



**REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I MJEKËSISË, TIRANË
FAKULTETI I MJEKËSISË
DEPARTAMENTI I FARMACISË**



UNIVERSITETI I MJEKËSISË, TIRANË

**DISERTACION
PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE
DOKTOR**

**“MONITORIMI FARMAKOKINETIK I ACIDIT MYKOFENOLIK, NJË
UDHËZUES PËR ADMINISTRIMIN OPTIMAL TEK PACIENTËT ME
TRANSPLANT RENAL”**

Kandidati:
Mikaela KOLACI

Udhëheqës Shkencor:
Prof. Asc. Dr. Leonard DEDA

TIRANË 2022

**REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I MJEKËSISË, TIRANË
FAKULTETI I MJEKËSISË
DEPARTAMENTI I FARMACISË**

DISERTACION

PARAQITUR NGA Znj. MIKAELA KOLACI

PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE

DOKTOR

**TEMA: MONITORIMI FARMAKOKINETIK I ACIDIT MYKOFENOLIK,
NJË UDHËZUES PËR ADMINISTRIMIN OPTIMAL TEK PACIENTËT ME
TRANSPLANT RENAL**

MBROHET MË DATË:

PARA JURISË:

1. Prof. Dr. LEDJAN MALAJ

KRYETAR

2. Prof. Dr. NDOKË MARKU

ANËTAR (OPONENT)

3. Prof. Asc. KLEJDA HUDHRA

ANËTAR (OPONENT)

4. Prof. Dr. MYFTAR BARBULLUSHI

ANËTAR

5. Prof. Asc. Dr. LAERTA KAKARIQI

ANËTAR

Përmbajtja

Parathënie	vii
Falenderime	ix
Abstrakt	x
Abstract	x
Lista e akronimeve	xii
1.1 Mekanizmi i veprimit i Acidit mykofenolik (AMF)	xiii
1.2 Indikimet dhe roli i MMF në transplantin renal	xiv
1.3 Toleranca ndaj barit	xvi
1.3.1 Çrregullime gastro-intestinale	xvi
1.3.2 Hematotoksiciteti	xvi
1.3.3 Infeksione	xvi
1.4 Metabolizmi dhe Farmakokinetika e mykofenolatit	xvii
1.4.1 Përthithja, shpërndarja	xvii
1.4.2 Metabolizmi	xviii
1.4.3 Eleminimi	xix
2. Faktorët që ndikojnë në ekspozimin e AMF	xx
2.1 Faktorët patofiziologjikë që ndikojnë në farmakokinetikën e AMF	xx
2.1.1 Insufiçenca renale	xx
2.1.2 Insufiçenca hepatike	xxi
2.1.3 Diabeti	xxi

2.1.4 Lidhja e AMF me proteinat	xxi
2.2 Faktorë demografikë që influencojnë farmakokinetikën e AMF	xxii
2.2.1 Gjinia	xxii
2.2.2 Etniciteti	xxii
2.2.3 Pësia	xxiii
2.3 Ndërveprimet me barnat	xxiii
2.3.1 Ndërveprimet me imunosupresivët e tjerë	xxiii
2.3.2 Ndërveprime me barna të tjera	xxiv
2.4 Variabiliteti farmakogjenetik	xxv
2.4.1 Polimorfizimi gjenetik i UGT-së	xxv
2.4.2 Polimorfizmi gjenetik i pompës transportuesve	xxv
2.4.3 Polimorfizim gjenetik i IMPDH	xxv
2.5 Kohëzgjatja e përdorimit dhe farmakokinetika e AMF	xxvi
3. Monitorimi terapeutik i AMF	xxvii
3.1 Principet e monitorimit terapeutik (TDM – Therapeutic drug monitoring)	xxvii
3.1.1 Përkufizim	xxvii
3.1.2 Kërkesat për monitorimin terapeutik	xxvii
3.1.3 Udhëzime për realizimin e monitorimit terapeutik	xxvii
3.1.4 Interpretimi i rezultateve	xxviii
3.1.5 Individualizimi i terapisë	xxix
3.2 Të dhëna nga literatura mbi monitorimin terapeutik të MMF	xxix
3.2.1 Studime të lidhjes përqëndrim/efikasitet të AMF në transplantin renal	xxix

3.2.2 Studime të lidhjes përqëndrim/efekte anësore të AMF në transplantin renal	xxx
3.2.3 Indeksi terapeutik i AMF	xxxi
3.3 Realizimi i Monitorimit terapeutik të AMF	xxxii
3.3.1 Mostra e gjakut	xxxii
3.3.2 Metodat që përdoren për përcaktimin e AMF	xxxii
3.4 Aplikimi i monitorimit terapeutik	xxxiii
4. Metoda analitike	xxxiv
4.1 Metoda bioanalitike	xxxiv
4.1.2 Përzgjedhshmëria (selektiviteti)	xxxiv
4.1.3 Saktësia, përsëritshmëria, rikuperimi	xxxiv
4.1.4 Kurba e kalibrimit	xxxv
4.1.5 Qëndrueshmëria	xxxvii
5. Objektivat dhe qëllimi i studimit	1
6. Përcaktimi i acidit mykofenolik në plazmën e njeriut	2
6.1 Materialet e punës	2
6.2 Pajisjet dhe instrumentat	2
6.3 Tretësira mëmë, tretësirat e punës dhe kontrollet e cilësisë	3
6.4 Tretësira e standartit të brendshëm	4
6.5 Përgatitja e mostrës	4
6.6 Proçedurat e përgatitjes së fazës së lëvizshme	4
6.7 Kushtet kromatografike optimale	4
6.8 Zhvillim dhe validimi i metodës bioanalitike	4

7. Rezultatet	5
7.1 Rezultatet e validimit të metodës për përcaktimin e acidit mykofenolik në plazëm	5
7.1.1 Përzgjedhshmëria (selektiviteti)	5
7.1.2 Lineariteti	7
7.1.3 Kufiri i përcaktimit (KP) dhe kufiri i zbulimit (KZ)	7
7.1.4 Precizioni dhe saktësia	8
7.1.5 Rikuperimi	9
7.1.6 Qëndrueshmëria e acidit mykofenolik në tretësirë ujore dhe plazmë	9
7.1.7 Stabiliteti i metodës	10
8. Monitorimi terapeutik i acidit mykofenolik tek pacientët me transplant renal	11
8.1 Aspekte etike	11
8.1.1 Komiteti i Etikës	11
8.1.2 Udhëzuesit dhe dokumentat bazë	11
8.1.3 Informimi për lejen me shkrim të pjesmarrësit	11
8.2 Plani i punës kërkimore	11
8.2.1 Përzgjedhja e popullatës	11
8.2.2 Mbledhja e të dhënave	12
8.2.3 Karakteristikat e pacientëve në studim	12
8.2.4 Trajtimi i plotë terapeutik	14
8.2.5 Të dhëna nga ekzaminimet laboratorike	16
8.2.6 Shpërndarja e subjekteve (randomizimi)	16
8.2.7 Komplanca e trajtimit	16

8.2.8 Koha e marrjes së mostrës	16
8.2.9 Mbledhja e mostrës	16
8.2.10 Trajtimi i mostrës biologjike	16
8.2.11 Rezultatet <i>in vivo</i> të përcakimit të acidit mykofenolik në plazëm	17
9. Analiza statistikore	25
10. Diskutime	26
11. Përfundime	29
12. Referencat	30

Parathënie

Transplanti i organeve, përvec suksesit të madh, shoqërohet me rrezikun e flakjes së organit për shkak të aktivizimit të sistemit imunitar ndaj graftit. Për të parandaluar flakjen akute ose kronike përdoren barnat imunosupresive. Ekzistojnë disa grupe imunosupresivësh që në shumicën e rasteve përdoren në një terapi të kombinuar, kortikosteroid, ciklosporinë ose takrolimus dhe mykofenolat.

Kortikosteroidet, si beklometazoni, prednizoni dhe metilprednizoloni shfaqin efekte imunosupresive dhe anti-inflamatore. Keto barna ulin ndjeshmërinë e receptorëve të indeve dhe frenojnë formimin e antigjeneve, citokinave dhe proliferimin e limfociteve duke parandaluar flakjen. Takrolimusi është imunosupresiv i cili parandalon flakjen duke frenuar limfocitet T. Ai përdoret për terapinë afat-gjatë mbajtëse pas transplantit.

Acidi mykofenolik (AMF) është metaboliti aktiv i dy barnave mykofenolat mofetil (MMF, Cellcept®) dhe mykofenolat natriumi (EC-MPS, Myfortic®) të cilat përdoren gjërësisht si barna imunosupresive në transplantin e organeve në doza fikse ditore.

Variabilitetit i shfaqur tek i njëjti pacient dhe midis pacientëve ndaj ekspozimit të AMF është i gjërë në krahasim me dritaren e propozuar terapeutike të AMF AUC₀₋₁₂ (30-60 mg*h/L). Faktorët të cilët ndikojnë në farmakokinetikën e AMF janë karakteristika të pacientit si koha pas transplantit, përqëndrimi i albuminës, funksioni renal, administrimi njëkohësisht i barnave të tjera dhe faktorë të tjerë farmakogjenetikë. Ekspozimi ndaj acidit mykofenolik (AMF) lidhet ngushtë me rrezikun e shfaqjes së flakjes akute të transplantit.

Monitorimi farmakokinetik i AMF ka dhënë rezultate pozitive përse i përket uljes së variabilitetit tek i njëjti pacient të niveleve të AMF. Në literaturën e publikuar shkencore paraqiten tre studime të mëdha prospektive të cilat krahasojnë terapinë me përqëndrim të kontrolluar të mykofenolat mofetil me terapinë me dozë fikse. Rezultatet e këtyre studimeve janë të ndryshme dhe konfliktuale për këtë arsye nevojitet një shtrirje me e gjatë në kohë për të qartësuar rolin e monitorimit terapeutik në rritjen e potencialit terapeutik të MMF dhe në klinikën e transplantit renal.

Qëllimi i këtij studimi është monitorimi i acidit mykofenolik tek të transplantuarit me veshkë gjatë viteve 2014-2018 të cilët ndiqen në Qendrën Spitalore Universitare “Nënë Tereza”. Ky studim u realizua në laboratorin e Farmakologjisë të Universitetit të Mjekësisë në bashkëpunim me Shërbimin e Nefrologjisë dhe Qendrën Kombëtare të Transplantit.

Për realizimin e monitorimit të AMF u zhvillua dhe u validua metoda HPLC për përcaktimin e acidit mykofenolik në plazëm e kombinuar me precipitimin e proteinave. Kjo metodë u aplikua për monitorimin terapeutik të AMF tek 21 pacientë me transplant renal. Rezultatet e monitorimit terapeutik tregojnë një variabilitet të konsiderueshëm përse i përket përqëndrimeve para-dozë të AMF.

Monitorimi terapeutik i AMF mund të kontribuojë në optimizimin e trajtimit terapeutik në mënyrë që të ulen rreziku i shfaqjes së toksicitetit që lidhet me barin dhe rreziku i flakjes së transplantit.

Falenderime

Faleminderit Prof. Leonard Deda për përkushtimin, besimin, humorin e mirë dhe këshillat e vlefshme. Kjo temë u realizua veçanërisht falë eksperiencës dhe pasionit tuaj për kërkimin shkencor.

Dëshiroj të shpreh mirënjohjen time ndaj stafit të Shërbimit të Nefrologjisë për bashkëpunimin dhe ndihmën për mbledhjen e të dhënave.

Falenderoj pjesëtarët e kësaj jurie të cilët pranuan të marrin pjesë në mbrojtjen e këtij disertacionit.

Ky punim ju dedikohet të gjithë pacientëve të transplantuar të ndjekur në Shërbimin e Nefrologjisë në Qendrën Spitalore Universitare “Nënë Tereza”.

Abstrakt

Mykofenolat mofetil dhe metaboliti i tij aktiv janë barna imunosupresive të cilat përdoren në transplantin e organeve në dozë të caktuar në kombinim me ciklosporinën, takrolimusin dhe kortikosteroidet. Monitorimi terapeutik i përqëndrimit të acidit mykofenolik është sugjeruar të optimizojë terapinë duke ulur flakjen dhe toksicitetin e shkaktuar nga barnat në transplantin renal. Qëllimi i këtij studimi është të përcaktojë përqëndrimin para-dozë të acidit mykofenolik tek pacientët e transplantuar me veshkë me metodën e kromatografisë së lëngshme me performancë të lartë HPLC për të vlerësuar variabilitetin interindividual bazuar në rangun terapeutik. Metoda kromatografike HPLC kombinuar me precipitim të proteinave u validua për përcaktimin e acidit mykofenolik në plazëm në 21 pacientë me transplant renal. Analiza kromatografike u realizua duke përdorur sistemin kromatografik Agilent Technologies 1200 DAD. Mostrat u injektuan manualisht dhe përbëresit u ndanë në kolonën analitike LiChrosphere® select B C18. Faza e lëngshme ishte 45:55 (v/v) acetonitril-bufer fosfat, pH 2.5, rrjedhja nëpër kolonë bëhet në presion me fluks 1.0 ml/min dhe temperaturë të kolonës 30°C. Detektimi u realizua në 215nm. Mostrat e gjakut u mblodhën në tuba me EDTA dhe u ndanë në 6000 g për 10 minuta. 200µL plazëm u transferua në një tub, u shtua 10µL naproksen si standard i brendshëm dhe 400µL acetonitril (v/v) si agjent i precipitimit të proteinave. Secili tub u përziej me vortex për 30 sekonda dhe u centrifugua për 10 min në 10000 rpm. 20 µL e supernatantit u injektua në sistemin HPLC për analizë. Metoda tregoi linearitet të përshtatshëm për acidin mykofenolik me koeficient korrelimi me të madh se 0.999. U vu re variabilitet i lartë midis pacietëve me 18% të pacientëve brenda rangut terapeutik, 27% të pacientëve nën rangun terapeutik dhe 54% mbi rangun me rrezik për toksicitet. Monitorimi terapeutik i acidit mykofenolik mund të kontribuojë në menaxhimin me të mirë të të transplantuarve duke mundësuar optimizimin e terapisë me qëllim uljen e rrezikut të flakjes së organit dhe toksicitetin të lidhur me përdorimin e acidit mykofenolik.

Fjalë kyc: barna imunosupresive, variabilitet ndërindividuale, përqëndrim paradozë, precipitim i proteinave.

Abstract

Mycophenolate mofetil and its active metabolite mycophenolic acid are routinely used as immunosuppressant drugs in solid organ transplantation in a fixed daily dose regimen in association with cyclosporine, tacrolimus and steroids. Therapeutic drug monitoring for mycophenolic acid concentration has been suggested to optimize outcomes by reducing rejection and drug related toxicities in clinical renal transplantation.

The aim of this study is to determine the predose concentration of mycophenolic acid in renal transplanted patients by a validated proposed high-performance liquid chromatography HPLC method and to estimate the interindividual variability based on the therapeutic target.

The HPLC method combined with protein precipitation has been validated for mycophenolic acid determination in the human plasma obtained from 21 renal transplant recipients. HPLC analysis was carried out using the chromatographic system

Agilent Technologies 1200 DAD. Samples were injected manually, and the compounds were separated on a LiChrosphere® select B C18 analytical column. The mobile phase was 45:55 (v/v) acetonitrile-buffer phosphate, pH 2.5, flow rate of 1.0 mL/min and column temperature of 30°C. Detection was performed at 215 nm. Whole blood samples were collected into vacutainers containing EDTA and separated at 6000 g for 10 minutes. A 200 µL aliquot of patient plasma was transferred to a tube, followed by addition of 10 µL naproxen as internal standard and 400 µL of acetonitrile (v/v) as a protein precipitating agent. Each tube was vortex-mixed for 30 sec and then centrifuged for 10 min at 10000 rpm. 20 µL of the supernatant was injected into the HPLC system for analysis. The method showed appropriate linearity for MPA with correlation coefficient greater than 0.999. High inter-patient variability is observed with 18% of patients within the target trough concentration range, 27% of patients below the target trough concentration range and 54% over the range with risk of toxicity. Therapeutic monitoring of MPA might contribute to a better management of renal transplant recipient with the goal of optimizing therapeutic regimens in order to reduce the risk of rejection and MPA-related toxicity.

Keywords: immunosuppressive drugs, interindividual variability, predose concentration, protein precipitation.

Lista e akronimeve

AMF: acid mykofenolik

AMFaG: acil-glukuronid i acidit mykofenolik

AMFG: glukuronid i acidit mykofenolik

ACN: acetonitril

C_0 : përqëndrim para-dozë

CV: koeficient variacioni

DS: deviacion standard

DSR: deviacion standard relativ

EC-MPS: mykofenolat natriumi, tabletë e veshur enterike (Myfortic®)

GS: gabimi standard

IMPDH: Inozinë Monofosfat Dehidrogjenazë

HPLC-UV: kromatografi e lëngët me performancë të lartë me spektrofotometri ultraviolet

KPM: kufiri i poshtëm i matjes

KC: kontroll cilësie

KZ: kufiri i zbulimit

KP: kufiri i përcaktimit

MMF: mykofenolat mofetil (Cellcept®)

PVN: Polyomavirus-associated nephropathy

TDM: Therapeutic Drug Monitoring, Monitorimi terapeutik

$AUC_{0-\infty}$: Sipërfaqja nën lakore e përqëndrimit plazmatik ndaj kohës, nga zero deri në infinit.

AUC_{0-t} : Sipërfaqja nën lakore e përqëndrimit plazmatik ndaj kohës, nga koha zero deri në përqëndrimin e fundit matës.

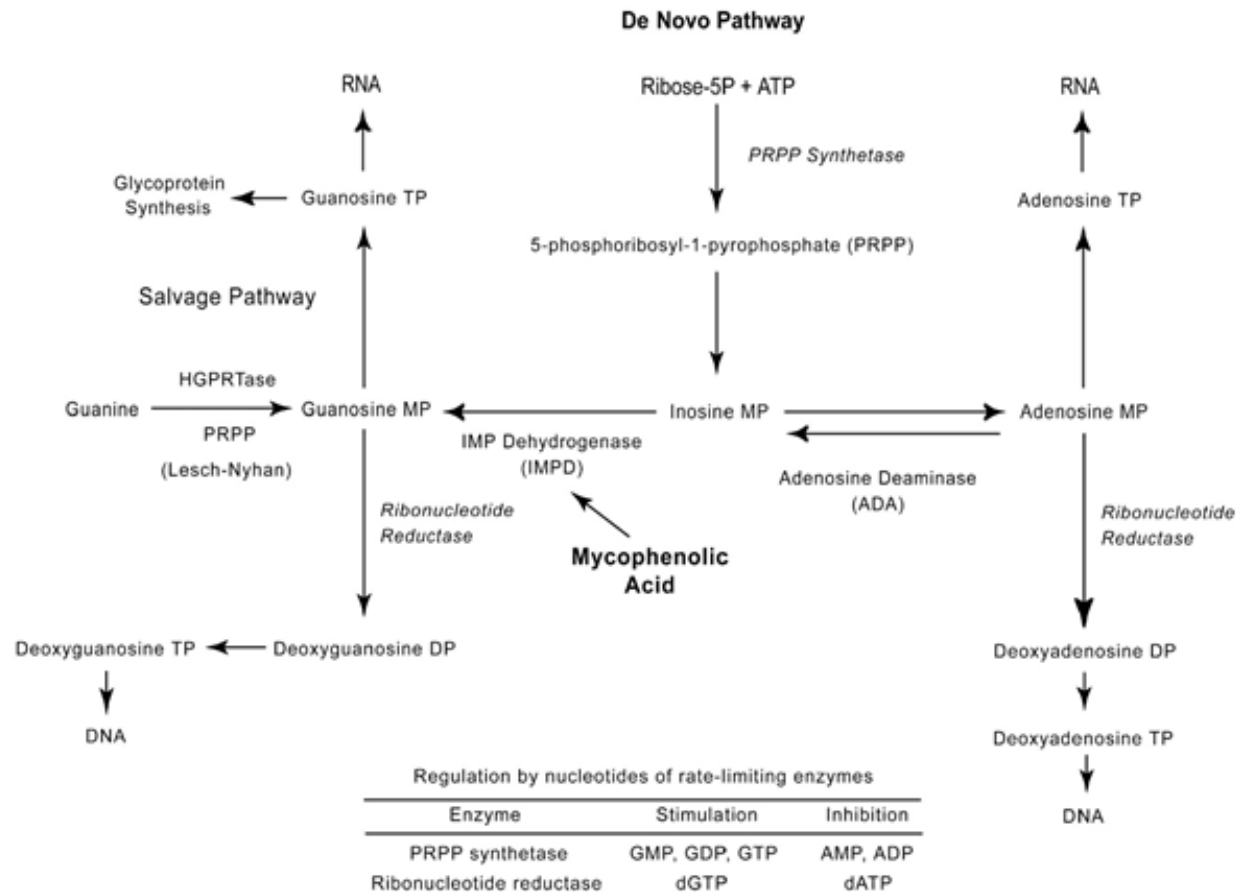


Figura 2. Mekanizmi i veprimit të acidit mykofenolik (AMF)

Këtij frenimi selektiv të profilerimit limfocitar, i bashkëngjiten dhe karakteristika të tjera specifike si frenimi i prodhimit të antittrupave dhe frenimi i shprehjes së molekulave të adezionit që e bëjnë AMF një imunosupresor veçanërisht interesant (6).

Duke u nisur nga fakti se IMPDH paraqet një variabilitet interindividual të rëndësishëm, matja e aktivitetit enzimatik të IMPDH-së u propozua nga disa autorë me qëllim individualizimin e trajtimit me MMF (‘monitorim farmakodinamik’).

Nivele të larta të aktivitetit të IMPDH-së lidhen me flakjen akute, fakt i cili sugjeron nevojën për individualizimin e dozës bazuar në aktivitetin e IMPDH-së (9). Enzima IMPDH konsiston në dy izoforma, tip I dhe tip II. AMF shfaq afinitet 5-herë më të madh për izoformën IMPDH-II nga IMPDH-I (10). Si rrjedhojë analiza farmakogjenetike e IMPDH-II mund të luajë rol të rëndësishëm në individualizimin e terapisë me MMF dhe EC-MPS.

1.2 Indikimet dhe roli i MMF në transplantin renal

Mykofenolat mofetil (MMF, Cellcept®) është një bar imunosupresiv i cili përdoret tek pacientët e transplantuar me veshkë, me zemër dhe hepar. MMF është përdorur për herë të parë në vitin 1995 në parandalimin e flakjes akute tek të transplantuarit me veshkë

me protokoll mjekimi 1 g nga goja dy herë në ditë (11). Efikasiteti i *Cellcept®* u vendos gjatë tre studimeve ku u përfshinë 1500 pacientë, të zhvilluar në disa qendra, të kontrolluar ndaj azathioprinës ose placebo. Kriteri kryesor i gjykimit ishte shpeshtësia e flakjes akute të provuar histologjikisht apo ndërprerjes së trajtimit (si rezultat i vdekjes, humbjes së transplantit, apo daljes të parakohshme nga studimi) gjatë 6 muajve të parë (12-14). Këto tre studime treguan se terapia me MMF e shoqëruar me glukokortikoide dhe Ciklosporinë ul në mënyrë të konsiderueshme shpeshtësinë e flakjes akute në krahasim me kombinimin Ciklosporinë, Glukokortikoide dhe Azathioprinë ose placebo (Tabela 1).

	PLA/AZA	MMF 2 g	MMF 3 g
Patients enrolled	498	505	490
First biopsy-proven rejection (%)	203 (40.8)	100 (19.8) ^b	81 (16.5) ^b
Grade I	84 (16.9)	50 (9.9)	41 (8.4)
Grade II	92 (18.5)	41 (8.1)	30 (6.1)
Grade III	27 (5.4)	9 (1.8)	10 (2.0)
Patients with biopsy-proven rejection or treatment failure (%)	268 (53.8)	186 (36.8%) ^c	194 (39.6%) ^c

^a Biopsy-proven rejection was indicated by core biopsy of Banff severity >1. Treatment failure occurred if patient terminated prematurely.
^b $P < 0.0001$ for pairwise comparisons between MMF 2 g vs. PLA/AZA and MMF 3 g vs. PLA/AZA (competing risk analysis using proportional hazards regression, 97.5% confidence intervals).
^c $P < 0.002$.

