

# Utjecaj farmakogenetičkih varijacija P-glikoproteina i inozin-5'-monofosfat dehidrogenaze na ishode liječenja bolesnika s transplantiranim bubregom

---

**Penezić, Luka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:481191>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Luka Penezić**

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija P-  
glikoproteina i inozin-5'-monofosfat  
dehidrogenaze na ishode liječenja  
bolesnika s transplantiranim bubregom**

**DISERTACIJA**



**ZAGREB, 2024.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Luka Penezić**

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija P-  
glikoproteina i inozin-5'-monofosfat  
dehidrogenaze na ishode liječenja  
bolesnika s transplantiranim bubregom**

**DISERTACIJA**

ZAGREB, 2024.

Doktorski rad izrađen je u Klinici za urologiju, Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju i Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelji rada: akademik Željko Kaštelan

Suvoditelj rada: prof. dr. sc. Nada Božina

#### ZAHVALA

Zahvaljujem prvenstveno akademiku Željku Kaštelanu i prof. dr. sc. Nadi Božina na vodstvu i nesebičnoj potpori tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Ambulante za transplantirane bolesnike na pomoći pri prikupljanju podataka i informiranih pristanaka, posebice sestri Karitas Majić, te prof. dr. sc. Nikolini Bašić Jukić na konstruktivnim prijedlozima.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji na pomoći oko statističke analize i interpretacije rezultata.

Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za tipizaciju tkiva na pomoći pri prikupljanju materijala donora, prvenstveno doc. dr. sc. Renati Žunec. Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije na pomoći oko genotipizacije, posebno dr. sc. Lani Ganoci, dr. sc. Zdenki Lalić i inž. Rini Kos.

Zahvaljujem svim djelatnicima Klinike za urologiju na potpori, a osobito prof. dr. sc. Tvrtku Hudolinu, prof. dr. sc. Nikoli Kneževiću i prim. dr. sc. Tomislavu Kulišu na brizi i stručnoj potpori u mom znanstvenom radu. Također se zahvaljujem liječnicima Sandri Nađ Škegro, Bojanu Čikiću, Toniju Zekuliću, Jerku Anđeliću i Hrvoju Saiću na pomoći pri prikupljanju kliničkih podataka.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji: ocu Vinku i majci Ivani na strpljenju, bratu Matiji na potpori na daljinu, punici Jadranki i puncu Živku na razumijevanju, te svojoj djeci, Dori i Svenu, koji unose veselje i ljepotu u moj život.

**Ovaj doktorski rad posvećujem svojoj supruzi Ani, bez čije bezrezervne podrške i ljubavi on nikada ne bi ugledao svjetlo dana.**

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC - kazeta za vezanje ATP-a (eng. *ATP-Binding Cassete*)

ABCB1 - član 1 podporodice B kazeta za vezanje ATP-a

ABCC2 – član 2 podporodice C kazeta za vezanje ATP-a

Ac-MPAG - Acil glukuronid MPA

AE – neželjeni događaji (eng. *Adverse Events*)

AMR - odbacivanje posredovano antitijelima (eng. *Antibody-Mediated Rejection*)

ATG - antitimocitni globulin

AUC - područje ispod krivulje (eng. *Area Under the Curve*)

BMI - indeks tjelesne težine (eng. *Body Mass Index*)

BIS – Bolnički informatički sustav

BCRP – protein otpornosti na rak dojke (eng. *Breast Cancer Resistance Protein*)

BPAR – biopsijom dokazano akutno odbacivanje (eng. *Biopsy Proven Acute Rejection*)

CDC - citotoksičnost ovisna o komplementu (eng. *Complement Dependent Citotoxicity*)

CDK-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* formula

Chi<sup>2</sup> –  $\chi^2$  test

CNI - inhibitori kalcineurina (eng. *Calcineurin Inhibitors*)

COVID-19 - *Corona Virus Disease 2019*

CsA – ciklosporin A

CTCAE – uobičajeni kriteriji terminologije nuspojava (eng. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*)

CYP3A4/5 – enzimi citokroma P-450 4/5

DAG – usmjereni aciklički graf (eng. *Directed Acyclic Graph*)

dbSNP - *The Single Nucleotide Polymorphism Database*

DNK - deoksinukleinska kiselina

eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (eng. *Estimated Glomerular Filtration Rate*)

EC-MPS – želučanootporne tablete MPA (eng. *Enteric-Coated Mycophenolate Sodium*)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *U.S. Food and Drug Administration*)

FKBP-12 - FK506-vezujući protein-12

GFR - brzina glomerularne filtracije (eng. *Glomerular Filtration Rate*)

GMP - guanozina-5'-monofosfat

GMR - omjeri geometrijskih sredina (eng. *Geometric Mean Ratio*)

HLA - sustav ljudskog leukocitnog antigena (eng. *Human Leukocyte Antigen*)

HGVS - *The Human Genome Variation Society*

IL-2 - interleukin 2

IL-2RA - interleukin-2 receptori

IMPDH - Inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza

KBB – kronična bubrežna bolest

KBC – Klinički bolnički centar

KDIGO- Organizacija za poboljšanje globalnih ishoda bubrežnih bolesti (eng. *Kidney Disease Improving Global Outcome*)

KKS – kompletna krvna slika

MDR– protein rezistencije na lijekove (eng. *Multidrug Resistance Protein*)

MHC - glavni sustav histokompatibilnosti (eng. *Main Histocompatibility Complex*)

MM - nepodudarnost (eng. *Missmatch*)

MPA - mikofenolna kiselina (eng. *Mycophenolic acid*)

MPAG - MPA-7-O-glukuronid

mRNK – m-ribonukleinska kiselina

mTOR inhibitori – inhibitori mehanicističkog cilja rapamicina

NFAT - nuklearni faktor aktiviranih T stanica (eng. *Nuclear Factor of Activated T-cells*)

NHAES – Nacionalno istraživanje o zdravlju i prehrani (eng. *National Health and Nutrition Examination Survey*)

OATP1B1 – transporter organskih aniona (eng. *Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*)

PCR – eng. *polymerase chain reaction*

P-gp - P-glikoprotein

PharmGKB - *The Pharmacogenomics Knowledgebase*

PubMed Medline – online databaza podataka

R – statistički program

$r^2$  – mjera korelacije

RH – Republika Hrvatska

ROM – omjer sredina (eng. *Ratio of Means*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SD – standardna devijacija

SAS 9.4 – statistički program

SLCO1B1 – član obitelji prijenosnika organskih aniona 1B1 (eng. *Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1*)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (eng. *Single-Nucleotide Polymorphism*)

TAC - takrolimus

Thymo – timoglobulin

TCMR - odbacivanje posredovano T-stanicama (eng. *T-cell-Mediated Rejection*)

TDM- terapijsko praćenje doze lijeka u krvi (eng. *Therapeutic Drug Monitoring*)

UACR - Odnos albumina i kreatinina u mokraći (eng. *Urine Albumin-to-Creatinine Ratio*)

UGT – uridin 5'-difosfo-glukuronoziltransferaze

Sadržaj.....	
1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Transplantacija bubrega.....	1
1.1.1. Kronična bubrežna bolest.....	1
1.1.2. Općenito o transplantaciji bubrega.....	4
1.2. Imunosupresivna terapija.....	9
1.2.1. Mikofenolna kiselina.....	12
1.2.2. Inhibitori kalcineurina.....	14
1.2.3. Nuspojave imunosupresivne terapije.....	17
1.3. Farmakogenetika.....	19
1.3.1. Inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza.....	20
1.3.2. P-glikoprotein.....	21
1.4. Svrha istraživanja.....	23
2. HIPOTEZA.....	24
3. CILJEVI RADA.....	25
3.1. Opći cilj.....	25
3.2. Specifični ciljevi.....	25
4. ISPITANICI I METODE.....	26
4.1. Ispitanici.....	26
4.2. Imunosupresivna terapija.....	26
4.3. Prikupljanje uzoraka i tijek istraživanja.....	27
4.4. Metode genotipizacije .....	29
4.4.1. Izdvajanje DNK.....	29
4.4.2. Genotipizacija <i>IMPDH2</i> , <i>ABCB1</i> , <i>UGT1a9</i> , <i>ABCG2</i> , <i>SLOCB1</i> .....	29
4.4.3. Genotipizacija <i>ABCB1</i> 2677G>T/A.....	32
4.5. Ishodi.....	33
4.6. Veličina uzorka.....	33
4.7. Analiza podataka.....	34
4.8. Kontrola <i>confoundera</i> .....	43
4.9. Statistička analiza.....	49
4.10. Osjetljivost na nemjereni (ostatni) <i>confounding</i> .....	50
4.11. Odobrenje etičkog povjerenstva.....	50
5. REZULTATI.....	51



5.1. Demografski podaci.....	51
5.2. Učestalost polimorfizma <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> (rs11706052).....	58
5.3. Utjecaj polimorfizma <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> (rs11706052) na bubrežnu funkciju presatka u 1. godini nakon transplantacije.....	59
5.4. Povezanost polimorfizma <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> (rs11706052) s akutnim odbacivanjem presatka u 1. godini nakon transplantacije bubrega.....	64
5.5. Utjecaj polimorfizma <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> (rs11706052) na preživljenje presatka i preživljenje pacijenta u 1. godini nakon transplantacije bubrega.....	64
5.6. Povezanost polimorfizma <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> (rs11706052) s učestalošću nuspojava, tumora i infekcija u 1. godini nakon transplantacije bubrega.....	64
5.7. Učestalost polimorfizma gena <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642).....	66
5.8. Utjecaj polimorfizma <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) na bubrežnu funkciju presatka u 1. godini nakon transplantacije.....	66
5.9. Povezanost polimorfizma <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) s akutnim odbacivanjem presatka u 1. godini nakon transplantacije.....	72
5.10. Utjecaj polimorfizma <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) na preživljenje presatka i preživljenje pacijenta u 1. godini nakon transplantacije.....	72
5.11. Povezanost polimorfizma <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) s učestalošću nuspojava, tumora i infekcija u 1. godini nakon transplantacije.....	72
6. RASPRAVA.....	74
7. ZAKLJUČAK.....	90
8. SAŽETAK.....	91
9. SUMMARY.....	92
10. POPIS LITERATURE.....	93
11. ŽIVOTOPIS.....	105

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Bubrezi su jedan od pet vitalnih organa čovjekova tijela koji su nužni za život. Iako je tek Galen utvrdio kako je funkcija bubrega proizvodnja i ekskrecija urina, njihova važnost poznata je od davnina, doduše, tada samo u metaforičkom smislu. U Bibliji se bubrezi spominju na više mjesta u tekstu, nevezano za njihovu fiziološku funkciju, nego se povezuju se s moralom i savjesti (1). Oni su smatrani centralnim dijelom čovjekove osobnosti (1) što govori o dubokom shvaćanju važnosti ovog organa za život. Danas znamo točno zašto su bubrezi vitalni organ i koja je cijena njihova zatajenja. Također, kompletni razvoj transplantacijske medicine možemo zahvaliti bubrežima jer je to prvi uspješno transplantirani organ u povijesti. Pioniri transplantacijske medicine savladavali su metode koje danas smatramo osnovama transplantacije: vaskularne anastomoze, imunološku podudarnost primatelja i darovatelja te imunosupresivnu terapiju. Današnji trendovi, u vremenu personalizirane medicine, streme k individualiziranoj terapiji. Genske analize i krojenje terapije prema genskom profilu svakog pojedinca predstavlja budućnost transplantacijske medicine kako bi se efikasnost terapije povećala, smanjila učestalost nuspojava i time produžilo preživljenje transplantiranog organa.

### 1.1. Transplantacija bubrega

#### 1.1.1. Kronična bubrežna bolest

Kronična bubrežna bolest (KBB) definirana je prema Organizaciji za poboljšanje globalnih ishoda bubrežnih bolesti (KDIGO, engl. *Kidney Disease Improving Global Outcome*) kao poremećaj strukture ili funkcije bubrega, koje traje dulje od 3 mjeseca uz prisutnost jednog od dvaju uvjeta navedenih u Tablici 1.

Tablica 1. Kriteriji kronične bubrežne bolesti (2)

Smanjena brzina glomerularne filtracije (GFR, engl. <i>glomerular filtration rate</i> )	$GFR < 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{ m}^2$
Znakovi bubrežne ozljede	Abnormalnosti sedimenta urina
	Elektrolitski poremećaji
	Patohistološke promjene
	Strukturni poremećaji na slikovnim pretragama
	Transplantacija bubrega u povijesti bolesti

Prilagođeno prema: Ann Intern Med. 158(11):825-30. (2)

Klasifikacija kronične bolesti temelji se na *GFR* i dijeli se u 6 stadija (Tablica 2).

Tablica 2. Klasifikacija kronične bubrežne bolesti (2)

Stadij	<i>GFR</i> (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )
1	≥90
2	60-89
3a	45-59
3b	30-44
4	15-29
5	<15

Prilagođeno prema: Ann Intern Med. 4;158(11):825-30. (2)

U odsustvu pokazatelja oštećenja bubrega, stadij 1 i 2 ne smatraju se kroničnom bubrežnom bolešću, stadij 3a označava blago do umjereno, stadij 3b umjereno do teško, stadij 4 teško smanjenje bubrežne funkcije, dok stadij 5 označava bubrežno zatajenje (2).

Prema nedavno objavljenoj studiji, koja je obuhvatila 11 razvijenih zemalja i analizirala 2,4 milijuna bolesnika, procjenjuje se kako 1 od 10 odraslih osoba potencijalno ima KBB (na temelju postavljene dijagnoze ili jednim patološkim nalazom odnosa albumina i kreatinina u mokraći (*UACR*, engl. *Urine Albumin-to-Creatinine Ratio*) ili procijenjene *GFR* (*eGFR*, engl. *estimated GFR*) (3). Temeljem podataka Nacionalnog istraživanja o zdravlju i prehrani *NHAES* (engl. *National Health and Nutrition Examination*

Survey) procijenjena učestalost KBB u odrasloj populaciji prema stadiju bolesti u Sjedinjenim Američkim Državama jest: stadij 1 - 4,7%, stadij 2 3,3%, stadij 3 6,4%, stadij 4 – 0,4% te stadij 5 – 0,1% (4). Europska komisija navodi kako u Europi 100 milijuna ljudi boluje od KBB, te da će ova bolest do 2040. godine postati 5 vodeći uzrok smrti na globalnoj razini (5). KBB predstavlja ozbiljan javno-zdravstveni problem jer je opterećena značajnim morbiditetima i mortalitetom, te je opterećenje za javno-zdravstveni sustav zbog visokih troškova liječenja ovih bolesnika. Smatra se kako je KBB jedna od najskupljih bolesti za zdravstvene sustave, jer se u Europi na liječenje ove bolesti godišnje potroši oko 140 milijardi eura (5). U Republici Hrvatskoj (RH) je 2017. godine zabilježeno 3544 osobe koje se liječe nekim oblikom nadomještanja bubrežne funkcije, od čega je 2649 na liječenju dijalizom, a 895 bolesnika ima funkcionirajući transplantirani bubreg (6).

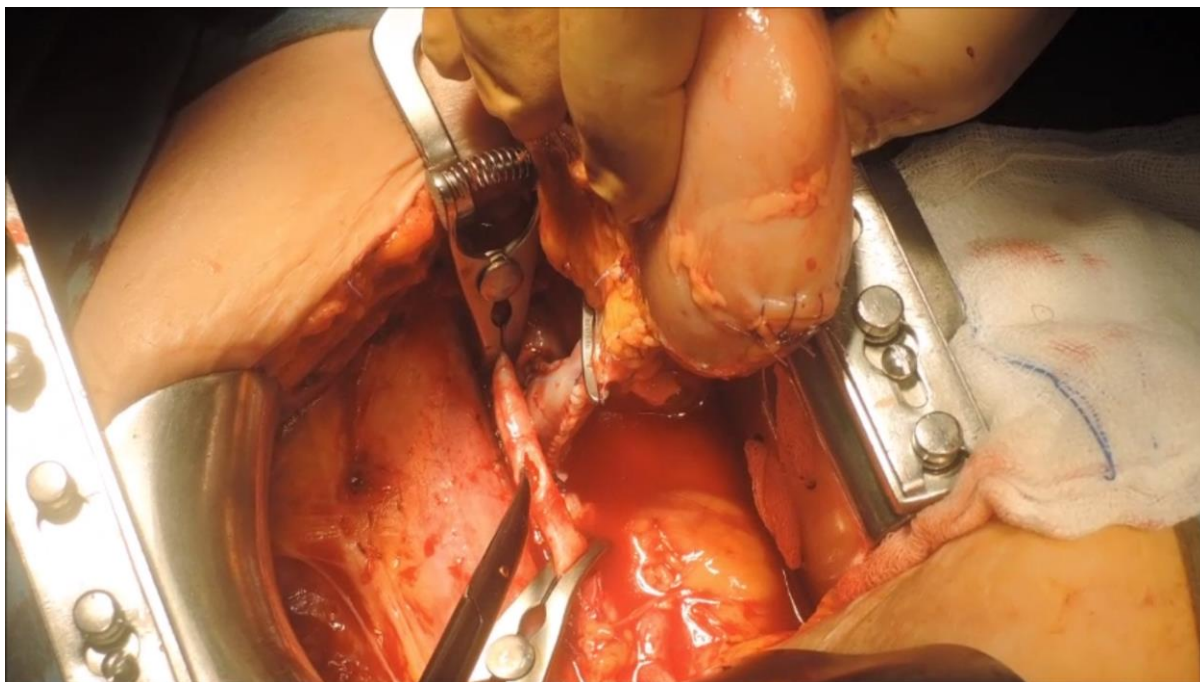
Faktori koji povećavaju sklonost nastanku kronične bubrežne bolesti su: prisutnost ove bolesti u drugih članova obitelji, starija životna dob, te prirođeno ili stečeno smanjenje mase bubrega. Faktori koji direktno uzrokuju ovu bolest su: arterijska hipertenzija, šećerna bolest, pretilost i metabolički sindrom. Bolesnici 1. i 2. stadija kronične bubrežne bolesti uglavnom nemaju nikakvih simptoma, osim simptoma bolesti koja uzrokuje bubrežno oštećenje (npr. povišeni krvni tlak kod arterijske hipertenzije, simptomi urinarne infekcije i sl.). Glavni znak oštećenja bubrega u ovim stadijima je nalaz albuminurije. Bolesnici 3. i 4. stadija bolesti pokazuju i simptome i znakove ove bolesti, jer ona utječe na cijeli organizam. Javljaju se slabost, smanjeni apetit, umor, te normocitna anemija. U tijelu dolazi do poremećaja elektrolita i acido-bazne ravnoteže, a pojavljuju se i znakovi poremećaja homeostaze kalcija, fosfora, paratiroidnog hormona i vitamina D. Bolesnici u završnom stadiju KBB nalaze se u uremijskom sindromu koji je posljedica sloma metaboličke, urinarne i endokrine funkcije bubrega. Ako se ovi bolesnici adekvatno ne liječe, rezultat je smrtni ishod.

Osnova liječenja KBB je nadomještanje bubrežne funkcije što se provodi na tri načina: hemodijalizom, peritonejskom dijalizom te transplantacijom bubrega. Svaki od modaliteta liječenja ima svojih prednosti i mana. Dijaliza, bila ona hemodijaliza ili peritonejska dijaliza, temelji se na procesu difuzije. To je proces pri kojem dvije otopine različitih koncentracija otopljenih tvari, odijeljene polupropusnom membranom, teže izjednačavanju koncentracija tih tvari. U hemodijalizi ovaj se proces događa izvan čovjekova tijela unutar aparata za hemodijalizu. Za hemodijalizu potreban je vaskularni pristup intravaskularnim kateterom, arterijo-venskom fistulom ili graftom. Arterijo-venska fistula najbolji je način hemodijalize zbog dugotrajnosti, za razliku od katetera ili grafta. Hemodijaliza je opterećena komorbiditetima te socijalno-ekonomskim čimbenicima zbog potrebe pristupa aparatu. Hemodijaliza skraćuje život, uzrokuje kardiovaskularne bolesti te stečenu policističnu bolest bubrega. Kod peritonejske dijalize peritoneum služi kao polupropusna membrana za izmjenu tvari između dijalizne tekućine i krvi. Peritonejska dijaliza smanjuje potrebu korištenja bolničkih sustava te omogućava veću

mobilnost bolesnika. S druge strane, potreban je opsežniji operativni zahvat kako bi se postavio peritonejski kateter za dijalizu.

### 1.1.2. Općenito o transplantaciji bubrega

Najkompleksniji oblik nadomjesne terapije bubrega predstavlja transplantacija bubrega. Ovaj oblik liječenja predstavlja metodu izbora za pacijente u završnom stadiju bubrežne bolesti. Transplantacija bubrega, u usporedbi s dijalizom, povezana je s manjom smrtnosti i boljom kvalitetom života (7). Upravo zbog toga potrebno je sve bolesnike s ovim oblikom bolesti razmotriti za transplantaciju bubrega. Glavni ograničavajući čimbenik transplantacije je dostupnost organa. Apsolutne kontraindikacije za transplantaciju bubrega su: aktivna maligna bolest, aktivna infektivna bolest te bolesti i stanja s očekivanim trajanjem života <2 godine (8). Postoji više vrsta transplantacije bubrega, ovisno o kontekstu. Gledajući pretransplantacijsku dijalizu, transplantacija se može učiniti kod bolesnika koji su u procesu liječenja dijalizom ili kod bolesnika kod kojih dijaliza još nije započela, što se zove preemtivna transplantacija. Ovaj oblik transplantacije ima bolji uspjeh od transplantacije kod bolesnika koji su na dijalizi (9). Uzimajući u obzir donaciju organa, transplantacija može biti sa živog srodnog ili nesrodnog donora ili mrtvog donora. Što se tiče kriterija odabira darovatelja organa, oni mogu biti po standardnim ili proširenim kriterijima („marginalni“ ili granični darovatelji), kao što su osobe starije od 70 godina bez drugih rizičnih čimbenika, osobe starije od 60 godina sa šećernom bolesti, arterijskom hipertenzijom, proteinurijom ili vaskularnim promjenama na mrežnici, osobe s klirensom kreatinina do 50 mL/min, osobne s klirensom <50mL/min (tada se koriste oba bubrega), biopsijom utvrđeno oko 5-20% glomeruloskleroze od barem 25 glomerula oba bubrega (bubrezi se mogu transplantirati pojedinačno ili u paru), te biopsijom utvrđeno >20% glomeruloskleroze (tada se donosi individualna odluka ovisno o bubrežnoj funkciji) (10).



Slika 1. Formiranje vaskularne anastomoze tijekom transplantacije (privatna zbirka autora)

Transplantacija organa svrstava se u popis najuspješnijih znanstvenih postignuća 20. stoljeća. Prva uspješna transplantacija bubrega napravljena je u Bostonu 1954. godine. Operaciju je izveo plastični kirurg dr. Joseph E. Murray, koji je presadio bubrege jednojajčanog blizanca kako bi premostio imunološku barijeru odbacivanja, te je za svoja postignuća u transplantacijskoj medicini, zajedno s E. Donnall Thomasom, 1990. godine dobio Nobelovu nagradu (11). Prva uspješna transplantacija u Hrvatskoj učinjena je 1971. godine u KBC Rijeka pod vodstvom prof. dr. Vinka Frančičkovića (12).

Transplantacija bubrega u RH regulirana je dvama zakonima: Zakonom o primjeni ljudskih tkiva i stanica (NN 144/12) i Zakonom o presađivanju ljudskih organa u svrhu liječenja (NN 144/12). Darivanje organa u RH temelji se na pretpostavljenom pristanku, što znači da su sve osobe darivatelji organa ako se za života nisu jasne izrazile da odbijaju darovati organe nakon smrti. Republika Hrvatska je 26. svibnja 2007. godine postala punopravna članica Eurotransplanta, Europske organizacije za razmjenu organa, što je omogućilo značajno povećanje broja transplantacija, te pozicioniralo RH u sam vrh transplantacijske medicine u svijetu.

Transplantacija bubrega u KBC Zagreb započela je prvim zahvatom 10. listopada 1973. godine. Uspjeh tog programa i kasniji razvoj transplantacijskih programa ostalih organa u KBC Zagreb temeljio se na odlično organiziranom radu Centra za tipizaciju tkiva. Tijekom 2000-tih godina, a pogotovo nakon ulaska RH u Eurotransplant, KBC Zagreb je vodeći transplantacijski centar u državi s najvećim brojem transplantacija bubrega godišnje, a posebno se ističe rekordna 2010. godina kada je učinjeno 157 transplantacija. COVID19 pandemija uzrokovala značajno smanjenje broja transplantacija bubrega u

cijelome svijetu, pa tako i u RH (13). Nepoznate su dugoročne posljedice ovoga događaja i buduće analize pokazati kakav je utjecaj pandemija imala na bolesnike s kroničnom bubrežnom bolešću.

Glavni izazov transplantacijske medicine je spriječiti odbacivanje organa. Imunosni sustav razlikuje svoje tkivo od tuđega i kod nepodudarnosti pokreće imunosni odgovor. Za kontrolu ovog kompliciranog zadatka kod svih viših organizama odgovoran je genski sustav koji se naziva glavni sustav histokompatibilnosti *MHC* (engl. *Main histocompatibility Complex*). Kod čovjeka se naziva sustav ljudskog leukocitnog antigena *HLA* (engl. *Human Leukocyte Antigen*). Geni tog sustava nalaze se na kratkom kraku 6. kromosoma. Organizirani su u tri razreda: razred I sadržava gene koji kodiraju antigene *HLA-A, B i C*, razred II sadržava gene koji kodiraju *HLA-D* molekule (*DR, DQ i DP*) dok razred III sadrži *non-HLA* gene *MICA i MICB*, kao i cijeli drugi niz gena za proteine, koji imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru. Među proizvodima svih tih gena najvažniju ulogu u imunološkom odgovoru imaju molekule *HLA* razreda I i II. Molekule razreda I nalaze se na svim stanicama s jezgrom (osim stanica endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava). Molekule razreda II nalaze se na površini stanice koja predočuju antigen (kao što su makrofagi, monociti, limfociti B i dendritične stanice). Analiza sustava *HLA* temelj je tipizacije tkiva. Jedan od važnih čimbenika dugotrajnog preživljenja transplantiranog bubrega je poklapanje darovatelja i primatelja u antigenima *HLA*. Nakon što se provede odabir primatelja prema podudarnosti krvnih grupa, sljedeći korak je određivanje nepodudarnosti (engl. *missmatch, MM*) za *HLA* sustav u lokusima *HLA-A, HLA-B i HLA-DR*. U svakom lokusu broj podudarnosti može biti 0-2, a istraživanja su pokazala kako je nepodudarnost u *HLA-DR* lokusu najbitnija, tj. povezana s povećanom incidencijom odbacivanja organa. Konačni test podudarnosti, prije pristupanja transplantaciji bubrega, predstavlja test križne reakcije (eng. *crossmatch*). To je metoda koja se temelji na reakciji citotoksičnosti ovisnoj o komplementu (engl. *Complement Dependent Cytotoxicity, CDC*) te se smatra „zlatnim standardom“ jer isključuje postojanje donor-specifičnih protutijela u serumu primatelja. Izvodi se na način da se upotrebljavaju serum primatelja i limfociti darovatelja. Pozitivan test je apsolutna kontraindikacija za transplantaciju zbog očite imunološke nepodudarnosti darovanog organa za tog primatelja.

U velikoj većini slučajeva transplantacije bubrega transplantirani organ nije genski podjednak primatelju i to će neminovno rezultirati odbacivanjem. Također, imunološki odgovor primatelja na organ nije uvjetovan samo genskom nepodudarnošću, nego i promjenama u organu koje nastaju kao posljedica: moždane smrti donora, kirurškog postupka eksplantacije organa, načina čuvanja organa, trajanja hladne ishemije, te ishemijsko-reperfuzijske ozljede organa koja nastaje nakon puštanja cirkulacije. Aktivacija T limfocita uzrokuje odbacivanje organa i tu ključnu ulogu imaju citotoksični T limfociti i pomoćni CD4+ T limfociti, koji proizvode citokine i time aktiviraju stanični imunosni odgovor ili humoralni imunosni odgovor – proizvodnju protutijela.

Odbacivanje transplantiranog organa dijeli se na akutno i kronično odbacivanje. Akutno odbacivanje može se podijeliti na akutno i hiperakutno odbacivanje. Hiperakutno odbacivanje nastaje u vrlo ranom postoperativnom periodu od nekoliko minuta do nekoliko sati od transplantacije i posredovano je protutijelima. To je događaj koji rezultira gubitkom grafta jer je potrebno učiniti graftektomiju. Danas se izrazito rijetko javlja zbog provođenja pretransplantacijskog testiranja na protutijela protiv darovatelja (14).

Akutno odbacivanje presatka dokazuje se biopsijom presatka. Biopsija bubrežnog presatka može se podijeliti u protokolarnu biopsiju i indikacijsku biopsiju. Protokolarna biopsija se provodi u dogovorenim intervalima nakon transplantacije bubrega, kako bi se pratili subkliničke promjene u bubrežnom parenhimu. Indikacijske biopsije provode se kod sumnje na odbacivanje (14).

Analiza bioptiranog tkiva provodi se prema klasifikaciji iz Banffa. To je široko prihvaćen i standardiziran alat koji se koristi za procjenu i klasifikaciju odbacivanja bubrežnog alografta. Pruža okvir za histopatološku procjenu biopsijom uzetog tkiva bubrežnog presatka omogućujući dosljednu interpretaciju i komunikaciju među patolozima i kliničarima (15, 16). Banff klasifikacijski sustav kategorizira odbacivanje u različite tipove na temelju specifičnih histoloških značajki. Glavne kategorije uključuju odbacivanje posredovano antitijelima (*AMR*, engl. *antibody-mediated rejection*) i odbacivanje posredovano T-stanicama (*TCMR*, engl. *T-cell-mediated rejection*). *AMR* je karakteriziran prisutnošću antitijela specifičnih za davatelja i histološkim dokazom ozljede posredovane antitijelima, kao što su glomerulitis i peritubularni kapilaritis. *TCMR* je, s druge strane, karakteriziran infiltracijom T limfocita unutar bubrežnog tkiva, što dovodi do tubulitisa i intersticijske upale. Banffov klasifikacijski sustav također uzima u obzir druge histopatološke značajke i daje potkategorije i stupnjeve za daljnje opisivanje ozbiljnosti i opsega odbacivanja. To uključuje prisutnost transplantacijske glomerulopatije, intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Banffov klasifikacijski sustav kontinuirano se ažurirao tijekom godina kako bi uključio novo znanje i poboljšao dijagnostičku točnost i prognostičku vrijednost procjene odbacivanja bubrežnog alografta (15, 17). Služi kao vrijedan alat u kliničkoj praksi za usmjeravanje odluka o liječenju i predviđanje dugoročnih ishoda nakon transplantacije bubrega.



TABLICA 3. Banff dijagnostičke kategorije

1. Normalno
2. Promjene posredovane protutijelima <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zahtijevaju prisutnost cirkulirajućih protutijela primatelja na darovatelja ili patološki nalaz u alograftu</li> <li>• Akutno odbacivanje posredovano protutijelima</li> <li>• Kronično aktivno odbacivanje posredovano protutijelima</li> </ul>
3. Granične promjene
4. Akutno odbacivanje posredovano limfocitima T <ul style="list-style-type: none"> <li>• Akutno odbacivanje posredovano limfocitima T</li> <li>• Kronično aktivno odbacivanje posredovano limfocitima T</li> </ul>
5. Intersticijska fibroza i tubularna atrofija, bez znakova specifične etiologije
6. Drugo: ostale promjene za koje se ne smatra da su posljedica odbacivanja

Prilagođeno prema: Transplantation. 2018;102(11):1795-814. (18)

Kronično odbacivanje presatka danas je zamijenjeno terminom „kronična disfunkcija presatka“ (19). Dokazuje se biopsijom, a za stupnjevanje stadija koristi se klasifikacija iz Banffa. Kronična disfunkcija presatka javlja se kod oko 20% bolesnika 10 godina nakon transplantacije bubrega (14).

Postoji jako puno faktora koji utječu na preživljenje grafta, a mogu se povezati s osobinama donora, što uključuje sve okolnosti eksplantacije organa, osobinama primatelja te događajima koji se dešavaju nakon transplantacije kao što su: akutno odbacivanje, kronično odbacivanje, pojava kardiovaskularnih bolesti, infekcija i malignih tumora. Poboljšanje kirurške tehnike i poboljšanje imunosupresivne terapije dovelo je do izvrsnog kratkoročnog preživljenja (jednogodišnje preživljenje transplantiranog bubrega više je od 95%), međutim, poboljšanje dugoročnog preživljenja grafta nije se značajno promijenilo unazad više desetljeća (20). Slabiji napredak dugoročnog preživljenja grafta više je izražen u SAD nego u Europi i ta se razlika prati već dulje vrijeme (21, 22). Mnogi su razlozi ovakve razlike, ali se najviše značaj pridodaje razlici u organizaciji postransplantacijskog praćenja i načina financiranja zdravstvenog sustava, a time i pridržavanja imunosupresivne terapije, koja je bolja u Europi (21). U svrhu poboljšanja dugoročnog preživljenja transplantiranog bubrega potrebno je identificirati sve faktore koji se mogu modificirati i time poboljšati rezultati.

## 1.2. Imunosupresivna terapija

Uspjeh zahvata nije samo rezultat dobre kirurške tehnike nego i multidisciplinarnu predoperativnu, intraoperativnu i postoperativnu suradnju više medicinskih struka. Upravo ta multidisciplinarnost karakterizira i povijesni razvoj transplantacije bubrega. Dugi je niz pokušaja i pogreški pri usavršavanju kirurške tehnike transplantacije od prvih pokušaja eksperimentalnih transplantacija početkom 20-og stoljeća do prve uspješne transplantacije s identičnog blizanca u Bostonu 1954. godine. Paralelno su se otkrivala saznanja o imunološkim procesima odbacivanja organa, tkivnoj podudarnosti i slično, što je omogućilo razvoj imunosupresivne terapije koja je postala osnova liječenja transplantiranih bolesnika. Temelj dugoročnog preživljenja transplantiranog bubrega je imunosupresivna terapija čiji je cilj uspješno spriječiti akutno i kronično odbacivanje, istovremeno pazeći da se pojavnost komplikacija svede na minimum. Imunosupresivna terapija dijeli se na indukcijsku, koja se primjenjuje u perioperativnom razdoblju, i terapiju održavanja, koja se primjenjuje sve dok bolesnik ima presadak (23). Imunosupresivna terapija ima za cilj modulirati imunološki odgovor i spriječiti odbacivanje nakon transplantacije organa. Nekoliko je mehanizama uključeno u imunosupresivno djelovanje ovih lijekova. Jedan je mehanizam inhibicija aktivacije i proliferacije T-stanica. Inhibitori kalcineurina (*CNI*, engl. *calcineurin inhibitors*), kao što su ciklosporin i takrolimus, blokiraju aktivaciju nuklearnog faktora aktiviranih T stanica (*NFAT*, engl. *Nuclear factor of activated T-cells*), faktora transkripcije neophodnog za aktivaciju T stanica i proizvodnju citokina (24). To dovodi do supresije imunološkog odgovora posredovanog T-stanicama.

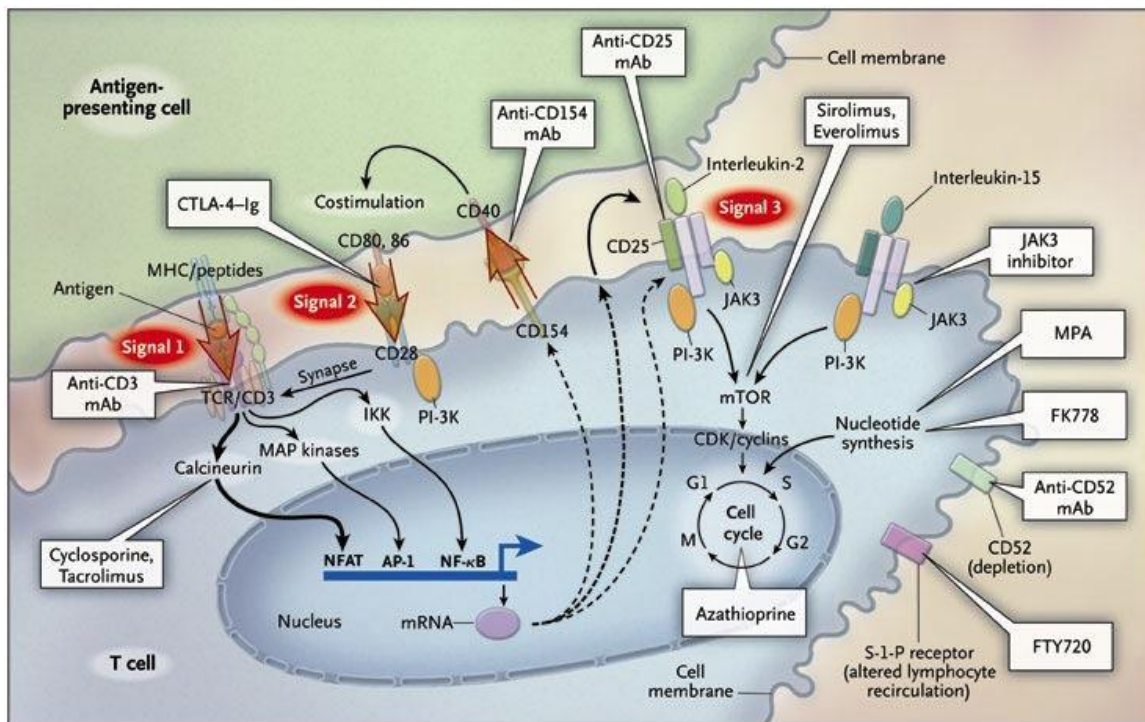
Drugi mehanizam uključuje interferenciju sa sintezom i funkcijom proliferacije limfocita i aktivacijskih signala. Agensi poput mikofenolne kiseline (*MPA*, engl. *mycophenolic acid*) inhibiraju enzim inozin-5'-monofosfat dehidrogenazu (*IMPDH*), koji je bitan za de novo sintezu gvanozinskih nukleotida potrebnih za proliferaciju limfocita (25). Osim toga, imunosupresivne terapije mogu ciljati na funkciju efektorskih T stanica i drugih imunoloških stanica. Glukokortikoidi, poput prednizona, imaju imunosupresivne učinke inhibicijom proizvodnje citokina i ometanjem migracije i aktivacije imunoloških stanica (26). Štoviše, biološki agensi, poput monoklonskih protutijela, mogu selektivno ciljati na imunološke stanice ili njihove površinske molekule. Na primjer, monoklonska protutijela protiv CD25 (IL-2 receptora), kao što su baziliksimumab ili daklizumab, selektivno blokiraju IL-2 receptor na aktiviranim T stanicama, inhibirajući njihovu proliferaciju i funkciju (23). Kombinacijom ovih mehanizama, imunosupresivna terapija ima za cilj prigušiti imunološki odgovor, spriječiti odbacivanje i pospješiti prihvaćanje presatka kod primatelja.

