
CES	karboksil-esteraza (engl. <i>carboxylesterase</i> )
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CNI	kalcineurinski inhibitori (engl. <i>calcineurin inhibitors</i> )
CsA	ciklosporin
CYP	nadporodica metaboličkih enzima citokroma P450
CYP3A	citokrom P450 3A
CYP3A4	citokrom P450 3A4
CYP3A5	citokrom P450 3A5
C <sub>max</sub>	vršna koncentracija, najveća koncentracija lijeka u plazmi/serumu nakon primjene
C <sub>trough</sub>	ostatna koncentracija, koncentracija na kraju intervala doziranja, koncentracija u plazmi/serumu ispitanika prije sljedeće doze (engl. <i>trough</i> )
DAG	usmjereni aciklički graf (engl. <i>directed acyclic graphs</i> )
EC-MPS	želučanootporna formulacija mikofenolatnatrija (engl. <i>enterocoated mycophenolate sodium</i> )
eCrCl	procijenjeni klirens kreatinina

EM	ekstenzivni metabolizator (engl. <i>extensive metabolizer</i> )
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
FDA	Američka uprava za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i> )
GMR	omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. <i>geometric mean ratio</i> )
HALMED	Agencija za lijekove i medicinske proizvode
IMPDH	enzim inozin-5'-monofosfat-dehidrogenaza (engl. <i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i> )
KDIGO	smjernice o skrbi za primatelje bubrežnog presatka globalne neprofitne organizacije (engl. <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i> )
LD	neravnoteža povezanosti alela/ravnotežno nasljeđivanje gena (engl. <i>linkage disequilibrium</i> )
MMF	mofetilmikofenolat (engl. <i>mycophenolate mofetil</i> , MMF)
MPA	mikofenolna kiselina (engl. <i>mycophenoloic acid</i> )
MPAG	glukuronid mikofenolne kiseline (engl. <i>mycophenolic acid glucuronide</i> )
MRP	protein višestruke rezistencije na lijekove (engl. <i>multidrug resistance protein</i> )
MRP2	protein višestruke rezistencije na lijekove 2 (engl. <i>multidrug resistance-associated protein 2</i> )
NM	normalni metabolizator (engl. <i>normal metabolizer</i> )
OATP	organski anionski transportni polipeptid (engl. <i>organic anion transporting polypeptide</i> )
PCR	lančana reakcija polimeraze (od engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
P-gp	P-glikoprotein, prijenosnik poznat i pod nazivom MDR1 i ABCB1
PM	spori/slabi metabolizator (engl. <i>poor metabolizer</i> )
SCM	strukturnalni kauzalni modeli (engl. <i>structural causal models</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SLC	SLC transporter (engl. <i>solute carrier</i> )
TAC	takrolimus
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijeka u krvi (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i> )

UGT	enzim uridin-difosfat-fosfoglukuronizil-transferaza (engl. <i>uridin 5'-diphospho-glucuronosyltransferase</i> )
wt	alel divljeg tipa (engl. <i>wild type</i> )

## 9. ŽIVOTOPIS

Ana Borić Bilušić (r. Borić) rođena je 4. svibnja 1982. godine u Splitu. Osnovnu školu završila je u Trogiru, a srednju školu u Splitu. Na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2000. studij farmacije, diplomirala je 2005. i stekla zvanje magistra farmacije. Poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je u listopadu 2015.

Nakon završetka studija farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, 2005. zaposlila se u Agenciji za lijekove i medicinske poslove. Pripravnički je staž odradila u ljekarnama Dvoržak te položila državni ispit 2008.

Od 2005. do danas zaposlena je u Agenciji za lijekove i medicinske poslove (HALMED) gdje je radila na poslovima provjere kakvoće u Službi za provjeru kakvoće te poslovima ocjene dokumentacije o lijeku u Službi za ocjenu kakvoće lijeka. Od 2011. radi na regulatornim poslovima, a od 2016. je voditeljica Odsjeka za validaciju zahtjeva.

Aktivno je sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. 2022. je sudjelovala na *20<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT 2022)* u Pragu te je održala predavanje na 10. Hrvatskom kongresu farmakologije i 1. Hrvatskom kongresu kliničke farmakologije u Opatiji, na temu utjecaja farmakogenetike na farmakokinetiku mikofenolne kiseline, ciklosporina i takrolimusa kod bolesnika s transplantiranim bubregom.

Objavila je 4 znanstvena rada citirana u bazama podataka Current Contents i Sci Expanded.



## 10. PRILOG

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada objavljena u časopisima koji su zastupljeni u bazi Web of Science Core Collection, koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:


**Borić Bilušić A**, Božina N, Lalić Z, Lovrić M, Nađ-Škegro S, Penezić L, Barišić K, Trkulja V. Loss of Function ABCG2 c.421C>A (rs2231142) Polymorphism Increases Steady-State Exposure to Mycophenolic Acid in Stable Renal Transplant Recipients: An Exploratory Matched Cohort Study. *Adv Ther* 2023;40(2):601-618;

Božina N, Lalić Z, Nađ-Škegro S, **Borić Bilušić A**, Božina T, Kaštelan Ž, Trkulja V. 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.



# Loss of Function *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) Polymorphism Increases Steady-State Exposure to Mycophenolic Acid in Stable Renal Transplant Recipients: An Exploratory Matched Cohort Study

A Ana Borić-Bilušić · Nada Božina · Zdenka Lalić · Mila Lovrić ·

Sandra Nađ-Škegro · Luka Penezić · Karmela Barišić · Vladimir Trkulja 

Received: September 9, 2022 / Accepted: November 8, 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Healthcare Ltd., part of Springer Nature 2022

## ABSTRACT

**Introduction:** Polymorphism *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) results in reduced activity of the important drug efflux transporter breast cancer-resistance protein (BCRP/*ABCG2*). One study has suggested that it may affect enterohepatic recirculation of mycophenolic acid (MPA). We evaluated the effect of rs2231142 on steady-state exposure to MPA in renal transplant recipients.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12325-022-02378-w>.

AA. Borić-Bilušić  
Agency for Medicinal Products and Medical Devices of Croatia, Zagreb, Croatia

N. Božina · V. Trkulja (✉)  
Department of Pharmacology, Zagreb University School of Medicine, Šalata 11, 10000 Zagreb, Croatia  
e-mail: vladimir.trkulja@mef.hr

Z. Lalić · M. Lovrić  
Department of Laboratory Diagnostics, Analytical Toxicology and Pharmacology Division, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

S. Nađ-Škegro · L. Penezić  
Department of Urology, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

K. Barišić  
Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb University, Zagreb, Croatia

**Methods:** Consecutive, stable adult (age  $\geq 16$  years) renal transplant recipients on standard MPA-based immunosuppressant protocols ( $N = 68$ ; 43 co-treated with cyclosporine, 25 with tacrolimus) underwent routine therapeutic drug monitoring after a week of initial treatment, and were genotyped for *ABCG2* c.421C>A and 11 polymorphisms in genes encoding enzymes and transporters implicated in MPA pharmacokinetics. *ABCG2* c.421C>A variant versus wild-type (wt) patients were matched with respect to demographic, biopharmaceutic, and genetic variables (full optimal combined with exact matching) and compared for dose-adjusted steady-state MPA pharmacokinetics [frequentist and Bayes (skeptical neutral prior) estimates of geometric means ratios, GMR].

**Results:** Raw data (12 variant versus 56 wt patients) indicated around 40% higher total exposure (frequentist GMR = 1.45, 95% CI 1.10–1.91; Bayes = 1.38, 95% CrI 1.07–1.81) and around 30% lower total body clearance (frequentist GMR = 0.66, 0.58–0.90; Bayes = 0.71, 0.53–0.95) in variant carriers than in wt controls. The estimates were similar in matched data (11 variant versus 43 wt patients): exposure GMR = 1.41 (1.11–1.79) frequentist, 1.39 (1.15–1.81) Bayes, with 90.7% and 85.5% probability of GMR > 1.20, respectively; clearance GMR = 0.73 (0.58–0.93) frequentist, 0.71 (0.54–0.95) Bayes. Sensitivity analysis indicated

low susceptibility of the estimates to unmeasured confounding.

**Conclusions:** Loss-of-function polymorphism *ABCG2* c.421C>A increases steady-state exposure to MPA in stable renal transplant patients.

**Keywords:** Mycophenolic acid; Renal transplant; Breast cancer-resistance protein; Polymorphism

### Key Summary Points

#### *Why carry out this study?*

*ABCG2* is an efflux transporter important in the pharmacokinetics of various drugs.

Polymorphism *ABCG2* c.421C>A results in reduced transporter activity.

One study has suggested that this polymorphism could affect enterohepatic recirculation of mycophenolic acid.

#### *What was learned from the study?*

The *ABCG2* c.421C>A variant allele increases steady-state exposure to mycophenolic acid in stable renal transplant recipients.

## INTRODUCTION

Mycophenolic acid (MPA) is a standard component of immunosuppressant protocols in organ transplantation. The considerable variability of MPA pharmacokinetics has attracted much attention, and has been comprehensively reviewed, e.g., [1–5]. A range of “classical” factors interfere with exposure to MPA, including age, body mass index (BMI), renal function, changes of gut microbiota, reduced albumin levels, interactions with food, drug–drug interactions at different levels [in particular with the calcineurin inhibitors (CNI) cyclosporine A (CsA) and tacrolimus, but also with other drugs] and MPA formulations [immediate-release tablets of mycophenolate mofetil (IR MMF) or

enteric-coated (acid-resistant) tablets containing MPA sodium salt (EC-MPS)] [1–5]. Orally administered MPA undergoes complex processes that include pro-drug activation [in the case of MMF, by carboxylesterases (CES)] in the intestinal cells and the liver; extensive biotransformation (around 90% of bioavailable fraction) to an inactive 7-O-glucuronide (MPAG), mainly by the uridine 5'-diphosphoglucosyltransferase (UGT) 1A9 in the liver (less so in the kidney), with a minor contribution of other UGTs; less extensive biotransformation by UGT2B7 (intestine, liver) to a biologically active acyl-glucuronide (AcMPAG); minor biotransformation by cytochrome P450 enzymes CPY3A4 and CY3A5 (liver) to inactive 6-O-desmethyl MPA; extensive albumin binding (in competition with MPAG); enterohepatic recirculation and, to a minor extent, active renal secretion of MPA and MPAG [1–5]. MPA is a substrate of the efflux transporter multidrug resistance protein 1 (MDR-1, encoded by *ABCB1*) (intestine), while MPAG and AcMPAG are substrates to efflux transporter multidrug resistance-associated protein 2 (MRP-2, encoded by *ABCC2*) and influx organic anion transporter polypeptides, primarily OATP1B1 and 1B3—these proteins move MPAG/AcMPAG in and out of the hepatocytes and renal tubular cells [1–5].

A recent systematic review [4] identified 38 studies with different designs, sampling populations and sample sizes, measured outcomes, and control of confounding, mainly in renal transplant recipients, assessing the relationship between several tens of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in ten enzyme (*UGT*, *CYP*, *CES*) families and six transporter genes (*ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1*, *SLCO1B3*, *SLCO2B1*, *ABCG2*) and exposure to or occurrence of MPA-related adverse events. Those with at least two consistent reports (in vivo or in vitro/in vivo) about associations with MPA exposure/clinical effects and regardless of the number of “negative” studies included the following: (i) *UGT1A9* c.-275T>A (rs6714486) and c.-2152C>T (rs17868320) variants [in complete linkage disequilibrium (LD)] resulting in increased enzyme activity and lower exposure to MPA; (ii) *UGT2B7* 802C>T (rs7439366) variants (or loci that are in LD) may also be relevant

for MPA clearance; (iii) *ABCB1* 2677G>T/A (rs2032582), 3435C>T (rs1045642) or 1236C>T (rs1128503) variant alleles (or haplotypes/diplotypes, since in LD) increase the risk of adverse events; (iv) in vitro, OATP1B1 with the *SLCO1B1\*5* c.521T>C (rs4149056) polymorphism shows reduced MPAG/AcMPAG uptake into hepatocytes. This might reduce enterohepatic recirculation, and in one study, this SNP was associated with a lower risk of MPA adverse events (no association in six other studies, and a further five failed to associate this SNP with MPA levels); (v) *SLCO1B3* c.334T>G (rs4149117) is in complete LD with *SLCO1B3* c.699G>A (rs7311358). OATP1B3 with the variant haplotype shows reduced MPAG uptake in vitro. In one study, c.334T>G TT/TG patients had somewhat higher MPA exposure versus GG subjects (not observed in three further studies, and one indicated the opposite); and (vi) *UGT1A9\*3* (c.98T>C, rs72551330) SNP results in reduced enzyme activity. Prevalence of variant carriers is very low ( $\leq 3\%$  in most of the studies) [4, 5]. In two studies, it was suggested that variant carriers had lower exposure to MPA than wt subjects, but no association between this SNP and MPA exposure/clearance was found in several other studies [4, 5]. (vii) *ABCC2* c.-24C>T (rs717620) was reportedly associated with somewhat higher exposure to MPA, but the opposite has also been reported; (viii) donors' SNPs in renal transplantation were rarely investigated—one study associated donor's *ABCC2* 1249G>A (rs2273697) with increased MPA clearance [4].

In the present analysis, we aimed to assess the potential effect of an SNP in the gene encoding breast cancer-resistance protein (BCRP, *ABCG2*) *ABCG2* c.421C>A (rs2231142; p.Q141K) on steady-state exposure to MPA in stable renal transplant recipients. As reviewed [4], four studies have failed to detect associations between this SNP and exposure to MPA. Our motivation was based on the following: (i) *ABCG2* is important for transmembrane transport of numerous drugs in the intestine, liver, and kidney [6–9], and c.421C>A SNP results in reduced transporter activity due to increased proteosomal degradation [9, 10] and

(ii) one study in Japanese renal transplant patients suggested that *ABCG2* participated in pharmacokinetics of MPAG [11], and this may reflect exposure to MPA.

## METHODS

### Study Outline

We included consecutive adult and adolescent (age  $\geq 16$  years) de novo renal transplant recipients submitted to routine therapeutic drug monitoring (TDM) of immunosuppressants after completion of the initial week of treatment. All participants provided signed informed consent for genotyping of pharmacogenes. Clinical and bioanalytical procedures were described in detail previously [12, 13]. Briefly, patients on standard immunosuppressant protocols including MPA (IR MMF or EC-MPS), CNI [CsA (microemulsion) or tacrolimus] and glucocorticoids were closely monitored over 5–7 post-transplant days; on the subsequent day (steady-states of MPA, CsA/tacrolimus achieved), after overnight fast, blood samples were taken at 08:00 h for quantification of MPA and CsA/tacrolimus, treatments were administered and six blood samples were taken over the 12 h dosing interval (at 0.5, 1, 2, 3, 8, and 12 h post-dose) for quantification of MPA. Patients were included in the present analysis if: (1) clinical status was considered stable during the observed period based on (i) lack of surgical complications and no signs of graft dysfunction or rejection, (ii) no severe comorbidity (cardiovascular, hepatic, metabolic, infectious, gastrointestinal), (iii) low immunological risk, (iv) stably improving renal function (serum creatinine  $\leq 300$   $\mu\text{mol/L}$  and by at least 1/3 lower than on the first postoperative day, with stable diuresis at around 60 mL/h), (v) serum albumin  $> 31$  g/L and (2) they were not treated with drugs that affect exposure to MPA (proton pump inhibitors, antacids, phosphate binders, oral iron, magnesium or calcium, rifampicin or any antibiotics) during the pre-study period and for the study duration. Patients were genotyped for *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) and further

SNPs suggested (although not unambiguously) to be associated with MPA pharmacokinetics: *UGT1A9-275 T>A* (rs6714486) and *-2152C>T* (rs17868320); *UGT2B7-161C>T* (rs7668258) [in complete LD with *UGT2B7 802C>T* (rs7439366)] [14]; *ABCB1 2677G>T/A* (rs2032582), *3435C>T* (rs1045642) and *1236C>T* (rs1128503); *SLCO1B1 c.521 T>C* (rs4149065) [in complete LD with *c.388A>G* (rs2306283)] [4]; *CYP3A4\*22* (rs35599367) and *CYP3A5\*3* (rs776746); *ABCC2 -24C>T* (rs717620); and *1249G>A* (rs2273697) (both recipients and donors). To estimate the effect of the *ABCG2 c.421C>A* SNP on exposure to MPA at steady state, patients were classified as *c.421C>A* variant carriers (“treated”) and wild-type (wt) subjects (“controls”), and were matched to achieve conditional exchangeability. We followed the principles introduced by Pearl [15] with operational development [16, 17] and implementation carried out in the *daggity* [18] package in R [19] [see Electronic supplementary material (ESM)—Supplementary Methods A, for details].

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Center Zagreb (approval no. 8.1-17/242-2 02/21, 30 January 2018). All procedures performed in the study were in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients included in the present analysis underwent standard routine therapeutic drug monitoring in their post-transplant period. Those meeting the inclusion criteria were included only if they signed an informed consent for genotyping of pharmacogenes for research purposes.