TRANSPLANTATION

Tabela 1. Halloran et. al Transplantation 1997

Të dhënat e studimit mbi efikasitetin nga Holloran et. al, tregojnë një ulje të konsiderueshme të raportit të flakjes tek të transplantuarit me veshkë nga 40.8% të trajtuar me placebo ose azathioprinë në 19.8 dhe 16.5% për grupin e trajtuar me MMF 2 g dhe 3 g, respektivisht (15).

Terapia immunosupresive pas transplantit renal ka ndryshuar vitet e fundit nga kombinimi azathioprinë, ciklosporinë A (CsA) dhe kortikosteroide në kombinimin e MMF, takrolimusit dhe kortikosteroidëve. Në të njëjtën kohë raporti i flakjes posttransplant është ulur nga ~40% në 20% në periudhën 1995-2001 (16).

Aktualisht, në Shqipëri janë të disponueshme dy lloje barnash të cilat përmbajnë mykofenolat: mykofenolat mofetil dhe mykofenolat natriumi tabletë enterike (EC). *Cellcept®*, me lëndë aktive mykofenolat mofetil, formë farmaceutike tabletë e veshur me film prej 500mg më Mbajtës të Autorizimit për Tregtim Roche dhe *Myfortic®*, me lëndë aktive mykofenolat natriumi me formë farmaceutike tabletë gastro-rezistence prej 180mg dhe 360mg me Mbajtës të Autorizimit për Tregtim Novartis. Të autorizuar janë respektivisht dhe zhenerikët e tyre përkatës.

1.3 Toleranca ndaj barit

Efektet kryesore të padëshiruara të shaktuara nga përdorimi i acidit mykofenolik janë gastro-intestinale, hematologjike dhe shfaqja e infeksioneve. Të dhënat e tolerancës janë rezultat i tre studimeve të gjëra të zhvilluara për marrjen e autorizimit për tregtim të barit në vitin 1996. Këto studime prospektive u zhvilluan në 55 qendra të transplantit në tre kontinentet dhe ishin të parat studime të mëdha të zhvilluara ndonjëherë për transplantin. Rezultatet e tyre vendosën bazën e protokollit të përdorimit të MMF në kombinim me ciklosporinën dhe kortikosteroidët për transplantin renal (98).

1.3.1 Çrregullime gastro-intestinale

Në studimin European, ku u përfshinë 491 pacientë, shfaqja e efekteve të padëshiruara gastro-intestinale ishte më e rëndësishme tek grupi i trajtuar me MMF në krahasim me grupin e trajtuar me placebo. Diarreja përben efektin kryesor të padëshiruar. Nauzeja dhe të vjellat u raportuan më shpesh në grupin e trajtuar me MMF në krahasim me grupin që përdori placebo. Hemorragjitë digjестive, perforimet intestinale dhe pankreatiti gjithashtu u vunë re tek disa pacientë (12).

Në studimin trikontinental dhe atë amerikan me pacientë të transplantuar me veshkë që krahason mykofenolat mofetilin me azathioprinën, shfaqja e efekteve anësore zinte një vend të rëndësishëm dhe ishte e ngjashme për të dy grupet e trajtimit. Nga ana tjetër, shpeshtësia e shfaqjes së efekteve gastro-intestinale ishte më e lartë në grupin e trajtuar me MMF, duke pasur nevojë më shpesh për ulje të dozave, apo të ndërprerjes së përkohshme apo përfundimtare të barit (13,14).

1.3.2 Hematotoksiciteti

Nga studimi European u evidentua një raport i lartë i efekteve të padëshiruara hematologjike të shfaqura në grupin e trajtuar me MMF në krahasim me placebo (12). Ashtu si dhe në studimin trikontinental, këto efekte i referohen kryesisht leukopenisë dhe anemive të cilat largohen pas uljes së dozës apo ndërprerjes së trajtimit (13). Gjithashtu, janë raportuar trombocitopenia, agranulocitoza, pancitopenia si dhe sindroma limfoproliferative.

1.3.3 Infeksione

Të gjithë pacientët e transplantuar janë të rrezikur që tju shfaqen infeksione rastësore (17,18). Në të tre studimet e zhvilluara për të vlerësuar efikasitetin e MMF (2g ose 3g në ditë) tek pacientët e transplantuar me veshkë, infeksionet më të shpeshta të raportuara pas 1 viti ishin infeksione të tipit të kandidozave të lëkurës dhe mukozave, infeksione urinare, viremi, sindroma të citomegalovirusit dhe infeksione nga herpes. Gjithashtu, përdorimi i MMF dhe takrolimusit lidhet vitet e fundit me shfaqjen e infeksioneve nga

virusi BK (5% e të transplantuarve renalë) (19) shkaktar i nefropatisë dhe ndryshimeve të funksionit të transplantit për një kohë të gjatë (17, 19-21).

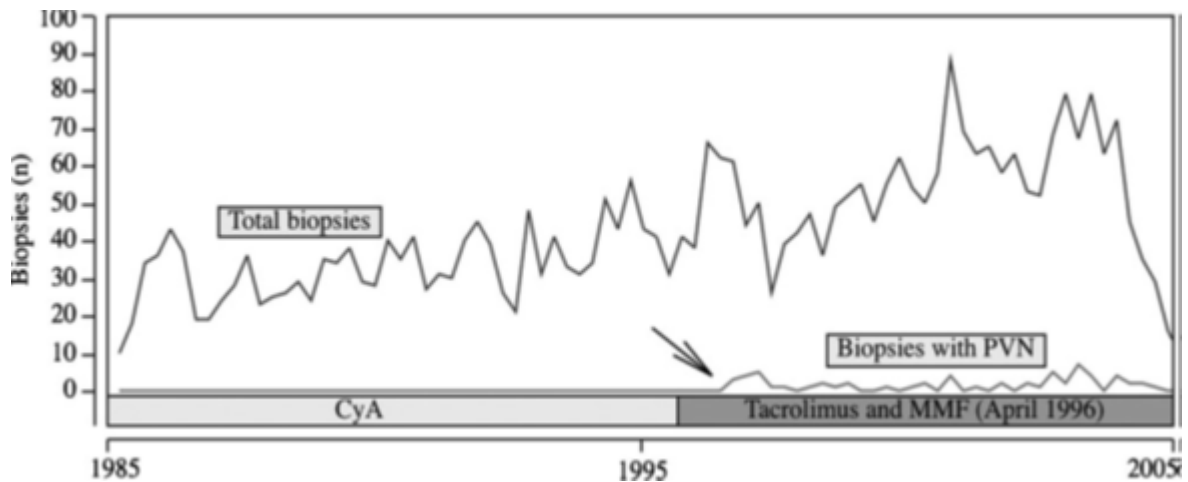


Figura 3. Biopsi me/pa PVN në varësi të terapisë për një periudhë 20 vjeçare, CyA = ciclosporina-A, MMF = mykofenolat mofetil, PVN = nefropati e shoqëruar me poliomavirus.

1.4 Metabolizmi dhe Farmakokinetika e mykofenolatit

1.4.1 Përthithja, shpërndarja

Pas administrimit nga goja, mykofenolat mofetil (MMF) dhe mykofenolat natriumi (EC-MPS) përthithen me shpejtësi dhe plotësisht dhe hidrolizohen në acid mykofenolik (AMF) e cila është dhe lënda vepruese. Përqëndrimi maksimal pas administrimit të MMF arrihet brenda 1-2 orëve, ndërsa pas administrimit të EC-MPS brenda 0.25- 1.25 orëve. Gjysëm jeta plazmatike mesatare varion nga 9 deri në 17 orë. AMF në plazëm shfaq një pik të mprehtë afërsisht 1 orë pas administrimit dhe një pik të dytë 6 deri 12 orë pas administrimit. Biodisponibiliteti mesatar i acidit mykofenolik të administruar si MMF nga goja, u vlerësua si 94.1% në krahasim me biodisponibilitetin e barit të administruar me rrugë parenterale (IV) (22,23) Mykofenolat natriumi (EC-MPS) paraqet një biodisponibilitet prej 72%. Në gjak, AMF lidhet me albuminat (97%). Efekti farmakologjik i AMF është rezultat i përqëndrimit të lirë të barit (24).

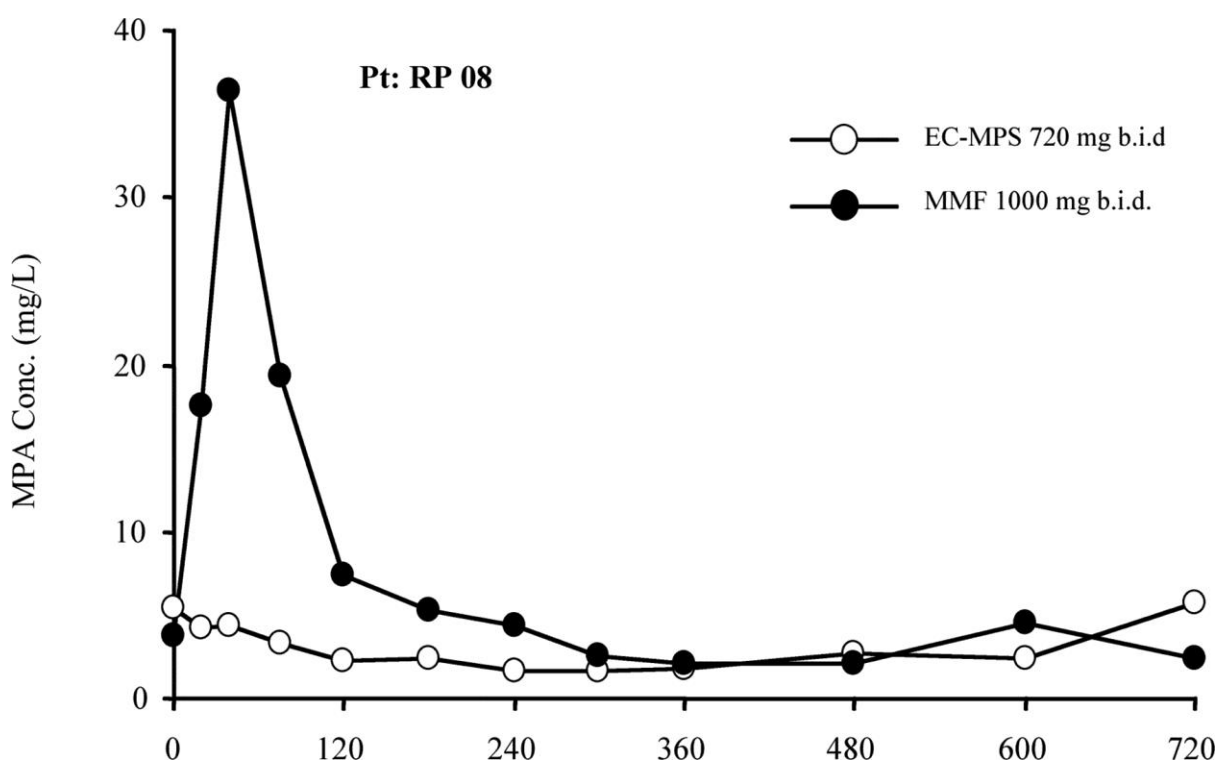


Figura 4: Profili farmakokinetik ditor i përqëndrimeve të MPA tek një pacient i transplantuar me veshkë pas kalimit nga terapia me EC-MPS në MMF¹.

1.4.2 Metabolizmi

Metabolizmi i AMF është kryesisht hepatic pas kapjes nëpërmjet transportuesve influx të tipit OATP (25). Një pjesë e vogël gjithashtu realizohet në nivel intestinal dhe renal (26,27,28). Përveç metabolizmit minor të fazës I ndërmjet (CYP 3A4, 3A5 dhe 2C8 të CYP450) që rezulton në 6-O-desmetil AMF (M3) të përshkruar nga Picard në 2004 (26), metabolizmi hepatic i AMF përfshin kryesisht reaksione të fazës II me ndërmjetimin e uridil-glukoronil transferazave (UGT) dhe uridil-glukozidil transferazave. Formohen kështu tre metabolitë kryesorë (figura 1):

- AMF-7-O-glukuronidi (AMF-fenil-glukuronidi ose AMFG) metabolit farmakologjikisht jo aktiv: 95% e AMF është e lidhur me glukuronidin si AMFG nga disa izoforma të UGT nga të cilat izoforma 1A9 siguron e vetme prodhim e 55% të AMFG në nivel hepatic (27,28, 29, 30). UGT1A7, 1A8 dhe 1A10 marrin pjesë gjithashtu në metabolizëm por në një nivel më të ulët.
- Acil-glukuronidi i AMF (AcAMFG ose M-2) i prodhuar kryesisht nga UGT2BT si dhe UGT1A1 (rrugë minore), është një metabolit aktiv karakteristika inflamatorë *in vitro* të së cilit lejojnë të supozohet se kjo molekulë ka një rol të rëndësishëm në toksicitetin gastro-intestinal dhe hematologjik (30,31,32). Kjo rrugë metabolike përfaqëson 5% të metabolizmit të AMF (30).

¹ Cattaneo et al. Pharmacokinetics of Mycophenolate sodium and comparison with Mofetil formulation in stable kidney transplant recipients.

- 7-O-glukozidi i AMF (M-1), produkt i lidhur me AMF nga një β -glukozidazë (33,34). (Figura 5)

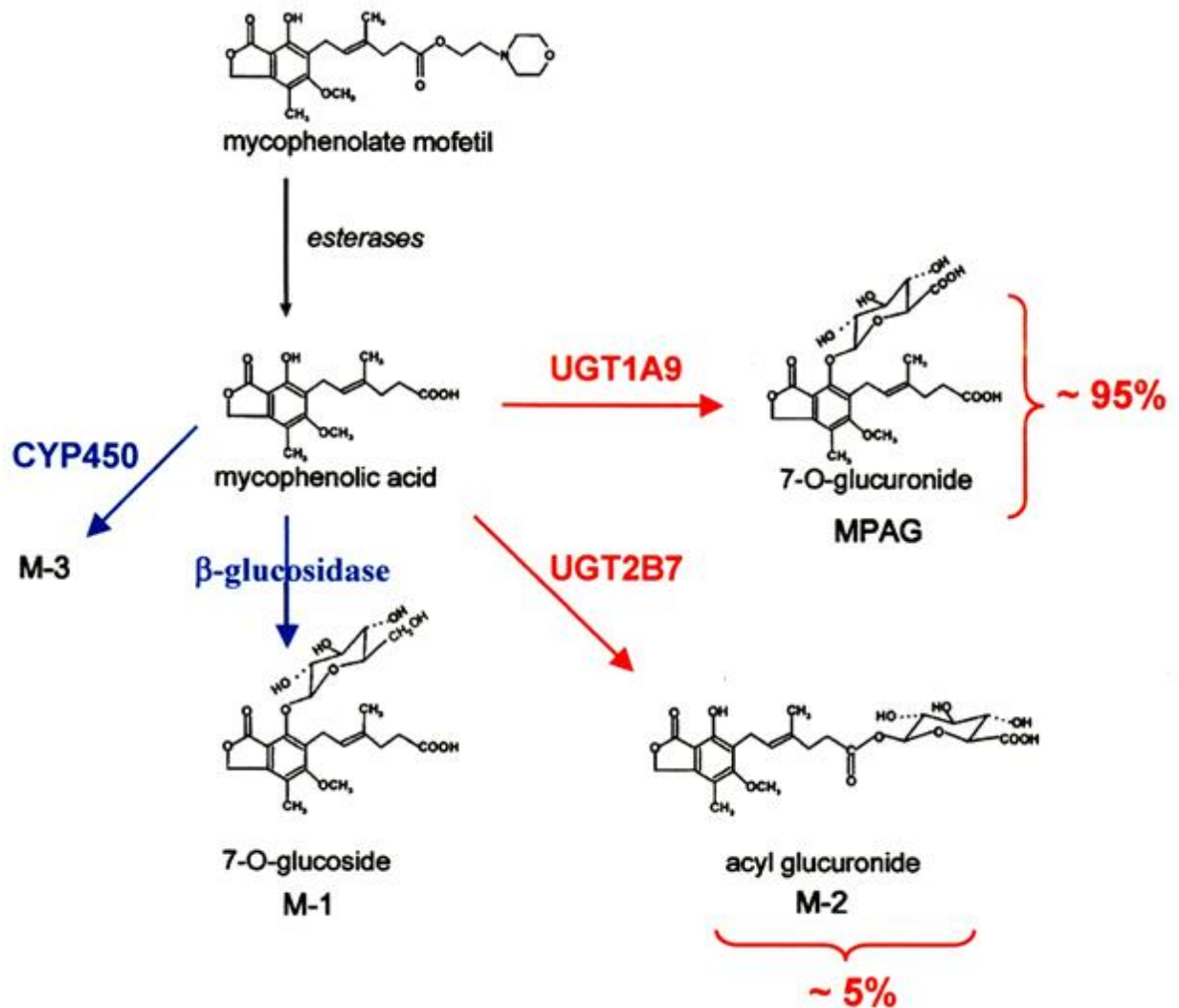


Figura 5: Rrugët kryesore enzimatiske të metabolizmit të AMF.²

1.4.3 Eleminimi

Metabolitët e glukorinuar dhe glukoziduar të acidit mykofenolik eliminohen nëpërmjet rrugëve biliare. Në zorrë, AMFG dekonjugohet pjesërisht nga flora bakteriale dhe ripërthithet si acid mykofenolik duke nxitur kështu një cikël enterohepatik që është përgjegjës për 40% të sipërfaqes totale nën lakore të AMF (27). Ky fenomen shpjegon pjesërisht kinetikën e veçantë me shfaqjen e një piku të dytë plazmatik, 6 dhe 12 orë pas administrimit të barit (30). Bazuar në një studim në Japoni, riqarkullimi i AMF është më i lartë gjatë natës duke u krahasuar me atë gjatë ditës (36).

Pas administrimit nga goja, 93% e dozës së MMF eliminohet nëpërmjet urinës, kryesisht në formën e AMFG (87%) me filtrim glomerular dhe sekretim tubular që implikojnë transportues aktivë të efluksit të tipit MRP2 (78). Vetëm 6% e dozës

² Shipkova et al. (Br. J. Pharmacology 1999).

eliminohet me feçen (30) dhe gjysëm jeta mesatare e eliminimit të AMF është afërsisht 17 orë (38).

2. Faktorët që ndikojnë në ekspozimin e AMF

Përgjigjia farmakologjike e AMF paraqet një variabilitet të madh inter-individual, jo vetëm në planin farmakokinetik por gjithashtu edhe në planin farmakodinamik, duke ekspozuar pacientët nën trajtim ndaj disa efekteve të padëshiruara për shkak të përqëndrimeve të larta në plazëm ose ndaj flakjes së transplantit si rezultat i përqëndrimeve plazmatike të ulta, duke justifikuar në këtë mënyrë monitorimin terapeutik. Monitorimi terapeutik mund të realizohet me përcaktimin e një mini-AUC (3 pika, marrje e gjakut në kohë të ndryshme të përcaktuara) për të vlerësuar AUC_{0-12h} të AMF (vlerësim Bayesiane) (39) ose përcaktimin e përqëndrimit në gjak të AMF para marrjes së dozës së radhës.

Faktor i rëndësishëm që ndikon në variabilitetin e përqëndrimit luan dhe farmakokinetika e veçantë e AMF, përthithja në formën e prodrogës, metabolizmi hepatic dhe cikli entero-hepatic. Gjithashtu një numër faktorësh të tjerë mund të ndryshojnë hapat e fatit të tij në organizëm. Këto burime të variabilitetit mund të jenë me natyrë fiziopatologjike, ambientale ose gjenetike.

2.1 Faktorët patofiziologjikë që ndikojnë në farmakokinetikën e AMF

2.1.1 Insufiçenca renale

Një numër i madh i pacientëve të transplantuar me veshkë paraqesin një ndryshim progresiv të funksionit të transplantit të lidhur me mekanizma imunologjikë, toksikë dhe metabolikë (18,40). Ndikimi i insufiçencës renale në farmakokinetikën e AMF është vlerësuar tek pacientët e transplantuar me veshkë pas administrimit oral të një doze të vetme (1g) të MMF (41). Ekspozimi ndaj AMF tek pacientët e prekur nga insufiçenca renale nuk dallon në mënyrë të konsiderueshme nga pacientët e shëndetshëm. Nga ana tjetër, përqëndrimet e AMFG u rritën me një faktor 3 deri 6 tek pacientët me debi të filtrimit glomerular më të ulët se 25 mL/min.

Rritja e kreatininës në serum dhe ulja e filtrimit glomerular shoqërohen me ulje të niveleve predozë të AMF (42). Insufiçenca renale çon në rritje të ekspozimit të fAMF për shkak të niveleve të larta të AMFG (24,43,44). Në një model farmakokinetik të një popullate, ulja e klerancës së kreatininës ndërlidhet ndjeshëm me rritjen e klerancës të AMF (45). Kleranca e kreatininës përbën 19% të variabilitetit intra-individual të klerancës të AMF (46). Në përgjithësi, mosfunksionimi i veshkave çon në ulje të përqëndrimeve të AMF, rritje të përqëndrimeve të AMFG dhe rritje të fraksioneve të lira të AMF.

2.1.2 Insuficienca hepatike

Ndikimi i funksionit hepatic në farmakokinetikën e AMF nuk është shumë i studiuar. Pas një studimi të zhvilluar tek pacientët e prekur nga ciroza alkoolike mesatarisht e rëndë, ekspozimi ndaj AMF dhe AMFG nuk ndikohet nga prekja e parenhimës hepatike (27,47). Gjithashtu, defiqiti i glukuronimit hepatic kompensohet nga rritja e glukuronimit në nivel renal (27,47). Përgjithësisht, nuk nevojitet adaptim i veçantë i dozës së MMF tek të transplantuarit me veshkë të prekur nga sëmundje të parenhimës hepatike (27).

2.1.3 Diabeti

Në një analizë retrospektive të të dhënave RCCT u analizua ndikimi i diabetit në farmakokinetikën e AMF. Rezultatet nuk treguan ndryshime të konsiderueshme të ekspozimit ndaj AMF (AUC_{0-12} , eliminimi dhe C_{max}) midis pacientëve të transplantuar diabetikë ($n=7$) dhe jodiabetikë ($n=12$). Ditën e 11 pas transplantit, kishte një ndryshueshmëri të konsiderueshme në T_{max} të AMF midis 6 diabetikëve dhe 125 jodiabetikëve (1.59 orë për pacientët me diabet dhe 0.67 orë për ata që nuk vuajnë nga diabeti, $p=0.04$) (48).

Një studim farmakokinetik i zhvilluar në popullatë për 4 pacientë të transplantuar renalë konfirmoi një T_{max} të rritur tek pacientët me diabet ($p=0.045$) (49). Rritja e T_{max} shkaktohet probablisht si rezultat i përthithjes së ngadaltë për shkak të gastroparesis (49). Ky ndryshim nuk ndikon në ekspozimin e përgjithshëm të AMF tek pacientët me diabet, pra efekti i T_{max} nuk lidhet me të dhënat klinike. Studime të tjera nuk kanë gjetur ndryshime në ekspozimin me AMF midis pacientëve që vuajnë ose jo nga diabeti pas transplantit renal (58,59).

2.1.4 Lidhja e AMF me proteinat

AMF është një bar që lidhet gjërësisht me proteinat ($\pm 97\%$). AMF lidhet në mënyrë të kthyeshme me albuminat e serumit. Ashtu si barnat e tjera, pjesa e lirë mendohet të jetë përgjegjëse për efektin imunosupresiv të AMF (11). Rritja e ekspozimit ndaj AMF së lirë shkaktën një rrezik të rritur të disa efekteve anësore që lidhen me MMF (60,61). Eliminimi i AMF gjithashtu lidhet me fraksionin e lirë të tij (62).

