

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Mirjana Z. Cvetković

**FAKTORI OD ZNAČAJA ZA
FARMAKOKINETIKU CIKLOSPORINA A
KOD DECE SA TRANSPLANTIRANIM
BUBREGOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Mirjana Z. Cvetković

**IMPORTANT FACTORS FOR
PHARMACOKINETICS OF
CYCLOSPORINE A IN CHILDREN WITH
KIDNEY TRANSPLANT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Podaci o mentoru i članovima komisije:

Mentor: Prof. dr Mirjana Kostić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi komisije:

1. Prof. dr Višnja Ležaić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. Prof. dr Radomir Naumović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Naučni savetnik, dr Maja Živković, Institut za nuklearne nauke „Vinča”

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem mentoru ovog rada, profesorki Mirjani Kostić. Poštovanje za sve što je učinila i što čini, neizmerno je. Hvala joj za savete, sugestije, ukazano poverenje, spremnost za zajednički rad.

Dr Maji Živković naučnoj savetnici i dr Aleksandri Stanković naučnoj savetnici Instituta za nuklearne nauke "Vinča" hvala za sva dragocena istraživanja i podatke. Izuzetna je čast i privilegija imati ih za saradnike i drage saputnike na putu u čaroban svet genetike. Hvala im za nepopravljivu optimističnost, vedrinu, razumevanje i ohrabrenje koje sam dobila u toku izrade ove disertacije.

Iskrenu zahvalnost Prof. dr Amiri Peco-Antić, dr Divni Kruščić, Brankici, Goci, Duletu, Ivani, Bojani i Sanji što su mi svojim neiscrpnim motivacijama i podstrecima pomogli da ovaj rad dobije završnu formu u kojoj ga prezentujem.

Dr Jadranki Mitrović, dr Biljani Vukmir i službi biohemijske laboratorije Univerzitetske dečje klinike hvala za razumevanje i stručnu pomoć.

Hvala osoblju Nefrološke službe na iskrenoj ljudskoj pomoći.

Hvala mojim dragim prijateljima Sandri, Kaći, Feđi i Viktoru koji su me pratili, slušali i razumevali.

Mojoj dragoj, velikoj, porodici hvala za ideal humanosti i moralni kodeks koji sam ponela iz nje.

Dragim bakama i deki iskreno hvala za posvećenost unucima i svaki trenutak proveden sa njima.

Na kraju volela bih da izrazim neizmernu zahvalnost svojim najbližima, suprugu Draganu, sinovima Vasiliju i Jovanu. Oni su moja sigurna luka i bezrezervna podrška svih ovih godina. Hvala mom Draganu što me je uvek podržavao i ohrabrivao u situacijama kada nije bilo lako usaglasiti svet nauke i porodicu. Hvala mu što mi je uvek bio utočište, što me je podsticao da istrajem u svemu, staložena i mirna. Mojim najdražim sinovima Vasketu i Joci, hvala što će jednog dana shvatiti značaj mog rada. Oni su moja zvezda vodilja, moja svetlost. Njihova dobrota, iskrenost u očima su mi davali snagu da se borim i uverile u to da je najveća sreća na svetu-srećno i zdravo dete.

Posvećeno mojim sinovima i Draganu

FAKTORI OD ZNAČAJA ZA FARMAKOKINETIKU CIKLOSPORINA A KOD DECE SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

Sažetak

Transplantacija bubrega je najpoželjniji metod lečenja pedijatrijskih pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, a Ciklosporin A (CsA) je imunosupresivni lek koji se koristi kod transplantiranih bolesnika u cilju prevencije odbacivanja kalema. Različita ekspresija komponenata familije enzima CYP3A (prvenstveno CYP3A4 i CYP3A5), POR enzima i P-glikoproteina može biti uzrok individualne varijabilnosti u apsorpciji, metabolizmu i tkivnoj distribuciji CsA. Individualni odgovor na terapiju može biti uslovljen prisustvom različitih alelnih varijanti (polimorfizama tipa zamene jednog nukleotidnog ponovka, eng. single nucleotide polymorphisms-SNP) u genima koji kodiraju navedene enzime i transporter. Takođe, biološko sazrevanje dečijeg organizma doprinosi razlikama u farmakokinetici CsA u grupi pedijatrijskih pacijenata.

Ciljevi studije: 1. da se utvrdi frekvencija alela i genotipova polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, 2. da se ispita uticaj uzrasta pacijenta, kao nezavisnog faktora, na farmakokinetiku CsA tokom prve godine nakon transplantacije, 3. da se ispita uticaj polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, tokom prve godine nakon transplantacije, 4. da se ispita uticaj polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) u zavisnosti od uzrasta pacijenta, na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, tokom prve godine nakon transplantacije.

Metodologija: Istraživanje je obavljeno na Univerzitetnoj dečjoj klinici, u Centru za hemodijalizu i transplantaciju, jedinom mestu u Srbiji, gde se radi transplantacija bubrega kod pedijatrijskih pacijenata uz njihovo postransplantaciono praćenje. U studiju je uključeno 47 pacijenata kojima je transplantiran bubreg u periodu od 2001-2015 godine. Pacijentima je nakon transplantacije uključen CsA u terapiju. Redovne kontrole

obavljene su jedan, tri, šest i dvanaest meseci nakon transplantacije i uvek kada je to bilo potrebno po proceni lekara. Na kontrolama su beleženi sledeći bazični podaci: uzrast, pol, visina, težina, krvni pritisak, redovna terapija koju uzimaju, vreme proteklo od transplantacije bubrega. Uz standardne biohemijske analize, pacijentima smo merili koncentraciju CsA u krvi pred jutarnju dozu (C_0) i koncentraciju CsA u krvi dva sata posle jutarnje doze (C_2). Potom smo preračunali odnose C_0 nivoa leka u krvi i dnevne doze leka (C_0/D ng/ml kroz mg/kgTT) i C_2 nivoa leka u krvi i dnevne doze leka (C_2/D ng/ml kroz mg/kgTT). Genetske analize su obavljene u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklerne nauke „Vinča“ tokom 2015/2016 godine. Primenom TaqMan[®] tehnologije su određeni genotipovi sledećih polimorfizama u grupi pacijenata: ABCB1 (rs 1045642), CYP3A5 (rs 776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs 1057868).

Rezultati: U grupi ispitanih pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom 26% su bili nosioci češćeg alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1. Homozigotnih nosioca polimorfnog alela je bilo 21%, dok je heterozigotnih nosioca polimorfnog alela bilo 53%. Frekvencija češćeg alela je bila 0,52, a polimorfnog alela 0,48. U ispitanoj grupi pacijenata nije bilo homozigota za alel CYP3A5*1 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5, koji omogućava metabolisanje lekova iako je ređe prisutan alel. Heterozigotni nosioci polimorfnog alela CYP3A5*3 su bili zastupljeni sa 13%, a homozigoti za polimorfni alel sa 87 %. Frekvencija predačkog, ali ređeg alela je bila 0,06 a polimorfnog alela 0,94. U ispitanoj grupi pacijenata nije bilo homozigotnih nosioca polimorfnog alela polimorfizma rs 35599367 u genu za CYP3A4. Homozigoti za češći alel CYP3A4*1 su bili zastupljeni sa 94%, dok je kod 6% pacijenata detektovan polimorfni alel CYP3A4*22 u heterozigotnom obliku. Frekvencija češćeg alela je bila 0,96, a polimorfnog alela 0,04. U ispitanoj grupi pacijenata bilo je 42% homozigota za češći alel polimorfizma rs1057868 u genu za POR. Homozigotnih nosioca polimorfnog alela POR*28 je bilo 13%, dok je heterozigotnih nosioca polimorfnog alela bilo 45%. Frekvencija češćeg alela je bila 0,65, a polimorfnog alela 0,35. Pedijatrijski pacijenti uzrasta do šest godina su zahtevali značajno veću dozu leka za postizanje adekvatnih nivoa CsA u krvi u odnosu na pacijente uzrasta preko 6 godina (7.12 ± 1.56 vs 4.91 ± 1.75 , $p=0,001$), što je praćeno značajno manjim odnosom C_0/D (18.82 ± 4.72 vs 34.19 ± 11.8 , $p=0,001$) i C_2/D (106.75 ± 26.99 vs 209.20 ± 71.57 , $p<0.001$).

Nosioci polimorfnog alela T u genu za ABCB1 (rs1045642) su statistički značajno češće primali dozu CsA <4 mg/kgTT u odnosu na homozigote alela C (95% vs. 50%, p=0,005). Nosioci polimorfog alela *28 u genu za POR (rs1057868) su statistički značajno češće primali dozu CsA >6 mg/kgTT u odnosu na homozigote za alel *1 (94% vs. 62%, p=0.03) . Utvrđeno je da su pacijenti sa genotipom *3/*3 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 (neekspresori) imali značajno veće ukupne C₀/D u odnosu na grupu pacijenata CYP3A5 ekspresora (genotip *1/*3)(p=0,01). Multivarijantnom analizom je utvrđen nezavistan značajan obrnuto proporcionalan efekat uzrasta (p<0.001) i značajan efekat POR*28 polimorfizma (p=0.04) na ukupnu dnevnu dozu CsA, dok su uzrast (p<0.001) i genotip sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 (p=0.02) imali značajan efekat na ukupni odnos C₀/D. Detektovan je nezavistan značajan proporcionalan efekat uzrasta (p<0.001) i značajan efekat genotipa sa alelom POR*28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR (p=0.03) na ukupni odnos C₂/D. U grupi pacijenata mlađih od šest godina utvrđen je nezavistan značajan efekat genotipova sa alelom POR*28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR (p=0.012), genotipova sa alelom T polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 (p=0.04) i genotipova sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 (p=0,006) na ukupni odnos C₂/D, dok u grupi pacijenata starijih od šest godina nisu detektovani značajni efekti ispitanih polimorfizama.

Zaključak: uzrast deteta, kao i alelne varijante ispitanih polimorfizama u genima za POR, CYP3A5 i ABCB1 su značajno i nezavisno udruženi sa farmakokinetikom CsA kod pedijatrijskih pacijenata nakon transplantacije bubrega. Rezultati ove studije svakako zahtevaju dodatno ispitivanje i proveru na većem uzorku, što je moguće jedino u velikim multicentričnim studijama. U cilju boljeg prilagođavanja terapije svakom pacijentu navedene faktore treba uzeti u obzir kao značajne modulatore terapijskog odgovora.

Ključne reči: deca, uzrast, transplantacija bubrega, Ciklosporin A, polimorfizam

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: pedijatrijska nefrologija

IMPORTANT FACTORS FOR PHARAMCOKINETICS OF CYCLOSPORINE A IN CHILDREN WITH KIDNEY TRANSPLANT

ABSTRACT

Kidney transplantation is the most desirable method for the treatment of children with terminal renal insufficiency and Cyclosporine A (CsA) is a cornerstone of immunosuppressive therapy used in transplanted patients, in order to prevent the rejection of kidney. Different expression of components of the CYP3A enzyme family (primarily CYP3A4 and CYP3A5), POR enzyme and of P-glycoprotein, may be the cause of individual variability in absorption, metabolism and tissue distribution of CsA. Individual response to therapy may be conditioned by the presence of various allelic variants (single nucleotide polymorphisms-SNP) in genes encoding said enzymes and a transporter. Also, biological maturation of child organism contributes to differences in the pharmacokinetics of CsA in a group of pediatric patients.

Aim: 1. to determine the frequency of alleles and genotypes of polymorphisms in genes for ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) and POR (rs1057868) in children with kidney transplants in Serbia; 2. to investigate the effect of polymorphisms in the genes of ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) and POR (rs1057868) on the pharmacokinetics of CsA in children with kidney transplants in Serbia; 3. to consider the influence of child age as an independent factor on the pharmacokinetics of CsA in children with kidney transplants in Serbia; 4. to investigate the effect of polymorphisms in the genes of ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) and POR (rs1057868) on the age of the patient, on the pharmacokinetics of CsA in children with kidney transplants in Serbia.

Methodology: The research was carried out at the University Children's Hospital, at the Center for Hemodialysis and Transplantation, the only place in Serbia, where kidney transplants are performed, in line with post-transplant monitoring. The study included 47 children who had a kidney transplant in the period of 2001-2015. Patients received CsA in the after transplantation treatment. Regular controls were performed 1, 3, 6 and 12 months after the transplantation and whenever needed by the doctor's assessment.

The controls recorded the following basic data: age, sex, height, weight, blood pressure, regular therapy they take, time passed from kidney transplantation. In addition to standard biochemical analyzes, the concentration of CsA in the blood was measured in the morning before the morning dose (C_0) and in the two hours after the morning dose (C_2). The blood levels of C_0 and the daily dose of the drug (C_0 / D ng / ml through mg / kgTT) and C_2 blood levels and daily doses (C_2 / D ng / ml through mg / kgTT) were calculated. Genetic analyzes were carried out at the Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics at the Institute for Nuclear Sciences „Vinča“ during 2015/2016. By using TaqMan® technology, genotypes of the following polymorphisms were determined for 47 patients: ABCB1 (rs 1045642), CYP3A4 (rs35599367), CYP3A5 (rs 776746), and POR (rs 1057868).

Results: In the group of children with kidney transplantation, 26% of patients were carriers of the wild type genotype of polymorphism rs1045642 in the ABCB1 gene. The homozygous carrier of the polymorphic allele was 21%, while the heterozygous carriers of the polymorphic allele were 53%. The wild type allele frequency was 0.52, and the polymorphic allele was 0.48. In the investigated group of patients, there was no carrier of the wild type genotype of polymorphism rs 776746 in the CYP3A5 gene. The heterozygous carriers of the CYP3A5 * 3 polymorphic allele were present with 13% and homozygous for polymorphic alleles with 87%. The frequency of the wild type allele was 0.06, and the polymorphic allele 0.94. In the investigated group of patients there were no homozygous carriers of the polymorphic allele polymorphism rs 35599367 in the CYP3A4 gene. Homozygotes for wild type CYP3A4 * 1 allele were present with 94%, while in 6% of patients, polymorphic CYP3A4 * 22 allele was detected in heterozygous form. The wild type allele frequency was 0.96, and the polymorphic allele was 0.04. In the examined group of patients, there were 42% of carriers of the wild type genotype of polymorphism rs1057868 in the POR gene. Homozygous carriers of polymorphic allele POR * 28 were 13%, while heterozygous carriers of polymorphic allele were 45%. The wild type allele frequency was 0.65, and the polymorphic allele was 0.35. It has been found that children with genotype *3/*3 of polymorphism rs776746 in the gene of CYP3A5 (nonexpressors) have significantly higher total C_0/D compared to a group of children of CYP3A5 expressors (genotype *1/*3)($p=0,01$). Children aged ≤ 6 years require significantly greater drug dose to

achieve adequate levels of CsA in blood compared to children aged > 6 years (7.12 ± 1.56 vs 4.91 ± 1.75 , $p=0,001$), which is followed by significantly lower C_0/D ratio (18.82 ± 4.72 vs 34.19 ± 11.8 , $p=0,001$) and C_2/D (106.75 ± 26.99 vs 209.20 ± 71.57 , $p < 0.001$). The carriers of polymorphic T allele in the ABCB1 gene, statistically observed, received daily dose of CsA < 4 mg/kgTT significant more often compared to allele C homozygotes (95% vs. 50%, $p=0,005$). The carriers of polymorphic *28 allele in the gene of POR (rs1057868), statistically observed, received daily dose of CsA > 6 mg/kgTT significant more often compared to allele *1 (94% vs. 62%, $p=0.03$). Multivariate analysis identified the independent, significant, inversely proportional effect of age ($p < 0.001$) and significant effect of the POR*28 polymorphism ($p=0.04$) on the total daily dose of CsA, while age ($p < 0.001$) and the genotype with CYP3A5*1 allele of polymorphism rs776746 in the gene of CYP3A5 ($p=0.02$) had a significant effect on the total C_0/D ratio. The independent, significant, proportional effect of age ($p < 0.001$) and a significant effect of the genotype with POR*28 allele of polymorphism rs1057868 in the gene of POR ($p=0.03$) on a total C_2/D ratio was detected. The independent, significant effect of genotypes with the POR*28 allele of polymorphism rs1057868 in the gene of POR ($p=0.012$), as well as of genotypes with the T allele of polymorphism rs1045642 in the gene of ABCB1 ($p=0.04$) and genotypes with the CYP3A5*1 allele of polymorphism rs776746 in the gene of CYP3A5 ($p=0.006$) on the total C_2/D was found in the group of children under 6 years of age, while no significant effects of tested polymorphism were detected in the group of children older than 6 years.

Conclusion: Age of a child, as well as allelic variants of tested polymorphism in the genes of POR, CYP3A5 and ABCB1, are significantly and independently associated with pharmacokinetics of CsA in pediatric patients after kidney transplantation. The results of this study certainly require additional research and checking in a larger sample, which is possible only in large multicenter studies. In order to better adapt the therapy to each patient, the said factors should be taken into consideration as significant modulators of therapeutic response.

Key words: children, age, kidney transplantation, Cyclosporine A , polymorphism

Scientific field: medicine

Scientific subfield: pediatric nephrology

SADRŽAJ

1.Uvod.....	1
1.1. Metode zamene bubrežne funkcije.....	1
1.2.Specifičnosti transplantacije bubrega kod dece u odnosu na adultnu populaciju.....	2
1.2.1. Specifičnosti imunog sistema deteta posmatrano sa aspekta transplantacije organa.....	4
1.2.2.Najčešći uzroci bubrežne insuficijencije u dečjem uzrastu.....	5
1.2.3. Neophodnost vakcinacije pre transplantacije organa.....	6
1.2.4. Prioritet dece kao primaoca bubrega u slučaju kadaverične transplantacije.....	6
1.2.5. Hiruški aspekti transplantacije kod dece.....	7
1.3.Specifičnosti postransplantacionog toka kod dece u odnosu na adultnu populaciju.....	8
1.3.1. Preživljavanje transplantiranog organa.....	8
1.3.2. Virusne infekcije i njihov uticaj na postransplantacioni tok.....	9
1.3.3. Problemi vezani za rast dece.....	9
1.3.4. Prevođenje u adultni centar.....	10
1.4. Primena terapije u cilju prevencije odbacivanja transplantiranog bubrega.....	10
1.4.1. Istorijski razvoj transplantacije i imunosupresivnih lekova.....	11
1.4.2. Značaj kalcineurin inhibitora u transplantaciji organa	13
1.4.3. Mehanizam dejstva kalcineurin inhibitora.....	13
1.4.4. Neželjeni efekti CNI.....	14
1.4.5. Doziranje lekova kod dece.....	14
1.5.Osnov kliničke farmakokinetike.....	15
1.5.1. Farmakokinetika CsA.....	15

1.5.2. Uticaj biološkog sazrevanja detetovog organizma na metabolizam lekova.....	16
1.6. Značaj farmakogenetskih studija za uspešnu transplantaciju organa.....	17
1.6.1. P glikoprotein.....	18
1.6.1.1. Uticaj P-gp na farmakokinetiku.....	18
1.6.1.2. Genetski polimorfizmi ABCB1 gena.....	19
1.6.1.3. Molekulski mehanizam uticaja C3435C>T SNP u genu za ABCB1 na P-gp i njegovu funkciju.....	21
1.6.1.4. Uticaj SNP ABCB1 gena na farmakokinetiku CsA.....	21
1.6.2. Uticaj polimorfizama na proces biotransformacije CsA.....	23
1.6.2.1. Polimorfizmi gena koji eksprimira CYP3A5 enzim.....	23
1.6.2.2. Uticaj CYP3A56986A>G SNP na farmakokinetiku CsA.....	23
1.6.2.3. Polimorfizmi gena koji eksprimira CYP3A4 enzim.....	25
1.6.2.4. Uticaj 392A>G SNP u CYP3A4 genu na farmakokinetiku CsA.....	25
1.6.2.5. Uticaj novog CYP3A4*22 polimorfizma u CYP3A4 genu na ekspresiju enzima i farmakokinetiku CYP3A4 supstrata.....	26
1.6.3. Uticaj kombinacije genotipova na farmakokinetiku CsA.....	27
1.6.3.1. Uticaj SNP u genu za P450 oksidoreduktazu na farmakokinetiku CNI.....	29
1.7. Značaj multicentričnih studija za bolji ishod lečenja dece sa transplantiranim organom.....	30
2. Ciljevi rada.....	31
3. Materijal i metode.....	32
3.1. Ispitanici.....	32
3.2. Protokol imunosupresivne terapije.....	32

3.3. Metod određivanja nivoa Ciklosporina A u krvi.....	32
3.4. Klinički podaci.....	33
3.5. Genetske analize.....	33
3.6. Statističke metode.....	33
4. Rezultati.....	35
4.1. Bazalne karakteristike ispitanika i demografski podaci	35
4.2. Doza i nivoi CsA u krvi.....	37
4.3. Distribucija genotipova polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	42
4.4.1. Raspodela pacijenata koji primaju različite doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1.....	44
4.4.2. Raspodela pacijenata koji primaju različite doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR	44
4.5. Uticaj polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 na dnevnu dozu CsA, odnos C ₀ /D i C ₂ /D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega.....	45
4.6. Uticaj polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 na dnevnu dozu CsA, odnos C ₀ /D i C ₂ /D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega.....	46
4.7. Uticaj polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4 na dnevnu dozu CsA,odnos C ₀ /D i C ₂ /D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega.....	48
4.8. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C ₀ /D i C ₂ /D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega.....	49
4.9. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C ₀ /D i C ₂ /D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca CC i CT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1.....	51

4.10. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca TT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1.....	52
4.11 Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod CYP3A5 neekspresora.....	54
4.12. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca *1/*1 genotipa polimorfizma rs1057868 u genu za POR.....	55
4.13. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR (*1/*28 i *28/*28).....	56
4.14. Multifaktorijalna analiza faktora koji utiču na dozu CsA i odnose C_0/D i C_2/D ..	58
4.15. Multifaktorijalna analiza faktora koji utiču na dozu CsA i odnose C_0/D i C_2/D u zavisnosti od uzrasta.....	60
5. Diskusija.....	62
6. Zaključci.....	81
7. Literatura.....	83

1.UVOD

1.1. Metode zamene bubrežne funkcije

Metode zamene bubrežne funkcije, bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom (TBI) su: hemodijaliza (HD), peritoneumska dijaliza (PD) i transplantacija bubrega. HD je ekstrakorporalna metoda purifikacije krvi koja se vrši procesom difuzije, ultrafiltracije ili konvekcije i adsorpcije od strane membrane za dijalizu. PD je metoda zamene bubrežne funkcije koji se odvija preko trbušne maramice, koja je iskorišćena kao bogato vaskularizovana površina za odstranjivanje štetnih materija iz organizma, takođe, procesima difuzije, osmoze i ultrafiltracije. Najčešće se primenjuje kontinuirana ambulatorna PD (KAPD) i kontinuirana ciklična PD (KCPD), a ređe drugi vidovi PD (Hrvačević R, 2002). Transplantacija bubrega sa živog donora i kadavera je počela da se radi šezdesetih godina prošlog veka. Hiruška tehnika transplantacije je proučena i pre tog vremena. Poteškoće je zadavala medikamentna terapija čiji je cilj bio da suprimira imuni sistem domaćina. U to vreme počela je da se radi tipizacija tkiva i cross-match. Kasnije, pronalazak boljih imunosupresivnih lekova je doprineo znatno dužem preživljavanju grafta tj. uspehu ovog vida zamene bubrežne funkcije. (Protas JM, 1988).

Donor bubrega za živu transplantaciju je najčešće krvni srodnik primaoca, mada može biti i supružnik ili prijatelj. Kadaverični donor je moždano mrtva osoba koja se artefijalno održava u životu do preuzimanja alografta. Vreme čekanja na listi za kadaveričnu transplantaciju je u pojedinim zemljama jako dugo. Sa druge strane transplantacija sa živog donora može se na vreme pripremati i biti inicijalni (preemptivna transplantacija) metod zamene bubrežne funkcije.

Na preživljavanje transplantiranog bubrega (grafta ili alografta) utiču brojni faktori: HLA podudarnost, trajanje hladne i tople ishemije, prisustvo ili odsustvo citotoksičnih antitela, epizode akutnog ili hroničnog odbacivanja transplantiranog organa, primenjen imunosupresivni protokol itd.

1.2. Specifičnosti transplantacije bubrega kod dece u odnosu na adultnu populaciju

Za decu sa TBI transplantacija bubrega je zlatan standard zamene brežne funkcije uz jednogodišnje preživljavanje pacijenta i grafta preko 95%. Odraslo doba doživi 90-95% dece sa transplantiranim bubregom (Dharnidharka VRi sar., 2014, Allain Latinay E i sar., 2009). Uspešnost ove metode zamene bubrežne funkcije raste vrtoglavom brzinom tokom prethodne decenije zahvaljujući napretku hiruške tenike, boljem odabiru donora i primaoca, kao i boljoj kontroli komplikacija. Ne sme se zaboraviti sve moćnija imunosupresivna terapija koja različitim mehanizmima inhibira imuni sistem domaćina (Hartono i sar., 2013). Od 1980 godine do 2012 godine učestalost akutnih kriza odbacivanja tokom prve godine je opala sa 80 % na 15% (Dharnidharka VR i sar., 2014). Ipak, krajnja sudbina pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom nije bez zamki. Glavne barijere ka uspešnoj transplantaciji ranijih godina bile su kratkoročne komplikacije, prvenstveno akutno odbacivanje i ishemisko-reperfuziono oštećenje, a danas dugoročne komplikacije kao što su hronična alograft nefropatija, infekcija, malignitet i kardiovaskularna bolest (Filler G i sar., 2010), koje značajno utiču na morbiditet i mortalitet pacijenta/grafta. Kardiovaskularne bolesti transplantirane dece se razlikuju u odnosu na odrasle. Kod odraslih, bolest se manifestuje simptomima ishemijske bolesti srca, koji se ne javljaju kod pedijatrijskih pacijenata. U faktore rizika kardiovaskularnog mortaliteta/morbiditeta kod dece sa transplantiranim bubregom spadaju: hipertenzija, dijabetes melitus i dislipidemija, dobro poznate komplikacije hronične primene imunosupresivne terapije. Najčešći kardiovaskularni uzrok smrti kod dece sa transplantiranim bubregom je aritmija (Cattaneo D i sar., 2012).

Kada se govori o transplantaciji ove grupe pacijenata neprestano se raspravlja o novim strategijama i izmenama. Takođe, izučavaju se novi imunosupresivni protokoli, ne samo sa ciljem da se smanji rizik odbacivanja grafta, već da se obezbedi normalan rast i razvoj deteta. Alograft nefropatija je vodeći uzrok insuficijencije grafta posle prve godine od transplantacije (Filler G, 2011). Destogodišnje preživljavanje grafta posle transplantacije u pedijatrijskoj dobi je 50-60% (Fille G i sar., 2010). Mehanizmi koji dovode do gubitka nefrona i disfunkcije grafta su imunološki i neimunološki. Značajan neimunološki faktor je svakako akutna i hronična nefrotoksičnost izazvana upotrebom

kalcineurin inhibitora (CNI): Ciklosporina A (CsA) i Takrolimusa (Tac). Ovi lekovi takođe doprinose i arterijskoj hipertenziji i dislipidemiji, sledeća dva faktora odgovorna za slabljenje funkcije grafta pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom (Cattaneo D i sar., 2012). Od kada je poznat nefrotoksičan efekat CNI, prvenstveno kod njihove dugotrajne upotrebe, inidikovana je modifikacija imunosupresivnog protokola u slučaju histološke potvrde nefrotoksičnosti. Otuda postoje različiti imunosupresivni protokoli koji imaju za cilj da izbegnu ili smanje CNI indukovanu nefrotoksičnost (Höcker B i sar., 2011, Sarwal M i sar., 2007, Pescovitz MD, 2008). Nažalost, isključenje CNI kod pedijatrijskih pacijenata sa stabilnom ili oslabljenom funkcijom transplantiranog bubrega često dovodi do neželjenih efekata po graft, prvenstveno akutnih kriza odbacivanja koje se jave kod 20% bolesnika (Höcker B i sar., 2011). Takođe, de novo upotreba m-TOR inhibitora (sirolimusa ili everolimusa) ili konverzija sa CNI na m-TOR inhibitore je druga terapijska opcija koja ima za cilj redukciju nefrotoksičnosti izazvanu CNI (Höcker B i sar., 2011, Sarwal M i sar., 2007). Međutim, m-TOR inhibitori nose sa sobom rizik od drugih neželjenih efekata kao što su proteinurija, hiperlipidemija, mijelosupresija, hipergonadotropni hipogonadizam. Indukciona terapija antitelima je svakako dovela do redukovanja doze CNI i kortikosteroida uz održavanje adekvatne imunosupresije, ali i ovaj vid terapije ima svoje rizike, pre svega veću stopu infekcija izazvane citomegalovirusom (CMV), polioma virusima i učestaliju pojavu limfoma (Pescovitz MD, 2008). Dalje poboljšanje dugoročnog preživljavanja transplantiranog bubrega u dečjem uzrastu zahteva fokusiranje na dugoročne komplikacije kao što su kardiovaskulni problemi i suvišna imunosupresija, kao i njihovo suzbijanje. Jedan od načina izbegavanja i lečenja neželjenih efekata pojedinih imunosupresiva je svakako i prilagođavanje terapije individualnim potrebama pacijenta. U prošlosti doze imunosupresivnih lekova kod dece određivane su individualno, na osnovu telesne težine ili telesne površine. Danas nam je svakako od velike koristi i određivanje koncentracije leka u krvi i u skladu sa tim korigovanje doze. Međutim, sve je veći broj studija koji ukazuje na značaj farmakogenetskog testiranja potencijalnih primaoca bubrega. Na osnovu rezultata ovih ispitivanja svakog pojedinca, pristupa se individualnom imunosupresivnom protokolu i dozi lekova. U ovom pogledu sada nam je od najvećeg značaja identifikacija SNP (eng.

single nucleotide polymorphisms) i haplotipova odgovornih za kodiranje proteina uključenih u transport, metabolizam i odgovor na lek (Cattaneo D i sar., 2012).