Imunosupresivna terapija kod transplantacije organa sastoji se od dvije glavne faze: indukcije i održavanja. Ove faze služe različitim svrhama i uključuju različite pristupe imunosupresiji. Razlika između uvodne i imunosupresivne terapije održavanja leži u njihovom vremenu, ciljevima i trajanju. Indukcijska terapija se primjenjuje rano nakon transplantacije kako bi se osigurala neposredna i intenzivna imunosupresija i time spriječilo akutno odbacivanje, dok se terapija održavanja daje kontinuirano kako bi se osigurala dugotrajna imunosupresija za održavanje funkcije transplantata i spriječilo kronično odbacivanje.

Indukcijska terapija primjenjuje se u perioperativnom razdoblju i ima za cilj brzu supresiju imunološkog odgovora primatelja kako bi se spriječilo akutno odbacivanje. Ova početna imunosupresija pomaže u kontroli intenzivne imunološke aktivacije izazvane postupkom transplantacije. Uobičajeno korišteni induksijski agensi uključuju monoklonska protutijela poput anti-timocitnog globulina (ATG) ili antagonista interleukina-2 receptora (IL-2RA) poput baziliksimumaba. Ovi agensi ciljaju specifične imunološke stanice ili njihove površinske molekule, dovodeći do iscrpljivanja T-stanica ili inhibicije aktivacije T-stanica (27, 28). Indukcijska terapija cilja na povećanje efikasnosti imunosupresije, smanjenje opasnosti od akutnog odbijanja te smanjenje doze drugih lijekova koji se koriste istovremeno, kao što su *CNI* ili kortikosteroidi (28).

S druge strane, imunosupresivna terapija održavanja osmišljena je kako bi osigurala stalnu imunosupresiju u cilju održavanja funkcije presatka i dugoročno spriječilo odbacivanje. Terapija održavanja obično uključuje kombinaciju imunosupresivnih lijekova. Ovi lijekovi djeluju kroz različite mehanizme za suzbijanje imunološkog odgovora i održavanje imunološke tolerancije na transplantirani organ (28). Primjenjuju se kombinirano kako bi se povećala učinkovitost terapije i smanjila razina nuspojava koje svaki lijek donosi individualno. Standardna imunosupresivna terapija održavanja danas se temelji na kombinaciji *CNI* (ciklosporin ili takrolimus), *MPA* i kortikosteroida. Drugi imunosupresivi, kao što su imunosupresivi novijeg datuma, mTOR inhibitor sirolimus i everolimus primjenjuju se većinom u posebnim slučajevima, kad su u pitanju maligne bolesti (bile prije ili poslije transplantacije), u slučaju razvoja toksičnosti *CNI* terapije, sprečavanju restenoze renalne arterije grafta i inkapsulirajućeg sklerozirajućeg peritonitisa (kod bolesnika na prethodnoj peritonejskoj dijalizi). Iako oni djeluju učinkovita i pouzdano, njihova primjena u transplantaciji bubrega nije još do kraja definirana (23).

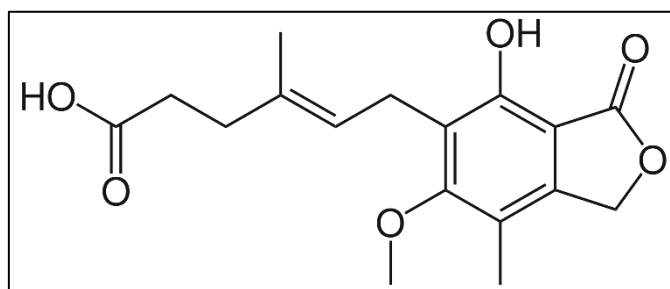
Danas se na temelju studije *Symphony* preferira imunosupresivna terapija koja uključuje kombinaciju daklizumaba, mikofenolne kiseline, kortikosteroida i niske doze takrolimusa zbog boljeg učinka na bubrežnu funkciju, preživljenje grafta i učestalost akutnog odbacivanja, u usporedbi s istom kombinacijom uz niskodozni ili standardno-dozni ciklosporin ili niskodozni sirolimus (27).



Slika 2. Mehanizmi imunosupresivne terapije. Preuzeto uz dozvolu iz N Engl J Med. 2004, 351(26):2715-29. Copyright Massachusetts Medical Society. (29)

### 1.2.1. Mikofenolna kiselina

Mikofenolna kiselina je imunosupresivni spoj koji je fermentacijski proizvod plijesni *Penicillium brevicompactum*. To je slaba kiselina koju je 1893. godine otkrio liječnik Bartolomeo Gosio u Rimu. On je demonstrirao njezin antibakterijski učinak protiv *Bacillus anthracis*, međutim je to otkriće potom zaboravljeno (30). Američki znanstvenici C. L. Alberg i O. M. Black izolirali su isti spoj 1913. godine i nazvali ga mikofenolnom kiselinom (30). Strukturu spoja definirali su 1932. Rainstrick i suradnici (31).



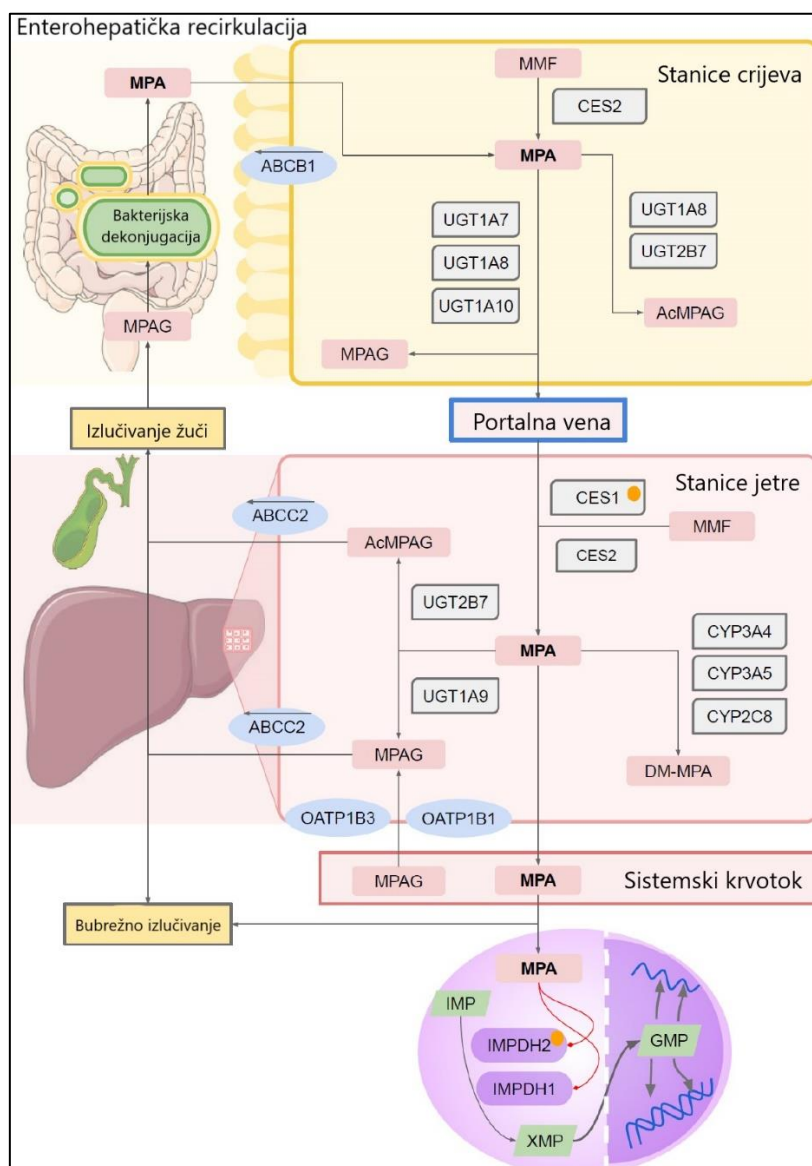
Slika 3. Kemijska struktura mikofenolne kiseline. Preuzeto od Meodipt, Wikipedia, Public domain, via Wikimedia Commons

Mikofenolna kiselina je snažan, reverzibilan i nekompetitivan inhibitor enzima IMPDH, čime se sprečava de novo sinteza guanozina-5'-monofosfata (*GMP*, eng. *Guanosine Monophosphate*) i time direktno utječe na proliferaciju stanica koje ovise o de novo sintezi purina, kao što su T i B limfociti (32). Postoje dvije formulacije lijeka – mikofenolat mofetil (33) i mikofenolat natrij (*EC-MPS*, od eng. *Enteric-coated mycophenolate sodium*) koje se razlikuju u brzini i mjestu apsorpcije u probavnom traktu. Vršna vrijednost koncentracije mikofenolata postiže se za 1-2 sata nakon promjene mikofenolat mofetila, a kod mikofenolat natrija za 2-4 sata (23). Metabolizam *MPA* (farmakokinetika) temelji se na tri procesa: glukuronidaciji, enterohepatičkoj recirkulaciji i izlučivanju bubrezima. To je složen procesi koji je pod utjecajem mnogih čimbenika.

*MPA* se u jetri pretvara u neaktivni oblik kroz proces glukuronidacije uz pomoć enzima poznatog kao uridin-difosfatfosfoglukuronizil-transferaza (UGT) (34). Tom transformacijom nastaje metabolit *MPA*-7-O-glukuronid (*MPAG*), koji se potom izlučuje kroz žuč i prelazi u crijeva. Otprilike 90% *MPA*-a se u jetri metabolizira u *MPAG*, dok se manji dio metabolizira u crijevima i bubrezima. Glukuronidacija se najvećim dijelom odvija preko dvaju enzima, jetrenog UGT1A9 i van jetrenog UGT8, uz manji doprinos ostalih UGT enzima (35). U biotransformaciji *MPA*-a u acil-glukuronid (*Ac-MPAG*), koji može inhibirati IMPDH i ima farmakološku aktivnost, sudjeluju UGT2B7 i UGT1A8 (36). Također, enzimi iz

CYP450 obitelji (kao što su CYP3A4, CYP3A5 i u nešto manjoj mjeri CYP2C8) također imaju ulogu u biotransformaciji MPA-a, stvarajući metabolit 6-O-desmetil-MPA (DM-MPA) (37).

Konzistentnost farmakokinetičkog ponašanja MPA-a varira zbog raznih faktora i tendencije da postane složenija s dužim uzimanjem lijeka. Te varijacije mogu ovisiti o spolu, koncentraciji albumina u serumu, funkciji bubrega, dodatnim lijekovima i genetskim razlikama. Istraživanja su pokazala da lijekovi poput CNI, kao i genetske razlike u metaboličkim enzimima i proteinima, koji sudjeluju u transportu, mogu utjecati na to kako se MPA metabolizira, a uočen je posebno jak utjecaj ciklosporina (33, 38).



Slika 4. Enterohepatička recirkulacija MPA. Prilagođeno prema J Transl Genet Genom 2020;4:320-55.

(39)

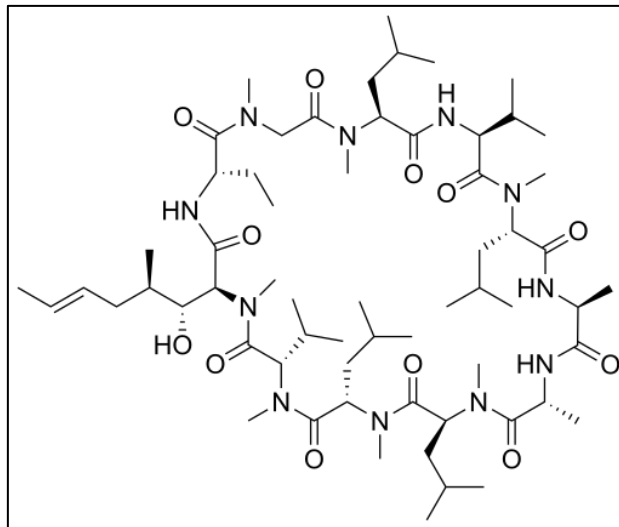
Iz jetrenih stanica, MPAG i Ac-MPAG se transportiraju u žuč uz pomoć transportnog proteina poznatog kao ABCC2. U žuči bakterijski enzimi  $\beta$ -glukuronidaza transformiraju MPAG natrag u aktivnu formu MPA, koja putem enterohepatičke cirkulacije ulazi ponovno u krvotok. Ova cirkulacija igra ključnu ulogu u očuvanju koncentracije MPA/MPAG u krvi. Nakon uzimanja lijeka prva značajna koncentracija u krvi postiže se za sat vremena. Zbog procesa enterohepatičke cirkulacije ponovne vršne vrijednosti MPA se bilježe 6 do 12 sati nakon što je lijek uzet oralnim putem.

MPAG i Ac-MPAG se transportiraju u žuč, dok u jetrene stanice ulaze koristeći influksne membranske transportere OATP čiji su geni označeni kao *SLCO*. Nakon oralne primjene MMF, MPA ima bioraspodivnost između 80,7% i 94%, s time da je 97% MPA u krvotoku vezano za albumine (40). Približno 90% oralno primijenjene doze izlučuje se urin kao MPAG, što se odvija transportom putem ABCC2, dok se MPA u urinu pojavljuje u vrlo malim količinama (manje od 1%). Budući da su većina MPA i MPAG-a u krvi vezani za albumine, fluktuacije u razinama albumina mogu se dogoditi zbog bolesti bubrega ili jetre ili kad više lijekova konkurira za mjesta na albuminu, što može zahtijevati prilagodbu doze MPA (41). Pacijenti s transplantiranom bubregom kod kojih se prati stabilna funkcija grafta, mogu se sigurno i bez ugrožavanja učinkovitosti terapije prebaciti s terapije MMF-a na EC-MPS (42) jer ova formulacija ima manju učestalost gastrointestinalnih nuspojava.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je farmakokinetika MPA izrazito složena i promjenjiva, te su također utvrđeni mnogi farmakogenetički parametri koji utječu na farmakokinetiku varijabilnost (43) (44), što rezultira uskim terapijskim prozorom lijeka. Uz navedene čimbenike, koji utječu na koncentraciju lijeka u plazmi, klinički odgovor (farmakodinamika) MPA komplicira se također i varijabilnom aktivnošću ciljanog enzima IMPDH. Određivanje aktivnosti enzima je u središtu mnogih istraživanja kako bi se predvidio odgovor na imunosupresive (45).

### 1.2.2. Inhibitori kalcineurina

Inhibitori kalcineurina (CNI) su skupina imunosupresivnih lijekova koji se obično koriste u transplantaciji solidnih organa za sprječavanje odbacivanja. Dva glavna CNI-a, koja se koriste u kliničkoj praksi su ciklosporin A (CsA) i takrolimus (TAC, eng. *tacrolimus*). CNI su glavni temelj imunosupresivne terapije. Ciklosporin je bio prvi, a u zadnje vrijeme takrolimus preuzima glavnu ulogu. Iako strukturno različiti, imaju isti mehanizam djelovanja inhibicijom kalcineurina čime se smanjuje stvaranje interleukina 2 (IL-2).



Slika 5. Kemijska struktura ciklosporina. Preuzeto od *Yikrazuul, Wikipedia, Public domain, via Wikimedia Commons*

Ciklosporin A je izoliran iz gljivice *Tolypocladium inflatum* u Baselu, Švicarska, 1971. godine (46). Pronalazak ciklosporina i njegova funkcija u modifikaciji imunološkog odgovora dovelo je do velikog napretka u transplantacijskoj medicini. Studije na životinjama i ljudima pokazale su njegovu učinkovitost u terapiji pacijenata s transplantiranim bubregom i koštanom srži. Zbog toga je 1983. godine FDA (eng. *U.S. Food and Drug Administration*, Američka agencija za hranu i lijekove) odobrila njegovu upotrebu kao lijeka za sprječavanje odbijanja transplantiranih organa.

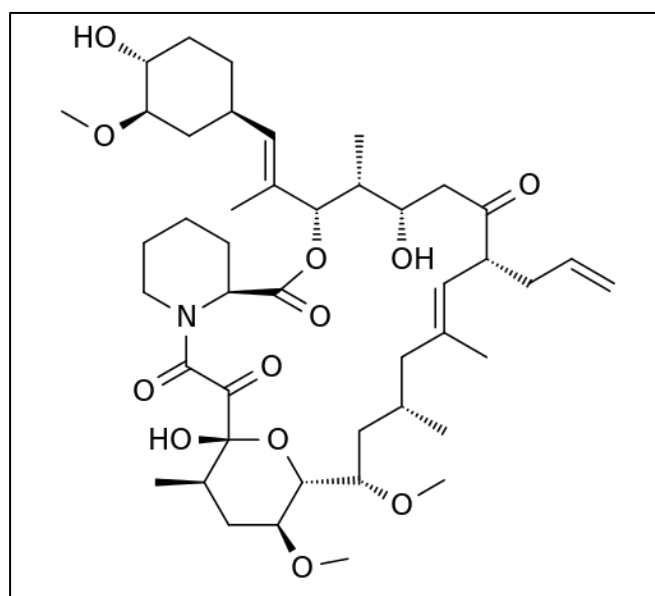
Ciklosporin djeluje blokirajući kalcineurin-fosfatazu, enzim koji se nalazi u citoplazmi, a koji je osjetljiv na  $Ca^{2+}$  i kalmodulin. Kada T-stanice prepoznaju antigen, pokreće se lanac događaja koji povećava koncentraciju kalcija unutar stanica. Ovaj kalcij se veže na kalmodulin, aktivirajući kalcineurin. Ciklosporin, nakon ulaska u stanicu, spaja se s ciklofilinom, stvarajući kompleks koji se veže na kalcineurin-fosfatazu, sprječavajući je da djeluje na *NFAT*, ključni molekularni prekidač u T-stanicama, koji pokreće niz reakcija koje aktiviraju T-limfocite, kao što je proizvodnja IL-2. Međutim, zbog prisutnosti ciklosporina ovaj proces je blokiran, sprječavajući tako aktivaciju T-limfocita (24).

Farmakokinetička varijabilnost ciklosporina ima značajne inter- i intraindividualne razlike, a također i slabo prediktivnu bioraspodjelivost. Njegova farmakokinetička svojstva pod utjecajem su različitih faktora kao što su: dob, etnička pripadnost, varijabilnost crijevne apsorpcije i prisutnost drugih bolesti kao što je dijabetes melitus (47). Ima ograničenu oralnu bioraspodjelivost zbog slabe apsorpcije, utjecaja metaboličkih enzima u crijevima te metabolizma prvoga prolaska kroz jetru. No bioraspodjelivost se poboljšala kada se počela primjenjivati nova formulacija lijeka u obliku mikroemulzije umjesto ranije korištene uljne formulacije (48).



Ciklosporin se pretežno metabolizira u jetri kroz enzim CYP3A4 i u manjoj mjeri kroz CYP3A5, stvarajući otprilike 30 metabolita. Ovi metaboliti nisu imunosupresivni. Većina se izlučuje kroz žuč, a vrlo malo se izlučuje kao nepromijenjeni lijek. Većina se izlučuje putem urina, ali samo mala količina kao originalni lijek (47).

Takrolimus otkriven je 1984. kao jedan od brojnih produkata fermentacije bakterija roda *Streptomyces tsukubaensis*, koje je je istraživala japanska tvrtka *Fujisawa Pharmaceuticals* zbog njihovog svojstva inhibicije limfocita. Moćan imunosupresiv je dobio ime takrolimus kao akronim za *Tsukuba macrolide immunosuppressive* (47). Takrolimus je makrolid koji je FDA prvobitno odobrila 1994. godine za prevenciju odbacivanja transplantirane jetre. Danas je njegova upotreba proširena i na prevenciju odbijanja transplantiranih bubrega i srca.



Slika 6. Kemijska struktura takrolimusa. Preuzeto od *Fuse809, Wikipedia, Public domain, via Wikimedia Commons*

Ovaj je lijek strukturno različit od ciklosporina, ali oba imaju isti mehanizam djelovanja blokade kalcineurina. Unutar stanice takrolimus se spaja s imunofilinom poznatim kao FK506-vezujući protein-12 (ili skraćeno FKBP-12). Kada se formira takrolimus-FKBP-12 kompleks, on se povezuje s kalcineurin-fosfatazom i blokira njezinu funkciju. Kao rezultat toga, blokiraju se kalcijumom vođeni mehanizmi prenošenja T-signala, što smanjuje aktivaciju T-stanica i proliferaciju B-stanica koja ovisi o T-pomoćnim stanicama. Ovo također smanjuje proizvodnju limfokina, kao što su interleukini 2, 3 i  $\gamma$ -interferon, te ekspresiju receptora za interleukin-2 (47).

Takrolimus je lipofilni lijek i kada se uzme oralno njegova farmakokinetika može biti promjenjiva zbog različite apsorpcije i prvog prolaska kroz jetru. To može utjecati na njegovu učinkovitost i potencijalnu toksičnost. Dodatno, takrolimus je podložan utjecaju P-glikoproteina (P-gp), transportnog proteina koji može ograničiti njegovu oralnu bioraspoloživost i distribuciju u tijelu. U crijevima P-gp može smanjiti apsorpciju takrolimusa, dok u jetri i bubrezima može poticati njegov transport u žuč i mokraću (49). Ključno je održavati ispravnu koncentraciju takrolimusa u krvi kako bi se postigla odgovarajuća imunosupresija, izbjeglo odbacivanje transplantiranog organa zbog niske doze, te spriječile toksične reakcije zbog previsokih doza lijeka (50).

Takrolimus se apsorbira u tankom crijevu, a njegova apsorpcija smanjuje se s prisustvom hrane. Nakon što se uzme oralno, vršne koncentracije u krvi postižu se između 1-3 sata. Ima nisku bioraspoloživost s velikim varijacijama među pojedincima jer intenzivno prolazi kroz jetru gdje je podložan enzimima CYP3A i transporterima ABC, koji se nalaze u jetri i crijevima. Takrolimus se metabolizira pretežno putem enzima CYP3A5 i manje putem CYP3A4 proizvodeći oko 15 metabolita. Većina (preko 95%) metabolita izlučuje se putem žuči, dok je samo 2% izlučeno urinom. U urinu i stolici pronađen je vrlo mali postotak nepromijenjenog lijeka, što pokazuje da se takrolimus gotovo potpuno metabolizira, a glavni put eliminacije je kroz žuč (51). S obzirom na njegovu usku terapijsku širinu, varijacije u izloženosti mogu utjecati na rizik od odbacivanja transplantata ili pojavu nuspojava.

CNI su lijekovi koji imaju uzak farmakoterapijski prozor s velikom varijabilnosti te se kod njih primjenjuje tzv. terapijsko praćenje doze lijeka u krvi (*TDM*, eng. *therapeutic drug monitoring*) (52). Za bolesnike s transplantiranim bubregom najznačajnija nuspojava je nefrotoksičnost zbog čega je vrlo važno redovito pratiti koncentraciju lijeka u plazmi i prilagođavati dozu.

### 1.2.3. Nuspojave imunosupresivne terapije

Imunosupresivna terapija, kamen temeljac transplantacije organa, ključna je za sprječavanje odbacivanja presatka. Međutim, ovi lijekovi povezani su s cijelim nizom različitih nuspojava.

Mikofenolna kiselina je imunosupresivni lijek koji se široko koristi u transplantaciji organa, posebno u kombinaciji s drugim imunosupresivnim agensima. Iako je učinkovita u sprječavanju odbacivanja, terapija MPA može biti povezana s mnogim nuspojava. Gastrointestinalni poremećaji, poput proljeva, mučnine i bolova u trbuhu, često su prijavljeni štetni učinci *MPA* (23). Manje često mogu se pojaviti ulkus gastrointestinalnog trakta, krvarenja i perforacija (53). Gastrointestinalne nuspojave mogu dovesti do smanjenja doze ili prekida terapije u nekim slučajevima. Nadalje, *MPA* može uzrokovati mijelosupresiju, što može dovesti do citopenije: anemije, leukopenije i trombocitopenije (23, 53). Za

otkrivanje i liječenje mijelosupresije potrebno je redovito praćenje laboratorijskih nalaza. Osim toga, *MPA* je povezana s povećanim rizikom od oportunističkih infekcija – bakterijskih, gljivičnih, virusnih i protozoalnih (23, 53). Profilaktičke strategije, uključujući upotrebu antivirusnih lijekova, često se koriste kako bi se smanjio rizik od ovih infekcija. Pažljivo praćenje i upravljanje ovim nuspojavama ključni su za optimizaciju sigurnosti i učinkovitosti terapije *MPA* u primatelja. *MPA* se povezuje i s povećanim rizikom od razvoja zloćudnih bolesti (53), ali je upitno da li je to posljedica izoliranog učinka ovog lijeka ili kombinirani utjecaj imunosupresije (23).

Inhibitori kalcineurina, kao što su ciklosporin i takrolimus, naširoko se koriste u imunosupresivnoj terapiji nakon transplantacije organa, ali su također povezani s različitim nuspojavama. Nefrotoksičnost je značajan problem kod *CNI*-a što dovodi do akutne ozljede bubrega i kronične bubrežne disfunkcije. Hipertenzija i dislipidemija česte su metaboličke nuspojave povezane s dugotrajnom terapijom *CNI*. Osim toga, *CNI* su povezani s: poremećajima metabolizma glukoze, uključujući novonastali dijabetes nakon transplantacije, pojavom hiperkalemije, hipomagnezije, alopecije, proljeva i konstipacije. Neurološke komplikacije, poput tremora i glavobolje, prijavljeni su kao štetni učinci *CNI*, pa je bitno napomenuti kako je neurotoksičnosti više izražena kod primjene takrolimusa (23), te se može javiti sindrom posteriorne reverzibilne encefalopatije (*PRES*, eng. *Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome*). Takrolimus se također u rijetkim slučajevima povezuje s hipertofičnom kardiomiopatijom, poremećajima vida te trombotskom mikroangiopatijom, te izoliranom aplazijom crvene krvne loze. Ciklosporin pak uzrokuje hepatotoksičnost zbog čega je potrebno redovito pratiti laboratorijske parametre jetrene funkcije. Nadalje, *CNI* mogu povećati rizik od infekcija, pogotovo oportunističkih infekcija, a povezani su i s povećanim rizikom od malignih bolesti (54, 55). Redovito praćenje i upravljanje ovim nuspojavama ključni su kako bi se optimizirala ravnoteža između imunosupresije i minimiziranja nuspojava kod primatelja.

Nuspojave imunosupresiva temelje se na njihovoj farmakokinetici i farmakodinamici. Bitno je uspostaviti dobar balans između učinkovite imunosupresije i minimalnih nuspojava. U slučaju nuspojave bitno je utvrditi njezinu težinu i na temelju toga odlučiti treba li modificirati dozu imunosupresiva, promijeniti formulaciju lijeka ili ukinuti i potpuno zamijeniti nekim drugim lijekom.

### 1.3. Farmakogenetika

Poznavanje mehanizama djelovanja imunosupresiva, njihovih metaboličkih puteva, međusobne interakcije, kao i interakcije drugih s drugim lijekovima postavlja osnovu za individualizaciju terapije. Osobine samog pacijenta, koje su lako dostupne spoznaji poput dobi, spola, zdravstvenog stanja, imunološkog statusa, okolišnih čimbenika i profesionalne izloženosti također utječu na individualizaciju terapije. Njih je bitno poznavati kako bi se ostvarili optimalni rezultati. Nakon što se u obzir uzmu svi navedeni čimbenici prilikom kreiranja individualne terapije, uloga genetičkog ustrojstva svakog pojedinca i dalje ostaje važan faktor koji je teže dostupan spoznaji. Njemu pripada oko 15-30% interindividualne razlike u farmakoterapijskom odgovoru (56). Farmakogenetika i farmakogenomika su discipline koje se bave proučavanjem i otkrivanjem genetičkih raznolikosti koje utječu na metabolizam lijekova, nuspojave i učinkovitost lijeka. Genetske varijacije u enzimima koji metaboliziraju lijekove, prijenosnicima lijekova i ciljevima lijekova mogu rezultirati varijabilnošću u odgovoru na lijek među pojedincima. Budući da imunosupresivni lijekovi imaju uzak terapijski raspon, kod njih je posebno izražena interindividualna i intraindividualna varijabilnost bolesnika u odgovoru na standardne doze.

Na primjer, polimorfizmi enzima citokroma P450 (CYP) mogu promijeniti metabolizam lijeka utječući na razine lijeka i odgovor (57). Osim toga, varijacije u prijenosnicima lijekova, kao što je P-glikoprotein, mogu utjecati na apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lijeka (58). Integracija farmakogenetičkih informacija u kliničku praksu može pomoći pri odabiru lijekova, individualizirati doziranje i poboljšati ishode za pacijente optimiziranjem terapijske učinkovitosti i minimiziranjem nuspojava.

Farmakogenetika igra značajnu ulogu u transplantaciji bubrega pružajući uvid u interindividualne varijabilnosti u odgovoru na lijekove i metabolizmu. Genetske varijacije u ključnim enzimima koji metaboliziraju lijekove, kao što su enzimi citokroma P450 (CYP), mogu utjecati na farmakokinetiku i učinkovitost imunosupresivnih lijekova. Na primjer, genetski polimorfizmi u enzimima CYP3A povezani su s promijenjenim metabolizmom inhibitora kalcineurina, što dovodi do varijacija u izloženosti lijeku i kliničkih ishoda (59). Nadalje, genetske varijante u prijenosnicima lijekova, kao što je P-glikoprotein, mogu utjecati na bioraspoloživost i tkivnu distribuciju imunosupresivnih lijekova (60). Također, polimorfizmi enzima IMPDH mogu utjecati na odgovor pojedinca na terapiju mikofenolnom kiselinom zbog čega bi bilo potrebno prilagoditi terapiju ovisno o varijaciji (61). Integracija farmakogenetskog testiranja u kliničku praksu omogućuje personaliziranu medicinu, čime se stvaraju uvjeti za individualizirano doziranje i optimiziranje terapijskih razina lijekova kako bi se poboljšali ishodi i smanjili štetni učinci.

Otkrivanje genskih polimorfizama izrazito je bitno za farmakogenetiku, a najviše se koristi detekcija polimorfizama jednoga nukleotida (*SNP*, engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*). *SNP* označava zamjenu jednog nukleotida na specifičnoj poziciji u genomu. *SNP* se prema poziciji unutar DNK može nalaziti u kodirajućoj i nekodirajućoj regiji i na taj način posjedovati različiti utjecaj. *SNP* koji se nalaze u kodirajućoj regiji mogu se podijeliti u dvije skupine: sinonimni i nesinonimni. Sinonimni *SNP*-ovi ne uzrokuju promjenu aminokiseline u proteinu, ali i dalje mogu utjecati na funkciju te se nazivaju „tihi“. Nesinonimni mogu biti *missense* ili *nonsense*, uzrokujući promjenu na proteinu koja dovodi do razvoja bolesti, kao što je cistična fibroza. *SNP*-ovi povezani s aktivnostima enzima koji metaboliziraju lijekove mogu promijeniti farmakokinetiku lijeka, dok *SNP*-ovi, povezani s ciljnim mjestom djelovanja lijeka, mogu promijeniti njegov farmakodinamiku.

Nomenklatura *SNP*-ova, tj. način označavanja gena, je esencijalno sredstvo komunikacije u farmakogenetici. Problem je što ne postoji jasni konsenzus kako je najbolje označavati *SNP*. Postoje dva načina koji su najrašireniji, a vezani su uz različite institucije. *The Human Genome Variation Society (HGVS)* koristi kombinaciju slova, brojki i znakova kojim se pokazuje pozicija *SNP*-a u odnosu na početak gena ili kodirajuće regije, npr: *ABCB1 - c.1236C>T*, „c“ označava kodirajuću sekvencu DNA, brojku koja označava poziciju nukleotida, veliko slovo skraćenice nukleotida, znak „veće od“ koji označava supstituciju i veliko slovo nukleotida kojim je prethodni zamijenjen (62). *The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)* koristi referentnu sekvenciju, koja se sastoji od prefiksa „rs“ i jedinstvenog broja koji je dodijeljen tom *SNP*-u (63), kao što je npr: *rs11706052* za *SNP IMPDH2* u intronu 7. U ovome doktoratu će se koristiti oba načina.

### 1.3.1. Inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza

Inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza (*IMPDH*) ključni je enzim uključen u metabolizam nukleotida, ima vitalnu ulogu u staničnim procesima kao što su sinteza DNK i RNK (ribonukleinska kiselina), imunološki odgovor i stanična proliferacija. *IMPDH* katalizira korak koji ograničava brzinu u de novo sintezi gvanozin nukleotida, pretvarajući inozin-5'-monofosfat (*IMP*) u ksantozin-5'-monofosfat (*XMP*) (64). Postoje dva izoenzima, *IMPDH1* i *IMPDH2*, različito distribuirana i inducibilna u tijelu. *MPA* ima pet puta veći učinak na *IMPDH2* nego na *IMPDH1*. *IMPDH2* se pretežno nalazi u slezeni, retini i limfocitima, te se njegova ekspresija pojačava u proliferirajućim stanicama (65) dok je *IMPDH1* prisutan u svim stanicama (25). Pacijenti s većom aktivnošću *IMPDH* u mononuklearnim stanicama periferne krvi (*PBMC*, engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*), prije i za vrijeme imunosupresivne terapije, mogu biti izloženi većem riziku od odbacivanja transplantata (66, 67, 68). Provedena istraživanja o polimorfizmima gena, koji kodiraju *IMPDH*, ustanovila su veliku raznolikost te izdvojila neke *SNP*-ove

koji uzrokuju smanjeni odgovor na *MPA* (69-71). Međutim, mnogi od tih polimorfizama se rijetko pojavljuju u populaciji, dok drugi imaju slabi ili nikakav klinički značaj (72, 73). Oba gena, *IMPDH1* i *IMPDH2*, su visoko polimorfna, s nekim izoenzimima koji pokazuju promijenjenu aktivnost (69). Od nekoliko procijenjenih *IMPDH1* SNP-ova, samo su dva povezana s rizikom od nepovoljnih bubrežnih ishoda: varijantni alel na *rs2278293* bio je povezan s smanjenim rizikom od akutnog odbacivanja u jednoj, ali ne i u 7 drugih studija; i varijantni alel na *rs2278294* bio je povezan s smanjenim rizikom od akutnog odbacivanja u 2, ali ne i u 6 drugih studija (39, 41, 67, 74). Što se tiče *IMPDH2*, Pouche et al. u svom preglednom članku izdvajaju SNP *IMPDH2* u intronu 7 (*rs11706052, 3757T>C*) kao dobrog kandidata za istraživanja o utjecaju polimorfizma IMPDH na kliničke ishode kod bolesnika s transplantiranim organima (75). Pacijenti s ovim varijantnim alelom pokazuju veću enzimsku aktivnost u *PBMC*-ima, a in vitro antiproliferativni učinak *MPA* je smanjen (76, 77). Grinyo i suradnici utvrdili su veću šansu za akutno odbacivanje do 12 mjeseci kod 28 bolesnika s varijantnim *IMPDH2* (SNP *n.3757T>C*) nego kod 193 s divljim tipom (78). Međutim, u najvećoj studiji na tu temu, nisu pronađene razlike u akutnom odbacivanju do 12 mjeseci te preživljavanju transplantata tijekom 5 godina između 184 pacijenata, nositelja varijantnog alela i 689 pacijenata, nositelja divljeg tipa (61). Unatoč činjenici kako je provedeno više studija o utjecaju navedenog SNP na kliničke ishode (61, 68, 78, 79), konačni zaključak još nije donesen, pa to pitanje ostaje otvoreno.

