

# Terapijsko praćenje mikofenolne kiseline u djece nakon transplantacije bubrega

---

Vidović, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:273072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



**Tina Vidović**

**Terapijsko praćenje mikofenolne kiseline u djece  
nakon transplantacije bubrega**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Toksikologija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilištu u Zagrebu, a izrađen u Odjelu za laboratorijsku farmakologiju s toksikologijom Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. doc. dr. sc. Mile Lovrić.

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Mili Lovrić na pruženoj prilici i stručnoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala Luki, prijateljima i kolegama na potpori. Hvala Domagoju na strpljenju. Najveće hvala mami i tati na beskrajnom razumijevanju i bezuvjetnoj podršci.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Farmakologija mikofenolne kiseline .....	1
1.2. Farmakodinamika .....	2
1.3. Farmakokinetika .....	3
1.3.1. Apsorpcija .....	4
1.3.2. Raspodjela .....	4
1.3.3. Metabolički put mikofenolne kiseline .....	5
1.3.4. Eliminacija .....	6
1.4. Farmakogenetička varijabilnost mikofenolne kiseline .....	7
1.5. Indikacije i doziranje .....	7
1.6. Transplantacija .....	8
1.7. Bubrež .....	9
1.7.1. Bolest bubrega .....	10
1.7.2. Primjena lijekova nakon transplantacije bubrega .....	12
1.8. Načela terapijskog praćenja lijekova .....	13
1.8.1. Terapijsko praćenje mikofenolne kiseline .....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Uzorci .....	19
3.1.2. Oprema .....	19
3.1.3. Laboratorijski pribor .....	20
3.1.4. Kemikalije .....	20
3.2. Metode .....	21

3.2.1. Priprema HPLC sustava za rad .....	21
3.2.2. Kromatografski uvjeti .....	21
3.2.3. Postupanje s uzorcima bolesnika i priprema uzoraka za analizu .....	21
3.2.4. Očitavanje rezultata .....	22
3.2.5. Statističke metode .....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. REZULTATI .....	24
4.1.1. Bolesnici s koncentracijom mikofenolne kiseline u više točaka.....	24
4.1.2. Izračun AUC vrijednosti s odgovarajućim formulama iz literature.....	29
4.1.3. Analiza AUC vrijednosti mikofenolne kiseline prema terapijskom intervalu .....	33
4.1.4. Analiza koncentracija mikofenolne kiseline prema spolu .....	35
4.1.5. Analiza koncentracije mikofenolne kiseline prema terapijskom intervalu .....	37
4.2. RASPRAVA .....	41
5. ZAKLJUČAK .....	44
6. POPIS KRATICA.....	45
7. LITERATURA .....	47
8. SAŽETAK .....	50

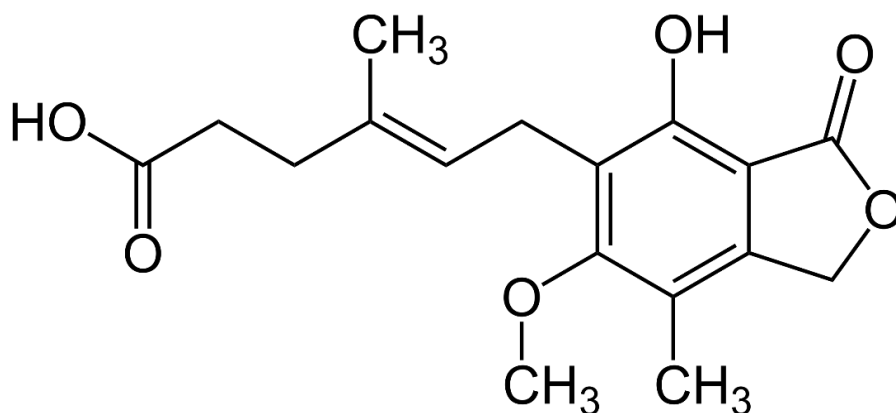
## 1. UVOD

### 1.1. Farmakologija mikofenolne kiseline

Imunosupresivi su skupina lijekova koja inhibira ili smanjuje intenzitet imunološkog odgovora organizma. Koriste se kod transplantacije tkiva ili organa te u terapiji autoimunih bolesti. Imunosupresivnim lijekovima koji se koriste u transplantacijskoj medicini želi se inhibirati imunosne stanice i/ili staničnu funkciju te također postići inhibiciju proupalnih citokina. Neki od često korištenih imunosupresivnih lijekova u transplantaciji organa su: prednizon, ciklosporin, takrolimus, azatioprin, mofetilmikofenolat i sirolimus (Hussain, Y i Khan, H., 2022).

Antimetaboliti su skupina antikancerogenih sredstava koji djeluju na način da inhibiraju sintezu purina i pirimidina. Blokiranjem sinteze nukleinskih kiselina u tumorskim tkivima onemogućavaju dijeljenje jezgre i stanice.

Mikofenolna kiselina (engl. *mycophenolic acid*, MPA) je antimetabolički imunosupresivni lijek koji se koristi u prevenciji akutnog odbacivanja presađenog organa nakon transplantacije te kao dio terapije održavanja. Izolirana je iz gljivice *Penicillium stoloniferum*, a osim imunosupresivnog, pokazuje i antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje. Koristi se kao dio imunosupresivne trojne terapije zajedno s kalcineurinskim inhibitorom i kortikosteroidom ([www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com)).

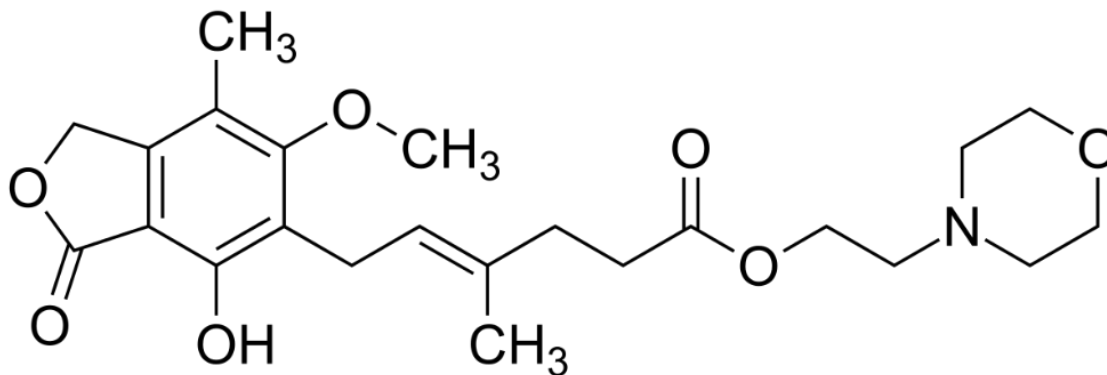


Slika 1. Struktura mikofenolne kiseline (preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/fig1-Structure-of-Mycophenolic-acid\\_fig1\\_301680420](https://www.researchgate.net/figure/fig1-Structure-of-Mycophenolic-acid_fig1_301680420)).

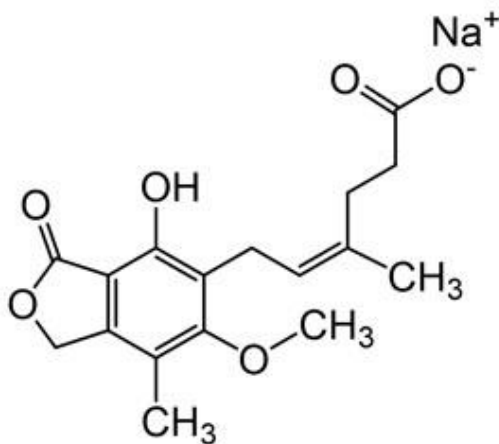
## 1.2. Farmakodinamika

Mikofenolna kiselina je selektivni, nekompetitivni, reverzibilni inhibitor enzima inozin-5'-monofosfat dehidrogenaze (engl. *inosine monophosphate dehydrogenase*, IMPDH), koji je bitan za pretvorbu inozin-5'-fosfata i ksantin-5'-fosfata u gvanozin-5'-fosfat. Inhibicijom ovog enzima onemogućava se pretvorba inozin-monofosfata u ksantin-monofosfat, koji je prekursor gvanozina, a gvanozin je nukleotid koji je potreban za sintezu deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Ovime se inhibira de novo sinteza purinskih nukleotida, odnosno gvanin nukleotida. Drugi tipovi stanica imaju mogućnost korištenja purina iz puteva spašavanja, no T- i B-limfociti nemaju. Dakle, mikofenolna kiselina ima snažne citostatske učinke na T- i B-limfocite te dovodi do supresije sinteze DNA. Također, smanjuje sposobnost B-limfocita da stvaraju protutijela i sprječava glikozilaciju limfocitnih i monocitnih glikoproteina uključenih u međustaničnu adheziju na endotelne stanice ([www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com)).

Mikofenolna kiselina je na tržištu dostupna u dvije formulacije. Prva formulacija je oblik esterskog prolijeka, mikofenolat-mofetila (engl. *mycophenolate mofetil*, MMF), odnosno 2,4-morfolinoetil estera MPA koji ima svojstvo trenutnog otpuštanja nakon ingestije. Drugi oblik je mikofenolat-natrij, formulacija s želučano-otpornom ovojnicom (engl. *enteric-coated mycophenolate sodium*, EC-MPS) koja prolazi želudac i djeluje u području crijeva, ne uzrokujući gastrointestinalne tegobe koje su najčešća nuspojava kod uzimanja MPA (Sintachak, Michael D. i sur., 1996).



Slika 2. Struktura mikofenolat-mofetila (Preuzeto s <https://de.wikipedia.org/wiki/Mycophenolat-Mofetil>).



Slika 3. Struktura mikofenolat-natrija (Preuzeto s <https://www.pharmaffiliates.com/en/parentapi/mycophenolate-sodium-impurities>).

### 1.3. Farmakokinetika

Mikofenolna kiselina pokazuje veliku farmakokinetičku inter i intraindividualnu varijabilnost. Površina ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC) mikofenolne kiseline, normalizirana prema dozi, može varirati više od 10 puta. Ukupne koncentracije mikofenolne kiseline treba interpretirati s oprezom kod bolesnika s teškim oštećenjem bubrega, bolešću jetre i hipoalbuminemijom. Kod takvih osoba, vezanje mikofenolne kiseline i glukuronida mikofenolne kiseline (engl. *mycophenolic acid 7-O-glucuronide*, MPAG) na proteine plazme može biti promijenjeno, mijenjajući udio dostupne slobodne MPA. Osim toga, do promjene koncentracije slobodne MPA može doći zbog interakcija s drugim istodobno primijenjenim lijekovima – ciklosporin inhibira izlučivanje MPAG preko žući, što smanjuje enterohepatičku recirkulaciju MPA. Visoke doze kortikosteroida induciraju izražaj enzima uridin difosfat glukuronoziltransferaze (UGT), što dovodi do bržeg metabolizma i smanjene izloženosti MPA. Istodobna primjena i nekih drugih lijekova može utjecati na apsorpciju, enterohepatičku recirkulaciju i metabolizam mikofenolata (Staaž i Tett, 2007).



### **1.3.1. Apsorpcija**

Nakon oralne primjene, enterički obloženi natrijev mikofenolat uglavnom se apsorbira u tankom crijevu gdje se lako otapa u neutralnom pH. Zaštita želučano-otpornom ovojnicom onemogućava otapanje pri  $\text{pH} < 5$ . Tablete s ovojnicom imaju prednost pred esterskim prolijekom zbog toga što je manja vjerojatnost da će doći do želučanih smetnji kod bolesnika. Oralna bioraspoloživost mikofenolne kiseline nakon primjene mofetilmikofenolata se kreće od 80,7 do 94 %, a srednje poluvrijeme izlučivanja lijeka je 9 do 17 sati (Lamba i sur., 2014).

Mofetilmikofenolat se brzo i potpuno apsorbira nakon peroralne primjene te se metabolizira sve do aktivnog metabolita, MPA. Imunosupresivna aktivnost MPA mofetilmikofenolata povezana je s koncentracijom MPA što je dokazano supresijom akutnog odbacivanja bubrega nakon presađivanja organa. Oralni mofetilmikofenolat ima srednju bioraspoloživost u odnosu na AUC MPA koja iznosi 94 % intravenskog mofetilmikofenolata.

Kad se u bolesnika s presađenim bubregom mofetilmikofenolat primjenjuje u dozama od 1,5 g dvaput dnevno, hrana nema utjecaj na količinu apsorpcije (AUC-a MPA), ali u prisutnosti hrane, vrijednost  $C_{\text{max}}$  mikofenolne kiseline se smanjuje za 40 %.

### **1.3.2. Raspodjela**

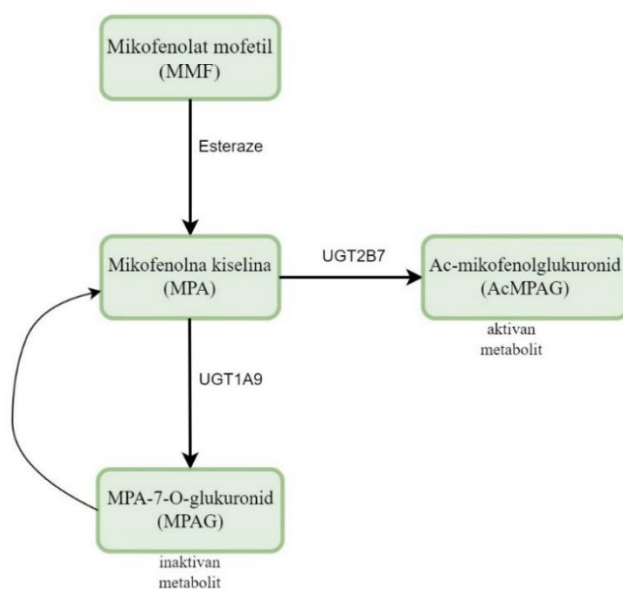
Uobičajeno se u vremenu od 6 do 12 sati nakon primjene lijeka primjećuje sekundarni porast koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi, što je posljedica enterohepatičke recirkulacije. Ukoliko se lijek primjenjuje istodobno s kolestiraminom (4 g triput dnevno), dolazi do smanjenja AUC-a MPA od otprilike 40 % što upućuje na značajnu količinu enterohepatične recirkulacije. U terapijskim koncentracijama, 97 % MPA vezano je na albumin u plazmi ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### 1.3.3. Metabolički put mikofenolne kiseline

Nakon oralne primjene, mikofenolat mofetil se bioaktivira pomoću enzima karboksilesteraza (CES), i to CES1 i CES2. U crijevima dolazi do hidrolize MMF u MPA, N-(2-karboksilmetil)-morfolin, N-(2-hidroksietil)-morfolin i N-oksid N-(2-hidroksietil)-morfolina pomoću enzima CES2. MMF koji izbjegne početnu intestinalnu hidrolizu ulazi u jetru kroz portalnu venu i hidrolizira se u MPA u hepatocitima. Enzimi CES1 i CES2 su izraženi u jetri, a samo CES2 je izražen u crijevima. Hidroliza MMF-a in vitro se događa u većoj mjeri u mikrosomima ljudske jetre nego u mikrosomima crijeva.