Izvesni aspekti transplantacije bubrega kod dece i odraslih su slični: imunosupresivni lekovi i protokoli njihove primene se ne razlikuju značajno, kreatinin je osnovni serumski biomarker funkcije grafta, dijagnoza akutnog odbacivanja postavlja se na osnovu biopsije bubrega uz primenu Banff kriterijuma za klasifikaciju odbacivanja, mehanizmi odbacivanja kalema su takođe slični (Haas M i sar., 2014, Nankivell BJ, 2010, Harmon WE, 2010, Solez K i sar., 2008).

Međutim, drugi aspekti transplantacije bubrega dece se razlikuju u odnosu na adultnu populaciju i to prvenstveno: imunološki faktori, primarna bubrežna bolest koja dovodi do bubrežne insuficijencije, uz često pridružen urološki problem, vakcinacija koju je potrebno obaviti pre transplantacije, specifičnost dodele bubrega od kadaveričnog donora kada su u pitanju deca primaoci, specifičnost hiruških tehnika transplantacije kod male dece, specifičnosti metabolizma lekova najmlađih pacijenata, veća učestalost primarnih virusnih infekcija nakon transplantacije, neophodnost praćenja rasta deteta i njegovog neurokognitivnog razvoja, na kraju, ali ne manje bitno, ne sme se zaboraviti da dete sa transplantiranim bubregom mora biti spremno za prelazak u adultni centar gde će se dalje obavljati kontrole i sprovoditi potrebno lečenje (Dharnidharka VR i sar., 2014, Medeiros M i sar., 2015).

1.2.1. Specifičnosti imunog sistema deteta posmatrano sa aspekta transplantacije organa

Imuni sistem čoveka trpi brojne promene od rođenja do adultnog doba što svakako utiče na antigensku prezentaciju i imuni odgovor prema graftu. Tokom rasta i razvoja deteta dolazi do sazrevanja imunog sistema. Povećava se broj cirkulišućih T i B ćelija u krvi, što je praćeno i povećanjem aloreaktivnosti (Shearer WT i sar., 2003, Härtel C i sar., 2005). Aktivnost timusa je snažna tokom detinjstva, ali slabi u zrelom dobu (McFarland RD i sar., 2000). Kod odraslih involucija (atrofija) timusa (Linton PJ i sar., 2004, Dorshkind K (1) i sar., 2009) i stalna izloženost antigenima dovodi do prelaska naivnih T ćelija u memorijske T ćelije (McFarland RD i sar., 2000). U poređenju sa odraslima, deca imaju aloimuni odgovor koji se karakteriše manjom

ekspresijom kostimulatornog liganda CD40L na T ćelijama (Brugnoni D i sar., 1996), manjim brojem antigen specifičnih T ćelijskih prekursora (Hassan J i sar., 1996), višim nivoom citokina Th2 ćelija u odnosu na citokine Th1 ćelija (Hanna-Wakim R i sar., 2009), smanjenom efektornom funkcijom T ćelija (Chiba Y i sar 1989) i nižim titrom anti-HLA antitela pre transplantacije (Gupta A i sar 2008). Tako npr. stepen aktivacije CD4+T ćelija, koje proizvode citokine (IFN- γ , IL4), nakon stimulacije enterotoksinom stafilokoka je znatno manji kod dece do 10 godine u odnosu na stariju populaciju (Dorshkind K (2) i sar., 2009, Hanna-Wakim R i sar., 2009). Manje zrele dendritske ćelije, doprinose manjem stepenu hroničnog odbacivanja grafta kod najmlađih pacijenata. Sve ovo ukazuje da „naivan“ imuni sistem dece doprinosi boljoj prognozi posle transplantacije kada govorimo o odbacivanju, važnom neželjenom efektu ove metode lečenja bubrežne insuficijencije, kao i boljim rezultatima u pogledu preživljavanja grafta kod dece mlađe od pet godina.

1.2.2. Najčešći uzroci bubrežne insuficijencije u dečjem uzrastu

Vodeći uzrok bubrežne insuficijencije u mlađem dečjem uzrastu su urođene ili nasledne bolesti bubrega i urinarnog trakta, (engl. congenital abnormalities of the kidney and urinary tract –CAKUT). Najčešće bolesti koje spadaju u ovu grupu su displazija bubrega, opstruktivna uropatija i refluksna nefropatija. CAKUT često zahtevaju urološki treman i specifičnu primpremu primaoca bubrega kako pre, tako i posle transplantacije. Loša funkcija mokraćne bešike često prati CAKUT. Kod bolesnika sa valvulom uretre posterior (VUP) nefrostoma je često neophodna u najranijem detinjstvu u cilju dekompresije difunkcionalne mokraćne bešike. Nekada je nefrostoma od velike koristi i nakon transplantacije, duži ili kraći vremenski period. U slučaju malog kapaciteta mokraćne bešike pribegava se augmentaciji najčešće uz pomoć ileuma ili apendiksa. Neka deca zahtevaju redovnu intermitentnu katetrizaciju mokraćne bešike. Pacijenti sa opstruktivnom uropatijom češće imaju infekcije urinarnog trakta (IUT) čak i posle transplantacije u odnosu na decu sa drugim uzrokom bubrežne slabosti. To često zahteva dugotrajnu antibiotsku profilaksu (Dharnidharka VR i sar., 2014).

U kasnijem detinjstvu najčešći uzrok bubrežne slabosti su glomerulopatije: fokalna segmentna glomeruloskleroza (FSGS) i lupus nefritis. FSGS se u velikom procentu vraća u transplantiran bubreg u prvim satima i danima posle transplantacije. To zahteva specifičan tretman i pravi velike probleme u ranom postransplantacionom toku (Dharnidharka VR i sar., 2014).

U adultnom dobu, najčešći uzroci primarne bubrežne slabosti koji zahtevaju zamenu bubrežne funkcije su diabetes mellitus, hipertenzija i autozomno dominantna policistična bolest bubrega (Dharnidharka VR i sar., 2014).

1.2.3. Neophodnost vakcinacije pre transplantacije organa

Deca se vakcinišu prema kalendaru vakcinacije, a u cilju prevencije određenih infektivnih bolesti. Međutim, vakcine mogu biti neefektivne ako se daju imunokompromitovanom pacijentu. Zbog toga je od ključnog značaja potpuna imunizacija deteta pre transplantacije organa. Nažalost, imuni sistem najmlađih pacijenata sa TBI je znatno slabiji u odnosu na zdravu populaciju uz smanjeno trajanje već stečenog imuniteta. To često zahteva veću početnu dozu vakcine, kontrolu titra antitela i u skladu sa potrebama primenu booster doze vakcine. Posle transplantacije organa primena živih vakcina je zabranjena, a ostale vakcine mogu biti primenjene nakon smanjenja visoke doze imunosupresiva, uglavnom šest do dvanest meseci nakon transplantacije (Neu AM i sar., 1998). Vakcina protiv gripa se savetuje svake godine (Dharnidharka VR i sar., 2014).

1.2.4. Prioritet dece kao primaoca bubrega u slučaju kadaverične transplantacije

Raspodela bubrega od kadaveričnog donora zahteva primenu složenog algoritma koji između ostalog obuhvata: stepen anti-HLA senzibilizacije, potrebu za više kadaveričnih organa, podudarnost krvne grupe, relativnu HLA podudarnost, vreme čekanja na listi za kadaveričnu transplantaciju.

Procenat dece na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega je mali. Takođe, ova grupa pacijenata zahteva veći broj transplantacija u životu. Shodno tome i naravno gore pomenutim specifičnostima dečjeg organizma, prvenstvenu u pogledu

rasta i ravoja, u mnogim zemljama ova populacija pacijenata ima prioritet pri dodeli kadaveričnog organa. Stoga se kvalitetniji bubrezi od mlađih preminulih donora, prvenstveno, dodeljuju deci. U tim zemljama vreme čekanja dece na kadaveričnu transplantaciju je kratko, do 3 meseca (Reese PP i sar., 2014). Međutim, ova strategija smanjuje broj transplantacija sa živog donora što uz lošiju HLA podudarnosti primaoca i kadaveričnih donora utiče na lošiji rani i kasni postransplantacioni ishod (Moudgil A i sar., 2013).

1.2.5. Hiruški aspekti transplantacije kod dece

Što se tiče veličine grafta, danas se u centrima sa velikim iskustvo i obučanim hiruškim kadrom adultni bubrezi presađuju deci, ako su dostigli TT od šest kilograma. U velikom broju slučajeva, peritonealna duplja odojčeta ima dovoljno mesta da primi adultni organ bez kompresije grafta (Sarwal MM i sar., 2000). Međutim, čak i kada hiruški aspekt transplantacije dobro prođe, presađivanje adultnog organa detetu nije bez začkoljica. Tako npr. veliki graft kod malog deteta doprinosi velikoj glomerulskoj filtraciji i posledično niskim vrednostima serumskog kreatinina. Stoga nam vrednost kreatinin u serumu (koja u ovom slučaju može biti normalna ili niska) ne može biti alarm za akutno odbacivanje.

Hiruška procedura transplantacije bubrega kod dece TT preko 30 kg se ne razlikuje u odnosu na adulte. Kod deteta sa TT ispod 10 kg, posle medijalnog longitudinalnog reza, bubreg se smešta intraperitonealno obzirom da je prostor između peritoneuma i subkutane fascije ograničen. Anastomoza se pravi između renalnih krvnih sudova donora i aorte i vene kave inferior primaoca. Kod dece sa TT između 10-30 kg svaki hirurrg ima individualni pristup u pogledu anastomoze i mesta gde će se bubreg transplantirati, prvenstveno zavisno od anatomskih osobnosti primaoca.

Kod male dece, stroga pažnja se mora posvetiti intravaskularnom volumenu tokom transplantacije i u ranom postoperativnom toku (Salvatierra O Jr i sar., 2006, Shapiro R i sar., 2010).

Privremeni ureteralni stent se uglavnom koristi kod adultnih pacijenata (Wilson CH i sar., 2005), ali se ne zna sa sigurnošću njegova korist kod transplantirane dece. Svakako je ureteralni stent bio uobičajena preporuka pre njegovog dovođenja u vezu sa

BK nefropatijom (Thomas A i sar., 2007, Brennan DC i sar., 2005). Pojedini pedijatrijski pacijenti zahtevaju reinplantaciju uretera, augmentaciju mogaćne bešike i druge urološke intervencije pre ili tokom transplantacije bubrega (Riley P i sar., 2010).

1.3. Specifičnosti postransplantacionog toka kod dece u odnosu na adultnu populaciju

1.3.1. Preživljavanje transplantiranog organa

Preživljavanje grafta bubrega kod pedijatrijskih pacijenata vremenom je znatno bolje. Za takav napredak odgovorni su brojni faktori: bolja pretransplantaciona priprema, usavršavanje hiruških tehnika, pažljiv izbor donora, moćni imunosupresivni lekovi, bolje razumevanje farmakokinetike u dečjem uzrastu, primena savremenih terapijskih protokola. Pored toga stopa akutnog odbacivanje, kod pedijatrijskih pacijenata, se znatno smanjila u prvoj godini posle translantacije sa 55%, kolika je bila kasnih 80 godina prošlog veka, na 10% prema poslednjim istraživanjima. Ovaj trend prate čak i zemlje u razvoju, koje svakako imaju nižu stopu transplantacija i manje resurse za skupe imunosupresive. Najveća stopa poboljšanja je primećena kod pedijatrijskih pacijenata od 5 i ispod 5 godina (Dharnidharka VR i sar., 2014).

Adolescenti imaju najlošiju stopu dugoročnog preživljavanja grafta i među svim starosnim grupama pedijatrije predstavljaju primaoca sa najvećim stepenom rizika. Glavni uzrok tome je neredovno uzimanje imunosupresivne terapije (Dobbels F i sar., 2010, Hsu DT, 2005). Stoga je desetogodišnje preživljavanje grafta bubrega bolje kod mlađe dece u odnosu na adolescente i adulte (Scientific Registry of Transplant Recipients, 2012).

Stopa mortaliteta među pedijatrijskim pacijentima posle transplantacije bubrega je niska, a najčešći uzroci letalnog ishoda su infekcija i malignitet. Kod adultnih primaoca bubrega, stopa mortaliteta je znatno veća, a njen najčeći uzrok su kardiovaskularne bolesti (Dharnidharka VR i sar., 2014).

1.3.2. Virusne infekcije i njihov uticaj na postransplantacioni tok

Virusne infekcije izazvane EBV, CMV i BK virusom su izmenile postransplantacioni tok, što je svakako posledica znatno potentnije imunosupresivne terapije koja se danas primenjuje u odnosu na onu koja je korišćena u prošlosti. Sredinom 90 godina prošlog veka učestalost epštajnbar virusne (EBV) infekcije i postransplantacione limfoproliferativne bolesti (PTLD) je znatno porasla, a BK virus se pojavio kao nov problem posle transplantacije. Ovi virusi kod imunokompetetnog čoveka uglavnom izazivaju blagu bolest koja se tipično javlja u dečjem uzrastu. Posle primarne infekcije virus ostaje da živi u retikuloendotelnom sistemu ili uroepitelu u svom latentnom obliku. Imajući u vidu da pedijatrski pacijenti uglavnom dobijaju bubreg od adultnog donora, velika je verovatnoća da bubreg seropozitivnog donora bude presađen u seronegativnog primaoca. Tako su transplantirani imunokompromitovani pedijatrski pacijenti, u poređenju sa adultnim, pod većim rizikom da imaju teži oblik primarne infekcije izazvane CMV, EBV i BK virusom (Dharnidharka VR i sar., 2009). Ove primarne infekcije su praćene većim stepenom komplikacija, gubitkom grafta pa čak i letalnim ishodom (Dharnidharka VR i sar., 2011 (1) , Dharnidharka VR i sar., 2011 (2)). U slučaju dokazane infekcije ovim virusima prva terapijska opcija je smanjenje imunosupresivne terapije, a ishod lečenja je neizvestan. Kada govorimo o antivirusnim lekovima, Ganciklovir je efikasan kao profilaksa, a i za lečenje CMV i EBV izazvane infekcije. Primena profilakse, nakon transplantacije doprinela je smanjenju stope PTLD. (Dharnidharka VR i sar 2011., (2), Dharnidharka VR i sar., 2008). Za lečenje infekcije izazvane BK virusom, antivirusni lekovi nisu dali očekivane rezultate iako se u nekim centrima primenjuje cidoforir i leflunomid. U cilju pravovremene dijagnostike i terapije pedijatrski transplantacioni centari vrše redovne kontrole seruma (PCR metodom) na prisustvo ovih virusa (Al Khasawneh E i sar., 2013).

1.3.3. Problemi vezani za rast dece

Hronična bubrežna insuficijencija (HBI) dovodi do ozbiljnog zaostatka u rastu, što često doprinosi ozbiljnim psihičkim problemima tokom detinjstva (Fine RN, 2010).

Pedijatrijski pacijenti sa bubrežnom insuficijencijom su prosečno 2,5 SD ispod očekivane visine za njihove godine u vreme transplantacije. Adekvatna ishrana pre transplantacije i primena rekombinantnog humanog hormona rasta može redukovati, ali ne i eliminisati ovaj zaostatak (Fine RN, 2010). Transplantacija bubrega najviše doprinosi poboljšanju linearnog rasta najmlađih pacijenata (Pape L i sar., 2005). Najbolji efekti se postižu kod najmlađih pacijenata, najlošiji kod adolescenata. Upotreba imunosupresivnih protokola gde se kortikosteroidi brzo isključuju ili ne upotrebljavaju dodatno poboljšavaju linearni rast (Bell DE i sar., 2010).

1.3.4. Prevođenje u adultni centar

U jednom momentu mladići i devojke, sa transplantiranim bubregom, se moraju prevesti u adultni centar radi nastavka praćenja i lečenja. Taj proces tranzicije često je stresan za pacijenta i roditelje. Studije su pokazale da je postepen prelaz u drugu ustanovu uz povremene kontrole u oba centra mnogo bolji metod od naglog prevođenja (Bell LE i sar., 2008).

1.4. Primena terapije u cilju prevencije odbacivanja transplantiranog bubrega

Dobra imunosupresija je ključni preduslov uspešne transplantacije solidnih organa. Zahvaljujući njoj, sada, znatno ređe srećemo gubitak grafta kao posledicu akutne krize odbacivanja (AL Taylor i sar., 2005, Hartono C i sar., 2013). Danas su nam dostupni brojni imunosupresivni lekovi sa različitim mehanizmom delovanja:

1. Kortikosteroidi (Prednisolon, Prednison, Metil-prednisolon)
2. Antiproliferativni lekovi (Azathioprin, Mycophenolat mofetil, Mycophenolat sodium)
3. Kalcineurin inhibitori (CNI) (Cyclosporin, Tacrolimus)
4. TOR inhibitori (Sirolimus, Everolimus)
5. Poliklonalna anti-limfocitna antitela (ALG, ATG, ALS)
6. Monoklonalna antitela (Basiliximab, Daclizumab)

Svi nabrojani lekovi prouzrokuju nespecifičnu imunosupresiju, a nažalost imaju i brojne neželjene efekte. Prvenstveno povećavaju rizik za nastanak infekcije i maligniteta (najčešće postransplantacione limfoproliferativne bolesti). Pored toga imaju i specifične neželjene reakcije.

1.4.1. Istorijski razvoj transplantacije i imunosupresivnih lekova

Prva uspešna transplantacije bubrega obavljena je 1954 godine i to samo zahvaljujući tome što su donor i primaoc bili monozigotni blizanci. Transplantacija između neidentičnih osoba, u to vreme je praćena ranim akutnim odbacivanjem i gubitkom grafta. Ovi pionirski pokušaji transplantacije organa doprineli su samo usavršavanju hiruške tehnike same procedure, ali poboljšanja kvaliteta života za primaoca organa nije bilo. Zračenje čitavog tela, u cilju imunosupresije i sprečavanja odbacivanja kalema, korišćeno je u Americi i Francuskoj kasnih pedesetih godina dvadestog veka. Ishod je u najvećem broju slučajeva bio loš (Murray JE i sar., 1962, Merrill JP i sar., 1960, Kuss R i sar., 1962).

Prvi hemijski imunosupresiv koji se pominje u eksperimentalnoj transplantacionoj medicini bio je 6-mercaptopurin (6-MP) šezdesetih godina prošlog veka. Primećeno je da ovaj lek doprinosi imunološkoj toleranciji na strani protein (humani albumin seruma), a kasnije i da prolongira preživljavanje grafta kože kod zečeva (Schwartz R i sar., 1958, Schwartz R i sar., 1959, Schwartz R i sar., 1960.). Uz teške komorbiditete, sa ovim lekom prolongirno je i preživljavanje grafta bubrega kod psa (Calne RY i sar., 1960).

Otprilike u isto vreme grupa naučnika u Njujorku je izumila par analoga nukleotida, a sa ciljem da pronađu novi hemioterapijski lek za lečenje leukemije (Elion GB i sar., 1960). U Bostonu je testirana sposobnost ovih lekova da prolongira preživljavanje transplantiranog bubrega kod psa. Jedan od njih BW57-322 (azathioprin) se pokazao kao znatno manje toksičan u odnosu na 6-MP. Takođe, njegova primena dovela je do dužeg preživljavanje grafta (Calne RY 1961 (1), Calne RY, 1961 (2)). Ubrzo je ovaj lek uveden u kliničku praksu. Iako se pokazao kao nešto efikasniji u odnosu na zračenje čitavog tela, mali broj primaoca nije odbacio graft (Murray JE i sar., 1963).

Upotreba kortikosteroida, kao imunosupresiva u transplantacionoj medicini pokušana je još pedesetih godina dvadesetog veka u Francuskoj bez uspeha. Značaj ovih lekova je došao do izražaja ranih šezdesetih godina prošlog veka kada su počeli da se primenjuju zajedno sa azathioprinom (Starzel TE i sar., 1963). Uprkos dvojnoj terapiji, jedan broj pacijenata sa transplantiranim bubegom je imao akutne krize odbacivanja, od kojih su neki odlično reagovali na pulsne doze kortikosteroida. Preživljavanje grafta je znatno poboljšano. Ipak, čak do kraja sedamdesetih godina prošlog veka jednogodišnje preživljavanje transplantiranog bubrega procenjivano je na 50%.

Azathioprin i steroidi su ostali kamen temeljac imunosupresije narednih 25 godina. U međuvremenu se tragalo za jedinjenjem koje će moći da ošteti funkciju limfocita. Dok su se timektomija i splenektomija pokazale kao bezuspešne, antilimfocitni globulin (ALG), dobijen iz seruma konja i zečeva kojima su prethodno ubrizgani humani limfociti, je mnogo obećavao. Pokazao se kao vredan dodatak steroidima i azathioprinu. Koristio se kako za lečenje akutnih kriza odbacivanja, tako i kao deo inicijalne imunosupresivne terapije (Starzl i sar., 1967).

CsA je inicijalno ispitivan kao antigljivični lek. Tokom 1976 godine potvrđeno je njegovo odlično antilimfocitno svojstvo, prvo eksperimentalno na modelu miša sa presađenom kožom (Borel JF i sar., 1976), a naredne godine na modelu psa sa presađenim bubregom (Calne RY i sar., 1977). Ubrzo je odobrena njegova klinička primena, što je olakšalo ne samo transplantaciju bubrega već transplantaciju pankreasa, jetre, a kasnije srca i pluća.

Dalje, sledi značajno otkriće monoklonskih antitela (mAb) u Americi 1970 godine (Kohler G i sar., 1975). Prvo monoklonsko antitelo uvedeno u kliničku praksu 1980 godine bilo je OKT3 (muromonab-CD3). Ovo monoklonsko antitelo je inicijalno korišćeno za lečenje akutnih kriza odbacivanja, a kasnije i kao deo indukcionne terapije (Cosimi AB i sar., 1981).

Kasnih osamdesetih godina prošlog veka počelo je eksperimentalno ispitivanje dva, danas vrlo važna imunosupresiva, Tac (FK506) i sirolimusa (rapamucin). Spoznajom fantastičnih imunosupresivnih svojstava Tac, prvo je korišćen kao terapija spasa kod pacijenata sa teško kontrolisanim odbacivanjem (Bismuth H i sar., 1994,

Klintmalm GB i sar., 1993). Kasnije je potvrđeno da se njegov imunosupresivni potencijal, kao i neželjeni efekti njegove primene ne razlikuju mnogo od istih CsA. Ipak izazivao je više neželjenih reakcija na nivou centralnog nervnog sistema (CNS-a) i imao značajniji prodijabetogen efekat (Pirsch JD i sar., 1997).

Posle 1990 godine tempo pronalazaka novih imunosupresiva je vrtoglavo rastao. Prvo je u kliničku praksu uveden mycophenolat mofetil, zatim sirolimis i everolimus, zajedno sa dva anti-CD25 monoklonska antitela (daclizumab i basiliximab).

1.4.2. Značaj kalcineurin inhibitora u transplantaciji organa

CNI, CsA i Tac su danas osnov imunosupresivne terapije u transplantacionoj medicini, čiji je cilj prevencije odbacivanja kalema. Zlatno pravilo uspešne terapije nakon transplantacije je primeniti minimalnu efektivnu dozu imunosupresiva, kojom se sprečava odbacivanje kalema, a istovremeno neželjeni efekti primenjene imunosupresivne terapije svode na minimum (Srinivas RT i sar., 2005). Merenje koncentracije leka u krvi danas se rutinski primenjuje u ranom i kasnom postransplantacionom toku (Schiff J i sar., 2007). Međutim, to nije dovoljno za određivanje startne doze imunosupresiva, niti objašnjava mehanizme i faktore koji utiču na farmakokinetiku CNI (Staa CE i sar., 2010).

1.4.3. Mehanizam dejstva kalcineurin inhibitora

Molekulski mehanizam kojim CNI sprečavaju aktivaciju T limfocita je dobro poznat (Shibasaki F i sar., 2002). Vezivanje T ćelijskih receptora za donorske MHC molekule pokreće kalcijum zavistan intraćelijski signalni put čiji je krajnji rezultat aktivacija kalcijum/kalmodulin zavisne fosfataze-kalcineurina. To je praćeno intranuklearnom aktivacijom gena odgovornih za sintezu proinflamatornih citokina: IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ i TNF- α . Kada dospe u citoplazmu ćelije CsA se vezuje za ciklofilin, a Tac za FK-506 vezujući protein. Kompleks CNI-imunofilin inhibira kalcineurin i posledičnu transkripciju citokinskih gena. Znači, CNI blokiraju produkciju citokina, kao što je IL-2, sa posledičnom inhibicijom aktivacije i proliferacije T ćelija.

1.4.4. Neželjeni efekti CNI

Upotreba CNI je povezana sa brojnim specifičnim neželjenim efektima. Veliki broj neželjenih efekata je dozno zavistan tj. javlja se u slučaju visoke koncentracije leka u krvi i zajednički je za CsA i Tac.

Oba leka su nefrotoksična i ovo je jedan od najznačajnijih neželjenih efekata naročito kod transplantacije bubrega. Delom je to izazvano jakom vazokonstrikcijom aferentnih arteriola sa posledičnom redukcijom protoka krvi kroz bubrege i smanjenjem glomerulske filtracije (Remuzzi G i sar., 1989, Shihab F, 1996, Nankivell BJ i sar., 2004). Ove promene su reverzibilne. Dugotrajna upotreba CNI prouzrokuje hronične, ireverzibilne promene na graftu, tj. dovode do inetrsticijske fibroze (Mattos A i sar., 2000). Brojne studije ukazuju na nešto manji stepen nefrotoksičnosti Tac u odnosu na CsA (Nankivell BJ i sar., 2004, Martins L i sar., 2004, Artz MA i sar., 2004).

Hipertenzija je drugi zajednički neželjen efekat oba leka (Luke RG, 1991), takođe nešto manje izražen pri upotrebi Tac.

Neurotoksičnost je jače izražena pri upotrebi Tac (Eidellman BH i sar., 1991). Glavobolja i tremor se mogu javiti i pogoršati 1-2 h posle uzimanja leka kada je njegova koncentracija u krvi najviša. Nesanica je takođe čest problem. Agitacija, konvulzije, psihoza, halucinacije, encefalopatija i poremećaj svesti su manje česti neželjeni efekti upotrebe ove grupe lekova (Scott JP i sar., 1988).

U metaboličke neželjene efekte spada povećana sklonost ka razvoju dijabetesa i to 2-4 puta češće pri uzimanju Tac, zatim hiperkalemija, hiperurikemija i hiperlipidemija, češće pri uzimanju CsA (Mayer AD i sar., 1997, Mentzer Jr RM i sar., 1998).

Hiperplazija gingiva i hipertrichoza su specifično neželjeni efekti CsA, a alopecija Tac (Reznik VM i sar., 1987)

1.4.5. Doziranje lekova kod dece

Pre više od 100 godina dr Abraham Jacobi, otac američke pedijatrije, prepoznao je značaj proučavanja farmakoterapije kod dece nezavisno u odnosu na odrasle rekavši da

se pedijatrija ne bavi minijaturnim muškarcima i ženama, te stoga prosto smanjenje doze leka u zavisnosti od veličine tela pacijenta nije dovoljno za uspešno lečene najmlađe populacije.

Međutim, čak i danas doze lekova, kao i ciljna koncentracija imunosupresivnog leka u krvi su najčešće ekstrapolisane na osnovu informacija poznatih za adultne pacijente, uprkos tome što se neki lekovi, kao što je azathioprin, decenijama koriste kod pedijatrijskih pacijenata (Frattarelli DA i sar., 2014). Netačno doziranje leka na osnovu formulacije za odrasle pacijente je čest izvor greške kod najmlađih pacijenata (Ali A i sar., 2014). Ništa manje bitna je činjenica da ne postoje svi imunosupresivi u formi sirupa i mikrogranula koji su pogodni za mlađe pedijatrijske pacijente.

1.5.Osnov kliničke farmakokinetike

Farmakokinetika je naučna disciplina koja se bavi kompleksnim procesom absorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije leka. Najveći broj lekova prolazi u organizmu kroz fazu biotransformacije tj. metabolizma, uglavnom u jetri, a manje u ostalim organima.

1.5.1. Farmakokinetika CsA

Brojni faktori utiču na farmakokinetiku CNI: vrsta solidnog organa koji je transplantiran (jetra, bubreg, srce, pluća...), funkcija jetre i bubrega primaoca organa, prateći lekovi koje primaoc uzima, proteklo vreme od transplantacije, uzrast i rasa pacijenta, hematokrit, koncentracija albumina u krvi, vrsta namirnica u ishrani, proliv, nivo enzima koji učestvuje u metabolizmu leka, ekspresija P glikoproteina (P-gp) od koga zavisi stepen reapsorpcije leka iz digestivnog trakta (bioraspoloživost) (Staaž CE i sar., 2010).

Posle reapsorpcije CNI u sistemska cirkulaciju u jetri nastupa proces metabolizma tj. biotransformacije leka. Faza I biotransformacije se odvija uz učešće enzima citohrom p-450. U fazi II biotransformacije, produkti faze jedan bivaju konjugovani i kao hidrosolubilne materije se zlučuju urinom ili putem žuči.