### Bioanalytical Procedures and Genotyping

Whole blood cyclosporine and tacrolimus were determined by a validated affinity chrome-mediated immunoassay (ACMIA, Siemens, Germany). Total plasma MPA was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with UV/VIS spectrophotometric detection (at 215 nm, 25 °C, workflow 1 mL/min) using a commercially available HPLC kit for MPA in plasma (Chromsystems, Germany). All analytes were included in the external proficiency testing schemes (RfB and Instand).

Creatinine clearance was estimated (Cockcroft–Gault) based on serum creatinine quantified by an enzymatic assay on an automated analyzer (Cobas c 501; Roche, Germany) validated by isotope dilution mass spectrometry.

Genomic DNA was isolated from whole blood using the BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on the KingFisher mL System (Thermo Labsystems, Vantaa, Finland). Genotyping was performed on an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, according to manufacturer’s instructions (Applied Biosystems, CA, USA) using validated TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for the following polymorphisms: *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142, ID C\_15854163\_70); *ABCC2 -24C>T* (rs717620, ID C\_2814642\_10) and *1249G>A* (rs2273697; ID C\_22272980\_20); *SLCO1B1 c.521 T>C* (rs4149065, ID C\_30633906\_10); *UGT2B7 -161C>T* (rs7668258, ID C\_27827970\_40); *UGT1A9-275 T>A* (rs6714486, ID C\_27843087\_10) and *-2152C>T* (rs17868320, ID C\_34418857\_10); *ABCB1 3435C>T* (rs1045642, ID C\_7586657\_20) and *1236C>T* (rs1128503, ID C\_7586662\_10); *CYP3A4\*22* (rs35599367, ID C\_59013445\_10); and *CYP3A5\*3* (rs776746, ID C\_26201809\_30). Genotyping of *ABCB1 c.2677G>T/A* (rs2032582) was performed by real-time PCR genotyping on a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

### Pharmacokinetic Indicators

Standard MPA steady-state measures [peak exposure ( $C_{\max,ss}$  mg/L), area under the concentration–time curve over the dosing interval of 12 h ( $AUC_{\tau,ss}$  mg h/L), morning and evening pre-dose concentrations ( $C_0$ ,  $C_{12}$ , mg/L), apparent total body clearance ( $CL_{T/F,ss}$  mL/min/kg)] were determined by the non-compartmental method (Kinetic 4.1, InnaPhase Corp., USA). We also calculated the  $C_{\max}/AUC_{\tau,ss}$  (1/h) ratio as an indicator of the absorption rate [20]. The analysis was based on dose-normalized concentrations (per 1000 mg) accounting for the fact that 1000 mg of MMF corresponded to

739 mg of MPA and 1000 mg of EC-MPS corresponded to 936 mg of MPA.

## Matching and Data Analysis

*ABCG2 c.421C>A* variant carriers and wt controls were matched in combined exact and optimal full matching with Mahalanobis as a distance measure using package *MatchIT* [21] in R [19]. The procedure allows “one-to-many” variant to control matching (and vice versa), and attains (exact) or approximates (Mahalanobis) balance achieved by fully blocked randomization (with respect to measured confounders) (see ESM—Supplementary Methods B, for details) [21–23]. Given the substantially different ranges (70–341 versus 3.4–37.4 µg/L) to be used in matching, CsA and tacrolimus troughs were re-scaled [ln(-tacrolimus) troughs re-scaled to ln(CsA troughs) range by linear transformation]. Inadequately matched covariates (standardized mean difference,  $d \geq 0.1$ ) were adjusted for in data analysis. The variant allele effect on (ln-transformed) pharmacokinetic outcomes was estimated in raw and matched/adjusted data in frequentist (maximum likelihood with Gauss–Hermite approximation for raw data; cluster robust variance estimator for matched data) and Bayesian [four chains, 4000 iterations, 8000 samples of the posterior, highest posterior density (HPD) credible intervals] general linear models, and was expressed as the geometric means ratio (GMR). In the latter, we defined a moderately informed skeptical prior for the effect of interest consistent with the a priori hypothesis of no effect: centered at 0 for ln(GMR) with a standard deviation of 0.355. This assigns 95% probability to a GMR between 0.5 and 2.0, and 48% probability to a GMR within the “conventional” limits of equivalence (0.80–1.25). We used SAS 9.4 for Windows (SAS Inc., Cary, NC) to fit frequentist models and the R package *rstanarm* [24] to fit Bayesian models. We used CubeX [25] to evaluate linkage disequilibrium (LD).

## Sensitivity to Unmeasured Confounding

We calculated E-values (package *Evalue* [26] in R), and also bias-corrected estimates [27] (package *episensr* [28] in R) to account for bias arising from the fact that we did not control for the *SLCO1B3 c.334T>G* (rs4149117) and *UGT1A9 c.98T>C* (rs72551330) SNPs. For the latter purpose, we used literature data to generate meta-analytical estimates (package *meta* [29] in R) of strength of association (we used ratio of means, ROM [30], as an effect measure) between these SNPs and steady-state exposure to MPA (see ESM—Supplementary Methods C, for details).

## RESULTS

### Patients

Of the 68 included patients, 12 (17.7%) were *ABCG2 c.421C>A* variant allele carriers and 56 were wt subjects (Table 1). Variants in *CYP3A4* and *CYP3A5* were rare (Table 1). The *UGT1A9 -275T>A* and *UGT1A9 -2152C>T* SNPs were in complete LD (Table 1). Consequently, patients were considered as having a wt or a variant diplotype. The three *ABCB1* SNPs (Table 1) were in a strong LD (pairwise  $D' = 0.85$ – $0.95$ ,  $r^2 = 0.615$ – $0.687$ ). Therefore, patients were categorized with respect to the number of variant alleles: (i) all three genotypes are wt, or one is heterozygous (none or one variant allele); (ii) two to three variant alleles (any two or all three loci are heterozygous; or one variant homozygous and one heterozygous locus); or (iii) four to six variant alleles. Variant carriers prevailed regarding *UGT2B7 -161 C>T* SNP, while wt homozygotes prevailed regarding *SLC01B1 521T>C* and *ABCC2 -24C>T* and *ABCC2 1249G>A* SNPs (Table 1). With respect to these SNPs, patients were categorized as variant carriers or as wt homozygotes.

Characteristics of *ABCG2 c.421C>T* variant carriers and wt controls are summarized in Table 2 and Fig. 1A summarizes their (dose-adjusted) MPA concentration–time profiles over the dosing interval.

**Table 1** Single nucleotide polymorphisms genotyped in the 68 included renal transplant recipients and donors

<i>Recipient</i>		<i>ABCB1 1236C&gt;T (rs1128503)</i>	
<i>ABCG2 421C&gt;A (rs2231142)</i>		CC	19 (28.0)
CC	56 (82.3)	CT	37 (54.4)
CA	12 (17.7)	TT	12 (17.6)
AA	0	<i>UGT2B7 -161C&gt;T (rs7668258)</i>	
<i>CYP3A4*22 (rs35599367)</i>		CC	13 (17.6)
*1/*1	67 (98.5)	CT	40 (58.8)
*1/*22	1 (1.5)	TT	15 (22.1)
<i>CYP3A5*3 (rs776746)</i>		<i>SLCO1B1 521 T&gt;C (rs4149065)</i>	
*3/*3	59 (86.8)	TT	43 (63.2)
*1/*3	9 (13.2)	TC	24 (35.3)
<i>UGT1A9 -275 T&gt;A (rs6714486)</i>		CC	1 (1.5)
TT	65 (95.6)	<i>ABCC2 -24C&gt;T (rs717620)</i>	
TA	3 (4.4)	CC	47 (69.1)
AA	0	CT	19 (27.9)
<i>UGT1A9 -2152C&gt;T (rs17868320)</i>		TT	2 (2.9)
CC	65 (95.6)	<i>ABCC2 1249G&gt;A (rs2273697)</i>	
CT	3 (4.4)	GG	41 (60.3)
TT	0	GA	22 (32.3)
<i>ABCB1 2677 G&gt;T/A (rs2032582)</i>		AA	5 (7.4)
GG	18 (26.5)	<i>Donor</i>	
GA	1 (1.5)	<i>ABCC2 1249G&gt;A (rs2273697)</i>	
GT	35 (51.5)	GG	41 (60.3)
TA	2 (2.9)	GA	21 (30.9)
TT	12 (17.6)	AA	6 (8.8)
<i>ABCB1 3435C&gt;T (rs1045642)</i>			
CC	13 (19.1)		
CT	37 (54.4)		
TT	18 (26.5)		

**Table 2** Characteristics of patients with variant and wild-type *ABCG2 c.421C>A* genotypes

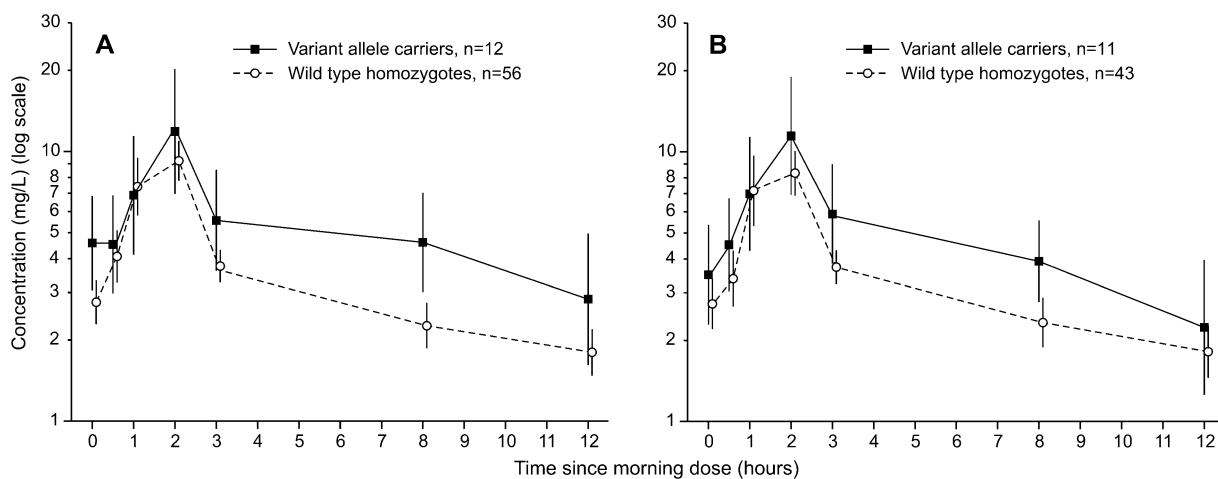
	Variant carriers	Wild type
<i>N</i>	12	56
Men	6 (50.0)	30 (53.6)
Age (years)	46.5 ± 13.3 (26–68)	50.5 ± 12.8 (16–71)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 ± 6.3 (17.7–39.5)	24.0 ± 3.3 (14.5–30.4)
Mycophenolate mofetil	2 (16.7)	21 (37.5)
1000 mg bid	1	17
750 mg bid	0	2
500 mg bid	1	2
Enteric-coated mycophenolate	10 (83.3)	35 (62.5)
Daily dose (mg)	All 720 mg bid	All 720 mg bid
Cyclosporine A	6 (50.0)	37 (66.1)
Morning dose (mg/kg)	160 (144–175; 125–175)	150 (125–188; 75–250)
Evening dose (mg/kg)	162 (125–181; 125–200)	150 (125–200; 75–250)
Morning trough (µg/L)	212 ± 53 (169–311)	204 ± 64 (70–341)
Tacrolimus	6 (50.0)	19 (33.9)
Morning dose (mg)	2.0 (1.7–3.9; 1.0–5.0)	3.0 (2.5–3.0; 1.5–4.0)
Evening dose (mg)	3.3 (2.2–4.3; 1.5–5.0)	3.0 (3.0–4.0; 2.0–4.0)
Morning trough (µg/L)	11.0 ± 3.2 (7.8–16.9)	10.8 ± 5.8 (3.4–27.4)
Prednisone equivalent (mg/day)	40 (30–40; 30–60)	35 (30–47; 20–75)
Urine output (L/day)	2.4 (2.1–2.6; 1.8–4.3)	2.6 (2.1–3.2; 1.1–5.7)
Estimated creatinine clearance (mL/min)	45 ± 16 (29–84)	41 ± 11 (23–74)
<i>CYP3A4</i> *22 genotype		
*1/*1	12 (100)	55 (98.2)
*1/*22	0	1 (1.8)
<i>CYP3A5</i> *3 genotype		
*3/*3	11 (91.7)	48 (85.7)
*1/*3	1 (8.3)	8 (14.3)
<i>UGT2B7 -161C&gt;T</i> genotype		
Variant allele	9 (75.0)	47 (83.9)
Wild type	3 (25.0)	9 (16.1)
<i>UGT1A9 -275/-2152</i> diplotype		
Variant allele	0	3 (5.4)
Wild type	12 (100)	53 (94.6)



**Table 2** continued

	Variant carriers	Wild type
<i>ABCB1</i> 2677/3435/1236 diplotype		
Wild type or one variant allele	3 (25.0)	15 (26.8)
2–3 variant alleles	6 (50.0)	25 (44.6)
4–6 variant alleles	3 (25.0)	16 (28.6)
<i>SLC01B1</i> 521 T>C genotype		
Variant allele	4 (33.3)	21 (37.5)
Wild type	8 (66.7)	35 (62.5)
<i>ABCC2</i> -24 C>T genotype		
Variant allele	2 (16.7)	19 (33.9)
Wild type	10 (83.3)	37 (66.1)
<i>ABCC2</i> 1249 G>A genotype		
Variant allele	4 (33.3)	23 (41.1)
Wild type	8 (66.7)	33 (58.9)
Donor's <i>ABCC2</i> 1249 G>A genotype		
Variant allele	6 (50.0)	21 (37.5)
Wild type	6 (50.0)	35 (62.5)

Data are counts (percent), mean  $\pm$  SD (range), or median (quartiles, range)



**Fig. 1** Average (geometric mean, 90% CI) mycophenolic acid (MPA) dose-adjusted concentrations over a steady-state dosing interval in *ABCG2* c.421C>A variant allele

carriers and wild-type controls: raw (measured) data (**A**) and data in matched sets (**B**)

**Table 3** Factors known or suggested to affect pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA PK) in renal transplant recipients controlled for by different means in the present analysis [see also Patients

and Methods: Study outline, and Electronic supplementary material—Supplementary Methods A (Fig. S1B) for details]

#### **Factors controlled for by inclusion–exclusion criteria**

Drugs affecting MPA pharmacokinetics

Serum creatinine dynamics and diuresis over 5–7 postoperative days (before MPA PK assessment)

Hypoalbuminemia at baseline of MPA PK assessment

Postoperative complications, acute rejection, infectious, cardiovascular, metabolic, or hepatic comorbidity that may affect MPA PK and/or exposure to calcineurin inhibitors (CNI)

Drugs that interfere (apart from CNI) with ABCG2—by inclusion–exclusion criteria pertinent to drugs affecting MPA PK (some are common) and comorbidities (i.e., no need for treatments)

Drugs affecting CNI pharmacokinetics—by inclusion–exclusion criteria pertinent to drugs affecting MPA PK (some are common) and comorbidities (i.e., no need for treatments)

#### **Factors controlled for by matching/statistical adjustment**

Type of MPA formulation

Estimated creatinine clearance at baseline of MPA PK assessment

Type of CNI

CNI trough concentrations at baseline of MPA PK assessment

Age and body mass index

Polymorphisms: *UGT1A9* -2152/-275 diplotypes; *UGT2B7* -161 genotype; *ABCB1* 2677/3435/1236 diplotypes; *SLC01B1* 521 genotype; *ABCC2* -24 genotype; *ABCC2* 1249 genotype (recipient and donor)

#### **Measured factors, but not included in matching/adjustment**

*CYP3A4*\*22 and *CYP3A5*\*3 polymorphisms: (a) only a few subjects overall had variant alleles. Considering that *CYP3A4/5* are almost irrelevant for MPA PK, adjustments for these two polymorphisms are practically meaningless; (b) potential impact of these two polymorphisms on exposure to CNIs is accounted for by matching in respect to CNI trough concentrations

Prednisone-equivalent doses: (a) doses were similar between *ABCG2* *c.421C>A* variant carriers and wild-type controls considering raw data (Table 2). After matching, weighted medians, quartiles, and ranges were similar in 11 variant carriers (40, 30–50, and 30–60 mg/day, respectively) matched to 43 wild-type controls (30, 30–40, and 20–75 mg/day, respectively); (b) effects of glucocorticoids on exposure to MPA are minor/irrelevant [1, 2, 5]; (c) possible effects on CNI troughs (e.g., CYP induction) are accounted for by matching with respect to CNI trough concentrations