### 1.3.2. P-glikoprotein

P-glikoprotein (engl. *permeability-glycoprotein*, P-gp) je jedan od transportera iz superporodice transmembranskih prijenosnika *ABC* (od eng. *ATP-binding cassette*), preciznije, član 1 potporodice B (*ABCB1*), također zvan i *MDR1* (od eng. *multidrug resistance protein 1*). On je efluksni transporter koji koristi energiju iz ATP-a za izbacivanje materijala iz stanice u ekstracelularnu tekućinu, često suprotno koncentracijskom gradijentu, utječući tako na bioraspoloživost lijekova koji su njegovi supstrati. Može se pronaći u stanicama crijeva, bubrega, jetre, gušterače, posteljice, testisa, barijere između krvi i mozga, limfocitima i makrofagima. On ima fiziološku ulogu u održavanju krvno-tkivnih barijera, u apsorpciji iz crijeva te u ekskrecijskim organima (jetra i bubreg). P-gp je prvi put identificiran u tumorskim stanicama, jer je izbacivao antitumorske lijekove, uzrokujući tako otpornost i smanjujući njihovu učinkovitost. Zbog toga je dobio naziv protein višestruke rezistencije na lijekove (80). Mnogi spojevi su njegovi supstrati, najviše antitumorski lijekovi kao što su etopozid, tenipozid, doksorubicin, vinblastin, vinkristin, daunorubicin, irinotekan, paklitaksel i docetaksel (81), ali i *CNI* (82). Trenutno baza podataka *PharmGKB* sadrži 1409 unosa o studijama koje istražuju biološke (kliničke ili druge) fenomene povezane s 59 različitih SNP-ova gena *ABCB1* (dostupno na *ABCB1* ([pharmgkb.org](http://pharmgkb.org)),

pristupljeno 14. rujna 2023.). Velika većina unosa (1213, 86,1%) odnosi se na tri kodirajuća *SNP*-a – *ABCB1* c.1236C>T (*rs1128503*), c.2677G>T/A (*rs2032582*) i c.3435C>T (*rs1045642*). To je razumljivo, budući da su ova tri *SNP*-a, koji su u snažnoj neravnotežnoj vezi (*LD*, engl. *linkage disequilibrium*) daleko najzastupljeniji *SNP*-ovi u svim etničkim skupinama (83). Razina ekspresije *ABCB1* u različitim tkivima varira unutar i među subjektima. Do sada nije bilo jasnih/repliciranih dokaza da tri uobičajena ili druga *ABCB1* *SNP*-a dovode do velikih promjena u tkivnim razinama mRNK i razini proteina (P-gp) (83, 84, 85). Međutim, i sinonimni (1236C>T i 3435C>T) i nesinonimni (2677G>T/A) polimorfizmi rezultiraju promijenjenim interakcijama P-gp-a sa supstratima i inhibitorima, te promijenjenim aktivnostima – ovisno o spoju u interakciji, aktivnosti bi mogle biti povećane ili smanjene (86, 87). Rezultati istraživanja o utjecaju polimorfizma 3435C>T jako variraju - neki autori sugeriraju da ovaj *SNP* utječe na stabilnost mRNK molekule što rezultira smanjenom razinom mRNK i posljedično manjom količinom proteina. S druge strane, neki navode veće količine proteina i pojačanu aktivnost P-gp-a (81). Rezultati studija su diskrepantni i nekonzistentni te još nije jasno utvrđena asocijacija između različitih genskih varijanti *ABCB1* i kliničkih ishoda (88, 89, 90, 91). U kontekstu transplantacije bubrega, transporter *ABCB1* (P-gp) je od interesa budući da su *MPA* i drugi često korišteni imunosupresivi – *CNI* (CsA, takrolimus) ili mTOR inhibitori (sirolimus, everolimus) – supstrati *ABCB1* (86) (također P-glikoprotein supstrati | DrugBank Online, pristupljeno 14. rujna 2023.). Štoviše, CsA i takrolimus navedeni su i kao inhibitori i kao induktori *ABCB1*, dok su sirolimus i everolimus inhibitori *ABCB1* (86) (inhibitori P-glikoproteina | DrugBank Online, induktori P-glikoproteina | DrugBank Online). Nedavni pregledni rad koji je uključio 14 sistematskih preglednih članaka na temu utjecaja genetskih polimorfizama na koncentracije *CNI* u krvi bolesnika s transplantiranim bubregom, zaključio je kako pacijenti s polimorfizmom *ABCB1* 3435C>T zahtijevaju veću dozu ciklosporina (92). *ABCB1* se također izražava u mononuklearima periferne krvi (*PMBC*) pa može utjecati na unutarstanične koncentracije imunosupresiva i posljedično na njihovu učinkovitost (93). S obzirom na poznatu inter-subjektivnu varijabilnost farmakokinetike i učinkovitosti/sigurnosti *MPA* koja se ne može u potpunosti objasniti "klasičnim" čimbenicima, poput spola, dobi, funkcije bubrega/jetre, komorbiditeta i interakcija između lijekova (67), *ABCB1* *SNP*-ovi također su istaknuti kao potencijalni izvori (39, 67, 74).

#### 1.4. Svrha istraživanja

Znanje o utjecaju genskih polimorfizama na farmakokinetiku i farmakodinamiku imunosupresiva te na učestalost nuspojava i ishode liječenja raste svakim danom, ali i dalje postoje nerazjašnjena pitanja. Ovim istraživanjem planira se istražiti utjecaj specifičnih *SNP*-ova *IMPDH2* i *P*-glikoproteina/*ABCB1* na ishode liječenja i učestalost nuspojava kod bolesnika s transplantiranim bubregom, čime se proširuju dosadašnje spoznaje. Do sada još nije provedeno istraživanje utjecaja navedenih polimorfizama niti je nije analizirana njihova učestalost u našoj populaciji. Rezultati ovoga istraživanja omogućili bi kreiranje novim farmakogenetičkih protokola za bolju individualizaciju imunosupresivne terapije čime bi se poboljšali dugoročni ishodi transplantacije bubrega.



## 2. HIPOTEZA

Polimorfizmi gena *IMPDH2* n.3757T>C (rs11706052), i P-glikoproteina/*ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) smanjuju učinkovitost i povećavaju učestalost nuspojava imunosupresivne terapije u bolesnika s transplantiranim bubregom.

### 3. CILJEVI RADA

#### 3.1. Opći cilj

Ispitati povezanost genskih polimorfizama *IMPDH2* n.3757T>C (rs11706052) i *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) s ishodom imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega.

#### 3.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi učestalost odabranog polimorfizma gena *IMPDH2* kod primatelja bubrežnog presatka
2. Utvrditi učestalost polimorfizama gena *ABCB1* kod primatelja bubrežnog presatka
3. Utvrditi utjecaj polimorfizma gena *IMPDH2* i *ABCB1* na bubrežnu funkciju presatka u 1. godini od transplantacije
4. Istražiti povezanost polimorfizama gena *IMPDH2* i *ABCB1* s akutnim odbacivanjem presatka u 1. godini od transplantacije
5. Istražiti utjecaj polimorfizama gena *IMPDH2* i *ABCB1* na preživljenje presatka i preživljenje pacijenta u 1. godini od transplantacije
6. Odrediti povezanost polimorfizama gena *IMPDH2* i *ABCB1* s učestalošću nuspojava, tumora i infekcija u 1. godini od transplantacije

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ispitanici

Provedena je retrospektivna kohortna opservacijska studija u koju je uključeno 254 odrasla ispitanika oba spola. Kriteriji za uključenje su bili: transplantacija bubrega učinjena u Klinici za urologiju KBC Zagreb od siječnja 2011. godine, mogućnost davanja informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju te dostupnost DNK primatelja za analizu. Kriteriji za ne uključenje su bili: rani gubitak presatka uzrokovan ranim postoperativnim kirurškim i vaskularnim komplikacijama kao što je akutno krvarenje i tromboza arterije i vene.

Za svakog ispitanika prikupljeni su osnovni i demografski podaci: dob, spol, rasa, visina, težina, *BMI* (eng. *Body Mass Index*), kvaliteta organa (*mismatch*, trajanje hladne ishemije), komorbiditeti, konkomitantna terapija, indukcijska terapija, osnovna bubrežna bolest, vrsta i trajanje dijalize te retransplantacija. Ispitanici su u ovom istraživanju regrutirani iz dva izvora s obzirom na podrijetlo uzoraka za genotipizaciju. Šezdeset i osam ispitanika imalo je arhivirane uzorke iz studije kojom je dr. sc. Zdenka Lalić, mag. pharm. doktorirala 2015. godine pod nazivom "Utjecaj genetičkih varijacija transportnog proteina *ABCC2* na biodostupnost mikofenolne kiseline u bolesnika s presađenim bubregom", odobreno od Etičkog povjerenstva KBC Zagreb (94). U tu studiju bilo je uključeno 68 pacijenata te je učinjena genotipizacija *ABCC2* transportnog proteina MRP2 za primatelja. Za ostatak ispitanika, njih 182, nakon provjere uključujućih i ne uključujućih kriterija te dobivanja informiranog pristanka, uzeta je krv tijekom rutinskog nefrološkog pregleda u sklopu post transplantacijskog praćenja. Posljednji uključeni pacijent transplantiran je u prosincu 2018. godine.

### 4.2. Imunosupresivna terapija

Svi ispitanici dobivali su imunosupresivnu terapiju prema standardnom protokolu što uključuje oralnu formulacije mikofenolne kiseline (2x720 mg/dan EC-MPS ili 2x500-1000 mg/dan MMF na temelju tjelesne težine), inhibitore kalcineurina (ciklosporin ili takrolimus) i kortikosteroide (pacijenti su počeli s ekvivalentima prednizona od 60 mg). Indukcijska terapija primijenjena na temelju standardnih kriterija, pretežno antagonistima interleukina-2, povremeno timoglobulinom ili rituksimabom. Uključeno je i nekoliko pacijenata koji su počeli uzimati sirolimus ili everolimus jer je prvotno liječenje ubrzo prebačeno na *MPA*. Terapija se tijekom vremena praćenja mijenjala ovisno o indikaciji. Očekivali smo, kod malog broja pacijenata, mogući prekid ili zamjenu *MPA* tijekom terapije održavanja. Stoga smo uključili sve pacijente koji su primali *MPA* najmanje mjesec dana tijekom prva dva mjeseca, uključujući najmanje dva tjedna prvog mjeseca nakon transplantacije, pretpostavljajući da bi ta

činjenica mogla utjecati na klinički ishod transplantacije. Upotreba *MPA* modelirana je kao vremenski promjenjiva kovarijabla (slika 7).

#### 4.3. Prikupljanje podataka i tijek istraživanja

Klinički podaci prikupljali su se iz dostupne medicinske dokumentaciju koja je pohranjena i dostupna putem BIS-a (Bolnički informatički sustav) KBC-a Zagreb u periodu 12 mjeseci nakon transplantacije.

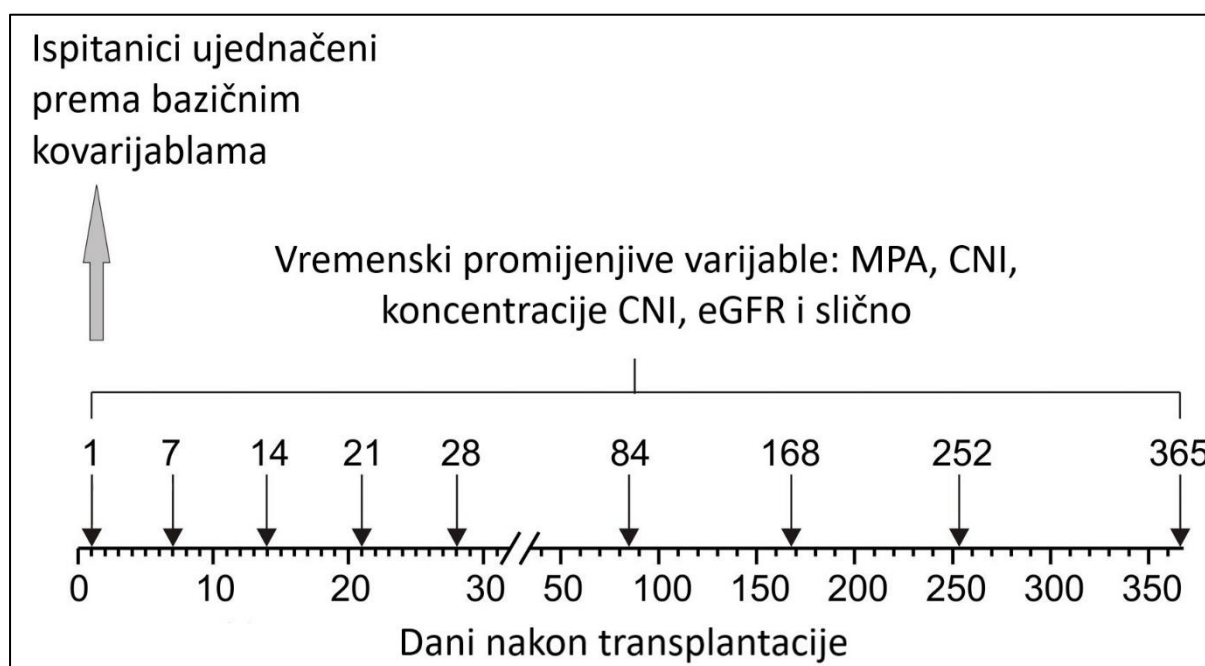
Prikupljeni su relevantni kliničke podaci:

1. funkcija presatka prema procijeni *GFR* uz pomoć formule *CDK-EPI*
2. biopsijom dokazano akutno odbacivanje presatka prema histološkoj klasifikaciji iz Banffa
3. vrsta odbacivanja prema histološkoj klasifikaciji iz Banffa
4. preživljenje presatka
5. preživljenje pacijenta
6. učestalost i vrsta infekcija
7. učestalost i težina nuspojava – gastrointestinalne, mijelosupresivne, poremećaji središnjeg živčanog sustava (težina nuspojava gradirana je prema kriterijima *CTCAE* (eng. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*) Nacionalnog instituta zdravlja SAD-a) (95)
8. pojavnost i vrsta tumora
9. doze imunosupresiva
10. promjena terapije

Prikupljeni su najvažniji laboratorijski parametri:

1. Kompletna krvna slika (KKS)
2. Kreatinin i ureja
3. Koncentracije kalcineurinskih inhibitora (ciklosporin u punoj krvi i takrolimus određeni su validiranim imunotestom posredovanim afinitetnom kolonom (Siemens, Njemačka) (točnost dosljedno >97%, nepreciznost unutar testa ≤2%, i nepreciznost među testovima <3,0%) uključeno u vanjsko testiranje sposobnosti sheme ((RfB i UK NEQUAS))
4. Pozitivni mikrobiološki izolati

Svi navedeni podaci prikupljeni su u vremenskim intervalima: 1. postoperativni dan, 7. postoperativni dan, 14. postoperativni dan, 21. postoperativni dan, 28. postoperativni dan (1. mjesec nakon operacije), 84. postoperativni dan (3. mjesec nakon operacije), 168. postoperativni dan (6. mjesec nakon operacije), 252. postoperativni dan (9. mjesec nakon operacije) i 365. postoperativni dan (12. mjesec nakon operacije) u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju bubrega KBC Zagreb (Slika 7).



Slika 7. Tijek istraživanja

Iz uzoraka periferne krvi učinjena je genotipizaciju *IMPDH2* (rs11706052) i *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642) za primatelja. Za genotipizaciju kod ispitanika koji su sudjelovali u studiji dr. sc. Zdenka Lalić, mag. pharm., koristili smo ostatne arhivirane uzorke iz arhive Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, uz suglasnost pacijenata. Za dodatnu skupinu od 182 pacijenta, nakon dobivanja informiranog pristanka za genske analize, genotipizacija je učinjena iz uzorka 3mL pune krvi uzete u epruvetu s antikoagulantnom EDTA tijekom redovite kontrole. Krv je pohranjena na -20°C, a genotipizacija je učinjena nakon prikupljanja dovoljnog broja uzoraka.

Osim *IMPDH2* 3757T>C (rs11706052) i *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642) provedena je i analiza polimorfizama za enzime *UGT1A9* -275T>A (rs6714486) i -2152C>T (rs17868320) i

transportere *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056); i *ABCG2* c.421C>A (rs2231142), za koje je sugerirana (iako ne jednoznačno) povezanost s izloženošću *MPA*.

#### 4.4. Metode genotipizacije

Postupci izdvajanja DNK i genotipizacija polimorfizama od interesa provodili su se u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

##### 4.4.1. Izdvajanje DNK

Za izdvajanje DNK korišteno je 3-5 ml pune krvi s antikoagulantom Na-EDTA, upotrebom komercijalnoga reagensa *iPrep<sup>®</sup>PureLink<sup>®</sup>gDNA Blood Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) na automatiziranom sustavu *AutoMate Express<sup>™</sup> DNA Extraction System* (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

##### 4.4.2. Genotipizacija *IMPDH2*, *ABCB1*, *UGT1A9*, *ABCG2*, *SLCO1B1*

Genotipizacija polimorfizama *IMPDH2* 3757T>C (rs11706052), *ABCB1* 1236 C>T (rs1128503), 3435 C>T (rs1045642), *UGT1A9* -275 T>A (rs6714486), -2152C>T (rs17868320), *ABCG2* 421 C>A (rs2231142), *SLCO1B1* 521T>C (rs4149065) provedena je metodom PCR-a (eng. *polymerase chain reaction*) u stvarnom vremenu (qPCR) na aparatu *TaqMan, 7500 RealTime PCR System* (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, SAD) za otkrivanje i analizu SNP-a koristeći reagens prema šiframa (*TaqMan<sup>®</sup>SNPAssay ID*) navedenim u tablici 4.

Reagensi:

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

Tablica 4. Polimorfizmi analizirani *Taqman*<sup>®</sup> metodom *PCR* u stvarnom vremenu

Gen/alel	db SNP* (rs#)	c. DNK	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> SNP Assay ID
<i>IMPDH2</i>	<i>rs11706052</i>	<i>3757T&gt;C</i>	C_1842928_10
<i>ABCB1/MDR1</i>	<i>rs1045642</i>	<i>3435 C&gt;T</i>	C_7586657_20
<i>ABCB1/MDR1</i>	<i>rs1128503</i>	<i>1236 C&gt;T</i>	C_7586662_10
<i>UGT1A9</i>	<i>rs17868320</i>	<i>-2152C&gt;T</i>	C_34418857_10
<i>UGT1A9</i>	<i>rs6714486</i>	<i>-275 T&gt;A</i>	C_27843087_10
<i>ABCG2</i>	<i>rs2231142</i>	<i>421C&gt;A</i>	C_15854163_70
<i>SLCO1B1</i>	<i>rs4149065</i>	<i>521 T&gt;C</i>	C_30633906_10

#### Postupak

Priprema reakcijske smjese (tablica 5) i uvjeti *PCR* reakcije (tablica 6) na uređaju *ABI 7500 Real-time PCR System* isti su za genotipizaciju svih polimorfizama, a provedeni su prema uputama proizvođača.

Tablica 5. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju *TaqMan*<sup>®</sup> metodom *PCR* u stvarnom vremenu

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	12,5	1x
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> DME Assay Mix *	1,25	1x
DNK razrjeđenje	11,25	1-20 ng
Ukupni 30 volumen reakcijske smjese	25	

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System

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

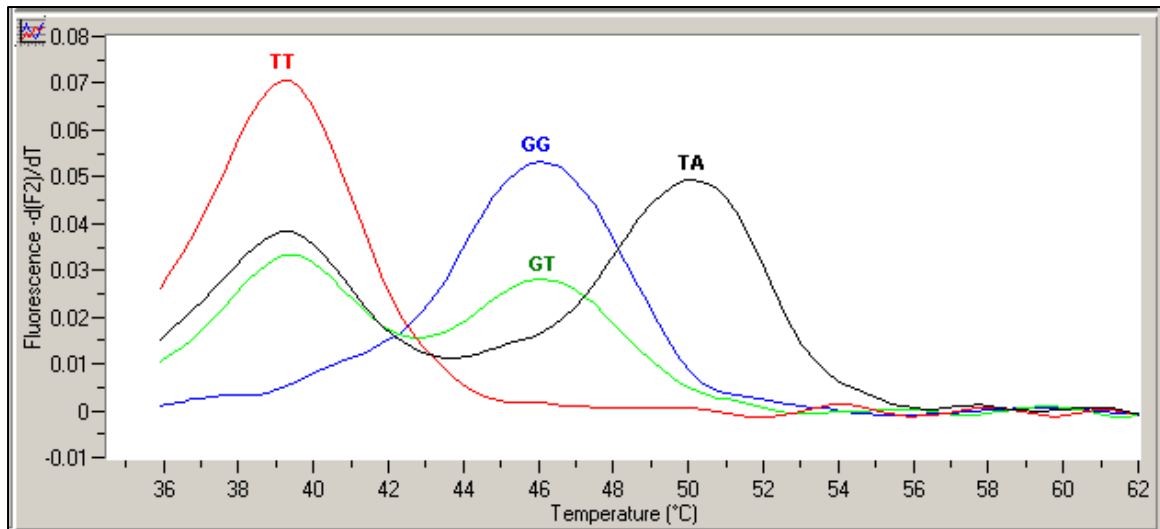


Slika 8. Analiza alelne diskriminacije *TaqMan*<sup>®</sup> metodom PCR u stvarnom vremenu (crvene točke – wt homozigoti; zelene točke – heterozigoti; plave točke – *mut* homozigoti)



#### 4.4.3. Genotipizacija *ABCB1* 2677G>T/A

Genotipizacija trialelnog lokusa *ABCB1* 2677G>T/A (rs2032582) provedena je *LightCycler*<sup>®</sup> metodom za PCR u stvarnom vremenu na uređaju *LightCycler*<sup>®</sup> v 2.0 (*Roche Diagnostics*, Njemačka) (slika 9) prema uputama proizvođača.



Slika 9. Analiza trialelnog lokusa *ABCB1* 2677G>T/A, temperature taljenja prema genotipu: TT 39 °C, GT 39 °C i 46 °C, GG 46 °C, TA 39 °C i 51 °C

#### 4.5. Ishodi

U ovom istraživanju glavni fokus je stavljen na analizu utjecaja ispitivanih polimorfizama *SNP* na promjenu vrijednosti *eGFR*, koja se ističe kao adekvatan indikator funkcije (96) i odličan prediktor dugoročnog preživljenja grafta (97). Ostali događaji, kao što su smrtni ishodi, odbacivanja, gubitak grafta te nuspojave unutar prve godine od transplantacije, bili su izrazito rijetki u ispitivanom razdoblju, zbog čega su analizirani kumulativno.

Očekivani kombinirani primarni ishod:

1. Razlika promjene *eGFR* (nagib krivulje) između nositelja varijantnih alela i kontrola (ispitanici divljeg tipa):
  - a. od 1. do 28. dana (očekivani vrh *eGFR*)
  - b. od 28. do 365. dana.

Sekundarni ishodi:

Razlika u stopama (uključujući ponovljene događaje):

- a. nepovoljnih bubrežnih ishoda definiranih kao kumulativni broj smrti, gubitka grafta i bubrežnih biopsija (bez obzira na nalaz PHD-a)
- b. neželjenih događaja (stupnjevanih prema kriterijima *CTCAE*), definirani kao kumulativni broj novonastalih karcinoma, bilo koja citopenija stupnja  $\geq 3$ , infekcija urinarnog ili respiratornog trakta, infekcija citomegalovirusom (CMV) ili herpes virusom, gastrointestinalnih nuspojava i nuspojava središnjeg živčanog sustava stupnja  $\geq 2$ .

#### 4.6. Veličina uzorka

Broj pacijenata koje treba uključiti u istraživanje određen je uzimajući u obzir primarni ishod. Pretpostavili smo: oko 8% manju učestalost alela, tj. oko 15% nositelja varijanti (40); log-transformirani *eGFR*; međupredmetni koeficijent varijacije 0,4 (što ukazuje na značajnu varijabilnost) i relativnu razliku u nagibima *eGFR* od  $\geq 20\%$  (omjeri geometrijskih sredina od 0,80 ili niže, ili 1,25 i više). Za snagu od 80% za otkrivanje takve razlike na dvostranoj alfa 0,05, bilo bi potrebno oko 190 subjekata (~30 nositelja varijanti). S obzirom na planirane metode kontrole confoundera, ovaj broj se odnosi na efektivnu veličinu uzorka, stoga se ciljalo na oko 25% veći stvarni broj pacijenata (230-250).

#### 4.7. Analiza podataka

Cilj je bio procijeniti učinak nošenja alela varijante *IMPDH2 3757T>C (rs11706052)* i tri *ABCB1 SNP*a (*rs1128503*, *rs2032582* i *rs1045642*) na funkciju presatka u ciljanoj populaciji. Koristila se teorija kauzalnosti temeljena na strukturalnim kauzalnim modelima (engl. *structural causal models, SCM*) i usmjerenih acikličkih grafova (engl. *directed acyclic graphs, DAG*) (98).

Kako bi se otkrio i kvantificirao kauzalni učinak između genotipa (varijantni alel naspram divljeg tipa) kao instrumenta i tretmana (promjena strukture ciljanog enzima *IMPDH2* ili *ABCB1* transportera) uspjeh imunosupresivne terapije *MPA* kao ishoda, nužno je procijeniti direktan učinak instrumenta na ishod. Takva procjena je valjana samo ako se isključe ili kontroliraju potencijalne ometajući čimbenici koji stvaraju „prividne“, tj. nekauzalne odnose između genotipa i ishoda. Ti se čimbenici engleskom jeziku zovu „*confounders*“ (engl. *confounding factors*), a njihov učinak se označava s „*confounding*“. U hrvatskom jeziku za „*confounders*“ se katkad rabi naziv „remetilački čimbenici“. Međutim, taj naziv vjerojatno nije svima poznat niti svi razumiju u potpunosti njegovo značenje. Stoga će se u ovom doktorskom radu rabiti „pohrvaćeni anglizam“ - *confounder* i *confounding*. Kontroliranje *confoundera* podrazumijeva njihovo isključivanje, odnosno neutraliziranje njihovog utjecaja. Cilj je izbjeći zamku gdje se pogrešno tumači povezanost između tretmana (ili instrumenta) i ishoda kao uzročno-posljedični odnos. U randomiziranom istraživanju, sama randomizacija automatski kontrolira sve *confoundere*, osiguravajući zamjenjivost ispitanika. U nerandomiziranom istraživanju, važno je: prepoznati i kvantificirati sve moguće *confoundere* na temelju razumijevanja tematike i upravljati njima putem alternativnih metoda (99). Cilj je postići zamjenjivost među ispitanicima (slično kao u randomiziranom istraživanju) usklađujući ispitanike izložene tretmanu s kontrolama temeljem *confoundera*. No u teoriji usklađivanje se može vršiti samo prema poznatim karakteristikama – oni *confounderi*, koje nismo kvantificirali ili čak nismo svjesni njihove prisutnosti, ne mogu se uravnotežiti. Zato se teži uravnoteženju po poznatim i mjerljivim faktorima, što se naziva uvjetovana izmjenjivost, a unaprijed pretpostavlja da uvijek postoji određena razina ostatnog (nemjerenog) *confoundinga*.

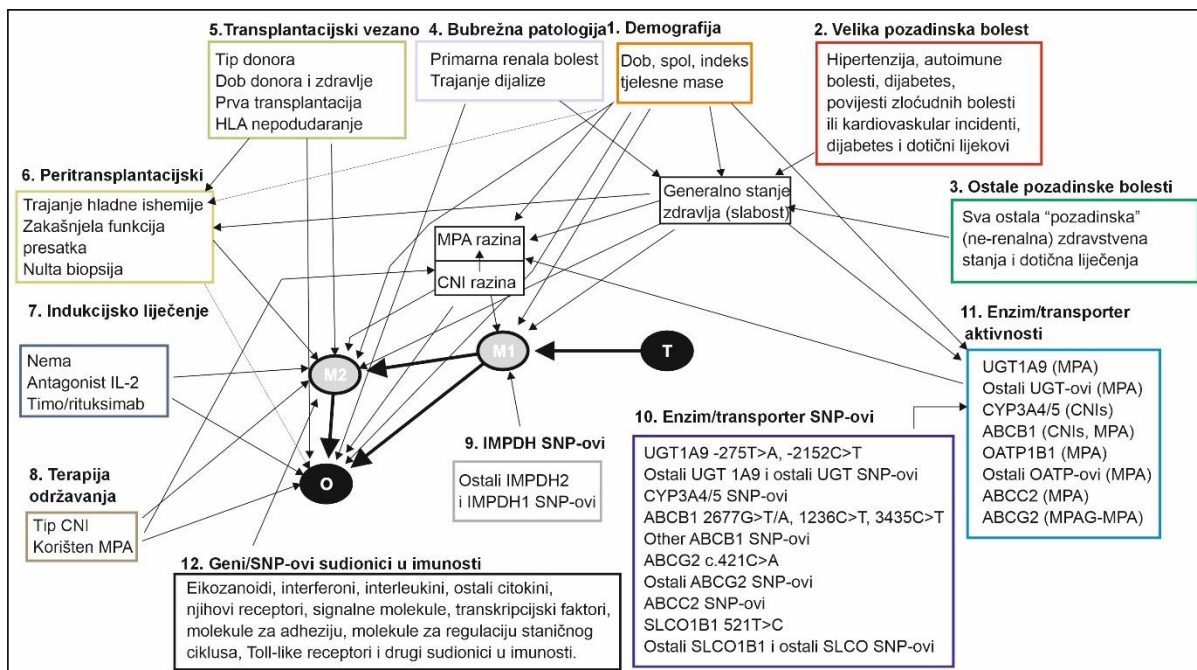
S obzirom na složenost okruženja, postoji cijeli niz čimbenika koji bi mogao zbuniti procijenjeni uzročni put (varijanta alela → funkcija presatka) zbog njihovih poznatih ili potencijalnih učinaka na funkciju presatka (tablica 7). S obzirom na specifičnosti ove studije, nekoliko njih nije bilo relevantno. Prvo, svi su pacijenti bili srednjoistočnoeuropskog (slavenskog) podrijetla, stoga rasa/etnička pripadnost primatelja nije bila faktor koji treba uzeti u obzir. Zatim, bilo je samo 6 (od 254) živih donacija – premalo da bi imalo utjecaj na ishod. Dakle, nije bilo potrebe voditi računa o vrsti donacije. Što se tiče protokola terapije održavanja imunosupresije i pridržavanja: prema definiciji ciljne populacije, *MPA* je morala biti uključena, ali je mogla varirati tijekom vremena (prekid, povlačenje, zamjena mTOR

inhibitorima), a isti je slučaj i s *CNI* (takrolimus ili ciklosporin), koji je također mogao varirati tijekom vremena (prebačen, prekinut, zamijenjen). Stoga nije bilo potrebno posebno navoditi "upotrebu mTOR inhibitora" - tamo gdje se nije koristio niti *CNI*, korišteni su mTOR inhibitori; tamo gdje *MPA* nije bila u uporabi, korišteni su mTOR inhibitori. Velik dio varijabilnosti u djelotvornosti i sigurnosti/podnošljivosti *MPA* pripisuje se varijabilnoj farmakokinetici. Posljedično, preporučuje se da se *MPA* podvrgne terapijskom praćenju lijeka i da se u tu svrhu koristi područje ispod krivulje (*AUC*, engl. *Area under the curve*) tijekom intervala doziranja (moguće na temelju smanjenog uzorkovanja). Međutim, redovito i opetovano određivanje *AUC MPA* tijekom vremena još uvijek nije raširena praksa. Stoga je izloženost *MPA* tijekom promatranog razdoblja ostala neizmjerena. Naposljetku, post-transplantacijski događaji (npr. infekcije) mogu utjecati na funkciju/ishod presatka (97). Međutim, također je moguće pretpostaviti da bi na njihovu pojavu mogao utjecati procijenjeni "tretman". Stoga bi takvi događaji zapravo mogli biti "posrednici" učinka liječenja, a prilagodba za takve varijable ne uklanja, već uvodi pristranost (99). Stoga su mogući takvi događaji razmatrani kao zaseban ishod – štetni događaji (epizode leukopenije, infekcije, novonastali karcinom, itd.).

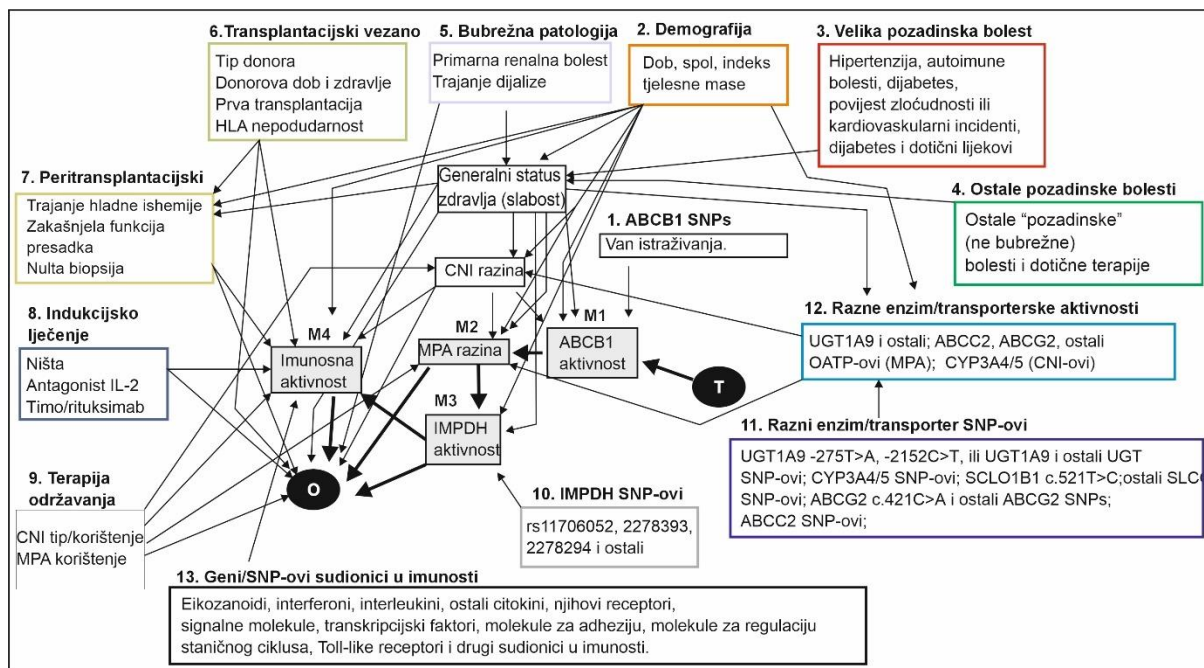
Tablica 7. Čimbenici koji se smatraju potencijalnim izvorima zbunjujuće pristranosti (engl. *confounding bias*) u procjeni uzročnog učinka istraživanih polimorfizama na funkciju presatka tijekom prvih 12 mjeseci nakon transplantacije bubrega

Potencijalni izvori zbunjujuće pristranosti ( <i>confounder</i> i)	Referenca
Karakteristike darivatelja i primatelja, čimbenici povezani s transplantacijom i peritransplantacijom: dob darivatelja, zdravstveni status, vrsta donora - živi (srodni/nesrodni) ili kadaver; demografski podaci primatelja, povijest dijalize, osnovna bubrežna bolest, rasa/etnička pripadnost, sveukupno ili "opće zdravstveno stanje"; prva ili ponovljena transplantacija, <i>HLA</i> nepodudarnost; trajanje hladne ishemije, odgođeni početak funkcije presatka, nalaz nulte biopsije	(100)
Čimbenici povezani s imunosupresijom: indukcija (da/ne) i korišteni tretmani; protokol održavanja i pridržavanje liječenja (npr. vrsta CNI, uporaba inhibitora mTOR-a; prekid/zamjena terapije tijekom vremena)	(100)
Posttransplantacijski događaji: infekcije, kardio-/cerebrovaskularni incidenti, traume, novonastali zloćudni tumori i slično.	(97)
„Klasični” čimbenici s poznatim/potencijalnim učincima na izloženost <i>MPA</i> (bez obzira na formulaciju): dob primatelja, spol, BMI, hrana, crijevna mikrobiota, hipalbuminemija, mogući komorbiditeti koji se odražavaju na funkciju bubrega i jetre; interakcije između lijekova (CNI – uglavnom ciklosporin (učinak na <i>ABCC2</i> ); inhibitori/induktori <i>UGT</i> enzima; moguće također <i>ABCB1</i> inhibitori/supstrati i lijekovi koji utječu na gastrointestinalni pH ili lijekovi koji sadrže metalne ione.	(38, 41, 67)
"Klasični" čimbenici s poznatim/potencijalnim učincima na izloženost CNI-ima: demografija, BMI, mogući komorbiditeti, interakcije između lijekova (osobito inhibitori/induktori <i>CYP3A4/5</i> , inhibitori <i>ABCB1</i> )	(101)
Polimorfizmi povezani s izlaganjem <i>MPA</i> . S obzirom na složenu PK ili <i>MPA</i> , procijenjen je veliki broj polimorfizama (enzima, transportera). Predloženo je da su samo neki od njih povezani s izloženošću <i>MPA</i> , ali ne jednoznačno (npr. suprotni rezultati, i "pozitivna" i "negativna" izvješća, upitna kvaliteta studije itd.). Sljedeće bi moglo biti barem donekle relevantno: (i) <i>UGT1A9</i> : -275T>A (rs6714486), -2152C>T (rs1786832), c.98T>C (*3, rs72551330); (87) <i>UGT2B7 802T&gt;C</i> (rs7439366); (iii) <i>SLCO1B1</i> : c.521T>C (*5, rs4149056); (iv) <i>SLCO1B3 c.334T&gt;G</i> (rs4149117); (v) <i>ABCB1 2677G&gt;T/A</i> (rs2032582), 3435C>T (rs1045642), 1236C>T (rs1128503); (vi) <i>ABCC2 - 24C&gt;T</i> (rs717620); (vii) <i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> (rs2231142).	(39, 41, 74, 102)
Polimorfizmi povezani s izloženošću CNI. Za takrolimus, <i>SNP</i> -ovi koji definiraju fenotip <i>CYP3A5</i> , moguće također <i>ABCB1 2677G&gt;T/A</i> (rs2032582), 3435C>T (rs1045642), 1236C>T (rs1128503). Za ciklosporin, <i>SNP</i> -ovi koji definiraju fenotip <i>CYP3A4/5</i> , moguće također <i>ABCB1 2677G&gt;T/A</i> (rs2032582), 3435C>T (rs1045642), 1236C>T (rs1128503).	(101)
Polimorfizmi u genima <i>IMPDH</i> osim <i>IMPDH2 3757T&gt;C</i> . <i>IMPDH2</i> – nijedan. <i>IMPDH1</i> – rs2278293, 2278294	Vidi u Uvodu
Polimorfizmi u genima koji kodiraju proteine uključene u imunitet/upalu. Oko 60 <i>SNP</i> -ova u genima koji kodiraju eikosoide, interferone, interleukine, druge citokine, njihove receptore, signalne molekule, molekule za regulaciju staničnog ciklusa, faktore transkripcije, adhezijske molekule <i>toll-like</i> receptore i druge inter- i intracelularne molekule, sporadično je prijavljeno povezano s nepovoljnim ishodima presađivanja kod transplantacije bubrega.	(103)

Na temelju znanja o predmetu o mogućim *confounderima*, navedenim u tablici 7, generirani su usmjereni aciklički grafovi (engl. *Directed Acyclic Graph, DAG*), po jedan za ispitivani polimorfizam, prikazani na slikama 10 i 11. Za izradu *DAG*-a korišten je programski paket *daggity* u R jeziku (104). U skladu s unesenim informacijama o problemu ovaj paket omogućuje: izradu odgovarajućeg *DAG*-a, određivanje uloge svake varijable unutar *DAG*-a, i prepoznavanje minimalnog skupa varijabli koje je potrebno kontrolirati da bi se postigla uvjetovana promjenjivost i nepristrano ocijenio kauzalni učinak tretmana (ili instrumenta) na rezultat.