Fraksioni i lirë i AMF varet nga përqëndrimi i albuminave në serum dhe funksionit renal të pacientit. Një përqëndrim i lartë i albuminave lidhet me ulje të fraksionit të lirë dhe të AUC_{0-12} të fAMF (23, 26, 62). Niveli i AMF të lirë është i lartë tek pacientët me mosfunksionim të mirë renal (45, 51). Lidhja e AMF me proteinat është me e ulët tek pacientët me mosfunksionim të mirë renal për arsye të efektit të uremisë dhe rritjes së AMFG, e cila *in vitro* ka treguar se konkuron për vendet e lidhjes së AMF tek albuminat (45). Gjithashtu, në një popullatë me pacientë pediatrikë, mosfunksionimi i mirë renal dhe nivelet e ulta të albuminave shoqërohen me rritje të pjesës së lirë dhe AUC -së së pjesës së lirë (60). Ulja e niveleve të fAMF çon në reduktim të eliminimit të AMF dhe rritje të niveleve të përgjithshme të AMF (30, 63). Ndikimi i përqëndrimit të

albuminave në eliminimin e AMF dhe ekspozimit u vendos në dy modele farmakokinetike në popullata (45,58).

2.2 Faktorë demografikë që influencojnë farmakokinetikën e AMF

2.2.1 Gjinia

Në një numër të konsiderueshëm studimesh është vërejtur një lidhje e rëndësishme midis farmakokinetikës së AMF dhe gjinisë (64, 65, 45). Morissette et al. kanë gjetur ndryshime të raportit AMFG: AMF në gjini të ndryshme. Raporti mesatar AMFG: AMF ishte më i lartë tek burrat në krahasim me gratë (64). Borrows et al. ka gjetur nivele më të larta predozë tek gratë e transplantuara me veshkë në krahasim me burrat ($p=0.002$) (65). Lidhja midis faktorëve dhe parametrave farmakokinetikë janë studiuar duke zhvilluar një model farmakokinetik në popullatë për AMF pas administrimit oral të MMF. Në modelin përfundimtar tregohet se meshkujt kanë një eliminim 11% më të lartë se femrat (45). Studime të tjera nuk kanë gjetur ndikim të gjinisë në farmakokinetikën e AMF (49,50,59). Në një studim, AUC mesatare tek femrat ishte me e lartë se te meshkujt, por kjo diferencë nuk ishte e konsiderueshme (raporti femra: meshkuj=1.094; 90% intervali i besueshmërisë [CI]: 0.975-1.228) (59). Në tërësi, rezultatet e studimeve janë konfliktuale.

2.2.2 Etniciteti

Pacientët e transplantuar me veshkë me prejardhje Afrikano-Amerikane (AA) dihet se janë në rrezik më të lartë për shfaqjen e episodeve akute të flakjes në fazën fillestare (51). Duke pasur parasysh rrezikun e flakjes akute të krahasuar me Kaukazianët të transplantuarit Afrikano-Amerikanë përfitojnë më pak nga trajtimi me MMF. (52) Tek të transplantuarit Afrikano-Amerikanë nevojitet një dozë më e lartë e MMF (1.5g dy herë në ditë) në krahasim me Kaukazianët (1g dy herë në ditë) në mënyrë që të arrihet një përfitim i konsiderueshëm në flakjen akute (51). Ndryshueshmëria në klinikë midis pacientëve Afrikano-Amerikane dhe Kaukazianëve nuk është rezultat i ndryshimeve në farmakokinetikën e AMF. Ekspozimi ndaj AMF dhe AMFG (të matur me AUC_{0-12} , C_{max} ose C_0) është e krahasueshme midis dy popullsive etnike (54,59). Ndryshueshmëria në nivelet predozë të AMF ishte e pandikuar nga etnia në krahasim me racat e tjera (të bardhë, indiano-aziatikë, afro-karibeanë). Këto rezultate tregojnë se ndryshueshmëritë raciale përse i përket mbarëvajtjes së transplantit nuk shkaktohen nga ndryshime farmakokinetike. Rreziku më i lartë për flakje të të transplantuarve AA me veshkë mund të shkaktohet nga përgjigja me e theksuar imune e këtyre pacientëve. (45,55) Në ndryshim nga pacientët AA, pacientët kinezë me doza standarte të MMF, kanë paraqitur AUC më të lartë të AMF-së. Kjo nënvizon rëndësinë e ekspozimit të duhur të immunosupresivëve në varësi të etnisë për të përftuar një rezultat më të mirë (54, 43,55).

2.2.3 Pesha

Një analizë farmakokinetike e Le Guellec et al. (n=60) gjeti se pesha lidhet pozitivisht me eliminimin e MMF per os. Marrja parasyshe e peshës trupore në modelin farmakokinetik uli ndryshueshmërinë e pashpjeguar të eliminimit nga 34.8% në 28.2%. Por, ulja e kësaj ndryshueshmërie nuk është e mjaftueshme për rekomandim të dozimit sipas peshës trupore (57). Në një studim të bërë nga Staats et al. (n=117) u tregua një rritje e klerancës së AMF me rritjen e peshës trupore. Përfshirja e peshës trupore në model rezultoi në një ulje absolute prej 1.3% të ndryshueshmërisë nderindividuale (58). Studime të tjera të mëdha të van Hest et al. (n=468), Kuypers et al. (n=100) dhe Borrow et al. (n=117) nuk kanë treguar një lidhje midis peshës trupore dhe farmakokinetikës së AMF-së. (65,61). Këto rezultate sugjerojnë se edhe nëse pesha trupore ndikon në farmakokinetikën e AMF, kjo nuk ndikon në të dhënat klinike.

2.3 Ndërveprimet me barnat

Ndjekja terapeutike e pacientëve të transplantuar me veshkë është veçanërisht e vështirë për arsye se kërkon kujdes në vlerësimin e benefit-riskut të lidhur me barnat imunosupresive. Gjithashtu, ekuilibri midis efikasitetit dhe efekteve të padëshiruara është shpesh herë i vështirë për tu arritur. Për këtë arsye, përveç rrezikut të efekteve anësore të shkaktuara nga çdo imunosupresor i përdorur, shtohen dhe ato të ndërveprimeve midis barnave (antibiotikëve, antidiabetikëve, antilipidemikëve, frenuesve të pompës protonike).

2.3.1 Ndërveprimet me imunosupresivët e tjerë

Administrimi njëkohësisht i imunosupresivëve të tjerë, veçanërisht frenuesve të kalcineurinës (CNIs), mund të ndikojë në ekspozimin ndaj AMF. Frenuesit e kalcineurinës ciklosporina dhe takrolimusi përdoren në kombinim me MMF dhe EC-MPS tek pacientët e transplantuar me veshkë. Disa studime kanë krahasuar farmakokinetikën AMF kur jepet me ciklosporinë ose takrolimus. Në rastin e bashkëadministrimit të ciklosporinës u vërejt rritje e ndjeshme e klerancës së AMF (16-17) dhe nivele të ulta të niveleve predozë të AMF (18-19) në krahasim me bashkëadministrimin e takrolimusit. Ekspozimi ndaj metabolitit AMFG ishte më i lartë tek të transplantuarit me veshkë të trajtuar me MMF në kombinim me ciklosporinën. (16, 55). Ndërprerja e përdorimit të ciklosporinës gjatë terapisë imunosupresive çon në rritje të niveleve predozë të AMF (56-57), duke sugjeruar se ndryshimet varen nga roli i ciklosporinës në farmakokinetikën e AMF. Efekti mund të shpjegohet me ulje të riciklimit enterohepatik të AMFG në rast të trajtimit të ciklosporinës për shkak të frenimit të enzimës proteinike 2 së rezistencës multiple ndaj barnave (MRP2) (18, 58-59). MRP2 është përgjegjëse për sekretimin e AMFG në rrugët biliare (60-61). Për më tepër, një analizë farmakokinetike në popullatë e zhvilluar nga Cremers et al., paraqet prova klinike mbështetëse për efektin frenues të ciklosporinës në riciklimin

enterohepatik të AMF. Ky studim tregoi se kleranca totale e AMFG ishte më e ulët në pacientët e trajtuar me ciklosporinë në krahasim me pacientët e trajtuar me takrolimus, pavarësisht funksionit të ngjashëm renal në të dy grupet (59). Përveç këtij efekti të ciklosporinës në riciklimin enterohepatik të AMFG, takrolimusi mund të luajë gjithashtu një rol në variabilitetin e farmakokinetikës së AMF. Kur MMF u administrua në kombinim me takrolimusin, kleranca e AMF u ul në krahasim me rastet kur nuk ishin administruar inhibitorë të kalcineurinës (16). Takrolimus mund të rrisë nivelin e AMF për shkak të frenimit të UGT, e cila është përgjegjëse për metabolizmin e AMF në metabolitin joaktiv AMFG (17), por ky efekt është shumë i vogël për të qenë klinikisht i rëndësishëm.

Kombinimi i MMF me sirolimus mund të përdoret si protokoll mjekimi pa frenues të kalcineurinës. Në pacientët e trajtuar me sirolimus, u vërejtën nivele të larta të AMF (62-63) dhe nivele të ulta të metabolitëve të tij (62) në krahasim me pacientë të trajtuar me ciklosporinë. Ekspozimi ndaj AMF, fAMF dhe AMFG te pacientët e trajtuar me sirolimus në krahasim me pacientët e trajtuar me takrolimus nuk paraqitit ndryshime të dukshme (64). Administrimi i kortikosteroideve mund të rrisë nivelet AMFG, mundësisht për shkak të induksionit të aktivitetit të UGT. Kjo u demonstrua në një studim nga Cattaneo et al, ku ndërprerja e steroidëve lidhet me rritje të AUC_{0-12} të AMF, rënie të klerancës së AMF dhe niveleve predozë të AMFG (65). Studime të tjera nuk gjetën ndonjë lidhje midis klerancës së AMF dhe terapisë me steroide (40, 48).

2.3.2 Ndërveprime me barna të tjera

Edhe pse Morii et al. treguan se kur pacientët e transplantuar me veshkë trajtoheshin gjithashtu edhe me sulfat hekuri AMF pësonte një ulje të konsiderueshme (66), ky ndërveprim nuk u demonstrua në studime të tjera (37, 67). Prania e sulfatit të hekurit dhe ndikimi i tij mbi vetitë fiziko-kimike të MMF dhe AMF nuk rezultoi në formimin e një kompleksi MMF-hekur. (68). Administrimi njëkohësisht i antacidëve zvogëlon disponueshmërinë e MMF për shkak të formimit të lidhjeve kimike me të (5). Trajtimi me aciklovir nuk pati asnjë efekt në nivelet e AMF, por rezultoi në rritjen e AMFG dhe AUC së aciklovirit me 10.6% dhe 21.9%, respektivisht. Tek pacientët që vuajnë nga dëmtimi i veshkave gancikloviri gjithashtu mund të konkurrojë me AMFG gjatë sekretimit tubular në pacientët me përqendrim të larta në plazëm (53). Trajtimi me antibiotikë oral aktivë ndaj anaerobeve Gram negativë në zorrë, të cilët janë përgjegjës për pjesën më të madhe të aktivitetit të glukuronidazës, zvogëlojnë ciklin enterohepatik dhe, rrjedhimisht, nivelet e AMF (5, 37). Kolestiramina ul AUC_{0-12} AMF dhe AMFG me 39 dhe 34% respektivisht, duke ndërhyrë në riciklimin enterohepatik të AMF (5). Pieper et al. në studimin e tyre treguan një ulje të konsiderueshme me një mesatare prej 25% të AUC së AMF pas një doze të vetme të sevelamer ($p > 0.05$) (69). Një rast i raportuar paraqiti një ndërveprim midis MMF dhe rifampinës, ku rifampina shkaktoi dyfishim të klerancës të AMF, ndoshta si rezultat i induksionit të UGT ose MRP2 (70).

2.4 Variabiliteti farmakogjenetik

Literatura është e pasur me shumë studime rreth polimorfizimit gjenetik të enzimave apo transportuesve si dhe ndikimit të tyre në farmakokinetikën e AMF, megjithëse disa prej tyre paraqesin rezultate kontradiktore. Janë identifikuar disa polimorfizma të nukleotideve të vetme (SNP) në gjenet e enzimave të përfshira në farmakokinetikën e AMF. Hulumtimi farmakogjenetik është përqëndruar në enzimën UGT, MRP2 (të dyja këto me efekt farmakokinetik) dhe tipet I dhe II të IMPDH (me efekt farmakodinamik) (14).

2.4.1 Polimorfizimi gjenetik i UGT-së

AMF metabolizohet në AMFG nga familja e enzimave UGT. Izoformat më të rëndësishme të UGT për glukuronidimin në AMFG dhe AcAMFG janë respektivisht UGT1A9 dhe -2B7 (71-72). Ndryshueshmëria në shprehjen e UGT1A9 nga mikrosomat hepatike ndryshon me një faktor 17. Glukuronidimi i AMF në këto mikrosoma lidhej ndjeshëm me nivelet e proteinave UGT1A9. Në hepar me SNP të T275A dhe C2152T (incidenca: 5/38), glukuronidimi i AMF ishte në mënyrë të konsiderueshme më i lartë në krahasim me heparin që nuk shpreh këto SNP (73). Të transplantuarit me veshkë të cilët përdorin edhe takrolimus, mbartës të TP275A dhe / ose C2152T SNP (11% e pacientëve) kishin AUC₀₋₁₂ të AMF (50.5 vs 63.0 mg * h / L; p <0.001) shumë më të ulët krahasuar me jo-mbartësit (74-75). Nuk u gjet asnjë lidhje e rëndësishme për polimorfizmin e UGT1A9*3 në pacientët me transplant renal. Mutacioni i gjenit UGT2B7 (G840A) shoqërohet me një raport të AcAMFG: AMF më të lartë (2- dhe 2.6-fish raport më i lartë tek pacientët me mutacione heterozigotë dhe homozigotë, përkatësisht; p <0.05) për shkak të prodhimit të lartë të AcAMFG (76). Në një popullatë japoneze të transplantit të veshkave, C802T SNP nuk shoqërohej me një ndryshim në nivelet e AMF, ndërsa përqendrime të AcAMFG nuk ishin matur (6).

2.4.2 Polimorfizmi gjenetik i pompës transportuesve

MRP2 është përgjegjëse për sekretimin biliar të AMFG. Ciklosporina zvogëlon riciklimin enterohepatik të AMF përmes frenimit të MRP2 (60-61). Van Agteren et al. përcaktuan ndikimin e polimorfizmit të gjenit MRP2 në ekspozimin ndaj AMF tek pacientët me transplant renal. Heterozigoziteti për SNP C3972T u gjet në 117/259 dhe homozigoziteti në 28/259 të pacientëve. Mbartësit e polimorfizmit C3972T në gjenin MRP2 kanë zvogëluar pak por dukshëm AUC₀₋₁₂ (59.0 vs 64.7 mg * h / L; p = 0.045) e AMF kur takrolimus administrohet njëkohësisht (77). Naesens et al. zbuluan se polimorfizmat C24T dhe C3972T shoqërohen me përqendrime më të larta të AMF në një nëngrup të pacientëve me mosfunksionim të heparit (78).

2.4.3 Polimorfizim gjenetik i IMPDH

AMF ushtron aktivitetin imunosupresiv duke frenuar IMPDH. Përqendrimi i AMF ka një lidhje të zhdrejtë me aktivitetin e IMPDH brenda intervalit të dozës MMF (30, 33-

34), edhe pse ndryshueshmëria fillestare e veprimtarisë IMPDH te njerëzit është shumë e gjerë. Aktiviteti i lartë i IMPDH para transplantit shoqërohet me flakje akute, çka sugjeron nevojën për individualizimin e dozës bazuar në aktivitetin e IMPDH (31). Enzima IMPDH paraqitet në dy izoforma, tipi I dhe tipi II. AMF ka një afinitet pesëfish më të lartë frenues për IMPDH-II në krahasim me IMPDH-I (79). Për këtë arsye, analiza farmakogjenetike e IMPDH-II mund të kontribuojë në individualizimin e terapisë me MMF (80). SNP-të e të dy izoformave janë identifikuar, por nuk është demonstruar lidhja midis këtyre polimorfizmave dhe incidencës së flakjes akute (81-83). Sidoqoftë, Grinyo et al. evidentuan rritje të konsiderueshme të flakjes akute tek mbartësit e polimorfizmit T3757C të IMPDH-II (raporti i probabilitetit: 2.99; 95% CI: 1.27-6.99; $p = 0.012$) (84).

2.5 Kohëzgjatja e përdorimit dhe farmakokinetika e AMF

Kleranca e AMF tek pacientët me transplant renal zvogëlohet me kalimin e kohës me të paktën 30% (9, 14, 41, 85). Për më tepër, pacientët pediatrikë me transplant renal shfaqin një rritje të dyfishtë të AUC_{0-12} totale të AMF me kalimin e kohës (85). Shaw et al. tregoi se rritja e AUC_{0-12} të AMF me kalimin e kohës ishte rezultat i uljes së klerancës së AMF, dhe ndodhte vetëm tek pacientët me mosfunksionim të mirë të veshkave (45). Kur funksioni i veshkave përmirësohet me kalimin e kohës pas transplantit, kleranca e AMFG rritet dhe lidhja e AMF me proteinat rikupërohet për arsye se nuk zhvendoset nga AMFG (7,45). Van Hest et al. përshkruan varësinë e klerancës së AMF në një meta-analizë farmakokinetike të një popullate. Në 6 muajt e parë pas transplantit renal, kleranca e AMF u ul nga 34 në 20 L / orë. Njëkohësisht ndryshimet në klerancën e kreatininës nga 19 në 71 ml / min, niveli i aluminës nga 35 në 40 g / L, hemoglobina nga 97 në 120 g / L dhe nivelet e predozës së ciklosporinës nga 225 në 100 ng / mL ishin përgjegjës për këtë ulje të klerancës të AMF dhe mund të shpjegojë përkatësisht 19, 12, 4 dhe 3% të ndryshueshmërisë intra-individuale (54).

3. Monitorimi terapeutik i AMF

3.1 Principet e monitorimit terapeutik (TDM – Therapeutic drug monitoring)

3.1.1 Përkufizim

Përkufizimi i Monitorimit Terapeutik i propozuar nga Shoqata Ndërkombëtare e Monitorimit Terapeutik dhe Toksikologjisë Klinike (IATDMCT) është si më poshtë:

“Monitorimi terapeutik është një specialitet klinik multidisiplinar që ka si qëllim përmirësimin e kujdesit ndaj pacientit duke përshtatur dozën e barnave për të cilat praktika klinike ose studimet klinike kanë treguar përmirësim të rezultateve në popullatën e përgjithshme ose në një popullatë të veçantë. Mund të bazohet *a priori* në informacione farmakogjenetike, demografike ose klinike, dhe/ose *a posteriori* në matje të përqëndrimit në gjak të barnave (monitorim farmakokinetik) dhe/ose biomarkerave (monitorim farmakodinamik).”

Qëllimet kryesore të Monitorimit Terapeutik janë:

- të sigurojë se përqëndrimi i barit është i mjaftueshëm për përgjigjen e dëshiruar farmakologjike.
- të sigurojë se përqëndrimi i barit (ose metabolitit) nuk është aq i lartë sa të shfaqen simptoma ose shenja toksiciteti.
- të ndihmojë në përshtatjen e dozës në rastet kur farmakokinetika ndryshon me shpejtësi (p.sh. tek të sapolindurit, pacientet pediatrikë ose pacientët me funksion hepatic ose renal të ndryshuar, ditët dhe javët e para pas transplantit).
- të përcaktojë parametrat farmakokinetikë dhe marrëdhënien efekt – përqëndrim të barnave të reja.

3.1.2 Kërkesat për monitorimin terapeutik

Monitorimi terapeutik justifikohet nëse:

- Lidhja përqëndrim – efekt farmakologjik është me e mirë se lidhja dozë – efekt
- Lidhja dozë-përqëndrim paraqet një variabilitet të lartë inter-individual
- Dritarja terapeutike është e ngushtë
- Paraqiten ndërveprime me barnat

3.1.3 Udhëzime për realizimin e monitorimit terapeutik

Për një interpretim të duhur të monitorimit terapeutik është thelbësore që të merren parasysh:

- të dhënat mbi pacientin emri, numri i identifikimit, mosha, gjinia dhe patologjia,
- bari i administruar (doza, forma farmaceutike, mënyra e administrimit, kohëzgjatja e terapisë, data dhe ora e dozës së fundit),

- qëllimi kryesor që justifikon monitorimin terapeutik
- data dhe koha e marrjes së mostrës.

Informacione shtesë si pesha e pacientit, funksioni renal dhe hepatic dhe barnat e tjera të cilat përshkruhen njëkohësisht mund të kërkojnë sipas rastit. Këto kërkesa kanë bërë që shumë qendra spitalore të hartojnë formularë kërkesë të posaçëm për analizat e monitorimit terapeutik. Përdorimi i sistemeve të kompjuterizuar të regjistrimit në laboratorët të cilët aplikojnë monitorimin terapeutik ka bërë që informacioni thelbësor të jetë i detyrueshëm në momentin e kërkesës.

Mostra e duhur është padyshim kërkesë kryesore për një monitorim terapeutik efektiv. Zakonisht përdoren mostrat e gjakut të plotë. Koha e marrjes së mostrës është gjithashtu e rëndësishme. Që monitorimi terapeutik të ketë vlerë duhet që pacienti të jetë në gjendje të qëndrueshme (steady state) me dozën aktuale të barit. Sidoqoftë, kur duhet të kontrollohet toksiciteti i dyshuar, pritja që të arrihet gjendja e qëndrueshme kundërrindikohet.

Koha që nevojitet në mënyrë që të arrihet gjendja e qëndrueshme përcaktohet nga gjysëm jeta e eliminimit të barit. Në praktikë, mostrat merren pasi bari është marrë në mënyrë të vazhdueshme për të paktën pesë gjysmë jetë. Tek të sapolindurit, gjendja klinike ndryshon me shpejtësi ashtu si dhe shkalla e hidratimit për këtë arsye gjendja e qëndrueshme ngelet një koncept teorik i cili në shumë raste nuk arrihet. Për këtë arsye nuk është me vlerë që matja e përqendrimit të vonohet.

Koha më e riprodhueshme për të marrë kampione është menjëherë para dozës së radhës, kur përqëndrimi është më i ulët dhe përdoret kur është e nevojshme të demonstronhet efikasiteti i barit. Analizimi i këtij kampioni paraqet ndryshueshmërinë më të vogël ndërmjet mostrave tek pacientët me terapi kronike.

Përqëndrimi mesatar i qëndrueshëm mund të merret duke marrë mostra ndërmjet dozave, ose një seri mostrash përgjatë intervalit të dozimit mund të përdoren për të vlerësuar sipërfaqen nën lakoren përqëndrim-kohë (AUC). Shpeshtësia e monitorimit është në varësi të barit, të pyetjes së parashtruar si dhe të situatës klinike të pacientit. Monitorimi ditor mund të jetë i nevojshëm në pacientët me sëmundje kritike me klerancë që ndryshon shpejt. Përqëndrimet në plazëm të barnave imunosupresive variojnë dukshëm në ditët e para dhe javët pas transplantit. Për këtë arsye monitorimi i shpeshtë është i domosdoshëm.

3.1.4 Interpretimi i rezultateve

Që monitorimi terapeutik të ketë vlerë megjithëse mund të jenë marrë parasysh të gjitha kërkesat e parashtruara më lart duhet që rezultati të interpretohet saktë dhe të ndërmerren vendimet e nevojshme. Interpretimi i përqendrimeve të barnave kërkon njohuri mbi faktorët farmakokinetikë dhe farmakodinamikë të barit si dhe ekspertizë profesionale. Qëllimi i procesit të monitorimit terapeutik është të përmirësojë simptomat e pacientit dhe jo vetëm të synojë nivelet në një interval të caktuar. Intervali terapeutik bazohet në dy koncepte: përqëndrimi minimal efektiv dhe përqëndrim maksimal i sigurt.