#### **Effect of *ABCG2* *c.421C>A* Variant on Exposure to MPA**

In estimating the effect of the *ABCG2* *c.421C>A* variant, we controlled for a number of potentially interfering factors (Table 3). Before matching, variant and wt patients differed considerably with respect to most of the

matching variables (Table 4), while total exposure ( $AUC_{\tau,ss}$ ) appeared higher and total body clearance ( $CL_{T/F,ss}$ ) appeared lower in variant carriers than in wt controls (Table 4). Frequentist and Bayesian estimates suggested by 45% (95% CI 10–92%) and by 38% (95% CrI 7–81%) higher total exposure, respectively (Table 5), and by 34% (10–52%) and 29% (5–47%) lower

**Table 4** Characteristics of *ABCG2* variant allele carriers and wild-type (wt) homozygotes before (full dataset) and after matching. Data are counts (%), mean  $\pm$  SD, or geometric mean (geometric coefficient of variation, %) for pharmacokinetic variables. Differences are expressed as standardized mean difference (*d*). For pharmacokinetic parameters, *d* was calculated based on mean (SD) of ln-transformed data. Values < 0.1 indicate nonsignificant differences

	Before matching			After matching		
	Variant	Wt	<i>d</i>	Variant	Wt	<i>d</i>
<i>N</i>	12	56	–	11	43	–
MMF	2 (16.7)	21 (37.5)	–0.715	3.3 (29.6)	12.9 (30.1)	–0.009
EC-MPS	10 (83.3)	35 (62.5)	0.715	7.7 (70.4)	30.1 (69.9)	0.009
Cyclosporine	6 (50.0)	37 (66.1)	–0.715	7.5 (68.5)	29.5 (68.5)	0.000
Tacrolimus	6 (50.0)	19 (33.9)	0.715	3.5 (31.5)	13.5 (31.5)	0.000
<i>SLCO1B1</i> variant	4 (33.3)	21 (37.5)	–0.087	4.3 (38.9)	15.4 (35.8)	0.062
<i>SLCO1B1</i> wild type	8 (66.7)	35 (62.5)	0.087	6.7 (61.1)	27.6 (64.2)	–0.062
<i>ABCC2-24</i> variant	2 (16.7)	19 (33.9)	–0.405	2.0 (18.5)	8.0 (18.5)	0.000
<i>ABCC2-24</i> wild type	10 (83.3)	37 (66.1)	0.405	9.0 (81.5)	35.0 (81.5)	0.000
<i>ABCC2-1249</i> variant	4 (33.3)	23 (41.1)	–0.161	4.7 (42.6)	18.3 (42.6)	0.000
<i>ABCC2-1249</i> wild type	8 (66.7)	33 (58.9)	0.161	6.3 (57.4)	24.7 (57.4)	0.000
<i>UGT2B7</i> variant	9 (75.0)	47 (83.9)	–0.222	9.6 (87.0)	37.4 (87.0)	0.000
<i>UGT2B7</i> wild type	3 (25.0)	9 (16.1)	0.222	1.4 (13.0)	5.6 (13.0)	0.000
<i>UGT1A9</i> variant diplotype	0	3 (5.4)	–0.336	0	0	0.000
<i>UGT1A9</i> wild type diplotype	12 (100)	53 (94.6)	0.336	11 (100)	43 (100)	0.000
<i>ABCB1</i> wild type/1 variant allele	3 (25.0)	15 (26.8)	–0.041	3.9 (35.2)	14.4 (33.5)	0.035
<i>ABCB1</i> 2–3 variant alleles	6 (50.0)	25 (44.6)	0.108	4.1 (37.0)	17.4 (40.5)	–0.071
<i>ABCB1</i> 4–6 variant alleles	3 (25.0)	16 (28.6)	–0.081	3.1 (27.8)	11.2 (26.0)	0.039
Donors' <i>ABCC2-1249</i> variant	6 (50.0)	21 (37.5)	0.282	7.7 (70.4)	18.7 (43.5)	0.564
Donors' <i>ABCC2-1249</i> wild type	6 (50.0)	35 (62.5)	–0.282	3.3 (29.6)	24.4 (56.5)	–0.564
Age (years)	46.5 $\pm$ 13.3	50.0 $\pm$ 12.8	–0.301	50.9 $\pm$ 11.7	50.7 $\pm$ 13.1	0.014
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 $\pm$ 6.3	24.0 $\pm$ 3.3	0.182	23.5 $\pm$ 5.6	24.1 $\pm$ 3.3	–0.121
eCrCl (mL/min)	45 $\pm$ 16	41 $\pm$ 11	0.315	44.3 $\pm$ 13.2	41.4 $\pm$ 11.1	0.234
Re-scaled ln(CNI trough) ( $\mu$ g/L) <sup>1</sup>	5.34 $\pm$ 0.21	5.26 $\pm$ 0.37	0.230	5.33 $\pm$ 0.20	5.31 $\pm$ 0.38	0.057
<i>PK outcomes</i>						
AUC <sub><math>\tau</math>,ss</sub> (mg h/L)	73.2 (57.3)	50.3 (44.8)	0.775	67.8 (41.8)	48.9 (40.9)	0.824
C <sub>max,ss</sub> (mg/L)	16.1 (64.9)	15.9 (60.5)	0.023	15.3 (50.2)	14.7 (64.4)	0.072
C <sub>0</sub> (mg/L)	4.6 (91.0)	2.8 (101)	0.625	3.5 (91.0)	2.7 (101)	0.307
C <sub>12</sub> (mg/L)	2.8 (149)	1.8 (101)	0.456	2.2 (143)	1.8 (106)	0.212
CL <sub>T/F,ss</sub> (mL/min/kg)	2.2 (77.0)	3.3 (48.0)	–0.715	2.7 (61.2)	3.4 (42.7)	–0.515

**Table 4** continued

	Before matching			After matching		
	Variant	Wt	<i>d</i>	Variant	Wt	<i>d</i>
$C_{\max}/AUC_{\tau}$ (1/h)	0.22 (51.0)	0.32 (56.0)	−0.715	0.22 (49.5)	0.30 (60.8)	−0.559

$AUC_{t,ss}$  area under the concentration–time curve during dosing interval at steady-state, *BMI* body mass index,  $C_{\max,ss}$  peak plasma concentration at steady-state,  $C_0$  morning pre-dose trough,  $C_{12}$  evening trough,  $CL_{T/F,ss}$  apparent total body clearance at steady state, *CNI* calcineurin inhibitor, *EC-MPS* enteric-coated mycophenolate sodium, *eCrCl* estimated creatinine clearance, *MMF* mycophenolate mofetil

<sup>1</sup>Linear transformation to ln(cyclosporine trough) scale

total body clearance, respectively (Table 5) in variant carriers than in wt controls. Finally, 11/12 variant carriers were matched to 43/56 wt controls with excellent balance regarding most matching covariates, except ( $d \geq 0.1$ ) for the donors' *ABCC2 1249 G>A* genotype, body mass index, and estimated creatinine clearance (Table 4): average concentration–time profiles were not significantly changed versus raw data (Fig. 1B),  $AUC_{\tau,ss}$  was still higher ( $d = 0.824$ ) and  $CL_{T/F,ss}$  was lower ( $d = -0.559$ ) in variant carriers than in wt controls (Table 4). With additional adjustment for suboptimally matched covariates, frequentist and Bayesian estimates indicated by 41% (95% CI 11–79%) and by 39% (95% CrI 5–81%), respectively, higher total exposure, and by 27% (7–42%) and by 29% (5–46%) lower total body clearance, respectively, in variant carriers than in wt controls (Table 5). Probability that the GMR for  $AUC_{\tau,ss}$  was  $> 1.20$  was 90.7% based on the frequentist analysis and 85.6% based on the Bayesian analysis (Fig. 2).

### Sensitivity to Unmeasured Confounding

Using published studies (see ESM—Supplementary results: sensitivity analysis, Figs. S2, S3, S4), we estimated the association between the *SLCO1B3 c.334T>G* TT/TG genotype (versus GG genotype, total  $N = 241$  versus 400) and steady-state MPA  $AUC_{0-12}$  as ROM = 1.136 (95% CI 0.949–1.361), and the association between the *UGT1A9 c.98T>C* genotype TC (versus TT, total  $N = 25$  versus 593) and the outcome as ROM =

1.098 (95% CI 0.548–2.198), with similar estimates in patients co-treated with CsA or tacrolimus/sirolimus in both cases; estimated prevalence of TT/TG (four cohorts, total  $N = 1192$ ) and TC subjects (nine cohorts, total  $N = 1827$ ) was 31.1% and 3.9% respectively. Although there is no reason to expect higher prevalence of TT/TG (*SLCO1B3*) or TC (*UGT1A9*) patients among *ABCG2 c.421C>A* variant carriers than among wt controls, we assumed scenarios with high-chance imbalances (see ESM—Supplementary results: sensitivity analysis, Tables S1 and S2) and TT/TG and TC effects much higher than estimated. Even under such conditions, bias-corrected estimate of the *ABCG2 c.421C>A* variant effect on exposure to MPA is still higher than the conventional limit of equivalent exposure (Fig. 3). E-values suggested that the cumulative effect of unmeasured confounders would have to be strong, i.e., GMR = 1.63 and GMR = 1.59 (frequentist and Bayesian, respectively) to at least partly explain the observed, i.e., to “push” the observed GMR point estimates (1.40) to 1.20.

## DISCUSSION

These data strongly suggest that the variant *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) allele increases  $AUC_{\tau,ss}$  of MPA in stable renal transplant patients (by around 40%, with a high probability that the effect is  $> 20\%$ ), in agreement with proportionally reduced  $CL_{T/F,ss}$ . The

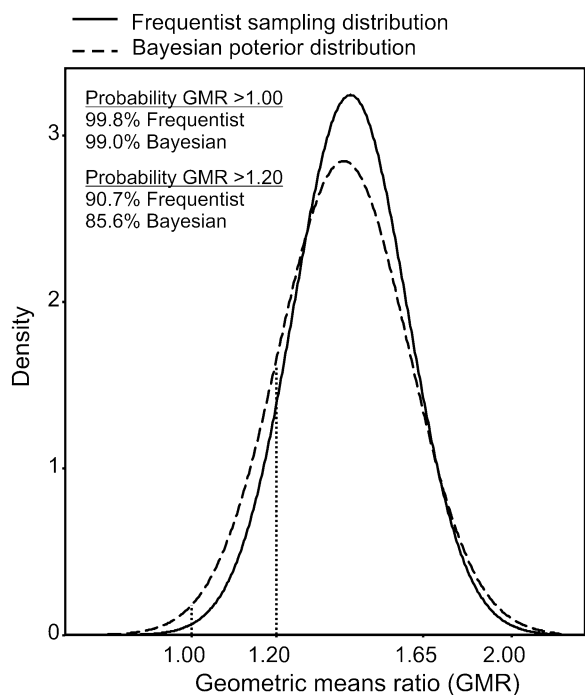
**Table 5** Comparison of pharmacokinetic parameters between *ABCG2* c.421C>A variant allele carriers and wild-type homozygotes (as geometric means ratios, GMR, for variant/wild type) in the entire dataset (unmatched and unadjusted) and the matched dataset (with additional adjustment)

	Unmatched/unadjusted			Matched/adjusted <sup>1</sup>		
	Bayesian			Bayesian		
	Frequentist GMR (95% CI) P	Frequentist GMR (95% CrI) P(GMR ≠ 1.0); P	Frequentist GMR (95% CrI) P	Frequentist GMR (95% CI) P	Frequentist GMR (95% CrI) P(GMR ≠ 1.0); P	Frequentist GMR (95% CrI) P(GMR ≠ 1.0); P
AUC <sub>τ,ss</sub> (mg h/L)	1.45 (1.10–1.92) 0.009	1.38 (1.07–1.81) 99.2%; 0.016	1.41 (1.11–1.79) 0.011	1.39 (1.05–1.81) 99.0%; 0.020		
C <sub>max,ss</sub> (mg/L)	1.01 (0.71–1.44) 0.940	1.01 (0.74–1.39) 53.3%; 0.934	1.16 (0.80–1.68) 0.381	1.10 (0.78–1.52) 72.1%; 0.557		
C <sub>0</sub> (mg/L)	1.66 (0.99–2.79) 0.056	1.39 (0.91–2.11) 93.7%; 0.126	1.23 (0.62–2.41) 0.517	1.32 (0.86–2.08) 88.9%; 0.222		
C <sub>12</sub> (mg/L)	1.57 (0.88–2.81) 0.123	1.30 (0.84–2.06) 87.8%; 0.243	1.21 (0.60–2.41) 0.560	1.28 (0.81–2.06) 84.5%; 0.310		
CL <sub>T,ss</sub> (mL/min/kg)	0.66 (0.48–0.90) 0.010	0.71 (0.53–0.95) 98.9%; 0.022	0.73 (0.58–0.93) 0.016	0.71 (0.54–0.95) 98.8%; 0.024		
C <sub>max</sub> /AUC <sub>τ</sub> (1/h)	0.70 (0.50–0.96) 0.029	0.75 (0.55–0.99) 97.5%; 0.050	0.81 (0.57–1.14) 0.193	0.81 (0.60–1.15) 89.6%; 0.208		

<sup>1</sup>Additionally adjusted for body mass index, estimated creatinine clearance, and donors' *ABCC2* 1249 G>A genotype

AUC<sub>τ,ss</sub> area under the concentration–time curve during dosing interval at steady state, C<sub>max,ss</sub> peak plasma concentration at steady state, C<sub>0</sub> morning pre-dose trough, C<sub>12</sub> evening trough, CL<sub>T,ss</sub> apparent total body clearance at steady state

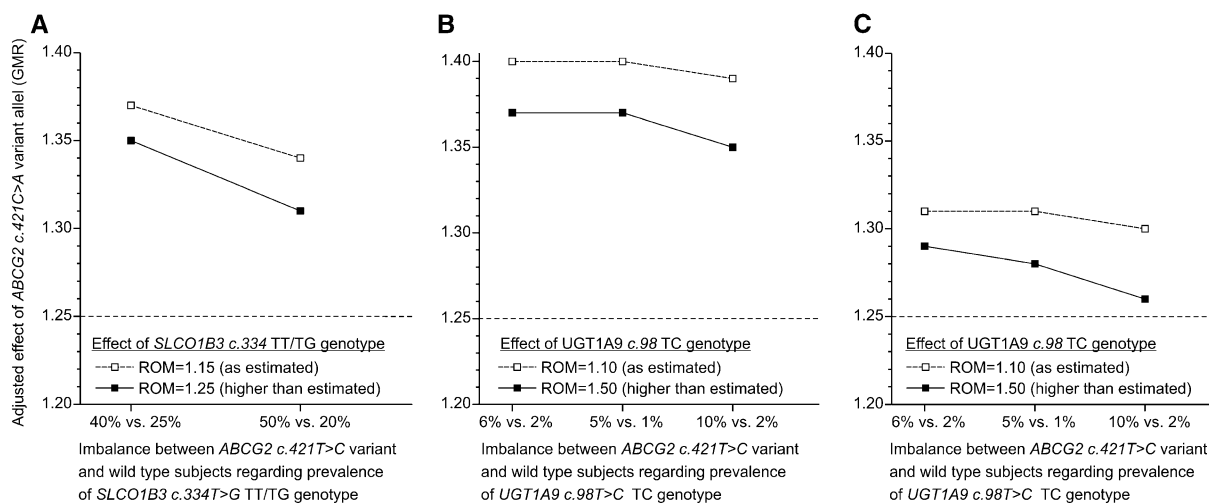
estimates are consistent based on raw data (patients free of relevant interfering comorbidities and co-medication) and in matched/adjusted analysis, where a number of further potential confounders, “classical” and pharmacogenetic, were controlled for. Considering the latter, we did not account for the *SLCO1B3* c.334T>G (rs4149117) or *UGT1A9*\*3 (c.98T>C, rs72551330) SNPs. OATP1B3 mediates MPAG uptake, and variant *SLCO1B3* c.334T>G shows around 40% reduced activity in vitro [33]. We identified four studies (two in European patients [31, 33], and one each in Chinese [34] and Japanese [35] patients) reporting crude mean ± SD dose-adjusted MPA AUC<sub>τ,ss</sub> in TT/TG versus GG patients on IR MMF co-treated with CsA (three cohorts) or macrolactam immunosuppressants (three cohorts): pooled TT/TG versus GG differences in the co-treatment subgroups (consistently) and overall suggested a slight tendency of higher exposure (by 10–15%) in TT/TG subjects (Fig. S2). The most compelling individual study findings were those [31] suggesting around 24% higher (crude) AUC in 56 TT/TG versus 111 GG patients co-treated with CsA, and around 18% higher AUC in 54 TT/TG versus 107 GG patients co-treated with macrolactams. The *UGT1A9* c.98 T>C SNP results in reduced enzyme activity in vitro [36]. We identified three studies (European patients) [32, 33, 37] reporting crude AUC<sub>τ,ss</sub> in TC versus TT patients on IR MMF co-treated with CsA (two cohorts) or with macrolactams (three cohorts): pooled TC versus TT differences consistently suggested a mild tendency of higher (by ~10%) exposure in TC subjects (Fig. S3). The most compelling individual study findings were those [32] reporting around 50% higher AUC (time-averaged estimate of six measurements over 1 year) in 5 TC versus 170 TT patients co-treated with CsA and in 5 TC versus 158 TT patients co-treated with tacrolimus. The present sensitivity analysis (Fig. 3) demonstrates that even with a marked simultaneous imbalance between *ABCG2* c.421C>A variant and wt patients regarding both TT/TG (*SLCO1B3*) and TC (*UGT1A9*) genotypes, and assuming their maximum reported effects, bias-adjusted estimate of the *ABCG2* c.421C>A variant allele effect would still be > 1.25 (i.e., above the conventional