Slika 10. DAG koji ilustrira okolnosti vezane za primarni ishod. Procijenjeni uzročni put proteže se između dva crna kruga (T, O) povezana debelim crnim strelicama. Krugovi/kvadratići ispunjeni sivom bojom označavaju varijable koje nisu izravno kvantificirane. Tretman (T) je nositelj alela varijante *IMPHD2* 3757T>C (TC/CC), a kontrola je genotip divljeg tipa (TT). Ishod (O, engl. *outcome*) je *eGFR* (kontinuirana, longitudinalna). Put uključuje dva posrednika: posrednik 1 (M1) je aktivnost IMPDH i posrednik 2 (M2) je posljedična aktivnost imunološkog sustava. Pretpostavlja se da potisnuta imunološka aktivnost pogoduje poboljšanju funkcije presatka. Pretpostavlja se da bi aktivnost IMPDH (budući da je prisutna u različitim vrstama stanica) mogla utjecati, barem donekle, na funkciju presatka nekim drugim mehanizmom(ima). Budući da je liječenje genotip, nema klasičnih zbunjujućih čimbenika koji uzrokuju i liječenje i ishod (99). Postoje, međutim, mnogi čimbenici koji mogu utjecati na ishod i medijatore i koji mogu biti nekauzalno povezani s liječenjem (mogućnost neravnoteže između liječenih i kontrolne skupine). DAG ne uključuje prikaz nekauzalnih asocijacija, ali one se pretpostavljaju za sve prikazane kovarijable. Kovarijable se mogu svrstati u nekoliko skupina. Iako mogu postojati brojni (i različiti) uzročni odnosi između pojedinačnih varijabli unutar i između takvih skupina, poznati su ili biološki vjerojatni uzročni učinci na "razini grupe". Svi takvi efekti prikazani su tankim crnim strelicama. Pogledati tekst za detalje.



Slika 11. DAG koji ilustrira okolnosti vezane za primarni ishod. Procijenjeni uzročni put proteže se između dva crna kruga (T, O) povezana debelim crnim strelicama. Sivo popunjeni kvadratići označavaju posredničke varijable koje nisu izravno kvantificirane. Tretman (T) ima tri razine na temelju broja varijantnih alela kroz tri procijenjena *ABCB1* SNP-a [0-1 varijantni alel (kontrola); 2-3 varijante ili 4-6 varijanti]. Ishod (O, engl. outcome) je procijenjena brzina glomerularne filtracije (kontinuirana, longitudinalna). Put uključuje 4 medijatora (M1-M4): liječenje nema drugog načina da utječe na ishod osim da utječe na aktivnost *ABCB1* (M1), što se pak odražava na razinu *MPA* (M2) koja utječe na aktivnost *IMPDH* (M3) da rezultira promijenjena aktivnost imunološkog sustava (M4) – vjerojatno utječe na ishod. Razina *MPA* (M2) može izravno utjecati na ishod (npr. toksičnost), a aktivnost *IMPDH* (M3) (budući da je prisutna u raznim stanicama) može u određenoj mjeri utjecati na funkciju presatka nekim drugim mehanizmom(ima) ("izravno"). Budući da je liječenje genotip, nema klasičnih zbunjujućih čimbenika koji uzrokuju i liječenje i ishod (99). Međutim, postoje mnogi čimbenici koji mogu utjecati na ishod i medijatore, a mogu biti nekauzalno povezani s liječenjem. DAG ne uključuje prikaz nekauzalnih asocijacija, ali one se pretpostavljaju za sve prikazane kovarijable. Kovarijable se mogu klasificirati u skupine. Iako mogu postojati brojne uzročne veze između pojedinačnih varijabli unutar i između takvih skupina, poznati su ili biološki vjerojatni uzročni učinci na "razini grupe". Svi takvi efekti prikazani su tankim crnim strelicama. Pogledati tekst za detalje.



Slike prikazuju nekoliko zajedničkih skupova *confounding* varijabli:

**1. Demografija** – dob, spol i BMI. Pretpostavlja se da bi mogli utjecati na aktivnost enzima i prijenosnika za koje je poznato da utječu na izloženost *CNI* (CYP3A4/5, ABCB1). To se može odraziti na aktivnost imunološkog sustava (M2)/(M4) → funkciju presatka, ili izravno na funkciju presatka (npr. *CNI* toksičnost). Također, izloženost *CNI* može utjecati na izloženost *MPA* budući da oba *CNI* (a posebno ciklosporin – putem inhibicije transportera ABCC2) utječu na izloženost *MPA*. Izloženost *MPA* odražava se na aktivnost enzima IMPDH (M1), a posljedično i na aktivnost imunološkog sustava (M2)/(M4) → funkcija presatka; ili, izravno na funkciju presatka (npr. toksičnost); utjecati na aktivnost enzima i prijenosnika za koje je poznato da sudjeluju u farmakokinetici *MPA* (*UGT1A9* (ključ) uz doprinos drugih UGT enzima, ABCB1, ABCC2, OATP1B1 i drugih OATP1B prijenosnika (npr. OATP1B3) i ABCG2), s posljedicama kako je objašnjeno; utjecati na neke peritransplantacijske događaje, na primjer, odgođeni početak funkcije presatka (s posljedicama na ishod); utjecati na izloženost *CNI* i/ili *MPA*, aktivnost IMPDH, aktivnost imunološkog sustava i funkciju presatka (*eGFR*) "izravno", tj. kroz neke druge potencijalne/hipotetske mehanizme; doprinose "općem zdravstvenom statusu" (ili slabosti), koji je, međutim, prvenstveno definiran drugim varijablama.

**2. Glavne pozadinske (nebubrežne) bolesti.** Do određene mjere nerenalni komorbiditeti mogu spriječiti indikaciju za transplantaciju bubrega, ali općenito, primatelji bubrežnih presađaka mogu patiti od niza popratnih bolesti. Smatrali smo da bi za trenutnu postavku (s funkcijom presatka (*eGFR*) kao primarnim ishodom) hipertenzija, dijabetes, autoimune bolesti, povijest zloćudnih bolesti i kardio/cerebrovaskularni incidenti trebali biti od posebnog interesa. Ovo uključuje i tretmane koji su primljeni za ova stanja. Smatrali smo da su ta stanja kumulativno jedan od glavnih čimbenika koji definiraju "opće zdravstveno stanje" (krhkost). Drugi veliki doprinos dolazi od temeljne bubrežne patologije, koja uključuje vrstu primarne bubrežne bolesti i vrijeme dijalize. Pretpostavlja se da bi opći zdravstveni status mogao: utjecati na aktivnost enzima i prijenosnika relevantnih za izloženost *CNI* i *MPA* (s daljnjim posljedicama); utjecati na razine *MPA/CNI* mogućim drugim mehanizmima; utjecati na peritransplantacijski događaji, npr. odgođenu funkciju presatku; i utjecati izravno, tj. putem drugih mogućih mehanizama – aktivnost IMPDH (M1), aktivnost imunološkog sustava (M2) i funkcija presatka (*eGFR*).

**3. Ostale pozadinske (nerenalne) bolesti** – manji doprinos "općem zdravstvenom stanju"; moguće interakcije između propisanih lijekova i *CNI/MPA*.

**4. Patologija bubrega.** Osim doprinosa "općem zdravstvenom statusu" (osobito povijest/trajanje dijalize; širi kontekst neke osnovne bolesti, npr. policistične bolesti bubrega), osnovna bubrežna patologija može se odraziti na funkciju presatka: glomerulonefritis, na primjer, može se ponovno pojaviti.

**5. Čimbenici povezani s transplantacijom** – vrsta donora (kadaverični ili živi) nije problem u sadašnjem okruženju (kako je objašnjeno). Opseg neusklađenosti *HLA* i je li to bila prva ili ponovljena transplantacija su svaki (i zajedno) za koje se smatra da potencijalno utječu na peritransplantacijske događaje (npr. trajanje hladne ishemije i/ili odgođeni početak funkcije presatka; nalazi nulte biopsije) i/ili aktivnost imunološkog sustava (M2), a sve bi to moglo, putem daljnjih posrednika, utjecati na funkciju presatka ili bi se na funkciju presatka moglo utjecati "izravno", tj. kroz neke druge potencijalne mehanizme.

**6. Peritransplantacijski događaji.** Dok se razumno može očekivati da će trajanje hladne ishemije pridonijeti patološkim nalazima već pri nultoj biopsiji i/ili odgođenoj funkciji presatka, ti se čimbenici razmatraju zajedno. Pretpostavlja se da bi na njih moglo utjecati nekoliko čimbenika (vidi gore) i da bi mogli utjecati na aktivnost imunološkog sustava (M2), ili "izravno" (tj. preko nekog drugog potencijalnog mehanizma) na funkciju presatka.

**7. Indukcijsko liječenje** – smatra se da, bez obzira na to je li primijenjeno ili ne, i korišteni tretmani utječu na aktivnost imunološkog sustava (M2) ili "izravno" (npr. toksičnost) na funkciju presatka.

**8. Terapija održavanja.** Tip *CNI* – iako su i ciklosporin i takrolimus valjane opcije za održavanje imunosupresije kod transplantacije bubrega, oni mogu različito utjecati na ishod: "izravno" (npr. različita renalna toksičnost) i (malim) razlikama u razini imunološke supresije. Oba ova učinka ovise o razini izloženosti – ali dva lijeka, s preporučenim doziranjem, mogu se razlikovati i po tome koliko su "uspješni" u postizanju željene (ciljane) izloženosti (predstavljene najnižim koncentracijama). *MPA* – dvije formulacije (*MMF*, *EC-MPS*) smatraju se terapijski ekvivalentnima, stoga nismo pravili razliku u tom pogledu. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti učinak određenih *IMPDH2* i *ABCB1* SNP-ova na ishod, posebno kod pacijenata liječenih *MPA*-om. Općenito, to implicira da je *MPA* korišten tijekom cijelog promatranog razdoblja. Međutim, u svakodnevnom životu, kod pacijenata koji su počeli uzimati *MPA*, s vremenom (i iz bilo kojeg razloga) *MPA* se može privremeno prekinuti ili trajno prekinuti ili zamijeniti drugim imunosupresivima. S obzirom na sadašnji cilj, takve promjene predstavljaju "promjene u stanju pacijenata". Međutim, s obzirom na definiranu procjenu, zaključili smo da treba uključiti sve pacijente liječene najmanje mjesec dana tijekom rane faze nakon transplantacije, a upotrebu *MPA* modelirati kao vanjsku vremenski promjenjivu kovarijablu (bez obzira na razloge potencijalnog prekida/povlačenja). *MPA* može utjecati na ishod kroz učinak na aktivnost *IMPDH2* (M1)/(M3) ili potencijalno "izravno" (npr. toksičnost). Svi učinci vjerojatno ovise o razini izloženosti *MPA*, ali izloženost *MPA* nije kvantificirana.

**9. *IMPDH SNP*-ovi** – cilj ove studije bio je procijeniti učinak jednog specifičnog *IMPDH2 SNP* koji utječe na aktivnost enzima *in vitro*. Teoretski, bilo koji od (mnogih) drugih *IMPDH2* ili *IMPDH1 SNP*-ova mogao je utjecati na aktivnost enzima, a time i učinak *MPA* na ishod.

**10. Enzim/transporter SNP-ovi /11. Odgovarajuća aktivnost enzima/transportera.** Iako nije bez nedosljednosti, za nekoliko *SNP*-ova se sugerira da utječu na aktivnost odgovarajućih proteina/enzima: primarno CYP3A4/5 u vezi s *CNI*-ima, prvenstveno UGT1A9 (uz mogući doprinos nekih drugih UGT-ova) u vezi s *MPA*; prijenosnici: *ABCB1* u pogledu i *CNI*-a i *MPA*, *ABCC2*, *SLCO1B1* (moguće drugi prijenosnici *SLCO*) i *ABCG2* u vezi s *MPA*) koji se mogu odraziti na izloženost *CNI* i/ili *MPA*. Uzimajući u obzir njihove fiziološke funkcije osim metabolizma i transporta lijeka, aktivnost barem nekih od ovih enzima/transportera mogla bi potencijalno utjecati na funkciju presatka nekim drugim mehanizmom. Međutim, smatrali smo da je to vrlo malo vjerojatno - stoga se enzimi/transporteri i odgovarajući *SNP*-ovi promatraju isključivo sa stajališta mogućih učinaka na izloženost imunosupresivima.

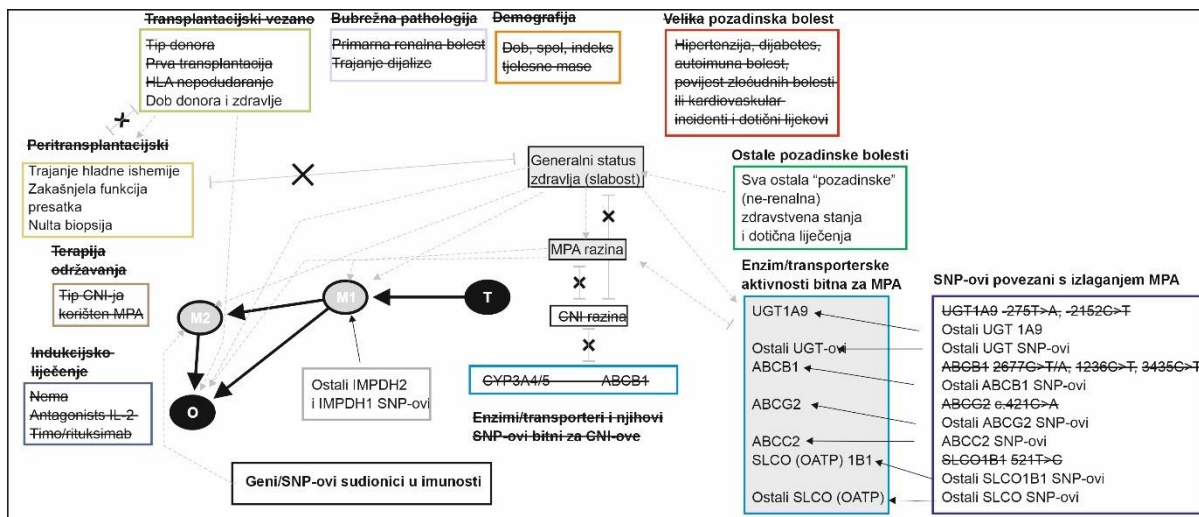
**12. Geni/*SNP*-ovi koji kodiraju proteine uključene u aktivnost imunološkog sustava.** Kao što je prikazano u tablici 7 i nedavno objavljeno (103), brojni geni/polimorfizmi izravno ili neizravno uključeni u aktivnost imunološkog sustava/regulaciju staničnog ciklusa sporadično su uključeni (u studijama gena kandidata ili u, još uvijek ograničenim, studijama povezivanja na cijelom genomu) kod bubrežnih štetnih ishoda.

U *DAG*-u na slici 11. pojavljuje se dodatni skup koji nije prisutan kod *IMPDH*, a to su: ***ABCB1 SNP-ovi – osim istraženih.*** Kao što je već razrađeno, kumulativna prevalencija svih ostalih *ABCB1 SNP*-ova (osim tri istražena zajednička *SNP*-a) ne prelazi 35% u europskim populacijama. Njihov potencijalni utjecaj na aktivnost *ABCB1* nije dokazan. Ipak, barem teoretski, treba ih smatrati potencijalnim izvorom ometanja.

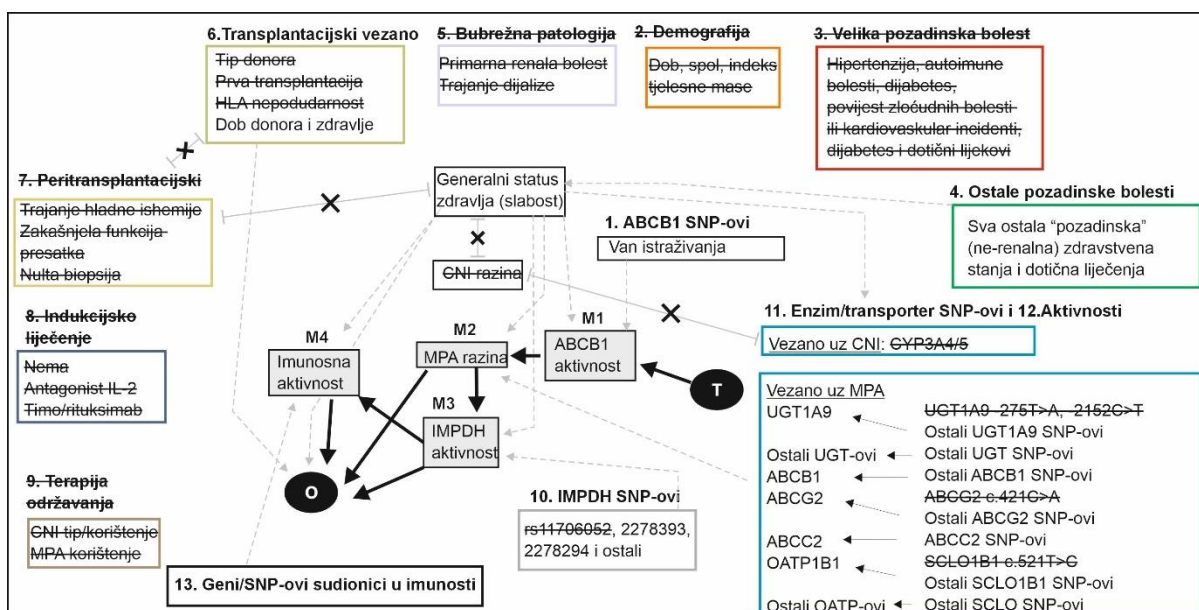
#### 4.8. Kontrola *confoundera*

Kontrola *confoundera*, odnosno uravnoteženost između tretiranih i kontrolnih jedinica temeljem vrijednosti potencijalno ometajućih čimbenika, može se ostvariti različitim pristupima. U ovom istraživanju postignuta je djelomično kroz kriterije uključivanja, dok su se ostale karakteristike nastojale uravnotežiti korištenjem metode egzaktnog uparivanja (engl. *exact matching*), kombinirano s optimalnim kompletnim uparivanjem (engl. *optimal full*), temeljenom na Mahalanobisovoj udaljenosti. Za postupak ujednačavanja korišten je paket *MatchIt* u programu R (105-107).

Ujednačavanje liječenih i kontrola prema osnovnim kovarijablama kombinirano je sa statističkim modeliranjem *BMI*-a, korištenja *MPA*, vrste *CNI*-a i najnižih *CNI*-ova kao vremenski promjenjivih kovarijabli. Kao što je već rečeno, zbog pojedinosti sadašnjeg okruženja, rasa/etnička pripadnost primatelja, kadaverična/živa donacija i (ne)uporaba mTOR inhibitora nisu bili problem. Slike 12 i 13 predstavljaju *DAG*-ove nakon poduzetih mjera ujednačavanja.



Slika 12. Neznatno reorganiziran (radi jasnoće) DAG sa slike 9 prikazuje varijable koje su bile kontrolirane u ovoj studiji, one koje bi se mogle smatrati "djelomično" kontroliranim i one koje su ostale kao potencijalni izvori rezidualnog *confoundinga*. Sivo osjenčani pravokutnici/krugovi označavaju varijable koje nisu izravno izmjerene, ali su se smatrale "potaknute" drugim varijablama.



Slika 13. Neznatno reorganiziran (radi jasnoće) DAG sa slike 11 prikazuje varijable koje su bile kontrolirane u ovoj studiji, one koje bi se mogle smatrati "djelomično" kontroliranim i one koje su ostale kao potencijalni izvori rezidualnog *confoundinga*. Sivo osjenčani pravokutnici/krugovi označavaju varijable koje nisu izravno izmjerene, ali su se smatrale "potaknute" drugim varijablama.

**Potpuno kontrolirane varijable** su varijable prema kojima su tretirani i kontrole potpuno ujednačeni. Prikazane su na slikama 12 i 13 uklanjanjem crnih strelica koje počinju od njih (što ukazuje da iz ovih varijabli ne proizlaze uzročni učinci) i precrtanim tekstom. Demografski podaci – liječeni i kontrolni subjekti bili su uravnoteženi na početku s obzirom na dob, spol i indeks tjelesne mase. Indeks tjelesne mase također je modeliran kao vremenski promjenjiva kovarijabla. Glavna pozadinska (nebubrežna) bolest – liječeni i kontrolni subjekti bili su uravnoteženi na početku u pogledu svih navedenih bolesti. Nisu bili posebno uravnoteženi s obzirom na tretmane koji su isporučeni za ove osnovne bolesti, ali se smatraju općenito sličnim. Patologija bubrega – liječene i kontrolne su bile uravnotežene na početku za primarnu bubrežnu bolest (glomerulonefritis u odnosu na druge) i dijalizu (do ili dulje od 24 mjeseca). Liječeni i kontrolni subjekti bili su uravnoteženi na početku za udio prve i druge transplantacije, kao i glede ozbiljnog *HLA* neslaganja (barem jedan lokus potpun + jedan lokus djelomično neslaganje). Peritransplantacijski događaji – liječeni i kontrole bili su uravnoteženi na početku za trajanje hladne ishemije, odgođenu funkciju presatka i rezultate nulte biopsije (nije napravljeno, nema patologije, neka patologija). Indukcijsko liječenje – liječeni i kontrolne skupine bili su uravnoteženi na početku za provedbu indukcijske terapije i korištenih lijekova. Liječenje održavanja – liječeni i kontrolni bili su uravnoteženi na početku za vrstu upotrebe *CNI* i *MPA* – te su varijable također modelirane kao vremenski promjenjive kovarijable. Izloženost *CNI* (najniže *CNI*) – Najniže *CNI* modelirane su kao vremenski promjenjiva kovarijabla kategorizirana kako je objašnjeno u glavnom tekstu. Aktivnost enzima/prijenosnika relevantnih za izloženost *CNI*-ima - kontroliranjem najnižih vrijednosti *CNI*-a, svaki utjecaj koji je aktivnost *CYP3A4/5* ili *ABCB1* mogla imati na izloženost *CNI*-ima bio je "retrogradno" blokiran (prikazano prekrštenom sivom "blok" crtom između *CNI*-a razina i enzimi/transporteri). Aktivnost *CYP3A4/5* i *ABCB1* kontrolirana je i kontrolom bubrežnih i drugih zdravstvenih stanja; *ABCB1* je dodatno kontroliran balansiranjem liječenih i kontrolnih subjekata s obzirom na 3 uobičajena *ABCB1 SNP*-a.

**Djelomično kontrolirane varijable** ne mogu se potpuno kontrolirati, tj. nisu izravno ujednačene između tretiranih i kontrola. Djelomično kontrolirane i nekontrolirane varijable izvor su ostatnog *confoundinga*. Prikazane su sivim sjenčanjem i sivim isprekidanim strelicama koje označavaju njihove "oslabljene" učinke. Ove se varijable razlikuju kod *IMPDH* i *ABCB1* te će biti odvojeno objašnjene.

**Za *IMPDH2*** Opće zdravstveno stanje – svi uzročni učinci koji proizlaze iz varijabli za koje se smatralo da definiraju „opće zdravstveno stanje“ na slici 10 bili su potpuno blokirani. Dodatno, jedan od njegovih potencijalnih medijatora (peritransplantacijski događaji) je blokiran. Stoga je jedini neblokirani potencijalni učinak na "opće zdravstveno stanje" bio onaj "drugih (manjih) nebubrežnih bolesti", za koje je malo vjerojatno da će stvoriti bilo kakvu relevantnu razliku između liječenih i kontrolnih subjekata u tom pogledu. Kao scenarij u "najgorem slučaju", liječeni i kontrolne skupine

mogli su se blago razlikovati u "općem zdravstvenom statusu" što je moglo utjecati na ishod kroz blage i malo vjerojatne relevantne učinke na izloženost *MPA* (izravno ili kroz učinke na enzime i prijenosnike uključene u farmakokinetiku *MPA*), ili na medijatore (*M1*, *M2*) i/ili ishod "izravno" (tj., kroz druge potencijalne mehanizme). *MPA* razina (izloženost) – izloženost *MPA* nije kvantificirana, međutim, malo je vjerojatno da su se liječene i kontrolne skupine značajno razlikovale u tom pogledu jer je to u velikoj mjeri ujednačeno kontroliranjem čimbenika prikazanih na slici 10 kao onih koji određuju izloženost *MPA*. Jedine nepotpuno kontrolirane determinante izloženosti *MPA* ostale su: dijelom, "opće zdravstveno stanje", tj. dio uzrokovan "drugim nebubrežnim bolestima", s vjerojatno samo manjim učinkom, ako ga ima; dijelom, aktivnost enzima *UGT1A9* i drugih *UGT* enzima koji potencijalno doprinose metabolizmu *MPA*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve negenetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *UGT1A9*/druge *UGT* i s obzirom na očito najrelevantnije *SNP*-ove *UGT1A9* (*-275T>A* i *-2152C>T*). Međutim, drugi *UGT1A9* *SNP*-ovi, koji su teoretski mogli utjecati na funkciju enzima, kao i *SNP*-ovi u drugim *UGT*-ovima koji potencijalno pridonose, nisu bili kontrolirani; dijelom, aktivnost *ABCB1*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve negenetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *ABCB1*, te s obzirom na tri uobičajena *ABCB1* *SNP*-a, ali ne i s obzirom na druge *SNP*-ove s hipotetskim učinkom na aktivnost *ABCB1*; dijelom, aktivnost *ABCC2*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve ne-genetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *ABCC2*, od kojih su upotreba i razina izloženosti ciklosporinu glavni doprinosi, ali nijedan *ABCC2* *SNP* nije genotipiziran; dijelom, aktivnost *ABCG2*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve negenetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *ABCG2* i s obzirom na zajednički *c.421G>A* *SNP*, ali ne i druge *SNP*-ove koji su hipotetski mogli utjecati na funkciju prijenosnika; dijelom, aktivnost *SLCO1B1*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi u odnosu na sve negenetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *SLCO1B1*, kao i u odnosu na *521T>C* *SNP*, ali ne i u odnosu na druge *SNP*-ove s hipotetskim učinkom na aktivnost *SLCO1B1*; dijelom, aktivnost drugih *SLCO* transportera koji potencijalno utječu na izloženost *MPA*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve ne-genetske čimbenike koji su mogli utjecati na drugu aktivnost *SLCO*, ali nijedan *SNP* nije genotipiziran.

**Za *ABCB1*** Opće zdravstveno stanje – svi uzročni učinci koji proizlaze iz varijabli koje su se smatrale glavnim pokretačima „općeg zdravstvenog stanja“ na slici 11 bili su potpuno blokirani. Dodatno, jedan od njegovih potencijalnih medijatora (peritransplantacijski događaji) je blokirani. Stoga je jedini neblokirani potencijalni učinak na "opće zdravstveno stanje" bio onaj "drugih (manjih) nebubrežnih bolesti", za koje je malo vjerojatno da će stvoriti bilo kakvu relevantnu razliku između liječenih i kontrolnih subjekata u tom pogledu. Kao scenarij u "najgorem slučaju", liječeni i kontrolne skupine mogli su se blago razlikovati u "općem zdravstvenom statusu", što je moglo utjecati na ishod kroz blage

i malo vjerojatne relevantne učinke na izloženost *MPA* (izravno ili kroz učinke na enzime i prijenosnike uključeni u farmakokinetiku *MPA*) ili na medijatore (M1, M2, M3) i/ili ishod "izravno" (tj. putem drugih potencijalnih mehanizama). Čimbenici koji mogu utjecati na aktivnost *ABCB1* (M1). Aktivnost *ABCB1* je "početni" medijator (M1) pretpostavljenog učinka procijenjenog liječenja na funkciju presatka. Kao što je navedeno u glavnom tekstu, drugi *ABCB1* *SNP*-ovi samo su sporadično procijenjeni u ovom okruženju, bez ikakvog jasnog signala o njihovoj važnosti za kliničke ili farmakokinetičke ishode. Ipak, smatrali smo da su - teoretski - "drugi *SNP*-ovi" također mogli utjecati na aktivnost *ABCB1*. Međutim, pretpostavili smo da je ovaj učinak blag. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s drugim, negenetičkim varijablama koje su mogle utjecati na aktivnost *ABCB1*.

Čimbenici koji mogu utjecati na razinu *MPA* (M2). Razina *MPA* daljnji je posrednik (M2) pretpostavljenog učinka procijenjenog liječenja na funkciju presatka. Liječeni i kontrolni pacijenti bili su uravnoteženi u odnosu na sve glavne ne-genetske čimbenike koji su mogli utjecati na *MPA* putem općeg zdravstvenog statusa – utjecajem na transporter/enzimske aktivnosti ili bilo kojim drugim potencijalnim mehanizmom. Također, tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na nekoliko *SNP*-ova koji se (u odnosu na druge *SNP*-ove odgovarajućih gena) mogu smatrati "glavnim" u ovoj postavci: *UGT1A9* *SNP*-ovi (-257T>A i -2152C>T), zajednički *SLCO1B1* *SNP* (c.521T>C) i uobičajeni *ABCG2* c.421C>A *SNP*. Jedine nepotpuno kontrolirane determinante izloženosti *MPA* ostale su: dijelom, "opće zdravstveno stanje", tj. dio potaknut "drugim (manjim) nebubrežnim bolestima", s vjerojatno samo manjim učinkom, ako ga ima; dijelom, aktivnost enzima *UGT1A9* i drugih *UGT*-ova koji potencijalno doprinose metabolizmu *MPA*, na račun "drugih" *UGT1A9* *SNP*-ova i *SNP*-ova u genima koji kodiraju "druge" *UGT*-ove koji nisu bili kontrolirani; dijelom, aktivnost *OAT1B1*, na račun "drugih" *SLCO1B1* *SNP*-ova koji nisu bili kontrolirani; dijelom, aktivnost *ABCC2*. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na sve ne-genetske čimbenike s potencijalnim učinkom na aktivnost *ABCC2*, od kojih je upotreba i razina izloženosti *CsA* glavni doprinos, ali nijedan *ABCC2* *SNP* nije genotipiziran; dijelom, aktivnost *ABCG2*, na račun "drugih" *ABCG2* *SNP*-ova koji nisu bili kontrolirani i mogli su – teoretski – utjecati na funkciju transportera; djelomično, aktivnost *OATP1B3* - tretirani i kontrole bile su uravnoteženi u odnosu na sve ne-genetske čimbenike koji su mogli utjecati na aktivnost *OATP1B3*, ali nijedan *SLCO1B3* *SNP* nije genotipiziran. Čimbenici koji bi mogli utjecati na aktivnost *IMPDH* (M3). Aktivnost *IMPDH* posrednik je (M3) pretpostavljenog učinka procijenjenog liječenja na ishod. Imunosupresivni učinak *MPA* posljedica je inhibicije ovog enzima. Od dva oblika (*IMPDH* tip 1, tip 2), tip 2 se smatra od primarnog interesa u ovom okruženju – njegova aktivnost u limfocitima je nekoliko puta veća od aktivnosti izoforme tipa 1. Tretirani i kontrole bili su uravnoteženi s obzirom na brojne negenetske varijable koje su se mogle odraziti na aktivnost enzima, te s obzirom na *IMPDH2* 3575T>C (rs11706052) *SNP*. Ovaj polimorfizam rezultira povećanom aktivnošću *IMPDH* u perifernim



mononuklearima, a enzim je manje osjetljiv na inhibiciju *MPA* in vitro (14, 15). Međutim, dva *IMPDH1* *SNP*-a (slika 11) koji su predloženi u vezi s bubrežnim ishodima u ovom okruženju (kao i "drugi" *IMPDH* *SNP*-ovi) nisu bili kontrolirani. Uzevši sve zajedno, smatrali smo razumnim pretpostaviti da je hipotetsko zbunjivanje, koje proizlazi iz razlika u aktivnosti *IMPDH* između liječenih i kontrolne skupine, "oslabljeno/ograničeno".

**Varijable koje nisu bile kontrolirane** također se razlikuju za *IMPDH* i *ABCB1*. Kod *IMPDH* (slika 12) prikazane su otvorenim kvadratima: "druga (manja) pozadinska nebubrežna bolest" nije bila kontrolirana, ali kao što je objašnjeno, očekivalo se da će imati samo manji doprinos "općem zdravstvenom statusu" (sivo isprekidana strelica označava samo "manji" učinak); dob i zdravstveno stanje donora nisu kontrolirani (ostali su nepoznati). Pretpostavlja se da bi ovi čimbenici mogli utjecati na peritransplantacijske događaje (kao posrednik) i "izravno" funkcioniranje presatka. Međutim, učinak je prikazan (samo) sivom isprekidanom strelicom (manje) budući da se pretpostavlja da podudarnost s obzirom na neusklađenost HLA i prethodnu transplantaciju, kao i na peritransplantacijske događaje (kako bi rezultiralo "natrag" blokiranjem učinka dob i zdravlje darivatelja – prikazano prekriženom sivom „blok“ linijom) „ublažilo“ ove hipotetske učinke; *IMPDH2* *SNP* osim istraživanog, *IMPHD1* *SNP* – nisu kontrolirani, a hipotetski zbunjujući učinak na aktivnost *IMPDH* (M1) prikazan je crnom strelicom; *Geni/SNP*-ovi koji kodiraju proteine uključene u aktivnost imunološkog sustava i/ili regulaciju staničnog ciklusa. Nismo kontrolirali niti jedan od najmanje 60 *SNP*-ova (104) u genima koji reguliraju sintezu/promjenu različitih izvanstaničnih i unutarstaničnih molekula uključenih u imunološke/upalne mehanizme i/ili kontrolu staničnog ciklusa (vidi tablicu 4). Međutim, njihov potencijalni učinak na ishod smatrali smo "manjim" (sive isprekidane strelice) iz dva glavna razloga: a) izvješća o njihovoj (potencijalnoj) povezanosti s nepovoljnim ishodima transplantacije nakon transplantacije bubrega bila su nedosljedna i dolazila su uglavnom iz metodološki ograničenih studije; b) razumno je smatrati da su svi čimbenici, koji bi spadali u ovu kategoriju, međusobno povezani s karakteristikama drugih pacijenata, npr. bubrežnom patologijom, glavnim nebubrežnim komorbiditetom, peritransplantacijskim događajima, tj. da se uravnoteženjem "drugih varijabli" postiže neka razina ravnoteže s obzirom na te čimbenike.