Në një publikim të hershëm për TDM, citohet (Sjoqvist F).: "*Vendimet terapeutike nuk duhet të bazohen kurrë vetëm në përqendrimin e barit në plazëm. Parimi themelor është të trajtoni pacientin jo përqendrimin e barit.*" Përqendrimet e barit mbi gamën e synuar nuk kërkojnë patjetër ndryshim të dozës. Për barnat imunosupresive mund të jetë e nevojshme që në disa pacientë nivelet të jenë mbi kufirin e synuar për të shmangur flakjen e transplantit.

3.1.5 Individualizimi i terapisë

Individualizimi i dozës konsiston në përcaktimin e një doze të administruar për çdo pacient. Me qëllim që të përfitohet një efekt terapeutik maksimal të një bari pa rrezik toksiciteti është e nevojshme që të përcaktohet skema optimale e dozimit (doza dhe koha e administrimit) që do të lejojë të mbajë përqendrimet e barit në dritaren terapeutike.

3.2 Të dhëna nga literatura mbi monitorimin terapeutik të MMF

Pas hedhjes në treg të MMF, u rekomandua administrimi i një doze fikse ditore për të gjithë pacientët pa parashikuar monitorimin terapeutik të barit. Megjithatë, disa argumente sot venë në pikëpyetje këtë skemë administrimi: klinikistët përballen me çështje të tolerancës ndaj barit, përgjegjëse për reduktimin e dozës ose ndërprerjen e trajtimit; përdorimi i MMF tek fëmijët kërkon shpesh individualizimin e dozës; kombinimi i MMF-së me imunosupresivë të tjerë si ciklosporina si dhe strategjitë e fundit për të reduktuar ekspozimin ndaj anti-calcineurinave për një kohë të gjatë, bëjnë të nevojshëm të merret parasysh individualizimi i terapisë.

Për më tepër, AMF plotëson shumicën e kushteve që justifikojnë monitorimin terapeutik. Farmakokinetika e AMF paraqet variabilitet të lartë inter-individual tek pacientët e rritur dhe fëmijë me transplant renal, me transplant të zemrës dhe heparit. Për doza fikse të MMF, është demonstruar se AUC e MPA mund të ndryshojnë me një faktor nga 1 në 10. MMF shfaq ndërveprime me barnat, duke përfshirë dhe imunosupresivët e tjerë me të cilët shoqërohet, të cilët janë përgjegjës për modifikimin e ekspozimit ndaj AMF. Efikasiteti i MMF-së matet me incidencën e flakjeve akute dhe tolerancës me shfaqjen e efekteve anësore.

Për këtë arsye, doza duhet të adaptohet përpara se të shfaqen ngjarje të tilla. Së fundi, shumë studime janë kryer me qëllim që të vlerësojnë marrëdhënien midis përqëndrimeve të AMF në plazëm dhe shpeshtësisë së shfaqjes së flakjes akute dhe/ose efekteve anësore me synim përcaktimin e dritares terapeutike.

3.2.1 Studime të lidhjes përqëndrim/efikasitet të AMF në transplantin renal

Një numër provash klinike kanë demonstruar lidhjen midis parametrave farmakokinetikë dhe efektit tek të transplantuarit me veshkë (9-11). Pacientët që kanë shfaqur flakje të transplantit kanë pasur një sipërfaqe më të vogël të lakores përqëndrim – kohë (AUC_{0-12}) dhe nivel më të ulët të përqëndrimit para-dozë (C_0) të krahasuar me pacientët që nuk

kanë shfaqur flakje (12). Këto parametra lidhen dobët ($r=1$) me dozën e dhënë të MMF (13).

Në një studim të randomizuar me përqëndrim të kontrolluar Hale et al. ndoqi pacientët me transplant renal në një terapi të kombinuar të MMF, ciklosporinë dhe prednizon për 6 muaj. Një numër total prej 150 pacientësh u ndanë në tre grupe sipas target AUC: e ulët ($16.1 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$), mesatare ($30.3 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$) dhe e lartë ($60.6 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$). Rreziku i flakjes akute të provuar me biopsi ishte i lartë në grupin me përqëndrim të ulët. Një lidhje statistikore e konsiderueshme u gjet midis incidencës të flakjes akute të provuar me biopsi dhe AUC së AMF ($p<0.001$) dhe C_0 AMF ($p=0.01$), ku AUC tregoi lidhjen me të mirë (9). Lidhje të ngjashme janë demonstruar tek pacientët pediatrikë të transplantuar me veshkë nga Weber et al. Rreziku i flakjes akute në 3 javët e para post-transplant u rrit tek fëmijët me vlera të AUC_{0-12} values $<33.8 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$ ($p=0.005$) ose nivele predozë $<1.2 \text{ mg/L}$ ($p<0.001$) (10). Një grup studimor kanadez ku përfshihen 94 pacientë të transplantuar me veshkë të trajtuar me CsA dhe MMF theksoi rëndësinë e ekzpozimit të hershëm me sasi të mjaftueshme AMF. Në këta pacientë $AUC_{AMF 0-12}$ (e vlerësuar me një numër mostrash të limituara) në ditën e 3 ishte e shoqëruar ngushtë me rritjen e rrezikut të flakjes akute (11). Studimet e sipërpërmendura të gjitha përfshinin pacientë të trajtuar njëkohësisht me CsA. Një lidhje statistikore e konsiderueshme, nuk është vënë re tek të transplantuarit renale të trajtuar njëkohësisht me takrolimus.

Kuypers et al. ndoqi 100 pacientë të transplantuar me veshkë për 12 muaj dhe gjeti një trend rritës ndaj incidencës së flakjes akute tek pacientët të cilët nuk mund të arrijnë vlera target të takrolimusit $AUC_{0-12} 150 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$ dhe të AUC_{0-12} së AMF prej $45 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$ ($p=0.07$) (15).

Tek pacientët e trajtuar njëkohësisht me takrolimus, është vënë re një ekspozim me i madh i AMF të krahasuar me trajtimin e njëkohshëm me CsA, ku më shumë pacientë arrijnë dritaren terapeutike. Numri i pacientëve të nevojshëm për të vendosur një korrelim të konsiderueshëm midis ekspozimit të AMF dhe efektit është i lartë si shkak i incidencës së ulët kur pacientët kanë ekspozim të AMF në dritaren terapeutike.

3.2.2 Studime të lidhjes përqëndrim/efekte anësore të AMF në transplantin renal

Efektet anësore me të shpeshta në terapinë me MMF janë simptomat gastrointestinale, çrregullimet hematologjike dhe infeksionet. Korrelimi ndërmjet parametrave farmakokinetikë dhe efekteve anësore është më i vështirë për tu vendosur në krahasim me korrelimin më efikasitetin. Pjesërisht, kjo është shkak i incidencës së ulët të disa prej këtyre efekteve anësore, por mund të jetë e vështirë për të dalluar efektet anësore të MMF nga efektet anësore të shkaktuar nga faktorë të tjerë, si përdorimi i njëkohshëm i barnave (imunosupresive) të tjera. Disa studime të mëdha nuk kanë mundur të gjejnë një lidhje midis parametrave farmakokinetikë dhe toksicitetit. Në studimin RCCT

(n=150), nuk është vënë re një korrelim i konsiderueshëm midis efekteve anësore dhe AMF C_0 , AMF C_{max} ose AMF AUC_{0-12} , ku doza e MMF lidhej në mënyrë të konsiderueshme me shfaqjen e efekteve anësore të cilat ishin më shumë të origjinës gastrointestinale në këtë studimin.

Në studimin e Kiberd et al. (n=94) e realizuar mbi parashikuesit e toksicitetit, efektet anësore ishin shkaku i uljes së dozës së MMF në 27 pacientë (29%). Ekspozimi ndaj AMF në terma të AUC_{0-12} , nuk ishte parashikuese për shfaqjen e efekteve anësore. Toksiciteti u përkufizua këtu si nevoja për të ulur ose për të ndërprerë dozën e MMF për simptomat klinike ose për vlera laboratorike jonormale.

Pavarësisht, disa studime më të vogla kanë gjetur një lidhje reciproke midis ekspozimit ndaj AMF dhe efekteve anësore. Një lidhje e konsiderueshme midis efekteve anësore, veçanërisht leukopenisë dhe anemisë, dhe ekspozimit ndaj AMF (AUC_{0-12} , C_0 dhe C_{max}) është vërejtur tek pacientët e transplantuar me veshkë të trajtuar njëkohësisht me CsA dhe takrolimus. Tek studimet kur është monitoruar fAMF, pacientët që kanë paraqitur infeksione ose ngjarje hematologjike, duke përfshirë këtu dhe leukopeninë, kishin AUC më të lartë të AMF. Mbetet e paqartë arsyeja përse fAMF nuk ka një lidhje të qartë midis përqendrimit dhe efikasitetit.

3.2.3 Indeksi terapeutik i AMF

Për herë të parë në vitin 1998 në kuadrin e konferencës Consensus u formuluan rekomandimet dhe udhëzimet e para mbi monitorimin farmakokinetik të MMF. Në atë kohë u këshillua që AUC e AMF të mbante vlera më të larta se 20mg.h/L tek të rriturit, për periudhën e hershme pas transplantit. Në vazhdimësi, bazuar në studimet klinike u propozuan vlerat të reja të dritares terapeutike të AUC_{0-12} nga 30 në 60 mg.h/L për AMF (26). Kjo dritare terapeutike e AUC_{0-12} e AMF është e krahasueshme me nivelet predoze në kufijtë target 1-3.5mg/L kur kombinohet me ciklosporinë ose 1.7-4.0 mg/L kur MMF kombinohet me takrolimus (26-27).

Farmakokinetika e AMF shfaq variabilitet të gjërë inter- dhe intra- individual, si në vlerat e AUC_{0-12} dhe në ato para-dozë (1). Tek të transplantuarit me veshkë AUC_{0-12} e AMF pas administrimit të 1 g MMF është në rangun ~10-100 mg*h/L (13-14, 28), me një dritare terapeutike të rekomanduar 30-60 mg*h/L (26). Eliminimi i AMF në transplante të tjera (hepar, zemër dhe palcë kurrizore) tregon gjithashtu një variabilitet 10-fish (27). Disa faktorë, si administrimi i njëkohshëm dhe koha pas transplantit, ndikojnë në ekspozimin e AMF.

Një model simulimi treguan se vetëm 13% e pacientëve që marrin MMF 1 g dy herë në ditë kishin një AUC të AMF në vlerat 30-60 mg*h/L 1 javë pas transplantit dhe kjo vlerë rritej pas 4-5 muaj tek 67% e pacientëve (29). Variabiliteti intraindividual në ekspozimin me AMF është relativisht i ulët i krahasuar me variabilitetin interindividual

(28). Të gjitha studimet e lartpërmendura sugjerojnë se monitorimi farmakokinetik do të rriste efektin e trajtimit me MMF.

3.3 Realizimi i Monitorimit terapeutik të AMF

3.3.1 Mostra e gjakut

Përqëndrimi i AMF matët në plazëm. Gjaku mblidhet në tuba me EDTA dhe më pas plazma ndahet me centrifugim dhe ruhet. Mostrat janë të qëndrueshme për 8 orë në temperaturën e ambjentit, 96 orë në +4°C dhe 11 muaj në -20°C (30). Studimet e stabilitetit kanë treguar se stoku i ruajtur gjatë një jave në temperaturë ambjenti pëson rritje të konsiderueshme të përqëndrimit të AMF si shkak i dekonjugimit të AMFG. Nuk u vu re rritje e përqëndrimeve të AMF të ruajtur në +4°C dhe -20°C. Përqëndrimi i AMFG shumë më i lartë se ai i AMF, nuk pësoi ulje të konsiderueshme (35). Pavarësisht kushteve të ruajtjes (temperaturë ambjenti, +4°C dhe -20°C), përqëndrimet e AMFaG nuk janë të qëndrueshme dhe ulen në mënyrë progresive me kalimin e kohës. Kur mostrat plazmatike kthehen në një pH 2.5, duket se ky degradim evitohet (32).

Është treguar *in vitro* se fraksioni i lirë i AMF është përgjegjës për efektin immunosupresiv (24) por përqëndrimet e AMF-së së lirë përfaqësojnë një përqëndrim të ulët të AMF totale (1 deri 2%) dhe për përcaktimin e tij nevojitet një etapë shtesë e izolimit të formës së lirë me ultracentrifugim ose dializë nëpërmjet një membrane.

3.3.2 Metodat që përdoren për përcaktimin e AMF

Metodat referencë që përdoren për të matur përqëndrimin e AMF janë metoda kromatografike e lengshme e kombinuar me spektrofotometrinë UV (HPLC-UV), spektrometria e masës (LC-MS) ose spektrometria tandem e masës (LS-MS/MS). Këto teknika janë të ndjeshme dhe specifike dhe mundësojnë përcaktimin njëkohësisht të AMF dhe metabolitëve të saj. Metodat kromatografike, veçanërisht LC-MS/MS mundëson përcaktimin e përqëndrimeve të ulta të AMF-së së lirë. (35)

Ekziston gjithashtu një metodë analize imunoenzimatike, gjërësisht e përdorur në ditët e sotme për përcaktimin e AMF. Kjo teknikë (EMIT ®) realizohet nëpërmjet antiturbave monoklonale anti-AMF të cilët paraqesin gjithashtu një aktivitet ndaj AMFaG, metabolitit aktiv të AMF. Ky fenomen mundëson vlerësimin e gabimeve sistematike të matura me EMIT dhe ato të matura me HPLC.

Disa studime sugjerojnë se EMIT mund të jetë metoda e zgjedhur për përcaktimin e AMF në kuadër të monitorimit terapeutik për arsye se është më e shpejtë, automatike dhe jep informacion më të plotë përse i përket ‘imunosupresionit’ duke qënë se përcakton njëkohësisht dhe metabolitin aktiv të AMF. Në këtë perspektivë, Weber et al. propozuan modifikimin e dritares terapeutike të AMF (AUC₀₋₁₂ midis 35 dhe

70mg.h/L dhe C_0 midis 1.3 dhe 4.5 μ g/ml) kur kjo e fundit përcaktohet me metodën EMIT.

3.4 Aplikimi i monitorimit terapeutik

Janë zhvilluar tre studime prospektive, multi-qëndrore, të randomizuara me qëllim vlerësimin e monitorimit terapeutik mbi rezultatet tek të transplantuarit me veshkë; studimi i dozës fikse versus përqëndrimit të kontrolluar *FDCC*; studimi *Apomygre* dhe studimi *OptiCept* (95-97). Me konkretisht u vlerësuan rreziku për flakjen akute dhe toksicitetin midis regjimit të përqëndrimit të kontrolluar dhe dozës fikse (14).

Në studimin *FDCC*, ekspozimi ndaj AMF u vlerësua me AUC të shkurtuara. Pacientët (n=901) të trajtuar njëkohësisht me frenues të inhibitorëve dhe kortikosteroide u krahasuan midis grupit me përqëndrim të kontrolluar dhe grupit me dozë fikse. Rezultatet e këtij studimi nuk treguan ndryshime të flakjes akute të provuar me biopsi (p=0.96). Gjithashtu, nuk u evidentua ndryshim mes ekspozimit ndaj AMF tek pacientët me përqëndrim të kontrolluar dhe dozë fikse (96).

Studimi *Apomygre* krahasoi trajtimin e dozës fikse me atë me përqëndrim të kontrolluar të MMF tek pacientët e trajtuar njëkohësisht me basiliksimab, ciklosporinë dhe steroide (n=130). Individualizimi i dozës u llogarit me metodën Bayesian. Rezultatet përfundimtare treguan AUC në mënyrë të konsiderueshme më të larta tek pacientët me përqëndrim të kontrolluar në javën e dytë dhe javën e tretë pas transplantit (p<0.0001) si dhe ulje të flakjes (p=0.01) në grupin me përqëndrim të kontrolluar të AMF (9).

Në fund, rezultatet e studimit *Opticept* (n=720), ku doza e MMF përshtatej bazuar në nivelin e matur predozë të AMF, nuk tregoi ndryshim të konsiderueshëm përsa i përket flakjes akute midis grupit me përqëndrim të kontrolluar dhe atij me përqëndrim fiks (95).

4. Metoda analitike

4.1 Metoda bioanalitike

Përcaktimi i përqendrimit të acidit mykofenolik në plazëm kryhet në përputhje me parimet e zbatueshme të Praktikës së Mirë Laboratorike (GLP-Good Laboratory Practice). Metoda bioanalitike përdoret për të përcaktuar barin dhe/ose metabolitët e tij në lëngjet biologjike. Ajo duhet të jetë e mirëkarakterizuar, e standardizuar, e validuar, e dokumentuar me rezultate të besueshme që mund të interpretohen në mënyrë të kënaqshme. Metoda përmbledh dy faza: fazën parastudimore dhe studimore. Faza parastudimore kryhet para studimit dhe përfshin validimin e metodës në mostrat biologjike të njeriut dhe mostrat biologjike të spikuara. Në fazën studimore, metoda bioanalitike e validuar zbatohet për analizën aktuale të mostrave.

Validimi i metodës bioanalitike përfshin kryerjen e të gjitha procedurave që tregojnë se një metodë e veçantë e përdorur për matjen sasiore të analitëve në një matriks të dhënë biologjik (p.sh. gjaku, plazma, serum, ose urina) është e besueshme dhe riprodhueshme për përdorimin e parashikuar. Parametrat themelorë që duhen mbajtur parasysht gjatë zhvillimit dhe validimit të një metode bioanalitike janë saktësia, përsëritshmëria, përzgjedhshmëria, riprodhueshmëria dhe qëndrueshmëria. Në qoftëse metoda do të shërbejë për të matur më tepër se një substancë atëherë është e nevojshme që validimi të bëhet veçmas për secilën prej tyre.

Në mënyrë tipike zhvillimi i një metode bioanalitike përfshin përcaktimin e (a) përzgjedhshmërisë, (b) saktësisë, përsëritshmërisë, rikuperimit, (c) kurbën e kalibrit dhe (d) qëndrueshmërinë e substancës që do të matet në mostrat e spikuara.

4.1.2 Përzgjedhshmëria (selektiviteti)

Përzgjedhshmëria përkufizohet si aftësia e një metode analitike për të dalluar dhe përcaktuar analitin e interesit në prani të komponentëve të tjerë në mostër. Ndër lëndët potenciale interferuese përfshihen: komponentët endogjenë të matriksit biologjik, metabolitët, produktet e degradimit, mjekimet shoqëruese dhe ksenobiotikët ekzogjenë.

Përzgjedhshmëria në metodë vlerësohet nga analiza e 6 mostrave blank nga subjekte të ndryshme (gjini apo grupmoshë) për të monitoruar interferencat e mundshme në kohën e mbajtjes të analitit. Gjithashtu përzgjedhshmëria vlerësohet edhe në përqendrimin më të vogël të matshëm. Limiti i pranueshëm për mungesën e interferencave është nën vlerën 20% të kufirit të poshtëm të matjes.

4.1.3 Saktësia, përsëritshmëria, rikuperimi

Saktësia e një metode analitike përshkruan afërsinë e vlerës së përcaktuar (të marrë nga metoda) me përqendrimin nominal të analitit (të shprehur në përqindje). Saktësia duhet

të vlerësohet në mostrat e spikuara me sasi të njohur të analitit, dhe në mostrat e kontrollit të cilësisë (KC). Mostrat e KC spikohen në mënyrë të pavarur nga standardet e kalibrimit, duke përdorur tretësira të përgatitura veçmas. Mostrat e KC analizohen kundrejt kurbës së kalibrimit dhe përqëndrimet e fituara krahasohen me vlerën nominale. Saktësia vlerësohet për vlerat e mostrave të KC të marra brenda një run-i të vetëm (saktësia brenda ditës) dhe run-eve të ndryshme (saktësia ndërmejt ditëve). Vlerësimi i saktësisë bëhet për çdo ditë pune duke matur nga 5 herë secilin nga 4 përqëndrimet e blankeve të spikuara të cilat shtrihen brenda diapazonit të lakores së kalibrimit. Saktësia e metodës (RE) shprehet përmes formulës së mëposhtme:

$$RE = [(përqëndrimi\ mesatar\ i\ matur - përqëndrimi\ nominal) / përqëndrimi\ nominal] \times 100\%$$

Saktësia raportohet si përqindje e vlerës nominale. Vlerësimi i saktësisë (brenda ditës dhe ndërmjet ditëve) konsiderohet i suksesshëm kur mesatarja e 5 matjeve nuk e kalon 15% të vlerës nominale përjashtoj rastin e kufirit të poshtëm të matjes i cili duhet të jetë brenda 20% të vlerës nominale.

Përsëritshmëria e metodës analitike përshkruan afërsinë e matjeve të përsëritura individuale të analitit. Përsëritshmëria duhet të demonstrohet për kufirit e poshtëm të matjes, kontrollet e cilësisë në përqëndrime të ulët, të mesëm dhe të lartë, brenda një run-i dhe midis run-eve të ndryshme. Për validimin e përsëritshmërisë brenda dhe midis run-it analitik, duhet të ketë një minimum prej 5 mostrash në përqëndrime të njohura të matura në mbi katër nivele (kufiri i poshtëm i matjes, kontrollet e cilësisë në përqëndrime të ulët, të mesëm dhe të lartë). Vlera e koeficientit të variacionit CV (brenda dhe midis run-it analitik) nuk duhet të tejkalojë 15% për mostrat e kontrollit të cilësisë, me përjashtim të kufirit të poshtëm të matjes e cila nuk duhet të kalojë 20%.

Rikuperimi i analitit të interesit nënkupton efikasitetin e procesit të ekstraktimit të analitit nga matriksi biologjik. Rikuperimi i analitit matet në tre përqëndrime të mostrave të KC (të ulët, mesatar, të lartë) duke krahasuar përgjigjen e detektorit pas procedurës së ekstraktimit nga matriksi biologjik të një përqëndrimi të njohur dhe përgjigjen e detektorit për të njëjtin përqëndrim të standardit të referencës, i cili konsiderohet 100%. Rikuperimi i analitit nuk ka nevojë të jetë 100%, por duhet që ky proces të jetë i qëndrueshëm, i përsëritshëm dhe i riprodhueshëm.

4.1.4 Kurba e kalibrimit

Kurba e kalibrimit shpreh vartësinë ndërmjet përgjigjes së instrumentit dhe përqëndrimeve të njohura të analitit të interesit. Për çdo analit që do të matet duhet të krijohet një kurbë kalibrimi. Kurba e kalibrimit duhet të ndërtohet duke përdorur të njëjtin matriks biologjik me atë ku ndodhet analiti i interesit, duke e spikuar me sasi (përqëndrime) të njohura të analitit.

Kurba e kalibrimit ndërtohet duke përdorur matriks (mostër) blank, mostër me përqendrim zero (spikuar vetëm me standard të brendshëm) dhe 6-8 mostra të spikuara me përqëndrime të cilat mbulojnë të gjithë diapazonin e vlerave të pritura, përfshi edhe përqëndrimin më të vogël të matshëm. Për ndërtimin e kurbave të kalibrimit përdoren gjithmonë mostra të spikuara të freskëta me përqëndrime të njohura.

Eksperimentet e validimit të metodës përfshijnë minimalisht 6 run-e analitike të kryera përgjatë ditëve të ndryshme, më së paku katër përqëndrime (përfshirë kufirin e poshtëm të matjes, përqëndrimin e ulët, mesatar dhe të lartë) të analizuara në dublikatë për çdo run analitik.

- Kufiri i poshtëm i matjes (përqëndrimi më i vogël i matshëm)

Kufiri i poshtëm i matjes është përqëndrimi më i ulët i analitit në një mostër, i cili mund të përcaktohet besueshmërisht brenda një saktësie dhe precizioni të pranueshëm. Ai mund të konsiderohet dhe vlere më e ulët e kalibrimit. Përgjigja që jep instrumenti ndaj përqëndrimit më të vogël të matshëm duhet të jetë 5 herë më e madhe se përgjigja që jep matriksi blank. Përgjigja duhet të jetë e identifikueshme, e dallueshme e riprodhueshme, me një përsëritshmëri <20% dhe me një saktësi 80-120%.