CNI, CsA i Tac, se metabolišu uz pomoć enzima CYP3A4 i CYP3A5 u tankom crevu, jetri i bubrezima (Dai Y i sar., 2006, Dai Y i sar., 2004, Iwasaiki K, 2007). Metabolizam CsA je pod većim uticajem CYP3A4 nego CYP3A5 enzima. Tri primarna metabolita tj. produkta biotransformacije CsA su AM1, AM9 i AM4N. CYP3A4 katalizuje formiranje sva tri primarna metabolita CsA, dok je AM9 delom i produkt metabolizma CYP3A5 enzima (Dai Y i sar., 2004).

1.5.2. Uticaj biološkog sazrevanja detetovog organizma na metabolizam lekova

Detaljno razumevanje farmakokinetičke specifičnosti imunosupresivnih lekova kod najmlađe populacije pacijenata, uslovljeno biološkim sazrevanjem dečjeg organizma, je od izuzetne važnosti. Ne treba zaboraviti da će oni biti na terapiji ovim lekovima praktično čitav život (del Mar Fernandez i sar., 2002).

Rast tela čoveka nije linearan proces. Uzrasno zavisne promene u funkciji organa su dinamične tokom prve decenije života. Danas se najčešće doza leka za pedijatrijske pacijente određuje uz pomoć telesne težine (TT) ili telesne površine (TP). Međutim, smatra se da je ovaj način pogodan za otpočinjanje terapije, a da je za dugotrajno lečenje ili terapiju održavanja neophodan individualan pristup na osnovu razvojnih specifičnosti vezanih za farmakokinetiku i farmakodinamiku (Kearns GL i sar., 2003). Izmene brojnih fizioloških parametara tokom rasta i razvoja utiču na metabolizam lekova: pH u želucu, vreme potrebno za pražnjenje želuca, vreme tranzita hrane kroz creva, procenat masti i vode u sastavu organizma, koncentracija proteina u plazmi. Podaci o ontogenezi CYP3A4, CYP3A5 enzima i P-gp su oskudni. Ne treba zaboraviti ni genetske specifičnosti svakog pojedinca o kojima će kasnije biti više reči.

Odojče ima najveći metabolički kapacitet, što može zahtevati veće doze leka (Sage D i sar., 2014). Glavni jetrin enzim koji učestvuje u procesu biotransformacije lekova na rođenju je CYP3A7. Ekspresija ovog enzima opada sa vremenom tokom prvih 6 meseci života, dok nivo CYP3A4 enzima dostiže adultni nivo posle prve godine života (Hines RN 2008). Tako npr. klirens intravenski primenjenog midalozama prvenstveno zavisi od aktivnosti jetrinih enzima CYP3A4 i CYP3A5. Dokazan je porast klirensa midalozama od 1,2 do 9 ml/min/kg TT tokom prva tri meseca života (de Wildt i sar., 1999). Takođe klirens karbamazepina iz plazme prvenstveno zavisi od CYP3A4 jetrinog enzima (Kerr BM i sar., 1994) i veći je kod pedijatrijskih pacijenata nego kod odraslih (Riva R i sar.,

1985) što zahteva veće doze leka po kg TT u cilju postizanja adekvatne koncentracije leka u plazmi. Kada govorimo o imunosupresivnim lekovima dokazan je viši klirens Tac kod pedijatrijskih pacijenata mlađih od 6 godina posle transplantacije jetre, bubrega i matičnih ćelija hematopoeze (Przepiorka D i sar., 2000, Kim JS i sar., 2005, MacFarlane GD i sar., 2001, Jain AB i sar., 1991). Mochon M i sar su pokazali da je klirens CsA kod pacijenata uzrasta 2-5 godina, sa transplantiranim bubregom, brži, što je zahtevalo i veću dozu leka, u odnosu na pacijente uzrasta preko 10 godina (Mochon M i sar., 1996). Razlozi za ove podatke nisu u potpunosti jasni, ali svakako da stepen aktivnosti CYP3A enzima jetre koji zavisi od uzrasta pedijatrijskih pacijenata ima značajnu ulogu. Kao mogući uzrok navodi se i veličina jetre deteta ispod 6 godina u odnosu na njegovu telesnu površinu (Kearns GL i sar., 2003). Na osnovu jedne studije, dostupne u literature, može se zaključiti da je aktivnost CYP3A4 enzima ekstremno slaba ili odsutna u uzorcima jetre fetusa, a počinje da raste nakon rođenja, dostižući 30-40% adultne aktivnosti nakon mesec dana života, a punu aktivnost sa navršениh godinu dana (Lacroix D i sar., 1997). Aktivnost CYP3A5 enzima u ovoj studiji nije razmatrana. Slično razvojnim promenama u jetri, verovatno enzimski transportni sistem creva podleže maturacionim izmenama, ali su dodatne studije u cilju ove potvrde neophodne (Hines RN, 2008).

1.6.Značaj farmakogenetskih studij za uspešnu transplantaciju organa

Farmakogenetika se bavi genetičkim razlikama u metaboličkim putevma pojedinaca, koje utiču na individualni odgovor na lekove, u pogledu terapijskog dejstva i nuspojava. Farmakogenomika, koja podrazumeva primenu farmakogenetike na ceo genom, pruža mogućnost individualnog terapijskog pristupa za svakog pacijenta, u skladu sa njegovim genotipom. Cilj ovih naučnih disciplina je osiguranje maksimalne efikasnosti primenjenog leka uz pojavu minimuma neželjenih efekata (Reider MJ i sar., 2014). Iako ćemo se u ovom radu prvensveno baviti uticajem genetike na farmakokinetiku CNI, ne treba zaboraviti da ona ima uticaj na metabolizam gotovo svih lekova koji se koriste neposredno pre i posle transplantacije od čega direktno zavisi i njen ishod (Medeiros M i sar., 2015).

1.6.1. P glikoprotein

P-gp je jedan od najznačajnijih adenzintrifosfat (ATP) zavisnih transmembranskih transportera. Produkt je gena koji je odgovoran za rezistenciju na mnoge lekove (engl. multidrug resistance gene-MDR1). Zove se još i ABCB1 (ATP-Binding Cassette, Sub-Family B) gen. Nalazi se na kratkom kraku 7 hromozoma (7q21.1) (Ambudkar SV i sar., 2003). P-gp transportuje brojne supstance iz citoplazme van ćelije. Nakon vezivanja substrata za P-gp aktivira se ATP zavisna kinaza i supstrat biva transportovan van ćelije (Efferth T i sar., 2001, Rosso Felipe C i sar., 2009). Fiziološki gledano on npr. sprečava ulaz potencijalno toksičnih materija iz lumena creva u krv ili štiti specifične organe, kao što je mozak, od štetnih materija koje cirkulišu u krvi (Rosso Felipe C i sar., 2009). Prisutan je na epitelnim ćelijama brojnih organa kao što su: površina kanalikula hepatocita, apikalnim ćelijama proksimalnog i distalnog tubula, epitelnim ćelijama enterocita, endotelnim ćelijama kapilara mozga, površini limfocita, ćelijama ovarijuma, testisa, pankreasa, adrenalne žlezde. Osnovna funkcija mu je protektivna. Sprečava reapsorpciju i podstiče eliminaciju štetnih ksenobiotika iz ćelije, putem urina i žuči (Cordon-Cardo C i sar., 1989, Thiebaut F i sar., 1987, Tanabe M i sar., 2001, Fromm MF i sar., 2002, Fromm MF, 2007, Staa CE i sar., 2010). Međutim, nekada je velika ekspresija ovog proteina na pojedinim ćelijama štetna jer doprinosi smanjenoj intracelularnoj koncentraciji leka. Npr. visoka ekspresija P-gp na malignim ćelijama je odgovorna za rezistenciju na brojne lekove čime se pogoršava prognoza malignih bolesti (Leith CP i sar., 1999).

1.6.1.1. Uticaj P-gp na farmakokinetiku

Od stepena aktivnosti P-gp u velikoj meri zavisi tkivna distribucija leka, stepen resorpcije od strane digestivnog trakta i eliminacije putem urina i žuči (LI YH i sar., 2006). P-gp interguje sa brojnim supstratima kao što su: blokatori kalcijumskih kanala, antiaritmici, antihipertenzivi, antibiotici, imunosupresivi, citotoksični lekovi. Dobro je poznato da su mnogi supstrati P-gp i njegovi potentni inhibitori (blokatori kalcijumskih kanala, imunosupresivi, inhibitori protein kinaze) (LI YH i sar., 2006). Klinička studija je pokazala da istovremeno davanje digoksina koji je supstrat P-gp sa gvanidinom, njegovim inhibitorom povećava koncentraciju digoksina u serumu (Doering W, 1979). Rifampicin, jedan od dobro poznatih suptrata P-gp je i njegov induktor, što smanjuje

koncentraciju digoksina u serumu (Greiner B i sar., 1999). Važnost ovih fenomena je u tome što nam razjašnjava mehanizme interakcije među lekovima u slučaju njihove istovremene primene (Lin JH., 2003).

Za modernu medicinu današnjice od izuzetnog je značaja razumevanje molekuskog mehanizma koji je odgovoran za interindividualne razlike u efikasnosti i odgovoru na isti lek i istu dozu leka. Jasno je da transmembranski transporteri u velikoj meri regulišu farmakokinetički profil lekova. Veliki broj studija danas se bavi ispitivanjem genetskih polimorfizama transportera lekova sa ciljem da objasne ove interindividualne razlike, čime će se preživljavanje grafta produžiti, a neželjni efekti njihove primene svesti na minimum. Različita ekspresija P-gp kod pojedinaca, može biti odgovorna za stepen reapsorpcije CNI, što je sigurno jednim delom rezultat mutacija u genu koji kodira P-gp (Staaž CE i sar., 2010). Procenjuje se da je za 20-95% interindividualne varijabilnosti u odgovoru na lek i njegovu efikasnost odgovorna genetika (Evans WE i sar., 2003).

1.6.1.2. Genetski polimorfizmi ABCB1 gena

Polimorfizam tipa zamene jednog nukleotidnog ponovka, SNP, podrazumeva varijaciju jednog nukleotida (adenina (A), timina (T), guanina (G), citozina (C)) u DNA sekvenci, koja je zastupljena kod više od 1% osoba opšte populacije. SNP može biti prisutan unutar kodirajuće, nekodirajuće ili sekvence DNA između gena.

SNP gena odgovornih za sintezu enzima koji učestvuju u metabolizmu lekova kao i njihovih transportera su meta istraživanja farmakogenetskih studija. Razumevanje uticaja genetskih faktora na farmakokinetiku CNI može doprineti otkriću optimalne kombinacije imunosupresivnih lekova za svakog pojedinca. Takođe ova istraživanja su od neprocenjivog značaja za određivanje startne doze leka i doze održavanja, kao i velika pomoć u otkrivanju pojedinaca za koje će određen lek biti manje efikasan ili izazivač neželjenih efekata u većoj meri (Staaž CE i sar., 2010).

Brojne genetske studije i analize su potvrdile da je ABCB1 gen izrazito polimorfan (>100 SNP), kao i da pojedini polimorfizmi iz ove grupe utiče na strukturu i funkciju njegovog krajnjeg produkta P-gp (Cascorbi I, 2011). Izvesni polimorfizmi ovog gena dovode do izmene aminokiseline u kodirajućem proteinu što ga može činiti manje

funkcionalnim, dok drugi nemaju uticaj na redosled aminokiselina u završnom proteinu, ali, takođe, mogu uticati na njegovu funkciju.

Najviše proučavani polimorfizmi ABCB1 gena su 3435C>T, 1236C>T i 2677G>T/A. U prvom je C zamenjen T na poziciji 3435 unutar egzona 26, u drugom je C zamenjen T na poziciji 1236 unutar egzona 12 i u trećem je G zamenjen T ili A na poziciji 2677 unutar egzona 21 ABCB1 gena. Aleli bez polimorfizma se obeležavaju kao ABCB1 3435C, 1236C i 2677G, a sa polimorfizmom kao ABCB1 3435T, 1236T i 2677T/A (Kroetz DL i sar., 2003). Krajnji rezultat polimorfizma 2677G>T/A u genu za ABCB1 je izmena jedne aminokiseline u kodirajućem proteinu, što ga čini manje funkcionalnim. Druga dva polimorfizma u genu za ABCB1 nemaju uticaj na redosled aminokiselina u završnom proteinu, a veruje se da mogu biti u genetskoj sprezi sa prethodnim polimorfizmom i uticati bilo na smanjenu stabilnost ABCB1 mRNA (Wang D i sar., 2005) ili imati uticaj na smanjenu ugradnju P-glikoproteina u membranu i samim tim smanjenu funkciju proteina (Kimchi-Sarfaty C i sar., 2007). Funkcionalni značaj ovih polimorfizama je kontraverzan. Hoffmayer i saradnici su pokazali da homozigoti nosioci T alela polimorfizma 3435 C>T u genu za ABCB1 imaju dva puta manju crevnu ABCB1 ekspresiju u poređenju sa homozigotima, nosiocima C alela istog polimorfizma (Hoffmayer S i sar., 2000), što su potvrdile i druge studije (Fellay J i sar., 2002, Hitzl M i sar., 2001, Hitzl M i sar., 2004, Tanabe M i sar., 2001). Teorijski to može dovesti do smanjenog efluksa leka iz enterocita nazad u lumen creva i posledično povećane resorpcije leka u cirkulaciju.

Etnička pripadnost značajno utiče na distribuciju C3435C>T polimorfizma u genu za ABCB1. Statistička analiza je pokazala značajnu razliku u frekvenci C alela između populacije Kineza i Afrikanaca. Takođe razlika u frekvenci postoji i između Novozelandana i Kineza. Nema statistički značajne razlike u frekvenci C alela između stanovnika Evrope (Schwab M i sar., 2003, Anglicheau D i sar., 2003, Jamroziak K i sar., 2002, Bernal M i sar., 2003) i Azije (Ameyaw MM i sar., 2001, Balarm C i sar., 2003, Sakaeda T i sar., 2001). Mutirani alel T je relativno redak kod Afrikanaca, a njegova frekvenca je visoka kod Kineza. Genotip TT nije detektovan među 206 stanovnika Gane, a prisutan je kod 20% Kineza, 24% Nemaca i 28% Engleza (Ameyaw MM i sar., 2001).

1.6.1.3. Molekulski mehanizam uticaja C3435C>T SNP u genu za ABCB1 na P-gp i njegovu funkciju

Postoje brojne pretpostavke na koji način C3435C>T SNP u genu za ABCB1 utiče na funkciju i strukturu P-gp. Prvi i najpopularniji mogući uzrok je da postoji povezanost ovog polimorfizma i drugih mutacija unutar ABCB1 gena, bilo u području promotora, egzona (T129C) ili introna (G2677T/A) (Saito K i sar., 2002, Anglicheau D i sar., 2003). Drugi mogući uzrok je da ova tiha (engl. silent) mutacija može smanjiti efikasnost translacije što ima funkcionalne posledice (Schwab M (2) i sar., 2003). Treća moguća pretpostavka je da ova tiha mutacija menja regulaciju i kontrolu translacije mRNA (Allain FH i sar., 1996, Wang D i sar., 2005). Poslednji razmatran uzrok je da ovaj SNP utiče na postranskripcionu obradu mRNA (Jamroziak K i sar., 2002).

1.6.1.4. Uticaj SNP ABCB1 gena na farmakokinetiku CsA

Uticaj 3435C>T, 1236C>T i 2677G>T/A SNP u ABCB1 genu na farmakokinetiku CsA je i dalje nejasan, sa nekonzistentnim rezultatima. Najveći broj studija se bavio uticajem 3435C>T SNP i nije potvrdio njegov značaj na farmakokinetiku CsA (Hesselink DA i sar., 2003 Hesselink DA i sar., 2004, Loh PT i sar., 2008, Anglicheau D i sar., 2004, von Ahnen N i sar., 2001, Haufroid V i sar., 2004, Min DI i sar., 2004, Qiu XY i sar., 2008, Chowbay B i sar., 2003, Mai I i sar., 2003, Kuzuya T i sar., 2003). Međutim, bilo je i studija koje su ukazale da ovaj polimorfizam značajno utiče na metabolizam CsA. Više vrednosti nivoa CsA posle identične doze leka uočene su kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u Japanu koji su bili heterozigoti ABCB1 3435CT u poređenju sa ABCB1 3435CC homozigotima nedelju dana nakon transplantacije (Hu YF i sar., 2006). Slični rezultati su dobijeni po završetku studije u koju su uključena 44 pacijenta bele rase sa transplantiranom jetrom i 88 pacijenata sa transplantiranim bubregom sa Srdnjeg Istoka mesec dana nakon transplantacije (Bonhomme Faivre L i sar., 2004, Azarpira N i sar., 2006). Ovi rezultati navode na činjenicu da je P-gp manje funkcionalan u nosioca T alela, što doprinosi većoj reapsorpciji CsA tj. manjem efluksu leka nazad u lumen creva. Meta-analiza u koju je uključeno 1036 pacijenata iz 14 različitih studija pokušala je da razreši dilemu uticaja ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA (Jiang ZP i sar., 2008). Nije dokazano da ovaj polimorfizam ima uticaj na AUC tokom prvih 4 sata od davanja leka, klirens leka

nakon oralne primene i koncentraciju leka u krvi pre sledeće doze (C_0). Kada su se iz ove grupe pacijenata izdvojili samo pacijenti bele rase C_0 koncentracija leka je bila niža u nosioca ABCB1 3435CC (wild type) genotipa, sugerišući uticaj etničke pripadnosti na farmakogenetiku CsA.

Većina studija koja je ispitivala 1236C>T SNP u genu za ABCB1, nije pokazala njegov značaj u pogledu farmakokinetike CsA (Haufrond V i sar., 2004, Min DI i sar., 2004, Chowbay B i sar., 2003, Kuzuya T i sar., 2003). Međutim, studija u koju su uključena 104 pedijatrijska pacijenta sa TBI, na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega i PD, pokazala je manju bioraspoloživost CsA kod pacijenata starijih od 8 godina, nosioca ABCB1 1236CC (wild-type) genotipa u odnosu na nosioce ABCB1 1236CT i ABCB1 1236TT genotipa iste uzrasne dobi (Fanta S i sar., 2008). Takođe je kod pacijenata bele rase, nosioca "wild-type" genotipa ABCB1 1236CC, sa transplantiranim bubregom utvrđen niži odnos $C_{max}/doza$ i $AUC_0-4/doza$, u odnosu na nosioce ABCB1 1236 CT i 1236TT genotipa (Anglicheau D i sar., 2004). Slično, kod pacijenata sa transplantiranim bubregom Kineske nacionalnosti odnos $C_0/doza$ je bio niži kod nosioca ABCB1 CC genotipa u odnosu na nosioce ABCB1 TT genotipa tokom prvog meseca nakon transplantacije (Qiu XY I sar., 2008). Ovi rezultati ukazuju na moguću manju funkcionalnu aktivnost P-gp uzrokovanu ovim SNP.

Većina studija, nije ukazala ni na značaj 2677G>T SNP ABCB1 gena u pogledu farmakokinetike CsA (Anglicheau D i sar., 2004, Haufrond V i sar., 2004, Min DI i sar., 2004, Chowbay B i sar., 2003, Kuzuya T i sar., 2003, Mai I i sar., 2003, Foote CJ i sar., 2006). Međutim, kao i kod prethodnog SNP, studija u koju su uključeni pedijatrijski pacijenti (n=104) sa TBI na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega i PD, je pokazala manju bioraspoloživost CsA kod pacijenata starijih od 8 godina, nosioca ABCB1 2677GG (wild-type) genotipa u odnosu na nosioce ABCB1 2677GT i ABCB1 2677TT genotipa iste starosne dobi (Fanta S i sar., 2008). Studija u koju su uključeni pacijenti sa transplantiranim bubregom Kineske nacionalnosti pokazala je da nosioci ABCB1 2677GG genotipa imaju niži odnos $C_0/doza$ u odnosu na nosioce ABCB1 2677 TT genotipa tokom prvog meseca nakon transplantacije (Qiu XY i sar., 2008). Ovi rezultati ukazuju na moguću manju funkcionalnu aktivnost P-gp uzrokovanu ovim SNP.

Svakako ne treba izgubiti iz vida da je sam CsA inhibitor P-gp (Herweijer H i sar., 1990, Lemahieu WP i sar., 2004). Razlika u stepenu inhibicije P-gp između studija, koja je uslovljena različitom koncentracijom leka u krvi može ograničiti ili učiniti nejasnim efekat ovih SNP na farmakokinetiku CsA, čime se mogu objasniti i gore navedeni konfliktni rezultati.

1.6.2. Uticaj polimorfizama na proces biotransformacije CsA

1.6.2.1. Polimorfizmi gena koji eksprimira CYP3A5 enzim

Do danas je otkriven veliki broj SNP gena koji eksprimira CYP3A5 enzim, preko 11. Najviše je proučavan SNP CYP3A5 gena u kome je A zamenjen G na poziciji 6986 unutar introna 3. Heterozigotni i homozigotni nosioci CYP3A5*1 "wild-type" alela produkuju više CYP3A5 mRNA i samim tim ekspimiraju viši nivo CYP3A5 proteina (CYP3A5 ekspresori). Homozigotni nosioci CYP3A5*3 varijantnog alela produkuju vrlo malu ili nedetektabilno količini CYP3A5 enzima (CYP3A5 ne-ekspresori) (Hutstert E i sar., 2001, Kuehl P i sar., 2001). Osobe koje su heterozigoti ili homozigoti nosioci CYP3A5*1 alela teorijski bi trebalo da imaju brži klirens i nižu bioraspoloživost primenjenog CsA, što bi trebalo da zahteva veće doze leka za postizanje ciljne koncentracije leka u krvi.

Etnička pripadnost ima veliki uticaj na učestalost ovog SNP. CYP3A5*1 alel je prisutan kod prosečno 5-15% pripadnika bele rase, 45-73% Afričkih Amerikanaca, 15-35% Aziata i 25% Meksikanaca (Lamba JK i sar., 2002).

1.6.2.2. Uticaj CYP3A56986A>G SNP na farmakokinetiku CsA

Rezultati velikog broja studija koje su proučavale uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA su kontraverzni. Četiri studije su rađene kod pacijenata sa transplantiranim bubregom Kineske nacionalnosti. Može se reći da je broj uključenih pacijenata bio sličan, takođe su korišćeni slični farmakokinetički parametri, a uticaj etničke pripadnosti na farmakokinetiku je isključen. Studija sa najvećim brojem pacijenata, 147, ukazala je na neočekivan rezultat tj. niži odnos C_0 /doza CsA kod pacijenata koji su homozigoti ili heterozigoti za CYP3A5*3 alel (Chu XM i sar., 2006). Teorijski homozigoti CYP3A5*1 bi trebali da imaju brži klirens CsA i samim tim niži

odnos C_0 /doza leka. Druge dve studije su pokazale očekivane rezultate. Studija sa 104 uključena pacijenta je pokazala da homozigoti ili heterozigoti za CYP3A5*1 alel imaju niži odnos C_0 /doza CsA nedelju dana nakon transplantacije (Hu YF i sar., 2006). Takođe, studija sa 103 uključena pacijenta je pokazala da homozigoti za CYP3A5*3 alel imaju 26-31% viši odnos C_0 /doza leka u odnosu na pacijente sa "wild-type" genotipom (Qiu XY i sar., 2008). Četvrta studija sa 137 uključenih pacijenata, tri, šest i dvanest, meseci nakon transplantacije bubrega nije ukazala na značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CsA (Zhao Y i sar., 2005), kao ni studija u koju su uključena 82 Azijata sa transplantiranim bubregom (Loh PT i sar., 2008). Rezultati studije u koju je uključeno 106 pacijenata bele rase sa transplantiranim bubregom, nije ukazala na značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CsA (Anglicheau D i sar., 2004). Slični su i rezultati studije u koju je uključeno 110 pacijenata sa transplantiranim bubregom, od čega je 72 bilo bele rase, 20 crnaca, 18 azijata (Hesselink DA i sar., 2003).

Mali je broj studija koji se bavi ispitivanjem uticaja SNP na farmakokinetiku CNI kod dece posle transplantacije. Gijesen V i sar. su ispitivali uticaj godina i CYP3A56986A>G SNP na farmakokinetiku Tac kod 39 pedijatriskih pacijenata sa transplantiranim srcem. Pokazali su da CYP3A5 ekspresori (nosioci bar jednog CYP3A5*1 alela) mlađi od 6 godina zahtevaju 1.5 put veću dozu Tac za optimalni nivo Tac u krvi u poredjenju sa CYP3A5 ekspresorima starijim od 6 godina. Takođe pacijenti mlađi od 6 godina koji ne ekspimiraju CYP3A5 (CYP3A5*3 homozigoti) zahtevaju 1,5 put veću dozu Tac u odnosu na pacijente starije od 6 godina sa istim genotipom. CYP3A5 ekspresori mlađi od 6 godina zahtevali su tri puta veću dozu Tac u odnosu na CYP3A5 ne-ekspresore starije od 6 godina (Gijesen V i sar., 2011). Ovi rezultati su slični rezultatima Zheng H i sar koji ukazali na potrebe za većim dozama Tac kod pedijatriskih pacijenata sa transplantiranim srcem (n=65), CYP3A5 ekspresora u poredjenju sa CYP3A5 ne-ekspresorima tri, šest i dvanest meseci posle transplantacije (Zheng H i sar., 2003). Druga studija u koju su uključeni pedijatriski pacijenti sa transplantiranim bubregom (n=50) pokazala je da nosioci CYP3A5*3/*3 genotipa imaju niži klirens Tac u poredjenju sa CYP3A5 ekspresorima (Zhao W i sar., 2009).

1.6.2.3. Polimorfizmi gena koji eksprimira CYP3A4 enzim

CYP3A4 je najzastupljeniji enzim u jetri koji pripada familiji P450, a odgovoran je za metabolizam 45-60% lekova koji se prepisuju od strane lekara. Postoji velika interindividualna razlika u ekspresiji CYP3A4 enzima, a u kojoj meri su genetski faktori za to odgovorni i dalje se istražuje (Elens (1) L i sar., 2011).

Utvrđen je veliki broj SNP CYP3A4 gena, preko 28. Do danas nije poznat SNP koji rezultira kompletnim gubitkom ekspresije ili funkcije CYP3A4 enzima. Najviše je proučavan SNP u kome je A zamenjen G na poziciji 392 promotornog regiona gena (Rebbeck TR i sar., 1998, Westlind A i sar., 1999). Nekoliko in vitro studija je potvrdilo da ekspresija varijantne sekvence CYP3A4*1B dovodi do povećanja transkripcione aktivnosti CYP3A4 (Amirmani B i sar., 1999, Amirmani B i sar., 2003), dok su druge to opovrgle (Westlind A i sar., 1999, Ando Y, 1999, Lambe JK (2) i sar., 2002, Spurdle AB i sar., 2002). Etnička pripadnost ima veliki uticaj na frekvencu polimorfnog alela ovog SNP. Polimorfni alel je prisutan kod 2-9,6% pripadnika bele rase, 35-67% Afrikanaca, 9,3-11% Hispanaca, 0% stanovnika Azije (Ball SE i sar., 1999, Lamba JK (1) i sar., 2002).

1.6.2.4. Uticaj 392A>G SNP u CYP3A4 genu na farmakokinetiku CsA

Veliki broj studija nije dokazao značajan uticaj 392A>G SNP u CYP3A4 genu na farmakokinetiku CsA (Hesselnik DA i sar 2003, von Ahsen N i sar 2001, Rivory LP i sar 2000). Jedna mala pilot studija u koju je uključeno 14 zdravih volontera, ukazala je niži odnos AUC 12h/doza CsA kod homozigota CYP3A4*1B (varijantni alel) u odnosu na homozigote ili heterozygote CYP3A4*1 „wild-type” alela (Min DI i sar 2003). Ovaj nalaz ukazuje na moguće veći metabolički kapacitet CYP3A4 enzima u nosioca varijantnog alela, sugerišući da oni zahtevaju veće doze CsA za dostizanje ciljne koncentracije leka u krvi. Svakako treba naglasiti da su učesnici ove studije bili većinom Afrikanci, za koje se zna da imaju veću prevalencu CYP3A4*1B varijantnog genotipa, dok su učesnici prethodno navedenih studija bili uglavnom pripadnici bele rase ili stanovnici Azije kod kojih je frekvencija varijantnog genotipa niža.

1.6.2.5. Uticaj novog CYP3A4*22 polimorfizma u CYP3A4 genu na ekspresiju enzima i farmakokinetiku CYP3A4 supstrata

Wang D i saradnici su pronašli novi SNP u intronu 6 gena za CYP3A4 (rs35599367, C>T) i ispitivali njegov uticaj na farmakokinetiku statina. Nivo CYP3A4 mRNA u jetri kao i aktivnost enzima je bila 1,7-2,5 puta veća u nosioca CC genotipa, a u odnosu na nosioce CT i TT genotipa. Od 235 pacijenata koja su uključena u studiju, nosioci T alela su zahtevali signifikantno niže doze statina za optimalnu lipidnu kontrolu. Dobijeni rezultati navode na zaključak da novotkriveni polimorfizam značajno utiče na ekspresiju CYP3A4 gena, tj. smanjenu sintezu funkcionalnog enzima. Zbog toga može poslužiti kao dobar biomarker, uz pomoć koga se može predvideti odgovor pojedinca na lek koji se metaboliše uz pomoće CYP3A4 enzima (Wang D i sar., 2011). Učestalost ovog polimorfizma u populaciji bele rase se procenjuje na 5-7 % (Elens L i sar., 2013). Prve studije koje su se bavile uticajem ovog polimorfizma na farmakokinetiku CNI su ukazale na njegov izuzetan značaj. Elens L i saradnici su pokazali da pacijenti sa transplantiranim bubregom, nosioci jednog ili dva T alela zahtevaju značajno niže doze Tac i CsA za postizanje adekvate koncentracije leka u krvi u odnosu na nosioce CC genotipa (Elens L i sar., (1) 2011, Elens L i sar., (2) 2011). Tako je odnos C_0 /doza Tac i CsA, bio 2 i 1,6 puta veći kod nosioca T alela u odnosu na CC homozigote (Elens L (2) i sar., 2011). Moes DJ i saradnici su pokazali da nosioci CYP3A4*22 alela imaju 15% sporiji klirens CsA (Moes DJ i sar., 2014).