Kod *ABCB1* (slika 13) donatorova dob i zdravlje nisu bili (izravno) kontrolirani i mogli su utjecati na ishod. Smatrali smo da je ovaj hipotetski učinak "oslabljen" budući da su liječeni i kontrolne skupine bili uravnoteženi na nekoliko čimbenika (odgođeni početak funkcije presatka, nulti nalazi biopsije) koji bi se razumno mogli smatrati medijatorima barem dijela učinka dobi darivatelja i zdravlja. *Geni/SNP* uključeni u imunitet. Nismo kontrolirali niti jedan od najmanje 60 (103) (vidi tablicu 7) *SNP*-ova u genima koji reguliraju sintezu/promjenu različitih izvanstaničnih i unutarstaničnih molekula uključenih u imunološke/upalne mehanizme i/ili kontrolu staničnog ciklusa. Međutim, njihov potencijalni učinak

na ishod smatrali smo "ograničenim/oslabljenim" iz dva glavna razloga: a) izvješća o njihovoj (potencijalnoj) povezanosti s nepovoljnim ishodima presađivanja nakon transplantacije bubrega su nedosljedna i potječu uglavnom iz metodološki ograničenih studija (103); b) razumno je smatrati da su svi čimbenici, koji bi spadali u ovu kategoriju, međusobno povezani s karakteristikama drugih pacijenata npr. bubrežnom patologijom, glavnim nebubrežnim komorbiditetom, peritransplantacijskim događajima, tj. da balansiranjem "drugih varijabli" određena razina ravnoteže se postiže i u odnosu na ove čimbenike.

#### 4.9. Statistička analiza

Kako bi se procijenio učinak ispitivanih polimorfizama na kliničke ishode transplantacije bubrega, razlike između nositelja varijantnoga alela (tretirani) i homozigota divljeg tipa (kontrola) procijenjene su prije ujednačavanja između tretiranih i kontrola za mjerene kovarijable i nakon ujednačavanja vrijednosti izmjerenih kovarijabli. Razlike (učinak varijantnoga alela) su iskazane kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio, GMR*) – GMR je eksponent razlika aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritama. Korišteno je energetsko balansiranje s prosječnim učinkom tretmana kao procjenu (paket *WeightIT* (109) u R (109)) kako bi se postigla ravnotežu između varijanti nositelja (tretiranih) i kontrola divljeg tipa u vezi s nizom kovarijabli na početku (bez podataka koji nedostaju). Energetsko uravnoteženje je metoda ponderiranja koja postiže (gdje je to moguće) distribucijsku ravnotežu kovarijabli između skupina (110, 111). Standardizirane razlike  $<0,1$  ukazuju na odgovarajuću ravnotežu. Iako interni protokol predviđa da se *eGFR* određuje pri svakom redovitom posjetu (slika 7), pretpostavili smo da bi neke vrijednosti mogle povremeno nedostajati zbog preskočenih posjeta (iz bilo kojeg razloga, ali neovisno o "liječenju"). Međutim, nije planirana imputacija podataka smatralo se da su 2-3 vrijednosti tijekom 1. mjeseca dovoljne za određivanje nagiba rastućeg *eGFR*-a, a također da su 2 ili 3 vrijednosti dovoljne za procjenu nagiba nakon 28. dana. Stoga, svi dostupni podaci korišteni su po vremenskoj točki. Sve vremenski promjenjive kovarijable smatrane su vanjskim. Podaci o upotrebi *MPA* (binarno), upotrebi *CNI* (ne, takrolimus ili *CsA*) i *BMI* redovito su bilježeni, a nedostajali su za preskočene posjete. Najniži *CNI* kategorizirani su kao "niski" (ispod ciljanih vrijednosti), "ciljani", "visoki" ili "nedostajući" - osim tijekom razdoblja s tjednim procjenama, gdje su vrijednosti imputirane na temelju susjednih vrijednosti (ako je moguće). Postavili smo ponderirana slučajna presretanja po komadima i vremenski linearni mješoviti model s čvorom na dan 28, s tretmanom, vremenom, interakcijom tretman\*vrijeme (prije i poslije čvora), te *BMI*, korištenjem *CNI*-a, najnižim vrijednostima *CNI*-a i korištenjem *MPA* kao fiksni učinci, s ograničenom procjenom maksimalne vjerojatnosti i robusnim (sendvič) estimatorom

varijance za ln-transformirani *eGFR*, za generiranje: (a) prilagođenih nagiba *eGFR* prije i poslije čvora (postotna promjena/dan prije čvora i po 28 dana nakon čvora čvor), te razlike između tretiranih i kontrola (omjeri geometrijskih sredina, *GMR*, eng. *Geometric means ratio*); (b) prilagođene (geometrijske sredine) vrijednosti *eGFR* u danima 1, 28 i 365, te razlike između liječenih i kontrola (*GMR*) (112). Ponavljajući štetni bubrežni ishodi i štetni događaji analizirani su prilagođavanjem Poissonovih modela s ln-time kao pomakom, s liječenjem, vremenom, *BMI*-om, upotrebom *MPA* i upotrebom *CNI*-a kao fiksnim učincima, s robusnom sendvič procjenom varijance za generiranje prilagođenih stopa događaja/1 pacijent-godina, te razlike između liječenih i kontrolnih skupina kao omjeri stopa (RR). Koristili smo SAS 9.4 za *Windows* (SAS Inc., Cary, NC) *proc mixed* i *proc genmod*. Koristili smo *CubeX* (113) za testiranje neravnoteže povezivanja (LD).

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

Identificirano je nekoliko varijabli kao potencijalni izvori neizmjenog *confoundinga* (vidi prethodni tekst), te je pretpostavljeno postojanje hipotetske varijable (ili skupa varijabli) s jakim učinkom odstupanja izraženim kao  $GMR=0,60$  ili  $0,79$ , s ukupnom prevalencijom od 58%, i s (nerealno) visokim izgledima neravnoteže u prevalenciji između liječenih i kontrolnih skupina (1,5:1,0, 1,0:1,5, 2,0:1,0, 1,0:2,0). Zatim smo ispravili promatrane procjene za te hipotetske pristranosti (114) (paket *episensr* (Haine, 2023 #155) u R).

#### 4.11. Odobrenje etičkog povjerenstva

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Klasa: 8.1-16/120-2, Broj: 20/21 AG) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno poštujući sve temeljne, etičke i bioetičke principe po važećim i primjenjivim smjernicama koje imaju cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u znanstvenom istraživanju, što uključuje Helsinšku deklaraciju te pozitivne propise Republike Hrvatske. Podaci o ispitanicima su povjerljivi i šifrirani te se identitet ispitanika čuva u tajnosti.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Demografski podaci

Medijan dobi ispitanika bio je 52 godine (raspon 16-73). Bilo je N=147 (57,9%) muškaraca i N=107 (42,1%) žena. Najčešća osnova bubrežna bolest je bila urođena (najčešće policistična bubrežna bolest i vezikoureteralna refluksna bolest) kod 29,5% bolesnika, a medijan trajanja dijalize prije transplantacije je bio 29 mjeseci (raspon 0-180). Bilo je N=6 (2,4%) transplantacija od živog donora, a ostalo N=248 (97,6%) su bile kadaverične transplantacije. Većina transplanacija u ovoj kohorti su bile prve, a samo N=29 (11,4%) ih je bilo drugih. Prosječno trajanje hladne ishemije je bilo 13 sati (raspon 0,1-35). Odgođenu funkciju presatka imalo je 68 (26,8%) pacijenata. Najčešći komorbiditet je bila arterijska hipertenzija kod N=191 (75,2%) pacijenta.

Osnovni neobrađeni demografski podaci pacijenata za *IMPDH2* 3757T>C (rs11706052) genotip prikazani su u tablici 8, a u tablici 9 nakon balansiranja kovarijabli. Isto je učinjeno i za SNP-ove P-glikoproteina/*ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642), u tablicama 10 i 11.

Tablica 8. Osnovne karakteristike pacijenta: grubi podaci, sveukupno i po nositeljima varijate *IMPDH2* 3757T>C, genotipovi, TC ili CC (tretirani), subjekti divljeg tipa (TT) (kontrolna skupina). Podaci su medijan (min-maks), prosjek±SD ili broj (%). Pokazano su standardizirane razlike (d) za nositelje varijante vs. subjekti divljeg tipa.

	Svi pacijenti	Varijantni alel	Divlji tip	d
N	254	52	202	---
Dob (godine)	52 (16-73)	52 (16-68)	52 (16-73)	-0.120
Muškarci	147 (57.9)	30 (57.7)	117 (57.9)	-0.005
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	25.5±4.2	24.5±3.6	25.8±4.3	-0.337
Podležeća bubrežna bolest				
Urođena	75 (29.5)	15 (28.9)	60 (29.7)	-0.019
Glomerulonefritis	74 (29.1)	17 (32.7)	57 (28.2)	0.097
Dijabetička nefropatija	13 (5.1)	5 (9.6)	8 (4.0)	0.226
Hipertenzivna nefropatija	18 (7.1)	4 (7.7)	14 (6.9)	0.029
Pijelonefritis	15 (5.9)	1 (1.9)	14 (6.9)	-0.245
Ostalo i nepoznato	59 (23.3)	10 (19.2)	49 (24.3)	-0.222
Trajanje hemodijalize (mjeseci)	29 (0-180)	41 (2-180)	27 (0-168)	0.390
Trajanje hemodijalize>24 mjeseca	141 (55.5)	37 (71.1)	104 (51.5)	0.412
Živi donor	6 (2.4)	0	6 (3.0)	-0.364
Druga (vs. prva) transplantacija	29 (11.4)	4 (7.7)	25 (12.4)	-0.156
HLA A nepodudaranje				
Ništa	80 (31.5)	12 (23.1)	68 (33.7)	-0.237
Djelomično	138 (54.3)	34 (65.4)	104 (51.5)	0.285
Potpuno	36 (14.2)	6 (11.5)	30 (14.8)	-0.098
HLA B nepodudaranje				
Ništa	30 (11.8)	0	30 (14.8)	-0.591
Djelomično	141 (55.5)	34 (65.4)	107 (53.0)	0.255
Potpuno	83 (32.7)	18 (34.6)	65 (32.2)	0.052
HLA DR nepodudaranje				
Ništa	55 (21.6)	7 (13.5)	48 (23.8)	-0.267
Djelomično	179 (70.5)	41 (78.8)	138 (68.3)	0.241
Potpuno	20 (7.9)	4 (7.7)	16 (7.9)	-0.009
Veliko nepodudaranje <sup>1</sup>	111 (43.7)	25 (48.1)	86 (42.1)	0.111
Trajanje ishemije (sati)	13 (0.1-35)	13 (6-20)	13 (0.1-35)	-0.002
Ishemija >14 sati	107 (42.1)	22 (42.3)	85 (42.1)	0.005
Nulta biopsija				
Neobavljena	74 (29.1)	22 (42.3)	52 (25.7)	0.355
Bilo kakva patologija	72 (28.3)	15 (28.8)	57 (28.2)	0.014
Odgođena funkcionalnost presadka	68 (26.8)	11 (21.2)	57 (28.2)	-0.162
<i>ABCB1</i> 2677/1236/3435 diplotip				
0-1 varijantni aleli	72 (28.3)	13 (25.0)	59 (29.2)	-0.095
2-3 varijantni aleli	103 (45.6)	24 (46.2)	79 (39.1)	0.143
4-6 varijantni aleli	79 (31.1)	15 (28.8)	64 (31.7)	-0.062
<i>SLCO1B1</i> 521T>C varijantni alel	86 (33.9)	17 (32.7)	69 (34.2)	-0.031
<i>UGT1A9</i> -275/-2152 diplotip				
Varijanta	19 (7.5)	4 (7.7)	15 (7.4)	0.010
<i>ABCG2</i> c.421C>A varijantni aleli	46 (18.1)	11 (21.1)	35 (17.3)	0.097
Hipertenzija	191 (75.2)	40 (76.9)	151 (74.7)	0.051
Ostali kardio-/cerebrovaskularni	50 (19.7)	12 (23.1)	38 (18.8)	0.105
Dijabetes	15 (5.9)	6 (11.5)	9 (4.5)	0.263
Autoimune bolesti	7 (2.8)	3 (5.8)	4 (2.0)	0.197
Povijest zloćudne bolesti	8 (3.2)	1 (1.9)	7 (3.5)	-0.095

Indukcija imunosupresiva				
Nema	40 (15.7)	7 (13.5)	33 (16.3)	-0.081
Antagonisti interleukina 2	199 (78.4)	43 (82.7)	156 (77.2)	0.137
Ostalo (timoglobulin, rituksimab)	15 (5.9)	2 (3.8)	13 (6.5)	-0.117
Imunosupresija održavanja				
Inhibitor kalcineurina				
Ciklosporin A	80 (31.4)	19 (36.5)	61 (30.2)	0.135
Takrolimus	174 (68.5)	33 (63.5)	141 (69.8)	-0.135
Mikofenolična kiselina				
Nema	5 (2.0)	2 (3.8)	3 (1.5)	0.147
Mofetilmikofenolat	88 (34.6)	20 (38.5)	68 (33.7)	0.100
Enterički-obloženo	161 (63.4)	30 (57.7)	131 (64.8)	-0.147
Ostalo (sirolimus, everolimus)	4 (1.6)	2 (3.8)	2 (1.0)	0.189
Kortikosteroidi	254 (100)	52 (100)	202 (100)	0.000
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	6.8 (3.3-17.8)	6.8 (3.4-17.8)	6.8 (3.3-16.9)	0.108
Hemoglobin (g/L)	118 $\pm$ 14	118 $\pm$ 16	118 $\pm$ 14	-0.013
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	195 (85-771)	197 (86-396)	197 (85-771)	-0.029

<sup>1</sup>Barem jedan lokus potpunog + jedan djelomičnog nepodudaranja

Tablica 9. Osnovne karakteristike pacijenta nakon uravnoteženja kovarijabli između *IMPDH2 3757T>C* nositelja varijantnih alela (tretirani) i subjekata divljeg tipa (kontrolni). Podaci su prosjek±SD ili broj (%). Pokazane su standardizirane razlike (d) za nositelje varijante vs. subjekti divljeg tipa.

	Varijantni alel	Divlji tip	d
N	52	202	---
Dob (godine)	50±12	50±12	0.006
Men	30.4 (58.5)	117.8 (58.4)	0.088
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	25.0±3.5	25.3±4.0	0.002
Podležeci glomerulonefritis	34.7 (66.7)	137.5 (68.1)	-0.029
Ostale kronične bolesti bubrega	17.3 (33.3)	64.5 (31.9)	0.029
Trajanje hemodijalize do 24 mjeseca	19.4 (37.2)	83.0 (41.1)	-0.080
Trajanje hemodijalize > 24 mjeseca	32.7 (62.8)	119.0 (58.9)	0.080
Prva transplantacija	46.9 (90.3)	179.6 (89.3)	0.033
Druga transplantacija	5.1 (9.7)	21.4 (10.7)	-0.033
Veliko nepodudaranje <sup>1</sup>	24.7 (47.4)	92.4 (45.8)	0.033
Trajanje ishemije (sati)	12.9±4.1	13.0±5.1	-0.007
Nulta biopsija			
Neobavljena	17.4 (33.4)	62.0 (30.7)	0.058
Bez patološkog nalaza	18.5 (35.6)	81.2 (40.3)	-0.098
Bilo kakva patologija	16.1 (31.0)	58.8 (29.0)	0.044
Odgođena funkcionalnost presadka	12.2 (23.6)	51.8 (25.7)	-0.049
<i>ABCB1 2677/1236/3435</i> diplotip			
0-1 varijantni aleli	14.8 (28.5)	58.4 (28.9)	-0.009
2-3 varijantni aleli	22.3 (42.8)	83.1 (41.2)	0.034
4-6 varijantni aleli	14.9 (28.7)	60.5 (29.9)	-0.028
<i>SLCO1B1 521T&gt;C</i>			
Nositelji varijante	16.5 (31.8)	65.0 (32.2)	-0.009
Divlji tip	35.5 (68.2)	137.0 (67.8)	0.009
<i>UGT1A9 -275T&gt;A /-2152C&gt;T</i> diplotip			
Varijanta	4.2 (8.0)	15.5 (7.7)	0.013
Divlji tip	47.8 (92.0)	186.5 (92.3)	-0.013
<i>ABCG2 c.421C&gt;A</i>			
Nositelji varijante	9.7 (18.7)	36.4 (18.1)	0.018
Divlji tip	42.3 (81.3)	165.6 (81.9)	-0.018
Hipertenzija ili kardio-/cerebrovaskularni incidenti	41.3 (79.4)	160.0 (79.2)	0.005
Dijabetes, autoimune bolesti ili povijest raka	7.3 (14.1)	23.5 (11.6)	0.072
Indukcija imunosupresiva			
Nema	7.6 (14.6)	31.3 (15.5)	-0.027
Antagonisti interleukina 2	42.3 (81.3)	160.7 (79.5)	0.045
Ostalo (timoglobulin, rituksimab)	2.1 (4.1)	10.0 (5.0)	-0.036
Imunosupresija održavanja			
Ciklosporin A	16.2 (31.1)	63.2 (31.3)	-0.004
Takrolimus	35.8 (68.9)	138.8 (68.7)	0.004
Mikofenolična kiselina			
Ne (korišteni sirolimus ili everolimus)	1.2 (2.4)	3.7 (1.8)	0.032
Da (bilo koji oblik)	50.8 (97.6)	198.3 (98.2)	-0.032

<sup>1</sup>Barem jedan lokus potpunog + jedan djelomičnog nepodudaranja

Učinkovite veličine uzorka su bile 44 tretirana i 161 kontrolna; prosječne težine±SD bile su 1.0±0.445 (raspon 0.13-2.15) odnosno 1.0±0.506 (raspon 0.13-2.15), a entropije 0.096 i 0.134 u liječenoj odnosno kontrolnoj skupini.

Tablica 10. Osnovne karakteristike pacijenata: grubi podaci pacijenata u podskupinama temeljenim na broju varijantnih alela kod tri *ABCB1* SNP-a (0-1 - kontrolni; 2-3 - "niska doza"; 4-6 - "visoka doza"). Podaci su medijani (min-maks), srednja vrijednost  $\pm$  SD ili broj (%). Prikazane su maksimalne standardizirane razlike za sve parne usporedbe (Max d).

	Kontrolni	Niska doza	Visoka doza	Max d
N	72	103	79	---
Dob (godine)	52 (18-73)	51 (16-72)	53 (23-70)	0.206
Muškarci	39 (54.2)	56 (54.4)	52 (65.8)	0.238
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	25.6 $\pm$ 3.9	25.1 $\pm$ 4.3	26.0 $\pm$ 4.4	0.211
Podležeća bubrežna bolest				
Urođena	19 (26.4)	29 (28.2)	27 (34.2)	0.171
Glomerulonefritis	24 (33.3)	27 (26.2)	23 (29.1)	0.156
Dijabetička nefropatija	5 (6.9)	5 (4.8)	3 (3.8)	0.140
Hipertenzivna nefropatija	4 (5.6)	8 (7.8)	6 (7.6)	0.087
Pijelonefritis	3 (4.2)	9 (8.7)	3 (3.8)	0.216
Ostalo i nepoznato	17 (23.6)	25 (24.3)	17 (21.5)	0.059
Trajanje hemodijalize (mjeseci)	29 (0-168)	31 (0-180)	27 (2-154)	0.146
Trajanje hemodijalize >24 mjeseca	42 (58.3)	58 (56.3)	41 (51.9)	0.130
Živi donor (114)	1 (1.4)	5 (4.8)	0	0.533
Druga (vs. prva) transplantacija	7 (9.7)	15 (14.6)	7 (8.9)	0.245
HLA A nepodudaranje				
Ništa	18 (25.0)	34 (33.0)	28 (35.4)	0.227
Djelomično	45 (62.5)	53 (51.5)	40 (50.6)	0.240
Potpuno	9 (12.5)	16 (15.5)	11 (13.9)	0.088
HLA B nepodudaranje				
Ništa	9 (12.5)	13 (12.6)	8 (10.1)	0.077
Djelomično	42 (58.3)	55 (57.3)	40 (50.6)	0.155
Potpuno	21 (29.2)	31 (30.1)	31 (39.2)	0.215
HLA DR nepodudaranje				
Ništa	16 (22.2)	21 (20.4)	18 (22.8)	0.058
Djelomično	52 (72.2)	72 (69.9)	55 (69.6)	0.057
Potpuno	4 (5.6)	10 (9.7)	6 (7.6)	0.157
Veliko nepodudaranje <sup>1</sup>	30 (41.7)	41 (39.8)	40 (50.6)	0.219
Trajanje ishemijske (sati)	13 (0.1-24)	13 (0.1-35)	12.5 (4-23)	0.097
Ishemija >14 sati	31 (43.1)	43 (41.8)	33 (41.8)	0.027
Nulta biopsija				
Neobavljena	21 (29.2)	33 (32.0)	20 (25.3)	0.149
Bilo kakva patologija	20 (27.8)	26 (25.2)	26 (32.9)	0.170
Odgođena funkcionalnost presadka	18 (25.0)	31 (30.1)	19 (24.1)	0.137
<i>IMDPH2 3753C&gt;T</i> varijantni alel	13 (18.1)	24 (23.3)	15 (19.0)	0.131
<i>SLCO1B1 521T&gt;C</i> varijantni alel	27 (37.5)	35 (34.0)	24 (30.4)	0.151
<i>UGT1A9 -275/-2152</i> diplotip				
Varijanta	6 (8.3)	8 (7.8)	5 (6.3)	0.076
<i>ABCG2 c.421C&gt;A</i> varijantni alel	16 (22.2)	15 (14.6)	15 (19.0)	0.197
Hipertenzija	52 (72.2)	75 (72.8)	64 (81.0)	0.205
Ostale kardio-/cerebrovaskular	12 (16.7)	22 (21.4)	16 (20.2)	0.119
Dijabetes	4 (5.6)	7 (6.8)	4 (5.1)	0.074
Autoimune bolesti	1 (1.4)	3 (2.9)	3 (3.8)	0.149
Povijest zloćudne bolesti	3 (4.2)	4 (3.9)	1 (1.3)	0.079
Inukcija imunosupresiva				
Nema	13 (18.1)	15 (14.6)	12 (15.2)	0.095
Antagonisti interleukina 2	55 (76.4)	82 (79.6)	62 (78.5)	0.078
Ostalo (timoglobulin, rituksimab)	4 (5.5)	6 (5.8)	5 (6.3)	0.033



Imunosupresija održavanja				
Inhibitor kalcineurina				
Ciklosporin A	25 (34.7)	39 (37.9)	16 (20.2)	0.386
Takrolimus	47 (65.3)	64 (62.1)	63 (79.8)	0.386
Mikofenolična kiselina				
Nema	1 (1.4)	3 (2.9)	1 (1.3)	0.122
Mofetilmikofenolat	26 (36.1)	30 (29.1)	32 (40.5)	0.239
Enterički-obloženo	45 (62.5)	70 (68.0)	46 (58.2)	0.202
Ostalo (sirolimus, everolimus)	1 (1.4)	2 (1.9)	1 (1.3)	0.055
Kortikosteroidi	72 (100)	103 (100)	79 (100)	0.000
Leukociti (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.8 (3.3-12.2)	6.9 (3.4-17.8)	6.6 (3.4-16.9)	0.146
Hemoglobin (g/L)	116±13	119±15	118±15	0.196
Trombociti (x 10 <sup>9</sup> /L)	187 (86-771)	193 (85-396)	197 (99-387)	0.183

<sup>1</sup>Barem jedan lokus potpunog + jedan djelomičnog nepodudaranja

Tablica 11. Osnovne karakteristike pacijenata nakon uravnoteženja kovarijabli među podskupovima pacijenata temeljene na broju varijantnih alela kod tri *ABCB1* SNP-a (0-1 – kontrolni; 2-3 - "niska doza"; 4-6 - "visoka doza"). Podaci su srednja vrijednost  $\pm$  SD ili broj (%). Prikazane su maksimalne standardizirane razlike za sve međusobne usporedbe (Max d).

	Kontrolni	Niska doza	Visoka doza	Max d
N	72	103	79	---
Dob (godine)	50 $\pm$ 12	50 $\pm$ 13	50 $\pm$ 12	0.041
Muškarci	41.6 (57.8)	58.9 (57.5)	48.1 (60.7)	0.066
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	25.6 $\pm$ 3.8	25.6 $\pm$ 4.3	25.7 $\pm$ 4.6	0.029
Podležeci glomerulonefritis	23.6 (32.8)	29.8 (29.1)	24.3 (30.7)	0.078
Ostale kronične bubrežne bolesti	48.4 (67.2)	73.2 (70.9)	54.7 (69.3)	0.078
Trajanje hemodijalize do 24 mjeseca	31.9 (44.3)	45.6 (44.5)	34.7 (43.9)	0.014
Trajanje hemodijalize > 24 mjeseca	40.1 (55.7)	57.4 (55.5)	44.3 (56.1)	0.014
Prva transplantacija	64.5 (89.5)	92.0 (89.3)	71.3 (90.1)	0.025
Druga transplantacija	7.5 (10.5)	11.0 (10.7)	7.7 (9.9)	0.024
Veliko nepodudaranje <sup>1</sup>	32.0 (44.5)	44.8 (43.7)	36.7 (46.3)	0.053
Trajanje ishemije (sati)	13.0 $\pm$ 4.1	13.0 $\pm$ 5.0	13.2 $\pm$ 4.7	0.031
Nulta biopsija				
Neobavljena	20.5 (28.5)	30.2 (29.5)	22.9 (28.9)	0.021
Bez patološkog nalaza	30.6 (42.5)	45.0 (43.8)	33.8 (42.7)	0.027
Bilo kakva patologija	20.9 (29.0)	27.8 (26.7)	22.3 (28.4)	0.051
Odgođena funkcionalnost presadka	18.5 (25.7)	28.2 (27.5)	19.5 (24.6)	0.067
<i>IMDPH2 3753C&gt;T</i> varijantni alel				
Nositelji varijante	13.6 (19.0)	21.0 (20.3)	15.1 (19.2)	0.035
Divlji tip	58.4 (81.0)	82.0 (79.7)	63.9 (80.8)	0.035
<i>SLCO1B1 521T&gt;C</i>				
Nositelji varijante	24.7 (34.3)	34.0 (32.9)	25.3 (31.9)	0.050
Divlji tip	47.3 (65.7)	69.0 (67.1)	53.7 (68.1)	0.050
<i>UGT1A9 -275T&gt;A /-2152C&gt;T</i> diplotip				
Nositelji varijante	4.9 (6.8)	7.2 (7.0)	4.5 (5.6)	0.051
Divlji tip	67.1 (93.2)	95.8 (93.0)	74.5 (94.4)	0.051
<i>ABCG2 c.421C&gt;A</i>				
Nositelji varijante	13.4 (18.6)	18.0 (17.3)	14.6 (18.5)	0.032
Divlji tip	58.6 (81.4)	85.0 (82.7)	64.5 (81.5)	0.032
Hipertenzija ili kardio-/cerebrovaskular incidenti	56.3 (78.3)	82.0 (79.9)	63.1 (79.6)	0.039
Dijabetes, autoimune bolesti ili povijest raka	7.8 (10.8)	11.7 (11.4)	8.9 (11.2)	0.019
Indukcija imunosupresiva				
Nema	11.5 (16.0)	16.0 (15.3)	12.2 (15.4)	0.019
Antagonisti interleukina 2	56.3 (78.2)	81.0 (79.1)	62.0 (78.3)	0.020
Ostalo (timoglobulin, rituksimab)	4.2 (5.8)	6.0 (5.6)	4.8 (6.3)	0.026
Imunosupresija održavanja				
Ciklosporin A	22.7 (31.5)	33.3 (32.5)	22.5 (28.5)	0.086
Takrolimus	49.3 (68.5)	69.7 (67.5)	56.5 (71.5)	0.086
Micofenolična kiselina				
Ne (korišteni sirolimus ili everolimus)	0.9 (1.3)	2 (1.6)	1.0 (1.3)	0.023
Da (bilo koji oblik)	71.1 (98.7)	101 (98.4)	78 (98.7)	0.023

<sup>1</sup>Barem jedan lokus potpunog + jedan djelomičnog nepodudaranja

Efektivne veličine uzorka - 66 kontrolnih, 87 pacijenata s niskom dozom i 66 pacijenata s visokom dozom. Odnosi: kontrolni - srednja vrijednost  $\pm$  SD 1,0  $\pm$  0,307 (raspon 0,27-1,90); pacijenti s niskom dozom - 1,0  $\pm$  0,423 (raspon 0,25-1,90); pacijenti s visokom dozom - 1,0  $\pm$  0,447 (raspon 0,25-1,90). Entropije - 0,048, 0,097 i 0,102, redom.

## 5.2. Učestalost polimorfizma *IMPDH2* 3757T>C (rs11706052)

Od 254 uključena bolesnika, 52 (20,5%) bili su nositelji varijante *IMPDH2* 3757T>C, od čega 50 (19,7%) heterozigota (T/C) i 2 (0,8%) homozigota (C/C) varijante, a 202 (79,5%) su bili homozigoti (T/T) divljeg tipa: u nastavku teksta, prvi se nazivaju liječeni, a zadnji kontrole (Tablica 12).

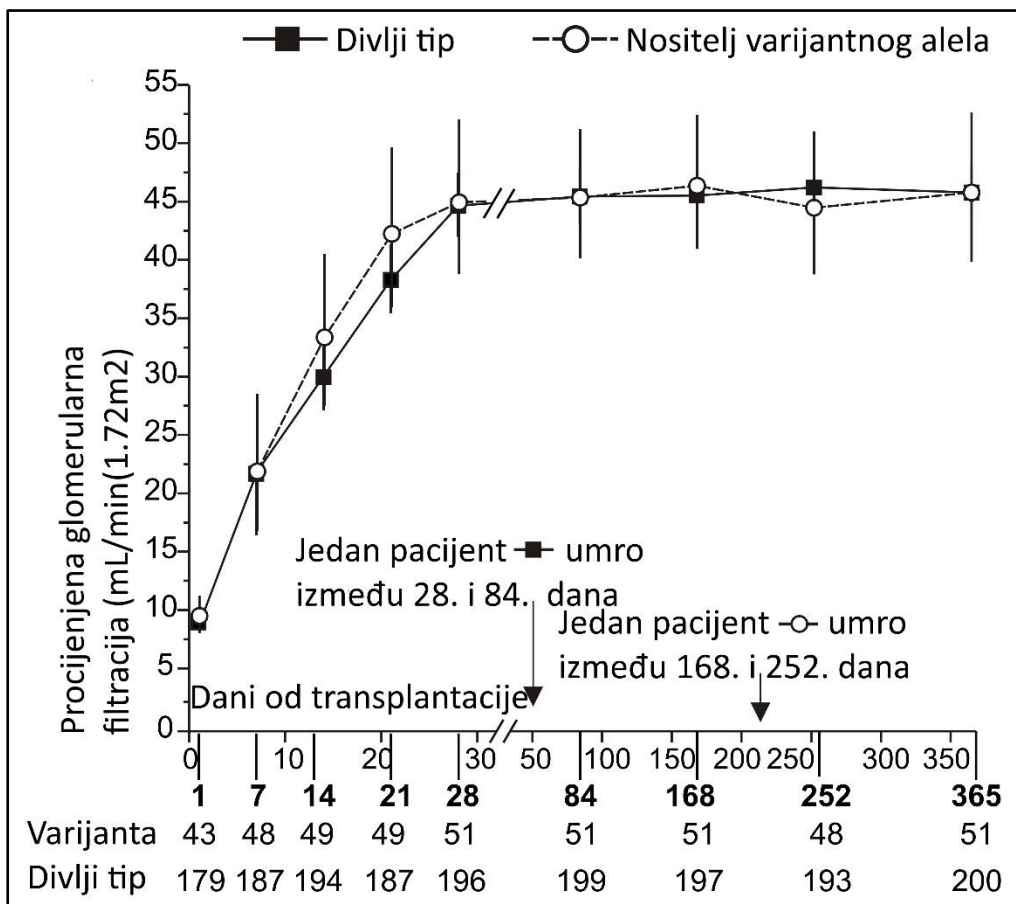
Tablica 12. Genotipovi polimorfizama od interesa (*IMPDH2* 3757T>C, rs11706052, *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642)), te ostali polimorfizmi kao kovarijable

POLIMORFIZAM	PREVALENCIJA	POLIMORFIZAM	PREVALENCIJA
<i>IMPDH2</i> 3757T>C (rs11706052)		<i>Ostali polimorfizmi</i>	
TT	202 (79.5)	<i>ABCG2</i> c.421C>A (rs2231142)	
TC	50 (19.7)	CC	208 (81.9)
CC	2 (0.8)	CA	43 (16.9)
<i>Učestalost varijantnog alela</i>	54 (10.6)	AA	3 (1.2)
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A (rs2032582)		<i>Učestalost varijantnog alela</i>	49 (9.6)
GG	78 (30.7)		
GT	117 (46.1)	<i>SLCO1B1</i> 521T>C (rs4149056)	
GA	8 (3.2)	TT	168 (66.1)
TT	48 (18.9)	TC	77 (30.3)
AA	1 (0.4)	CC	9 (3.5)
TA	2 (0.8)	<i>Učestalost varijantnog alela</i>	95 (18.7)
Homozigot divljeg tipa	78 (30.7)		
Heterozigot	125 (49.2)	<i>UGT1A9</i> -275T>A (rs6714486)	
Variant homozigot	51 (20.1)	TT	235 (92.5)
<i>Učestalost varijantnog alela</i>	227 (44.7)	TA	18 (7.1)
<i>ABCB1</i> 1236C>T (rs1128503)		AA	1 (0.4)
CC	78 (30.7)	<i>Učestalost varijantnog alela</i>	20 (3.9)
CT	123 (48.4)		
TT	53 (20.9)	<i>UGT1A9</i> -2152C>T (rs17868320)	
<i>Učestalost varijantnog alela</i>	229 (45.1)	CC	235 (92.5)
<i>ABCB1</i> 3435C>T (rs1045642)		CT	19 (7.5)
CC	54 (21.2)	TT	0
CT	134 (52.8)	<i>Učestalost varijantnog alela</i>	19 (3.7)
TT	66 (26.0)	<i>UGT1A9</i> -275/-2152diplotype <sup>2</sup>	
<i>Učestalost varijantnog alela</i>	266 (52.4)	Homozigot divljeg tipa	235 (92.5)
Varijantni aleli po <i>ABCB1</i> diplotipu <sup>1</sup>		Heterozigot	19 (7.5)
0-1 varijanta alela	72 (28.4)		
2-3 varijanta alela	103 (40.5)		
4-6 varijanta alela	79 (31.1)		

<sup>1</sup> Tri *ABCB1* polimorfizma su bila u snažnoj LD: 2677G>T/A vs. 1236 C>T ( $D'=0.892$ ,  $r^2=0.784$ ,  $\text{Chi}^2=199.1$ ), 2677G>T/A vs. 3435C>T ( $D'=0.776$ ,  $r^2=0.442$ ,  $\text{Chi}^2=112.3$ ) i 1236C>T vs. 3435C>T ( $D'=0.713$ ,  $r^2=0.379$ ,  $\text{Chi}^2=96.3$ ) <sup>2</sup> Dva *UGT1A9* polimorfizma su bila u potpunoj LD:  $D'=1.0$ ,  $r^2=0.948$ ,  $\text{Chi}^2=240.8$

### 5.3. Utjecaj polimorfizma *IMPDH2 3757T>C* (rs11706052) na bubrežnu funkciju presatka u 1. godini nakon transplantacije

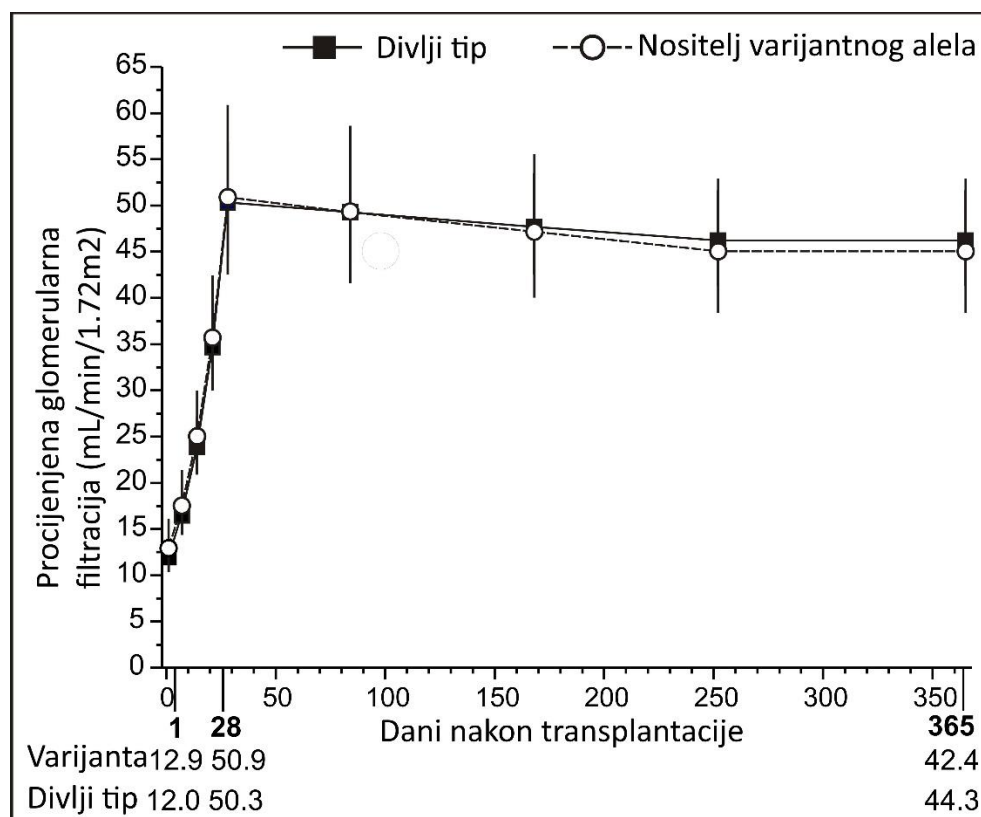
U liječenoj skupini, 44/52 (85%) ispitanika bilo je kontinuirano izloženo *MPA*, 4/52 (7,7%) bilo je izloženo tijekom 7 posjeta, 2/52 (3,3%) bilo je izloženo tijekom 5 posjeta, a 2 (3,3%) bili su izloženi tijekom jednog mjeseca u ranoj fazi liječenja. U kontrolnoj skupini, 182/202 (90%) bilo je izloženo *MPA* kontinuirano, 12/202 (5,9%) bilo je izloženo tijekom 6-7 posjeta, 1/202 (0,5%) tijekom 5 posjeta i 7/202 (3,5 %) bili su izloženi tijekom jednog mjeseca u ranoj fazi liječenja. U obje skupine, gotovo svi pacijenti dali su 7-9 vrijednosti *eGFR* N=49 (94,2%) u liječenim i N=189 (93,5%) u kontrolnim skupinama, s najmanjim brojem vrijednosti *eGFR* od 5 (slika 14). Vrijednosti grubog *eGFR*-a bile su vrlo slične u dvije skupine tijekom vremena, s dosljednim povećanjem do 28. dana i prilično stabilnim kasnijim razinama (slika 14).



