



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Katarina S. Danković**

**POVEZANOST FARMAKOKINETIČKE  
VARIJABILNOSTI TAKROLIMUSA, GENSKIH  
POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA I  
EKSPRESIJE MIKRORNAK SA FUNKCIJOM  
GRAFTA KOD PACIJENATA SA  
TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Katarina S. Danković**

**THE ASSOCIATION OF PHARMACOKINETIC  
VARIABILITY OF TACROLIMUS,  
INTERLEUKIN GENE POLYMORPHISMS AND  
MICRORNA EXPRESSION WITH GRAFT  
FUNCTION IN KIDNEY TRANSPLANT  
RECIPIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2025.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: **Prof. dr Nikola Stefanović, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet**

Naslov: Povezanost farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa, genskih polimorfizama interleukina i ekspresije mikroRNK sa funkcijom grafta kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

**Cilj:** Glavni cilj doktorske disertacije je bio ispitati povezanost parametara farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa (Tak), genskih polimorfizama interleukina (IL) i nivoa ekspresije mikroRNK sa parametrima funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. **Pacijenti i metode:** U istraživanje je bilo uključeno 115 pacijenata sa transplantiranim bubregom na Tak-baziranoj imunosupresiji i 91 zdravi ispitanik. Disertacija je sprovedena kao prospektivna studija i studija preseka. Dnevna doza i koncentracija određena pre jutarnje doze Tak ( $C_0$ ) su evidentirane za petogodišnji post-transplantacioni period. Preračunati su dozom-prilagođena  $C_0$  ( $C_0/D$ ) i intraindividualna farmakokinetička varijabilnost (IPV) Tak. Funkcija grafta izražena je kao procenjena jačina glomerularne filtracije, pri čemu su zabeleženi nepovoljni ishodi u dugoročnom post-transplantacionom periodu (otkazivanje funkcije grafta, hronična disfunkcija i odbacivanje grafta i udvostručenje koncentracije serumskog kreatinina). Polimorfizmi -174G/C u genu za IL-6, -1082G/A, -819C/T i -592C/A u genu za IL-10, -607A/C i -137G/C u genu za IL-18 detektovani su odgovarajućom PCR metodom. Određene su koncentracije IL-6, IL-10, IL-18 i cistatina C u plazmi, odnosno ekspresija miR-21-5p, miR-142-3p, miR-155-5p i miR-204-5p u urinu pacijenata i kontrola. **Rezultati:** Rezultati disertacije su pokazali da pacijenti istovremeno okarakterisani nižim Tak  $C_0/D$  i višim Tak IPV vrednostima imaju

približno 3 puta veći rizik za nastanak nepovoljnih ishoda u petogodišnjem post-transplantacionom periodu. Genski polimorfizmi IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A i IL-18 -137G/C, metabolički fenotip Tak određen na osnovu Tak C<sub>0</sub>/D u 3. post-transplantacionom mesecu i period nakon transplantacije su bili nezavisni prediktori Tak C<sub>0</sub>/D od 6 do 60 post-transplantacionog meseca. Sprovedeno istraživanje je pokazalo značajnu disregulaciju miR-204-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u dugoročnom periodu, pri čemu je pokazana njena povezanost sa metaboličkim fenotipom Tak i funkcijom grafta u dugoročnom post-transplantacionom periodu. **Zaključak:** Rezultati doktorske disertacije mogu doprineti poboljšanju post-transplantacionih ishoda i istovremeno predstavljaju osnovu za dalja istraživanja u oblasti farmakokinetike, farmakoterapije i kliničke farmacije.

Naučna  
oblast:

Farmacija

Naučna  
disciplina:

Farmakokinetika, Farmakoterapija, Klinička farmacija

Ključne reči:

takrolimus, farmakokinetička varijabilnost, transplantacija bubrega, genski polimorfizam, interleukini, funkcija grafta, mikroRNK

UDK:

615.015-616.61-089.843(043.3)

CERIF  
klasifikacija:

B740

Tip licence  
Kreativne  
zajednice:

CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Associate professor Nikola Stefanović, PhD, University of Niš, Faculty of Medicine

Title: The Association of Pharmacokinetic Variability of Tacrolimus, Interleukin Gene Polymorphisms and MicroRNA Expression with Graft Function in Kidney Transplant Recipients

Abstract: **Objective:** The main goal of this doctoral thesis was to investigate the association between the parameters of pharmacokinetic variability of tacrolimus (Tac), polymorphisms in interleukin (IL) genes and microRNA expression levels with graft function in the long-term period after kidney transplantation. **Patients and Methods:** The study included 115 kidney transplant recipients on Tac-based immunosuppression and 91 healthy controls. The thesis was conducted as a prospective study and a cross-sectional study. Tacrolimus daily dose and trough concentration in whole blood ( $C_0$ ) were recorded over a five-year post-transplantation period. The dose-adjusted  $C_0$  ( $C_0/D$ ) and intraindividual pharmacokinetic variability (IPV) of Tac were calculated. Graft function was assessed using estimated glomerular filtration rate, while adverse outcomes in the long-term post-transplantation period were recorded (graft failure, chronic dysfunction and rejection, and doubling of serum creatinine concentration). Genetic polymorphisms -174G/C in the IL-6 gene, -1082G/A, -819C/T, and -592C/A in the IL-10 gene, -607A/C and -137G/C in the IL-18 gene were detected using appropriate PCR methods. Plasma concentrations of IL-6, IL-10, IL-18, and cystatin C were measured, as well as the urinary expression of miR-21-5p, miR-142-3p, miR-155-5p, and miR-204-5p in patients and controls. **Results:** The findings of this study demonstrated that patients exhibiting both lower Tac  $C_0/D$  and higher Tac IPV values had approximately a 3-fold increased risk of developing adverse outcomes

during the five-year post-transplantation follow-up. Furthermore, gene polymorphisms IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A, and IL-18 -137G/C, the Tac metabolic phenotype determined based on Tac C<sub>0</sub>/D at the 3<sup>rd</sup> post-transplantation month, and the post-transplantation period were independent predictors of Tac C<sub>0</sub>/D from months 6 to 60. The study also showed a significant dysregulation of miR-204-5p in the urine of kidney transplant patients in the long-term period, demonstrating its correlation with Tac metabolic phenotype and graft function in the late post-transplantation period. **Conclusion:** The results of the doctoral dissertation may contribute to the improvement of post-transplantation outcomes, while also serving as a foundation for further research.

Scientific  
Field:

Pharmacy

Scientific  
Discipline:

Pharmacokinetics, Pharmacotherapy, Clinical Pharmacy

Key Words:

tacrolimus, pharmacokinetic variability, kidney transplantation, gene polymorphism, interleukins, graft function, microRNA

UDC:

615.015-616.61-089.843(043.3)

CERIF  
Classification:

B740

Creative  
Commons  
License Type:

CC BY-NC-ND

## ČLANOVI KOMISIJE

1. *Predsednik komisije*: Prof. dr Radmila Veličković-Radovanović, redovni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu  
Klinika za nefrologiju “Prof dr Spira Strahinjić”, Univerzitetski klinički centar Niš
2. *Mentor i član komisije*: Prof. dr Nikola Stefanović, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
3. *Član komisije*: Prof. dr Branka Mitić, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu  
Klinika za nefrologiju “Prof dr Spira Strahinjić”, Univerzitetski klinički centar Niš
4. *Član komisije*: Prof. dr Marija Vukelić-Nikolić, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
5. *Član komisije*: Prof. dr Marija Jovanović, vanredni profesor  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

## ZAHVALNICA

*Veliku zahvalnost dugujem svima koji su na bilo koji način učestvovali u ovom istraživanju i pružali mi podršku tokom mog akademskog puta.*

*Duboku zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Nikoli Stefanoviću na besprekornom mentorstvu tokom dugogodišne saradnje, neprocenjivim poslovnim i životnim savetima i podršci. Hvala Vam što ste mi svojim primerom pokazali da je trud, rad i disciplina uvek ključ uspeha. Ovaj doktorat je naš veliki zajednički uspeh.*

*Prof. dr Radmili Veličković-Radovanović dugujem veliku zahvalnost za usađivanje ljubavi prema farmakoterapiji, dragocene savete i podršku tokom mog istraživačkog rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr Branki Mitić što svesrdno podržava naučnoistraživački rad na Klinici za nefrologiju "Prof. dr Spira Strahinjić" i na učešću u oceni ove disertacije.*

*Prof. dr Mariji Vukelić-Nikolić za stručnu i naučnu pomoć za deo disertacije posvećen mikroRNK, kao i za učešće u komisiji za ocenu.*

*Prof. dr Mariji Jovanović na saradnji i učešću u oceni ove disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Tatjani Cvetković koja je oblikovala moje prve korake tokom doktorskih studija, bezrezervno usmeravala i budnim okom pratila svaki moj korak.*

*Zahvalnost dugujem prof. dr Dušici Pavlović sa kojom sam tokom izrade diplomskog rada zakoračila i zavolela svet personalizovane medicine, kao i prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov na podršci u okviru projekta, koji je finansirao ovo istraživanje.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama Stevanu Vujiću i Maši Jović na prijatnim trenucima druženja, deljenja znanja i pomoći tokom laboratorijskog rada. Zahvaljujem se i koleginići Vladani Stojiljković za saradnju tokom naučno-istraživačkog rada i deljenja znanja u oblasti mikroRNK.*

*Takođe se zahvaljujem svim sestrama i tehničarima iz Biohemijske laboratorije Klinike za nefrologiju "Prof. dr Spira Strahinjić", koji su mi svesrdno pomogli u laboratorijskom radu.*

*Svojoj porodici i prijateljima dugujem zahvalnost što su me uvek podržavali i verovali u mene.*

*Majci Lidiji za безусловnu ljubav, podršku i za sve vrednosti koje je usadila u mene. Hvala za sve što jesam. Veliku zahvalnost dugujem suprugu Stefanu i sinu Vidaku. Vaša ljubav me je vodila i davala snagu da istrajem u svim sferama života. Hvala Vam što me činite boljim čovekom.*

*Iako doktorska disertacija predstavlja profesionalni razvoj jednog pojedinca, ova teza pre svega predstavlja ispunjenje obećanja datog ocu Siniši, mom anđelu čuvaru. Obećanje da ću se potruditi da lično doprinesem unapređenju tretmana transplantiranih bubrežnih pacijenata. Najboljem Tati, za večnost.*

*Istraživanja u okviru doktorske disertacije su finansijski podržana od strane nadležnog Ministarstva za nauku Republike Srbije, a u okviru projekata III41018 do 2019. godine, naučnoistraživačkog projekta Medicinskog fakulteta u Nišu, broj: 451-03-68/2020-14/200113 za 2020. godinu, broj 451-03-9/2021-14/200113 za 2021. godinu, broj: 451-03-68/2022-14/200113 za 2022. godinu, broj: 451-03-47/2023-01/200113 za 2023. godinu, broj: 451-03-65/2024-03/200113 za 2024. godinu i broj: 451-03-137/2025-03/200113 za 2025. godinu.*

*Autor*

## **Naučni doprinos doktorske disertacije**

1. Danković K, Stefanović N, Cvetković T, Vujić S, Jović M, Mitić B, Veličković-Radovanović R. Potential influence of interleukin-6 -174G/C gene polymorphism on kidney graft function and tacrolimus dose requirements: five-year follow-up. *Xenobiotica*. 2024;54(10):855–63.
2. Stefanović N, Danković K, Cvetković T, Vujić S, Pavlović I, Jevtović-Stoimenov T, Mitić B, Veličković-Radovanović R. Impact of IL-6 and IL-10 genotypes on tacrolimus dose requirements in kidney transplant recipients: Monte Carlo analysis. *Pharmacogenomics*. 2024;25(7):315-27.

**SADRŽAJ**

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>18</b>
2.1	Transplantacija bubrega i odbacivanje transplantiranog organa .....	18
2.2	Imunosupresivni lekovi u kliničkoj praksi .....	21
2.3	Takrolimus .....	27
2.3.1	Mehanizam dejstva takrolimusa .....	27
2.3.2	Farmakokinetičke karakteristike takrolimusa .....	28
2.3.3	Terapijski monitoring takrolimusa.....	30
2.3.4	Interindividualna varijabilnost u izloženosti takrolimusa.....	31
2.3.5	Intraindividualna varijabilnost u izloženosti takrolimusa.....	34
2.4	Interleukini .....	35
2.4.1	Interleukin-6.....	35
2.4.2	Interleukin-10.....	37
2.4.3	Interleukin-18.....	38
2.5	Procena funkcije grafta.....	39
2.5.1	KNI-posredovana nefrotoksičnost .....	41
2.6	MikroRNK-potencijalni rani markeri praćenja funkcije grafta.....	42
<b>3</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>PACIJENTI I METODE .....</b>	<b>45</b>
4.1	Pacijenti.....	45
4.1.1	Imunosupresivni protokol pacijenata sa transplantiranim bubregom .....	46
4.1.2	Farmakokinetički podaci.....	47
4.1.3	Hematološki i biohemijski parametri.....	47
4.1.4	Post-transplantacioni ishodi .....	48
4.2	Metode.....	49
4.2.1	Genotipizacija IL-6 .....	49
4.2.2	Genotipizacija IL-10 .....	50
4.2.3	Genotipizacija IL-18 .....	53
4.2.4	Određivanje koncentracije IL-6, IL-10, IL-18 i cistatina C u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.....	53
4.2.5	Izolacija RNK, reverzna transkripcija i relativna ekspresija miRNK.....	54
4.3	Veličina uzorka .....	55

4.4	Statistička obrada rezultata.....	55
<b>5</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>57</b>
5.1	Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika .....	57
5.2	Ispitivanje povezanosti parametara inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti takrolimusa sa parametrima funkcije grafta i nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega .....	60
5.3	Učestalost genotipova i alela polimorfizama u genima za IL-6, IL-10 i IL-18 .....	68
5.4	Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama ispitivanih IL-6, IL-10 i IL-18 na dozni režim i izloženost takrolimusa u različitim periodima nakon transplantacije bubrega.....	72
5.5	Ispitivanje povezanosti genskih polimorfizama ispitivanih IL-6, IL-10 i IL-18 sa funkcijom grafta i nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.....	87
5.6	Određivanje koncentracije cistatina C, IL-6, IL-10, IL-18 u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i ispitanika kontrolne grupe .....	95
5.7	Ispitivanje povezanosti ekspresije miRNK u urinu sa funkcijom grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, kao i sa parametrima farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa.....	97
<b>6</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>110</b>
6.1	Uticaj inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti takrolimusa na funkciju grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega .....	110
6.2	Uticaj polimorfizama IL-6, IL-10 i IL-18 na farmakokinetiku takrolimusa i funkciju grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega .....	119
6.3	Funkcija grafta.....	128
6.4	Povezanost funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega i parametara farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa sa relativnom ekspresijom miRNK u urinu .....	129
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>BIOGRAFIJA AUTORA.....</b>	<b>164</b>

**Lista skraćenica**

ABMR	antitelima-posredovano odbacivanje grafta (engl. <i>antibody-mediated rejection</i> )
ACR	albumin-kreatinin odnos (engl. <i>albumin to creatinine ratio</i> )
AP-1	aktivirajući protein-1
APC	antigen-prezentujuća ćelija
ATG	anti-timocitni globulin
AUC	površina ispod krive (engl. <i>area under the curve</i> )
BK	humani poliomavirus 1
C <sub>0</sub>	koncentracija određena pre jutarnje doze (minimalna koncentracija leka)
C <sub>0</sub> /D	dozom-prilagođena koncentracija leka određena pre jutarnje doze (na kraju doznog intervala)
CL	klirens (engl. <i>clearance</i> )
CPIC	Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i> )
CRP	C-reaktivni protein
CsA	ciklosporin A
CV	koeficijent varijacije (engl. <i>coefficient of variation</i> )
CYP	citohrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i> )
DSA	donor-specifična antitela
EBV	<i>Epstein–Barr</i> virus
eGFR	procenjena jačina glomerularne filtracije (engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i> )
ELISA	enzimski imunosorbentni test (engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
EVR	everolimus
FDA	Američka agencija za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
FKBP12	FK-vezujući protein 12 (engl. <i>FK-binding protein 12</i> )
GIT	gastrointestinalni trakt
gp130	glikoprotein 130
HBI	hronična bubrežna insuficijencija
HLA	humani leukocitni antigen
IATDMCT	Međunarodno udruženje za terapijski monitoring lekova i kliničku toksičnost (engl. <i>International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology</i> )
IF/TA	intersticijalna fibroza i tubularna atrofija
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IL-6R	interleukin-6 receptor

---

IL-10R	interleukin-10 receptor
IPV	intraindividualna varijabilnost (engl. <i>inpatient variability</i> )
iRNK	informaciona RNK
JAK	Janus kinaze
KNI	kalcineurinski inhibitori
MAD	srednja apsolutna devijacija (engl. <i>mean absolute deviation</i> )
MAPK	mitogen-aktivirana proteinska kinaza
MFK	mikofenolna kiselina
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
miRNK	mikroRNK
MMF	mikofenolat-mofetil
MMT	tranzicija makrofaga u miofibroblaste (engl. <i>macrophage-to-myofibroblast transition</i> )
MPS	mikofenolat-natrijum (engl. <i>mycophenolate sodium</i> )
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih T-limfocita
NK-ćelije	ćelije prirodne ubice (engl. <i>natural killer</i> )
NF-κB	nuklearni faktor-κB
PGP	P-glikoprotein
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PTDM	post-transplantacioni dijabetes melitus
SAD	Sjedinjene Američke Države
SD	standardna devijacija
s-IL-6R	solubilni interleukin-6 receptor
SIR	sirolimus
STAT	signalni transduktori i aktivatori transkripcije
Tak	takrolimus
TCMR	T-limfocitima posredovano odbacivanje grafta (engl. <i>T cell-mediated rejection</i> )
TCR	T-limfocitni receptor (engl. <i>T-cell receptor</i> )
TDM	terapijski monitoring leka (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i> )
Th	T helper
TNF-α	faktor nekroze tumora-α (engl. <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
Treg	regulatorni T-limfociti

## 1 UVOD

U protekle tri decenije ostvaren je značajan napredak u kratkoročnim ishodima nakon transplantacije bubrega, ali bez istovetnog poboljšanja u dugoročnim ishodima kod transplantiranih pacijenata. Transplantacija bubrega omogućava duže preživljavanje i bolji kvalitet života u odnosu na dijalizni tretman, ali je stopa smrtnosti pacijenata sa transplantiranim bubregom i dalje veća u odnosu na opštu populaciju [1]. Preživljavanje grafta zavisi od brojnih faktora, uključujući genetičku osnovu, imunološke faktore i imunosupresivnu farmakoterapiju prilagođenu pacijentu. Takrolimus (Tak) čini osnovu većine imunosupresivnih protokola nakon transplantacije bubrega. Međutim, mali terapijski indeks, izražena farmakokinetička interindividualna i intraindividualna (IPV, engl. *inpatient variability*) varijabilnost, kao i hronična nefrotoksičnost leka komplikuju njegovu kliničku primenu. Slaba korelacija između koncentracije imunosupresiva (farmakokinetika leka) i njegovog dejstva (farmakodinamika leka) zahteva kontinuirano istraživanje novih mogućnosti u individualizaciji doznih režima u cilju prevencije odbacivanja grafta, ali i neželjenih efekata primenjenih lekova (renalna disfunkcija, hipertenzija i dr.). Veliki broj studija je ispitivao povezanost parametara interindividualne (dozom-prilagođena koncentracija određena pre jutarnje doze- $C_0/D$ ) i intraindividualne (npr. koeficijent varijacije (CV%)  $C_0$ ) varijabilnosti u izloženosti Tak sa oštećenjem grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega [2-4]. Međutim, određivanje ovih parametara, nezavisno od kliničkih i biohemijskih parametara, nedovoljno je za validnu procenu njihovog doprinosa oštećenju grafta. U skladu s tim, potrebno je istražiti kompleksne veze parametara farmakokinetičke varijabilnosti Tak sa imunološkim i genetičkim markerima i njihov doprinos disfunkciji grafta.

Genski polimorfizam citohroma P450 3A5 (CYP3A5) izoenzima 6986A/G (*rs776746*) se smatra glavnom determinantom interindividualne farmakokinetičke varijabilnosti Tak. Ipak, njegov efekat na dugoročne post-transplantacione ishode je upitan i nedovoljno ispitan. Pored toga, ovaj genski polimorfizam ne objašnjava sveukupnu farmakokinetičku varijabilnost, te je ispitivanje drugih farmakogenetičkih i negenetičkih faktora od velike važnosti [2, 5]. Određivanje polimorfizama u genima za interleukin (IL)-6, IL-10 i IL-18 može imati značajnu ulogu u transplantaciji bubrega. Interleukin-6 je proinflamatorni citokin koji utiče na produkciju proteina akutne faze, proliferaciju i aktivaciju T-limfocita, diferencijaciju B-limfocita i produkciju imunoglobulina. Pored toga, uključen je

u proces endotelne disfunkcije i fibrogeneze. Polimorfizam -174G/C (*rs1800795*) u genu za IL-6 odgovoran je za različitu ekspresiju IL-6 u plazmi (načelno se smatra da je C alel udružen sa nižim nivoima u plazmi) [6, 7]. Proinflamatorni citokin IL-18 je potentan induktor Th1 (engl. *T-helper*) imunološkog odgovora, povećava ekspresiju proinflamatornih citokina stimulacijom T-limfocita i makrofaga, uključujući IL-6. Ispitivanje polimorfizama -137G/C (*rs187238*) i -607A/C (*rs1946518*) u genu za IL-18, naročito haplotipa -607C/-137G (navedeni aleli su povezani sa povišenim IL-18 nivoima), može biti od značaja kod transplantiranih pacijenata [8-10]. Interleukin-10 izaziva supresiju Th1 imunološkog odgovora, inhibirajući aktivaciju antigen-prezentujućih ćelija (APĆ) (makrofagi i dendritične ćelije), uz inhibiciju drugih proinflamatornih citokina, uključujući IL-6. Promotor gena za IL-10 je visoko polimorfan, a od interesa su tri polimorfizma: -1082G/A (*rs1800896*), -819C/T (*rs1800871*) i -592C/A (*rs1800872*), koji utiču na nivoe IL-10 (-1082G, -819C i -592C alel su udruženi sa višom ekspresijom) [11, 12]. Pored toga, smatra se da su citokini potentni supresori CYP izoenzima u jetri, pri čemu mogu doprineti inhibiciji metabolizma lekova posredovanih CYP enzimima. U skladu s tim, pokazano je da pomenuti polimorfizmi mogu ispoljiti uticaj na režim doziranja i/ili izloženost Tak [4, 11-16].

Sve veću ulogu u dijagnozi, predikciji i prognozi bolesti različite etiologije dobijaju mikroRNK (miRNK). MikroRNK su male, nekodirajuće RNK sastavljene od 18-25 nukleotida koje regulišu ekspresiju gena procesom RNK interferencije. RNK interferencija je proces koji se karakteriše vezivanjem miRNK za komplementarnu sekvencu informacione RNK (iRNK), što za posledicu ima inhibiciju ekspresije target gena. Korišćenjem invazivne tehnike biopsije bubrega, akumulirani su podaci o disregulaciji specifičnih miRNK za koje se zna da su uključene u aloimune odgovore primalaca nakon transplantacije bubrega, od odložene funkcije grafta do hronične disfunkcije grafta. Sa aspekta transplantacione medicine izuzetno je značajna mogućnost određivanja target miRNK u neinvazivnim uzorcima poput urina i plazme (seruma) [17, 18]. MikroRNK mogu biti rani markeri oštećenja funkcije grafta, omogućavajući kategorizaciju pacijenata prema riziku. U prethodnim studijama pokazano je da su miR-21-5p, miR-142-3p, miR-155-5p i miR-204-5p, između ostalih, najčešće ispitivane disregulisane miRNK kod pacijenata sa intersticijalnom fibrozom i tubularnom atrofijom (IF/TA), pri čemu je indikativna povezanost nivoa miRNK u biološkim tečnostima sa IF/TA [19-22].

Identifikacija ranih i pouzdanih pokazatelja (npr. biomarkera rizika, prediktivnih biomarkera) dugoročnih post-transplantacionih ishoda bi mogla predstavljati osnov za klasifikaciju pacijenata prema riziku (npr. od gubitka grafta, koncentracija van željenog

terapijskog opsega), kao i za posledično sprovođenje odgovarajućih terapijskih intervencija, što je ključno za optimizaciju imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Transplantacija bubrega i odbacivanje transplantiranog organa

Transplantacija bubrega je modalitet izbora u lečenju pacijenata u terminalnom stadijumu bubrežne insuficijencije. U protekle tri decenije ostvaren je značajan napredak u kratkoročnim ishodima nakon transplantacije bubrega, pri čemu je jednogodišnje preživljavanje pacijenata i grafta preko 90% [23]. Međutim, nije došlo do istovetnog poboljšanja u dugoročnim post-transplantacionom ishodima, te je desetogodišnje preživljavanje grafta između 50% (kadaverična transplantacija) i 70% (živa srodnička transplantacija) [23, 24].

Osnovni problem transplantacije bubrega je oštećenje i/ili gubitak grafta, koje u praksi može biti akutno ili hronično. Hiperakutno odbacivanje je postalo vrlo redak entitet, usled opsežne pre-transplantacione pripreme [25]. Ova izuzetno retka komplikacija se dešava u roku od nekoliko minuta ili sati nakon transplantacije bubrega. Vodeći uzroci akutnog oštećenja grafta su smanjena perfuzija bubrega (nefrotoksičnost kalcineurinskih inhibitora (KNI), stenoza renalne arterije), opstrukcije (stenoza uretre, disfunkcija mokraćne bešike) i intrinzičke povrede (akutno odbacivanje, infekcije, rekurencija bolesti) [26]. Hronična disfunkcija grafta, koja se karakteriše pogoršanjem funkcije i morfologije grafta, može biti imunološki-zavisne ili imunološki-nezavisne etiologije [27]. Imunološki posredovana hronična disfunkcija grafta obuhvata odbacivanje grafta posredovano antitelima (ABMR, engl. *antibody-mediated rejection*) ili T-limfocitima (TCMR, engl. *T cell-mediated rejection*), kao i infekcije poput nefropatije izazvane humanim poliomavirusom 1 (BK) i rekurentnih urinarnih infekcija. Imunološki-nezavisna hronična disfunkcija grafta obuhvata KNI nefrotoksičnost, opstruktivnu ili refluksnu bolest bubrega, rekurenciju primarne bolesti i dijabetesnu nefropatiju [23].

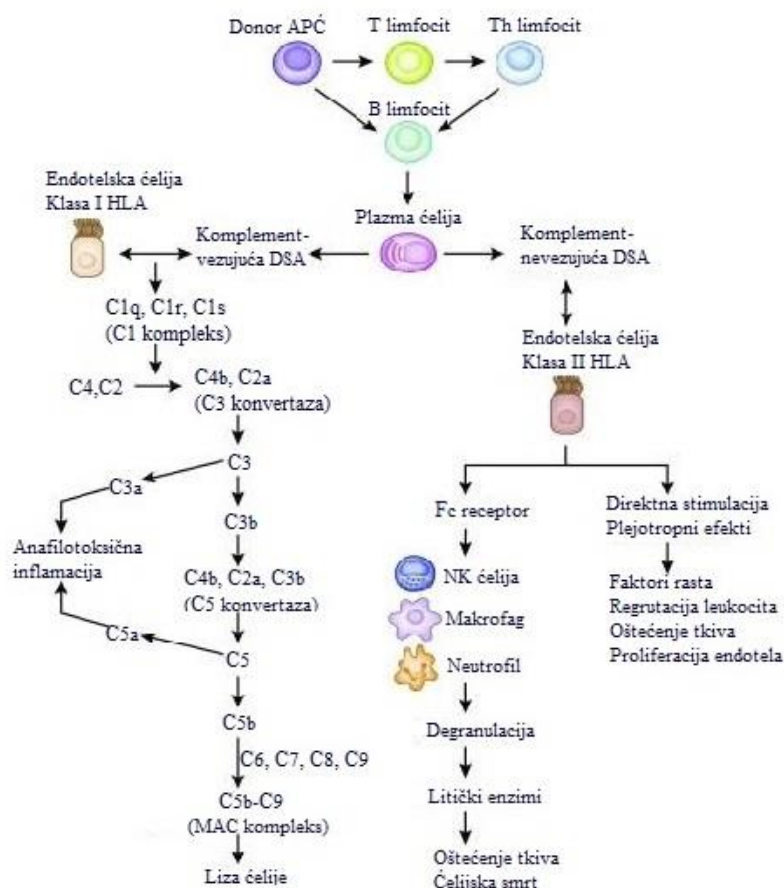
Akutno i hronično odbacivanje su posredovani celularnim i/ili humoralnim mehanizmima. Akutno odbacivanje se može javiti u prvih nekoliko nedelja ili meseci (ili godina u slučaju ABMR) nakon transplantacije, a klinički se karakteriše naglim skokom serumskog kreatinina, uz isključivanje drugih faktora koji mogu da dovedu do akutne disfunkcije grafta [28]. Hronično odbacivanje transplantiranog bubrega se karakteriše progresivnim smanjenjem funkcije grafta koje počinje da se manifestuje godinu dana nakon transplantacije bubrega i obično je praćeno hipertenzijom i proteinurijom. Uglavnom se javlja

usled nedovoljne imunosupresije i neadherence pacijenata prema propisanoj imunosupresivnoj terapiji [24, 29].

Antitelima-posredovano odbacivanje (humoralno) je uzrok nastanka epizoda akutnog odbacivanja u 30 do 50% slučajeva, dok se u 60% slučajeva smatra vodećim uzrokom gubitka grafta u kasnom periodu nakon transplantacije bubrega [26]. U osnovi ABMR su donor-specifična antitela (DSA, engl. *donor-specific antibodies*), uglavnom usmerena protiv humanog leukocitnog antigena (HLA, engl. *human leukocyte antigen*), kompleksa gena čiji aleli kodiraju polimorfne glikoproteine na površini ćelija, a koji pripadaju glavnom kompleksu histokompatibilnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) [29, 30]. Klasu I HLA (A, B, C) eksprimiraju sve ćelije sa jedrom. Konstitutivna ekspresija klase II HLA (DR, DQ, DP) ograničena je na APC (makrofagi, dendritične ćelije i B-ćelije), premda može doći do ushodne regulacije njihove ekspresije u epitelnim i vaskularnim endotelnim ćelijama pod uticajem proinflamatornih citokina [30, 31]. Određivanje HLA podudarnosti između primaoca i donora (HLA klase I i HLA DR) je obavezno pre izvođenja transplantacije na osnovu važećih smernica, dok je preporuka testiranje na HLA DQ i DP (kod senzibilisanih pacijenata) [25]. Donor-specifična antitela mogu biti prisutna u krvi primaoca bubrega pre transplantacije usled senzibilizacije pacijenata na HLA putem prethodnih transplantacija, trudnoće i transfuzija krvi (prethodno formirana DSA), ili se mogu formirati nakon operacije transplantacije (*de novo* DSA). Posledično, prethodno formirana DSA su odgovorna za hiperakutno odbacivanje, ubrzano akutno odbacivanje (odloženo hiperakutno) i rano akutno ABMR, dok *de novo* DSA uzrokuju kasno akutno ABMR, hronično ABMR i glomerulopatiju transplantata. *De novo* DSA se uglavnom razvijaju u toku prve post-transplantacione godine, međutim mogu se javiti i nekoliko godina nakon transplantacije [31]. Kako je u osnovi ABMR aloimuna aktivacija, važno je razmotriti ulogu citokina, hemokina i faktora rasta, medijatora imunološkog sistema u formiranju DSA i ABMR.

Akutno ABMR je uglavnom uzrokovano prethodno formiranim DSA usmerenih protiv HLA klase I ili II koja dovode do odbacivanja posredstvom mehanizma zavisnog od klasičnog sistema komplementa i komplement-nezavisnog puta [31]. U slučaju oštećenja grafta koje je nezavisno od sistema komplementa, DSA mogu direktno delovati na proliferaciju endotelnih ćelija ili mogu pokrenuti ćelije urođenog imuniteta (NK ćelije, (engl. *natural killer*), makrofage i neutrofile) preko Fc receptora i dovesti do antitelima-zavisne celularne citotoksičnosti (**Slika 2.1**) [31, 32]. Na osnovu Banff kriterijuma iz 2019. godine, akutno aktivno ABMR treba da zadovolji tri kriterijuma za dijagnozu, odnosno prisustvo histoloških promena (mikrovaskularna inflamacija, intimalni ili transmuralni arteritis, akutna

trombotička mikroangiopatija i akutno tubularno oštećenje), imunohistološki dokaz o skorašnjoj/trenutnoj interakciji antitela sa endotelom i serološka pozitivnost na cirkulišuća DSA. Imunohistološki i serološki pokazatelji su isti za aktivno i hronično ABMR, sa krucijalnom razlikom u pogledu pratećih histoloških promena kod hroničnog ABMR (transplantaciona glomerulopatija, raslojavanje bazalne membrane peritubularnih kapilara, fibroza intime arterija) [33, 34]. Hronično ABMR se vezuje za *de novo* DSA usmerena protiv HLA klase II koja koriste komplement-nezavisne mehanizme [32].



**Slika 2.1** Predloženi patogenetski mehanizmi donor-specifičnih antitela kod odbacivanja posredovanog antitelima (preuzeto i prilagođeno iz Zhang [31])

Odbacivanje posredovano T-limfocitima (celularno) se uglavnom javlja u prvih nekoliko nedelja ili meseci nakon transplantacije bubrega. Dijagnostički kriterijumi za akutno TCMR zasnivaju se na morfološkim promenama u tubulointercijumu (stadijum IA i IB) do intimalnog arteritisa (stadijum IIA i IIB) i transmuralnog arteritisa i/ili arterijske fibronoidne nekroze (stadijum III) [34]. Akutno TCMR je faktor rizika za produkciju *de novo* DSA i posledično hronično aktivno ABMR. Za dijagnozu hroničnog aktivnog TCMR je potrebna

inflamacija u području korteksa sa IF/TA i tubulitis (stadijum I) ili hronična alograftna ateropatija (stadijum II) [24, 34]. Za razliku od hroničnog aktivnog ABMR, smatra se da hronični aktivni TCMR ne korelira sa gubitkom grafta. Njegova učestalost se progresivno smanjuje sa godinama proteklim od transplantacije bubrega, te je pojava hroničnog aktivnog TCMR nakon 5 godina vrlo retka, dok se hronični aktivni ABMR može javiti godinama i decenijama nakon transplantacije [35].

Za razliku od tretmana epizoda ranog akutnog odbacivanja, još uvek nema obećavajućih nalaza u vezi efikasnosti lekova koji se potencijalno mogu primeniti u prevenciji i lečenju hroničnog odbacivanja, posebno ABMR [29]. Iako je biopsija bubrega zlatni standard za dijagnozu odbacivanja, ona je skupa, invazivna i rizična metoda sa lošom reproducibilnošću u interpretaciji rezultata [32]. Stoga se kao imperativ nameće pronalaženje isplativih, lako dostupnih, neinvazivnih prediktivnih biomarkera koji bi omogućili identifikaciju pacijenata u riziku za odbacivanje i time omogućili blagovremene intervencije i posledično bolje terapijske ishode kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. U cilju prevencije odbacivanja transplantiranog organa koriste se imunosupresivni lekovi.

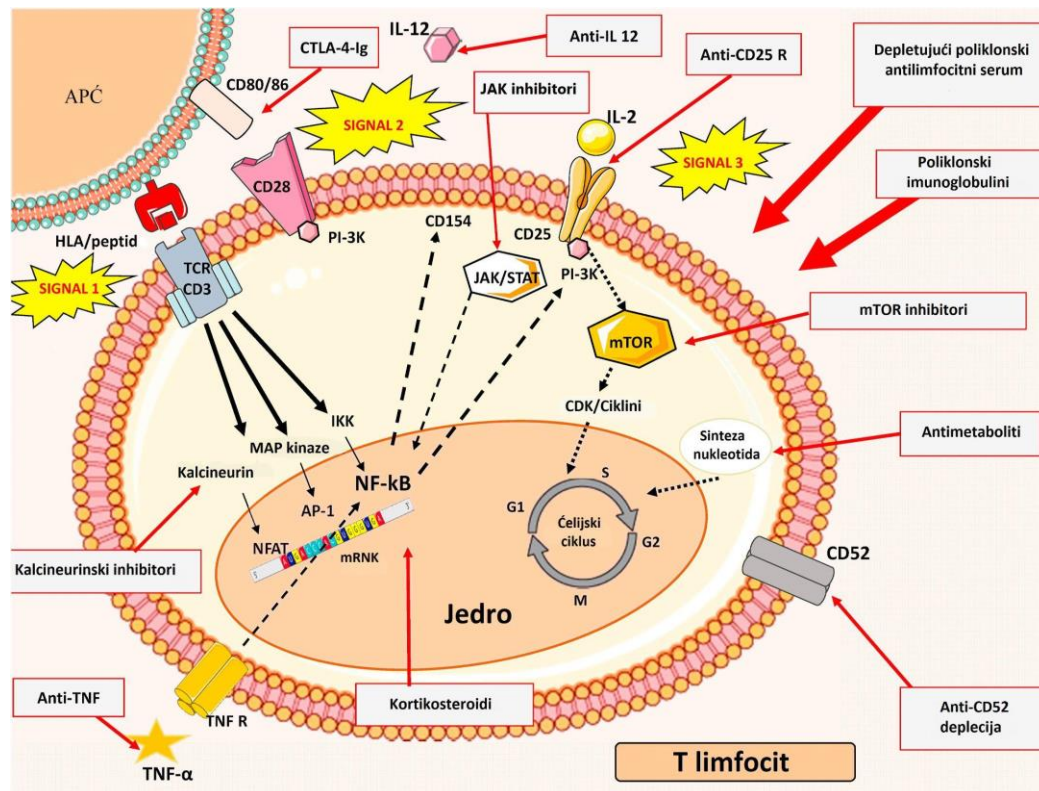
## 2.2 Imunosupresivni lekovi u kliničkoj praksi

Primarni cilj imunosupresivne terapije podrazumeva prevenciju odbacivanja grafta i indukovanje imunološke tolerancije [30]. Fokus imunosupresivnih protokola se tokom vremena znatno pomera sa smanjenja incidence akutnog odbacivanja na unapređenje dugoročnog preživljavanja grafta i pacijenata uz minimiziranje neželjenih efekata primenjene terapije [36]. Nakon transplantacije organa, imunosupresivna terapija se sprovodi u nekoliko koraka: indukciona imunosupresivna terapija, inicijalna terapija održavanja i dugoročna terapija održavanja.

*Indukciona imunosupresivna terapija* se ordinara neposredno pre, u vreme ili neposredno nakon transplantacije [28, 37], a ima za cilj da inhibira limfocite (deplecioni agensi) ili modulira T-limfocitni odgovor prilikom prezentacije donorskih antigena (antagonisti IL-2 receptora). Glavni indukcionni agensi su biološki lekovi-antitela, i to baziliksimumab, alemtuzumab i anti-timocitni globulin (ATG) [38]. Kao prva linija se preporučuju antagonisti IL-2 receptora (baziliksimumab), dok se kod primaoca bubrega sa visokim imunološkim rizikom kao prva linija preporučuju deplecioni agensi (ATG). Dodatno, u fazi indukcije primenjuju se pulsne doze kortikosteroida (npr. metilprednizolona) [28]. Baziliksimumab je rekombinantno himerno čovek/miš monoklonsko antitelo, koje se u

indukcionoj terapiji primenjuje kao intravenska infuzija/bolus u dve doze: u roku od 2 sata nakon operacije i 4. dana nakon operacije. Ovo antitelo inhibira proliferaciju T-limfocita vezivanjem za  $\alpha$  lanac IL-2 receptora (IL-2R/CD25) na površini antigen-aktiviranih T-limfocita [39].

*Imunosupresivna terapija održavanja* je dugoročna terapija sa čijom primenom se započinje pre ili u vreme transplantacije (sa ili bez indukcione terapije). Prvobitno se imunosupresivni agensi primenjuju u većim dozama u prva tri post-transplantaciona meseca sa ciljem sprečavanja epizoda akutnog odbacivanja (inicijalna terapija održavanja). Nakon faze adaptacije, nastavlja se sa dugoročnom terapijom održavanja, koja uglavnom uključuje iste lekove, pri čemu se doze lekova postepeno smanjuju u odnosu na profil rizika individualnog pacijenta (rizik za akutno odbacivanje/rizik za neželjena dejstva lekova) [28]. Imunosupresivni agensi se daju u kombinaciji kako bi se postigao adekvatan nivo imunosupresije i ciljano delovalo na više mehanizama koji dovode do imunološkog odgovora pacijenta protiv transplantiranog organa (aloimunološki odgovor), uz istovremeno minimiziranje neželjenih efekata [38]. Mehanizam dejstva imunosupresivnih lekova se zasniva na inhibiciji jednog ili više ključnih koraka u 3-signalnom modelu T-limfocitne aktivacije i proliferacije [40]. Mehanizam dejstva imunosupresiva prikazan je na **Slici 2.2**.



**Slika 2.2** Ciljevi glavnih imunosupresiva na T-limfocitima i antigen-prezentujućim ćelijama (preuzeto i prilagođeno iz *Meneghini i sar.* [41])

Aloimunološki odgovor započinje prepoznavanjem antigena donora od strane „naivnih” T-limfocita direktnim ili indirektnim mehanizmom (*signal 1*). Za direktni mehanizam je karakteristična migracija dendritičnih ćelija donora iz transplantiranog organa u limfoidno tkivo primaoca (sekundarne limfne organe) gde prezentuju intaktne donorske MHC molekule T-limfocitima primaoca organa. Kod indirektnog mehanizma, nakon internalizacije i obrade donorskih antigena, dendritične ćelije primaoca organa prezentuju T-limfocitima peptide iz transplantiranog organa [38]. Klasa I MHC molekula predstavlja antigene CD8<sup>+</sup> T-limfocitima, dok klasa II MHC molekula prezentuje antigene CD4<sup>+</sup> T-limfocitima. Direktni mehanizam aloimunog prepoznavanja se vezuje za akutno odbacivanje, dok se smatra da je indirektni mehanizam karakteristika hroničnog odbacivanja. Objašnjenje leži u činjenici da donorske dendritične ćelije imaju ograničen životni vek (nekoliko nedelja ili meseci nakon transplantacije), odnosno vremenom dolazi do njihove zamene dendritičnim ćelijama primaoca [38, 42, 43]. Međutim, pojedini autori sugerišu da oba mehanizma opstaju tokom „životnog veka” transplantata, premda se direktno prepoznavanje aloantigena verovatno odvija pomoću trećeg mehanizma (polu-direktni mehanizam) [42].

Nakon prepoznavanja antigena i aktivacije T-limfocitnog receptora (TCR), „naivni” CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfociti diferenciraju u efektorne ćelije, i to CD4<sup>+</sup> T-limfociti u Th1, Th2, Th17, folikularne (Tfh) i regulatorne T-limfocite (Treg) u zavisnosti od citokinskog miljea, a CD8<sup>+</sup> T-limfociti u citotoksične T-limfocite. *Signal 2* uključuje kostimulaciju, odnosno interakciju CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) na površini APC i CD28 na površini T-limfocita [38, 42]. *Signal 1* i *signal 2* dovode do aktivacije tri signalna puta: kalcijum-kalcineurinski, RAS-mitogen aktivirana proteinska kinaza (MAPK) signalni put i protein kinaza C nuklearni faktor-κB (NF-κB) signalni put [30]. Ova tri signalna puta omogućavaju aktivaciju transkripcionih faktora, nuklearnog faktora aktiviranih T-limfocita (NFAT), aktivirajućeg proteina-1 (AP-1) i NF-κB, koji zatim pokreću transkripciju faktora rasta, uključujući citokine, prvenstveno IL-2. Interleukin-2 nakon interakcije sa receptorom pokreće intracelularnu signalnu kaskadu, odnosno aktivaciju „mammalian target of rapamycin” (mTOR) i fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI-3K) signalnih puteva, što je krajnji okidač za proliferaciju T-limfocita (*Signal 3*) [40].

U savremenoj kliničkoj praksi se preko 90% imunosupresivnih protokola održavanja bazira na KNI, pre svega Tak, u kombinaciji sa antimetabolitom mikofenolat-mofetilom (MMF)/mikofenolat-natrijumom (MPS), sa ili bez kortikosteroida [44]. Imunosupresivni protokol koji se sastoji od belatacepta, MMF/MPS i kortikosteroida je trenutno jedini protokol bez KNI odobren od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA, engl. *Food*

and Drug Administration) za primenu kod pacijenata seropozitivnih na *Epstein–Barr* virus (EBV) [45].

Kortikosteroidi su sastavni deo inicijalne imunosupresivne terapije, a prisutni su preko 50 godina u transplantacionoj medicini [37]. Glavni predstavnici su prednizon i metilprednizolon. Mehanizam dejstva kortikosteroida se zasniva na inhibiciji transkripcionih faktora NF- $\kappa$ B i AP-1, čime se sprečava transkripcija proinflamatornih gena i posledična ekspresija citokina neophodnih za T-limfocitnu aktivaciju [26, 41]. Iako su potentni imunosupresivi, dugotrajna primena kortikosteroida je udružena sa mnogobrojnim neželjenim dejstvima, kao što su hiperglikemija, hipertenzija, hiperlipidemija, osteoporoza, avaskularna nekroza, katarakta [28, 37]. Iz tog razloga se razvila težnja ka primeni imunosupresivnih protokola koji ne uključuju kortikosteroide (engl. *steroid-free*) ili ranom/kasnom ukidanju kortikosteroida iz protokola (engl. *steroid withdrawal*). Međutim, veći broj sprovedenih studija je pokazalo da ukidanje kortikosteroida znatno povećava rizik za akutno odbacivanje, pri čemu su kratkoročno i dugoročno preživljavanje pacijenata i grafta bili uporedivi među protokolima sa i bez kortikosteroida [37, 45]. Takođe, uticaj ukidanja kortikosteroida na neželjene efekte povezane sa njihovom upotrebom je ograničen, što se donekle može objasniti činjenicom da se kortikosteroidi u dugoročnoj terapiji održavanja primenjuju u malim dozama koje uglavnom ne dovode do težih neželjenih efekata.

Od uvođenja u kliničku praksu do danas, KNI čine okosnicu imunosupresivnih protokola nakon transplantacije solidnih organa. Kalcineurinski inhibitori inhibiraju kalcijum-kalcineurinski signalni put [26]. Naime, vezivanjem za svoje citoplazmatske receptore (imunofiline) blokiraju fosfatazu kalcineurin, što za posledicu ima inhibiciju transkripcije i produkcije IL-2 [40]. Takođe, KNI sprečavaju progresiju T-limfocita iz G0 u G1 fazu ćelijskog ciklusa [41]. Ciklosporin A (CsA) je bio lek izbora u transplantaciji solidnih organa poslednje dve decenije 20. veka. Međutim, on je potpuno potisnut od strane Tak iz imunosupresivnih protokola [37].

Mikofenolat mofetil je pro-lek, koji se nakon oralne primene brzo i potpuno biotransformiše pod dejstvom esteraza u aktivni metabolit mikofenolnu kiselinu (MFK). Pro-lek i njegov aktivni metabolit spadaju u grupu antiproliferativnih agenasa, koji svoje efekte ostvaruju selektivnom, reverzibilnom inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze tipa II, enzima ključnog u *de novo* sintezi purina guanina. Na ovaj način je poremećena DNK replikacija i proliferacija T- i B-limfocita [37, 41]. Zbog povoljnog profila neželjenih dejstava, MMF/MFK su deo skoro svih (preko 90%) savremenih imunosupresivnih režima u svetu [46]. Naime, oni ne ispoljavaju nefrotoksične, hiperlipidemične, hipertenzivne ili

dijabetogene efekte [47]. Iako poseduje značajan immunosupresivni potencijal, pokušaji da MMF bude primarni immunosupresiv, odnosno da KNI ne bude deo protokola održavanja, rezultirali su povećanim rizikom za akutno i hronično odbacivanje [37, 48]. S tim u vezi, potentnost MMF se prevashodno može ogledati u mogućnosti minimizacije KNI kod pacijenata sa hroničnom disfunkcijom grafta [37].

mTOR inhibitori, sirolimus (SIR) i everolimus (EVR), deluju na *signal 3*, odnosno inhibiraju proteinsku kinazu mTOR, koja je ključna u procesu proliferacije T-limfocita [49]. Ovim mehanizmom se blokira progresija T-limfocita iz G1 u S fazu ćelijske deobe. Sirolimus i EVR su strukturno slični Tak, vezuju se za isti intracelularni imunofilin FK-vezujući protein 12 (FKBP12, engl. *FK-binding protein 12*), ali umesto inhibicije kalcineurina, kompleks FKBP12–SIR/EVR inhibira mTOR. Smatra se da mTOR inhibitori smanjuju stopu maligniteta i citomegalovirusnih (CMV) i BK virusnih infekcija, neželjenih dejstava koja se vezuje za upotrebu KNI [41]. Stoga mogu biti alternativni immunosupresivi izbora kod pacijenata koji su iskusili pomenute neželjene efekte KNI. Generalno, strategija konverzije KNI nekim od mTOR inhibitora može biti prihvatljiva opcija samo kod pacijenata niskog imunološkog rizika sa normalnom bubrežnom funkcijom i niskom proteinurijom [50]. Ipak, mTOR inhibitore prevashodno treba posmatrati kao alternativu antiproliferativnom agensu u kombinaciji KNI+MMF/MFK, ali u tom slučaju treba težiti minimizaciji doze i izloženosti Tak zbog sinergističnih nefrotoksičnih efekata [45]. Iako su efekti mTOR inhibitora i MMF/MFK na stopu akutnog odbacivanja i preživljavanje pacijenta i grafta uporedivi, mTOR inhibitori izazivaju više neželjenih efekata. Najznačajniji neželjeni efekti mTOR inhibitora su: hiperlipidemija, limfocele, mukozitis, edem i proteinurija [37, 50].

Belatacept je rekombinantni fuzioni protein, koji se sastoji iz citotoksičnog T-limfocit udruženog antigena-4 (CTLA-4) i fragmenta Fc domena humanog imunoglobulina G1 (IgG1). On deluje na *signal 2*, odnosno vezuje se za CD80/CD86 ligande na APC i time blokira CD28-posredovanu kostimulaciju i posledičnu aktivaciju T-limfocita [30]. Iako se kontinuirano ispituju mogućnosti zamene KNI kao primarnog immunosupresiva mTOR inhibitorom ili belataceptom, sprovedene studije za sada nisu dale ubedljive dokaze o potencijalnim benefitima potpune zamene KNI drugim lekom [45]. Njegovo odobrenje od strane FDA bazirano je na rezultatima dveju studija BENEFIT i BENEFIT-EXT [51-54]. Lek je namenjen za intravensku primenu, a indikacija je profilaksa odbacivanja organa kod odraslih pacijenata sa transplantiranim bubregom niskog imunološkog rizika koji su seropozitivni na EBV. Primena kod EBV seronegativnih pacijenata je kontraindikovana zbog povećanog rizika od post-transplantacionog limfoproliferativnog poremećaja, pretežno

centralnog nervnog sistema [25, 55]. Pored toga, tokom post-marketinške faze primene belatacepta u kliničkoj praksi, uočene su znatno visoke stope akutnog odbacivanja, što je kompromitivalo njegovu širu upotrebu (<5% pacijenata u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD)) [45]. U **Tabeli 2.1** su prikazani potencijalni lekovi za primenu u transplantaciji bubrega i drugih organa [30, 56, 57].

**Tabela 2.1** Pregled potencijalnih lekova za primenu u transplantaciji bubrega

Lek	Mehanizam dejstva	Komentar
Alemtuzumab (humanizovano monoklonsko antitelo)	Vezuje se za CD52 na B i T-limfocitima, ćelijama prirodnim ubicama (NK), monocitima i dendritičnim ćelijama, izazivajući lizu i produženu depleciju.	Faza IV kliničkog ispitivanja (indukciona terapija; tretman steroid-rezistentnog akutnog odbacivanja)
Anti-CD38 monoklonsko antitelo (daratumumab)	Vezuju se za CD38 na plazma ćelijama, T- i B-limfocitima i NK ćelijama i dovodi do njihove deplecije.	Faza II kliničkog ispitivanja (Desenzitizacija recipijenata pre transplantacije)
Anti-CD40 monoklonsko antitelo (iscalimab - CFZ533)	Blokada kostimulacije.	Faza II kliničkog ispitivanja (imunosupresivna terapija održavanja) -dalja ispitivanja obustavljena
Belimumab (humano monoklonsko antitelo)	Imunomodulacija. Inhibira citokin B-limfocit stimulator (BLyS).	Faza II kliničkog ispitivanja (prevencija odbacivanja)
Bortezomib	Proteazomni inhibitor. Deplecija i apoptoza plazma ćelija.	Faza II (tretman hroničnog ABMR)/Faza IV kliničkog ispitivanja (indukciona terapija, desenzitizacija)
Ekulizumab (humanizovano monoklonsko antitelo)	Inhibira C5 komponentu sistema komplementa.	Faza II/III kliničkog ispitivanja (prevencija ABMR/prevencija odložene funkcije grafta)
Imlifidaza	IgG-degradirajući enzim.	Faza II/III kliničkog ispitivanja (tretman ABMR/Desenzitizacija recipijenata pre transplantacije)
Rituksimab (himerno monoklonsko antitelo)	Vezuje se za CD20 na B-limfocitima i dovodi do njihove deplecije.	Faza II/III kliničkog ispitivanja (prevencija akutnog odbacivanja/Faza IV (tretman ABMR/indukciona terapija)
Sotrastaurin (AEB071)	Oralni inhibitor protein kinaze C.	Faza II kliničkog ispitivanja (prevencija akutnog odbacivanja)
Tocilizumab/Klazakizumab	Blokada IL-6 ili IL-6 receptora (IL-6R).	Faza III kliničkog ispitivanja (tretman hroničnog ABMR)
Tofacitinib	Sintetski molekul. Vezuje se za citoplazmatsku tirozin kinazu (Janus kinazu JAK3), inhibira citokin-indukovanu signalizaciju.	Faza II kliničkog ispitivanja (prevencija akutnog odbacivanja)
Voklosporin (ISA 247) Analog ciklosporina	Kalcineurinski inhibitor.	Faza II kliničkog ispitivanja (studija faze III obustavljena)
Adoptivni transfer <i>ex vivo</i> ekspondovanih regulatornih T-limfocita	Imunomodulacija.	Faza I/II kliničkog ispitivanja.
Adoptivni transfer mezenhimijalnih stem ćelija	Imunomodulacija.	Faza I/II kliničkog ispitivanja.

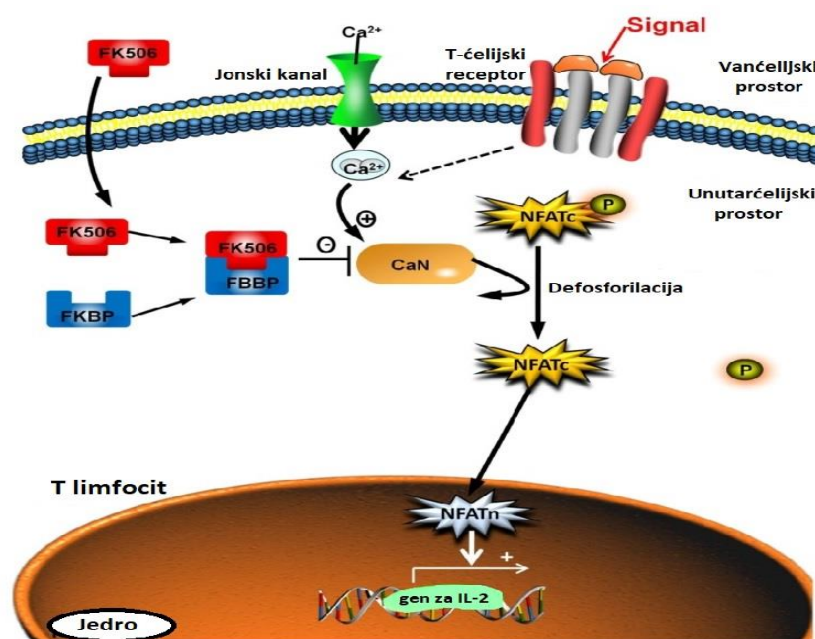
Iako postoje nastojanja da se Tak zameni novim, jednako efikasnim, ali bezbednijim imunosupresivnim agensom, dosadašnji pokušaji su imali ograničen uspeh, uglavnom usled manje potentnosti u pogledu prevencije akutnog odbacivanja i ozbiljnih neželjenih efekata. Stoga se očekuje da će Tak ostati osnova imunosupresivne terapije solidnih organa i u godinama koje slede.