Lunde I i sar. su potvrdili značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CNI. Pacijenti sa transplantiranim bubregom, nosioci CYP3A4*22 alela zahtevaju značajno manju dozu CsA za postizanje adekvatne vrednosti C_2 nivoa CsA u krvi. Univarijantna analiza je utvrdila da CYP3A4*1/*22 heterozigoti imaju 50% veći odnos C_2/D u poređenju sa CYP3A4*1/*1 homozigotima. Multivarijantna analiza je potvrdila nezavistan efekat CYP3A4*22 alela na farmakokinetiku CsA sa 53% višim odnosom C_2/D kod nosioca varijantnog alela u poređenju sa nosiocima alela divljeg tipa ("wild-type"). Prema ovom istraživanju CYP3A4*22 alel objašnjava prosečno 12% interindividualne varijabilnosti odnosa C_2/D CsA (Lunde I i sar., 2014). Iako je učestalost ovog genotipa u populaciji belaca mala, za pojedince nosioce ovog alela je od izuzetnog značaja. Gruba je procena da pacijenti primaoci transplantiranog bubrega, a

koji su nosioci jednog ili dva CYP3A4*22 alela zahtevaju 50% manju dozu CsA za postizanje terapijskog cilja. Izenađujuće je da ova grupa naučnika nije pronašla vezu između CYP3A4*22 genotipa i odnosa $Tac C_0/D$ (Lunde I i sar., 2014). Jedno od mogućih objašnjenja je da su metabolički putevi razgradnje CsA i Tac, kao i enzimi koji učestvuju u njemu različiti. Dobro je poznato da oksidacija CsA odvija pretežno preko CYP3A4 enzima, a Tac uz pomoć CYP3A5 enzima (Dai Y i sar., 2004, Dai Y i sar., 2006). Svakako ne sme se izgubiti iz vida da izvesni metaboliti CsA nastaju pod dejstvom CYP3A5 enzima, a i brojne studije su potvrdile da CYP3A5 genotip ima značajan uticaj na farmakokinetiku CsA (De Jonge H i sar., 2013, Falck P i sar., 2009, Dai Y i sar., 2006). Konkretno u studiji Lunde i i sar među 123 pacijenta sa transplantiranim bubregom, a koji su bili na terapiji Tac nije bilo CYP3A4*22 homozigota što svakako može uticati na dobijen rezultat (Lunde I i sar., 2014).

Malo je studija koje se uopšte bave ispitivanjem farmakokinetike imunosupresiva kod dece sa transplantiranim organom. Svakako jedan od razloga je relativno mali broj ovih bolesnika po centru. Zato su multicentrične studije od izuzetnog značaja za ovu populaciju pacijenata. Gijsen VM i sar su ispitivali uticaj CYP3A4*22 polimorfizma na farmakokinetiku Tac kod dece sa transplantiranim srcem. U studiju je uključeno 60 pacijenata. Nosioci bar jednog CYP3A4*22 alela zahtevali su 30% nižu dozu Tac u poređenju sa CYP3A4*1 homozigotima (Gijsen VM i sar., 2013).

1.6.3. Uticaj kombinacije genotipova na farmakokinetiku CsA

Najveći broj studija u literaturi je ispitivao pojedinačni uticaj SNP na farmakokinetiku CNI. Međutim izvesni SNP se ne nasleđuju pojedinačno, već zajedno sa drugim polimorfizmima. Neke haplotipske analize koje ispituju zajednički efekat više polimorfizama nagoveštavaju da oni mogu međusobno interagovati doprinoseći kombinovanom zbirnom efektu na farmakokinetiku ove grupe lekova, mada ima i radova koji to opovrgavaju.

Jedan broj studija je proučavao kombinovani uticaj SNP u CYP3A4, CYP3A5 i/ili ABCB1 genu na farmakokinetiku CsA. Studija u koju je uključen najveći broj pacijenata sa transplantiranim bubregom (n= 407), nije pokazala da haplotipska kombinacija CYP3A4-392A>G+ CYP3A5 6986A>G ima uticaj na odnos C_0 /doza CsA i vreme

neophodno za postizanje ciljne koncentracije leka u krvi (Bandur S i sar., 2008). Proučavajući moguću interakciju između CYP3A4*1B varijantnog alela i ABCB1 3435C>T genotipa, osam pacijenata koji su bili heterozigoti za CYP3A4*1B varijantni alel, a pritom su bili i heterozigoti (n=5) ili homozigoti (n=3) za ABCB1 3435C>T varijantni genotip, je poređeno sa 27 pacijenata koji su eksprimirali oba "wild-type" alela, pri čemu nije potvrđeno da ova haplotipska kombinacija ima bilo kakav uticaj na farmakokinetiku CsA (von Ahsen N i sar., 2001). Ni naredne četiri studije, takođe nisu pronašle uticaj haplotipske kombinacije sledećih SNP, ABCB1 3435C>T, ABCB1 1236C>T i ABCB1 2677G>T, na farmakokinetiku CsA (Anglicheau D i sar., 2004, Haufroid V i sar., 2004, Mai i i sar., 2003, Bandur S i sar., 2008). Međutim studija u koju su uključeni pedijatrijski pacijenti (n=104) sa TBI na PD i listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega je pokazala da pacijenti mlađi od 8 godina nosioci ABCB1 1199G-1236C-2677G-3435C "wild-type" genotipa imaju nižu bioraspoloživost CsA u odnosu na nosioce varijantnog haplotipa pacijenata starijih od 8 godina (n=22) (Fanta S i sar., 2008).

Kravljaja M i saradnici su ispitivali kombinovani uticaj tri polimorfizma u ABCB1 genu (G2677T/A, C1236T i C3435T) kod CYP3A5 neekspresora sa transplantiranim bubregom na farmakokinetiku Tac. Pokazali su da homozigotni nosioci varijantnog alela polimorfizama G2677T/A i C3435T u genu za ABCB1 zahtevaju veću dozu Tac, što je praćeno nižim odnosom C_0/D u odnosu na homozigotne i heterozigotne nosioce "wild type" alela (Kravljaja M i sar., 2016).

U radovima koji su ispitivali međusobni uticaj SNP u intronu 6 CYP3A4 gena i SNP 6986A>G CYP3A5 gena pokazano je da pacijenti sa transplantiranim bubregom koji su nosioci T alela za polimorfizam u intronu 6 CYP3A4 gena (sintetišu manju količinu funkcionalnog CYP3A4 enzima) i homozigoti CYP3A5*3 (sintetišu nemerljivu količinu CYP3A5 enzima) sporo metabolišu CNI te zahtevaju znatno manje doze leka (Elens L i sar., 2011 (1), Elens L i sar., 2011 (2)).

Moes DJ i saradnici su ispitivali kombinovani uticaj CYP3A4*22 i CYP3A56986A>G SNP na klirens CsA, evrolimusa i Tac, pri čemu nisu dokazali značajan uticaj kombinacije genotipova u odnosu na pojedinačne SNP. Kombinovana analiza nije olakšala identifikovanje grupa pacijenata koji sporo, umereno brzo i brzo

metabolišu gore navedene lekove. Konkretno za CsA razlika u prosečnim vrednostima klirensa između navedenih grupa pacijenata je bila manja od 16% (Moes DJ i sar., 2014).

Gijesen VM i sar su ispitivali kombinovani uticaj CYP3A4*22 i CYP3A56986A>G SNP na farmakokinetiku Tac kod dece sa transplantiranim srcem (n=60). Pacijente su podelili u tri grupe: grupa loših metabolizera (CYP3A4*1/22* i CYP3A5 ne-ekspresor), grupa srednje brzih metabolizera (CYP3A4*1/*1 i CYP3A5 ne-ekspresor) i grupa brzih metabolizera (CYP3A4*1/*1 i CYP3A5 ekspresor). Pokazali su da loši metabolizeri zahtevaju 17% manju dozu Tac nego srednje brzi metabolizeri i 48% manju dozu leka nego brzi metabolizeri (Gijesen VM i sar., 2013).

1.6.3.1. Uticaj SNP u genu za P450 oksidoreduktazu na farmakokinetiku CNI

P450 (citohrom) oksidoreduktaza (POR) gen je lociran na 7 hromozomu. Kodira istoimeni enzim koji sadrži 680 aminokiselina, a neophodan je za funkcionisanje više od 50 enzima citohrom P450 familije. Vršni oksidaciju tj. prenos elektrona sa nikotinadenin-dinukleotid-fosfat-oksidade (NADPH) na enzime CYP familije, što je preduslov za njihovu aktivaciju (Pandey AV i sar., 2014). POR gen je izrazito polimorfan. Opisano je preko 40 SNP ovog gena. Najviše proučavan je 1508C>T (rs 1057868; POR*28) (Agrawal V i sar., 2008, Huang N i sar., 2008). Mutirani alel je prisutan kod 19,1% Afričkih Amerikanaca, 26,4% Amerikanaca bele puti, 36,7% Kineza u Americi i 31% Meksikanaca u Americi (Zhang JJ i sar 2013). Jasna je veza ovog polimorfizma i povećane in vivo aktivnosti enzima CYP3A familije (Oneda B i sar., 2009, Elens L (2) i sar., 2013). Primećen je značajan uticaj POR*28 alela, kod CYP3A5 ekspresora, na farmakokinetiku Tac. Studija je rađena kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. CYP3A5 ekspresori, koji su bili nosioci bar jednog POR*28 alela su zahtevali znatno veće doze Tac u cilju održavanja adekvatnih koncentracije C_0 Tac u krvi godinu dana nakon transplantacije u poređenju sa POR*1/*1 CYP3A5 ekspresorima (Elens L i sar., 2014). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno rađenim studijama, kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (de Jonge H i sar., 2011) i zdravih volontera Kineske nacionalnosti (Zhang JJ i sar., 2012). Nameće se zaključak da CYP3A5 ekspresori, nosioci bar jednog POR*28 alela imaju jače izraženu aktivnost CYP3A5 enzima. Činjenica da POR*28 homozigoti, sa transplantiranim bubregom, zahtevaju 15% veću

dozu CsA za održavanje adekvatne koncentracije leka u krvi, navodi na zaključak da ovaj SNP utiče i na ubrzan metabolizam CsA posredstvom povećane aktivnosti CYP3A4 enzima (Elens L i sar., 2014). Takođe, POR*28 homozigoti koji ne ekspimiraju CYP3A5 su imali 24% manji odnos $Tac C_0$ /doza u odnosu na nosioce POR*1 alela, što takođe može biti uzrok povećane aktivnosti CYP3A4 enzima u nosioca ovog polimorfizma (Elens L i sar., 2014).

1.7.Značaj multicentričnih studija za bolji ishod lečenja dece sa transplantiranim organom

Broj transplantirane dece u svetu je relativno mali u poređenju sa adultnim pacijentima. Zato su potrebne multicentrične studije, gde će se sumirati rezultati velikog broja centara i time obuhvatiti dovoljan broj pacijenata za adekvatnu statističku analizu (Dharnidharka VR i sar., 2014). Jedino tako se obezbeđuju adekvatni rezultati, kojima možemo verovati i na osnovu kojih možemo unapređivati sve aspekte transplantacije najmlađih pacijenata.

2. CILJEVI RADA

U ovoj studiji postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Utvrditi frekvencije alela i genotipova polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji
2. Ispitati uticaj uzrasta deteta, kao nezavisnog faktora, na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, tokom prve godine nakon transplantacije
3. Ispitati uticaj polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, tokom prve godine nakon transplantacije.
4. Ispitati uticaj polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) u zavisnosti od uzrasta pacijenta, na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji, tokom prve godine nakon transplantacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je obavljeno na Univerzitetској dečјој klinici, u Centru za hemodijalizu i transplantaciju, једином mestu u Srbiji, gde se radi transplantacija bubrega kod pedijatrijskih pacijenata uz njihovo postransplantaciono praćenje. U studiju je uključeno 47 pacijenata kojima je transplantiran bubreg u periodu 2001-2015. Od živog srodnika bubreg je dobilo 37, a od moždano mrtve osobe 10 pacijenata. Od ukupno 75 pacijenata, koliko se prati u našem centru iz studije su isključeni pacijenti : koji su inicijalno bili na terapiji Takrolimusom, sa dva transplantirana organa (jetra i bubreg), sa povratkom osnovne bolesti u transplantiran bubreg koji su zahtevali plazmafereze i čije uzorke krvi za DNK analizu nismo imali. Ovu studiju je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u skladu je sa Helsinškom deklaracijom.

3.2. Protokol imunosupresivne terapije

Svi pacijenti su primili indukcionu terapiju: Monoklonska anti CD 25 ili poliklonska anti-timocitna antitela u zavisnosti od imunološkog rizika, Metilprednizolon (MP), Mikofenolat mofetil i CsA, sa izuzetkom pacijenata sa odloženom funkcijom grafta kod kojih je odložena primena CsA. Kod pacijenata sa niskim rizikom primenjivana su monoklonska (Daclizumab ili Basiliximab), a kod pacijenata sa visokim rizikom poliklonska antitela (ATG) po preporučenim protokolima. Daclizumab-Zenepax, Roche Pharmaceutical; prva doza, 1 mg/kg/dan, na dan transplantacije i potom još četiri iste doze na dve nedelje; Basiliximab-Simulect, Novartis Pharmaceutical Corporation; prva doza, 10 mg za pacijente koji imaju TT ispod 35 kg i 20 mg za pacijente kojima je TT preko 35 kg, na dan transplantacije i druga doza četvrtog postransplantacionog dana; ATG, Fresenius, prva doza, 9 mg/kgTT, na dan transplantacije, potom naredna tri dana 3 mg/kgTT. Metilprednisolon u dozi od 1gr/m² je ordiniran na dan transplantacije, a naredna četiri dana je doza smanjivana za 50%/dan. Od petog dana pacijenti su prevedeni na prednizon per os u dozi od 60 mg/m²/dan do 14 postransplantacionog dana uz dalje postepeno smanjenje doze do kraja trećeg meseca od transplantacije do doze održavanja od 5 mg/m². CsA (Sandimun

Neoral, Novartis) je uključen u početnoj dnevnoj dozi od 5 mg/kg/dan na dan transplantacije, a dalje je doza korigovana shodno vrednostima nivoa leka u krvi. Preporučeni nivoi leka u krvi su bili sledeći: tokom prvog meseca posle transplantacije C_0 130-180 ng/ml, C_2 1000-1300 ng/ml, tokom drugog i trećeg meseca C_0 100-150 ng/ml, C_2 900-1200 ng/ml, nakon toga do kraja prve godine C_0 90-120 ng/ml, C_2 800-1000 ng/ml. Mikofenolat mofetil (CellCept, Roche Pharmaceutical) je primenjen u dozi od 400-600 mg/m² dva puta dnevno (u slučaju transplantacije sa živog donora lek je uključen dva dana pre planirane hiruške intervencije, a kod kadaverične na dan transplantacije). Kod transplantacije bubrega sa živog donora kortikosteroidi su uključeni dan pre zakazane hiruške intervencije (Pronizon 60 mg/m²/dan).

3.3. Metod određivanja nivoa Ciklosporina A u krvi

Krv za genetske analize uzeta je tokom praćenja pacijenata, kada je venepunkcija vršena iz kliničkih indikacija. Koncentracija CsA u krvi je određivana iz pune krvi imunoesejem na bazi hemiluminiscence mikročestica na uređaju ARCHITECT iSystem (Abbott, Abbott Park, IL), a prema uputstvima proizvođača, u biohemiskoj laboratoriji Univerzitetske dečje Klinike u Beogradu.

3.4. Klinički podaci

Redovne kontrole obavljene su jedan, tri, šest i dvanaest meseci nakon transplantacije i uvek kada je to bilo potrebno po proceni lekara. Pri svakoj kontroli uzimani su sledeći bazični podaci: uzrast, pol, visina, težina, BMI, krvni pritisak, redovna terapija koju uzimaju, vreme proteklo od transplantacije bubrega. Takođe pacijentima smo uz standardne biohemijske analize merili C_0 koncentraciju CsA u krvi (koncentracija leka u krvi pred jutarnju dozu) i C_2 koncentracija CsA u krvi (koncentracija leka u krvi dva sata posle jutarnje doze). Takođe su preračunati odnosi C_0 nivoa leka u krvi i dnevne doze leka (C_0/D ng/ml kroz mg/kgTT) i C_2 nivoa leka u krvi i dnevne doze (C_2/D ng/ml kroz mg/kgTT).

3.5. Genetske analize

Genetske analize obavljene su u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku u Institutu za nuklerne nauke Vinča tokom 2015/2016 godine. Određeni su

sledeći polimorfizmi za 47 pacijenata: ABCB1 (rs 1045642), CYP3A5 (rs 776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs 1057868). Polimorfizmi u ciljnim genima su analizirani korišćenjem eseja za genotipizaciju na bazi TaqMan tehnologije (Thermo Scientific). Za navedene polimorfizme korišćeni su sledeći eseji: rs35599367 (C_59013445_10), rs776746 (C_26201809_30), rs1057868, (C__8890131_30) i rs 1045642 (C__7586657_20). Genotipizacija je urađena na aparatu ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNK je izolovana metodom fenol hloroformske ekstrakcije iz uzoraka pune krvi.

3.6. Statističke metode

Statistička analiza podataka je urađena primenom programa Statistika (verzija 8). Metodom prebrojavanja (*engl.* gene counting method) su utvrđene frekvencije genotipova i alela. Razlika u distribuciji genotipova i alela u različitim grupama pacijenata ispitana je Pearsonovim χ^2 testom. Distribucija vrednosti kontinualnih varijabli je analizirana Kolmogorov-Smirnovim testom. Analiza varijanse (ANOVA) je korišćena da se utvrdi relacija između vrednosti kategorijskih i kontinualnih varijabli, ukoliko su vrednosti kontinualnih varijabli bile u normalnoj raspodeli, sa primenom LSD post-hoc testa, a vrednosti su predstavljane kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. U cilju ispitivanja farmakokinetike CsA u zavisnosti od godina pacijenti su podeljeni u dve grupe (≤ 6 godina i > 6 godina). U cilju ispitivanja uticaja nekoliko različitih prediktora (polimorfizmi u ispitivanim genima i godine) na parametre farmakokinetike CsA primenjena je multivarijantna regresiona analiza a rezultati predstavljeni kao vrednost regresionog koeficijenta (Beta) i njegove standardne greske. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom u svim statističkim testovima.

4. REZULTATI

4.1. *Bazalne karakteristike ispitanika i demografski podaci*

U ispitivanje je uključeno ukupno 47 pacijenata sa transplantiranim bubregom uzrasta od 3-20 godina. Na tabeli 1 predstavljene su osnovne demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Prosečan uzrast pacijenata bio je 11.17 ± 4.57 godina. Dečaka je bilo 63,9%, prosečnog uzrasta $11,27 \pm 4,6$ godina. Devojčica je bilo 36,1%, prosečnog uzrasta $10,9 \pm 4,7$ godina. Primarna bolest bubrega koja je dovela do terminalne bubrežne insuficijencije kod 44,7% pacijenata je bila urođena anomalija bubrega i urinarnih puteva, 27,7% pacijenata je imalo glomerulonefritis, 23,3% pacijenata cističnu bolest bubrega, ostale bolesti je imalo 4,3% pacijenata. Od živog srodnika bubreg je dobilo 78,7%, a od moždano mrtve osobe 21,3% pacijenata. Posle prve transplantacije bubrega u studiju je uključeno 93,6% pacijenata, a posle druge 6,4% pacijenata. Godinu dana posle transplantacije bubrega praćeno je 82,97% pacijenata, šest meseci 8,51% pacijenata, tri meseca 6,38% pacijenata, mesec dana 2,13 % pacijenata. Pacijentima koji su isključeni iz studije mesec dana, tri meseca i šest meseci posle transplantacije bubrega CsA je isključen iz terapije i zamenjen drugim imunosupresivnim lekom. Akutnu krizu odbacivanja transplantiranog bubrega je imalo jedanest (23,4%) pacijenata. Od toga četiri pacijenta su imala akutnu krizu odbacivanja u prvom mesecu, tri pacijenta u četvrtom mesecu, jedan pacijent u petom mesecu, jedan pacijent u sedmom mesecu, jedan pacijent u desetom mesecu i jedan pacijent u dvanestom mesecu posle transplantacije bubrega.

Tabela 1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom

Karakteristike	n=47
uzrast (god.±SD)	11.17± 4.57
pol (dečaci/devojčice), n (%)	30 (63,9) /17 (36,1)
uzrast dečaci (god.±SD) / uzrast devojčice (god±SD)	11,27±4,6 / 10,9±4,7
Primarna bolest bubrega, n (%)	
urođene anomalije bubrega i urinarnih puteva	21 (44,7)
glomerulonefritis	13 (27,7)
cistične bolesti bubrega	11 (23,3)
ostale	2 (4,3%)
Poreklo grafta	
živ srodnik/kadaver, n (%)	37 (78,7) / 10 (21,3%)
Transplantacija po redu (1/2), n (%)	44 (93,6%) / 3 (6,4%)
Dužina praćenja n (%)	
12 meseci	39 (82,97)
6 meseci	4 (8,51)
3 meseca	3 (6,38)
1 mesec	1 (2,13)
Akutna kriza odbacivanja, n (%)	11 (23,4)

4.2. Doza i nivoi CsA u krvi

U tabeli dva prikazane su prosečne vrednosti doze CsA, C_0 nivoa CsA u krvi, C_2 nivoa CsA u krvi, odnosa C_0 /doza leka i C_2 /doza leka.

Tabela 2. Prosečne vrednosti doze CsA, C_0 , C_2 nivoa leka u krvi, odnosa C_0/D i C_2/D , jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega.

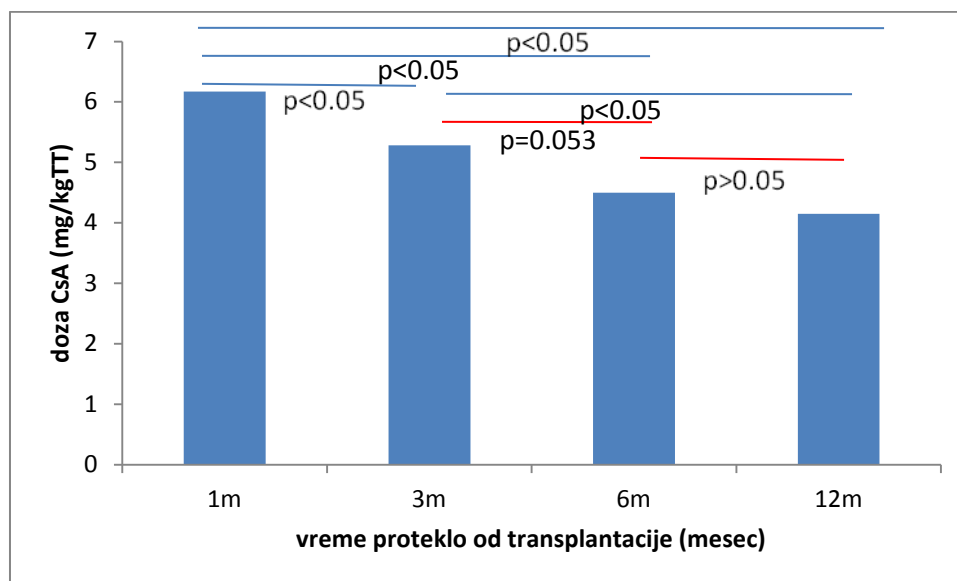
Vreme proteklo od transplantacije	1 m	3m	6m	12m	p
Doza CsA (mg/kgTT \pm SD)	6,17 \pm 1,99	5,28 \pm 1,95	4,50 \pm 1,74	4,15 \pm 1,82	<0,01
C_0 nivo CsA u krvi (ng/ml \pm SD)	139,65 \pm 54,55	130,32 \pm 35,51	119,00 \pm 36,14	107,67 \pm 37,27	<0,01
C_2 nivo CsA u krvi (ng/ml \pm SD)	1028,86 \pm 366,25	911,78 \pm 296,19	713,90 \pm 243,5	662,31 \pm 36,30	<0,01
Odnos C_0/D (ng/ml/mg/kg \pm SD)	26,60 \pm 10,50	31,43 \pm 14,75	32,09 \pm 15,19	33,31 \pm 23,77	ns
Odnos C_2/D (ng/ml/mg/kg \pm SD)	181,15 \pm 88,20	195,76 \pm 95,12	178,52 \pm 90,20	186,53 \pm 101,55	ns

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Prosečna doza CsA koju su pacijenti pili, mesec dana posle transplantacije bubrega bila je 6,17 \pm 1,99 mg/kgTT, tri meseca posle transplantacije bubrega 5,28 \pm 1,95 mg/kgTT, šest meseci posle transplantacije bubrega 4,50 \pm 1,74 mg/kgTT, dvanaest meseci posle transplantacije bubrega 4,14 \pm 1,82 mg/kgTT. Prosečna doza CsA se značajno razlikovala između sledećih vremenskih tačaka: mesec dana i tri meseca ($p < 0,05$), mesec dana i šest meseci ($p < 0,01$), mesec dana i dvanaest meseci ($p < 0,01$) i tri meseca i dvanaest meseci ($p < 0,05$) posle transplantacije bubrega. Doza CsA tri i šest meseci posle transplantacije bubrega je bila na granici statističke značajnosti ($p = 0,053$). Nije bilo značajne razlike u dozi leka šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega ($p = 0,403$). Prosečne vrednosti doze CsA jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega prikazane su na grafikonu 1.

Grafik 1

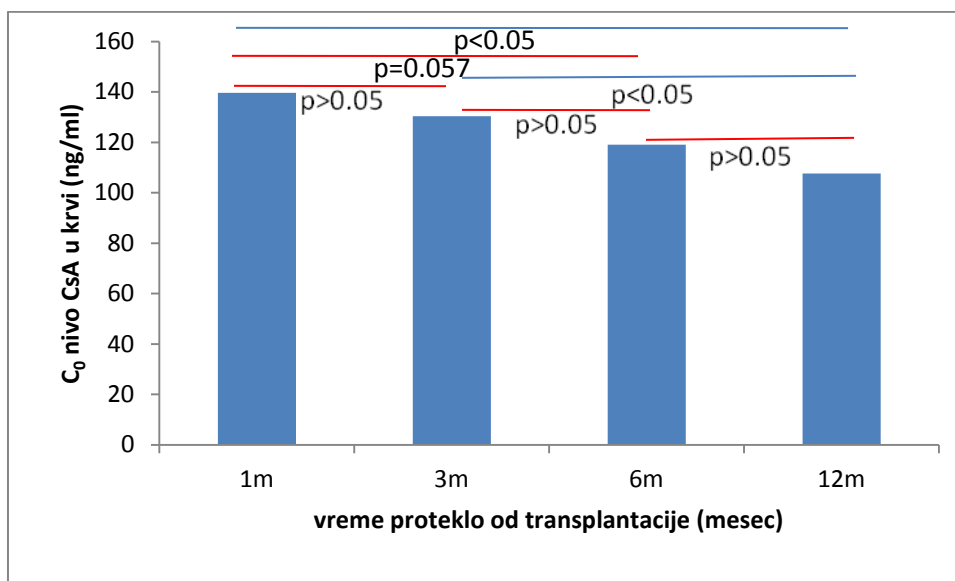
Prosečne vrednosti doze CsA jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega



Prosečan C_0 nivo CsA u krvi mesec dana posle transplantacije bubrega bio je $139 \pm 54,55$ ng/ml, tri meseca posle transplantacije bubrega $130,32 \pm 35,51$ ng/ml, šest meseci posle transplantacije bubrega $119,00 \pm 36,14$ ng/ml, dvanaest meseci posle transplantacije bubrega $107,67 \pm 37,27$ ng/ml. Prosečan C_0 nivo CsA se nije razlikovao mesec dana i tri meseca ($p=0,387$), tri meseca i šest meseci ($p=0,298$), šest meseci i dvanaest meseca posle transplantacije bubrega ($p=0,315$), na granici statističke značajnosti je bio mesec dana i šest meseci posle transplantacije ($p=0,057$), a značajno se razlikovao mesec dana i dvanaest meseci ($p=0,005$) i tri meseca i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega ($p=0,046$). Prosečne vrednosti C_0 nivoa CsA u krvi jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega prikazani su na grafikonu 2.