Slika 14. Grubi *eGFR* tijekom vremena u nositelja varijante *IMPDH2 3757T>C* (genotip TC ili CC, tretirani) i kontrole divljeg tipa (genotip TT). Podaci su geometrijske sredine s 95% CI. Prikazana su dva pacijenta koja su umrla i broj pacijenata po podskupu koji daje podatke u svakoj vremenskoj točki. Među 52 nositelja varijante (liječenih) 44 (84,6%) dalo je sve vrijednosti, 5 (9,6%) dalo je 7 vrijednosti, a 3 (5,8%) dalo je 5-6 vrijednosti. Od 202 kontrole 178 (88,1%) dalo je sve vrijednosti, 11 (5,4%) dalo je 7 vrijednosti, a 13 (6,4%) dalo je 5-6 vrijednosti.

## Analiza uravnoteženih podataka

Nakon uravnoteženja kovarijabla i s prilagodbom za vremenski promjenjive kovarijable, *eGFR* bili su praktički identični u liječenih i kontrolnih (Slika 15). Promjena *eGFR* (povećanje od oko 5,5%/dan) do 28. dana (tablica 13), te između 28. i 365. dana (trend blagog pada) (tablica 10) bili su praktički identični u dvije skupine ( $GMR=1,01$ , 95%CI) 0,93-1,09, i  $GMR=1,01$ , 95% CI 0,99-1,02, redom). Sukladno tome, prilagođene geometrijske srednje vrijednosti *eGFR* 1., 28. i 365. dana bile su praktički identične u liječenih i kontrolnih skupina (tablica 13).



Slika 15. Prilagođene *eGFR* tijekom vremena u nositelja varijante *IMPDH2 3757T>C* (genotip TC ili CC, tretiran) i kontrole divljeg tipa (genotip TT). Podaci su geometrijske sredine (95%CI). Prikazane su prilagođene geometrijske srednje vrijednosti 1., 28. i 365. dana.

Tablica 13. Kombinirani primarni i komplementarni ishodi: prilagođene procijene brzine promjene (nagib) *eGFR* od 1. do 28. dana i od 28. do 365. dana nakon transplantacije; vrijednosti *eGFR* u danima 1, 28 i 365 u nositelja alela varijante *IMPDH2 3757T>C* (liječenih) i kontrola divljeg tipa. Razlike između liječenih i kontrola izražene su kao *GMR* (74).

	Varijantni aleli (95%CI)	Divlji tip (95%CI)	GMR (95%CI)
<i>Kombinirani primarni ishodi</i>			
Nagib Dan 1-28 ( <i>eGFR</i> /dan) (%)	5.5 (4.7-6.2)	5.4 (5.0-5.8)	1.01 (0.93-1.09)
Nagib Dan 28-365 ( <i>eGFR</i> /28 dana) (%) <sup>1</sup>	-1.7 (-2.7, -0.8)	-1.2 (-1.7, -0.7)	1.01 (0.99-1.02)
<i>Komplementarni podaci</i>			
<i>eGFR</i> Dan 1 (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	12.4 (9.9-15.5)	12.4 (10.6-14.4)	1.00 (0.80-1.25)
<i>eGFR</i> Dan 28 (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	52.0 (43.6-62.2)	50.9 (45.1-57.3)	1.02 (0.87-1.20)
<i>eGFR</i> Dan 365 (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	42.1 (35.8-49.6)	43.9 (39.3-49.0)	0.96 (0.83-1.11)

<sup>1</sup>Nagib od 28. dana do 365. dana imao je negativan predznak u obje skupine pacijenata. Razlika (74) odnosi se na apsolutne vrijednosti, stoga nagibi od -1.7%/28 dana te od -1.2%/28 dana daju GS=1.01

## Osjetljivost na nemjerljive *confoundere*

Procijenjene razlike (*GMR*) između liječenih i kontrolnih skupina u pogledu nagiba *eGFR* do 28. dana i između 28. i 365. dana ostale su u potpunosti unutar konvencionalnih granica ekvivalencije (*GMR* 0,80 do 1,25) (tj. između -20% do +20% razlike u nagibi) čak i nakon korekcije za jaki hipotetski učinak odstupanja (tablica 14).

Tablica 14. Osjetljivost procijenjenih utjecaja alela varijante *IMPDH2 3757T>C* (genotip TC ili CC, liječenje) vs. genotip divljeg tipa (TT, kontrolna skupina) na primarne ishode: nagib procijenjene *eGFR* do 28. dana i od 28. dana do 365. dana. Pretpostavili smo postojanje hipotetske nekontrolirane (nemjerene) kovarijable (ili skupa kovarijabli) s ukupnom učestalošću od 58% i velikim stupnjem odstupanja izraženim kao omjer geometrijske sredine (75) od 0.60 ili 0.79. Ispravili smo opažene učinke (GS-ove) za učinak odstupanja pretpostavljajući visoko vjerojatnost neravnoteže u učestalosti učinka odstupanja za liječene i kontrolnu skupinu 1,5:1,0 ili 1,0:1,5 i 2,0;1,0 ili 1,0:2,0 (za detalje pogledati u tekstu Analiza podataka)

Ishod	Promatrana GS	Pristrana GS	Učestalost pogreške varijabli	Ispravljena GS
Nagib do 28. dana	1.01 (0.93-1.09)	0.60	41/52 (79%) varijanta vs. 106/202 (52%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.5:1.0	1.16 (1.07-1.25)
			22/52 (42%) varijanta vs. 125/202 (62%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.0:1.5	0.91 (0.84-0.98)
		0.79	50/52 (96%) variant vs. 97/202 (48%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 2.0:1.0	1.14 (1.05-1.23)
			17/52 (32%) varijanta vs. 130/202 (64%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.0:2.0	0.94 (0.86-1.01)
Nagib od 28. do 365. dana	1.01 (0.99-1.02)	0.60	41/52 (79%) varijanta vs. 106/202 (52%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.5:1.0	1.16 (1.14-1.17)
			22/52 (42%) varijanta vs. 125/202 (62%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.0:1.5	0.91 (0.89-0.92)
		0.79	50/52 (96%) varijanta vs. 97/202 (48%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 2.0:1.0	1.14 (1.12-1.15)
			17/52 (32%) varijanta vs. 130/202 (64%) wt Varijanta omjera neuravnoteženosti vs. wt: 1.0:2.0	0.94 (0.92-0.95)



5.4. Povezanost polimorfizma *IMPDH2 3757T>C* (rs11706052) s akutnim odbacivanjem presatka u 1. godini nakon transplantacije bubrega

Kumulativna incidencija smrti, zatajenja presatka i biopsija bubrega bila je slična u liječenih i kontrolnih skupina (prilagođene stope 0,25 prema 0,21 događaj/pacijent/godina) (tablica 15).

5.5. Utjecaj polimorfizma *IMPDH2 3757T>C* (rs11706052) na preživljenje presatka i preživljenje pacijenta u 1. godini nakon transplantacije bubrega

Po jedan pacijent u svakoj skupini je preminuo tijekom promatranog razdoblja (slika 14) pri čemu su oba smrtna slučaja bila povezana s gubitkom presatka.

Kumulativna incidencija smrti, zatajenja presatka i biopsija bubrega bila je slična u liječenih i kontrolnih skupina (prilagođene stope 0,25 prema 0,21 događaj/pacijent/godina) (tablica 15).

5.6. Povezanost polimorfizma *IMPDH2 3757T>C* (rs11706052) s učestalošću nuspojava, tumora i infekcija u 1. godini nakon transplantacije bubrega

Kumulativna incidencija smrti, novonastalih karcinoma i nuspojava bila je slična u liječenih i kontrolnih skupina (prilagođene stope 0,78 prema 0,96, respektivno) (tablica 15).

Tablica 15. Neželjeni događaji (AE - eng. *adverse events*) i nepovoljni ishodi vezani uz bubrege (neobrađeni podaci i prilagođene procjene) kod nositelja *IMPDH2 3757T>C* alela (liječeni) i divljeg tipa (kontrolna skupina). Razlike između tretiranih nositelja i kontrolne skupine izražene su kao relativni rizik (RR).

	Varijantni alel	Divlji tip	RR (95%CI)
N	52	202	
<i>Nepovoljni ishodi vezani uz bubrege</i>			
Smrt	1 (otkazivanje presatka)	1 (otkazivanje presatka)	---
Odbacivanje presadaka	2 (1 smrt)	1 (smrt)	---
N sa indikacijom za renalnu biopsiju	11 (21.1)	30 (14.8)	---
Ukupan broj renalnih biopsija	12	35	---
Umrli ili otkazivanja presadaka ili biopsija	12 (23.1)	31 (15.3)	---
Ukupno umrlih, otkazivanja, ili biopsija	14	36	---
Prilagođena stopa smrti, otkazivanja, biopsija /1 o-g	0.25 (0.09-0.67)	0.21 (0.11-0.40)	1.19 (0.58-2.44)
<i>Nepovoljni događaji (AE)</i>			
Citopenija stupnja $\geq 3^1$	9 (17.3)	27 (13.4)	---
Ostali događaji (AE) stupnja $\geq 2^2$	18 (34.6)	79 (39.1)	---
Novonastali karcinom	0	3	---
Smrt ili barem jedan AE	23 (44.2)	94 (46.5)	---
Ukupno AE-ova (smrti, AE-ovi, novonastali karcinomi)	38	173	---
Prilagođena stopa AE-ova /1 o-g	0.78 (0.48-1.27)	0.86 (0.55-1.37)	0.90 (0.55-1.48)

<sup>1</sup>Anemija ili trombocitopenija ili leukopenija *CTCAE* trećeg ili višeg stupnja

<sup>2</sup> Događaji štetni za gastrointestinalni sustav, respiratorne infekcije, infekcije urinarnog trakta ili događaji štetni za centralni neurološki sustav *CTCAE* drugog ili višeg stupnja. Nijedan pacijent nije bio dijagnosticiran sa citomegalovirusnom infekcijom ili herpes simplex virus infekcijom

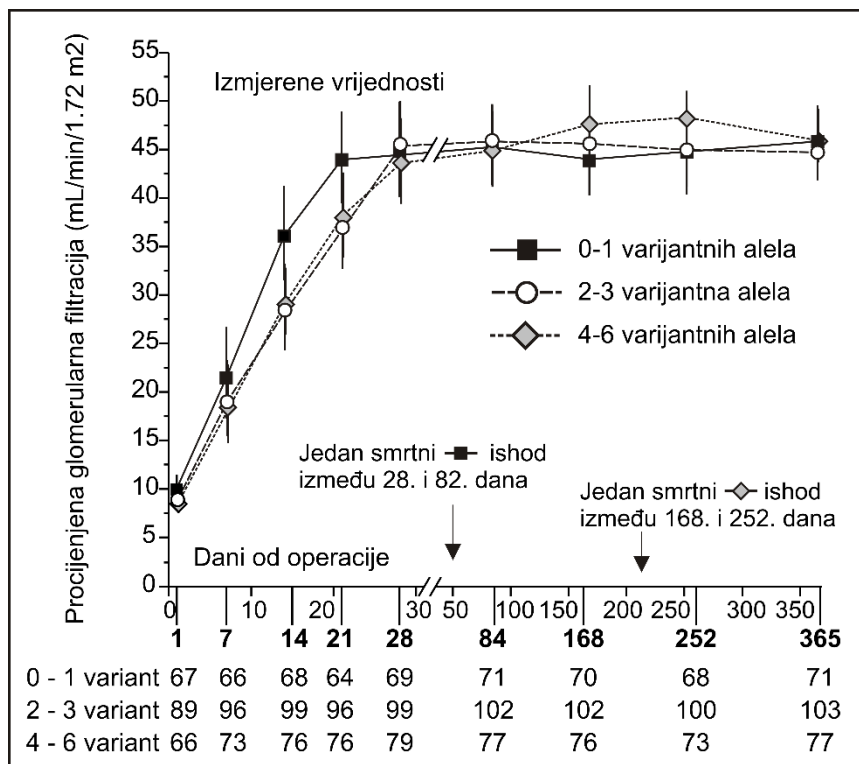
5.7. Učestalost polimorfizma gena *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642)

Od 254 uključena pacijenta, 72 (28,4%) su imala 0 ili 1 varijantu alela u tri *ABCB1* SNP-a, tj. bili su "pretežno subjekti divljeg tipa" i smatrani su kontrolnim, 103 (40,5%) bolesnika imala su 2-3 varijante alela (liječeni, smatrani "niskom dozom"), a 79 (31,1%) imalo je 4-6 varijantnih alela (liječeni, smatrani "visokom dozom") (tablica 12).

5.8. Utjecaj polimorfizma polimorfizma *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) na bubrežnu funkciju presatka u 1. godini nakon transplantacije

Od 72 kontrolna bolesnika, 65 (90,3%) bilo je izloženo *MPA* tijekom čitavog razdoblja, 4 (5,6%) su bila izložena tijekom 7 posjeta, 1 (1,4%) bio je izložen tijekom 5 posjeta, a 2 (2,7%) bila su izložena tijekom jednog mjeseca u ranoj fazi liječenja. Od 103 bolesnika liječena "niskom dozom" 95 (92,2%) bilo je izloženo *MPA* tijekom čitavog razdoblja, 3 (3,0%) su bila izložena tijekom 7 posjeta, 1 (1,0%) je bio izložen tijekom 5 posjeta, a 2 (2,0%) su bila izložena tijekom najmanje mjesec dana u ranoj fazi liječenja. Od 79 pacijenata liječenih "visokim dozama", 72 (91,1%) su bila izložena *MPA* tijekom cijelog perioda, 3 (3,8%) su bila izložena tijekom 7 posjeta, a 4 (5,1%) su bila izložena najmanje mjesec dana tijekom rane faze liječenja.

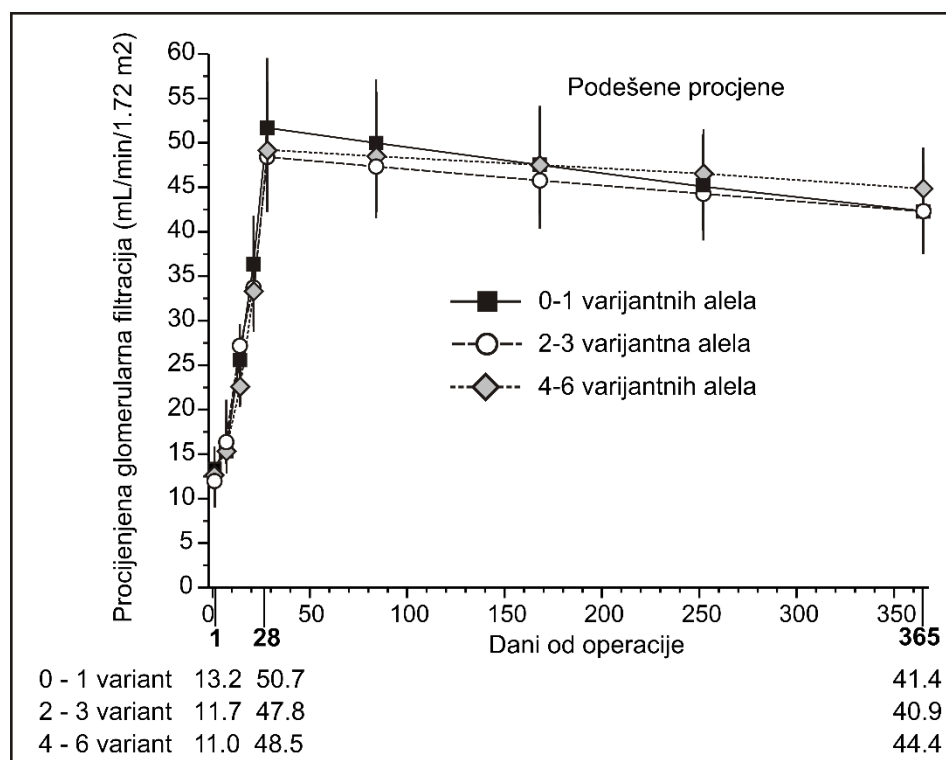
Gotovo svi pacijenti u tri podskupine imali su 7-9 vrijednosti *eGFR* [65/72 (90,3%) kontrole (od ostalih, 5 je imalo 6, a dva 5 vrijednosti); 98/103 (95,1%) liječeno "niskom dozom" (preostalih 5 imalo je 6 vrijednosti); 76/79 (96,2%) liječenih "visokom dozom" (preostala 3 imala su 5 ili 6 vrijednosti)]. Procijenjene vrijednosti *eGFR*-a činile su se vrlo sličnima u tri podskupine tijekom promatranog razdoblja (slika 16).



Slika 16. Procijenjene vrijednosti *eGFR*-a tijekom vremena u tri podskupine pacijenata na temelju broja varijanti alela u tri *ABCB1* SNP-a (0-1 (kontrolne), 2-3 (liječeni, "niska doza"), 4-6 (liječeni, "visoke doze")). Podaci su geometrijske sredine s 95% CI. Prikazana su dva pacijenta koji su umrli i broj pacijenata po podskupu koji daje podatke u svakoj vremenskoj točki.

## Analiza uravnoteženih podataka

Kontrola (0-1 *ABCB1* varijanta alela) i dvije podskupe liječenih pacijenata (2-3 (niska doza) ili 4-6 (visoka doza) varijanta alela) brojčano su se donekle razlikovale u pogledu broja osnovnih kovarijabli (tablica 11). Razlike između tri skupine općenito su bile umjerene – najveća standardizirana srednja razlika u paru (max d) bila je 0,386 koja se odnosila na udjele pacijenata koji su istodobno liječeni CsA ili takrolimusom (tablica 11). Uravnoteženje kovarijabli omogućilo je izvrsnu ravnotežu među skupinama: sve max d vrijednosti bile su <0,1 (tablica 12). Uz dodatnu prilagodbu za vremenski promjenjive kovarijable (korištenje *MPA*, korištenje/tip *CNI*, indeks tjelesne mase i najniže koncentracije *CNI*), vrijednosti *eGFR* tijekom vremena bile su vrlo slične u sve tri skupine (slika 17). Stoga su nagibi *eGFR* do 28. dana i između 28. i 365. dana bili vrlo slični između pacijenata liječenih niskom ili visokom dozom i kontrolnih bolesnika (tablica 16).



Slika 17. Prilagođene procjene *eGFR*-a tijekom promatranog vremena u tri podskupa pacijenata temeljem broja varijantnih alela kod tri *ABCB1* SNP-a (0-1 (kontrola), 2-3 (tretirani, "niska doza"), 4-6 (tretirani, "visoka doza")). Podaci su geometrijske sredine s 95% intervalom pouzdanosti. Prikazane su geometrijske srednje vrijednosti *eGFR*-a u 1., 28. i 365. danu.

Tablica 16. Prilagođene procjene (95% CI) za kombinirane primarne i komplementarne ishode.

	Kontrolni	Niska doza	Visoka doza
<i>Kombinirani primarni ishodi</i>			
Nagib Dan 1-28 (eGFR/dan) (%)	5.1 (4.6-5.6)	5.3 (4.8-5.8)	5.6 (5.1-6.2)
GS vs. Kontrolni	---	1.02 (0.95-1.09)	1.05 (0.98-1.13)
Nagib Dan 28-365 (eGFR/28 dana) (%) <sup>1</sup>	-1.7 (-2.5, -0.8)	-1.4 (-2.2, -0.6)	-0.8 (-1.4, -0.1)
GS vs. Kontrolni	---	1.00 (0.99-1.01)	0.99 (0.98-1.01)
<i>Komplementarni ishodi</i>			
eGFR dan 1	13.8 (11.1-15.7)	11.7 (9.8-14.1)	11.0 (9.1-13.3)
GS vs. Kontrolni	---	0.89 (0.72-1.10)	0.83 (0.69-1.03)
eGFR dan 28	50.7 (44.2-58.2)	47.8 (41.9-54.6)	48.5 (42.1-55.9)
GS vs. Kontrolni	---	0.94 (0.82-1.08)	0.96 (0.83-1.10)
eGFR dan 365	41.4 (36.7-46.6)	40.9 (35.9-46.7)	44.4 (39.4-50.0)
GS vs. Kontrolni	---	0.99 (0.87-1.12)	1.07 (0.96-1.20)

<sup>1</sup>Nagib od 28. dana do 365. dana imao je negativan predznak u svim skupinama pacijenata. Gdje je nagib manje negativan u usporedbi s kontrolom, GS teži vrijednostima manjim od 1,0.

### Osjetljivost na nemjerljive *confoundere*

Sve procjene učinaka "opterećenja" varijantnog alela kroz tri *ABCB1* SNP-a na *eGFR*, tj. nagib do 28. dana i nagib između 28. dana i 365. dana ostale su unutar konvencionalnih granica jednakosti (0,80 do 1,25 za 95% CI oko *GMR*) čak i nakon korekcije za veliki hipotetski učinak odstupanja i značajnu hipotetsku neravnotežu između liječenih i kontrola u pogledu prevalencije (hipotetskih) varijabli odstupanja (tablica 17).

Tablica 17. Osjetljivost procijenjenih utjecaja "niskih doza" i "visokih doza" (u usporedbi s kontrolnom) varijantnih alela kod tri *ABCB1* polimorfizma na primarne ishode: nagib *eGFR* do 28. dana i od 28. dana do 365. dana. Pretpostavili smo postojanje hipotetske nekontrolirane (nemjerene) kovarijable (ili skupa kovarijabli) s ukupnom učestalošću od 58%, i velikim stupnjem odstupanja izraženim kao omjer geometrijske sredine (74) od 0.60 ili 0.79. Ispravili smo opažene učinke (GS-ove) za učinak odstupanja pretpostavljajući visoko vjerojatnost neravnoteže u učestalosti učinka odstupanja za liječene i kontrolnu skupinu 1,5:1,0 ili 1,0:1,5 i 2,0;1,0 ili 1,0:2,0.

Ishod	Promatrana GS	Odstupanje GS-a	Učestalost pogreške varijabli	Ispravljeni GS
Nagib do 28. dana Niska doza vs. kntrl Visoka doza vs. kntrl	1.02 (0.95-1.09)	0.60	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola: 1.5:1.0 69/103 (67%) niska doza vs. 32/72 (44%) kntrl	1.15 (1.07-1.23)
	1.05 (0.98-1.13)	0.60	55/79 (69%) visoka doza vs. 33/72 (46%) kntrl	1.18 (1.10-1.27)
	1.02 (0.95-1.09)	0.60	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola: 1.0:1.5 49/103 (48%) niska doza vs. 52/72 (72%) kntrl	0.90 (0.84-0.96)
	1.05 (0.98-1.13)	0.60	37/79 (47%) visoka doza vs. 51/72 (71%) kntrl	0.93 (0.86-1.00)
	1.02 (0.95-1.09)	0.79	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 2.0:1.0 75/103 (73%) niska doza vs. 26/72 (36%) kntrl	1.11 (1.04-1.19)
	1.05 (0.98-1.13)	0.79	60/79 (76%) visoka doza vs. 28/72 (39%) kntrl	1.15 (1.07-1.23)
	1.02 (0.95-1.09)	0.79	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 1.0:2.0 42/103 (41%) niska doza vs. 59/72 (82%) kntrl	0.92 (0.86-0.99)
	1.05 (0.98-1.13)	0.79	31/79 (39%) visoka doza vs. 57/72 (79%) kntrl	0.99 (0.89-1.03)
Nagib od 28. do 365. dana	1.00 (0.99-1.01)	0.60	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 1.5:1.0 69/103 (67%) niska doza vs. 32/72 (44%) kntrl	1.13 (1.11-1.14)
	0.99 (0.98-1.01)	0.60	55/79 (69%) visoka doza vs. 33/72 (46%) kntrl	1.12 (1.10-1.14)
	1.00 (0.99-1.01)	0.60	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 1.0:1.5 49/103 (48%) niska doza vs. 52/72 (72%) kntrl	0.88 (0.87-0.89)
	0.99 (0.98-1.01)	0.60	37/79 (47%) visoka doza vs. 51/72 (71%) kntrl	0.87 (0.86-0.89)
	1.00 (0.99-1.01)	0.79	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 2.0:1.0 75/103 (73%) niska doza vs. 26/72 (36%) kntrl	1.09 (1.08-1.10)
	0.99 (0.98-1.01)	0.79	60/79 (76%) visoka doza vs. 28/72 (39%) kntrl	1.08 (1.08-1.10)
	1.00 (0.99-1.01)	0.79	Omjer neravnoteže tretirani vs. kontrola 1.0:2.0 42/103 (41%) niska doza vs. 59/72 (82%) kntrl	0.91 (0.90-0.92)
	0.99 (0.98-1.01)	0.79	31/79 (39%) visoka doza vs. 57/72 (79%) kntrl	0.90 (0.89-0.92)



5.9. Povezanost polimorfizma gena *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) s akutnim odbacivanjem presatka u 1. godini nakon transplantacije

Učestalost neželjenih događaja povezanih s presađivanjem (smrti, otkazivanje presatka, biopsije bubrega) i (vjerojatnih) štetnih događaja povezanih s terapijom (citopenija, druge nuspojave, smrti, infekcije) bila je vrlo niska. Zbog toga se ne može donositi valjani konačni zaključak, ali stope (uključujući ponovljene događaje) činile su se vrlo sličnim u tri podskupine pacijenata (tablica 18).

5.10. Utjecaj polimorfizma gena *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) na preživljenje presatka i preživljenje pacijenta u 1. godini nakon transplantacije

Po jedan pacijent u svakoj skupini je preminuo tijekom promatranog razdoblja (slika 16) pri čemu su oba smrtna slučaja bila povezana s neuspjehom presatka.

Učestalost neželjenih događaja povezanih s presađivanjem (smrti, otkazivanje presatka, biopsije bubrega) i (vjerojatnih) štetnih događaja povezanih s terapijom (citopenija, druge nuspojave, smrti, infekcije) bila je vrlo niska. Zbog toga se ne može donositi valjani konačni zaključak, ali stope (uključujući ponovljene događaje) činile su se vrlo sličnim u tri podskupine pacijenata (tablica 18).

5.11. Povezanost polimorfizma gena *ABCB1* c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) i c.3435C>T (rs1045642) s učestalošću nuspojava, tumora i infekcija u 1. godini nakon transplantacije

Učestalost neželjenih događaja povezanih s presađivanjem (smrti, otkazivanje presatka, biopsije bubrega) i (vjerojatnih) štetnih događaja povezanih s terapijom (citopenija, druge nuspojave, smrti, infekcije) bila je vrlo niska. Zbog toga se ne može donositi valjani konačni zaključak, ali stope (uključujući ponovljene događaje) činile su se vrlo sličnim u tri podskupine pacijenata (tablica 18).

Tablica 18. Neželjeni ishodi povezani s transplantatom i (eventualno) nepoželjni događaji (ND) povezani s terapijom: grubi podaci i prilagođene procjene u podskupovima pacijenata temeljenim na broju varijantnih alela kod tri *ABCB1* SNP-a [0-1 (kontrolni), 3-4 (niska doza) i 4-6 (visoka doza)].

	Kontrolni	Niska doza	Visoka doza
N	72	103	79
<i>Nepovoljni ishodi vezani uz bubrege</i>			
Smrt	1 (otkazivanje transplantata)	1 (otkazivanje transplantata)	0
Odbacivanje transplantata	1 (smrt)	1 (smrt)	1
N sa indikacijom za renalnu biopsiju	17 (23.6)	15 (14.6)	9 (11.4)
Ukupan broj renalnih biopsija	20	17	10
Umrli ili otkazivanja presadaka ili biopsija	18 (25.0)	15 (14.6)	10 (12.7)
Ukupno umrlih, otkazivanja, ili biopsija	21	18	11
Prilagođena stopa smrti, otkazivanja, biopsija /1 o-g	0.38 (0.20-0.73)	0.22 (0.08-0.55)	0.18 (0.07-0.37)
Prilagođeni RR (95%CI) vs. Kontrolni	---	0.55 (0.26-1.14)	0.46 (0.21-0.97)
<i>Nepovoljni događaji (3)</i>			
N s citopenijom stupnja $\geq 3^1$	9 (12.5)	18 (17.5)	9 (11.4)
N s ostalim ND-om stupnja $\geq 2^2$	28 (38.9)	37 (35.9)	32 (40.5)
N s novonastalim karcinomom	1	0	2
Ukupno ND-ova (smrti, ND-ova, karcinoma)	56	101	72
Prilagođena stopa ND-ova /1 o-g	0.67 (0.40-1.10)	0.80 (0.54-1.24)	0.77 (0.54-1.24)
Prilagođeni RR (95%CI) vs. Kontrolni	---	1.19 (0.77-1.85)	1.17 (0.74-1.85)

## 6. RASPRAVA

Suvremeni pravci u eri personalizirane medicine streme terapiji prilagođenoj svakom pojedincu – individualnom pristupu. Genske analize u sklopu farmakogenetičkog testiranja i prilagođavanje terapije temeljeno na genskoj konstituciji osobe otvaraju nove perspektive u transplantacijskoj medicini. Cilj je optimizacija terapije, smanjenje nuspojava i produljenje vijeka transplantiranog organa. Upravo su zato farmakogenetička istraživanja bitna kako bi se odgovorilo na pitanje kako genski polimorfizmi utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku immunosupresivnih lijekova, te posredno na ishode transplantacije.

Ovo istraživanje nastojalo je pridonijeti saznanjima o važnosti genotipizacije bolesnika koji primaju immunosupresivnu terapiju. Nastojalo se odgovoriti na dva pitanja: je li genotip *IMPDH2 3757T>C* (*rs11706052*) u primatelja bubrežnog presatka, kod kojih je *MPA* dio immunosupresije održavanja, faktor koji treba uzeti u obzir (npr. treba li prilagoditi doziranje *MPA*)? Utječu li varijante genotipa *ABCB1 c.1236C>T* (*rs1128503*), *c.2677G>T/A* (*rs2032582*) i *c.3435C>T* (*rs1045642*) primatelja bubrežnog presatka, kod kojih je *MPA* dio immunosupresije održavanja, na ishod transplantacije bubrega?

### Utjecaj SNP *IMPDH2 n.3757T>C* (*rs11706052*)

Unatoč očitim biološkim razlozima (varijantni alel povezan s većom aktivnošću *IMPDH2*, veća aktivnost *IMPDH2* povezana s rizikom od akutne reakcije odbacivanja (76, 77, 78)), nije jasno nosi li varijantni *IMPDH2 3757T>C* alel bilo kakvu važnost za ishode presatka kod primatelja čije liječenje immunosupresijom uključuje *MPA*.

Jedna analiza pacijenata iz randomizirane studije (78) sugerirala je trostruko veći rizik od biopsijom potvrđenog akutnog odbacivanja (*BPAR*, engl. *biopsy proven acute rejection*) tijekom 12 mjeseci kod nositelja varijante u usporedbi s subjektima divljeg tipa prilagođeno prema dobi, spolu, režimu ko-tretmana *CsA* i vrsti donacije. Međutim, bilo je samo 13 odbacivanja među 28 nositelja varijante (u usporedbi s 48/193 subjekata divljeg tipa) (78), a s obzirom na opseg prilagodbe (36 strata temeljenih na dobi, spolu, ko-tretmanu i vrsti donora) procijenjeni omjer izgleda vjerojatno je bio snažno vođen modelom. Osim toga, moguća je i zbunjujuća pristranost. Veće istraživanje (pacijenti *Collaborative transplant* studije, 689 divljeg tipa i 184 nositelja varijante (61)), s opsežnijom prilagodbom kovarijabli, nije pronašlo povezanost između varijantnog alela i preživljavanja presatka tijekom 5 godina ili *BPAR*-a tijekom 12 mjeseci. Sve druge studije izvještavale su samo o univarijatnim podacima (tablica 19), što onemogućuje pouzdano zaključivanje.

Tablica 19. Sažetak studija o povezanosti polimorfizma *IMPDH2* 3575T>C (rs11706052) i kliničkih ishoda (BPAR ili preživljenje presatka) kod odraslih primatelja bubrežnog presatka

Studija	Kratak pregled
Grinyo 2008 (78)	237 pacijenata iz RCT-a. Ishod: BPAR tijekom 12 mjeseci. TT 48/193 (24,9%), TC/CC 13/28 (46,4%). Rezultati: OR=3,39 (1,42-8,09) za TC/CC naspram TT, prilagođeno za dob (<50 ili ≥50 godina), spol, 3 razine doze ciklosporina, vrstu donora (kadaverični, živi nesrodni, živi srodni).
Sombogaard 2009 (76)	80 pacijenata transplantirano tijekom 1 godine. Ishod: BPAR tijekom 12 mjeseci. Rezultati: grubi omjeri: TT 15/68 (22%), TC/CC 1/12 (8,0%)
Wang 2008 (115)	169 pacijenata transplantirano tijekom 5 godina. Ishod: BPAR za 12 mjeseci. Rezultati: grubi omjeri - TT 21/153 (13,7%) vs. TC/CC 3/16 (18,8%)
Gensburger 2010 (73)	456 pacijenata iz 2 RCTa (374 TT & 82 TC/CC). Ishod: BPAR tijekom 12 mjeseci. Rezultati: univarijatni OR=0,89 (0,44-1,78) za TC/CC vs.TT.
Pazik 2011 (116)	177 pacijenata transplantirano tijekom 12 godina, praćeni tijekom 48 tjedana. Ishod: BPAR između 12 do 48 tjedna. Rezultati: grube proporcije - TT 15/135 (11,1%) vs. CT 3/24 (12,5%).
Shah 2012 (61)	Pacijenti iz studije Collaborative Transplant. TT n=689, TC/CC n=184. Ishod: preživljavanje presatka (cenzurirani za smrt) tijekom 5 godina. Rezultati: HR (TC/CC u odnosu na CC)=0,88 (0,57-1,37) prilagođeno za dob, spol, godinu i broj transplantacija, vrijeme hladne ishemije, HLA neusklađenost, primarnu bubrežnu bolest, početni režim imunosupresije i tip CNI. Također i BPAR tijekom 12 mjeseci: TT 14,0% naspram TC/CC 17,6% (podaci dostupni za 368 TT i 97 TC/CC ispitanika).
Woillard 2014 (117)	189 pacijenata iz RCT-a. Ishod: BPAR do 6 mjeseci (ukupno n=42). Rezultat: univarijatni OR=1,35 (0,56-3,24) TT u odnosu na TC/CC.
Cilião 2018 (118)	145 pacijenata praćeno prosječno 7 godina nakon transplantacije. 49 s odbacivanjem (45 TT, 4 TC/CC); 96 bez odbacivanja (70 TT, 26 TC/CC). Rezultira grubim omjerima: TT 45/115 (39,1%) u odnosu na TC/CC 4/30 (13,3%).
Winnicki 2022 (68)	277 transplantiranih pacijenata. Ishod: BPAR tijekom 12 mjeseci. Rezultat: grubi omjeri - TT 60/221 (27,1%) naspram TC/CC 24/56 (42,8%).

U ovoj studiji fokusirali smo se na funkciju presatka tijekom prve godine nakon transplantacije predstavljenu s *eGFR*. Ovaj ishod smo preferirali u odnosu na procjenu učestalosti *BPAR*-a iz više razloga: čini se da (longitudinalni) *eGFR* nije bio do sada procijenjen u ovom kontekstu (tablica 19); *eGFR* je preporučena krajnja točka za klinička ispitivanja u ovom kontekstu (98) i snažno predviđa dugoročno preživljavanje presatka (97). Osim toga, trebalo bi ga promatrati kao dopunu postojećim podacima o *BPAR*-u i preživljavanju presatka; učestalost *BPAR*-a tijekom prvih 12 mjeseci je varijabilna, ali općenito prilično niska. Budući da je prevalencija varijantnog *IMPDH2 3757T>C* alela također relativno niska (20% u ovom uzorku, slično ili malo više od prevalencije u objavljenim studijama (Tablica 16)), adekvatna procjena učinka zahtijevala bi veliki uzorak koji bi rezultirao s barem nekoliko desetaka događaja među nositeljima varijantnog alela - što nije lako ostvarivo; kao u mnogim (ili većini) centara širom svijeta (119, 120). U našem centru bubrežne biopsije se rade samo kada je klinički indicirano. Stoga smo među "ostalim ishodima" odredili proporcije pacijenata kojima su bile indicirane biopsije, kao i ukupan broj biopsija (bez obzira na nalaze).