Për përcaktimin e kufirit të poshtëm të matjes si sinjal zbulimi përcaktohet vlere e raportit sinjal/zhurmë 10/1. Sinjalet e matura të mostrave me përqëndrime të ulëta të njohura krahasohen me vlerën e sinjalit (zhurmën) e blankut. Nga analizimi i këtyre vlerave përcaktohet vlere më e ulët që mund të matet në mënyrë të besueshme. Kufiri i poshtëm i matjes llogaritet sipas formulës $KPM=10 \text{ SD/S}$, ku SD është deviacioni rezidual standard i vijës së regresionit dhe S është pjerrësia e vijës.

- Kufiri i sipërm i matjes

Standardi më i lartë do të përcaktojë vlerën e sipërme të matjes të analitit. Piku i analitit duhet të jetë i riprodhueshëm dhe përqëndrimi i llogaritur duhet të ketë një përsëritshmëri < 15% dhe një saktësi < 15% të përqëndrimit nominal.

- Kurba e kalibrimit/varësia përqëndrim-përgjigje aparati

Për varësinë përqëndrim-përgjigje e aparatit u përdor një model i thjeshtë. Tretësira ujore mëmë e barit hollohet me ujë për të përftuar një varg përqëndrimesh. Me anë të këtyre tretësirave spikohet plazma blank. Gjashtë mostra përfshirë dhe kufirin e poshtëm të matjes përdoren për të ndërtuar kurbën e kalibrimit ($n=3$). Mostrat përgatiten dhe injektohen në të njëjtën ditë. Për çdo kurbë kalibrimi ndërtohet kromatograma me mostrën blank. Për secilin përqëndrim bëhen të paktën tre matje. Matjet për kurbën e kalibrimit dhe blankun bëhen çdo ditë dhe të shpërndara përgjatë gjithë periudhës së matjeve. Kurba e kalibrimit përftohet nga plotimi i përgjigjes së aparatit ndaj përqëndrimit të barit. Pas ndërtimit të kurbës së kalibrimit llogariten parametrat e saj (pjerrësia, intercepti). Kurba konsiderohet e vlefshme kur vlerat e parashikuara nuk

devijojnë më shumë se 15% nga përqëndrimet nominale, përjashtuar vlerën e parashikuar të kufirit të poshtëm të matjes e cila nuk duhet të devijojë më shumë se 20% nga vlera e matur. Duke qënë se për secilin përqëndrim bëhen 3 matje, kurba konsiderohet e vlefshme kur të paktën 2 nga matjet plotësojnë kriteret e mësipërme.

- Mostrat e kontrollit të cilësisë

Gjatë seancës analitike përfshihen tre kontrole cilësie në triplikate në vlerë të ulët, mesatare dhe të lartë. Së paku 67% e rezultateve të përqëndrimeve të KC duhet të jenë brenda 15% të vlerave teorike respektive. Së paku 50% e KC në çdo nivel duhet të jetë brenda 15% të përqëndrimeve të tyre nominale. Standardet e kurbës së kalibrimit dhe KC përgatiten nga tretësirat e veçanta pas hollimit të tretësirës mëmë të barit. Shpërndarja e mostrave të standardeve të kalibrimit dhe të kontrollit të cilësisë duhet bërë në mënyrë të tillë që të zbulohet devijimi eventual gjatë seancës analitike.

4.1.5 Qëndrueshmëria

Provat e qëndrueshmërisë të analitit janë dizenuar për të mbuluar kushtet e pritshme në lidhje me mbajtjen e mostrave klinike. Qëndrueshmëria e barit studiohet në mostrat e trajtuara dhe të patrajtuara. Procedurat e qëndrueshmërisë duhet të vlerësojnë qëndrueshmërinë e analitit për të cilën jemi të interesuar në kushtet e marrjes së kampionit dhe ruajtjes afatgjatë të tij (sipas kushteve të specifikuara), në kushtet e përdorimit të tij në procedurën analitike (qëndrueshmëria në temperaturën e dhomës), si dhe qëndrueshmëria në kushtet e ngrirjes dhe shkrirjes së matriksit biologjik. Përqëndrimet mesatare të mostrave të spikuara me barin e interesit për analizën e qëndrueshmërisë krahasohen me përqëndrimin teorik.

Cikli i trefishtë i ngrirje-shkrirjes Tre alikuota me tre përqëndrime të ndryshme (KC) mbahen 24 orë në temperaturë dhome (shkrirja) dhe më pas ringrijnë për 24 orë të tjera. Ky cikël përsëritet tre herë dhe më pas analizohet përmbajtja e barit në lëngun biologjik.

Ruajtja afatshkurtër (temperaturë dhome) Tre alikuota me tre përqëndrime të ndryshme (KC) shkrijnë në temperaturë dhome për 4-24 orë dhe më pas analizohen. Njëkohësisht analizohen dhe mostrat e ruajtura 48 orë në -20°C.

Ruajtja afatgjatë Qëndrueshmëria afatgjatë e tretësirave analizohet për 30 ditë në -20°C.

Qëndrueshmëria e tretësirës mëmë Qëndrueshmëria e tretësirës mëmë, përfshi edhe atë të standardit të brendshëm, duhet të vlerësohet në kushtet e temperaturës së dhomës për të paktën 6 orë. Në fund të procesit analitik duhet të krahasohet përgjigja e instrumentit si për tretësirën mëmë të përdorur ashtu edhe për tretësirës me të njëjtin përqëndrim të përgatitur rishtas.

5. Objektivat dhe qëllimi i studimit

Objektivat e këtij studimi janë:

- 1) Zhvillimi dhe valimi i një metode kromatografike të përshtatshme, të thjeshtë dhe të shpejtë, për të përcaktuar përqëndrimin e acidit mykofenolik në plazëm.
- 2) Monitorimi terapeutik i AMF. Përcaktimi i niveleve para-dozë të acidit mykofenolik në plazëm tek pacientët me transplant renal të ndjekur në Qendrën e Transplantit në Spitalin Universitar “Nënë Tereza”.

Qëllimi i studimit është vlerësimi i variabilitetit ndërindividual i përqëndrimeve para-dozë të AMF duke marrë parasysh dritaren terapeutike të barit.

6. Përcaktimi i acidit mykofenolik në plazmën e njeriut

6.1 Materialet e punës

Për përgatitjen e mostrave u përdorën mikropipeta dhe balona qelqi të taruar 10 dhe 50 mL. Lënda aktive acid mykofenolik AMF (6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-phtalanyl) -4- methyl-4-hexenoic acid) u dhurua nga zyra e përfaqësisë Novartis (Tiranë, Shqipëri). Lënda aktive naproksen e përdorur si standard i brendshëm u dhurua nga Agjencia Kombëtare e Barnave. Reagentët e përdorur në eksperiment ishin: metanol; dihidrogenortofosfat kaliumi (Sigma Aldrich, Germany); acid orto-fosforik 85% (Prolabo, Briare, France); acetonitril i gradës HPLC (Merck, Darmstadt, Germany). Për filtrimin e ujit dhe të fazës së lëvizshme u përdorën filtra membranorë hidrofilikë Nylon (EMD Millipore) (47mm, 0.45µm madhësi poresh). Plazma, për provën e bardhë e siguruar nga Qendra e Grupit të Gjakut (Tiranë) ishte e ambalazhuar në flakone prej 130 ml.

Mostrat e gjakut u mblodhën gjatë procedurës së dhënies së gjakut për analizat mujore të pacientit në Qendrën e Transplantit. U përdorën shiringa 5 mL dhe kateterë intravenozë. Për mbajtjen dhe përpunimin e mostrave të gjakut u përdorën tuba gjaku (2 mL) nën trysni BD Vacucontainer (Becton Dickinson & Company, USA) me material PET dhe me antikoagulues K3EDTA (figura 6).

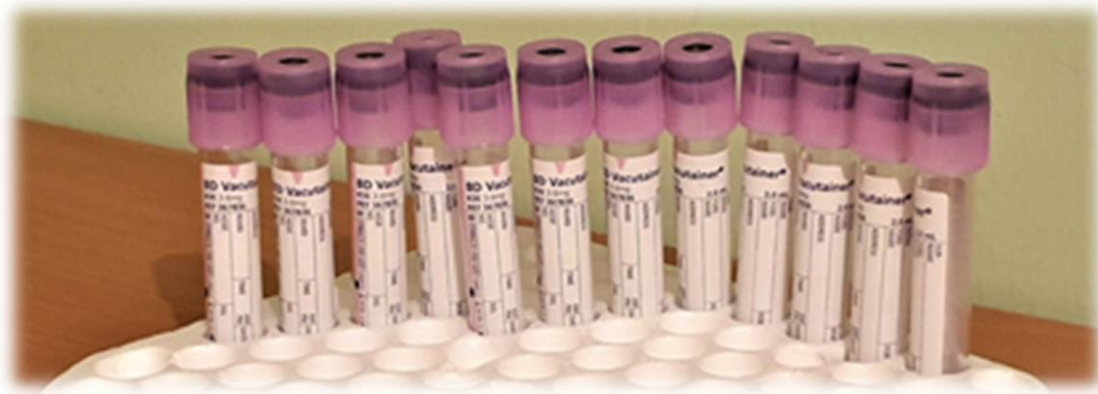


Figura 6. Tuba PET nën zbrazëti për mbledhjen e gjakut.

6.2 Pajisjet dhe instrumentat

Metoda analitike e përdorur ishte kromatografia e lëngët me performancë të lartë. Të dhënat u përfutuan duke përdorur sistemin kromatografik në fazë reverse Agilent 1200 i përbërë nga një pompë binare me përzierje në presion të lartë dhe i pajisur me një detektor UV-VIS DAD (Agilent 1200), i kontrolluar nga ChemStation i instaluar në PC. Matjet e pH u realizuan me ndihmën e një pH-metri tryeze (Denver Instruments), u përdorën gjithashtu centrifuga, përzierësi dhe banjo me ultratinguj (Ultrasonic bath).

Për filtrimin e fazës së lëvizshme, u përdorën filtra membranorë hidrofilik Nylon (EMD Millipore) (47 mm; 0.45 µm pore). Aparatet analitike paraqiten në tabelën 2.

Nr.	Emri i aparatit	Origjina
1	Centrifugë 55702	Bioblock Scientific, Illkirch, France
2	Peshore analitike	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
3	Aparati për përftimin e ujit Millipore	Direct Q-UV-Ultrapure® ëater system Millipore, France
4	Përzierësi	VELP Scientifica, Usmate, Italy
5	PH- metër tip DN2401	Denver Instruments
6	Banjo me ultratinguj Ultrasonic 1210	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
7	Pompë zbrazëtie	DryFast® EELCH, USA
8	Sistemi kromatografik	Agilent 1200, Agilent Technologies

Tabela 2. Lista e aparateve dhe origjina e tyre.

6.3 Tretësira mëmë, tretësirat e punës dhe kontrollet e cilësisë

Tretësira mëmë u përgatit duke tretur 50 mg acid mykofenolik në 50 mL metanol (1mg/mL). Tretja u bë në banjo me ultratinguj për 30 minuta. Tretësira u ruajt në 4-8°C. Duke u nisur nga tretësira mëmë u përgatitën një varg tretësirash ujore me përqëndrime 25, 50, 100, 200, 400, 600 µg/ml. Me anën e këtyre të fundit u bë spikimi i plazmës blank dhe u ndërtua lakorja e kalibrimit me përqëndrime nga 0.5 – 12 µg/mL. Nga lakorja e kalibrimit u zgjodhën tre përqëndrime (i ulët, i mesëm, i lartë), të cilat shërbyen si kontrolle cilësie (1, 5 dhe 12 µg/mL). Këto tretësira u përgatitën të freskëta për çdo analizë.

6.4 Tretësira e standartit të brendshëm

Tretësira e standartit të brendshëm u përgatit duke tretur 1 mg naproksen në 1 ml acetonitril (1mg/ml). Më pas, u morr me pipetë nga tretësira 1mg/mL naproksen një alikuote prej 5mL dhe u hollua me acetonitril në një ballon volumetrik 10 mL duke përfutur hollimin e dëshiruar 0.5 mg/mL naproksen. Plazma blank do të spikohet me 10 μ L nga kjo tretësirë.

6.5 Përgatitja e mostrës

Në 200 μ L plazëm u shtua 10 μ L nga tretësira e standartit të brendshëm. Më pas u shtua 400 μ L acetonitril (1:2) dhe u përzie për 30 sekonda në 25 Hertz. Përzierja u centrifugua me 10000 rpm për 10 minuta. Shtresa e sipërme u nda dhe 20 μ L e lëngut që qëndronte sipër (supernatanti) u injektua në sistemin kromatografik.

6.6 Proçedurat e përgatitjes së fazës së lëvizshme

Faza e lëvizshme është e përbërë nga dy komponentë acetonitril (ACN) dhe bufer fosfat kaliumi 0.01 M në raportin 45:55 (v/v). Tretësi buferik fosfat kaliumi 0.01 M, u filtrua nëpërmjet filtrave membranorë Nylon me madhësi poresh 0.45 μ m, u degazua në banjo me ultratinguj dhe pH u rregullua në 2.5 me acid ortofosforik 85%. U vendos në një përzierës magnetik dhe më pas u mat pH me pH-metër (Denver instrument). pH-metri u standartizua para fillimit të punës me tretësirë standarte me pH=4 dhe tretësirë standarte me pH=7. Tretësi ujqor u përgatit i ri çdo ditë pune në pH-in përkatës.

6.7 Kushtet kromatografike optimale

Kushtet kromatografike optimale të arritura për metodën konsistojnë në përdorimin e sistemit kromatografik RP HPLC, me detektor UV-VIS DAD i cili u vendos në gjatësi vale 215 nm. Kolona e përdorur është 250 Lichrosphere select B ® C18 (12.5 cm $\times$ 4 mm i.d. madhësi grimcash size 5 μ m). Faza e lëvizshme u përfutua nga përzierja e tretësit organik me tretësin ujqor përkatësisht: Acetonitril/Bufer fosfat kaliumi (i rregulluar në pH 2.5 me acid ortofosforik) (45: 55 v/v), dhe rrjedhja nëpër kolonë bëhet në presion të lartë me fluksin 1.0 ml/min. Vëllimi i injektimit në aparat ishte 20 μ L, dhe kohëzgjatja e analizës ishte 9 minuta.

6.8 Zhvillim dhe validimi i metodës bioanalitike

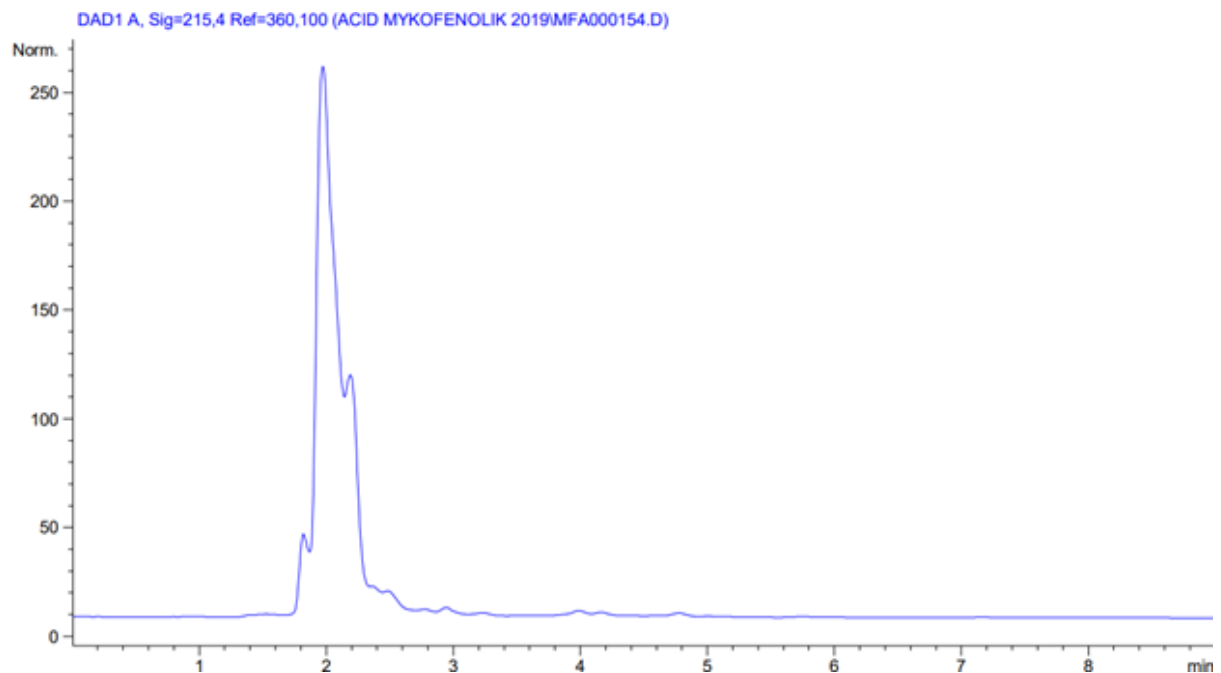
Për matjen e acidit mykofenolik në plazmë janë zhvilluar shumë metoda, shumica e të cilave bazohen në HPLC me detektim spektrofotometrik në intervalin 215 nm. Metoda u validua sipas parametrave të validimit të ICH të paraqitur në paragrafin dhe u siguroi që i plotësonte kushtet e linearitetit, saktësisë dhe përpikmërisë.

7. Rezultatet

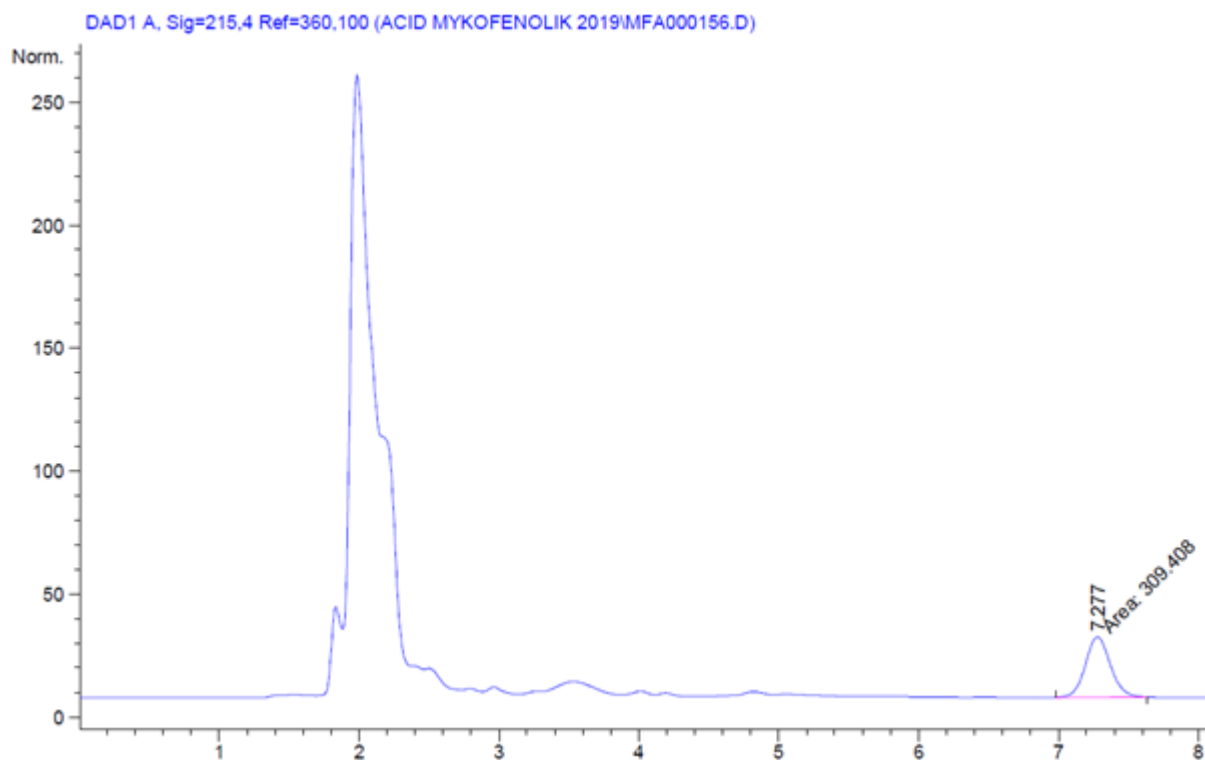
7.1 Rezultatet e validimit të metodës për përcaktimin e acidit mykofenolik në plazëm

7.1.1 Përzgjedhshmëria (selektiviteti)

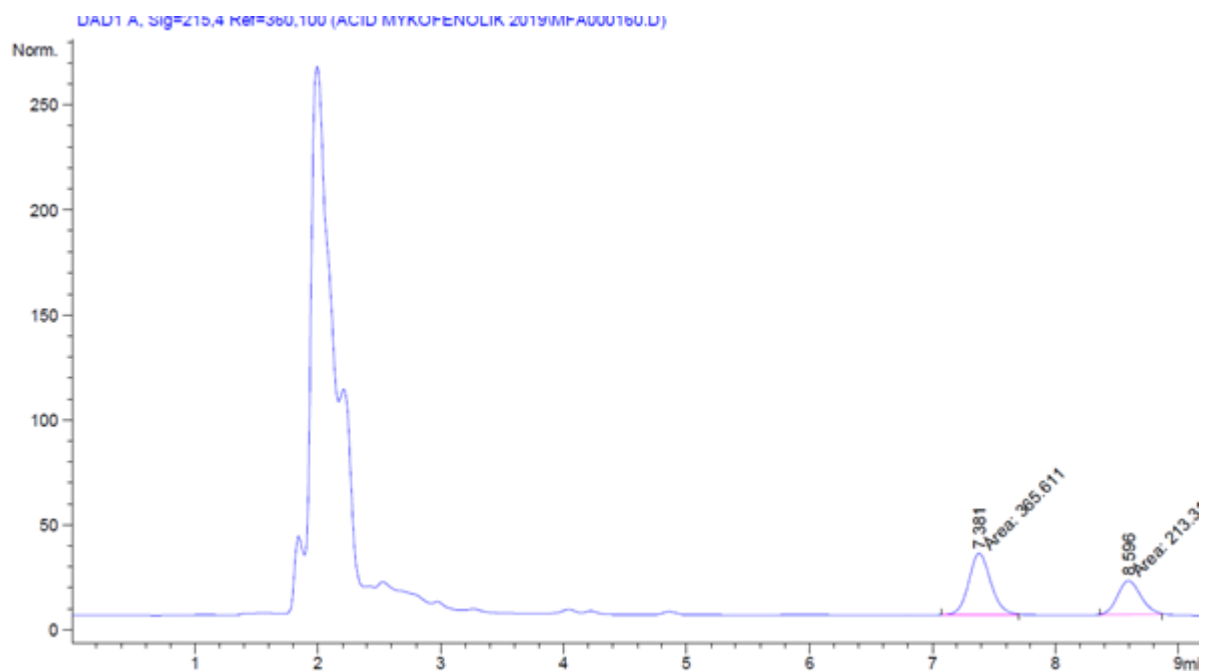
Selektiviteti i metodës demonstron nga mungesa e pikeve të tjerë në intervalin kohor të pritshëm për pikun e acidit mykofenolik (kohën e retnionit të acidit mykofenolik 7minuta). Mungesa e pikut në këtë interval është vërejtur në të gjithë plazmat blanke të përdorura. Në figurën 7 jepen kromatograma e marra nga plazma blank (figura 7a) dhe kromatogramat e plazmës të spikuara me acid mykofenolik dhe standart të brendshëm (figura 7b dhe 7c). Në këto kushte, koha e retnionit të analitit ishte 7 minuta. Koha e retnionit të standartit të brendshëm ishte 8 minuta. Metoda ka një kohë eluimi 9 minuta për mostrat plazmatike.