Grafik 2

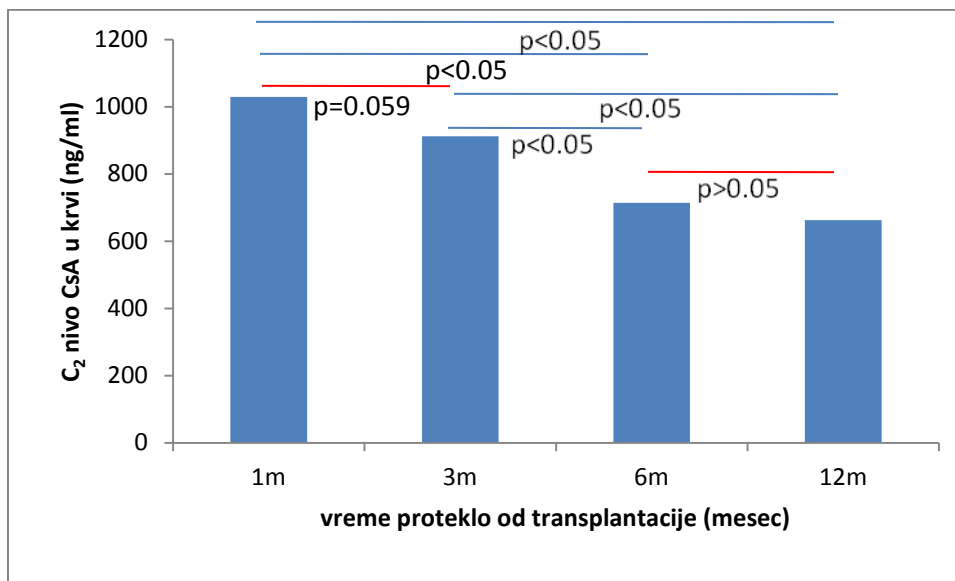
Prosečne vrednosti C_0 nivoa CsA u krvi jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega



Prosečan C_2 nivo CsA u krvi mesec dana posle transplantacije bubrega bio je $1028 \pm 366,25$ ng/ml, tri meseca posle transplantacije bubrega $911,78 \pm 296,19$ ng/ml, šest meseci posle transplantacije bubrega $713,90 \pm 243,5$ ng/ml, dvanaest meseci posle transplantacije bubrega $662,31 \pm 36,30$ ng/ml. Prosečan C_2 nivo CsA je bio na granici statističke značajnosti mesec dana i tri meseca ($p=0,059$) posle transplantacije bubrega. Prosečan C_2 nivo leka u krvi se značajno razlikovao jedan mesec i šest meseci ($p<0,01$), jedan mesec i dvanaest meseci ($p<0,01$), tri meseca i šest meseci ($p<0,05$) i tri meseca i dvanaest meseci ($p<0,01$) posle transplantacije bubrega. Prosečan C_2 nivo leka u krvi se nije značajno razlikovao šest meseci i dvanaest meseci ($p=0,423$) posle transplantacije bubrega. Prosečne vrednosti C_2 nivoa CsA u krvi jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega prikazani su na grafikonu 3.

Grafik 3

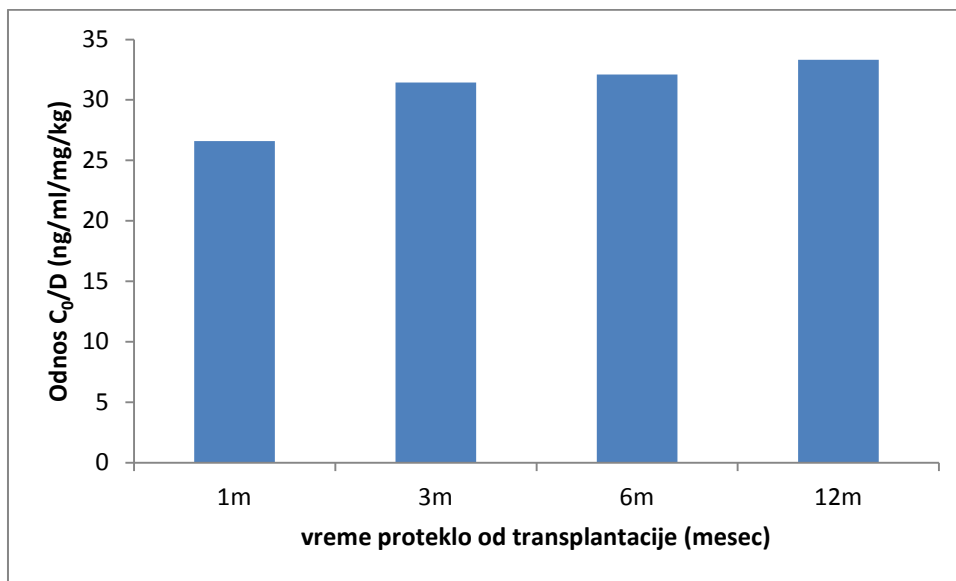
Prosečne vrednosti C_2 nivoa CsA u krvi jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega



Prosečan odnos C_0/D mesec dana posle transplantacije bubrega bio je $26,60 \pm 10,50$, tri meseca posle transplantacije bubrega $31,43 \pm 14,75$, šest meseci posle transplantacije bubrega $32,09 \pm 15,19$, dvanaest meseci posle transplantacije bubrega $33,31 \pm 23,77$. Nije bilo značajne razlike u odnosu C_0/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Prosečne vrednosti odnosa C_0/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega prikazane su na grafikonu 4.

Grafik 4

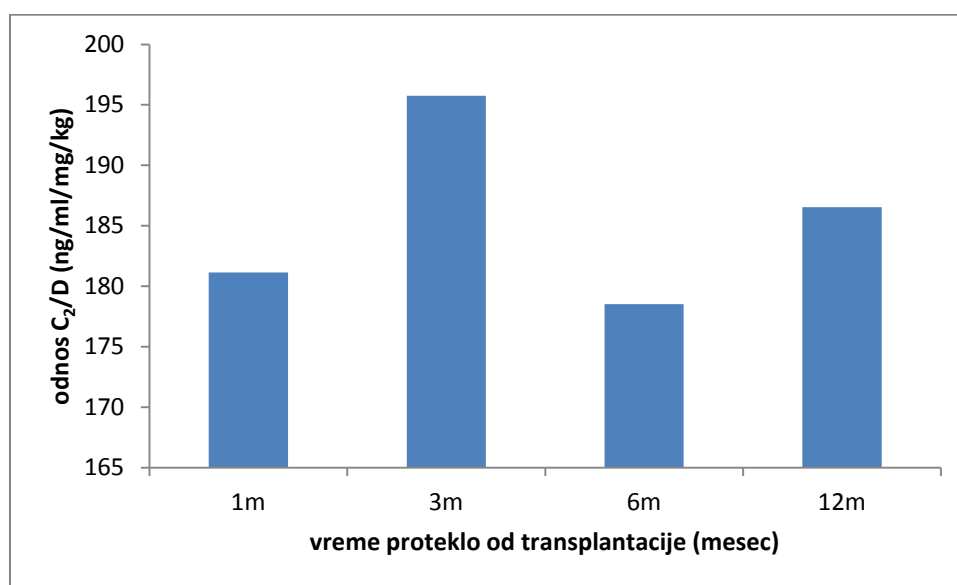
Prosečne vrednosti odnosa C_0/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega



Prosečan odnos C_2/D mesec dana posle transplantacije bubrega bio je $181,15 \pm 88,20$ ng/ml/mg/kg, tri meseca posle transplantacije bubrega $195,76 \pm 95,12$ ng/ml/mg/kg, šest meseci posle transplantacije bubrega $178,52 \pm 90,20$ ng/ml/mg/kg,, dvanaest meseci posle transplantacije bubrega $186,53 \pm 101,55$ ng/ml/mg/kg,. Nije bilo značajne razlike u odnosu C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Prosečne vrednosti odnosa C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega prikazane su na grafikonu 5.

Grafik 5

Prosečne vrednosti odnosa C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega



4.3. Distribucija genotipova polimorfizama u genima za ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom utvrđeni su genotipovi polimorfizama u ciljnim genima: ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367) i POR (rs1057868). U tabelama 3, 4, 5 i 6 prikazana je distribucija genotipova i frekvencija alela ispitivanih polimorfizama

Tabela 3. Distribucija genotipova i frekvencija alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Polimorfizam	CC genotip N (%)	CT genotip N (%)	TT genotip N (%)	Alel C	Alel T	Ukupno N
ABCB1	12 (26)	25 (53)	10 (21)	0,52	0,48	47

U grupi ispitivanih pacijenata sa transplantiranim bubregom 26% pacijenata su bili homozigoti za češći alel, CC genotip, polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1. Heterozigotnih nosioca polimorfnog alela je bilo 53% dok je homozigotnih nosioca polimorfnog alela T bilo 21%.

Tabela 4. Distribucija genotipova i frekvencija alela polimorfizma rs 776746 u genu za CYP3A5

Polimorfizam	genotip *1/*1 N (%)	genotip *1/*3 N (%)	genotip *3/*3 N (%)	Alel *1	Alel *3	Ukupno N
CYP3A5	0 (0)	6 (13)	41 (87)	0,06	0,94	47

U grupi ispitivanih pacijenata sa transplantiranim bubregom nije bilo nosioca genotipa *1/*1 polimorfizma rs 776746 u genu za CYP3A5 . Heterozigotni nosioci polimorfnog alela *3 su bili zastupljeni sa 13%, a homozigoti za polimorfni alel sa 87 %, u ispitanoj grupi pacijenata.

Tabela 5. Distribucija genotipova i frekvencija alela polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4

Polimorfizam	genotip *1/*1 N (%)	genotip *1/*22 N (%)	genotip *22/*22 N (%)	Alel *1	Alel *22	Ukupno N
CYP3A4	44 (94)	3 (6)	0 (0)	0,96	0,04	47

U grupi ispitivanih pacijenata sa transplantiranim bubregom homozigoti za češći alel *1 su bili zastupljeni sa 94%, dok je kod 6% pacijenata detektovan polimorfni alel *22 u heterozigotnom obliku. Nije bilo homozigotnih nosioca polimorfnog alela *22 polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4.

Tabela 6. Distribucija genotipova i frekvencija alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR

Polimorfizam	genotip *1/*1 N (%)	genotip *1/*28 N (%)	genotip *28/*28 N (%)	Alel *1	Alel *28	Ukupno N
POR	20 (42)	21(45)	6 (13)	0,65	0,35	47

U grupi ispitivanih pacijenata sa transplantiranim bubregom bilo je 42% nosioca genotipa *1/*1 polimorfizma rs1057868 u genu za POR. Heterozigotnih nosioca polimorfnog alela bilo je 45%, dok je homozigotnih nosioca polimorfnog alela*28 bilo 13%,

4.4.1. Raspodela pacijenata koji primaju različite doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Ispitivali smo raspodelu pacijenata koji primaju dozu CsA < 4mg/kgTT i > 6 mg/kgTT u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1. Genotipovi sa polimorfnim alelom su grupisani i upoređeni sa homozigotima za češći alel.

Tabela 7. Raspodela pacijenata koji primaju različite doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

ABCB1 (rs1045642)	Doza CsA	<4mg/kgTT N (%)	>6mg/kgTT N (%)	Ukupno N(%)	P
CC genotip		4 (50)	4(50)	8(100)	0,005
CT+TT genotip		19 (95)	1(5)	20(100)	
Ukupno		23	5	28	

* χ^2 test

Statističkom analizom podataka uočena je veza između raspodele pacijenata u zavisnosti od doze CsA i genotipova polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1. U grupi pacijenata koji su nosioci polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 statistički je značajno više onih koji primaju dozu CsA<4 mg/kgTT.

4.4.2. Raspodela pacijenata koji primaju različite doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR

Ispitivali smo raspodelu pacijenata koji su primali dozu CsA < 4mg/kgTT CsA i > 6 mg/kgTT u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR.

Tabela 8. Raspodela pacijenata koji primaju razliciti doze CsA u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR

POR (rs1057868)	Doza CsA	<4mg/kgTT N (%)	>6 mg/kgTT N (%)	Ukupno N(%)	P
*1*1 genotip		5 (38)	8 (62)	13 (100)	0,03
*1*28 +*28*28 genotip		1 (6)	15 (94)	16 (100)	
Ukupno		14	15	29	

* χ^2 test

Statističkom analizom podataka uočena je veza između raspodele pacijenata u zavisnosti od doze CsA i genotipova polimorfizma rs1057868 u genu za POR. U grupi pacijenata koji su nosioci polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR statisticki je znacajno vise onih koji primaju dozu CsA > 6 mg/kgTT.

4.5. Uticaj polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 na dnevnu dozu CsA, odnos C₀/D i C₂/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega

Ispitan je uticaj polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 na dnevnu dozu CsA, odnose C₀/D i C₂/D mesec dana, tri meseca, šest meseci i godinu dana posle transplantacije bubrega. Na tabeli 9. prikazane su srednje vrednosti doze leka, odnosa C₀/D i C₂/D po mesecima u odnosu na genotipove polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1.

Tabela 9. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na genotip polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

ABCB1(rs1045642)	CC genotip	CT genotip	TT genotip	P
Doza 1 m	6,57±2,34	6,21±2,10	5,37±1,28	0,405
Doza 3 m	5,48±2,25	5,34±2,15	4,89±1,23	0,795
Doza 6 m	5,48±2,25	5,34±2,15	4,89±1,23	0,795
Doza 12 m	5,33±2,11	4,41±2,07	4,38±1,24	0,726
Co/D 1 m	26,97±8,84	26,87±11,62	25,30±11,44	0,949
Co/D 3 m	29,72±13,62	31,15±13,64	34,38±20,77	0,848
Co/D 6 m	26,56±10,90	32,92±14,46	37,22±21,53	0,424
Co/D 12 m	27,47±11,36	38,64±32,50	30,45±13,66	0,575
C2/D 1 m	179,27±84,03	181,90±104,40	187,50±58,41	0,979
C2/D 3 m	200,80±80,16	205,93±110,50	175,63±81,13	0,731
C2/D 6 m	147,44±49,53	200,23±113,00	161,72±40,61	0,245
C2/D 12 m	171,68±72,90	202,48±128,05	180,81±77,31	0,726

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Statističkom analizom podataka nije pokazano da genotipovi polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 utiču na dnevnu dozu leka, niti na odnose C_0/D i C_2/D .

4.6. Uticaj polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega

Dalje je ispitivan uticaj polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 na dnevnu dozu CsA, odnose C_0/D i C_2/D mesec dana, tri meseca, šest meseci i godinu dana posle transplantacije bubrega. Na tabeli 10. prikazane su srednje vrednosti doze leka, odnosa C_0/D i C_2/D po mesecima u odnosu na genotipove polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5

Tabela 10. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na genotip polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5

CYP3A5(rs776746)	*1/*3 genotip	*3/*3 genotip	P
Doza 1 m	6,51±1,16	6,09±2,12	0,671
Doza 3 m	5,65±1,57	5,24±2,06	0,674
Doza 6 m	5,65±1,57	5,24±2,06	0,674
Doza 12 m	5,83±1,67	4,56±1,98	0,283
Co/D 1 m	23,19±11,92	27,10±10,45	0,496
Co/D 3 m	18,25±8,1	32,88±14,66	0,104
Co/D 6 m	18,71±3,98	33,04±15,27	0,203
Co/D 12 m	19,62±3,42	34,45±24,41	0,407
C2/D 1 m	180,53±85,22	182,56±91,20	0,963
C2/D 3 m	197,36±103,15	198,46±96,71	0,981
C2/D 6 m	130,82±85,45	182,78±91,56	0,348
C2/D 12 m	146,16±75,29	192,38±104,97	0,463

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Statističkom analizom podataka nije pokazano da genotipovi polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 utiču na dnevnu dozu leka, niti na odnose C_0/D i C_2/D .

Zatim je izračunata srednja vrednost svih doza CsA, svih odnosa C_0/D i C_2/D kod CYP3A5 ekspresora i CYP3A5 neekspresora i prikazana u tabeli 17.

Tabela 11. Srednje vrednosti svih doza CsA, svih odnosa C_0/D i C_2/D kod CYP3A5 neekspresora i CYP3A5*3*3 neekspresora .

	CYP3A5 neekspresori	CYP3A5 ekspresori	P
Doza	5.36 ± 2.00	5.78 ± 1.33	0.18
C_0/D	31.48 ± 12.75	22.44 ± 7.12	0.01
C_2/D	186.92 ± 77.54	182.57 ± 83.29	0.17

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Odnos C_0/D je bio statistički značajno veći u grupi pacijenata CYP3A5 neekspresora (genotip *3/*3) u odnosu na grupu pacijenata CYP3A5 ekspresora (genotip *1/*3). Razlika doza CsA i odnosa C_2/D između ove dve grupe nije dostigla statističku značajnost.

4.7. Uticaj polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4 na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega

Dalje je ispitivan uticaj polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4 na dnevnu dozu CsA, odnose C_0/D i C_2/D mesec dana, tri meseca, šest meseci i godinu dana posle transplantacije bubrega. Na tabeli 12. prikazane su srednje vrednosti doze leka, odnosa C_0/D i C_2/D po mesecima u odnosu na genotipove polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4.

Tabela 12. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na genotip polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4

CYP3A4(rs35599367)	*1/*1 genotip	*1/*22 genotip	P
Doza 1 m	6,00±1,85	6,50±1,83	0,632
Doza 3 m	5,18±1,91	5,03±1,14	0,893
Doza 6 m	5,18±1,91	5,03±1,14	0,894
Doza 12 m	4,62±1,91	3,70±0,37	0,417
C_0/D 1 m	26,37±10,79	29,84±5,84	0,660
C_0/D 3 m	31,62±14,89	28,60±17,89	0,786
C_0/D 6 m	31,86±15,41	35,15±16,40	0,773
C_0/D 12 m	33,36±24,25	32,00±0,00	0,960
C_2/D 1 m	188,56±91,61	123,14±18,06	0,229
C_2/D 3 m	203,94±96,39	156,50±98,40	0,416
C_2/D 6 m	180,79±92,87	179,09±92,77	0,976
C_2/D 12 m	194,64±104,91	140,28±11,87	0,475

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Statističkom analizom podataka nije pokazano da genotipovi polimorfizma rs35599367 u genu za CYP3A4 utiču na dnevnu dozu leka, niti na odnose C_0/D i C_2/D .

4.8. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega

Zatim je ispitan uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D kod pacijenata sa transplantiranim bubregom mesec dana, tri meseca, šest meseci i godinu dana posle transplantacije. Na tabeli 13. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina.

Tabela 13. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na uzrast pacijenata sa transplantiranim bubregom

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	7,41±1,82	5,81±1,98	0,034
Doza 3 m	7,16±1,60	4,80±1,81	0,001
Doza 6 m	7,16±1,60	4,80±1,81	0,001
Doza 12 m	6,38±1,57	4,17±1,78	0,002
Co/D 1 m	16,76±7,30	29,47±9,60	0,003
Co/D 3 m	16,49±4,16	35,96±13,79	0,001
Co/D 6 m	18,97±5,21	36,85±14,85	0,003
Co/D 12 m	21,12±5,50	36,97±25,96	0,156
C2/D 1 m	105,99±25,60	201,96±89,76	0,003
C2/D 3 m	111,82±41,43	220,58±93,87	0,002
C2/D 6 m	105,24±45,69	202,14±89,87	0,002
C2/D 12 m	111,82±44,63	206,56±104,71	0,026

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Obradom prikazanih podataka pokazano je da pacijenti uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu CsA jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega u odnosu na pacijente uzrasta preko šest godina. Pacijenti uzrasta do šest godina imaju statistički značajno manji odnos C_0/D jedan, tri i šest meseci posle transplantacije, kao i odnos C_2/D jedan, tri, šest i dvanest meseci posle transplantacije u odnosu na pacijente starije od šest godina.

Zatim je izračunata srednja vrednost svih doza CsA, svih odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata do šest godina i starijih i prikazana u tabeli 14.

Tabela 14. Srednje vrednosti svih doza CsA, svih odnosa C_0/D i C_2/D u zavisnosti od uzrasta

	≤ 6 godina	> 6 godina	P
Doza CsA	7.12±1.56	4.91 ±1.75	0.001
C_0/D	18.82±4.72	34.19±11.89	0.001
C_2/D	106.75±26.99	209.20±71.57	<0.001

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p<0,05$ je smatrana signifikantnom.

Doza CsA je bila statistički značajno veća u grupi mlađih pacijenata, što je praćeno statistički značajno manjim odnosom C_0/D i C_2/D u odnosu na grupu starijih pacijenata.

4.9. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca CC i CT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Dalje je ispitivano da li kod pacijenata, nosioca CC i CT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, uzrast utiče na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Na tabeli 15. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata, nosioca CC i CT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije.

Tabela 15. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na uzrast nosioca CC i CT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	7,91±1,64	5,97±2,16	0,035
Doza 3 m	7,59±1,49	4,83±1,98	0,002
Doza 6 m	7,59±1,49	4,83±1,98	0,002
Doza 12 m	6,70±1,52	4,29±1,95	0,005
Co/D 1 m	17,47±4,50	28,70±10,24	0,027
Co/D 3 m	16,42±5,06	34,38±12,63	0,006
Co/D 6 m	18,59±5,71	34,82±13,29	0,009
Co/D 12 m	18,87±1,72	39,24±28,75	0,183
C2/D 1 m	106,79±28,06	190,67±77,37	0,009
C2/D 3 m	107,79±39,41	226,22±91,84	0,002
C2/D 6 m	93,69±38,56	211,14±98,57	0,003
C2/D 12 m	105,59±50,91	213,68±114,72	0,052

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Obradom prikazanih podataka pokazano je da nosioci češćeg alela, polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 (homozigoti i heterozigoti) uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu leka jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije, što je praćeno manjim odnosom C_0/D jedan, tri i šest meseci posle transplantacije i manjim odnosom C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije u odnosu na nosioce istih genotipova koji su stariji od šest godina.

4.10. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca TT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Dalje je ispitivano da li kod pacijenata, nosioca TT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, uzrast utiče na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D jedan, tri,

šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Na tabeli 16. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata, nosioca TT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije.

Tabela 16. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na uzrast nosioca TT genotipa polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	5,66±1,63	5,36±1,29	0,780
Doza 3 m	5,63±1,39	4,73±1,28	0,386
Doza 6 m	5,63±1,39	4,73±1,28	0,386
Doza 12 m	5,24±1,59	3,80±1,13	0,167
Co/D 1 m	14,98 ±15,17	32,40±6,69	0,069
Co/D 3 m	16,67±1,02	41,62±17,80	0,120
Co/D 6 m	20,11±4,88	43,76±19,34	0,170
Co/D 12 m	25,62±9,03	30,15±15,23	0,718
C2/D 1 m	103,22±22,36	234,58±118,00	0,166
C2/D 3 m	125,96±62,42	204,26±103,38	0,341
C2/D 6 m	151,45±55,16	175,14±52,32	0,585
C2/D 12 m	127,41±30,06	186,99±73,08	0,307

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p<0,05$ je smatrana značajnom.

Statističkom analizom podataka nije uočeno da kod homozigotnih nosioca polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, dnevna doza CsA i odnosi C_0/D i C_2/D zavise od uzrasta jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije.

4.11 Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod CYP3A5 neekspresora

Dalje je ispitivano da li kod pacijenata, CYP3A5 neekspresora, uzrast utiče na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Na tabeli 17. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata, CYP3A5 neekspresora (genotip *3/*3), sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije..

Tabela 17. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na uzrast CYP3A5 neekspresora sa transplantiranim bubregom

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	7,39±1,95	5,76±2,07	0,052
Doza 3 m	7,16±1,71	4,74±1,86	0,002
Doza 6 m	7,16±1,71	4,74±1,86	0,002
Doza 12 m	6,42±1,68	4,06±1,76	0,002
Co/D 1 m	17,77±7,45	29,78±9,71	0,010
Co/D 3 m	17,86±2,22	37,17±13,82	0,002
Co/D 6 m	19,41±5,47	37,58±14,81	0,004
Co/D 12 m	21,90±5,76	37,76±26,43	0,202
C2/D 1 m	111,22±21,64	200,97±93,38	0,011
C2/D 3 m	115,76±42,45	219,80±95,57	0,005
C2/D 6 m	108,95±46,84	204,93±90,45	0,004
C2/D 12 m	120,57±41,80	207,77±108,41	0,064

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinuiranih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana signifikantnom.

Obradom prikazanih podataka pokazano je da CYP3A5 neekspresori uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu leka u odnosu na CYP3A5 neekspresore starije od šest godina. Takođe odnos C_0/D i C_2/D je statistički značajno manji kod

CYP3A5 neekspresora uzrasta do šest godina u odnosu na CYP3A5 neekspresore starije od šest godina jedan, tri i šest meseci posle transplantacije.

4.12. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca *1/*1 genotipa polimorfizma rs1057868 u genu za POR

Potom smo ispitali da li kod pacijenata homozigota za češći alel (genotip *1/*1) polimorfizma rs1057868 u genu za POR, uzrast utiče na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Na tabeli 18. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata, nosioca *1/*1 genotipa polimorfizma rs1057868 u genu za POR, sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije.

Tabela 18. Doza, C₀/D, C₂/D u odnosu na uzrast nosioca *1/*1 genotipa polimorfizma rs1057868 u genu za POR

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	7,21±2,37	5,04±1,76	0,041
Doza 3 m	6,86±2,11	4,24±1,62	0,009
Doza 6 m	6,86±2,11	4,24±1,62	0,009
Doza 12 m	6,41±2,18	3,64±1,60	0,007
Co/D 1 m	14,85±9,35	30,60±10,05	0,015
Co/D 3 m	15,85±5,64	38,84±16,70	0,019
Co/D 6 m	19,24±3,61	39,31±15,99	0,029
Co/D 12 m	21,61±6,98	42,41±31,89	0,226
C2/D 1 m	99,60±23,66	224,04±112,06	0,026
C2/D 3 m	122,68±53,59	238,14±104,33	0,031
C2/D 6 m	130,73±48,56	225,14±93,31	0,046
C2/D 12 m	125,53±44,15	238,33±127,46	0,072

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od p<0,05 je smatrana značajnom.

Obradom prikazanih podataka pokazano je da nosioci genotipa *1/*1 polimorfizma rs1057868 u genu za POR uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu leka u odnosu na nosioce istog genotipa koji su stariji od šest godina. Takođe odnos C₀/D i C₂/D je statistički značajno manji kod nosioci genotipa *1/*1 polimorfizma rs1057868 u genu za POR uzrasta do šest godina u odnosu na nosioce istog genotipa starije od šest godina jedan, tri i šest meseci posle transplantacije.

4.13. Uticaj uzrasta na dnevnu dozu CsA, odnos C₀/D i C₂/D jedan, tri, šest i dvanest meseci posle transplantacije bubrega kod nosioca polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR (*1/*28 i *28/*28)

Potom je ispitano da li kod pacijenata, nosioca polimorfnog alela (genotipovi*1/*28 i *28/*28) polimorfizma rs1057868 u genu za POR uzrast utiče na dnevnu dozu CsA,

odnos C_0/D i odnos C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije bubrega. Na tabeli 19. prikazane su srednje vrednosti dnevnih doza CsA, odnosa C_0/D i C_2/D kod pacijenata, nosioca polimorfnog alela *28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR, sa transplantiranim bubregom uzrasta do šest godina i preko šest godina jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije.

Tabela 19. Doza, C_0/D , C_2/D u odnosu na uzrast nosioca polimorfnog alela *28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR

Uzrast	< 6 godina	> 6 godina	P
Doza 1 m	7,66±1,12	6,39±1,97	0,231
Doza 3 m	7,53±0,77	5,23±1,88	0,026
Doza 6 m	7,53±0,77	5,23±1,88	0,026
Doza 12 m	6,34±0,49	4,63±1,84	0,084
Co/D 1 m	19,31±3,44	28,33±9,43	0,135
Co/D 3 m	17,34±1,48	32,82±9,53	0,018
Co/D 6 m	18,70±7,08	33,90±13,57	0,058
Co/D 12 m	20,14±1,46	28,81±10,26	0,287
C2/D 1 m	113,99±29,12	185,39±67,03	0,051
C2/D 3 m	98,27±17,48	207,41±85,57	0,020
C2/D 6 m	79,76±26,75	181,84±84,25	0,016
C2/D 12 m	77,55±29,40	174,79±65,58	0,061

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD), Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćenja za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli u normalnoj raspodeli. Vrednost verovatnoće od $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

Obradom prikazanih podataka pokazano je da nosioci polimorfnog alela, homozigoti i heterozigoti, polimorfizma rs1057868 u genu za POR uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu leka i imaju manji odnos C_0/D u odnosu na nosioce istog genotipa koji su stariji od šest godina tri i šest meseci posle transplantacije bubrega. Takođe odnos C_2/D je statistički značajno manji kod nosioci polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR uzrasta do šest godina jedan, tri i šest meseci posle transplantacije.

4.14. Multifaktorijalna analiza faktora koji utiču na dozu CsA i odnose C_0/D i C_2/D

U cilju definisanja faktora koji utiču na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D , urađena je multivarijantna regresiona analiza parametara koji su ispitivani u ovoj studiji.