Kao u bilo kojoj jednocentričnoj studiji, općenitost sadašnjih nalaza mogla bi biti ograničena. Međutim, početne karakteristike pacijenata, gotovo isključivo donacija kadavera i implementirani imunosupresivni protokoli općenito su slični onima u bilo kojoj kohorti primatelja bubrežnog presatka u sličnim studijama (npr. u studijama koje se bave istom temom, tablica 16). Ove karakteristike činile su se sličnim/stabilnima tijekom 6-godišnjeg razdoblja tijekom kojeg su upisani pacijenti bili podvrgnuti transplantaciji. Svjesni smo da bi studija imala koristi od ponovno procijenjenog izlaganja *MPA*-u (*AUC* 0-12 sati) - ali to nije raširena praksa - zahtijeva vrijeme i resurse i trenutno su strategije ograničenog uzorkovanja još uvijek predmet rasprave ili zahtijevaju dodatnu validaciju (121). Vjerujem, međutim, da su metode kontrole konfuzije implementirane u ovoj analizi razumno dobro "uravnotežile" "tretirane" i kontrolne subjekte u ovom pogledu. Naposljetku, moglo bi se prigovoriti da smo uključivanjem samo pacijenata s prilično stabilnim oporavkom prvog tjedna bez komplikacija uveli neku vrstu pristranosti u odabiru. U jednoj studiji na japanskim pacijentima (70) primijećene su suptilne histološke razlike u bubrežnim biopsijama na dan 28 između nositelja varijantnog alela *IMPDH1 rs2278294* i subjekata divljeg tipa. Činjenica je, međutim, da "ranije postoperativne komplikacije" uključuju kirurške komplikacije, infekcije i slične događaje koji vjerojatno nisu povezani s "liječenjem od interesa" (*IMPDH2 3757T>C* varijantni alel), ali bi mogli snažno utjecati na kasniji tijek. U isto vrijeme suptilne promjene, koje bi (barem hipotetski) mogle biti posljedica procijenjenog "liječenja", najvjerojatnije klinički ostaju neprepoznate - ali, ako postoje, vjerojatno bi se odrazile na razvoj *eGFR*-a. Dakle, implementirani kriteriji uključivanja također nisu vjerojatno izvor pristranosti u sadašnjoj analizi.

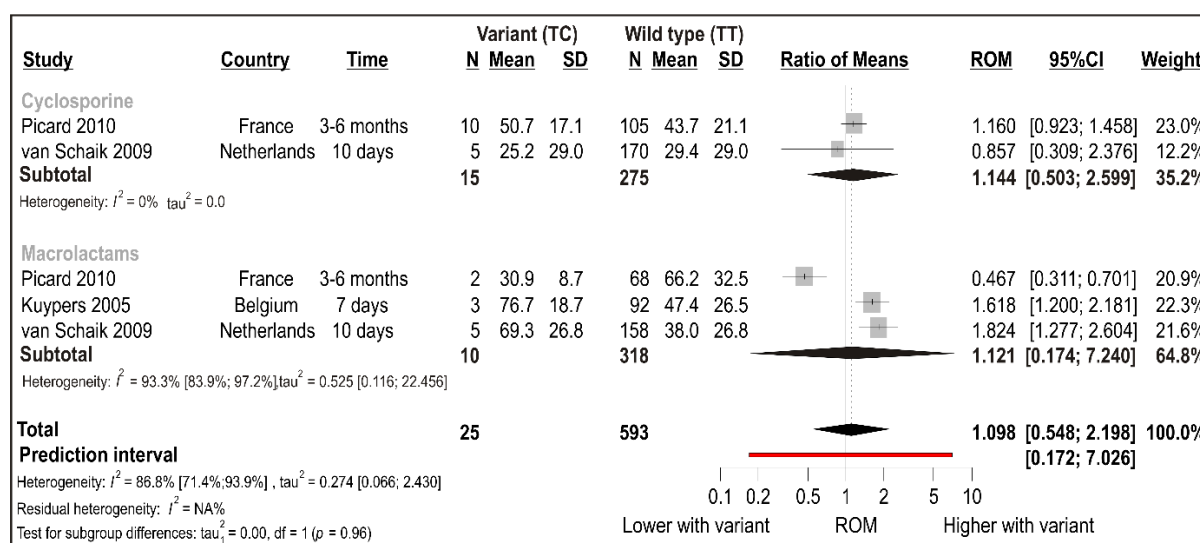
Potrebno je temeljito objasniti moguće druge izvore skrivene zbunjujuće pristranosti. Dob i zdravstveno stanje starijeg darivatelja, osobito hipertenzija i pretilost, pokazali su se kao važni prediktori smanjenog dugoročnog preživljavanja presatka u analizama nekoliko velikih baza podataka (100). U sadašnjem okruženju ti su čimbenici smatrani razumnim ostatnim *confounderima*, međutim, pretpostavlja se da "učinak" možda neće biti tako izražen kao što je sugerirano nekim ranijim analizama (100): određeno "slabljenje" dolazi od prilagodbe peritransplantacijskim čimbenicima (npr. odgođeni početak funkcije presatka, rezultati nulte biopsije); stvarni učinak dobi darivatelja može biti "značajan", ali umjeren. Nedavna analiza iz baze podataka Eurotransplanta za darivatelje umrle od moždane smrti (2006.-2018., praćenje do srpnja 2020.) (122) (od interesa za ovu studiju) odnosila se na 32958 transplantacija u 8 europskih zemalja. U modelu darivatelja i primatelja preživljenja presatka cenzuriranog smrću (na 10-godišnjem horizontu), "učinak" dobi darivatelja bio je HR=1,02, 1,02-1,02; tj. oko 21% veći neposredni rizik od zatajenja transplantata za 10 godina višu dob darivatelja (122). Puno jači prediktori u modelu bili su broj transplantata, dijabetes primatelja, cistična bolest, vrijeme čekanja i *HLA* podudarnosti.

Postoji mogući utjecaj drugih *IMPDH2* SNP-ova osim istraživanog. Identificirano je ukupno 25 varijanti (uključujući 3757T>C) *IMPDH2* (70). Kao što je nedavno sveobuhvatno pregledano i objavljeno (39), osim za 3757T>C, odnos s kliničkim ishodima istražen je za *rs121434586* (rezultira smanjenom razinom proteina i smanjenom enzimskom aktivnošću) i *rs4974081*. U ukupno 3 studije niti jedan SNP nije bio povezan s kliničkim ishodom. Teoretski, bilo koji od negenotipiziranih *IMPDH2* SNP-ova mogao bi zbuniti sadašnje procjene – ali to je vrlo malo vjerojatno.

Ne smije se zaboraviti niti utjecaj *IMPDH1* SNP-ova. Identificirane su ukupno 73 varijante *IMPDH1* (69). Kao što je nedavno pregledno izloženo (39), najmanje za 17 varijanti je procijenjena potencijalna povezanost s (bilo kojim) kliničkim ishodom. Tri varijante, dvije intronske (*rs2278293*, *rs2278294*) i jedna sinonimna (*rs2228075*) povezuju se s bubrežnim ishodima. Moguće je (premda dvosmisleno – s obzirom na kvalitetu/ograničenja studije i proturječna izvješća) da bi nositelji varijantnog alela *rs2278293* i/ili *rs2278294* mogli imati smanjeni rizik od akutnog odbacivanja tijekom prve godine.

Postoje i SNP-ovi u genima koji kodiraju enzime i prijenosnike uključene u farmakokinetiku *MPA*. Odabir SNP-ova enzima/transportera, koji se u ovoj analizi smatraju kovarijablama, bio je rezultat kompromisa između njihovih prethodno prijavljenih povezanosti s izloženošću *MPA* i *CNI* (39, 41, 74, 101, 102) i izvedivosti. Ovdje se govori o potencijalnoj relevantnosti onih koji nisu genotipizirani. *UGT1A9\*3* (c.98T>C, *rs72551330*) rezultira smanjenom enzimskom aktivnošću in vitro (36). Korištenjem nedavnih sustavnih pregleda (39, 74) i dodatnim pretraživanjem *PubMed Medline* identificirane su 3 studije (europski pacijenti s transplantiranim bubregom) (123, 124, 125) koje su prijavile neobrađene (neprilagođene za potencijalne kovarijable) *AUC*-ove u stanju dinamičke

ravnoteže ( $AUC_{Cr,ss}$ ) za varijantni genotip (TC) u odnosu na pacijente divljeg tipa (TT) na MMF-u koji su istodobno liječeni ciklosporinom (2 skupine) ili makrolaktamima (3 skupine). Temeljem toga provedena je meta-analiza nasumičnog učinka (paket meta u R (126)) koristeći omjer srednjih vrijednosti (ROM) kao mjeru učinka (127): združene razlike TC u odnosu na TT upućuju na blagu tendenciju veće izloženosti (za oko 10%) u ispitanika s genotipom TC. Međutim, heterogenost je bila ogromna, a intervali pouzdanosti varijabilni (od 2 -puta niža do 2-2,5 puta veća izloženost), bez obzira na CNI i sveukupno (slika 18).



Slika 18. Meta-analiza studija koja izvještuje o srednjoj vrijednosti  $\pm$ SD  $MPA AUC_{0-12}$  u stanju dinamičke ravnoteže kod primatelja bubrežnog presatka liječenih MMF-om i istovremeno liječenih ciklosporinom ili makrolaktamima (takrolimus ili sirolimus) i genotipiziranih za  $UGT1A9^*3$  (c.98T>C) SNP, klasificiran kao varijantni nositelj (heterozigot, TC) naspram divljeg tipa homozigota. Mjera učinka je omjer srednjih vrijednosti (ROM, eng. *Ratio of means*).

Najuvjerljiviji nalazi pojedinačne studije bili su oni van Schaika iz 2009. godine (123). Međutim, vrlo je malo vjerojatno da su sadašnje procjene učinka  $IMPDH2$  3757T>C na  $eGFR$  bile poremećene činjenicom da nismo uzeli u obzir  $UGT1A9$  c.98T>C SNP jer: a) slika 18 prikazuje vrlo heterogene i neuvjerljive sirove podatke iz studija koje ne uzimaju u obzir bilo kakvu potencijalnu zbunjujuću pristranost; b) kao što se vidi na slici 16, nositeljstvo varijantnih alela je vrlo rijetko (oko 3%), stoga je samo oko 5-7 pacijenata u ovoj studiji bilo vjerojatnim nositeljima varijante; c) populacijske farmakokinetičke studije na francuskim (128) i kineskim (129) pacijentima nisu pronašle povezanost između ovog SNP-a i klirensa  $MPA$ .

Tri SNP-a u promotorskoj regiji  $UGT1A9$ , osim -275T>A ( $rs6714486$ ) i -2152C>T ( $rs17868320$ ) koje smo kontrolirali, povezana su s povišenim razinama  $UGT1A9$  u jetri: -440C>T ( $rs2741045$ ), -331T>C

(rs2741046) i -665C>T (rs10176426) (34, 39). Međutim, studije nisu uspjele pružiti dosljedne dokaze o povezanosti bilo kojeg od tih SNP-ova i izloženosti MPA (39); štoviše, rs6714486 i rs17868320 su u potpunom LD-u s ovim SNP-ovima i tvore dva haplotipa (UGT1A9\*1I i \*1n) (34). Stoga, kontrolom za rs6714486 i rs17868320 kontrolira se i nekoliko SNP-ova koji nisu izravno genotipizirani. Za nekoliko drugih UGT1A9 SNP-ova (rs6731242, rs13418420, rs3832043, rs2741049, rs13418420, rs17868323) nije pronađen dosljedan signal povezanosti s izloženošću MPA (39, 74, 130). Štoviše, rs6714486 i rs17868320 su u LD-u s nekima od njih (haplotipovi UGT1A91v i \*1w) (34). Sveukupno vrlo je malo vjerojatno da su UGT1A9 SNP-ovi, koji nisu bili genotipizirani (kontrolirani) pojedinačno ili kumulativno, unijeli bilo kakvu relevantnu pristranost u procjene učinka IMPDH2 3757T>C na eGFR. Nedavni sustavni pregledi (39, 74) i evaluacije (129) nisu pronašli razumne dokaze povezanosti između bilo kojeg od brojnih procijenjenih UGT2B7 SNP-ova (rs7439366, rs7668258, rs7438135, rs7662029, rs73823859, rs62298861, rs28365063) i haplotipova s izloženošću MPA, bubrežnim ili sigurnosnim ishodom. Isto se odnosi na UGT1A1, UGT1A7 i UGT1A8 SNP. Stoga je vrlo malo vjerojatno da su sadašnje procjene bile ometene činjenicom da nisu razmatrani kao kovarijable.

Aktivnost ABCC2 izbacivačkog/efluksnog transportera važan je mehanizam u farmakokinetici MPA, posebice enterohepatičke recirkulacije – dva glavna metabolita MPA, MPAG i AcMPAG supstrati su ABCC2 (41). Dobro dokumentiran i praktično relevantan učinak CsA na izloženost MPA posljedica je inhibicije ABCC2 pomoću CsA. Razumljivo, ABCC2 SNP-ovi su privukli veliku pozornost. Dva nedavna sustavna pregleda (39, 74) identificirala su ukupno 21 studiju, od kojih se 20 odnosilo, između ostalih SNP-ova, na ABCC2 c.-24C>T (rs717620) i c.1249G>A (rs2273697) SNP-ove i njihov potencijalni odnos izloženosti MPA i/ili kliničkim ishodom u primatelja bubrežnog presatka. Ostali adresirani SNP-ovi uključuju rs1885301, rs7910642, rs2804402, rs717620, rs113646094, rs113646094, rs8187694, rs17222723, rs3740066, rs8187710, rs12762549, rs280402. Ove studije nisu pružile razumne dokaze da je bilo koji od ovih SNP-ova bio relevantan za izloženost MPA ili za ishode presađivanja ili sigurnost kod pacijenata liječenih MPA. Jedna novija presječna studija (130) na 147 pacijenata (oko 3-4 godine nakon transplantacije), 82 bijelaca i 65 Afroamerikanaca, liječenih MPA i CsA (n=80) ili takrolimusom (n=67), sugerira da su ABCC2 c.-24C>T, c.1249G>A i 3972C>T (rs3740066) – kada se smatraju haplotipovima – povezani s izloženošću MPA. Iako je poznato da c.-24C>T i c.1249G>A nisu povezani, zabilježen je jak LD između svakog od ova dva SNP-a i 3972C>T. U bolesnika koji su istodobno liječeni CsA, AUC i klirens MPA bili su slični između ispitanika divljeg tipa haplotipa (CGC) i (kombiniranih) ispitanika s 3 varijante haplotipa (CGT, CAC, TGT), što se čini logičnim s obzirom na učinke CsA na ABCC2. Međutim, u bolesnika koji su istodobno liječeni takrolimusom, haplotip divljeg tipa bio je povezan s višim AUC (40 mg\*h/L) u odnosu na varijante haplotipova (20 mg\*h/L), dok je ukupni klirens iz tijela bio proporcionalno niži. Međutim, nisu provedene nikakve prilagodbe za kovarijable (npr. dob,



spol, rasa, *BMI*, razina albumina, komedijacija, komorbiditeti itd.). Uzimajući u obzir pojedinačne *SNP*-ove, čini se da je samo genotip divljeg tipa 3972C>T povezan s blago višim *AUC MPA* u odnosu na varijante nositelja alela/varijante homozigota (130). Nasuprot tome, nedavna populacijska farmakokinetička analiza (129), temeljena na 917 koncentracija *MPA* u 191 odraslog bolesnika koji su istodobno liječeni takrolimusom, nije ukazala na ikakvu važnost bilo kojeg od ova tri (i brojnih drugih enzimskih/transportnih *SNP*-ova) *SNP*-a za klirens *MPA*. Sveukupno, smatra se da je vrlo malo vjerojatno da je neuzimanje u obzir *ABCC2 SNP*-ova remetilo u sadašnjim procjenama: a) na temelju postojećih podataka nije vjerojatno da bilo koji od *ABCC2 SNP*-ova/haplotipova utječe na izloženost *MPA* u bilo kojoj relevantnoj mjeri; b) CsA je vjerojatno glavni "regulator" uloge *ABCC2* u izloženosti *MPA*. U ovoj studiji kontrolirana je (tijekom vremena) upotreba CsA ili takrolimusa, kao i najniže koncentracije *CNI*-a, i na taj su se način vjerojatno "uravnotežili" 3757T>C pacijenti divljeg tip i varijantne u dovoljnoj mjeri da se spriječi bilo kakav (ako postoji) učinak *ABCC2 SNP*(ova).

*MPA* je supstrat izbacivačkog /efluksnog proteina *ABCB1* – *SNP*-ovi u *ABCB1* privukli su također dosta pažnje u pogledu varijabilnosti farmakokinetike *MPA*. Tri genotipizirana *SNP*-a daleko su najzastupljeniji kodirajući *SNP*-ovi kod bijelaca (prevalencija manjeg alela oko 45-55%). Jedini drugi kodirajući *SNP* s minornom prevalencijom alela >1% kod bijelaca je 61A>G (*rs9282564*) – 8% (84). Od 8 studija koje su procjenjivale *ABCB1 SNP*-ove povezane s izloženošću/učincima *MPA* identificirane u nedavnim sustavnim pregledima (39, 74), sve su se bavile jednim od- ili sva tri uobičajena *SNP*-a, a samo je jedna procijenila *rs9282564* i nije prijavila povezanost ni s jednom izloženošću *MPA* ili s kliničkim događajima.

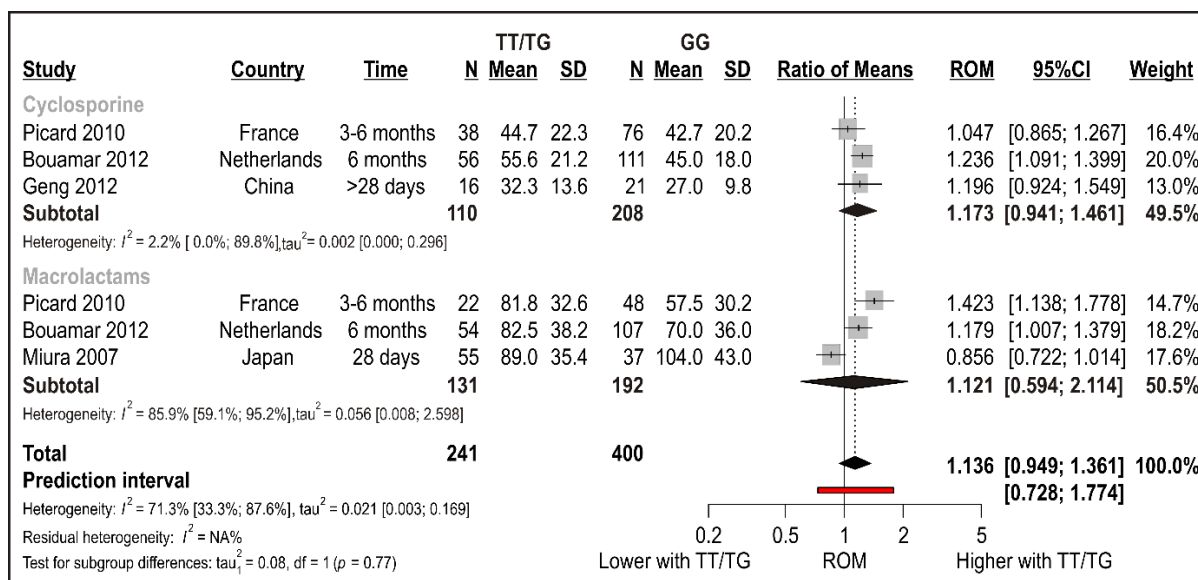
Osim c.421C>A, smanjena funkcija *ABCG2* prijavljena je za još tri *SNP*-a (*rs34783571*, *rs192169062* i *rs34264773*), za tri *SNP*-a nije prijavljen učinak na funkciju, a za ostale funkcionalne posljedice nisu poznate (131). Kumulativna prevalencija minornih alela svih *SNP*-ova "smanjene funkcije" i "nepoznatih" *SNP*-ova je oko 1,0% (131), stoga, neuzimanje u obzir drugih *SNP*-ova *ABCG2* najvjerojatnije nije utjecalo na sadašnje procjene.

*MPAG* i *AcMPAG* su supstrati za *OATP1B1* (132). I CsA i takrolimus inhibiraju *OATP1B1* (133). Gen *SLCO1B1* visoko je polimorfan sa 190 varijanti s manjom učestalošću alela >5% (133). Dvije česte nesinonimne varijante dobro su karakterizirane: 521T>C i 388A>G (*rs2306293*) u djelomičnom su LD i tvore 4 haplotipa: TA (ili divlji tip, \*1A), zatim \*1B ili TG, \*5B ili CA, \*15 ili CG. Kod bijelaca prevalencija divljeg tipa \*1A haplotipa je oko 52%, \*1B oko 27% i \*5 i \*15 oko 2,5% za svaki (133) (134). *SLCO1B1*\*15 može se dalje podijeliti na haplotipove \*16 i \*17 na temelju dva *SNP*-a promotora (učestalosti oko 8% odnosno 7%) (134). U staničnim studijama, haplotipovi \*5 i posebno \*15, tj. oni koji nose 521T>C minor alel, pokazali su smanjenu aktivnost transportera. Dakle, identifikacijom varijante 521T>C identificira se enzim smanjene funkcije (bez obzira na genotip 388A>G). Jedini drugi *SLCO1B1 SNP*

procijenjen u pogledu farmakokinetike/kliničkih ishoda *MPA* je 463C>A (rs11045819) – nije dokumentirana nikakva povezanost (39). Stoga je vrlo malo vjerojatno da je izostanak genotipizacije "drugih" *SLCO1B1* SNP-ova utjecao na rezultate ovog istraživanja.

In vitro MPAG je supstrat za OATP1B3 (124). CsA inhibira OATP1B3 (134). *SLCO1B3* je manje polimorfan od *SLCO1B1* (135). Kao što je nedavno sustavno pregledano (39, 74), četiri *SLCO1B3* SNP-a procijenjena su s obzirom na *MPA* (izloženost, klinički ishodi): c.334T>G (rs4149117), c.699G>A (rs7311358), c.767G>C (rs60140950) i rs1104585. Posljednja dva procijenjena su u samo jednoj studiji (analiza pacijenata iz Transgene studije (132)) i nisu se činila povezanim s bilo kakvim ishodom. Prva dva, c.334T>G i c.699G>A su u potpunom LD-u i tvore haplotip divljeg tipa (TG) i varijante (GA) – stoga, identifikacija nositelja varijante c.334T>G identificira varijantni haplotip.

Na temelju objavljenih sustavnih pregleda (39, 74) i *PubMed Medline* pretraživanja, identificirane su 4 studije koje izvješćuju o *AUC MPA* tijekom intervala doziranja u stanju dinamičke ravnoteže (*AUC* 0-12 (mg×h/L) izračunato na temelju koncentracija *MPA* prilagođenih dozi) u bolesnika s transplantiranim bubregom klasificiranih s obzirom na *SLCO1B3* c.334T>G SNP kao kombinirani TT/TG subjekti u odnosu na GG subjekte: jedna francuska (Picard 2010) (124) i jedna nizozemska (Bouamar 2012) (136) studija, svaka prijavljuje (odvojeno) vrijednosti kod pacijenata na MMF-u koji su istodobno liječeni ili CsA ili makrolaktamima (uglavnom takrolimusom, rjeđe sirolimusom); jedna kineska studija (Geng 2012) (137) u kojoj je MMF kombiniran s CsA; i jedna japanska studija (Miura 2007) (138) u kojoj je MMF kombiniran s takrolimusom. Sve su vrijednosti bile grube, neprilagođene srednje vrijednosti±SD *AUC* 0-12 kvantificirane u različitim vremenima nakon transplantacije. Provedena je meta-analiza nasumičnih učinaka koristeći *ROM* kao mjeru učinka (kao za sliku 18) (slika 19).

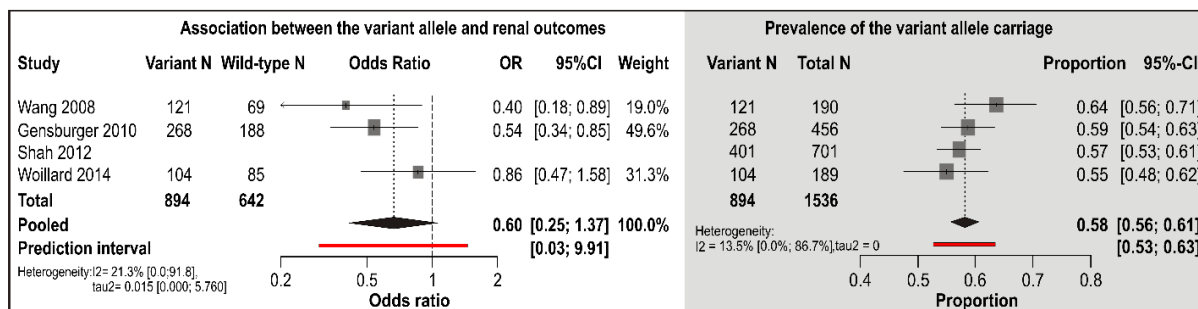


Slika 19. Meta-analiza studija koja izvještuje o srednjoj vrijednosti  $\pm$ SD  $MPA AUC_{0-12}$  u stanju dinamičke ravnoteže kod primatelja bubrežnog presatka liječenih MMF-om i istodobno liječenih CsA ili makrolaktamima (takrolimus ili sirolimus) i genotipiziranih za *SLCO1B3* c.334T>G SNP, klasificiran kao TT/TG naspram GG pacijenata. Mjera učinka je ROM.

Kod subjekata liječenih zajedno s CsA, jedna studija nije pokazala relevantnu razliku između pacijenata s TT/TG i GG, dok su dvije predložile nešto veći  $AUC$  u pacijenata s TT/TG: skupna procjena bila je  $ROM=1,173$  (0,941-1,461) (slika 19) što ukazuje na tendencija nešto veće izloženosti u bolesnika s TT/TG (ukupno  $N=110$ ) nego u bolesnika s GG (ukupno  $N=208$ ). U bolesnika koji su istodobno liječeni makrolaktamom dvije studije sugerirale su nešto viši  $AUC$  u TT/TG u odnosu na GG pacijente, a jedna je predložila nešto niže vrijednosti: skupna procjena bila je  $ROM=1,121$  (0,594-2,114) (Slika 19) ne ukazuje na nikakvu relevantnu razliku u izloženosti između TT/TG (ukupno  $N=131$ ) i GG pacijenata (ukupno  $N=192$ ). Ukupna procjena ( $ROM=1,136$ , 0,949-1,361) (slika 19) ukazuje na mogućnost nešto veće izloženosti u TT/TG (ukupno  $N=241$ ) nego u GG pacijenata (ukupno  $N=400$ ), ali nesigurnost (zbog heterogenosti, najbolje ilustrirano širokim intervalima predviđanja koji se protežu od 27% niže do 77% više  $AUC$ ) o veličini učinka (razlika) bila je znatna. Jedna populacijska farmakokinetička studija temeljena na 917 uzoraka krvi uzetih od 191 pacijenta (129) objavila je da c.334T>G nije bio povezan s klirensom  $MPA$  u pacijenata koji su istodobno liječeni takrolimusom. Jedna studija procijenila je 1457C>T (rs2306168), a druga c.71T>C (rs2851969) SNP-ove s ishodima, ali nije ustanovljena povezanost s  $MPA AUC$  (39). Zaključno: ne čini se vjerojatnim da su sadašnje procjene bile ometene činjenicom da nismo uzeli u obzir *SLCO1B3* ili *2B1* SNP-ove.

Kao što je već istaknuto, izvješća o odnosu između bilo kojeg od ovih *SNP*-ova i kliničkih ishoda kod pacijenata s transplantiranim bubregom bila su nedosljedna i potjecala su uglavnom iz metodološki ograničenih studija – neizvjesnost o njihovoj relevantnosti je znatna (103). Razumno je pretpostaviti da je bilo kakva "neravnoteža" u prevalenciji takvih "učinaka" između nositelja varijanti *IMPHD2 3757T>C* i kontrola divljeg tipa "ublažena" njihovim balansiranjem na karakteristikama na koje su ti hipotetski učinci mogli utjecati. Stoga se ovaj element smatra malo vjerojatnim zaostalom *confounderom*.

Sve u svemu, od svih potencijalnih zaostalih (neizmjenjenih) *confoundera* čini se da su najvjerojatniji izvor *IMPDH1 SNP*-ovi, unatoč nekonzistentnim/dvosmislenim nalazima dosadašnjih istraživanja (39, 74). Konkretno, neuzimanje u obzir *IMPDH1 SNP rs2278294* moglo je unijeti pristranost u sadašnje procjene. *IMPDH1 SNP*-ovi *rs2278293* i *rs2278294* su u jakom *LD*-u i tvore 4 haplotipa (73) – međutim, ni haplotipovi ni varijanta alela *rs2278293* nisu povezani s kliničkim ishodima u bolesnika liječenih *MPA* (73). S druge strane, čini se da je prisutnost alela *rs2278294* povezana s kliničkim ishodima (73) unatoč nekim nedosljednostima. Proučene su četiri studije koje daju vjerodostojne procjene povezanosti između varijante alela *rs2278294* i ishoda presađivanja, kako bi se utvrdio "učinak" varijante alela. Jedna studija, koja izvještava o HR-u za preživljavanje presatka (Shah 2012) (18) (HR=0,79 (0,53-1,15)), razmatrana je sama za sebe, dok su tri druge, koje su prijavile OR za akutno odbacivanje tijekom 6-12 mjeseci (Wang 2008 (115), Gensburger 2010 (73), Woillard 2014 (117)), bili meta -analitički združene za generiranje ukupne procjene. Sve četiri studije korištene su za aproksimaciju prevalencije varijante alela provođenjem meta-analize proporcija. Kao što je prikazano na slici 18, meta-analiza OR-ova pokazala je značajnu heterogenost u studijama (najbolje ilustrirana iznimno širokim intervalima predviđanja). Skupna točkasta procjena pokazala je smanjenje od 40% u izgledima za odbacivanje/neuspjeh presatka povezanog s varijantnim nositeljem alela (slika 20). Četiri studije dosljedno su ukazivale na visoku prevalenciju nošenja varijantnog alela – združena procjena udjela pokazala je 58% s uskim CI i uskim intervalom predviđanja (slika 20).



Slika 20. Meta-analiza povezanosti nositeljstva alela rs2278294 varijante *IMPDH1* i akutnog odbacivanja tijekom 6-12 mjeseci u bolesnika liječenih MPA, i meta-analiza prevalencije nositeljstva varijante alela na temelju četiri studije. Korišten je paket meta (126) u R – metodi generičke inverzne varijance za prijavljene OR-ove; logistički regresijski model slučajnog presretanja prilagođen logit-transformiranim proporcijama za prevalenciju. Oba postupka uključivala su Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman prilagodbu.

Zaključno, ova studija snažno sugerira da je nositelj varijantnog *IMPDH2 3757T>C* alela nevažan za razvoj funkcije presatka tijekom prve godine nakon transplantacije kod primatelja bubrežnog presatka čije liječenje imunosupresijom uključuje MPA.

Prednosti ovog istraživanja su: vrlo mala, gotovo zanemariva, količina nedostajućih podataka, implementacija opsežne kontrole *confoundera* i procjena osjetljivosti na neizmjerene *confoundere*. U ovim uvjetima i opažene i ispravljene procjene pokazale su vrlo sličan razvoj eGFR-a u nositeljima varijantnog alela *IMPDH2 3757T>C* i kontrolama divljeg tipa do te mjere da se mogu smatrati "ekvivalentnim" - i tijekom početnog brzog poboljšanja do 28. dana, i tijekom stabilnih razina između 28. i 365. dana. Lagani pad trenda od oko -1,5%/28 dana, opažen tijekom tog razdoblja, je zanemariv. Dva podskupa pacijenata bila su također vrlo slična u pogledu svih nepovoljnih ishoda - bubrežnih i ostalih. Ti su ishodi bili rijetki, pa se nisu mogli donositi snažni zaključci u tom pogledu, ali sličnost između dva podskupa pacijenata ukazuje na slabi učinak ovog alela na razvoj istraživanih nepovoljnih ishoda.

## Utjecaj *SNP*-ova *ABCB1*, *c.1236C>T* (rs1128503), *c.2677G>T/A* (rs2032582) i *c.3435C>T* (rs1045642)

Transporter P-glikoprotein/*ABCB1* privlači pažnju istraživača jer su *MPA* i drugi često upotrebljavani imunosupresivi poput *CNI* ili mTOR inhibitori supstrati *ABCB1* (85). Tri najčešća *SNP*-a *ABCB1* su *c.1236C>T* (rs1128503), *c.2677G>T/A* (rs2032582) i *c.3435C>T* (rs1045642). Oni se nalaze u snažnoj neravnotežnoj vezi (*LD*), te su najzastupljeniji *SNP*-ovi u svim etničkim skupinama (83). Opisan je utjecaj polimorfizma *SNP*-a *3435C>T* na doziranje ciklosporina (92), te su *ABCB1* *SNP*-ovi također spomenuti kao potencijalni izvori inter-subjektne varijabilnosti farmakokinetike i učinkovitosti/sigurnosti *MPA* (39, 67, 74).

Najjači pokazatelj da bi tri uobičajena *ABCB1* *SNP*-a mogla biti važna za ishode kod primatelja bubrežnog presatka došao je iz analize (78) koja je uključivala europske pacijente uključene u randomizirano ispitivanje namijenjeno usporedbi bubrežnih ishoda u tri imunosupresivna protokola: daclizumab indukcija + niske doze CsA 3 mjeseca, zatim prekid + MMF; indukcija daklizumaba + niske doze CsA kontinuirano + MMF; standardna ("visoka") doza CsA + MMF. Ishod od interesa bio je *BPAR* tijekom prvih 12 mjeseci. Uzimajući u obzir neobrađene podatke, za sva tri *SNP*-a, učestalost *BPAR*-a bila je veća u homozigotnih varijanti nego u homozigotnih pacijenata divljeg tipa:

- Za *c.1236C>T*: ako je TT=18/41 (43,9%); ako je CT= 28/103 (27,2%); ako je CC= 18/87 (20,7%)
- Za *c.2677G>T/A*: ako je TT= 17/39 (43,6%); ako je GT= 30/103 (29,1%); ako je GG=13/73 (17,8%)
- Za *c.3435C>T*: ako je TT=20/53 (37,7%); ako je CT=35/117 (29,9%); ako je CC= 9/56 (16,1%)

Za svaku varijantu homozigotnog genotipa, u odnosu na genotip divljeg tipa, povezanost s *BPAR*-om ostala je prisutna s prilagodbom za režim liječenja, dob (dihotomizirano na 55 godina), spol i vrstu donora (tri tipa). Kada su sva tri *SNP*-a uključena u model, samo je povezanost između varijante *c.2677G>T/A* i *BPAR*-a ostala očita. Zaključak je bio da je "glavni" *SNP* za promatranu povezanost *c.2677G>T/A* (78). Također, uzimajući u obzir *LD* kroz tri *SNP*-a, analiza haplotipa (s istim prilagodbama) pokazala je veće izglede ( $OR=2,14, 1,34.-3,44$ ) za *BPAR* za haplotip T/T/T (varijanta) u odnosu na C/G/C (divlji tip). Autori su tumačili opažanja u svjetlu činjenice da je CsA supstrat *ABCB1* (78), tj. nisu "povezali" promatrano s odnosom *ABCB1* – *MPA*. Međutim, i kontraintuitivno, termin interakcije "*SNP*\*režim liječenja" (CsA povučen, održavana na niskoj dozi, održavana na standardnoj "visokoj" dozi) nije ukazivao da se odnos *SNP*-*BPAR* razlikuje među režimima liječenja, što dovodi u pitanje, do određene mjere, "vezu" između ovih *SNP*-ova i *BPAR*-a. Postoji nekoliko drugih razloga koji upućuju na to da su prijavljene povezanosti možda bile precijenjene: multivarijantni model uključivao je četiri kategoričke kovarijable: dob (2 razine), spol (2 razine), režim imunosupresije (3 razine) i vrstu donora (3 razine). Takav model formira  $2 \times 2 \times 3 \times 3=36$  kovarijantnih stratuma. Također, svi učinci *SNP*-a procijenjeni su za varijantne homozigote u odnosu na subjekte divljeg tipa, tj. genotip je također

imao 2 razine, za ukupno 72 sloja – i najveći broj *BPAR*-ova na bilo kojoj od dvije razine genotipa za svaki od *SNP*-ova bio je 35: posljedično, većina kovarijatnih stratuma nije sadržavala događaje, stoga su procijenjene mjere učinka bile uglavnom ekstrapolacije modela bez stvarnih podataka, pa su stoga procijenjene vrijednosti bile vrlo problematične; osim toga, niti jedan model nije objasnio druge moguće izvore zbunjujuće pristranosti, tj. genotip-fenotip *CYP3A4/5* (glavni metabolički put CsA), polimorfizme *ABCC2* (važne za interakciju CsA-*MPA*) ili *SNP*-ove *IMPDH1/2* – sve je to moglo utjecati na rizik od *BPAR*-a.