(7a) plazma blank



(7b) plazma blank të spikuar me 5 µg/mL acid mykofenolik



(7c) plazma blank të spikuar me 5 µg/mL acid mykofenolik dhe standart të brendshëm naproksen

Figura 7. Kromatogramat HPLC-UV të (a) plazmës blank; (b) plazmës blank të spikuar me 5 µg/mL acid mykofenolik; (c) plazmës blank të spikuar me 5 µg/mL acid mykofenolik dhe standart të brendshëm naproksen.

Nuk ka interferenca sinjifikative në plazmën blank me substancat endogjene në kohën e retensionit të analitit dhe të standartit të brendshëm.

7.1.2 Lineariteti

Në fazën e validimit të metodës lineariteti u përcaktua nga kurba e kalibrimit. Për ndërtimin e kurbës së kalibrimit u përdorën në ditë të ndryshme 6 mostra plazme të spikuara me sasi të njohura të acidit mykofenolik (0.5, 1, 2, 4, 8, 12 µg/mL) dhe standart të brendshëm përfshirë këtu dhe kufirin e poshtëm të përcaktimit si edhe plazmën blank. Kurba e kalibrimit u përfutua nga plotimi i raportit të lartësisë së pikut të acidit mykofenolik dhe standartit të brendshëm naproksen Mostrat u përgatitën dhe u injektuan vetëm një herë brenda ditës. Për diapazonin e AMF 0.5 – 12 µg/mL u përfutua kurba e kalibrimit me ekuacion $y = 0.172x + 0.0121$; $R^2 = 0.9988$, ku y është raporti i lartësive, x përqëndrimi i analitit dhe R koeficienti i korrelimit. Kurba e kalibrimit paraqitet në figurën 8.

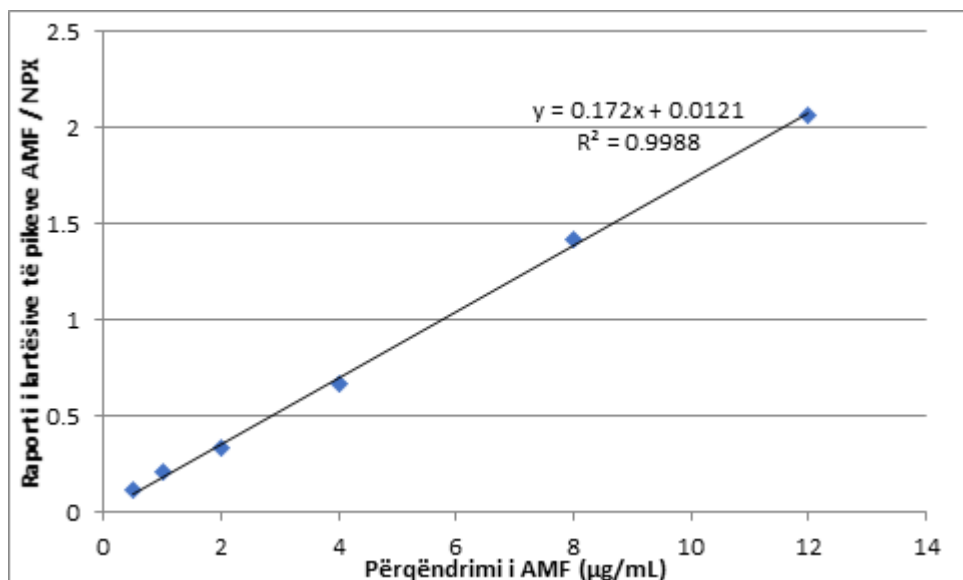


Figura 8. Kurba e kalibrimit për acidin mykofenolik në plazmën e njeriut.

7.1.3 Kufiri i përcaktimit (KP) dhe kufiri i zbulimit (KZ)

Ndjeshmëria e metodës të propozuar u vlerësua në termat e KP dhe KZ. Kufiri i përcaktimit dhe kufiri i zbulimit (detektimit) u përcaktuan veçmas në bazë të kurbës së kalibrimit. Deviacioni rezidual standard i vijës së regresionit ose deviacioni standard i y-intercepteve të vijave të regresionit u përdorën për të llogaritur KP dhe KZ. Këto të fundit u llogaritën sipas formulave vijuese:

$KZ = 3.3 \text{ SD/S}$ dhe $KP = 10 \text{ SD/S}$, ku SD është deviacioni rezidual standard i vijës të regresionit dhe S është pjerrësia e vijës. Kufiri i përcaktimit dhe kufiri i zbulimit në plazmë u gjetën përkatësisht 0.7 µg/mL dhe 2.1 µg/mL.

7.1.4 Precizioni dhe saktësia

Precizioni dhe saktësia e metodës brenda ditës u përfatuan duke analizuar gjashtë replikata të mostrave të kontrollit të cilësisë në një ditë të vetme. Precizioni dhe saktësia e metodës ndërmjet ditëve u përfatuan duke analizuar tre replikata të mostrave të kontrollit të cilësisë në tre ditë të ndryshme. Precizioni (përsëritshmëria) vlerësohet nëpërmjet koeficientit të variacionit (CV) të vlerave të matjeve, të vlerësuara nëpërmjet kurbës së kalibrimit dhe shprehet në përqindje. Precizionet brenda dhe ndërmjet ditëve u llogaritën sipas formulës:

$[\text{deviacion standard} / \text{përqëndrim mesatar}] \times 100\%$.

Saktësia shpreh shmangien e vlerës së vlerësuar nëpërmjet kurbës së kalibrimit nga vlera nominale dhe llogaritet në përqindje, mbi bazën e formulës:

$[(\text{përqëndrimi mesatar i matur} - \text{përqëndrimi nominal}) / \text{përqëndrimi nominal}] \times 100\%$.

Përqindja e gabimit relativ (RE%) e vlerës mesatare duhet të jetë brenda $\pm 15\%$ në çdo përqëndrim. Precizioni duhet të jetë më pak se 15% në çdo përqëndrim. Siç tregohet në tabelën 3 vlerat e saktësisë dhe precizionit brenda dhe ndërmjet ditëve për plazmën ishin brenda kriterëve të pranimit.

Përqëndrimi ($\mu\text{g/mL}$)	Brënda ditës (n=6)			Ndërmjet ditëve (n=21)		
	Përqëndrimi i gjetur ($\mu\text{g/mL}$)			Përqëndrimi i gjetur (ng/mL)		
	Mesatare $\pm$ DS	Precizion (CV, %)	Saktësia (RE, %)	Mesatare $\pm$ DS	Precizion (CV, %)	Saktësia (RE %)
1	1 ± 0.04	4.3	4.5	0.9 ± 0.1	12.1	12.1
5	5.1 ± 0.1	1.5	1.5	5.2 ± 0.3	5.7	4.7
10	10 ± 0.4	4.2	3.7	9.9 ± 4.6	4.6	4.1

Tabela 3. Precizioni dhe saktësia brenda dhe ndërmjet ditëve për acidin mykofenolik në plazmën e njeriut

7.1.5 Rikuperimi

Përcaktimi i rikuperimit të analitit me interes për të tre mostrat e KC bëhet duke llogaritur raportin e pikut të substancës të injektuar pas ekstraktimit me pikun e substancës të përfutur nga injektimi i tretësirës ujore.

Rikuperimi u vlerësua nga raporti i matur i mostrave të kontrollit të cilësisë përkatësisht me përqëndrim të ulët KC 1 µg/ml, të mesëm KC 5 µg/ml dhe të lartë KC 10 µg/ml, të matur tre herë në tretësirë ujore për secilën nga përqëndrime e mësipërme. Rikuperimi varjon nga 90% në 93%. Të dhënat paraqiten në tabelën 4.

Përqëndrimi µg/ml	Rikuperimi (%)	Mesatare (%)
1	86	91
	92	
	87	
5	110	90
	87	
	76	
10	88	93
	96	
	96	

Tabela 4. Rikuperimi i AMF me metodën e propozuar AMF (n=3)

7.1.6 Qëndrueshmëria e acidit mykofenolik në tretësirë ujore dhe plazmë

Provat e qëndrueshmërisë të analitëve janë projektuar për të mbuluar kushtet e pritshme në lidhje me trajtimin e mostrave klinike. Qëndrueshmëria e acidit mykofenolik u hetua në mostrat plazmatike të përpunuara dhe të papërpunuara.

Acidi mykofenolik në mostrat e përpunuara (5 dhe 10 µg/mL) u gjet e qëndrueshme për 24 orë në temperaturën e dhomës dhe 48 orë në -20°C. Acidi mykofenolik në mostrat e papërpunuara të plazmës ishte i qëndrueshëm për të paktën 24 orë në temperaturën e dhomës, 30 ditë në -20 °C, ose pas tre ciklesh ngrirje dhe shkrirje. Acidi mykofenolik në tretësirat mëmë (1mg/mL dhe 25µg/mL në ujë të gradës HPLC) u gjet i qëndrueshme për 48 orë në temperaturën e dhomës dhe të paktën 4 javë në 2 ° - 8 °C. Mostrat

konsiderohen të qëndrueshme, nëse vlerat janë brenda kufijve të pranueshëm të saktësisë ($\leq 15\%$ RE) dhe precizionit ($\leq 15\%$ CV).

7.1.7 Stabiliteti i metodës

Stabiliteti i metodës tregon aftësinë e metodës për të mbetur e paprekur nga ndryshimet e vogla të kushteve eksperimentale. Ndryshime të vogla të fazës lëvizëse në pH (me ± 0.2 njësi) nuk paraqesin efekt të rëndësishëm në rezolucionin kromatografik.

8. Monitorimi terapeutik i acidit mykofenolik tek pacientët me transplant renal

8.1 Aspekte etike

8.1.1 Komiteti i Etikës

Përpara fillimit të studimit Komitetit të Etikës iu paraqitën për rishikim dhe miratim protokollit i studimit, fleta informuese lidhur me studimin dhe formulari i lejes së pjesmarrjes në studim. Studimi filloi vetëm pas marrjes së miratimit nga ana e Komitetit të Etikës.

8.1.2 Udhëzuesit dhe dokumentat bazë

Ky studim u krye në përputhje me Udhëzuesin “Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95)” e publikuar nga EMA më Qershor të 1995, “Guideline for good clinical practice E6(R1)” të 10 Qershorit, 1996, me “Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation” një raport i publikuar në Clinical Journal of American Society of Nephrology, 2010 dhe me legjislacionin shqiptar në fuqi.

8.1.3 Informimi për lejen me shkrim të pjesmarrësit

Studimi u krye në pacientë të transplantuar me veshkë të cilët u paraqitën gjatë konsultës mujore tek Qendra e Transplantit. Pacientët gjatë kësaj vizite kryejnë analizat biokimike dhe gjak komplet. Pacientët u informuan mbi, natyrën, rëndësinë dhe shkallën e përfshirjes së tyre në studim. U shpjeguan metodat e aplikuara, mënyra e marrjes së gjakut si dhe rregullat dhe kufizimet të cilave do ti nënshtrohet pacienti gjatë studimit. Subjektet duhet të jenë plotësisht të aftë që të kuptojnë pasojat dhe implikimet që rrjedhin nga vendimi i tyre. Përpara fillimit të punës kërkimore të gjithë subjektet nënshkruan me vullnetin e tyre të lirë një dokument (consent form) si vërtetim i lejes së tyre për të marrë pjesë në studim.

8.2 Plani i punës kërkimore

8.2.1 Përzgjedhja e popullatës

Në studim janë përfshirë pacientë që kanë kryer transplant të veshkës dhe që ndiqen në mënyrë periodike në Qendrën Kombëtare të Transplantit pranë Qendrës Spitalore Universitare “Nënë Tereza”, Tiranë. Pacientet janë rekrutuar në studim gjatë vizitës së tyre pranë Qendrës së Transplantit. Kriteret e përzgjedhjes së pacientëve në studim ishin:

- Pacient me transplant të veshkës

- Mosha e pacientit mbi 18 vjeç
- Gjëndja shëndetësore e mirë
- Trajtim me mykofenolat mofetil (Cellcept®) ose mykofenolat natriumi (Myfortic®)
- Ndjekja mjekësore realizohet në mënyrë periodike pranë Qendrës së Transplantit
- Pacienti është i disponueshëm
- Pacienti ka dëshirë të marrë pjesë në studim

Në studim u përfshinë 21 pacientë që u paraqitën në Qëndren Kombëtare të Transplantit gjatë vitit 2018 -2019.

8.2.2 Mbledhja e të dhënave

Për të gjithë pacientët të dhënat shënohen në kartelat klinike të ndjekjes ambulatorie. U mbledhën këto të dhëna për secilin pacient:

- Të dhëna të përgjithshme, emër mbiemër, mosha, gjinia, koha nga transplantit.
- Trajtimi terapeutik, doza ditore e MMF ose EC-MPS. Lista e barnave të tjera që administrohen njëkohësisht me mykofenolatit.
- Të dhëna të analizave biokimike të realizuara ditën kur është marrë kampioni për përcaktimin e nivelit para-dozë të mykofenolatit.
- Të dhëna të analizave të gjakut të realizuara ditën kur është marrë kampioni për përcaktimin e nivelit para-dozë të mykofenolatit

8.2.3 Karakteristikat e pacientëve në studim

Një numër i përgjithshëm prej 21 pacientësh ju nënshtuan studimit pas miratimit të protokollit të studimit nga Komiteti Kombëtar i Etikës. Pacientët u përzgjedhën në mënyrë rastësore (12 meshkuj dhe 9 femra). Mosha mesatare është 29.6 vjeç. Të dhënat e tyre paraqiten në tabelën 5.

NR.	INICIALE	MOSHA (VJEC)	GJINIA	KOHA TX.
1	O. S.	36	M	18 MUAJ
2	A. M.	20	F	1 VIT
3	F. SH.	32	F	9 VJET
4	M. S.	32	M	9 VJET

5	A. H.	27	F	2 VJET
6	I. P.	51	M	6 VJET
7	S. N.	35	F	3 MUAJ
8	M. S.	19	M	2 MUAJ
9	E. B.	25	F	3 MUAJ
10	E. A.	26	M	6 MUAJ
11	S. SH.	33	F	9 VJET
12	Z. XH.	31	F	N/D
13	E. M.	29	F	10 MUAJ
14	A. C.	36	M	18 MUAJ
15	A. M.	32	M	8 VITE
16	Xh. S.	18	F	18 MUAJ
17	R. B.	20	M	1 VIT
18	A. SH.	30	M	N/D
19	A. H.	26	M	10 MUAJ
20	G. H.	31	M	5 VJET
21	A. B.	33	M	4 VJET

Tabela 5. Të dhëna të përgjithshme të pacientëve

8.2.4 Trajtimi i plotë terapeutik

Të gjithë pacientët e transplantuar ishin nën mjekim me triple terapi: inhibitor të calcineurinës [tackrolimus ose ciklosporinë], bllokues të sintezës purine [MMF ose EC-MPS] dhe kortikoterapi. Pothuaj të gjithë pacientët trajtohen me kortikoterapi si plotësues të terapisë imunosupresive. Gjithashtu, disa prej tyre të cilët vuajnë edhe nga patologji të tjera bashkëshoqëruese marrin terapinë përkatëse. Tabela 6 paraqet trajtimin terapeutik, doza ditore e mykofenolat mofetil ose mykofenolat natriumit si dhe barnat e tjera të administruara njëkohësisht.

NR.	Inicia le	MMF mg/d	EC- MPS mg/d	TAKRO LIMUS mg/d	Everoli mus mg/d	Ciklosp orin mg/d	PREDNI ZON mg/d	TE TJERA
1	O. S.		720	6			5	
2	A. M.		1440	4			5	
3	F. SH.		720		1.5		5	ATENOLOL, AMLODIPIN, RANITIDIN, HEKUR, ACID FOLIC
4	M. S	1000				150	5	
5	A. H.		720	2			5	
6	I.P.		1440	3			5	
7	S.N.		1440	9			5	CATAPRESAN , PHYSIOTENS, NEXIUM, VALCYTE, FLUCONAZOL

8	M. SE.		1440	4			5	NEXIUM
9	E. B.		1080	8			5	
10	E. A.		720	3			5	
11	S.SH.	1500		1			5	
12	Z. XH.		1440	2			5	
13	E. M.		1440	4			5	
14	A.C.		720	4			5	
15	A. M.		1080	4			5	
16	XH. S.		720	6			5	
17	R. B.		720	16			5	
18	A. SH.		720	3			5	
19	A. H.	2000		6			5	
20	G. H.	4000		3			5	
21	A. B	1000		2			5	

Tabela 6. Trajtimi i plotë terapeutik

8.2.5 Të dhëna nga ekzaminimet laboratorike

Vlerësimi i parametrave klinike dhe biokimike të pacientit bëhet në mënyrë periodike cdo 1, 3, 6 muaj dhe 1 vit pas transplantit. Gjatë këtyre ekzaminimeve vlerësohet gjendja e përgjithshme e pacientit, funksioni i graftit, imunosupresorët e përdorur dhe prania e sëmundjeve bashkëshoqeruese. Ekzaminimet laboratorike përfshijnë: gjak komplet, funksioni renal (kl-kreatininemise, proteinuria 24h)- azot+kreat, proteinat totale, albuminemia, urine komplet, urokulturë, kolesterol, HDL, LDL, trigliceridet, monitorimi i CsA/Takrolimus.

8.2.6 Shpërndarja e subjekteve (randomizimi)

Subjektet që morën pjesë në studim i bashkëngjitet një numër rendor progresiv, duke filluar nga numri 1. Ky numër, ID, është plotësisht i pavarur nga ndonjë karakteristikë tjetër e subjektit apo nga dëshira e tij.

8.2.7 Komplanca e trajtimit

Komplanca e pacientit u siguroa pas pohimit të tij për marrjen e dozës së fundit të mykofenolatit 12 orë para marrjes së mostrës për analizë. Pacienti ishte esëll edhe për arsyen se do jepte gjak për të kryer analizat laboratorike të radhës dhe kampionet u mbledhën në orët e para të mëngjesit.

8.2.8 Koha e marrjes së mostrës

Përcaktimi i përqëndrimit para-dozë u zgjodh si koha për të kryer monitorimin terapeutik. Koha para-dozë përcaktohet si e përshtatshme në udhëzime mbi monitorimin e imunosupresorëve. Përqëndrimi para-dozë është përqëndrimi me i ulët i barit në plazmë në një gjendje të qëndrueshme. Duke zgjedhur vetëm një pikë kohore shmanget shpimi disa herë i pacientit. Gjithashtu, zgjedhja e kohës së dhënies së gjakut për analiza laboratorike është optimale për arsye se nuk kërkon shpim domosdoshmërisht për të kryer monitorimin e mykofenolatit.

8.2.9 Mbledhja e mostrës

Të gjithë pacientëve iu mor nga 5 ml gjak nga personeli shëndetësor i Qendrës së Transplantit. 2 ml u hodh në tubat BD Vacucontainer të vënë në dispozicion për këtë analizë.

8.2.10 Trajtimi i mostrës biologjike

Pas mbledhjes, mostrat e gjakut u centrifuguan në 6000 g për 10 minuta në temperaturë dhomë për të ndarë plazmën. Plazma u mbledh në gypa plastikë ku ishte shënuar paraprakisht data, ora dhe emri i vullnetarit. Plazma u ruajt në kushte frigoriferike në -20°C deri sa të analizohej. Gjatë transferimit të mostrave, u ndërmorën masa të përshtatshme për mirëmbajtjen e temperaturës dhe integritetin e mostrave.

Për analizimin e mostrës, 200 µL plazëm u transferuan në një gyp plastik, shtua 10 µL nga tretësira e standartit të brendshëm. Më pas u shtua 400 µL acetonitril (1:2) dhe u përzie për 30 sekonda në 25 Hertz. Përzierja u centrifugua me 10000 rpm për 10 minuta. Shtresa e sipërme u nda dhe 20 µL e lëngut që qëndronte sipër (supernatanti) u injektua në sistemin kromatografik.

8.2.11 Rezultatet *in vivo* të përcakimit të acidit mykofenolik në plazëm

Me qëllim përcaktimin e përqendrimit të acidit mykofenolik u ndërtua gjithashtu dhe kurba e kalibrimit.

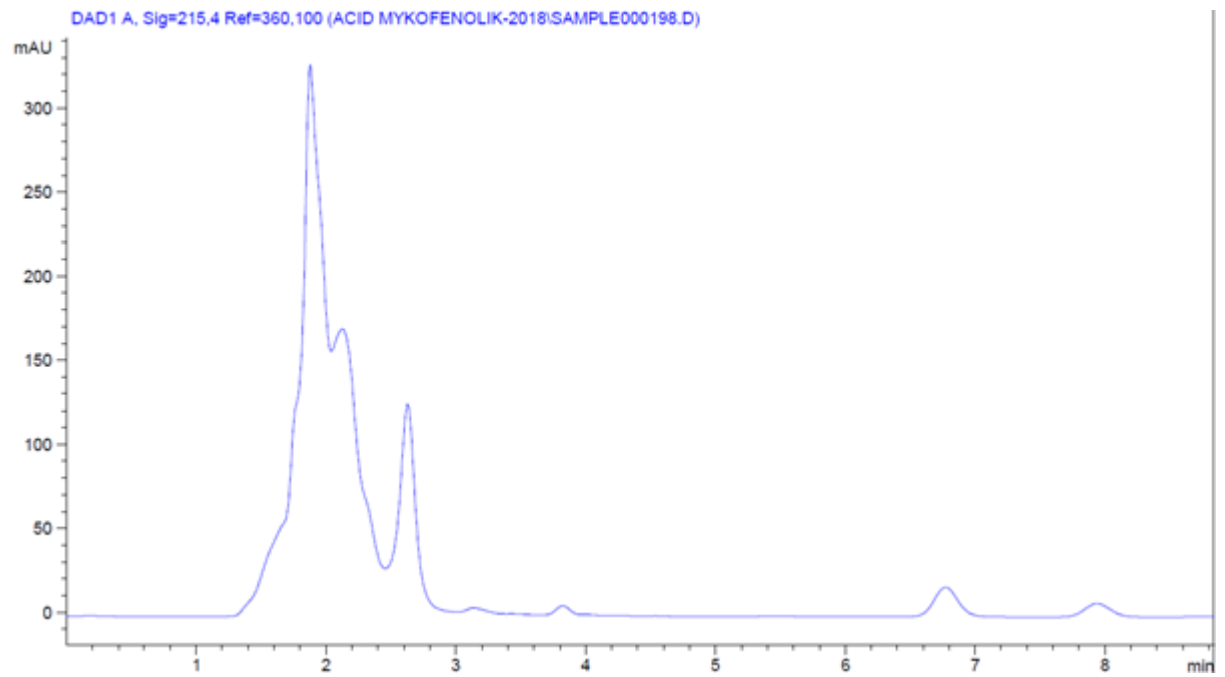
Të dhënat e përqendrimit të AMF paraqiten në tabelën 6.