Glavni metabolički put MPA ide preko enzima II faze, a posredovan je jetrenim i crijevnim UDP glukuronozil transferazama (UGT). Primarni enzimi koji sudjeluju u glukuronidaciji su UGT1A8 i UGT1A9. Enzim UGT1A8 izražen je izvan jetre i odgovoran za metabolizam MPA u gastrointestinalnom traktu, dok je UGT1A9 odgovoran za metabolizam MPA u jetri. Glukuronidacijom nastaje neaktivni fenolni glukuronid – MPA-7-O-glukuronid (MPAG).

Drugi metabolit MPA je njegov acil glukuronidni oblik, AcMPAG (engl. *acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid*), sporedan metabolit koji nastaje uz pomoć enzima UGT2B7. AcMPAG je farmakološki aktivan te se smatra da bi mogao biti odgovoran za neke od nuspojava mofetilmikofenolata, poput proljeva i leukopenije.



Slika 4. Dijagram metabolizma mikofenolne kiseline.

Glukuronid MPA (MPAG) i acilni glukuronid MPA (AcMPAG) su supstrati organskih anionskih transportnih polipeptida (OATP), dok mikofenolna kiselina nije. MPAG i AcMPAG se izlučuju u žuč putem kanalikularnog proteina 2 (MRP2) koji je povezan s rezistencijom na više lijekova, a kodira ga gen ABCC2. Izlučivanje MPAG-a putem žuči povezano je s gastrointestinalnom (GI) toksičnošću zbog mikofenolne kiseline. MPAG izlučen u žuč podvrgava se deglukuronidaciji bakterijskim enzimima u gastrointestinalnom traktu da nastane MPA, koja se ponovno reciklira (Lamba i sur., 2014).

#### 1.3.4. Eliminacija

Količina lijeka koja se izlučuje urinom kao MPA ( $< 1$  % doze) je zanemariva. Nakon peroralne primjene, radioizotopom označeni mofetilmikofenolat, 93 % primijenjene doze detektira se u urinu, a 6 % u fecesu. Većina (otprilike 87 %) doze koja se primjeni izlučuje se u urinu u obliku MPAG-a.

MPA i MPAG u terapijskim koncentracijama se ne uklanjaju hemodijalizom, a pri visokim koncentracijama MPAG-a u plazmi ( $> 100$   $\mu\text{g/mL}$ ) uklanjaju se male količine MPAG-a.

U raspoloživosti MPA sudjeluju spomenuti organski anionski transportni polipeptidi (engl. *organic anion-transporting polypeptide*, OATP) i protein povezan s rezistencijom na više lijekova 2 (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*, MRP2); izooblici OATP-a, MRP2 i protein koji uzrokuje rezistenciju raka dojke na lijekove (engl. *breast cancer resistance protein*, BCRP) prijenosnici su povezani s izlučivanjem tih glukuronida kroz žuč. MPA također može prenositi protein povezan s rezistencijom na više lijekova (MDR1), no čini se da je doprinos tog prijenosnika ograničen na proces apsorpcije. U snažne interakcije s bubrežnim organskim anionskim prijenosnicima ulaze MPA i njegovi metaboliti u bubrežima.

Zbog enterohepatične recirkulacije, točno utvrđivanje parametara dispozicije MPA je otežano; mogu se navesti samo prividne vrijednosti. U zdravih dobrovoljaca i bolesnika s autoimunim bolestima su približne vrijednosti klirensa od 10,6 L/h odnosno 8,27 L/h, uz poluvijek od 17 sati. U bolesnika s transplantiranim organom srednje vrijednosti klirensa bile su više (u rasponu od 11,9 do 34,9 L/h), a srednji poluvijek kraći (5 – 11 sati), uz zanemarive razlike među bolesnicima s

presatkom bubrega, jetre ili srca. Ovi parametri eliminacije razlikuju se kod pojedinog bolesnika ovisno o istodobnoj primjeni drugih immunosupresiva, vremenu nakon transplantacije, koncentraciji albumina i bubrežnoj funkciji. Navedeni čimbenici objašnjavaju smanjenu izloženost kod primjene mofetilmikofenolata zajedno s ciklosporinom, kao i tendenciju povećanja koncentracije u usporedbi s vrijednostima neposredno nakon transplantacije ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

#### **1.4. Farmakogenetička varijabilnost mikofenolne kiseline**

Novi immunosupresivi i formulacije te napredak u terapijskom praćenju lijekova doveli su do značajnog smanjenja stope akutnog odbacivanja organa, produljenog preživljavanja presatka i poboljšanog ishoda u bolesnika. Unatoč navedenom, i dalje postoje razni izazovi u primjeni immunosupresivnih lijekova. Značajna je interindividualna varijabilnost u koncentracijama lijeka i odgovoru na lijek, a budući da su immunosupresivi lijekovi s uskim terapijskim indeksom, varijacije u koncentracijama immunosupresiva mogu rezultirati akutnom toksičnošću ili odbacivanjem transplanta (Warrington i Shaw, 2005).

Utvrđeno je da genetske varijante unutar gena koji kodiraju proteine uključene u prijenos i metabolizam mikofenolne kiseline utječu na farmakokinetiku i odgovor MPA. Značajan je polimorfizam UGT1A9, enzima u jetri koji je važan enzim za glukuronidaciju MPA u MPAG.

#### **1.5. Indikacije i doziranje**

Mikofenolat se primjenjuje kod transplantacije solidnih organa, a dostupan je u dvije formulacije na tržištu: MMF i EC-MPS. MMF je indiciran kao dio terapije za sprječavanje odbacivanja organa kod bolesnika koji primaju alogene bubrežne, srčane i jetrene transplantate kod odraslih primatelja, zajedno s inhibitorima kalcineurina te s ili bez glukokortikoida. U pedijatrijskoj populaciji, MMF je odobren za primjenu kod transplantacije bubrega. Također ima „off-label“ indikacije za primjenu kod autoimunih bolesti poput sistemskog erimatoznog lupusa, lupusnog nefritisa, vaskulitisa i nekih drugih.

Preporučena standardna oralna dnevna doza za odrasle bolesnike je 2 g kod transplantiranog bubrega, a za formulaciju EC-MPS, 720 mg je ekvivalentno 1 g MMF-a.

Preporučena doza u pedijatrijskoj populaciji kod transplantacije bubrega s istodobnom primjenom ciklosporina A je 1200 mg/m<sup>2</sup> tjelesne površine dnevno u dvije podijeljene doze. Kod istodobne primjene s takrolimusom ili primjene bez inhibitora kalcineurina preporučuje se primjena 900 mg/m<sup>2</sup> na dan u dvije podijeljene doze ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 1.6. Transplantacija

Transplantacija bubrega je metoda izbora u liječenju bolesnika u završnoj fazi kronične bolesti bubrega. To je postupak u kojem se uzimaju stanice, tkiva ili organ osobe darivatelja koja najčešće nije genetski istovjetna osobi primatelja. Genetsko nepodudaranje između darivatelja i primatelja organa može dovesti do neželjenih reakcija imunosnog sustava primatelja, što u konačnici može dovesti i do odbacivanja samog presatka. Funkcija imunosnog sustava je da prepozna i uklanja potencijalne opasnosti za organizam, a u tome sudjeluje urođena imunost, koja svojom aktivacijom daje upute za aktivaciju stečene imunosti. Kod presađivanja bubrega, jedan od glavnih ciljeva je postići toleranciju primatelja na presadak te smanjenje reakcije imunosnog sustava što se postiže primjenom imunosupresivne terapije (Bašić Jukić i sur., 2016).

Donori organa mogu biti umrle (kadaverične) ili žive osobe. Živi darovatelj organa je najčešće osoba koja je dio uže obitelji primatelja (Bašić Jukić i sur., 2016).

Prikupljeni klinički dokazi tijekom godina upućuju na to da postoji podudarnost transplantacije bubrega u odraslih osoba i djece, a podudarnost se odnosi na primjenu istih imunosupresivnih lijekova, procjenu funkcije presatka prema serumskom kreatininu te mehanizmima odbacivanja.

Općenito prihvaćene indikacije za transplantaciju bubrega u djece su ireverzibilno zatajenje bubrežne funkcije, najmanja dob od 6 do 12 mjeseci te najmanja težina od 6 do 10 kg. Usvojeni kriteriji za uvrštavanje na listu čekanja za kadaveričnu transplantaciju djece se razlikuju u pojedinim europskim državama. Prije transplantacije, imunizacija djece je nužna radi zaštite od preventibilnih bolesti, a također je bitna i obrada donjeg dijela mokraćnog sustava zbog mogućih abnormalnosti kod djece s kroničnom bubrežnom bolesti.

Imunosupresivna terapija predstavlja izazov u postransplantacijskom liječenju. Može uzrokovati brojne komplikacije kao što je disfunkcija presatka, a kod djece posebno utječe na smanjenje rasta, pogoduje infekcijama te povećava rizik od razvoja zloćudnih bolesti. Kortikosteroidi

(metilprednizolon, prednizolon) nepovoljno utječu na prekomjerno debljanje i kušingoidni izgled, a dugoročno imaju utjecaj na linearni rast djece pa se iz tog razloga u posljednje vrijeme u brojnim transplantacijskim centrima preporučuje nakon godine dana nastavak liječenja terapijom održavanja bez kortikosteroida. Od antimetabolita (mikofenolat mofetil, azatioprin) koji inhibiraju proliferaciju stanica, MMF djeluje više specifično jer inhibira sintezu purina u limfocitima, ali istodobno povećava sklonost zarazama. Međutim, kliničko iskustvo je pokazalo da je učestalost infekcija manja ako se uz mikofenolnu kiselinu nastavi terapija održavanja uz istodobnu primjenu minimalnih doza kortikosteroida. Kalcineurinski inhibitori (ciklosporin, takrolimus) i mTOR inhibitori (sirolimus, everolimus) su nezaobilazni dio terapije i imaju dokazanu učinkovitost u smanjenju akutnog odbacivanja nakon presađivanja bubrega u djece (Bašić Jukić i sur., 2016).

### **1.7. Bubrež**

Bubrež (lat. *ren*) je parni žljezdani organ veličine šake koji oblikom nalikuje zrnu graha. Smješteni su po jedan s obje strane kralježnice, ispod prsnog koša.

Primarna funkcija bubrega je održavanje pravilne ravnoteže vode i minerala u tijelu. Osim toga, bubrezi filtriraju i izlučuju otpadne produkte koji nastaju metabolizmom hrane, lijekova i štetnih tvari. Također sudjeluju u regulaciji krvnog tlaka izlučivanjem viška natrija. Ako se izlučuje premalo natrija, krvni tlak će vjerojatno porasti. Bubrezi također pomažu u regulaciji krvnog tlaka proizvodnjom enzima koji se zove renin. Kad dođe do pada krvnog tlaka ispod normalne razine, bubrezi izlučuju renin u krvotok, čime dolazi do aktivacije sustava renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS), što zauzvrat povisuje krvni tlak. Bubrezi proizvode i urotenzin, koji uzrokuje sužavanje krvnih žila i pomaže u povećanju krvnog tlaka. Osoba sa zatajenjem bubrega slabije je u stanju regulirati krvni tlak i sklona je visokom krvnom tlaku. Bubrezi sudjeluju i u izlučivanju nekih hormona poput eritropoetina, koji stimulira proizvodnju crvenih krvnih stanica u koštanoj srži. Također, bubrezi sudjeluju u održavanju zdravlja kostiju na način da sudjeluju u regulaciji razine kalcija i fosfora, minerala koji su ključni za zdravlje kostiju. To čine pretvaranjem neaktivnog oblika vitamina D, koji se proizvodi u koži te je prisutan i u mnogim namirnicama, u aktivni oblik vitamina D (kalcitriol) koji djeluje poput hormona koji stimulira apsorpciju kalcija i fosfora iz tankog crijeva.

Krv u glomerul ulazi pod velikim pritiskom, a velik dio tekućeg dijela krvi se filtrira kroz male pore u glomerulu, dok krvne stanice i većina velikih molekula zaostaju. Filtrirana i bistra tekućina ulazi u Bowmanov prostor i prolazi u tubul koji vodi do Bowmanove kapsule. Kod zdravih odraslih osoba, oko 180 litara tekućine se svakodnevno filtrira u bubrežne tubule, a bubreg reapsorbira gotovo svu tekućinu i elektrolite koji se nalaze u njoj. Samo oko 1,5 do 2 % tekućine se izlučuje kao urin.

Sve funkcije koje inače obavljaju dva bubrega može adekvatno obavljati jedan zdravi bubreg. Neki se ljudi se rode samo s jednim bubregom, dok drugi odluče donirati jedan bubreg za presađivanje kod osobe sa zatajenjem bubrega. U drugim slučajevima, jedan bubreg može biti ozbiljno oštećen zbog bolesti ili ozljede (Glenn, 2023).

### **1.7.1. Bolest bubrega**

Bolest bubrega je stanje u kojem su bubrezi oštećeni i ne mogu filtrirati krv na način koji bi trebali. Nepravilno funkcioniranje bubrega može dovesti do nakupljanja štetnih tvari i tekućine u organizmu.

Za procjenu bubrežne funkcije koriste se razni klinički laboratorijski testovi. Najbolji ukupni pokazatelj glomerularne funkcije je brzina glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR). GFR je volumen tekućine koja se filtrira iz kapilara glomerula u Bowmanovu kapsulu po jedinici vremena.

Najčešće korišteni endogeni marker za procjenu glomerularne funkcije je kreatinin. To je nusprodukt kreatin fosfata u mišićima kojeg tijelo proizvodi konstantnom brzinom. Kreatinin se većim dijelom iz krvi potpuno uklanja putem bubrega, a upravo smanjeni klirens bubrega rezultira povećanjem kreatinina u krvi. Količina dnevno proizvedenog kreatinina ovisi mišićnoj masi te postoji razlika u rasponima kreatinina između muškaraca i žena, djece i onih sa smanjenom mišićnom masom. Također, prehrana može utjecati na vrijednosti kreatinina pa tako nakon konzumacije crvenog mesa može doći do promjene za čak 30 %. Serumski kreatinin je kasniji pokazatelj oštećenja bubrega. Prije nego što se zamijeti porast serumskog kreatinina, došlo je do smanjenja bubrežne funkcije za 50 %. Prema međunarodnoj organizaciji KDIGO (engl. *Kidney*

*Disease Improving Global Outcomes*), kronična bubrežna bolest dijeli se na 5 stadija (Slika 5) (Gounden i sur., 2024).

Stadij		Glomerularna filtracija (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
1.	oštećenje bubrega uz normalnu glomerularnu filtraciju	> 90
2.	oštećenje bubrega uz blago smanjenje glomerularne filtracije	89 – 60
3.	umjereno smanjenje glomerularne filtracije	59 – 30
4.	teško smanjenje glomerularne filtracije	29 – 15
5.	konačno zatajenje bubrega	< 15 ili dijaliza

Slika 5. Stadiji bubrežne bolesti.

Razlikujemo akutno i kronično zatajenje bubrega.

Kod akutne bubrežne bolesti dolazi do naglog smanjenja funkcije bubrega koje obično traje kratko. Iako ne traje dugo, može uzrokovati dugotrajne posljedice čak i nakon liječenja temeljnog problema.

Kronična bubrežna bolest razvija se polako tijekom dužeg vremenskog razdoblja i može postupno dovesti do zatajenja bubrega. Dolazi do nepovratnog pogoršanja bubrežne funkcije koja polako prelazi u završni stadij bubrežne bolesti (engl. *end-stage renal disease*, ESRD). Ukoliko do toga dođe, osoba će vrlo vjerojatno trebati na transplantaciju bubrega, hemodijalizu ili peritonealnu dijalizu kako bi dulje ostala zdrava.