## 2.3 Takrolimus

Takrolimus (FK506), makrolidni lakton, je izolovan 1987. godine iz *Streptomyces tsukubaensis*. Prvobitno je odobren za primenu kod transplantacije jetre 1994. godine od strane FDA. U predstojećim godinama, Tak postaje okosnica savremene imunosupresivne terapije kod transplantacije solidnih organa, uključujući transplantaciju bubrega [58].

### 2.3.1 Mehanizam dejstva takrolimusa

Takrolimus pripada grupi KNI, čiji se mehanizam dejstva zasniva na inhibiciji sinteze IL-2 i aktivacije T-limfocita. Naime, Tak ostvaruje imunosupresivni efekat vezivanjem za citoplazmatski proteinski receptor FKBP12, pri čemu se formirani kompleks lek-receptor vezuje i blokira funkciju enzima kalcineurina. Kalcineurin defosforiliše citoplazmatsku komponentu NFAT, time omogućava njen transport do jezgra, vezivanje za nuklearnu komponentu NFAT i indukciju NFAT posredovane transkripcije gena, uključujući IL-2 (Slika 2.3) [59, 60].



Slika 2.3 Mehanizam dejstva takrolimusa (preuzeto i prilagođeno iz Bennet i sar. [61])

U savremenoj kliničkoj praksi, preko 90% transplantiranih bubrežnih pacijenata je na Tak-baziranoj imunosupresivnoj terapiji. U 2023. godini, 68,8% pacijenata je bilo na trostrukom imunosupresivnom režimu (Tak, MMF i kortikosteroidi), dok je 24,7% pacijenata bilo na imunosupresivnom režimu bez kortikosteroida (Tak i MMF) [44]. Takrolimus je u potpunosti potisnuo CsA zbog veće efikasnosti i boljeg profila neželjenih efekata. Iako su im neželjeni efekti u osnovi slični, Tak se karakteriše nižom učestalošću hiperlipidemije, promena na koži, hirzuitizma i hiperplazije gingiva, ali pokazuje veću učestalost post-transplantacionog dijabetes melitusa (PTDM) i neurotoksičnosti [62]. Dodatno, nefrotoksičnost KNI znatno komplikuje sprovođenje post-transplantacione imunosupresivne terapije. Rezultati studija nisu konzistentni, ali se čini da Tak i CsA imaju sličan intrinzički (sopstveni) nefrotoksični potencijal [63]. Objavljeni sistemski pregledni radovi i meta-analize su kao zaključak ukazale da je Tak superiorniji u odnosu na CsA u pogledu smanjene incidence gubitka grafta (poboljšano preživljavanje grafta), prevencije akutnog odbacivanja i smanjene incidence hiperholesterolemije, dok je CsA superiorniji u odnosu na Tak u pogledu smanjene incidence PTDM [64, 65].

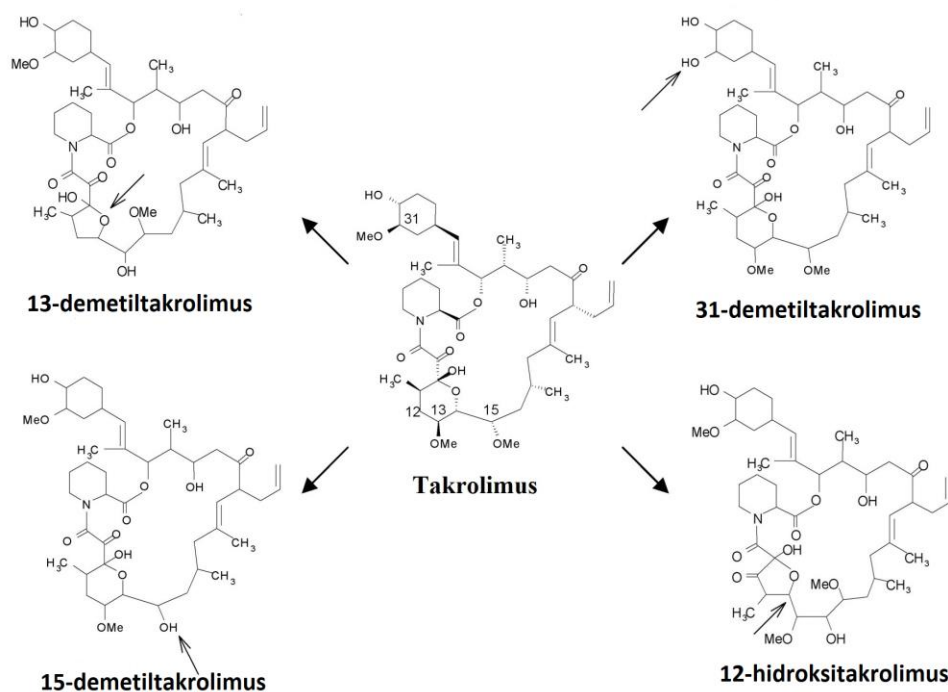
### **2.3.2 Farmakokinetičke karakteristike takrolimusa**

Takrolimus se karakteriše značajnom interindividualnom varijabilnošću u brzini resorpcije, pri čemu većina pacijenata dostiže maksimalne koncentracije leka u krvi ( $C_{max}$ ,  $C_{peak}$ ) 1-2 sata nakon oralne primene leka [1, 66]. Apsolutna bioraspoloživost Tak je niska, u proseku 25% (5-90%), pri čemu značajnu ulogu ima presistemski metabolizam (metabolizam prvog prolaza) u tankom crevu i jetri, uključujući i efluks iz creva posredovan transporterima [58, 62]. CYP3A izoenzimi i ATP-zavisna efluks pumpa P-glikoprotein (PGP) su odgovorni za izraženi presistemski metabolizam. Subfamilija CYP3A izoenzima je u crevu prisutna u koncentracijama koje su 10-50% udela onih u jetri, dok kod nekih pojedinaca intestinalne koncentracije mogu biti iste ili čak veće od koncentracija u jetri. P-glikoprotein (proizvod ABCB1 gena), eliminiše resorbovani lek nazad u lumen gastrointestinalnog trakta (GIT), smanjujući njegovu intraćelijsku koncentraciju [66]. Ovim mehanizmom se CYP3A izoenzimima ograničava pristup leku i sprečava njihova saturacija [67].

Nakon što Tak dospe u sistemsku cirkulaciju, on se u najvećem procentu kumulira u eritrocitima (85-95%), pri čemu su koncentracije u punoj krvi u proseku 15 puta (rang 4-114) više od koncentracija u plazmi. U plazmi je oko 99% leka vezano za proteine, i to 60% za albumin i  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein, 30% za lipoprotein velike gustine (HDL, engl. *high-density lipoprotein*), 8% za lipoprotein niske gustine (LDL, engl. *low-density lipoprotein*) i 1% za

lipoprotein veoma niske gustine (VLDL, engl. *very-low-density lipoprotein*) [68]. Usled obimnog vezivanja za eritrocite i proteine plazme, prividni volumen distribucije Tak baziran na koncentracijama u krvi iznosi 1–1,5 L/kg [69]. Slobodna frakcija leka (oko 1%), koja je u ravnoteži sa koncentracijom leka u tkivu, odgovorna je za terapijske, ali i za neželjene efekte Tak [62, 67].

Takrolimus se uglavnom eliminiše procesom metabolizma u jetri preko CYP3A5 i CYP3A4, pri čemu metabolizam na nivou GIT značajno doprinosi eliminaciji Tak iz organizma. Funkcionalni CYP3A4 se nalazi u jetri i tankom crevu svih ljudi, dok je CYP3A5 pored jetre i tankog creva prisutan i u bubrezima, ali samo kod pacijenata koji ekspimiraju funkcionalno aktivni CYP3A5 protein (tzv. ekspresori) [70]. Polimorfizam 6986A/G u CYP3A5 genu je odgovoran za različitu ekspresiju CYP3A5 proteina, tj. da li će pojedinac biti ekspresor ili ne-ekspresor ovog izoenzima [71, 72]. CYP3A4 je najzastupljeniji CYP izoenzim u jetri, dok je CYP3A5 prisutan sa znatno manjim udelom. Zastupljenost se može promeniti kod ekspresora, te sadržaj CYP3A5 može biti od 6 do 99% ukupnog sadržaja CYP3A u jetri. CYP3A5 ima glavnu ulogu u metabolizmu Tak kod ekspresora, pri čemu je intrinzički klirens (CL) Tak dva puta veći za CYP3A5 nego za CYP3A4 [66, 70, 73].



**Slika 2.4** Odabrani metaboliti takrolimusa (preuzeto i prilagođeno iz *Dai i sar.* [74])

Opisano je do 15 različitih Tak metabolita, dok je 5 metabolita izolovano iz krvi pacijenata sa transplantiranim bubregom (demetil-, demetilhidroksi-, didemetil-, didemetilhidroksi- i hidroksi-Tak), pri čemu su najzastupljeniji demetilhidroksi- i demetil-Tak (**Slika 2.4**). Terminalno poluvreme eliminacije Tak je prosečno 12h (opseg 4-41h) [58]. Metaboliti Tak se prvenstveno izlučuju putem žuči (>90%), dok se manje od 5% nepromenjenog Tak i njegovih metabolita izlučuje putem urina [66, 73].

### 2.3.3 Terapijski monitoring takrolimusa

Takrolimus je značajno smanjio incidencu akutnog odbacivanja grafta i poboljšao jednogodišnje preživljavanje pacijenta i grafta [1]. Međutim, njegovu kliničku primenu komplikuju uska terapijska širina, izražena farmakokinetička inter- i intraindividualna varijabilnost i hronična nefrotoksičnost leka [59]. Iz navedenih razloga, neophodno je rutinsko sprovođenje terapijskog monitoringa leka (TDM, engl. *therapeutic drug monitoring*) kako bi se  $C_0$  (Ctrough, engl. *trough concentration in the whole blood*) održavale u optimalnom opsegu. Primena TDM se u savremenoj kliničkoj praksi smatra standardnim pristupom za prilagođavanje doze Tak na osnovu izmerene Tak  $C_0$ , iako postoje brojna ograničenja u vezi sa njegovom upotrebom [67]. Naime, korelacija Tak  $C_0$  i površine ispod krive (AUC, engl. *area under the curve*), kao mere ukupne izloženosti organizma leku, daleko je od idealne i konstantno se menja tokom vremena proteklog od transplantacije. Dodatno ograničenje je i varijabilnost analitičkih metoda korišćenih za merenje Tak  $C_0$ , kao i činjenica da je odnos između Tak  $C_0$  i ishoda (akutnog odbacivanja ili toksičnosti) i dalje kontroverzan [75]. Međutim, i pored brojnih prednosti, korišćenje Tak AUC umesto  $C_0$  bi bilo povezano sa finansijskim i logističkim ograničenjima usled potrebe za višestrukim uzorkovanjem krvi. Pored toga, ne postoje čvrsti dokazi o ciljnim vrednostima AUC. Na kraju, potrebno je sprovođenje daljih studija kako bi se jasno utvrdila veza između AUC i kliničkih ishoda [76].

Aktuelne preporuke ukazuju da su ciljne  $C_0$  između 8 i 12 ng/mL u prva tri meseca nakon transplantacije, odnosno 6-10 ng/mL u toku prve post-transplantacione godine i 5-8 ng/mL nakon tog perioda (kombinacija sa MMF) [77]. Ipak, većina stručnjaka smatra da je prihvatljivo da koncentracija Tak u krvi bude u optimalnom opsegu 5-15 ng/mL nezavisno od post-transplantacionog perioda. I pored široke upotrebe i obimnog proučavanja već skoro dve decenije, i dalje ne postoji konsenzus za uniformni ciljni opseg Tak koncentracija.

Za inter- i intraindividualnu varijabilnost u farmakokinetici Tak postoje brojni literaturni podaci o povezanosti sa nepovoljnim dugoročnim post-transplantacionim ishodima

[67]. Dodatno, potrebno je razmotriti njihovu kombinovanu procenu u cilju kategorizacije pacijenata prema riziku za javljanje nepovoljnih post-transplantacionih ishoda i posledično gubitka grafta.

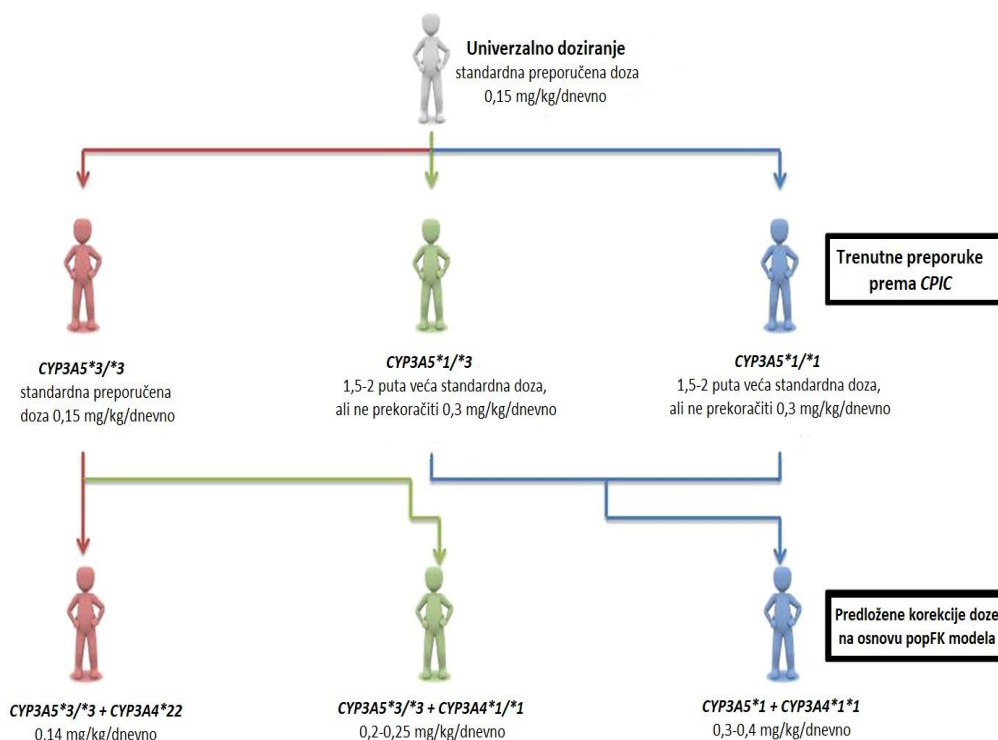
#### **2.3.4 Interindividualna varijabilnost u izloženosti takrolimusa**

Interindividualna varijabilnost u dispoziciji Tak je dobro poznat entitet na koji mogu da utiču brojni faktori, kao što su demografski faktori (pol, starost, rasa), genske varijacije enzima i transportera koji učestvuju u metabolizmu i dispoziciji Tak (CYP3A4, CYP3A5, ABCB1), interakcije lekova i cirkadijalni ritam [1]. Lek-lek interakcije se mogu javiti na nivou apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije, pri čemu Tak najčešće ostvaruje interakcije na nivou metabolizma. Simultana primena Tak sa umerenim ili jakim CYP3A inhibitorima/induktorima (inhibitori: makrolidi, azoli; induktori: rifampicin), kao i inhibitorima/induktorima PGP (inhibitori: eritromicin, verapamil, diltiazem; induktori: rifampicin, karbamazepin) može povećati ili smanjiti oralnu bioraspoloživost Tak i dovesti do klinički značajnih interakcija [78].

Jedna od najznačajnijih determinanti interindividualne varijabilnosti u izloženosti Tak je genska varijacija u CYP3A5 genu. CYP3A5 gen je visoko polimorfan, pri čemu najviše proučavan polimorfizam uključuje zamenu adenina (A) guaninom (G) u poziciji 6986 u intronu 3 gena za CYP3A5 (*rs776746*). Heterozigoti i homozigoti nosioci alela divljeg tipa CYP3A5\*A (CYP3A5\*1) produkuju visoke nivoe kompletne iRNK i spadaju u grupu CYP3A5 ekspresora. Homozigoti nosioci mutiranog alela CYP3A5\*G (CYP3A5\*3) produkuju veoma male ili nedetektabilne nivoe CYP3A5 proteina, i spadaju u grupu CYP3A5 ne-ekspresora [70]. Veliki je broj kliničkih studija čiji je fokus bilo ispitivanje uticaja CYP3A5 6986A/G polimorfizma na potrebe u dozi Tak, i nedvosmisleno je pokazano da nosioci bar jednog CYP3A5\*1 alela mogu zahtevati duplo veće doze Tak u odnosu na nosioce CYP3A5\*3/\*3 genotipa za održavanje Tak  $C_0$  u željenom opsegu. Međutim, CYP3A5 genski polimorfizam ne objašnjava celokupnu varijabilnost u potrebama u dnevnoj dozi Tak. Prema nekim autorima, CYP3A5 genotip može objasniti približno 35% varijabilnosti u izloženosti Tak [79].

Od ostalih genskih varijacija, polimorfizam CYP3A4 gena, CYP3A4\*22, (*rs35599367*), je od najvećeg interesa, jer ima potencijal za objašnjenje dodatnog dela rezidualne varijabilnosti u farmakokinetici Tak [80]. Ovaj genski polimorfizam karakteriše tranzicija C (citozina) / T (timinom) u intronu 6 CYP3A4 gena i smanjenja CYP3A4 aktivnosti u jetri, što vodi smanjenom CL Tak, te izučavanje ima smisla samo kod CYP3A5

ne-ekspresora [81, 82]. CYP3A4\*22 polimorfizam je relativno čest kod Kavkasko populacije, tj. bele rase (2,5%-6,9%) [83]. Na osnovu podataka dobijenih iz studija o potencijalnom korišćenju populacionih farmakokinetičkih modela u optimizaciji inicijalne doze Tak, proistekle su preporuke za doziranje bazirano na farmakogenetici koje, pored CYP3A5 6986A/G genotipa, treba da razmotri i CYP3A4\*22 genotip (Slika 2.5).



**Slika 2.5** Izbor doze takrolimusa na osnovu CYP3A4/5 genotipa (preuzeto i prilagođeno iz Brunet i sar. [80])

ABCB1 gen (kodira PGP) je polimorfno eksprimiran, ali za razliku od CYP3A5, nijedan polimorfizam ne dovodi do potpunog gubitka funkcije proteina. Zamena C/T u poziciji 3435 u egzonu 26 (*rs1045642*) je najčešće i najviše ispitivan polimorfizam ABCB1 gena, gde je T alel povezan sa smanjenom intestinalnom PGP ekspresijom i aktivnošću *in vivo*. Pored njega, još dva polimorfizma ABCB1 gena su detaljno ispitivana: zamena C sa T u poziciji 1236 u egzonu 12 (*rs1128503*) i zamena G sa T ili A u poziciji 2677 u egzonu 21 (*rs2032582*). Dostupni podaci o povezanosti polimorfizama ABCB1 gena i farmakokinetike Tak su nekonzistentni [70, 83]. Kao potencijalno objašnjenje se navodi da ABCB1 polimorfizmi imaju veći uticaj na lokalnu ćelijsku koncentraciju Tak u samom graftu i kompartmentalizaciju nego na sistemsku izloženost [82].

Iako Tak figurira kao lek izbora kod transplantacije bubrega više od dve decenije, optimizacija i individualizacija doznog režima i dalje predstavlja izazov u savremenoj kliničkoj praksi. Univerzalni pristup doziranju „one size fits all”, ili prikladnije pacijentima sa transplantiranim bubregom „one approach fits all”, gde se prilagođavanje doze isključivo sprovodi na osnovu  $C_0$ , ultimativno ne dovodi do predviđanja sistemskih koncentracija, kao i predikcije dugoročnih post-transplantacionih ishoda [73]. I pored doprinosa farmakogenetičkih biomarkera u objašnjenju varijabilnosti u izloženosti i odgovoru Tak, njihov klinički potencijal bi se prvenstveno odnosio na optimizaciju inicijalne doze Tak i brže postizanje ciljanih Tak  $C_0$  u prvim danima nakon transplantacije [71]. Takođe, uvođenje populacionih farmakokinetičkih modela, koji bi impregnirali farmakogenetičke, zajedno sa demografskim i kliničkim faktorima, uključujući i metode mašinskog učenja, je poželjan iskorak u transplantacionoj medicini. Međutim, ovaj iskorak zahteva sveobuhvatnija istraživanja, pri čemu bi potencijalna limitacija bila translacija rezultata u kliničku praksu i nedostatak obučenosti osoblja da upravlja dobijenim podacima. Stoga je kontinuirano istraživanje jednostavnih i isplativih faktora koji utiču na farmakokinetičku/farmakodinamičku varijabilnost Tak od suštinskog značaja, iako njihova klinička relevantnost možda neće biti odmah očigledna. Postojeći farmakogenetički biomarkeri, pre svega CYP3A5 6986A/G i CYP3A4\*22 polimorfizmi, objašnjavaju samo deo varijabilnosti u izloženosti Tak, te je potrebno ispitati ostale genetičke i negenetičke faktore koji doprinose interindividualnim razlikama u doziranju Tak.

Poslednjih nekoliko godina, intenzivno se ispituje relativno novi parametar-metabolički fenotip Tak, koji se u osnovi zasniva na određivanju Tak  $C_0/D$ , uglavnom u ranom post-transplantacionom periodu (najčešće u 3. post-transplantacionom mesecu). *Thölking i saradnici* [84, 85] su kao graničnu vrednost za kategorizaciju pacijenata prema metaboličkom fenotipu ustanovili vrednost Tak  $C_0/D$  od 1,05 ng/mL/mg, pri čemu su pacijenti kod kojih je  $C_0/D$  vrednost manja od granične okarakterisani kao brzi, oni sa  $C_0/D$  u opsegu 1,05-1,54 kao intermedijarni, dok su pacijenti sa  $C_0/D \geq 1,55$  ng/mL/mg definisani kao spori metabolizeri. Pored jednostavnosti primene, studije su demonstrirale značajnu povezanost između brzog metabolizma Tak (niskih  $C_0/D$ ) i nepovoljnih dugoročnih post-transplantacionih ishoda (smanjena funkcija grafta, lošije preživljavanje pacijenta i grafta, KNI nefrotoksičnost, BK nefropatija) [84, 85, 86].

Iako postularno smatran surogat markerom metabolizma i izloženosti Tak [5, 87], Tak  $C_0/D$  se pre može okarakterisati kao indikator doziranja Tak. Naime, niže vrednosti  $C_0/D$  su povezane sa manjom izloženošću Tak i posledično većim potrebama u dozi da bi se postigao

ili održao ciljni nivo leka. Sprovedene studije navode na zaključak da je minimizacija doze značajnija od snižavanja Tak  $C_0$  vrednosti. Stoga bi kategorizacija pacijenata na osnovu Tak metaboličkog fenotipa mogla biti jednostavna metoda koja bi omogućila individualizaciju imunosupresivne terapije i blagovremenu reakciju kod pacijenata sa rizikom za javljanje nepovoljnih post-transplantacionih ishoda.

### 2.3.5 Intraindividualna varijabilnost u izloženosti takrolimusa

Pored interindividualne farmakokinetičke varijabilnosti, veliki broj kliničkih studija su potvrdile povezanost IPV u izloženosti Tak sa nepovoljnim dugoročnim ishodima nakon transplantacije bubrega (kasno akutno odbacivanje, formiranje *de novo* DSA, lošije preživljavanje pacijenata, hronično odbacivanje i gubitak grafta) [3, 88, 89]. Intraindividualna varijabilnost Tak se definiše kao fluktuacija Tak  $C_0$  vrednosti na nivou pojedinca u toku određenog perioda, pri čemu je doza Tak konstantna [1]. Postoji više metoda za izračunavanje Tak IPV, pri čemu još uvek nije demonstrirana klinički značajna razlika između različitih formula. Najčešće se koristi CV%  $C_0$  ili  $C_0/D$  u periodu između 6 i 12 meseci nakon transplantacije bubrega („stabilan” period). Drugi načini za IPV izračunavanje uključuju korišćenje standardne devijacije (SD), varijanse ( $\sigma^2$ ), srednje apsolutne devijacije (MAD, engl. *mean absolute deviation*), vremenski ponderisanog CV (TWCV, engl. *time-weighted coefficient of variability*) i indeksa varijabilnosti Tak (TVS, engl. *tacrolimus variability score*) [90]. Iako se najveći broj istraživača fokusirao na period između 6 i 12 meseci nakon transplantacije, postoje limitirani podaci o korišćenju Tak IPV određenog u ranoj fazi (<6 meseci), kao i u kasnijim periodima (>12 meseci) nakon transplantacije [91, 92]. Preporuka je da se minimum 3 Tak  $C_0$  vrednosti, određene tokom vanbolničkih rutinskih kontrola, koristi za IPV izračunavanje kod individualnog pacijenta, pri čemu studije prijavljuju medijane od 3 do 15 korišćenih koncentracija [92].

Generalno, IPV vrednosti iznad 30% se smatraju visoko varijabilnim. Međutim, različite granične vrednosti (engl. *cut-offs*) se koriste za kategorizaciju pacijenata u odnosu na Tak IPV, a uglavnom su bazirane na medijani, tercilima i kvartilima IPV vrednosti izmerenih u određenoj populaciji pacijenata [92]. Prethodne studije su pokazale širok spektar vrednosti Tak IPV (<5% do >50%), pri čemu se prosečne vrednosti kreću između 15% i 30% [1]. Glavne determinante koje utiču na Tak IPV su neadherenca pacijenta prema propisanoj terapiji i/ili režimu doziranja i lek-lek, lek-hrana i lek-bolest (dijareja) interakcije, pri čemu je identifikovano još nekoliko važnih faktora, poput tipa analitičkog postupka, formulacije leka, zamene preparata leka i farmakogenetike [1, 93, 94].

Pacijenti sa visokim Tak IPV vrednostima skloniji su subterapijskim i supraterapijskim koncentracijama leka od primaoca organa sa niskim IPV vrednostima, odnosno u većem su riziku za prekomernu (neželjeni efekti Tak) ili smanjenu imunosupresiju (odbacivanje grafta) [3]. Međutim, korišćeni IPV parametri ne mogu da razlikuju da li je varijabilnost nastupila usled fluktuacije nivoa Tak ispod ili iznad terapijskog opsega, odnosno da li su fluktuacije ka višim ili nižim Tak  $C_0$  [93]. Iako se Tak IPV smatra nezavisnim faktorom rizika za inferiorne post-transplantacione ishode, studije koje su ukrstile Tak IPV sa parametrima izloženosti Tak (Tak  $C_0$  ili  $C_0/D$ ), navele su kao zaključak da kombinovana procena inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti Tak može sveobuhvatnije kategorizovati pacijente prema riziku od smanjenja funkcije i oštećenja grafta u dugoročnom post-transplantacionom periodu [2, 3, 95].

U većini objavljenih studija, autori su pratili pacijente do javljanja nepovoljnih ishoda, dok su *Vanhove i saradnici* [96] prvi ispitali vezu između visokog Tak IPV i progresije hroničnih histoloških lezija. Naime, pokazali su da pacijenti sa visokim IPV vrednostima imaju povećan rizik od IF/TA u odnosu na pacijente sa niskim i srednjim Tak IPV vrednostima, pre pojave bilo kakve bubrežne disfunkcije i/ili proteinurije, što je zaključeno na osnovu protokolarnih biopsija urađenih u 3. i 24. mesecu nakon transplantacije bubrega. S obzirom da je IF/TA u osnovi KNI nefrotoksičnosti, kao potencijalno objašnjenje se nameće da je veza između Tak IPV i propadanja funkcije grafta pre rezultat prekomerne nego nedovoljne izloženosti Tak.

## 2.4 Interleukini

### 2.4.1 Interleukin-6

Citokini obavljaju bitnu ulogu u odbrani organizma i održavanju tkivne homeostaze [97]. Interleukin-6 je citokin sa dvojakom ulogom u imunološkom sistemu. Sa jedne strane, IL-6 podstiče inflamaciju i učestvuje u različitim funkcijama imunog sistema, uključujući produkciju proteina akutne faze, proliferaciju i aktivaciju T-limfocita, diferencijaciju B-limfocita i produkciju imunoglobulina. Pored toga, IL-6 je povezan sa endotelnom disfunkcijom i fibrogenozom [6, 7]. Sa druge strane, IL-6 može ispoljiti antiinflamatorni efekat, prvenstveno smanjenjem produkcije proinflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i IL-1 [6]. Ambivalentnost i širok spektar bioloških efekata, kao i činjenica da većina stromalnih i ćelija imunološkog sistema organizma produkuje IL-6, podržavaju njegovu ulogu glavnog modulatora imunološke funkcije. Međutim, prekomerna

ili abnormalna produkcija IL-6 može rezultovati povredom tkiva, inflamacijom i autoimunim poremećajima. Normalne serumske vrednosti IL-6 kod zdravih individua održavaju se u rasponu 0-5 pg/mL, dok kod infekcija, hronične inflamacije i karcinoma mogu dosegnuti vrednosti veće od 10 000 pg/mL [97, 98, 99]. Tokom akutne inflamacije, glavni „izvori” IL-6 su monociti i makrofagi, a T-limfociti tokom hronične inflamacije [100].

Imunološki mehanizam odbacivanja grafta posredovan je citokinima, važnim medijatorima odbrane imunološkog sistema kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [101]. Pored uticaja na funkciju grafta, citokini kod transplantiranih pacijenata mogu doprineti progresiji kardiovaskularnih bolesti, koje predstavljaju jedan od glavnih uzroka smrti pacijenata sa funkcionalnim graftom [102]. Ovaj uticaj prevashodno ostvaruju putem IL-6/IL-6R interakcije u hepatocitima što pokreće transkripciju reaktanata akutne faze, kao što su C-reaktivni protein (CRP), fibrinogen, hepcidin i serumski amiloid A. Sa druge strane, IL-6 signalizacija u hepatocitima dovodi do inhibicije transkripcije biološki važnih proteina albumina, fibronektina i transferina [98, 102].

Ekspresija IL-6 je određena polimorfizmom -174G/C (*rs1800795*) prisutnim u promotornom regionu gena, koji utiče na nivo IL-6 u plazmi (smatra se da je C alel udružen sa nižim nivoima u plazmi). Interleukin-6 je jedan od citokina sa značajnom ulogom u patogenezi akutnog i hroničnog odbacivanja grafta. Smatra se da uticaj na incidencu i težinu ovih ishoda može ispoljiti kako genotip primaoca, tako i genotip donora grafta [101, 103, 104]. Sa aspekta transplantacione medicine, IL-6 može imati veći značaj u predikciji i prevenciji dugoročnih nepovoljnih post-transplantacionih ishoda. Smatra se da primena visokih doza imunosupresiva u ranom post-transplantacionom periodu, naročito kortikosteroida, može zamaskirati uticaj IL-6 -174G/C polimorfizma na produkciju IL-6 i akutni odgovor pacijenta. U skladu s tim, pretpostavka je da genotip donora ima veći uticaj u akutnom odbacivanju grafta, dok je genotip primaoca organa značajniji u hroničnom odbacivanju grafta [105].

Pored pretpostavljene povezanosti IL-6 sa post-transplantacionim ishodima, nije zanemarljiv ni njegov uticaj na CYP3A-posredovan metabolizam Tak. Generalno, ekspresija i aktivnost CYP izoenzima je smanjena tokom hronične upale i u prisustvu proinflamatornih citokina (npr. IL-6, TNF- $\alpha$  i interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )). Uočeno je da IL-6 ima ključnu ulogu u modulaciji CYP aktivnosti tokom inflamacije, pri čemu, za razliku od ostalih citokina, negativno reguliše sve CYP izoenzime [106, 107]. Međutim, srednji do visoki stepen inflamacije je neophodan kako bi IL-6 imao uticaj na bazalni CYP3A-zavisni metabolizam Tak i posledično doprineo varijabilnosti Tak C<sub>0</sub> i Tak C<sub>0</sub>/D [108]. *Enokiya i saradnici* su

pokazali da IL-6 može da smanji CL Tak kod CYP3A5 ne-ekspresora u ranom post-transplantacionom periodu [15]. Pored toga, uticaj IL-6 na farmakokinetiku Tak se može razlikovati u odnosu na -174G/C genotip [4].

Novije studije ispituju potencijal primene monoklonskih antitela usmerenih protiv IL-6 i/ili IL-6R u tretmanu kasnog ABMR. Međutim, za sada dobijeni rezultati ne idu u prilog njihovoj primeni [109]. Randomizovana multicentrična klinička studija faze 3 koja je ispitivala efikasnost i bezbednost leka klazakizumaba za lečenje hroničnog aktivnog ABMR je obustavljena zbog nedostatka efikasnosti klazakizumaba u privremenoj analizi [110].

#### **2.4.2 Interleukin-10**

Interleukin-10 je antiinflamatorni citokin čije dejstvo se zasniva na inhibiciji ekspresije MHC molekula klase II na APC (makrofagi i dendritične ćelije) i posledično inhibiciji antigen-stimulisane proliferacije pomoćnih CD4<sup>+</sup> Th1 limfocita. Pored toga, smanjuje produkciju proinflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , i promoviše razvoj imunološke tolerancije [12, 111, 112]. Interleukin-10 proizvode različite subpopulacije T-limfocita (Th2, Treg), NK ćelije, monociti i ostali tipovi ćelija (makrofagi, dendritične ćelije, B-limfociti), dok su u bubrezima mezangijalne i endotelne ćelije prevashodno odgovorne za sekreciju IL-10 [112, 113]. Sa druge strane, IL-10 poseduje i proinflamatorno dejstvo, odnosno povećava humoralni odgovor protiv antigena grafta indukovanjem proliferacije i diferencijacije B-limfocita, pri čemu, takođe, stimuliše rast i diferencijaciju citotoksičnih T-limfocita i NK ćelija. Signalna kaskada započinje vezivanjem IL-10 za podjedinicu 1 IL-10 receptora (IL-10R1), da bi se potom stvoreni kompleks vezao za podjedinicu 2 IL-10 receptora (IL-10R2), što dovodi do niza intracelularnih događaja i aktivacije JAK-STAT (Janus Kinaze-Signalni Transduktori i Aktivatori Transkripcije) signalnog puta i signalizacije putem fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K-Akt) [12, 112].

Promotor gena za IL-10 je visoko polimorfan, a od interesa su tri polimorfizma -1082G/A (*rs1800896*), -819C/T (*rs1800871*) i -592C/A (*rs1800872*), koji utiču na nivoe IL-10 (-1082G, -819C i -592C alel su udruženi sa višom ekspresijom). Dugi niz godina naučnici izučavaju IL-10 polimorfizme u kontekstu povezanosti sa nepovoljnim ishodima (rizik za odbacivanje grafta) nakon transplantacije bubrega. Iako je mali procenat studija tvrdio o postojanju korelacije [113, 114, 115], drugi autori su smatrali da nema ubedljivih dokaza o povezanosti IL-10 sa post-transplantacionim ishodima [116]. Pored toga, pokazana je prekomerna ekspresija IL-10 u transplantatu bubrega tokom procesa subkliničkog odbacivanja sa IF/TA [117].

Takođe, IL-10 se smatra regulatorom CYP3A-zavisnog metabolizma Tak. On selektivno dovodi do depresije CYP3A, pri čemu se ne zapaža uticaj na ostale članove CYP familije (kao što su CYP1A2, CYP2C9 i CYP2D6) [16, 118]. Efekat na CYP3A se objašnjava dejstvom na smanjenje produkcije proinflatornih citokina, ali i putem interakcije sa signalnim putevima unutar ćelije (efekat na pregnanski X receptor (PXR), za koji se smatra da reguliše i povećava ekspresiju CYP3A4) [118, 119]. U *in vitro* studiji je pokazano da IL-10 može da modulira PXR ekspresiju putem inhibicije transkripcije NF- $\kappa$ B-p65 podjedinice u hepatocitima sa inflamacijom izazvanom lipopolisaharidima [119]. Sva tri polimorfizma su ekstenzivno izučavana u kontekstu potencijalnog uticaja na farmakokinetiku Tak kod transplantacije bubrega, jetre i pluća, ali uglavnom u ranom post-transplantacionom periodu. Međutim, rezultati su nedosledni u pogledu postojanja povezanosti polimorfizama IL-10 sa farmakokinetikom Tak. U slučajevima gde je takva povezanost demonstrirana, kontradiktornost se dodatno produbljuje u ispitivanju koji od tri proučavana polimorfizma ima značajan uticaj, kao i koji genotip/alel specifičnog polimorfizma utiče na potrebe u dozi i parametre izloženosti Tak [11, 16, 120, 121, 122, 123]. Stoga je IL-10 polimorfizme potrebno izučavati udruženo sa drugim polimorfizmima IL u kontekstu uticaja na farmakokinetiku Tak.

### 2.4.3 Interleukin-18

Interleukin-18 je proinflatorni citokin koji ima sposobnost indukovanja Th1 i Th2 odgovora. Glavna uloga IL-18 je stimulisanje produkcije IFN- $\gamma$  od strane limfocita i regulisanje aktivnosti makrofaga. Smatra se da IL-18 zauzima značajno mesto u autoimunim, inflamatornim i infektivnim bolestima, pri čemu je fokus brojnih istraživanja njegovo posredovanje u disfunkciji i/ili odbacivanju grafta [10, 124]. Ekspresija IL-18 je pod genskom kontrolom, pri čemu dva polimorfizma u promotoru IL-18 gena, -137G/C (*rs187238*) i -607A/C (*rs1946518*), imaju uticaj na aktivnost IL-18 gena i/ili produkciju IL-18 (-137G i -607C alel su udruženi sa višim IL-18 nivoima) [13].

Kako su aktivirani makrofagi glavni izvor IL-18, a makrofagi mogu da deluju kao efektorne ćelije u akutnom odbacivanju grafta, deo istraživača je ispitivao ulogu IL-18 u patogenezi makrofagno-indukovanog oštećenja grafta prilikom akutnog odbacivanja. Rezultati su ukazali da IL-18 -137GG genotip predstavlja faktor rizika za akutno odbacivanje, dok je IL-18 -607C alel doveden u vezu sa odloženom funkcijom grafta kod pacijenata sa transplantiranim bubregom [125, 126, 127]. Studije koje su ispitivale uticaj IL-18 -137G/C i -607A/C polimorfizama na dugoročne post-transplantacione ishode,

demonstrirale su opozitne rezultate u pogledu genotipova povezanih sa ishodima u odnosu na rani post-transplantacioni period [9, 128].

Interleukin-18 je, takođe, jedan od citokina koji je doveden u vezu sa farmakokinetikom Tak. Veruje se da IL-18 svoj uticaj na CYP3A-zavisani metabolizam Tak ostvaruje posredstvom stimulisanja produkcije proinflamatornih citokina (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6) [10, 14]. Pored toga, kao i u slučaju IL-10, uticaj IL-18 na farmakokinetiku Tak može se razlikovati u odnosu na -137G/C i -607A/C genotip [11, 13]. Stoga je IL-18 polimorfizme potrebno posmatrati udruženo sa drugim polimorfizmima IL u kontekstu uticaja na farmakokinetiku Tak.

## 2.5 Procena funkcije grafta

U svrhu monitoringa transplantiranog bubrega tradicionalno se koriste klinički (jačina glomerularne filtracije-GFR, proteinurija), imunološki (DSA), instrumentalni (indeks otpornosti na dopler ultrazvuku) i histološki parametri [129]. Mere funkcije grafta su najčešće korišćeni primarni i sekundarni ishodi (engl. *end points*) u kliničkim studijama kod transplantiranih bubrežnih pacijenata [130, 131]. Procenjena GFR (eGFR, engl. *estimated glomerular filtration rate*) je u najvećem broju slučajeva primarni ishod kliničkih studija. Prethodno korišćeni parametri, odnosno serumski kreatinin i klirens kreatinina, vremenom su zapostavljeni usled svojih nedostataka. Određivanje serumskog kreatinina je brza, isplativa i univerzalno dostupna metoda za procenu GFR. Kreatinin se slobodno filtrira u glomerulima, međutim, usled aktivne tubularne sekrecije i delimične ekstrarenalne eliminacije, ne zadovoljava kriterijume „idealnog filtracionog markera” [132]. Dodatno, na njegove vrednosti utiče pol, starost, mišićna masa i dijetetski režim [133]. Serumski kreatinin se može smatrati pouzdanim markerom za otkrivanje akutnih promena u funkciji grafta, međutim, pouzdanost je znatno smanjena kod detektovanja hroničnih promena [28]. Serumski kreatinin je nedovoljno osetljiv za procenu GFR kod blago i umereno oštećene funkcije bubrega, jer njegova koncentracija u serumu ostaje nepromenjena. Naime, serumske koncentracije mogu ostati unutar referentnog opsega i prilikom smanjenja GFR za 50% [134, 135]. Procena bubrežne funkcije na osnovu klirensa kreatinina vrši se merenjem koncentracije izlučenog kreatinina u 24-časovnom urinu i njegove koncentracije u serumu. Ova metoda je zapostavljena zbog komplikovanosti procedure i mogućih grešaka u sakupljanju urina [134].

Metode za merenje eGFR uglavnom se zasnivaju na prediktivnim jednačinama na bazi kreatinina, koje uključuju determinante poput godina, pola, rase, telesne mase. Najčešće

korišćene su MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*) i CKD-EPI (engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) jednačine. Vrednost eGFR u određenoj vremenskoj tački (uglavnom 12. post-transplantacioni mesec), kao i pad eGFR vrednosti u relativno kratkom periodu ( $\geq 30\%$  tokom dve godine), smatraju se prediktorima propadanja funkcije grafta [131, 136]. Štaviše, eGFR vrednost u 12. post-transplantacionom mesecu se smatra nezavisnim prediktorom gubitka grafta (ukupnog i gubitka grafta koji ne uključuje smrt pacijenta) i ukupnog mortaliteta [131]. U cilju praćenja progresije disfunkcije grafta preporučena metoda je monitoring promena u eGFR vrednostima [137].

Cistatin C se može koristiti kao alternativni marker procene bubrežne funkcije, međutim, njegova primena je ograničena u rutinskoj praksi. Cistatin C je protein male molekulske težine, član familije inhibitora cistein proteaze. Produkuju ga sve ćelije sa jedrom konstantnom brzinom, a na njega, za razliku od kreatinina, ne utiču starost, pol, rasa, mišićna masa, dijetetski režim. Cistatin C se iz plazme eliminiše glomerularnom filtracijom i skoro kompletno ( $>99\%$ ) se reapsorbuje i kataboliše u proksimalnim tubulima, stoga se u fiziološkim uslovima ne nalazi u urinu ili je prisutan u vrlo niskim koncentracijama [134, 138]. Koncentracija cistatina C u krvi je stabilna, ukoliko je funkcija bubrega očuvana. Smanjenje funkcije bubrega rezultuje smanjenjem GFR i posledičnim povećanjem koncentracije cistatina C u krvi. Međutim, njegovu širu kliničku upotrebu ograničava činjenica da na povećanje koncentracija u krvi mogu uticati i velike doze kortikosteroida, inflamacija, dijabetes, hipertireodizam, hiperbilirubinemija i reumatoidni faktor [139]. Prediktivne jednačine za određivanje eGFR mogu biti zasnovane i na cistatinu C. Studije koje su uporedo ispitivale upotrebu jednačina zasnovanih na kreatininu i cistatinu C kod transplantiranih bubrežnih pacijenata, demonstrirale su da jednačine zasnovane na cistatinu C pokazuju slične dijagnostičke karakteristike kao one zasnovane na kreatininu, mada se smatra da potencijalno mogu poboljšati performanse predviđanja GFR kod pacijenata nakon transplantacije bubrega. Međutim, pokazuju veći „bias” (sklonost ka željenim vrednostima), pri čemu su, takođe, vrednosti serumskog cistatina C podložne značajnijim intraindividualnim varijacijama od serumskog kreatinina [132, 140, 141].

Sporadično se kao ishod kliničkih studija navodi izmerena GFR pomoću egzogenih supstanci (inulin, ioheksol,  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA,  $^{125}\text{I}$ -iotalamat ili  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilentriaminpentasilirćetna kiselina). Ove tehnike su precizne i pouzdane, ali su vremenski zavisne, skupe i komplikovane za izvođenje u rutinskoj laboratorijskoj praksi, pri čemu studije kod transplantiranih bubrežnih pacijenata nisu demonstrirale očiglednu prednost upotrebe izmerene GFR u odnosu na eGFR [142, 143].

Uzimajući u obzir da prediktivne jednačine za određivanje eGFR mogu delimično prevazići prateće nedostatke serumskog kreatinina kao markera bubrežne funkcije, kao i činjenicu da eGFR nije idealan surogat marker kod pacijenata koji primenjuju lekove koji utiču na mišićnu masu i/ili izazivaju akutne promene GFR (inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima, antagonisti angiotenzinskih receptora, kalcijumski antagonisti) [131], poslednjih godina se intenzivno traga za novim markerima bubrežne funkcije. Potencijalni markeri su deo „OMICS” pristupa (skup tehnologija koje se koriste za merenje i funkcionalnu karakterizaciju različitih biomolekula u ćelijama ili tkivima), koji je kamen temeljac precizne medicine. Precizna medicina, element personalizovane medicine, ima za cilj predikciju i prevenciju patoloških procesa pružanjem ranijih i obimnijih informacija od tradicionalnih markera bubrežne funkcije [129].

### **2.5.1 KNI-posredovana nefrotoksičnost**

Uzroci kasnog gubitka grafta nisu jasno definisani, međutim jedan od uobičajenih fenotipa je gubitak funkcije grafta sa IF/TA. Entitet IF/TA nespecifične etiologije (ranije hronična nefropatija grafta) treba posmatrati kao krajnju posledicu kumulativnog tubulointercijalnog, mikrovaskularnog i glomerularnog oštećenja nastalih kao rezultat različitih povreda grafta (ishemijsko-reperfuziona povreda, subkliničko i akutno odbacivanje, KNI nefrotoksičnost, BK nefropatija) [144].

Dugi niz godina su se jednogodišnje preživljavanje grafta i akutno odbacivanje koristili kao ishodi kliničkih studija. Stav da je akutno odbacivanje jedan od najvažnijih prediktora gubitka grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega doveden je u pitanje. Naime, uvođenjem potentnijih imunosupresivnih lekova u kliničku praksu, drastično se smanjila stopa akutnog odbacivanja, dok nije došlo do simultanog poboljšanja dugoročnih ishoda transplantacije. Postoje uverenja da je efekat akutnog odbacivanja na dugoročnu funkciju grafta, odnosno petogodišnju eGFR, u potpunosti posredovan njegovim uticajem na jednogodišnje eGFR vrednosti [136]. Stoga se fokus tokom godina pomera na KNI nefrotoksičnost, BK nefropatiju i hronično ABMR, za koje se smatra da mogu doprineti nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu [130].

Prevalenca IF/TA kod pacijenata koji su na KNI-baziranom imunosupresivnom režimu je oko 40%, 60% i 90% u trećem mesecu, drugoj i petoj post-transplantacionoj godini, redom. Prvih nekoliko post-transplantacionih meseci su kritični za nastanak IF/TA, pri čemu se histološke lezije javljaju pre evidentnih kliničkih znakova. Naime, serumski kreatinin i eGFR, konvencionalni klinički markeri procene funkcije grafta, imaju slabu prediktivnu

vrednost za IF/TA [144]. Stoga se nameće potreba za pronalaženjem ranih biomarkera oštećenja funkcije grafta koji će korelirati sa IF/TA.

## 2.6 MikroRNK-potencijalni rani markeri praćenja funkcije grafta

MikroRNK su male, nekodirajuće RNK sastavljene od 18-25 nukleotida koje učestvuju u brojnim fiziološkim (ćelijska diferencijacija i proliferacija, razvoj organa, regulacija imunološkog sistema), ali i patološkim procesima (nastanak karcinoma, kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti) [145]. Smatra se da igraju važnu ulogu u održavanju homeostaze na nivou bubrega, a da je RNK interferencija važan proces u razvoju i progresiji različitih bubrežnih bolesti. Naime, kontinuirana biogeneza miRNK u bubrežnim ćelijama, pogotovo podocitima, od značaja je za održavanje normalne bubrežne fiziologije i funkcije, pri čemu su miRNK uključene u održavanje homeostaze vode i osmoregulaciju, produkciju renina, procese reapsorpcije/sekrecije natrijuma i kalijuma u distalnim tubulima, ali i u proces nefrogeneze i pogoršanja bubrežne funkcije uslovljenog starenjem [146]. Od 2008. godine, *Lawrie i saradnici* su otvorili put detaljnijem izučavanju miRNK kao potencijalnog biomarkera i terapeutika otkrićem cirkulišućih miRNK u krvi [147]. Nakon toga, brojni naučnici detektuju miRNK u krvi, urinu, pljuvački, suzama i drugim biološkim tečnostima kod različitih bolesti. Krv je najčešće korišćen neinvazivni metod praćenja. Međutim, nivoi ekspresije miRNK u urinu mogu direktno odražavati ono što se dešava unutar samog bubrega. MikroRNK regulišu fibrozu direktnom represijom i/ili ekspresijom matriksnih gena i putem signalizacije posredovane transformišućim faktorom rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Pored toga, miRNK moduliraju sistemski, ali i intra-renalni inflamatorni odgovor [148].

Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, uloga miR-21-5p u regulatornim procesima postaje još složenija zbog učešća imunološkog sistema. Pored toga, miR-21-5p je povezan sa metabolizmom ksenobiotika, što može uticati na efikasnost određenih lekova [149]. Povišena ekspresija miR-21-5p je primećena u plazmi [22] i u urinu [150, 151] pacijenata sa transplantiranim bubregom koji imaju disfunkciju grafta. Poznato je da miR-21-5p podstiče i fibrozu i inflamaciju [152] kroz svoje učešće u regulaciji ekspresije TGF- $\beta$  gena [153]. Pošto fibroza grafta može dovesti do njegove disfunkcije, miR-21-5p se nameće kao logičan kandidat za razvoj novih dijagnostičkih markera. Razmatrajući miR-142-3p kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, pokazano je da učestvuje u funkcionalnoj regulaciji Treg i makrofaga. U skladu s tim, povišeni nivoi miR-142-3p u uzorcima sa IF/TA mogu ukazivati na smanjenu sposobnost Treg da suzbiju imunološke procese koji se odvijaju unutar

bubrega. Međutim, IF/TA je često povezana sa inflamatornim oštećenjima, te se povišena ekspresija miR-142-3p u takvim slučajevima može i očekivati [19, 154]. Kada je reč o miR-155-5p, njena abnormalna ekspresija je uočena u više patoloških stanja na nivou bubrega, uključujući karcinom bubrega, terminalnu bubrežnu insuficijenciju i TCMR nakon transplantacije bubrega [22, 155, 156]. Dodatno, miR-155-5p doprinosi fibrozi ćelija proksimalnih tubula najverovatnije kroz modulaciju TGF- $\beta$  i epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) [156, 157]. Ova miRNK ima ključnu ulogu u adaptivnom imunitetu i T-limfocitima posredovanom odgovoru na antitela, regulišući diferencijaciju pomoćnih T-limfocita. Lokalna inflamacija koja se povezuje sa odbacivanjem transplantata strogo je regulisana ravnotežom pomoćnih T-limfocita, pri čemu miR-155 utiče na diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u različite podtipove pomoćnih T-limfocita [22, 158]. Prethodno je pokazana povezanost smanjene ekspresije miR-204-5p u urinu pacijenata sa IF/TA. Naime, smatra se da inhibicija ove miRNK doprinosi povećanju stepena apoptoze, te samim tim igra ulogu u regulatornim procesima u ćeliji [19]. Dodatno, pokazana je povezanost BK virusa i smanjene ekspresije miR-204-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom [159]. Pacijenti sa transplantiranim bubregom izloženi su visokom riziku od replikacije BK virusa, što može rezultirati nefropatijom i posledično gubitkom grafta.

Uzimajući u obzir uticaj miRNK na brojne biološke procese, kao i stabilnost i reproducibilnost u biološkim tečnostima, miRNK se potencijalno mogu koristiti kao neinvazivni i specifični markeri za monitoring funkcije grafta. Dodatno, prethodne studije su pokazale da Tak IPV ili C<sub>0</sub>/D mogu biti udruženi sa nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Međutim, da li se efekti farmakokinetičke varijabilnosti Tak mogu reflektovati na ekspresiju miRNK još uvek je nepoznato.

### 3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja je ispitati povezanost parametara farmakokinetičke varijabilnosti Tak, genskih polimorfizama IL i nivoa ekspresije miRNK sa parametrima funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- Ispitati povezanost parametara inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti Tak sa parametrima funkcije grafta i nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.
- Odrediti učestalost alela i genotipova polimorfizama u genima za IL-6, IL-10 i IL-18 kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.
- Uporediti dozni režim i izloženost Tak u različitim periodima nakon transplantacije bubrega u odnosu na genotip navedenih IL.
- Ispitati povezanost navedenih genskih polimorfizama sa funkcijom grafta i nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.
- Odrediti nivo cistatina C, IL-6, IL-10, IL-18 u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i ispitanika kontrolne grupe.
- Odrediti ekspresiju miRNK (miR-21-5p, miR-142-3p, miR-155-5p, miR-204-5p) u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.
- Ispitati povezanost ekspresije miRNK u urinu sa funkcijom grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, kao i sa parametrima farmakokinetičke varijabilnosti Tak.

## 4 PACIJENTI I METODE

### 4.1 Pacijenti

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je sprovedeno u Naučno-istraživačkom centru za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i na Klinici za nefrologiju “Prof dr Spira Strahinjić”, Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu (odluka broj: 4665/11 od 23.02.2022. godine) i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (rešenje broj: 12-3588-2/2 od 07.04.2022. godine). Istraživanje, uključujući i obradu rezultata, sprovedeno je u periodu od aprila 2022. do maja 2025. godine, na materijalu dobijenom od pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika (kontrolne grupe). Pacijenti i zdravi ispitanici su dali informisani pristanak za učestvovanje u istraživanju. Sprovedene procedure u studiji bile su u skladu sa etičkim standardima institucionalnih i/ili nacionalnih istraživačkih komiteta, kao i sa Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine i njenim kasnijim amandmanima ili uporedivim etičkim standardima. Eksperimentalnu grupu činili su pacijenti podvrgnuti transplantaciji bubrega u periodu od 2008. do 2018. godine, sa stabilnom funkcijom transplantata u 6. post-transplantacionom mesecu. Ispitivani pacijenti su redovne kontrole, koje uključuju TDM Tak i proveru biohemijskih parametara, sprovodili na Klinici za nefrologiju “Prof dr Spira Strahinjić”. Ukupan broj pacijenata iznosio je 115, od toga 75 muškaraca i 40 žena. Živu srodničku transplantaciju imala su 84 pacijenta, dok je 31 pacijent podvrgnut kadaveričnoj transplantaciji. Prosečna starost u eksperimentalnoj grupi iznosila je  $40 \pm 11$  godina. Kontrolnu grupu je činio 91 zdravi ispitanik, a koja se nije razlikovala od ispitivane populacije u pogledu starosti i distribucije polova. Broj ispitanika se razlikovao u pojedinim delovima istraživanja, što je naznačeno u sekciji Rezultati. Doktorska disertacija je sprovedena kao prospektivna kohortna studija i studija preseka. Prospektivna studija je obuhvatila petogodišnje praćenje transplantiranih pacijenata između 6. i 60. meseca nakon transplantacije bubrega ili do pojave nepovoljnog post-transplantacionog ishoda. Primenjeni su sledeći isključujući kriterijumi za transplantirane pacijente:

- Period nakon transplantacije manji od godinu dana;
- Pacijenti čiji je inicijalni imunosupresivni protokol baziran na CsA;
- Pacijenti kod kojih su uočeni znaci otkazivanja presađenog bubrega, što je uključivalo potrebu za redovnom dijalizom u toku prve godine nakon transplantacije bubrega.

Dodatno, nisu korišćeni podaci pacijenta sa akutnim stanjima, koja su zahtevala hospitalizaciju i/ili uvođenje lekova koji su mogli stupiti u interakciju sa Tak ili uticati na eGFR, poput nekontrolisane hipertenzije.

Podaci o režimu doziranja, koncentraciji leka, hematološki i biohemijski podaci koji su korišćeni u studiji uzeti su iz medicinske dokumentacije ili razgovora sa transplantiranim pacijentima. Identitet ispitanika garantovan je procedurom protokola u kojoj je ispitanicima dodeljena šifra, odnosno nije korišćeno ime i prezime ili lični podaci.