Tabela 20. Multivarijantna regresiona analiza uticaja uzrasta, polimorfizama u genima za CYP3A5 (rs776746), CYP3A4(rs35599367), POR(rs1057868) i ABCB1 (rs1045642) na dnevnu dozu leka.

doza CsA	BETA	St. Err.of BETA	P
Uzrast	-0,60	0,14	0,000014
POR*28	0,31	0,15	0,04
ABCB1genotip	-0,13	0,14	0,35
CYP3A5*1	0,08	0,15	0,61
CYP3A4*22	-0,11	0,14	0,44

$R^2=0,36$, Korigovani $R^2=0,27$, $p < 0,004$

Faktori uključeni u multifaktorijalni model analize potencijalnih prediktora ukupne dnevne doze leka predstavljani u tabeli objašnjavaju 27% varijabilnosti dnevne doze leka. U ispitanom modelu uočen je nazavistan značajan obrnuto proporcionalan efekat uzrasta na ukupnu dnevnu dozu leka ($p < 0.001$) i značajan efekat POR*28 polimorfizma u genu za POR ($p = 0.04$)

Tabela 21. Multivarijantna regresiona analiza uticaja uzrasta, polimorfizama u genima za CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367), POR (rs1057868) i ABCB1 3435 (rs1045642) na odnos C₀/D.

C ₀ /D	BETA	St. Err.of BETA	P
Uzrast	0,67	0,14	0,00006
POR*28	-0,14	0,14	0,31
ABCB1 genotip	0,22	0,15	0,14
CYP3A5*1	-0,35	0,14	0,02
CYP3A4*22	0,03	0,14	0,81

R²=0,56, Korigovani R²=0,45, p< 0,001

Faktori uključeni u multifaktorijalni model analize potencijalnih prediktora ukupne C₀/D predstavljeni u tabeli obašnjavaju 45% varijabilnosti odnosa C₀/D . U ispitanom modelu uočen je nazavistan značajan proporcionalan efekat uzrasta na onos C₀/D (p < 0.001) i značajan efekat genotipa sa aleleom CYP3A5*1 polimorfizma u genu za CYP3A5 (p =0.02)

Tabela 22. Multivarijantna regresiona analiza uticaja uzrasta, CYP3A5 (rs776746), POR(rs1057868) i ABCB1 3435(rs1045642) polimorfizama na ukupni odnos C₂/D.

C ₂ /D	BETA	St. Err.of BETA	P
Uzrast	0,73	0,11	0,00000006
POR*28	-0,24	0,11	0,03
ABCB1 T alel	0,15	0,11	0,17
CYP3A5*1	-0,11	0,11	0,34

R²=0,54, Korigovani R²=0,50, p< 0,001

Faktori uključeni u multifaktorijalni model analize potencijalnih prediktora ukupne C_2/D predstavljeni u tabeli obašnjavaju 50% varijabilnosti ukupnih odnosa C_2/D . U ispitanom modelu uočen je nazavistan značajan proporcionalan efekat uzrasta na odnos C_2/D ($p < 0.001$) i značajan efekat genotipa sa aleleom POR*28 polimorfizma u genu za POR ($p = 0.03$). Polimofrizam u genu za CYP3A4 (rs35599367) nije uključen u model jer nije doprinio značajnosti modela.

4.15. Multifaktorijalna analiza faktora koji utiču na dozu CsA i odnose C_0/D i C_2/D u zavisnosti od uzrasta

Pošto je pokazano da je uzrast nezavistan, značajan faktor koji utiče na dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D , dalje smo analizirali ispitivane parametre posebno u grupi pacijenata ≤ 6 godina i u grupi pacijenata > 6 godina. Utvrđeno je da jedino multivarijantni model prikazan u tabeli 23. detektuje značajne prediktore i to za ukupni odnos C_2/D u grupi dece ≤ 6 godina. Modeli ispitani za detekciju prediktora ukupne doze leka i ukupni odnos C_0/D nisu definisali značajne parametre. U grupi dece starije od šest godina ni jedan ispitani parametar nije statistički značajno uticao na doze i farmakokinetiku leka.

Tabela 23. Multivarijantna regresiona analiza uticaja polimorfizama u genima za CYP3A5 (rs776746), CYP3A4(rs35599367), POR(rs1057868) i ABCB1(rs1045642) na odnos C_2/D kod pacijenata ≤ 6 godina.

C_2/D	BETA	St. Err.of BETA	P
POR*28	-0,64	0,17	0,012
ABCB1 T alel	-0,40	0,15	0,041
CYP3A5*1	0,67	0,15	0,006
CYP3A4*22	-0,13	0,15	0,42

$R^2=0,92$, Korigovani $R^2=0,86$, $p < 0,006$

Faktori uključeni u multifaktorijalni model analize potencijalnih prediktora ukupne C_2/D kod pacijenata ≤ 6 godina predstavljeni u tabeli obašnjavaju 86% varijabilnosti

odnosa ukupnih C₂/D kod pacijenata ≤6 godina. U ispitanom modelu uočen je nezavistan značajan efekat genotipova sa alelom POR*28 polimorfizma u genu za POR, genotipova sa alelom T polimorfizma u genu za ABCB1, i genotipova sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma u genu za CYP3A5 na ukupni odnos C₂/D kod dece ≤6 godina (p= 0.012 ; p=0,041 ; p=0,006).

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj tezi analizirali smo uticaj genetskih faktora i uzrasta na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Transplantacija bubrega je najpoželjniji metod lečenja pedijatrijskih pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, a CsA je osnov imunosupresivne terapije koja se koristi kod transplantiranih bolesnika u cilju prevencije odbacivanja kalema. Bioraspoloživost peroralno unetog CsA, tj. stepen reapsorpcije leka iz gastrointestinalnog trakta, pored ostalog, u velikoj meri zavisi od ekspresije P-gp, glavnog kontratransportera enterocita, koji vraća CsA iz enterocita nazad u lumen creva smanjujući na taj način stepen njegove reapsorpcije. Sa tim u vezi ispitivali smo uticaj polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 na neophodnu dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D tokom prve godine posle transplantacije. Takođe smo ispitali raspodelu pacijenata koji su primali dozu CsA $< 4\text{mg/kgTT}$ i $> 6\text{ mg/kgTT}$ u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1.

Posle reapsorpcije CsA u cirkulaciju, nastupa proces njegovog metabolizma. CsA se metaboliše uz pomoć enzima CYP3A4 i CYP3A5 prvenstveno u jetri, a znatno manje u crevima i bubrezima. Shodno tome ispitivali smo uticaj polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5, rs35599367 u genu za CYP3A4 i rs1057868 u genu za POR na neophodnu dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D tokom prve godine posle transplantacije. I ovde smo ispitali raspodelu pacijenata koji su primali dozu CsA $< 4\text{mg/kgTT}$ i $> 6\text{ mg/kgTT}$ u odnosu na prisustvo polimorfnog alela gore navedenih polimorfizama.

Poznato je da se stepen apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije leka menja sa biološkim sazrevanjem organizma. To znatno otežava pravilno doziranje medikamenata kod pedijatrijskih pacijenata. Mlađi pedijatrijski pacijenti imaju veći metabolički kapacitet. Zašto je to tako nije u potpunosti jasno, ali svakako da stepen maturacije P-gp i aktivnost CYP3A enzima jetre, koji zavise od uzrasta deteta, imaju značajnu ulogu. Zato smo u ovom radu prvo ispitali da li i naša populacija mlađih pacijenata sa transplantiranim bubregom (do 6 god.), ima veći metabolički kapacitet tj.

zahteva veću dnevnu dozu CsA, a u cilju održavanja adekvatnih nivoa leka u krvi, u odnosu na grupu starijih pacijenata (preko 6 godina). Potom smo ispitali kako gore navedeni SNP utiču na dnevnu dozu CsA, odnos C_0/D i odnos C_2/D , kod pacijenata do 6 godina, a kako kod starijih pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Za modernu medicinu današnjice od izuzetnog je značaja razumevanje molekuskog mehanizma koji je odgovoran za interindividualne razlike u efikasnosti i odgovoru na isti lek i istu dozu leka. Jasno je da transmembranski transporteri u velikoj meri regulišu farmakokinetički profil lekova. Veliki broj studija danas se bavi ispitivanjem genetskih polimorfizama transportera lekova sa ciljem da objasne ove interindividualne razlike, čime će se preživljavanje grafta produžiti, a neželjni efekti njihove primene svesti na minimum. Različita ekspresija P-gp, glavnog kontratransportera enterocita, koji vraća CsA iz enterocita nazad u lumen creva, može biti odgovorna za interindividualnu razliku u stepenu reapsorpcije CsA. Ovo je sigurno jednim delom rezultat varijacije u genu za ABCB1 koji kodira P-gp (Staaž CE i sar., 2010). Brojne genetske studije su potvrdile da je ABCB1 gen izrazito polimorfan i da jedan broj polimorfizama utiče na strukturu i funkciju njegovog krajnjeg produkta P-gp.

Proučeno je preko 100 SNP u genu za ABCB1 (Cascorbi I, 2011). Najviše proučavan polimorfizam ABCB1 gena je 3435C>T (rs1045642), gde je C zamenjen sa T na poziciji 3435 unutar egzona 26 (Kroetz DL i sar., 2003). Pomenut SNP nema uticaj na redosled aminokiselina u završnom proteinu. Postoje brojne pretpostavke na koji način ovaj SNP utiče na funkciju i strukturu P-gp. Prvi i najverovatniji mogući uzrok je da postoji povezanost između polimorfizma rs1045642 i drugih varijacija unutar ABCB1 gena, bilo u području promotora, egzona (T129C) ili introna (G2677T/A) (Saito K i sar., 2002, Anglicheau D i sar., 2003). Drugi mogući uzrok je da ova varijacija može smanjiti efikasnost translacije što ima funkcionalne posledice (Schwab M (2) i sar., 2003). Treća moguća pretpostavka je da ova varijacija menja regulaciju i kontrolu translacije mRNA (Allain FH i sar., 1996, Wang D i sar., 2005). Poslednji razmatran uzrok je da ovaj SNP utiče na posttranskripcionu obradu mRNA (Jamroziak K i sar., 2002). Hoffmayer i saradnici su pokazali da homozigoti nosioci T alela (TT) ABCB1 3435C>T polimorfizma imaju dva puta manju crevnu ekspresiju P-gp u poređenju sa homozigotima, nosiocima C alela (CC) (Hoffmayer S i sar., 2000). Brojne druge studije

su potvrdile da homozigotni nosioci polimorfnog alela imaju smanjenu ekspresiju ili funkciju P-gp na intestinalnom traktu in vivo (Fellay J i sar., 2002, Hitzl M i sar., 2001, Hitzl M i sar., 2004, Tanabe M i sar., 2001). Teorijski to može dovesti do smanjenog efluksa leka iz enterocita nazad u lumen creva i posledično povećane resorpcije leka u cirkulaciju.

Od 47 pacijenata bele rase, dece sa transplantiranim bubregom, koji su uključeni u ovu studiju TT genotip je imalo 21%, CT genotip 53%, CC genotip 26%. Zna se da etnička pripadnost značajno utiče na distribuciju polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1. Mutantni T alel je relativno redak kod Afrikanaca. TT genotip nije detektovan među 206 stanovnika Gane, a prisutan je kod prosečno 26% pripadnika bele rase, 16% Kineza, 20% Japanaca, 5% Afrikanaca (Felipe CR i sar., 2009).

Polimorfizam C3435C>T SNP u genu za ABCB1 je u žiži interesovanja naučnika širom sveta, ne samo u pogledu farmakokinetike lekova, već je doveden u vezu i sa sklonošću ka pojedinim bolestima. Niska ekspresija P-gp na crevima, uslovljena ovim polimorfizmom, može biti udružena sa pojavom ulceroznog kolitisa. Schwab i saradnici su ustanovili dva puta povećan rizik za ulcerozni kolitisa kod pacijenata sa ABCB13435TT genotipom (Balram C i sar., 2003). Oni su mišljenja da smanjena ekspresija P-gp kod ovih pacijenata utiče na odbranu od crevnih bakterija i predstavlja faktor rizika za ovu bolest (Balram C i sar., 2003). Potocnik i saradnici su mišljenja da je ABCB1 gen potencijalna meta za terapiju pacijenata sa ulceroznim kolitisom i refraktarnom Kronovom bolešću (Potocnik U i sar., 2004). Sa druge strane ima i oprečnih mišljenja (Sills GJ i sar., 2005, Glas J i sar., 2004, Croucher PJ i sar., 2003, Gazouli M i sar., 2004). Studije u budućnosti su svakako neophodne u cilju razrešenja brojnih pitanja vezanih za ovaj SNP. Brojni radovi dovode u vezu 3435C>T SNP u ABCB1 genu sa Parkinsonovom bolešću. Nosioci 3435C>T polimorfizma u genu za ABCB1 manje ekspimiraju P-gp na endotelnim ćelijama kapilara mozga (Maimone D i sar., 2001). Dokazano je, da osobe izložene pesticidima, a koji su ujedno nosioci ovog polimorfizma, češće boluju od Parkinsonove bolesti (Drozdik M i sar., 2003). Furrno i sar., su objavili da je rani oblik Parkinsonove bolesti u jasnoj vezi sa 3435TT genotipom ovog polimorfizma (Furuno T i sar., 2002). Pretpostavlja se da manja ekspresija P-gp na krvno moždanoj barijeri, doprinosi većoj intracelularnoj

koncentraciji potencijalno neurotoksičnih supstanci, naročito kod mlađe populacije pacijenata.

U skladu sa rezultatima najvećeg broja studija iz literature u ovoj studiji nije dokazano da genotip polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1 samostalno utiče na dnevnu dozu leka, niti na odnose C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci nakon transplantacije bubrega. Međutim kada je ispitana raspodela pacijenata koji primaju dozu CsA $<4\text{mg/kgTT}$ i $> 6 \text{ mg/kgTT}$ u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, pokazano je da u grupi pacijenata nosioca polimorfnog alela statistički značajno više ima onih koji su primali dozu CsA $<4 \text{ mg/kgTT}$. Ovaj rezultat navodi na zaključak da nosioci bar jednog mutantnog T alela zbog manje funkcionalnog P-gp imaju smanjen efluks leka iz enterocita nazad u lumen creva što ima za posledicu povećanu resorpciju leka u cirkulaciju i samim tip potrebu za manjom dozom leka u cilju postizanja željenog nivoa CsA u krvi.

Prema podacima iz literature uticaj polimorfizama 3435C>T u genu za ABCB1 na farmakokinetiku CsA je i dalje nejasan, sa nekonzistentnim rezultatima. Najveći broj studija nije pokazao značajan uticaj ovog polimorfizma na dnevnu dozu CsA, C_0 i C_2 nivo leka, odnos C_0/D ili C_2/D (Hesselink DA i sar., 2003 Hesselink DA i sar., 2004, Loh PT i sar., 2008, Anglicheau D i sar 2004, von Ahsen N i sar., 2001, Haufroid V i sar., 2004, Min DI i sar., 2004, Qiu XY i sar., 2008, Chowbay B i sar., 2003, Mai I i sar., 2003, Kuzuya T i sar., 2003). Međutim, bilo je i studija koje su ukazale na statistički značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CsA. Pacijenti sa transplantiranom jetrom, 3435TT homozigoti, su imali viši C_2 nivo CsA i zahtevali su 50% manju dozu leka u poređenju sa "wild-type" homozigotima (Bonhomme Faivre L i sar., 2004). Više vrednosti nivoa CsA posle identične doze leka uočene su kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, Japanske nacionalnosti, heterozigota ABCB1 3435CT, u poređenju sa ABCB1 3435CC homozigotima, nedelju dana nakon transplantacije (Hu YF i sar 2006). Na slične rezultate je ukazala studija u koju su uključeni pacijenti sa transplantiranim bubregom (n= 88) sa Srednjeg Istoka mesec dana nakon transplantacije (Azarpira N i sar., 2006). Ovi rezultati navode na činjenicu da je P-gp manje funkcionalan u nosioca T alela, što doprinosi većoj reapsorpciji CsA tj. manjem efluksu leka nazad u lumen creva. Meta-analiza, u koju je uključeno 1036

individua iz 14 različitih studija, je rađena radi razrešenja dileme uticaja ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA (Jiang ZP i sar., 2008). Nije dokazano da ovaj polimorfizam ima uticaj na AUC tokom prvih 4 sata od davanja leka, niti na klirens leka nakon oralne primene i C_0 koncentraciju leka u krvi. Kada su iz ove grupe pacijenata izdvojili samo pacijente bele rase C_0 koncentracija leka je bila niža u nosiocima ABCB1 3435CC "wild type" genotipa, sugerišući uticaj etničke pripadnosti na farmakogenetiku CsA.

Do danas je otkriven veliki broj polimorfizama tipa zamene jednog nukleotidnog ponovka gena koji eksprimira CYP3A5 enzim. Najviše je proučavan SNP CYP3A5 gena u kome je A zamenjen G na poziciji 6986 unutar introna 3 CYP3A5 gena. Heterozigotni i homozigotni nosioci CYP3A5*1 "wild type" alela produkuju više CYP3A5 mRNA i samim tim ekspimiraju viši nivo CYP3A5 proteina (CYP3A5 ekspresori). Homozigotni nosioci CYP3A5*3 varijantnog alela sintetišu vrlo malu ili nedetektabilnu količinu CYP3A5 enzima (CYP3A5 ne-ekspresori) (Hutstert E i sar., 2001, Kuehl P i sar., 2001). Osobe koje su heterozigoti ili homozigoti nosioci CYP3A5*1 alela teorijski bi trebalo da imaju brži klirens i nižu biorasploživost primenjenog CsA, što bi trebalo da zahteva veće doze leka za postizanje adekvatnog nivoa leka u krvi.

Među 47 pedijatrijskih pacijenata bele rase, sa transplantiranim bubregom, koji su uključeni u ovu studiju nije bilo homozigotnih nosioca CYP3A5*1 alela, a njegova frekvencija je bila 6% što je u skladu sa podacima iz literature. Etnička pripadnost ima veliki uticaj na učestalost ovog polimorfizma. CYP3A5*1 alel ("wild-type") je prisutan kod prosečno 5-15% pripadnika bele rase, 45-73% Afričkih Amerikanaca, 15-35% Aziata i 25% Meksikanaca (Lamba JK i sar., 2002).

Statističkom analizom podataka, u ovoj studiji, nije pokazano da genotip CYP3A5*3 (rs776746) polimorfizma utiče na dnevnu dozu CsA, niti na odnose C_0/D i C_2/D , jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije. Nažalost u našoj grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom nije bilo nosioca "wild type" genotipa CYP3A5*3 (rs776746) polimorfizma, a heterozigotnih nosioca polimorfnog alela, tzv. CYP3A5 ekspresora je bilo samo 13%. Ostalih 87% pacijenata su bili CYP3A5 ne-ekspresori- tj. homozigotni nosioci polimorfnog alela. Nameće se značaj težnje ka

multicentričnim studijama kada želimo da ispitujemo farmakokinetiku imunosupresiva kod pedijatrijskih pacijenata u zavisnosti od genotipa ispitivanih SNP. Jedino tako ukupan broj ispitanika i broj ispitanika nosioca svakog genotipa ispitivanog polimorfizma, može biti adekvatan za statističku analizu, a rezultati dobijenog ispitivanja relevantni za donošenje ispravnih zaključaka, a sve u cilju boljeg lečenja i ishoda transplantacije organa najmlađih bolesnika. Zaključci ovako dizajniranih studija bi svakako doprineli manjoj pojavi neželjenih reakcija koje su u vezi sa upotrebom CNI, kao i manjoj učestalosti akutnih kriza odbacivanja u postransplantacionom toku.

Kada su izračunate prosečne vrednosti svih doza, odnosa C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije pokazano je da CYP3A5 ekspresori imaju statistički značajno manji odnos C_0/D u odnosu na CYP3A5 neekspresore, što je praćeno potrebom za većom dnevnom dozom leka kod CYP3A5 ekspresora, ali ovaj rezultat nije dostigao statističku značajnost. Multivarijantnom regresionom analizom u koju su uključeni svi faktori ispitani u ovoj studiji (uzrast i polimorfizme u genima za CYP3A4, CYP3A5, POR i ABCB1) potvrđen je nezavistan efekat genotipa sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma u genu za CYP3A5 na farmakokinetiku CsA tj. odnos ukupne C_0/D ($p=0,02$). Rezultati ove studije nisu pokazali očekivano manji ukupni odnos C_2/D kod CYP3A5 ekspresora. Moguće objašnjenje za ovaj rezultat je da u prva dva sata posle uzimanja leka, na metabolizam CsA, u velikoj meri utiče proces reapsorpcije CsA iz digestivnog trakta, a da enzimi CYP3A familije imaju veći udeo na metabolizam leka u kasnijem toku. Pokazano je da među brojnim faktorima, P-gp igra važnu ulogu u procesu reapsorpcije CsA (Lown KS i sar., 1997), što svakako ima veliki uticaj na odnos C_2/D leka u krvi.

Rezultati velikog broja studija, dostupnih u literaturi, koje su ispitivale uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA, su kontraverzni. Četiri studije su rađene kod pacijenata sa transplantiranim bubregom Kineske nacionalnosti. U sve četiri studije je uključen sličan broj pacijenata, takođe korišćeni su slični farmakokinetički parametri, a uticaj etničke pripadnosti na farmakokinetiku je isključen. Studija sa najvećim brojem pacijenata, 147, ukazala je na neočekivan rezultat tj. niži odnos $C_0/doza$ CsA kod homozigotnih i heterozigotnih nosioca CYP3A5*3 alela (Chu XM i sar., 2006). Druge dve studije su pokazale očekivane rezultate. Studija u koju su uključena 104 pacijenta sa

transplantiranim bubregom pokazala je da homozigotni i heterozigotni nosioci CYP3A5*1 alela imaju niži odnos C_0 /doza CsA nedelju dana nakon transplantacije (Hu YF i sar., 2006). Takođe, studija u koju su uključena 103 pacijenta sa transplantiranim bubregom pokazala je da homozigotni nosioci CYP3A5*3 alela imaju 26-31% viši odnos C_0 /doza CsA u krvi u odnosu na pacijente sa "wild type" genotipom (Qiu XY i sar., 2008). U četvrtu studiju je uključeno 137 pacijenata sa transplantiranim bubregom. Statistička analiza podataka nije ukazala na značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CsA (Zhao Y i sar., 2005). Do sličnih rezultata se došlo i u sledećim studijama: studije u koje su uključena 82 Azijata (Loh PT i sar., 2008), 106 pacijenata bele rase (Anglicheau D i sar., 2004) i etnički mešovita studija u koju je uključeno 110 pacijenata, od čega je 72 bilo bele rase, 20 crne rase i 18 azijata (Hesselink DA i sar., 2003), svi posle transplantacije bubrega.

Mali broj studija koji se bavio uticajem ovog polimorfizma na farmakokinetiku CNI kod dece je takođe sa kontradiktornim rezultatima. Deca sa transplantiranim srcem, CYP3A5 ekspresori zahtevali su veću dozu Tac, u cilju održavanja željenog nivoa leka u krvi, u poređenju sa CYP3A5 neekspresorima tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije (Zheng H i sar., 2003). Takođe, deca sa transplantiranim bubregom CYP3A5 ekspresori su imali brži klirens Tac u poređenju sa CYP3A5 neekspresorima (Zhao W i sar., 2009), kao i potrebu za većim dozom Tac, što je praćeno nižim odnosom Tac C/D (de Wildt SN i sar., 2011). Sa druge strane, Turolo S i sar., kod dece sa transplantiranim bubregom i Wildt i sar., kod dece sa transplantiranom jetrom, nisu ukazali na značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CNI (Turolo S i sar. 2010, de Wildt SN i sar., 2011).

Utvrđen je veliki broj SNP u genu za CYP3A4, preko 28. Do danas nije poznat SNP koji rezultira kompletnim gubitkom ekspresije ili funkcije CYP3A4 enzima. CYP3A4 je najzastupljeniji enzim u jetri koji pripada familiji P450, a odgovoran je za metabolizam 45-60% lekova koji se prepisuju od strane lekara. Postoji velika interindividualna razlika u ekspresiji CYP3A4 enzima, a u kojoj meri su genetski faktori za to odgovorni i dalje se istražuje (Elens (1) L i sar., 2011). Wang D i saradnici su pronašli nov SNP u intronu 6 gena za CYP3A4 (rs35599367, C>T) i ispitivali njegov uticaj na farmakokinetiku statina. Nivo CYP3A4 mRNA u jetri kao i aktivnost enzima

je bila 1,7-2,5 puta veća kod homozigotnih nosioca "wild type" genotipa u odnosu na homozigotne i heterozigotne nosioce polimorfnog alela. Shodno tome nosioci polimorfnog alela su zahtevali manju dozu leka (Wang D i sar., 2011).

Među 47 pedijatrijska pacijenata bele rase, sa transplantiranim bubregom, koji su uključeni u ovu studiju nije bilo, inače retkih, homozigotnih nosioca polimorfnog alela, a njegova frekvencija je bila 4% što je u skladu sa podacima iz literature. Učestalost polimorfnog alela CYP3A4 (rs35599367, C>T) polimorfizma u populaciji bele rase se procenjuje na 5-7 % (Elens L i sar., 2013).

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija kojom je ispitan uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA kod pedijatrijskih pacijenata. Statističkom analizom podataka nije pokazano da polimorfizam rs35599367 u genu za CYP3A4 utiče na dnevnu dozu leka, niti na odnose C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanest meseci nakon transplantacije bubrega. Nedostatak ove studije je svakako relativno mali broj uključenih pacijenata. Dalje, ne smemo izgubiti iz vida da u grupi ispitivanih pacijenata nije bilo homozigotnih nosioca ovog polimorfizma, a da su samo tri pacijenta bili heterozigotni nosioci polimorfnog alela. Međutim, obzirom na veoma mali broj studija koje se bave ispitivanjem farmakokinetike imunosupresiva kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim organom, a razlog tome je svakako mali broj ispitanika po centru, svaki rezultat je od izuzetne važnosti, a samo multicentrične studije, kojima treba da težimo mi koji se bavimo transplantacijom najmlađih pacijenata, mogu pomoći u donošenju definitivnih zaključaka vezano za ovu problematiku.

Prve studije koje su se bavile uticajem ovog polimorfizma na farmakokinetiku CNI su ukazale na njegov izuzetan značaj. Elens L i saradnici su pokazali da pacijenti sa transplantiranim bubregom, nosioci jednog ili dva T alela zahtevaju značajno niže doze Tac i CsA za postizanje adekvatne koncentracije leka u krvi u odnosu na nosioce CC genotipa (Elens L i sar., (1) 2011, Elens L i sar., (2) 2011). Druga grupa naučnika je utvrdila da nosioci CYP3A4*22 (polimorfnog) alela imaju 15% niži klirens CsA u odnosu na „wild-type” homozigote (Moes DJ i sar., 2014). Lunde I i sar. su potvrdili značaj ovog polimorfizma u pogledu farmakokinetike CNI. Pacijenti sa transplantiranim bubregom, nosioci CYP3A4*22 alela zahtevaju značajno manju dozu CsA za postizanje adekvatne vrednosti C_2 nivoa CsA u krvi. Univarijantna analiza je utvrdila da

CYP3A4*1/*22 heterozigoti imaju 50% veći odnos C_2/D u poređenju sa CYP3A4*1/*1 homozigotima. Multivarijantna analiza je potvrdila nezavistan efekat CYP3A4*22 alela na farmakokinetiku CsA sa 53% višim odnosom C_2/D kod nosioca varijantnog alela u poređenju sa nosiocima alela divljeg tipa („wild-type”). Prema ovom istraživanju CYP3A4*22 alel objašnjava prosečno 12% interindividualne varijabilnosti odnosa C_2/D CsA (Lunde I i sar., 2014). Iako je učestalost ovog genotipa u populaciji belaca mala, za pojedince nosioce ovog alela je od izuzetnog značaja. Gruba je procena da pacijenti primaoci transplantiranog bubrega, a koji su nosioci jednog ili dva CYP3A4*22 alela zahtevaju 50% manju dozu CsA za postizanje terapijskog cilja. Izenađujuće je da ova grupa naučnika, kod pacijenata na terapiji Tac, nije pronašla vezu između CYP3A4*22 alela i odnosa C_0/D (Lunde I i sar., 2014). Jedno od mogućih objašnjenja je to što su metabolički putevi razgradnje CsA i Tac, kao i enzimi koji učestvuju u njemu različiti. Dobro je poznato da se oksidacija CsA odvija pretežno preko CYP3A4 enzima, a Tac uz pomoć CYP3A5 enzima (Dai Y i sar 2004, Dai Y i sar., 2006). Svakako ne sme se izgubiti iz vida da izvesni metaboliti CsA nastaju pod dejstvom CYP3A5 enzima, a i brojne studije su potvrdile da CYP3A5*3(rs776746) SNP ima značajan uticaj na farmakokinetiku CsA (De Jonge H i sar., 2013, Falck P i sar., 2009, Dai Y i sar., 2006). Takođe ako se, konkretno, vratimo na studiju Lunde I i sar., ne treba zaboraviti da među 123 pacijenta sa transplantiranim bubregom, a koji su bili na terapiji Tac nije bilo CYP3A4*22 homozigota što svakako može uticati na dobijen rezultat (Lunde I i sar., 2014).

Kada govorimo o pedijatrijskim pacijentima, malo je ispitivan uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CNI. Gijsen VM i sar su potvrdili uticaj CYP3A4*22 polimorfizma na farmakokinetiku Tac kod dece. U studiju je uključeno 60 pacijenata, sa transplantiranim srcem. Nosioci bar jednog CYP3A4*22 alela zahtevali su 30% nižu dozu Tac u poređenju sa CYP3A4*1 homozigotima (Gijsen VM i sar., 2013).