Uzrok bolesti bubrega kod djece može biti primjerice urođena mana, nasljedna bolest, infekcija u nekom drugom dijelu tijela koja prethodi razvoju bolesti, nefrotski sindrom, sistemska bolest poput lupusa te neka trauma poput opekotina ili krvarenja (Warady i Weidemann, 2023).

Kronično zatajenje bubrega može negativno utjecati na sam razvoj djeteta, na rast, snagu kostiju i živčani sustav. S obzirom da kod zatajenja bubrezi ne funkcioniraju pravilno, dolazi do nakupljanja otpadnih tvari u organizmu. Za djecu koja imaju zatajenje bubrega, idealan izbor nadomjesne bubrežne terapije je transplantacija bubrega, čime bi se trebao osigurati manji rizik obolijevanja i smrtnosti te omogućiti bolja kvaliteta života (Iyengar i sur., 2022).



### **1.7.2. Primjena lijekova nakon transplantacije bubrega**

Imunosupresivi su lijekovi koji se koriste u terapiji nakon presađivanja s ciljem smanjivanja sposobnosti tijela da odbaci presađeni organ. Trenutno postoje dva imunosupresivna protokola u transplantaciji bubrega, a to su:

1. Indukcijska terapija – primjenjuje se u vrijeme transplantacije ili neposredno nakon, a uključuje monoklonska i poliklonska protutijela
2. Terapija održavanja – lijekovi se primjenjuju dugoročno

Imunosupresive prema mehanizmu djelovanja možemo podijeliti u pet skupina: kortikosteroidi, inhibitori kalcineurina, antiproliferativni lijekovi, inhibitori proliferacijskih signala i biološki lijekovi. U terapiji održavanja najčešće se primjenjuje trojna imunosupresivna terapija koju čine kortikosteroidi, inhibitori kalcineurina (CNI) i antiproliferativni lijekovi.

Glukokortikoidi su često korišteni u liječenju autoimunih bolesti i čine glavnu komponentu imunosupresivne terapije koja se koristi za prevenciju odbacivanja transplantata. Kod dugoročne primjene povezuju se s metaboličkim poremećajima poput razvoja posttransplantacijske šećerne bolesti i hiperlipidemije, također mogu djelovati i negativno na gustoću kostiju uzrokujući sekundarnu osteoporozu. Iako su protokoli bez steroida i s brzim ukidanjem steroida zanimljivi, treba uzeti u obzir da su povezani s višom stopom akutnih odbacivanja te uvijek treba individualno pristupati takvom protokolu uz opreznu procjenu rizika odbacivanja.

U inhibitore kalcineurina ubrajamo ciklosporin A i takrolimus čije je djelovanje usmjereno na smanjenje aktivacije T-limfocita i posljedično na sprječavanje aktivacije B-limfocita. Metabolizam oba lijeka odvija se pomoću citokroma P450 3A, imaju uzak terapijski raspon i farmakokinetika ovih lijekova pokazuje značajne razlike između pojedinaca. Upravo zbog metaboliziranja preko enzima CYP3A je potrebno obratiti pozornost na lijekove koji inhibiraju njegov metabolizam, a također i na one koji utječu na transport P-glikoproteina jer mogu utjecati na koncentraciju inhibitora kalcineurina.

U antiproliferativne lijekove spadaju azatioprin i mikofenolna kiselina, a također se nazivaju i antimetabolitima. Oni utječu na sintezu nukleinskih kiselina, inhibiraju proliferaciju limfocita i smanjuju aktivnost NK stanica koje su odgovorne za pokretanje imunološkog odgovora. Istraživanja pokazuju da je mikofenolat superiorniji u odnosu na azatioprin zbog nižih stopa

akutnog odbacivanja i potencijalno boljeg preživljavanja presatka. Istraživanja provedena vezano uz interakciju među imunosupresivnih lijekova pokazala su kako takrolimus inhibira UDP-glukuronoziltransferazu, a to je enzim koji sudjeluje u metabolizmu mikofenolne kiseline te inhibicija dovodi do povećavanja njene koncentracije. Suprotno tome, istovremenom primjenom s ciklosporinom dolazi do smanjena razine mikofenolata. To je potvrđeno istraživanjima u kojima je došlo do značajnog povećanja razine mikofenolata nakon prekida primjene ciklosporina u usporedbi s razinama mikofenolata kod bolesnika koji su nastavili uzimati trojnu terapiju ili im je u terapiji ukinut prednizon.

Treba imati na umu da je uvijek potrebno terapiju prilagoditi individualno prema potrebama svakog bolesnika (Bašić Jukić i Kljajić, 2023).

### **1.8. Načela terapijskog praćenja lijekova**

Terapijsko praćenje koncentracije lijeka (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) je metoda koja se koristi u kliničkoj praksi, a odnosi se na kvantitativno određivanje koncentracije odabranog lijeka u biološkim uzorcima kao što su krv, serum ili plazma te se mjeri u određenim vremenskim intervalima. Provodi se u svrhu optimiziranja terapije, odnosno individualizacije terapije s ciljem postizanja što prikladnijeg terapijskog režima, sigurnije i učinkovitije primjene lijekova s minimalnom toksičnošću.

Prilikom mjerenja koncentracije lijeka, važno je pravilno odabrati vrijeme uzorkovanja krvi, odnosno uzeti uzorak krvi u točno određeno vrijeme nakon same primjene lijeka, odabrati vrstu uzorka krvi, tehniku mjerenja te provesti stručnu interpretaciju dobivenih rezultata kako bi se osigurala puna klinička korist (Kang i Lee, 2009).

Osnovno načelo kliničke farmakologije je da je farmakološka aktivnost egzogeno primijenjene tvari, odnosno lijeka, povezana s koncentracijom slobodnog lijeka koji je vezan na svoj receptor ili na mjesto djelovanja. Drugim riječima, koncentracija tvari u krvi, serumu ili nekom drugom mjerljivom tkivu, povezana je s koncentracijom slobodnog, odnosno nevezanog lijeka, na njegovom mjestu djelovanja. Lijekovi se primjenjuju s ciljem postizanja željenog terapijskog učinka pri čemu se pomno bira lijek i protokol doziranja za pojedinog bolesnika, a pritom uzimajući u obzir terapijski raspon. Terapijski raspon je omjer između toksične doze i terapijske doze lijeka.

Što je ovaj omjer bliži vrijednosti 1, to je sami lijek teže koristiti u kliničkoj praksi. Može se definirati i kao raspon koncentracije lijeka koji je povezan s maksimalnom učinkovitošću i minimalnom toksičnošću, odnosno raspon koncentracije lijeka unutar kojeg je vjerojatnost željenog kliničkog odgovora relativno visoka, dok je vjerojatnost neželjene toksičnosti relativno niska. Terapijski raspon lijeka je koristan alat u kliničkoj praksi, no ne smije ga se koristiti kao apsolutni pokazatelj. Klinička primjena lijekova koji imaju uzak terapijski raspon dovela je do praćenja koncentracije lijekova kod bolesnika, tzv. TDM, kako bi se prilagodila doza za svakog bolesnika s ciljem postizanja željene terapijske koncentracije lijeka. Stručnjaci koji su uključeni u korištenje informacija izvedenih iz TDM-a moraju imati na umu da se tumačenje koncentracije lijeka u plazmi mora provoditi zajedno s procjenom kliničkog statusa bolesnika te također uzimati u obzir druge čimbenike koji mogu imati važan utjecaj na farmakodinamički odgovor pojedinca, primjerice primjena drugih lijekova (Robles Piedras i sur., 2013).

Terapijsko praćenje koncentracije lijeka provodi se za lijekove koji zadovoljavaju sljedeće kriterije: postoji jasan odnos između koncentracije lijeka i učinka, postoji mala razlika između učinkovite koncentracije i neučinkovite ili toksične koncentracije tog lijeka – lijek ima uski terapijski indeks, ne postoje neki drugi parametri koji su pokazatelji djelovanja lijeka, poput krvnog tlaka, koje je lakše izmjeriti, postoji velika varijabilnost izloženosti lijeku među bolesnicima nakon fiksnog doziranja lijeka, trajanje liječenja odabranim lijekom mora biti dovoljno dugo da bi terapijsko praćenje imalo koristi te moraju postojati analitičke metode za mjerenje koje su pouzdane i standardizirane (Udomkarnjananun i sur., 2021).

Imunosupresivi zahtijevaju terapijski nadzor lijeka zbog toga što imaju uski terapijski raspon i značajnu interindividualnu varijabilnost koncentracije u krvi. Kod bolesnika s transplantiranim organom, koncentracije iznad i ispod terapijskih mogu dovesti do neželjenih učinaka. Ako su koncentracije ispod terapijskih, primatelj transplantata je u riziku od odbacivanja presađenog organa, a kad su iznad terapijskih koncentracija, u opasnosti je od prekomjerne imunosupresije koja potencijalno može dovesti do infekcije ili može doći do pojave nekih neželjenih učinaka lijeka, poput neuroloških ili gastrointestinalnih nuspojava.

Varijabilnost između pojedinaca može biti uzrokovana raznim čimbenicima, kao što su: interakcije između lijeka i hrane, lijek-bolest interakcije, bubrežna insuficijencija, upala i infekcija, spol, dob,

polimorfizmi važnih enzima i transportera te masa jetre. Terapijsko praćenje provodi se za: ciklosporin, takrolimus, mikofenolnu kiselinu, sirolimus i everolimus (Robles Piedras i sur., 2013).

### **1.8.1. Terapijsko praćenje mikofenolne kiseline**

Kad je mikofenolna kiselina došla na tržište, proizvođač je preporučio primjenu fiksne doze u rasponu od 2 do 3 g dnevno u podijeljenim dozama. Međutim, provedenim istraživanjima tijekom godina ustanovljeno je da postoje razni čimbenici koji mogu utjecati na koncentraciju metabolita mikofenolne kiseline.

Budući da niz različitih čimbenika ima utjecaj na farmakokinetiku mikofenolne kiseline te sama činjenica da je teško predvidjeti njihovo međudjelovanje i utjecaj na varijabilnost među bolesnicima, u praksi se počelo primjenjivati terapijsko praćenje koncentracije lijeka u svrhu individualnog doziranja. Studija sustavnog pretraživanja literature iz 2008. godine, čiji kriterij za uključivanje studija je bio da odabrane studije uključuju odrasle ili pedijatrijske primatelje presađenih solidnih organa koji su primali mikofenolnu kiselinu kao dio imunosupresivnog protokola, dala je odgovor na dva pitanja: postoji li odnos između farmakokinetičkih parametara (SPSS, LSS ili AUC) i kliničkih ishoda te poboljšava li praćenje pomoću tih strategija (SPSS, LSS ili AUC) kliničke ishode.

Naime, AUC se smatra zlatnim standardom za praćenje razina lijeka, a predstavlja odraz izloženosti lijeku tijekom cijelog razdoblja doziranja. Iako se smatra najboljom mjerom ukupne izloženosti lijeku, potreba za višestrukim uzorcima krvi unutar 12 sati nakon doze ga čini nekad nepraktičnim načinom praćenja za svakodnevnu kliničku upotrebu. Iz tog razloga, brojni transplantacijski centri koriste uzorkovanje u jednoj točki, uobičajeno najniže razine u krvi – mjerenje prije doze, za terapijsko praćenje imunosupresiva poput ciklosporina i takrolimusa, a slične strategije su predložene i za praćenje razine MPA u krvi. Farmakokinetičke studije su pokazale slabu korelaciju najnižih razina s punim AUC-om, a najbolje korelacije su vidljive kod kasnije uzetih uzoraka, oko 6 do 8 sati od primjene doze. Nemogućnost metode uzorkovanja u jednoj točki da učinkovito predvidi AUC je dovela do provođenja brojnih studija koje istražuju upotrebu strategije korištenja niza točaka uzorkovanja za predviđanje AUC na temelju regresijske analize ili Bayesijskog modela, a obično su se koristile između 2 i 4 točke.

Studije koje se temelje na regresijskog analizi koreliraju puni AUC u uzorku populacije s pojedinačnim koncentracijama u zadanim vremenskim točkama, što rezultira jednadžbom koja procjenjuje AUC koristeći koncentracije iz dva ili više mjerenja. Općenito, te studije koje uključuju 2 do 3 vremenske točke unutar prva dva sata nakon primjene doze mikofenolne kiseline pokazuju prihvatljivu korelaciju sa smanjenom pristranošću i poboljšanom preciznošću u usporedbi sa strategijama s jednom točkom. Do poboljšanja korelacije dolazi kod dodavanja dodatne vremenske točke 3 do 6 sati nakon doziranja, ali time se smanjuje klinička pogodnost te se smatra da možda ipak nije potrebno dodavanje te dodatne točke (Knight i Morris, 2008).

Također, neke nedavne studije pokazale su da bi izloženost MPA mogla biti bolje predviđena putem jednadžbi koje se temelje na LSS-u (engl. *Limited sampling strategy*) te da se provodi uzorkovanje u dvije do četiri točke. Takve LSS jednadžbe pokazale su dobru korelaciju s AUC-om s poboljšanom vrijednosti  $r$  (0,90 – 0,94) što tu metodu čini prikladnijim alatom za mjerenje TDM-a od  $C_0$  (Udomkarnjananun i sur., 2021).

Za mikofenolnu kiselinu postoji povezanost između vrijednosti AUC-a i ishoda liječenja pa se dovodi u pitanje klinička korist praćenja jedne koncentracije, posebno  $C_0$ , tzv. „trough“ koncentracije. Tijekom proteklog desetljeća provedeno je nekoliko studija za procjenu kliničke korisnosti koncentracije lijeka kod terapije mikofenolnom kiselinom. Iako se očekivalo da će se ovim studijama u potpunosti razjasniti korisnost praćenja terapije mikofenolne kiseline, dobiveni rezultati bili su proturječni i nisu uspješno razriješili kontroverze oko ovog područja terapijskog praćenja lijekova. Najniža koncentracija MPA u plazmi, odnosno  $C_0$ , se mjeri neposredno prije primjene doze, a ovakav način mjerenja može imati za nedostatak variranje vremenskog intervala od posljednje doze, odnosno ne uzimanje lijeka u točno vrijeme kad bi određena doza trebala biti primijenjena. Praćenje terapijskih koncentracija mikofenolne kiseline ima ograničene strategije uzorkovanja za procjenu AUC-a. Interval doziranja MPA  $AUC_{0-12h}$  se općenito smatra najpouzdanijim farmakokinetičkim parametrom indeksa rizika za akutno odbacivanje, ali je sama primjena nepraktična u kliničkoj praksi. Također, uzimanje uzoraka pojedinih vremenskih točaka, kao što je najniža koncentracija ili neka druga koncentracija, ne koreliraju dobro s AUC mikofenolne kiseline, posebice u posttransplantacijskom razdoblju presađivanja bubrega te i kod bolesnika koji uz mikofenolnu kiselinu također primjenjuju još neki od imunosupresiva poput ciklosporina ili takrolimusa. Upravo iz ovih razloga, vrlo je važna procjena korelacije koncentracije

$C_0$  ili neke druge pojedinačne vremenske točke s AUC-om kako bi se uspostavilo zadovoljavajuće rutinsko praćenje lijeka. Osim mjerenja koncentracije  $C_0$ , ispituju se i druge vremenske točke nakon doziranja mikofenolne kiseline u svrhu procjene mogućnosti predviđanja pune AUC vrijednosti. Puni izračun AUC vrijednosti zahtjeva minimalno osam uzoraka krvi tijekom 12-satnog intervala doziranja što je u kliničkoj praksi vrlo nepraktično, stoga se primjenjuju skraćene sheme uzorkovanja koje uključuju do pet uzoraka plazme. Provedena istraživanja dala su rezultate koji procjenjuju da je korelacija između pristupa skraćenog uzorkovanja i pune AUC vrijednosti MPA visoka ( $r^2 > 0,8$ ) (Robles Piedras i sur., 2013).