#### **4.1.1 Imunosupresivni protokol pacijenata sa transplantiranim bubregom**

Svi pacijenti su bili na trostrukom imunosupresivnom režimu održavanja, koji je pored Tak uključivao uglavnom MMF ili MPS i kortikosteroid, najčešće prednizon. Inicijalna imunosupresivna terapija je uključivala: intravenski primenjen metilprednizolon u početnoj dozi od 0,5 g/dan, koji je potom zamenjen oralnim preparatom kortikosteroida (prednizonom) u inicijalnoj dozi od 1 mg/kg/dan, i 20 mg monoklonskog antitela, baziliksimaba, primenjenog prvog i četvrtog dana. Takrolimus je primenjen petog post-transplantacionog dana, u dve formulacije: 79 pacijenata koristilo je konvencionalni preparat, sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance (Tak-TD (engl. *twice daily*), Prograf®, *Astellas Ireland Co. Ltd.*), dok je 36 pacijenata primenjivalo preparat sa produženim oslobađanjem lekovite supstance (Tak-OD (engl. *once daily*), Advagraf®, *Astellas Ireland Co. Ltd.*). Početni režim doziranja bio je 0,2-0,3 mg/kg/dan podeljeno u dve doze (Tak-TD) ili 0,2-0,3 mg/kg/dan jednom dnevno (Tak-OD). Nakon toga, Tak je primenjivan dva puta dnevno (u 08.00 h i 20.00 h) ili jednom dnevno (u 08.00 h) u zavisnosti od propisanog preparata. Doza je bila prilagođena prema Tak C<sub>0</sub>, koja je izmerena neposredno pre primene jutarnje doze leka. Preporučeni terapijski opseg bio je 8-12 ng/mL u prva tri meseca, a potom 6-10 ng/mL. Mikofenolat-mofetil, odnosno MPS su primenjeni u inicijalnoj dozi od 1,5-2,0 g/dan, odnosno 1,08-1,44 g/dan *per os*. Pored standardne imunosupresivne terapije, pacijenti su primenjivali antihipertenzivne lekove: beta blokatore (bisoprolol, metoprolol ili karvedilol) i/ili blokatore kalcijumovih kanala (amlodipin, lerkandipin i nifedipin), ređe inhibitore angiotenzin konvertujućeg enzima i metildopu. Pacijenti su koristili gastroprotektivne lekove, najčešće omeprazol i pantoprazol. U cilju prevencije pneumonije uzrokovane gljivicom *Pneumocystis jirovecii* veliki broj transplantiranih pacijenata bio je na terapiji sulfometaksazol-trimetoprimom [160]. Dodatno, ciprofloksacin i cefiksime su bili često korišćeni antibiotici, prevashodno za lečenje urinarnih infekcija.

#### 4.1.2 Farmakokinetički podaci

U svrhu istraživanja su korišćeni sledeći podaci: dnevna doza Tak, C<sub>0</sub>, C<sub>0</sub>/D i IPV Tak. Podaci o dnevnoj dozi Tak dobijeni su iz medicinske evidencije i razgovora sa pacijentima. Koncentracija C<sub>0</sub> je izmerena u punoj krvi korišćenjem CMIA (*chemiluminescent microparticle immunoassay*) metode, u skladu sa uputstvom proizvođača (*Architect, Abbott, Illinois, SAD*). Vrednost C<sub>0</sub>/D predstavlja količinu C<sub>0</sub> (ng/mL) i dnevne doze leka (mg). Prikupljeni su podaci o dnevnoj dozi Tak i C<sub>0</sub> za period od 5 godina nakon transplantacije. U svakoj ispitivanoj vremenskoj tački (6., 12., 24., 36., 48. i 60. mesec nakon transplantacije) korišćene su tri vrednosti C<sub>0</sub> oko vremenske tačke za izračunavanje reprezentativne vrednosti. Intraindividualna varijabilnost Tak je izračunata kao CV% dostupnih vrednosti Tak C<sub>0</sub>/D za svakog pacijenta u periodu između 6 i 12 meseci nakon transplantacije bubrega kod većine pacijenata. S obzirom da dnevna doza Tak nije bila uniformna, za izračunavanje IPV, umesto C<sub>0</sub> korišćen je odnos C<sub>0</sub>/D, iako je kod većine pacijenata korišćen period sa stalnom dozom Tak.

Za izračunavanje korišćena je sledeća jednačina (*Jednačina 4.1*):

*Jednačina 4.1:*

$$CV\% = SD/\bar{x} \times 100\%$$

gde su srednja vrednost ( $\bar{x}$ ) i SD izračunate na osnovu dostupnih vrednosti Tak C<sub>0</sub>/D za svakog pacijenta tokom perioda između 6 i 12 meseci nakon transplantacije. Prosečan broj C<sub>0</sub> vrednosti korišćenih za izračunavanje Tak C<sub>0</sub>/D i sledstveno IPV vrednosti bio je 7 po pacijentu, u rasponu od 4 do 11. Podaci prikupljeni tokom hospitalizacije pacijenata ili akutnih stanja nisu bili uključeni u proračun.

#### 4.1.3 Hematološki i biohemijski parametri

*Biohemijski monitoring.* Vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara su rutinski određivane standardizovanim metodama u Biohemijskoj laboratoriji Klinike za nefrologiju “Prof dr Spira Strahinjić” Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu. Analize hematoloških parametara su vršene na aparatu *Nihon Kohden MEK-6318* (*Nihon Kohden Corporation, Japan*) i na hematološkom analizatoru *DxH 500* (*Beckman Coulter Diagnostics*), dok su biohemijske analize vršene na automatskom analizatoru za kliničku hemiju (*Dimension RxL Max, Siemens, Nemačka*). U svrhu hematološkog i biohemijskog monitoringa rutinski su određivani: leukociti (10<sup>9</sup>/L), eritrociti (10<sup>12</sup>/L), hemoglobin (g/L),

hematokrit (L/L), alanin aminotransferaza (ALT, U/L), aspartat aminotransferaza (AST, U/L), alkalna fosfataza (ALP, U/L), gama-glutamil transferaza (GGT, U/L), glukoza (mmol/L), holesterol (mmol/L), trigliceridi (mmol/L), serumski kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ ), urea (mmol/L), albumini (g/L) i ukupni proteini (g/L) u serumu pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Procenjena GFR je izračunata na osnovu MDRD jednačine (*Jednačina 4.2*) [161]. U svakoj ispitivanoj vremenskoj tački (6., 12., 24., 36., 48. i 60. mesec nakon transplantacije) korišćene su tri vrednosti eGFR oko vremenske tačke za izračunavanje reprezentativne vrednosti. Indeks telesne mase (BMI, engl. *body mass index*) je izračunat za svakog pacijenta. Dodatno, kod pacijenata koji su učestvovali u ispitivanju koje je vezano za miRNK, određena je koncentracija kreatinina i albumina u urinu, kako bi se odredio albumin-kreatinin odnos (ACR, engl. *albumine-to-creatinine ratio*).

#### *Jednačina 4.2:*

$$\text{eGFR (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{serumski kreatinin u mg/dL})^{-1,154} \times (\text{starost u godinama})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za žene}) \times (1,212 \text{ za ispitanike crne rase})$$

#### **4.1.4 Post-transplantacioni ishodi**

Složeni nepovoljni ishodi u dugoročnom post-transplantacionom periodu obuhvatali su otkazivanje funkcije grafta [definisano kao  $\text{eGFR} \leq 15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ , ponovno započinjanje dijalize i retransplantacija], hroničnu disfunkciju grafta, hronično odbacivanje i udvostručenje koncentracije serumskog kreatinina između 12. meseca i poslednje kontrole tokom perioda praćenja.

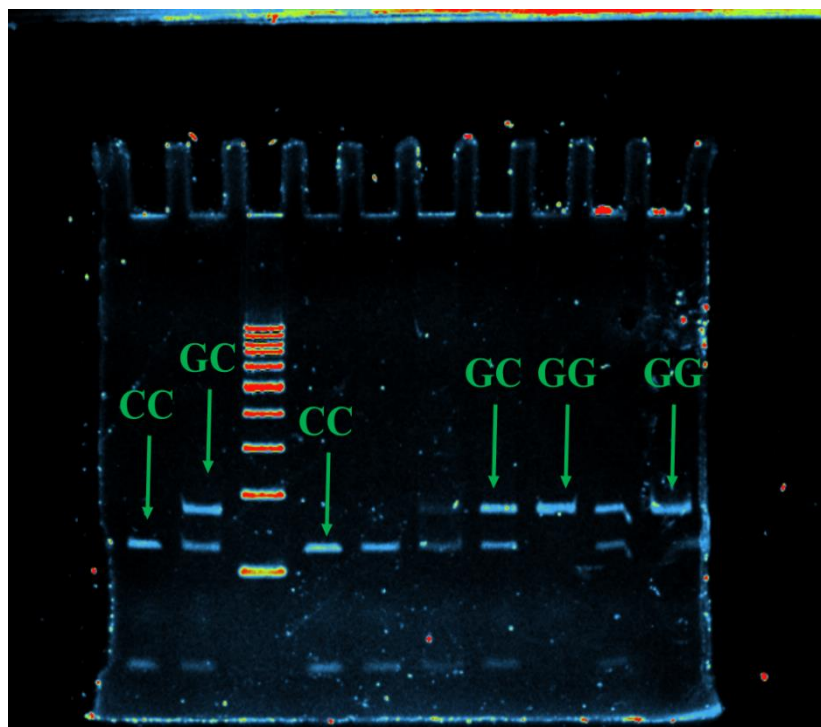
Hronična disfunkcija grafta karakteriše se promenljivim, ali progresivnim pogoršanjem bubrežne funkcije (povećanje nivoa serumskog kreatinina), sa ili bez proteinurije i hipertenzije. Hronična disfunkcija grafta obuhvata hronično odbacivanje, koje se manifestuje povećanjem nivoa serumskog kreatinina praćenim postepenim pogoršanjem bubrežne funkcije, a koje je povezano sa karakterističnim nalazima na biopsiji transplantata. Takođe, odnosi se na hronično odbacivanje potvrđeno biopsijom, pri čemu biopsije nisu rađene rutinski, već samo kada je postojao opravdan razlog. Dijagnoze su postavljene od strane nefrologa, a u svrhu sprovođenja istraživanja u okviru doktorske disertacije preuzimane su iz medicinske dokumentacije pacijenata sa transplantiranim bubregom.

## 4.2 Metode

U istraživanju su korišćeni krv, plazma, izolovana DNK, urin, sediment urina i RNK pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Plazma i DNK su izolovane iz uzoraka krvi, dok je RNK izolovana iz uzoraka sedimenta urina, koji su korišćeni za rutinske kontrole pacijenata na Klinici za nefrologiju "Prof dr Spira Strahinjić". Zdravi dobrovoljci su davali krv i urin u zakazanom terminu. U cilju izolacije DNK korišćeno je 200  $\mu$ L pune krvi, koja je prethodno uzeta u EDTA epruvetama (3mL). DNK je izolovana uz pomoć komercijalnog kita (*Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific, Litvanija*) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga, ostatak uzorka krvi je centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti (rpm), nakon čega je izdvojena i zamrznuta plazma na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2.1 Genotipizacija IL-6

Genotipizacija polimorfizma -174G/C (*rs1800795*) u genu za IL-6 sprovedena je prema modifikovanoj metodi opisanoj od strane *Losito i saradnika* [162]. Genski polimorfizam (G/C zamena) na poziciji -174 u promotoru gena za IL-6 ispitivan je pomoću PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) metode. Za PCR umnožavanje ispitivane sekvence korišćeni su sledeći prajmeri: nishodni: 5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' i ushodni: 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'. Reakciona smeša, ukupne zapremine 20  $\mu$ L, sadržala je 0,5 IU HotStart DNK polimeraze (*FIREPol DNA polymerase, Solis BioDyne, Tartu, Estonija*), 2  $\mu$ L FIREPol 10x pufera B i 1-1,5 ng/ $\mu$ L uzorka DNK. Koncentracija  $\text{MgCl}_2$  u reakciji je bila 1,75 mM, koncentracija svakog pojedinačnog dNTP je bila 200  $\mu$ M, dok su prajmeri bili u koncentraciji po 0,4  $\mu$ M. PCR program je bio: inicijalna denaturacija na  $95^{\circ}\text{C}$  tokom 5 minuta, 35 ciklusa denaturacije na  $95^{\circ}\text{C}$  za 30s, hibridizacije (engl. *annealing*) na  $55^{\circ}\text{C}$  za 45s i elongacije na  $72^{\circ}\text{C}$  za 45s, sa 7 minuta finalne elongacije na  $72^{\circ}\text{C}$ . Za identifikaciju ispitivanog polimorfizma, restriktivna digestija dobijenog PCR produkta od 198 baznih parova (bp) vršena je pomoću enzima NlaIII (Hin1II) (*Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija*) na  $37^{\circ}\text{C}$  u toku 16 sati. Dobijeni fragmenti bili su razdvojeni na 8% poliakrilamidnom gelu pomoću vertikalne elektroforeze. Nakon bojenja u rastvoru etidijum-bromida, obojeni gelovi su posmatrani pod UV svetlom. Kod individua sa IL-6 -174GG genotipom na gelu su bila vidljiva dva DNK fragmenta od po 167 i 31 bp, dok su kod nosioca -174CC genotipa detektovani DNK fragmenti od po 122, 45 i 31 bp. Kod heterozigota (-174GC), sva četiri DNK fragmenta su bila uočljiva (**Slika 4.1**).

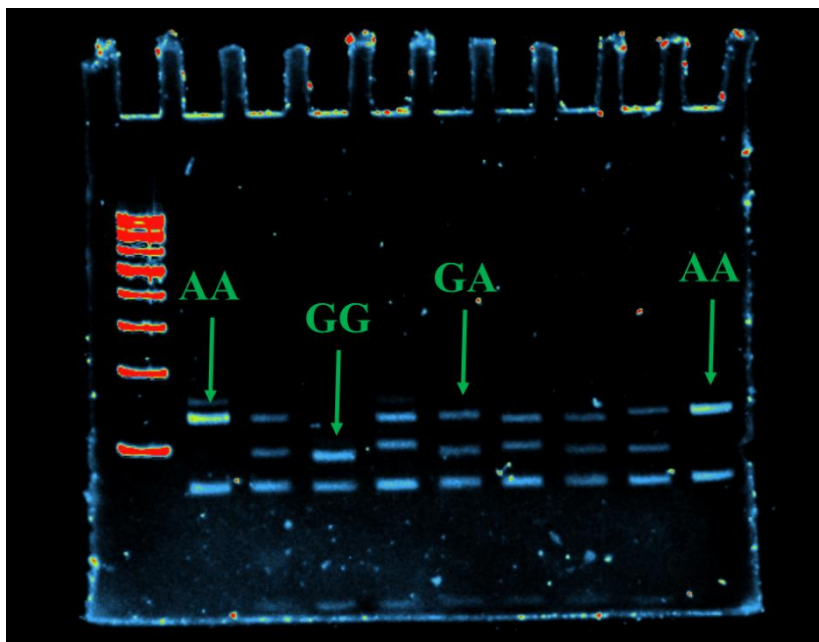


**Slika 4.1** Vizualizacija fragmenata na 8%-poliakrilamidnom gelu za IL-6 -174G/C genski polimorfizam

#### 4.2.2 Genotipizacija IL-10

Sva tri ispitivana polimorfizma se nalaze u promotoru gena za IL-10. Genotipizacija je izvršena primenom PCR-RFLP metode, slično prethodno opisanoj metodi za IL-6 -174G/C polimorfizam. Prajmeri korišćeni za umnožavanje PCR sekvence IL-10 -1082G/A (*rs1800896*) su preuzeti iz rada *Moudi i saradnika* [163]: nishodni, 5'-CCAGATATCTGAAGAAGTCCTG-3', i ushodni, 5'-CTCTTACCTATCCCTACTTCC-3'. PCR reakciona smeša je bila slična gore opisanoj za IL-6, sa jedinom razlikom u koncentraciji MgCl<sub>2</sub> koja je bila 1,875 mM, dok su koncentracije svakog dNTP i oba prajmera bile istovetne kao u metodi za IL-6. Za umnožavanje je korišćena *touchdown* PCR metoda [164] sa sledećim programom: nakon inicijalne denaturacije na 95°C tokom 5 minuta, usledila je faza *touchdown* od 22 ciklusa, sa korakom denaturacije od 30s na 95°C, 45s hibridizacije (*annealing*) gde se temperatura u svakom ciklusu spuštala počevši od 65°C do 51°C i elongacijom od 45s na 72°C. Druga faza PCR programa se sastojala od 14 ciklusa na 95°C tokom 30s, zatim na 50°C tokom 45s i na 72°C tokom 45s, sa finalnom elongacijom na 72°C tokom 8 minuta. Digestija dobijenog PCR produkta od 199 bp vršena je MnlI restrikcionim enzimom (*NEB*, Ipsvič, Masačusets, SAD) na 37°C tokom 60 minuta. Dobijeni fragmenti su razdvojeni na vertikalnoj elektroforezi na 8% poliakrilamidnim gelovima.

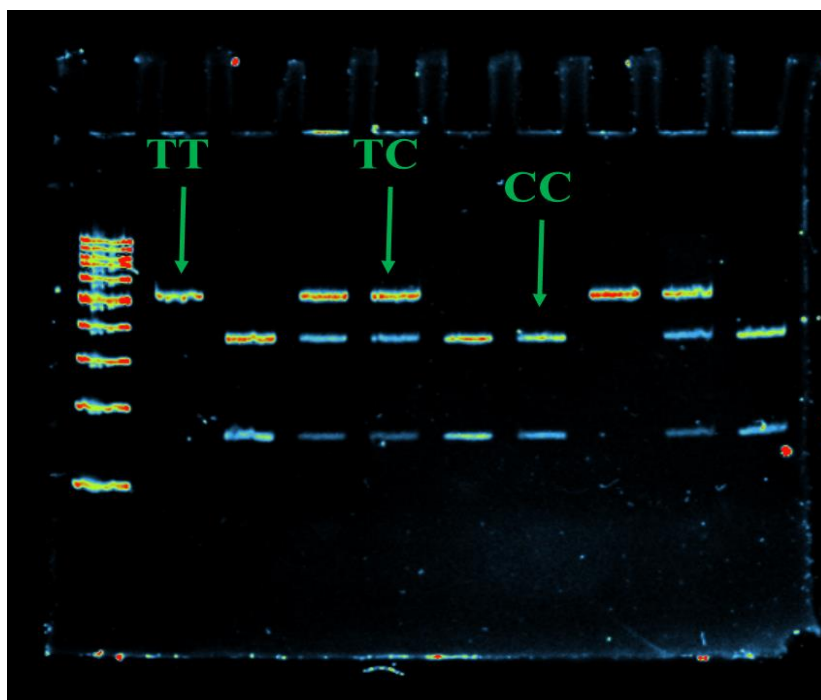
Gelovi su obojeni etidijum bromidom i zatim posmatrani pod UV svetlom. Kod genotipa -1082AA detektovana su dva fragmenta (127 bp i 72 bp), genotip -1082GG je imao vidljiva tri fragmenta (94 bp, 72 bp i 33 bp), dok su sva četiri fragmenta bila prisutna kod nosioca heterozigotnog genotipa -1082GA (Slika 4.2).



**Slika 4.2** Vizualizacija fragmenata na 8%-poliakrilamidnom gelu za IL-10 -1082G/A genski polimorfizam

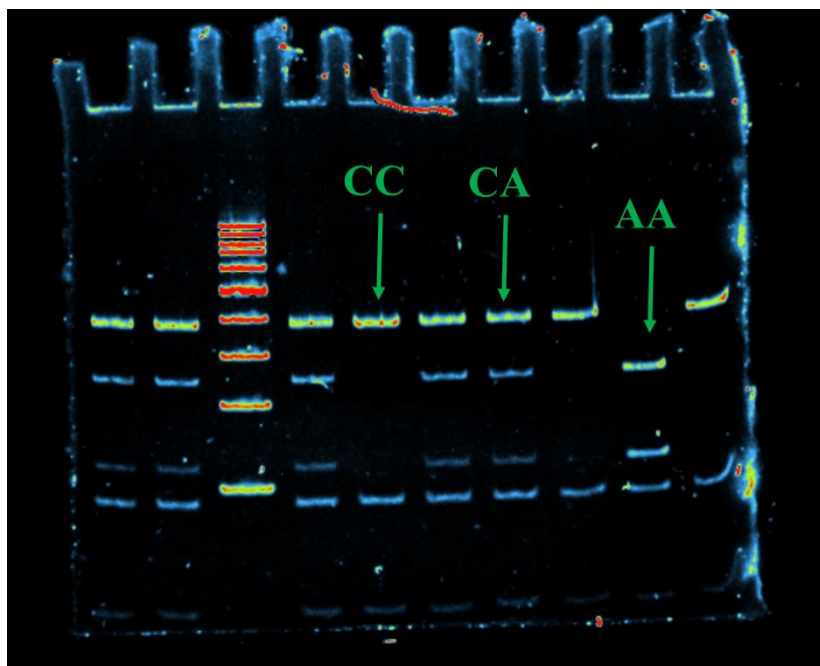
Genski polimorfizmi IL-10 -819C/T (*rs1800871*) i -592C/A (*rs1800872*), locirani su u neposrednoj blizini u promotoru gena, stoga su oba polimorfizma analizirana korišćenjem PCR produkta koji sadrži oba polimorfizma od interesa. PCR prajmeri su usvojeni od *Rad i saradnika* [165]: nishodni 5'-GACTCCAGCCACAGAAGCTTAC-3' i ushodni 5'-AGGTCTCTGGGCCTTAGT-3'. Reakciona smeša je bila slična prethodno opisanim, ali sa koncentracijom MgCl<sub>2</sub> od 1,625 mM i koncentracijom oba prajmera po 0,3 μM. Umnožavanje je takođe izvedeno primenom *touchdown* PCR-RFLP metode pod sledećim uslovima: početna denaturacija na 95°C tokom 5 minuta, zatim faza *touchdown* od 27 ciklusa, sa korakom denaturacije od 30s na 95°C, 45s hibridizacije (*annealing*), gde se temperatura spuštala u svakom ciklusu sa 69°C na 55°C, i elongacijom od 45s na 72°C. Druga faza programa se sastojala od 7 ciklusa na 95°C tokom 30s, zatim na 54°C tokom 45s i na 72°C tokom 45s, sa finalnom elongacijom na 72°C tokom 7 minuta. Dobijeni PCR produkt, dužine 486 bp, je upotrebljen u dve odvojene digestije kako bi različiti polimorfizmi bili određeni. Produkti digestije su potom zasebno razdvojeni vertikalnom elektroforezom na

8% poliakrilamidnom gelu, gelovi su obojeni rastvorom etidijum bromida i posmatrani pod UV svetlom. Za genotipizaciju IL-10 -819C/T, u digestiji je korišćena restrikciona endonukleaza MslI (*NEB*, Ipsvič, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača, na 37°C tokom 60 minuta. Genotip -819TT ne poseduje mesto prepoznavanja restrikcionog enzima, što rezultuje prisustvom neisečenog proizvoda od 486 bp nakon digestije. Genotip -819CC je isečen u dva fragmenta od po 333 bp i 153 bp, dok su kod heterozigotnih nosioca na gelu bila prisutna sva tri fragmenta (**Slika 4.3**).



**Slika 4.3** Vizualizacija fragmenata na 8%-poliakrilamidnom gelu za IL-10 -819C/T genski polimorfizam

Procedura digestije za određivanje IL-10 -592C/A je bila slična, na 37°C tokom 60 minuta, prema uputstvu proizvođača, ali je korišćeni restrikcioni enzim bio RsaI (*Thermo Scientific*, Litvanija). Prisustvo genotipa -592CC rezultiralo je formiranjem četiri fragmenta digestije: 351 bp, 85 bp, 42 bp i 8 bp; dok genotipa -592AA formiranjem pet fragmenata digestije: 240 bp, 111 bp, 85 bp, 42 bp i 8 bp. Kod heterozigotnih nosioca formirali su se svi pomenuti fragmenti (**Slika 4.4**).



**Slika 4.4** Vizualizacija fragmenata na 8%-poliakrilamidnom gelu za IL-10 -592C/A genski polimorfizam

#### 4.2.3 Genotipizacija IL-18

Određivanje prisustva polimorfizma u genu za IL-18, -137G/C (*rs187238*) i -607A/C (*rs1946518*) gena izvršena je korišćenjem *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays*, *C\_\_2408543\_10* i *C\_\_2898460\_10*, respektivno (*Applied Biosystems*, Karlsbad, Kalifornija, SAD), na *7500 Fast Real-Time PCR* sistemu (*Applied Biosystems*, Karlsbad, Kalifornija, SAD), u skladu sa uputstvima proizvođača. Pre ulaska u PCR reakciju, koncentracija svakog uzorka DNK je podešena na 5 ng/μL.

#### 4.2.4 Određivanje koncentracije IL-6, IL-10, IL-18 i cistatina C u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

Koncentracija IL-6 (pg/mL) u plazmi određivana je enzimskim imunosorbentnim testom (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) primenom *DuoSet ELISA* kita (*R&D Systems*, Mineapolis, Minesota, SAD) [166], dok je koncentracija IL-10 (pg/mL) [167] IL-18 (pg/mL) [168] i cistatina C (ng/mL) [169] u plazmi takođe određena ELISA metodom (*FineTest ELISA Kit*, Vuhan, Hubei, Kina). Svi ELISA testovi su urađeni u skladu sa uputstvima proizvođača.

#### 4.2.5 Izolacija RNK, reverzna transkripcija i relativna ekspresija miRNK

Izolacija RNK, uključujući miRNK, vršila se iz sedimenta urina, koji je izdvojen centrifugiranjem 10 mL urina na 1500 rpm tokom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, približno 9,5 mL supernatanta je bilo odbačeno, dok se preostali sediment koristio za izolaciju RNK (uključujući miRNK) pomoću komercijalnog kita (*miRNEASY Mini Kit, Qiagen*). Za svaki uzorak izolovane RNK se potom vršilo određivanje koncentracije i razblaženje na konačnu koncentraciju od 5 ng/ $\mu$ L. Nakon toga, usledila je reverzna transkripcija, izvršena upotrebom komercijalnog miksa koji sadrži reverznu transkriptazu (*miRCURY LNA RT Kit, Qiagen*). Reakcija se odvijala prema sledećem temperaturnom profilu: 42°C tokom 60 minuta, potom 95°C tokom 5 minuta i hlađenje na 4°C. Nakon dobijanja komplementarne DNK (cDNK) i njenog razblaženja u odnosu 1:30, pripremao se reakcioni miks za analizu ekspresije miRNK. Ovaj miks je sadržao: razblaženu cDNK, odgovarajući master miks (*miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen*), odgovarajući pufer, *RNase-free* vodu i komercijalni set prajmera (*miRCURY LNA miRNA PCR Assay, Qiagen*), prikazan u **Tabeli 4.1**.

**Tabela 4.1** Komercijalni set prajmera za miRNK analizu

hsa-miR-21-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay CATALOG No. - YP00204230 PRODUCT No. - 339306
hsa-miR-142-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay CATALOG No. - YP00204291 PRODUCT No. - 339306
hsa-miR-155-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay CATALOG No. - YP00204308 PRODUCT No. - 339306
hsa-miR-204-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay CATALOG No. - YP00206072 PRODUCT No. - 339306
SNORD48(hsa) miRCURY LNA miRNA PCR Assay CATALOG No. - YP00203903 PRODUCT No. - 339306
<b>Referentni gen</b>

*Real-Time* PCR program se sastojao od sledećih koraka: Segment 1: 1 ciklus na 95°C tokom 2 minuta; Segment 2: 40 ciklusa: 95°C tokom 10s, a potom 56°C tokom 1 minuta; Segment 3: 1 ciklus na 95°C tokom 1 minuta, 60°C tokom 30s i 95°C tokom 30s.

Relativna ekspresija miRNK izračunata je  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodom, prema sledećim jednačinama:

*Jednačina 4.3:*

$$\Delta Ct = Ct (\text{ciljni gen}) - Ct (\text{referentni gen})$$

*Jednačina 4.4:*

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uzorak}) - \Delta Ct (\text{kontrolna grupa, srednja vrednost})$$

Relativna ekspresija se predstavlja kao promena u odnosu na osnovnu vrednost, tj. u odnosu na ekspresiju kod zdravih ispitanika (*Jednačina 4.5*).

*Jednačina 4.5:*

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 4.3 Veličina uzorka

Za proračun veličine uzorka je korišćena koncentracija IL-6 kod transplantiranih pacijenata sa stabilnom funkcijom grafta i zdravih ispitanika, a na osnovu istraživanja *Sonkar i saradnika* [170]. Za snagu studije od 0,8 i verovatnoću greške prve vrste  $\alpha=0,05$ , minimalan studijski uzorak iznosi 172 ispitanika, 86 ispitanika po grupi. Izračunavanje veličine uzorka je izvršeno korišćenjem G-power 3.1.9.7 statističkog paketa.

### 4.4 Statistička obrada rezultata

U okviru deskriptivne statistike određena je aritmetička sredina, standardna devijacija, medijana i interkvartilna razlika za ispitivane parametre. Za procenu odstupanja učestalosti alela i genotipova od *Hardy-Weinberg* (HW) ravnoteže korišćen je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test. Takođe,  $\chi^2$  test je korišćen za testiranje postojanja statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između populacije pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Za poređenje demografskih, biohemijskih, hematoloških parametara i koncentracija IL-6, IL-10, IL-18 i cistatina C između eksperimentalne i kontrolne grupe i/ili dve različite grupe pacijenata, korišćen je Studentov t-test nezavisnih uzoraka (kod normalne distribucije vrednosti parametara) ili Man-Vitnijev U test (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara). Za poređenje parametara između tri različite grupe pacijenata korišćena je jednofaktorska ANOVA različitih grupa sa *Tukey* testom kao *Post-hoc* analizom (kod normalne distribucije vrednosti parametara) ili Kruskal-Volisov test sa Man-Vitnijevim U testom kao *Post-hoc* analizom (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara). Za poređenje parametara u okviru iste grupe ispitanika u različitim vremenskim periodima nakon transplantacije bubrega (najmanje tri različita perioda), korišćena je

jednofaktorska ANOVA ponovljenih merenja (kod normalne distribucije vrednosti parametara) ili Fridmanov test (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara). Univarijantna i multivarijantna linearna regresiona analiza korišćena je za utvrđivanje postojanja veze između ispitivanih parametara i vrednosti zavisne promenljive (Tak C<sub>0</sub>/D, eGFR, ekspresije miRNK). Kaplan-Majerova analiza preživljavanja korišćena je za procenu vremenskih razlika u dostizanju složenih nepovoljnih ishoda, dok su univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza sprovedene radi ispitivanja povezanosti između pripadnosti grupi pacijenata (podele na osnovu Tak IPV, Tak C<sub>0</sub>/D i genotip ispitivanih IL) i složenih nepovoljnih ishoda, uz prilagođavanje uticaja različitih faktora rizika. Pirsonova (kod normalne distribucije vrednosti parametara) i Spirmanova (kada nije zadovoljena normalnost u distribuciji vrednosti parametara) korelaciona analiza korišćene su za ispitivanje jačine veze između ispitivanih parametara. Statističke analize urađene su pomoću softverskog paketa SPSS (verzija 24) na nivou značajnosti  $p < 0,05$ .

## 5 REZULTATI

### 5.1 Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika

U **Tabeli 5.1** prikazane su demografske karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom na terapiji Tak uključenih u istraživanje.

**Tabela 5.1** Demografske karakteristike pacijenata sa transplantiranim bubregom na Tak-baziranoj imunosupresivnoj terapiji

Karakteristika	Pacijenti sa transplantiranim bubregom
Pol (muško/žensko)	75/40 (65,2%/34,8%)
Starost (godine)	39,89±11,30** 39,00 (31,00-48,00)
Telesna masa (kg)	70,00 (61,50-77,50)*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,25 (22,19-26,05)*
Tip transplantacije (živa srodnička/kadaverična)	84/31 (73.0%/27.0%)
Broj transplantacija bubrega:	
I	111 (96.52%)
II	3 (2.61%)
III	1 (0.87 %)

Rezultati su prikazani kao broj (procenat) ili srednja vrednost±standardna devijacija, medijana (interkvartilna razlika). BMI- indeks telesne mase

\*U 6. post-transplantacionom mesecu

\*\*U vreme transplantacije bubrega

U **Tabeli 5.2** su prikazani osnovni demografski, hematološki i biohemijski parametri pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika. Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom vrednosti ispitivanih parametara su određene u 6. post-transplantacionom mesecu kada je započeto njihovo praćenje. Nije bilo statistički značajne razlike u polu i starosti među ispitanicima obe grupe. Na osnovu sprovedenih analiza uočeno je da zdravi ispitanici imaju statistički značajno više vrednosti eritrocita, hemoglobina, hematokrita, glukoze, eGFR, albumina i proteina, dok su vrednosti holesterola, triglicerida, kreatinina i uree bile značajno niže u odnosu na populaciju pacijenata sa transplantiranim bubregom. Nije bilo razlike u ostalim ispitivanim parametrima.

**Tabela 5.2** Demografski, hematološki i biohemijski parametri kod pacijenata sa transplantiranim bubregom prilikom uključivanja u studiju u odnosu na zdravu populaciju

Parametar	Pacijenti (N=115)	Zdravi ispitanici (N=91)	p vrednost
Pol (muško/žensko)	75/40 (65,2%/34,8%)	60/31 (65,9%/34,1%)	$\chi^2=0,056^{***}$ p=0,813
Starost (godine)	39,89±11,30 39,00 (31,00-48,00)	42,49±9,86 45,00 (37,00-50,00)	t=-1,767* p=0,079
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	7,42±2,29 7,30 (5,75-8,90)	7,39±2,08 7,20 (5,75-8,50)	t=0,088* p=0,930
Eritrociti (10 <sup>12</sup> /L)	4,53±0,78 4,46 (3,92-5,04)	5,06±0,45 5,04 (4,72-5,30)	t=-5,740* p<0,001
Hemoglobin (g/L)	130,57±19,50 131,00 (116,00-143,00)	144,67±15,65 145,00 (132,50-156,00)	t=-5,515* p<0,001
Hematokrit (L/L)	39,45 (34,58-43,62)	43,50 (40,40-46,10)	Z=-3,988** p<0,001
AST (U/L)	20,00 (15,15-24,92)	21,00 (18,00-25,00)	Z=-1,120** p=0,263
ALT (U/L)	26,60 (18,00-38,75)	23,00 (17,00-32,00)	Z=-1,559** p=0,119
ALP (U/L)	74,50 (55,00-103,00)	67,50 (55,00-83,50)	Z=-1,724** p=0,085
GGT (U/L)	24,00 (16,50-38,50)	21,00 (16,00-31,00)	Z=-0,766** p=0,444
Glukoza (mmol/L)	5,05 (4,60-5,65)	5,50 (5,10-5,75)	Z=-3,190** p=0,001
Holesterol (mmol/L)	5,77±1,29 5,70 (4,90-6,50)	5,24±0,78 5,27 (4,66-5,76)	t=3,472* p=0,001
Trigliceridi (mmol/L)	2,00 (1,48-2,58)	1,38 (0,94-2,02)	Z=-4,308** p<0,001
Serumski kreatinin (μmol/L)	130,00 (110,00-158,00)	74,50 (64,20-86,45)	Z=-10,831** p<0,001
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	46,98 (37,88-57,62)	89,92 (77,42-99,48)	Z=-10,867** p<0,001
Urea (mmol/L)	7,20 (5,80-9,12)	4,90 (4,10-6,35)	Z=-7,412** p<0,001
Albumini (g/L)	42,00 (39,00-44,00)	43,50 (43,00-45,75)	Z=-4,054** p<0,001
Ukupni proteini (g/L)	70,66±5,58 71,00 (67,00-74,00)	73,26±4,37 73,00 (71,00-76,75)	t=-3,266* p=0,001

Rezultati su prikazani kao broj (procenat) ili srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija, medijana (interkvartilna razlika).

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

\*\*\*: vrednosti parametara su upoređivane hi-kvadrat testom razlike

ALT-alanin aminotransferaza; ALP-alkalna fosfataza; AST-aspartat aminotransferaza; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; GGT-gama-glutamil transferaza.

**Tabela 5.3** Grupe pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na Tak IPV i C<sub>0</sub>/D vrednosti

Parametar	Vrednosti		
Tak IPV (%) između 6. i 12. meseca	22,80 $\pm$ 9,60 21,36 (15,21-27,86)		
Tak IPV (%) između 6. i 12. meseca (tercili)	<i>I tercil:</i> <i>IPV &lt; 18,20</i>	<i>II tercil:</i> <i>18,20 <math>\leq</math> IPV <math>\leq</math> 24,87</i>	<i>III tercil:</i> <i>IPV &gt; 24,87</i>
	13,23 $\pm$ 2,64 13,00 (11,28-15,21)	21,44 $\pm$ 2,06 21,36 (19,39-23,64)	33,81 $\pm$ 7,43 32, 35 (27,86-36,70)
Tak C <sub>0</sub> /D (ng/mL/mg) između 6. i 12. meseca	1,79 $\pm$ 0,91 1,50 (1,15-2,18)		
Tak C <sub>0</sub> /D (ng/mL/mg) između 6. i 12. meseca (podela na grupe na osnovu medijane)	<i>I grupa: C<sub>0</sub>/D <math>\leq</math> 1,50</i>		<i>II grupa: C<sub>0</sub>/D &gt; 1,50</i>
Tak C <sub>0</sub> /D (ng/mL/mg) u 3. mesecu (podela na grupe na osnovu indeksa metabolizma)	<i>Brzi metabolizeri:</i> <i>C<sub>0</sub>/D &lt; 1,05</i>	<i>Intermedijarni metabolizeri:</i> <i>1,05 <math>\leq</math> C<sub>0</sub>/D <math>\leq</math> 1,54</i>	<i>Spori metabolizeri:</i> <i>C<sub>0</sub>/D <math>\geq</math> 1,55</i>

Vrednosti parametara su prikazane kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija, medijana (interkvartilna razlika).

C<sub>0</sub>/D- dozom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; IPV-intraindividualna varijabilnost; Tak-takrolimus

U daljem toku istraživanja, pacijenti su, pored genotipa ispitivanih IL, podeljeni i na grupe prema prosečnim vrednostima Tak IPV i C<sub>0</sub>/D između 6. i 12. post-transplantacionog meseca, kao i Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti određenoj u 3. post-transplantacionom mesecu. Za parametar Tak C<sub>0</sub>/D korišćene su obe podele, podela po medijani i podela po indeksu metabolizma Tak (metaboličkom fenotipu). Uzimajući u obzir IPV, podela na grupe nije

izvršena na osnovu vrednosti medijane, već su formirane tri jednake grupe (tercili). Uporište tome je bila usklađenost granične vrednosti trećeg tercila (24,87%) sa vrednošću od 30%, iznad koje se vrednosti CV% u statistici smatraju visoko varijabilnim (**Tabela 5.3**).

## 5.2 Ispitivanje povezanosti parametara inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti takrolimusa sa parametrima funkcije grafta i nepovoljnim ishodom u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

**Tabela 5.4** Poređenje eGFR vrednosti kod pacijenata u različitim C<sub>0</sub>/D grupama u različitim vremenskim tačkama tokom petogodišnjeg perioda

eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Tak C <sub>0</sub> /D 6-12 meseci (ng/mL/mg)		p vrednost
	C <sub>0</sub> /D ≤1,50	C <sub>0</sub> /D >1,50	
eGFR u 12. mesecu	45,75 ± 16,72 45,62 (35,81-55,55)	56,31 ± 16,76 55,57 (46,38-61,17)	<b>Z=-3,235**</b> <b>p=0,001</b>
eGFR u 24. mesecu	44,92 ± 17,48 47,38 (32,50-55,06)	54,31 ± 13,47 54,71 (46,25-60,49)	<b>t=-2,907*</b> <b>p=0,005</b>
eGFR u 36. mesecu	42,47 ± 15,88 43,18 (32,94-55,29)	53,03 ± 15,47 55,66 (44,46-58,80)	<b>Z=-3,178**</b> <b>p=0,001</b>
eGFR u 48. mesecu	42,33 ± 19,15 41,32 (29,08-58,05)	55,92 ± 18,40 52,94 (43,82-63,70)	<b>Z=-2,935**</b> <b>p=0,003</b>
eGFR u 60. mesecu	44,84 ± 18,38 43,77 (31,63-54,21)	53,59 ± 16,06 53,79 (44,59-60,74)	<b>Z=-2,377**</b> <b>p=0,017</b>

U 6. post-transplantacionom mesecu (nulta tačka dugoročnog post-transplantacionog perioda) postojala je značajna razlika u eGFR vrednostima između ispitivanih C<sub>0</sub>/D grupa (p=0,001).

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

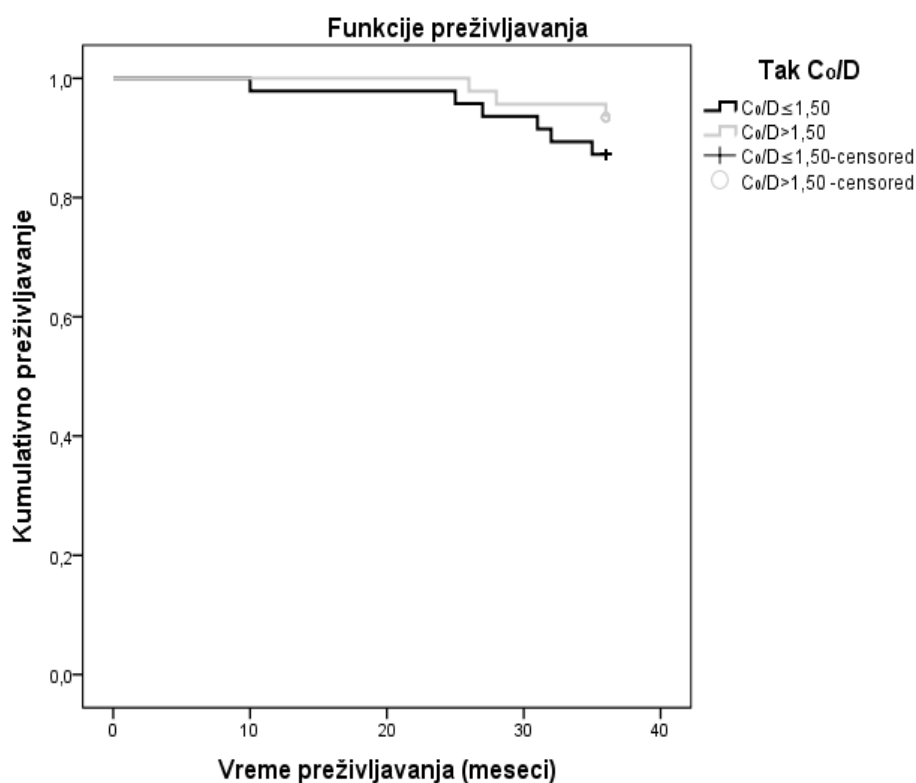
C<sub>0</sub>/D-doza-prilagođena koncentracija takrolimusa na kraju doznog intervala; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; Tak-takrolimus.

Razmatrajući uticaj Tak C<sub>0</sub>/D određene u stabilnom post-transplantacionom periodu (između 6. i 12. post-transplantacionog meseca) na funkciju grafta tokom prvih pet godina nakon transplantacije bubrega, pokazano je da su pacijenti sa transplantiranim bubregom okarakterisani niskim C<sub>0</sub>/D vrednostima (C<sub>0</sub>/D ≤1,50 ng/mL/mg) imali konstantno niže eGFR vrednosti u poređenju sa pacijentima koji su imali Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti veće od 1,50

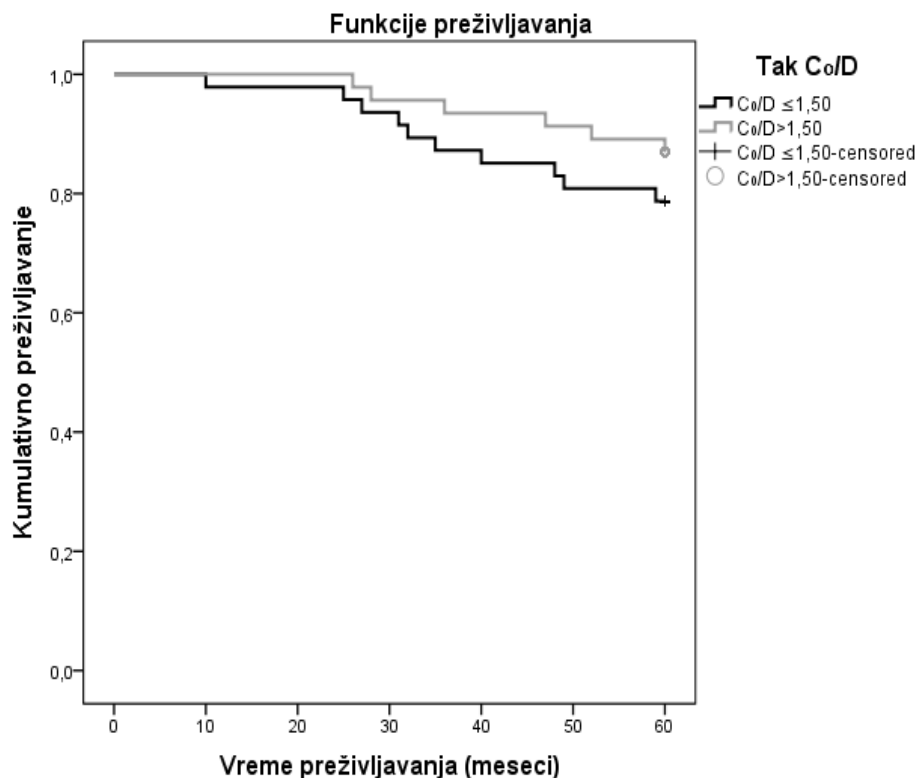
ng/mL/mg u svim vremenskim tačkama. Podela na Tak  $C_0/D$  grupe izvršena je po medijani (**Tabela 5.4**).

Veza između Tak  $C_0/D$  određene između 6. i 12. post-transplantacionog meseca i Tak  $C_0/D$  određene u 3. post-transplantacionom mesecu ispitana je pomoću Spirmanovog ro koeficijenta korelacije. Rezultati sprovedene analize ukazuju na postojanje jake pozitivne korelacije između ove dve vrednosti (Spirmanov  $r=0,755$ ;  $p<0,001$ ). Pored toga, vrednost medijane (1,5 ng/mL/mg) korišćena za podelu na Tak  $C_0/D$  grupe odgovara graničnoj vrednosti (1,55 ng/mL/mg) za kategorizaciju pacijenata prema metaboličkom fenotipu, odnosno podelu na brze/intermedijarne i spore metabolizere.

(a)



(b)



**Grafikon 5.1** Kaplan-Majerova kriva preživljavanja kod pacijenata u različitim Tak  $C_0/D$  grupama tokom 3 godine (a) i tokom 5 godina (b)

Grupe su poredene korišćenjem log-rank testa.

$C_0/D$ -dozom-prilagođena koncentracija takrolimusa na kraju doznog intervala; Tak-takrolimus.

Primenom analize preživljavanja demonstrirano je da nema statistički značajne razlike u trogodišnjem ( $\chi^2=1,055$ ,  $p=0,304$ ) i petogodišnjem ( $\chi^2=1,179$ ,  $p=0,277$ ) preživljavanju (vremenu do pojave ishoda) pacijenata u različitim Tak  $C_0/D$  grupama, iako je postojao evidentan trend ka većem broju nepovoljnih ishoda u grupi pacijenata sa nižim Tak  $C_0/D$  vrednostima (**Grafikon 5.1**). Termin preživljavanje u okviru Kaplan-Majerovih kriva predstavlja rezultat sprovedene analize i označava vreme do pojave nepovoljnog ishoda.

Procenom uticaja parametra intraindividualne varijabilnosti Tak, odnosno Tak IPV vrednosti određene između 6. i 12. post-transplantacionog meseca, na funkciju grafta, nije uočena statistički značajna razlika između formiranih Tak IPV grupa pacijenata. Prvobitno su pacijenti podeljeni u tri ekvivalentne grupe na osnovu vrednosti Tak IPV tercila (**Tabela 5.3**), pri čemu je za svrhu statističkih analiza upoređivan treći tercil ( $IPV > 24,87\%$ ) sa kombinacijom prvog i drugog tercila ( $IPV \leq 24,87\%$ ). Rezultati sprovedenog istraživanja su

ukazali da nije bilo statistički značajne razlike u funkciji grafta među pacijentima u različitim Tak IPV grupama u svim ispitivanim vremenskim tačkama (**Tabela 5.5**).

**Tabela 5.5** Poređenje eGFR vrednosti kod pacijenata u različitim Tak IPV grupama u različitim vremenskim tačkama tokom petogodišnjeg perioda

eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Tak IPV 6-12 meseci (%)		p vrednost
	I i II tercil (IPV≤24,87)	III tercil (IPV>24,87)	
eGFR u 12. mesecu	52,60 ± 16,71 53,08 (43,48-60,04)	49,00 ± 17,86 46,91 (38,29-58,02)	Z=-1,166** p=0,244
eGFR u 24. mesecu	51,27 ± 15,80 52,76 (44,09-59,56)	47,20 ± 16,43 49,02 (36,69-59,24)	t=1,199* p=0,234
eGFR u 36. mesecu	48,37 ± 16,73 49,14 (39,42-57,40)	47,92 ± 15,43 50,57 (38,50-59,18)	Z=-0,362** p=0,717
eGFR u 48. mesecu	51,44 ± 19,15 51,75 (40,06-61,46)	45,59 ± 19,72 46,48 (32,86-58,54)	Z=-1,114** p=0,265
eGFR u 60. mesecu	49,41 ± 17,19 49,31 (39,02-56,32)	49,78 ± 18,34 52,18 (36,30-62,36)	Z=-0,260** p=0,795

U 6. post-transplantacionom mesecu (nulta tačka dugoročnog post-transplantacionog perioda) nije bilo razlike u eGFR vrednostima između IPV grupa (p=0,648).

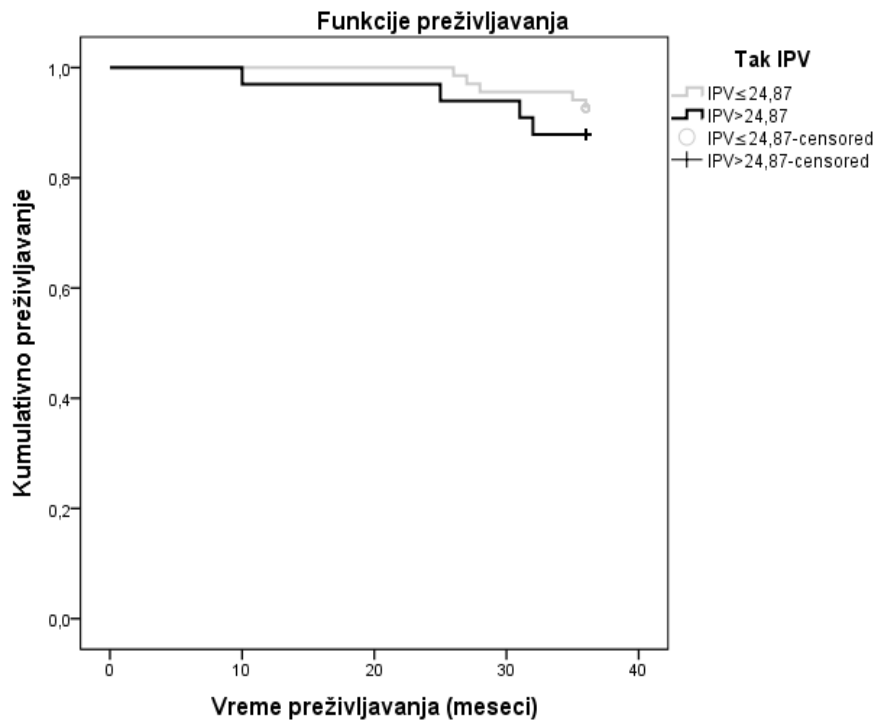
\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

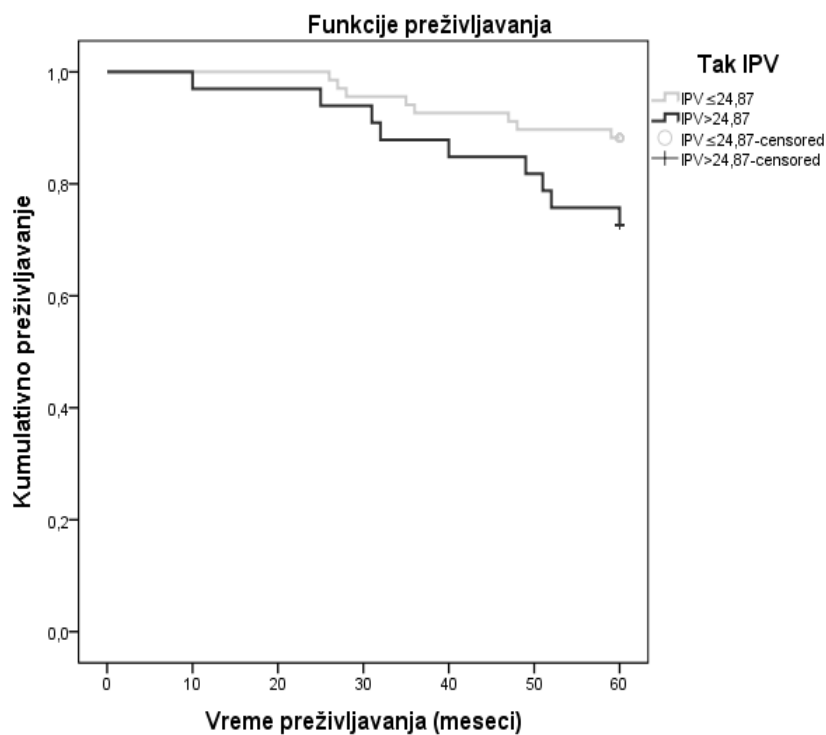
eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; IPV-intraindividualna varijabilnost; Tak-takrolimus.

U daljem toku istraživanja, ispitivana je veza između Tak IPV i nepovoljnih post-transplantacionih ishoda korišćenjem analize preživljavanja (**Grafikon 5.2**). Kumulativno preživljavanje pacijenata u odnosu na pripadnost Tak IPV grupi ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u trogodišnjem preživljavanju između formiranih Tak IPV grupa pacijenata (I i II tercil vs. III tercil) ( $\chi^2=0,673$ , p=0,412). Međutim, posmatranjem petogodišnjeg preživljavanja, indikativna je povezanost između visokih IPV vrednosti (Tak IPV>24,87%) i inferiornih post-transplantacionih ishoda ( $\chi^2=3,769$ , p=0,052).