POR gen lociran na 7 hromozomu kodira istoimeni enzim neophodan za funkcionisanje više od 50 enzima citohrom P450 familije. Ovaj enzim vrši oksidaciju tj. prenos elektrona sa NADPH na enzime CYP familije, što je preduslov za njihovu aktivaciju (Pandey AV i sar., 2014). POR gen je izrazito polimorfan, sa preko 40 opisanih SNP. Najviše proučavan SNP je 1508C>T (rs 1057868; POR*28) (Agrawal V

i sar., 2008, Huang N i sar., 2008). Jasna je veza ovog polimorfizma i povećane in vivo aktivnosti enzima CYP3A familije (Oneda B i sar., 2009, Elens L (2) i sar., 2013).

Među 47 pacijenata bele rase, dece sa transplantiranim bubregom, koji su uključeni u ovu studiju 42% je bilo homozigotnih nosioca "wild-type" genotipa, 45% heterozigotnih nosioca polimorfnog alela i 13% homozigotnih nosioca polimorfnog alela. Frekvencija POR*28 alela bila je 35%. Prema jednoj studiji koja je ispitivala učestalost polimorfnih alela POR gena, frekvencija POR*28 alela kod bele rase je bila 31% (Pandey AV i sar., 2014).

Rezultati ove studije, nisu pokazali da alel POR*28 (rs1057868) polimorfizma, utiče na dnevnu dozu leka, niti na odnose CsA C_0/D i C_2/D tokom prve godine nakon transplantacije. Međutim pedijatrijski pacijenti nosioci polimorfnog POR*28 alela su zahtevali veću dozu CsA, što je praćeno nižim odnosima C_2/D , u odnosu na homozigotne nosioce "wild type" alela, ali ti rezultati nisu dostigli statističku značajnost. Takođe, multivarijantna regresiona analiza u koju su uključeni faktori ispitivani u ovoj studiji (uzrast i polimorfizme u genima za CYP3A4, CYP3A5, POR i ABCB1) je ukazala na značajan efekat POR*28 polimorfizma u genu za POR na ukupnu dnevnu dozu leka i njegov značajan efekat na ukupni odnos $C_2/doza$. Takođe, ispitivanjem raspodele pacijenata koji su primali dozu CsA $< 4\text{mg/kgTT}$ i $> 6\text{mg/kgTT}$ u odnosu na prisustvo polimorfnog alela polimorfizma rs1057868 u genu za POR utvrđeno je da u grupi pacijenata nosioca polimorfnog alela statistički značajno je više onih koji su primali dozu CsA $> 6\text{mg/kgTT}$, što navodi na zaključak da ovi pacijenti imaju pojačanu aktivnost CYP3A familije enzima.

Elens L i sar. su prvo razmatrali uticaj ovog polimorfizma nezavisno od polimorfizama CYP3A4 i CYP3A5 gena kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji Tac i CsA. Nisu ukazali na njegov značaj u pogledu farmakokinetike Tac. Pacijenti na terapiji CsA homozigotni nosioci polimorfnog alela su imali 15,1% manji odnos C_0/D u poređenju sa heterozigotnim nosiocima polimorfnog alela i homozigotnim nosiocima wild-type alela (Elens L (2) i sar., 2013). Lunde i sar. su takođe, ispitivali uticaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CsA i Tac kod adultnih pacijenata sa transplantiranim bubregom. Pokazano je da postoji tendencija ka nižim vrednostima odnosa C/D kod pacijenata na terapiji Tac nosioca bar jednog polimorfnog POR*28

alela u odnosu na homozigotne nosioce „wild-type” genotipa. Nije pokazano da POR*28 alel ima statistički značajan uticaj na odnos CsA C₂/D. Značaj ovog polimorfizma na farmakokinetiku CNI pokazana je u kombinaciji sa SNP CYP3A5 gena (De Jonge H i sar., 2011). Naime CYP3A5 ekspresori nosioci jednog ili dva POR*28 alela su zahtevali veću dozu Tac u poređenju sa CYP3A5 ekspresorima koji nisu bili nosioci POR*28 alela.

Iako se u ovom radu bavilo uticajem nekoliko genetskih faktora na farmakokinetiku CNI, ne treba zaboraviti da oni imaju uticaj na metabolizam gotovo svih lekova koji se koriste neposredno, pre i posle transplantacije od čega direktno zavisi i njen ishod (Medeiros M i sar., 2015). Tako npr. odgovor pojedinaca na kortikosteroide je različit, a to je jednim delom uslovljeno genetskim varijacijama u signalnim putevima, prvenstveno receptora za ove lekove, koje kodira NR3C1 gen (Koper J i sar., 2014). Izvesne genetske varijacije su udružene sa povećanom (rs41423247, rs6195) ili smanjenom (rs6189, rs6190, rs6198) osetljivošću na kortikosteroide. Azathioprin se tokom poslednje decenije retko koristi u inicijalnim protokolima za transplantaciju bubrega. Njegovo mesto zauzeo je Mycophenolat mofetil. Međutim, u slučaju neželjenih efekata Mycophenolat mofetila, Azathioprin je lek izbora. Ovaj lek se nakon unosa, serijom enzimskih reakcija pretvara u aktivnu formu. Enzim tiopurin-metiltransferaza (TPMT) inaktivira višak aktivne forme leka spečavajući njegovo mijelosupresivno dejstvo. SNP gena odgovornog za ekspresiju TPMT odgovorni su za smanjenu aktivnost ili odsustvo aktivnosti ovog enzima. Prosečno 0,3-1% pacijenata koji uzimaju ovaj lek su homozigoti za jedan od SNP enzima TPMT. Ti pacijenti imaju veliki rizik za mijelosupresiju. Preko 95% homozigota ima jedan od sledećih SNP ovog gena: TMPT*2 (238 G>C, rs1800462), TMPT3*A (460G>A rs1800460; 719A>G rs1142345), TMP*3C (719A>G rs1142345), TMPT*8 (644G>A rs56161402) (Roberts RL i sar 2014). Lek Mycophenolat mofetil izaziva brojne neželjene reakcije kao što su leukopenija, anemija, gastrointestinalne tegobe. Brojni SNP su udruženi sa rizikom od ovih neželjenih reakcija (Jacobson PA i sar 2011).

Pre više od 100 godina dr Abraham Jacobi, otac američke pedijatrije, prepoznao je značaj proučavanja farmakoterapije (kliničke farmakologije) kod dece nezavisno u

odnosu na odrasle rekavši da se pedijatrija ne bavi minijaturnim muškarcima i ženama, te stoga prosto smanjenje doze leka u zavisnosti od veličine tela pacijenta nije dovoljno za uspešno lečene najmlađe populacije.

Međutim, čak i danas doze lekova, kao i ciljna koncentracija imunosupresivnog leka u krvi su najčešće ekstrapolisane na osnovu informacija poznatih za adultne pacijente, uprkos tome što se neki lekovi, kao što je azathioprin, decenijama koristi kod dece (Frattarelli DA i sar., 2014). Netačno doziranje leka na osnovu formulacije za odrasle pacijente je čest izvor greške kod najmlađih pacijenata (Ali A i sar., 2014).

Detaljno razumevanje farmakokinetike specifičnosti imunosupresivnih lekova kod najmlađe populacije pacijenata, uslovljeno biološkim sazrevanjem dečjeg organizma, je od izuzetne važnosti. Ne treba zaboraviti da će oni biti na terapiji ovim lekovima praktično čitav život (del Mar Fernandez i sar., 2002).

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da mlađi pacijenti (uzrast do 6 godina) zahtevaju statistički značajno veću dozu CsA, za postizanje adekvatnih nivoa leka u krvi, jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije, što je praćeno statistički značajno manjim odnosom C_0/D jedan, tri i šest meseci posle transplantacije i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije, u odnosu na grupu starijih pacijenata (> 6 godina). Odnos C_0/D godinu dana nakon transplantacije je takođe manji kod mlađih pacijenata uzrasta do 6 godina, u odnosu na starije pacijente, ali ovaj rezultat nije statistički značajan. Kada je izračunata prosečna vrednost svih doza CsA i odnosa C_0/D i C_2/D jedan, tri, šest i dvanaest meseci posle transplantacije, takođe je primećeno da mlađi pacijenti uzrasta do 6 godina zahtevaju značajno manju dozu leka u odnosu na starije pacijente. Takođe grupa mlađih pacijenata je imala značajno manji odnos C_0/D i C_2/D u odnosu na stariju grupu. Multivarijantna regresiona analiza u koju su uključeni svi faktori ispitani u ovoj studiji (uzrast i polimorfizme u genima za CYP3A4, CYP3A5, POR i ABCB1) je potvrdila da uzrast pacijenta, sa graničnom vrednošću od 6 godina, predstavlja nezavistan značajan faktor koji utiče na dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa podacima iz literature. Odavno se zna da pedijatrijski pacijenti sa transplantiranom jetrom, bubregom ili matičnim ćelijama eritropoeze zahtevaju veću dozu CNI, u odnosu na adulte, za postizanje

adekvatne koncentracije leka u krvi (Cooney GF i sar., 1997, Staatez CE i Tett SE, 2004). Unutar populacije pedijatrijskih pacijenata, takođe, je dokazano da uzrast pacijenta utiče na farmakokinetiku ove grupe lekova. Dokazan je viši klirens Tac kod dece mlađe od 6 godina posle transplantacije jetre, bubrega i matičnih ćelija hematopoeze (Przepiorka D i sar., 2000, Kim JS i sar., 2005, MacFarlane GD i sar., 2001, Jain AB i sar., 1991). Fanta i sar. su zaključili da pacijenti do 8 godina zahtevaju 25% veću dozu CsA u cilju održavanja adekvatne koncentracije leka u krvi u poređenju sa starijim pedijatrijskim pacijentima (Fanta S i sar., 2007). Mochon M i sar su pokazali da je klirens CsA kod pacijenata, posle transplantacije bubrega, uzrasta 2-5 godina viši, što je zahtevalo i veću dozu leka, u odnosu na pacijente uzrasta preko 10 godina (Mochon M i sar., 1996). Razlozi za ove podatke nisu u potpunosti jasni, ali svakako da proces maturacije tj. biološkog razvoja malog deteta igra veliku ulogu. Rast tela čoveka nije linearan proces. Uzrasno zavisne promene u funkciji organa su dinamične tokom prve decenije života. Danas se najčešće doza leka za dete određuje uz pomoć telesne težine (TT) ili telesne površine (TP). Međutim, smatra se da je ovaj način pogodan za otpočinjanje terapije, a da je za dugotrajno lečenje ili terapiju održavanja neophodan individualan pristup na osnovu razvojnih specifičnosti vezanih za farmakokinetiku i farmakodinamiku (Kearns GL i sar., 2003). Izmene brojnih fizioloških parametara tokom rasta i razvoja utiču na metabolizam lekova: pH u želucu, vreme potrebno za pražnjenje želuca, vreme tranzita hrane kroz creva, procenat masti i vode u sastavu organizma, koncentracija proteina u plazmi, kao i nezrelost bubrega tj. procesa glomerulske filtracije, tubulske sekrecije i reapsorpcije odojčeta i malog deteta (Lu H i Rosenbaum S., 2014, Fernandez E i sar., 2011, Yokoi T i sar., 2009). Odojčad i mala deca imaju visok pH u želucu. To može imati protektivan efekat na acidolabilne lekove, čime se, može objasniti bolja biorasploživost beta-laktamskih antibiotika u ovom uzrast (Huang NN i High RH., 1953). Biorasploživost lekova koji su slabe kiseline, kao što su fenobarbiton, fenitoin, acetaminofen je smanjena (Albani M i Wernicke I., 1983), a slabih baza, Penicillina G, Ampicilina, povećana (Bartelnik IH i sar 2006). Vreme potrebno za pražnjenje želuca i motilitet creva su od izuzetnog značaja za proces apsorpcije leka iz tankog creva. Vreme pražnjenja želuca je sporije kod male dece u odnosu na adulte. Time se može objasniti odložena reapsorbicaja oralno primenjenog fenobarbitona, sulfonamida, digoksina (Heimann G., 1980). Takođe, smanjena

apsorpciona površina creva, kao i brži tranzit kroz creva su odgovorni za manju bioraspoloživost lekova kod najmlađih pacijenata (Lu H i Rosenbaum S., 2014). Dalje, smanjena sekrecija i aktivnost žuči i pankreasnih enzima smanjuju reapsorpciju lipofilnih lekova, kao što je eritromicin (Kearns GL i Read MD., 1989). Volumen distribucije (Vd) predstavlja odnos ukupne količine leka u telu i njegove koncentracije u plazmi (Lu H i Rosenbaum S., 2014). Veliki Vd (koncentracija leka u plazmi je relativno niska za određenu količinu leka u telu) ukazuje na veliku distribuciju leka u tkiva. Mali Vd (koncentracija leka u plazmi je relativno visoka za određenu količinu leka u telu) ukazuje na manju distribuciju leka iz plazme u tkiva, a razlog tome može biti vezanost leka za proteine plazme. Procenat vode u sastavu tela čoveka opada sa godinama, a procenat masti raste. Na rođenju voda čini i do 80% TT, u uzrastu od godinu dana 60%, a u adultnom dobu 50%. Sa druge strane, kod terminskog novorođenčeta masti čine 12% TT, a u adultnom dobu 18% TT. U zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika leka ove maturacione promene utiču na Vd (Yokoi T i sar., 2009). Jedinjenja rastvorljiva u vodi, kao što je gentamicin, imaju veliki Vd u novorođenčadi u odnosu na odrasle. Vd gentamicina kod novorođenčeta je 0,5 l/kg, a kod odraslih 0,25-0,3 l/kg. Zbog toga je potrebna veća doza leka u mg/kgTT kod novorođenčeta u odnosu na adulte (Echeverria P i sar., 1975). Sa druge strane lipofilni lekovi kao što je diazepam imaju manji Vd kod odojčadi u odnosu na stariju decu i odrasle (Moraselli PL., 1976). Koncentracija proteina u serumu je niža kod odojčadi, što doprinosi manjoj vezanosti leka za proteine plazme. Stepem vezivanja leka, koji je kiselina, za proteine plazme, dostiže adultni nivo u uzrastu od godinu dana, a za lekove koji su baze, u uzrastu od 4 godine (Yokoi T i sar., 2009). Proces izlučivanja lekova putem bubrega zavisi od tri procesa, glomerulske filtracije, tubulske sekrecije i tubulske reapsorpcije. Na rođenju kod terminskog novorođenčeta glomerulska filtracija je jako niska (2-4 ml/min), a dostiže adultni nivo (120 ml/min) u 8 mesecu života (Yokoi T i sar., 2009). Sekretorni kapacitet tubula raste u prvim mesecima života i dostiže adultni nivo u uzrastu od 7 meseci, dok proces maturacije tubula u pogledu reapsorpcije se završava do treće godine života (Fernandez E i sar., 2011).

Razvojne promene u aktivnosti transportera lekova i enzima koji učestvuju u njihovom metabolizmu su sledeći faktor od značaja za bioraspoloživost lekova kod mlađe dece. Malo se zna o ontogenezi P-gp, glavnog kontratransportera lekova u

digestivnom traktu, ali sigurno i to utiče na metabolizam lekova kod dece. Jedna grupa naučnika nije ukazala na uticaj uzrasta tj. biološkog razvoja, na ekspresiju ABCB1 mRNA u sluzokoži duodenuma (Fakhoury M i sar., 2005). Sa druge strane, studija, rađena na miševima, je utvrdila porast ekspresije P-gp u mozgu sa biološkom postnatalnom maturacijom (Tsai CE i sar., 2002). Lam J i saradnici su našli da je ekspresija P-gp u krvnomoždanoj barijeri minimalna kod neonatusa na rođenju i da raste sa postnatalnom maturacijom (Lam J i sar., 2015). Rezultati jedne studije su ukazali na izuzetno malu ekspresiju P-gp u crevima neonatusa. Dalje ekspresija raste sa godinama i maksimalni nivo dostiže od 15-38 godine života, da bi potom opadala do 50% adultnih vrednosti kod starijih osoba (67-85 godina života) (Miki Y i sar., 2005). Nažalost, klinički značaj razvojnih promena u ekspresiji i funkciji P-gp još uvek nije ispitivan. Podaci o ontogenezi CYP3A4, CYP3A5 enzima su oskudni. Odojče ima najveći metabolički kapacitet, što može zahtevati veće doze leka (Sage D i sar., 2014). Glavni jetrin enzim koji učestvuje u procesu biotransformacije lekova na rođenju je CYP3A7. Ekspresija ovog enzima opada sa vremenom tokom prvih šest meseci života, dok nivo CYP3A4 enzima dostiže adultni nivo posle prve godine života (Hines RN 2008). Brojni radovi su pokazali da mlađa deca brže metabolišu lekove, što se dovodi u vezu sa većim stepenom aktivnosti CYP3A enzima jetre u ovoj starosnoj dobi (Przepiorka D i sar., 2000, Kim JS i sar., 2005, MacFarlane GD i sar., 2001, Jain AB i sar., 1991). Klirens intravenski primenjenog midazolama prvenstveno zavisi od aktivnosti jetrinih enzima CYP3A4 i CYP3A5. Dokazan je porast klirensa midazolama od 1,2 do 9 ml/min/kg TT tokom prva tri meseca života (de Wildt i sar., 1999). Takođe klirens karbamazepina iz plazme prvenstveno zavisi od CYP3A4 jetrinog enzima (Kerr BM i sar., 1994) i veći je kod dece nego kod odraslih (Riva R i sar., 1985) što zahteva veće doze leka po kg TT kod dece u cilju postizanja adekvatne koncentracije leka u plazmi. Kao mogući uzrok navodi se i veličina jetre deteta ispod šest godina u odnosu na njegovu telesnu površinu (Kearns GL i sar., 2003). Jetra čini 5% TT na rođenju, a samo 2% TT u adultnom dobu (Benedetti MS i sar., 2007). Slično razvojnim promenama u jetri, enzimski sistem creva, takođe, podleže maturacionim izmenama, ali su dodatne studije u cilju ove potvrde neophodne (Hines RN, 2008). Gibbs JP I sar. su dokazali povećanu aktivnost glutathion S transferaze u enterocitima male dece (uzrast 1-3

godine) u odnosu na stariju decu (uzrast 9-17 godina), što može biti uzrok smanjene bioraspoloživosti izvesnih lekova kod mladih pacijenata (Gibbs JP I sar., 2005).

Svakako ne treba izgubiti iz vida da i brojni drugi spoljni faktori kao što su navike u ishrani i interakcije među lekovima mogu delovati na farmakokinetiku. Recimo, dobro je poznato da su mnogi supstrati P-gp i njegovi potentni inhibitori (blokatori kalcijumskih kanala, imunosupresivi, inhibitori protein kinaze) (LI YH i sar., 2006). Klinička studija je pokazala da istovremeno davanje digoksina koji je supstrat P-gp sa gvanidinom, njegovim inhibitorom povećava koncentraciju digoksina u serumu (Doering W, 1979). Sa druge strane, Rifampicin, jedan od dobro poznatih suptrata P-gp je i njegov induktor, što smanjuje koncentraciju digoksina u serumu (Greiner B i sar., 1999). Važnost ovih fenomena je u tome što nam razjašnjava mehanizme interakcije među lekovima u slučaju njihove istovremene primene (Lin JH., 2003). Kada govorimo o navikama u ishrani, npr., odavno je poznato da sok od grejpfruta znatno usporava metabolizam CsA inhibirajući citohrom P450 enzime jetre i creva, što je razlog povećanja koncentracije leka u krvi (Hollander AA i sar., 1995). U našoj populaciji pacijenata, kao deo naše kliničke prakse, vršili smo striktan monitoring svih lekova koje su pili pacijenti, svodeći na minimum mogućnost interakcije među lekovima. Takođe, upozoravali smo ih na hranu koja može uticati, bilo kao induktor, ili supresor, na farmakokinetiku ove grupe lekova, svodeći na minimum dijetetske navike kao mogući faktor uticaja na farmakokinetiku CNI.

I na kraju, ali ne manje bitno, izvestan broj studija je ukazao na značaj farmakogenetskih ispitivanja kod dece u kontekstu biološkog razvoja (Fanta S i sar., 2001, de Wildt SN i sar., 2011, Gijesen V i sar., 2011).

Ovo je prva farmakogenetska studija koja je ispitala uticaj CYP3A5*3 (rs776746), CYP3A4*22 (rs 35599367), ABCB1 3435 i POR*28 (rs1057868) polimorfizama na dozu CsA, odnose C_0/D i C_2/D u zavisnosti od uzrasta dece sa transplantiranim bubregom. Naši rezultati ukazuju da nosioci CYP3A*3 alela uzrasta do šest godina zahtevaju veću dozu CsA u odnosu na nosioce CYP3A5*3 alela uzrasta preko šest godina, a u cilju postizanja adekvatne koncentracije leka u krvi, što je praćeno nižim odnosom C_0/D i C_2/D . Kod pacijenata koji su CYP3A5 ekspresori nismo pokazali da uzrast utiče ni na jedan, gore ispitivan parameter. Takođe je pokazano da

nosioci POR*28 alela uzrasta do šest godina zahtevaju veću dozu CsA tri, šest i dvanest meseci posle transplantacije, što je praćeno statistički značajno nižim odnosom C_0/D tri i šest meseci posle transplantacije i nižim odnosom C_2/D jedan, tri i šest meseci posle transplantacije, u poređenju sa nosiocima POR*28 alela uzrasta preko 6 godina. Ovi rezultati, na indirektan način, mogu ukazati da POR*28 alel uzrokuje ubrzanje metabolizma CsA, posredsvom, prvenstveno, CYP3A4, a ne CYP3A5 enzima. Već smo istakli, da je metabolizam CsA pod većim uticajem CYP3A4 nego CYP3A5 enzima. Tri primarna metabolita tj. produkta biotransformacije CsA su AM1, AM9 i AM4N. CYP3A4 enzim katalizuje formiranje sva tri primarna metabolite CsA, dok je samo AM9 delom produkt metabolizma i CYP3A5 enzima (Dai Y i sar 2004). Svakako, veliko ograničenje ove studije je niska frekvenca CYP3A4*22 alela u ispitivanom uzorku, što je onemogućilo analizu uticaja ovog polimorfizma samostalno i u kombinaciji sa uzrastom i drugim polimorfizmima na farmakokinetiku CsA. Stoga, neke zaključke možemo izvesti jedino indirektno. Drugi nedostatak je relativno mali broj pacijenata uključenih u istraživanje što je uobičajeno ograničenje ovakvih studija svuda u svetu, i ponovo sugeriše na potrebu za multicentričnim pristupom.

Dalje je pokazano da nosioci "wild-type" alela ABCB1 3435 polimorfizma, homozigoti i heterozigoti, uzrasta do šest godina zahtevaju statistički značajno veću dozu CsA, što je praćeno nižim odnosom C_0/D jedan, tri i šest meseci posle transplantacije bubrega i nižim odnosom C_2/D jedan, tri, šest i dvanest meseci posle transplantacije, u odnosu na decu uzrasta preko šest godina sa istim genotipom. Takođe je i odnos C_0/D dvanest meseci posle transplantacije bio niži kod mlađih nosioca "wild-type" alela u odnosu na grupu starije dece sa istim genotipom, ali ovaj rezultat nije dostigao statističku značajnost. Iako se malo zna o uticaju ontogeneze na P-gp, očigledno je da u nosioca bar jednog funkcionalnog alela, biološki razvoj tj. maturacija P-gp igra veliku ulogu u reapsorpciji CsA i njegovom metabolizmu. Sa druge strane kod homozigotnih nosioca varijantnog alela ovog polimorfizma uzrast ne utiče na dozu leka niti na odnose C_0/D i C_2/D što je i shvatljivo obzirom da nemaju funkcionalni alel, tako da je funkcija P-gp inače minimalna. Svakako ne smemo zaboraviti da je metabolizam CsA posredovan i CYP3A enzimima u jetri, na čiju ekspresiju i funkcionalnost značajno utiče biološki razvoj, shodno čemu je verovatno da, uz ostale faktore, kombinovani

efekat SNP gena odgovornog za sintezu P-gp i SNP gena CYP3A familije enzima, zajedno doprinose specifičnom metabolizmu imunosupresiva kod najmlađih pacijenata.

Pošto je pokazano da uzrast kao nezavistan faktor utiče na sve farmakokinetiske parametre ispitane u ovoj studiji (doza leka, C_0/D i C_2/D) urađena je multivarijantna regresiona analiza ispitivanih polimorfizama u ciljanim genima kod pacijenata uzrasta preko šest godina i mlađih. Ukazali smo na nezavistan značajan efekat genotipova sa alelom POR*28 polimorfizma u genu za POR, genotipova sa alelom T polimorfizma u genu za ABCB1 i genotipova sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma u genu za CYP3A5 na ukupni odnos C_2/D kod dece uzrasta do šest godina.

Prema podacima iz literature Fanta i sar. su prvi ukazali na značaj ispitivanja SNP ABCB1 gena u zavisnosti od uzrasta. Grupa dece uzrasta preko osam godina, sa TBI, na programu hronične PD, nosioci varijantnog alela ABCB1 1236C>T i ABCB1 2677G>T SNP, imali su 1,5 puta veću bioraspoloživost peroralno unetog CsA u odnosu na homozigotne nosioce "wild-type" genotipa. Ova povezanost nije nađena u grupi dece mlađe od osam godina (Fanta S i sar., 2001). Gijesen i sar. su pokazali da CYP3A5 ekspresori uzrasta ispod šest godina sa transplantiranim srcem, zahtevaju 1,5 puta veću dozu Tac u odnosu na grupu starije dece sa istim genotipom (Gijesen V i sar., 2011). U istom radu je pokazano da mlađa grupa CYP3A5 neekspresora zahteva 1,5 puta veću dozu Tac u odnosu na grupu starijih pacijenata sa istim genotipom, kao i da CYP3A5 ekspresori mlađi od šest godina zahtevaju tri puta veću dozu Tac u odnosu na CYP3A5 neekspresore starije od šest godina (Gijesen V i sar., 2011). Takođe, de Wildt i sar. su zaključili da deca mlađa od pet godina sa transplantiranim bubregom, CYP3A5 ekspresori, zahtevaju veću dozu Tac u odnosu na stariju decu sa istim genotipom (de Wildt SN i sar., 2011).

Imajući u vidu gore navedeno, od izuzetnog značaja su studije koje ispituju uticaj genetskih polimorfizama na farmakokinetiku CNI u kontekstu biološkog razvoja deteta, tj. u zavisnosti od uzrasta pacijenta.

Na kraju možemo zaključiti da uzrast deteta, kao i alelne varijante ispitanih polimorfizama u genima za POR, CYP3A5 i ABCB1 su značajno i nezavisno asocirani sa farmakokinetikom CsA kod pedijatrijskih pacijenata nakon transplantacije bubrega.

Rezultati ove studije svakako zahtevaju proveru na većem uzorku, što je moguće jedino u velikim multicentričnim studijama. U cilju boljeg prilagođavanja terapije svakom pacijentu navedene faktore treba uzeti u obzir kao značajne modulatore terapijskog odgovora.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji, doneti su sledeći zaključci :

1. Frekvencije alela i genotipova polimorfizama u genima za
 - ABCB1 (rs1045642)
 - ✓ alel C (0,52), T (0,48)
 - ✓ genotip CC (26%), CT (53%), TT (21%)
 - CYP3A5 (rs776746)
 - ✓ alel *1 (0,06), *3 (0,94)
 - ✓ genotip *1/*1 (0%), *1/*3 (13%), *3/*3 (87%)
 - CYP3A4 (rs35599367)
 - ✓ alel *1 (0,96), *22 (0,4%)
 - ✓ genotip *1/*1 (94%), *1/*22 (6%), *22/*22 (0%)
 - POR (rs1057868)
 - ✓ alel *1 (0,65), *28 (0,35)
 - ✓ genotip *1/*1 (42%), *1*28 (45%), *28/*28 (13%)

kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom u Srbiji su u skladu sa frekvencijama u ostalim populacijama u Evropi.

2. Utvrđeno je da uzrast pedijatrijskih pacijenata, sa graničnom vrednošću od 6 godina, predstavlja nezavistan značajan faktor koji utiče na dozu CsA, odnos C_0/D i C_2/D
3. Utvrđeno je da polimorfizmi u genu za ABCB1 (rs1045642) i POR (rs1057868) utiču na raspodelu pacijenata u zavisnosti od doze CsA
 - nosioci polimorfnog alela T u genu za ABCB1 (rs1045642) statistički značajno češće primaju dozu CsA <4 mg/kgTT u odnosu na homozigote alela C.
 - Nosioci polimorfnog alela *28 u genu za POR (rs1057868) statistički značajno češće primaju dozu CsA >6 mg/kgTT u odnosu na homozigote alela *1.

Utvrđeno je da polimorfizam u genu za CYP3A5 (rs776746) značajno utiče na odnos ukupne C_0/D

- Pedijatrijski pacijenti sa genotipom *3/*3 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 (neekspresori) su imali značajno veće ukupne C_0/D u odnosu na grupu dece CYP3A5 ekspresora (genotip *1/*3).

Utvrđen je nezavistan značajan obrnuto proporcionalan efekat uzrasta i značajan efekat POR*28 polimorfizma na ukupnu dnevnu dozu CsA.

Utvrđen je nezavistan značajan proporcionalan efekat uzrasta i značajan efekat genotipa sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 na ukupni odnos C_0/D .

Utvrđen je nezavistan značajan proporcionalan efekat uzrasta i značajan efekat genotipa sa alelom POR*28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR na ukupni odnos C_2/D .

4. Utvrđen je nezavistan značajan efekat genotipova sa alelom POR*28 polimorfizma rs1057868 u genu za POR, genotipova sa alelom T polimorfizma rs1045642 u genu za ABCB1, i genotipova sa alelom CYP3A5*1 polimorfizma rs776746 u genu za CYP3A5 na ukupni odnos C_2/D kod dece mlađe od 6 godina.