**Fig. 2** Frequentist sampling distribution and Bayesian posterior distribution of the geometric means ratio (GMR) generated in the matched/adjusted comparison of total exposure ( $AUC_{\tau,ss}$ ) in variant allele carriers and wild type controls. Dotted vertical lines indicate  $GMR = 1.00$  (“no effect”) and  $GMR = 1.20$ —depicted are probabilities of GMRs  $> 1.0$  and  $> 1.20$

upper limit of equivalent exposure). However, it is not very likely that the present estimate was biased by these two SNPs to such an extent because (i) all the reported values were crude, unadjusted values; (ii) there is no biologically plausible reason to expect such a huge simultaneous imbalance in prevalence of the two genotypes between *ABCG2* variant and wt subjects; (iii) *UGT1A9* *c.98 T>C* SNP is rare, and a reasonably expected number of TC subjects in the present sample is two to three; and (iv) population pharmacokinetic models in French [38] and Chinese patients [39] found no association between these two SNPs and MPA clearance. Also, it does not seem likely that other enzyme/transporter SNPs could explain the present observations. Three *UGT1A9* promoter SNPs [beyond  $-275 T>A$  (rs6714486) and  $-2152C>T$  (rs17868320) that we controlled for] are associated with increased *UGT1A9* levels in

the liver:  $-440C>T$  (rs2741045),  $-331 T>C$  (rs2741046) and  $-665C>T$  (rs10176426) [4, 5, 40]. However, studies have failed to provide consistent signals about association of any of these SNPs and exposure to MPA; moreover, rs6714486 and rs17868320 are in complete LD with these SNPs and form two haplotypes (*UGT1A9*\*1*l* and \*1*n*) [40]. Therefore, by controlling for rs6714486 and rs17868320, one controls also for several SNPs that were not directly genotyped. No consistent signal of association with MPA exposure has been found for several other *UGT1A9* SNPs (rs6731242, rs13418420, rs3832043, rs2741049, rs13418420, rs17868323) [4, 5, 39, 41]. Moreover, rs6714486 and rs17868320 are in LD with some of them (haplotypes *UGT1A9*1*v* and \*1*w*) [40]. Apart from *UGT2B7*  $802C>T$  (rs7439366), here “represented” by rs7668258 (since in complete LD), studies have consistently failed to yield a clear, reproducible signal of association of any other *UGT2B7* SNP and exposure to MPA. The same applies for a number of evaluated *UGT1A1*, *1A7*, and *1A8* SNPs [4, 5, 39, 41]. In the present analysis, we evaluated the effect of one of the *ABCG2* polymorphisms (rs2231142). Reduced transporter function has been associated with three further SNPs (rs34783571, rs192169062, and rs34264773), for three SNPs, no effect on function is reported, and for the other SNPs, the functional consequences are unknown [8]. The estimated global cumulative minor allele prevalence of all “reduced function” SNPs is 0.68%, and for combined “unknown” and “reduced” it is 1.3% [8]—this implies that, at most, one of the present patients should be reasonably expected to carry any of these SNPs, and it is highly unlikely that this possibility affected the present estimates. Similarly, the three *ABCB1* (linked) SNPs controlled for are by far the most prevalent (among Caucasians) coding *ABCB1* variants. Cumulative prevalence of other six coding *ABCB1* SNPs in Caucasians is around 10% [42], suggesting that, at most, six to seven patients in the current sample might have harbored any of those SNPs. To be accountable to any relevant part of the present observations, all such (hypothetical) SNPs should have had marked and synergistic effects—not a likely scenario, as reviewed recently [43], most



**Fig. 3** Sensitivity analysis of the effect of *ABCG2* *c.421C>A* variant allele on MPA  $AUC_{\tau,ss}$  ( $GMR = 1.40$ ) to account for hypothetical bias arising from not accounting for the *SLCO1B3* *c.334T>G* and *UGT1A9* *c.98T>C* SNPs. Effect of the TT/TG (versus GG) *SLCO1B3* *c.334* genotype is estimated at  $ROM = 1.136$  (95% CI 0.949–1.361) (Fig. S2); effect of the TC (versus TT) *UGT1A9* *c.98* genotype is estimated at  $ROM = 1.098$  (0.548–2.198) (Fig. S3); and prevalence of the TT/TG and TC genotypes is estimated at 31% and 3.9%, respectively (Fig. S4). Shown are bias-adjusted effects (GMRs) of the *ABCG2* *c.421C>A* variant allele, assuming considerable imbalance between variant carriers and wild-type controls in prevalence of confounders (i.e., *SLCO1B3* *c.334* TT/TG genotype and *UGT1A9* *c.98* TC genotype) and different effects of confounders (expressed as ratio of means, ROM)—those estimated based on published studies (Figs. S2 and S3), and larger effects. **A** Confounder to adjust for is *SLCO1B3* *c.334 T>G* genotype TT/TG (versus GG). Effect to adjust is  $GMR = 1.40$ . The confounder effect is estimated at  $ROM = 1.136$ , rounded

up to 1.15. The “higher than estimated” ( $ROM = 1.25$ ) is the effect somewhat higher than reported in the largest individual study, with 110 TT/TG and 218 GG subjects [31]. **B** Confounder to adjust for is *UGT1A9* *c.98T>C* genotype TC (versus TT). Effect to adjust is 1.40. The confounder effect is estimated at 1.098, rounded up to 1.10. The “higher than estimated” ( $ROM = 1.50$ ) is the effect somewhat higher than reported in the largest individual study, with 10 TC and 328 TT subjects [32]. **C** Assumed is simultaneous and maximum imbalance between *ABCG2* *c.421* variant carriers and wild-type controls regarding *SLCO1B3* *c.334T>G* TT/TG genotype (50% versus 20%) and regarding *UGT1A9* *c.98T>C* TC genotype (10% versus 2%), with consecutive adjustment for their larger effects ( $ROM = 1.25$ ,  $ROM = 1.50$ ): initial estimate ( $GMR = 1.40$ ) is first adjusted for TT/TG to  $GMR = 1.31$ , and  $GMR = 1.31$  is further adjusted for *UGT1A9* SNP. Dashed horizontal line depicts the conventional upper limit of equivalent exposure ( $GMR = 1.25$ )

of them have no practical relevance in drug pharmacokinetics. The same is applicable to the *ABCC2* SNPs (beyond those controlled for in the present study) and a wide range of investigated *ABCC1* and *ABCC3* SNPs [43]. Specifically, with respect to MPA, apart from *ABCC2* *1249G>A* (rs2273697) and *-24C>T* (rs71762) controlled for in the present analysis, studies have consistently failed to identify a relevant signal of association between MPA exposure and a range of investigated *ABCC2* SNPs (rs3740066, rs8187710, rs1885301, rs7910642,

rs113646094, rs8187694, rs17222723, rs3740066, rs2804402) and *ABCC3* SNPs (rs4793665, rs2277624) [4, 5, 39, 41]. Finally, (apart from the *SLCO1B1* *c.521T>C*, in LD with *c.388A>G*, controlled in the present study, and already discussed *SLCO1B3* *c.334T>G*), no consistent signal of association between a range of *SLCO1B1* and *1B3* SNPs and MPA exposure has been detected across numerous individual studies [4, 5, 39, 41]. To attribute the observed effect to these unmeasured but unlikely confounders, one needs to assume their

simultaneous synergistic effects. The present sensitivity analysis suggests that even if it existed and is marked (GMR = 1.60), such a (hypothetical) cumulative confounding effect would not completely explain away the observed effect, since the GMR for the variant *ABCG2 c.421C>A* allele versus wild type would still be 1.20. Overall, it is justified to state that the present data reasonably and validly document an effect of the *ABCG2 c.421C>A* variant allele on steady-state exposure to MPA in renal transplant patients. Discrepancy between the present results and earlier studies not detecting associations between exposure to MPA and *ABCG2 c.421C>A* SNP might, at least in part, be due to methodological differences. A study in Chinese patients co-treated with CsA reported slightly higher crude dose-adjusted  $AUC_{\tau,ss}$  in 17 variant carriers than in 20 wt controls ( $30.9 \pm 13.0$  versus  $27.7 \pm 10.7$  mg h/L) [34]. Our patients were co-treated with CsA or tacrolimus (and matched for CNI and CNI troughs). Neither CsA nor tacrolimus are *ABCG2* substrates, but both are *ABCG2* inhibitors, and their inhibitory effect might differ, particularly under *c.421* SNP (with reduced transporter numbers) [44–46]. Two larger studies (Chinese [47] and Brazilian [48] patients) reporting no association between the *c.421* SNP and MPA measured only trough concentrations, while present data refer to  $AUC_{\tau,ss}$  (note, in the present analysis, dose-adjusted MPA troughs tended to be higher in variant carriers, but variability was high), while a Chinese population pharmacokinetic model included only patients co-treated with tacrolimus [39]. Clearly, it is difficult to directly compare results from observational studies differing in methodology and design, sampling populations and sizes, outcomes and control of confounding—each should be evaluated on its own merit. We believe that the present analysis reasonably supports a conclusion that the observed difference in  $AUC_{\tau,ss}$  between the *ABCG2 c.421C>A* variant and wt subjects is attributable to the fact of variant allele carriage.

The present study is limited by a modestly sized single-center sample, the fact that MPAG was not measured (as it is not part of routine TDM) and, relatedly, there are no insights into

possible mechanisms of the observed effect. A study in Japanese patients [11] reported higher steady-state MPAG concentrations in 44 *c.421C>A* variant carriers than in 36 wt controls (median 1540 versus 1195 mg h/L;  $P = 0.029$ ; corresponds to ROM = 1.29), and suggested involvement of *ABCG2* in MPAG-MPA recirculation. The current observations (Fig. 1, Table 5) of similar  $C_{max}$  (at around 2 h post-dose), but clearly larger  $AUC_{\tau,ss}$  in variant carriers versus wt controls indirectly support such a possibility: the difference in AUC is primarily due to differences that occurred between 3 and 12 h post-dose, which is in agreement with hypothetical differences in MPAG recirculation.

## CONCLUSIONS

Present data strongly suggest that the variant *ABCG2 c.421C>A* allele increases steady-state exposure to MPA in stable renal transplant patients. Further studies are needed to validate this observation and elucidate underlying mechanism(s).

## ACKNOWLEDGEMENTS

**Funding.** No funding or sponsorship was received for this study or publication of this article.

**Author Contributions.** All named authors meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship for this article, take responsibility for the integrity of the work as a whole, and have given their approval for this version to be published.

**Disclosures.** Ana Borić Bilušić, Nada Božina, Zdenka Lalić, Mila Lovrić, Sandra Nađ-Škegro, Luka Penezić, Karmela Barišić and Vladimir Trkulja have nothing to disclose.

**Compliance with Ethics Guidelines.** Study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Center Zagreb (approval No. 8.1-17/242-2 02/21, January 30, 2018). All



procedures performed in the study were in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients included in the present analysis underwent standard routine therapeutic drug monitoring in their post-transplant period. Those meeting inclusion criteria were included only if they signed an informed consent for genotyping of pharmacogenes for research purposes.

**Data Availability.** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## REFERENCES

1. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46:13–58.
2. Tett SE, Saint-Marcoux F, Staatz CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M, et al. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev.* 2011;5: 47–57.
3. Lamba V, Sanhavi K, Fish A, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway. *Pharmacogenet Genom.* 2014;24:73–9.
4. Dalla Vecchia Genvigir F, Cerda A, Dominguez Crespo Hirata T, Hirata MH, Hirata DC. Mycophenolic acid pharmacogenomics in kidney transplantation. *J Transl Genet Genom.* 2020;4:320–55.
5. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, et al. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the International association on therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2021;43:150–200.
6. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. International transporter consortium: membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:215–36.
7. Giacomini KM, Balimane PV, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, et al. International transporter consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:23–6.
8. Foher AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Pharm GKB summary: very important pharmacogene information for *ABCG2*. *Pharmacogenet Genom.* 2017;27:420–7.
9. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Kobayashi D, et al. Functional analysis of SNPs variants of *BCRP/ABCG2*. *Pharm Res.* 2004;21:1895–903.
10. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, et al. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter *ABCG2* undergoes lysosomal and proteosomal degradations. *Pharm Res.* 2009;26:469–79.
11. Miura M, Kagaya H, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T, Suzuki T. Influence of drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2008;30:559–64.
12. Trkulja V, Lalić Z, Nađškegro S, Lebo A, Granić P, Lovrić M, et al. Effect of cyclosporine on steady-state pharmacokinetics of MPA in renal transplant recipients is not affected by the MPA formulation: analysis based on therapeutic drug monitoring data. *Ther Drug Monit.* 2014;36:456–64.
13. Božina N, Lalić Z, Nađškegro S, Borić-Bilušić A, Božina T, Kaštelan Ž, Trkulja V. 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;73:1129–40.
14. Hu DG, Meech R, Lu L, McKinnon RA, Mackenzie PI. Polymorphisms and haplotypes of the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:854–62.
15. Pearl J. *Causality: models, reasoning and inference.* 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
16. Knol MJ, VanderWeele TJ. Recommendations for presenting analyses of effect modification and interaction. *Int J Epidemiol.* 2016;42:514–20.
17. VenderWeele TJ, Rothman KJ, Lash TL. Confounding and confounders. In: Lash TL, VanderWeele TJ, Haneuse S, Rothman KJ, editors. *Modern epidemiology.* 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2021. p. 610–67.
18. Textor J, van der Zander B, Gilthorpe MS, Liskiewicz M, Elliot GTH. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package “dagitty.” *Int J Epidemiol.* 2016;45:1887–94.

19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
20. Endrenyi L, Gritsch S, Yan W. Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1991;29:394–9.
21. Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIT: non-parametric preprocessing for parametric causal inference. *J Stat Software.* 2011;42:1–28. <https://doi.org/10.18637/jss.v042.i08>.
22. Hansen BB, Olsen KS. Optimal full matching and related designs via network flows. *J Comput Global Stat.* 2006;15:609–27.
23. King G, Nielsen R. Why propensity scores should not be used for matching. *Polit Anal.* 2019;27:435–54.
24. Goodrich B, Gabry J, Ali I, Brilleman S. rstanarm: Bayesian applied regression modeling via Stan. R package version 2.21.3, 2022, <https://mc-stan.org/rstanarm/>
25. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool “CubeX.” *BMC Bioinform.* 2007;8(1):428. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-428>.
26. VanderWeele TJ, Ding P. Sensitivity analysis in observational research: introducing the E-value. *Ann Intern Med.* 2017;167:268–74.
27. Schneeweiss S. Sensitivity analysis and external adjustment for unmeasured confounders in epidemiological database studies of therapeutics. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2006;15:291–303.
28. Haine D. The episensr package: basic sensitivity analysis of epidemiological results. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4554553>, R package version 1.1.0, <https://dhaine.github.io/episensr>
29. Balduzzi S, Rücker G, Schwarzer G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health.* 2019;22:153–60.
30. Friedrich JO, Adhikari NKJ, Beyene J. The ratio of means method as an alternative to mean differences for analyzing continuous outcome variables in meta-analysis: a simulation study. *BMC Med Res Methodol.* 2008;8:32. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-8-32>.
31. Boumar R, Hessenlink DA, van Schaik RHN, Weimar W, van der Heiden I, de Fijter JW, et al. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLCO1B1 nor with ABCB1 in renal transplant recipients. *Pharmacogen Genom.* 2012;22:399–407.
32. van Schaik RHN, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, et al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86:319–27.
33. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, Marquet P. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharm Ther.* 2010;87:100–8.
34. Geng F, Jiao Z, Dao YJ, Qiu XY, Ding JJ, Shi X, et al. The association of the UGT1A8, SLCO1B3 and ABCC2/ABCG2 genetic polymorphisms with the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide metabolite in Chinese individuals. *Clin Chim Acta.* 2012;423:683–90.
35. Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue M, 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;63:1161–9.
36. Bernard O, Cuillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:775–8.
37. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrentghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78:351–61.
38. Zhao W, Fakhoury M, Deschenes G, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal transplant patients. *J Clin Pharmacol.* 2010;50:1280–91.
39. Yang CI, Shen CC, Liao GY, Yong S, Feng LJ, Xia Q, et al. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: a population analysis. *J Clin Pharm Ther.* 2021;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13488>.
40. UGT alleles Nomenclature. Available at <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/> (last accessed July 11, 2022)

41. Takuathung MN, Sakuludomkan W, Koonrungsesomboon N. The impact of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid: systematic review and meta-analysis. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60:1291–302.
42. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin Pharmacokinet.* 2015;54:709–35.
43. Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2 and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding. *Exp Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17:369–96.
44. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23:563–85.
45. Gupta A, Dai Y, Vethanayagam RR, Herber MF, Thummel KE, Unadkat JD, et al. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;58:374–83.
46. Bakhsheshian J, Hall MD, Robey RW, Herrmann MA, Chen JQ, Bates SE, Gottesman MM. Overlapping substrate and inhibitor specificity of human and murine ABCG2. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:1805–12.
47. Li LQ, Chen DN, Li CJ, Li QP, Chen Y, Fang P, et al. Impact of UGT2B7 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid metabolism in Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics.* 2018;19:1323–34.
48. Dalla Vecchia Genvigir F, Campus-Salazar AB, Rosso Felipe C, Tedesco-Silv H, Medina-Pestana JO, de Quateli DS, et al. *CYP3A5\*3* and *CYP2C8\*3* variants influence exposure and clinical outcomes of tacrolimus-based therapy. *Pharmacogenomics.* 2020;21:7–21.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

# 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

N. Božina<sup>1,2</sup> · Z. Lalić<sup>3</sup> · S. Nađ-Škegro<sup>4</sup> · A. Borić-Bilušić<sup>5</sup> · T. Božina<sup>6</sup> · Ž. Kaštelan<sup>7</sup> · V. Trkulja<sup>2</sup>

Received: 9 March 2017 / Accepted: 9 June 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

## Abstract

**Purpose** The study aims to evaluate the impact of recipients' and donors' polymorphisms in multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene *ABCC2* -24C>T and 1249G>A on disposition of mycophenolic acid (MPA) and their interaction with cyclosporine (CsA) (compared to tacrolimus, TAC) in stable de novo adult renal transplant patients of Croatian origin.