(a)



(b)

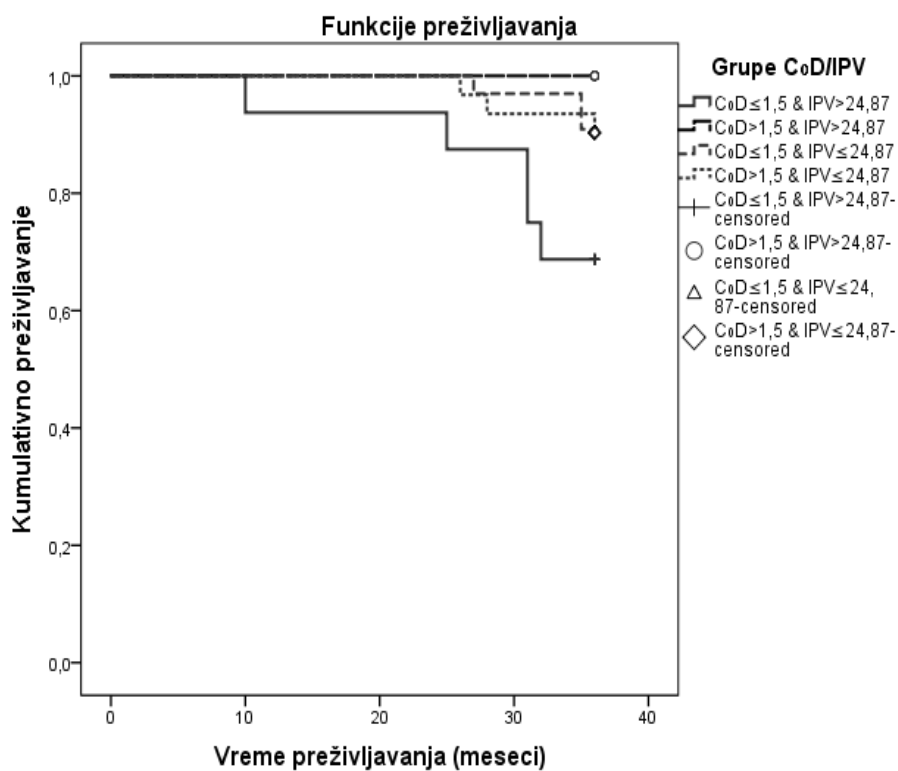


**Grafikon 5.2** Kaplan-Majerova kriva preživljavanja kod pacijenata u različitim Tak IPV grupama tokom 3 godine (a) i tokom 5 godina (b)

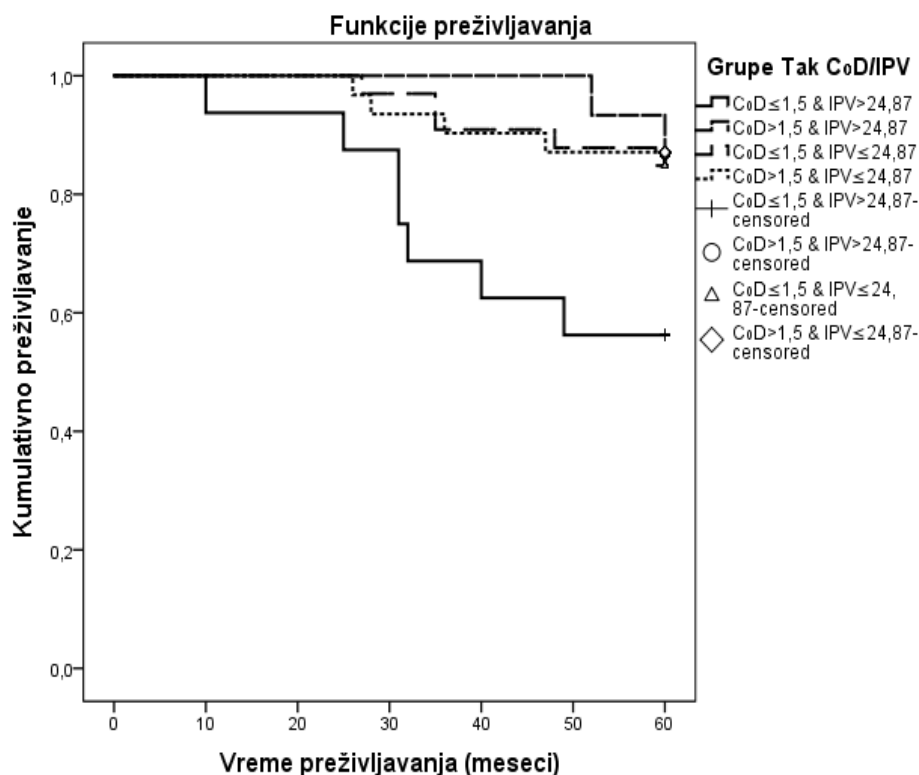
Grupe su poredene korišćenjem log-rank testa. IPV-intraindividualna varijabilnost takrolimusa; Tak-takrolimus.

Kako su literaturni podaci pokazali da parametri inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti Tak mogu udruženo uticati na funkciju grafta i/ili neželjene post-transplantacione ishode [2, 3, 95], onda je sprovedena analiza preživljavanja za grupe formirane kombinovanjem Tak IPV i Tak C<sub>0</sub>/D grupa na sledeći način: Grupa 1: C<sub>0</sub>/D ≤ 1,5 ng/mL/mg & IPV > 24,87%; Grupa 2: C<sub>0</sub>/D > 1,5 ng/mL/mg & IPV > 24,87%; Grupa 3: C<sub>0</sub>/D ≤ 1,5 ng/mL/mg & IPV ≤ 24,87%; Grupa 4: C<sub>0</sub>/D > 1,5 ng/mL/mg & IPV ≤ 24,87%.

(a)



(b)



**Grafikon 5.3** Kaplan-Majerova kriva preživljavanja kod pacijenata u različitim kombinovanim Tak C<sub>0</sub>/D / IPV grupama tokom 3 godine (a) i tokom 5 godina (b)

Grupe su poredene korišćenjem log-rank testa.

C<sub>0</sub>/D-dozaom-prilagođena koncentracija takrolimusa na kraju doznog intervala; IPV-intraindividualna varijabilnost takrolimusa; Tak-takrolimus.

Rezultati su nedvosmisleno ukazali da su pacijenti iz grupe 1 okarakterisani niskim C<sub>0</sub>/D vrednostima i visokim IPV vrednostima imali značajno veći broj neželjenih ishoda nakon transplantacije bubrega u odnosu na ostale kombinovane grupe kako tokom trogodišnjeg ( $\chi^2=9,312$ , **p=0,025**), tako i tokom petogodišnjeg perioda ( $\chi^2=9,861$ , **p=0,020**) (**Grafikon 5.3**). Srednje vreme preživljavanja tokom petogodišnjeg perioda bilo je značajno manje u Grupi 1 (47,38 meseci) u odnosu na ostale grupe pacijenata (Grupa 2: 59,47 meseci; Grupa 3: 57,09 meseci; Grupa 4: 56,68 meseci).

**Tabela 5.6** Univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza pojave neželjenih post-transplantacionih ishoda unutar 5 godina za različite parametre kod transplantiranih pacijenata

Varijabla	B	Standardna greška	Exp (B) (95% IP)	p vrednost
<b>Univarijantna regresija</b>				
<i>Pol</i> (referentna kategorija: muški pol)	0,551	0,486	1,734 (0,669-4,496)	p=0,257
<i>Tip transplantacije</i> (referentna kategorija: živa srodnička)	0,338	0,508	1,402 (0,518-3,791)	p=0,506
<i>Tak IPV</i> (apsolutna vrednost u %)	0,031	0,021	1,031 (0,989-1,076)	p=0,151
<i>Prosečna vrednost Tak C<sub>0</sub>/D između 6. i 12. meseca (ng/mL/mg)</i>	-0,183	0,302	0,833 (0,461-1,504)	p=0,544
<i>Tak C<sub>0</sub>/D / Tak IPV grupe</i> (referentna kategorija: Grupa 2+3+4)	1,400	0,485	4,056 (1,568-10,488)	<b>p=0,004</b>
<i>eGFR u 6. post-transplantacionom mesecu (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</i>	-0,054	0,020	0,947 (0,911-0,986)	<b>p=0,008</b>
<i>Godine u vreme transplantacije</i>	0,026	0,020	1,027 (0,986-1,069)	p=0,196
<b>Multivarijantna regresija</b>				
<i>Tak C<sub>0</sub>/D / Tak IPV grupe</i> (referentna kategorija: Grupa 2+3+4)	1,151	0,522	3,161 (1,136-8,800)	<b>p=0,028</b>
<i>eGFR u 6. post-transplantacionom mesecu (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</i>	-0,051	0,022	0,950 (0,911-0,991)	<b>p=0,018</b>

B-nestandardizovani koeficijent, C<sub>0</sub>/D-dozom-prilagođena koncentracija takrolimusa na kraju doznog intervala; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; Exp (B)-hazard odnos; IPV-intraindividualna varijabilnost takrolimusa; Tak-takrolimus.

Nakon konstruisanja Kaplan-Majerovih kriva preživljavanja, sprovedena je univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza u cilju ispitivanja povezanosti vremena do pojave inferiornog post-transplantacionog ishoda i različitih parametara. Rezultati univarijantne Cox regresione analize su pokazali da su vrednosti eGFR u 6. post-transplantacionom mesecu i grupa pacijenata sa niskim C<sub>0</sub>/D/visokim IPV vrednostima (odnosno Grupa 1: C<sub>0</sub>/D ≤ 1,5 ng/mL/mg & IPV > 24,87%) značajno povezani sa neželjenim ishodima nakon transplantacije. Kao proširenje rezultata Kaplan-Majerove analize, a u cilju procene hazard odnosa, gore pomenuta Grupa 1 upoređena je sa svim ostalim grupama zajedno. Naime, pacijenti okarakterisani niskim C<sub>0</sub>/D/visokim IPV vrednostima imali su 4 puta veći rizik za pojavu neželjenih ishoda u odnosu na ostale kombinacije Tak C<sub>0</sub>/D/Tak IPV. Što se tiče eGFR vrednosti u 6. post-transplantacionom mesecu, rezultati ukazuju da se svakim povećanjem eGFR vrednosti za 1 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, rizik za javljanje neželjenog ishoda smanjuje za 5,3% (**Tabela 5.6**). Naime, 6. post-transplantacioni mesec je nulta faza dugoročnog stabilnog post-transplantacionog perioda, jer se smatra da funkcija grafta u 6. mesecu „odražava” uticaj pre-transplantacionih i post-transplantacionih faktora u ranom periodu na funkciju grafta tokom prvih šest meseci. To uključuje potencijalni uticaj ranog akutnog odbacivanja i odloženu funkciju grafta.

Prateća multivarijantna Cox regresiona analiza potvrdila je da su pacijenti sa niskim C<sub>0</sub>/D/visokim IPV vrednostima (u odnosu na ostale grupe) i eGFR u 6. post-transplantacionom mesecu nezavisni prediktori pojave neželjenih post-transplantacionih ishoda unutar 5 godina nakon transplantacije bubrega (**Tabela 5.6**).

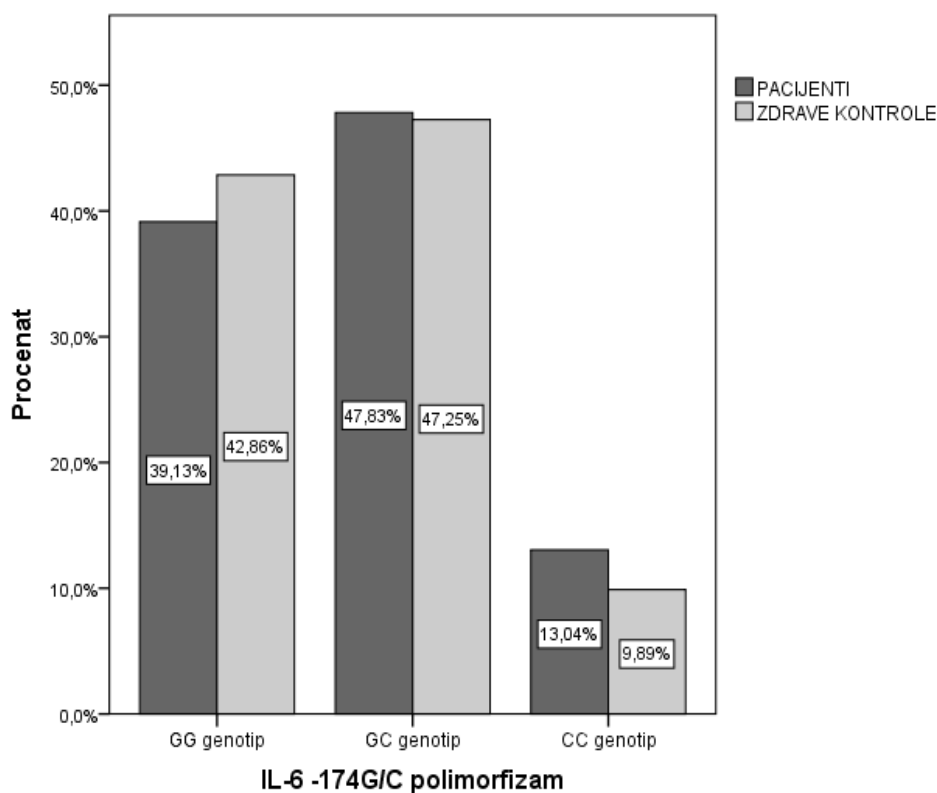
### 5.3 Učestalost genotipova i alela polimorfizama u genima za IL-6, IL-10 i IL-18

Svi pacijenti sa transplantiranim bubregom i zdrave kontrole su genotipizirani radi analize distribucije genotipova i alela za polimorfizme u genima za IL (IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819C/T, IL-10 -592C/A, IL-18 -137G/C i IL-18 -607A/C). Rezultati genotipizacije su ukazali da genotipovi ispitivanih polimorfizama u populaciji pacijenata i zdravih ispitanika nisu odstupali od HW ravnoteže (**Tabela 5.7**). Kako je nađeno da su IL-10 -819C/T i IL-10 -592C/A u potpunoj neravnoteži veze (engl. *linkage disequilibrium*), samo je polimorfizam IL-10 -819C/T korišćen u daljim analizama.

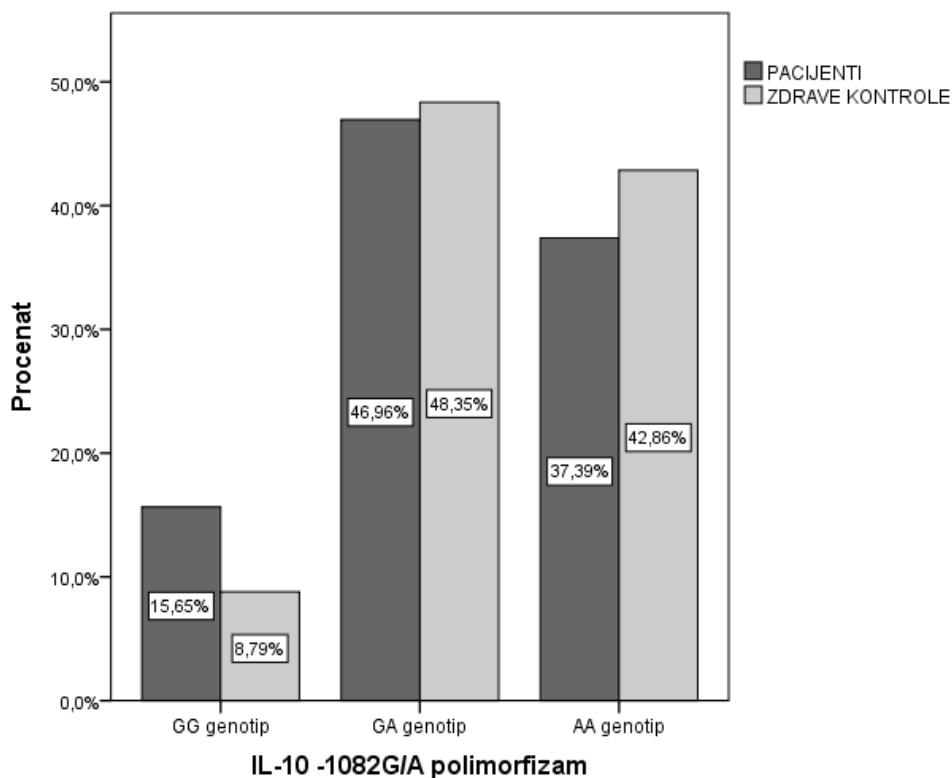
**Tabela 5.7** Provera odstupanja ispitivanih polimorfizama od HW ravnoteže

Genski polimorfizam	HW ravnoteža - $\chi^2$ test	
	Pacijenti	Zdrave kontrole
IL-6 -174G/C	$\chi^2=0,08$ , p=0,78	$\chi^2=0,33$ , p=0,57
IL-10 -1082G/A	$\chi^2=0,02$ , p=0,88	$\chi^2=0,80$ , p=0,37
IL-10 -819C/T	$\chi^2=0,73$ , p=0,39	$\chi^2=2,45$ , p=0,12
IL-18 -137G/C	$\chi^2=2,88$ , p=0,09	$\chi^2=0,65$ , p=0,42
IL-18 -607A/C	$\chi^2=0,08$ , p=0,78	$\chi^2=2,23$ , p=0,14

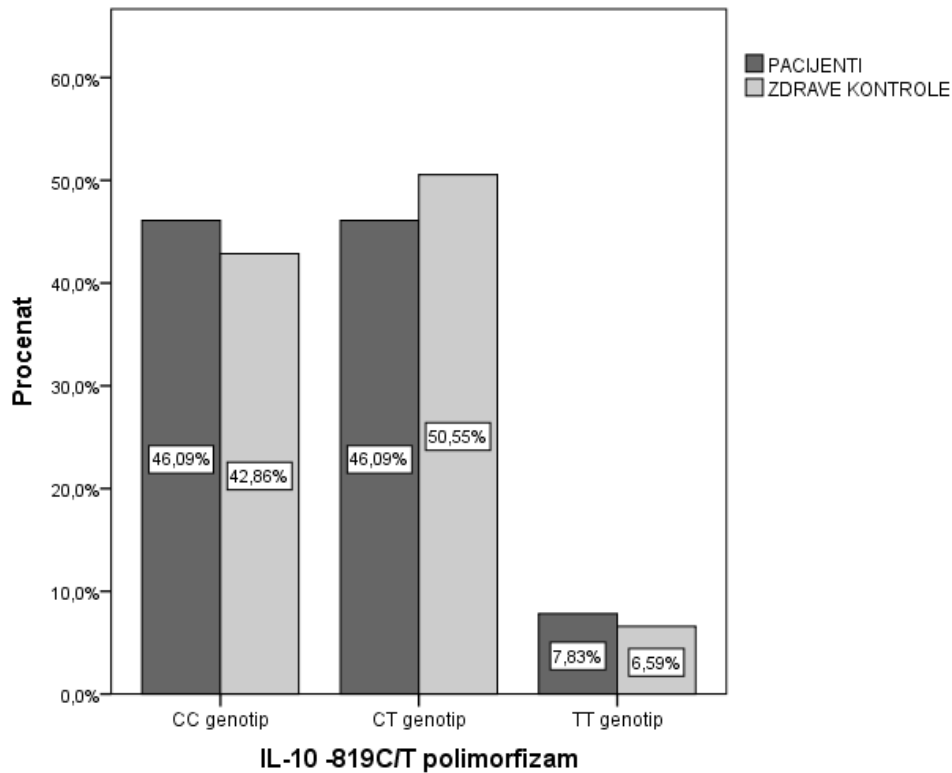
Učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama u populaciji pacijenata i zdravih kontrola (zdravih ispitanika) prikazana je na **Grafikonima 5.4-5.8**, dok je učestalost alela prikazana u **Tabeli 5.8**.



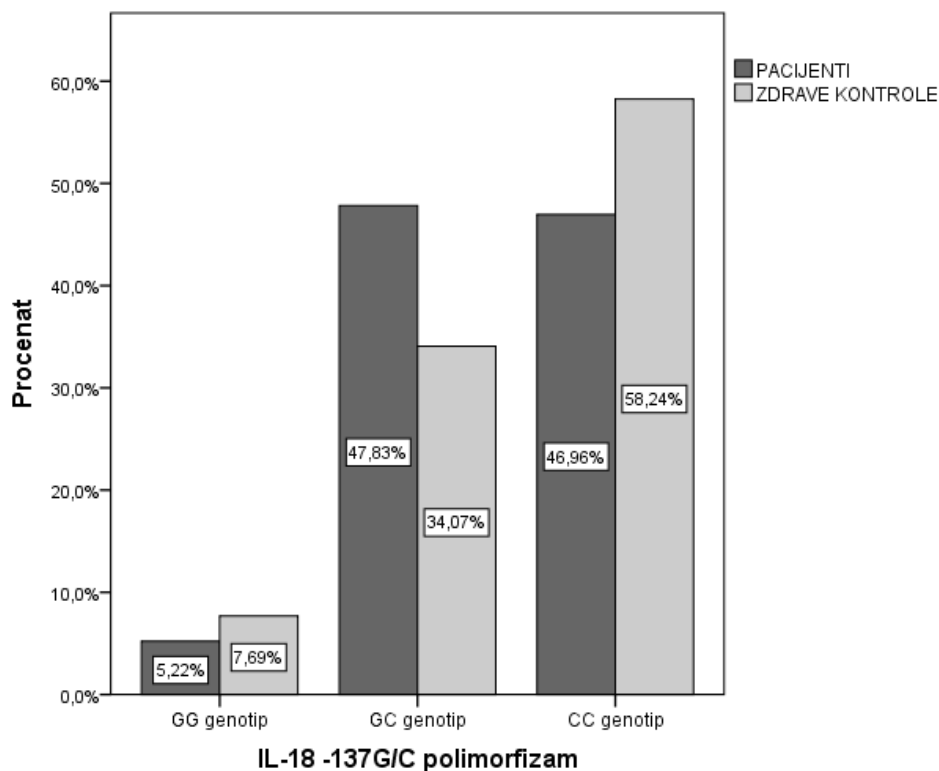
**Grafikon 5.4** Učestalost genotipova polimorfizma IL-6 -174G/C kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=115) i zdravih kontrola (n=91)



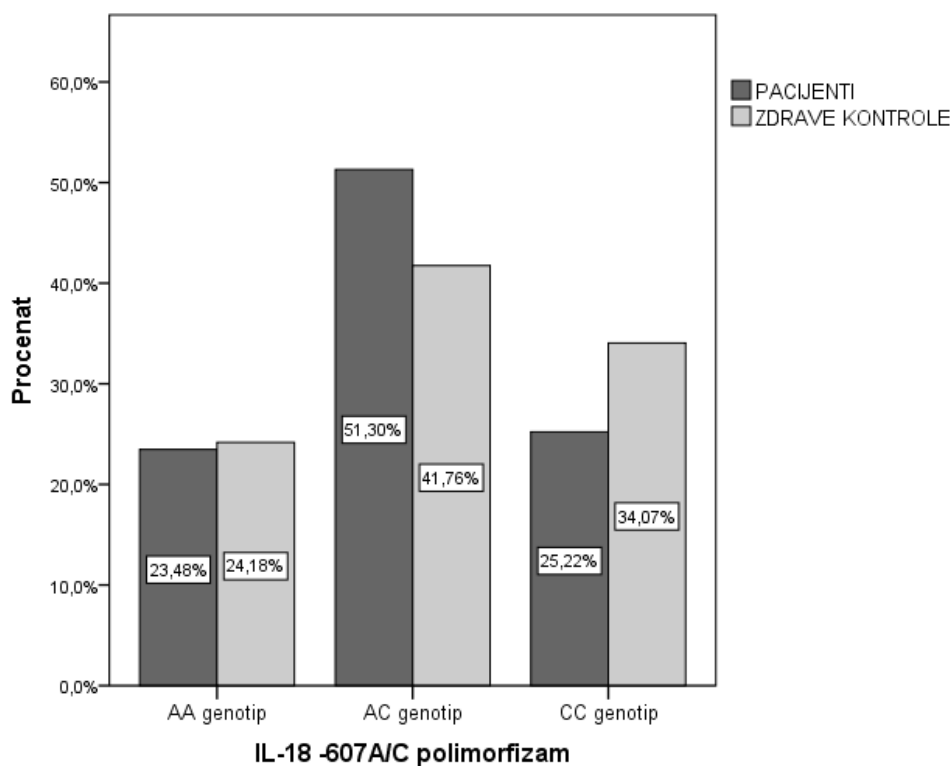
**Grafikon 5.5** Učestalost genotipova polimorfizma IL-10 -1082G/A kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=115) i zdravih kontrola (n=91)



**Grafikon 5.6** Učestalost genotipova polimorfizma IL-10 -819C/T kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=115) i zdravih kontrola (n=91)



**Grafikon 5.7** Učestalost genotipova polimorfizma IL-18 -137G/C kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=115) i zdravih kontrola (n=91)



**Grafikon 5.8** Učestalost genotipova polimorfizma IL-18 -607A/C kod pacijenata sa transplantiranim bubregom (n=115) i zdravih kontrola (n=91)

**Tabela 5.8** Učestalost alela ispitivanih polimorfizama u genima za interleukine

Genski polimorfizam	Frekvencija alela	
	Pacijenti	Zdrave kontrole
IL-6 -174G/C	G alel: 63,0%	G alel: 66,5%
	C alel: 37,0%	C alel: 33,5%
IL-10 -1082G/A	G alel: 39,1%	G alel: 33,0%
	A alel: 60,9%	A alel: 67,0%
IL-10 -819C/T	C alel: 69,1%	C alel: 68,1%
	T alel: 30,9%	T alel: 31,9%
IL-18 -137G/C	G alel: 29,1%	G alel: 24,7%
	C alel: 70,9%	C alel: 75,3%
IL-18 -607A/C	A alel: 49,1%	A alel: 45,05%
	C alel: 50,9%	C alel: 54,95%

Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti genotipova (IL-6 -174G/C:  $\chi^2=0,610$ ,  $p=0,737$ ; IL-10 -1082G/A:  $\chi^2=2,297$ ,  $p=0,317$ ; IL-10 -819C/T:  $\chi^2=0,435$ ,  $p=0,804$ ; IL-18 -137G/C:  $\chi^2=4,043$ ,  $p=0,132$ ; IL-18 -607A/C:  $\chi^2=4,297$ ,  $p=0,117$ ) niti učestalosti alela (IL-6 -174G/C:  $\chi^2=0,526$ ,  $p=0,468$ ; IL-10 -1082G/A:  $\chi^2=1,667$ ,  $p=0,197$ ; IL-10 -819C/T:  $\chi^2=0,047$ ,  $p=0,828$ ; IL-18 -137G/C:  $\chi^2=0,996$ ,  $p=0,318$ ; IL-18 -607A/C:  $\chi^2=0,677$ ,  $p=0,411$ ) svih ispitivanih polimorfizama između pacijenata i zdravih kontrola, što implicira da populacija zdravih ispitanika odgovara populaciji pacijenata sa transplantiranim bubregom u pogledu učestalosti genotipova i alela.

#### **5.4 Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama ispitivanih IL-6, IL-10 i IL-18 na dozni režim i izloženost takrolimusa u različitim periodima nakon transplantacije bubrega**

U cilju ispitivanja uticaja genskih polimorfizama ispitivanih IL na Tak farmakokinetičke parametre, korišćena su dva genetička modela u **Tabelama 5.9-5.13**:

- Homozigot za divlji alel (*engl. wild type, WW*) vs. Heterozigot (*WM*) + Homozigot za mutantni alel (*engl. mutant type, MM*)
- Homozigot za divlji alel (*eng. wild type, WW*) + Heterozigot (*WM*) vs. Homozigot za mutantni alel (*engl. mutant type, MM*)

U **Tabeli 5.9a** i **5.9b** prikazano je poređenje Tak farmakokinetičkih parametara u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega u odnosu na 2 genetička modela IL-6 -174G/C polimorfizma. Dobijeni rezultati u **Tabeli 5.9a** su pokazali da su nosioci IL-6 -174GG genotipa primenjivali veće Tak dnevne doze u odnosu na nosioce IL-6 -174C alela u svim posmatranim vremenskim tačkama. Pored toga, nosioci IL-6 -174GG genotipa su imali značajno niže Tak  $C_0/D$  vrednosti u poređenju sa nosiocima IL-6 -174C alela u 6., 12., 36., 48. i 60. post-transplantacionom mesecu. Nasuprot tome, Tak  $C_0$  vrednosti bile su uporedive između različitih grupa pacijenata.

**Tabela 5.9a** Dnevna doza,  $C_0$  i  $C_0/D$  Tak u odnosu na IL-6 -174G/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 1: WW vs. WM+MM)

IL-6 -174G/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG	6,57±3,83 5,90 (4,10)	5,45±3,11 4,80 (2,65)	4,50±2,58 4,00 (3,21)	4,12±2,22 4,00 (2,50)	4,05±2,18 4,00 (2,63)	4,23±2,43 3,00 (2,00)
GC+CC	4,86±2,63 4,75 (3,00)	4,13±2,45 3,56 (2,31)	3,47±1,99 3,00 (1,96)	2,95±1,69 2,59 (1,50)	2,82±1,42 2,75 (1,13)	2,73±1,47 2,33 (1,00)
Statistika	<b>Z=-2,475**</b> <b>p=0,013</b>	<b>Z=-2,748**</b> <b>p=0,006</b>	<b>Z=-2,196**</b> <b>p=0,028</b>	<b>Z=-3,387**</b> <b>p=0,001</b>	<b>Z=-3,279**</b> <b>p=0,001</b>	<b>Z=-3,883**</b> <b>p&lt;0,001</b>
	<b>Tak <math>C_0</math> (ng/mL)</b>					
GG	7,87±1,77 8,18 (2,77)	7,19±1,44 7,30 (1,86)	6,51±1,22 6,55 (1,37)	6,18±1,30 6,08 (1,84)	6,10±1,64 5,88 (2,02)	6,28±1,34 6,20 (1,44)
GC+CC	7,48±2,24 7,47 (2,62)	6,88±1,82 7,44 (2,11)	6,35±1,78 6,65 (2,14)	6,11±1,97 6,24 (2,68)	5,63±1,69 5,99 (2,10)	5,74±2,03 5,95 (2,05)
Statistika	t=0,911* p=0,364	Z=-0,503** p=0,615	Z=-0,187** p=0,851	t=0,230* p=0,819	Z=-0,825** p=0,409	Z=-1,056** p=0,291
	<b>Tak <math>C_0/D</math> (ng/mL/mg)</b>					
GG	1,49±0,73 1,30 (0,76)	1,64±0,82 1,42 (0,80)	1,80±0,83 1,68 (1,06)	1,84±0,89 1,74 (0,99)	1,78±0,74 1,73 (1,16)	1,89±0,99 1,75 (1,40)
GC+CC	1,92±1,04 1,62 (1,05)	2,08±1,03 1,89 (1,30)	2,26±1,27 1,95 (1,25)	2,48±1,40 2,24 (1,17)	2,34±1,23 2,10 (1,39)	2,53±1,44 2,17 (1,61)
Statistika	<b>Z=-2,075**</b> <b>p=0,038</b>	<b>Z=-2,306**</b> <b>p=0,021</b>	Z=-1,688** p=0,091	<b>Z=-2,899**</b> <b>p=0,004</b>	<b>Z=-2,111**</b> <b>p=0,035</b>	<b>Z=-2,208**</b> <b>p=0,027</b>

$C_0$ -minimalna koncentracija leka;  $C_0/D$ -dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

Kada je poređenje sprovedeno korišćenjem drugog genetičkog modela (IL-6 -174G alel vs. IL-6 CC genotip), nije dobijena statistički značajna razlika ni za jednu od sprovedenih analiza (Tabela 5.9b).

**Tabela 5.9b** Dnevna doza,  $C_0$  i  $C_0/D$  Tak u odnosu na IL-6 -174G/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 2: WW+WM vs. MM)

IL-6 -174G/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG+GC	5,62±3,39 5,00 (3,87)	4,65±2,89 4,00 (2,54)	3,94±2,36 3,25 (2,17)	3,50±2,08 3,00 (1,96)	3,36±1,92 3,00 (2,00)	3,40±2,15 3,00 (2,00)
CC	4,87±1,97 4,75 (2,79)	4,60±2,14 4,00 (3,00)	3,46±1,72 3,25 (3,11)	2,79±1,17 2,75 (1,79)	2,80±1,19 2,75 (2,00)	2,76±0,89 3,00 (1,25)
Statistika	Z=-0,569** p=0,569	Z=-0,340** p=0,734	Z=-0,515** p=0,607	Z=-1,252** p=0,211	Z=-0,886** p=0,376	Z=-0,635** p=0,526
	<b>Tak <math>C_0</math> (ng/mL)</b>					
GG+GC	7,66±2,10 7,72 (2,82)	6,94±1,64 7,27 (1,93)	6,40±1,46 6,55 (2,07)	6,23±1,71 6,24 (2,05)	5,84±1,65 5,92 (2,07)	6,00±1,80 6,08 (1,59)
CC	7,45±1,98 7,40 (2,07)	7,37±1,95 7,70 (2,35)	6,48±2,27 6,75 (1,88)	5,59±1,86 5,79 (2,97)	5,61±1,90 6,19 (2,09)	5,64±1,89 5,85 (1,95)
Statistika	t=0,365* p=0,716	Z=-1,287** p=0,198	Z=-0,240** p=0,810	t=1,276* p=0,205	t=0,477* p=0,634	Z=-0,296** p=0,767
	<b>Tak <math>C_0/D</math> (ng/mL/mg)</b>					
GG+GC	1,77±1,00 1,46 (1,07)	1,92±0,99 1,72 (1,26)	2,05±1,10 1,91 (1,07)	2,20±1,27 1,95 (1,18)	2,08±1,00 1,96 (1,05)	2,29±1,34 2,07 (1,50)
CC	1,67±0,67 1,45 (0,81)	1,83±0,85 1,65 (1,06)	2,30±1,40 1,85 (1,71)	2,38±1,20 2,02 (2,08)	2,42±1,62 2,11 (1,63)	2,24±1,20 2,08 (1,42)
Statistika	Z=-0,158** p=0,875	Z=-0,046** p=0,963	Z=-0,297** p=0,767	Z=-0,477** p=0,634	Z=-0,543** p=0,587	Z=-0,093** p=0,926

$C_0$ -minimalna koncentracija leka;  $C_0/D$ -dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnjevim U testom

Ispitivanjem uticaja IL-10 -1082G/A polimorfizma na farmakokinetiku Tak korišćenjem modela 1 (IL-10 -1082GG genotip vs. IL-10 -1082A alel), nađeno je da su nosioci -1082GG genotipa imali manje Tak dnevne doze u poređenju sa nosiocima -1082A alela u 6., 36., 48. i 60. mesecu nakon transplantacije, kao i više Tak  $C_0/D$  u 36. i 60. post-transplantacionom mesecu. Nije bilo statistički značajne razlike u Tak  $C_0$  vrednostima (Tabela 5.10a).

**Tabela 5.10a** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-10 -1082G/A genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 1: WW vs. WM+MM)

IL-10 -1082G/A polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG	4,64±3,45 3,50 (2,81)	4,02±3,29 3,50 (2,25)	3,64±2,90 2,50 (2,67)	2,96±2,63 2,33 (1,13)	2,66±2,14 2,00 (1,50)	2,40±2,00 2,00 (0,96)
GA+AA	5,69±3,16 5,00 (3,50)	4,78±2,67 4,00 (2,67)	3,92±2,16 3,50 (2,50)	3,50±1,84 3,00 (1,75)	3,41±1,75 3,00 (1,75)	3,50±1,98 3,00 (1,88)
Statistika	<b>Z=-1,987**</b> <b>p=0,047</b>	Z=-1,938** p=0,053	Z=-1,408** p=0,159	<b>Z=-2,374**</b> <b>p=0,018</b>	<b>Z=-2,634**</b> <b>p=0,008</b>	<b>Z=-3,372**</b> <b>p=0,001</b>
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
GG	6,99±1,55 6,89 (1,93)	6,46±1,77 6,48 (2,56)	6,69±1,96 6,90 (1,92)	6,16±1,87 6,53 (2,56)	5,43±1,97 5,65 (2,13)	6,18±2,47 6,55 (1,55)
GA+AA	7,77±2,16 7,78 (2,79)	7,12±1,65 7,50 (1,80)	6,35±1,50 6,55 (2,08)	6,13±1,72 6,13 (2,34)	5,89±1,61 5,97 (2,00)	5,90±1,64 6,05 (1,51)
Statistika	t=-1,444* p=0,152	Z=-1,408** p=0,159	Z=-0,539** p=0,590	t=0,060* p=0,952	t=-1,023* p=0,309	Z=-1,298** p=0,194
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
GG	2,20±1,36 1,80 (2,08)	2,21±1,22 1,89 (1,78)	2,43±1,33 2,28 (1,31)	2,59±1,03 2,48 (1,05)	2,53±1,44 2,43 (1,17)	3,19±1,63 3,05 (2,25)
GA+AA	1,66±0,82 1,40 (0,87)	1,85±0,91 1,66 (0,96)	2,02±1,09 1,84 (0,92)	2,16±1,30 1,88 (0,99)	2,05±1,01 1,90 (0,94)	2,09±1,16 1,95 (1,15)
Statistika	Z=-1,486** p=0,137	Z=-1,178** p=0,239	Z=-1,440** p=0,150	<b>Z=-2,339**</b> <b>p=0,019</b>	Z=-1,862** p=0,063	<b>Z=-2,858**</b> <b>p=0,004</b>

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

Kada je za podelu na grupe korišćen model 2 (IL-10 -1082G alel vs. IL-10 -1082AA genotip), jedina značajna razlika između grupa bila je u Tak C<sub>0</sub> vrednostima u 12. mesecu (**Tabela 5.10b**).

**Tabela 5.10b** Dnevna doza,  $C_0$  i  $C_0/D$  Tak u odnosu na IL-10 -1082G/A genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 2: WW+WM vs. MM)

IL-10 -1082G/A polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG+GA	5,32±3,08 4,75 (3,44)	4,62±2,79 4,00 (2,67)	3,86±2,34 3,25 (2,73)	3,41±2,01 3,00 (2,00)	3,18±1,81 2,75 (2,00)	3,16±1,88 2,92 (2,00)
AA	5,83±3,48 5,00 (3,58)	4,69±2,82 4,00 (2,78)	3,89±2,23 3,33 (2,50)	3,39±1,98 3,00 (2,00)	3,44±1,90 3,00 (1,63)	3,54±2,25 3,00 (1,71)
Statistika	Z=-0,890** p=0,374	Z=-0,040** p=0,968	Z=-0,206** p=0,837	Z=-0,070** p=0,944	Z=-1,072** p=0,284	Z=-1,053** p=0,292
	<b>Tak <math>C_0</math> (ng/mL)</b>					
GG+GA	7,45±2,02 7,68 (2,49)	6,78±1,69 7,00 (2,06)	6,36±1,66 6,68 (2,00)	6,20±1,81 6,37 (2,22)	5,79±1,68 5,95 (2,24)	5,97±1,80 6,22 (1,56)
AA	7,94±2,15 7,78 (2,72)	7,40±1,61 7,68 (1,37)	6,50±1,46 6,55 (2,10)	6,03±1,60 5,83 (2,38)	5,83±1,69 5,97 (1,83)	5,90±1,85 5,60 (1,81)
Statistika	t=-1,137* p=0,258	<b>Z=-2,164**</b> <b>p=0,030</b>	Z=-0,325** p=0,745	t=0,460* p=0,646	t=-0,101* p=0,920	Z=-1,440** p=0,150
	<b>Tak <math>C_0/D</math> (ng/mL/mg)</b>					
GG+GA	1,78±0,98 1,49 (1,03)	1,85±0,95 1,64 (0,88)	2,08±1,07 1,93 (1,30)	2,19±0,98 2,15 (1,14)	2,15±1,04 2,09 (1,11)	2,32±1,25 2,10 (1,52)
AA	1,73±0,92 1,36 (0,95)	2,01±1,01 1,86 (1,36)	2,10±1,26 1,85 (0,73)	2,29±1,65 1,82 (1,24)	2,09±1,22 1,80 (1,18)	2,23±1,43 2,07 (1,53)
Statistika	Z=-0,240** p=0,811	Z=-0,907** p=0,364	Z=-0,192** p=0,847	Z=-0,679** p=0,497	Z=-0,890** p=0,373	Z=-0,650** p=0,516

$C_0$ -minimalna koncentracija leka;  $C_0/D$ -dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnjevim U testom

Kada je analiziran IL-10 -819C/T polimorfizam, poređenjem farmakokinetičkih parametara među grupama formiranim na osnovu genetičkog modela 1 (IL-10 -819CC genotip vs. IL-10 -819T alel), zapažena je razlika u dnevnoj dozi Tak u 6. mesecu i Tak C<sub>0</sub> u 60. post-transplantacionom mesecu (**Tabela 5.11a**), dok nije dobijena statistički značajna razlika ni za jednu od sprovedenih analiza kada su grupe formirane na osnovu genetičkog modela 2 (IL-10 -819C alel vs. IL-10 -819TT genotip) (**Tabela 5.11b**).

**Tabela 5.11a** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-10 -819C/T genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 1: WW vs. WM+MM)

IL-10 -819C/T polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
CC	5,13±3,47 4,25 (2,69)	4,58±3,16 3,56 (2,68)	3,80±2,39 3,08 (2,37)	3,38±2,10 3,00 (2,00)	3,20±1,85 2,75 (2,00)	3,04±1,86 3,00 (1,75)
CT+TT	5,82±2,99 6,00 (3,00)	4,70±2,45 4,00 (2,59)	3,93±2,21 3,50 (2,56)	3,43±1,91 3,00 (2,13)	3,35±1,84 3,00 (1,94)	3,58±2,16 3,00 (2,44)
Statistika	<b>Z=-2,121**</b> <b>p=0,034</b>	Z=-1,308** p=0,191	Z=-0,690** p=0,490	Z=-0,458** p=0,647	Z=-0,731** p=0,465	Z=-1,449** p=0,147
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
CC	7,42±1,95 7,04 (2,51)	6,91±1,78 7,08 (2,37)	6,36±1,60 6,33 (1,85)	6,34±1,82 6,56 (2,37)	5,89±1,82 5,95 (2,05)	6,24±2,11 6,30 (1,43)
CT+TT	7,81±2,18 7,78 (2,42)	7,08±1,60 7,50 (1,34)	6,45±1,58 6,70 (2,18)	5,95±1,64 5,82 (2,29)	5,73±1,55 5,97 (2,00)	5,65±1,40 5,55 (1,75)
Statistika	t=-0,942* p=0,348	Z=-0,499** p=0,618	Z=-0,695** p=0,487	t=1,136* p=0,259	t=0,461* p=0,646	<b>Z=-2,023**</b> <b>p=0,043</b>
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
CC	1,94±1,07 1,78 (1,14)	1,98±1,03 1,78 (1,45)	2,11±1,10 1,93 (1,27)	2,21±0,89 2,07 (0,99)	2,20±1,15 1,97 (1,10)	2,51±1,36 2,12 (1,56)
CT+TT	1,61±0,83 1,36 (0,63)	1,85±0,93 1,65 (0,96)	2,06±1,18 1,85 (1,01)	2,24±1,52 1,78 (1,23)	2,07±1,07 1,96 (1,17)	2,05±1,24 1,98 (1,31)
Statistika	Z=-1,708** p=0,088	Z=-0,753** p=0,452	Z=-0,537** p=0,591	Z=-1,069** p=0,285	Z=-0,619** p=0,536	Z=-1,789** p=0,074

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-doza prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

**Tabela 5.11b** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-10 -819C/T genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 2: WW+WM vs. MM)

IL-10 -819C/T polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
CC+CT	5,43±2,95 5,00 (3,81)	4,61±2,66 4,00 (2,67)	3,85±2,15 3,25 (2,46)	3,34±1,84 3,00 (2,00)	3,18±1,63 3,00 (2,00)	3,21±1,84 3,00 (2,00)
TT	6,36±5,76 4,88 (3,88)	5,05±4,27 4,00 (2,33)	4,14±3,72 3,16 (1,81)	4,12±3,39 3,50 (2,25)	4,38±3,42 3,50 (3,25)	4,43±3,55 3,00 (2,00)
Statistika	Z=-0,113** p=0,910	Z=-0,054** p=0,957	Z=-0,369** p=0,712	Z=-0,469** p=0,639	Z=-0,991** p=0,322	Z=-1,180** p=0,238
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
CC+CT	7,56±2,11 7,67 (2,49)	6,94±1,72 7,30 (2,10)	6,36±1,60 6,55 (2,02)	6,11±1,79 6,16 (2,47)	5,78±1,73 5,92 (2,11)	5,94±1,85 6,08 (1,57)
TT	8,38±1,43 8,27 (2,61)	7,84±0,66 7,65 (1,05)	7,05±1,14 6,94 (2,30)	6,51±0,76 6,48 (1,33)	6,08±0,93 6,22 (1,86)	6,00±1,33 5,40 (2,40)
Statistika	t=-1,068* p=0,288	Z=-1,492** p=0,136	Z=-1,250** p=0,211	t=-1,232* p=0,237	t=-0,477* p=0,634	Z=-0,259** p=0,796
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
CC+CT	1,73±0,92 1,44 (1,01)	1,88±0,95 1,66 (1,12)	2,03±1,04 1,85 (1,09)	2,21±1,22 1,95 (1,20)	2,11±1,02 1,96 (1,12)	2,28±1,21 2,08 (1,51)
TT	2,05±1,38 1,49 (2,11)	2,22±1,27 1,80 (1,98)	2,71±1,95 2,00 (2,37)	2,47±1,80 1,93 (1,67)	2,34±1,93 1,87 (2,37)	2,39±2,38 1,80 (1,80)
Statistika	Z=-0,698** p=0,485	Z=-0,821** p=0,411	Z=-0,888** p=0,375	Z=-0,025** p=0,980	Z=-0,266** p=0,790	Z=-0,732** p=0,464

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

U **Tabela 5.12a i 5.12b** prikazan je potencijalni uticaj IL-18 -607A/C polimorfizma na dozni režim i izloženost Tak. Nije zapažena razlika ni u jednom od ispitivanih Tak farmakokinetičkih parametara tokom celokupnog ispitivanog perioda između nosioca IL-18 -607AA genotipa i nosioca IL-18 -607C alela (genetički model 1 - **Tabela 5.12a**), dok je poređenjem farmakokinetičkih parametara između nosioca IL-18 -607A alela i nosioca IL-18 -607CC genotipa (genetički model 2 - **Tabela 5.12b**) dobijena značajna razlika samo u dnevnoj dozi Tak u 12. post-transplantacionom mesecu.

**Tabela 5.12a** Dnevna doza,  $C_0$  i  $C_0/D$  Tak u odnosu na IL-18 -607A/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 1: WW vs. WM+MM)

IL-18 -607A/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
AA	5,45±4,15 4,10 (4,58)	4,43±3,22 3,50 (3,00)	3,93±2,84 3,00 (2,00)	3,41±2,42 2,58 (2,00)	3,31±2,24 2,75 (2,00)	3,37±2,36 3,00 (1,92)
AC+CC	5,52±2,95 5,00 (3,50)	4,71±2,67 4,00 (2,67)	3,86±2,12 3,50 (2,44)	3,41±1,87 3,00 (1,67)	3,27±1,73 3,00 (2,00)	3,28±1,93 3,00 (2,00)
Statistika	Z=-0,865** p=0,387	Z=-1,036** p=0,300	Z=-0,711** p=0,477	Z=-0,892** p=0,373	Z=-0,397** p=0,691	Z=-0,199** p=0,842
	<b>Tak <math>C_0</math> (ng/mL)</b>					
AA	7,43±1,85 7,77 (2,02)	6,72±1,78 7,13 (2,38)	6,51±1,80 6,60 (1,13)	6,31±2,03 6,58 (2,71)	6,20±1,62 6,40 (1,90)	6,05±1,23 6,25 (1,59)
AC+CC	7,68±2,14 7,58 (2,90)	7,08±1,66 7,48 (1,68)	6,38±1,53 6,60 (2,15)	6,09±1,65 6,16 (2,21)	5,70±1,69 5,75 (1,88)	5,92±1,95 6,05 (1,62)
Statistika	Z=-0,136** p=0,892	Z=-0,616** p=0,538	Z=-0,050** p=0,960	t=0,514* p=0,608	t=1,218* p=0,226	Z=-0,541** p=0,589
	<b>Tak <math>C_0/D</math> (ng/mL/mg)</b>					
AA	1,88±1,02 1,60 (1,36)	2,06±1,12 1,93 (1,35)	2,20±1,27 1,99 (1,42)	2,29±1,01 2,26 (1,18)	2,33±1,30 2,15 (1,13)	2,31±1,15 2,18 (1,64)
AC+CC	1,73±0,94 1,40 (0,96)	1,87±0,93 1,66 (1,04)	2,05±1,10 1,84 (1,08)	2,21±1,33 1,93 (1,16)	2,08±1,05 1,93 (1,07)	2,28±1,37 2,03 (1,47)
Statistika	Z=-0,745** p=0,457	Z=-0,794** p=0,427	Z=-0,511** p=0,609	Z=-0,887** p=0,375	Z=-1,022** p=0,307	Z=-0,585** p=0,559

$C_0$ -minimalna koncentracija leka;  $C_0/D$ -dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

**Tabela 5.12b** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-18 -607A/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 2: WW+WM vs. MM)

IL-18 -607A/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
AA+AC	5,35±3,16 5,00 (3,67)	4,47±2,86 3,83 (2,65)	3,72±2,31 3,00 (1,75)	3,38±2,04 3,00 (2,00)	3,24±1,79 3,00 (2,00)	3,25±2,01 3,00 (1,92)
CC	5,97±3,41 5,00 (4,10)	5,15±2,56 5,00 (2,20)	4,35±2,19 4,29 (2,34)	3,48±1,88 3,42 (1,54)	3,38±1,99 3,00 (2,25)	3,46±2,10 3,00 (2,25)
Statistika	Z=-0,883** p=0,377	<b>Z=-2,109**</b> <b>p=0,035</b>	Z=-1,931** p=0,053	Z=-0,849** p=0,396	Z=-0,345** p=0,730	Z=-0,753** p=0,452
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
AA+AC	7,49±2,17 7,67 (2,47)	6,82±1,76 7,22 (2,08)	6,38±1,69 6,55 (2,15)	6,09±1,89 6,12 (2,50)	5,82±1,66 5,96 (2,06)	6,05±1,88 6,18 (1,79)
CC	8,02±1,76 8,24 (3,02)	7,54±1,30 7,60 (1,69)	6,49±1,23 6,70 (1,55)	6,29±1,18 6,46 (1,83)	5,76±1,77 5,90 (1,75)	5,62±1,54 5,85 (1,54)
Statistika	t=-1,110* p=0,270	Z=-1,676** p=0,094	Z=-0,189** p=0,850	t=-0,656* p=0,514	t=0,164* p=0,870	Z=-0,981** p=0,327
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
AA+AC	1,78±0,95 1,50 (1,10)	1,96±1,00 1,78 (1,27)	2,14±1,10 1,96 (1,20)	2,19±1,24 1,93 (1,16)	2,14±1,07 1,97 (1,07)	2,33±1,27 2,10 (1,49)
CC	1,70±0,99 1,39 (0,66)	1,77±0,88 1,50 (0,69)	1,93±1,26 1,56 (1,12)	2,34±1,34 2,07 (1,27)	2,11±1,23 1,84 (1,34)	2,14±1,47 1,75 (1,63)
Statistika	Z=-0,579** p=0,563	Z=-0,990** p=0,322	Z=-1,570** p=0,116	Z=-0,207** p=0,836	Z=-0,273** p=0,785	Z=-0,995** p=0,320

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

U **Tabelama 5.13a i 5.13b** prikazan je potencijalni uticaj drugog ispitivanog IL-18 polimorfizma -137G/C na dozni režim i izloženost Tak. Nije zapažena razlika ni u jednom od ispitivanih Tak farmakokinetičkih parametara tokom svih ispitivanih vremenskih tačaka kada je poređenje vršeno između nosioca IL-18 -137GG genotipa i nosioca IL-18 -137C alela (genetički model 1 - **Tabela 5.13a**), dok je poređenjem farmakokinetičkih parametara između nosioca IL-18 -137G alela i nosioca IL-18 -137CC genotipa (genetički model 2 - **Tabela 5.13b**) dobijena značajna razlika u Tak C<sub>0</sub> u 6. mesecu i Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti u 24. post-transplantacionom mesecu.

**Tabela 5.13a** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-18 -137G/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 1: WW vs. WM+MM)

IL-18 -137G/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG	4,86±3,19 3,50 (5,40)	3,76±1,56 3,62 (2,50)	2,99±1,46 2,75 (1,98)	2,51±1,10 2,50 (1,82)	3,08±1,24 2,75 (2,00)	2,67±1,21 2,00 (1,50)
GC+CC	5,54±3,24 5,00 (3,76)	4,70±2,84 4,00 (2,67)	3,93±2,32 3,38 (2,42)	3,46±2,02 3,00 (2,00)	3,29±1,87 3,00 (2,00)	3,35±2,06 3,00 (2,00)
Statistika	Z=-0,619** p=0,536	Z=-0,664** p=0,507	Z=-1,114** p=0,265	Z=-1,266** p=0,206	Z=-0,015** p=0,988	Z=-0,977** p=0,329
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
GG	7,35±0,97 7,47 (1,82)	6,07±1,27 5,82 (1,29)	6,68±1,10 6,65 (1,69)	5,75±2,00 5,98 (3,51)	6,46±1,85 7,20 (2,83)	6,25±1,38 6,48 (1,66)
GC+CC	7,64±2,12 7,72 (2,65)	7,06±1,69 7,50 (1,83)	6,39±1,61 6,60 (2,10)	6,16±1,72 6,22 (2,02)	5,76±1,67 5,92 (1,99)	5,93±1,84 6,05 (1,58)
Statistika	t=-0,303* p=0,763	Z=-1,754** p=0,079	Z=-0,262** p=0,793	t=-0,564* p=0,574	t=0,987* p=0,326	Z=-0,990** p=0,322
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
GG	2,05±1,19 2,11 (1,93)	1,88±0,71 1,84 (1,09)	2,52±0,75 2,51 (1,14)	2,45±0,78 2,29 (1,16)	2,21±0,57 2,14 (1,13)	2,60±0,91 2,78 (1,63)
GC+CC	1,74±0,95 1,43 (1,01)	1,91±0,99 1,70 (1,09)	2,06±1,15 1,85 (1,08)	2,21±1,29 1,93 (1,21)	2,13±1,13 1,96 (1,12)	2,26±1,34 2,07 (1,41)
Statistika	Z=-0,798** p=0,425	Z=-0,331** p=0,740	Z=-1,795** p=0,073	Z=-1,060** p=0,289	Z=-0,741** p=0,459	Z=-1,227** p=0,220

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnijevim U testom

**Tabela 5.13b** Dnevna doza, C<sub>0</sub> i C<sub>0</sub>/D Tak u odnosu na IL-18 -137G/C genotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (model 2: WW+WM vs. MM)

IL-18 -137G/C polimorfizam	Period nakon transplantacije bubrega					
	6. mesec	12. mesec	24. mesec	36. mesec	48. mesec	60. mesec
	<b>Dnevna doza Tak (mg)</b>					
GG+GC	5,16±3,41 4,50 (4,17)	4,49±2,86 4,00 (3,54)	3,63±2,28 3,00 (2,00)	3,23±1,91 2,67 (2,00)	3,09±1,71 2,75 (2,00)	3,06±1,77 3,00 (1,13)
CC	5,88±3,00 5,00 (2,75)	4,82±2,72 4,00 (2,42)	4,15±2,28 3,50 (2,21)	3,62±2,08 3,25 (1,50)	3,50±1,97 3,00 (2,25)	3,61±2,29 3,00 (2,50)
Statistika	Z=-1,720** p=0,085	Z=-1,083** p=0,279	Z=-1,896** p=0,058	Z=-1,603** p=0,109	Z=-1,095** p=0,274	Z=-1,088** p=0,277
	<b>Tak C<sub>0</sub> (ng/mL)</b>					
GG+GC	7,19±2,14 7,47 (2,22)	6,86±1,71 7,22 (2,02)	6,49±1,75 6,70 (2,16)	6,05±1,95 6,05 (2,37)	5,81±1,69 5,96 (2,16)	6,16±1,99 6,25 (1,91)
CC	8,12±1,90 8,32 (2,77)	7,15±1,65 7,50 (2,00)	6,31±1,37 6,50 (1,79)	6,25±1,46 6,40 (2,07)	5,81±1,68 5,89 (1,74)	5,67±1,52 5,85 (1,52)
Statistika	<b>Z=-2,142**</b> <b>p=0,032</b>	Z=-0,612** p=0,540	Z=-0,665** p=0,506	t=-0,578* p=0,564	Z=-0,514** p=0,607	Z=-1,261** p=0,207
	<b>Tak C<sub>0</sub>/D (ng/mL/mg)</b>					
GG+GC	1,85±1,06 1,53 (1,22)	2,03±1,11 1,76 (1,60)	2,28±1,22 2,03 (1,35)	2,27±1,34 1,98 (1,12)	2,22±1,11 2,10 (1,10)	2,42±1,20 2,17 (1,33)
CC	1,66±0,82 1,42 (0,81)	1,78±0,79 1,65 (1,06)	1,86±1,00 1,68 (0,77)	2,17±1,17 1,92 (1,02)	2,03±1,10 1,82 (1,03)	2,12±1,44 1,75 (1,34)
Statistika	Z=-0,530** p=0,596	Z=-0,705** p=0,481	<b>Z=-2,017**</b> <b>p=0,044</b>	Z=-0,577** p=0,564	Z=-1,118** p=0,264	Z=-1,786** p=0,074

C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala;

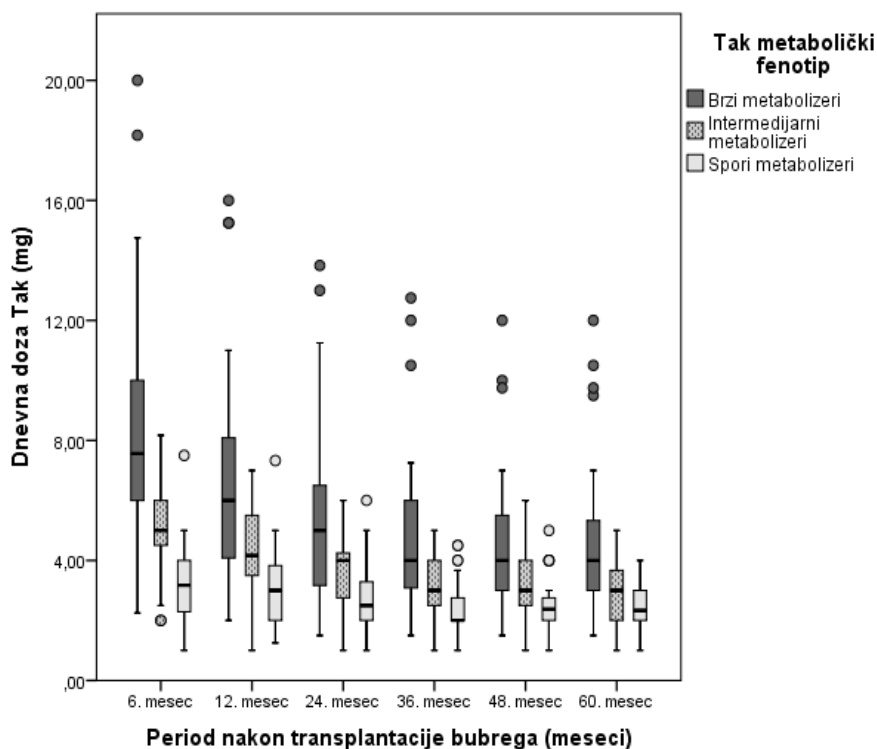
Tak-takrolimus.