Za procjenu primjene odgovarajuće doze lijeka važna je koncentracija mikofenolne kiseline u plazmi. Društvo za transplantaciju okupilo je 47 stručnjaka iz cijelog svijeta s ciljem da bi se pružila objektivna i uravnotežena klinička interpretacija znanstvenih dokaza o terapijskom praćenju mikofenolne kiseline. Prema konsenzusu iz 2008., preporučeni terapijski interval AUC koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi je 30 do 60 mg\*h/L (Kuypers i sur., 2010).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Imunosupresivi su lijekovi koji potiskuju odgovor imunološkog sustava na transplantirani organ čime se smanjuje sposobnost prepoznavanja transplantiranog organa kao stranog tijela što ih čini važnim dijelom terapijskog protokola. Jedan od najčešće korištenih imunosupresiva u terapiji nakon transplantacije bubrega, uz takrolimus, je mikofenolna kiselina. Imunosupresivi zbog svog uskog terapijskog raspona i interindividualnih razlika u metabolizmu spadaju u skupinu lijekova koji zahtijevaju terapijsko praćenje. To je koristan alat u kliničkog praksi za optimizaciju farmakoterapije te osiguravanje da se koncentracije lijeka održavaju unutar željenog terapijskog raspona u kojem je lijek učinkovit i siguran, a time se izbjegavaju i subterapijske doze, ali i moguće toksične razine lijeka.

S obzirom na to da se radi o primjeni mikofenolne kiseline u pedijatrijskoj populaciji, gdje upravljanje imunosupresijom nakon transplantacije bubrega predstavlja poseban izazov, terapijsko praćenje lijeka je od iznimne važnosti. Također, svi bolesnici, a posebno djeca, trebaju prilagođene doze i protokole liječenja kako bi se postigla učinkovita koncentracija lijeka bez izazivanja toksičnosti. Iako je terapijsko praćenje lijeka danas široko primjenjivano u praksi, nije potpuno utvrđen njegov doprinos za mikofenolnu kiselinu, osobito zbog loše povezanosti minimalne (*trough*) koncentracije s kliničkim ishodom i problema oko provedbe potpune AUC u kliničkim uvjetima.

Ciljevi rada su:

- Mjeriti i procijeniti koncentracije mikofenolne kiseline u uzorcima plazme bolesnika nakon transplantacije
- Izmjerene koncentracije analizirati prema spolu
- Usporediti rezultate dobivene izabranim jednadžbama za izračun AUC mikofenolne kiseline temeljene na ograničenom broju uzoraka
- Procijeniti minimalne (*trough*) koncentracije mikofenolne kiseline prema definiranom terapijskom rasponu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Uzorci**

Za potrebe ispitivanja korištena je puna krv bolesnika uzorkovana u epruvetu s antikoagulansom EDTA. Uzorci koji su bili transportirani u laboratorij iz drugih kliničkih jedinica nisu bili zamrznuti. Za analizu se koristila plazma koja se dobije nakon centrifugiranja uzorka krvi pri 3500 o/min na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Plazma je stabilna na sobnoj temperaturi kroz 3 dana, a do tjedan dana uzorak se čuvao pohranjen u hladnjaku na +2 do +8 °C sve do analize. Ukoliko su se uzorci čuvali duže, a maksimalno 12 tjedana, potrebno ih je pohraniti u ledenici hladnjaka na -18 °C.

Svakom je bolesniku određivana koncentracija mikofenolne kiseline.

##### **3.1.2. Oprema**

Za određivanje mikofenolne kiseline u plazmi korištena je kromatografska metoda na uređaju tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC):

Shimadzu HPLC-2 Prominence sustav koji se sastoji od: otplinjavača (DGU-20A3), 2 pumpe (LC-20AD), autoinjektora SIL-20AHT, kontrolne jedinice (CBM-20A), spektrofotometrijskog detektora s diodnim nizom (SPD-M20A) te termostatisane kolone (CTO-20AC).

- Vorteks (TechnoKartell TK3S)
- Centrifuga (Hettich Zentrifugen Mikro200)

HPLC sustav je povezan s računalom i pisačem.



### **3.1.3. Laboratorijski pribor**

- Plastične epruvete
- Eppendorf epruvete
- Automatske pipete (Eppendorf Research plus) od 10–100, 20–200, 100–300  $\mu\text{L}$
- Bočica za injiciranje sa staklenim insertom od 200  $\mu\text{L}$
- Staklene čaše od 100 mL
- Plastične kapaljke
- Hladnjak

### **3.1.4. Kemikalije**

- pročišćena voda (HPLC čistoće  $< 0,060 \mu\text{S/cm}$ )
- metanol (Merck)
- Komercijalni ClinRep® Complete Kit for Mycophenolic Acid in Plasma (REF 29000, RECIPE, Njemačka) koji se sastoji od:
  - o mobilne faze
  - o internog standarda
  - o tekuće test otopine za provjeru MPA u plazmi
  - o liofiliziranog plazma kalibracijskog standarda
  - o sredstva za taloženje
  - o kontrole kvalitete L1 i L2

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema HPLC sustava za rad**

Prije instalacije HPLC kolone, sustav je potrebno isprati s 30 mL MeOH/H<sub>2</sub>O protokom od 1 mL/min. Nakon toga sustav se ispiri s komercijalnom mobilnom fazom. Mobilna faza čuva se na sobnoj temperaturi. Instalira se HPLC kolona te nakon što se bazna linija stabilizira, mobilna faza se stavi u recirkulaciju.

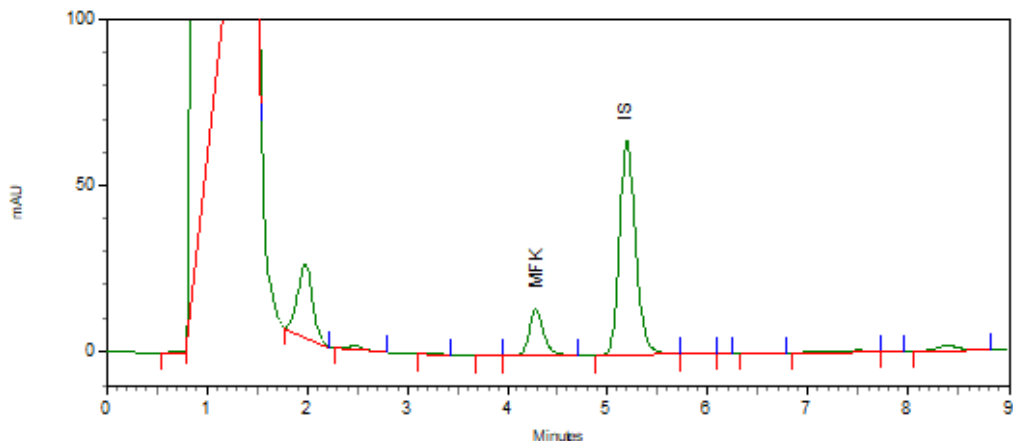
### **3.2.2. Kromatografski uvjeti**

- temperatura kolone: 30 °C
- protok mobilne faze brzinom od 1,2 mL/min
- UV detektor je namješten na 215 nm
- volumen uzorka za analizu je 50 µL

### **3.2.3. Postupanje s uzorcima bolesnika i priprema uzoraka za analizu**

Uzorak plazme iz koje se određuje koncentracija mikofenolne kiseline se ekstrahira iz uzorka pune krvi. Uzorak za analizu na HPLC-u se priprema na način da se uzima: 100 µL uzorka (plazma bolesnika, kontrole i kalibrator), zatim se dodaje 20 µL internog standarda te se kratko izmiješa na vorteks miješalici. Nakon toga pipetom se dodaje 200 µL precipitacijskog reagensa za precipitaciju proteina i miješa se 30 sekundi na vorteks miješalici. Nakon toga se uzorak centrifugira 5 minuta pri 10 000 o/min na sobnoj temperaturi. Za analizu se injektira 50 µL supernatanta u HPLC sustav.

Na opisani način pripremljeni uzorci su stabilni barem 24 sata ukoliko su pohranjeni na sobnoj temperaturi (15 – 30 °C), 10 dana ukoliko su pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C te 3 mjeseca kada su pohranjeni na temperaturi nižoj od 18 °C.



Slika 6. Kromatogram uzorka komercijalne kontrole s mikofenolnom kiselinom i unutarnjim standardom (IS) (HPLC Prominence Shimadzu i PDA detektor SPD-M20A).

### 3.2.4. Očitavanje rezultata

Za analizu je korišten HPLC-2 Prominence Shimadzu izokratični sustav. HPLC kolona je termostatirana na 30 °C kako bi se izbjegle fluktuacije ovisne o temperaturi te optimizirala stabilnost razdvajanja. HPLC sustavu dodan je UV detektor podešen na 204 nm.

Ista se količina internog standarda dodaje u svaki uzorak (kalibrator, kontrolu, uzorak bolesnika) te se koncentracija mikofenolne kiseline dobiva iz jednadžbe:

$$C(\text{sample}) \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = C(\text{calibrator}) \cdot \frac{A(\text{sample}) \cdot IS(\text{calibrator})}{A(\text{calibrator}) \cdot IS(\text{sample})}$$

\*legenda za oznake unutar jednadžbe:

$A_{\text{sample}}$  = površina/visina pika MPA u uzorku

$A_{\text{calibrator}}$  = površina/visina pika MPA u kalibracijskom standardu

$IS_{\text{sample}}$  = površina/visina pika internog standarda u uzorku

$IS_{\text{calibrator}}$  = površina/visina pika internog standarda u kalibracijskom sredstvu

$C_{\text{calibrator}}$  = koncentracija MPA u kalibracijskom sredstvu

$C_{\text{sample}}$  = koncentracija MPA u uzorku

### 3.2.5. Statističke metode

Prikupljeni podaci o ispitanicima obrađeni su statistički u računalnim programima Microsoft Excel kao dio paketa Microsoft Office 2013 i MedCalc verzija 23.0.2. Pomoću D'Agostino-Pearson testa utvrđeno je da li uzorci prate normalnu razdiobu. D'Agostino-Pearsonov test procjenjuje koliko se raspodjela podataka razlikuje od normalne Gaussove raspodjele koristeći statističke mjere simetričnosti i oblika krivulje. Ključni pokazatelj testa je P vrijednost. Ukoliko je dobivena  $P < 0,05$ , odbacuje se hipoteza da je raspodjela podataka normalna. Ako podaci prate normalnu razdiobu, za njihovu statističku obradu mogu se koristiti parametrijski testovi poput T-testa.

Analiza vrijednosti AUC dobivenih pomoću različitih formula učinjena je pomoću povezanog T-testa, a podaci su prikazani pomoću kutijastog dijagrama.

Usporedba *trough* koncentracija mikofenolne kiseline u bolesnika podijeljenih u dvije grupe prema spolu analizirana je pomoću Mann-Whitney testa. Taj test koristi se u statistici za usporedbu dviju nezavisnih skupina podataka koji ne slijede normalnu razdiobu kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između grupa. Provedena je i kratka statistička obrada vrijednosti *trough* koncentracija s obzirom na terapijski interval, a dobiveni rezultati prikazani su pomoću kružnog dijagrama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI

#### 4.1.1. Bolesnici s koncentracijom mikofenolne kiseline u više točaka

U studiju je uključeno 12 bolesnika kod kojih je za terapijsko praćenje provedeno mjerenje koncentracija mikofenolne kiseline u više točaka (0 min – prije terapije, 20, 60 i 120 minuta nakon terapije).

Tablica 1. Deskriptivni podaci bolesnika kod kojih je provedeno terapijsko praćenje mikofenolne kiseline u više točaka

	N	%
<b>ISPITANICI</b>	12	100
<b>SPOL – muški</b>	5	41,67
<b>SPOL – ženski</b>	7	58,33
	<b>Median</b>	<b>Raspon</b>
<b>Dob (g)</b>	15,5	7 – 20
	<b>Doza mikofenolne kiseline (mg/dan)</b>	<b>Doza takrolimusa (mg/dan)</b>
<b>Median</b>	1000	3,5
<b>X</b>	886	4,6
<b>SD</b>	350,3	2,5
<b>Raspon</b>	360 – 1500	2,25 – 13

Od 12 bolesnika kojima je učinjena kratka farmakokinetika, 5 bolesnika je muškog spola, a 7 ženskog. Dob bolesnika je u rasponu od 7 do 20 godina, a medijan je 15,5 godina.

Svi bolesnici su u terapiji su imali mikofenolnu kiselinu i takrolimus. Dobivali su jedan od dva preparata mikofenolne kiseline koji su na tržištu: CellCept ili Myfortic i uzimali ih u dvije dnevne doze. Svi bolesnici su uz mikofenolnu kiselinu uzimali i takrolimus, kao Adoport ili Prograf u različitim dozama. Točne doze navedenih lijekova za pojedine bolesnike prikazane su u Tablici 2. Najniža primjenjivana doza CellCept-a je 400 mg, Myfortic-a 360 mg, dok su najviše doze

CellCept-a 1500 mg te Myfortic-a 1480 mg. Neki bolesnici uzimaju CellCept u obliku sirupa. Takrolimus se najčešće primjenjuje u dvije dnevne doze. Najniža primjenjivana doza Prografa je 2,25 mg, dok je najviša primjenjivana doza 13 mg. Adoport se primjenjuje kod svih bolesnika u dozi od 3,5 mg.

Koncentracije mikofenolne kiseline u 33 odvojene serije mjerenja u četiri točke za 12 bolesnika prikazane su u Tablici 2. Mjerenja su provedena u „nultom“ vremenu, tj. prije primjene terapijske doze te 20, 60 i 120 minuta nakon primjene doze lijeka. Za svakog bolesnika prikazana je dob, oblik lijeka i doza u vrijeme uzorkovanja te izmjerene koncentracije mikofenolne kiseline u svim točkama i koncentracije takrolimusa. U tablici su prikazane i AUC vrijednosti za mikofenolnu kiselinu koje su izvučene iz povijesti bolesti bolesnika, a dobivene iz ove četiri točke. Transplantacije bubrega u djece krenule su u suradnji s kliničkim centrom u inozemstvu koji je i dalje uključen u praćenje bolesnika i procjenu izloženosti mikofenolnoj kiselini. Koncentracije mikofenolne kiseline koje su izmjerene u Kliničkom bolničkom centru Zagreb poslane su u centar u inozemstvu u kojem je izračunata AUC vrijednost prema formuli za koju su utvrdili korelaciju s učinkom. Dobivena vrijednost AUC se koristila za liječenje i daljnju korekciju terapije, a korištena formula nam nije bila dostupna.