**Methods** A total of 68 recipient-donor pairs were genotyped. Steady-state pharmacokinetics of MPA was assessed by the model-independent method.

**Results** Adjusted for MPA formulation, renal function, type of calcineurin inhibitor and recipients' and donors' genotypes at the two loci, donors' A-allele at 1249G>A was associated with a reduced peak (29%) and early ( $AUC_{0-2}$ , 33%) exposure and increased MPA clearance (26%). Donors' A-allele combined with CsA was associated with 78% higher MPA clearance, 49% lower early and 48% lower total exposure as compared to wild type homozygosity + TAC. Recipients' SNPs per se

did not reflect on MPA disposition. However, A-allele at 1249G>A + CsA (compared to wild type + TAC) was associated with a numerically greater increase in MPA clearance (59 vs. 41%), reduction in total exposure (36 vs. 27%) and increase in absorption rate ( $C_{max}/AUC$ ) (56 vs. 37%) than observed for the main effect of CsA. Less pronounced effects were observed for the combination of variant allele at -24C>T and CsA.

**Conclusion** Considering MPA disposition, data indicate: donors' *ABCC2* 1249G>A polymorphism increases clearance and reduces exposure; CsA increases clearance and reduces exposure by inhibiting MRP2 in the gut, the liver, and the kidney; donors' *ABCC2* 1249G>A polymorphism enhances the renal CsA effect, while recipients' polymorphism seems to enhance the liver and the gut CsA effects.

**Keywords** Renal transplantation · Immunosuppression · Mycophenolic acid · Cyclosporine · Tacrolimus · *ABCC2* protein

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00228-017-2285-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ N. Božina  
nbozina@kbc-zagreb.hr

<sup>1</sup> Division of Pharmacogenomics and Therapy Individualization, Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Zagreb University School of Medicine, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Department of Laboratory Diagnostics, Analytical Toxicology and Pharmacology Division, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> Department of Urology, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>5</sup> Agency for Medicinal Products and Medical Devices of Croatia, Zagreb, Croatia

<sup>6</sup> Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Chemistry, Zagreb University School of Medicine, Zagreb, Croatia

<sup>7</sup> Department of Urology, University Hospital Center Zagreb, Zagreb University School of Medicine, Zagreb, Croatia

## Introduction

Mycophenolic acid (MPA) is an antimetabolite immunosuppressant of choice in solid organ transplantation. Regardless of the (oral) formulation (immediate-release ester pro-drug mycophenolate mofetil, MMF, or enteric-coated sodium salt, EC-MPS), pharmacokinetics (PK) of MPA is complex and variable; hence, MPA is subject to therapeutic drug monitoring (TDM) [1, 2].

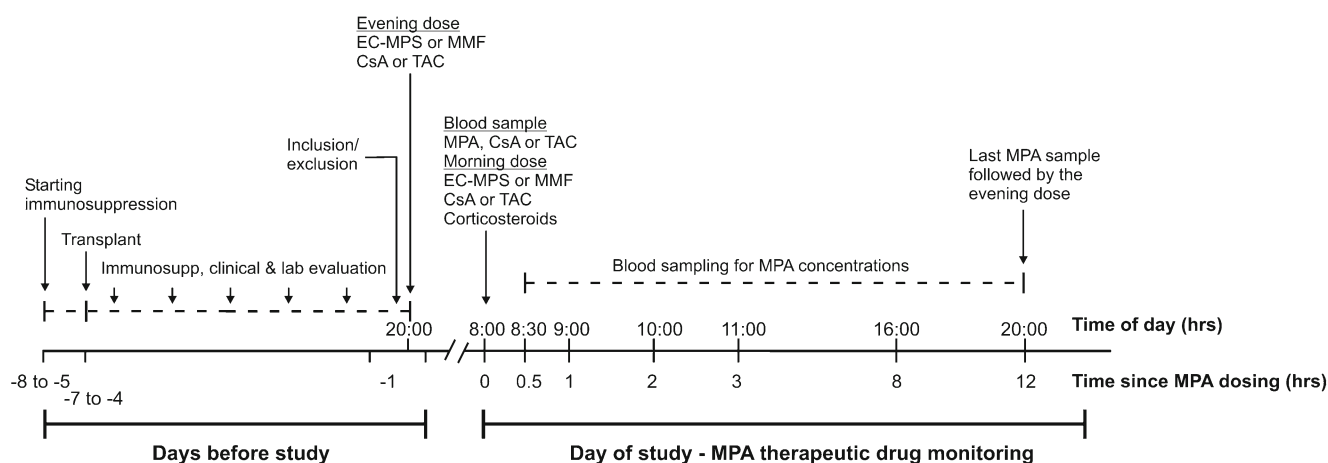
MPA is extensively metabolized in the liver by glucuronidation to inactive MPA-phenyl-glucuronide (MPAG) and a minor acyl-MPAG. Glucuronides are largely excreted into the bile, deglucuronidated in the gut, and contributed to MPA enterohepatic re-circulation accounting for 10–61% of total MPA exposure (a second increase in concentration 6–12 h after dosing). Final elimination is by the kidney apparently by active secretion (MPAG) involving organic anion transporters [1]. Reduced renal function reduces MPAG/MPA elimination and increases total circulating MPA. Exposure to MPA is strongly related to its effects in renal transplant recipients: low(er) area under the concentration-time curve over dosing interval and pre-dose levels increase the risk of acute rejections [3, 4].

Variability in MPA PK is due to a number of factors including gender, serum albumin, renal function, co-medication, and genetics [1]. Regarding the latter two, calcineurin inhibitors (CNIs) included in standard immunosuppressant protocols in renal transplantation, cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (TAC), affect exposure to MPA with more profound effects of CsA [1, 5]. CsA increases MPA clearance and reduces pre-dose levels. Inhibition of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/*ABCC2*) resulting in a reduced enterohepatic re-circulation of MPAG/MPA is considered to be the main CsA effect [5–7]. MRP2, a member of the ATP-binding

cassette (ABC) transporter superfamily, is expressed at the apical hepatocyte membrane, the luminal membrane of the proximal renal tubular cells, in the intestinal epithelium, placenta, and some other organs. Both MPA and MPAG are substrates for MRP2, and MRP2 is considered the main transporter in MPAG excretion in the liver [8], although this role was suggested also for the breast cancer resistance protein (BCRP/*ABCG2*) [9]. Animal studies indicate the role of MRP2 in MPAG/MPA transport in the kidneys. In vitro, CsA potently inhibits MRP2-mediated MPAG transport, while TAC has no effect [10].

Several SNPs in the *ABCC2* gene encoding MRP2 might partly explain variability in MPA PK. In vitro, *ABCC2* -24C>T variant (rs717620) decreases the *ABCC2* promoter activity [11]. Recipients' variant allele carriage at this locus had no major impact on MPA disposition in several studies in solid organ transplant patients [12–16], but an “additive” effect to the effect of SNPs in glucuronidation enzymes has been suggested [17]. Moreover, the *ABCC2* -24C>T might modify the effect of CsA on MRP2 [18–20]. The *ABCC2* 1249G>A SNP in exon 10 (rs2273697) (valine-to-isoleucine at position 417) in vitro has no effect on MRP2 expression or activity [21] but appears associated with a reduced expression of MRP2 in preterm placenta [22]. To our knowledge, there have been no reports to indicate relevance of this SNP for disposition of MPA.

Little is known about potential effects of the donors' *ABCC2* SNPs in renal transplantation. Certain variant alleles, but not -24C>T or 1249G>A, were reported associated with delayed graft function [23]. However, there have been no reports on effects of donors' *ABCC2* SNPs on exposure to MPA. Here, we investigate the impact of recipients' and donors' *ABCC2* -24C>T and 1249G>A on steady-state exposure to MPA and their interaction with CsA, an inhibitor of several transporter proteins [24] in stable de novo renal transplant patients.



**Fig. 1** Study flow. See “Patients and Methods” for details. Renal transplant recipients on immunosuppressive therapy (based on mycophenolic acid and cyclosporine or tacrolimus) for 5–8 days meeting predefined criteria were included in the present analysis of steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid during a dosing

interval based on data obtained through routine therapeutic drug monitoring. *EC-MPS* enteric-coated mycophenolate sodium, *MMF* mycophenolate mofetil immediate-release formulation, *CsA* cyclosporine, *TAC* tacrolimus, *MPA* mycophenolic acid

**Table 1** Patient characteristics in respect to recipients' and donors' *ABCC2* genotype. Data are median (range), mean  $\pm$  SD, or count (%)

	Recipient <i>ABCC2</i> -24C>T genotype		Recipient <i>ABCC2</i> 1249G>A genotype		Donor <i>ABCC2</i> -24C>T genotype		Donor <i>ABCC2</i> 1249G>A genotype	
	CC ( <i>n</i> = 47)	T-carrier ( <i>n</i> = 21)	GG ( <i>n</i> = 41)	A-carrier ( <i>n</i> = 27)	CC ( <i>n</i> = 39)	T-carrier ( <i>n</i> = 29)	GG ( <i>n</i> = 41)	A-carrier ( <i>n</i> = 27)
Age (years)	52 (15–71)	53 (22–65)	54 (22–71)	50 (15–67)	53 (25–69)	52 (15–71)	51 (22–67)	55 (15–71)
Male	24 (51.1)	11 (52.4)	20 (48.8)	15 (55.6)	21 (53.9)	14 (48.3)	20 (48.8)	15 (55.6)
Weight (kg)	69 (37–101)	65 (48–92)	67 (48–101)	69 (37–100)	66 (37–101)	69 (50–100)	72 (41–101)	66 (37–100)
Height (cm)	168.1 $\pm$ 11.4	167.9 $\pm$ 9.0	165.9 $\pm$ 8.8	171.4 $\pm$ 12.5	167.7 $\pm$ 9.5	168.7 $\pm$ 12.2	168.9 $\pm$ 12.0	166.9 $\pm$ 8.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 (14–39)	24 (17–28)	24 (17–39)	23 (14–31)	24 (14–39)	24 (18–31)	25 (17–39)	24 (14–29)
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	154 (89–266)	165 (89–302)	152 (89–302)	165 (93–262)	157 (93–302)	161 (89–248)	161 (89–266)	152 (93–302)
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	34 (14–102)	34 (17–67)	37 (14–102)	34 (20–65)	37 (14–67)	29 (19–102)	32 (14–102)	40 (17–65)
Corticosteroid-treated	68 (100)	68 (100)	41 (100)	27 (100)	39 (100)	29 (100)	41 (100)	27 (100)
Prednis. eq. dose (mg)	40 (20–75)	30 (20–60)	40 (20–60)	30 (20–75)	30 (20–60)	40 (20–75)	40 (20–75)	30 (20–63)
EC-MPS-treated	30 (63.8)	15 (71.4)	30 (73.2)	15 (55.6)	26 (66.7)	19 (65.5)	26 (63.4)	19 (70.4)
EC-MPS dose (mg) <sup>a</sup>	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid	All 720 bid
MMF-treated	17 (36.2)	6 (28.6)	11 (26.8)	12 (44.4)	13 (33.3)	10 (34.5)	15 (36.6)	8 (29.6)
1000 mg (739 MPA) bid	12	6	10	8	11	7	12	6
750 mg (554 MPA) bid	2	0	0	2	1	1	1	1
500 mg (370 MPA) bid	3	0	1	2	1	2	2	1
CsA-treated	28 (59.6)	15 (71.4)	26 (63.4)	17 (29.6)	27 (69.2)	16 (55.2)	27 (65.9)	16 (59.3)
Morning dose (mg/kg)	2.47 (1.03–3.65)	2.38 (1.28–3.52)	2.43 (1.28–3.52)	2.44 (1.03–3.65)	2.38 (1.28–3.65)	2.50 (1.03–3.52)	2.43 (1.03–3.52)	2.47 (1.28–3.65)
Evening dose (mg/kg)	2.59 (1.29–4.00)	2.14 (0.96–3.52)	2.44 (0.96–4.00)	2.44 (1.29–4.00)	2.30 (0.96–3.66)	2.59 (1.29–4.00)	2.44 (1.29–4.00)	2.37 (0.96–3.65)
CsA C <sub>trough</sub> ( $\mu$ g/L)	201 (70–341)	193 (139–279)	196 (133–341)	203 (70–341)	199 (70–341)	198 (133–341)	199 (70–341)	200 (143–341)
TAC-treated	19 (40.4)	6 (28.6)	15 (36.6)	10 (70.4)	12 (30.8)	13 (44.8)	14 (34.1)	11 (40.7)
Morning dose (mg/kg)	0.04 (0.02–0.08)	0.04 (0.03–0.05)	0.04 (0.02–0.06)	0.04 (0.02–0.08)	0.04 (0.02–0.08)	0.04 (0.03–0.06)	0.04 (0.02–0.05)	0.04 (0.02–0.08)
Evening dose (mg/kg)	0.04 (0.02–0.11)	0.05 (0.04–0.07)	0.05 (0.02–0.07)	0.04 (0.03–0.11)	0.04 (0.02–0.11)	0.05 (0.03–0.07)	0.05 (0.02–0.07)	0.05 (0.03–0.11)
TAC C <sub>trough</sub> ( $\mu$ g/L)	10.4 (5.2–27.4)	9.1 (3.4–13.6)	9.6 (3.7–20.1)	9.6 (3.4–27.4)	10.0 (3.4–27.4)	9.0 (5.2–20.1)	8.9 (3.4–15.4)	10.9 (6.6–27.4)

MPA mycophenolic acid, EC-MPS enteric-coated MPA sodium salt, MMF mycophenolate mofetil, CsA cyclosporine, TAC tacrolimus, BMI body mass index, eGFR estimated glomerular filtration rate, bid bis in die (twice daily)

<sup>a</sup> 720 mg of MPA sodium salt corresponds to 674 mg of MPA

**Patients and methods**

**Study outline**

This prospective observational study was approved by the institutional Ethics Committee and is outlined in Fig. 1. Study procedures were described in detail previously [25]. Briefly, renal transplant recipients on a standard immunosuppressant treatment including MPA, a CNI (CsA or TAC), and corticosteroids for 5–8 days (i.e., 4–7 days after transplantation) (attained steady-state of MPA, CsA, and TAC) were included if meeting the predefined criteria: (1) informed consent; (2) stable clinical condition based on a close monitoring over the pre-study days (Fig. 1): (a) no surgical complications, (b) no signs of graft dysfunction/rejection, (c) no severe comorbidity (cardiovascular, hepatic, metabolic, infections, gastrointestinal), (d) low immunological risk, (e) serum creatinine  $\leq 300 \mu\text{mol/L}$  (or estimated glomerular filtration rate  $\geq 14 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ) and by at least 1/3 lower than the initial value (first postoperative day) and stable diuresis at around 60 mL/h, (f) serum albumin  $>31 \text{ g/L}$ ; (3) not treated with proton pump inhibitors, antacids, phosphate binders, oral iron, magnesium or calcium, rifampicin, or any antibiotics during the pre-study and study days. A standard immunosuppressive protocol consisted of (a) EC-MPS (Myfortic<sup>®</sup>, Novartis, Switzerland) or MMF (CellCept<sup>®</sup>, Roche, Switzerland), (b) CsA (microemulsion formulation, Neoral<sup>®</sup>, Novartis, Switzerland) or TAC (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma Ireland), (c) prednisone (Decortin<sup>®</sup>, Merck, Germany) or methylprednisolone (Medrol<sup>®</sup>, Pfizer, Italy) starting post transplantation at 60 mg/day prednisone-equivalent dose for 3 days with a rapid reduction to 30 mg/day. All drugs were obtained commercially and their assignment was at the discretion of the attending physician.