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

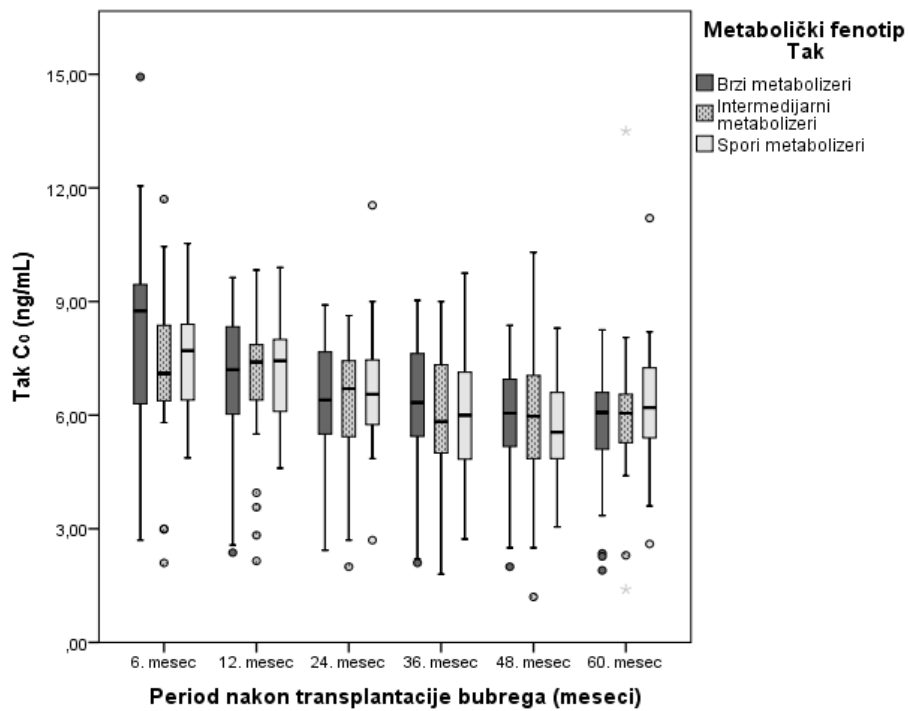
\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnjevim U testom

Prethodne studije su ukazale da se Tak  $C_0/D$  određena u 3. post-transplantacionom mesecu može smatrati indeksom brzine metabolizma Tak. Stoga su pacijenti kategorizovani u tri grupe:  $<1,05$  ng/mL/mg (brzi metabolizeri),  $1,05-1,54$  ng/mL/mg (intermedijarni metabolizeri) i  $\geq 1,55$  ng/mL/mg (spori metabolizeri). Na **Grafikonu 5.9** prikazano je poređenje između Tak dnevne doze,  $C_0$  i  $C_0/D$ , respektivno, u odnosu na metabolički fenotip Tak. Dobijeni rezultati su pokazali značajnu razliku u dnevnoj dozi u odnosu na Tak metabolički fenotip u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (6. mesec:  $\chi^2=49,129$ ,  $p<0,001$ ; 12. mesec:  $\chi^2=34,440$ ,  $p<0,001$ ; 24. mesec:  $\chi^2=29,512$ ,  $p<0,001$ ; 36. mesec:  $\chi^2=28,398$ ,  $p<0,001$ ; 48. mesec:  $\chi^2=22,392$ ,  $p<0,001$ ; 60. mesec:  $\chi^2=22,715$ ,  $p<0,001$ ), pri čemu takva razlika nije primećena u vrednostima Tak  $C_0$  (6. mesec:  $F=1,505$ ,  $p=0,227$ ; 12. mesec:  $\chi^2=0,089$ ,  $p=0,956$ ; 24. mesec:  $\chi^2=0,137$ ,  $p=0,934$ ; 36. mesec:  $\chi^2=1,071$ ,  $p=0,586$ ; 48. mesec:  $\chi^2=0,598$ ,  $p=0,742$ ; 60. mesec:  $\chi^2=1,658$ ,  $p=0,436$ ). Kada je reč o vrednostima Tak  $C_0/D$ , pokazana je značajna razlika u u odnosu na grupe metaboličkog fenotipa (6. mesec:  $\chi^2=51,309$ ,  $p<0,001$ ; 12. mesec:  $\chi^2=43,478$ ,  $p<0,001$ ; 24. mesec:  $\chi^2=38,417$ ,  $p<0,001$ ; 36. mesec:  $\chi^2=30,175$ ,  $p<0,001$ ; 48. mesec:  $\chi^2=24,977$ ,  $p<0,001$ ; 60. mesec:  $\chi^2=30,912$ ,  $p<0,001$ ), što implicira da su veće doze u grupi brzih metabolizera doprinele nižim Tak  $C_0/D$  vrednostima.

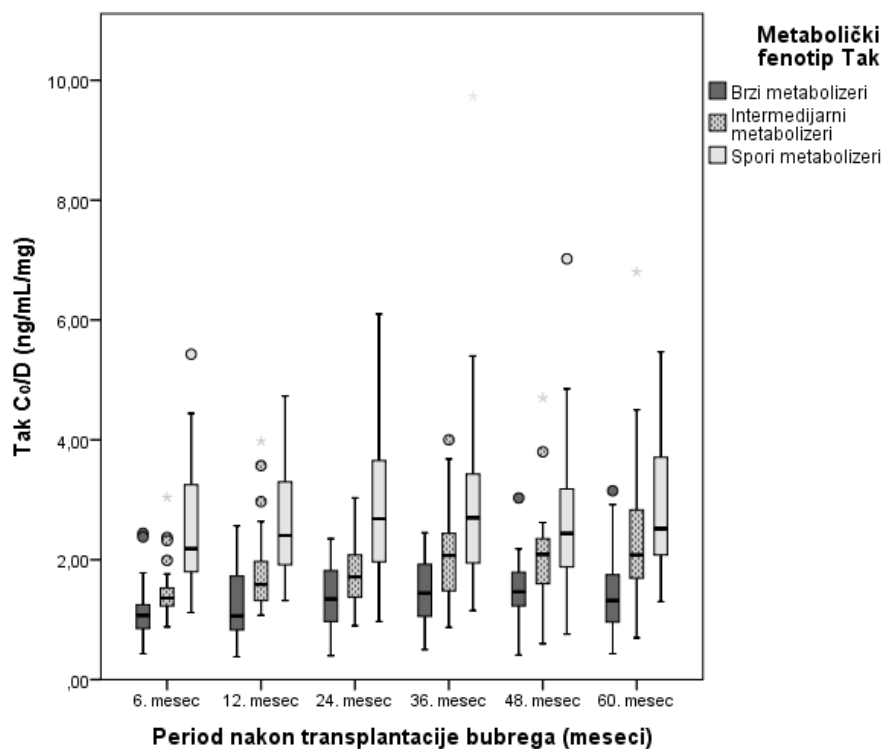
(a)



(b)



(c)



**Grafikon 5.9** Farmakokinetički parametri u odnosu na metabolički fenotip takrolimusa u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega a) Tak dnevna doza b) Tak C<sub>0</sub> c) Tak C<sub>0</sub>/D

**Tabela 5.14** Univarijantna linearna regresiona analiza uticaja različitih parametara na C<sub>0</sub>/D takrolimusa od 6-60 post-transplantacionog meseca kod transplantiranih bubrežnih pacijenata

Varijabla	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%)	p <sup>2</sup>
<b>Pol</b> (konstanta: muški pol)	2,157 (2,045-2,269)	0,057	/	p<0,001	1,3	<b>p=0,004</b>
Ženski vs. muški pol	-0,277 (-0,468-(-0,086))	0,097	-0,116	p=0,004		
<b>Godine u vreme Tx</b>	0,020 (0,012-0,028)	0,004	0,195	p<0,001	3,8	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Period nakon Tx</b> (konstanta: 6. mesec)	1,753 (1,532-1,974)	0,113	/	p<0,001	2,4	<b>p=0,002</b>
12. vs. 6. mesec	0,152 (-0,161-0,465)	0,159	0,050	p=0,341		
24. vs. 6. mesec	0,332 (0,019-0,645)	0,159	0,109	p=0,038		
36./48./60. vs. 6. mesec	0,454 (0,199-0,710)	0,130	0,200	p=0,001		
<b>Tak metabolički fenotip</b> (konstanta:brzi metabolizeri)	1,337 (1,202-1,471)	0,068	/	p<0,001	30,2	<b>p&lt;0,001</b>
Intermedijarni vs. brzi	0,612 (0,416-0,808)	0,100	0,246	p<0,001		
Spori vs. brzi	1,483 (1,296-1,669)	0,095	0,628	p<0,001		
<b>IL-6 -174G/C genotip</b> (konstanta: GG genotip)	1,226 (0,922-1,530)	0,155	/	p<0,001	5,0	<b>p&lt;0,001</b>
GC+CC vs. GG genotip	0,521 (0,340-0,703)	0,093	0,225	p<0,001		
<b>IL-10 -1082G/A genotip</b> (konstanta: GG genotip)	3,092 (2,632-3,552)	0,234	/	p<0,001	3,3	<b>p&lt;0,001</b>
GA+AA vs. GG genotip	-0,560 (-0,805-(-0,315))	0,125	-0,180	p<0,001		
<b>IL-18 -137G/C genotip</b> (konstanta: GG+GC genotip)	2,432 (2,149-2,715)	0,144	/	p<0,001	1,2	<b>p=0,007</b>
CC vs. GG+GC genotip	-0,251 (-0,433-(-0,070))	0,092	-0,110	p=0,007		

B- нестанardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; IP-interval poverenja; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse Tak C<sub>0</sub>/D datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus.

Univarijantna linearna regresiona analiza je sprovedena kako bi se procenio uticaj različitih parametara na Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti između 6. i 60. post-transplantacionog meseca. Kao varijable uzete su demografske karakteristike (pol, godine), period nakon transplantacije bubrega, Tak metabolički fenotip baziran na Tak C<sub>0</sub>/D u 3. post-transplantacionom mesecu, kao i polimorfizmi IL za koje je prethodnim analizama utvrđeno da ispoljavaju uticaj na Tak C<sub>0</sub>/D (IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A i IL-18 -137G/C). Za sve ispitivane varijable nađeno je da ispoljavaju značajan uticaj na Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti objašnjavajući varijansu Tak C<sub>0</sub>/D u različitom procentu (**Tabela 5.14**).

**Tabela 5.15** Multivarijantna linearna regresiona analiza uticaja različitih parametara na C<sub>0</sub>/D takrolimusa od 6-60 post-transplantacionog meseca kod transplantiranih bubrežnih pacijenata

Varijabela	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%)	p <sup>2</sup>
<b>Konstanta</b>	1,226 (0,531-1,920)	0,354	/	p=0,001	36,3	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Pol</b> Ženski vs. muški pol	-0,071 (-0,234-0,093)	0,083	-0,030	p=0,396		
<b>Godine u vreme Tx</b>	0,005 (-0,002-0,012)	0,004	0,049	p=0,161		
<b>Period nakon Tx</b> 12. vs. 6. mesec	0,152 (-0,108-0,412)	0,132	0,050	p=0,252		
24. vs. 6. mesec	0,332 (0,072-0,592)	0,132	0,109	<b>p=0,012</b>		
36./48./60. vs. 6. mesec	0,454 (0,242-0,667)	0,108	0,200	<b>p&lt;0,001</b>		
<b>Tak metabolički fenotip</b> Intermedijarni vs. brzi	0,625 (0,435-0,816)	0,097	0,252	<b>p&lt;0,001</b>		
Spori vs. brzi	1,348 (1,159-1,537)	0,096	0,571	<b>p&lt;0,001</b>		
<b>IL-6 -174G/C genotip</b> GC+CC vs. GG genotip	0,305 (0,145-0,465)	0,081	0,131	<b>p&lt;0,001</b>		
<b>IL-10 -1082G/A genotip</b> GA+AA vs. GG genotip	-0,268 (-0,481-(-0,054))	0,109	-0,086	<b>p=0,014</b>		
<b>IL-18 -137G/C genotip</b> CC vs. GG+GC genotip	-0,169 (-0,321-(-0,018))	0,077	-0,074	<b>p=0,029</b>		

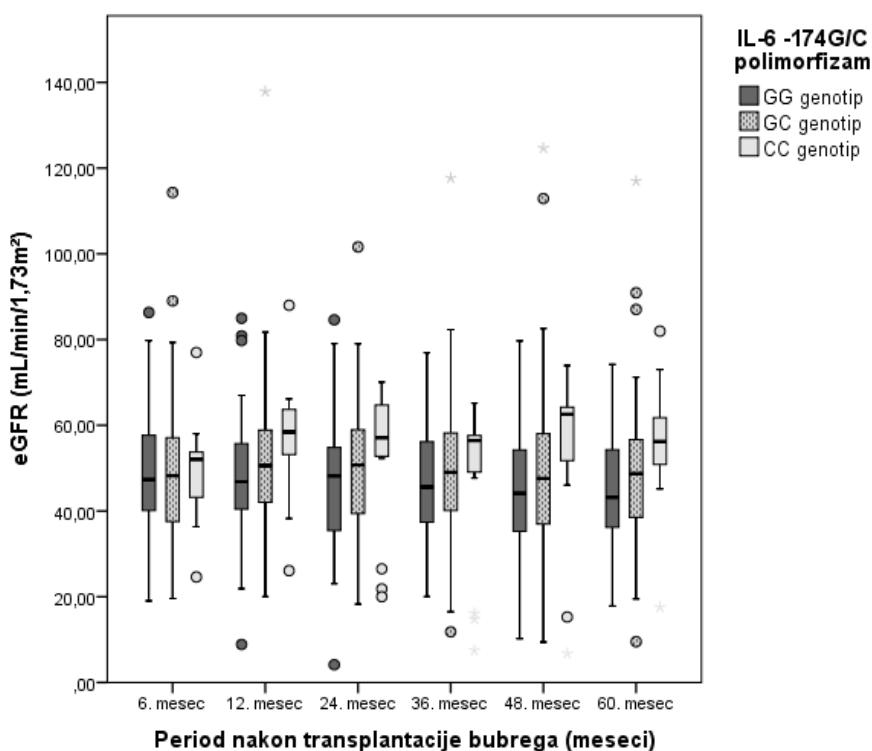
B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; IP-interval poverenja; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse Tak C<sub>0</sub>/D datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus.

Prateća standardna multivarijantna linearna regresiona analiza potvrdila je jedinstven doprinos perioda nakon transplantacije bubrega, Tak metaboličkog fenotipa i polimorfizama IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A i IL-18 -137G/C predikciji Tak  $C_0/D$  vrednosti u toku perioda praćenja transplantiranih bubrežnih pacijenata (6.-60. mesec). Rezultati demonstriraju da se više predviđene Tak  $C_0/D$  vrednosti mogu očekivati u kasnijem post-transplantacionom periodu (>24 meseci) u odnosu na referentni 6. mesec, kod intermedijarnih/sporih metabolizera u odnosu na brze metabolizere, kao i kod nosioca IL-6 -174GC+CC (u odnosu na -174GG), IL-10 -1082GG (u odnosu na -1082GA+AA) i IL-18 -137GG+GC (u odnosu na -137CC). Dati model kao celina objašnjava 36,3% ukupne varijanse Tak  $C_0/D$  (Tabela 5.15).

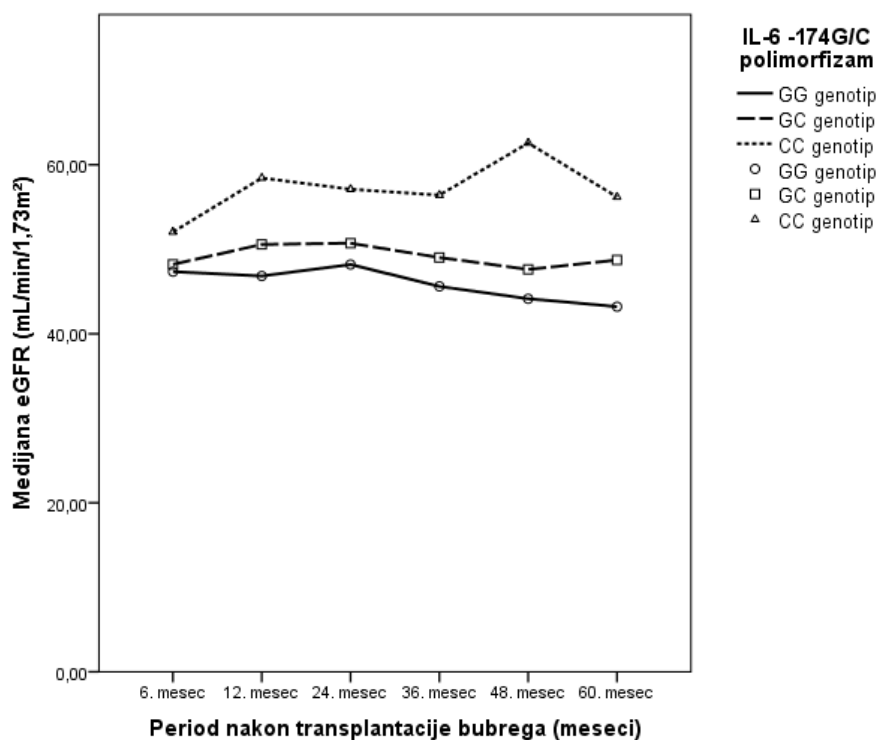
### 5.5 Ispitivanje povezanosti genskih polimorfizama ispitivanih IL-6, IL-10 i IL-18 sa funkcijom grafta i nepovoljnim ishodima u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

U cilju ispitivanja povezanosti polimorfizama u genima za IL-6, IL-10 i IL-18 sa funkcijom grafta, sprovedena je analiza poređenja eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega kako između različitih genotipova ispitivanih polimorfizama, tako i unutar različitih genotipova (analiza ponovljenih merenja). Rezultati sprovedene analize prikazani su na **Grafikonima 5.10-5.14**.

(a)



(b)



**Grafikon 5.10** Poređenje eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (a) između (b) unutar različitih IL-6 -174G/C genotipova

U sprovedenom istraživanju nosioci IL-6 -174GG genotipa imali su značajno niže eGFR vrednosti u 12. ( $\chi^2=6,058$ ; **p=0,048**), 48. ( $\chi^2=6,143$ ; **p=0,046**) i 60. post-transplantacionom mesecu ( $\chi^2=6,676$ ; **p=0,036**) u poređenju sa heterozigotima i nosiocima IL-6 -174CC genotipa. Nije bilo razlike u eGFR vrednostima između različitih IL-6 genotipova u 6. ( $\chi^2=0,309$ ; p=0,857), 24. (F=0,680; p=0,509) i 36. post-transplantacionom mesecu ( $\chi^2=2,011$ ; p=0,366). Naknadnim testovima poređenja različitih grupa (GG vs. GC, GG vs. CC, GC vs. CC), utvrđeno je da se eGFR vrednosti značajno razlikuju između nosioca IL-6 -174GG i IL-6 -174CC genotipova u 12. (*Post-hoc* GG vs. CC: Z=-2,414; **p=0,016**), 48. (*Post-hoc* GG vs. CC: Z=-2,476; **p=0,013**) i 60. post-transplantacionom mesecu (*Post-hoc* GG vs. CC: Z=-2,650; **p=0,008**) uz primenu Bonferonijeve korekcije alfa vrednosti (0,05/3=0,017) (**Grafikon 5.10a**).

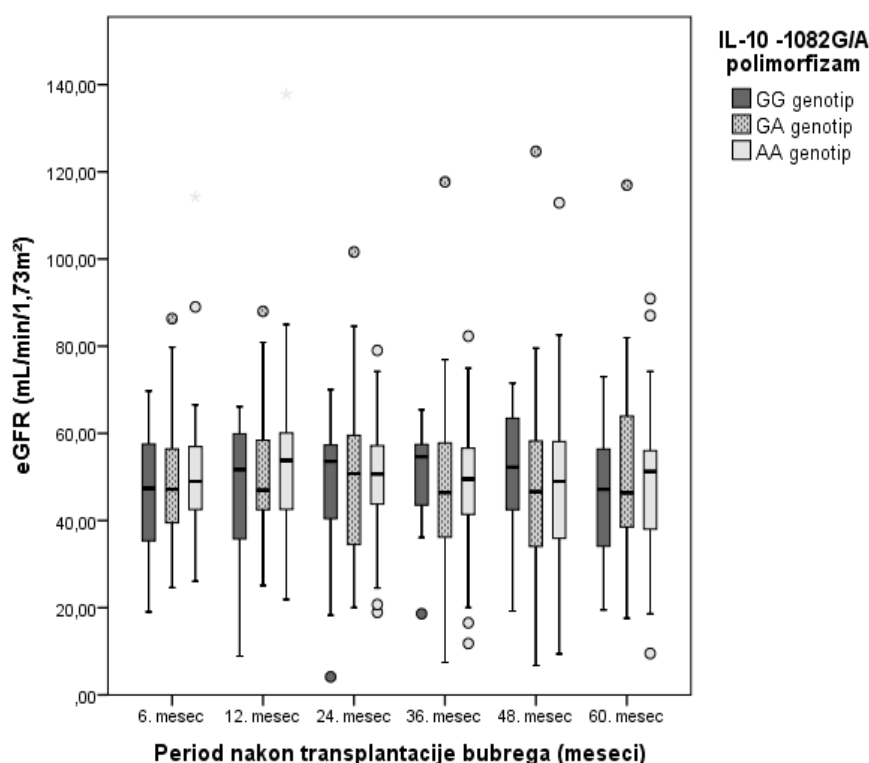
Kada su eGFR vrednosti upoređene u okviru grupa pacijenata nosioca istog IL-6 -174G/C genotipa, značajan trend smanjenja eGFR vrednosti tokom petogodišnjeg perioda u grupi nosioca IL-6 -174GG je ilustrovan na **Grafikonu 5.10b** ( $\chi^2=11,967$ ; **p=0,035**). Nosioci IL-6 -174CC genotipa su imali fluktuirajuće eGFR vrednosti u ispitivanom periodu

( $\chi^2=13,044$ ;  $p=0,023$ ). Nije bilo razlike u vrednostima eGFR unutar heterozigotne grupe ( $\chi^2=5,176$ ;  $p=0,395$ ).

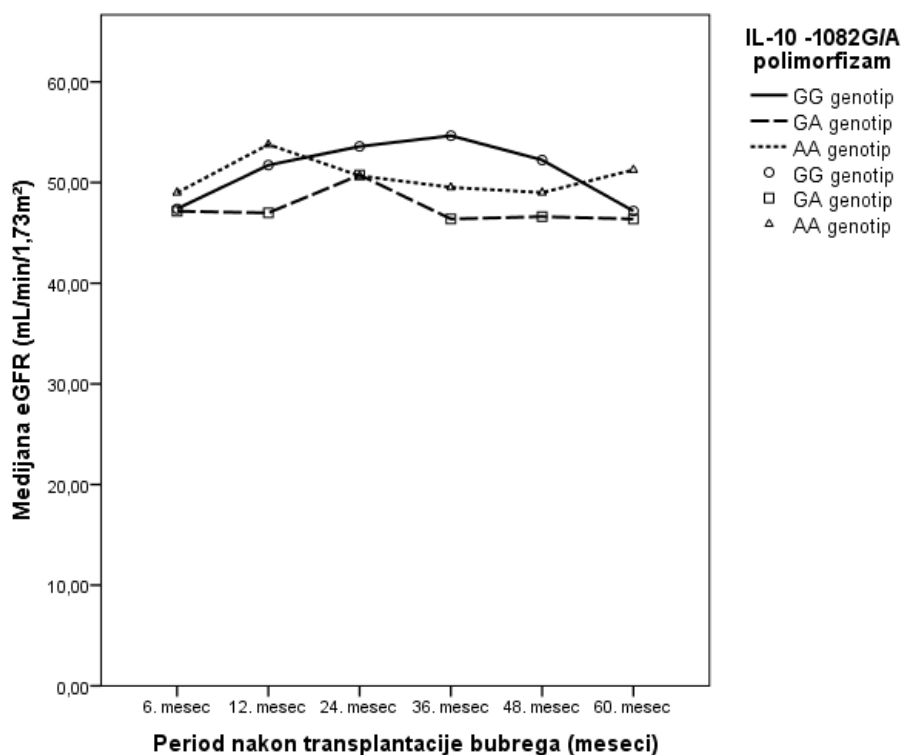
**Grafikon 5.11a** ilustruje komparabilne eGFR vrednosti između različitih IL-10 -1082G/A genotipova u svim ispitivanim vremenskim tačkama (6. mesec:  $\chi^2=0,398$ ,  $p=0,820$ ; 12. mesec:  $\chi^2=0,314$ ,  $p=0,855$ ; 24. mesec:  $\chi^2=0,141$ ,  $p=0,932$ ; 36. mesec:  $\chi^2=1,052$ ,  $p=0,591$ ; 48. mesec:  $\chi^2=1,569$ ,  $p=0,456$ ; 60. mesec:  $\chi^2=0,276$ ,  $p=0,871$ ).

Poređenjem eGFR vrednosti unutar grupa pacijenata sa različitim IL-10 -1082G/A genotipovima, iako na granici statističke značajnosti, indikativan je trend ka padu eGFR vrednosti počevši od 36. post-transplantacionog meseca kod nosioca IL-10 -1082GG genotipa ( $\chi^2=11,064$ ;  $p=0,050$ ). Sa druge strane, nije bilo značajnih promena u eGFR vrednostima unutar grupa pacijenata nosioca IL-10 -1082GA ( $\chi^2=4,563$ ;  $p=0,471$ ) i nosioca IL-10 -1082AA genotipa ( $\chi^2=5,797$ ;  $p=0,327$ ) (**Grafikon 5.11b**).

(a)



(b)

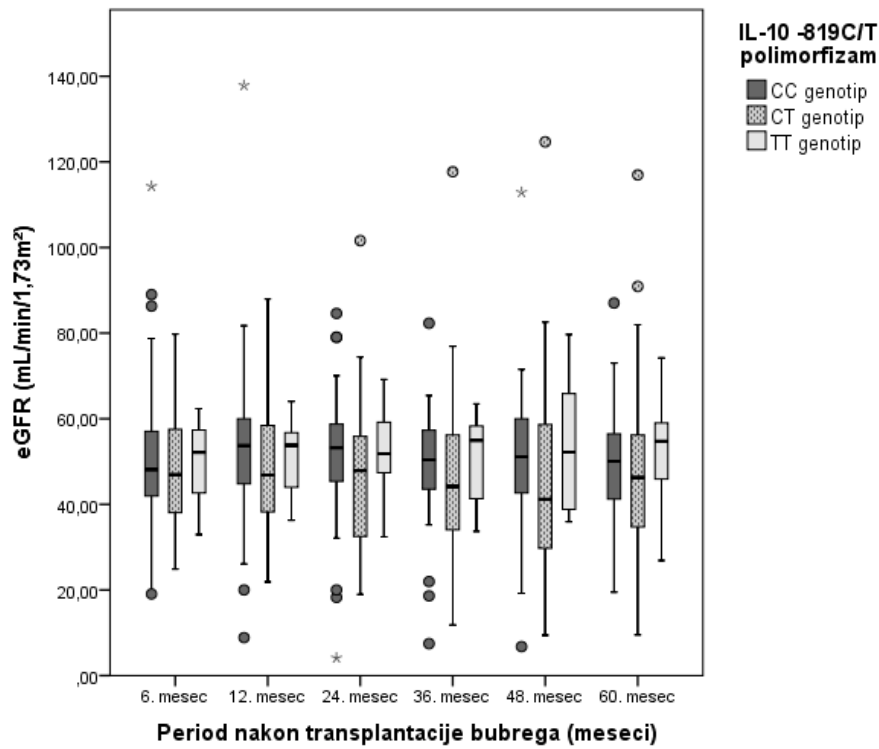


**Grafikon 5.11** Poređenje eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (a) između (b) unutar različitih IL-10 -1082G/A genotipova

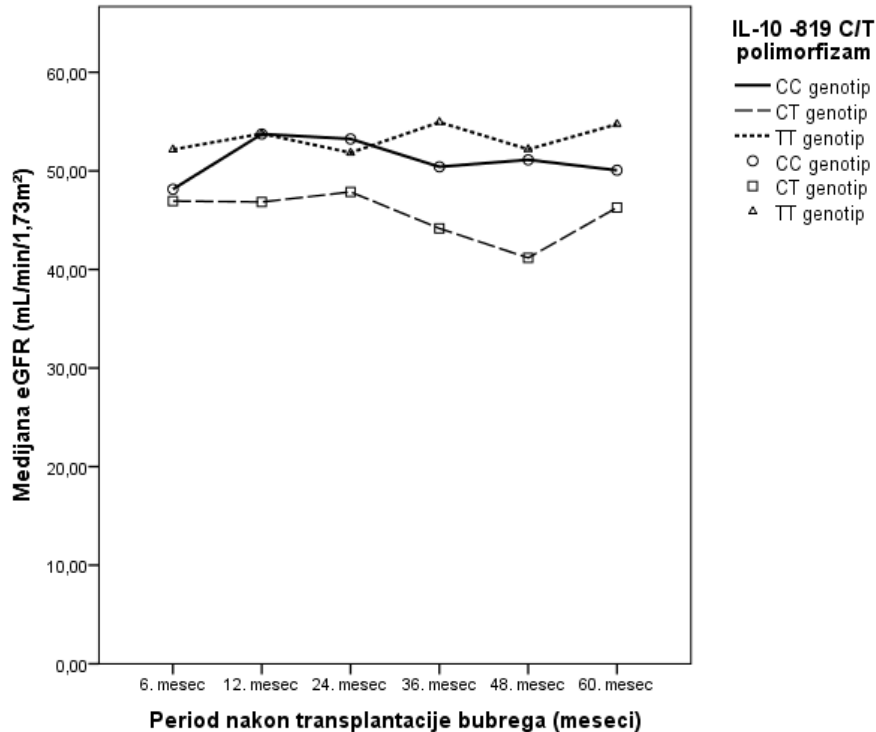
**Grafikon 5.12a** prikazuje uporedne eGFR vrednosti između različitih IL-10 -819C/T genotipova u svim ispitivanim vremenskim tačkama (6. mesec:  $\chi^2=0,786$ ,  $p=0,675$ ; 12. mesec:  $\chi^2=1,630$ ,  $p=0,443$ ; 24. mesec:  $F=1,351$ ,  $p=0,263$ ; 36. mesec:  $\chi^2=2,820$ ,  $p=0,244$ ; 48. mesec:  $\chi^2=4,537$ ,  $p=0,103$ ; 60. mesec:  $F=0,398$ ,  $p=0,673$ ).

**Grafikon 5.12b** ilustruje statistički značajnu razliku u eGFR vrednostima kod nosioca IL-10 -819CC genotipa ( $\chi^2=12,794$ ;  $p=0,025$ ) kroz različite vremenske tačke nakon transplantacije bubrega. Suprotno tome, nisu zabeležene značajne promene u eGFR vrednostima unutar grupa pacijenata sa IL-10 -819CT ( $\chi^2=2,381$ ;  $p=0,794$ ) i IL-10 -819TT genotipovima ( $\chi^2=5,143$ ;  $p=0,399$ ).

(a)

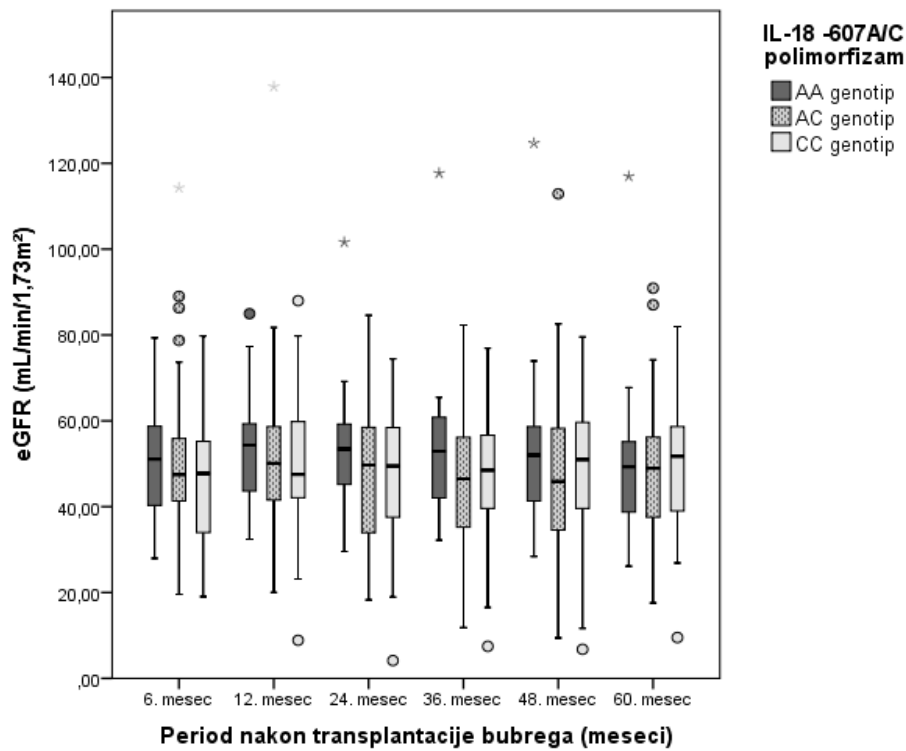


(b)

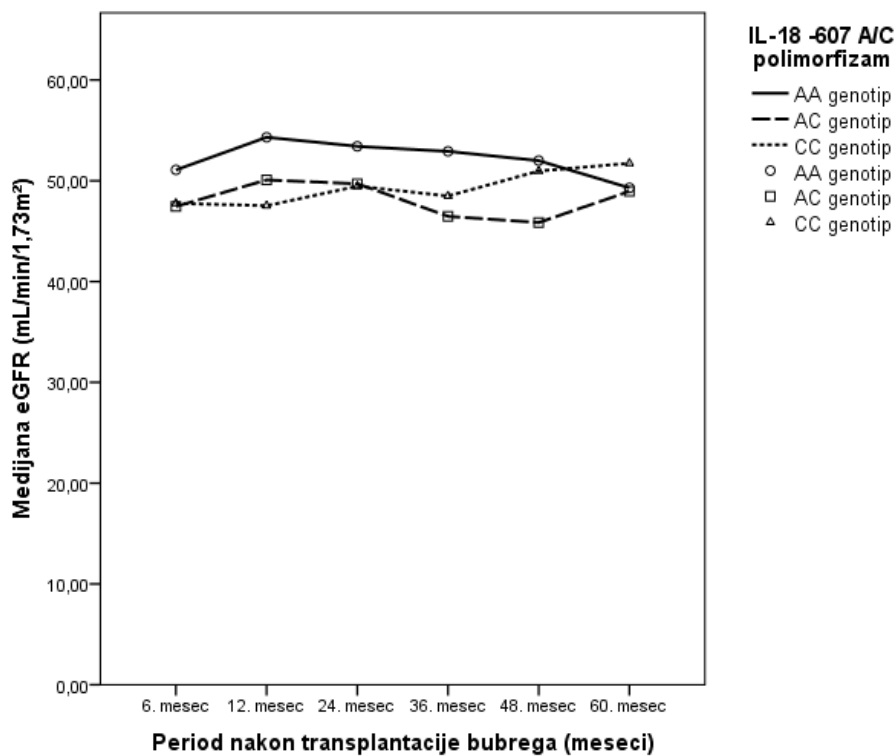


**Grafikon 5.12** Poređenje eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (a) između (b) unutar različitih IL-10 -819C/T genotipova

(a)



(b)



**Grafikon 5.13** Poređenje eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (a) između (b) unutar različitih IL-18 -607A/C genotipova

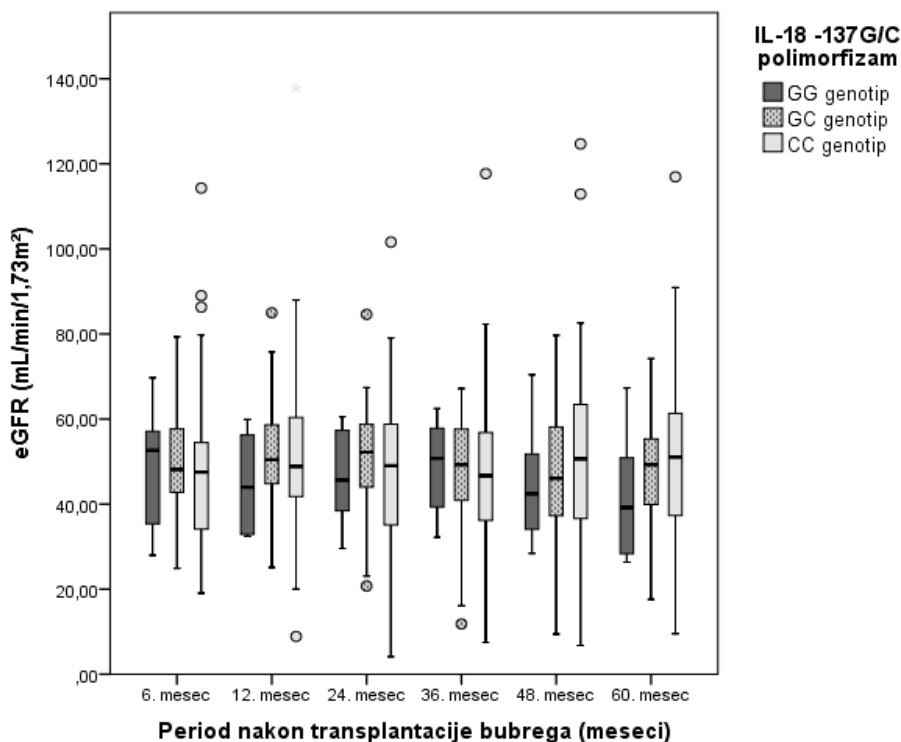
Poređenjem eGFR vrednosti između različitih IL-18 -607A/C genotipova tokom petogodišnjeg perioda, nije primećena statistički značajna razlika ni u jednoj od ispitivanih vremenskih tačaka (6. mesec:  $\chi^2=1,166$ ,  $p=0,558$ ; 12. mesec:  $\chi^2=0,333$ ,  $p=0,847$ ; 24. mesec:  $\chi^2=1,884$ ,  $p=0,390$ ; 36. mesec:  $\chi^2=3,131$ ,  $p=0,209$ ; 48. mesec:  $\chi^2=2,009$ ,  $p=0,366$ ; 60. mesec:  $\chi^2=0,309$ ,  $p=0,857$ ) (**Grafikon 5.13a**).

Na **Grafikonu 5.13b** može se videti da nije bilo značajnih fluktuacija između eGFR vrednosti posmatranih u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega unutar različitih IL-18 -607A/C genotipova (AA:  $\chi^2=10,641$ ,  $p=0,059$ ; AC:  $\chi^2=4,609$ ,  $p=0,465$ ; CC:  $\chi^2=5,104$ ,  $p=0,403$ ).

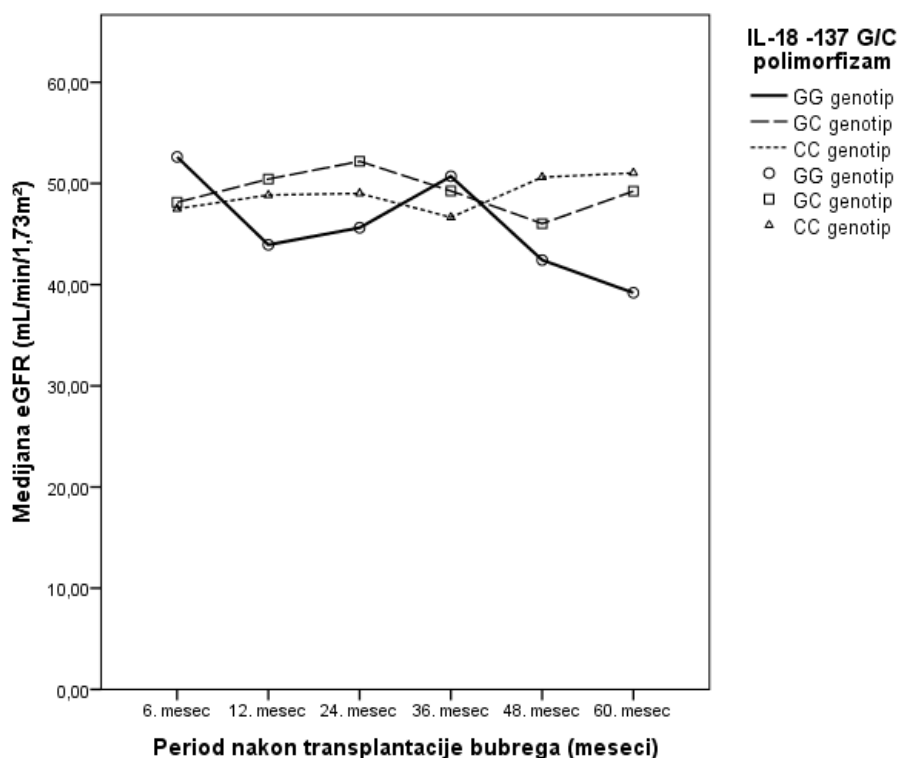
Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u eGFR vrednostima između različitih IL-18 -137G/C genotipova (6. mesec:  $\chi^2=1,025$ ,  $p=0,599$ ; 12. mesec:  $\chi^2=1,043$ ,  $p=0,594$ ; 24. mesec:  $F=0,190$ ,  $p=0,827$ ; 36. mesec:  $\chi^2=0,075$ ,  $p=0,963$ ; 48. mesec:  $\chi^2=1,317$ ,  $p=0,518$ ; 60. mesec:  $F=0,644$ ,  $p=0,528$ ) (**Grafikon 5.14a**).

Nije bilo značajnih promena u eGFR vrednostima određenim u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega unutar različitih IL-18 -137G/C genotipova (GG:  $\chi^2=6,667$ ,  $p=0,247$ ; GC:  $\chi^2=6,772$ ,  $p=0,242$ ; CC:  $\chi^2=9,191$ ,  $p=0,102$ ) (**Grafikon 5.14b**).

(a)



(b)



**Grafikon 5.14** Poređenje eGFR vrednosti u različitim vremenskim tačkama nakon transplantacije bubrega (a) između (b) unutar različitih IL-18 -137G/C genotipova

Kako je prethodno ustanovljen potencijalni uticaj IL-6 -174G/C polimorfizma na eGFR vrednosti u dugoročnom periodu nakon transplantacije, sprovedena je standardna multivarijantna linearna regresiona analiza radi ispitivanja nezavisnog uticaja IL-6 -174G/C polimorfizma, eGFR vrednosti u 6. mesecu nakon transplantacije i pola na eGFR vrednosti na kraju perioda praćenja. Ostale ispitivane varijable (starost pacijenata u vreme transplantacije, tip donora) nisu se pokazale kao značajni prediktori u preliminarnoj univarijantnoj linearnoj regresionoj analizi. Rezultati su ukazali da su IL-6 -174G/C polimorfizam i eGFR u 6. post-transplantacionom mesecu nezavisni prediktori eGFR vrednosti u 60. mesecu nakon transplantacije. Testirani model je objasnio 45,5% varijanse eGFR vrednosti (**Tabela 5.16**).

**Tabela 5.16** Multivarijantna linearna regresiona analiza faktora koji utiču na eGFR vrednost u 60. post-transplantacionom mesecu

Model	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%)	p <sup>2</sup>
<b>Multivarijantna analiza</b>						
Konstanta	16,590 (2,963-30,218)	6,849	/	0,018	45,5	<b>&lt;0,001</b>
Pol (žene vs. muškarci)	-4,040 (-10,025-1,945)	3,008	-0,112	0,183		
IL-6 -174G/C (GC+CC vs. GG)	6,792 (1,051-12,533)	2,885	0,193	<b>0,021</b>		
eGFR u 6. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,683 (0,499-0,867)	0,092	0,614	<b>&lt;0,001</b>		

B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; IP-interval poverenja; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse eGFR vrednosti datim modelom; SG-standardna greška.

U drugom koraku sprovedena je Kaplan-Majerova analiza preživljavanja u cilju ispitivanja potencijalne povezanosti polimorfizama proučavanih IL i složenih nepovoljnih post-transplantacionih ishoda u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Evaluacija dobijenih rezultata je dovela do zaključka da nije bilo statistički značajne razlike u trogodišnjem (IL-6 -174G/C: Log Rank  $\chi^2=3,590$ , p=0,166; IL-10 -1082G/A: Log Rank  $\chi^2=1,309$ , p=0,520; IL-10 -819C/T: Log Rank  $\chi^2=0,985$ , p=0,611; IL-18 -607A/C: Log Rank  $\chi^2=3,275$ , p=0,194; IL-18 -137G/C: Log Rank  $\chi^2=0,640$ , p=0,726) i petogodišnjem preživljavanju (IL-6 -174G/C: Log Rank  $\chi^2=0,442$ , p=0,802; IL-10 -1082G/A: Log Rank  $\chi^2=2,208$ , p=0,331; IL-10 -819C/T: Log Rank  $\chi^2=1,468$ , p=0,480; IL-18 -607A/C: Log Rank  $\chi^2=2,562$ , p=0,278; IL-18 -137G/C: Log Rank  $\chi^2=1,089$ , p=0,580) između pacijenata nosioca različitih genotipova.

### 5.6 Određivanje koncentracije cistatina C, IL-6, IL-10, IL-18 u plazmi pacijenata sa transplantiranim bubregom i ispitanika kontrolne grupe

U analizi koja je za cilj imala određivanje koncentracije cistatina C, IL-6, IL-10 i IL-18, učestvovalo je 90 pacijenata sa transplantiranim bubregom kod kojih je medijana vremena proteklog od transplantacije bila 9 godina (6-11). Poređenje nivoa između pacijenata

i zdravih ispitanika ukazalo je na postojanje statistički značajne razlike u nivoima IL-6 i IL-10 između dve grupe, odnosno pacijenti sa transplantiranim bubregom su imali više vrednosti IL-6 i niže vrednosti IL-10. Nije uočena statistički značajna razlika u nivoima cistatina C i IL-18 između dve grupe (**Tabela 5.17**).

**Tabela 5.17** Poređenje plazma nivoa cistatina C, IL-6, IL-10 i IL-18 između pacijenata i zdravih ispitanika

Marker	Pacijenti (N=90)	Zdravi ispitanici (N=90)	p vrednost
Cistatin C (ng/mL)	26,80 ± 2,74 26,74 (24,74-28,60)	26,98 ± 4,46 26,48 (24,26-30,01)	t=-0,177* p=0,861
IL-6 (pg/mL)	59,20 ± 187,00 3,57 (2,30-10,50)	3,58 ± 6,58 1,33 (0,79-2,84)	Z=-4,796** p<0,001
IL-10 (pg/mL)	229,51 ± 407,42 35,86 (20,77-193,05)	758,10 ± 725,82 739,96 (38,59-1410,11)	Z=-2,257** p=0,023
IL-18 (pg/mL)	141,84 ± 187,03 82,22 (61,36-133,47)	95,66 ± 78,22 71,86 (56,49-116,79)	Z=-1,292** p=0,196

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\*: vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnjevim U testom

**Tabela 5.18** Poređenje nivoa cistatina C, IL-6, IL-10 i IL-18 kod pacijenata u odnosu na metabolički fenotip takrolimusa

Marker	Brzi metabolizeri (Tak C <sub>0</sub> /D <1,05 ng/mL/mg)	Intermedijarni metabolizeri (1,05 ≤ Tak C <sub>0</sub> /D ≤ 1,54 ng/mL/mg)	Spori metabolizeri (Tak C <sub>0</sub> /D ≥ 1,55 ng/mL/mg)	p vrednost
Cistatin C (ng/mL)	25,30 ± 2,11 25,22 (23,40-27,35)	28,23 ± 2,71 28,65 (26,07-29,87)	26,85 ± 2,84 26,74 (24,84-28,56)	F=5,914* p=0,005  Post-hoc: Brzi vs. intermedijarni p=0,003
IL-6 (pg/mL)	55,32 ± 154,98 3,25 (1,82-5,96)	115,13 ± 297,30 3,36 (2,21-9,53)	20,43 ± 54,21 4,26 (2,64-10,98)	χ <sup>2</sup> =0,341** p=0,843
IL-10 (pg/mL)	143,46 ± 369,14 22,13 (20,10-79,91)	329,28 ± 559,38 33,23 (24,07-486,80)	238,14 ± 319,55 69,20 (21,15-478,40)	χ <sup>2</sup> =2,984** p=0,225
IL-18 (pg/mL)	146,38 ± 184,10 77,97 (60,66-126,57)	194,10 ± 292,52 98,97 (61,47-155,95)	108,95 ± 58,51 92,20 (65,78-141,74)	χ <sup>2</sup> =0,622** p=0,733

\*: vrednosti parametara su upoređivane ANOVA testom, a za *Post-hoc* analizu korišćen je *Tukey* test

\*\*: vrednosti parametara su upoređivane Kruskal-Volisovim testom.

C<sub>0</sub>/D-doza-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; Tak-takrolimus

Kako bi se istražila povezanost između nivoa ispitivanih markera i parametara inter- i intraindividualne varijabilnosti Tak, izvršeno je poređenje nivoa markera kod pacijenata u odnosu na pripadnost Tak IPV grupama tercila i metaboličkog fenotipa Tak. Nije zapažena razlika u nivoima IL-6, IL-10 i IL-18 između različitih grupa Tak metaboličkog fenotipa. Sa druge strane, uočena je značajna razlika u nivoima cistatina C između intermedijarnih i brzih metabolizera, dok ista nije zapažena između intermedijarnih i sporih, kao ni sporih i brzih (Tabela 5.18). Uviđena je razlika u nivoima IL-10 poređenjem grupa pacijenata sa višim i nižim Tak IPV vrednostima, dok ista nije zapažena za druge ispitivane markere (Tabela 5.19).

**Tabela 5.19** Poređenje nivoa cistatina C, IL-6, IL-10 i IL-18 kod pacijenata u odnosu na IPV takrolimusa

Marker	Tak IPV $\leq$ 24,87%	Tak IPV $>$ 24,87%	p vrednost
Cistatin C (ng/mL)	26,53 $\pm$ 2,93 26,31 (24,17-28,58)	27,43 $\pm$ 2,56 27,65 (25,22-29,56)	t=-1,063* p=0,292
IL-6 (pg/mL)	51,53 $\pm$ 194,66 2,92 (2,22-7,10)	82,91 $\pm$ 167,35 5,30 (3,04-90,67)	Z=-1,413** p=0,158
IL-10 (pg/mL)	139,59 $\pm$ 284,47 22,96 (20,33-152,83)	442,03 $\pm$ 569,69 113,91 (38,00-1077,75)	Z=-2,459** p=0,014
IL-18 (pg/mL)	111,23 $\pm$ 106,24 78,91 (59,96-125,10)	210,37 $\pm$ 305,36 115,33 (77,97-223,38)	Z=-1,871** p=0,061

\*: vrednosti parametara su upoređivane t-testom nezavisnih uzoraka

\*\* : vrednosti parametara su upoređivane Man-Vitnjevim U testom

IPV-intraindividualna varijabilnost; Tak-takrolimus

U ovom delu istraživanja ispitano je postojanje korelacije između nivoa ispitivanih markera i parametra funkcije grafta (eGFR). Rezultati su ukazali da ne postoji statistički značajna veza između eGFR vrednosti i nivoa IL-6 (Spirmanov  $r=0,073$ ;  $p=0,640$ ), IL-10 (Spirmanov  $r=0,263$ ;  $p=0,116$ ), IL-18 (Spirmanov  $r=-0,159$ ;  $p=0,210$ ) i Cistatina C (Pirsonov  $r=-0,120$ ;  $p=0,345$ ).

### 5.7 Ispitivanje povezanosti ekspresije miRNK u urinu sa funkcijom grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega, kao i sa parametrima farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa

U ovom delu studije je učestvovalo 50 pacijenata sa transplantiranim bubregom i 12 zdravih kontrola. Karakteristike pacijenata su prikazane u Tabeli 5.20.

**Tabela 5.20** Karakteristike ispitivane populacije

<b>Demografske karakteristike</b>	
Pol pacijenata (muški/ženski)	32/18 (64%/36%)
Starost pacijenata (godine)	48,50±12,93 45,50 (39,00-58,25)
Period nakon transplantacije (godine)	8,89±2,72 9 (7-11)
<b>Hematološki i biohemijski parametri</b>	
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	7,77±1,62 7,35 (6,60-9,00)
Eritrociti (10 <sup>12</sup> /L)	4,41±0,74 4,43 (3,92-4,89)
Hemoglobin (g/L)	135,13±20,23 137,00 (118,25-151,25)
Hematokrit (L/L)	38,84±5,94 39,65 (35,08-42,83)
AST (U/L)	19,61±6,96 19,50 (15,00-22,25)
ALT (U/L)	37,11±18,68 30,50 (25,00-45,25)
ALP (U/L)	70,08±35,36 60,00 (45,50-83,25)
GGT (U/L)	28,08±15,90 23,00 (17,75-30,25)
Glukoza (mmol/L)	5,40±1,32 5,15 (4,80-5,60)
Holesterol (mmol/L)	5,91±1,10 5,90 (5,04-6,64)
Trigliceridi (mmol/L)	1,09±0,45 1,06 (0,79-1,38)
Serumski kreatinin (μmol/L)	131,24±47,66 129,00 (95,50-147,00)
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	52,31±20,79 50,98 (37,47-62,60)
Urea (mmol/L)	7,77±2,93 7,00 (5,53-9,70)
Albumin (g/L)	38,86±3,47 40,00 (36,50-42,00)
Ukupni proteini (g/L)	71,84±4,20 72,00 (68,50-75,00)
<b>Farmakokinetički parametri Tak</b>	
Dnevna doza Tak (mg)	3,39±1,85 3,00 (2,00-4,00)
Tak C <sub>0</sub> (ng/mL)	6,20 ±1,65 6,40 (5,45-7,45)
Tak C <sub>0</sub> /D (ng/mL/mg)	2,14 ±0,82 2,18 (1,54-2,62)

Tak IPV (%)	22,32 ±9,41 21,11 (15,89-26,99)
Tak IPV (tercili)	I: ≤ 19% (14,19±3,15%) II: 19,01-24% (21,26±1,69%) III: > 24% (32,85±8,79%)
Tak C <sub>0</sub> /D (ng/mL/mg) u trećem mesecu nakon transplantacije bubrega	1,44 ±0,66 1,46 (0,93-1,86)

ALT-alanin aminotransferaza; ALP-alkalna fosfataza; AST-aspartat aminotransferaza; C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozaom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; eGFR-procjenjena jačina glumerularne filtracije; GGT-gama-glutamil transferaza; IPV-intraindividualna varijabilnost; Tak-takrolimus

Dobijeni podaci o pacijentima sa transplantiranim bubregom ukazuju da su imali stabilnu funkciju grafta, s obzirom na to da je medijana vremena nakon transplantacije 9 godina, a medijana eGFR iznad 50 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Cilj ovog dela doktorske disertacije bio je da ispita nivoe ekspresije miRNK u urinu (miR-21-5p, miR-142-3p, miR-155-5p i miR-204-5p) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Relativna ekspresija miRNK u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na zdrave ispitanike izračunata je primenom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode (**Tabela 5.21, Grafikon 5.15**).