Tablica 2. Dob, terapija, doze i koncentracije lijekova, te AUC MPA u bolesnika s mjerenjima mikofenolne kiseline u više točaka

BOLESNIK	DOB (g)	Lijek	MPA (mg/d)	MPA koncentracija (mg/L)				AUC (mg*h/L)	Lijek	Takrolimus doza (mg/d)	Takrolimus konc. (µg/L)
				0	20	60	120				
<b>Vrijeme uzimanja uzorka (min)</b>				<b>0</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>120</b>				
<b>1</b>	15	CellCept	1000	2,9	2,7	10,3	7,0	59,3	Adoport	3,5	3,7
		CellCept	1000	2,8	2,0	1,3	10,4	27,8	Adoport	3,5	5,6
		CellCept	1000	0,8	0,9	4,7	3,8	/	Adoport	3,5	5,3
		CellCept	1250	1,7	1,7	7,1	11,0	57,2	Adoport	3,5	4,7
		CellCept	1000	4,1	4,5	12,5	8,9	75,2	Adoport	3,5	4,2
		CellCept	1000	0,8	3,6	7,5	5,7	39	Adoport	3,5	4,3
		CellCept	1000	0,7	0,6	10,0	3,7	29	Adoport	3,5	4,9
		CellCept	1200	0,3	10,9	6,6	3,0	21,9	Adoport	3,5	5,8
<b>2</b>	14	CellCept	1500	1,3	9,2	14,3	6,0	53,2	Prograf	3,75	5,3
		CellCept	1250	1,4	3,6	24,7	11,1	76,9	Prograf	5,5	10,3
<b>3</b>	18	CellCept	1250	7,5	7,3	11,9	8,1	71	Prograf	13	15,1
		CellCept	500	2,8	7,2	10,8	4,0	/	Prograf	8,5	6,1
<b>4</b>	16	Myfortic	360	4,4	4,3	24,4	5,8	84,2	Prograf	8,25	4,0
		CellCept	400	6,1	11,4	6,5	3,6	47,7	Prograf	8,5	5,0
		CellCept	400	3,4	12,4	5,0	2,1	30,7	Prograf	8,5	5,6
		CellCept	500	3,9	3,5	5,1	4,8	49,6	Prograf	8,5	6,6

<b>5</b>	13	CellCept	750	1,3	1,7	8,5	5,5	39	Prograf	2,5	4,9
		CellCept	750	0,9	4,8	14,6	3,4	39,8	Prograf	2,5	3,8
		CellCept	1000	0,8	8,0	8,7	3,5	34,4	Prograf	2,5	3,6
		CellCept	1000	1,0	3,0	14,4	3,7	36,6	Prograf	3	4,5
		CellCept	1250	2,4	2,3	20,2	6,4	59,5	Prograf	3	4,6
		CellCept	1000	1,5	2,6	22,5	5,1	66,1	Prograf	3	4,0
		CellCept	1000	1,4	5,6	11,3	3,8	/	Prograf	3	4,4
<b>6</b>	13	CellCept	1000	2,2	4,1	6,2	1,9	25	Prograf	5	2,9
		CellCept	750	2,5	2,9	16,5	9,0	68	Prograf	5	4,3
		CellCept	750	2,2	13,7	9,9	3,9	45,6	Prograf	3,75	3,8
<b>7</b>	11	CellCept	400	6,2	10,5	20,5	9,3	99,9	Prograf	2,25	6,6
<b>8</b>	19	CellCept	1500	4,0	4,6	8,3	12,2	77,9	Adoport	3	6,4
		Myfortic	540	3,3	2,9	23,3	6,7	80,5	Adoport	3,5	5,9
<b>9</b>	19	Myfortic	1480	4,2	4,0	20,3	8,0	78,1	Prograf	5,5	6,4
<b>10</b>	20	CellCept	750	2,1	2,1	1,9	9,5	57,2	Prograf	3,5	/
<b>11</b>	20	Myfortic	360	3,0	2,3	1,8	6,2	47	Prograf	4,5	5,4
<b>12</b>	7	Myfortic	360	1,0	3,2	2,4	1,4	16,2	Prograf	4	5,6



Bolesnica 1 ima 15 godina, a u terapiji ima CellCept i Adoport. Početna doza mikofenolne kiseline bila je 1000 mg/dan, a mijenjana je nakon što je vrijednost AUC bila niža od donje granice terapijskog intervala (30 mg\*h/L) te je ponovno smanjena na početnu dozu kad se postigao porast AUC vrijednosti. Ponovno povećanje doze dogovoreno je nakon što je AUC vrijednost pala ispod 30 mg\*h/L u dva uzastopna pregleda.

Bolesnik 2 ima 14 godina. U terapiji ima Prograf i CellCept u dozi od 1500 mg na dan. Dnevna doza smanjena je na 1250 mg s obzirom da je AUC bio bliže gornjoj granici terapijskog intervala. Potrebno je daljnje praćenje jer nije postignut željeni odgovor.

Bolesnik 3 ima 18 godina. U terapiji ima Prograf te CellCept u dozi od 1250 mg na dan, a koji je smanjen na 500 mg zbog visoke AUC vrijednosti. Koncentracije mikofenolne kiseline su pale, ali vrijednosti AUC-a nije dobivena iz suradne ustanove.

Bolesnica 4 ima 16 godina. U terapiji ima Prograf i Myfortic u dozi od 360 mg dnevno koji je nakon prve specijalističke kontrole zamijenjen CellCept-om. Kod bolesnice nije promijenjena doza mikofenolne kiseline već je zamijenjen lijek i dobivene su vrijednosti AUC unutar terapijskih intervala.

Bolesnik 5 ima 13 godina. U terapiji ima Prograf i CellCept u početnoj dozi od 750 mg dnevno, a koja je povišena na 1000 mg kod AUC vrijednosti od 39,8 mg\*h/L, a potom na 1250 mg dnevno jer je AUC bio 36,6 mg\*h/L. Nakon postizanja povišenja AUC vrijednosti, doza je smanjena na 1000 mg na dan.

Bolesnica 6 ima 13 godina. U terapiji ima CellCept i Prograf. Doza mikofenolne kiseline bila je 1000 mg dnevno te je smanjena na 750 mg kad je vrijednost AUC bila iznad terapijskog intervala.

Bolesnica 7 ima 11 godina. U terapiji ima CellCept i Prograf. Iako je doza mikofenolne kiseline 400 mg dnevno, AUC je daleko iznad terapijskog intervala.

Bolesnica 8 ima 19 godina. U terapiji početno ima CellCept koji je zamijenjen Myfortic-om te je doza mikofenolne kiseline smanjena s 1500 mg na 540 mg. Zamjena formulacije lijeka i odgovarajuće doze nije značajno snizila vrijednost AUC-a. Uz mikofenolnu kiselinu, u terapiji ima Adoport.

Bolesnik 9 ima 19 godina. U terapiji ima Prograf i Myfortic u dozi od 1480 mg. AUC vrijednost je viša od terapijske vrijednosti, ali nije napravljena kratka kinetika nakon promjene terapije nakon specijalističkog pregleda.

Bolesnik 10 ima 20 godina. U terapiji ima Prograf i CellCept u dozi od 750 mg dnevno. AUC vrijednost je unutar granica terapijskog intervala.

Bolesnica 11 ima 20 godina. U terapiji ima Prograf i Myfortic u dozi od 360 mg dnevno. AUC vrijednost je unutar terapijskog intervala.

Bolesnica 12 ima 7 godina. U terapiji ima Prograf i Myfortic u dozi od 360 mg dnevno. Vrijednost AUC je 16,2 mg\*h/L što je značajno niže od donje granice terapijskog intervala i nemamo podatke je li došlo do promjene u terapiji.

#### **4.1.2. Izračun AUC vrijednosti s odgovarajućim formulama iz literature**

U suradnji s liječnicima, pedijatrijskim nefrolozima, iz literature su preuzete dvije formule za izračun površine ispod krivulje (AUC) koje odgovaraju našoj grupi ispitanika i vremenima mjerenja koncentracije mikofenolne kiseline. Vrijednosti AUC su izračunate prema sljedećim formulama:

$$\text{Formula 1: eMPA} - \text{AUC}_{0-12} = 8,70 + 4,63C_0 + 1,90C_1 + 1,52C_2$$

$$\text{Formula 2: eMPA} - \text{AUC}_{0-12} = 7,75 + 6,49C_0 + 0,76C_{0,5} + 2,43C_2$$

Navedene formule zahtijevaju tri mjerenja koncentracije MPA u plazmi –  $C_0$  je koncentracija neposredno prije primjene terapijske doze lijeka, zatim  $C_1$  je izmjerena 60 minuta nakon primjene doze te treća točka, odnosno  $C_2$ , izmjerena 120 minuta nakon primjene lijeka. U drugoj formuli je druga koncentracija izmjerena 30 minuta nakon primjene doze ( $C_{0,5}$ ). S obzirom na to da su naša mjerenja provedena u vremenu prije primjene terapije, 20, 60 i 120 minuta nakon primjene terapije, u drugu formulu prilikom izračuna uvrštena je vrijednost koncentracije koja je izmjerena 20 minuta nakon primjene terapije. Vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i izračunate vrijednosti prema navedenim formulama za sve bolesnike prikazane su u Tablici 3., a formule su navedene redom: F1 za Formulu 1 i F2 za Formulu 2. Za sve tri vrijednosti u izračunu su korištene koncentracije

dobivene pri uzorkovanju u četiri vremena: prije primjene lijeka, 20, 60 i 120 minuta nakon primjene doze.

Tablica 3. Vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i dobivene izračunom prema formulama F1 i F2

<b>BOLESNIK</b>	<b>AUC (mg*h/L)</b>	<b>F1 - AUC (mg*h/L)</b>	<b>F2 - AUC (mg*h/L)</b>
<b>1</b>	59,3	52,3	51,4
	27,8	39,9	52,2
	/	27,1	25,8
	57,2	46,8	50,9
	75,2	70,0	65,5
	39,0	35,3	32,5
	29,0	36,6	28,9
	21,9	27,2	22,0
<b>2</b>	53,2	51,0	41,6
	76,9	79,0	62,6
<b>3</b>	71,0	78,4	85,2
	/	48,3	43,9
<b>4</b>	84,2	84,3	69,0
	47,7	54,8	61,0
	30,7	37,1	38,7
	49,6	43,7	48,6
<b>5</b>	39,0	35,5	36,0
	39,8	45,8	33,0
	34,4	32,3	28,1
	36,6	46,3	34,2
	59,5	67,9	54,2
	66,1	66,2	47,0
	/	42,4	34,7

<b>6</b>	25,0	35,6	31,4
	68,0	65,3	58,4
	45,6	43,6	39,0
<b>7</b>	99,9	90,5	86,2
<b>8</b>	77,9	61,5	69,7
	80,5	78,4	63,2
<b>9</b>	78,1	78,9	69,9
<b>10</b>	57,2	36,5	45,9
<b>11</b>	47,0	35,4	43,7
<b>12</b>	16,2	19,8	19,5

U analizu je uključeno 33 mjerenja te je pomoću formula dobiveno 33 AUC vrijednosti, dok je AUC iz povijesti bolesti prikazano 30 vrijednosti jer tri vrijednosti nisu bile dostupne.

U Tablici 4. je prikazana osnovna statistika vrijednosti AUC izračunatih pomoću Formule 1 (F1), Formule 2 (F2) te AUC vrijednosti iz povijesti bolesti.

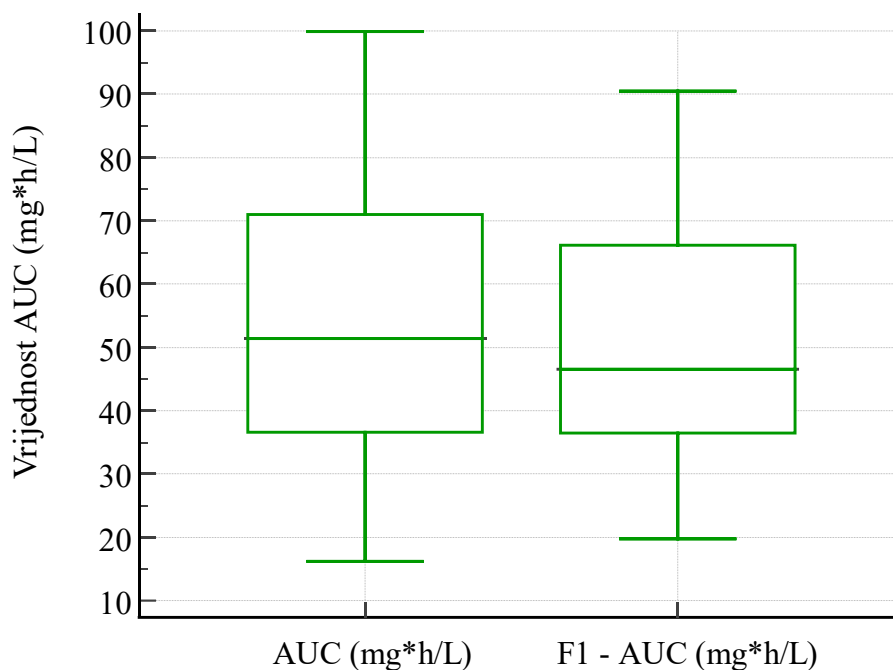
Tablica 4. Statistika AUC vrijednosti

	F1 - AUC (mg*h/L)	F2 - AUC (mg*h/L)	AUC (mg*h/L)
<b>N</b>	33	33	30
<b>Min</b>	19,7	19,5	16,2
<b>Max</b>	90,5	86,2	99,9
<b>X</b>	51,2	47,7	53,2
<b>Median</b>	46,3	45,9	51,4
<b>SD</b>	18,7	17,3	21,3

Najniža i najviša vrijednost AUC dobivena je za AUC iz povijesti bolesti i iznosi 16,2 i 99,9 mg\*h/L. Najniža srednja vrijednost je dobivena za račun prema Formuli 2 i iznosi 47,7 mg\*h/L, a za AUC iz povijesti bolesti je najviša i iznosi 53,2 mg\*h/L.

Za svakog bolesnika su ispitane statistički značajne razlike između AUC vrijednosti iz povijesti bolesti s vrijednostima koje su dobivene izračunom prema formulama F1 i F2. Vrijednosti slijede normalnu razdiobu pa je analiza provedena pomoću povezanog T-testa. Za AUC iz povijesti bolesti i vrijednosti izračunatih pomoću Formule 1, P vrijednost je iznosila 0,6171. P vrijednost je veća od 0,05 ( $P > 0,05$ ) što ukazuje na to da nema statistički značajne razlike između vrijednosti AUC dobivenih prema Formuli 1 i vrijednosti iz povijesti bolesti.