Rezultati druge veće studije na europskim pacijentima nisu uspjeli potvrditi gore navedene rezultate (136). Ukupno 338 de novo odraslih primatelja koji su bili uključeni u randomizirano ispitivanje uspoređujući dva režima MMF-a - fiksne doze MMF-a naspram doziranja MMF-a vođenog koncentracijom - opetovano je procijenjeno za *MPA AUC* 0-12 na temelju ograničenog protokola uzorkovanja, na 3. i 10. dan postoperativno, te 1., 3., 6. i 12. mjeseca postoperativno. Bez obzira na to jesu li istodobno liječeni CsA ili takrolimusom (približno 1:1), sirove vrijednosti *AUC MPA* u svakoj vremenskoj točki bile su vrlo slične u pacijenata divljeg tipa, heterozigota i varijante homozigota za svaki od tri uobičajena *ABCB1 SNP* (136). Nisu primijećene relevantne razlike u analizi haplotpova, kao ni u analizama mješovitog modela (ponovljena mjerenja) s prilagodbom za vrstu *CNI*, protokol liječenja *MPA*, *ABCB1*, *SLCO1B1* (521C>T i 388A>G) i *1B3* (344T>G) *SNP*-ovi, vrsta donora, indukcijsko liječenje i vrijednosti kreatinina 10. dana (136). Također nije bilo relevantnih razlika među genotipovima u tri *ABCB1 SNP*-a u pogledu kliničkih ishoda od interesa – učestalost proljeva i leukopenije, tipičnih štetnih učinaka *MPA* – niti uzimajući u obzir neobrađene podatke, niti u multivarijabilnim modelima s navedenim prilagodbama (136). Iako učestalost *BPAR* nije analizirana, ovi nalazi nisu u skladu s prijavljenom većom učestalošću *BPAR* u homozigota varijante *c.2677G>T/A* (u odnosu na subjekte divljeg tipa) iz nekoliko razloga: terapijski i štetni učinci *MPA* (kao i CsA i takrolimusa) ovise o koncentraciji, stoga bi se očekivala analogija u smislu da su mutacije koje rezultiraju povećanom incidencijom *BPAR* također povezane sa smanjenom incidencijom nuspojava, osobito leukopenije (budući da imunosupresija i leukopenija na kraju proizlaze iz učinaka na *PBMC*) i manje izloženosti (i obrnuto); moguće je pretpostaviti da mutacija, koja rezultira izmijenjenim učincima, na isti način utječe na sustavnu izloženost i razine *MPA PBMC*-a – npr. trebalo bi očekivati da će smanjena aktivnost *ABCB1* rezultirati višim sistemskim i višim koncentracijama *PBMC*-a, i izraženije učinke, dok se od mutacije, koja rezultira povećanom aktivnošću prijenosnika, treba očekivati da će rezultirati smanjenim sistemskim razinama i razinama *PBMC*-a te smanjenim učincima. Međutim, odnos između sistemskih i staničnih koncentracija *MPA* i učinaka vjerojatno nije tako jednostavan.

U nedavnoj analizi (139), 78 odraslih primatelja bubrežnog presatka liječenih MMF-om, takrolimusom i prednizolonom procijenjeni su na ukupnu plazmatsku *MPA*, nevezanu plazmatsku *MPA* i *PBMC MPA*

*AUC* 0-12 15 dana, 1, 3 i 6 mjeseci postoperativno. Genotipizirani su za transporter SNP-ove: *ABCB1 c.3435C>T*, *ABCC2 24C>T* i *SLCO1B3T>G*. Iako je tijekom promatranog razdoblja bilo samo 11 BPAR događaja, nije primijećena naznaka da su dob, tjelesna težina, početne razine albumina u serumu ili klirens kreatinina 15. dana bili povezani s rizikom od BPAR-a. Također, *AUC* 0-12 15. dana za ukupnu plazmu, nevezanu plazmu i *PBMC MPA*, nije bio povezan s rizikom od BPAR (139). Modeliranje populacijske farmakokinetike pokazalo je: PK *MPA* najbolje je opisana modelom s dva odjeljka; dosljedno tijekom vremena, ukupni *AUC MPA* u plazmi bio je oko dva puta veći od *AUC*-a *PBMC*-a, dok je *AUC* nevezanog bio oko 2% ukupnog *AUC*-a. Jedine relevantne kovarijable bile su: (a) klirens kreatinina – viši je bio povezan s višim klirensom nevezane *MPA*, (b) razine albumina u serumu – frakcija nevezane *MPA* bila je viša u bolesnika s nižim albuminom u serumu, (c) varijanta homozigotnosti na *ABCB1 c.3435C>T* – varijanta homozigota naspram divljeg tipa ili heterozigotnih ispitanika imala je manji klirens *MPA* iz *PBMC*-a, tj. varijanta alela favorizira više stanične razine *MPA*. Sveukupno, unatoč gotovo 20 godina istraživanja, još uvijek nije jasno jesu li uobičajeni polimorfizmi *ABCB1* od praktične važnosti za primatelje bubrežnog presatka ili ne. Tijekom godina, druge studije također su se bavile ovom temom, ali je njihovo značenje nejasno zbog metodoloških ograničenja. Oni identificirani na temelju nedavnih sustavnih pregleda i pretrage na *Medlineu* sažeti su u tablici 20.



Tablica 20. Sažetak studija povezanosti između tri uobičajena polimorfizma *ABCB1* i kliničkih ili farmakokinetičkih ishoda u primatelja bubrežnog presatka.

Studija	Kratki opis studije
Satoh 2006 (140)	Japanski pacijenti, prva transplantacija od živih darivatelja (n=30) s identičnim liječenjem (MMF, takrolimus, steroidi), bez ABO nekompatibilnosti i bez znakova odgođene funkcije presatka procijenjeni su za MPA AUC0-12 28. dana nakon transplantacije. Vršna vrijednost prilagođena dozi i ukupna izloženost MPA i trakrolimusu bili su vrlo slični u ispitanika <i>ABCB1 c.3435C&gt;T</i> divljeg tipa i nositelja varijanti alela.
Grenda 2009 (141)	Retrospektivna analiza 207 poljske djece/adolescenata liječenih MMF-om, takrolimusom ili CsA ili azatioprinom. Nije primijećen univarijantni odnos između <i>ABCB1 c.3435C&gt;T</i> SNP i bubrežne toksičnosti, ali je prisutna loša analiza podataka.
Michelon 2010 (132)	Retrospektivna analiza 239 odraslih francuskih pacijenata liječenih MMF-om. Nije primijećena univarijantna povezanost između <i>ABCB1 c.3435C&gt;T</i> SNP i rizika od BPAR-a ili štetnih događaja, ali je prisutna loša analiza podataka.
Varnell 2017 (142)	Retrospektivna analiza 38 djece iz SAD-a koja su iskusila leukopeniju povezanu s MMF-om uparuje se s 38 djece bez epizoda leukopenije, uparuje se za indukcijsko liječenje, tjedne terapije steroidima, rasu i etničku pripadnost. Nema univarijantne povezanosti između <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> , <i>c.2677G&gt;T/A</i> ili <i>c.3435C&gt;T</i> SNP-ova i leukopenije, ali ograničeni uzorak i kontrola confoundera.
Genvigir 2020 (143)	97 odraslih brazilskih pacijenata, liječenih EC-MPA + takrolimusom, nizak imunološki rizik, bez ABO nekompatibilnosti, s najnižim mjerenjem MPA nakon 1 i 2 tjedna te 1, 3, 6 i 12 mjeseci postoperativno. Nema univarijantne povezanosti između <i>ABCB1 c.1236C&gt;T</i> ili <i>c.2677G&gt;T/A</i> SNP-ova i koncentracije MPA prilagođene dozi, ali je prisutna loša analiza podataka.

Nezahvalna je usporedba rezultata opisanih studija s ovom jer je ovdje glavni fokus stavljen na funkciju grafta, dok su druge uglavnom analizirale štetne događaje, kojih je u ovoj studiji bilo izrazito malo. Također, u tablici 20 istaknuto je kako je u većini studija prisutna manjkava analiza podataka, po čemu se ovo istraživanje razlikuje. Velike prednosti ovog istraživanja su: mala, gotovo zanemariva, količina nedostajućih podataka, upotreba opsežne kontrole *confoundera*, te procjena osjetljivosti na neizmjerene *confoundere*. U ovim uvjetima, i opažene i ispravljene procjene pokazale su vrlo sličan razvoj *eGFR*-a u tri podskupine pacijenata na temelju broja varijanti alela u tri *ABCB1* SNP-a do te mjere da se mogu smatrati "ekvivalentnim" - i tijekom početnog brzog poboljšanja do 28. dana, i tijekom stabilnih razina između 28. i 365. dana. Tri podskupine pacijenata bile su također vrlo slične u pogledu svih nepovoljnih ishoda - bubrežnih i ostalih. Ti su ishodi bili rijetki, pa se nisu mogli donositi snažni zaključci u tom pogledu, ali sličnost između tri podskupine pacijenata ukazuje na slabi učinak ovih SNP-ova na razvoj istraživanih nepovoljnih ishoda.

## Ograničenja istraživanja

Provedeno istraživanje ima nekoliko ograničenja. Reprezentativnost uzorka je ključna za validnost i generalizaciju rezultata istraživanja na širu populaciju. U ovom konkretnom istraživanju, postoji zabrinutost da uzorak možda nije potpuno reprezentativan zbog moguće pristranosti uzorkovanja (engl. *selection bias*). Točnije, u istraživanje su bili uključeni pacijenti koji su imali dostupnu krv za gensku analizu. Takav pristup može rezultirati pristranim uzorkom koji ne odražava cjelokupnu populaciju transplantiranih pacijenata, što bi moglo imati implikacije na interpretaciju rezultata. Na primjer, primijećen je relativno mali broj neželjenih događaja, poput biopsija grafta, smrti i gubitka grafta. Tu se nadovezuje još jedno značajno ograničenje ovog istraživanja, a to je nedostatak dugoročnog praćenja pacijenata, dulje od 12 mjeseci. Kratkoročno praćenje pruža uvid u rane rezultate, ali ne može osvijetliti dugoročne ishode ili potencijalne komplikacije koje se javljaju godinama nakon transplantacije. Odsutnost dugoročnih podataka može također doprinijeti percipirano niskoj stopi nepoželjnih događaja u istraživanju. Dok kratkoročni ishodi mogu biti povoljni, potencijalno ozbiljniji i dugotrajniji problemi neće biti zabilježeni bez produženog praćenja. Stoga, dok rezultati ovog istraživanja pružaju važne uvide, ključno je razumjeti da oni možda ne prikazuju potpunu sliku dugoročnih ishoda i rizika. U svakom slučaju, važno je kritički razmotriti i interpretirati rezultate u svjetlu ovih potencijalnih ograničenja. Međutim, istraživanje se temelji na pažljivo i temeljito skupljenom nizu relevantnih kliničkih podataka, uz minimalne nedostatke, te kontroli svih mogućih mjerenih i nemjerenih *confoundera* kako bi se isključili njihovi potencijalni utjecaji na mjerene ishode. Unatoč navedenim ograničenjima, analiza provedena na skupini pacijenata uključenih u doktorsko istraživanje pruža uvjerljive dokaze da nepostojanje značajnog utjecaja polimorfizama *SNP IMPDH2* i *ABCB1* na funkciju grafta tijekom prve godine nakon transplantacije bubrega može biti valjano. Na temelju toga, rezultati ovog istraživanja mogu se smatrati preciznima i relevantnima.

## 7. ZAKLJUČAK

Ova studija nije potvrdila postavljenu hipotezu. Međutim, snažno sugerira da prisutnost varijantnog *IMPDH2 3757T>C* alela ne utječe negativno na razvoj funkcije presatka tijekom prve godine nakon transplantacije kod primatelja bubrežnog presatka čije liječenje imunosupresijom uključuje MPA. Također, nije potvrđen niti negativan utjecaj tri najčešća *SNP ABCB1* na razvoj funkcije presatka tijekom prve godine nakon transplantacije kod primatelja bubrežnog presatka čije liječenje imunosupresijom uključuje MPA.

Iako je bio prisutan mali broj štetnih događaja u promatranom periodu, sličnosti u pojavnosti tih događaja između istraživanih podskupina i kontrola, sugerira da nema utjecaja ovih polimorfizama na njihov razvoj.

## 8. SAŽETAK

Transplantacija bubrega je metoda izbora za liječenje pacijenata sa završnim stadijem kronične bubrežne bolesti. Imunosupresivna terapija predstavlja osnovu dugoročnog preživljena transplantiranog bubrega. U novom dobu personalizirane medicine, farmakogenetička istraživanja pružaju uvid kako različite genske varijacije mogu utjecati na ishod liječenja. U okviru ovog istraživanja, analizirana je veza između određenih genetskih polimorfizama - specifično, varijacija gena za *IMPDH2* (rs11706052) i P-glikoproteina, *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642) - i ishoda transplantacije. Ukupno 254 pacijenta, koji su podvrgnuti transplantaciji bubrega i koji su primali standardnu imunosupresivnu terapiju, praćeni su tijekom 12 mjeseci. Uz analizu *eGFR*, kao primarnog pokazatelja funkcije presatka, također su razmatrani i drugi klinički ishodi poput odbacivanja organa, smrti i nuspojava terapije. Rezultati su ukazali na neznatne razlike u funkciji presatka među pacijentima s različitim genskim varijacijama. Odnosno, nisu pronađeni uvjerljivi dokazi da bilo koja od ispitivanih genskih varijacija negativno utječe na ishod transplantacije tijekom prve godine. To nam sugerira da, iako genetička komponenta može igrati ulogu u mnogim aspektima zdravlja, specifični polimorfizmi koji su istraženi u ovoj studiji, ne igraju presudnu ulogu u odgovoru pacijenta na imunosupresivnu terapiju nakon transplantacije bubrega.

## 9. SUMMARY

### **The effect of pharmacogenetic variations of P-glycoprotein and inosine-5'-monophosphate dehydrogenase on treatment outcomes in patients with kidney transplant**

**Luka Penezić, 2024.**

Kidney transplantation is the primary therapeutic intervention for patients presenting with end-stage chronic kidney disease. The efficacy of immunosuppressive therapy serves as a fundamental determinant for the long-term viability of the transplanted graft. In the evolving paradigm of personalized medicine, pharmacogenetic investigations elucidate the role of distinct genetic variations in modulating treatment outcomes. In this study, associations between specific genetic polymorphisms — notably those pertaining to *IMPDH2* (rs11706052) and P-glycoprotein, *ABCB1* (rs1128503, rs2032582, and rs1045642) — and transplantation outcomes were methodically analyzed. A cohort of 254 patients, who underwent kidney transplantation and were administered standard immunosuppressive regimen, were longitudinally monitored over a span of 12 months. In addition to the analysis of eGFR as a main indicator of graft function and primary outcome, other clinical endpoints including graft rejection, mortality, and therapy-related adverse events were also evaluated. Data analyses revealed negligible disparities in graft function based on genetic variations. Notably, the research found an absence of compelling evidence linking the investigated genetic polymorphisms with detrimental transplantation outcomes during the initial post-operative year. This underscores the inference that, while genetics undeniably influence various health parameters, the specific polymorphisms evaluated in this study do not markedly alter the patient's response to immunosuppressive therapy after kidney transplantation.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Kopple JD. The biblical view of the kidney. *Am J Nephrol.* 1994;14(4-6):279-81.
2. Stevens PE, Levin A, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2013;158(11):825-30.
3. Sundström J, Bodegard J, Bollmann A, Vervloet MG, Mark PB, Karasik A, i sur. Prevalence, outcomes, and cost of chronic kidney disease in a contemporary population of 2·4 million patients from 11 countries: The CaReMe CKD study. *Lancet Reg Health Eur.* 2022;20(100438).
4. US Renal Data System. CKD in the General Population. 2020.
5. Casares NG, S&D Group. Question for oral answer O-000006/2022 to the Commission. European Commission; 2022. Dostupno na: [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/O-9-2022-000006\\_EN.html](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/O-9-2022-000006_EN.html). Pristupljeno 29. srpnja 2023.
6. Hrvatsko društvo za nefrologiju, Hrvatskog liječničkog zbora (HDNDT). Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije. Available from: <https://www.hdndt.org/registar>.
7. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D i sur. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2093-109.
8. Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske. Nacionalne smjernice za obradu i odabir primatelja i darivatelja bubrega. 2016.
9. Yishak AA, Rubenstein K, Clark ED, Bhatia M, Vupputuri S. Early Referral, Living Donation, and Preemptive Kidney Transplant. *Transplant Proc.* 2022;54(3):615–21.
10. Kaštelan Ž, Hudolin T. Kirurški principi nefrektomije kod umrlog darovatelja bubrega. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, ur. *Transplantacija bubrega*. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 92-102.
11. Raju TN. The Nobel chronicles. 1990: Joseph Edward Murray (b 1919) and E Donnall Thomas (b 1920). *Lancet.* 2000;355(9211):1282.
12. Orlić P. Povijest transplantacije bubrega u svijetu i u Hrvatskoj. *Medicinski vjesnik.* 2005;37(1-4):37-41.
13. Kuitcheu CAT, Bašić Jukić N. Pandemija covid-19 i transplantacija bubrega. *Acta Med Croatica.* 2021;75(2):137-41.
14. Ćorić M. Patologija bubrežnog presatka. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, ur. *Transplantacija bubrega*. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 206-21.

15. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, i sur. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant.* 2017;17(1):28-41.
16. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, i sur. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008;8(4):753-60.
17. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, i sur. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293-307.
18. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, i sur. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation.* 2018;102(11):1795-814.
19. Furić-Čunko V, Ćorić M, Bašić Jukić N. Kronična disfunkcija presatka. U: Bašić Jukić N Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, ur. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 249-61.
20. Poggio ED, Augustine JJ, Arrigain S, Brennan DC, Schold JD. Long-term kidney transplant graft survival-Making progress when most needed. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2824–32.
21. Gondos A, Döhler B, Brenner H, Opelz G. Kidney Graft Survival in Europe and the United States: Strikingly Different Long-Term Outcomes. *Transplantation.* 2013;95(2).
22. Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, i sur. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int.* 2018;94(5):964–73.
23. Bašić Jukić N, Leko N. Imunosupresivni lijekovi. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, ur. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 144-74.
24. Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol.* 2013;191(12):5785-91.
25. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):85-118.
26. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol.* 2006;14(3):245-54.
27. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, i sur. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2562-75.
28. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, i sur. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int.* 2010;77(4):299-311.

29. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29.
30. Demain AL, Zhang L. Fundamental issues related to natural product-based drug delivery. U: Zhang L, Demain AL, ur. *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine.* Totowa, New Jersey: Humana Press; 2005.
31. Clutterbuck PW, Oxford AE, Raistrick H, Smith G. Studies in the biochemistry of micro-organisms: The metabolic products of the *Penicillium brevi-compactum* series. *Biochem J.* 1932;26(5):1441-58.
32. Kitchin JE, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL. Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37(3):445-9.
33. Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, Perner F, Fabrizi V, Holzer H, i sur. Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther Drug Monit.* 2001;23(6):717–21.
34. UGT alleles Nomenclature. Dostupno na: <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/>. Pristupljeno 11. srpnja 2023.
35. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(8):775-8.
36. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit.* 2003;25(1):1-16.
37. Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit.* 2004;26(6):600-8.
38. Tett SE, Saint-Marcoux F, Staatz CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M, i sur. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev.* 2011;25(2):47–57.
39. Genvigir FDV, Cerda A, Hirata TDC, Hirata MH, Hirata RDC. Mycophenolic acid pharmacogenomics in kidney transplantation. *J Transl Genet Genomics.* 2020;4(4):320-55.
40. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(6):429-55.
41. Lamba V, Sangkuhl K, Sanghavi K, Fish A, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2014;24(1):73-9.
42. Budde K, Bauer S, Hambach P, Hahn U, Röblitz H, Mai I, i sur. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant.* 2007;7(4):888-98.



43. Trkulja V, Lalić Z, Nađ-Škegro S, Lebo A, Granić P, Lovrić M, i sur. Effect of cyclosporine on steady-state pharmacokinetics of MPA in renal transplant recipients is not affected by the MPA formulation: analysis based on therapeutic drug monitoring data. *Ther Drug Monit.* 2014;36(4):456-64.
44. Staatz CE, Tett SE. Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: an update. *Arch Toxicol.* 2014;88(7):1351-89.
45. Budde K, Sommerer C, Rissling O, Dieterlen MT, Barten MJ. Target Enzyme Activity and Phosphorylation of Pathway Molecules As Specific Biomarkers in Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2016;38:S43-9.
46. Watts R, Conaghan PG, Hall F, Marshall T. DMARDs and immunosuppressive drugs. U: Watts R, Conaghan PG, Hall F, Marshall T, ur. *Oxford Desk Reference: Rheumatology.* Oxford: Oxford University Press; 2009. p. 558.
47. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of Calcineurin antagonists. *Transplant Proc.* 2004;36(2S):25S-32S.
48. Van Driest SL, Wells QS. Personalizing pediatric heart transplantation. *Pharmacogenomics.* 2015;131(5):503-215.
49. Provenzani A, Santeusanio A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, i sur. Pharmacogenetics considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9156-73.
50. Tavira B, Díaz-Corte C, Coronel D, Ortega F, Coto E. Pharmacogenetics of tacrolimus: from bench to bedside? *Nefrologia.* 2014;34(1):11-7.
51. Starzl BM. Two decades of tacrolimus in renal transplant: Basic science and clinical evidences. *Exp Clin Transplant.* 2017;15(1):1-9.
52. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med.* 2009;24(1):1-10.
53. Cellcept. Sažetak opisa svojstava lijeka Cellcept 250 mg tvrde kapsule. Dostupno na: [<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/CellCept/9490/>](<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/CellCept/9490/>). Pristupljeno: 29. kolovoza 2023.
54. Advagraf. Sažetak opisa svojstava lijeka Advagraf 0,5/1/3mg. Dostupno na: [<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Advagraf/9420/>](<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Advagraf/9420/>). Pristupljeno: 29. kolovoza 2023.

55. Ciklosporin. Sažetak opisa svojstava lijeka Ciklosporin Alkaloid 15/50/100mg. Dostupno na: [<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Ciklosporin-Alkaloid-100-mg-meke-kapsule/11060/>](<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Ciklosporin-Alkaloid-100-mg-meke-kapsule/11060/>). Pristupljeno: 29. kolovoza 2023.
56. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119-37.
57. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008;392(6):1093-108.
58. Ingelman-Sundberg M. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporter in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):457-73.
59. Traynor C, Conlon P Jr, Phelan PJ, O'Kelly P, Elens L, McCormack M, i sur. Association of CYP3A variants with kidney transplant outcomes. *Ren Fail.* 2015;37(4):562-6.
60. Lo A, Burckart GJ. P-glycoprotein and drug therapy in organ transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(10):995-1005.
61. Shah S, Harwood SM, Döhler B, Opelz G, Yaqoob MM. Inosine monophosphate dehydrogenase polymorphisms and renal allograft outcome. *Transplantation.* 2012;94(5):486-91.
62. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, i sur. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
63. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, i sur. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2022 7;50(D1):D20-6.
64. Hedstrom L. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev.* 2009;109(7):2903-28.
65. Zimmermann AG, Gu JJ, Laliberté J, Mitchell BS. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;61:181-209.
66. Bentata Y. Mycophenolates. The latest modern and potent immunosuppressive drugs in adult kidney transplantation: what we should know about them? *Artif Organs.* 2020;44(6):561-76.
67. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, i sur. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the International association on therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2021;43(2):150-200.
68. Winnicki W, Fichtenbaum A, Mitulović G, Herkner H, Regele F, Baier M, i sur. Individualization of Mycophenolic Acid Therapy through Pharmacogenetic, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Testing. *Biomedicines.* 2022;10(11):2882.

69. Wu TY, Peng Y, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Wieben ED, i sur. Pharmacogenetics of the mycophenolic acid targets inosine monophosphate dehydrogenases IMPDH1 and IMPDH2: gene sequence variation and functional genomics. *Br J Pharmacol*. 2010;161(7):1584-98.
70. Kagaya H, Miura M, Saito M, Habuchi T, Satoh S. Correlation of IMPDH1 gene polymorphisms with subclinical acute rejection and mycophenolic acid exposure parameters on day 28 after renal transplantation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;107(2):631-6.
71. Picard N, Marquet P. The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(6):731-43.
72. Mohamed MF, Frye RF, Langaee TY. Interpopulation variation frequency of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II (IMPDH2) genetic polymorphisms. *Genet Test*. 2008;12(4):513-6.
73. Gensburger O, Van Schaik RH, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard JB, i sur. Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(9):537-43.
74. Na Takuathung M, Sakuludomkan W, Koonrunsesomboon N. The impact of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid: a systematic review and meta-analysis. *Clinical pharmacokinetics*. 2021;60(10):1291-302.
75. Pouché L, Stojanova J, Marquet P, Picard N. New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics*. 2016;17(3):277-96.
76. Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, Budde K, van der Werf M, Vulto AG, i sur. Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(8):626-34.
77. Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G, Bajari T, Winter B, Herkner H, i sur. An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(1):70-6.
78. Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, i sur. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2008;21(9):879-91.
79. Ohmann EL, Burckart GJ, Brooks MM, Chen Y, Pravica V, Girnita DM, i sur. Genetic polymorphisms influence mycophenolate mofetil-related adverse events in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:509-16.

80. Lai Y. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)/ABCB1. U: Lai Y, ur. Transporters in drug discovery and development. Woodhead Publishing Limited; 2013. p. 147-259.
81. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH. Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist*. 2011;16(6):820-34.
82. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, i sur. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics*. 2004;14(3):147-54.
83. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporter in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*. 2006;112(2):457-73.
84. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT, i sur. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(7):709-35.
85. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, i sur. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(3):152-61.
86. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obabayama K, Kim G, i sur. Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry*. 2007;46(26):7678-93.
87. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, i sur. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2006;315(5811):525-8.
88. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(3):154-79.
89. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(4):207-21.
90. Venuto RC, Meaney CJ, Chang S, Leca N, Consiglio JD, Wilding GE, i sur. Association of Extrarenal Adverse Effects of Posttransplant Immunosuppression With Sex and ABCB1 Haplotypes. *Medicine*. 2015;94:e1315.
91. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, Macphee IA, de Fijter JW, i sur. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine

- pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit.* 2011;33:178-84.
92. Su L, Yin L, Yang J, Sun L. Correlation between gene polymorphism and blood concentration of calcineurin inhibitors in renal transplant recipients: An overview of systematic reviews. *Medicine.* 2 (26):e16113.
  93. Giraud C, Manceau S, Treluyer JM. ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(5):571-89.
  94. Lalić, Z. Utjecaj farmakogenetičkih varijacija transportnog proteina ABCC2 na biodostupnost mikofenolne kiseline u bolesnika s presađenim bubregom [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2015.
  95. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5, 2017. Dostupno na: [[https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf)]([https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf)). Pristupljeno 20. rujna 2023.
  96. Hilbrands L, Budde K, Bellini MI, Diekmann F, Furian L, Grinyó J, i sur. Allograft function as endpoint for clinical trials in kidney transplantation. *Transpl Int.* 2022;35:10139.
  97. Schold JD, Nordyke RJ, Wu Z, Corvino F, Wang W, Mohan S. Clinical Events and Renal Function in the First Year Predict Long-Term Kidney Transplant Survival. *Kidney360.* 2022;3(4):714-27.
  98. Pearl, J. *Causality: models, reasoning and inference.* 2. izd. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
  99. VanderWeele TJ, Robins JM, Lash TL. Confounding and confounders. U: Lash TL, VanderWeele TJ, Haneuse S, Rothman KJ, ur. *Modern epidemiology.* 4. izd. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2021. str. 610-67.
  100. Patzer RE, Hariharan S. Results of renal transplantation. U: Knechtle SJ, Morris PJ, ur. *Kidney transplantation: principles and practice.* 8. izd. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. str. 684-708.
  101. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(10):563-85.
  102. Borić-Bilušić A, Božina N, Lalić Z, Lovrić M, Nađ-Škegro S, Penezić L i sur. Loss of function ABCG2 c.421C>A (rs2231142) polymorphism increases steady-state exposure to mycophenolic acid in stable renal transplant recipients: an exploratory matched cohort study. *Adv Ther.* 2023;40(2):601-18.

103. Dorr CR, Oetting WS, Jacobson PA, Israni AK. Genetics of acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2018;31(3):263–77.
104. Textor J, van der Zander B, Gilthorpe MS, Liskiewicz M, Ellison GT. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package “dagitty”. *Int J Epidemiol*. 2016;45(6):1887-94.
105. Hansen BB, Klopfer SO. Optimal full matching and related designs via network flows. *J Computat Global Stat*. 2006;15:609-27.
106. Ho D, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIT: nonparametric preprocessing for parametric causal inference. *J Stat Softw*. 2011;42:1-28.
107. King G, Nielsen R. Why propensity scores should not be used for matching. *Polit Anal*. 2019;27:435-54.
108. Greifer N. WeightIt: Weighting for Covariate Balance in Observational Studies. Dostupno na: <https://ngreifer.github.io/WeightIt/>. Pristupljeno 10. kolovoza 2023.
109. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Dostupno na: <https://www.r-project.org/>. Pristupljeno 10. kolovoza 2023.
110. Huling JD, Mak S. Energy balancing of covariate distributions. arXiv:200413962. 2020. Dostupno na: <https://arxiv.org/abs/2004.13962>. Pristupljeno 10. kolovoza 2023.
111. Huling JD, Greifer N, Chen G. Independence weights for causal inference with continuous treatments. *Journal of the American Statistical Association*. 2023. Dostupno na: <https://arxiv.org/abs/2107.07086>. Pristupljeno 10. kolovoza 2023.
112. Huang Q. Hands-on tutorial for piecewise linear mixed-effect models using SAS proc mixed. PharmaSUG [Internet]. 2015. Dostupno na: <https://www.lexjansen.com/pharmasug-cn/2015/ST/PharmaSUG-China-2015-ST08.pdf>. Pristupljeno 10. kolovoza 2023.
113. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool “CubeX”. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(428).
114. Schneeweiss S. Sensitivity analysis and external adjustment for unmeasured confounders in epidemiologic database studies of therapeutics. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2006;15(5):291-303.
115. Wang J, Yang JW, Zeevi A, Webber SA, Girnita DM, Selby R, i sur. IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(5):711-7.

116. Pazik J, Ołdak M, Podgórska M, Lewandowski Z, Sitarek E, Płoski R, i sur. Lymphocyte counts in kidney allograft recipients are associated with IMPDH2 3757T>C gene polymorphism. *Transplant Proc.* 2011;43(8):2943-5.
117. Woillard JB, Picard N, Thierry A, Touchard G, Marquet P; DOMINOS study group. Associations between polymorphisms in target, metabolism, or transport proteins of mycophenolate sodium and therapeutic or adverse effects in kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24(5):256-62.
118. Cilião HL, Camargo-Godoy RBO, Souza MF, Zanuto A, Delfino VDA, Cólus IMS. Polymorphisms in IMPDH2, UGT2B7, and CES2 genes influence the risk of graft rejection in kidney transplant recipients taking mycophenolate mofetil. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018;836:97-102.
119. Mehta R, Cherikh W, Sood P, Hariharan S. Kidney allograft surveillance biopsy practices across US transplant centers: A UNOS survey. *Clin Transplant.* 2017;31(5).
120. Lee DM, Abecassis MM, Friedewald JJ, Rose S, First MR. Kidney Graft Surveillance Biopsy Utilization and Trends: Results From a Survey of High-Volume Transplant Centers. *Transplant Proc.* 2020;52(10):3085-9.
121. Sobiak J, Resztak M. A Systematic Review of Multiple Linear Regression-Based Limited Sampling Strategies for Mycophenolic Acid Area Under the Concentration-Time Curve Estimation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2021;46(6):721-42.
122. Miller G, Ankerst DP, Kattan MW, Hüser N, Vogelaar S, Tieken I, i sur. Kidney Transplantation Outcome Predictions (KTOP): A Risk Prediction Tool for Kidney Transplants from Brain-dead Deceased Donors Based on a Large European Cohort. *Eur Urol.* 2023;83(2):173-9.
123. van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, i sur. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(3):319-27.
124. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, i sur. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(1):100-8.
125. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(4):351-61.
126. Balduzzi S, Rücker G, Schwarzer G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health.* 2019;22(1):153-60.

127. Friedrich JO, Adhikari NK, Beyene J. The ratio of means method as an alternative to mean differences for analyzing continuous outcome variables in meta-analysis: a simulation study. *BMC Med Res Methodol.* 2008;8:32.
128. Zhao W, Fakhoury M, Deschênes G, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, i sur. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal-transplant patients. *J Clin Pharmacol.* 2010;50(11):1280-91.
129. Yang CL, Sheng CC, Liao GY, Su Y, Feng LJ, Xia Q, Jiao Z, i sur. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: a population analysis. *J Clin Pharm Ther.* 2021;46:1-12.
130. Brazeau D, Meaney CJ, Consiglio JD, Wilding GE, Cooper LM, i sur. Association of ABCC2 haplotypes to mycophenolic acid pharmacokinetics in stable kidney transplant recipients. *J Clin Pharmacol* 2021; 61:(12):1592-605.
131. Fohner AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for ABCG2. *Pharmacogenet Genomics.* 2017;27(11):420-7.
132. Michelon H, König J, Durrbach A, Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, i sur. SLCO1B1 genetic polymorphisms influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics.* 2010;11(12):1703-13.
133. Oshiro C, Mangravite L, Klein T, Altman R. PharmGKB very important pharmacogene: SLCO1B1. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(3):211-6.
134. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):693-705.
135. Sandoval P, Hagenbuch B. Drug transport-uptake. U: Kenakin TP, Riddick DS, ur. *Comprehensive pharmacology.* 1. Cambridge MA: Elsevier; 2022. p. 585-607.
136. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, van der Heiden IP, de Fijter JW, i sur. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLCO1B nor with ABCB1 in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(6):399-407.
137. Geng F, Jiao Z, Dao YJ, Qiu XY, Ding JJ, Shi XJ, i sur. The association of the UGT1A8, SLCO1B3 and ABCC2/ABCG2 genetic polymorphisms with the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide metabolite in Chinese individuals. *Clin Chim Acta.* 2012;416(7-8):683-90.



138. Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T, i sur. Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63(12):1161-9.
139. Riglet F, Bertrand J, Barrail-Tran A, Verstuyft C, Michelon H, Benech H, i sur. Population Pharmacokinetic Model of Plasma and Cellular Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Patients from the CIMTRE Study. *Drugs R D*. 2020;20(4):331-42.
140. Satoh S, Tada H, Murakami M, Tsuchiya N, Li Z, Numakura K, i sur. Circadian pharmacokinetics of mycophenolic Acid and implication of genetic polymorphisms for early clinical events in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82(4):486-93.
141. Grenda R, Prokurat S, Ciechanowicz A, Piatosa B, Kaliciński P. Evaluation of the genetic background of standard-immunosuppressant-related toxicity in a cohort of 200 paediatric renal allograft recipients--a retrospective study. *Ann Transplant*. 2009;14(3):18-24.
142. Varnell CD, Fukuda T, Kirby CL, Martin LJ, Warshaw BL, Patel HP, i sur. Mycophenolate mofetil-related leukopenia in children and young adults following kidney transplantation: Influence of genes and drugs. *Pediatr Transplant*. 2017;21(7): 10.1111/petr.13033
143. Genvigir FDV, Campos-Salazar AB, Felipe CR, Tedesco-Silva H Jr, Medina-Pestana JO, Doi SQ, i sur. CYP3A5\*3 and CYP2C8\*3 variants influence exposure and clinical outcomes of tacrolimus-based therapy. *Pharmacogenomics*. 2020;21(1):7-21.

## 11. ŽIVOTOPIS

Luka Penezić rođen je 26. svibnja 1986. godine u Zagrebu. Maturu je položio završivši srednjoškolsko obrazovanje u Privatnoj klasičnoj gimnaziji 2005. godine. Iste godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i diplomirao 2011. godine. Za svoj rad u uredništvu studentskog časopisa "Medicinar" dobio je Posebnu rektorovu nagradu 2010. godine. Pripravnički staž obavio je u KBC Zagreb od 2011. do 2012. godine. Od studenog 2012. do svibnja 2013. godine radio je kao liječnik hitne medicinske pomoći u Nastavnom zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba. U lipnju 2013. započeo je specijalizaciju iz urologije u Klinici za urologiju KBC Zagreb. Godine 2015. upisao je Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo". Sveučilišni poslijediplomski specijalistički studij "Urologija" pohađao je 2017. godine, a specijalistički ispit iz urologije položio je 2018. godine. Učestvovao je u mnogim kliničkim tečajevima i edukacijskim programima organiziranim od Europskog urološkog društva u Češkoj, Austriji i Njemačkoj. Prošao je trening robotske kirurgije za robotski sustav *Senhance*. Postao je član Europskog odbora urologa 2019. godine nakon položenog ispita F.E.B.U. (eng. *Fellow of the European Board of Urology*). Subspecijalizaciju iz urološke onkologije započeo je 2020. godine, a subspecijalistički ispit položio 2022. godine. Trenutačno je zaposlen kao specijalist urolog u Klinici za urologiju KBC Zagreb. Aktivno je sudjelovao na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima. Objavio je 25 znanstvenih radova u indeksiranim časopisima te 7 drugih radova i kongresnih priopćenja.