**Bioanalytical methods**

Blood samples were drawn immediately before 08:00 H to determine trough concentrations of CsA, TAC, and MPA, followed by drug administration and six serial blood samples for determination of the MPA profile during the dosing interval at 0.5, 1, 2, 3, 8, and 12 h post-dose (Fig. 1). Whole blood CsA and TAC were determined by a validated affinity column-mediated immunoassay (Siemens, Germany). Total plasma MPA was determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) with UV/VIS spectrophotometric detector and Turbochrom software (Perkin Elmer, USA) using a commercially available HPLC kit and reverse-phase column for MPA in plasma (Chromsystems, Germany). All analytes were included in the external proficiency testing scheme (RfB and UK NEQUAS). Serum creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR) were determined as previously described [25].

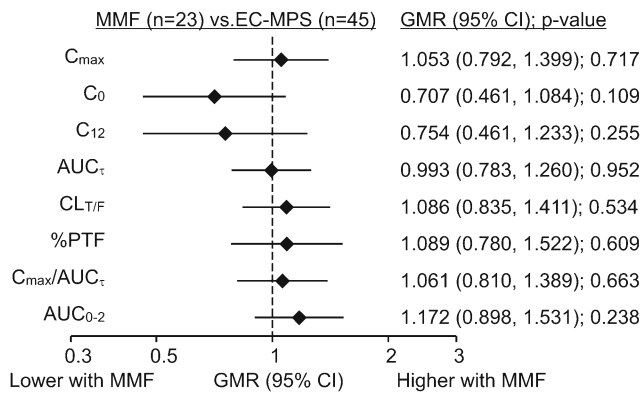
**Table 2** Dose-normalized (per mycophenolic acid dose) pharmacokinetic parameters of mycophenolic acid at steady-state in respect to recipients' and donors' ABCC2 genotype. Data are median (range)

	Recipient ABCC2 -24C>T genotype		Recipient ABCC2 1249G>A genotype		Donor ABCC2 -24C>T genotype		Donor ABCC2 1249G>A genotype	
	CC (n = 47)	T-carrier (n = 21)	GG (n = 41)	A-carrier (n = 27)	CC (n = 39)	T-carrier (n = 29)	GG (n = 41)	A-carrier (n = 27)
$C_{\text{max,ss}}$ (mg/L)	15.5 (3.1–51.2)	17.9 (11.2–44.7)	16.6 (3.1–51.2)	16.7 (5.8–39.3)	15.5 (3.1–34.9)	17.9 (6.8–51.2)	18.8 (6.8–51.2)	13.5 (3.1–39.3)
$T_{\text{max,ss}}$ (h)	1 (0–12)	2 (0.5–3)	2 (0–8)	1 (0–12)	2 (0–12)	1 (0–2)	1 (0–2)	2 (0–12)
$C_0$ (mg/L)	3.6 (0.6–17.4)	3.2 (0.5–12.4)	3.1 (0.5–17.4)	3.7 (0.6–13.8)	4.0 (0.6–17.4)	2.9 (0.5–8.4)	3.1 (0.5–17.4)	3.6 (0.6–13.8)
$C_{12}$ (mg/L)	1.8 (0.15–16.9)	2.3 (0.14–9.6)	2.4 (0.15–16.9)	1.8 (0.14–10.3)	2.3 (0.14–16.9)	1.9 (0.15–8.6)	2.2 (0.14–16.9)	1.8 (0.15–10.3)
$AUC_{0-12,ss}$ (mg·h/L)	50.7 (22.8–153)	58.3 (25.0–177)	53.5 (23.8–177)	52.4 (22.8–153)	50.2 (22.8–177)	53.5 (23.8–115)	53.8 (23.9–153)	50.2 (22.8–153)
$CL_{\text{T/F,ss}}$ (mL/min/kg)	3.5 (0.8–9.1)	2.6 (1.0–8.1)	3.1 (0.8–9.1)	3.5 (0.8–8.1)	3.5 (0.8–8.1)	3.0 (0.9–9.1)	3.1 (0.8–8.1)	3.5 (0.8–9.1)
%PTF	334 (52–1120)	365 (124–1054)	333 (52–1120)	341 (108–1053)	332 (52–1053)	365 (124–1120)	366 (94–1053)	217 (52–1120)
$C_{\text{max}}/AUC_{\tau}$ (1/h)	0.30 (0.10–0.94)	0.32 (0.15–0.88)	0.29 (0.10–0.84)	0.31 (0.14–0.88)	0.30 (0.10–0.88)	0.32 (0.15–0.94)	0.33 (0.13–0.88)	0.22 (0.10–0.94)
$AUC_{0-2}$ (mg·h/L)	16.1 (3.5–47.2)	18.6 (6.4–47.0)	15.4 (3.5–49.7)	19.1 (5.1–42.8)	16.8 (3.5–49.7)	16.1 (5.2–47.2)	19.9 (5.2–49.7)	12.6 (3.5–42.8)

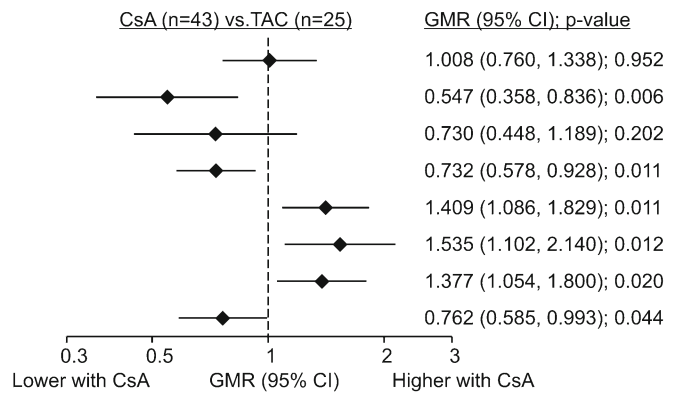
720 mg of mycophenolic acid (MPA) sodium salt corresponds to 674 mg of MPA, and 1000 mg, 750 or 500 mg of mycophenolate mofetil correspond to 739, 554, and 370 mg of MPA

$C_{\text{max,ss}}$  peak plasma concentration at steady-state,  $T_{\text{max,ss}}$  time of peak concentration,  $C_0$  morning pre-dose trough,  $C_{12}$  evening trough,  $AUC_{0-12}$  area under the concentration-time curve during dosing interval at steady-state, %PTF peak-trough fluctuation,  $AUC_{0-2}$  partial AUC over the first 2 h

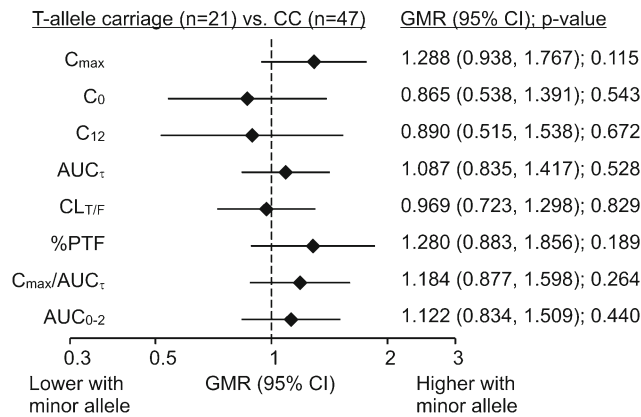
**MPA formulation effects**



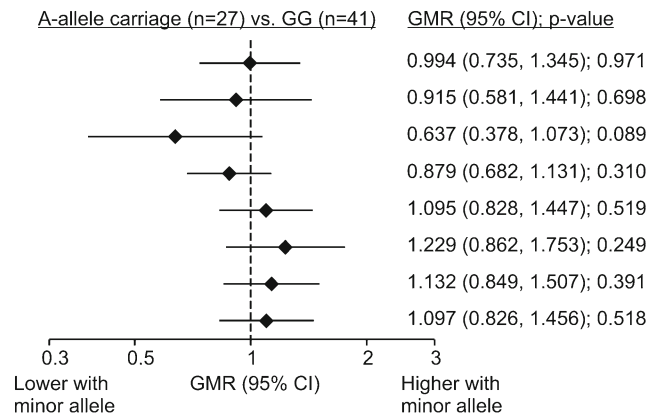
**Cyclosporin effects**



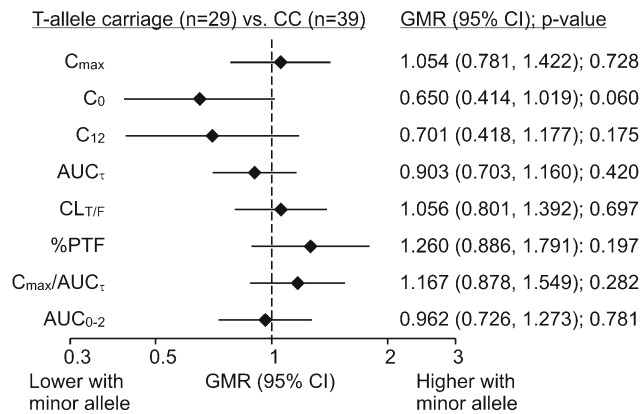
**Recipient -24C>T genotype effects**



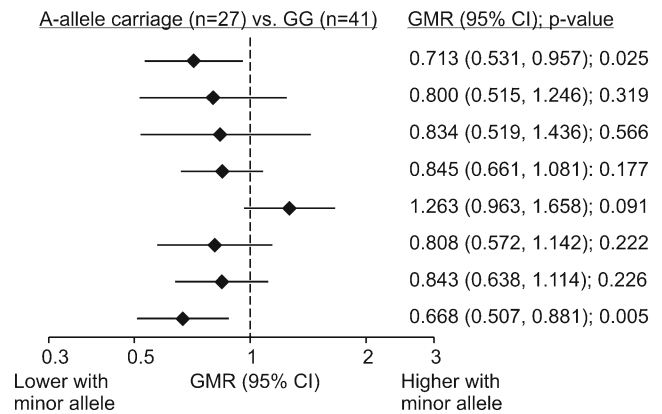
**Recipient 1249G>A genotype effects**



**Donor -24C>T genotype effects**



**Donor 1249G>A genotype effects**



**Fig. 2** Adjusted effects of mycophenolic acid (MPA) formulation (mycophenolate mofetil, MMF vs. enteric-coated sodium salt, EC-MPS), cyclosporine (CsA) compared to tacrolimus (TAC) and recipients' and donors' *ABCC2* genotypes at locus -24C>T and locus 1249G>A on steady-state pharmacokinetics of MPA. Ln-transformed data for each pharmacokinetic parameter were analyzed in a separate general linear model (effects, MPA formulation, calcineurin inhibitor, estimated glomerular filtration rate, recipients' genotype at *ABCC2* locus -24 dichotomized as CC or T-allele carriage, recipients' genotype

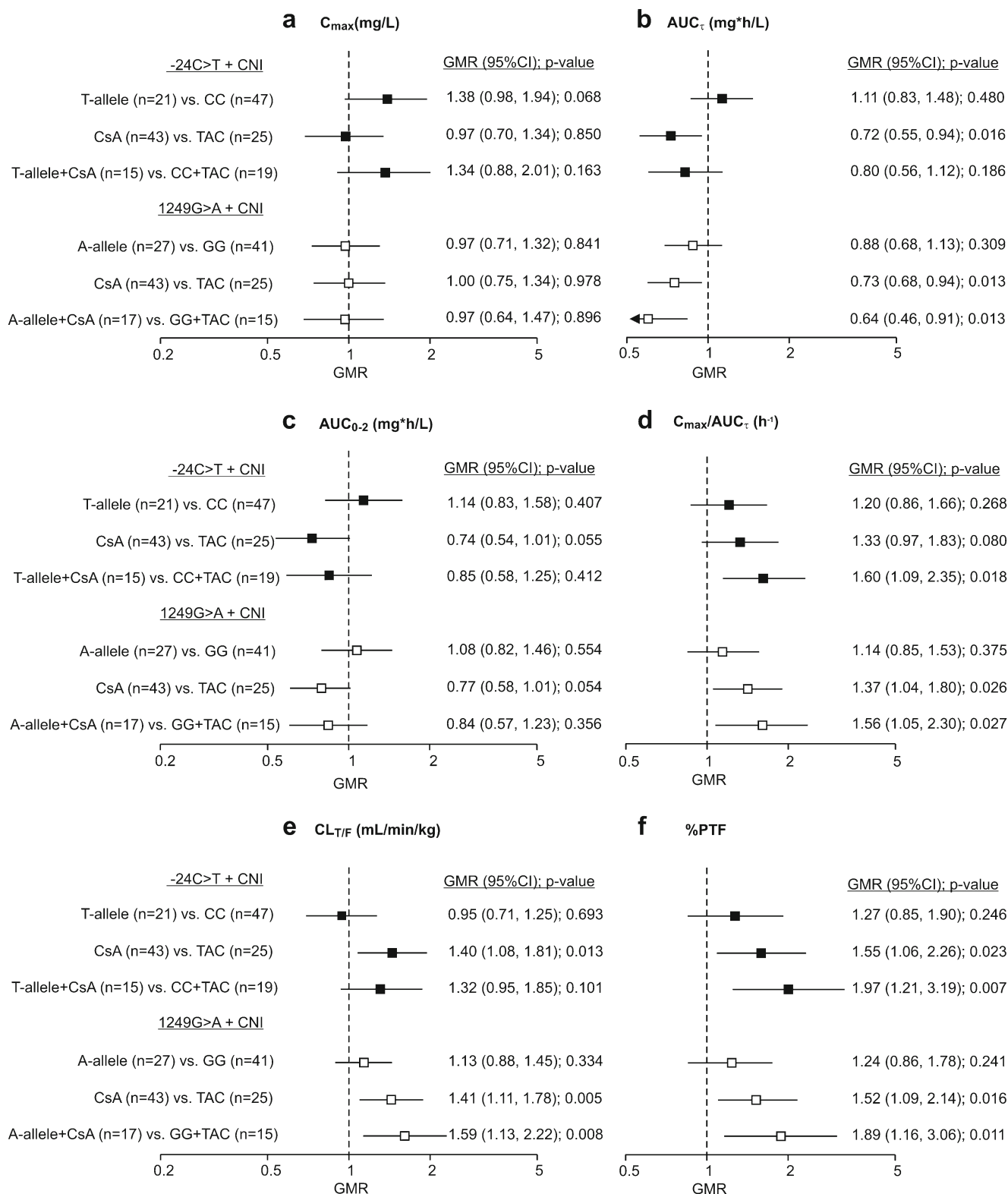
at *ABCC2* locus 1249 dichotomized as GG or A-allele carriage and donors' genotypes at the two loci dichotomized in the same way) and derived contrasts are expressed as geometric means ratios (GMR) with 95% confidence intervals.  $C_{max,ss}$  peak plasma concentration at steady-state,  $C_0$  morning pre-dose trough,  $C_{12}$  evening trough,  $AUC_{t,ss}$  area under the concentration-time curve during dosing interval at steady-state, %PTF peak-trough fluctuation,  $AUC_{0-2}$  partial AUC over the first 2 h



**Genotyping**

Genomic DNA was isolated from whole blood using BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on

KingFisher mL System (Thermo Labsystems, Vantaa, Finland). Analysis of the *ABCC2* -24C>T and 1249G>A was performed on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System according to the manufacturer's instructions (Applied



◀ **Fig. 3** Joint effects of the recipients' minor allele carriage at locus -24 or locus 1249 in *ABCC2* and treatment with cyclosporine (CsA) on steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid. Ln-transformed data for each pharmacokinetic parameter were analyzed in a separate general linear model (effects, MPA formulation, calcineurin inhibitor (CNI; CsA or tacrolimus, TAC), estimated glomerular filtration rate, donors' genotypes at *ABCC2* locus -24 dichotomized as CC or T-allele carriage, donors' genotype at *ABCC2* locus 1249 dichotomized as GG or A-allele carriage, recipients' genotypes at the two loci dichotomized in the same way and an interaction term between the recipients' minor allele carriage (each locus) and calcineurin inhibitor) and derived contrasts are expressed as geometric means ratios (GMR) with 95% confidence intervals. Adjustments for multiple comparisons were by the simulation method.  $C_{max,ss}$  peak plasma concentration at steady-state,  $T_{max,ss}$  time of peak concentration,  $AUC_{t,ss}$  area under the concentration-time curve during dosing interval at steady-state, %PTF peak-trough fluctuation,  $AUC_{0-2}$  partial AUC over the first 2 h

Biosystems, CA, USA) using a validated TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, CA, USA). Assay IDs were for *ABCC2* -24C>T C\_2814642\_10 and for 1249G>A C\_22272980\_20.