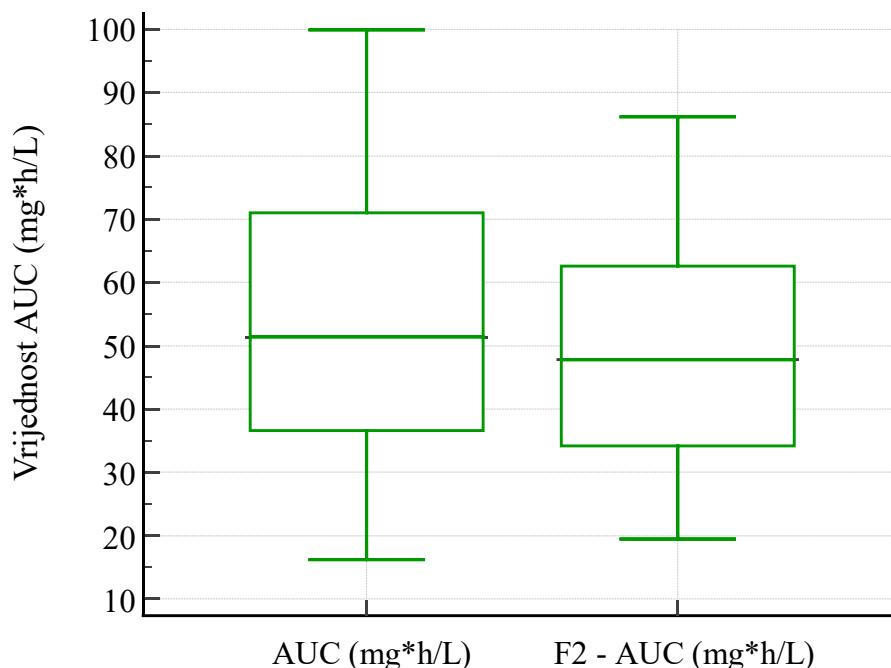
Usporedbom vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i vrijednosti dobivenih pomoću Formule 2 pomoću povezanog T-testa dobivena je P vrijednost 0,0275. P vrijednost je niža od 0,05 ( $P < 0,05$ ) što ukazuje na to da se vrijednosti statistički značajno razlikuju.



Slika 7. Usporedba AUC vrijednosti iz povijesti bolesti i vrijednosti dobivenih Formulom 1 (F1).

Pomoću kutijastog dijagrama prikazana je usporedba vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i vrijednosti dobivenih pomoću Formule 1 (Slika 7). Donja linija kutije predstavlja prvi kvartil (25 % percentil), a gornja linija kutije predstavlja treći kvartil (75 % percentil). Linija unutar kutije označava medijan (50 % percentil). Vidljivo je da je medijan lijeve skupine podataka, odnosno AUC iz povijesti bolesti, nešto viši od medijana F1. Obje skupine podataka imaju širok raspon

između donjeg i gornjeg kvartila što ukazuje na dosta širok raspon podataka. Raspon AUC je nešto viši od raspona F1 – AUC.



Slika 8. Usporedba AUC vrijednosti iz povijesti bolesti i vrijednosti dobivenih Formulom 2 (F2).

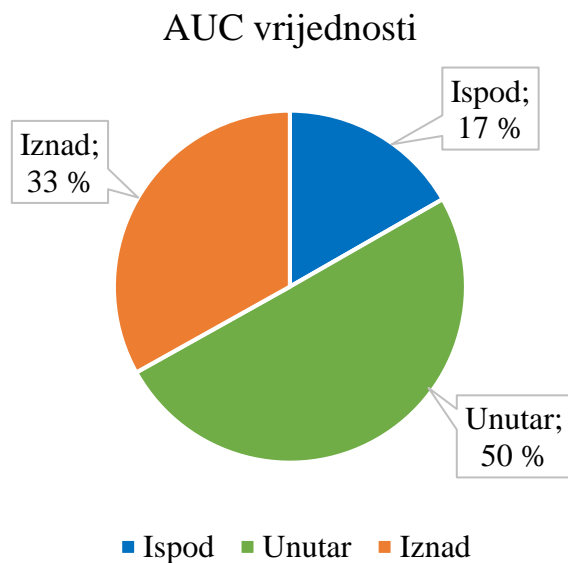
Pomoću kutijastog dijagrama prikazana je usporedba vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i vrijednosti dobivenih pomoću Formule 2 (Slika 8). Vidljivo je da je medijan AUC skupine nešto viši od medijana F2 – AUC. Širi raspon donjeg i gornjeg kvartila zapažen je kod dijagrama AUC što znači da je raspršenost podataka u AUC grupi veća nego kod grupe F2 – AUC.

#### 4.1.3. Analiza AUC vrijednosti mikofenolne kiseline prema terapijskom intervalu

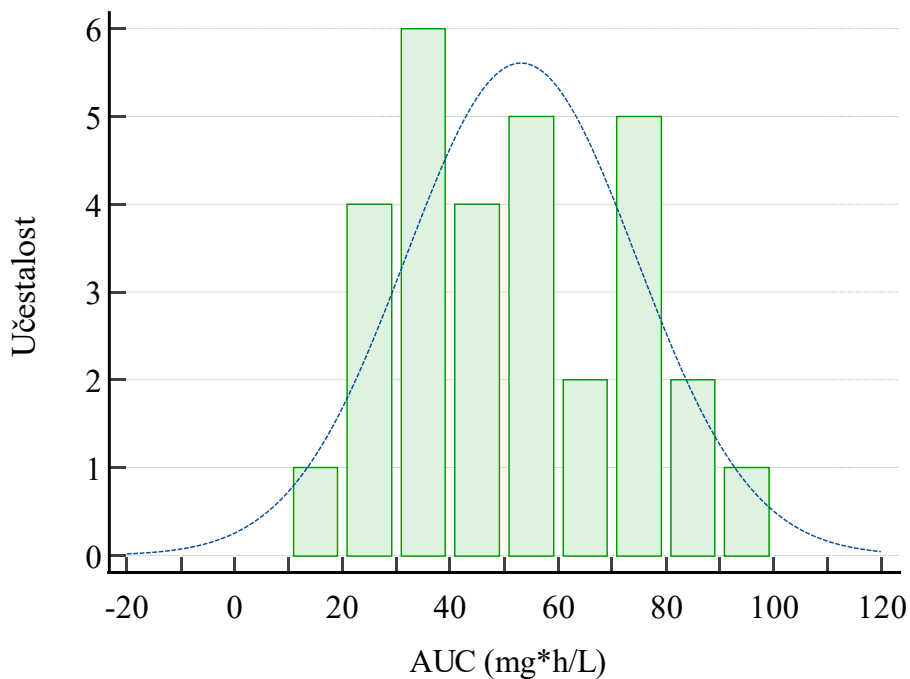
Integracijom površine ispod krivulje (AUC) koja prikazuje koncentracije lijeka u krvi tijekom vremena unutar propisanog intervala doziranja, izračunava se bioraspoloživost MPA nakon oralne primjene lijeka u stanju ravnoteže ( $AUC_{0-12}$ ). Prema smjernicama, preporuka je da bi za mikofenolnu kiselinu  $AUC_{0-12}$  trebao biti unutar raspona vrijednosti 30 – 60 mg\*h/L.

Analiza vrijednosti AUC iz povijesti bolesti pokazala je da je 17 % vrijednosti ispod terapijskog intervala, a najniža vrijednost je 16,2 mg\*h/L. Zabilježeno je 33 % vrijednosti iznad 60 mg\*h/L

od kojih je najviša zabilježena vrijednost 99,9 mg\*h/L. Preostalih 50 % AUC vrijednosti nalazi se unutar željenog terapijskog intervala.



Graf 1. Prikaz udjela broja AUC vrijednosti s obzirom na terapijski interval



Slika 9. Raspodjela AUC vrijednosti.

Krivulja raspodjele prati oblik normalne raspodjele, a većina podataka je koncentrirana između 40 i 80 mg\*h/L. Primjetna je blaga desna asimetrija s obzirom na to da postoji nešto veći broj vrijednosti iznad 50 mg\*h/L nego broj vrijednosti ispod 50 mg\*h/L. Najučestalije su vrijednosti u intervalu od 30 do 40 mg\*h/L.

#### 4.1.4. Analiza koncentracija mikofenolne kiseline prema spolu

Zbog složenosti predanalitičkog postupka za određivanje koncentracije mikofenolne kiseline u više točaka, u praksi se terapijsko praćenje često provodi u jednom mjerenju i to ujutro, neposredno prije uzimanja terapije (minimalna, ostatna ili *trough* koncentracija). Iz bolničkog informacijskog sustava (BIS) prikupljeno je 112 nasumičnih mjerenja *trough* koncentracija mikofenolne kiseline. U obradu su uključeni i *trough* koncentracije mikofenolne kiseline bolesnika kod kojih je za terapijsko praćenje učinjena i kratka farmakokinetika.

U Tablici 5. prikazane su izmjerene *trough* koncentracije mikofenolne kiseline kod ispitanika podijeljenih prema spolu. Od ukupno analiziranih 145 mjerenja koncentracije MPA, njih 65 je kod osoba ženskog spola, dok je ostalih 80 kod osoba muškog spola.

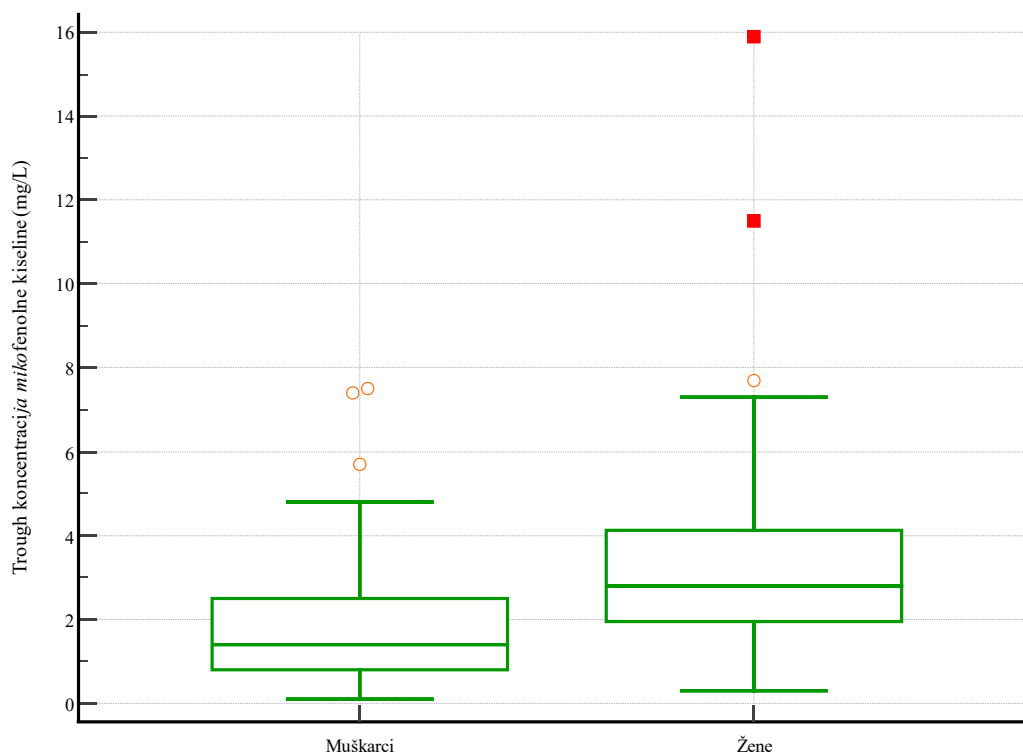
Tablica 5. Koncentracije mikofenolne kiseline prema spolu

MPA (mg/L)	Ukupno	Muškarci	Žene
<b>N</b>	145	80	65
<b>Min</b>	0,1	0,1	0,3
<b>Max</b>	15,9	7,5	15,9
<b>X</b>	2,6	1,9	3,4
<b>Median</b>	2,2	1,4	2,8
<b>SD</b>	2,2	1,6	2,6
<b>25 – 75 percentile</b>	/	0,800 – 2,500	1,950 – 4,125



Analiza je pokazala da ispitanici muškog spola imaju niže koncentracije mikofenolne kiseline od ženskih ispitanika. Medijan koncentracija kod muškaraca iznosi 1,4 mg/L, dok kod žena iznosi 2,8 mg/L. Najniža izmjerena vrijednost kod muškaraca je 0,1 mg/L, dok je kod žena 0,3 mg/L. Najviša koncentracija mikofenolne kiseline 15,9 mg/L zabilježena je u grupi žena, a najviša izmjerena koncentracija u grupi muškaraca je 7,5 mg/L.

Koncentracije mikofenolne kiseline ne slijede normalnu razdiobu pa je usporedba *trough* koncentracija između muškaraca i žena učinjena Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke te je dobiven  $P < 0,0001$  što znači da se vrijednosti statistički značajno razlikuju između spolova. Na Slici 12. je prikazana usporedba *trough* koncentracija mikofenolne kiseline između muškog i ženskog spola pomoću kutijastog dijagrama. Središnji pravokutnik na dijagramu (Slika 10) je pokazatelj vrijednosti koje se nalaze između donjeg i gornjeg kvartila (25 – 75 % percentile), a središnja linija u pravokutniku označava medijan koncentracije. Vodoravne linije povezuju najnižu i najvišu vrijednost. Izdvojene točke predstavljaju vrijednosti koje su izvan interkvartilnog raspona.



Slika 10. Kutijasti dijagram usporedbe *trough* koncentracija mikofenolne kiseline za muškarce i žene.

Iz dijagrama (Slika 10) je vidljivo da skupina muškaraca ima medijan niži od skupine žena što znači da su bolesnice ženskog spola generalno imale više vrijednosti *trough* koncentracije mikofenolne kiseline. Raspon između donjeg i gornjeg kvartila kod muškaraca je nešto niži od raspona između donjeg i gornjeg kvartila kod žena. Izdvojene tri točke na okomitoj liniji kod muškaraca ukazuju na koncentracije koje su značajno veće od većine uzorka, a radi se o koncentraciji oko 6 mg/L te dvije koncentracije oko 7,5 mg/L. Kod žena vidljivo je da je jedna koncentracija nešto niža od 8 mg/L, odnosno malo iznad raspona. Dvije crvene točke predstavljaju izrazito više vrijednosti van raspona, a one iznose oko 12 mg/L i oko 16 mg/L.

#### **4.1.5. Analiza koncentracije mikofenolne kiseline prema terapijskom intervalu**

Terapijski interval ima značajnu ulogu za interpretaciju rezultata i najčešće je preuzet iz literature koja se temelji na velikim kliničkim studijama. Za analizu su terapijski intervali preuzeti iz uputa Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC „Rebro“, odnosno terapijski intervali MPA u plazmi:

1,3 – 3,5 mg/L kod terapije samo s MPA

1,0 – 3,5 mg/L uz terapiju ciklosporinom

1,9 – 4,0 mg/L uz terapiju takrolimusom

Terapijski interval za ispitanike je 1,9 – 4,0 mg/L, s obzirom na to da su svi pacijenti na politerapiji koja uključuje mikofenolnu kiselinu uz primjenu takrolimusa.