**Tabela 5.21** Relativna ekspresija miRNK u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u poređenju sa zdravim ispitanicima

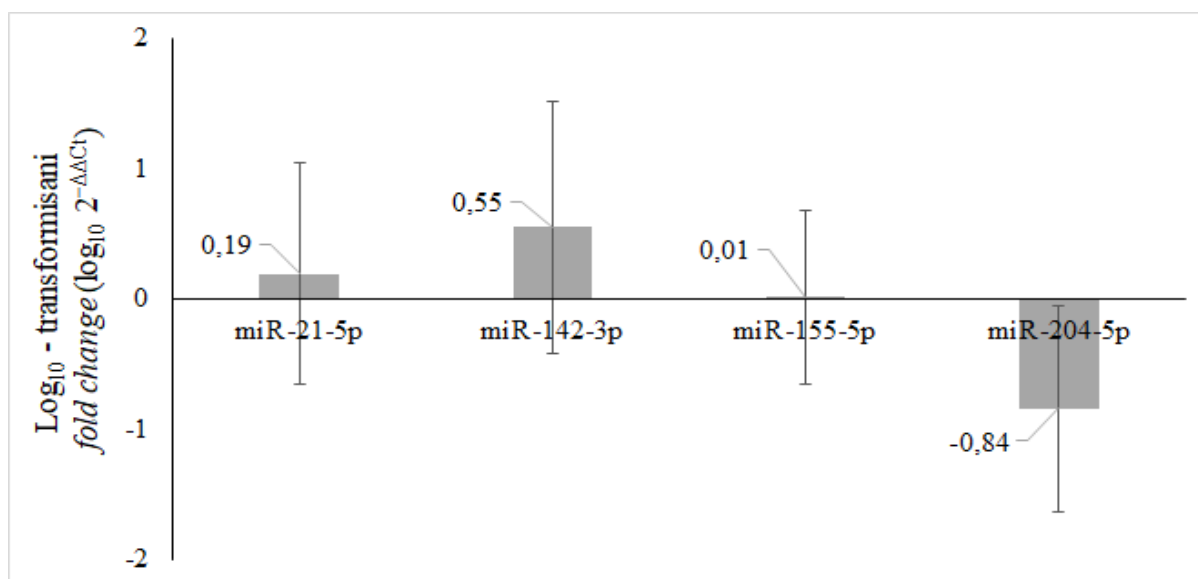
miRNK	Pacijenti sa transplantiranim bubregom	Zdravi ispitanici	Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), 95% IP	Statistika
miR-21-5p	1,44 (0,43-6,38)	1,27 (0,25-5,02)	1,57 (0,84–2,92)	t=-0,601 p=0,551
miR-142-3p	3,51 (0,62-17,41)	1,07 (0,39-1,91)	3,55 (1,75–7,23)	<b>t=-2,457</b> <b>p=0,022</b>
miR-155-5p	0,97 (0,35-2,74)	1,00 (0,51-2,94)	1,03 (0,63–1,69)	t=-0,005 p=0,996
miR-204-5p	0,14 (0,05-0,43)	1,05 (0,38-2,51)	0,15 (0,08–0,26)	<b>t=-2,825</b> <b>p=0,007</b>

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilna razlika), odnosno geometrijska sredina sa 95% intervalom poverenja. Poređenje je izvršeno na osnovu  $\Delta Ct$  vrednosti, koje su normalno distribuirane. IP-interval poverenja

**Tabela 5.21** pokazuje da se ekspresija miR-142-3p (**p=0,022**) i miR-204-5p (**p=0,007**) u urinu značajno razlikuje između pacijenata i kontrolne grupe. S druge strane, miR-21-5p i miR-155-5p nisu pokazale statistički značajnu razliku između grupa. Dodatno,

**Tabela 5.21** prikazuje porast *fold change* vrednosti (promena u odnosu na osnovnu vrednost) za miR-142-3p i smanjenje *fold change* vrednosti za miR-204-5p, koristeći geometrijsku sredinu i odgovarajući interval poverenja (IP). Iako je miR-21-5p pokazala blago povećanje *fold change* vrednosti, razlika nije bila statistički značajna. Kada je reč o miR-155-5p, nije zabeležena promena ekspresije između pacijenata i kontrolne grupe. Važno je napomenuti da geometrijska sredina nije nužno centralna vrednost IP. To je posledica toga što se IP prvo izračunava u logaritamskoj skali, a zatim se konvertuje nazad u originalnu skalu, što dovodi do asimetrične distribucije.

Na **Grafikonu 5.15** je prikazan  $\log_{10}$ -transformisani *fold change* u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije. Sa grafikona se može uočiti značajno viša, odnosno niža relativna ekspresija kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u poređenju sa zdravim ispitanicima za miR-142-3p i miR-204-5p, respektivno.



**Grafikon 5.15**  $\log_{10}$ -transformisani *fold change* eksprimiranih miRNK u urinu kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina i standardna devijacija

**Tabela 5.22** Analiza korelacije između  $\Delta C_t$  vrednosti ispitivanih miRNK

	miR-142-3p	miR-155-5p	miR-204-5p
miR-21-5p	0,633 (<0,001)	0,583 (<0,001)	0,322 (0,048)
miR-142-3p		0,571 (<0,001)	-0,063 (0,705)
miR-155-5p			0,438 (0,006)

Rezultati su prikazani kao Pirsonov korelacioni koeficijent (statistička značajnost)

**Tabela 5.22** je pokazala pozitivnu korelaciju između ispitivanih miRNK, pri čemu miR-142-3p nije pokazala značajnu korelaciju sa miR-204-5p.

**Tabela 5.23** Poređenje relativne ekspresije miRNK u urinu u odnosu na metabolički fenotip takrolimusa

Metabolički fenotip Tak	miR-21-5p	miR-142-3p	miR-155-5p	miR-204-5p
Brzi metabolizeri (<1,05 ng/mL/mg)	0,70 (0,19-8,06)	1,91 (0,37-16,31)	1,00 (0,23-2,59)	0,10 (0,04-0,27)
Intermedijarni metabolizeri (1,05-1,54 ng/mL/mg)	1,04 (0,20-2,81)	4,09 (0,60-17,41)	0,59 (0,19-1,31)	0,06 (0,01-0,21)
Spori metabolizeri (≥1,55ng/mL/mg)	3,10 (0,67-7,21)	5,39 (1,18-40,22)	2,28 (0,58-5,21)	0,35 (0,13-2,28)
Statistika*	$\chi^2=4,296$ p=0,117	$\chi^2=0,810$ p=0,667	$\chi^2=4,846$ p=0,089	$\chi^2=11,127$ , p=0,004 Post-hoc: <1,05 vs. 1,05-1,54: Z=-0,868, p=0,385; <1,05 vs. ≥1,55: Z=-2,695, p=0,007; 1,05-1,54 vs. ≥1,55: Z=-2,829, p=0,005

\*Poređenje je izvršeno Kruskal-Volisovim testom, a za *Post-hoc* analizu korišćen je Man-Vitnijev U test (granična p vrednost u *Post-hoc* analizi je prilagođena korišćenjem Bonferonijeve korekcije alfa vrednosti  $0,05/3=0,017$ )

Dobijeni rezultati su pokazali da je miR-204-5p imala višu relativnu ekspresiju kod pacijenata sa sporim metaboličkim fenotipom Tak u poređenju sa pacijentima sa brzim i intermedijarnim metaboličkim fenotipom, na osnovu Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti u 3. mesecu nakon transplantacije. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji miR-21-5p, miR-142-3p i miR-155-5p u odnosu na pripadnost grupi Tak metaboličkog fenotipa (**Tabela 5.23**).

**Tabela 5.24** pokazuje da se relativna ekspresija miR-21-5p i miR-142-3p razlikovala u odnosu na Tak IPV grupe, koje su formirane na osnovu tercila IPV vrednosti pacijenata sa transplantiranim bubregom koji su učestovali u ovom delu studije. Dodatno, *Post-hoc* analiza je pokazala da relativna ekspresija miR-21-5p i miR-142-3p nije bila značajno različita između I i II grupe pacijenata, te su ove grupe spojene u daljoj analizi.

**Tabela 5.24** Poređenje relativne ekspresije miRNK u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na IPV takrolimusa

Tak IPV	miR-21-5p	miR-142-3p	miR-155-5p	miR-204-5p
I tercil (≤19%)	3,63 (1,14-9,97)	7,04 (1,19-29,69)	1,13 (0,66-3,22)	0,29 (0,10-1,16)
II tercil (19,01-24%)	2,00 (0,78-6,93)	10,35 (1,62-48,03)	0,90 (0,39-4,59)	0,11 (0,02-0,33)
III tercil (>24%)	0,46 (0,31-0,90)	0,91 (0,25-1,82)	0,55 (0,17-1,84)	0,10 (0,04-0,32)
Statistika*	$\chi^2=6,245$ , <b>p=0,044</b> <i>Post-hoc:</i> I vs. II: Z=-0,463, p=0,643; I vs. III: Z=-2,161, p=0,031; II vs. III: Z=-2,136, p=0,033	$\chi^2=9,044$ , <b>p=0,011</b> <i>Post-hoc:</i> I vs. II: Z=-0,334, p=0,738; I vs. III: Z=-2,417, <b>p=0,016</b> ; II vs. III: Z=-2,774, <b>p=0,006</b>	$\chi^2=3,243$ p=0,198	$\chi^2=4,368$ p=0,113

\*Poređenje je izvršeno Kruskal-Volisovim testom, a za *Post-hoc* analizu korišćen je Man-Vitnijev U test (granična p vrednost u *Post-hoc* analizi je prilagođena korišćenjem Bonferonijeve korekcije alfa vrednosti  $0,05/3=0,017$ )

IPV-intraindividualna varijabilnost

**Tabela 5.25** Poređenje relativne ekspresije miRNK u urinu u odnosu na vrednosti eGFR

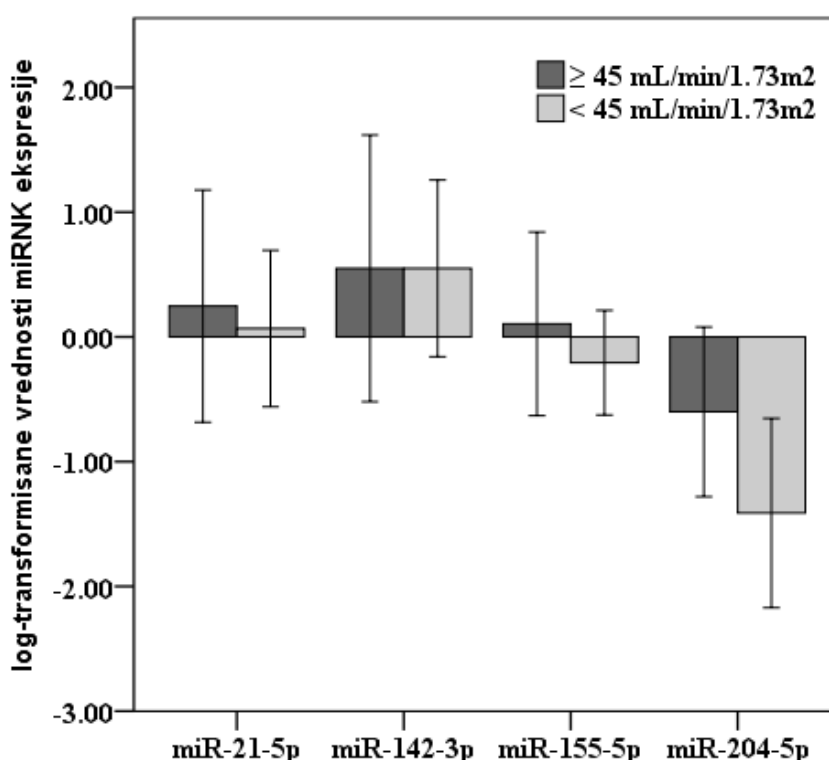
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	miR-21-5p	miR-142-3p	miR-155-5p	miR-204-5p
<45mL/min/1,73m <sup>2</sup>	1,12 (0,39-1,71)	6,36 (0,63-15,67)	0,73 (0,37-1,16)	0,05 (0,02-0,16)
45-59 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	2,30 (0,29-9,45)	4,08 (1,03-56,49)	2,07 (0,93-4,86)	0,30 (0,06-0,78)
>59mL/min/1,73m <sup>2</sup>	1,88 (0,45-6,54)	1,58 (0,52-19,32)	0,64 (0,28-2,38)	0,17 (0,10-0,47)
Statistika*	$\chi^2=0,868$ p=0,648	$\chi^2=0,887$ p=0,642	$\chi^2=4,159$ p=0,125	$\chi^2=8,333$ , <b>p=0,016</b> <i>Post-hoc:</i> <45 vs. 45-59: Z=-2,777, <b>p=0,005</b> ; <45 vs. >59: Z=-1,969, p=0,049
<45mL/min/1,73m <sup>2</sup>	1,12 (0,39-1,71)	6,36 (0,63-15,67)	0,73 (0,37-1,16)	0,05 (0,02-0,16)
≥45 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	2,30 (0,44-6,82)	1,91 (0,12-22,63)	1,07 (0,31-4,17)	0,26 (0,09-0,65)
Statistika**	Z=-0,740 p=0,459	Z=-0,03 p=0,974	Z=-1,304 p=0,192	Z=-2,752 <b>p=0,006</b>

\*Poređenje je izvršeno Kruskal-Volisovim testom, a za *Post-hoc* analizu korišćen je Man-Vitnijev U test (granična p vrednost u *Post-hoc* analizi je prilagođena korišćenjem Bonferonijeve korekcije alfa vrednosti  $0,05/2=0,025$ )

\*\* Poređenje je izvršeno Man-Vitnijevem U testom

eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije

Dobijeni rezultati su pokazali da se relativna ekspresija miR-204-5p u urinu pacijenata razlikuje u odnosu na vrednosti eGFR u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Ovo se nije pokazalo za druge ispitivane miRNK (**Tabela 5.25**). U cilju bolje vizualizacije, interpretabilnosti i smanjene varijabilnosti, korišćene su log-transformisane vrednosti ekspresije miRNK umesto „sirovih” vrednosti (**Grafikon 5.16**). Na osnovu prethodnih rezultata, izvršeno je poređenje ovih vrednosti u odnosu na eGFR sa graničnom vrednošću od 45 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Dobijeni rezultati su pokazali da pacijenti sa eGFR  $\geq$  45 mL/min/1,73m<sup>2</sup> imaju veću log-transformisanu relativnu ekspresiju miR-204-5p u poređenju sa pacijentima kojima je eGFR ispod 45 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (t=3,227, **p=0,003**).



**Grafikon 5.16** Poređenje log-transformisanih vrednosti miRNK u odnosu na eGFR pacijenata

U cilju sprovođenja linearne regresione analize (univarijantne i multivarijantne), kao zavisne varijable korišćene su log-transformisane vrednosti ekspresije miRNK. Uzimajući u obzir univarijantnu regresionu analizu, sledeći faktori su testirani kao nezavisne varijable: pol, starost, period nakon transplantacije, eGFR, serumski kreatinin, nivo kreatinina u urinu, ACR, eGFR u 12. mesecu nakon transplantacije, Tak metabolički fenotip (zasnovan na C<sub>0</sub>/D u 3. mesecu), Tak IPV (određen između 6 i 12. meseca nakon transplantacije), aktuelna

dnevna doza Tak, Tak C<sub>0</sub> i Tak C<sub>0</sub>/D. Značajne varijable iz univarijantnog modela su dalje testirane u multivarijantnom modelu (**Tabela 5.26-5.29**). Razmatrajući miR-21-5p, metabolički fenotip Tak i Tak IPV su bile značajne varijable u univarijantnoj analizi, ali ovaj rezultat nije potvrđen u multivarijantnoj analizi (**Tabela 5.26**). Dodatno, uočena je značajna povezanost između log-transformisanih vrednosti miR-142-3p sa vrednostima IPV i ACR (**Tabela 5.27**), kao i između log-transformisanih vrednosti miR-155-5p i pola (**Tabela 5.28**). Uzimajući u obzir miR-204-5p, nekoliko varijabli su se pokazale značajnim u univarijantnoj analizi (eGFR, serumski kreatinin, kreatinin u urinu, eGFR u 12. mesecu i Tak metabolički fenotip). S obzirom da postoji jaka korelacija između aktuelne eGFR i serumskog kreatinina (-0,913, **p<0,001**), aktuelne eGFR i eGFR u 12. mesecu (0,705, **p<0,001**) i serumskog kreatinina i eGFR u 12. mesecu (-0,519, **p=0,001**), u multivarijantnoj analizi je korišćena jedna od ove tri varijable. U skladu s tim, korišćena je eGFR u 12. mesecu, jer je raniji marker u odnosu na aktuelnu vrednost funkcije grafta. Rezultati multivarijantne analize su pokazali da su eGFR u 12. post-transplantacionom mesecu i Tak metabolički fenotip značajne nezavisne varijable koje doprinose varijabilnosti miR-204-5p određenoj u urinu (**Tabela 5.29**).

**Tabela 5.26** Univarijantna i multivarijantna linearna regresiona analiza povezanosti različitih faktora sa log transformisanom ekspresijom miR-21-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom

Univarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p	R <sup>2</sup> (%)
Pol (muški vs. ženski)	0,118 (-0,469-0,705)	0,289	0,068	0,685	0,5
Starost (godine)	-0,003 (-0,025-0,020)	0,011	-0,040	0,811	0,2
Post-transplantacioni period (godine)	-0,005 (-0,111-0,101)	0,052	-0,015	0,927	<0,1
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,001 (-0,012-0,015)	0,007	0,036	0,832	0,1
Serumski kreatinin (μmol/L)	-0,003 (-0,009-0,003)	0,003	-0,154	0,355	2,4
Kreatinin u urinu (mmol/L)	-0,041 (-0,132-0,049)	0,045	-0,151	0,364	2,3
ACR (mg/g)	<0,001 (<0,001-0,001)	<0,001	0,220	0,184	4,9
eGFR u 12. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	-0,008 (-0,029-0,014)	0,011	-0,117	0,483	2,3

Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0,609 (0,066-1,152)	0,268	0,355	<b>0,029</b>	12,6
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,660 (-1,229-(-0,092))	0,280	-0,366	<b>0,024</b>	13,4
Aktuelna dnevna doza Tak (mg)	-0,040 (-0,199-0,119)	0,078	-0,087	0,610	0,8
Aktuelna Tak C <sub>0</sub>	-0,021 (-0,200-0,157)	0,088	-0,041	0,810	0,2
Aktuelna Tak C <sub>0</sub> /D	-0,027 (-0,388-0,334)	0,178	-0,026	0,880	0,1
Multivarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SE	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%), p <sup>2</sup>
<i>Konstanta</i>	0,272 (-1,739-2,283)	0,991	/	0,785	17,1 (0,014)
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55 ng/mL/mg)	0,503 (0,029-1,036)	0,262	0,293	0,063	
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,554 (-1,114-0,006)	0,276	-0,307	0,053	

\*Pacijenti su podeljeni u IPV grupe prema distribuciji na tercile (I, II – nizak, III – visok)

ACR-odnos albumina i kreatinina u urinu; B- нестандардизовани коефицијент; Beta-стандардизовани коефицијент; C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozaom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; IP-interval poverenja; IPV-intraindividualna varijabilnost; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse log-transformisane miRNK datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus

**Tabela 5.27** Univarijantna i multivarijantna linearna regresiona analiza povezanosti različitih faktora sa log transformisanom ekspresijom miR-142-3p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom

Univarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p	R <sup>2</sup> (%)
Pol (muški vs. ženski)	-0,143 (-0,811-0,526)	0,330	-0,072	0,668	0,5
Starost (godine)	<0,001 (0,025-0,026)	0,012	0,004	0,979	<0,1
Post-transplantacioni period (godine)	-0,030 (-0,150-0,090)	0,059	-0,085	0,613	0,7
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,001 (-0,015-0,016)	0,008	0,016	0,925	<0,1
Serumski kreatinin (μmol/L)	-0,001 (-0,006-0,008)	0,003	-0,062	0,712	0,4
Kreatinin u urinu (mmol/L)	-0,009 (-0,113-0,096)	0,051	-0,028	0,867	0,1
ACR (mg/g)	0,001 (<0,001-0,001)	<0,001	0,348	<b>0,032</b>	12,1
eGFR u 12. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	-0,002 (-0,027-0,023)	0,012	-0,028	0,870	0,1
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0,309 (0,344-0,963)	0,322	0,158	0,343	2,5
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,969 (-1,582-(-0,355))	0,303	-0,471	<b>0,003</b>	22,2
Aktuelna dnevna doza Tak (mg)	0,068 (-0,110-0,251)	0,089	0,133	0,434	1,8
Aktuelna Tak C <sub>0</sub>	0,070 (-0,135-0,270)	0,100	0,114	0,501	1,3
Aktuelna Tak C <sub>0</sub> /D	-0,049 (-0,461-0,362)	0,203	-0,041	0,809	0,2
Multivarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%), p <sup>2</sup>
Konstanta	2,541 (1,139-3,943)	0,690	/	0,001	31,4 (0,001)
ACR (mg/g)	0,001 (<0,001-0,001)	<0,001	0,306	<b>0,037</b>	
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,908 (-1,496-(-0,320))	0,690	-0,441	<b>0,003</b>	

\*Pacijenti su podeljeni u IPV grupe prema distribuciji na tercile (I, II – nizak, III – visok)

ACR-odnos albumina i kreatinina u urinu; B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; eGFR-procjenjena jačina glomerularne filtracije; IP-interval poverenja; IPV-intraindividualna

varijabilnost;  $p^1$ -značajnost prediktora u okviru datog modela;  $p^2$ -značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse log-transformisane miRNK datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus

**Tabela 5.28** Univarijantna i multivarijantna linearna regresiona analiza povezanosti različitih faktora sa log transformisanom ekspresijom miR-155-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom

Univarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p	R <sup>2</sup> (%)
Pol (muški vs. ženski)	-0,609 (-1,023-(-0,194))	0,204	-0,445	<b>0,005</b>	19,8
Starost (godine)	-0,003 (-0,020-0,015)	0,009	-0,054	0,746	0,3
Post-transplantacioni period (godine)	-0,016 (-0,099-0,067)	0,041	-0,065	0,697	0,4
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,004 (-0,006-0,015)	0,005	0,134	0,421	1,8
Serumski kreatinin (μmol/L)	0,001 (-0,004-0,004)	0,002	0,001	0,993	<0,1
Kreatinin u urinu (mmol/L)	0,001 (-0,049-0,046)	0,024	-0,008	0,956	<0,1
ACR (mg/g)	<0,001 (<0,001-0,001)	<0,001	0,155	0,303	2,4
eGFR u 12. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,008 (-0,009-0,025)	0,008	0,149	0,372	2,2
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0,519 (0,097-0,940)	0,208	0,384	<b>0,017</b>	14,8
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,415 (-0,874-0,044)	0,226	-0,293	0,075	8,6
Aktuelna dnevna doza Tak (mg)	-0,018 (-0,143-0,108)	0,062	-0,048	0,776	0,2
Aktuelna Tak C <sub>0</sub>	-0,002 (-0,143-0,139)	0,069	-0,005	0,978	<0,1
Aktuelna Tak C <sub>0</sub> /D	-0,016 (-0,300-0,268)	0,140	-0,019	0,911	<0,1
Multivarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%), p <sup>2</sup>
Konstanta	-0.210 (-1.498-1.078)	0,635	/	0,742	27,1 (0,004)
Pol (muški vs. ženski)	-0.500 (-0.918-(-0.082))	0,206	-0,366	<b>0,020</b>	
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0.380 (-0.033-0.792)	0,203	0,281	0,070	

$\geq 1,55 \text{ ng/mL/mg}$					
------------------------------	--	--	--	--	--

\*Pacijenti su podeljeni u IPV grupe prema distribuciji na tercile (I, II – nizak, III – visok)

ACR-odnos albumina i kreatinina u urinu; B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; eGFR-procjenjena jačina glomerularne filtracije; IP-interval poverenja; IPV-intraindividualna varijabilnost; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procent objašnjene varijanse log-transformisane miRNK datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus

**Tabela 5.29** Univarijantna i multivarijantna linearna regresiona analiza povezanosti različitih faktora sa log transformisanom ekspresijom miR-204-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom

Univarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p	R <sup>2</sup> (%)
Pol (muški vs. ženski)	-0,438 (-0,961-0,085)	0,258	-0,272	0,098	7,4
Starost (godine)	-0,003 (-0,023-0,018)	0,010	-0,043	0,797	0,2
Post-transplantacioni period (godine)	0,009 (-0,089-0,107)	0,048	0,031	0,853	0,1
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,017 (0,006-0,028)	0,006	0,451	<b>0,004</b>	20,4
Serumski kreatinin (μmol/L)	-0,009 (-0,013-(-0,004))	0,002	0,524	<b>&lt;0,001</b>	27,4
Kreatinin u urinu (mmol/L)	0,090 (0,034-0,145)	0,028	0,439	<b>0,002</b>	19,3
ACR (mg/g)	<0,001 (-0,001-<0,001)	<0,001	-0,056	0,710	0,3
eGFR u 12. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,024 (0,005-0,042)	0,009	0,401	<b>0,013</b>	16
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0,864 (0,414-1,315)	0,222	0,544	<b>&lt;0,001</b>	29,6
Tak IPV (nizak vs. visok)*	-0,200 (-0,760-0,361)	0,276	-0,120	0,475	1,4
Aktuelna dnevna doza Tak (mg)	-0,117 (-0,257-0,023)	0,069	-0,276	0,098	7,6
Aktuelna Tak C <sub>0</sub>	-0,044 (-0,206-0,118)	0,080	-0,093	0,582	0,9
Aktuelna Tak C <sub>0</sub> /D	0,105 (-0,221-0,431)	0,161	0,110	0,517	1,2
Multivarijantna analiza					
Varijable	B (95% IP za B)	SG	Beta	p <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> (%), p <sup>2</sup>

<i>Konstanta</i>	-3,620 (-4,868-(-2,372))	0,614	/	<0,001	38,9 (0,001)
Kreatinin u urinu (mmol/L)	0,019 (-0,051-0,090)	0,035	0,078	0,559	
eGFR u 12. mesecu (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,018 (0,001-0,034)	0,008	0,296	<b>0,039</b>	
Tak metabolički fenotip prema C <sub>0</sub> /D u 3. mesecu (<1,55 ng/mL/mg vs. ≥1,55ng/mL/mg)	0,738 (0,284-1,192)	0,232	0,464	<b>0,002</b>	

\*Pacijenti su podeljeni u IPV grupe prema distribuciji na tercile (I, II – nizak, III – visok)

ACR-odnos albumina i kreatinina u urinu; B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; C<sub>0</sub>-minimalna koncentracija leka; C<sub>0</sub>/D-dozom-prilagođena koncentracija leka na kraju doznog intervala; eGFR-procenjena jačina glomerularne filtracije; IP-interval poverenja; IPV-intraindividualna varijabilnost; p<sup>1</sup>-značajnost prediktora u okviru datog modela; p<sup>2</sup>-značajnost samog modela; R-procentat objašnjene varijanse log-transformisane miRNK datim modelom; SG-standardna greška; Tak-takrolimus

## 6 DISKUSIJA

### 6.1 Uticaj inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti takrolimusa na funkciju grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega

Transplantacija bubrega predstavlja optimalnu terapijsku strategiju za pacijente sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, omogućavajući značajno poboljšanje funkcionalnog statusa. Međutim, iako se očekuje poboljšanje u hematološkim i biohemijskim parametrima nakon transplantacije bubrega, biohemijski status populacije pacijenata sa transplantiranim bubregom se razlikuje u odnosu na opštu populaciju, što je pokazala i ova teza. Gubitak grafta u kasnom periodu nakon transplantacije bubrega može nastupiti usled smrtnog ishoda sa funkcionalnim graftom, gubitka grafta isključujući smrtni ishod (engl. *death-censored graft loss*) i gubitka grafta uključujući smrtni ishod. Hronično ABMR se smatra glavnim uzrokom kasnog gubitka grafta [171], pri čemu i pored napretka u transplantacionoj medicini, njegov tretman predstavlja značajan izazov u kliničkoj praksi. Potencijalni lekovi koji bi se mogli koristiti u tretmanu ABMR su u različitim fazama kliničkih ispitivanja, ali nijedan nije zvanično odobren. Shodno tome, akcenat treba biti stavljen na prevenciju, odnosno pronalaženje ranih, neinvazivnih biomarkera. Idealni neinvazivni biomarker trebalo bi da ima prognostički potencijal, da omogući kategorizaciju pacijenata prema riziku od javljanja hroničnog ABMR, kao i da razlikuje odbacivanje grafta od drugih bolesti bubrega [172].

Kako su DSA u osnovi ABMR, prospektivno praćenje DSA može potencijalno omogućiti blagovremenu reakciju pre nastanka ireverzibilnih promena. Međutim, nedostatak ove metode se ogleda u činjenici da nisu sva DSA potencijalno patogena, kao i da nivoi DSA ne koreliraju striktno sa oštećenjem tkiva [24, 33]. *Sharma i saradnici* [173] su analizom podataka 10 535 transplantiranih bubrežnih pacijenata zaključili da su *de novo* DSA povećala rizik za nastanak akutnog ABMR sa zadovoljavajućim kvalitetom dokaza, dok je kvalitet dokaza za povezanost *de novo* DSA i hroničnog ABMR bio nizak. Pored toga, kao potencijalni biomarkeri se razmatraju i testovi merenja aloreaktivnosti T- i B-limfocita, međutim, dobijeni preliminarni podaci o korisnosti testova imunomonitoringa tek treba da budu potvrđeni u prospektivnim, multicentričnim studijama [42].

Pored pronalaženja ranih biomarkera koji treba da ukažu na hroničnu disfunkciju i odbacivanje grafta, akcenat se može staviti i na optimizaciju postojeće imunosupresivne

terapije. Stoga, tokom vremena, pažnja se preusmerila ka izučavanju prognostičkog potencijala parametara inter- i intraindividualne varijabilnosti u izloženosti Tak. Naime, Tak je okosnica većine imunosupresivnih protokola širom sveta. Rezultati multicentrične, randomizovane „ELITE–Symphony“ studije su dodatno učvrstili poziciju Tak u transplantacionoj medicini, jer je pokazana smanjena incidenca akutnog odbacivanja, poboljšano preživljavanje grafta i bolja funkcija grafta kod pacijenata koji su pored MMF i kortikosterioda primenjivali Tak u odnosu na pacijente na CsA i SIR-baziranom režimu [174]. Dodatno, neinvazivni i jednostavni pokazatelji, poput Tak C<sub>0</sub>/D i Tak IPV, demonstrirali su izražen potencijal u stratifikaciji pacijenata prema riziku od smanjene funkcije grafta i nastanka nepovoljnih post-transplantacionih ishoda. Smatra se da Tak C<sub>0</sub>/D može biti indikator metabolizma Tak, odražavajući efekte svih faktora koji utiču na metabolizam, a ne samo genskih polimorfizama. Upravo genski polimorfizam u CYP3A5 genu, koji predstavlja jednu od najznačajnijih determinanti, samo delimično objašnjava interindividualnu varijabilnost u metabolizmu Tak [175]. Inače, nosioci CYP3A5\*1/\*1 genotipa imaju CL Tak 2 puta veći, dok CYP3A5\*1/\*3 genotip rezultuje CL većim 1,7 puta u poređenju sa nosiocima CYP3A5\*3/\*3 genotipa, odnosno CYP3A5 ne-ekspresorima [73]. Dodatno, kod CYP3A5 ekspresora, potrebno je do 2 nedelje da se dostignu željene koncentracije Tak [70]. Važno je, takođe, napomenuti da nema dokaza o korelaciji između doziranja Tak na osnovu CYP3A5 genotipa i poboljšanja kliničkog ishoda. U skladu s tim, ovo može biti moguće objašnjenje zašto se strategija genotipom-vođenog doziranja još uvek ne primenjuje rutinski u kliničkoj praksi [59, 176, 177]. Postojeće smernice daju preporuke kako da se koriste informacije o genotipu u svrhu prilagođenog doziranja Tak, ali samo ukoliko su dostupne. Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC, engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) dao je preporuku za povećanje inicijalne doze Tak 1,5-2 puta u odnosu na preporučenu standardnu dozu kod CYP3A5 ekspresora u poređenju sa ne-ekspresorima [81]. *Brunet i saradnici* [80] su, u okviru Međunarodnog udruženja za terapijski monitoring lekova i kliničku toksičnost (IATDMCT, engl. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicity*) ukazali da su doze Tak potrebne za postizanje ciljanog opsega C<sub>0</sub> u proseku više za 50% kod ekspresora u poređenju sa ne-ekspresorima CYP3A5 (nivo dokaza AI). Neosporno je da CYP3A5 predstavlja samo dodatni alat u cilju optimizacije potreba u dnevnoj dozi Tak i da genotipizacija ne može zameniti TDM, posebno jer i drugi faktori mogu uticati na potrebe u dnevnoj dozi Tak (demografski faktori, lek-lek interakcije i drugi genski polimorfizmi) [81].

Stoga je fokus ove doktorske disertacije bilo izučavanje parametra Tak C<sub>0</sub>/D (srednja vrednost Tak C<sub>0</sub>/D između 6. i 12. meseca), kao i metaboličkog fenotipa Tak zasnovanog na vrednosti Tak C<sub>0</sub>/D određenoj u 3. post-transplantacionom mesecu. Važno je naglasiti da je postojala jaka pozitivna korelacija između Tak C<sub>0</sub>/D između 6. i 12. meseca i Tak C<sub>0</sub>/D u 3. post-transplantacionom mesecu. Rezultati teze ukazuju na povezanost Tak C<sub>0</sub>/D između 6. i 12. meseca i funkcije grafta, odnosno pacijenti u grupi sa nižom izloženošću (C<sub>0</sub>/D ≤ 1,50 ng/mL/mg) su imali značajno niže eGFR vrednosti tokom svih vremenskih tačaka tokom petogodišnjeg perioda praćenja u odnosu na pacijente sa Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima većim od 1,50 ng/mL/mg. Dve studije su, takođe, ukazale da su pacijenti sa niskim Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima (brzi metabolizeri: <1,05 ng/mL/mg) imali značajno lošiju funkciju grafta, odnosno niže eGFR, tokom 2 [84] i tokom 5 godina nakon transplantacije [86] u poređenju sa pacijentima koji su imali visoke Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti (intermedijarni+spori: ≥1,05 ng/mL/mg). Iako su pripadajuće Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti bile različite, medijana Tak C<sub>0</sub>/D kohorte pacijenata u ovoj tezi (1,50 ng/mL/mg) je inicirala i reprodukovala spajanje brzih i intermedijarnih metabolizera i njihovo poređenje sa sporim metabolizerima. Nedavna studija je za podelu na grupe na osnovu indeksa metabolizma Tak (brzi, varijabilni i spori) koristila procentualnu zastupljenost Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti manjih, odnosno većih od 1,05 ng/mL/mg tokom prethodnih merenja. Pacijenti kod kojih je C<sub>0</sub>/D bio manji, odnosno veći, od 1,05 ng/mL/mg u najmanje 75% prethodnih merenja klasifikovani su kao brzi, odnosno spori metabolizeri, respektivno, dok su pacijenti koji nisu pripadali ni jednoj od ove dve kategorije klasifikovani kao „varijabilni“ metabolizeri. Podelu na grupe je bilo moguće izvršiti već tokom 2. post-transplantacionog meseca, a rezultati su ukazali da je kod brzih metabolizera bio evidentan trend ka nižim eGFR vrednostima tokom prvih 5 godina, pri čemu je eGFR bio značajno niži u 3. post-transplantacionoj godini kod ove grupe pacijenata u odnosu na druge dve [178].

Rezultati ove teze su ukazali na statistički značajnu razliku u primenjenoj dnevnoj dozi Tak između brzih, intermedijarnih i sporih metabolizera, koja je sledstveno doprinela razlici u Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima. Ova razlika u dnevnoj dozi Tak između Tak metabolizera, iako se smanjuje kroz vreme, ostaje stabilna tokom celokupnog perioda praćenja ovog istraživanja. Naime, primena većih doza kod brzih metabolizera rezultuje većim „peak“ koncentracijama Tak u prvim satima nakon primene (2 sata nakon primene, C<sub>2</sub>) [179], koje se, između ostalog, dovode u vezu sa prekomernom imunosupresijom Tak i potencijalnom KNI nefrotoksičnošću. Iako se veće terapijske doze u cilju održavanja optimalnih koncentracija Tak smatraju osnovnom karakteristikom CYP3A5 ekspresora, *Kuypers i saradnici* [180] su pokazali da veće terapijske doze nisu bile isključivo povezane sa

CYP3A5\*1 nosiocima. Razlog za ovakav nalaz se objašnjava činjenicom da nije samo prisustvo CYP3A5\*1 alela usko vezano za brzi metabolizam, već brzi fenotip mogu imati i nosioci CYP3A5\*3/\*3 genotipa. Drugim rečima, CYP3A5\*1 alel je važna determinanta nižih Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti, ali ne i isključiva. S tim u vezi, prognostički potencijal Tak C<sub>0</sub>/D je znatno veći od CYP3A5 genotipa, jer je indikativno da većina, ako ne i svi pacijenti sa niskim Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima, poseduju isključivo fenotip brzih metabolizera [181].

Ova doktorska disertacija je ispitala da li se razlikuje vreme do pojave složenih dugoročnih nepovoljnih ishoda u odnosu na izloženost Tak, odnosno Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti. Kaplan-Majerove krive preživljavanja su ukazale na evidentan trend ka većem broju nepovoljnih ishoda u grupi pacijenata sa nižom izloženosti (C<sub>0</sub>/D ≤ 1,50 ng/mL/mg) u odnosu na grupu pacijenata sa Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima većim od 1,50 ng/mL/mg, iako razlika u trogodišnjem i petogodišnjem preživljavanju grafta nije dostigla statističku značajnost. *Masset i saradnici* [178] su sprovedli analizu preživljavanja transplantata nakon 5 i 10 godina od transplantacije i demonstrirali statističku značajnu razliku u preživljavanju između brzih i sporih metabolizera. Međutim, razlika u odnosu na ovu tezu je bila što su *Masset i saradnici* [178] koristili stopu preživljavanja prilagođenu na ometajuće faktore (engl. *confounding factors*), kao što su godine, formulacija Tak, istorija odbacivanja tokom prvih dva meseca i tip donora, dok je u tezi određena neprilagođena stopa preživljavanja. Prateća multivarijantna Cox regresiona analiza u studiji *Masset i saradnika* [178] potvrdila je da brzi metabolizeri imaju 2 puta i 1,7 puta veći rizik od gubitka grafta i odbacivanja grafta, respektivno, u odnosu na spore metabolizere. *Jouve i saradnici* [5] su u „TOMATO” studiji, takođe, ukazali na razliku u preživljavanju grafta između pacijenata sa Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima <1,05 i ≥1,05 ng/mL/mg (bazirane na medijani C<sub>0</sub>/D vrednosti u 3. i 6. post-transplantacionom mesecu) koja je primećena već nakon 4 godine od transplantacije. Ovaj rezultat je potvrđen i u multivarijantnoj Cox regresionoj analizi, gde su pacijenti sa Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima <1,05 ng/mL/mg imali 2,25 puta veći rizik od gubitka grafta isključujući smrtni ishod [5]. Slično tome, *Schütte-Nütgen i saradnici* [86] su demonstrirali lošije ukupno preživljavanje grafta kod pacijenata sa Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima <1,05 ng/mL/mg u odnosu na pacijente sa ≥1,05 ng/mL/mg (bazirane na Tak C<sub>0</sub>/D u 3. post-transplantacionom mesecu). Povrh toga, brzi metabolizeri su imali 2,7 puta veći rizik od gubitka grafta uključujući smrtni ishod. Rezultati doktorske disertacije nisu reprodukovali rezultate navedenih studija, što se najverovatnije može objasniti brojem pacijenata koji su učestvovali u ispitivanju (n=115 u tezi u odnosu na 1979 [178], 666 [5] i ~400 [86]). Uzimajući u obzir evidentan trend većeg broja nepovoljnih

ishoda kod pacijenata sa niskom izloženošću, na većem uzorku pacijenata mogli bi se očekivati slični rezultati.

Iako je zapažena korelacija između niskih Tak  $C_0/D$  vrednosti (brzi metabolizeri) i nepovoljnih post-transplantacionih ishoda, i dalje nije u potpunosti razjašnjen mehanizam koji je u osnovi ove povezanosti, iako je akcentovan uticaj na „*peak*” koncentracije i metaboličke puteve Tak [5]. Iako u osnovi kontradiktorno, rezultati studija ukazuju na povezanost niskih Tak  $C_0/D$  vrednosti sa KNI nefrotoksičnošću usled rane prekomerne imunosupresije (C2 koncentracija), ali i sa odbacivanjem grafta usled nedovoljne imunosupresije, odnosno kontinuiranom težnjom ka postizanju ciljanog opsega primenom većih doza Tak. Uprkos većim potrebama u dozi, pacijenti sa nižim Tak  $C_0/D$  vrednostima uglavnom ne ispoljavaju više Tak  $C_0$ , AUC i koncentracije Tak metabolita od pacijenata sa višim Tak  $C_0/D$  vrednostima [179]. Pored toga, nađeno je da Tak  $C_0$  i AUC vrednosti određene u 3. i 12. post-transplantacionom mesecu nisu povezane sa KNI nefrotoksičnošću [180]. Ovo istraživanje je demonstriralo uporedive Tak  $C_0$  vrednosti kod brzih, intermedijarnih i sporih metabolizera, uprkos statistički značajnim razlikama u primenjenim dnevnim dozama Tak, što je očekivano uzimajući u obzir da se primenom TDM cilja vrlo uzak opseg  $C_0$  vrednosti.

Dugotrajna primena i izlaganje visokim koncentracijama može dovesti do ispoljavanja neželjenih efekata Tak, koji, pored nefrotoksičnosti, uključuju i neurotoksičnost, infekcije, malignitete i PTDM [67]. Pored toga, Tak može ispoljiti svoje neželjene efekte i pri koncentracijama koje su neznatno iznad, pa čak i u okviru terapijskog opsega, Nasuprot tome, kod određenih pacijenata koji su izloženi supratherapijskim koncentracijama ne dolazi do pojave neželjenih efekata. Sa druge strane, izlaganje niskim koncentracijama može dovesti do odbacivanja grafta. Međutim, mogu se javiti epizode akutnog odbacivanja i kada su koncentracije unutar ciljnog opsega. Ovo sugerise da Tak  $C_0$  nije uvek u korelaciji sa njegovim farmakološkim efektom [73, 76]. U prilog tome idu i rezultati dobijeni u „*ELITE–Symphony*“ studiji, odnosno zaključak da Tak zadržava profil toksičnosti uprkos primeni niskih doza [182]. Za strategije imunosupresije koje su razvijene sa ciljem smanjenja izloženosti KNI i njihovoj toksičnosti, uključujući minimizaciju, konverziju, ukidanje i izbegavanje, čvrsti pozitivni dokazi postoje jedino za strategiju minimizacije. Naime, nisko-dozni režim Tak (sa/bez mTOR inhibitora) je korelirao sa poboljšanom bubrežnom funkcijom u poređenju sa standardno-doznim režimom [183, 184]. Međutim, minimizacija doze može potencijalno dovesti do nedovoljne imunosupresije, koja je sama po sebi jedan od važnih faktora za formiranje *de novo* DSA i posledičnog posredovanja u odbacivanju grafta [172].

Iako postularno smatran surogat markerom neadherence pacijenata prema propisanoj imunosupresivnoj terapiji, ima nalaza koji ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u IPV vrednosti (CV%) između adherentnih i neadherentnih stabilnih pacijenata sa transplantiranim bubregom [185]. Sa druge strane, u slučajevima gde je nađena korelacija između neadherence i visokih IPV vrednosti, ista je bila slaba [186]. Tip formulacije Tak, kao jedan od pretpostavljenih uzroka visokih IPV vrednosti, odnosno konverzija sa Tak-TD na Tak-OD nije se pokazala kao efikasan metod u snižavanju Tak IPV vrednosti [187, 188]. Postoje dokazi koji indikuju da je uticaj IPV na dugoročne nepovoljne post-transplantacione ishode zavisao od imunološkog rizika transplantiranih bubrežnih pacijenata (na osnovu maksimalnih pre-transplantacionih vrednosti panel-reaktivnih antitela i prisustva DSA) [189].

Rezultati ove teze su pokazali da nije bilo razlike u eGFR vrednostima između grupe pacijenata sa niskim i visokim IPV vrednostima. Slično rezultatima ove teze, *Ko i saradnici* [185] nisu uvideli značajnu razliku u funkciji grafta u 1., 3. i 5. godini između pacijenata sa niskim i visokim Tak IPV vrednostima (CV% manje, odnosno veće od vrednosti medijane 16,5). Shodno tome, *Mendoza Rojas i saradnici* [190] nisu pronašli korelaciju između Tak IPV i eGFR vrednosti, serumskog kreatinina i ACR u 5. post-transplantacionoj godini. Takođe, funkcija grafta nije identifikovana kao faktor rizika povezan sa visokim IPV vrednostima [189]. Nasuprot tome, *Whalen i saradnici* [191] su ukazali na značajno lošiju funkciju grafta (niže eGFR vrednosti) kod pacijenata sa visokim u odnosu na pacijente sa niskim IPV vrednostima u 1., 2., 3. i 4. post-transplantacionoj godini (CV% Tak C<sub>0</sub> između 6. i 12. meseca; *cut-off* vrednost medijane od 15%). Kao potencijalno objašnjenje za različite rezultate mogu se iskoristiti rezultati studija koji ukazuju da visok IPV može dovesti do histoloških promena pre pojave disfunkcije grafta. Naime, dve grupe naučnika su ispitivanjem nalaza protokolarnih biopsija u 2. post-transplantacionoj nedelji i 12. mesecu, ustanovile da je visok IPV između 6. i 12. meseca (vrednosti veće od vrednosti medijane) značajan prediktor pogoršanja histološkog skora hroničnosti u odnosu na grupu pacijenata sa niskim IPV vrednostima [192, 193]. Pripadnost grupi sa visokom IPV u odnosu na grupu sa niskim IPV vrednostima bila je u vezi sa progresijom skora IF, TA, IF/TA, ekspresije mezigijalne matrice i skora hroničnosti [192], odnosno u vezi sa nalazom akutne KNI nefrotoksičnosti [193]. Vrednosti eGFR u 12. mesecu, odnosno u vreme izvođenja protokolarne biopsije, nisu se razlikovale među grupama sa visokim i niskim IPV vrednostima. *Vanhove i saradnici* su ukazali da histološki skor hroničnosti protokolarnih biopsija u 3. i 24. mesecu nije korelirao sa pogoršanjem funkcije grafta, odnosno promene u eGFR vrednostima između 3. i 24. meseca nisu se razlikovale između IPV grupa tercila [96].

Pored toga, u ovom istraživanju nije nađena povezanost između IPV i složenih nepovoljnih ishoda u dugoročnom periodu, iako je razlika u vremenu do pojave ishoda unutar 5 godina bila na granici statističke značajnosti. *Borra i saradnici* [88] su prvi ukazali na klinički značaj IPV. U kohorti od 297 pacijenata sa transplantiranim bubregom, sa prosečnim praćenjem od  $1849 \pm 585$  dana, *Borra i saradnici* su pronašli povezanost visokih IPV vrednosti sa složenim krajnjim ishodom koji je uključivao gubitak grafta, biopsijom-potvrđenu hroničnu nefropatiju alografta i udvostručenje koncentracije kreatinina u plazmi [88]. *Shuker i saradnici* [3] su potvrdili ove rezultate, uz modifikaciju složenog krajnjeg ishoda (kasno akutno odbacivanje, transplantaciona glomerulopatija, gubitak grafta i udvostručenje koncentracije kreatinina), većim brojem ispitanika i dužim periodom praćenja. Nakon ovih studija, koje su otvorile put izučavanju IPV, različite studijske grupe su imale za cilj dalju procenu povezanosti IPV i neželjenih dugoročnih post-transplantacionih ishoda (prevashodno odbacivanja grafta, gubitka grafta i razvoja *de novo* DSA). Dodatno, *Kim i saradnici* [189] su demonstrirali povezanost visokih IPV vrednosti i otkazivanja funkcije grafta i kasnog odbacivanja kroz analizu preživljavanja, međutim, uticaj IPV je bio evidentan samo kod grupe pacijenata sa visokim imunološkim rizikom, dok isti nije zapažen kod grupe pacijenata sa niskim imunološkim rizikom. Ova teza nije vršila podelu pacijenata u odnosu na imunološki rizik, jer je kohorta pacijenata u ovoj studiji bila pretežno niskog imunološkog rizika.

Moguća objašnjenja za različite rezultate između objavljenih studija, kao i ove doktorske disertacije, mogu biti razlika u periodu praćenja transplantiranih bubrežnih pacijenata, broju pacijenata uključenih u studije, definisanim složenim nepovoljnim ishodima, korišćenim formulama za izračunavanje IPV i graničnim vrednostima za podelu na grupe, odnosno može se zaključiti da je povezanost između IPV i neželjenih ishoda multifaktorijalna [90]. Međutim, većina objavljenih studija je pratila pacijente do pojave prethodno determinisanih neželjenih ishoda. Nasuprot tome, ova doktorska disertacija je imala predefinisani period praćenja od 5 godina, jer se smatra da se značajan broj ishoda upravo dešava u ovom periodu. Takođe, cilj je bio da period praćenja bude istovetan za sve pacijente uključene u ovo istraživanje.

Kako je diskutovano u *Pregledu literature*, ne može se jasno razgraničiti da li je veza između Tak IPV i neželjenih ishoda rezultat prekomerne ili nedovoljne izloženosti Tak. Iako većina objavljenih studija podržava povezanost između IPV i razvoja *de novo* DSA [194], koja ukazuju na nedovoljnu imunosupresiju i posledično imunološke mehanizme odbacivanja grafta, postoje i dokazi koji takvu povezanost nisu potvrdili. Naime, *Mendoza Rojas i*

*saradnici* [190] nisu našli korelaciju između IPV određenog između 6. i 12. meseca i prisustva anti-HLA i DSA antitela merenih između 5. i 7. godine nakon transplantacije bubrega, niti korelaciju sa incidencom odbacivanja grafta nakon 1. post-transplantacione godine. Nasuprot tome, ukazali su na povezanost između visokog IPV i veće incidence gubitka grafta, uključujući smrt sa funkcionalnim graftom. U objašnjenju svojih nalaza, autori su za nađenu povezanost prepostavili da je rezultat prekomerne izloženosti Tak, jer je gubitak grafta u velikom broju slučajeva uključivao smrt sa funkcionalnim graftom usled maligniteta i infekcija, što su neželjena dejstva povezana sa dugotrajnom primenom i prekomernim izlaganjem Tak [190].

Pored toga, *Sablik i saradnici* [195] su utvrdili da su pacijenti koji su razvili hronično aktivno ABMR pokazali značajan trend pada Tak  $C_0$  i eGFR tokom 3 godine pre postavljanja dijagnoze, dok su ovi parametri bili stabilni kod kontrolne grupe pacijenata bez ishoda. Sa druge strane, Tak IPV se nije razlikovao između pacijenata sa hroničnim aktivnim ABMR i kontrolne grupe pacijenata bez ishoda, ali je bio povezan sa lošijim preživljavanjem transplantata nakon što je ABMR dijagnostikovano.

Na osnovu svega rečenog, nameće se potreba za kombinovanom procenom uticaja markera izloženosti Tak, odnosno Tak  $C_0/D$  i IPV, na nepovoljne ishode transplantacije i za identifikaciju i stratifikaciju pacijenata prema riziku [194]. *Rozen-Zvi i saradnici* [196] su među prvima izvestili o značajno smanjenom preživljavanju grafta (uključujući smrt sa funkcionalnim graftom) kod pacijenata koji su istovremeno imali visoke IPV vrednosti, izražene kao TWCV, i Tak  $C_0 < 5$  ng/mL. U poređenju sa ostalim kombinovanim grupama (visok IPV i Tak  $C_0 > 5$  ng/mL; nizak IPV i Tak  $C_0 < 5$  ng/mL; nizak IPV i Tak  $C_0 > 5$  ng/mL), ova grupa je imala 2,7 puta veći rizik od gubitka grafta u univarijantnoj analizi, odnosno približno 3 puta veći rizik u modelu prilagođenom za druge nezavisne varijable povezane sa ishodom. *Goodall i saradnici* [197] su formirali Tak IPV/Tak  $C_0$  grupe rukovodeći se vrednostima CV% između 6. i 12. meseca (kvartili) i optimalnim opsegom Tak  $C_0$  korišćenog u studiji (<5, 5-8 i >9 ng/mL). Kaplan-Majerove krive preživljavanja su ukazale na razliku u preživljavanju grafta isključujući smrtni ishod između različitih grupa pacijenata, pri čemu su grupa sa niskim IPV (II kvartil, 25% vrednosti manjih od medijane) / Tak  $C_0 < 5$  ng/mL i grupa sa visokim IPV (III kvartil, 25% vrednosti većih od medijane) / Tak  $C_0 < 5$  ng/mL bile okarakterisane većim procentom javljanja ishoda u odnosu na ostale grupe (nizak IPV/ $C_0$  5-8; nizak IPV/ $C_0 > 9$ ; visok IPV/ $C_0$  5-8; visok IPV/ $C_0 > 9$ ) [197]. U kontekstu ovih dveju studija, kod pacijenata koji se karakterišu visokim IPV vrednostima, razumno je kontinuirano težiti

ka postizanju većih Tak  $C_0$  vrednosti ( $\geq 7$  ng/mL) u cilju izbegavanja perioda nedovoljne imunosupresije i epizoda odbacivanja grafta [3].

U studiji *Stefanović i saradnika* [72], koja je uključivala pacijente iz ove doktorske disertacije ( $n=104$ ), pokazano je da udružena procena efekata Tak IPV i  $C_0/D$  može omogućiti kategorizaciju pacijenata prema riziku od pogoršanja funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Naime, sprovedena analiza trogodišnjeg preživljavanja je pokazala da su pacijenti koji su istovremeno imali visoke IPV vrednosti (III tercil:  $IPV > 25\%$ ) i niske Tak  $C_0/D$  vrednosti ( $C_0/D$  manje od vrednosti medijane 1,59 ng/mL/mg) imali značajno lošije preživljavanje grafta u odnosu na ostale kombinovane grupe pacijenata ( $C_0/D \geq 1,59$  ng/mL/mg i  $IPV > 25\%$ ;  $C_0/D < 1,59$  ng/mL/mg i  $IPV \leq 25\%$ ;  $C_0/D \geq 1,59$  ng/mL/mg i  $IPV \leq 25\%$ ), odnosno imali su 4 puta veći rizik od dostizanja složenog ishoda u univarijantnoj analizi, i približno 3 puta veći rizik u modelu prilagođenom za druge varijable povezane sa ishodom. Dodatno, 37,5% pacijenata iz ove grupe je imalo neki od definisanih složenih nepovoljnih ishoda. Ova doktorska disertacija potvrdila je rezultate ove studije na većem broju pacijenata ( $n=115$ ) tokom dužeg perioda praćenja (5 godina). Rizik od pojave neželjenog ishoda u grupi pacijenata sa niskim  $C_0/D$ /visokim IPV vrednostima ( $C_0/D \leq 1,5$  ng/mL/mg i  $IPV > 24,87\%$ ) tokom petogodišnjeg perioda praćenja je, takođe, bio približno 4 puta, odnosno 3 puta veći u odnosu na ostale kombinovane grupe u univarijantnoj i multivarijantnoj Cox regresiji, respektivno.

*Park i saradnici* [198] su, slično ovoj tezi, formirali 4 grupe pacijenata na osnovu vrednosti TWCV (baziran na Tak  $C_0$  vrednostima određenim tokom rutinskih kontrola u toku 1. godine) i vrednosti Tak  $C_0/D$  određenoj u 3. post-transplantacionom mesecu. Posmatrane grupe su korelirale sa onim formiranim u ovoj tezi (visoke IPV/niske  $C_0/D$ ; niske IPV/niske  $C_0/D$ ; visoke IPV/visoke  $C_0/D$ ; niske IPV/visoke  $C_0/D$  vrednosti), pri čemu je postojala razlika u korišćenoj formuli za izračunavanje IPV i utvrđenim graničnim vrednostima (30% za TWCV i 1,05 ng/mL/mg za Tak  $C_0/D$ ). Primarni ishod (gubitak grafta isključujući smrtni ishod sa funkcionalnom graftom) i sekundarni ishodi (razvoj *de novo* DSA, biopsijom-potvrđeno odbacivanje grafta, KNI nefrotoksičnost i stopa mortaliteta) su upoređeni između 4 grupe pacijenata. Rezultati su pokazali da se incidenca KNI nefrotoksičnosti, razvoja *de novo* DSA i BK nefropatije, kao ni stopa mortaliteta nisu razlikovale, dok se incidenca biopsijom-potvrđenog odbacivanja grafta (akutnog ABMR i TCMR i hroničnog ABMR) razlikovala među grupama. Analiza preživljavanja je potvrdila da su pacijenti u grupi sa visokim IPV/niskim  $C_0/D$  vrednostima imali najnižu stopu preživljavanja u odnosu na ostale grupe tokom perioda praćenja sa medijanom od 5,7 godina. Pritom, grupa sa visokim IPV/niskim

C<sub>0</sub>/D vrednostima je imala 3 puta, odnosno približno 2,5 puta veći rizik za gubitak grafta isključujući smrtni ishod u neprilagođenim i prilagođenim modelima Cox regresione analize [198].