### Pharmacokinetic analysis

Steady-state PK parameters of MPA were determined by non-compartmental method (Kinetica 4.1, InnaPhase Corp., USA): peak concentration ( $C_{max,ss}$ ) (mg/L); time to peak concentration ( $T_{max,ss}$ ) (hours); area under the concentration-time curve ( $AUC_{\tau,ss}$  by the log-linear method) (mg × h/L); pre-dose concentrations ( $C_0$ ,  $C_{12}$ ) (mg/L); apparent total body clearance ( $CL_{T/F,ss}$ ) (mL/min/kg), and peak-trough fluctuation (%PTF). Partial area under the curve  $AUC_{0-2}$  and  $C_{max}/AUC_{\tau}$  ratio as an indicator of the absorption rate [26] were also determined. The analysis was based on dose-normalized concentrations accounting for the fact that 1000 mg of MMF corresponded to 739 mg of MPA and 1000 mg of EC-MPS corresponded to 936 mg of MPA.

### Sample size and data analysis

No exact a priori sample size calculation was done since assignment of CNI (CsA or MPA) was not directed and variability of the PK outcomes and prevalence of variant alleles in the population were largely unknown. The enrollment continued until the smallest CNI (CsA or MPA)-by-genotype subset (wild-type or variant allele carriage) attained 12 subjects. A comparison between any two 12 vs. 12 patients subset has 80% power to detect a difference of at least 50% (geometric means ratio  $\geq 1.5$  or  $\leq 0.67$ ) at two-sided alpha level assuming a relatively conservative coefficient of variation of 35%. Such a difference could be reasonably considered as potentially clinically relevant. Ln-transformed PK parameters were analyzed by fitting general linear models to obtain the adjusted effects of CsA (vs. TAC), recipients' and donors' genotype, and their interactions. Results are expressed as geometric mean ratios

(GMRs). Adjustment for multiple comparisons was by the simulation method. We used SAS 9.4 (SAS Inc., Cary, NC).

## Results

### Patient characteristics

A total of 68 patients were included. Recipients' and donors' *ABCC2* genotypes indicated no departure from Hardy-Weinberg equilibrium and no linkage disequilibrium between the loci (electronic supplementary material Table S1). Table 1 summarizes demographic, renal function, and other characteristics in respect to recipients' and donors' genotypes.

### Effects of MPA formulation, CNI, and recipients' and donors' *ABCC2* SNPs on steady-state pharmacokinetics of MPA

Concentration-time MPA profiles by formulation, CNI, and *ABCC2* genotypes are depicted in electronic supplementary material (Fig. S1). Table 2 summarizes pharmacokinetic parameters by genotype.

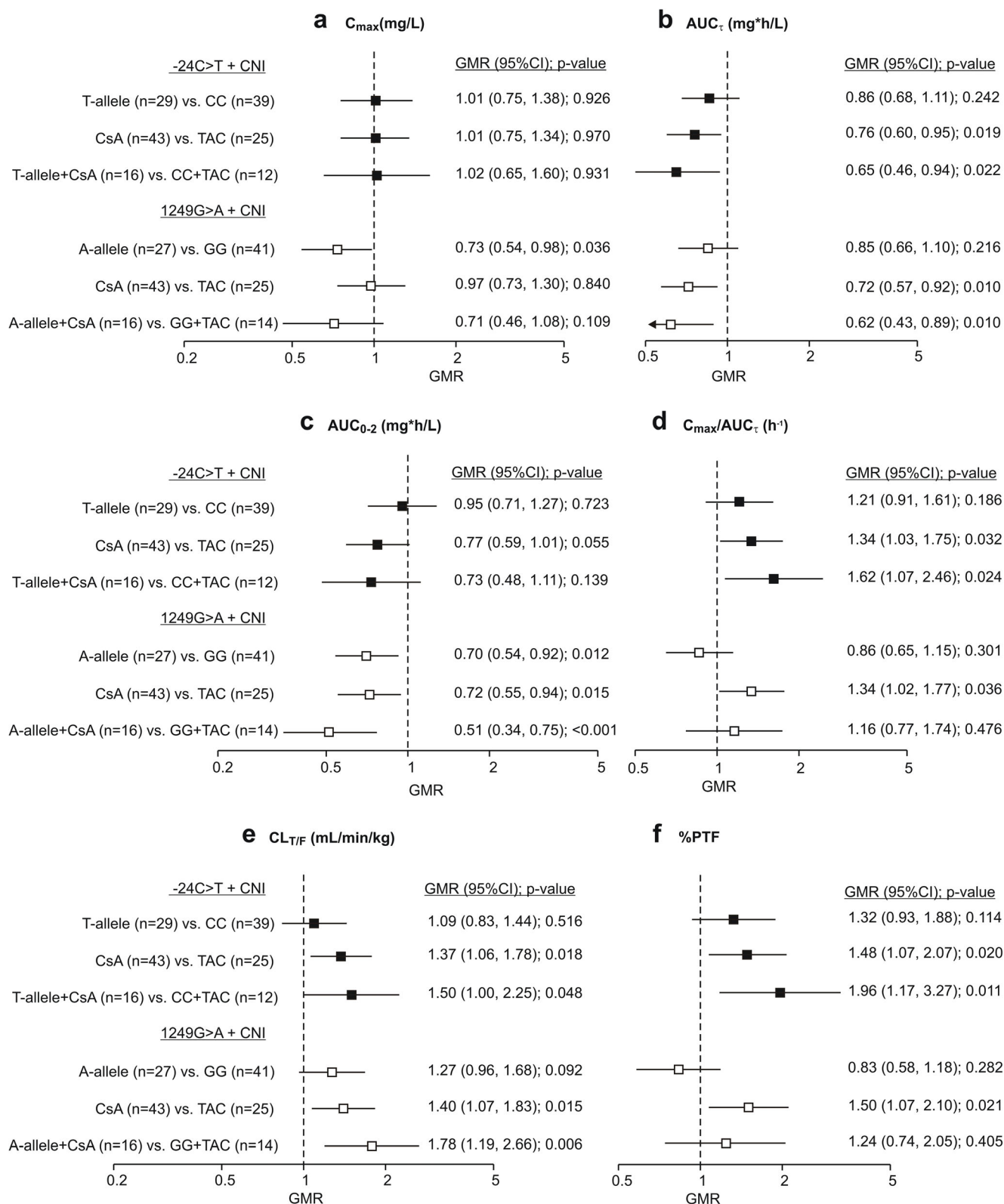
PK parameters were analyzed with the following effects: MPA formulation, CNI type, eGFR, recipients' and donors' *ABCC2* genotypes (both loci) dichotomized as minor allele carriage vs. wild type. The adjusted main effects are depicted in Fig. 2. There appeared no effect of MPA formulation except for a trend of lower troughs ( $C_0$ ,  $C_{12}$ ) with MMF. CsA-treated patients had significantly lower  $C_0$  (45%),  $AUC_{\tau}$  (27%), and  $AUC_{0-2}$  (24%) and higher  $CL_{T/F}$  (41%), %PTF (54%), and  $C_{max}/AUC_{\tau}$  (38%) than those of TAC-treated patients. The CsA effect was consistent by MPA formulation (not shown). Recipients' minor allele carriage at either locus had no apparent effect except for a tendency of lower  $C_{12}$  in A-allele carriers at 1249G>A, but the estimate was imprecise (GMR=0.637, 95% CI 0.378–1.073). Donors' T-allele carriage at -24C>T was associated with a tendency of lower  $C_0$ , but the estimate was imprecise (GMR=0.650, 95% CI 0.414–1.019). However, donors' A-allele at 1249G>A was associated with a significantly lower  $C_{max}$  (29%) and a lower  $AUC_{0-2}$  (33%) (Fig. 2).

### Joint effects of CsA and recipients' *ABCC2* SNPs

PK parameters were analyzed with the same effects as in Fig. 2 plus interactions between recipients' -24C>T or 1249G>A genotype and CNI. The adjusted effects of the recipients' minor allele carriage (vs. wild type), CsA (vs. TAC), and of minor allele combined with CsA (vs. wild type + TAC) are depicted in Fig. 3. A combination of CsA and 1249A was associated with a reduction in  $AUC_{\tau}$  and an increase in clearance that were numerically greater than the main effects of

CsA (36 vs. 27, 59 vs. 41%, respectively). Similar additive effects were observed regarding increased  $C_{max}/AUC_{\tau}$  and %PTF, whereas the effect on  $AUC_{0-2}$  appeared numerically “opposing” to the main CsA effect (Fig. 3). CsA and -24T

combination effect appeared numerically “opposing” to the main CsA effect regarding  $AUC_{\tau}$ , clearance and  $AUC_{0-2}$ , and additive regarding increased  $C_{max}/AUC_{\tau}$  and %PTF (Fig. 3).



◀ **Fig. 4** Joint effects of the donors' minor allele carriage at locus -24 or locus 1249 in *ABCC2* and treatment with cyclosporine (CsA) on steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid. Ln-transformed data for each pharmacokinetic parameter were analyzed in a separate general linear model (effects, MPA formulation, calcineurin inhibitor (CNI; CsA or tacrolimus, TAC), estimated glomerular filtration rate, recipients' genotypes at *ABCC2* locus -24 dichotomized as CC or T-allele carriage, recipients' genotype at *ABCC2* locus 1249 dichotomized as GG or A-allele carriage, donors' genotypes at the two loci dichotomized in the same way and an interaction term between the donors' minor allele carriage (each locus) and calcineurin inhibitor) and derived contrasts are expressed as geometric means ratios (GMR) with 95% confidence intervals. Adjustments for multiple comparisons were made by the simulation method.  $C_{max,ss}$  peak plasma concentration at steady-state,  $T_{max,ss}$  time of peak concentration,  $AUC_{t,ss}$  area under the concentration-time curve during dosing interval at steady-state, %PTF peak-trough fluctuation,  $AUC_{0-2}$  partial AUC over the first 2 h

### Joint effects of CsA and donors' *ABCC2* SNPs

PK parameters were analyzed with the same effects as in Fig. 3, but interactions were between donors' -24C>T or 1249G>A genotype and CNI. The adjusted effects of the donors' minor allele carriage (vs. wild type), CsA (vs. TAC), and of minor allele combined with CsA (vs. wild type + TAC) are depicted in Fig. 4. A combination of CsA and 1249A was associated with a reduction in  $AUC_{\tau}$  (38%) and  $AUC_{0-2}$  (49%) and an increase in clearance (78%) that were numerically greater than the main effects of CsA (28, 28, and 40%, respectively), while the effects of the combination appeared numerically "opposing" to the main CsA effects regarding  $C_{max}/AUC_{\tau}$  and %PTF (Fig. 4). A combination of CsA and -24T was associated with a reduction in  $AUC_{\tau}$  (35%) and increase in clearance (50%) that was numerically greater than the main CsA effects (24 and 37%, respectively). Similar additivity was observed regarding  $C_{max}/AUC_{\tau}$  and %PTF (increase), but not regarding  $AUC_{0-2}$  (Fig. 4).

### Discussion

The effects of CNIs and of genetic factors have attracted much attention in investigations of the variability of MPA pharmacokinetics. Currently, only UGT1A9 genotype is considered a relevant biomarker to predict initial dosing of MPA in patients co-treated with TAC [27]. However, *ABCC2* variants have been extensively evaluated as potential sources of MPA PK variability, per se, as well as molecular basis for the effects of CsA. Present study is specific in that it accounted for both the recipients' and donors' genotypes, bearing in mind MRP2-mediated renal MPAG/MPA transport. The study has limitations; as it was observational (routine TDM), it did not include MPAG measurements and did not account for glucuronidation enzyme or other transporter genotypes. The PK blood sampling schedule was guided by the TDM requirement of an

$AUC_{\tau}$  based on at least six sampling points and might have been suboptimal for detection of  $t_{max}$ . However, it has several strengths—by inclusion/exclusion criteria and simultaneous adjustments for renal function and recipients' and donors' genotypes at both loci, a fair control of confounding was achieved; all treatment-by-genotype subsets were large enough to detect potentially relevant effects (the smallest compared subsets contained 16 vs. 12 patients, Fig. 4). Under these circumstances, there appeared no major main effect of the donors' variant allele -24T on PK of MPA. However, donors' variant allele 1249A was associated with a reduced peak ( $C_{max}$ , 29%) and early exposure ( $AUC_{0-2}$ , 33%) co-incident with an increased clearance (26%,  $p = 0.091$ ) (Fig. 2). These findings are indicative of an increased renal elimination. The fact that total exposure and trough values were not proportionally reduced (15–20% lower  $AUC_{\tau}$ ,  $C_0$  and  $C_{12}$ ,  $p > 0.05$ ) might be explained by the (assumed) "second wave of MPA exposure" due to MPAG/MPA enterohepatic re-circulation— $AUC_{\tau}$  might have been reduced less than  $AUC_{0-2}$  on the account of an "input" occurring after the 2nd post-dose hour. Unfortunately, "late partial AUC" was not informative since there were only three sampling points over 10 later hours (Fig. S1). Still, a trend towards lower %PTF (by 20%,  $p > 0.05$ ) indirectly supports such a possibility as it reflects a difference between  $C_{max}$  (reduced) and  $C_{min}$  (reduced, but less so). In mechanistic terms, this is in line with the role of MRP2 as a major efflux protein and with association of the variant allele with lower MRP2 expression [22]. In such a scenario, MPAG/MPA would be more available for tubular secretion resulting in an increased clearance. Indirectly, this possibility is supported by additive effects of CsA (an MRP2 inhibitor as opposed to TAC) and variant allele carriage: reductions in  $AUC_{\tau}$  and  $AUC_{0-2}$  and increase in clearance were all numerically greater in 1249A carriers co-treated with CsA (vs. wild-type homozygosity + TAC) than the main effects of CsA (Fig. 4). Similar effects regarding  $AUC_{\tau}$  (reduction) and clearance (increase) were observed also for the combination of CsA and donors' variant allele carriage at *ABCC2* -24C>T but are difficult to interpret since no main effect of the T-allele was observed (Fig. 4). However, the differences between the T-allele + CsA combination and CC + TAC combination were numerically greater than the main CsA effects suggesting a greater MRP2 inhibition by CsA when variant allele was present. Overall, data suggest that the donors' *ABCC2* polymorphisms may affect exposure to MPA per se and/or by increasing susceptibility to inhibition of tubular MRP2 by CsA.

The lack of the main effects of either *ABCC2* -24C>T or *ABCC2* 1249G>A recipients' SNPs on MPA is in line with previous reports [9, 12–16], but present data suggest that the recipients' *ABCC2* SNPs could moderate the effect of CsA on MRP2. The observed main effects of CsA (compared to TAC) are generally consistent with the reported [6, 24] increased

clearance and reduced exposure to MPA. Increased clearance (41%) is in agreement with reduced morning trough (45%) total ( $AUC_{\tau}$ , 27%) and early ( $AUC_{0-2}$ , 24%) exposure (Fig. 2). This is consistent with the reported CsA inhibition of the MRP2-mediated hepatic MPAG excretion and inhibited enterohepatic re-circulation of MPAG/MPA [6, 7]. As already discussed, present data suggest a relevant contribution of the renal MRP2 inhibition to the increased MPA clearance. The fact that  $C_{\max}$  was not affected should be viewed in parallel with the increased  $C_{\max}/AUC_{\tau}$  (38%) (Fig. 2)—increased absorption rate suggests MRP2 inhibition at the intestinal level and could have “compensated” for the effect of increased clearance on peak exposure. The increased %PTF (53%) (Fig. 2) is an understandable consequence of an increased clearance and unchanged peak exposure. Therefore, the present observations appear plausible when viewed in the light of the (assumed) simultaneous effects of CsA on MRP2 at the intestinal, hepatic, and renal levels. Such a view is further supported by the apparent additive effects of the recipients’ variant allele 1249A and CsA (Fig. 3): The differences between the A-allele + CsA combination and wild-type homozygosity + TAC combination in respect to clearance, total exposure, absorption rate, and %PTF were all numerically greater than the main CsA effects. Lack of such an effect on  $AUC_{0-2}$  should be viewed in the light of the (additively) increased  $C_{\max}/AUC_{\tau}$ —additionally increased absorption rate might have “compensated” for the effect of an increased clearance not only in respect to  $C_{\max}$  but also, in part, in respect to early exposure. To our knowledge, this is the first indication that the recipients’ *ABCC2* 1249G>A polymorphism might moderate the effects of CsA on MRP2 since previous studies in renal transplant recipients [18–20] focused on the -24C>T SNP. The results have been in part conflicting. In a study in patients co-treated with TAC [19], variant allele was associated with higher MPA trough, while in a study in CsA co-treated patients, no such effect was seen [20]. One study included [18] both genetic and co-treatment patient subsets (CsA vs. TAC or sirolimus). Raw  $AUC_{0-12}$  values on day 7 for T-allele overall (50.0,  $n = 14$ ) were similar to wild type overall (46.6,  $n = 23$ ); for CsA overall (40.2,  $n = 22$ ) were 27% lower ( $p = 0.009$ ) than for TAC/sirolimus overall (55.2,  $n = 17$ ); whereas values for CsA+T-allele (51.9,  $n = 7$ ) were 17% lower than those of TAC/sirolimus + wild type (62.8,  $n = 9$ ). The present data also suggest that the recipients’ -24T allele could actually “act in opposition” to CsA regarding MPA clearance/disposition (Fig. 4): Adjusted differences between T-allele carriers co-treated with CsA and wild-type homozygotes co-treated with TAC regarding clearance,  $AUC_{\tau}$ , and  $AUC_{0-2}$  were all numerically smaller than the main CsA effects indicating a reduced CsA effect. The seemingly additive effect on  $C_{\max}/AUC_{\tau}$  (consistent with a trend of increased  $C_{\max}$  for the T-allele + CsA combination vs. wild-type homozygosity + TAC combination, 34%,  $p = 0.163$ ; Fig. 3) suggests a possibility of a

different CsA–T-allele interaction at the intestinal vs. the hepatic level.