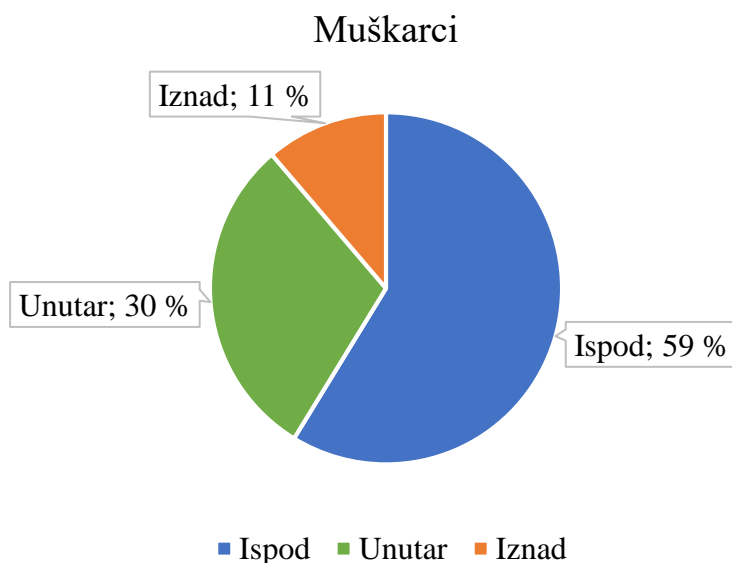
Od 145 mjerenja, 59 izmjerenih vrijednosti nalazi se unutar propisanog terapijskog intervala. 27 vrijednosti koncentracija je ispod donje granice terapijskog intervala, a kod 59 mjerenja koncentracija je iznad gornje granice terapijskog intervala.

Tablica 6. Raspodjela koncentracija mikofenolne kiseline prema terapijskom intervalu

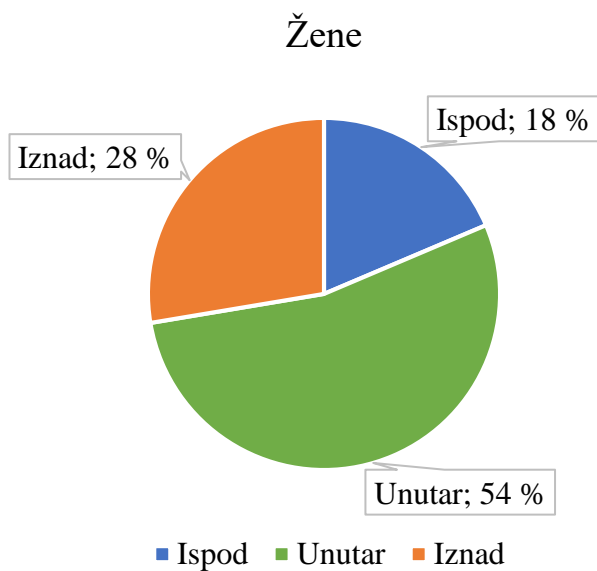
	N	%	Muškarci	Žene
<b>Ukupno</b>	145	100	80	65
<b>Ispod intervala</b>	59	40,69	47	12
<b>Unutar intervala</b>	59	40,69	24	35
<b>Iznad intervala</b>	27	18,62	9	18

Od 80 osoba muškog spola, 24 vrijednosti *trough* koncentracija nalazi se unutar željenog intervala, 47 ih je ispod donje granice, dok ih je 9 iznad. Od 65 bolesnika ženskog spola, 35 izmjerenih vrijednosti mikofenolne kiseline nalazi se unutar raspona terapijskog intervala, dok je 12 vrijednosti ispod, a 18 vrijednosti je iznad gornje granice.

Raspodjela udjela bolesnika prema terapijskom intervalu prikazana je grafički pomoću kružnog dijagrama za muškarce (Graf 2) i žene (Graf 3).

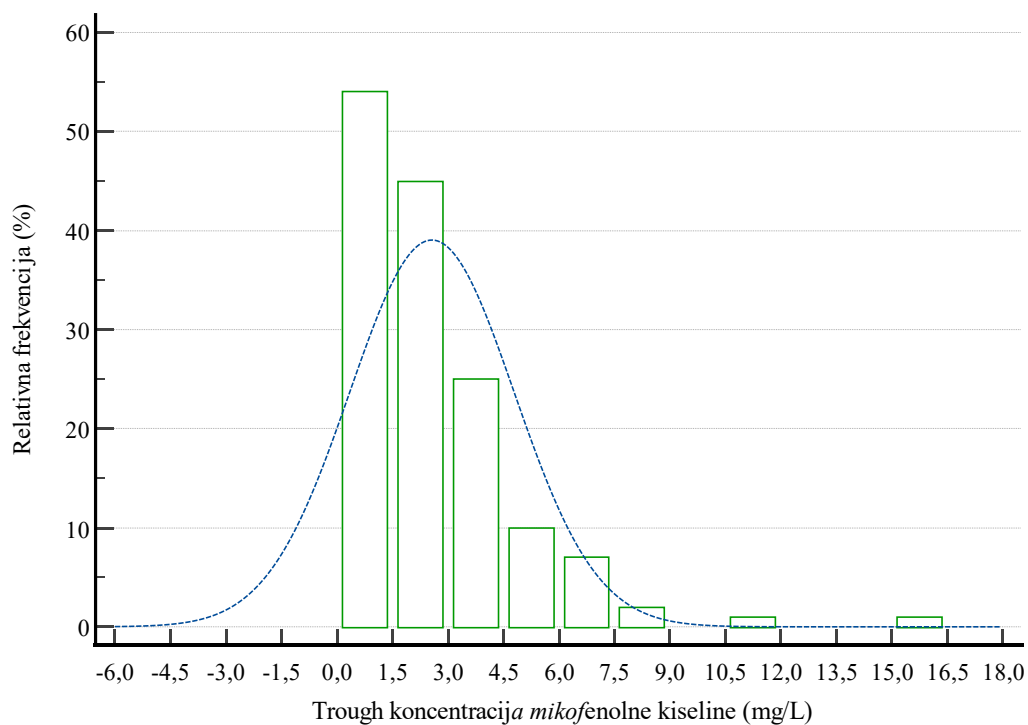


Graf 2. Prikaz udjela bolesnika muškog spola s obzirom na terapijski interval



Graf 3. Prikaz udjela bolesnika ženskog spola s obzirom na terapijski interval

Histogram prikazuje vrijednosti *trough* koncentracija mikofenolne kiseline za 145 ispitanika koji nisu podijeljeni prema dobi i spolu.



Slika 11. Histogram *trough* koncentracija svih ispitanika.

Raspodjela koncentracija u histogramu je asimetrična prema desno i ukazuje na to da se većina *trough* koncentracija mikofenolne kiseline nalazi u rasponu od 0 do 5 mg/L, a da je mali broj koncentracija viši od 5 mg/L.

## 4.2. RASPRAVA

Mikofenolna kiselina je imunosupresiv koji se koristi u terapiji transplantacije tkiva ili organa. Djeluje kao reverzibilni inhibitor enzima koji sudjeluje u sintezi DNA. Pokazuje veliku farmakokinetičku inter i intraindividualnu varijabilnost te je praćenje koncentracije mikofenolne kiseline iznimno bitno u kliničkoj praksi.

Terapijsko praćenje mikofenolne kiseline nije jasno definirano. Osim samo jednog mjerenja koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi, kod pojedinih bolesnika u svrhu individualnog doziranja i kvalitetnijeg liječenja, provodi se i terapijsko praćenje koncentracije lijeka primjenom kratke farmakokinetike. Mjerenja koncentracije mikofenolne kiseline u više točaka i izračun površine ispod krivulje (AUC) od posebnog je interesa za procjenu izloženosti bolesnika navedenom lijeku. Zlatnim standardom za praćenje razine lijeka smatra se AUC koji je uz *trough* koncentracije uzet kao predmet istraživanja ovog diplomskog rada.

U provedeno ispitivanje uključeno je 12 bolesnika koji su na terapiji mikofenolnom kiselinom i učinjena im je kratka farmakokinetika s izračunom AUC. Svi bolesnici su uz mikofenolnu kiselinu uzimali i takrolimus. Ispitanici su različite dobi, oba spola, različitih doza mikofenolne kiseline i takrolimusa. U ovaj uzorak je uključeno 7 bolesnica ženskog spola i 5 muškog spola koji su mlađe životne dobi u rasponu od 7 do 20 godina.

Mikofenolna kiselina primjenjivana je kao Myfortic ili CellCept, a takrolimus kao Prograf ili Adoport. Najniža primjenjivana doza mikofenolne kiseline je 360 mg dnevno, a najviša 1500 mg. Takrolimus je primjenjivan u najnižoj dnevnoj dozi od 2,25 mg, a najviša doza je 13 mg.

U kliničkoj praksi upotrebljava se AUC vrijednost izračunata u suradnoj ustanovi u inozemstvu, a formula za izračun nam je nepoznata. U literaturi su dostupne brojne formule za izračun AUC u pedijatrijskoj populaciji, ali imaju različita vremena i različit broj uzoraka. U suradnji s liječnicima, pedijatrijskim nefrolozima, prema njihovim saznanjima i literaturnim podacima odabrane su dvije formule za izračun koje odgovaraju našoj grupi ispitanika i vremenima mjerenja koncentracije mikofenolne kiseline. Vrijednosti AUC dobivene odabranim formulama (Formula 1 i Formula 2) uspoređene su s vrijednostima AUC koju nam ustupa suradna ustanova za koju je potvrđena korelacija s učinkom u inozemnom centru. U literaturi nije pronađena formula za izračun AUC mikofenolne kiseline s istim vremenima uzorkovanja pa smo se odlučili za ista vremena samo s tri

točke uzorkovanja, a za drugu formulu su korištene isto tri točke i najbliža vremena uzorkovanja. U sve tri formule uvrštava se  $C_0$ , odnosno *trough* koncentracija te  $C_2$  – koncentracija izmjerena 120 minuta nakon primjene doze. U Formuli 1 koristi se koncentracija izmjerena 60 minuta nakon primjene doze kao treća varijabla, a u Formuli 2 se koristi koncentracija izmjerena nakon 30 minuta i za tu varijablu smo koristili koncentracije izmjerene 20 minuta nakon primjene lijeka.

Usporedbom AUC vrijednosti iz povijesti bolesti i dobivenih Formulom 1 pomoću povezanog T-testa utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između pojedinih vrijednosti. Usporedbom AUC vrijednosti iz povijesti bolesti i dobivenih pomoću Formule 2 pomoću povezanog T-testa, utvrđeno je da se vrijednosti statistički značajno razlikuju. Grafičkom analizom pomoću kutijastog dijagrama, utvrđeno je da je raspon podataka vrijednosti AUC iz povijesti bolesti viši od raspona podataka F1 – AUC i podataka F2 – AUC. Apsorpcija lijeka je ključni moment za biodostupnost lijeka pa su početne točke do postizanja vršne koncentracije jako značajne za izračun očekivanog AUC. Dobiveno slaganje vrijednosti AUC posljedica je podudaranja vremena uzorkovanja za Formulu 1, dok je kod Formule 2 uz smanjenje broja uzorkovanja prisutna i razlika od deset minuta u drugom uzorkovanju, što očito ima ključnu ulogu u izračunu potpune površine iz krivulje u samo tri točke. Formula 1 koristi  $C_2$  nakon 60 minuta što je dovoljno vrijeme za potpunu apsorpciju, a Formula 2 koristi  $C_2$  nakon 20 minuta što je za većinu bolesnika nedovoljno vrijeme za postizanje vršne točke i time je ekstrapolacija krivulje puno lošija nego kod Formule 1.

Preporučeni terapijski interval za AUC mikofenolne kiseline iznosi 30 – 60 mg\*h/L (Kuypers i sur., 2010) pa su vrijednosti AUC iz povijesti bolesti analizirane s obzirom na terapijski interval. Od 30 vrijednosti AUC, 5 vrijednosti je ispod terapijskog intervala, 15 ih je unutar intervala, a 10 vrijednosti je iznad terapijskog intervala. Većina AUC vrijednosti nalazi se u intervalu od 40 do 80 mg\*h/L, što ukazuje na pomak prema višim vrijednostima. Pomak prema višim vrijednostima, posebno kod djece kod kojih je podešavanje doze jako zahtjevno, može dovesti do pojačane supresije i mogućeg toksičnog učinka za presadak.

Primjena preporuke terapijskog intervala vrijednosti AUC (30 – 60 mg\*h/L) u uporabi je od 2006. godine. U istraživanju je utvrđeno da je 7 od 10 epizoda BPAR (engl. *biopsy-proven acute rejection*), koje su se dogodile unutar 3 mjeseca od transplantacije, bilo povezano uz vrijednosti AUC koje su bile niže od 30 mg\*h/L. Nijedna epizoda odbacivanja nije bila povezana s AUC > 45 mg\*h/L (Le Meur i sur., 2007). U drugom istraživanju koje je uključivalo 901 bolesnika, njih 61

% procijenjeno je visokorizičnima. Utvrđeno je da je učestalost akutnog odbacivanja transplanta veća kod visokorizičnih bolesnika ukoliko je  $AUC < 30 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$ . Suprotno tome, nije primijećena razlika u incidenciji akutnog odbacivanja kod niskorizičnih bolesnika kod kojih je AUC manji, jednak ili veći od  $30 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$  (van Gelder i sur., 2010).

Analizirane su *trough* koncentracije mikofenolne kiseline u većem broju uzoraka bolesnika kojima je traženo terapijsko praćenje i ispitana razlika među spolovima. Bolesnici muškog spola imali su niže koncentracije mikofenolne kiseline od bolesnica ženskog spola. Analizom neparametrijskog Mann-Whitney testa dobiveno je da se *trough* koncentracije značajno razlikuju između grupa muškog i ženskog spola ( $P < 0,0001$ ). Bolesnice ženskog spola su imale značajno više vrijednosti (medijan  $2,8 \text{ mg/L}$ ) u odnosu na muškarce (medijan  $1,4 \text{ mg/L}$ ).

Terapijski interval za *trough* koncentraciju mikofenolne kiseline u plazmi uz primjenu takrolimusa je  $1,9 - 4,0 \text{ mg/L}$ . Od ukupnog broja bolesnika, samo  $40,69 \%$  izmjerenih vrijednosti nalazilo se unutar željenog intervala, a od toga je  $40,6 \%$  muškaraca, a  $59,4 \%$  žena. U studiji koja je uključila trogodišnje istraživanje od 720 bolesnika, a od kojih je 590 u terapiji uz mikofenolnu kiselinu imalo takrolimus, utvrđeno je da kod bolesnika kod kojih nije korigirana doza, a imali su niske vrijednosti mikofenolne kiseline, ne korigiranje doze imalo je značajan utjecaj na BPAR nakon 6 i 12 mjeseci. *Trough* koncentracije  $MPA > 1,6 \text{ mg/L}$  povezane su s time da je kod tih bolesnika zabilježen veći vremenski okvir do prve epizode BPAR. Više koncentracije MPA ili više vrijednosti AUC povezane su s nižim rizikom od odbacivanja organa (Gaston RS i sur., 2009).

Naši rezultati ukazuju da se može očekivati veća učestalost odbacivanja organa u  $40,69 \%$  bolesnika kojima je koncentracija mikofenolne kiseline ispod terapijskog raspona, a od toga je veći broj muškaraca koji imaju medijan MPA koncentracije ispod  $1,6 \text{ mg/L}$ , koncentracije koja je u navedenoj studiji uzeta kao granična vrijednost. Ako gledamo samo skupinu bolesnika muškog spola njih  $59 \%$  je ispod terapijskog raspona, dok je kod bolesnica ženskog spola svega  $18 \%$  bolesnica ispod terapijskog raspona. Iako to u ovoj studiji nismo istraživali, može se očekivati veliki udio bolesnika s akutnim odbacivanjem uslijed niske koncentracije mikofenolne kiseline.