NR.	INICIALET E PACIENTIT	MMF mg/d	EC-MPS mg/d	Co AMF (µg/ml)
1	O. S.		720	1.66
2	A. M.		1440	1.83
3	F. SH.		720	2.79
4	M. S	1000		1.20
5	A. H.		720	3.47
6	I.P.		1440	3.18
7	S.N.		1440	5.37
8	M. SE.		1440	3.53
9	E. B.		1080	0.46
10	E. A.		720	7.32
11	S.SH.	1500		3.43

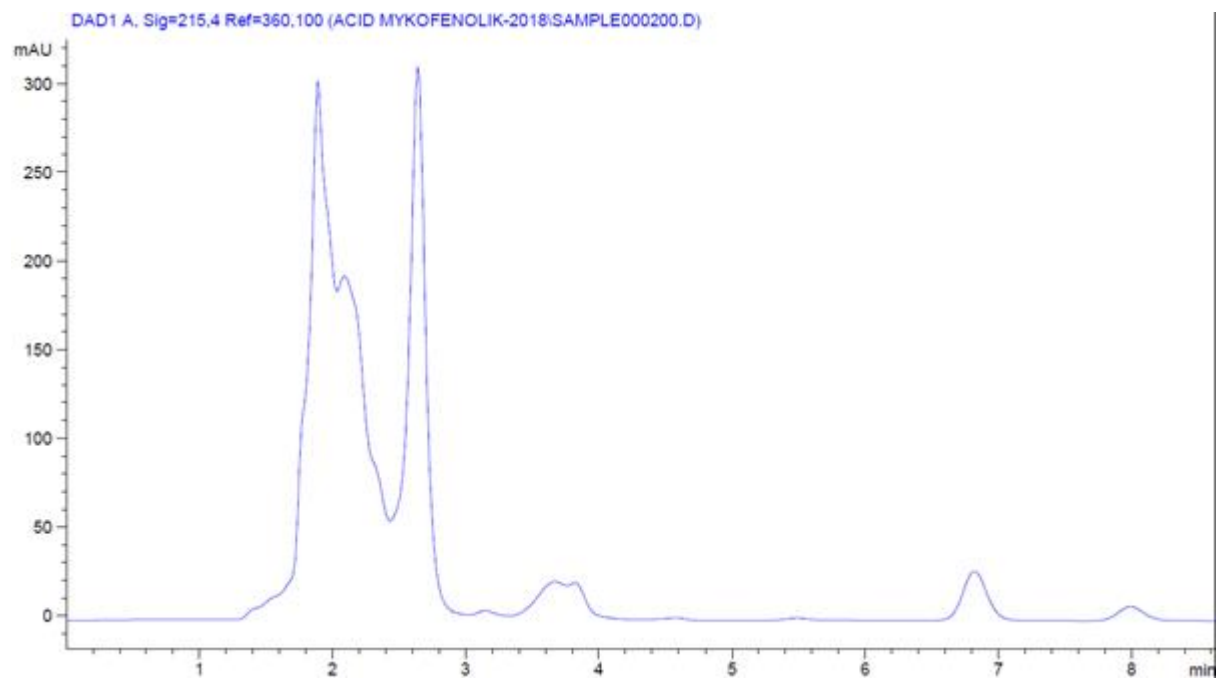
12	Z. XH.		1440	1.19
13	E. M.		1440	3.72
14	A.C.		720	13.83
15	A. M.		1080	16.59
16	XH. S.		720	3.94
17	R. B.		720	1.55
18	A. SH.		720	1.29
19	A. H.	2000		3.35
20	G. H.	4000		1.09
21	A. B	1000		4.13

Tabela 7. Përqëndrimi në plazëm i AMF tek pacientët e monitoruar

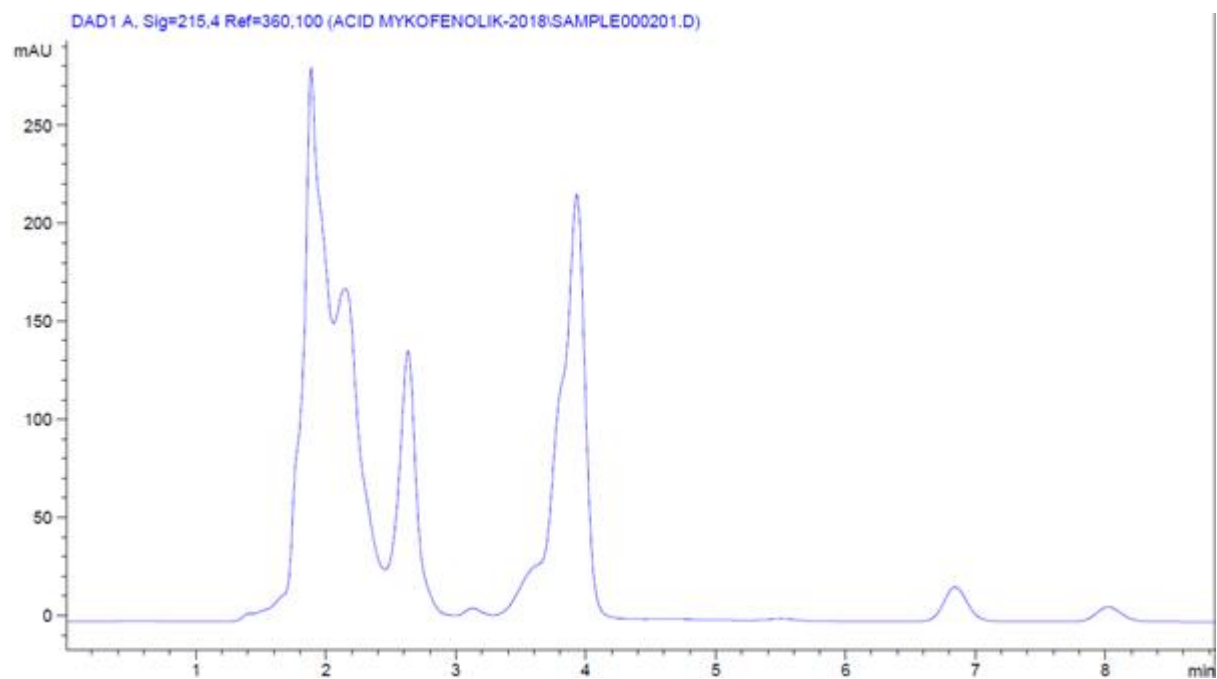
Kromatogramat përkatëse paraqiten në figurën 9.



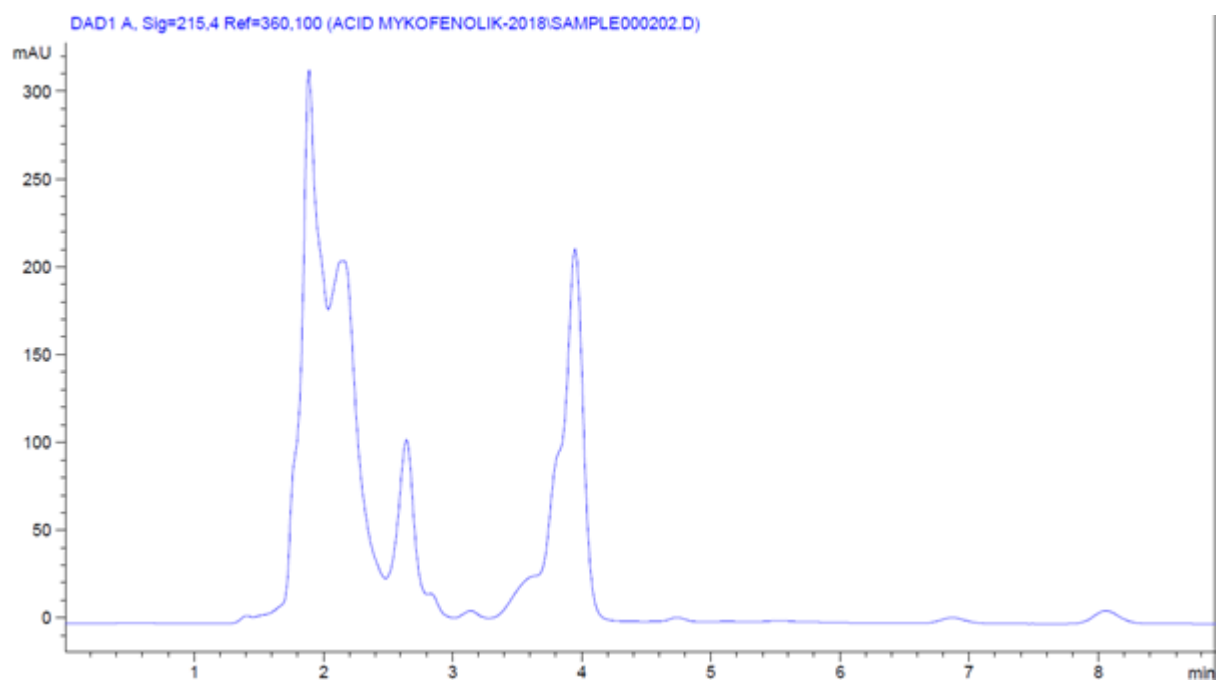
Pacienti nr. 5



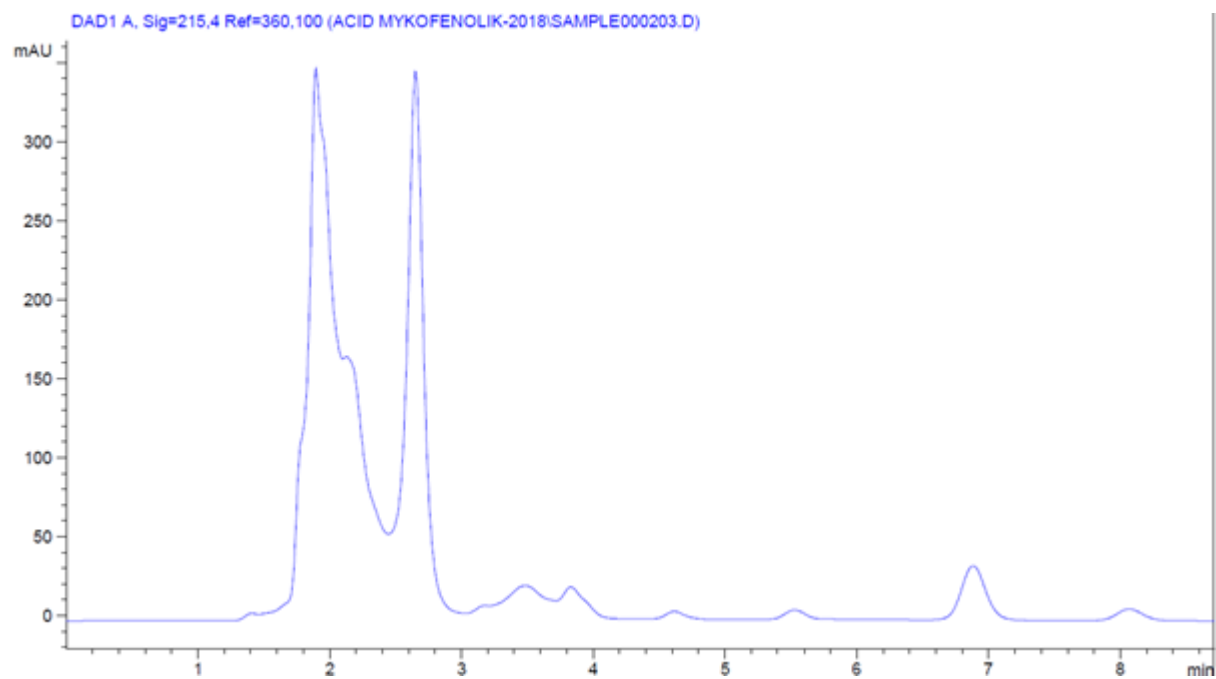
Pacienti nr. 7



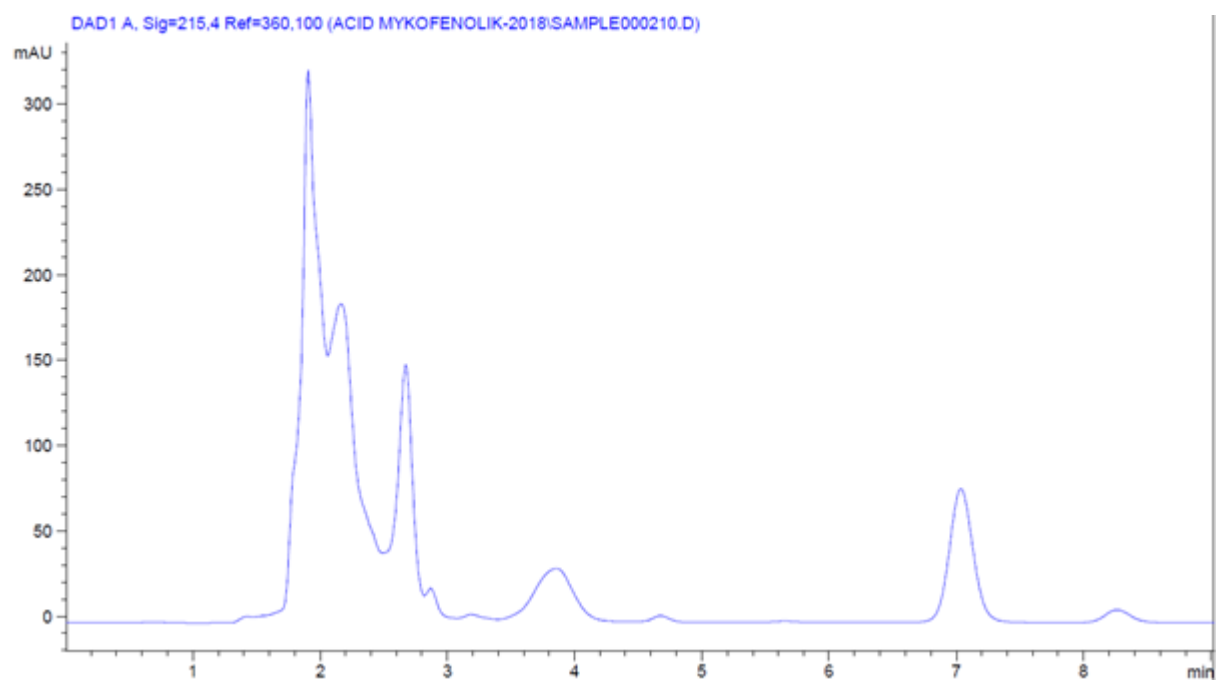
Pacienti nr. 8



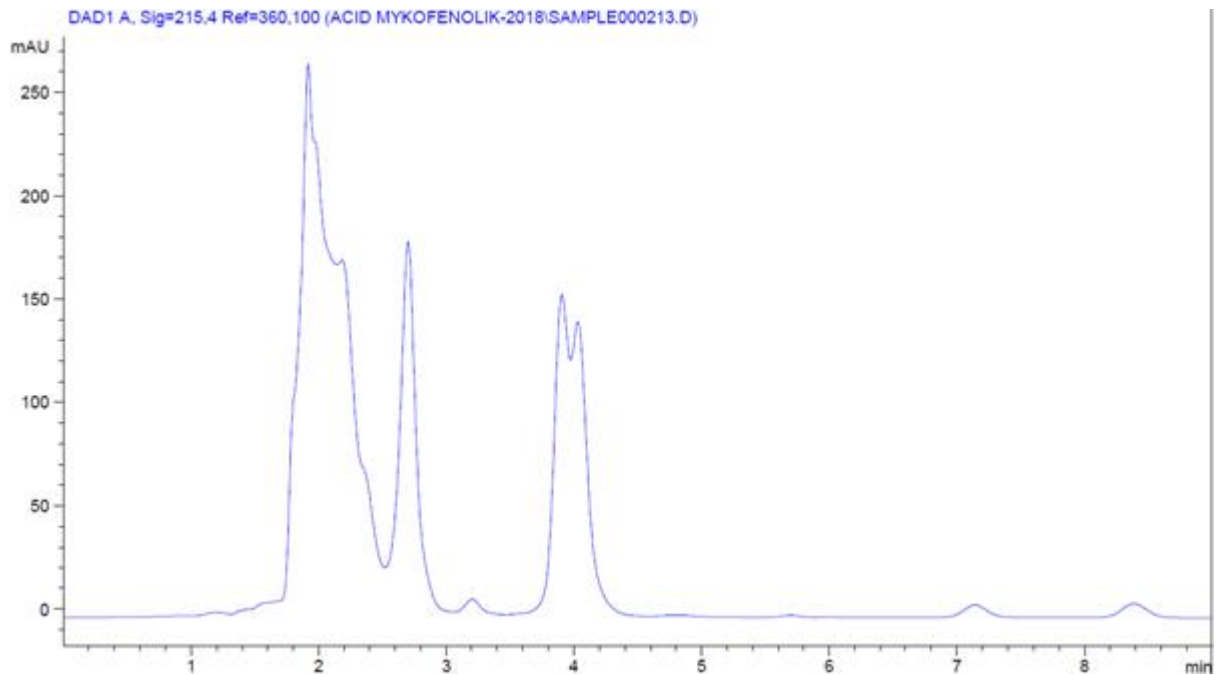
Pacienti nr. 9



Pacienti nr. 10



Pacienti nr. 15



Pacienti nr. 18

Figura 9. Kromatogramat e pacientëve të monitoruar

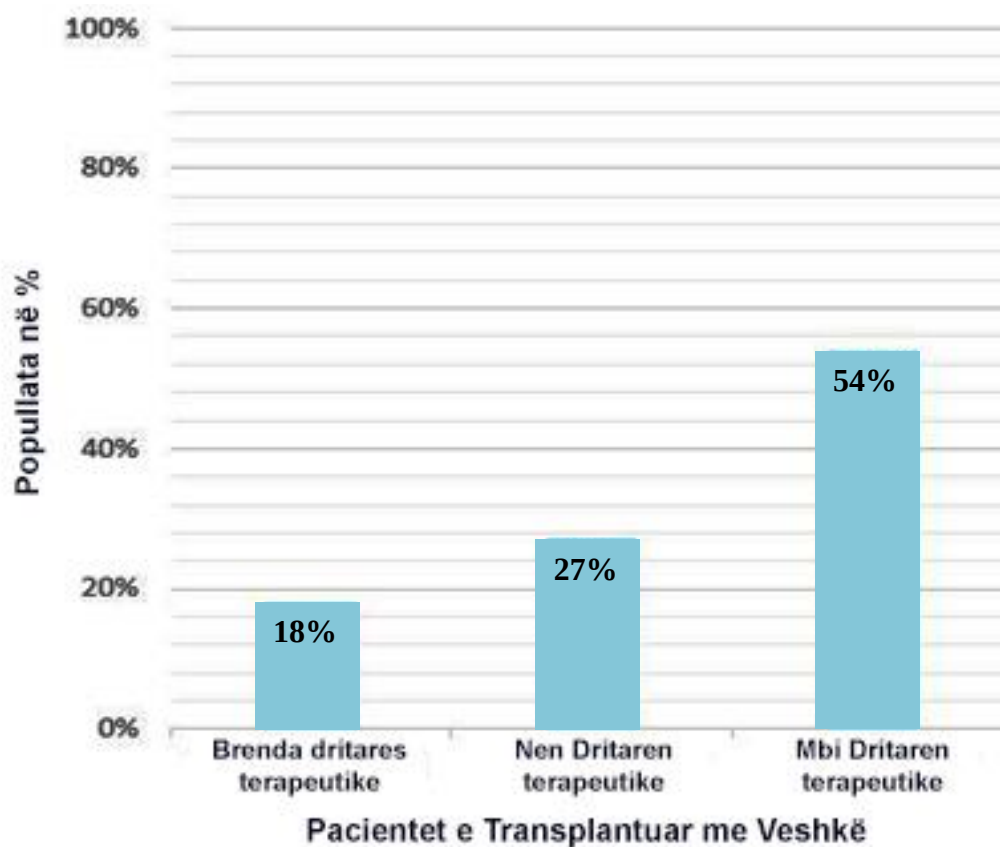
Përqëndrimet plazmatike të acidit mykofenolik variojnë nga 0.46 µg/ml në 16.59 µg/ml.

Studimi i randomizuar i përqëndrimit të kontrolluar (Randomized Concentration-Controlled Trial -RCCT) ishte baza e përcaktimit të AUC target midis 30 dhe 60 mg x h/L. Nga këto vlera u përcaktua dhe përqëndrimi target para-dozë për AMF të administruar me ciklosporinë $C_0 \geq 1.3$ mg/L dhe për AMF të administruar me takrolimus $C_0 \geq 1.9$ mg/L.

Gjithashtu, Borrows et al. përcaktoi dritaren terapeutike 1.5 - 3.0mg/ml për përqëndrimin para-dozë të AMF.

Nisur nga këto të dhëna si dhe nga përqëndrimet para-dozë të përcaktuara me metodën HPLC të përshkruar më sipër u vu re një variabilitet i konsiderueshëm i përqëndrimit para-dozë të AMF me 18% të pacientëve brenda dritares terapeutike, 27% të pacientëve nën kufirin e poshtëm të përqëndrimit para-dozë dhe 54 % mbi kufirin e sipërm të rrezikuar për të shfaqur shenja toksiciteti.

Grafiku 1 paraqet shpërndarjen e popullatës së marrë në studim në raport me dritaren terapeutik 1.5 – 3.0 µg/ml të acidit mykofenolik.



Grafiku 1. Shpërndarja e popullatës së marrë në studim në raport me dritaren terapeutike të acidit mykofenolik.

	Co AMF (µg/ml)	MMF mg/d	EC-MPS mg/d	Pacienti
Përqëndrim i lartë predozë AMF (57%)	16.59		1080	N15
	13.83		720	N14
	7.32		720	N10
	5.37		1440	N7
	4.13	1000		N21
	3.94		720	N16
	3.72		1440	N13
	3.53		1440	N8
	3.47		720	N5
	3.43	1500		N11
	3.35	2000		N19
	3.18		1440	N6
Përqëndrim në dritaren	2.79		720	N3
	1.83		1440	N2

terapeutike (19%)	1.66		720	N1
	1.55		720	N17
Përqëndrim i ulët AMF (24%)	1.29		720	N18
	1.2	1000		N4
	1.19		1440	N12
	1.09	4000		N20
	0.46		1080	N9

Tabela 8. Përqëndrimi në plazëm i AMF tek pacientët e monitoruar bazuar në dritaren terapeutike 1.6 µg/ml – 3 µg/ml (renditur nga përqëndrimi më i lartë tek ai më i ulët).

Forma e Mykofenolatit	Doza ditore	Përqëndrim predozë	Pacienti
MMF	4000	1.09	N20
	1000	1.2	N4
	2000	3.35	N19
	1500	3.43	N11
	1000	4.13	N21

Tabela 9. Përqëndrimi në plazëm i AMF tek pacientët e monitoruar trajtuar me MMF

Forma e Mykofenolatit	Doza ditore	Përqëndrim predozë	Pacienti
EC-MPS	1080	0.46	N9
	1440	1.19	N12
	720	1.29	N18
	720	1.55	N17
	720	1.66	N1
	1440	1.83	N2
	720	2.79	N3
	1440	3.18	N6
	720	3.47	N5
	1440	3.53	N8
	1440	3.72	N13

720	3.94	N16
1440	5.37	N7
720	7.32	N10
720	13.83	N14
1080	16.59	N15

Tabela 10. Përqëndrimi në plazëm i AMF tek pacientët e monitoruar trajtuar me EC-MPS

Co AMF (µg/ml)	MMF mg/d	EC-MPS mg/d	Pacienti	Koha nga transplantimi
3.53		1440	N8	2 Muaj
0.46		1080	N9	3 Muaj
3.35	2000		N19	3 Muaj
5.37		1440	N7	3 Muaj
7.32		720	N10	6 Muaj
3.72		1440	N13	10 Muaj
1.83		1440	N2	12 Muaj

Tabela 11. Përqëndrimi në plazëm i AMF tek pacientët të transplantuar nga 0 – 12 muaj nga koha e marrjes së mostrës.

9. Analiza statistikore

Me qëllim evidentimin e lidhjes midis përqëndrimit të AMF dhe dozës së Cellcept® dhe Myfortic®, moshës së pacientit, gjinisë, kohës pas transplantit dhe administrimit të takrolimusit u krye analiza statistikore. Nuk u gjet asnjë lidhje e rëndësishme me asnjërën nga kombinimet. Përmes teknikës së regresionit linear përsëri nuk u gjet asnjë lidhje e rëndësishme midis variablave. Të dhënat e analizës statistikore paraqiten në tabelën 12.