Pored niskih C<sub>0</sub>/D/visokih IPV vrednosti, druga značajna nezavisna varijabla povezana sa neželjenim ishodom bila je eGFR vrednost u 6. post-transplantacionom mesecu. Analiza uticaja pre-transplantacionih i ranih post-transplantacionih faktora na klirens kreatinina u 6. mesecu, zasnovana na podacima 42 250 pacijenata iz UNOS baze podataka (engl. *United Network for Organ Sharing*), pokazala je da su akutno odbacivanje u prvih šest meseci, HLA neslaganje između primaoca i donora, starost primaoca i donora, tip donora, potreba za dijalizom u prvoj nedelji, vreme hladne ishemije i rasa primaoca bili povezani sa vrednostima klirensa kreatinina nakon šest meseci [199]. Druga studija je pokazala da su na klirens kreatinina u 6. mesecu nezavisno uticali faktori vezani za donora (starost, pol), primaoca (starost, pol) i imunološki faktori (epizode odbacivanja, ponovna transplantacija) kod 429 pacijenata sa kadaveričnom transplantacijom bubrega [200]. S obzirom na pretpostavku da rana funkcija transplantata može predvideti dugoročne ishode, 6. post-transplantacioni mesec mogao bi se smatrati početnom, odnosno nultom fazom dugoročnog post-transplantacionog perioda što je pretpostavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji.

## **6.2 Uticaj polimorfizama IL-6, IL-10 i IL-18 na farmakokinetiku takrolimusa i funkciju grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega**

Potencijalna uloga IL-6 u ABMR i TCMR ogleda se u posredovanju u razvoju i sazrevanju B-limfocita, na taj način utičući na formiranje DSA, odnosno stimulaciji odgovora efektivnih T-limfocita uz inhibiciju Treg [201]. S obzirom da je aloimuna aktivacija u osnovi odbacivanja grafta, *Van Loon i saradnici* [202] su ispitali povezanost panela od 28 citokina, hemokina i faktora rasta sa prisustvom HLA-DSA i ABMR, pri čemu je IL-6 pokazao najjaču pozitivnu korelaciju sa prisustvom DSA, kao i sa dijagnozom ABMR. Takođe, nivoi proinflamatornih citokina u krvi su bili povišeni kod pacijenata koji su imali HLA-DSA, čak i u odsustvu histoloških znakova ABMR, što ukazuje na činjenicu da HLA-DSA mogu dovesti do aloimune aktivacije koja se ne mora nužno odraziti na histološki nalaz biopsije. S obzirom na to da nisu svi pacijenti uključeni u studiju neposredno nakon transplantacije, a i uzimajući u obzir da su uključeni pacijenti bili niskog imunološkog rizika, nivoi DSA nisu ispitivani.

Postoje tri različita tipa IL-6 signalizacije. Klasična signalizacija se odvija vezivanjem IL-6 za membranski IL-6 receptor (IL-6R) uz prisustvo transmembranskog proteina

glikoproteina 130 (gp130) za sprovođenje signala. Kod trans-signalizacije do prenosa signala dolazi usled stvaranja kompleksa IL-6 sa solubilnim IL-6R (s-IL-6R) i potom vezivanja stvorenog kompleksa za ćelije koje ekspimiraju gp130. Na kraju, prepoznata je i trans-prezentacija, kao vid signalizacije, koja se dešava kada se IL-6 veže za IL-6R na jednoj ćeliji, a za gp130 na drugoj ćeliji, međutim, izgleda da je njena uloga ograničena na formiranje patogenih Th17 ćelija. Prenos signala uključuje aktivaciju JAK, što dovodi do aktivacije transkripcionih faktora STAT. Drugi važan put je MAPK signalna kaskada. Klasična signalizacija se dovodi u vezu sa protektivnim (regenerativnim) i antiinflamatornim efektima IL-6, dok je trans-signalizacija povezana sa proinflamatornim efektima IL-6 [100, 203, 204]. Bubrezi ekspimiraju IL-6R prvenstveno u mezangijalnim ćelijama, ali i u podocitima, tubularnim epitelnim ćelijama, arterijama i arteriolama [98].

Mnogobrojna naučna istraživanja su stavila u fokus ispitivanje povezanosti IL-6 -174G/C polimorfizma primaoca organa i nepovoljnih ishoda u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Naime, pokazana je značajna povezanost datog polimorfizma sa hroničnom disfunkcijom grafta, hroničnim odbacivanjem i preživljavanjem grafta [6, 101, 105, 203]. Ipak, deo istraživača je ukazao da IL-6 -174G/C polimorfizam nema uticaj na post-transplantacione ishode [102, 111, 205]. Dodatno, naučna zajednica nije dobila konzistentne rezultate ni u pogledu -174G/C genotipa/alela koji se dovodi u relaciju sa nepovoljnim post-transplantacionim ishodima. Deo autora ističe da -174G/C genotipovi sa visokom transkripcionom aktivnošću (GG ili GG/GC) imaju zaštitni efekat na transplantat zbog sposobnosti suzbijanja inflamacije [101, 105, 206], dok drugi deo istraživača upravo postojanje G alela povezuje sa hroničnom disfunkcijom grafta i rizikom za gubitak grafta u kasnom periodu nakon transplantacije bubrega [6].

Rezultati ove doktorske disertacije podržavaju povezanost između -174GG genotipa, koji je postularno povezan sa povišenim nivoima IL-6, i smanjene funkcije grafta u 12., 48. i 60. mesecu nakon transplantacije, u poređenju sa nosiocima IL-6 -174C alela (IL-6 -174GC i IL-6 -174CC genotip). Takođe, u okviru grupe nosioca -174GG genotipa, uočava se izražena tendencija ka smanjenju eGFR vrednosti od početka do kraja perioda praćenja. Važno je naglasiti da je funkcija grafta bila uporediva između nosioca različitih -174G/C genotipova na početku perioda praćenja. U studiji *Kocierz i saradnika* [6], koji su analizirali eGFR nagib (engl. *slope*), nađeno je da su nosioci IL-6 -174GG+GC genotipova okarakterisani bržim pogoršanjem funkcije grafta tokom petogodišnjeg perioda u odnosu na nosioce IL-6 -174CC genotipa. Nasuprot tome, *Breulmann i saradnici* [207] nisu uočili razliku u serumskom kreatininu i klirensu kreatinina ni u jednoj vremenskoj tački (godine nakon transplantacije)

tokom perioda praćenja od  $4,9 \pm 2,0$  godine između pacijenata nosioca -174GG genotipa i nosioca -174C alela. Međutim, serumski kreatinin i klirens kreatinina su zapostavljeni kao metode za procenu GFR usled svojih nedostataka i manje pouzdanosti u odnosu na metode zasnovane na prediktivnim jednačinama.

Ispitivanjem vremena do pojave definisanih neželjenih ishoda u dugoročnom periodu nakon transplantacije, nije nađena razlika u vremenu do pojave ishoda unutar tri i pet godina nakon transplantacije između nosioca različitih -174G/C genotipova u ovoj tezi. Konzistentno sa ovim rezultatima, *Sánchez-Velasco i saradnici* [102] nisu uvideli razliku u petogodišnjem preživljavanju poređenjem nosioca -174G alela i -174CC genotipa, kao ni *Breulmann i saradnici* tokom praćenja od  $4,9 \pm 2,0$  godine [207]. Iako je obuhvaćen znatno duži period praćenja u odnosu na ovu tezu, *Eskandari i saradnici* [203], takođe, nisu pronašli razliku u 15-godišnjem preživljavanju grafta (isključujući smrtni ishod) između primaoca bubrega koji su bili nosioci -174G alela i -174CC genotipa u populaciji od 1271 pacijenta. Zanimljivo je, međutim, da je u konsekventnoj analizi parova donor-primalac, zapažena značajno veća stopa preživljavanja grafta kada su i donor i primalac organa imali -174CC genotip u poređenju sa grupom u kojoj nijedan od njih nije imao -174CC genotip, kao i grupom gde je ili primalac ili donor posedovao -174CC genotip. Nasuprot nalazima koji nisu išli u prilog povezanosti -174G/C polimorfizma i neželjenih ishoda kod primaoca organa, *Kocierz i saradnici* [6] su demonstrirali smanjeno petogodišnje preživljavanje grafta kod pacijenata nosilaca -174G alela u poređenju sa nosiocima -174CC genotipa. *Müller-Steinhardt i saradnici* [105] su ukazali na marginalno značajnu razliku u trogodišnjem preživljavanju grafta između nosilaca -174GG genotipa i -174C alela, pri čemu je lošije preživljavanje grafta bila karakteristika nosilaca -174C alela. Moguće objašnjenje za razliku u rezultatima može imati uporište u činjenici da su studije u kojima je demonstrirana razlika u preživljavanju grafta obuhvatale samo pacijente koji su bili podvrgnuti kadaveričnoj transplantaciji, dok su ova teza i studija *Eskandari i saradnika* [203] uključivale pacijente nezavisno od tipa transplantacije. Takođe, u studijama drugih naučnika, svi pacijenti [105], ili značajan deo ispitanika [6, 203], bili su podvrgnuti imunosupresivnom režimu zasnovanom na CsA, dok je ova teza uključivala pacijente isključivo na Tak režimu.

Kontradiktornost rezultata studija delom se može pripisati plejotropnim efektima i ambivalentnosti dejstva IL-6. Drugim rečima, ne može se jasno razgraničiti u kojim periodima nakon transplantacije IL-6 ispoljava proinflamatorno, odnosno antiinflamatorno dejstvo, kao i koje dejstvo je dominantno u određenim patofiziološkim stanjima transplantiranih pacijenata [205]. U prilog oprečnim rezultatima ide i činjenica da se dovodi u

pitanje stav da je G alel povezan sa visokom, a C alel sa niskom IL-6 produkcijom. Dalje, Noss i saradnici [208] su zaključili da se uticaj -174G/C polimorfizma na produkciju IL-6 razlikuje zavisno od tipa ćelije i stimulacije. Naime, genska varijacija IL-6 -174G/C može uticati na ekspresiju IL-6 u fibroblastima, te su najviši nivoi IL-6 primećeni kod fibroblasta izolovanih iz uzoraka donora nosioca -174CC genotipa. Međutim, ista povezanost nije zabeležena u izolovanim monocitima, a analiza drugih studija pokazala je odsustvo ove veze i kod endotelnih i perifernih mononuklearnih ćelija krvi. S druge strane, u makrofagima i B-limfocitima, -174G alel podsticao je veću ekspresiju IL-6, ali tek nakon stimulacije noradrenalinom [208]. Kako je prethodno naglašeno da skoro svaka ćelija u organizmu proizvodi IL-6, postaje ključno razmotriti uticaj polimorfizma IL-6 -174G/C na ekspresiju IL-6 u ćelijama relevantnim za specifična patološka stanja, jer se smatra da ne treba deterministički generalizovati direktnu vezu između -174G alela i povišene ekspresije IL-6. Takođe, istraživači naglašavaju da povezivanje genotipa sa *in vivo* fenotipskim karakteristikama zahteva oprezan pristup, uzimajući u obzir širok spektar bioloških funkcija IL-6 [209].

Ova doktorska disertacija je, takođe, imala za cilj i procenu uticaja -174G/C polimorfizma na farmakokinetiku Tak. Osnov za postavljanje hipoteze o povezanosti može se pripisati pretpostavci da je IL-6 potentan inhibitor CYP3A enzima [210]. Uticaj na CYP-posredovanu dispoziciju lekova se može objasniti stanjem pojačane inflamacije, jer mehanizam delovanja citokina IL-6, kao i drugog izučavanog IL-18, uključuje stimulaciju drugih proinflamatornih citokina (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), kao i reaktanata akutne faze (CRP, fibrinogen) [6, 10, 13]. Iako se veruje da IL-6 negativno reguliše sve CYP izoenzime, *in vitro* studije su pokazale da je CYP3A4 „najosetljiviji” na inhibiciju posredovanu IL-6 [211, 212], pri čemu je IL-6 smanjio CYP3A4 ekspresiju za 90% nakon 24 sata od izlaganja [211]. Farmakokinetički modeli razvijeni kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom ukazali su da su konstantno povišeni IL-6 nivoi (50–100 pg/mL) predviđali smanjenje aktivnosti enzima CYP3A u odnosu na početne vrednosti (kod zdravih individua), pri čemu se očekivala redukcija od 40-52% u jetri i 41-54% u crevima [210].

U cilju ispitivanja povezanosti -174G/C polimorfizma sa farmakokinetičkim parametrima Tak, sprovedene su analize korišćenjem 2 različita genetička modela uzimajući u obzir da ne postoji jedinstven stav o kriterijumima za podelu na genotipove/alele udružene sa višom, odnosno nižom ekspresijom i nivoima IL-6. Rezultati su pokazali da su nosioci IL-6 -174GG genotipa primenjivali značajno veće Tak dnevne doze u cilju održavanja Tak C<sub>0</sub> u optimalnom opsegu. Seyhun i saradnici [4] su pretpostavili da pacijenti sa IL-6 -174GG

genotipom zahtevaju veće doze Tak zbog nižih Tak  $C_0$  vrednosti, međutim, to nije bio slučaj u ovoj studiji. *Kotowski i saradnici* [213] pokazali su da su pacijenti sa IL-6 -174GG genotipom primenjivali najveću prosečnu dozu imunosupresiva CsA u poređenju sa pacijentima nosiocima IL-6 -174GC i -174CC genotipa. Takođe, u ovoj tezi su pacijenti sa -174GG genotipom imali niže Tak  $C_0/D$  vrednosti u odnosu na nosioce IL-6 -174C alela u svim posmatranim vremenskim tačkama praćenja (osim u 24. mesecu), što se verovatno može pripisati većim potrebama u dozi [214]. Nasuprot tome, u studiji *Kotowski i saradnika* [213], iako nije zapažena statistički značajna razlika u CsA  $C_0/D$  vrednostima, fluktuacija ka višim  $C_0/D$  vrednostima je bila karakteristika IL-6 -174GG genotipa. Uprkos očekivanju da bi osobe sa IL-6 -174GG genotipom trebalo da primenjuju manje dnevne doze zbog smanjenog CL Tak usled povećane produkcije IL-6, mora se uzeti u obzir da na interindividualnu varijabilnost Tak mogu uticati i drugi genetički i ne-genetički faktori, što su potvrdili i rezultati ove teze. Naime, pokazan je nezavisan uticaj IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A i IL-18 -137G/C polimorfizma na Tak  $C_0/D$  vrednosti od 6. do 60. post-transplantacionog meseca u modelu prilagođenom na pol, godine u vreme transplantacije, period nakon transplantacije i Tak metabolički fenotip.

Uzimajući u obzir pretpostavljeni supresivni efekat IL-6 na CYP3A4, ovaj polimorfizam bi imalo smisla izučavati i u kontekstu CYP3A5 genskog polimorfizma, za koji se smatra da je važna determinanta dnevne doze Tak. Naime, pokazano je da je efekat IL-6 -174G/C polimorfizma na Tak  $C_0/D$  vrednosti nezavisan od CYP3A5 genotipa u toku prve tri post-transplantacione godine [214]. Međutim, ne treba zanemariti činjenicu da je IL-6 posredovana supresija prethodno indukovanih CYP izoformi enzima (korišćenjem CYP induktora) utvrđena tek pri koncentracijama IL-6 koje su bile značajno više od uobičajenih vrednosti prisutnih u serumu pacijenata sa inflamatornim oboljenjima [212]. Pacijenti sa transplantiranim bubregom u svojoj terapiji često primenjuju lekove koji stupaju u interakciju sa Tak, te ostaje nejasno u kojoj meri je uticaj IL-6 na inhibiciju CYP3A zaslužan za njegove efekte na farmakokinetičke parametre Tak.

U ovom istraživanju, učestalost IL-6 genotipova kod pacijenata bila je sledeća: -174GG 40,0%; -174GC 47,0%; -174CC 13%. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim studijama o učestalosti ovih genotipova među kavkaskom populacijom [102, 105, 207].

Pored genetičkih uticaja, smatra se da nivoi IL-6 u plazmi zavise i od vremena koje je proteklo od transplantacije bubrega. Naime, pokazano je da se visoki nivoi IL-6 pre same transplantacije održavaju i neposredno nakon transplantacije, da bi se potom smanjivali do

30. dana, a zatim ponovo povećavali od 180. post-transplantacionog dana. U prilog tome idu i rezultati *Alves i saradnika* [7] koji su ukazali da je nivo ekspresije IL-6 najviši u prva 24 meseca u poređenju sa kasnijim post-transplantacionim periodom. Takođe, nivoi IL-6 se razlikuju u zavisnosti od funkcije transplantata, te pacijenti koji su imali akutno ili hronično odbacivanje imaju značajno više nivoe IL-6 u odnosu na pacijente sa stabilnom funkcijom grafta i kontrolne pacijente [170, 215]. Grupa pacijenata u ovom istraživanju imala je značajno više IL-6 nivoe u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu nije vršena podela pacijenata u odnosu na javljanje nepovoljnog ishoda. Cilj je bio uvezati IL-6 nivoe sa markerima, odnosno Tak C<sub>0</sub>/D i Tak IPV kao potencijalnim prediktorima oštećenja funkcije grafta. Nije zapažena razlika u IL-6 nivoima između pacijenata sa nižim i višim Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima, kao ni pacijenata sa višim i nižim IPV vrednostima. Pošto su pacijenti sa različitim periodom proteklom od transplantacije uključeni u studiju preseka, nije bilo moguće pratiti inflamatorni status.

Balans između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina je esencijalan za uspeh, odnosno neuspeh transplantacije bubrega [7]. Upravo u cilju procene ovog balansa, IL-10 se često izučava zajedno sa IL-6, pri čemu simultano izučavanje podržava i činjenica da oba koriste JAK-STAT put za prenos signala. *Eskandari i saradnici* [203] su razvili poligeniski skor rizika koji je uključivao polimorfizme zamene jednog nukleotida u genu za IL-6, IL-6R, IL-10 i IL-10R. Glavni nalaz ove studije je da poligeniski skor rizika predstavlja jednu od glavnih determinanti kasnog gubitka grafta [203]. U prilog međuzavisnosti između IL-6 i IL-10 idu i rezultati *Alves i saradnika* [7] koji podržavaju ulogu IL-10 u imunološkoj toleranciji. Naime, nivoi IL-10 se značajno povećavaju nakon 2. post-transplantacione godine, što se poklapa sa smanjenjem nivoa IL-6, odnosno kontrolom inflamacije. Ova teza je pokazala da pacijenti u dugoročnom post-transplantacionom periodu imaju značajno niže koncentracije IL-10 u plazmu u poređenju sa zdravim kontrolama.

Za razliku od IL-6, nije nađena povezanost između ispitivanih polimorfizama IL-10 -1082G/A i -819C/T i funkcije grafta u svim vremenskim tačkama praćenja transplantiranih pacijenata. Slično tome, *Breulmann i saradnici* [207] nisu uočili razliku u serumskom kreatininu i klirensu kreatinina ni u jednoj vremenskoj tački (godine nakon transplantacije) tokom perioda praćenja od  $4,9 \pm 2,0$  godine između pacijenata nosioca -1082GG genotipa i nosioca -1082A alela. U ovom istraživanju nije pokazana povezanost polimorfizama u genu za IL-10 i nepovoljnih ishoda u dugoročnom periodu nakon transplantacije unutar tri i pet godina, što je u skladu sa rezultatima *Breulmann i saradnika* tokom praćenja od  $4,9 \pm 2,0$  godine [207] i *Asderakis i saradnika* unutar 5 godina [216]. *Xiong i saradnici* su u meta

analizi zaključili da ne postoji povezanost između ovih polimorfizama i akutnog i/ili hroničnog odbacivanja grafta [116]. Sa druge strane, ispitivanjem uzoraka biopsije između 6. i 12. meseca nakon transplantacije bubrega, *Khan i saradnici* [113] su predočili da pacijenti sa genotipovima IL-10 -819C/T i -592C/A polimorfizama, koji su povezani sa niskom ekspresijom IL-10 (-819TT i -592AA), imaju veću verovatnoću da imaju visoke skorove IF/TA i intersticijalne inflamacije. Smatra se da histološki skorovi predstavljaju prediktivne markere nepovoljnih post-transplantacionih ishoda, pri čemu je indikativna njihova povezanost sa hroničnim propadanjem i disfunkcijom grafta. Dodatno, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da se -819C/T i -592C/A nalaze u kompletnoj neravnoteži veze, odnosno da svakom C alelu -819C/T polimorfizma kod pojedinačnog pacijenta odgovara C alel drugog ispitivanog polimorfizma. U ovom istraživanju, učestalost IL-10 genotipova kod pacijenata bila je sledeća - za -1082G/A: -1082GG 16%, -1082GA 47%, -1082AA 37%; za -819C/T -819CC 46%, -819CT 46%, -819TT 8%). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim studijama o učestalosti ovih genotipova kod transplantiranih bubrežnih pacijenata [113, 121].

Kada se razmatra IL-10 -1082G/A genski polimorfizam, pojedini autori su isticali da G alel predstavlja primarnu genetičku determinantu koja utiče na regulaciju konstitutivnog nivoa IL-10 iRNK. Rezultati ovog istraživanja su demonstrirali da IL-10 -1082G/A genski polimorfizam može ispoljiti uticaj na režim doziranja i/ili izloženost Tak. Naime, nosioci -1082GG genotipa su imali manje Tak dnevne doze u 6., 36., 48. i 60. mesecu nakon transplantacije i imali više Tak C<sub>0</sub>/D u 36. i 60. post-transplantacionom mesecu u poređenju sa nosiocima -1082A alela. Srodno tome, *Khaleel i saradnici* [121] su pronašli da su muškarci primaoci bubrega koji su nosili najmanje jedan -1082A alel imali značajno niže Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti od muškaraca nosilaca -1082GG genotipa tokom prvog meseca nakon transplantacije bubrega. Nasuprot tome, *Li i saradnici* [122] su pokazali da su nosioci IL-10 -1082AA genotipa imali značajno više vrednosti Tak C<sub>0</sub>/D u prve 3 nedelje nakon transplantacije jetre. Sa druge strane, deo istraživača nije utvrdio uticaj -1082G/A polimorfizma na Tak C<sub>0</sub>/D vrednosti, dok su ukazali na povezanost IL-10 -819C/T i -592C/A polimorfizama i izloženosti Tak [16, 123]. Ova teza je pokazala minorni uticaj -819C/T polimorfizma na dozni režim i/ili izloženost Tak, odnosno jedine zapažene statistički značajne razlike su bile primena manje doze u 6. mesecu i veće Tak C<sub>0</sub> u 60. mesecu kod nosilaca -819CC genotipa u odnosu na nosioce -819T alela. Međutim, ima studija koje govore u prilog ove povezanosti u ranom i stabilnom post-transplantacionom periodu [123, 217]. Dodatno, postoje studije koje nisu pokazale razlike u Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima među

različitim genotipovima IL-10 -1082G/A, -819C/T i -592C/A polimorfizama [11, 120]. Međutim, mora se ukazati na činjenicu da je većina sprovedenih studija posmatrala rani post-transplantacioni period, gde faktori poput procesa zarastanja, inflamacije i promena u fiziološkom statusu pacijenta mogu značajno uticati na metabolizam lekova, dok je ovo istraživanje stavilo akcenat na stabilni, kasni post-transplantacioni period. Osim toga, ova teza ukazuje na potencijalnu potrebu za udruženom procenom uticaja polimorfizama različitih IL na farmakokinetičke parametre Tak, jer je nađeno da su IL-10 -1082G/A, IL-6 -174G/C i IL-18 -137G/C nezavisni prediktori Tak  $C_0/D$  vrednosti u dugoročnom post-transplantacionom periodu (6-60 meseci). U radu koji je proistekao iz istraživanja ove doktorske disertacije, pokazano je da su brzi Tak metabolizeri ( $C_0/D < 1,05$  ng/ml/mg) koji su istovremeno bili nosioci IL-6 -174GG genotipa i IL-10 -1082A alela imali najniže predviđene vrednosti Tak  $C_0/D$  vrednosti, nezavisno od post-transplantacionog perioda [218].

Kako je prethodno ukazano, pored IL-6 -174G/C i IL-10 -1082G/A genskog polimorfizma, pokazan je nezavisan uticaj polimorfizma -137G/C u genu za IL-18 na Tak  $C_0/D$  vrednosti od 6-60 post-transplantacionog meseca. Prvobitno su rezultati teze ukazali na razliku u Tak  $C_0$  u 6. mesecu i Tak  $C_0/D$  u 24. post-transplantacionom mesecu između nosioca IL-18 -137G alela i -137CC genotipa, što je bio osnov za uključivanje u univarijantnu regresionu analizu. Nasuprot tome, *Li i saradnici* [14] nisu demonstrirali razlike u IL-18 nivoima, niti u farmakokinetičkim parametrima Tak, poređenjem različitih genotipova IL-18 -137G/C i -607A/C polimorfizama. Sa druge strane, pokazali su da nivoi IL-18 koreliraju sa Tak  $C_0/D$  vrednostima kod pacijenata sa transplantiranom jetrom, odnosno da pacijenti sa nižim IL-18 nivoima imaju više Tak  $C_0/D$  vrednosti u odnosu na grupe pacijenata sa srednjim i višim IL-18 nivoima [14]. U ovom istraživanju, nivoi IL-18 se nisu razlikovali između brzih, intermedijarnih i sporih metabolizera, niti u odnosu na pripadnost Tak IPV grupi sa nižim, odnosno višim IPV vrednostima. Dodatno, nije utvrđena razlika u IL-18 nivoima između pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika.

Ovo istraživanje je pokazalo minoran uticaj drugog ispitivanog polimorfizma u genu za IL-18 -607A/C na dozni režim Tak, odnosno jedina zapažena statistički značajna razlika bila je primena manje doze u 12. mesecu kod nosioca -607A alela u odnosu na nosioce -607CC genotipa. Suprotno tome, druge studije su ukazale na značajne razlike u Tak  $C_0/D$  u odnosu na IL-18 -607A/C genotip, gde je -607CC genotip doveden u vezu sa višim Tak  $C_0/D$  vrednostima, odnosno -607A alel sa brzim metabolizmom Tak u prvom mesecu nakon transplantacije. Dodatno, kada su istraživači ukrstili IL-18 -607A/C genotip sa CYP3A5

6986A/G genotipom, uočena je još upadljivija razlika u Tak C<sub>0</sub>/D vrednostima među različitim IL-18 -607A/C genotipovima, ali samo kod CYP3A5 ekspresora [11, 13].

Ispitivanjem uticaja polimorfizama u genu za IL-18 nije nađena razlika niti u funkciji grafta, niti u vremenu do javljanja neželjenog ishoda u dugoročnom periodu među nosiocima različitih -607A/C i -137G/C genotipova. *do Nascimento i saradnici* [8] takođe nisu pronašli vezu između pomenutih polimorfizama i funkcije grafta, ali u ranom post-transplantacionom periodu (do 6. meseca). Međutim, ova grupa naučnika je istakla značajno veću zastupljenost haplotipa -137G/-607C (aleli udruženi sa većom produkcijom IL-18) kod transplantiranih bubrežnih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu zdravih [8], dok je u ovoj tezi učestalost genotipova i alela kod transplantiranih bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika bila uporediva, ukazujući da nijedan od ispitivanih polimorfizama ne korelira sa patološkim stanjem pacijenata koje je dovelo do transplantacije bubrega. *Mittal i saradnici* [125] su ukazali da je haplotip -137G/-607A bio povezan s povećanim rizikom odbacivanja grafta u poređenju sa haplotipom -137G/-607C. Druge studijske grupe su pronašle marginalnu povezanost -137C alela sa lošijim dugoročnim preživljavanjem grafta [128], i veći rizik za hronično odbacivanje grafta kod nosioca IL-18 -607AA genotipa u poređenju sa -607CC genotipom [9].

U ovom istraživanju, učestalost IL-18 genotipova kod pacijenata bila je sledeća - za -607A/C: -607AA 24%, -607AC 51%, -607CC 25%; za -137G/C: -137GG 5%, -137GC 48%, -137CC 47%). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima 1000Genome projekta [219].

Proinflamatorni medijatori, poput citokina, hemokina, leukotriena i prostaglandina, imaju ključnu ulogu u regulisanju sinteze proteina akutne faze. Ove sistemske promene, poznate kao odgovori akutne faze, mogu se manifestovati u akutnim i hroničnim inflamatornim stanjima. Tokom akutne epizode u okviru hronične inflamacije, fenokonverzija može dovesti do prelaska na manje efikasan metabolički fenotip. Suprotno tome, rezolucija hronične inflamacije može doprineti vraćanju fenotipa na njegov fiziološki status. Kao rezultat, inflamatorni procesi mogu uticati ne samo na interindividualnu, već i na intraindividualnu varijabilnost u odgovoru na lekove. Međutim, postoje ograničenja u sposobnosti predviđanja metaboličkih kapaciteta i prilagođavanja terapije na osnovu farmakogenetičkih informacija. Različiti faktori mogu otežati ovaj proces, uključujući istovremenu primenu lekova koji modifikuju aktivnost enzima i transportera zaduženih za metabolizam lekova, što može dovesti do fenokonverzije [220, 221, 222]. Jedna od limitacija ove teze je bila nemogućnost praćenja inflamatornog statusa pacijenata, pošto su pacijenti sa različitim periodom proteklom od transplantacije bili uključeni u studiju preseka. Sa druge

strane, ovo istraživanje je stavilo u fokus kasni post-transplantacioni period, jer pacijent dostiže stabilnije stanje u odnosu na rani period, a analiza dugoročnih efekata genskih varijacija na nivo Tak postaje ključna.

### 6.3 Funkcija grafta

Određivanje serumskog kreatinina i proteinurije predstavljaju standardne neinvazivne biomarkere za procenu funkcije grafta. Dodatno, autori su istraživali potencijalni benefit cistatina C kao alternativnog markera bubrežne funkcije. Naime, sve ćelije sa jedrom proizvode cistatin i njegova je produkcija stabilnija u odnosu na kreatinin, zbog čega može predstavljati rani marker disfunkcije grafta. Međutim, cena određivanja cistatina C u serumu je značajno viša nego određivanje serumskog kreatinina [223]. Pored toga, pretpostavljena veća dijagnostička tačnost cistatina C u proceni GFR u odnosu na serumski kreatinin [224] i klirens kreatinina je upitna [225]. Takođe, cistatin C je podložniji je intraindividualnim varijacijama, te se smatra da je serumski kreatinin, i pored svojih nedostataka, stabilniji parametar za praćenje bubrežne funkcije [225]. U ovoj tezi nije nađena razlika u nivoima cistatina C između pacijenata i zdravih kontrola. Upoređivanjem koncentracija cistatina C između različitih grupa Tak metabolizera, pokazana je razlika u koncentraciji cistatina C u plazmi između brzih i intermedijarnih metabolizera. Nasuprot nalazima ove teze, *Gökkuşu i saradnici* [226] su našli statistički značajnu razliku u serumskim nivoima cistatina C, odnosno nivoi su bili povišeni kod pacijenata pred hemodijalizu, na hemodijalizi, na peritonealnoj dijalizi i sa transplantacijom bubrega u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Ali, kod pacijenata sa transplantacijom bubrega, nivo cistatina C je bio niži u poređenju sa ostalim grupama (sem kontrolne). Slično tome, *Uzun i saradnici* [227] su demonstrirali razliku u serumskim nivoima cistatina C između pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom i zdravih dobrovoljaca. Međutim, mora se uzeti u obzir činjenica da je koncentracija cistatina C u plazmi u ovoj tezi određena u različitom post-transplantacionom periodu za pacijente uključene u studiju preseka. Takođe, uključeni pacijenti su imali stabilnu funkciju grafta, čemu se potencijalno može pripisati nedostizanje statističke značajne razlike u nivoima cistatina C poređenjem pacijenata sa transplantiranim bubegom i zdravih ispitanika.

#### **6.4 Povezanost funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega i parametara farmakokinetičke varijabilnosti takrolimusa sa relativnom ekspresijom miRNK u urinu**

Iako je ostvaren značajan napredak u unapređenju ranih post-transplantacionih ishoda, ovaj pomak nije proporcionalno reflektovan u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Brojni oblici oštećenja bubrežnog grafta, uključujući ishemijsko/reperfuziono oštećenje, kasno akutno odbacivanje, nefrotoksičnost izazvanu lekovima, hroničnu disfunkciju alografta i infekciju BK virusom, i dalje predstavljaju ključne faktore koji nepovoljno utiču na dugoročno preživljavanje grafta. S obzirom na to da trenutno ne postoje odobreni biomarkeri u krvi ili urinu za pouzdano otkrivanje oštećenja grafta, biopsija ostaje zlatni standard u dijagnostici ovih stanja [145]. MikroRNK pokazuju značajan potencijal u kontekstu povezanosti njihove ekspresije u biološkim tečnostima sa različitim patohistološkim entitetima. Neinvazivna priroda, kao i stabilnost u biološkim tečnostima, predstavljaju važne prednosti u kontekstu njihove kliničke primene. Međutim, šira upotreba miRNK u rutinskoj kliničkoj praksi ograničena je odsustvom standardizovanih metoda normalizacije, kao i uticajem brojnih bioloških i spoljašnjih faktora, pri čemu ne postoje obimni i validirani klinički podaci [228], na osnovu kojih bi se izveli zaključci i smernice. MikroRNK iz urina mogu poticati iz ćelija renalnog porekla ili iz imunoloških ćelija koje su penetrirale i infiltrirale se u bubrežno tkivo, a zatim dospale u urin [229]. Dodatno, miRNK iz urina mogu ukazati na lokalne promene unutar transplantiranog bubrega. Pored toga, rastući broj studija pokušava da uspostavi vezu konkretne(ih) miRNK sa specifičnim post-transplantacionim ishodima, poput: akutnog odbacivanja, hronične disfunkcije grafta, IF/TA, TCMR, ABMR, što pruža mogućnost diferencijalne dijagnoze bez potrebe za histološkom analizom [145].

Rezultati ove disertacije ukazuju na značajnu povišenu ekspresiju miR-142-3p i sniženu ekspresiju miR-204-5p u sedimentu urina kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u poređenju sa zdravim kontrolama. Ovakav rezultat nije uočen za miR-21-5p (ova miRNK je bila ushodno ekspimirana, ali bez statističke značajnosti) niti za miR-155-5p. Istraživanje *Zununi Vahed i saradnika* [230] pokazalo je povišene nivoe miR-21-5p i miR-142-3p u urinu pacijenata sa IF/TA u poređenju sa zdravim kontrolama. Međutim, poređenjem ekspresije ovih miRNK kod pacijenata sa stabilnom funkcijom grafta i zdravih dobrovoljaca nisu uočene značajne razlike. U ovom istraživanju nije vršena selekcija ispitanika na osnovu prisustva IF/TA promena. Međutim, medijana eGFR je iznosila 51

mL/min/1,73m<sup>2</sup> (interkvartilna razlika: 37,47–62,60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>), dok je u studiji *Zununi Vahed i saradnika* [230] medijana eGFR za pacijente sa stabilnom funkcijom grafta iznosila 63 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (od 41 do 114 mL/min/1,73m<sup>2</sup>), a za IF/TA pacijente 18,2 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (od 7 do 40 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da većina, ako ne i svi pacijenti uključeni u ovaj deo disertacije, odgovaraju pacijentima sa stabilnom funkcijom grafta. *Maluf i saradnici* [21] su pokazali povišenu ekspresiju miR-142-3p i sniženu ekspresiju miR-125b, miR-203, miR-204 i miR-211 u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom i prisutnom IF/TA. *Scian i saradnici* [19] su takođe uočili diferencijalnu ekspresiju miR-142-3p, miR-204 i miR-211 u urinu pacijenata sa histološki potvrđenom hroničnom disfunkcijom grafta i okarakterisanim prisustvom IF/TA, u poređenju sa pacijentima sa normalnim histološkim nalazima i očuvanom funkcijom grafta.

Razmatrajući cirkulišuće miRNK (određene u plazmi ili serumu), *Zununi Vahed i saradnici* [22] su pokazali povišenu ekspresiju miR-21-5p, miR-142-3p i miR-155-5p kod pacijenata sa IF/TA u poređenju sa zdravim kontrolama. Međutim, statistička značajnost se gubi poređenjem pacijenata sa stabilnom funkcijom grafta i zdravih dobrovoljaca.

MiR-21-5p ima ključnu ulogu u različitim ćelijskim funkcijama, uključujući regulaciju ćelijske deobe i otpornost na apoptozu [231]. Ova miRNK je visoko ekspimirana u vaskularnim ćelijama, kao što su glatke mišićne ćelije, endotelne ćelije, miokardne ćelije i miofibroblasti [232]. Smatra se da miR-21-5p doprinosi ranim fazama ateroskleroze stabilizacijom novonastalih plakova putem svog profibrotičnog delovanja [233]. Ipak, u kasnijim fazama, miR-21 može pospešiti aterogenezu kroz svoje proinflamatorne efekte i ulogu u formiranju neo-intimalnih lezija [152]. Naime, ekspresija miR-21-5p pokazuje deregulaciju u okviru različitih kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja. Većina miRNK pokazuje sniženu ekspresiju u plazmi pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (HBI), dok je miR-21-5p jedna od retkih izuzetaka [234, 235]. Mehanizam koji stoji iza ovog fenomena još uvek nije u potpunosti razjašnjen, s obzirom na to da su studije pokazale urednu ekspresiju i funkciju enzima *DROSHA* i *DICER*, koji su uključeni u biogenezu miRNK. Podaci o ubrzanoj degradaciji miRNK kod ovih pacijenata su kontradiktorni, iako novija istraživanja odbacuju hipotezu o ubrzanoj razgradnji miRNK u plazmi pacijenata sa HBI. U slučaju pacijenata sa transplantiranim bubregom, uloga miR-21-5p u regulatornim procesima postaje još složenija usled uključivanja imunološkog sistema [235]. Kao što je već rečeno, povišena ekspresija miR-21-5p zabeležena je u plazmi [22, 236], tako i u urinu [150, 151] pacijenata sa hroničnom disfunkcijom grafta, pri čemu je relativna ekspresija ove miRNK bila značajno povišena u grupi pacijenata sa IF/TA stadijumom II + III u poređenju sa

grupom IF/TA 0 + I. Takođe, pokazana je značajna korelacija sa serumskom koncentracijom kreatinina i eGFR [151]. Poznato je da miR-21-5p promoviše fibrozu i inflamaciju [152], kroz svoju ulogu u regulaciji ekspresije gena TGF- $\beta$  [237]. Naime, miR-21-5p ima ključnu ulogu u patogenezi fibroze negativnom regulacijom *Smad7*. *Smad7* je direktna meta miR-21-5p, pri čemu je pokazano na modelu pacova da prekomerna ekspresija miR-21-5p može da inhibira proliferaciju tubularnih epitelnih ćelija bubrega [238]. Prethodna istraživanja pokazala su da otprilike 50% miofibroblasta zapaženih u biopsijama bubrežnog grafta sa hroničnim aktivnim odbacivanjem potiču od makrofaga iz koštane srži [239, 240]. Zbog toga je uočeno da uključivanje makrofaga i njihova tranzicija u miofibroblaste (MMT, engl. *macrophage-to-myofibroblast transition*) igra značajnu ulogu u mehanizmu fibroziranja grafta. *Zhong i saradnici* [239] su sugerisali da miR-20a/miR-21-TGF- $\beta$  osa može usmeriti makrofage ka M2-fenotipu, pospešiti proces MMT i pojačati ekspresiju TGF- $\beta$ . Takođe su ukazali da TGF- $\beta$  može dodatno stimulirati makrofage da proizvode miR-20a-5p i miR-21-5p, čime se pojačava TGF- $\beta$ /Smad signalni put i podstiče proces MMT [239]. Ipak, u studiji *Chen i saradnika* [241], gde je uključeno 40 pacijenata sa transplantiranim bubregom i kasnim preživljavanjem grafta dužim od 10 godina, zabeleženo je da je ekspresija miR-21-5p bila snižena u grupi pacijenata sa hroničnom disfunkcijom grafta u poređenju sa kontrolnim grupama. Takođe, *Saejong i saradnici* [242] su zabeležili da je visoka ekspresija miR-21-5p zabeležena u egzozomima, ali ne i u celjoj plazmi, kod pacijenata sa IF/TA stadijumom II i III, u poređenju sa pacijentima koji su imali stadijum I. *Vandenbussche i saradnici* [243] su lečili CD-1 miševе primenom Tak, što je rezultiralo bubrežnim oštećenjem udruženim sa ekspresijom gena uključenih u ćelijski stres, fibrozu i inflamaciju. Takrolimus je, takođe, uticao na ekspresiju bubrežnih miRNK, uključujući i tzv. “*fibromirs*”, poput miR-21-5p, koje su uključene u procese fibroze i inflamacije. Ova studija sugerise da miR-21-5p može imati ulogu u Tak-indukovanoj nefrotoksičnosti.

*Lazarou i saradnici* [244] su sugerisali da pored miR-21-5p, više drugih miRNK, poput: miR-200b, miR-150, miR-192, miR-423-3p, miR-145-5p, miR-148a, miR-142-3p, miR-204 i miR-211, mogu biti povezane sa različitim aspektima hroničnog odbacivanja grafta, uključujući IF/TA i hroničnu disfunkciju grafta. Povišena ekspresija miR-142-3p je prvi put zabeležena u biopsijama pacijenata sa TCMR [245]. Prekomerna ekspresija miR-142-3p takođe je dokumentovana kod pacijenata sa IF/TA, pri čemu je primećena značajna korelacija između nivoa ove miRNK u biopsijama i uzorcima urina [19]. Potencijalna primena miR-142-3p, kao biomarkera hroničnog odbacivanja, potvrđena je u nekoliko nezavisnih kohorti [20, 21, 246]. Pored toga, identifikovana je u studijama koje su istraživale

akutno odbacivanje [158, 247, 248]. Naime, ova miRNK je opisana kao „glavni regulator hematopoeze” zbog svoje visoke ekspresije u hematopoetskim ćelijama, uključujući različite subpopulacije imunoloških ćelija kao što su T-limfociti, B-limfociti, makrofagi i dendritične ćelije [249]. Delimično deluje tako što cilja adenilat ciklazu 9, čime smanjuje nivo cikličnog adenozin-monofosfata (cAMP), inhibirajući supresorske funkcije Treg [250, 251]. Ovaj mehanizam doprinosi hroničnoj subkliničkoj inflamaciji i imunološkoj aktivaciji blagog stepena u graftu [23]. Pored toga, pokazano je da visoka ekspresija transkripcionog faktora FOXP3, povezanog sa Treg, negativno reguliše ekspresiju miR-142-3p [19]. Postoji sve veći broj dokaza koji ukazuju na to da miR-142-3p može da modulira TGF- $\beta$  signalni put. *Danger i saradnici* [252] su opisali negativnu povratnu spregu u kojoj prekomerna ekspresija miR-142-3p dovodi do smanjene ekspresije receptora 1 za TGF- $\beta$ . Na osnovu ovoga, može se pretpostaviti da inhibicija miR-142-3p može osloboditi TGF- $\beta$ /Smad signalni put iz stanja inhibicije, čime se potencira proliferacija, migracija, invazija fibroblasta i razvoj fibroze [253]. S obzirom na to da se TGF- $\beta$  signalni put opisuje kao glavni regulator fibroze [254], a da je fibroza jedno od osnovnih patohistoloških obeležja IF/TA, povišena ekspresija miR-142-3p može predstavljati deo povratnog mehanizma koji ima za cilj da ublaži nekontrolisani razvoj fibroze. Ova hipoteza je u skladu sa nalazima povišenih nivoa miR-142-3p u biopsijama, a što je još značajnije, i u urinu pacijenata sa IF/TA [230]. Takođe, može se pretpostaviti da kontinuirana imunološka aktivacija blagog stepena u graftu uspostavlja „začarani krug” perzistentne inflamacije, koja dovodi do oštećenja grafta, nakon čega sledi nepotpuna rezolucija kroz reparaciju tkiva. Na duže staze, ponavljanje ovog ciklusa pogoduje progresivnoj akumulaciji fibroznog tkiva u graftu, što na kraju vodi ka disfunkciji i odbacivanju grafta. Kako je miR-142-3p važan regulator imunološkog odgovora, njegova povišena ekspresija može imati aktivnu ulogu ne samo u ranim fazama oštećenja grafta, već i potencijalnu dijagnostičku vrednost, kako u ranoj fazi inflamacije/imunološke aktivacije, tako i u kasnijoj fazi hroničnog odbacivanja.

Abnormalna ekspresija miR-155-5p povezana je sa različitim bubrežnim oboljenjima, uključujući karcinom, terminalni stadijum bubrežne bolesti i odbacivanje transplantiranog bubrega. *In vitro* studije ukazuju da miR-155-5p indukovana hipoksijom, podstiče fibrozu u bubrežnim ćelijama, iako tačni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni [156]. *Zhang i saradnici* [156] su predložili da miR-155-5p/SOCS/STAT3 osa igra značajnu ulogu u patogenezi bubrežne fibroze. *Zununi Vahed i saradnici* [22] pokazali su da je miR-155-5p značajno povišen u plazmi primalaca sa IF/TA u poređenju sa pacijentima sa stabilnom funkcijom grafta i zdravim kontrolama. Međutim, ova miRNK je pretežno povezana sa

akutnim odbacivanjem grafta i smatra se njegovim potencijalnim prognostičkim faktorom. Prekomerna ekspresija miR-155-5p zabeležena je u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, pri čemu je odbacivanje grafta potvrđeno biopsijom [255]. Studija *Liang i saradnika* [256] istraživala je ulogu miR-155-5p kao biomarkera disfunkcije grafta, kombinujući meta-analizu kliničkih podataka i eksperimentalnu validaciju na modelu transplantacije bubrega kod pacova. Koncentracija miR-155-5p u plazmi pacova 7. i 9. dana nakon transplantacije korelirala je sa pojavom akutnog odbacivanja grafta, što je sugerisalo da miR-155 može služiti kao marker za procenu statusa grafta [256]. Studija iz 2017. godine sprovedena na 80 transplantiranih pacijenata pokazala je razliku u ekspresiji miR-155-5p u urinu između pacijenata sa akutnim odbacivanjem grafta i pacijenata sa stabilnom funkcijom grafta [158]. Pored toga, druga studija iz 2021. godine pokazala je da su pacijenti sa biopsijski potvrđenim odbacivanjem grafta imali približno 5,7 puta veći nivo miR-155-5p u poređenju sa onima bez znakova odbacivanja. U multivarijantnom modelu, ekspresija miR-155-5p zajedno sa drugim biomarkerima pokazala je visoku dijagnostičku pouzdanost (AUC = 0,94, osetljivost 89,1%, specifičnost 75,6%) [257]. Ipak, ovi rezultati nisu uporedivi sa nalazima ove disertacije, s obzirom na to da su uključeni pacijenti bili u dugoročnom post-transplantacionom periodu, u proseku devet godina nakon transplantacije bubrega. *Nagy i saradnici* [258] pokazali su da plazmatski nivoi miR-155, miR-21 i miR-223 mogu ukazivati na razvoj ABMR nakon transplantacije bubrega, u korelaciji sa klasičnim kliničkim parametrima. Pritom je miR-155 pokazao najveću osetljivost (90%) i specifičnost (81%) za detekciju ABMR [258]. Kao što je ranije pomenuto, ekspresija miR-204-5p u urinu se pokazala sniženom u većini studija koje su poredile pacijente sa IF/TA i one sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega [19, 21]. Razmatrajući miR-204-5p, između ostalih miRNK, pretpostavlja se da njena inhibicija dovodi do povećanog nivoa apoptoze, što je pokazano na *HeLa* ćelijama. Shodno tome, *Cheng i saradnici* [259] su zaključili da miRNK mogu biti posrednici u regulaciji apoptoze. Pored toga, *Scian i saradnici* [19] su se složili sa ovom tvrdnjom koja se odnosi na vezu između miR-204-5p i apoptoze. *Nog i saradnici* [159] su identifikovali 29 značajno izmenjenih miRNK (*fold change*  $\geq 2$  puta), od kojih je 8 bilo sa povišenom ekspresijom, a 21 sa sniženom ekspresijom, uključujući i miR-204-5p, u grupi pacijenata sa nefropatijom izazvanom BK virusom u poređenju sa kontrolnom grupom. Nefropatija izazvana BK virusom je usko povezana sa disfunkcijom i gubitkom transplantata. *Su i saradnici* [260] su pokazali da CsA izaziva sniženje miR-204 u makrofagima na životinjskim modelima. Autori su takođe sugerisali da inhibicija NFAT doprinosi efektima CsA na nivoe pre-miR-204. MiR-

204 u makrofagima može ublažiti aterosklerozu izazvanu CsA inhibicijom formiranja penastih ćelija. Ova miRNK je takođe snižena kod HBI, uključujući pacijente sa hipertenzijom, hipertenzivnom nefrosklerozom ili dijabetesnom nefropatijom [261]. Primaoci bubrežnih transplantata se smatraju osobama sa HBI, čak i neposredno nakon operacije [262].

Značajna farmakokinetička varijabilnost Tak, odnosno visok IPV i/ili nizak  $C_0/D$ , povezana je sa nepovoljnim dugoročnim post-transplantacionim ishodima [72, 91, 181]. Oba navedena parametra su prethodno dovedena u vezu sa IF/TA [91, 192]. Prema *Kuypersu*, pacijenti sa visokim Tak IPV i višim Tak  $C_0$  podložniji su razvoju neinflamatornih oštećenja putem aktivacije profibrotskih puteva, smanjenog protoka krvi kroz graft i ishemije (npr. IF/TA) [91]. Značajna varijabilnost u Tak  $C_0$  zahteva redovno sprovođenje TDM i prilagođavanje doze kako bi se održao  $C_0$  unutar ciljanog terapijskog opsega. Shodno tome, Tak  $C_0/D$  odnos može predstavljati pouzdaniji parametar za poređenje izloženosti Tak među pacijentima. Prethodno je pokazano da pacijenti kojima su potrebne veće doze Tak (odgovara nižoj vrednosti  $C_0/D$ ) mogu imati znatno više maksimalne koncentracije leka zbog ranog prekomernog imunosupresivnog delovanja i ukupne izloženosti leku, u poređenju sa onima koji postižu slične Tak  $C_0$  uz niže doze leka. Iako naizgled kontradiktorno, niske vrednosti Tak  $C_0/D$  Tak mogu dovesti do hronične nefrotoksičnosti, kao i do odbacivanja grafta usled nedovoljne imunosupresije [179, 181]. Ipak, ne postoje dokazi o povezanosti izloženosti Tak ili njegove farmakokinetičke varijabilnosti sa ekspresijom miRNK.

Rezultati ove studije ukazuju da je relativna ekspresija miR-204-5p u urinu povezana sa Tak  $C_0/D$  u 3. mesecu nakon transplantacije, koji se smatra pokazateljem brzine metabolizma Tak. U tom kontekstu, pacijenti sa brzim i intermedijarnim metabolizmom (niže Tak  $C_0/D$ ) pokazali su značajno sniženje ekspresije miR-204-5p u poređenju sa grupom pacijenata koju karakteriše spori metabolizam (više Tak  $C_0/D$ ). Ovaj rezultat je potvrđen i u regresionoj analizi. S druge strane, primećena je povezanost između Tak IPV i miR-21-5p, odnosno miR-142-3p, pri čemu su niže vrednosti Tak IPV bile povezane sa višom relativnom ekspresijom obe miRNK u urinu. Međutim, regresiona analiza je potvrdila značajnu povezanost samo za miR-142-3p. *Gu i saradnici* [263] su sugerisali da miR-29a-3p, miR-99a-5p, miR-532-5p i miR-26-5p mogu da inhibiraju metabolizam Tak koji se odvija posredstvom CYP3A5 enzima. Ipak, navedene miRNK nisu bile uključene u panel korišćen u ovoj studiji, jer je fokus bio na miRNK koje su prethodno bile povezane sa IF/TA i dugoročnim ishodima. *Freitas i saradnici* [264] su ispitivali vezu između relativne ekspresije miR-155-5p i doze Tak,  $C_0/D$  i funkcije grafta kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Rezultati su pokazali negativnu korelaciju između ekspresije miR-155-5p u urinu, tačnije

egozomima, i doze Tak, dok nije pronađena veza sa  $C_0/D$ . Autori su pretpostavili da prekomerna ekspresija miR-155-5p negativno reguliše gene uključene u proliferaciju i diferencijaciju ćelija, što odražava uticaj imunosupresivne terapije na ćelijski odgovor i može objasniti negativnu korelaciju između miR-155-5p ekspresije i doze Tak [264]. U studiji *Millán i saradnika* [158], pacijenti sa nižim Tak AUC vrednostima ( $<100 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ ) imali su višu ekspresiju miR-155-5p u urinu i veću učestalost akutnog odbacivanja, dok su AUC vrednosti iznad  $180 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$  bile povezane sa nižim nivoima miR-155 i smanjenim rizikom od odbacivanja. U ovom kontekstu je takođe razmatrana MFK AUC vrednost. U studiji *Quintairos i saradnika* [265] istražena je povezanost između izloženosti Tak i ekspresije miR-155-5p u urinu sa pojavom akutnog odbacivanja korišćenjem logističke regresije u kombinaciji sa populacionim farmakokinetičkim pristupom. Rezultati su pokazali da ekspresija miR-155-5p, a ne Tak ili MFK izloženost, može poslužiti kao prediktor akutnog odbacivanja. Treba napomenuti da je ova studija obuhvatila rani post-transplantacioni period [265].

MiR-204-5p je jedina od ispitivanih miRNK koja je pokazala značajnu povezanost sa eGFR vrednostima u dugoročnom periodu. Pacijenti sa nižim vrednostima eGFR ( $<45 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ) imali su značajno nižu ekspresiju vrednosti miR-204-5p u urinu u poređenju sa pacijentima sa višim eGFR vrednostima. Ovo je očekivan rezultat u kontekstu uloge miR-204-5p u bubregu, kako je ranije opisano u ovoj disertaciji. U radu *Zunnuni Vahed i saradnika* [22] pokazana je pozitivna korelacija između eGFR i cirkulišuće miR-21-5p  $\Delta\text{Ct}$  vrednosti, ali ne i sa miR-142-3p i miR-155-5p. Dodatno, pacijenti uključeni u ovu studiju imali su sličan post-transplantacioni period kao pacijenti uključeni u ovu doktorsku disertaciju. Razmatrajući miR-155-5p, nalazi ove studije su u skladu sa rezultatima *Borštnar i saradnika* [266], koji su pokazali da ekspresija miR-155-5p nije zavisna od eGFR. Pored toga, sprovedena je multivarijantna regresiona analiza u ovoj tezi koja je ukazala na povezanost između miR-204-5p i Tak metaboličkog fenotipa i funkcije grafta u 12. mesecu nakon transplantacije bubega. Pozitivna korelacija između relativne ekspresije miR-204-5p i metaboličkog fenotipa, kao i funkcije bubrega je očekivana i potvrđena. Međutim, negativna povezanost između miR-142-3p i Tak IPV nije bila očekivana. S obzirom da visoke vrednosti Tak IPV u odgovarajućem kontekstu mogu biti udružene sa fibrozom [91], potencijalno objašnjenje ovog rezultata ogleđa se u konstantnoj aktivaciji profibrotičkih puteva, poput TGF- $\beta$ , a koji mogu stvoriti negativnu povratnu spregu koja potiskuje miR-142-3p.

Na kraju, treba spomenuti i limitacije ove doktorske disertacije. Najpre mali broj uključenih ispitanika i sprovođenje istraživanja u jednom centru što može ograničiti

generalizaciju rezultata. Međutim, upravo fokus na jedan centar omogućava detaljno praćenje, kao činjenicu da je kod svih pacijenata primenjen isti imunosupresivni protokol. Dodatno, DSA i inflamatorni status nisu bili određeni. Ipak, u studiju preseka su uključeni pacijenti niskog imunološkog rizika, koji nisu imali akutno odbacivanje, kao i sa različitim periodom proteklom od transplantacije, te nije bilo pogodno pratiti promene u DSA i inflamatornom statusu. Takođe, drugi polimorfizmi povezani sa farmakokinetikom Tak nisu analizirani, niti su bili dostupni podaci o genotipu donora. Ova studija nije imala podatke o adherenci pacijenata prema propisanoj terapiji, što bi dodatno učvrstilo razumevanje izvora visokih IPV vrednosti. Takođe, biopsije nisu rutinski sprovedene, već samo u slučajevima medicinskih indikacija. Na kraju, izbor miRNK panela mogao je biti proširen, uključivanjem dodatnih miRNK koje bi pružile sveobuhvatniji uvid u regulaciju fibrotskih procesa, međutim, fokus je stavljen na miRNK sa dostupnim podacima o povezanosti sa IF/TA.