7. LITERATURA

Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, et al. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet Genomics*. 2010; 20:611–618.

Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18:569–576.

Albani M, Wernicke I. Oral phenytoin in infancy: dose requirement, absorption, and elimination. *Pediatr Pharmacol (New York)*. 1983;3:229-36.

Ali AA, Charoo NA, Abdallah DB. Pediatric drug development: formulation considerations. *Drug.Dev.Ind.Pharm*. 2014; 40:1283–1299.

Allian FH, Gubser CC, Howe PW, Nagai K et al. Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature*, 1996, 380:646-650.

Allain-Launay E, Roussey-Kesler G, Ranchin B, Guest G, Maisin A, Novo R, et al. Mortality in pediatric renal transplantation: a study of the French pediatric kidney database. *Pediatr Transplant* 2009; 13:725–30

Al Khasawneh E, Araya CE, Dharnidharka VR. Missed viral surveillance testing visits associate with full blown viral diseases in children receiving kidney transplants. *Pediatr Transplant* 2013; 17:129-32.

Amirimani B, Walker AH, Weber BL, et al. Response: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(18): 1588-90

Amirimani B, Ning B, Deitz AC, et al. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42 (4): 299-305

Amayaw MM, Regaterio F, Li T, Liu X et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001, 11:217-221.

Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003, 22:7468-7485.

dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 1889-1896.

Ando Y, Tateishi T, Sekido V, et al. Re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (18): 1587-90

Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(7):1889-96.

Anglicheau D, Thervet E, Etienne L et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75 (5): 422-33

Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant* 2004; 4(6):937-45.

Azarpira N, Aghdaie MH, Behzad-Behbahanie A, et al. Association between cyclosporine concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 during the early stage after renal transplantation. *Exp Clin Transplant* 2006; 4(1): 416-9

Balarm C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: Phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003, 56: 78-83.

Ball SE, Scatina J, Kao J, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66 (3): 288-94

Bandur S, Petrasek J, Hribova P, et al. Haplotype structure of ABCBI/MDRI gene modifies the risk of acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86(9): 1206-13

Bartelink IH, Rademaker CM, Schobben AF, van den Anker JN. Guidelines on paediatric dosing on the basis of developmental physiology and pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:1077-97.

Bell LE, Bartosh SM, Davis CL, et al. Adolescent transition to adult care in solid organ transplantation: a consensus conference report. *Am J Transplant* 2008;8:2230-42

Benedetti MS, Whomsley R, Canning M. Drug metabolism in the pediatric population and in the elderly. *Drug Discov. Today* 2007; 12: 599-610

Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in Spanish population. *Ther Drug Monit* 2003, 25: 107-111.

Bismuth H, Samuel D, Neuhaus P, et al. Focus on intractable rejection: 6-month results of the European multicentre liver study of FK 506 and cyclosporin A. *Transpl Int* 1994;7 (Suppl. 1):S3–6.

Bjorkman S. Prediction of cytochrome p450-mediated hepatic drug clearance in neonates, infants and children: how accurate are available scaling methods? *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(1): 1 -11

Bonhomme-Faivre L, Dcvocelle A, Saliba F, et al. MDR-1 C3435T polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation* 2004: 78 (I): 21-5

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6(4):468–75

Brugnoni D, Airò P, Graf D, et al. Ontogeny of CD40L expression by activated peripheral blood lymphocytes in humans. *Immunol Lett* 1996;49:27-30.

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005;5:582-94

Brugnoni D, Airo P, Graf D, Marconi M, Molinari C, Braga D, et al. Ontogeny of CD40L expression by activated peripheral blood lymphocytes in humans. *Immunol. Lett.* 1996; 49: 27–30

Calne RY, White DJG. Cyclosporin A—a powerful immunosuppressant in dogs with renal allografts. *IRCS Med Sci* 1977; 5:595.

Calne RY. The rejection of renal homografts. Inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet* 1960; 1:417–8.

Calne RY, Murray JE. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by Burroughs Wellcome 57–322. *Surgical Forum* 1961; 12:118–20.

Calne RY. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues. *Transplant Bull* 1961;28(2):445–61.

Cattaneo D, Vinks AA. Optimizing immunosuppressive drug dosing in pediatric renal transplantation. Part of a special series on Paediatric Pharmacology, guest edited by Gianvincenzo Zuccotti, Emilio Clementi, and Massimo Molteni. *Pharmacol Res.* 2012; 65(2):163-7.

Casorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(201):261-83.

Chiba Y, Higashidate Y, Suga K, Honjo K, Tsutsumi H, Ogra PL. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J Med Virol* 1989;28:133-9.

Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung Y., et al. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; 13 (2): 89-95

Chu XM, Hao HP, Wang GJ. et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on cyclosporine A metabolism and elimination in Chinese renal transplant recipients. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27 (11): 1504-8

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 695-698

Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S. Lack of association between the C3435T MDR1 polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations. *Gastroenterology* 2003, 125:1919-1920.

Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, et al. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 1981;32(6):535–9.

Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos* 2006; 34 (5): 836-47

Dai Y, Iwanage K, Lin YS et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004; 68 (9): 1889-902

De Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Impact of CYP3A5 genotype on tacrolimus versus midazolam clearance in renal transplant recipients: new insights in CYP3A5-mediated drug metabolism. *Pharmacogenomics* 2013;14(12):1467–1480.

De Jonge H, Metalidis C, Naesens M, et al. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011;12:1281–1291

Del Mar Fernández De Gatta M. Santos-Buelga D. Dominguez-Gil A, et al. Immunosuppressive therapy for paediatric transplant patients: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(2):15-35

Dharnidharka VR, Stevens G, Howard RJ. En-bloc kidney transplantation in the United states: an analysis of United Network of Organ Sharing (UNOS) data from 1987 to 2003. *Am J Transplant* 2005;5: 1513-7.

DharnidharkaVR,FiorinaP,HarmonWE. Kidney transplantation in children. *N.Engl.J.Med.* 2014;371: 549–558

Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* 2009;87:1019-26.

Dharnidharka VR (1), Martz KL, Stablein DM, Benfield MR. Improved survival with recent post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) in children with kidney transplants. *Am J Transplant* 2011;11:751-8.

Dharnidharka VR, Araya CE, Wadsworth CS, McKinney MC, Howard RJ. Assessing the value of ureteral stent placement in pediatric kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008;85:986-91

Dharnidharka VR (2), Abdunour HA, Araya CE. The BK virus in renal transplant recipients — review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatr Nephrol* 2011;26:1763-74.

Dobbels F, Ruppert T, De Geest S, Decorte A, Van Damme-Lombaerts R, Fine RN. Adherence to the immunosuppressive regimen in pediatric kidney transplant recipients: a systematic review. *Pediatr Transplant* 2010;14:603-13

Doering W. Quinidine-digoxin interaction: Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications. *N Engl J Med* 1979;301(8): 400-404

Dorshkind K (2), Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 57–62.

Dorshkind K (1), Swain S. Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr. Opin. Immunol.* 2009,21, 404–407

Drozdik M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2003, 13: 259-263.

Eidelman BH, Abu-Elmagd K, Wilson J, et al. Neurologic complications of FK 506. *Transplant Proc* 1991;23(6):3175–8.

Efferth T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med*, 2001;1: 45-65

Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J Biol Chem* 1951;192(2):505–18.

Elens L (1), Boumar R, Hesselink DA, Haufroid V et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clinical Chemistry* 2011;57:1574-1583.

Elens L (2), Schaik RH, Panin N, Mayer M, Wallemacq P et al. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Summary pharmacogenomics* 2011;12:1383-1396.

Elens L, Hesselink DA, Boumar R, et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2014;36:71-79.

Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* 2013; 14 (1):47-62

Elens L (2), Nieuweboer AJ, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, van Gelder T, Mathijssen RH, van Schaik RH. Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(3):148-55.

Evans WE, MCLeod HL. Pharmacogenomics: drug disposition, drug targets and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348 (6): 538-49

Fakhoury M, Litalien C, Medard Y i sar. Localization and mRNA expression of CYP3A and P-glycoprotein in human duodenum as a function of age. *Drug. Metab.Dispos*. 2005; 33:1603-1607.

Falck P, Midtvedt K, Van Le TT, Storehagen L, Holdaas H, Hartmann A, Asberg A. A population pharmacokinetic model of ciclosporin applicable for assisting dose management of kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(9):615–623.

Fanta S, Niemi M, Jonsson S, et al. Pharmacogenetics of cyclosporine in children suggests an age-dependent influence of ABCB1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18 (2): 77-90

Felipe CR, de Sandes TV, Sampaio M, Park SI et al. Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzymes involved in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transpl. Proc.* 2009; 46: 1441-1455.

Fernandez E, Perez R, Hernandez A, Tejada P, Arteta M, Ramos JT. Factors and Mechanisms for Pharmacokinetic Differences between Pediatric Population and Adults. *Pharmaceutics*. 2011;3:53-72.

Filler G, Huang SH. Progress in pediatric kidney transplantation. *Ther Drug Monit* 2010;32:250–2

Filler G. Challenges in pediatric transplantation: the impact of chronic kidney disease and cardiovascular risk factors on long-term outcomes and recommended management strategies. *Pediatr Transplant* 2011;15:25–31

Fine RN. Etiology and treatment of growth retardation in children with chronic kidney disease and end-stage renal disease: a historical perspective. *Pediatr Nephrol* 2010;25:725-32.

Foote CJ, Greer W, Kiberd BA, et al. MDR1 C3435T polymorphisms correlate with cyclosporine levels in de novo renal recipients. *Transplant Proc* 2006; 38 (9): 2847-9

Frattarelli DA, Galinkin JL, Green TP, Johnson TD, Neville KA, Paul IM, et al. Off-label use of drugs in children. *Pediatrics* 2014; 133: 563–567

Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphism on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 54: 1295

Fromm MF. Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk. *Toxicology* 2002; 181-182: 299-303

Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I et al. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2002, 12: 529-534.

Gazouli M, Zachartos P, Gorgoulis V, Mantzaris G et al. The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in a Greek population. *Gastroenterology* 2004,126: 367-369.

Gibbs JP, Liacouras CA, Baldassano RN, Slattery JT. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27:1466-1469

Gijzen VM, van Schaik RH, Elens L, Soldin OP, Soldin SJ, Koren G, de Wildt SN. CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2013;14(9):1027-36.

Gijzen V, Mital S, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, van der Heiden IP, Nulman I, Koren G, de Wildt SN. Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(12):1352-9

Glass J, Torok HP, Schiemann U, Folwaczny C. MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004, 126: 367.

Gomes AM, Winter S, Klein K, et al. Pharmacogenomics of human liver cytochrome P450 oxidoreductase: multifactorial analysis and impact on microsomal drug oxidation. *Pharmacogenomics.* 2009;10:579–599.

Gomes LG, Huang N, Agrawal V, et al. The common P450 oxidoreductase variant A503V is not a modifier gene for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2913–2916.

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; 104(2): 147-153

Gupta A, Iveson V, Varagunam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation* 2008;85:1200-4

Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14:272-83

Hanna-Wakim R, Yasukawa LL, Sung P, Fang M, Sullivan B, Rinki M, et al. Age-related increase in the frequency of CD4(+) T cells that produce interferon-gamma in response to staphylococcal enterotoxin B during childhood. *J. Infect. Dis.* 2009; 200; 1921–1927

Harmon WE. Pediatric renal transplantation. In: Himmelfarb J, Sayegh MH, eds. *Chronic kidney disease, dialysis and transplantation*. Philadelphia: Elsevier, 2010:591-608.

Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol* 2005;142:446-53.

Hassan J, Reen DJ. Reduced primary antigen-specific T-cell precursor frequencies in neonates is associated with deficient interleukin-2 production. *Immunology* 1996;87:604-8.

Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Immunosuppressive drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013, 1;3(9):a015487. doi: 10.1101/cshperspect.a015487

Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove , et al. The effect of CYP3A5 and MDRI (ABCBI) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmaco-genetics* 2004; 14(3): 147-54

Heimann G. Enteral absorption and bioavailability in children in relation to age. *Eur J Clin Pharmacol.* 1980;18:43-50.

Herweijer H, Sonneveld P, Baas F, et al. Expression of *mdr1* and *mdr3* multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (13): 1133-40

Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5 and MDR-I genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74 (3): 245-54

Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol Ther* 2008; 118 (2); 250-67

Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1 CYP3A4 and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76 (6): 545-56

Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol. Ther.* 2008;118:250–267

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H. et al. The C 3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001: II (4): 293-8

Hitzl M, Schaeffeler E, Hofer B, et al. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004: 14(5): 309-18

Höcker B, Tönshoff B. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in pediatric renal transplantation: a viable option? *Paediatr Drugs* 2011;13:49–69.

Hoffmayer S, Burk O, von Richter O, Arnold H et al. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 3473-3478.

Hollander AA, van Rooij J, Lentjes GW, Arbouw F, van Bree JB, Schoemaker RC, van Es LA, van der Woude FJ, Cohen AF. The effect of grapefruit juice on cyclosporine and prednisone metabolism in transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57:318-24

Hrvačević R. Savremene metode dijalize. 2. izmenjeno i dopunjeno izdanje. Beograd, 2012.

Hsu DT. Biological and psychological differences in the child and adolescent transplant recipient. *Pediatr Transplant* 2005;9:416-21

Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, et al. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:1733–1738.

Huang NN, High RH. Comparison of serum levels following the administration of oral and parenteral preparations of penicillin to infants and children of various age groups. *J Pediatr.* 1953;42:657-8.

Hu YF, Qiu W, Liu ZQ. et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(11): 1093-8

Hutstert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11 (9): 773-9

Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK 506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22(5): 328-35

Jacobson PA, Schladt D, Oetting WS, Leduc R, Guan W, Matas AJ, et al. Genetic determinants of mycophenolate-related anemia and leukopenia after transplantation. *Transplantation* 2011; 91: 309–316.

Jain AB, Fung JJ, Tzakis AG, et al. Comparative study of cyclosporine and FK 506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc.* 1991;23:2763–2766.

Jamroziak K, Balcerczak E, Mlynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435 polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol* 2002, 54: 495-500

Jiang ZP, Wang YR, Xu P et al. Meta-analysis of the effects MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Bic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103 (5); 433-44

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315 (5811): 525-8

Kravljaca M, Perovic V, Pravica V, Brkovic V, Milinkovic M, Lausevic M, Naumovic R. The importance of MDR1 gene polymorphisms for tacrolimus dosage. *Eur J Pharm Sci.* 2016, 83:109-13.

Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1 multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13 (8) :481-94.

Kuss R, Legrain M, Mathe G, Nedey R, Camey M. Homologous human kidney transplantation. Experience with six patients. *Postgrad Med J* 1962;38:528–31.

Lacroix D, Sonnick M, Moncion A, et al. Expression of CYP3A in the human liver: evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem* 1997; 247 (2): 625-34

Lam J, Baello S, Iqbal M, Kelly LE, Shannon PT, Chitayat D, Matthews SG, Koren G. The ontogeny of P-glycoprotein in the developing human blood-brain barrier: implication for opioid toxicity in neonates. *Pediatr Res.* 2015;78:417-21

Lamba JK (1), Lin YS, Schiuetz EG, et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54 (10): 1271-94

Lamba JK (2), Lin YS, Thummel K, et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002; 12(2): 121-32

Lemahieu WP, Maes BD, Verbeke K, et al. CYP3A4 and P-glycoprotein activity in healthy controls and transplant patients on cyclosporin vs tacrolimus vs sirolimus. *Am J Transplant* 2004; 4 (9): 1514-22

Li YH, Wang YH, LI Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Acta genetic Sinica* 2006;33:93-104

Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 53-81

Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004;5: 133–139

Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Elijedems L et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance protein MDR1/P-glycoprotein, MRP1 and LRP in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94:1086-1099

Loh PT, Lou HX, Zhao V, et al. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2008; 40 (5): 1690-5

Loh PT, Lou HX, Zhao V et al. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2008; 40 (5): 1690-5

Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62:248-60.

Lu H, Rosenbaum S. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2014;19:262-76.

Luke RG. Mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1991;4(5 Pt 1):468–71.

Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, Bergan S, Åsberg A, Christensen H. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70(6):685-93.

Kearns GL, Reed MD. Clinical pharmacokinetics in infants and children. A reappraisal. *Clin Pharmacokinet*. 1989;17:29-67.

Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, et al. Developmental pharmacology—drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med*. 2003; 349:1157–1167.

Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, et al. Human liver carbamazepine metabolism: role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem Pharmacol* 1994;47:1969-79.

Kim JS, Aviles DH, Silverstein DM, Leblanc PL, Matti Vehaskari V. Effect of age, ethnicity, and glucocorticoid use on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2005; 9:162–169.

Klintmalm GB, Goldstein R, Gonwa T, et al. Prognostic factors for successful conversion from cyclosporine to FK 506-based immunosuppressive therapy for refractory rejection after liver transplantation. US Multicenter FK 506 Liver Study Group. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 1):641–3.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* 1975;256:495–7.

Koper JW, van Rossum EF, vanden Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 2014; 92:62–73.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27 (4): 383-91

Kuzuya T, Kobayashi T, Moriyama N, et al. Amlodipine, but not MDRI polymorphisms, alters the pharmacokinetics of cyclosporine A in Japanese kidney transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76(5): 865-8

de Mattos A, Olyaei A, Bennett W. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000;35(2):333–46.

MacFarlane GD, Venkataramanan R, McDiarmid SV, et al. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2001; 5:119–124

Mai I, Stormer E, Goldammer M, et al. MDRI haplotypes do not affect the steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003; 43 (10): 1101-7

Maimone D, Dominici R, Grimaldi LM. Pharmacogenomics of neurodegenerative disease. *Eur Pharmacol* 2001, 413:11-29

Martins L, Ventura A, Branco A, et al. Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc* 2004;36(4):877-9.

Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997;64(3):436-43.

McFarland RD, Douek DC, Koup RA, Picker LJ. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4215-20.

Medeiros M, Castañeda-Hernández G, Ross CJ, Carleton BC. Use of pharmacogenomics in pediatric renal transplant recipients. *Front Genet* 2015;6:41

Mentzer Jr RM, Jahania MS, Lasley RD. Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart and lung transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Study Group. *Transplantation* 1998;65(1):109-13.

Merrill JP, Murray JE, Harrison J, Freedman E, Dealy Jr JB, Dammin GJ. Successful homotransplantation of the kidney between non-identical twins. *N Engl J Med* 1960;262:1251-60.

Miki Y, Suzuki T, Tazawa C et al. Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 231: 75-85

Min D, Ellingrod VL. Association of the CYP3A4*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2003; 25 (3):105-9

Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy Jr JB, Alexandre GW, Harrison J. Kidney transplantation in modified recipients. *Ann Surg* 1962;156:337–55.

Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, et al. CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2004; 26 (5): 524-8

Mochon M, Cooney G, Lum B, Caputo GC, Dunn S, Goldsmith B, Baluarte HJ, Polinsky MS, Kaiser BA. Pharmacokinetics of cyclosporine after renal transplant in children. *J Clin Pharmacol.* 1996;36(7):580-6.

Moes DJ, Swen JJ, den Hartigh J, van der Straaten T, van der Heide JJ, Sanders JS, Bemelman FJ, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A Combined Genotypes on Cyclosporine, Everolimus, and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2014;3:e100. doi: 10.1038/psp.2013.78.

Morselli PL. Clinical pharmacokinetics in neonates. *Clin Pharmacokinet.* 1976;1:81-98.

Moudgil A, Dharnidharka VR, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Best allograft survival from share-35 kidney donors occurs in middle-aged adults and young children — an analysis of OPTN data. *Transplantation* 2013;95:319-25

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963;268:1315–23.

Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation* 2004;77(9):1457–9.

Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451-62.

Neu AM, Fivush BA. Recommended immunization practices for pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1998;2:263-9.

Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, et al. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19: 877–883.

Pandey AV, Sproll P. Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. *Front Pharmacol*. 2014 9;5:103.

Pescovitz MD. Use of antibody induction in pediatric renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:495–9

Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *FK506 Kidney Transplant*

Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Chron disease and ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004, 5: 530-539.

Przepiorka D, Blamble D, Hilsenbeck S, et al. Tacrolimus clearance is age-dependent within the pediatric population. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26:601–605.

Prottas JM. Shifting responsibilities in organ procurement: a plan for routine referral. *JAMA* 1988; 260:832-833

Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, et al. Association of MDR1 CYP3A4*18B, and CYP3A5*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2008: 64 (11): 1069-84

Reese PP, Hwang H, Potluri V, Abt PL, Shults J, Amaral S. Geographic determinants of access to pediatric deceased donor kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:827-35.

Rieder MJ, Carleton B. Pharmacogenomics and adverse drug reactions in children. *Front. Genet.* 2014; 5:78

Riley P, Marks SD, Desai DY, Mushtaq I, Koffman G, Mamode N. Challenges facing renal transplantation in pediatric patients with lower urinary tract dysfunction. *Transplantation* 2010;89:1299-307

Riva R, Contin M, Albani F, Perucca E, Procaccianti G, Baruzzi A. Free concentration of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in children and adults: influence of age and phenobarbitone co-medication. *Clin Pharmacokinet* 1985;10:524-31.

Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, et al. Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56 (5): 395-8

Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, et al. Modification of etnical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Nail Cancer Inst* 1998; 90 (16): 1225-9

Remuzzi G, Bertani T. Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am J Kidney Dis* 1989;13(4):261–72.

Reznik VM, Jones KL, Durham BL, Mendoza SA. Changes in facial appearance during cyclosporin treatment. *Lancet* 1987;1(8547):1405–7. Scott JP, Higenbottam TW. Adverse reactions and interactions of cyclosporin. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1988;3(2):107–27.

Roberts RL, Wallace MC, Drake JM, Stamp LK. Identification of a novel thiopurine S-methyltransferase allele (TPMT*37). *Pharmacogenet. Genomics* 2014; 24: 320–323.

Rosso Felipe C, de Sandes TV, Sampaio EL, Park SI, Silva HT Jr, Medina Pestana JO. Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzymes involved in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc.* 2009 ;41(5):1441-55.

Sage DP, Kulczar C, Roth W, Liu W, Knipp GT. Persistent pharmacokinetic challenges to pediatric drug development. *Front.Genet.* 2014,5:281

Saito K, Miyake S, Moriya H, Yamazaki M, Itoh F et al. Detection of the four sequence variations of MDR1 gene using TaqManMGB probe based real-time PCR and haplotype analysis in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem* 2003;36:511-518.

Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;18: 1400-1404.

Salvatierra O Jr, Millan M, Concepcion W. Pediatric renal transplantation with considerations for successful outcomes. *Semin Pediatr Surg* 2006;15:208-17.

Sandee D, Morrissey K, Agrawal V, et al. Effects of genetic variants of human P450 oxidoreductase on catalysis by CYP2D6 in vitro. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20:677–686.

Sarwal MM, Cecka JM, Millan MT, Salvatierra O Jr. Adult-size kidneys without acute tubular necrosis provide exceedingly superior long-term graft outcomes for infants and small children: a single center and UNOS analysis. *Transplantation* 2000;70:1728-36

Sarwal M, Pascual J. Immunosuppression minimization in pediatric transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:2227–35

Schwartz R, Stack J, Dameshek W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;99:164–7.

Scientific Registry of Transplant Recipients. Annual Data Report. Available online at:http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2012/

Shapiro R, Sarwal MM. Pediatric kidney transplantation. *Pediatr Clin North Am* 2010;57:393-400

Shihab F. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 1996;16(6):536–47.

Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:374-384.

Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959;183(4676):1682-3.

Schwartz R, Dameshek W. The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest* 1960;39:952-8.

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm M et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis . *Gastroenterology* 2003, 124: 26-33.

Schwab M (2), Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphism of the human MDR1 drug transporter. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2003, 43:285-307.

Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:973-80

Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia* 2005, 46: 643-647.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.

Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, et al. The CYP3A4* 1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (5): 35S-66

Srinivas RT, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacokinetics principles of immunosuppressive drugs. *American Journal of transplantation* 2005;5:207-217.

Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010; 49:207-221.

Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR. The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:385–95.

Starzl TE, Marchioro TL, Hutchinson DE, Porter KA, Cerilli GJ, Brettschneider L. The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation. *Transplantation* 1967;5(4):1100–5.

Stevens JC, Hines RN, Gu C, et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307 (2): 573-82

Study Group. *Transplantation* 1997;63(7):977–83.

Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncology/Hematology* 2005;56:23-46.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7735-7738

Thomas A, Dropulic LK, Rahman MH, Geetha D. Ureteral stents: a novel risk factor for polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 2007;84:433-6.

Tsai CE, Daoood MJ, Lane RH, Hansen TWR, Gruetzmacher EM, Watchko JF. P-glycoprotein expression in mouse brain increases with maturation. *Biol Neonate* 2002; 81:58-64.

Turolo S, Tirelli AS, Ferrareso M, Ghio L, Belingheri M, Groppali E, Torresani E, Edefonti A. Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacol Rep.* 2010;62(6):1159-69.

Von Ahsen N, Richter M, Grupp C, et al. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporine A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001; 47 (6): 1048-52

Wang D, Johnson AD, Papp A, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005, 15: 693-704.

Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Ironic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11(4):274-286.

Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, et al. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259 (1):201-5

de Wildt SN, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Brojeni PY, van der Heiden IP, Parshuram C, Nulman I, Koren G. The interactions of age, genetics, and disease severity on tacrolimus dosing requirements after pediatric kidney and liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011;67(12):1231-41

de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* 1999;37:485-505.

Wilson CH, Bhatti AA, Rix DA, Manas DM. Routine intraoperative stenting for renal transplant recipients. *Transplantation* 2005;80:877-82

Yokoi T. Essentials for starting a pediatric clinical study (1): Pharmacokinetics in children. *J Toxicol Sci*. 2009; 2:307-12.

Zhao Y, Song M, Guan D. et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 178-81

Zhao W, Elie V, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, Leroy V, Loirat C, Cochat P, Cloarec S, André JL, Garaix F, Bensman A, Fakhoury M, Jacqz-Aigrain E. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(6):609-18.

Zhang JJ, Zhang H, Ding XL, et al. Effect of the P450 oxidoreductase *28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;69:807–812.

Zheng H, Webber S, Zeevi A, et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant*. 2003; 3:477–483.

SPISAK SKRAĆENICA

ABCB1gen	Gen 1 podfamilije B genske kasete za proteine koji vezuju adenozin-trifosfat
ALG	Antilimfocitni globulin
ATP	Adenozintrifosfat
AUC	Površina ispod krive
CAKUT	Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta
CMV	Citomegalovirus
CNI	Kalcineurin inhibitori
CsA	Ciklosporin A
C ₀	Koncentracija leka u krvi pre uzimanja jutarnje doze
C ₂	Koncentracija leka u krvi dva sata posle jutarnje doze
C ₀ /D	Koncentracija leka u krvi pre uzimanja jutarnje doze/doza leka
C ₂ /D	Koncentracija leka u krvi dva sata posle jutarnje doze/doza leka
CYP3A4	Citohrom P450 3A4
CYP3A5	Citohrom P450 3A5
CYP3A7	Citohrom P450 3A7
D	Doza leka
EBV	Ebštajnbar virus
FSGS	Fokalna segmentna glomeruloskleroza
HBI	Hronična bubrežna insuficijencija
HD	Hemodijaliza
HLA	Humani leukocitni antigen
IL-2	Interleukin 2

IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4
IFN- γ	Interferon gama
IUT	Infekcija urinarnog trakta
KAPD	Kontinuirana ambulatorna peritoneumska dijaliza
KCPD	Kontinuirana ciklična peritoneumska dijaliza
MDR1 gen	Gen odgovoran za rezistenciju na brojne lekove
MHC	Glavni kompleks histokompatibilnosti
PD	Peritoneumska dijaliza
P-gp	P-glikoprotein
POR	P450 oksidoreduktaza
PTLD	Posttransplantaciona limfoproliferativna bolest
SNP	Polimorfizam tipa zamene jednog nukleotidnog ponovka
Tac	Takrolimus
TBI	Terminalna bubrežna insuficijencija
TNF- α	Faktor tumorske nekroze alfa
TP	Telesna površina
TT	Telesna težina
TPMT	Tiopurin-metiltransferaza
VUP	Valvula zadnje uretre

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Mirjana Cvetković (devojačko prezime Stanić) je rođena 18.04.1976. godine u Čačku. Medicinski fakultet u Beogradu je završila 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,03. Od novembra 2003 godine zaposlena je u Univerzitetškoj dečjoj klinici u Beogradu. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 2012. godine sa odličnim uspehom. Radi na odeljenju hemodijalize i transplantacije bubrega u okviru službe nefrologije Univerzitetske dečje klinike u Beogradu.

Magistarsku tezu pod nazivom "Markeri oštećenja tubulointersticijuma kod dece sa hroničnim progresivnim bolestima glomerula" odbranila je 2010 godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Autor je i koautor preko 60 stručnih radova od kojih je 14 publikovano u celini u međunarodnim i domaćim časopisima, a ostali radovi su štampani kao izvodi u publikacijama inostranih i domaćih kongresa.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мирјана Цветковић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Фактори од значаја за фармакокинетику Циклоспорина А код деце са
трансплантираним бубрегом”

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.4.2019.

Мирјана Цветковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Цветковић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада “Фактори од значаја за фармакокинетику Циклоспорина А код деце са трансплантираним бубрегом”

Ментор проф. др Мирјана Костић

Потписани Мирјана Цветковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 27.4.2018.

Мирјана Цветковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Фактори од значаја за фармакокинетику Циклоспорина А код деце са трансплантираним бубрегом”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 27. 4. 2018.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.