Variablet	Përqendrim AMF		
	Koef i korrelacionit	Vlera <i>p</i>	N

Cellcept	-.224	.670	6
Myfortic	-.123	.649	16
MOSHA	.176	.446	21
GJINIA	-.247	.281	21
KOHA	.102	.679	19
TAKROLIMUS	-.135	.582	19

Tabela 12. Të dhënat e analizës statistikore

10. Diskutime

Për barnat imunosupresive si ciklosporina, takrolimusi dhe sirolimusi praktikohet gjerësisht monitorimi terapeutik duke matur përqëndrimin para-dozë të barit. Pavarësisht të dhënave se matja e AUC është më e saktë, ka disa faktorë që kufizojnë aplikimin e matjeve të AUC si kostoja e analizimit të disa mostrave dhe logjistika përse i përkët mbledhjes së mostrave. Si rezultat i interesit të gjërë përse i përkët aplikimit të matjeve të AUC-së për monitorimin e ciklosporinës dhe takrolimusi, u ndoq e njëjta logjikë për të mbledhur të dhëna gjatë fazave të hershme të studimeve të efikasitetit të MMF. Duke u nisur nga këto të dhëna, një sërë studimesh u zhvilluan me qëllim vlerësimin e dobisë së monitorimit terapeutik të MMF.

Studimi me përqëndrime të kontrolluara vlerësoi lidhjen midis AUC së AMF dhe efikasitetit (99). Në këtë studim morrën pjesë 154 pacientë marrës të transplantit të veshkës nga dhurues kadaverikë. Pacientët të cilët ishin në trajtim me ciklosporinë, dhe prednizon u ndanë në mënyrë rastësorë për të marrë MMF në doza të krijuara për të prodhuar një nga tre AUC të synuara. Gjatë 6 muajve pas transplantit AUC e AMF u mat nëntë here dhe doza e MMF u rregullua në mënyrë dyfish të verbër duke përdorur një sistem të koduar. Pacientët morën doza MMF të përshtatura për të arritur matjet AUC prej 16.1, 32. 2 ose 60.6 mg.h/L. MPA u mat duke përdorur një metodë analitike me HPLC. Qëllimi i këtij studimi ishte vlerësimi i incidencës së flakjes të provuar me biopsi brenda 6 muajve nga fillimi i studimit. Ky studim tregoi një lidhje të rëndësishme midis AUC së AMF dhe incidences së flakjes; në AUC të ulët, të ndërmjetëm dhe të lartë incidenca ishte 27.5%, 14.9% dhe 11.5%, respektivisht. Megjithatë, duhet theksuar se vlerat e synuara të AUC u tejkaluan në secilin grup. Në javën e 20-të, vlerat

mesatare për secilin grup ishin 27.6, 54.8 dhe 96.7 mg.h/L respektivisht. Gjithashtu duhet thënë se një numër i rëndësishëm pacientësh u tërhoq nga studimi për arsye se AUC e AMF u rrit me 7.8%, 23.4% dhe 44.2% për të tre grupet, respektivisht. Në studimin e sipërpërmendur për të vlerësuar AUC u zgjodhën pikat kohore: para-dozë, 20, 40, 75 dhe 120 min pas marrjes së dozës.

Në një studim me pacientë pediatrikë të transplantuar me veshkë, matjet e AUC nën 30mg.h/L shoqëroheshin me flakje të shpeshtë të graftit. Gjithashtu, flakja shfaqej më shpesh për përqëndrime para-dozë nën 1mg/L (60).

Variabiliteti farmakokinetik është një arsye e fortë për strategji të reja në individualizimin e terapisë me mykofenolat.

Të dhënat nga tre studime të cilat krahasojnë efikasitetin dhe kosto-efektivitetin përkatësisht FDCC (Fixed dose versus concentration-controlled), studimi Apogymre dhe OtpiCept kanë dhënë rezultate kontradiktore.

Monitorimi rutinë i AMF praktikohet në disa qendra të specializuara, kryesisht në Europë. Nuk praktikohet një monitorim rigoroz, por zakonisht një matje e vetme në rastet e flakjes ose infeksioneve serioze, para ndryshimeve madhore të terapisë si p.sh. ndërprerjes së kortikosteroideve ose tek pacientët me sëmundje specifike shoqëruese (p.sh. ileostomisë). Toleranca gastrointestinale, e cila shfaqet në rastet e përqëndrimeve të larta të AMF është gjithashtu një tregues praktik që tregon një dozë të lartë të MMF.

Shumica e mjekëve të cilët ndjekin të transplantuarit, adaptojnë dozën e MMF kur përqëndrimet e AMF në plazëm shoqërohen me të dhëna klinike (42). Kjo, edhe për faktin se monitorimi terapeutik është kryesisht i rëndësishëm për barna me indeks të ngushtë terapeutik dhe në këtë kontekst mykofenolati nuk hyn në këtë grup.

Studimi APOMYGRE (Adaption de Posologie du MMF en Greffe Renale) i zhvilluar në 11 qendra në Francë, randomizoi pacientët në doza fikse dhe terapi me përqëndrim të kontrolluar. Të gjithë pacientët merrnin terapi me basiliksimab, ciklosporinë dhe MMF. Bazuar në 6 matje për një AUC të shkurtuar, doza u adaptua për të arritur një AUC prej 40mg.h/L. Adaptimi i dozës u përllogarit me një program kompjuterik (i disponueshëm në <https://pharmaco.chu-limoges.fr>) i cili përdor analizën Bayesiane. Vdekja e pacientit, humbja e graftit flakja akute dhe ndërprerja e trajtimit me MMF janë faktorët që përcaktojnë dështimin e trajtimit. Grupi me përqëndrime të kontrolluara kishte me pak dështim të trajtimit (19/65 vs. 31/65 në pacientët me dozë fikse; $p = 0.03$) dhe me pak raste të flakjes akute (BPARs) (5/65 vs. 16/65; $p = 0.01$). Pacientët me përqëndrim të kontrolluar nuk shfaqën rritje të efekteve anësore me përjashtim të infeksioneve të herpesit. Përveç të tjerave ky model parashikon se nevojiten nivele më të larta në muajt e parë pas transplantit për të arritur përqëndrimet e synuara (99).

Platforma elektronike e përshkruar më sipër, mund të aksesohet me lehtësi dhe të përdoret nga klinikistët për të adaptuar dozën e AMF.

Një parametër tjetër i rëndësishëm për monitorimin e AMF është dhe matja e përqëndrimit të metabolitit kryesor të tij, MPAG, veçanërisht kur pacienti vuan nga pamjaftueshmëria e veshkave. Përshtatja dhe validimi i një metode HPLC që do të mund të masë përqëndrimin e AMF dhe MPAG ngelet një detyrë e re për laboratorin e farmakologjisë.

Aktualisht, nuk është arritur një konsensus përse i përkët përqëndrimeve plazmatike të AMF dhe shfaqjes së efekteve anësore. Në studimin me përqëndrime të kontrolluara të AMF nuk u evidentua një lidhje statistikore midis përqëndrimeve para dozë të AMF dhe shfaqjes së efekteve anësore. Por në këtë studim u vu re se doza e MMF lidhej në mënyrë të konsiderueshme me tërheqjen e pacienteve nga studimi për shkak të shfaqjes së efekteve anësore. Matja e përqëndrimit të metabolitit AcMPAG të AMF do të mundësonte qartësimin e kësaj çështjeje.

Gjithashtu, duhet përmendur se veprimi enzimatik i IMPDH-së, inozinë monofosfat dehidrogjenazës paraqet ndryshime farmakodinamike në individë të ndryshëm të trajtuar me MMF (100). Së fundmi, është gjetur një lidhje e rëndësishme midis veprimit enzimatik të IMPDH-së para operacionit dhe rezultateve post-transplant (101). Pacientët me aktivitet të ulët të IMPDH-së paraqitën komplikime me terapinë me MMF. Ky studim evidentoi lidhjen midis aktivitetit të lartë të IMPDH-së para transplantit dhe shfaqjes së flakjes së organit. Variabiliteti ndërindividual i IMPDH-së mund të jetë i rëndësishëm për ndryshimet e efekteve terapeutike dhe efekteve anësore. Pacientët me aktivitet të lartë të IMPDH-së mund të kenë nevojë për përqëndrime të larta të AMF në mënyrë që të realizohet imunosupresioni i duhur, krahasuar me pacientët të cilët paraqesin aktivitet të ulët të IMPDH-së. Këta të fundit, mund të jenë të predispozuar ndaj shfaqjes së efekteve anësore, edhe kur nivelet e AMF janë të ulta.

Të dhënat e këtyre studimeve ishin pikënisja e studimit tonë i cili kishte si qëllim validimin e një metode me HPLC e cila do të mund të vihej në dispozicion të ekipit të mjekëve dhe teknikëve të laboratorit të cilët ndjekin pacientët e transplantuar në QSUT.

Deri më sot në Shqipëri nuk ishte realizuar asnjëherë një matje e përqëndrimeve të Cellcept® ose Myfortic® ndryshe nga Takrolimus i cili monitorohet në mënyrë të rregullt për çdo pacient të transplantuar.

Metoda e propozuar HPLC-UV e kombinuar me precipitimin e proteinave për matjen e përqëndrimit të AMF në plazmën e pacientëve të transplantuar me veshkë është e shpejtë dhe e përshtatshme për tu përdorur për analiza rutinë të AMF si dhe për studime farmakokinetike.

Nëpërmjet kësaj metode ne realizuam matjen e përqëndrimeve para-dozë të AMF në plazmën e 21 pacientëve të transplantuar me veshkë të cilët trajtoheshin me Cellcept® dhe Myfortic®. Përqëndrimet plazmatike të AMF variojnë nga 0.46 µg/ml në 16.59 µg/ml. Variabiliteti është i konsiderueshëm por duhet theksuar se edhe studime të tjera

të realizuara me metoda HPLC-UV të kombinuar me precipitim të proteinave paraqesin të dhëna të ngjashme me tonat.

Në një studim të realizuar nga Dzodic et al. (102) në Universitetin e Nis, ku u përfshinë 20 pacientë të transplantuar me veshkë të trajtuar me Cellcept® ose Myfortic® të dhënat e përqëndrimeve të AMF varionin nga 0.9 µg/ml në 12.32 µg/ml.

Interpretimi i këtyre përqëndrimeve është i vështirë. Janë disa faktorë të cilët luajnë rolin e tyre. Koha pas kryerjes së transplantit është e rëndësishme. Ditët e para pas transplantit deri në tre muaj pas tij, variabiliteti i përqëndrimeve të imunosupresorëve është tepër i madh. Gjithashtu, barnat e tjera imunosupresore të cilat merren në kombinim me Cellcept® ose Myfortic®. Patologjitë e ndryshme bashkëshoqëruese janë gjithashtu shumë të rëndësishme. Pacientë të cilët vuajnë nga pamjaftueshmëria e veshkës dhe paraqesin të dhëna të larta të kreatinemisë, janë të predispozuar të kenë nivele të ulta të AMF në plazëm.

Në mënyrë që të dhënat e matjes së përqëndrimeve plazmatike të AMF të jenë të vlefshme, ato nuk duhet të krahasohen vetëm me vlerat reference, por duhet të jenë nisma e një dialog midis kolegeve klinikistë të cilët kujdesen për ecurinë e të transplantuarve. Ne nuk dispononim të dhëna përse i përket shfaqjes së flakjes nga pacientët e përfshirë në këtë studim, por do të ishte shumë me interes që vlerësimi i flakjes të shoqërohej me monitorimin e përqëndrimit të AMF ashtu si takrolimus.

11. Përfundime

Metoda e propozuar HPLC-UV e kombinuar me precipitim të proteinave për matjen e përqëndrimit të AMF në plazmën e pacientëve të transplantuar me veshkë është e shpejtë dhe e përshtatshme për tu përdorur për analiza rutinë të AMF si dhe për studime farmakokinetike.

Ndryshimet intra dhe inter-individuale të farmakokinetikës së barit janë arsye për të rekomanduar monitorimin terapeutik të AMF. Megjithatë monitorimi terapeutik është një kosto e cila i shtohet një terapie të kushtueshme, organet e transplantuara janë burim i çmuar jete, për këtë arsye analizat laboratorike të cilat mund të parandalojnë humbjen e graftit apo efektet anësore të lidhura me barnat imunosupresore, janë shumë të domosdoshme.

12. Referencat

1. Bartman C.D., Doerfler D.L., Bird B.A., Remaley A.T., Peace J.N., Campell I.M. Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum* on Solid Media.
2. Gosio B. Sperimentate su culture pure di bacilli del carbapnchio dimostreranno notevole potere antisettica. G Accad Med Torino. 1983; 61:484.
3. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. Biochem J. 1969;113(3):515–524.
4. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. Transplant Proc. 1991; Apr 23(2 Suppl 2):19–25.
5. Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm AG, Kauffman RS. RS-61443—a phase I clinical trial and pilot rescue study. Transplantation. 1992;53(2):428–432.
6. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanism of action. Immunopharmacology 2000; 47(2-3):85-118.
7. Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. Ther. Drug Monit 1995; 17(6): 681-684.
8. Wang J, Yang JW, Zeevi A, Webber SA, Girnita DM, Selby R et al. IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. Clin Pharmacol Ther 2008; 83 (5): 711-717.
9. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. Am J Transplant. 2004;4(12):2045-2051.
10. Carr SF, Papp E, Wu JC, et al Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. J Biol Chem. 1993;268(36):27286-27290.
11. Cox VC, Ensom MH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? Ther Drug Monit. 2003;25(2):137-157.
12. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Lancet 1995;345(8961):1321-1325.
13. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation 1996; 61 (7):1029-1037.

14. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995;60(3):225-232.
15. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 1997;63(1):39-47.
16. Kaufman DB, Shapiro R, Lucey MR, et al Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant.*2004;4 Suppl 9:38-53.
17. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine* 2004;351(26):2715-2729.
18. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nature medicine* 2005;11(6):605-613.
19. Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to polyomavirus type BK. *The New England journal of medicine* 2000;342(18):1361-1363.
20. Kim HC, Hwang EA, Kang MJ, Han SY, Park SB, Park KK. BK virus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2004;36(7):2113-2115.
21. Prince O., Savic S., Dickenmann M., Steiger J., Bubendorf L., Mihatsch M. Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (2009) 24: 1024–1033.
22. Vidal. Cellcepte. Dictionnaire Vidal® 2008.
23. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics, and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996;36(4):315-324.
24. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem.* 1995;41(7):1011-1017.
25. Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T et al. Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology* 2007; 63(12):1161 -1169.
26. Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004;26(6):600-608.

27. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics, and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007;46(1):13-58.
28. Bowalgaha K, Miners JO. The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney, and jejunum microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52 (5): 605-609
29. Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005;33(1):139-146.
30. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998;34(6):429-455.
31. Levesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO, Caron P, Bernard O, Couture F et al. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(3):392-400.
32. Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, Niedmann PD, Wieland E, Haley J et al. Pharmacokinetics and protein 'adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2002;24(3):390-399.
33. Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, Schutz E, Niedmann PD, Armstrong VW et al. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin Biochem* 2000;33(2):107-113.
34. Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clinical chemistry* 1999;45(3):419-422.
35. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schutz E, Brenner-Weiss G et al. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *British journal of pharmacology* 1999;126(5):1075-1082.
36. Kagaya H, Inoue K, Miura M, et al Influence of UGT1A8 and UGT2B7 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63(3):279-288.
37. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006;82(8) :1074-1084.
38. Roche. Cellcept®. October 2005.

39. Le Guellec C, Bourgoïn H, Buehler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2004;43(4):253-266.
40. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England journal of medicine* 2007;357(25):2562-2575.
41. Johnson HJ, Swan SK, Heim-Duthoy KL, Nicholls AJ, Tsina I, Tarnowski T. The pharmacokinetics of a single oral dose of mycophenolate mofetil in patients with varying degrees of renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63(5):512-518.
42. van Gelder T. Mycophenolate mofetil: how to further improve using an already successful drug? *Am J Transplant.* 2005;5(2):199-200.
43. Shaw LM, Korecka M, Aradhye S, et al Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. *J Clin Pharmacol.* 2000;40(6):624-633.
44. Shaw LM, Mick R, Nowak I, et al Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients with delayed graft function. *J Clin Pharmacol.* 1998;38(3):268-275.
45. van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, et al Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(10):1083-1096.
46. van Hest R, van Gelder T, Bouw R, et al Time-dependent clearance of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;63(6):741-752.
47. Parker G, Bullingham R, Kamm B, Hale M. Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment. *J Clin Pharmacol* 1996;36(4):332-344.
48. van Hest RM, Mathot RA, Vulto AG, et al Mycophenolic acid in diabetic renal transplant recipients: pharmacokinetics and application of a limited sampling strategy. *Ther Drug Monit.* 2004;26(6):620-625.
49. van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, et al Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):871-880.
50. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, et al Long-term changes in mycophenolic acid exposure in combination with tacrolimus and corticosteroids are dose dependent and

not reflected by trough plasma concentration: a prospective study in 100 de novo renal allograft recipients. *J Clin Pharmacol.* 2003;43(8):866-880.

51. Neylan JF. Immunosuppressive therapy in high-risk transplant patients: dose-dependent efficacy of mycophenolate mofetil in African American renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation.* 1997;64(9):1277-1282.

52. Schweitzer EJ, Yoon S, Fink J, et al Mycophenolate mofetil reduces the risk of acute rejection less in African American than in Caucasian kidney recipients. *Transplantation.* 1998;65(2):242-248.

53. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leichtman AB, et al Effect of mycophenolate mofetil on long-term outcomes in African american renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(12):2366-2370.

54. Shaw LM, Korecka M, Aradhye S, et al Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. *J Clin Pharmacol.* 2000;40(6):624-633.

55. Shaw LM, Nawrocki A, Korecka M, et al Using established immunosuppressant therapy effectively: lessons from the measurement of mycophenolic acid plasma concentrations. *Ther Drug Monit.* 2004;26(4):347-351.

56. Chen H, Peng C, Yu Z, et al Pharmacokinetics of mycophenolic Acid and determination of area under the curve by abbreviated sampling strategy in chinese liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(2):175-185.

57. Le Guellec C, Bourgoïn H, Buchler M, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(4):253-266.

58. Staatz CE, Duffull SB, Kiberd B, et al Population pharmacokinetics of mycophenolic acid during the first week after renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61(7):507-516.

59. Pescovitz MD, Guasch A, Gaston R, et al Equivalent pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in African American and Caucasian male and female stable renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2003;3(12):1581-1586.

60. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the german study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(3):759-768.

61. van Hest RM, Mathot RA, Vulto AG, et al Within-patient variability of mycophenolic acid exposure: therapeutic drug monitoring from a clinical point of view. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):31-34.
62. Atcheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, et al Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther Drug Monit.* 2004;26(3):284-286.
63. van Gelder T, Shaw LM. The rationale for and limitations of therapeutic drug monitoring for mycophenolate mofetil in transplantation. *Transplantation.* 2005;80(2 Suppl): S244-253.
64. Morissette P, Albert C, Busque S, et al In vivo higher glucuronidation of mycophenolic acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit.* 2001;23(5):520-525.
65. Borrows R, Chusney G, James A, et al. Determinants of mycophenolic acid levels after renal transplantation. *Ther Drug Monit.* 2005;27(4):442-450.
66. Morii M, Ueno K, Ogawa A, et al. Impairment of mycophenolate mofetil absorption by iron ion. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):613-616.
67. Mudge DW, Atcheson B, Taylor PJ, et al The effect of oral iron administration on mycophenolate mofetil absorption in renal transplant recipients: a randomized, controlled trial. *Transplantation.* 2004;77(2):206-209.
68. Lidgate D, Brandl M, Holper M, et al Influence of ferrous sulfate on the solubility, partition coefficient, and stability of mycophenolic acid and the ester mycophenolate mofetil. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(10):1275-1283.
69. Pieper AK, Buhle F, Bauer S, et al The effect of sevelamer on the pharmacokinetics of cyclosporin A and mycophenolate mofetil after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(10):2630-2633.
70. Kuypers DR, Verleden G, Naesens M, et al Drug interaction between mycophenolate mofetil and rifampin: possible induction of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(1):81-88.
71. Hesselink DA, van Gelder T. Genetic and nongenetic determinants of between-patient variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(4):317-321.
72. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(8):775-778.

73. Girard H, Court MH, Bernard O, et al Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics*. 2004;14(8):501-515.
74. van Agteren M, van Schaik R, de Fijter H, et al Polymorphisms in the uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferases (UGT) gene explain part of the inter-individual variability in mycophenolate mofetil (MMF) pharmacokinetics. *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl 2):478.
75. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, et al The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(4):351-361.
76. Marquet P, Djebli N, Picard N, et al Influence of metabolic enzymes and efflux transporter polymorphisms on the plasma concentrations of MPA metabolites in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005;5(Suppl. 11):391.
77. van Agteren M, van Schaik R, de Fijter H, et al The impact of MRP2 gene polymorphism on mycophenolic acid exposure in renal transplant patients. *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl 2):478.
78. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, et al Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2006;82(8):1074-1084.
79. Carr SF, Papp E, Wu JC, et al Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem*. 1993;268(36):27286-27290.
80. Vannozzi F, Filipponi F, Di Paolo A, et al. An exploratory study on pharmacogenetics of inosinemonophosphate dehydrogenase II in peripheral mononuclear cells from liver-transplant recipients. *Transplant Proc*. 2004;36(9):2787-2790.
81. van Agteren M, van Gelder T. Incidence of acute rejection after kidney transplantation and the correlation with polymorphisms in the inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) gene. *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl 2):478.
82. Bazrafshani MR, Poulton KV, Qasim FJ, et al Genetic polymorphism of non-synonymous amino acid change of the IMPDH-1 gene in renal patients. *Human Immunology*. 2003;64(10): S70.
83. Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, et al IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J*. 2006:1-6.

84. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, et al Association of three polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation: an exploratory pharmacogenetic analysis of a randomized multicenter clinical trial (the caesar study). *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl 2):410-411.
85. Weber LT, Lamersdorf T, Shipkova M, et al Area under the plasma concentration-time curve for total, but not for free, mycophenolic acid increases in the stable phase after renal transplantation: a longitudinal study in pediatric patients. German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Ther Drug Monit*. 1999;21(5):498-506.
86. Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Squifflet JP, et al. Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit*. 2003;25(5):609-622.
87. Nicholls AJ. Opportunities for therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for mycophenolic acid and suppression of rejection. *Clin Biochem*. 1998;31(5):329-333.
88. Rousseau A, Marquet P. Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16(4):253-262.
89. Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit*. 2006;28(3):419-430.
90. Pawinski T, Hale M, Korecka M, et al Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult renal transplant patients treated with concomitant tacrolimus. *Clin Chem*. 2002;48(9):1497-1504.
91. van Gelder T, Meur YL, Shaw LM, et al Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit*. 2006;28(2):145-154.
92. Le Guellec C, Buchler M, Giraudeau B, et al Simultaneous estimation of cyclosporin and mycophenolic acid areas under the curve in stable renal transplant patients using a limited sampling strategy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002;57(11):805-811.
93. Premaud A, Le Meur Y, Debord J, et al Maximum a posteriori bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different postgrafting periods. *Ther Drug Monit*. 2005;27(3):354-361.

94. Marquet P. Clinical application of population pharmacokinetic methods developed for immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit.* 2005;27(6):727-732.
95. Gaston RS, Kaplan B, Shah T, et al Fixed- or controlled-dose mycophenolate mofetil with standard or reduced-dose calcineurin inhibitors: the Opticept trial. *Am J Transplant.* 2009;9(7):1607-1619.
96. van Gelder T, Silva HT, de Fijter JW, et al Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation.* 2008;86(8):1043-1051.
97. Le Meur Y, Buchler M, Thierry A, et al Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2496-2503.
98. van Gelder T, Hilbrands L, Vareterghem Y et al A randomized double-blind, multicenter plasma concentration-controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 1999 Jul 27;68(2):261-6.
99. Le Meur Y, Büchler M, Thierry A *et al.* Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2496– 2503
100. Budde K, Glander P, Bauer S, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1213.
101. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 2045.
102. Dzodic P, Radovanovic R, Smelcerovic A, et al. Validation of HPLC method for the determination of mycophenolic acid in human plasma obtained from renal transplant recipients. UDC: 615.07:616.61-089.843