## 7 ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata doktorske disertacije, može se zaključiti sledeće:

1. Pacijenti sa nižim prosečnim vrednostima Tak  $C_0/D$  između 6. i 12. meseca nakon transplantacije bubrega ( $C_0/D \leq 1,50$  ng/mL/mg) imali su značajno niži eGFR u svim vremenskim tačkama praćenja u odnosu na pacijente sa Tak  $C_0/D$  vrednostima većim od 1,50 ng/mL/mg.
2. Funkcija grafta, izražena kao eGFR vrednost, nije se razlikovala između grupa pacijenata sa nižim ( $IPV \leq 24,87\%$ ) i višim ( $IPV > 24,87\%$ ) Tak IPV vrednostima u svim vremenskim tačkama praćenja pacijenata sa transplantiranim bubregom.
3. Nije ustanovljena povezanost između Tak  $C_0/D$  vrednosti, odnosno Tak IPV vrednosti, i pojave nepovoljnih post-transplantacionih ishoda unutar tri i pet godina nakon transplantacije bubrega.
4. Pacijenti sa nižim Tak  $C_0/D$ /višim Tak IPV vrednostima ( $C_0/D \leq 1,50$  ng/mL/mg;  $IPV > 24,87\%$ ) imali su značajno veći rizik za pojavu nepovoljnih ishoda unutar 5 godina nakon transplantacije bubrega u odnosu na ostale kombinovane grupe Tak  $C_0/D$ /Tak IPV.
5. Utvrđena je uporediva učestalost genotipova i alela ispitivanih polimorfizama, -174G/C u genu za IL-6, -1082G/A, -819C/T i -592C/A u genu za IL-10, -607A/C i -137G/C u genu za IL-18 kod pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na zdrave ispitanike. Polimorfizmi IL-10 -819C/T i IL-10 -592C/A su bili u potpunoj neravnoteži veze.
6. Nosioци IL-6 -174GG genotipa su imali značajno veće Tak dnevne doze i niže Tak  $C_0/D$  vrednosti u odnosu na nosioce IL-6 -174C alela u svim posmatranim vremenskim tačkama (osim u 24. mesecu za  $C_0/D$ ), dok su Tak  $C_0$  vrednosti bile uporedive.
7. Nosioци IL-10 -1082GG genotipa su primenjivali značajno manje Tak dnevne doze u 6., 36., 48. i 60. mesecu nakon transplantacije i imali više Tak  $C_0/D$  u 36. i 60. post-transplantacionom mesecu u poređenju sa nosiocima -1082A alela, dok su Tak  $C_0$  vrednosti bile uporedive.

8. Nosioци IL-18 -137G alela su imali značajno nižu Tak  $C_0$  u 6. i višu Tak  $C_0/D$  u 24. post-transplantacionom mesecu u poređenju sa nosiocima -137CC genotipa.
9. Polimorfizmi IL-6 -174G/C, IL-10 -1082G/A i IL-18 -137G/C su ispoljili nezavisan uticaj na Tak  $C_0/D$  vrednosti od 6. do 60. post-transplantacionog meseca, u modelu prilagođenom na period nakon transplantacije i Tak metabolički fenotip određen na osnovu Tak  $C_0/D$  u 3. post-transplantacionom mesecu.
10. Polimorfizam -174G/C u genu za IL-6 može biti značajan prediktor eGFR vrednosti na kraju pete post-transplantacione godine. Dodatno, pokazano je da ispitivani genski polimorfizmi nisu doprineli nepovoljnim post-transplantacionim ishodima u dugoročnom periodu.
11. Pacijenti sa transplantiranim bubregom su imali značajno više koncentracije IL-6 i niže IL-10 koncentracije u plazmi u dugoročnom post-transplantacionom periodu u poređenju sa zdravim ispitanicima, dok nije zapažena razlika u koncentracijama IL-18 i cistatina C u plazmi.
12. Relativna ekspresija miR-142-3p i miR-204-5p u urinu značajno se razlikovala između pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih ispitanika, dok nije bilo razlike u relativnoj ekspresiji miR-21-5p i miR-155-5p među ispitivanim grupama.
13. Relativna ekspresija miR-204-5p u urinu je bila značajno viša kod pacijenata sa boljom funkcijom grafta u dugoročnom post-transplantacionom periodu.
14. Takrolimus IPV i ACR predstavljaju nezavisne prediktore relativne ekspresije miR-142-3p u urinu, a eGFR u 12. post-transplantacionom mesecu i Tak metabolički fenotip nezavisne prediktore relativne ekspresije miR-204-5p u urinu pacijenata u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega.

Doprinos ovog istraživanja se ogleda u potencijalnom pronalasku ranih, neinvazivnih markera koji mogu stratifikovati pacijente prema riziku za smanjenje i gubitak funkcije grafta u dugoročnom periodu nakon transplantacije bubrega. Udružena procena parametara Tak  $C_0/D$  i Tak IPV može omogućiti identifikaciju pacijenata sa većom verovatnoćom javljanja nepovoljnih ishoda u dugoročnom post-transplantacionom periodu. Pored toga, rezultati ukazuju da je potrebno sagledati uticaj polimorfizama -174G/C u genu za IL-6, -1082G/A u

genu za IL-10 i -137G/C u genu za IL-18 u kontekstu njihovog uticaja na Tak C<sub>0</sub>/D. Sprovedeno istraživanje je pokazalo značajnu disregulaciju miR-204-5p u urinu pacijenata sa transplantiranim bubregom u dugoročnom periodu, pri čemu je pokazano da na njenu relativnu ekspresiju može uticati metabolički fenotip Tak, određen na osnovu Tak C<sub>0</sub>/D u 3. post-transplantacionom mesecu i funkcija grafta na kraju prve post-transplantacione godine. Rezultati doktorske disertacije mogu doprineti poboljšanju post-transplantacionih ishoda i istovremeno predstavljaju osnovu za dalja istraživanja u oblasti farmakokinetike, farmakoterapije i kliničke farmacije.

## 8 LITERATURA

1. Shuker N, van Gelder T, Hesselink DA. Intra-patient variability in tacrolimus exposure: causes, consequences for clinical management. *Transplant Rev (Orlando)*. 2015;29(2):78–8.
2. Stefanović N, Veličković-Radovanović R, Danković K, Pavlović I, Catić-Đorđević A, Bašić J, et al. Effect of the Interrelation between CYP3A5 Genotype, Concentration/Dose Ratio and Inpatient Variability of Tacrolimus on Kidney Graft Function: Monte Carlo Simulation Approach. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1970.
3. Shuker N, Shuker L, van Rosmalen J, Roodnat JJ, Borra LC, Weimar W, et al. A high inpatient variability in tacrolimus exposure is associated with poor long-term outcome of kidney transplantation. *Transpl Int*. 2016;29(11):1158–67.
4. Seyhun Y, Ciftci HS, Kekik C, Karadeniz MS, Tefik T, Nane I, et al. Genetic association of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and blood concentrations of calcineurin inhibitors in Turkish renal transplant patients. *Int J Immunogenet*. 2015;42:147-60.
5. Jouve T, Fonrose X, Noble J, Janbon B, Fiard G, Malvezzi P, et al. The TOMATO Study (Tacrolimus Metabolization in Kidney Transplantation): Impact of the Concentration-Dose Ratio on Death-censored Graft Survival. *Transplantation*. 2020;104(6):1263–71.
6. Kocierz M, Siekiera U, Kolonko A, Karkoszka H, Chudek J, Cierpka L, et al. -174G/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period. *Tissue Antigens*. 2011;77(4):283-90.
7. Alves LV, Martins SR, Simões E Silva AC, Cardoso CN, Gomes KB, Mota APL. TNF, IL-6, and IL-10 cytokines levels and their polymorphisms in renal function and time after transplantation. *Immunol Res*. 2020;68(5):246-54.
8. do Nascimento WG, Cilião DA, Genre J, Gondim DD, Alves RG, Hassan ND, et al. Genetic polymorphisms of Interleukin-18 are not associated with allograft function in kidney transplant recipients. *Genet Mol Biol*. 2014;37(2):343-9.
9. Pawlus J, Sierocka A, Tejchman K, Ziętek Z, Romanowski M, Pawlik A, et al. The impact of interleukin 12B (1188A>C), interleukin 16 (-295T>C), and interleukin 18 (607C>A, 137G>C) gene polymorphisms on long-term renal transplant function and recipient outcomes. *Transplant Proc*. 2014;46(6):2079-82.

10. Liu C, Chen J, Liu B, Yuan S, Shou D, Wen L, et al. Role of IL-18 in transplant biology. *Eur Cytokine Netw.* 2018;29(2):48–51.
11. Zhang X, Xu J, Fan J, Zhang T, Li Y, Xie B, et al. Influence of IL-18 and IL-10 Polymorphisms on Tacrolimus Elimination in Chinese Lung Transplant Patients. *Dis Markers.* 2017;2017:7834035.
12. Bogacz A, Polaszewska A, Bartkowiak-Wieczorek J, Tejchman K, Dziewanowski K, Ostrowski M, et al. The effect of genetic variations for interleukin-10 (IL-10) on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients after kidney transplantation. *Int Immunopharmacol.* 2020;89(Pt A):107059.
13. Xing J, Zhang X, Fan J, Shen B, Men T, Wang J. Association between interleukin-18 promoter variants and tacrolimus pharmacokinetics in Chinese renal transplant patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(2):191-8.
14. Li Y, Zou Y, Cai B, Yang B, Ying B, Shi Y, et al. The associations of IL-18 serum levels and promoter polymorphism with tacrolimus pharmacokinetics and hepatic allograft dysfunction in Chinese liver transplantation recipients. *Gene.* 2012;491(2):251-5.
15. Enokiya T, Nishikawa K, Hamada Y, Ikemura K, Sugimura Y, Okuda M. Temporary decrease in tacrolimus clearance in cytochrome P450 3A5 non-expressors early after living donor kidney transplantation: Effect of interleukin 6-induced suppression of the cytochrome P450 3A gene. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2021;128(3):525-33.
16. Chen Z, Cheng X, Zhang L, Tang L, Fang Y, Chen H, et al. The impact of IL-10 and CYP3A5 gene polymorphisms on dose-adjusted trough blood tacrolimus concentrations in early post-renal transplant recipients. *Pharmacol Rep.* 2021;73(5):1418-26.
17. Ledeganck KJ, Gielis EM, Abramowicz D, Stenvinkel P, Shiels PG, Van Craenenbroeck AH. MicroRNAs in AKI and Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(3):454-68.
18. Jelencsics K, Oberbauer R. microRNA and Kidney Transplantation. *Adv Exp Med Biol.* 2015;888:271-90.
19. Scian MJ, Maluf DG, David KG, Archer KJ, Suh JL, Wolen AR, et al. MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2110-22.

20. Ben-Dov IZ, Muthukumar T, Morozov P, Mueller FB, Tuschl T, Suthanthiran M. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*. 2012;94(11):1086-94.
21. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Scian MJ, King AL, Cathro H, et al. The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. *Kidney Int*. 2014;85(2):439-49.
22. Zununi Vahed S, Poursadegh Zonouzi A, Ghanbarian H, Ghojzadeh M, Samadi N, Omidi Y, et al. Differential expression of circulating miR-21, miR-142-3p and miR-155 in renal transplant recipients with impaired graft function. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(9):1681-9.
23. Langewisch E, Mannon RB. Chronic Allograft Injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(11):1723-9.
24. Lai X, Zheng X, Mathew JM, Gallon L, Leventhal JR, Zhang ZJ. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol*. 2021;12:661643.
25. European Association of Urology. EAU guidelines on Renal Transplantation. Uroweb. [citirano 15.05.2024.] Dostupna na: <https://uroweb.org/guidelines/renal-transplantation>
26. Voora S, Adey DB. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(6):866-79.
27. Hara S. The Chronology of Renal Allograft Dysfunction: The Pathological Perspectives. *Nephron*. 2023;147 Suppl 1:67-73.
28. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9:S1–157.
29. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*. 2019;32(8):775-88.
30. Parlakpınar H, Gunata M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2021;43(6):651-65.
31. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(1):182-92.
32. Singh N, Samant H, Hawxby A, Samaniego MD. Biomarkers of rejection in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24(1):103-10.

33. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med.* 2018;379(12):1150-60.
34. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2318-31.
35. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar ID, Merino Lopez M, et al. Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated Rejection in Late Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1711-20.
36. Yang H. Maintenance immunosuppression regimens: conversion, minimization, withdrawal, and avoidance. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(4 Suppl 2):S37-51.
37. Kho M, Cransberg K, Weimar W, van Gelder T. Current immunosuppressive treatment after kidney transplantation. *Expert Opin Pharmacother.* 2011;12(8):1217-31.
38. Szumilas K, Wilk A, Wiśniewski P, Gimpel A, Dziedziejko V, Kipp M, et al. Current Status Regarding Immunosuppressive Treatment in Patients after Renal Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):10301.
39. McKeage K, McCormack PL. Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *BioDrugs.* 2010;24(1):55-76.
40. Menon MC, Murphy B. Maintenance immunosuppression in renal transplantation. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:662-71.
41. Meneghini M, Bestard O, Grinyo JM. Immunosuppressive drugs modes of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2021;54-55:101757.
42. Bestard O, Cravedi P. Monitoring alloimmune response in kidney transplantation. *J Nephrol.* 2017;30(2):187-200.
43. Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(10):663-76.
44. Lentine KL, Smith JM, Lyden GR, Miller JM, Booker SE, Dolan TG, et al. OPTN/SRTR 2023 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant.* 2025;25(2S1):S22-S137.
45. Wojciechowski D, Wiseman A. Long-Term Immunosuppression Management: Opportunities and Uncertainties. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(8):1264-71.
46. van Gelder T, Hesselink DA. Mycophenolate revisited. *Transpl Int.* 2015;28(5):508-15.

47. Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs*. 2009;69(16):2227-43.
48. Grinyó JM, Bestard O, Torras J, Cruzado JM. Optimal immunosuppression to prevent chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl*. 2010;(119):S66-70.
49. Zaza G, Granata S, Tomei P, Dalla Gassa A, Lupo A. Personalization of the immunosuppressive treatment in renal transplant recipients: the great challenge in "omics" medicine. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):4281-305.
50. Cuadrado-Payán E, Diekmann F, Cucchiari D. Medical Aspects of mTOR Inhibition in Kidney Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14):7707.
51. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant*. 2010;10(3):547-57.
52. Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, Becker T, Campistol JM, Florman S, et al. Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: a phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant*. 2012;12(3): 630-9.
53. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant*. 2010;10(3):535-46.
54. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(1):210-7.
55. Archdeacon P, Dixon C, Belen O, Albrecht R, Meyer J. Summary of the US FDA approval of belatacept. *Am J Transplant*. 2012;12(3):554-62.
56. van Vugt LK, Schagen MR, de Weerd A, Reinders ME, de Winter BC, Hesselink DA. Investigational drugs for the treatment of kidney transplant rejection. *Expert Opin Investig Drugs*. 2022;31(10):1087-100.
57. ClinicalTrials.gov. [citirano 15.05.2025.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/>
58. Yu M, Liu M, Zhang W, Ming Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation. *Curr Drug Metab*. 2018;19(6):513-22.

59. Zhang X, Lin G, Tan L, Li J. Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: Pharmacogenetic considerations. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:107-14.
60. Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2(4):1-23.
61. Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Tacrolimus Modulates TGF- $\beta$  Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin Med.* 2016;5(5):50.
62. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(10):563-85.
63. Maes BD, Vanrenterghem YF. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. *Transplant Proc.* 2004;36(2 Suppl):40S-49S.
64. Azarfar A, Ravanshad Y, Mehrad-Majd H, Esmaeeli M, Aval SB, Emadzadeh M, et al. Comparison of tacrolimus and cyclosporine for immunosuppression after renal transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2018;29(6):1376-85.
65. Webster A, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(4):CD003961.
66. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(10):623-53.
67. Schutte-Nutgen K, Tholking G, Suwelack B, Reuter S. Tacrolimus - Pharmacokinetic Considerations for Clinicians. *Curr Drug Metab.* 2018;19(4):342-50.
68. Zahir H, Nand RA, Brown KF, Tattam BN, McLachlan AJ. Validation of methods to study the distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2001;46(1):27-35.
69. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(4):283-95.
70. 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(3):141-75.
71. Brunet M, Pastor-Anglada M. Insights into the Pharmacogenetics of Tacrolimus Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmaceutics.* 2022;14(9):1755.

72. Stefanović NZ, Veličković-Radovanović RM, Danković KS, Mitić BP, Paunović GJ, Cvetković MB, et al. Combined Effect of Inter- and Inpatient Variability in Tacrolimus Exposure on Graft Impairment Within a 3-Year Period Following Kidney Transplantation: A Single-Center Experience. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2020;45(6):749-60.
73. Chen L, Prasad GVR. CYP3A5 polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment. *Pharmgenomics Pers Med.* 2018;11:23-33.
74. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:836-47.
75. Woillard JB, Saint-Marcoux F, Debord J, Åsberg A. Pharmacokinetic models to assist the prescriber in choosing the best tacrolimus dose. *Pharmacol Res.* 2018;130:316-21.
76. Andrews LM, Li Y, De Winter BCM, Shi YY, Baan CC, Van Gelder T, et al. Pharmacokinetic considerations related to therapeutic drug monitoring of tacrolimus in kidney transplant patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(12):1225-36.
77. Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Oetting WS, Israni AK, Jacobson PA. Dosing equation for tacrolimus using genetic variants and clinical factors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72:948-57.
78. Rančić NK, Vavić NN, Kovačević AM, Mikov MM, Dragojević Simić VM. Drug-drug interactions of tacrolimus. *Hospital Pharmacology - International Multidisciplinary Journal.* 2015;2(3):291-6.
79. Op den Buisch R. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplant patients. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University, 2007.
80. Brunet M, van Gelder T, Åsberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman L, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther Drug Monit.* 2019;41(3):261-307.
81. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;98(1):19-24.
82. Degraeve AL, Moudio S, Haufroid V, Chaib Eddour D, Mourad M, Bindels LB, et al. Predictors of tacrolimus pharmacokinetic variability: current evidences and future perspectives. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020;16(9):769-82.

83. Provenzani A, Santeusanio A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9156-73.
84. Thölking G, Fortmann C, Koch R, Gerth HU, Pabst D, Pavenstädt H, et al. The tacrolimus metabolism rate influences renal function after kidney transplantation. *PLoS One.* 2014;9(10):e111128.
85. Thölking G, Schmidt C, Koch R, Schuette-Nuetgen K, Pabst D, Wolters H, et al. Influence of tacrolimus metabolism rate on BKV infection after kidney transplantation. *Sci Rep.* 2016;6:32273.
86. Schütte-Nütgen K, Thölking G, Steinke J, Pavenstädt H, Schmidt R, Suwelack B, Reuter S. Fast Tac Metabolizers at Risk - It is Time for a C/D Ratio Calculation. *J Clin Med.* 2019;8(5):587.
87. Thongprayoon C, Hansrivijit P, Kovvuru K, Kanduri SR, Bathini T, Pivovarova A, et al. Impacts of High Intra- and Inter-Individual Variability in Tacrolimus Pharmacokinetics and Fast Tacrolimus Metabolism on Outcomes of Solid Organ Transplant Recipients. *J Clin Med.* 2020;9(7):2193.
88. Borra LC, Roodnat JJ, Kal JA, Mathot RA, Weimar W, van Gelder T. High within-patient variability in the clearance of tacrolimus is a risk factor for poor long-term outcome after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:2757-63.
89. Rodrigo E, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, Benito A, Ruiz JC, et al. Within-Patient Variability in Tacrolimus Blood Levels Predicts Kidney Graft Loss and Donor-Specific Antibody Development. *Transplantation.* 2016;100(11):2479-85.
90. Xie W, Fan S, Liu R, Yan W, Su C, Zheng K, et al. Tacrolimus intra-patient variability measures and its associations with allograft clinical outcomes in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2024;38(3):100842.
91. Kuypers DRJ. Inpatient Variability of Tacrolimus Exposure in Solid Organ Transplantation: A Novel Marker for Clinical Outcome. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;107(2):347-58.
92. Gonzales HM, McGillicuddy JW, Rohan V, Chandler JL, Nadig SN, Dubay DA, et al. A comprehensive review of the impact of tacrolimus inpatient variability on clinical outcomes in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2020;20(8):1969-83.
93. Schumacher L, Leino AD, Park JM. Tacrolimus inpatient variability in solid organ transplantation: A multiorgan perspective. *Pharmacotherapy.* 2021;41(1):103-18.

94. Stefanović NZ, Veličković-Radovanović RM, Danković KS, Catić-Djordjević AK, Damnjanović ID, Mitić BP, et al. Insight into the potential influence of inter- and intra-individual variability of tacrolimus exposure on graft function decline in three-year period following kidney transplantation. *Farmacía*. 2020;68(6):1036-46.
95. Goodall DL, Willicombe M, McLean AG, Taube D. High Inpatient Variability of Tacrolimus Levels and Outpatient Clinic Nonattendance Are Associated With Inferior Outcomes in Renal Transplant Patients. *Transplant Direct*. 2017;3(8):e192.
96. Vanhove T, Vermeulen T, Annaert P, Lerut E, Kuypers DRJ. High Inpatient Variability of Tacrolimus Concentrations Predicts Accelerated Progression of Chronic Histologic Lesions in Renal Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16:2954-63.
97. Jordan SC, Choi J, Kim I, Wu G, Toyoda M, Shin B, et al. Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection: Therapeutic Implications of IL-6 Receptor Blockade. *Transplantation*. 2017;101(1):32-44.
98. Jordan SC, Ammerman N, Choi J, Kumar S, Huang E, Toyoda M, et al. Interleukin-6: An Important Mediator of Allograft Injury. *Transplantation*. 2020;104(12):2497-506.
99. Miller CL, Madsen JC. IL-6 Directed Therapy in Transplantation. *Curr Transplant Rep*. 2021;8(3):191-204.
100. Tvedt THA, Ersvaer E, Tveita AA, Bruserud Ø. Interleukin-6 in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Its Possible Importance for Immunoregulation and As a Therapeutic Target. *Front Immunol*. 2017;8:667.
101. Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL, et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol*. 2008;18(4):344-8.
102. Sánchez-Velasco P, Rodrigo E, Fernández-Fresnedo G, Ocejó-Vinyals JG, Ruiz JC, Arnau A, et al. Influence of interleukin-6 promoter polymorphism -174 g/c on kidney graft outcome. *Transplant Proc*. 2010;42(8):2854-5.
103. Ligeiro D, Sancho MR, Papoila A, Barradinhas AM, Almeida A, Calão S, et al. Impact of donor and recipient cytokine genotypes on renal allograft outcome. *Transplant Proc*. 2004;36(4):827-9.
104. Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Geramizadeh B, Yaghobi R, Rais-Jalali GA, et al. A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):509-15.

105. Müller-Steinhardt M, Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 - 174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int.* 2002;62(5):1824-7.
106. Stipp MC, Acco A. Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87(3):295-309.
107. Lenoir C, Rollason V, Desmeules JA, Samer CF. Influence of Inflammation on Cytochromes P450 Activity in Adults: A Systematic Review of the Literature. *Front Pharmacol.* 2021;12:733935.
108. Chavant A, Fonrose X, Gautier-Veyret E, Hilleret MN, Roustit M, Stanke-Labesque F. Variability of Tacrolimus Trough Concentration in Liver Transplant Patients: Which Role of Inflammation? *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1960.
109. Mühlbacher J, Schörgenhofer C, Doberer K, Dürr M, Budde K, Eskandary F, et al. Anti-interleukin-6 antibody clazakizumab in late antibody-mediated kidney transplant rejection: effect on cytochrome P450 drug metabolism. *Transpl Int.* 2021;34(8):1542-52.
110. Nickerson PW, Böhmig GA, Chadban S, Kumar D, Mannon RB, van Gelder T, et al. Clazakizumab for the treatment of chronic active antibody-mediated rejection (AMR) in kidney transplant recipients: Phase 3 IMAGINE study rationale and design. *Trials.* 2022;23(1):1042.
111. Dhaouadi T, Sfar I, Bardi R, Jendoubi-Ayed S, Abdallah TB, Ayed K, et al. Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2013;45(6):2152-7.
112. Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Sandbank J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World J Transplant.* 2013;3(4):91-8.
113. Khan F, Sar A, Gonul I, Benediktsson H, Doulla J, Yilmaz S, et al. Graft inflammation and histologic indicators of kidney chronic allograft failure: low-expressing interleukin-10 genotypes cannot be ignored. *Transplantation.* 2010;90(6):630-8.
114. Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2008;21(9):879-91.
115. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.* 1999;56(1):281-8.

116. Xiong J, Wang Y, Zhang Y, Nie L, Wang D, Huang Y, et al. Lack of Association between Interleukin-10 Gene Polymorphisms and Graft Rejection Risk in Kidney Transplantation Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127540.
117. Hueso M, Navarro E, Moreso F, O'Valle F, Pérez-Riba M, Del Moral RG, et al. Intragraft expression of the IL-10 gene is up-regulated in renal protocol biopsies with early interstitial fibrosis, tubular atrophy, and subclinical rejection. *Am J Pathol*. 2010;176:1696-704.
118. Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL, Haehner-Daniels B. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;67(1):32-43.
119. Deng X, Li Y, Jiang L, Xie X, Wang X. 1-methylnicotinamide modulates IL-10 secretion and voriconazole metabolism. *Front Immunol*. 2025;16:1529660.
120. Zhang X, Wang Z, Fan J, Liu G, Peng Z. Impact of interleukin-10 gene polymorphisms on tacrolimus dosing requirements in Chinese liver transplant patients during the early posttransplantation period. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011;67(8):803-13.
121. Khaleel B, Yousef AM, Al-Zoubi MS, Al-Ulemat M, Masadeh AA, Abuhaliema A, et al. Impact of genetic polymorphisms at the promoter area of IL-10 gene on tacrolimus level in Jordanian renal transplantation recipients. *J Med Biochem*. 2022;41:327-34.
122. Li D, Zhu JY, Gao J, Wang X, Lou YQ, Zhang GL. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cytochrome P450 3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):133-9.
123. Li CJ, Li L, Lin L, Jiang HX, Zhong ZY, Li WM, et al. Impact of the CYP3A5, CYP3A4, COMT, IL-10 and POR genetic polymorphisms on tacrolimus metabolism in Chinese renal transplant recipients. *PLoS One*. 2014;9(1):e86206.
124. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol*. 2013;25(6):439-48.
125. Mittal RD, Srivastava P, Singh V, Jaiswal P, Kapoor R. Association of common variants of vascular endothelial growth factor and interleukin-18 genes with allograft survival in renal transplant recipients of North India. *DNA Cell Biol*. 2011;30(5):309-15.
126. Kim CD, Ryu HM, Choi JY, Choi HJ, Cho JH, et al. Association of G-137C IL-18 promoter polymorphism with acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86(11):1610-4.

127. Kolesar L, Novota P, Krasna E, Slavcev A, Viklicky O, Honsova E, et al. Polymorphism of interleukin-18 promoter influences the onset of kidney graft function after transplantation. *Tissue Antigens*. 2007;70:363-8.
128. Piancatelli D, Maccarone D, Colanardi A, Sebastiani P, Clemente K, Iesari S, et al. Kidney Transplantation, Polymorphisms of IL-18, and Other Pro-Inflammatory Genes and Late Post-Transplant Outcome. *Transplant Proc*. 2016;48(2):323-5.
129. Quaglia M, Merlotti G, Guglielmetti G, Castellano G, Cantaluppi V. Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5404.
130. White CA, Siegal D, Akbari A, Knoll GA. Use of kidney function end points in kidney transplant trials: a systematic review. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(6):1140-57.
131. Hilbrands L, Budde K, Bellini MI, Diekmann F, Furian L, Grinyó J, et al. Allograft Function as Endpoint for Clinical Trials in Kidney Transplantation. *Transpl Int*. 2022;35:10139.
132. Gompou A, Perrea D, Karatzas T, Bellos JK, Kastania AN, Boletis I, et al. Relationship of Changes in Cystatin-C With Serum Creatinine and Estimated Glomerular Filtration Rate in Kidney Transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(6):1662-74.
133. Delanaye P, Cavalier E, Pottel H. Serum Creatinine: Not So Simple! *Nephron*. 2017;136(4):302-8.
134. Obrenović R. Značaj određivanja cistatina c za procenu poremećaja glomerulske filtracije. [Doktorska disertacija]. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd. 2012.
135. Vinge E, Lindergård B, Nilsson-Ehle P, Grubb A. Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(8):587-92.
136. Salvadori M, Rosati A, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritsche L, et al. Estimated one-year glomerular filtration rate is the best predictor of long-term graft function following renal transplant. *Transplantation*. 2006;81(2):202-6.
137. Marcén R, Morales JM, Fernández-Rodríguez A, Capdevila L, Pallardó L, Plaza JJ, et al. Long-term graft function changes in kidney transplant recipients. *NDT Plus*. 2010;3(Suppl\_2):ii2-ii8.
138. Madero M, Sarnak MJ, Stevens LA. Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(6):610-6.

139. Tajima S, Yamamoto N, Masuda S. Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2019;170:113664.
140. Ramos-Barron MA, Hernandez Bejarano I, Rodrigo E, Cruz Iglesias E, Benito Hernandez A, et al. Assessment of Kidney Graft Function Evolution Measured by Creatinine and Cystatin C. *Transplant Proc.* 2016;48(9):2913-6.
141. Pöge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B, Palmedo H, Klehr HU, Sauerbruch T, et al. Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2006;70(1):204-10.
142. Bjornstad P, Karger AB, Maahs DM. Measured GFR in Routine Clinical Practice-The Promise of Dried Blood Spots. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25(1):76-83.
143. Boele-Schutte E, Gansevoort RT. Measured GFR: not a gold, but a gold-plated standard. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(suppl\_2):ii180-ii4.
144. Mas VR, Archer KJ, Scian M, Maluf DG. Molecular pathways involved in loss of graft function in kidney transplant recipients. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(3):269-84.
145. Wu J, Zhang F, Zhang J, Sun Z, Wang W. Advances of miRNAs in kidney graft injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2021;35(1):100591.
146. Nassirpour R, Raj D, Townsend R, Argyropoulos C. MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: from diabetic nephropathy renal transplantation and beyond. *Food Chem Toxicol.* 2016;98(Pt A):73-88.
147. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008;141(5):672-5.
148. Zhou H, Ni WJ, Meng XM, Tang LQ. MicroRNAs as Regulators of Immune and Inflammatory Responses: Potential Therapeutic Targets in Diabetic Nephropathy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:618536. Erratum in: *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:875280.
149. Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, et al. PPAR $\alpha$  Is Regulated by miR-21 and miR-27b in Human Liver. *Pharm Res.* 2011;28(10):2467-76.
150. Khalid U, Newbury LJ, Simpson K, Jenkins RH, Bowen T, Bates L, et al. A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation. *Sci Rep.* 2019;9(1):3584.

151. Gniewkiewicz MS, Paszkowska I, Gozdowska J, Czerwinska K, Sadowska-Jakubowicz A, Deborska-Materkowska D, et al. Urinary MicroRNA-21-5p as Potential Biomarker of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA) in Kidney Transplant Recipients. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(2):113.
152. Feng J, Li A, Deng J, Yang Y, Dang L, Ye Y, et al. miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: potential role in cerebrovascular disease. *Lipids Health Dis*. 2014;13(1):27.
153. Dey N, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, Choudhury GG. TGF $\beta$ -stimulated microRNA-21 utilizes PTEN to orchestrate AKT/mTORC1 signaling for mesangial cell hypertrophy and matrix expansion. *PLoS One*. 2012;7(8):e42316.
154. Domenico TD, Joelsons G, Montenegro RM, Manfro RC. Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(4):e5533.
155. Gao Y, Ma X, Yao Y, Li H, Fan Y, Zhang Y, et al. miR-155 regulates the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting E2F2. *Oncotarget*. 2016;7(15):20324-37.
156. Zhang W, Li X, Tang Y, Chen C, Jing R, Liu T. miR-155-5p Implicates in the Pathogenesis of Renal Fibrosis via Targeting SOCS1 and SOCS6. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6263921.
157. Xie S, Chen H, Li F, Wang S, Guo J. Hypoxia-induced microRNA-155 promotes fibrosis in proximal tubule cells. *Mol Med Rep*. 2015;11(6):4555-60.
158. Millán O, Budde K, Sommerer C, Aliart I, Rissling O, Bardaji B, et al. Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(12):2636-50.
159. Nog R, Mopidevi B, Sivankutty I, Rivera VB, Islam HK, Glicklich D, et al. BK Polyomavirus microRNA in Kidney Transplant Recipient. *Transplant Proc*. 2024;56(6):1493-5.
160. Prasad GVR, Beckley J, Mathur M, Gunasekaran M, Nash MM, Rapi L, et al. Safety and efficacy of prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia involving trimethoprim-sulfamethoxazole dose reduction in kidney transplantation. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):311.

161. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006;145:247-54.
162. Losito A, Kalidas K, Santoni S, Jeffery S. Association of interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Kidney Int.* 2003;64(2):616-22.
163. Moudi B, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Hashemi M, Metanat M, Khosravi S, et al. Association Between IL-10 Gene Promoter Polymorphisms (-592 A/C, -819 T/C, -1082 A/G) and Susceptibility to HBV Infection in an Iranian Population. *Hepat Mon.* 2016;16(2):e32427.
164. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc.* 2008;3(9):1452-6.
165. Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2004;53(8):1082-9.
166. Human IL-6 DuoSet ELISA. [citirano 07.04.2025.]. Dostupno na: [https://www.rndsystems.com/products/human-il-6-duoset-elisa\\_dy206](https://www.rndsystems.com/products/human-il-6-duoset-elisa_dy206)
167. Human IL-10(Interleukin 10) ELISA Kit. [citirano 07.04.2025.]. Dostupno na: <https://www.fn-test.com/product/eh0173/>
168. Human IL-18(Interleukin 18) ELISA Kit. [citirano 07.04.2025.]. Dostupno na: <https://www.fn-test.com/product/eh0011/>
169. Human CST3(Cystatin C) ELISA Kit. [citirano 07.04.2025.]. Dostupno na: <https://www.fn-test.com/product/eh0110/>
170. Sonkar GK, Singh S, Sonkar SK, Singh U, Singh RG. Evaluation of serum interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha levels, and their association with various non-immunological parameters in renal transplant recipients. *Singapore Med J.* 2013;54(9):511-5.
171. Betjes MGH, Roelen DL, van Agteren M, Kal-van Gestel J. Causes of Kidney Graft Failure in a Cohort of Recipients With a Very Long-Time Follow-Up After Transplantation. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:842419.
172. Kim MY, Brennan DC. Therapies for Chronic Allograft Rejection. *Front Pharmacol.* 2021;12:651222.
173. Sharma A, Lewis JR, Lim WH, Palmer S, Strippoli G, Chapman JR, Alexander SI, Craig JC, Wong G. Renal transplant outcomes and de novo donor-specific anti-human

- leukocyte antigen antibodies: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(8):1472-80.
174. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, et al; ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357(25):2562-75.
175. Oberbauer R, Bestard O, Furian L, Maggiore U, Pascual J, Rostaing L, Budde K. Optimization of tacrolimus in kidney transplantation: New pharmacokinetic perspectives. *Transplant Rev (Orlando)*. 2020;34(2):100531.
176. Cheung CY, Tang SCW. Personalized immunosuppression after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2022;27(6):475-83.
177. Kuypers DR. "What do we know about tacrolimus pharmacogenetics in transplant recipients?". *Pharmacogenomics*. 2018;19(7):593-7.
178. Masset C, Lorent M, Kerleau C, Garandeau C, Houzet A, Ville S, et al. Early Determination of Tacrolimus Concentration–Dose Ratio Identifies Risk of Allograft Loss in Kidney Transplantation. *Kidney International Reports*. 2025;10(5):1428-40.
179. Thölking G, Schütte-Nütgen K, Schmitz J, Rovas A, Dahmen M, Bautz J, et al. A Low Tacrolimus Concentration/Dose Ratio Increases the Risk for the Development of Acute Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity. *J Clin Med*. 2019;8(10):1586.
180. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit*. 2010;32(4):394-404.
181. van Gelder T, Meziyerh S, Swen JJ, de Vries APJ, Moes DJAR. The Clinical Impact of the C0/D Ratio and the CYP3A5 Genotype on Outcome in Tacrolimus Treated Kidney Transplant Recipients. *Front Pharmacol*. 2020;11:1142.
182. Ekberg H, Bernasconi C, Nöldeke J, Yussim A, Mjörnstedt L, Erken U, et al. Cyclosporine, tacrolimus and sirolimus retain their distinct toxicity profiles despite low doses in the Symphony study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(6):2004-10.
183. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL, et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant*. 2016;16(7):2117-38.
184. Karpe KM, Talaulikar GS, Walters GD. Calcineurin inhibitor withdrawal or tapering for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;7(7):CD006750.

185. Ko H, Kim HK, Chung C, Han A, Min SK, Ha J, et al. Association between medication adherence and inpatient variability in tacrolimus concentration among stable kidney transplant recipients. *Sci Rep.* 2021;11(1):5397.
186. Kostalova B, Mala-Ladova K, Sulkova SD, Denhaerynck K, De Geest S, Maly J. Comparison of different methods to assess tacrolimus concentration intra-patient variability as potential marker of medication non-adherence. *Front Pharmacol.* 2022;13:973564.
187. Bunthof KLW, Al-Hassany L, Nakshbandi G, Hesselink DA, van Schaik RHN, Ten Dam et al. A randomized crossover study comparing different tacrolimus formulations to reduce inpatient variability in tacrolimus exposure in kidney transplant recipients. *Clin Transl Sci.* 2022;15(4):930-41.
188. Shuker N, Cadogan M, van Gelder T, Roodnat JJ, Kho MM, Weimar W, et al. Conversion from twice-daily to once-daily tacrolimus does not reduce inpatient variability in tacrolimus exposure. *Ther Drug Monit.* 2015;37(2):262-9.
189. Kim EJ, Kim SJ, Huh KH, Kim BS, Kim MS, Kim SI, et al. Clinical significance of tacrolimus intra-patient variability on kidney transplant outcomes according to pre-transplant immunological risk. *Sci Rep.* 2021;11(1):12114.
190. Mendoza Rojas A, Hesselink DA, van Besouw NM, Dieterich M, de Kuiper R, Baan CC, et al. High Tacrolimus Inpatient Variability and Subtherapeutic Immunosuppression are Associated With Adverse Kidney Transplant Outcomes. *Ther Drug Monit.* 2022;44(3):369-376.
191. Whalen HR, Glen JA, Harkins V, Stevens KK, Jardine AG, Geddes CC, et al. High Inpatient Tacrolimus Variability Is Associated With Worse Outcomes in Renal Transplantation Using a Low-Dose Tacrolimus Immunosuppressive Regime. *Transplantation.* 2017;101(2):430-6.
192. Mo H, Kim SY, Min S, Han A, Ahn S, Min SK, et al. Association of Inpatient Variability of Tacrolimus Concentration With Early Deterioration of Chronic Histologic Lesions in Kidney Transplantation. *Transplant Direct.* 2019;5(6):e455.
193. Kim H, Han A, Ahn S, Min SK, Ha J, Min S. Association of high intra-patient variability in tacrolimus exposure with calcineurin inhibitor nephrotoxicity in kidney transplantation. *Sci Rep.* 2023;13(1):16502.
194. Mendoza Rojas A, Hesselink DA, van Besouw NM, Baan CC, van Gelder T. Impact of low tacrolimus exposure and high tacrolimus intra-patient variability on the

- development of *de novo* anti-HLA donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(12):1323-31.
195. Sablik KA, Clahsen-van Groningen MC, Hesselink DA, van Gelder T, Betjes MGH. Tacrolimus intra-patient variability is not associated with chronic active antibody mediated rejection. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196552.
196. Rozen-Zvi B, Schneider S, Lichtenberg S, Green H, Cohen O, Gafter U, et al. Association of the combination of time-weighted variability of tacrolimus blood level and exposure to low drug levels with graft survival after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(2):393-9.
197. Goodall DL, Willicombe M, McLean AG, Taube D. High Inpatient Variability of Tacrolimus Levels and Outpatient Clinic Nonattendance Are Associated With Inferior Outcomes in Renal Transplant Patients. *Transplant Direct*. 2017;3(8):e192.
198. Park Y, Lee H, Eum SH, Ko EJ, Min JW, Yoon SH, et al. Combined impact of the inter and intra-patient variability of tacrolimus blood level on allograft outcomes in kidney transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:1037566.
199. Hunsicker LG, Bennett LE. Acute rejection reduces creatinine clearance (Ccr) at 6 months following renal transplantation but does not affect subsequent slope of Ccr. *Transplantation*. 1999;67(7):S83.
200. Gourishankar S, Hunsicker LG, Jhangri GS, Cockfield SM, Halloran PF. The stability of the glomerular filtration rate after renal transplantation is improving. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(9):2387-94.
201. Jordan SC, Ammerman N, Huang E, Vo A. Importance of IL-6 inhibition in prevention and treatment of antibody-mediated rejection in kidney allografts. *Am J Transplant*. 2022;22 Suppl 4:28-37.
202. Van Loon E, Lamarthée B, Barba T, Claes S, Coemans M, de Loor H, et al. Circulating Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Associate With Immune Activation Independent of Kidney Transplant Histopathological Findings. *Front Immunol*. 2022;13:818569.
203. Eskandari SK, Gaya da Costa M, Faria B, Petr V, Azzi JR, Berger SP, et al. An interleukin 6-based genetic risk score strengthened with interleukin 10 polymorphisms associated with long-term kidney allograft outcomes. *Am J Transplant*. 2022;22 Suppl 4(Suppl 4):45-57.
204. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-1013.

205. Krüger B, Walberer A, Farkas S, Tokmak F, Obed A, Schenker P, et al. The impact of "high-producer" interleukin-6 haplotypes on cardiovascular morbidity and mortality in a kidney transplant population. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2539-43.
206. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G, et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol.* 2005;14(1):49-52.
207. Breulmann B, Bantis C, Siekierka M, Blume C, Aker S, Kuhr N, et al. Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. *Clin Transplant.* 2007;21(5):615-21.
208. Noss EH, Nguyen HN, Chang SK, Watts GF, Brenner MB. Genetic polymorphism directs IL-6 expression in fibroblasts but not selected other cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(48):14948-53.
209. Stojanova J, Pouché L, Picard N. Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation. *Clin Biochem.* 2016;49(4-5):363–76.
210. Chen Y, Ma F, Jones N, Deng R, Li C, Li CC. Assessment of CYP3A-mediated drug interaction via cytokine (IL-6) elevation for mosunetuzumab using physiologically-based pharmacokinetic modeling. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2024;13(2):234-46.
211. Aitken AE, Morgan ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(9):1687-93.
212. Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, Slatter JG. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(8):1415-22.
213. Kotowski M, Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Sienko J, Tejchman K, Dziejowski K, et al. Effect of Interleukin-6 polymorphism on function of the renal allograft function and efficacy of immunosuppressive therapy. *Farmacia* 2018;66(5):791-7.
214. Danković K, Stefanović N, Cvetković T, Vujić S, Jović M, Mitić B, et al. Potential influence of interleukin-6 -174G/C gene polymorphism on kidney graft function and tacrolimus dose requirements: five-year follow-up. *Xenobiotica.* 2024;54(10):855–63.
215. Omrani H, Jasemi SV, Sadeghi M, Golmohamadi S. Evaluation of Serum Interleukin-6 Levels in the Renal Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(1):174-8.

216. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation*. 2001;71(5):674-7.
217. Cheng X, Chen Y, Zhang L, Chen B, Yang D, Chen W, et al. Influence of *CYP3A5*, *IL-10* polymorphisms and metabolism rate on tacrolimus exposure in renal post-transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2022;23(18):961-72.
218. Stefanović N, Danković K, Cvetković T, Vujić S, Pavlović I, Jevtović-Stoimenov T, et al. Impact of IL-6 and IL-10 genotypes on tacrolimus dose requirements in kidney transplant recipients: Monte Carlo analysis. *Pharmacogenomics*. 2024;25(7):315
219. IGSR: The International Genome Sample Resource. [citirano 05.08.2025.]. Dostupno na: <https://www.internationalgenome.org/>
220. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-32.
221. Shah RR, Smith RL. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos*. 2015;43(3):400-10.
222. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R; French Society of Pharmacology and Therapeutics. Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacol Ther*. 2020;215:107627.
223. Ferguson TW, Komenda P, Tangri N. Cystatin C as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(3):295-300.
224. Akbas SH, Yavuz A, Tuncer M, Ruhi C, Gurkan A, Cetinkaya R, et al. Serum cystatin C as an index of renal function in kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2004;36(1):99-101.
225. Risch L, Blumberg A, Huber AR. Assessment of renal function in renal transplant patients using cystatin C. A comparison to other renal function markers and estimates. *Ren Fail*. 2001;23(3-4):439-48.
226. Gökkuşu CA, Ozden TA, Gül H, Yildiz A. Relationship between plasma Cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant patients. *Clin Biochem*. 2004;37(2):94-7.

227. Uzun H, Ozmen Keles M, Ataman R, Aydin S, Kalender B, Uslu E, et al. Serum cystatin C level as a potentially good marker for impaired kidney function. *Clin Biochem.* 2005;38(9):792-8.
228. Janszky N, Süsal C. Circulating and urinary microRNAs as possible biomarkers in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2018; 32(2):110-8.
229. van de Vrie M, Deegens JK, Eikmans M, van der Vlag J, Hilbrands LB. Urinary MicroRNA as Biomarker in Renal Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17(5):1160-6.
230. Zununi Vahed S, Omid Y, Ardalan M, Samadi N. Dysregulation of urinary miR-21 and miR-200b associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in renal transplant recipients. *Clin Biochem.* 2017;50(1-2):32-9.
231. Muendlein A, Geiger K, Leiherer A, Saely CH, Fraunberger P, Drexel H. Evaluation of the associations between circulating microRNAs and kidney function in coronary angiography patients. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2020;318(2):F315–21.
232. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* 2011;8(5):706–13.
233. Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T. Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition Is Partly Mediated by MicroRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2):361–9.
234. Ramanathan K, Padmanabhan G. MiRNAs as potential biomarker of kidney diseases: A review. *Cell Biochem Funct.* 2020;38(8):990–1005.
235. Stojiljković V, Stefanović N, Vukelić Nikolić M, Đorđević B, Bašić J, Kocić G, et al. Mikro RNK - potencijalni biomarkeri kod hronične bolesti bubrega. *Acta Facultatis Medicae Naissensis.* 2023;40(3):270-8.
236. Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, Van der Hauwaert C, Lo-Guidice J-M, et al. Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e58014.
237. Dey N, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, Choudhury GG. TGF $\beta$ -Stimulated MicroRNA-21 Utilizes PTEN to Orchestrate AKT/mTORC1 Signaling for Mesangial Cell Hypertrophy and Matrix Expansion. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e42316.
238. Lin L, Gan H, Zhang H, Tang W, Sun Y, Tang X, et al. MicroRNA 21 inhibits SMAD7 expression through a target sequence in the 3' untranslated region and inhibits proliferation of renal tubular epithelial cells. *Mol Med Rep.* 2014;10(2):707-12.

239. Zhong Q, Zeng J, Li Y, Zhang H, Lin T, Song T. Senescent renal tubular cells derived extracellular vesicles transported miR-20a and miR-21 induced macrophage-to-myofibroblast transition in renal fibrosis after ischemia reperfusion injury. *Int J Biol Sci.* 2025;21(3):940-54.
240. Wang YY, Jiang H, Pan J, Huang XR, Wang YC, Huang HF, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2053-67.
241. Chen YJ, Hsu CT, Tsai SF, Chen CH. Association between Circulating MicroRNAs (miR-21-5p, miR-20a-5p, miR-29b-3p, miR-126-3p and miR-101-3p) and Chronic Allograft Dysfunction in Renal Transplant Recipients. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12253.
242. Saejong S, Townamchai N, Somparn P, Tangtanatakul P, Ondee T, Hirankarn N, et al. MicroRNA-21 in plasma exosome, but not from whole plasma, as a biomarker for the severe interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) in post-renal transplantation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2022;40(1):94-102.
243. Vandebussche C, Van der Hauwaert C, Dewaeles E, Franczak J, Hennino MF, Gnemmi V, et al. Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation. *Arch Toxicol.* 2018;92(4):1539-50.
244. Lazarou C, Moysidou E, Christodoulou M, Lioulios G, Sampani E, Dimitriadis C, et al. Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Kidney Allograft Dysfunction: Current and Future Applications in the Era of Precision Medicine. *Medicina (Kaunas).* 2025;61(2):262.
245. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(13):5330-5.
246. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, Sharbafi MH, Keshavarz Shahbaz S, Barabadi M, et al. Altered Expression of MicroRNAs Following Chronic Allograft Dysfunction with Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(6):615-23.
247. Vitalone MJ, Sigdel TK, Salomonis N, Sarwal RD, Hsieh SC, Sarwal MM. Transcriptional Perturbations in Graft Rejection. *Transplantation.* 2015 ;99(9):1882-93.

248. Oghumu S, Bracewell A, Nori U, Maclean KH, Balada-Lasat JM, Brodsky S, et al. Acute pyelonephritis in renal allografts: a new role for microRNAs? *Transplantation*. 2014;97(5):559-68.
249. Huang W, Paul D, Calin GA, Bayraktar R. miR-142: A Master Regulator in Hematological Malignancies and Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2023;13(1):84.
250. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008;19(1):81-5.
251. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*. 2009;10(2):180-5.
252. Danger R, Pallier A, Giral M, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Degauque N, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(4):597-606.
253. Ge X, Sun Y, Tang Y, Lin J, Zhou F, Yao G, et al. Circular RNA HECTD1 knockdown inhibits transforming growth factor-beta/ small mothers against decapentaplegic (TGF- $\beta$ /Smad) signaling to reduce hypertrophic scar fibrosis. *Bioengineered*. 2022;13(3):7303-15.
254. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-38.
255. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316:608-1.
256. Liang J, Tang Y, Liu Z, Wang X, Tang L, Zou Z, et al. Increased expression of miR-155 correlates with abnormal allograft status in solid organ transplant patients and rat kidney transplantation model. *Life Sci*. 2019;227:51-7.
257. Gielis EM, Anholts JDH, van Beelen E, Haasnoot GW, De Fijter HW, Bajema I, et al. A Combined microRNA and Chemokine Profile in Urine to Identify Rejection After Kidney Transplantation. *Transplant Direct*. 2021;7(7):e711.
258. Nagy PF, Pócsi M, Fejes Z, Bidiga L, Szabó E, Balogh O, et al. Investigation of Circulating MicroRNA Levels in Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplant Proc*. 2022;54(9):2570-7.

259. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(4):1290-7.
260. Su JH, Hong Y, Han CC, Yu J, Guan X, Zhu YM, et al. Dual action of macrophage miR-204 confines cyclosporine A-induced atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2024;181(5):640-58.
261. Liu J, Liu Y, Wang F, Liang M. miR-204: Molecular Regulation and Role in Cardiovascular and Renal Diseases. *Hypertension.* 2021;78(2):270-81.
262. Djamali A, Samaniego M, Muth B, Muehrer R, Hofmann RM, Pirsch J, et al. Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(4):623-40.
263. Gu XQ, Tang D, Wan P, Qin T, Yang TH, Wu J, et al. Multiple microRNAs regulate tacrolimus metabolism through CYP3A5. *Pharmacol Res.* 2021;164:105382.
264. Freitas RCC, Bortolin RH, Genvigir FDV, Bonezi V, Hirata TDC, Felipe CR, et al. Differentially expressed urinary exo-miRs and clinical outcomes in kidney recipients on short-term tacrolimus therapy: a pilot study. *Epigenomics.* 2020;12(22):2019-34.
265. Quintairos L, Colom H, Millán O, Fortuna V, Espinosa C, Guirado L, et al. Early prognostic performance of miR155-5p monitoring for the risk of rejection: Logistic regression with a population pharmacokinetic approach in adult kidney transplant patients. *PLoS One.* 2021;16(1):e0245880.
266. Borštnar Š, Večerić-Haler Ž, Boštjančič E, Pipan Tkalec Ž, Kovač D, Lindič J, et al. Uromodulin and microRNAs in Kidney Transplantation-Association with Kidney Graft Function. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5592.

## 9 BIOGRAFIJA AUTORA

Katarina Danković (rođ. Dinić) rođena je 12.05.1992. godine u Prokuplju. Završila je Gimnaziju u Prokuplju, prirodno-matematički smer, kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet u Nišu, integrisane akademske studije farmacije, upisala je školske 2011/2012. godine, a diplomirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,73 i diplomskim radom na temu “Personalizovana terapija tumora”. Doktorske akademske studije, smer farmaceutске nauke, upisala je oktobra 2016. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Katarina Danković je položila stručni ispit za diplomiranog farmaceuta maja 2017. godine.

Od aprila 2017. do juna 2020. godine bila je istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije “Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije” (ev. br. III 41018). Od juna 2020. godine, profesionalnu karijeru započinje u oblasti medicinskih sredstava, gde je stekla značajno iskustvo na različitim pozicijama u regulatornim poslovima i obezbeđenju kvaliteta. Njen rad obuhvata usklađivanje sa regulatornim zahtevima i implementaciju najboljih praksi za obezbeđenje usaglašenosti i visokih standarda kvaliteta.

Autor je i koautor više naučnih radova publikovanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja. Najznačajniji radovi iz bibliografije autora:

1. **Danković K**, Stefanović N, Cvetković T, Vujić S, Jović M, Mitić B, Veličković-Radovanović R. Potential influence of interleukin-6 -174G/C gene polymorphism on kidney graft function and tacrolimus dose requirements: five-year follow-up. *Xenobiotica*. 2024;54(10):855–63.
2. Stefanović N, **Danković K**, Cvetković T, Vujić S, Pavlović I, Jevtović-Stoimenov T, Mitić B, Veličković-Radovanović R. Impact of IL-6 and IL-10 genotypes on tacrolimus dose requirements in kidney transplant recipients: Monte Carlo analysis. *Pharmacogenomics*. 2024;25(7):315-27.
3. Stefanović N, Veličković-Radovanović R, **Danković K**, Pavlović I, Catić-Dorđević A, Bašić J, Despotović M, Jevtović-Stoimenov T, Mitić B, Cvetković T. Effect of the Interrelation between CYP3A5 Genotype, Concentration/Dose Ratio and Inpatient Variability of Tacrolimus on Kidney Graft Function: Monte Carlo Simulation Approach. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1970.

4. Stefanović NZ, Veličković-Radovanović RM, **Danković KS**, Mitić BP, Paunović GJ, Cvetković MB, Cvetković TP. Combined Effect of Inter- and Inpatient Variability in Tacrolimus Exposure on Graft Impairment Within a 3-Year Period Following Kidney Transplantation: A Single-Center Experience. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2020;45(6):749-60.
5. Stefanović NZ, Veličković-Radovanović RM, **Danković KS**, Catić-Djordjević AK, Damnjanović ID, Mitić BP, Cvetković MB, Cvetković TP. Insight into the potential influence of inter- and intra-individual variability of tacrolimus exposure on graft function decline in three-year period following kidney transplantation. *Farmacia.* 2020;68(6):1036-46.
6. Veličković-Radovanović R, Catić-Đorđević A, **Dinić K**, Radivojević J, Žikić O, Cvetković T, Mitić B. Metronidazole- and levofloxacin-induced psychotic disorders in chronic kidney patient. *Eur J Hosp Pharm.* 2019;26(6):347-9.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

**POVEZANOST FARMAKOKINETIČKE VARIJABILNOSTI TAKROLIMUSA,  
GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA I EKSPRESIJE MIKRORNA SA  
FUNKCIJOM GRAFTA KOD PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM  
BUBREGOM**

koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivala na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredila autorska prava, niti zloupotrebila intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, \_\_\_\_\_.

Potpis autora disertacije:

*Danković K.*

Katarina S. Danković

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANOG I ELEKTRONSKOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije:

**POVEZANOST FARMAKOKINETIČKE VARIJABILNOSTI TAKROLIMUSA,  
GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA I EKSPRESIJE MIKRORNA SA  
FUNKCIJOM GRAFTA KOD PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM  
BUBREGOM**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za  
unošenje u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu**, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, \_\_\_\_\_.

Potpis autora disertacije:

*Danković.*

Katarina S. Danković

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetu biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

### **POVEZANOST FARMAKOKINETIČKE VARIJABILNOSTI TAKROLIMUSA, GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA I EKSPRESIJE MIKRORNA SA FUNKCIJOM GRAFTA KOD PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM**

Disertaciju sa svim prilogama predala sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)**

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu, \_\_\_\_\_.

Potpis autora disertacije:

*Danković K.*

Katarina S. Danković