High inter-individual variability in MPA pharmacokinetics in renal transplant recipients is largely due to genetic factors: polymorphisms of MPA metabolizing enzymes (UGT1A9 [27], UGT2B7 [14, 16]) and various transporter proteins (MRP2 [8, 10], BCRP [9], SLCO1B3 or 1B1 [12, 28]); CNIs are substrates of polymorphic CYP3A4/5 and P-glycoprotein/ABCB1 [29]; CsA in particular inhibits CYPs and UGTs and a range of drug transporters [7, 8, 10, 30] where the extent of CsA effects might be affected by their polymorphisms. Hence, a polygenic approach is needed to achieve a comprehensive understanding of the gene-drug and gene-moderated drug-drug interactions. In this respect, the present study is clearly limited and its results should be viewed within these limitations.

## Conclusions

The present study is an initial exploration of a potential interaction between effects of CsA and of recipients’ and donors’ *ABCC2* gene variants on disposition of MPA in renal transplant recipients. Since it is based only on plasma MPA pharmacokinetics, arising inferences are largely indirect. With these limitations in mind, the present results are in agreement with the view that CsA reduces MPA disposition by inhibiting enterohepatic cycle (MRP2 inhibition). However, they indicate that the recipients’ *ABCC2* -24T>C and 1249G>A SNPs might moderate the effects of CsA on MRP2. Data also indicate that CsA might reduce MPA disposition at the renal level as well, by inhibiting MRP2. Finally, to our knowledge, the present results are first to indicate that the donors’ *ABCC2* genotype may influence disposition of MPA—variant allele carriage at 1249G>A per se appears to reduce the exposure to MPA (likely by increasing renal MPAG/MPA clearance) and apparently acts in the “same direction” as CsA at the renal level.

**Authors’ contributions** BN, LZ, VT and KŽ were responsible for the study concept and design. LZ, NŠS, and KŽ were responsible for acquisition of subjects. BT and LZ performed research. BBA and NŠS analyzed and interpreted the data. TV and BN analyzed and interpreted the data and prepared the manuscript. All authors participated in critical revision of the manuscript, contributed comments, and approved the final version.

**Compliance with ethical standards** This prospective observational study was approved by the institutional Ethics Committee and was conducted in line with the Declaration of Helsinki (2008 version). Laboratory analyses were performed in line with the ISO-15189 standard of good practice.

## References

- Tett SE, Saint-Marcoux F, Staatz CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M et al (2011) Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev* 25:47–57. doi:10.1016/j.ttre.2010.06.001
- van Hest R, Mathot R, Vulto A, Weimar W, van Gelder T (2005) Predicting the usefulness of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: a computer simulation. *Ther Drug Monit* 27:163–167
- van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP et al (1999) A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 68:261–266
- Kiberd BA, Lawen J, Fraser AD, Keough-Ryan T, Belitsky P (2004) Early adequate mycophenolic acid exposure is associated with less rejection in kidney transplantation. *Am J Transplant* 4:1079–1083
- van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP et al (2001) Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 23:119–128
- Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW et al (2005) Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 5:987–994
- Cremers S, Schoemaker R, Scholten E, den Hartigh J, König-Quartel J, van Kan E et al (2005) Characterizing the role of enterohepatic recycling in the interactions between mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitors in renal transplant patients by pharmacokinetic modelling. *Br J Clin Pharmacol* 60:249–256
- Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC (2006) Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine. *Drug Metab Dispos* 34:261–266
- Miura M, Kagaya H, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T et al (2008) Influence of drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 30:559–564. doi:10.1097/FTD.0b013e3181838063
- El-Sheikh AA, Koenderink JB, Wouterse AC, van den Broek PH, Verweij VG, Masereeuw R et al (2014) Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus. *Transl Res* 164:46–56. doi:10.1016/j.trsl.2014.01.006
- Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W et al (2007) Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 7:56–65
- Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T et al (2007) Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 63:1161–1169
- van Schaik RH, van Ageren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K et al (2009) UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 86:319–327. doi:10.1038/clpt.2009.83
- Zhao W, Fakhoury M, Deschênes G, Roussey G, Brochard K, Niaudet P et al (2010) Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal-transplant patients. *J Clin Pharmacol* 50:1280–1291. doi:10.1177/0091270009357429
- Ruiz J, Herrero MJ, Bosó V, Megías JE, Hervás D, Poveda JL et al (2015) Impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on immunosuppressive therapy in lung transplantation. *Int J Mol Sci* 16:20168–20182. doi:10.3390/ijms160920168
- Ting LS, Benoit-Biancamano MO, Bernard O, Riggs KW, Guillemette C, Ensom MH (2010) Pharmacogenetic impact of UDP-glucuronosyltransferase metabolic pathway and multidrug resistance-associated protein 2 transport pathway on mycophenolic acid in thoracic transplant recipients: an exploratory study. *Pharmacotherapy* 30:1097–1108. doi:10.1592/phco.30.11.1097
- Fukuda T, Goebel J, Cox S, Maseck D, Zhang K, Sherbotie JR et al (2012) UGT1A9, UGT2B7, and MRP2 genotypes can predict mycophenolic acid pharmacokinetic variability in pediatric kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 34:671–679. doi:10.1097/FTD.0b013e3182708f84
- Lloberas N, Torras J, Cruzado JM, Andreu F, Oppenheimer F, Sánchez-Plumed J, Spanish Pharmacogenetic Symphony Substudy Group et al (2011) Influence of MRP2 on MPA pharmacokinetics in renal transplant recipients—results of the Pharmacogenomic Substudy within the Symphony Study. *Nephrol Dial Transplant* 26:3784–3793. doi:10.1093/ndt/gfr130
- Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y (2006) Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 82:1074–1084
- Baldelli S, Merlini S, Perico N, Nicastrì A, Cortinovis M, Gotti E et al (2007) C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 8:1127–1141
- Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I et al (2004) Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm Res* 21:742–748
- HE M z S, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C et al (2005) Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos* 33:896–904
- Grisk O, Steinbach AC, Ciecholewski S, Schlüter T, Klötting I, Schmidt H et al (2009) Multidrug resistance-related protein 2 genotype of the donor affects kidney graft function. *Pharmacogenet Genomics* 19:276–288. doi:10.1097/FPC.0b013e31832828d4e9
- Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T (2004) Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309:1029–1035
- Trkulja V, Lalić Z, Nad-Škegro S, Lebo A, Granić P, Lovrić M et al (2014) Effect of cyclosporine on steady-state pharmacokinetics of MPA in renal transplant recipients is not affected by the MPA formulation: analysis based on therapeutic drug monitoring data. *Ther Drug Monit* 36:456–464. doi:10.1097/FTD.000000000000052
- Endrenyi L, Fritsch S, Yan W (1991) Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 29:394–399
- Brunet M, Shipkova M, van Gelder T, Wieland E, Sommerer C, Budde K et al (2016) Barcelona consensus on biomarker-based immunosuppressive drugs management in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* 38(Suppl 1):S1–S20. doi:10.1097/FTD.0000000000000287
- Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM et al (2010) The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in

- mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 87: 100–108. doi:[10.1038/clpt.2009.205](https://doi.org/10.1038/clpt.2009.205)
29. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC et al (2004) The effect of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 14:147–154
30. Picard N, Bergan S, Marquet P, van Gelder T, Wallemacq P, Hesselink DA et al (2016) Pharmacogenetic biomarkers predictive of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 38(Suppl1):S57–S69. doi:[10.1097/FTD.0000000000000255](https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000255)

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## UČINAK FARMAKOGENETIČKIH VARIJACIJA UGT1A9, CYP3A4 I CYP3A5 NA FARMAKOKINETIKU MIKOFENOLNE KISELINE PRIMIJEJENE S CIKLOSPORINOM ILI TAKROLIMUSOM U BOLESNIKA S PRESADENIM BUBREGOM

ANA BORIĆ BILUŠIĆ

Cilj je ovoga istraživanja ispitati utjecaj polimorfizama metaboličkih enzima UGT i CYP te ABC transportera na bioraspoloživost mikofenolne kiseline (MPA) u stanju dinamičke ravnoteže primijenjene u kombinaciji s ciklosporinom (CsA) ili takrolimusom (TAC) kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Analizirana je povezanost genske varijabilnosti metaboličkog enzima UGT1A9 te membranskog prijenosnika ABCG2 s bioraspoloživosti MPA-a. Dodatno je provedena i analiza utjecaja genske varijabilnosti metaboličkih enzima CYP3A4 i CYP3A5 s koncentracijama CsA-a i TAC-a te su procijenjeni dometi interakcije MPA-a s CsA-om i TAC-om u odnosu na ispitane varijante gena *ABCG2* u bolesnika s transplantiranim bubregom. U istraživanje je bilo uključeno je 68 bolesnika (n=68, muškarci=35, dob 16-71) na standardnom imunosupresivnom protokolu koji uključuje MPA, CsA ili TAC te kortikosteroide. Uzorci krvi uzeti su tjedan dana nakon početnoga doziranja. Uzorak krvi za određivanje ostalih koncentracija MPA, CsA i TAC-a, uzet je u 8h ujutro prije jutarnje doze lijeka nakon čega je uslijedila standardna jutarnja doza. Tijekom 12-satnoga intervala doziranja za MPA je uzeto 6 uzoraka krvi za određivanje koncentracije MPA. MPA je analizirana HPLC metodom, a genotipizacija polimorfizama *UGT1A9 -2152C>T* i *-275 T>A*, *CYP3A4\*22*, *CYP3A5\*3*, *ABCG2 c.421C>A*, *ABCC2 24 C>T* i *1249 G>A*, *ABCB1 2677G>T/A*, *3435C>T*, *1236C>T*, *SLCO1B1 c.521T>C* je provedena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR). Bolesnici homozigoti divljega tipa i nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* ujednačeni su metodom egzaktnoga uparivanja u kombinaciji s optimalnim potpunim uparivanjem u odnosu na demografske, biofarmaceutske i genetičke varijable te je procijenjen učinak varijantnoga alela (frequentist, Bayes) usporedbom omjera geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) farmakokinetičkih parametara MPA



ujednačenih prema dozi u stanju dinamičke ravnoteže. Dobiveni rezultati ukazuju na značajnu povezanost varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* i farmakokinetike MPA-a. Kod stabilnih bolesnika s transplantiranim bubregom koji su ujedno i nositelji varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A*, rezultati ukazuju na povećanu bioraspoloživost MPA ( $AUC_{\tau,ss} \approx 40\%$ ) u skladu s proporcionalno smanjenim klirensom ( $CL_{T/F,ss} \approx 30\%$ ). Dodatno je uočena značajna uloga polimorfizma *ABCG2 c.421 C>A* u moduliranju interakcije CsA-a i TAC-a s MPA-a. Rezultati upućuju na znatno izraženiji učinak varijantnoga alela *ABCG2 c.421C>A* u skupini bolesnika na terapiji TAC-om kod kojih je zabilježena dva puta veća bioraspoloživost MPA, manji klirens i manja brzina apsorpcije u odnosu na skupinu bolesnika na terapiji CsA-om. Rezultati nisu pokazali utjecaj ispitivanih polimorfizama metaboličkog enzima UGT1A9 na koncentracije MPA-a. Također nije zabilježen ni značajan utjecaj polimorfizama enzima CYP3A4 i CYP3A5 na koncentracije CsA-a i TAC-a, moguće zbog malog broja bolesnika nositelja varijantnih alela.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži 183 stranice, 24 slike, 19 tablica i 238 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mikofenolna kiselina, ciklosporin, takrolimus, bolesnici s transplantiranim bubregom, *ABCG2* polimorfizam

Mentori: izv. prof. dr. sc. Nada Božina

prof. dr. sc. Karmela Barišić

Povjerenstvo: nasl. izv. prof. dr. sc. Mila Lovrić

izv. prof. dr. sc. Mario Laganović

izv. prof. dr. sc. Jelena Osmanović Barilar

Rad je prihvaćen: 20. rujna 2023.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### **EFFECT OF PHARMACOGENETIC VARIANTS OF THE UGT1A9, CYP3A4 AND CYP3A5 ON PHARMACOKINETIC OF MYCOPHENOLIC ACID ADMINISTERED IN COMMEDICATION WITH CYCLOSPORINE OR TACROLIMUS IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS**

**ANA BORIĆ BILUŠIĆ**

The aim of this research was to analyse the influence of metabolic enzymes UGTs, CYPs and ABCs transporter polymorphism on steady-state mycophenolic acid (MPA) exposure applied in commedication with cyclosporine (CsA) or tacrolimus (TAC) in renal transplant recipients. The association between the genetic variability of the metabolic enzyme UGT1A9 and the membrane transporter ABCG2 and the MPA bioavailability was analysed. In addition, an analysis of the influence of the genetic variability of the metabolic enzymes CYP3A4 and CYP3A5 on the concentrations of CsA and TAC was performed. The range of MPA interaction with CsA and TAC in relation to the tested variants of the ABCG2 gene in kidney transplant patients was also evaluated. The study included 68 patients (n=68, men=35, age 16-71) on standard immunosuppressant protocols including MPA, CsA or TAc and glucocorticoids. Blood samples were taken after completion of the initial week of treatment, at 8.00 a.m. before the next dose for quantification of MPA, CsA or TAC trough concentrations followed by the standard morning dose. During the 12-hour dosing interval for MPA, six blood samples were taken to determine MPA concentration. Total plasma MPA was determined by HPLC method, genotyping of polymorphisms *UGT1A9* -2152C>T i -275 T>A, *CYP3A4*\*22, *CYP3A5*\*3, *ABCG2* c.421C>A, *ABCC2* 24 C>T i 1249 G>A, *ABCB1* 2677G>T/A, 3435C>T, 1236C>T, *SLCO1B1*c.521T>C was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Homozygous wild type patients and *ABCG2* c.421C>A variant allele carriers were matched in combined exacted and optimal full matching with respect to demographic, biopharmaceutic and genetic variables. Variant allele effect was assessed by comparing the ratio of geometric means

(GMR) of dose adjusted steady state MPA pharmacokinetics estimates (frequentist and Bayes). Results indicate significant association between *ABCG2 c.421C>A* variant allele and MPA pharmacokinetics. In stable renal transplant recipients *ABCG2 c.421C>A* variant allele carriers results showed an increased MPA bioavailability ( $AUC_{\tau,ss} \approx 40\%$ ) in accordance with proportionally reduced clearance ( $CL_{T/F,ss} \approx 30\%$ ) Additionally, significant role of the *ABCG2 c.421C>A* polymorphism in modulating the interaction of CsA and TAC with MPA was observed. Results imply a significantly more pronounced effect of the *ABCG2 c.421C>A* variant allele in patients on TAC therapy. Two times higher MPA bioavailability, lower clearance and slower absorption rate were recorded compared to the patients on CsA therapy. Results showed no influence of the tested polymorphisms of the metabolic enzyme UGT1A9 on MPA concentrations. Also, there was no overall effect of CYP3A4 and CYP3A5 enzyme polymorphisms on CsA and TAC concentrations, possibly due to small number of patients carrying variant alleles.

The thesis is deposited at the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis includes 183 pages, 24 figures, 19 tables and 238 literature references

Key words: mycophenolic acid, cyclosporine, tacrolimus, transplant patients, *ABCG2* polymorphism

Supervisors: Associate Professor Nada Božina, PhD

Professor Karmela Barišić, PhD

Reviewers: Associate Professor Mila Lovrić, PhD

Associate Professor Mario Laganović, PhD

Associate Professor Jelena Osmanović Barilar, PhD

Accepted: 20<sup>th</sup> September 2023