## 5. ZAKLJUČAK

Terapijsko praćenje koncentracije mikofenolne kiseline u biološkim uzorcima provodi se u svrhu prilagođavanja doze bolesnicima zbog iznimno velike intra i interindividualne varijabilnosti koju pokazuje mikofenolna kiselina. Individualizacija terapije posebno je važna za djecu jer razvoj i rast može značajno utjecati na farmakokinetiku, a time i na biodostupnost lijeka, a sam učinak lijeka teško je predvidjeti iz kliničke slike bolesnika.

Analizom koncentracija mikofenolne kiseline primjenom kratke farmakokinetike može se zaključiti da:

- Nema statistički značajne razlike između AUC vrijednosti ( $C_0$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{60}$  i  $C_{120}$ ) za koju je potvrđena korelacija s učinkom u inozemnom centru i vrijednosti koje smo dobili pomoću Formule 1 ( $C_0$ ,  $C_{60}$  i  $C_{120}$ ),
- Dokazana je statistički značajna razlika između AUC vrijednosti ( $C_0$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{60}$  i  $C_{120}$ ) za koju je potvrđena korelacija s učinkom u inozemnom centru i vrijednosti koje smo dobili pomoću Formule 2 ( $C_0$ ,  $C_{20}$  i  $C_{120}$ ),
- Analiza AUC vrijednosti s obzirom na terapijski interval pokazala je da samo 50 % bolesnika postiže željene vrijednosti.

Analizom koncentracija mikofenolne kiseline primjenom jednog mjerenja neposredno prije slijedeće doze (*trough* koncentracija) može se zaključiti:

- Dokazana je statistički značajna razlika u *trough* koncentracijama mikofenolne kiseline između bolesnika muškog i ženskog spola.
- Analiza *trough* koncentracija mikofenolne kiseline u odnosu na preporučeni terapijski interval pokazala je da manje od polovine (40,69 %) bolesnika postiže željene terapijske vrijednosti, od čega je manji udio bolesnika muškog spola (40,68 %), a veći (59,32 %) bolesnika ženskog spola.

## 6. POPIS KRATICA

ABCC2 – proteinski transportni kanal (engl. *ATP-binding cassette sub-family C member 2*)

AcMPAG – acilni glukuronid mikofenolne kiseline (engl. *acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid*)

AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under curve*)

BCRP – protein za rezistenciju tumora dojke (engl. *breast cancer resistance protein, BCRP*)

BIS – bolnički informacijski sustav

BPAR – biopsijom potvrđeno akutno odbacivanje (engl. *biopsy-proven acute rejection*)

CES – enzim karboksilesteraza

CNI – kalcineurinski inhibitor (engl. *calcineurin inhibitor*)

CYP – enzim citokrom P

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EC-MPS – formulacija mikofenolat-natrija s želučano-otpornom ovojnicom (engl. *enteric-coated mycophenolate sodium*)

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

ESRD – završni stadij bubrežne bolesti (engl. *end-stage renal disease*)

GFR – glomerularna filtracija

GI – gastrointestinalni

HPLC – visoko učinkovita tekućinska kromatografija

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

IS – interni standard

KDIGO – Globalna inicijativa za smanjenje bolesti bubrega (engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*)

LSS – strategija ograničenog uzorkovanja (engl. *limited sampling strategy*)

MDR1 – protein rezistentan na više lijekova 1 (engl. *multidrug resistance protein 1*)

MMF – mikofenolat-mofetil (engl. *mycophenolate mofetil*)

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

MPAG – glukoronid mikofenolne kiseline (engl. *mycophenolic acid 7-O-glucuronide*)

MRP2 – protein povezan s rezistencijom na više lijekova 2 (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*)

mTOR – cilj metabolizma rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamicin*)

NK stanice – prirodne stanice ubojice (engl. *natural killer cells*)

OATP – organski anionski transportni polipeptid

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

SPSS – samostalni sustav za uzorkovanje i selektivnu analizu (engl. *standalone protocol for sampling and selective analysis*)

TDM – terapijsko praćenje lijeka (engl. *therapy drug monitoring*)

UGT – uridin difosfat glukuronozil transferaza

UV – ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

## 7. LITERATURA

Bašić Jukić N, Kaštelan Ž i sur. Transplantacija bubrega. 2016, str. 35–36; 75–77; 428–439.

Bašić Jukić N, Kljajić M. Imunosupresijska terapija nakon transplantacije bubrega. *Izabrane teme iz transplantacije solidnih organa*. 2023. 32(2), 189–196.

Drug Bank online, [www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com), pristupljeno: 28. 01. 2024.

Gaston RS, Kaplan B, Shah T, Kriesche HU, Patel D, Bloom RD. Fixed- or Controlled-Dose Mycophenolate Mofetil with Standard- or Reduced-Dose Calcineurin Inhibitors: The Opticcept Trial. *American Journal of Transplantation*. 2009, 9(7), 1607–1619.

Glenn PM. Kidneys. Duke Comprehensive Kidney Stone, *MSD Manual*, 2023.

Gounden V, Bhatt H, Jialal I. Renal Function Tests. *StatPearls Publishing*, 2024.

Halmed, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno: 27. 01. 2024.

Hussain Y, Khan H. Immunosuppressive drugs. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 2022, 726–740.

Iyengar A, McCulloch MI. Paediatric kidney transplantation in under-resourced regions-a panoramic view. *Pediatric Nephrology*. 2022, 37, 745–755.

Kang JS, Lee MH. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med.* 2009, 24(1), 1–10.

Knight SR, Morris PJ. Does the Evidence Support the Use of Mycophenolate Mofetil Therapeutic Drug Monitoring in Clinical Practice? A Systematic Review. *Transplantation.* 2008, 85(12), 1675–1685.

Kuypers DRJ, Meuer YL, Cantharovic M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, Tonshoff B, Holt DW, Chapman J, Gelder T. Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2010, 5(2), 341–358.

Lamba V, Sangkuhl K, Sanghavi K, Fish A, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway. *Pharmacogenet Genomics,* 2015, 24(1), 73–79.

Le Meur Y, Buchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, Etienne I, Westeel P-F, de Ligny BH, Rostaing, Thervet E, Szelag JC, Rellore JP, Rosseau A, Touchard G, Marquet P. Individualized Mycophenolate Mofetil Dosing Based on Drug Exposure Significantly Improves Patient Outcomes After Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2007, 7(11), 2496–2503.

Robles Piedras AL, De la O Arciniega M, Reynoso Vazquez J. Clinical Pharmacology and Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Agents. *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation.* 2013, 15.

Sažetak opisa svojstava lijeka, [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150319131438/anx\\_131438\\_hr.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150319131438/anx_131438_hr.pdf), pristupljeno 13. 12. 2023.

Sintchak DM, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP. Structure and Mechanism of Inosine Monophosphate Dehydrogenase in Complex with the Immunosuppressant Mycophenolic Acid. *Cell*, 1996, 85(6), 921–930.

Staatz C. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Pharmacokinetics*, 2007, 46, 13–58.

Udomkarnjananun S, Francke MI, De Winter BCM, Mulder MB, Baan CC, Metselaar HJ, den Hoed CM, Hesselink DA. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in hepatology and gastroenterology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2021, 54–55.

Van Gelder T, Tedesco Silva H, de Fijter JW, Budde K, Kuypes D, Arns W, Paul Souillou J, Kanellis J, Zelvys A, Ekberg H, Holzer H, Rostaing L, Mamelok RD. Renal Transplant Patients at High Risk of Acute Rejection Benefit From Adequate Exposure to Mycophenolic Acid. *Transplantation*. 2010, 89(5), 595–599.

Warady BA, Weidemann DK, Chronic kidney disease in children: Epidemiology, etiology, and course, *UpToDate*, 2023.

Warrington JS, Shaw LM. Pharmacogenetic differences and drug-drug interactions in immunosuppressive therapy. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2005, 487–503.

## 8. SAŽETAK

Mikofenolna kiselina (MPA) je imunosupresivni antimetabolit koji se primjenjuje kao dio terapije za sprječavanje akutnog odbacivanja presađenog organa i kao dio terapije održavanja. Uz sve veću upotrebu MPA u transplantaciji solidnih organa, postala je očita potreba za preciznijim doziranjem lijeka. Zbog velike farmakokinetičke inter i intraindividualne varijabilnosti te mogućih interakcija s drugim lijekovima, izrazito je važno praćenje koncentracije lijeka u plazmi. Za provedbu terapijskog praćenja (TDM) MPA, kao zlatni standard za praćenje izloženosti lijeku smatra se vrijednost površine ispod krivulje (AUC), a sve u svrhu personalizacije imunosupresivne terapije. Cilj rada bio je procijeniti AUC i *trough* koncentracije MPA i analizirati ih prema definiranom terapijskom intervalu, te prema spolu. Također, usporediti rezultate koji su dobiveni različitim jednadžbama za izračun AUC MPA. Statističkom analizom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i onih dobivenih pomoću Formule 1 ( $P = 0,6171$ ), dok je u usporedbi AUC s Formulom 2 utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između dobivenih vrijednosti ( $P = 0,0275$ ). Terapijski interval AUC MPA je 30 – 60 mg\*h/L, a samo 50 % bolesnika je postiglo ciljane vrijednosti. Za *trough* koncentracije MPA je utvrđena statistički značajna razlika među spolovima ( $P < 0,0001$ ). Na temelju analize utvrđeno je da 40,69 % bolesnika postiže vrijednosti unutar terapijskog intervala koji je 1,9 – 4,0 mg/L, budući da svi bolesnici u terapiji imaju uz MPA i takrolimus. Ovaj rad potvrđuje važnost personaliziranog pristupa imunosupresivnoj terapiji kod bolesnika nakon transplantacije, ističući vrijednost terapijskog praćenja lijekova za optimizaciju ishoda liječenja.

## SUMMARY

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive antimetabolite used to prevent acute organ rejection and as a part of maintenance therapy in transplant patients. With the increasing application of MPA in solid organ transplantation, the necessity for more accurate drug dosing has become evident. Due to significant inter- and intra-individual pharmacokinetic variability and potential interactions with other drugs, monitoring plasma drug concentrations is crucial. For the implementation of therapeutic drug monitoring (TDM) of MPA, the area under the curve (AUC) is considered as a gold standard, aimed at optimizing personalized immunosuppressive therapy. The objective of this study was to evaluate the AUC and *trough* concentrations of MPA and analyse them according to defined therapeutic ranges and by gender. Additionally, compare the results obtained using different equations for calculation the AUC of MPA. Statistical analysis demonstrated no statistically significant differences between AUC values from the medical history and those obtained using Formula 1 ( $P = 0,6171$ ). However, a comparison of the AUC with Formula 2 revealed a statistically significant difference between the obtained values ( $P = 0,0275$ ). The reference interval for the AUC of MPA is 30 – 60 mg\*h/L and only 50 % of patients have achieved the desired values. Analysis of *trough* concentrations of MPA revealed a statistically significant difference between genders ( $P < 0,0001$ ). Furthermore, the analysis determined that 40.69 % of patients achieve values within the therapeutic interval of 1.9 – 4.0 mg/L, considering that all patients were receiving both MPA and tacrolimus. This thesis confirms the significance of a personalized approach to immunosuppressive therapy in post-transplant patients, underscoring the importance of therapeutic drug monitoring in optimizing clinical outcomes.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za toksikologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### TERAPIJSKO PRAĆENJE MIKOFENOLNE KISELINE U DJECE NAKON TRANSPLANTACIJE BUBREGA

Tina Vidović

#### SAŽETAK

Mikofenolna kiselina (MPA) je imunosupresivni antimetabolit koji se primjenjuje kao dio terapije za sprječavanje akutnog odbacivanja presađenog organa i kao dio terapije održavanja. Uz sve veću upotrebu MPA u transplantaciji solidnih organa, postala je očita potreba za preciznijim doziranjem lijeka. Zbog velike farmakokinetičke inter i intraindividualne varijabilnosti te mogućih interakcija s drugim lijekovima, izrazito je važno praćenje koncentracije lijeka u plazmi. Za provedbu terapijskog praćenja (TDM) MPA, kao zlatni standard za praćenje izloženosti lijeku smatra se vrijednost površine ispod krivulje (AUC), a sve u svrhu personalizacije imunosupresivne terapije. Cilj rada bio je procijeniti AUC i *trough* koncentracije MPA i analizirati ih prema definiranom terapijskom intervalu, te prema spolu. Također, usporediti rezultate koji su dobiveni različitim jednadžbama za izračun AUC MPA. Statističkom analizom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između vrijednosti AUC iz povijesti bolesti i onih dobivenih pomoću Formule 1 ( $P = 0,6171$ ), dok je u usporedbi AUC s Formulom 2 utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između dobivenih vrijednosti ( $P = 0,0275$ ). Terapijski interval AUC MPA je 30 – 60 mg\*h/L, a samo 50 % bolesnika je postiglo ciljane vrijednosti. Za *trough* koncentracije MPA je utvrđena statistički značajna razlika među spolovima ( $P < 0,0001$ ). Na temelju analize utvrđeno je da 40,69 % bolesnika postiže vrijednosti unutar terapijskog intervala koji je 1,9 – 4,0 mg/L, budući da svi bolesnici u terapiji imaju uz MPA i takrolimus. Ovaj rad potvrđuje važnost personaliziranog pristupa imunosupresivnoj terapiji kod bolesnika nakon transplantacije, ističući vrijednost terapijskog praćenja lijekova za optimizaciju ishoda liječenja.

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

Rad sadrži: 51 stranica, 3 grafičkih prikaza, 6 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mikofenolna kiselina, terapijsko praćenje lijeka, površina ispod krivulje, *trough* koncentracija

Mentor: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *izvanredni profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *izvanredni profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Miranda Sertić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of toxicology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF MYCOPHENILIC ACID IN CHILDREN AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Tina Vidović

#### SUMMARY

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive antimetabolite used to prevent acute organ rejection and as a part of maintenance therapy in transplant patients. With the increasing application of MPA in solid organ transplantation, the necessity for more accurate drug dosing has become evident. Due to significant inter- and intra-individual pharmacokinetic variability and potential interactions with other drugs, monitoring plasma drug concentrations is crucial. For the implementation of therapeutic drug monitoring (TDM) of MPA, the area under the curve (AUC) is considered as a gold standard, aimed at optimizing personalized immunosuppressive therapy. The objective of this study was to evaluate the AUC and *trough* concentrations of MPA and analyse them according to defined therapeutic ranges and by gender. Additionally, compare the results obtained using different equations for calculation the AUC of MPA. Statistical analysis demonstrated no statistically significant differences between AUC values from the medical history and those obtained using Formula 1 ( $P = 0,6171$ ). However, a comparison of the AUC with Formula 2 revealed a statistically significant difference between the obtained values ( $P = 0,0275$ ). The reference interval for the AUC of MPA is 30 – 60 mg\*h/L and only 50 % of patients have achieved the desired values. Analysis of *trough* concentrations of MPA revealed a statistically significant difference between genders ( $P < 0,0001$ ). Furthermore, the analysis determined that 40.69 % of patients achieve values within the therapeutic interval of 1.9 – 4.0 mg/L, considering that all patients were receiving both MPA and tacrolimus. This thesis confirms the significance of a personalized approach to immunosuppressive therapy in post-transplant patients, underscoring the importance of therapeutic drug monitoring in optimizing clinical outcomes.

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

Thesis includes: 51 pages, 3 figures, 6 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mycophenolic acid, therapy drug monitoring, area under curve, *trough* concentration

Mentor: **Mila Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mila Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Miranda Sertić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.